(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2019-205432
(P2019-205432A)
(43)公開日　令和1年12月5日(2019.12.5)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA	4B064
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4B065
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28		4C084
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10		4C085
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4H045

審査請求 有　請求項の数 30　ＯＬ　（全 182 頁）　最終頁に続く

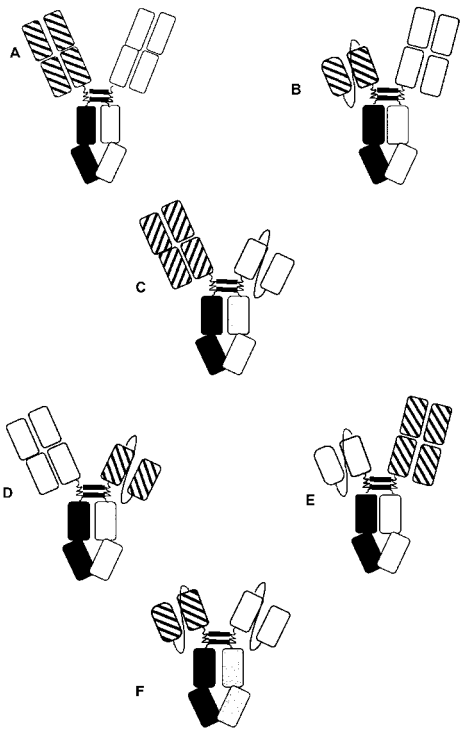
(21)出願番号　特願2019-105971 (P2019-105971)
(22)出願日　令和1年6月6日 (2019.6.6)
(62)分割の表示　特願2016-534706 (P2016-534706)の分割
原出願日　平成26年11月27日 (2014.11.27)
(31)優先権主張番号　61/910,026
(32)優先日　平成25年11月27日 (2013.11.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/000,908
(32)優先日　平成26年5月20日 (2014.5.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国 (US)

(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　ブイ６エイチ　３ブイ９　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　１３８５　スイート　５４０
(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】ＨＥＲ２を標的とする二重特異性抗原結合性コンストラクト

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ＨＥＲ２に特異的に結合する二重パラトピック抗原結合性コンストラクトを提供する。
【解決手段】二重パラトピック抗原結合性コンストラクトは、ＨＥＲ２のＥＣＤ２に結合する１つの抗原結合性部分、ＨＥＲ２のＥＣＤ４に結合する第２の抗原結合性部分、およびＦｃを含む。抗原結合性部分の少なくとも１つはｓｃＦｖである。二重パラトピック抗原結合性コンストラクトは、癌の処置において使用することができる。
【選択図】図１



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＨＥＲ２（ヒト上皮成長因子受容体２）発現細胞上のＨＥＲ２　ＥＣＤ２（細胞外ドメイン２）抗原に一価で特異的に結合する第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト；
ＨＥＲ２発現細胞上のＨＥＲ２　ＥＣＤ４（細胞外ドメイン４）抗原に一価で特異的に結合する第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト；
第１および第２のリンカーポリペプチド
を含む、抗原結合性コンストラクトであって、
第１のリンカーポリペプチドは第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており、第２のリンカーポリペプチドは第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており、
前記リンカーポリペプチドが相互に共有結合を形成することができ、
第１または第２の抗原結合性ポリペプチドの一方または両方がｓｃＦｖである、前記抗原結合性コンストラクト。
【請求項２】
第１および第２のリンカーポリペプチドがそれぞれ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、またはＩｇＧ４ヒンジ領域から選択される免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドを含む、請求項１に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項３】
第１および／または第２のリンカーポリペプチドが骨格、任意選択によりＦｃに、機能的に連結されている、請求項１または２に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項４】
第１および第２のリンカーポリペプチドが、ＣＨ３配列をそれぞれ含む第１および第２のＦｃポリペプチドを含む二量体Ｆｃに機能的に連結されており、第１のＦｃポリペプチドが、第１のリンカーポリペプチドに機能的に連結されていて、第２のリンカーポリペプチドが第２のリンカーポリペプチドに機能的に連結されている、請求項１または２に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項５】
（ｉ）第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであるか；または（ｉｉ）第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであり、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであるか；または（ｉｉｉ）第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトおよび第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの両方がｓｃＦｖである、前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項６】
ｉ．　第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであり、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトＦａｂが、
ａ．　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０５）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６７）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９９）のペルツズマブアームのＶＨを含む第１の重鎖可変ポリペプチドＶＨ１および
ｂ．　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１）のペルツズマブアームのＶＬを含む第１の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ１
を含み、
第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７９）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５７）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０５）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ

ＮＯ：１７９）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０５）のトラスツズマブアームのＶＨを含む第２の重鎖可変ポリペプチドＶＨ２および
（ｂ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７１）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９７）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７１）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９７）のトラスツズマブアームのＶＬを含む第２の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ２
を含むか；または
　ｉｉ．　第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであり、第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０５）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６７）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９９）のペルツズマブアームのＶＨを含む第１の重鎖可変ポリペプチドＶＨ１および
（ｂ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１）のペルツズマブアームのＶＬを含む第１の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ１
を含み；
　第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトＦａｂが、
（ａ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７９）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５７）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０５）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７９）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０５））のトラスツズマブアームのＶＨを含む第２の重鎖可変ポリペプチドＶＨ２および
（ｂ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７１）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９７）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７１）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９７）のトラスツズマブアームのＶＬを含む第２の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ２
を含むか；または
　ｉｉｉ．　第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０５）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２１）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６７）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９９）のペルツズマブアームのＶＨを含む第１の重鎖可変ポリペプチドＶＨ１および
（ｂ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３５）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５９）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１）のペルツズマブアームのＶＬを含む第１の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ１
を含み；
　第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７９）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５７）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０５）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７９）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０５）のトラスツズマブアームのＶＨを含む第２の重鎖可変ポリペプチドＶＨ２および
（ｂ）　ｖ５０１９（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７１）、ｖ５０２０（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４９）、ｖ７０９１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９７）、ｖ６７１７（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７１）、またはｖ１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９７）のトラスツズマブアームのＶＬを含む第２の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ２

を含む、
前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項７】
第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、
ｉ．アミノ酸配列ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３７か、またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４８を含む３つのＶＨ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｉｉ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３７か、またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４８の３つのＶＨ ＣＤＲ配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む３つのＶＨ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｉｉｉ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３９、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０か、またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４７、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０の３つのＶＬ ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む３つのＶＬ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｉｖ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３９、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０か、またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４７、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０と少なくとも９０％同一である３つのＶＬ ＣＤＲ配列のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である３つのＶＬ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｖ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３７、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３９、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０か；またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４７、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０の６つのＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む６つのＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；または
ｖｉ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３７、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３９、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０か；またはＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３５、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３６、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３８、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４７、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４０の６つのＣＤＲ配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む６つのＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト
から選択され、かつ、
第２の抗原結合性ポリペプチドが、
ｖｉｉ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４１、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４２、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４３の３つのＶＨ ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む３つのＶＨ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｖｉｉｉ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４１、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４２、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４３の３つのＶＨ ＣＤＲ配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む３つのＶＨ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｉｘ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４４、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４５、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４６の３つのＶＬ ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む３つのＶＬ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｘ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４４、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４５、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４６の３つのＶＬ ＣＤＲ配列のアミノ酸配列と少なくとも９０％同一である３つのＶＬ ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｘｉ．ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４１、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４２、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４３、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４４、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４５、およびＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３４６の６つのＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む６つのＣＤＲ配列を含む

ポリペプチドコンストラクト；または
ｘｉｉ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４１、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４２、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４４、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４５、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４６の６つのＣＤＲ配列と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列を含む６つのＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト
から選択される、
前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項８】
第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが（ｉ）ＥＣＤ２へのペルツズマブの結合を５０％以上遮断し、かつ／または（ｉｉ）第２の抗原結合性ポリペプチドがＥＣＤ４へのトラスツズマブの結合を５０％以上遮断する、前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項９】
第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ２　ＥＣＤ２に特異的な前記ｖ５０１９、ｖ１００００、ｖ７０９１、ｖ５０２０、またはｖ６７１７抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの１つを含み、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ２　ＥＣＤ４に特異的な前記ｖ５０１９、ｖ１００００、ｖ７０９１、ｖ５０２０、またはｖ６７１７抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの１つを含む、前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項１０】
第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ２　ＥＣＤ２に特異的な前記ｖ５０１９、ｖ１００００、ｖ７０９１、ｖ５０２０、またはｖ６７１７抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと少なくとも８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一のアミノ酸配列を含み、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ２　ＥＣＤ４に特異的な前記ｖ５０１９、ｖ１００００、ｖ７０９１、ｖ５０２０、またはｖ６７１７抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと少なくとも８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一のアミノ酸配列を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項１１】
ｖ５０１９、ｖ１００００、ｖ７０９１、ｖ５０２０、およびｖ６７１７から選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項１２】
第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであり、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、前記抗原結合性コンストラクトが、２つのＦａｂを有する基準二重パラトピック抗原結合性コンストラクトと比較して、
（ｉ）ＨＥＲ２　３＋細胞において受容体内部移行の増大を誘導し、かつ／または
（ｉｉ）ＡＤＣＣ（antibody directed cellular cytotoxicity）アッセイにおいて、ＨＥＲ２　１＋細胞に対して、より高い効力を示す、
前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項１３】
第１および第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、前記抗原結合性コンストラクトが、２つのＦａｂを有する基準抗原結合性コンストラクトと比較して、ＨＥＲ２　１＋、２＋、および３＋細胞において受容体内部移行の増大を誘導する、
前記請求項のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項１４】
ＨＥＲ２　ＥＣＤ２に一価で特異的に結合する１つまたは複数の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを含み、各ポリペプチドコンストラクトがＶＨおよびＶＬを含み、該ＶＨが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３５、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３６、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４８の３つのＶＨ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む３つのＣＤＲ配列を含み、該ＶＬが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４７、およびＳＥＱ

ＩＤ　ＮＯ：３４０の３つのＶＬ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む３つのＣＤＲ配列を含む、修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項１５】
前記ＶＨがｖ９９９６のＶＨを含み、前記ＶＬがｖ９９９６のＶＬを含む、請求項１４に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項１６】
前記抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ｖ９９９６のＶＨおよびｖ９９９６のＶＬと少なくとも８０％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１４または１５に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項１７】
一価、二価、または多価である、請求項１４から１６のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項１８】
（ｉ）一価であり、ＦａｂまたはｓｃＦｖを含むか、（ｉｉ）二価であり、ＦａｂおよびｓｃＦｖを含むか、または（ｉｉｉ）二価であり、２つのｓｃＦｖを含む、請求項１４から１７のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項１９】
一価であり、ＨＥＲ２　ＥＣＤ２について、ペルツズマブと比較して７～９倍の親和性の増大を示す、請求項１４から１７のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項２０】
リンカーを用いてまたは用いずに前記抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに連結されている二量体Ｆｃを含む、請求項１４から１９のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項２１】
第１および第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト、ならびにそれぞれＣＨ３配列を含む第１および第２のＦｃポリペプチドを含み、第１のＦｃポリペプチドが、第１のリンカーを用いてまたは用いずに第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されていて、第２の単量体Ｆｃポリペプチドが、第２のリンカーを用いてまたは用いずに第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されている、請求項１４から２０のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項２２】
ポリペプチドリンカーを含む、請求項２０および２１のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項２３】
前記リンカーがＩｇＧ１ヒンジ領域を含む、請求項２２に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項２４】
前記ＦｃがヒトＦｃである、請求項２０および２１のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項２５】
前記ＦｃがヒトＩｇＧ１　Ｆｃである、請求項２０および２１のいずれか一項に記載の修飾ペルツズマブコンストラクト。
【請求項２６】
ヘテロ二量体Ｆｃを含み、二量体化されたＣＨ３配列が、約６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７７．５、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、または８５℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有する、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。
【請求項２７】

発現させた場合に、約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％超の純度で形成されるヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。

【請求項２８】

単一の細胞によって発現させた場合に、約７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％超の純度で形成されるヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。

【請求項２９】

前記ＣＨ３配列の少なくとも１つにおいて、１つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。

【請求項３０】

前記ＣＨ３配列の少なくとも１つにおいて、野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する１つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。

【請求項３１】

野生型ホモ二量体Ｆｃと比較して、ＥＵ付番に従うと、

ｉ．　第１のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの修飾、および第２のＦｃポリペプチドにおいてＴ３６６Ｉ＿Ｎ３９０Ｒ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；または

ｉｉ．　第１のＦｃポリペプチドにおいてＬ３５１Ｙ＿Ｓ４００Ｅ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの修飾、および第２のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ、

ｉｉｉ．　第１のＦｃポリペプチドにおいてＬ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの修飾、および第２のポリペプチドにおいてＴ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；

ｉｖ．　第１のＦｃポリペプチドにおいてＬ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの修飾、および第２のＦｃポリペプチドにおいてＴ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；

ｖ．　第１のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの修飾、および第２のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；

ｖｉ．　第１のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの修飾、および第２のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃ；または

ｖｉｉ．　第１のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｓ４００Ｅ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの修飾、および第２のＦｃポリペプチドにおいてＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｎ３９０Ｒ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ１　Ｆｃを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。

【請求項３２】

少なくとも１つのＣＨ２ドメインを含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。

【請求項３３】

前記ヘテロ二量体Ｆｃの前記ＣＨ２ドメインが１つまたは複数の修飾を含む、請求項３２に記載のコンストラクト。

【請求項３４】

Ｆｃ－ガンマ受容体の選択的結合を促進する１つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。

【請求項３５】

グリコシル化されている、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。
【請求項３６】
薬物にコンジュゲートされている、前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクト。
【請求項３７】
前記薬物がメイタンシン（ＤＭ１）である、請求項３６に記載のコンストラクト。
【請求項３８】
ＳＭＣＣリンカーでＤＭ１にコンジュゲートされている、請求項３６に記載のコンストラクト。
【請求項３９】
前記請求項のいずれか一項に記載のコンストラクトと薬学的担体とを含む、薬学的組成物。
【請求項４０】
前記薬学的担体が、緩衝剤、抗酸化剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート化剤、安定剤、または添加剤を含む、請求項３９に記載の薬学的組成物。
【請求項４１】
請求項１から３８のいずれか一項に記載のコンストラクトを含む、医療において使用するための薬学的組成物。
【請求項４２】
請求項１から３８のいずれか一項に記載のコンストラクトを含む、癌を処置する際に使用するための薬学的組成物。
【請求項４３】
請求項１から３８のいずれか一項に記載のコンストラクトまたは請求項３９から４２のいずれか一項に記載の薬学的組成物の有効量を対象に投与することを含む、ＨＥＲ２発現（ＨＥＲ２＋）腫瘍を有する対象を処置する方法。
【請求項４４】
前記処置の結果が、前記腫瘍の縮小、前記腫瘍の増殖の阻害、前記腫瘍が進行するまでの時間の増大、前記対象の無病生存期間の延長、転移の低減、前記対象の無進行生存期間の増大、または前記対象の全生存期間の増大である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記腫瘍が、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮癌、悪性黒色腫、咽頭癌、口腔癌、または皮膚癌である、請求項４３または４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記腫瘍が、腫瘍細胞１個当たり平均１０，０００以上のＨＥＲ２のコピーを発現する細胞を含む、請求項４３から４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記腫瘍が、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって判定した場合にＨＥＲ２　１＋、ＨＥＲ２　２＋、またはＨＥＲ２　３＋である、請求項４３から４６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４８】
前記腫瘍がＨＥＲ２を、ＩＨＣによって判定した場合に２＋以下のレベルで発現する、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
前記ＨＥＲ２＋腫瘍が、ＩＨＣによって判定した場合にＨＥＲ２　２＋／３＋を発現し、遺伝子増幅されていて、かつトラスツズマブに対して中程度に感受性がある卵巣癌である、請求項４３に記載の方法。
【請求項５０】
前記ＨＥＲ２＋腫瘍が、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって判定した場合にＨＥＲ２を２

＋レベル以下で発現する乳癌である、請求項４３に記載の方法。
【請求項５１】
前記ＨＥＲ２＋腫瘍が、（ｉ）ＨＥＲ２　３＋、エストロゲン受容体陰性（ＥＲ－）、プロゲステロン受容体陰性（ＰＲ－）、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌、（ｉｉ）ＨＥＲ２　３＋、ＥＲ－、ＰＲ－、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌、（ｉｉｉ）ＨＥＲ２　３＋、ＥＲ－、ＰＲ－の侵襲性腺管癌、または（ｉｖ）ＨＥＲ２　２＋、ＨＥＲ２遺伝子増幅、トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性乳癌である、請求項４３に記載の方法。
【請求項５２】
前記対象が、抗ＨＥＲ２抗体で以前に処置されていない、請求項４３から５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５３】
前記腫瘍が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および／またはＴＤＭ１に対して抵抗性または難治性である、請求項４３から５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
前記対象が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および／またはＴＤＭ１で以前に処置されている、請求項４３から５１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
前記コンストラクトが、ｖ５０１９、ｖ１００００、ｖ７０９１、ｖ５０２０、またはｖ６７１７から選択される、請求項４３から５４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
投与を注射または注入によって行う、請求項４３から５５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記対象に、追加の薬剤、任意選択で化学療法薬を投与することをさらに含む、請求項４３から５６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
ｉ．　前記腫瘍が非小細胞肺癌であり、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、ビノレルビン、イリノテカン、エトポシド、ビンブラスチン、またはペメトレキセドのうちの１種または複数種であり；
ｉｉ．　前記腫瘍が胃癌であり、前記追加の薬剤が、５－フルオロウラシル（フォリン酸を含むか、または含まない）、カペシタビン、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、エピルビシン、イリノテカン、オキサリプラチン、またはパクリタキセルのうちの１種または複数種であり；
ｉｉｉ．　前記腫瘍が膵臓癌であり、前記追加の薬剤が、ゲムシタビン、フォルフィリノックス、アブラキサン、または５－フルオロウラシルのうちの１種または複数種であり；
ｉｖ．　前記腫瘍がエストロゲンおよび／またはプロゲステロン陽性乳癌であり、前記追加の薬剤が、（ａ）ドキソルビシンおよびエピルビシンの組み合わせ、（ｂ）パクリタキセルおよびドセタキセルの組み合わせ、または（ｃ）フルオロウラシル、シクロホスファミド、およびカルボプラチンの組み合わせのうちの１つまたは複数であり；
ｖ．　前記腫瘍が頭頸部癌であり、前記追加の薬剤が、パクリタキセル、カルボプラチン、ドキソルビシン、またはシスプラチンのうちの１種または複数種であり；
ｖｉ．　前記腫瘍が卵巣癌であり、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルなどのタキサンのうちの１種または複数種である、
請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
前記対象がヒトである、請求項４３から５８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】

請求項１から３８のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクトに試料を接触させ、結合した複合体を検出または測定することを含む、試料中のＨＥＲ２を検出または測定する方法。

【請求項６１】

請求項１から３８のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクトの有効量を細胞に投与することを含む、細胞においてＨＥＲ２シグナル伝達を阻害、低減、または遮断する方法。

【請求項６２】

ＨＥＲ２発現腫瘍細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、前記細胞を、請求項１から３８のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクトと接触させること含む、前記方法。

【請求項６３】

前記腫瘍細胞が、ＨＥＲ２　１＋もしくは２＋ヒト膵臓癌細胞、ＨＥＲ２　３＋ヒト肺癌細胞、ＨＥＲ２　２＋白色人種気管支肺胞癌細胞、ヒト咽頭癌細胞、ＨＥＲ２　２＋ヒト舌扁平上皮細胞癌細胞、咽頭のＨＥＲ２　２＋扁平上皮細胞癌細胞、ＨＥＲ２　１＋または２＋ヒト結腸直腸癌細胞、ＨＥＲ２　３＋ヒト胃癌細胞、ＨＥＲ２　１＋ヒト乳房腺管ＥＲ＋（エストロゲン受容体陽性）癌細胞、ＨＥＲ２　２＋／３＋ヒトＥＲ＋、ＨＥＲ２増幅乳癌細胞、ＨＥＲ２　０＋／１＋ヒト三重陰性乳癌細胞、ＨＥＲ２　２＋ヒト子宮内膜様癌細胞、ＨＥＲ２　１＋肺転移悪性黒色腫細胞、ＨＥＲ２　１＋ヒト子宮頸癌細胞、Ｈｅｒ２　１＋ヒト腎細胞癌細胞、またはＨＥＲ２　１＋ヒト卵巣癌細胞である、請求項６２に記載の方法。

【請求項６４】

前記腫瘍細胞が、ＨＥＲ２　１＋もしくは２＋もしくは３＋ヒト膵臓癌細胞、ＨＥＲ２　２＋転移性膵臓癌細胞、ＨＥＲ２　０＋／１＋、＋３＋ヒト肺癌細胞、ＨＥＲ２　２＋白色人種気管支肺胞癌細胞、ＨＥＲ２　０＋未分化肺癌、ヒト非小細胞肺癌細胞、ヒト咽頭癌細胞、ＨＥＲ２　２＋ヒト舌扁平上皮細胞癌細胞、咽頭のＨＥＲ２　２＋扁平上皮細胞癌細胞、ＨＥＲ２　１＋もしくは２＋ヒト結腸直腸癌細胞、ＨＥＲ２　０＋、１＋、もしくは３＋ヒト胃癌細胞、ＨＥＲ２　１＋ヒト乳房腺管ＥＲ＋（エストロゲン受容体陽性）癌細胞、ＨＥＲ２　２＋／３＋ヒトＥＲ＋、ＨＥＲ２増幅乳癌細胞、ＨＥＲ２　０＋／１＋ヒト三重陰性乳癌細胞、ＨＥＲ２　０＋ヒト乳房腺管癌（Ｂａｓａｌ　Ｂ、間葉状三重陰性）細胞、ＨＥＲ２　２＋　ＥＲ＋乳癌、ＨＥＲ２　０＋ヒト転移性乳癌細胞（ＥＲ－、ＨＥＲ２増幅、ルミナールＡ、ＴＮ）、ヒト子宮中胚葉腫瘍（混合グレードＩＩＩ）細胞、２＋ヒト子宮内膜様癌細胞、ＨＥＲ２　１＋ヒト皮膚類表皮癌細胞、ＨＥＲ２　１＋肺転移悪性黒色腫細胞、ＨＥＲ２　１＋悪性黒色腫細胞、ヒト子宮頸類表皮癌細胞、ＨＥＲ２　１＋ヒト膀胱癌細胞、ＨＥＲ２　１＋ヒト子宮頸癌細胞、Ｈｅｒ２　１＋ヒト腎細胞癌細胞、またはＨＥＲ２　１＋、２＋、もしくは３＋ヒト卵巣癌細胞であり、前記抗原結合性コンストラクトがメイタンシン（ＤＭ１）にコンジュゲートされている、請求項６２に記載の方法。

【請求項６５】

前記腫瘍細胞が、膵臓腫瘍細胞系のＢｘＰＣ３、Ｃａｐａｎ－１、ＭｉａＰａｃａ２；肺腫瘍細胞系のＣａｌｕ－３、ＮＣＩ－Ｈ３２２；頭頸部腫瘍細胞系のＤｅｔｒｏｉｔ５６２、ＳＣＣ－２５、ＦａＤｕ；結腸直腸腫瘍細胞系のＨＴ２９、ＳＮＵ－Ｃ２Ｂ；胃腫瘍細胞系のＮＣＩ－Ｎ８７；乳房腫瘍細胞系のＭＣＦ－７、ＭＤＡＭＢ１７５、ＭＤＡＭＢ３６１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＢＴ－２０、ＪＩＭＴ－１、ＳｋＢｒ３、ＢＴ－４７４；子宮腫瘍細胞系のＴＯＶ－１１２Ｄ；皮膚腫瘍細胞系のＭａｌｍｅ－３Ｍ；子宮頸部腫瘍細胞系のＣａｓｋｉ、ＭＳ７５１；膀胱腫瘍細胞系のＴ２４、卵巣腫瘍細胞系のＣａＯＶ３、およびＳＫＯＶ３から選択される細胞である、請求項６２に記載の方法。

【請求項６６】

前記腫瘍細胞が、膵臓腫瘍細胞系のＢｘＰＣ３、Ｃａｐａｎ－１、ＭｉａＰａｃａ２、ＳＷ１９９０、Ｐａｎｃ１；肺腫瘍細胞系のＡ５４９、Ｃａｌｕ－３、Ｃａｌｕ－６、Ｎ

ＣＩ－Ｈ２１２６、ＮＣＩ－Ｈ３２２；頭頸部腫瘍細胞系のＤｅｔｒｏｉｔ５６２、ＳＣＣ－１５、ＳＣＣ－２５、ＦａＤｕ；結腸直腸腫瘍細胞系のＣｏｌｏ２０１、ＤＬＤ－１、ＨＣＴ１１６、ＨＴ２９、ＳＮＵ－Ｃ２Ｂ；胃腫瘍細胞系のＳＮＵ－１、ＳＮＵ－１６、ＮＣＩ－Ｎ８７；乳房腫瘍細胞系のＳｋＢｒ３、ＭＣＦ－７、ＭＤＡＭＢ１７５、ＭＤＡＭＢ３６１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＺＲ－７５－１、ＢＴ－２０、ＢＴ５４９、ＢＴ－４７４、ＣＡＭＡ－１、ＭＤＡＭＢ４５３、ＪＩＭＴ－１、Ｔ４７Ｄ；子宮腫瘍細胞系のＳＫ－ＵＴ－１、ＴＯＶ－１１２Ｄ；皮膚腫瘍細胞系のＡ４３１、Ｍａｌｍｅ－３Ｍ、ＳＫＥＭＥＬ２８；子宮頸部腫瘍細胞系のＣａｓｋｉ、ＭＳ７５１；膀胱腫瘍細胞系のＴ２４、腎臓腫瘍細胞系のＡＣＨＮ；卵巣腫瘍細胞系のＣａＯＶ３、Ｏｖａｒ－３、およびＳＫＯＶ３から選択される細胞であり、前記抗原結合性コンストラクトがメイタンシンにコンジュゲートされている、請求項６２に記載の方法。

【請求項６７】

前記腫瘍細胞が、ＨＥＲ２　２／３＋遺伝子増幅卵巣癌細胞、ＨＥＲ２　０＋／１＋三重陰性乳癌細胞；ＥＲ＋、ＨＥＲ２　１＋乳癌細胞；トラスツズマブ抵抗性ＨＥＲ２　２＋乳癌細胞；ＥＲ＋、ＨＥＲ２＋乳癌細胞；またはＨＥＲ２　３＋乳癌細胞から選択される、請求項６２に記載の方法。

【請求項６８】

請求項１から３８のいずれか一項に記載のコンストラクトを製造する方法であって、前記抗原結合性コンストラクトを発現させるために適した条件下で、請求項１から３８のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクトをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養し、前記コンストラクトを精製することを含む、前記方法。

【請求項６９】

請求項１から３８のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクトの少なくとも１つのポリペプチドをコードする少なくとも１つの核酸配列を含む単離ポリヌクレオチドまたは単離ポリヌクレオチドのセット。

【請求項７０】

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ｃＤＮＡである、請求項６９に記載のポリヌクレオチド。

【請求項７１】

ｖ５０１９、ｖ７０９１、ｖ１００００、ｖ５０２０、またはｖ６７１７をコードするポリヌクレオチドまたは単離ポリヌクレオチドのセット。

【請求項７２】

請求項６９から７１のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの１つまたは複数を含むベクターまたはベクターのセット。

【請求項７３】

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、および組換え発現ベクターからなる群から選択される、請求項７２に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの１つまたは複数を含むベクターまたはベクターのセット。

【請求項７４】

請求項６９から７１のいずれか一項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７２もしくは７３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７５】

ハイブリドーマ、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはＨＥＫ２９３細胞である、請求項７４に記載の単離細胞。

【請求項７６】

請求項１から３８のいずれか一項に記載のコンストラクトと使用説明書とを含むキット。

【請求項７７】

非フコシル化されている、請求項３５に記載のコンストラクト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連出願の相互参照

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

【０００２】

配列表

本出願は、ＥＦＳウェブを介して提出され、かつその全体が参照によって本明細書に組み込まれる配列表を含む。２０ＸＸ年ＸＸ月に作成された上記ＡＳＣＩＩコピーは、ＸＸＸＸＵＳ＿ｓｅｑｕｅｎｃｅｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔと名付けられ、Ｘ，ＸＸＸ，ＸＸＸバイトのサイズである。

【背景技術】

【０００３】

背景

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

【０００４】

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

【０００５】

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

【先行技術文献】
【特許文献】
【０００６】
【特許文献１】ＷＯ２０１２／１４３５２３
【特許文献２】ＷＯ２００９／１５４６５１
【特許文献３】ＷＯ２００９／０６８６２５
【特許文献４】ＷＯ２００９／０６８６３１
【特許文献５】ＰＣＴ／ＣＡ２０１１／００１２３８
【特許文献６】ＰＣＴ／ＣＡ２０１２／０５０７８０
【特許文献７】ＰＣＴ／ＣＡ２０１３／００４７１
【特許文献８】ＰＣＴ／ＣＡ２０１３／０５０３５８
【発明の概要】
【０００７】
ＨＥＲ２に結合する二価抗原結合性コンストラクトを本明細書において記載する。その抗原結合性コンストラクトは、ＨＥＲ２（ヒト上皮成長因子受容体２）発現細胞上のＨＥＲ２　ＥＣＤ２（細胞外ドメイン２）抗原に一価で特異的に結合する第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと、ＨＥＲ２発現細胞上のＨＥＲ２　ＥＣＤ４（細胞外ドメイン４）抗原に一価で特異的に結合する第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと、第１および第２のリンカーポリペプチドとを含み、その第１のリンカーポリペプチドは、第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており、その第２のリンカーポリペプチドは、第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており；それらのリンカーポリペプチドは、相互に共有結合を形成し得、ＥＣＤ２またはＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトの少なくとも一方は、ｓｃＦｖである。ある特定の実施形態では、ＥＣＤ２結合性ポリペプチドコンストラクトはｓｃＦｖであり、ＥＣＤ２結合性ポリペプチドコンストラクトはＦａｂである。ある特定の実施形態では、ＥＣＤ２結合性ポリペプチドコンストラクトはＦａｂであり、ＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトはｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、ＥＣＤ２およびＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトは両方ともｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、ＣＨ３配列を含む二量体Ｆｃを有する。いくつかの実施形態では、Ｆｃは、ＣＨ３配列において、野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する１つまたは複数の修飾を有するヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体ＣＨ３配列は、６８℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有する。抗原結合性コンストラクトをコードする核酸、ならびにベクターおよび細胞も記載する。本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを使用して、障害、例えば、癌を処置する方法も記載する。
【０００８】
ＶＬ領域においてＹ９６Ａの変異、およびＶＨ領域においてＴ３０Ａ／Ａ４９Ｇ／Ｌ７０Ｆの変異（Ｋａｂａｔに従って付番）を含む修飾ペルツズマブコンストラクトも、本明細書において提供する。一実施形態では、修飾ペルツズマブコンストラクトは一価であり、ＨＥＲ２　ＥＣＤ２についてペルツズマブよりも７～９倍高い親和性を有する。ある特定の実施形態では、修飾ペルツズマブコンストラクトは、Ｆａｂ／Ｆａｂ、Ｆａｂ／ｓｃＦｖ、またはｓｃＦｖ／ｓｃＦｖ形式を有する。
[本発明1001]
ＨＥＲ2（ヒト上皮成長因子受容体2）発現細胞上のＨＥＲ２　ＥＣＤ2（細胞外ドメイン2）抗原に一価で特異的に結合する第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト；
ＨＥＲ2発現細胞上のＨＥＲ２　ＥＣＤ4（細胞外ドメイン4）抗原に一価で特異的に結合する第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト；
第1および第2のリンカーポリペプチド
を含む、抗原結合性コンストラクトであって、
第1のリンカーポリペプチドは第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に

連結されており、第2のリンカーポリペプチドは第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されており、
前記リンカーポリペプチドが相互に共有結合を形成することができ、
第1または第2の抗原結合性ポリペプチドの一方または両方がｓｃＦｖである、前記抗原結合性コンストラクト。
[本発明1002]
第1および第2のリンカーポリペプチドがそれぞれ、ＩｇＧ1、ＩｇＧ2、またはＩｇＧ4ヒンジ領域から選択される免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドを含む、本発明1001の抗原結合性コンストラクト。
[本発明1003]
第1および／または第2のリンカーポリペプチドが骨格、任意選択によりＦｃに、機能的に連結されている、本発明1001または1002の抗原結合性コンストラクト。
[本発明1004]
第1および第2のリンカーポリペプチドが、ＣＨ3配列をそれぞれ含む第1および第2のＦｃポリペプチドを含む二量体Ｆｃに機能的に連結されており、第1のＦｃポリペプチドが、第1のリンカーポリペプチドに機能的に連結されていて、第2のリンカーポリペプチドが第2のリンカーポリペプチドに機能的に連結されている、本発明1001または1002の抗原結合性コンストラクト。
[本発明1005]
（ｉ）第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであるか；または（ｉｉ）第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであるか；または（ｉｉｉ）第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトおよび第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの両方がｓｃＦｖである、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。
[本発明1006]
ｉ．　第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトＦａｂが、
ａ．　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：221）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：205）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：221）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：267）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：99）のペルツズマブアームのＶＨを含む第1の重鎖可変ポリペプチドＶＨ1および
ｂ．　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：259）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：71）のペルツズマブアームのＶＬを含む第1の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ1
を含み、
第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：179）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：157）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：305）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：179）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：305）のトラスツズマブアームのＶＨを含む第2の重鎖可変ポリペプチドＶＨ2および
（ｂ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：171）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：149）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：297）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：171）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：297）のトラスツズマブアームのＶＬを含む第2の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ2
を含むか；または
ｉｉ．　第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがＦａｂであり、第1の抗原結合性ポリペプチドコンス

トラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：221）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：205）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：221）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：267）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：99）のペルツズマブアームのＶＨを含む第1の重鎖可変ポリペプチドＶH1および
（ｂ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：259）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：71）のペルツズマブアームのＶＬを含む第1の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ1
を含み；
　第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトＦａｂが、
（ａ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：179）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：157）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：305）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：179）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：305））のトラスツズマブアームのＶＨを含む第2の重鎖可変ポリペプチドＶH2および
（ｂ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：171）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：149）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：297）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：171）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：297）のトラスツズマブアームのＶＬを含む第2の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ2
を含むか；または
　ｉｉｉ．　第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：221）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：205）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：221）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：267）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：99）のペルツズマブアームのＶＨを含む第1の重鎖可変ポリペプチドＶH1および
（ｂ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：35）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：259）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：71）のペルツズマブアームのＶＬを含む第1の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ1
を含み；
　第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトｓｃＦｖが、
（ａ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：179）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：157）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：305）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：179）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：305）のトラスツズマブアームのＶＨを含む第2の重鎖可変ポリペプチドＶH2および
（ｂ）　ｖ5019（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：171）、ｖ5020（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：149）、ｖ7091（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：297）、ｖ6717（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：171）、またはｖ10000（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：297）のトラスツズマブアームのＶＬを含む第2の軽鎖可変ポリペプチドＶＬ2
を含む、
前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。
[本発明1007]
　第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、
ｉ．　アミノ酸配列ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：335、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：336、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：337か、またはＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：335、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：336、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：348を含む3つのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；
ｉｉ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：335、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：336、およびＳＥＱ　ＩＤ　Ｎ

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

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

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

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

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

から選択され、かつ、

第2の抗原結合性ポリペプチドが、

ｖｉｉ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：341、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：342、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：343の3つのＶＨ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む3つのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；

ｖｉｉｉ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：341、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：342、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：343の3つのＶＨ　ＣＤＲ配列と少なくとも90％同一であるアミノ酸配列を含む3つのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；

ｉｘ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：344、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：345、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：346の3つのＶＬ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む3つのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；

ｘ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：344、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：345、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：346の3つのＶＬ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列と少なくとも90％同一である3つのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；

ｘｉ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：341、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：342、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：343、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：344、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：345、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：346の6つのＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む6つのＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト；または

ｘｉｉ．　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：341、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：342、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：343、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：344、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：345、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：346の6つのＣＤＲ配列と少なくとも90％同一であるアミノ酸配列を含む6つのＣＤＲ配列を含むポリペプチドコンストラクト

から選択される、

前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1008]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが（ｉ）ＥＣＤ2へのペルツズマブの結合を50％以上遮断し、かつ／または（ｉｉ）第2の抗原結合性ポリペプチドがＥＣＤ4へのト

ラスツズマブの結合を50％以上遮断する、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1009]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ2　ＥＣＤ2に特異的な前記ｖ5019、ｖ10000、ｖ7091、ｖ5020、またはｖ6717抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの1つを含み、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ2　ＥＣＤ4に特異的な前記ｖ5019、ｖ10000、ｖ7091、ｖ5020、またはｖ6717抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの1つを含む、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1010]

第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ2　ＥＣＤ2に特異的な前記ｖ5019、ｖ10000、ｖ7091、ｖ5020、またはｖ6717抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと少なくとも80％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％同一のアミノ酸配列を含み、第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ＨＥＲ2　ＥＣＤ4に特異的な前記ｖ5019、ｖ10000、ｖ7091、ｖ5020、またはｖ6717抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと少なくとも80％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％同一のアミノ酸配列を含む、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1011]

ｖ5019、ｖ10000、ｖ7091、ｖ5020、およびｖ6717から選択される、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1012]

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

（ｉ）ＨＥＲ2　3＋細胞において受容体内部移行の増大を誘導し、かつ／または

（ｉｉ）ＡＤＣＣ（antibody directed cellular cytotoxicity）アッセイにおいて、ＨＥＲ2　1＋細胞に対して、より高い効力を示す、

前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1013]

第1および第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトがｓｃＦｖであり、前記抗原結合性コンストラクトが、2つのＦａｂを有する基準抗原結合性コンストラクトと比較して、ＨＥＲ2　1＋、2＋、および3＋細胞において受容体内部移行の増大を誘導する、前記本発明のいずれかの抗原結合性コンストラクト。

[本発明1014]

ＨＥＲ2　ＥＣＤ2に一価で特異的に結合する1つまたは複数の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを含み、各ポリペプチドコンストラクトがＶＨおよびＶＬを含み、該ＶＨが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：335、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：336、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：348の3つのＶＨ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む3つのＣＤＲ配列を含み、該ＶＬが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：338、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：347、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：340の3つのＶＬ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む3つのＣＤＲ配列を含む、修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1015]

前記ＶＨがｖ9996のＶＨを含み、前記ＶＬがｖ9996のＶＬを含む、本発明1014の修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1016]

前記抗原結合性ポリペプチドコンストラクトが、ｖ9996のＶＨおよびｖ9996のＶＬと少なくとも80％、90％、95％、96％、97％、98％、または99％同一のアミノ酸配列を含む、本発明1014または1015の修飾ペルツズマブコンストラクト。

[本発明1017]

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

[本発明1018]
（ｉ）一価であり、ＦａｂまたはｓｃＦｖを含むか、（ｉｉ）二価であり、ＦａｂおよびｓｃＦｖを含むか、または（ｉｉｉ）二価であり、2つのｓｃＦｖを含む、本発明1014から1017のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1019]
一価であり、ＨＥＲ2　ＥＣＤ2について、ペルツズマブと比較して7～9倍の親和性の増大を示す、本発明1014から1017のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1020]
リンカーを用いてまたは用いずに前記抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに連結されている二量体Ｆｃを含む、本発明1014から1019のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1021]
第1および第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクト、ならびにそれぞれＣＨ3配列を含む第1および第2のＦｃポリペプチドを含み、第1のＦｃポリペプチドが、第1のリンカーを用いてまたは用いずに第1の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されていて、第2の単量体Ｆｃポリペプチドが、第2のリンカーを用いてまたは用いずに第2の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに機能的に連結されている、本発明1014から1020のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1022]
ポリペプチドリンカーを含む、本発明1020および1021のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1023]
前記リンカーがＩｇＧ1ヒンジ領域を含む、本発明1022の修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1024]
前記ＦｃがヒトＦｃである、本発明1020および1021のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1025]
前記ＦｃがヒトＩｇＧ1　Ｆｃである、本発明1020および1021のいずれかの修飾ペルツズマブコンストラクト。
[本発明1026]
ヘテロ二量体Ｆｃを含み、二量体化されたＣＨ3配列が、約68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77．5、78、79、80、81、82、83、84、または85℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有する、前記本発明のいずれかのコンストラクト。
[本発明1027]
発現させた場合に、約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99％超の純度で形成されるヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。
[本発明1028]
単一の細胞によって発現させた場合に、約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99％超の純度で形成されるヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。
[本発明1029]
前記ＣＨ3配列の少なくとも1つにおいて、1つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。
[本発明1030]
前記ＣＨ3配列の少なくとも1つにおいて、野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する1つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。
[本発明1031]

野生型ホモ二量体Ｆｃと比較して、ＥＵ付番に従うと、
ｉ．　第1のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｌ351Ｙ＿Ｆ405Ａ＿Ｙ407Ｖの修飾、および第2のＦｃポリペプチドにおいてＴ366Ｉ＿Ｎ390Ｒ＿Ｋ392Ｍ＿Ｔ394Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ1　Ｆｃ；または
ｉｉ．　第1のＦｃポリペプチドにおいてＬ351Ｙ＿Ｓ400Ｅ＿Ｆ405Ａ＿Ｙ407Ｖの修飾、および第2のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｔ366Ｌ＿Ｋ392Ｌ＿Ｔ394Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ1　Ｆｃ、
ｉｉｉ．　第1のＦｃポリペプチドにおいてＬ351Ｙ＿Ｆ405Ａ＿Ｙ407Ｖの修飾、および第2のポリペプチドにおいてＴ366Ｌ＿Ｋ392Ｍ＿Ｔ394Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ1　Ｆｃ；
ｉｖ．　第1のＦｃポリペプチドにおいてＬ351Ｙ＿Ｆ405Ａ＿Ｙ407Ｖの修飾、および第2のＦｃポリペプチドにおいてＴ366Ｌ＿Ｋ392Ｌ＿Ｔ394Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ1　Ｆｃ；
ｖ．　第1のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｌ351Ｙ＿Ｆ405Ａ＿Ｙ407Ｖの修飾、および第2のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｔ366Ｌ＿Ｋ392Ｌ＿Ｔ394Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ1　Ｆｃ；
ｖｉ．　第1のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｌ351Ｙ＿Ｆ405Ａ＿Ｙ407Ｖの修飾、および第2のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｔ366Ｌ＿Ｋ392Ｍ＿Ｔ394Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ1　Ｆｃ；または
ｖｉｉ．　第1のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｌ351Ｙ＿Ｓ400Ｅ＿Ｆ405Ａ＿Ｙ407Ｖの修飾、および第2のＦｃポリペプチドにおいてＴ350Ｖ＿Ｔ366Ｌ＿Ｎ390Ｒ＿Ｋ392Ｍ＿Ｔ394Ｗの修飾を有するヘテロ二量体ＩｇＧ1　Ｆｃ
を含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1032]
少なくとも1つのＣＨ2ドメインを含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1033]
前記ヘテロ二量体Ｆｃの前記ＣＨ2ドメインが1つまたは複数の修飾を含む、本発明1032のコンストラクト。

[本発明1034]
Ｆｃ－ガンマ受容体の選択的結合を促進する1つまたは複数の修飾を含むヘテロ二量体Ｆｃを含む、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1035]
グリコシル化されている、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1036]
薬物にコンジュゲートされている、前記本発明のいずれかのコンストラクト。

[本発明1037]
前記薬物がメイタンシン（ＤＭ1）である、本発明1036のコンストラクト。

[本発明1038]
ＳＭＣＣリンカーでＤＭ1にコンジュゲートされている、本発明1036のコンストラクト。

[本発明1039]
前記本発明のいずれかのコンストラクトと薬学的担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1040]
前記薬学的担体が、緩衝剤、抗酸化剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート化剤、安定剤、または添加剤を含む、本発明1039の薬学的組成物。

[本発明1041]
本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトを含む、医療において使用するための薬学的組成物。

[本発明1042]
本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトを含む、癌を処置する際に使用するための薬学的組成物。
[本発明1043]
本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトまたは本発明1039から1042のいずれかの薬学的組成物の有効量を対象に投与することを含む、ＨＥＲ2発現（ＨＥＲ2＋）腫瘍を有する対象を処置する方法。
[本発明1044]
前記処置の結果が、前記腫瘍の縮小、前記腫瘍の増殖の阻害、前記腫瘍が進行するまでの時間の増大、前記対象の無病生存期間の延長、転移の低減、前記対象の無進行生存期間の増大、または前記対象の全生存期間の増大である、本発明1043の方法。
[本発明1045]
前記腫瘍が、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮癌、悪性黒色腫、咽頭癌、口腔癌、または皮膚癌である、本発明1043または1044の方法。
[本発明1046]
前記腫瘍が、腫瘍細胞1個当たり平均10，000以上のＨＥＲ2のコピーを発現する細胞を含む、本発明1043から1045のいずれかの方法。
[本発明1047]
前記腫瘍が、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって判定した場合にＨＥＲ2　1＋、ＨＥＲ2　2＋、またはＨＥＲ2　3＋である、本発明1043から1046のいずれかの方法。
[本発明1048]
前記腫瘍がＨＥＲ2を、ＩＨＣによって判定した場合に2＋以下のレベルで発現する、本発明1047の方法。
[本発明1049]
前記ＨＥＲ2＋腫瘍が、ＩＨＣによって判定した場合にＨＥＲ2　2＋／3＋を発現し、遺伝子増幅されていて、かつトラスツズマブに対して中程度に感受性がある卵巣癌である、本発明1043の方法。
[本発明1050]
前記ＨＥＲ2＋腫瘍が、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって判定した場合にＨＥＲ2を2＋レベル以下で発現する乳癌である、本発明1043の方法。
[本発明1051]
前記ＨＥＲ2＋腫瘍が、（ｉ）ＨＥＲ2　3＋、エストロゲン受容体陰性（ＥＲ－）、プロゲステロン受容体陰性（ＰＲ－）、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌、（ｉｉ）ＨＥＲ2　3＋、ＥＲ－、ＰＲ－、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌、（ｉｉｉ）ＨＥＲ2　3＋、ＥＲ－、ＰＲ－の侵襲性腺管癌、または（ｉｖ）ＨＥＲ2　2＋、ＨＥＲ2遺伝子増幅、トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性乳癌である、本発明1043の方法。
[本発明1052]
前記対象が、抗ＨＥＲ2抗体で以前に処置されていない、本発明1043から1051のいずれかの方法。
[本発明1053]
前記腫瘍が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および／またはＴＤＭ1に対して抵抗性または難治性である、本発明1043から1051のいずれかの方法。
[本発明1054]
前記対象が、ペルツズマブ、トラスツズマブ、および／またはＴＤＭ1で以前に処置されている、本発明1043から1051のいずれかの方法。
[本発明1055]
前記コンストラクトが、ｖ5019、ｖ10000、ｖ7091、ｖ5020、またはｖ6717から選択される、本発明1043から1054のいずれかの方法。

[本発明1056]
投与を注射または注入によって行う、本発明1043から1055のいずれかの方法。
[本発明1057]
前記対象に、追加の薬剤、任意選択で化学療法薬を投与することをさらに含む、本発明1043から1056のいずれかの方法。
[本発明1058]
ｉ．　前記腫瘍が非小細胞肺癌であり、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、ビノレルビン、イリノテカン、エトポシド、ビンブラスチン、またはペメトレキセドのうちの1種または複数種であり；
ｉｉ．　前記腫瘍が胃癌であり、前記追加の薬剤が、5－フルオロウラシル（フォリン酸を含むか、または含まない）、カペシタビン、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、エピルビシン、イリノテカン、オキサリプラチン、またはパクリタキセルのうちの1種または複数種であり；
ｉｉｉ．　前記腫瘍が膵臓癌であり、前記追加の薬剤が、ゲムシタビン、フォルフィリノックス、アブラキサン、または5－フルオロウラシルのうちの1種または複数種であり；
ｉｖ．　前記腫瘍がエストロゲンおよび／またはプロゲステロン陽性乳癌であり、前記追加の薬剤が、（ａ）ドキソルビシンおよびエピルビシンの組み合わせ、（ｂ）パクリタキセルおよびドセタキセルの組み合わせ、または（ｃ）フルオロウラシル、シクロホスファミド、およびカルボプラチンの組み合わせのうちの1つまたは複数であり；
ｖ．　前記腫瘍が頭頸部癌であり、前記追加の薬剤が、パクリタキセル、カルボプラチン、ドキソルビシン、またはシスプラチンのうちの1種または複数種であり；
ｖｉ．　前記腫瘍が卵巣癌であり、前記追加の薬剤が、シスプラチン、カルボプラチン、またはパクリタキセルもしくはドセタキセルなどのタキサンのうちの1種または複数種である、
本発明1057の方法。
[本発明1059]
前記対象がヒトである、本発明1043から1058のいずれかの方法。
[本発明1060]
本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトに試料を接触させ、結合した複合体を検出または測定することを含む、試料中のＨＥＲ2を検出または測定する方法。
[本発明1061]
本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトの有効量を細胞に投与することを含む、細胞においてＨＥＲ2シグナル伝達を阻害、低減、または遮断する方法。
[本発明1062]
ＨＥＲ2発現腫瘍細胞を死滅させるか、またはその増殖を阻害する方法であって、前記細胞を、本発明1001から1038のいずれかの抗原結合性コンストラクトと接触させること含む、前記方法。
[本発明1063]
前記腫瘍細胞が、ＨＥＲ2　1＋もしくは2＋ヒト膵臓癌細胞、ＨＥＲ2　3＋ヒト肺癌細胞、ＨＥＲ2　2＋白色人種気管支肺胞癌細胞、ヒト咽頭癌細胞、ＨＥＲ2　2＋ヒト舌扁平上皮細胞癌細胞、咽頭のＨＥＲ2　2＋扁平上皮細胞癌細胞、ＨＥＲ2　1＋または2＋ヒト結腸直腸癌細胞、ＨＥＲ2　3＋ヒト胃癌細胞、ＨＥＲ2　1＋ヒト乳房腺管ＥＲ＋（エストロゲン受容体陽性）癌細胞、ＨＥＲ2　2＋／3＋ヒトＥＲ＋、ＨＥＲ2増幅乳癌細胞、ＨＥＲ2　0＋／1＋ヒト三重陰性乳癌細胞、ＨＥＲ2　2＋ヒト子宮内膜様癌細胞、ＨＥＲ2　1＋肺転移悪性黒色腫細胞、ＨＥＲ2　1＋ヒト子宮頸癌細胞、Ｈｅｒ2　1＋ヒト腎細胞癌細胞、またはＨＥＲ2　1＋ヒト卵巣癌細胞である、本発明1062の方法。
[本発明1064]
前記腫瘍細胞が、ＨＥＲ2　1＋もしくは2＋もしくは3＋ヒト膵臓癌細胞、ＨＥＲ2　2＋

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

[本発明1065]

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

[本発明1066]

前記腫瘍細胞が、膵臓腫瘍細胞系のＢｘＰＣ3、Ｃａｐａｎ－1、ＭｉａＰａｃａ2、ＳＷ1990、Ｐａｎｃ1；肺腫瘍細胞系のＡ549、Ｃａｌｕ－3、Ｃａｌｕ－6、ＮＣＩ－Ｈ2126、ＮＣＩ－Ｈ322；頭頚部腫瘍細胞系のＤｅｔｒｏｉｔ562、ＳＣＣ－15、ＳＣＣ－25、ＦａＤｕ；結腸直腸腫瘍細胞系のＣｏｌｏ201、ＤＬＤ－1、ＨＣＴ116、ＨＴ29、ＳＮＵ－Ｃ2Ｂ；胃腫瘍細胞系のＳＮＵ－1、ＳＮＵ－16、ＮＣＩ－Ｎ87；乳房腫瘍細胞系のＳｋＢｒ3、ＭＣＦ－7、ＭＤＡＭＢ175、ＭＤＡＭＢ361、ＭＤＡ－ＭＢ－231、ＺＲ－75－1、ＢＴ－20、ＢＴ549、ＢＴ－474、ＣＡＭＡ－1、ＭＤＡＭＢ453、ＪＩＭＴ－1、Ｔ47Ｄ；子宮腫瘍細胞系のＳＫ－ＵＴ－1、ＴＯＶ－112Ｄ；皮膚腫瘍細胞系のＡ431、Ｍａｌｍｅ－3Ｍ、ＳＫＥＭＥＬ28；子宮頸部腫瘍細胞系のＣａｓｋｉ、ＭＳ751；膀胱腫瘍細胞系のＴ24、腎臓腫瘍細胞系のＡＣＨＮ；卵巣腫瘍細胞系のＣａＯＶ3、Ｏｖａｒ－3、およびＳＫＯＶ3から選択される細胞であり、前記抗原結合性コンストラクトがメイタンシンにコンジュゲートされている、本発明1062の方法。

[本発明1067]

前記腫瘍細胞が、ＨＥＲ2　2／3＋遺伝子増幅卵巣癌細胞、ＨＥＲ2　0＋／1＋三重陰性乳癌細胞；ＥＲ＋、ＨＥＲ2　1＋乳癌細胞；トラスツズマブ抵抗性ＨＥＲ2　2＋乳癌細胞；ＥＲ＋、ＨＥＲ2＋乳癌細胞；またはＨＥＲ2　3＋乳癌細胞から選択される、本発明1062の方法。

[本発明1068]

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

[本発明1069]

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

[本発明1070]
前記ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットがｃＤＮＡである、本発明1069のポリヌクレオチド。
[本発明1071]
ｖ5019、ｖ7091、ｖ10000、ｖ5020、またはｖ6717をコードするポリヌクレオチドまたは単離ポリヌクレオチドのセット。
[本発明1072]
本発明1069から1071のいずれかのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの1つまたは複数を含むベクターまたはベクターのセット。
[本発明1073]
プラスミド、ウイルスベクター、非エピソーム哺乳動物ベクター、発現ベクター、および組換え発現ベクターからなる群から選択される、本発明1072のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうちの1つまたは複数を含むベクターまたはベクターのセット。
[本発明1074]
本発明1069から1071のいずれかのポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または本発明1072もしくは1073のベクターもしくはベクターのセットを含む、単離細胞。
[本発明1075]
ハイブリドーマ、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、またはＨＥＫ293細胞である、本発明1074の単離細胞。
[本発明1076]
本発明1001から1038のいずれかのコンストラクトと使用説明書とを含むキット。
[本発明1077]
非フコシル化されている、本発明1035のコンストラクト。
【図面の簡単な説明】
【０００９】
【図１】図１Ａは、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式の二重パラトピック（ｂｉｐａｒａｔｏｐｉｃ）抗体の構造を図示する。図１Ｂ～１Ｅは、ｓｃＦｖ－Ｆａｂ形式の二重パラトピック抗体の考えられ得るバージョンの構造を図示する。図１Ｂでは、抗原結合性ドメイン１は、鎖Ａに融合しているｓｃＦｖであり、抗原結合性ドメイン２は、鎖Ｂに融合しているＦａｂである。図１Ｃでは、抗原結合性ドメイン１は、鎖Ａに融合しているＦａｂであり、抗原結合性ドメイン２は、鎖Ｂに融合しているｓｃＦｖである。図１Ｄでは、抗原結合性ドメイン２は、鎖Ａに融合しているＦａｂであり、抗原結合性ドメイン１は、鎖Ｂに融合しているｓｃＦｖである。図１Ｅでは、抗原結合性ドメイン２は、鎖Ａに融合しているｓｃＦｖであり、抗原結合性ドメイン１は、鎖Ｂに融合しているＦａｂである。図１Ｆでは、抗原結合性ドメインは両方ともｓｃＦｖである。
【図２Ａ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の発現および精製の特性決定を図示する。図２Ａは、プロテインＡ精製抗体のＳＥＣクロマトグラフを図示する。
【図２Ｂ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の発現および精製の特性決定を図示する。図２Ｂは、ｖ５０１９の１０Ｌ発現および精製の非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を図示する。
【図２Ｃ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の発現および精製の特性決定を図示する。図２Ｃは、ｖ１００００の２５Ｌ発現および精製のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を図示する。
【図３Ａ】プロテインＡおよびＳＥＣによって精製された例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のＵＰＬＣ－ＳＥＣ分析の結果を図示する。図３Ａは、ｖ５０１９についての結果を示しており、上部のパネルは、精製結果を示しており、下部のパネルは、ｙ軸のスケールを拡大した同じ結果を示している。得られたデータの概要が、ＵＰＬＣ－ＳＥＣの結果の下に提示されている。

【図３Ｂ】プロテインＡおよびＳＥＣによって精製された例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のＵＰＬＣ－ＳＥＣ分析の結果を図示する。図３Ｂは、ｖ１００００についての結果を示している。
【図４Ａ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のヘテロ二量体純度のＬＣＭＳ分析を図示する。図４Ａは、ｖ５０１９の貯留ＳＥＣ画分のＬＣ－ＭＳ分析からの結果を図示する。
【図４Ｂ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のヘテロ二量体純度のＬＣＭＳ分析を図示する。図４Ｂは、ｖ１００００の貯留プロテインＡ画分のＬＣ－ＭＳ分析からの結果を図示する。
【図５Ａ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の２５Ｌ規模調製物の分析を図示する。図５Ａは、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）およびＨｉＴｒａｐ（商標）ＳＰ　ＦＦ精製後の例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックのＳＤＳ－ＰＡＧＥプロファイルを図示する。
【図５Ｂ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の２５Ｌ規模調製物の分析を図示する。図５Ｂは、精製抗体のＬＣＭＳ分析を図示する。
【図６Ａ】ＦＡＣＳによって測定し、対照抗体と比較して、異なるＨＥＲ２受容体密度を示すＨＥＲ２＋全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を比較する。図６Ａは、ＳＫＯＶ３細胞への結合を図示する。
【図６Ｂ】ＦＡＣＳによって測定し、対照抗体と比較して、異なるＨＥＲ２受容体密度を示すＨＥＲ２＋全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を比較する。図６Ｂは、ＪＩＭＴ１細胞への結合を図示する。
【図６Ｃ】ＦＡＣＳによって測定し、対照抗体と比較して、異なるＨＥＲ２受容体密度を示すＨＥＲ２＋全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を比較する。図６Ｃは、ＭＣＦ７細胞への結合を図示する。
【図６Ｄ】ＦＡＣＳによって測定し、対照抗体と比較して、異なるＨＥＲ２受容体密度を示すＨＥＲ２＋全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を比較する。図６Ｄは、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞への結合を図示する。
【図６Ｅ】ＦＡＣＳによって測定し、対照抗体と比較して、異なるＨＥＲ２受容体密度を示すＨＥＲ２＋全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を比較する。図６Ｅは、ＳＫＯＶ３細胞への結合を図示する。
【図６Ｆ】ＦＡＣＳによって測定し、対照抗体と比較して、異なるＨＥＲ２受容体密度を示すＨＥＲ２＋全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を比較する。図６Ｆは、ＭＣＦ７細胞への結合を図示する。
【図６Ｇ】ＦＡＣＳによって測定し、対照抗体と比較して、異なるＨＥＲ２受容体密度を示すＨＥＲ２＋全細胞に結合する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を比較する。図６Ｇは、ＷＩ－３８細胞への結合を図示する。
【図７Ａ】ＨＥＲ２＋細胞の増殖を阻害する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図７Ａは、ＳＫＯＶ３細胞における増殖阻害を示している。
【図７Ｂ】ＨＥＲ２＋細胞の増殖を阻害する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図７Ｂは、ＢＴ－４７４細胞における増殖阻害を示している。
【図７Ｃ】ＨＥＲ２＋細胞の増殖を阻害する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図７Ｃは、ＳＫＢＲ３細胞における増殖阻害を示している。
【図７Ｄ】ＨＥＲ２＋細胞の増殖を阻害する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図７Ｄは、ＳＫＯＶ３細胞における増殖阻害を示している。
【図７Ｅ】ＨＥＲ２＋細胞の増殖を阻害する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図７Ｅは、ＪＩＭＴ－１細胞における増殖阻害を示している。
【図８】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のパラトープに関するＳＰＲ結合データを図示する。図８Ａは、固定化Ｈｅｒ２　ＥＣＤまたは二量体Ｈｅｒ２－Ｆｃへの結合についての一価抗Ｈｅｒ２抗体（ｖ１０４０；例示的な抗Ｈｅｒ２二重パラトピック抗体のＣＨ－Ｂ上の抗原結合性ドメインを表す）のK_D値（ｎＭ）を図示する。図８Ｂは、固定化Ｈｅｒ２　ＥＣＤまたは二量体Ｈｅｒ２－Ｆｃへの結合についての一価抗Ｈｅｒ２抗

体（ｖ４１８２；例示的な抗Ｈｅｒ２二重パラトピック抗体のＣＨ－Ａ上の抗原結合性ドメインを表す）のK_D値（ｎＭ）を図示する。
【図９】ＨＥＲ２＋細胞内へ内部移行する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図９Ａは、ＢＴ－４７４細胞への内部移行を図示しており、図９ｂは、ＪＩＭＴ－１細胞への内部移行を図示する。
【図１０Ａ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図１０Ａ（ｖ５０１９）は、ＢＴ－４７４細胞における結果を図示する。
【図１０Ｂ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図１０Ｂ（ｖ５０１９）は、ＪＩＭＴ１細胞における結果を図示する。
【図１０Ｃ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図１０Ｃ（ｖ５０１９）は、ＳＫＯＶ３細胞における結果を図示する。
【図１０Ｄ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図１０Ｄ（ｖ５０１９）は、ＭＣＦ７細胞における結果を図示する。
【図１０Ｅ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図１０Ｅ（ｖ５０１９およびｖ１００００）は、ＳＫＯＶ３細胞における結果を図示する。
【図１０Ｆ】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の表面結合および内部移行を図示する。図１０Ｆ（ｖ５０１９およびｖ１００００）は、ＪＩＭＴ１細胞における結果を図示する。
【図１１】ＳＫＯＶ３細胞におけるＡＤＣＣを媒介する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図１１Ａでは、アッセイを、５：１のエフェクターとターゲット細胞との比を使用して実施し；図１１Ｂでは、アッセイを、３：１のエフェクターとターゲット細胞との比を使用して実施し；図１１Ｃでは、アッセイを、１：１のエフェクターとターゲット細胞との比を使用して実施した。
【図１２】組換えヒトＨＥＲ２に対する一価抗ＨＥＲ２（ｖ６３０およびｖ４１８２）および例示的な二重パラトピック抗Ｈｅｒ２抗体（ｖ５０１９）の親和性および結合反応速度の特性決定を図示する。図１２Ａは、ｋａ（１／Ｍｓ）の測定値を示している。図１２Ｂは、ｋｄ（１／ｓ）の測定値を示している。図１２Ｃは、K_D（Ｍ）の測定値を示している。
【図１３】抗体捕捉レベルの範囲にわたる、組換えヒトＨＥＲ２に対する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の親和性および結合特性を図示する。図１３Ａは、例示的な二重パラトピック抗Ｈｅｒ２抗体（ｖ５０１９）について抗体捕捉レベルの範囲にわたって決定されたＨＥＲ２　ＥＣＤに対するｋｄ（１／ｓ）の測定値を図示する。図１３Ｂは、一価抗Ｈｅｒ２抗体（ｖ４１８２）について抗体捕捉レベルの範囲にわたって決定されたＨＥＲ２　ＥＣＤに対するｋｄ（１／ｓ）の測定値を図示する。図１３Ｃは、一価抗Ｈｅｒ２抗体（ｖ６３０）について抗体捕捉レベルの範囲にわたって決定されたＨＥＲ２　ＥＣＤに対するｋｄ（１／ｓ）の測定値を図示する。
【図１４】単一特異性抗ＥＣＤ４　ＨＥＲ２抗体（左側）およびＦａｂ－ｓｃＦｖ二重パラトピック抗ＥＣＤ２×ＥＣＤ４　ＨＥＲ２抗体（右側）の結合機構の比較を示す。単一特異性抗ＥＣＤ４　ＨＥＲ２抗体は、１個の抗体分子を２個のＨＥＲ２分子に結合させ得るが；二重パラトピック抗ＥＣＤ２×ＥＣＤ４　ＨＥＲ２抗体は、１個の抗体を２個のＨＥＲ２分子に、さらには、２個の抗体を１個のＨＥＲ２分子に、またその組み合わせで結合させ得て、ＨＥＲ２受容体架橋および格子形成、続いて、矢印によって示されるとおりの内部移行および／または増殖阻害などの下流生物学的効果をもたらす。ＩＥＣは、「免疫エフェクター細胞」を表す。ＨＥＲ２の４つの細胞外ドメインは、１、２、３、または４と付番されていて、１＝ＥＣＤ１、２＝ＥＣＤ２、３＝ＥＣＤ３、および４＝ＥＣＤ４である。
【図１５】ＢＴ－４７４細胞におけるＡＫＴリン酸化に対する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の効果を図示する。
【図１６】心筋細胞生存率に対する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の効果を図

示する。図１６Ａは、心筋細胞生存率に対するｖ５０１９および対応するＡＤＣ　ｖ６３６３の効果を図示しており；図１６Ｂは、心筋細胞生存率に対するｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００、ならびに対応するＡＤＣ　ｖ６３６３、７１４８、１０５５３の効果を図示しており、図１６Ｃは、ドキソルビシン事前処置した心筋細胞の生存率に対するｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００、ならびに対応するＡＤＣ　ｖ６３６３、７１４８、１０５５３の効果を図示する。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【図２４】ヒト一次細胞異種移植片モデル（ＨＢＣｘ－１３ｂ）における抗ＨＥＲ２処置抵抗性腫瘍に対する二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の効果を図示する。
【図２５】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の熱安定性を図示する。図２５Ａは、ｖ５０１９の熱安定性を図示する。図２５Ｂは、ｖ１００００の熱安定性を図示する。図２５Ｃは、ｖ７０９１の熱安定性を図示する。
【図２６】例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体薬物コンジュゲートの熱安定性を図示する。図２６Ａは、ｖ６３６３の熱安定性を図示する。図２６Ｂは、ｖ１０５５３の熱安定性を図示する。図２６Ｃは、ｖ７１４８の熱安定性を図示する。
【図２７Ａ】ＨＥＲ２＋細胞においてＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図２７Ｃにおける注釈は、図２７Ａおよび図２７Ｂにも適用される。図２７Ａは、ＳＫＢＲ３細胞におけるこの能力を図示する。
【図２７Ｂ】ＨＥＲ２＋細胞においてＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図２７Ｃにおける注釈は、図２７Ａおよび図２７Ｂにも適用される。図２７Ｂは、ＪＩＭＴ－１細胞におけるこの能力を図示する。
【図２７Ｃ】ＨＥＲ２＋細胞においてＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図２７Ｃは、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞におけるこの能力を図示する。
【図２７Ｄ】ＨＥＲ２＋細胞においてＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を図示する。図２７Ｄは、ＷＩ－３８細胞におけるこの能力を図示する。
【図２８Ａ】ＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力に対する非フコシル化の効果を図示する。図２８Ｂにおいて示されている注釈は、図２８Ａにも適用される。図２８Ａは、ＳＫＯＶ３細胞において、ＡＤＣＣを媒介するｖ５０１９の非フコシル化バージョンの能力をＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）の能力と比較している。
【図２８Ｂ】ＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力に対する非フコシル化の効果を図示する。図２８Ｂは、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞において、ＡＤＣＣを媒介するｖ５０１９の非フコシル化バージョンの能力をＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）の能力と比較している。
【図２８Ｃ】ＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力に対する非フコシル化の効果を図示する。図２８Ｃは、ＺＲ－７５－１細胞において、ＡＤＣＣを媒介するｖ１００００およびｖ１００００の非フコシル化バージョンの能力をＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）の能力と比較している。
【図２９】増殖刺激リガンドの存在または不在下でＢＴ－４７４細胞の増殖を阻害するｖ５０１９の能力を図示する。
【図３０】ヒト乳癌異種移植片モデル（ＨＢＣｘ１３Ｂ）において、腫瘍体積に対するｖ５０１９（ｖ７１８７）の非フコシル化バージョンの効果を図示する。
【図３１Ａ】ＨＥＲ２＋腫瘍細胞に結合する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの能力を図示する。図３１Ａは、ＳＫＯＶ３細胞において、ｖ６３６３の結合をＴ－ＤＭ１類似体、ｖ６２４６と比較している。
【図３１Ｂ】ＨＥＲ２＋腫瘍細胞に結合する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの能力を図示する。図３１Ｂは、ＪＩＭＴ－１細胞において、ｖ６３６３の結合をＴ－ＤＭ１類似体、ｖ６２４６と比較している。
【図３１Ｃ】ＨＥＲ２＋腫瘍細胞に結合する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの能力を図示する。図３１Ｃは、ＳＫＯＶ３細胞において、数種の例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの結合を対照と比較している。
【図３１Ｄ】ＨＥＲ２＋腫瘍細胞に結合する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの能力を図示する。図３１Ｄは、ＪＩＭＴ－１細胞において、数種の例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの結合を対照と比較している。

【図３２】ＨＥＲ２　３＋（ＥＲ－ＰＲ陰性）患者由来異種移植片モデル（ＨＢＣｘ１３ｂ）において、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの用量依存性腫瘍増殖阻害を図示する。図３２Ａは、腫瘍体積に対するｖ６３６３の効果を示しており、図３２Ｂは、生存率に対する効果を示している。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【図４２】ＨＥＲ２＋細胞において、抗体の内部移行に対する抗ＨＥＲ２二重パラトピッ

ク抗体形式の効果を図示する。図４２Ａは、ＢＴ－４７４細胞において、内部移行に対する効果を図示する。図４２Ｂは、ＪＩＭＴ－１細胞において、内部移行に対する効果を図示する。図４２Ｃは、ＭＣＦ７細胞において、内部移行に対する効果を図示する。

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

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

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

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

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

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

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

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

【図４７】ＳＰＲによって測定した場合の、異なる形式の抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の結合特性の比較を図示する。図４７Ａは、ｖ６９０３およびｖ７０９１を用いて、異なる抗体捕捉レベルでのｋｄ（１／ｓ）のプロットおよび線形回帰分析を図示する。図４７Ｂは、ｖ６９０３およびｖ７０９１を用いて、異なる抗体捕捉レベルでのＫＤ（Ｍ）のプロットおよび線形回帰分析を図示する。

【００１０】

図３８に示される参照文献は次のとおりである：1. Labouret et al. 2012, Neoplasia 14：121－130；2. Ghasemi et al. 2014, Oncogenesis doi：10.1038／oncsis.2014.31；3. Gaborit et al. 2011 J Bio Chem, 286：1133－11345；4. Kimura et al. 2006, Clin Cancer Res；12：4925－4932；5. Komoto et al. 2009, Canc Sci；101：468－473；6. Cretella et al. 2014, Molecular Cancer 13：143－155；7. Bunn et al. 2001, Clin Cancer Res；7：3239－3250；8. Lewis Phillips et al. 2013, Clin Cancer Res, 20：456－468；9. McDonagh et al. 2012, 11：582－593；10. Coldren et al. 2006, Mol Cancer Res：521－528；11. Cavazzoni et al. 2012 Mol Cancer, 11：91－115；12. Li et al. 2014, Mol Cancer Res, doi：10.1158／1541－7786.MCR－13－0396；13. Chmielewski et al. 2004, Immunology, 173：7647－7653；14. Kuwada et al. 2004,

Ｉｎｔ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ，１０９：２９１－３０１；１５．Ｆｕｊｉｍｏｔｏ－Ｏｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．２００７，Ｃｌｉｎ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ，５９：７９５－８０５；１６．Ｃｈａｖｅｚ－Ｂｉａｎｃｏ ｅｔ ａｌ．２００４，ＢＭＣ Ｃａｎｃｅｒ，４：５９；１７．Ｃａｍｐｉｇｌｉｏ ｅｔ ａｌ．２００４，Ｊ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｙ．１９８：２５９－２６８；１８．Ｌｅｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．２０１１，Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１２１：２７５０－２７６７；１９．Ｃｏｌｌｉｎｓ ｅｔ ａｌ．２０１１，Ａｎｎａｌｓ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，２３：１７８８－１７９５；２０．Ｔａｋａｉ ｅｔ ａｌ．２００５，Ｃａｎｃｅｒ，１０４：２７０１－２７０８；２１．Ｒｕｓｎａｃｋ ｅｔ ａｌ．２００７，Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆ，４０：５８０－５９４；２２．Ｍａ ｅｔ ａｌ．２０１３，ＰＬＯＳ ＯＮＥ，８：ｅ７３２６１－ｅ７３２６１；２３．Ｍｅｉｒａ ｅｔ ａｌ．２００９，Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ，１０１：７８２－７９１；２４．Ｈａｙａｓｈｉ ＭＰ２８－１４ ｐｏｓｔｅｒ；２５．Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．２００５ Ｊ Ｈｕａｚｈｏｎｇ Ｕｎｉｖ Ｓｃｉ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇ Ｍｅｄ Ｓｃｉ．２５：３２６－８；２６．Ｍａｋｈｊａ ｅｔ ａｌ．２０１０．Ｊ Ｃｌｉｎｅ Ｏｎｃｏｌｏ ２８：１２１５－１２２３。

【発明を実施するための形態】

【００１１】

詳細な説明

ＨＥＲ２（ヒト上皮成長因子受容体２）発現細胞上のＨＥＲ２ ＥＣＤ２（細胞外ドメイン２）抗原に一価で特異的に結合する第１の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトと、ＨＥＲ２発現細胞上のＨＥＲ２ ＥＣＤ４（細胞外ドメイン４）抗原に一価で特異的に結合する第２の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトとを含み、ＥＣＤ２またはＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトの少なくとも１つがｓｃＦｖである抗原結合性コンストラクトを本明細書において記載する。ある特定の実施形態では、ＥＣＤ２結合性ポリペプチドコンストラクトはｓｃＦｖであり、ＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトはＦａｂである。ある特定の実施形態では、ＥＣＤ２結合性ポリペプチドコンストラクトはＦａｂであり、ＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトはｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、ＥＣＤ２およびＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトは両方ともｓｃＦｖである。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、ＣＨ３配列を含む二量体Ｆｃを有する。いくつかの実施形態では、Ｆｃは、ＣＨ３配列において、野生型ホモ二量体Ｆｃに匹敵する安定性を有するヘテロ二量体の形成を促進する１つまたは複数の修飾を有するヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体ＣＨ３配列は、６８℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有する。

【００１２】

抗原結合性コンストラクトは、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて、（ｉ）表皮成長因子またはヘレグリンによる刺激の存在下または不在下の両方において、癌細胞増殖を阻害する能力、（ｉｉ）癌細胞において内部移行される能力、および（ｉｉｉ）抗体統制（ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ）エフェクター細胞死滅（ＡＤＣＣ）を媒介する能力などの抗腫瘍活性を示す。これらのｉｎ ｖｉｔｒｏ活性は、裸の抗原結合性コンストラクト（すなわち、薬物または毒素にコンジュゲートされていない）と、メイタンシンにコンジュゲートされた抗原結合性コンストラクトとの両方で、ＨＥＲ２発現の様々なレベル（１＋、２＋および３＋）で観察される。

【００１３】

抗原結合性コンストラクトの形式（ｓｃＦｖ／ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ／Ｆａｂ、またはＦａｂ／Ｆａｂ）が、その機能プロファイルの決定において重要であることを、本明細書において示す。ある特定の実施形態では、抗ＨＥＲ２結合性コンストラクトは、ＥＣＤ２およびＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトの両方がＦａｂである基準二重パラトピック抗原結合性コンストラクトと比較して、ＨＥＲ２発現腫瘍細胞によって内部移行され

る能力の増大を示す。ＥＣＤ２およびＥＣＤ４結合性ポリペプチドの両方がｓｃＦｖである一実施形態は、Ｆａｂ／ｓｃＦｖ形式を有する同等の親和性のコンストラクト（これも、Ｆａｂ／Ｆａｂ形式を有する同等の親和性のコンストラクトよりは、効率的に内部移行される）よりも、１＋、２＋、または３＋のレベルでＨＥＲ２を発現する腫瘍細胞によって、より大規模に内部移行される。容易に内部移行される実施形態は、死滅をもたらすために腫瘍細胞による内部移行が必要な抗体－薬物コンジュゲートのための良好な候補物質である。

【００１４】

ある特定の実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、Ｆａｂ／Ｆａｂ形式を有する同等の親和性のコンストラクトと比較して、低レベルのＨＥＲ２を発現する腫瘍細胞のＡＤＣＣ死滅において効力の増大を示す。一実施形態では、Ｆａｂ／ｓｃＦｖ形式を有する抗原結合性コンストラクトは、低レベルのＨＥＲ２（ＨＥＲ２　０－１＋または１＋）を発現する腫瘍細胞のＡＤＣＣ死滅において、Ｆａｂ／Ｆａｂ形式を有する抗ＨＥＲ２コンストラクト（これも、ｓｃＦｖ／ｓｃＦｖ形式を有する抗原結合性コンストラクトよりは効力がある）よりも効力がある。

【００１５】

いくつかの実施形態では、抗ＨＥＲ２抗原結合性コンストラクトは、グリコシル化されている。

【００１６】

いくつかの実施形態では、抗ＨＥＲ２結合性コンストラクトは、非フコシル化されている。いくつかの実施形態では、抗ＨＥＲ２結合性コンストラクトは、薬物にカップリングされている。いくつかの実施形態では、抗ＨＥＲ２結合性コンストラクトは、ＳＭＣＣリンカーを介してメイタンシン（ＤＭ１）にカップリングされている。

【００１７】

その対象に抗ＨＥＲ２抗原結合性コンストラクトを投与することによって、ＨＥＲ２＋腫瘍を有する対象を処置する方法も、本明細書において記載する。いくつかの実施形態では、腫瘍でのＨＥＲ２発現のレベルは、２＋以下である。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、メイタンシンにコンジュゲートされている。ある特定の実施形態では、腫瘍は、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、子宮内膜癌、子宮癌、悪性黒色腫、咽頭癌、口腔癌、または皮膚癌である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、（ｉ）ＨＥＲ２　３＋、エストロゲン受容体陰性（ＥＲ－）、プロゲステロン受容体陰性（ＰＲ－）、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌、（ｉｉ）ＨＥＲ２　３＋、ＥＲ－、ＰＲ－、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌、（ｉｉｉ）ＨＥＲ２　３＋、ＥＲ－、ＰＲ－の侵襲性腺管癌、または（ｉｖ）ＨＥＲ２　２＋、ＨＥＲ２遺伝子増幅トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性乳癌である。

【００１８】

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

【００１９】

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

【００２０】

二重特異性抗原結合性コンストラクト

ＨＥＲ２に結合する二重特異性抗原結合性コンストラクトを、本明細書において提供する。二重特異性抗原結合性コンストラクトは、ＨＥＲ２の異なるエピトープにそれぞれ特異的に結合する２つの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを含む。いくつかの実施形

態では、抗原結合性コンストラクトは、既知の抗体または抗原結合性コンストラクトから誘導されている。下記でより詳細に記載するとおり、抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、限定されないが、Ｆａｂ（抗原結合性フラグメント）、ｓｃＦｖ（一本鎖Ｆｖ）、およびｓｄａｂ（シングルドメイン抗体）などのタンパク質コンストラクトであり得る。典型的には、抗原結合性コンストラクトはＦｃを含む。

【００２１】

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

【００２２】

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

【００２３】

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

【００２４】

抗原結合性コンストラクトは、抗体またはその抗原結合性部分であり得る。本明細書において使用する場合、「抗体」または「免疫グロブリン」は、分析物（例えば、抗原）に特異的に結合して、それを認識する１種の免疫グロブリン遺伝子もしくは複数種の免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされるポリペプチド、またはその断片を指す。認められている免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域遺伝子、さらには、無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかとして分類される。抗体または免疫グロブリンの「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。抗体には５種の主要なクラス、すなわちＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭが存在し、これらのうちの数種は、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、ＩｇＧｉ、IgG_2、IgG_3、IgG_4、ＩｇＡｉ、およびIgA_2にさらに分けられ得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。

【００２５】

例示的な免疫グロブリン（抗体）構造ユニットは、２対のポリペプチド鎖から構成されており、それぞれの対が、１本の「軽鎖」（約２５ｋＤ）および１本の「重鎖」（約５０～７０ｋＤ）を有する。各鎖のＮ末端ドメインが、抗原認識を主に担う約１００～１１０以上のアミノ酸からなる可変領域を画定している。軽鎖可変（ＶＬ）および可変重鎖（Ｖ

Ｈ）という用語は、それぞれこれらの軽鎖および重鎖ドメインを指す。ＩｇＧ１重鎖は、Ｎ末端からＣ末端へとそれぞれＶＨ、ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３ドメインから構成される。軽鎖は、Ｎ末端からＣ末端へとＶＬおよびＣＬドメインから構成される。ＩｇＧ１重鎖は、ＣＨ１とＣＨ２ドメインとの間にヒンジ部を含む。ある特定の実施形態では、免疫グロブリンコンストラクトは、治療用ポリペプチドに接続しているＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、またはＩｇＥからの少なくとも１つの免疫グロブリンドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書において提供する抗原結合性コンストラクトに存在する免疫グロブリンドメインは、ダイアボディまたはナノボディなどの免疫グロブリンベースのコンストラクトからなるか、またはそれから誘導されている。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の免疫グロブリンコンストラクトは、ラクダ科動物抗体などの重鎖抗体からの少なくとも１つの免疫グロブリンドメインを含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供する免疫グロブリンコンストラクトは、ウシ抗体、ヒト抗体、ラクダ科動物抗体、マウス抗体、または任意のキメラ抗体などの哺乳動物抗体からの少なくとも１つの免疫グロブリンドメインを含む。

【００２６】

「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、本明細書において使用する場合、配列中で超可変的で、かつ／または構造的に画定されるループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの領域のそれぞれを指す。一般に、天然の４本鎖抗体は、６つのＨＶＲ、すなわち、ＶＨに３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、およびＶＬに３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含む。ＨＶＲは一般に、超可変ループから、かつ／または相補性決定領域（ＣＤＲ）からのアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性を有し、かつ／または抗原認識に関係する。ＶＨにおけるＣＤＲ１を除いて、ＣＤＲは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。超可変領域（ＨＶＲ）はまた、「相補性決定領域」（ＣＤＲ）とも称され、これらの用語は本明細書において、抗原結合性領域を形成する可変領域の部分に言及する際には互換的に使用される。この特定の領域は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．, Ｕ．Ｓ．Ｄｅｐｔ, ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ, Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（１９８３）およびＣｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．, Ｊ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ １９６：９０１－９１７（１９８７）において記載されており、その定義は、相互に比較すると、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それにも関わらず、抗体またはその変異体のＣＤＲに言及するためのいずれの定義の適用も、本明細書において定義および使用するとおりの用語の範囲内であることが意図されている。上で参照した参照文献のそれぞれによって定義されるとおりのＣＤＲを含む適切なアミノ酸残基を、比較として、下記の表１に示す。特定のＣＤＲを包含する正確な残基番号は、ＣＤＲの配列およびサイズに依存して変化する。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮すると、どの残基が特定のＣＤＲを構成しているかを日常的に決定することができる。

【００２７】

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

【００２８】

抗原結合性ポリペプチドコンストラクト

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

【００２９】

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

【００３０】

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

【００３１】

「一本鎖Ｆｖ」または「ｓｃＦｖ」は、抗体のＶＨおよびＶＬドメインを含み、これらのドメインが、一本鎖ポリペプチド鎖で存在する。一実施形態では、ＦｖポリペプチドはＶＨとＶＬドメインとの間に、そのｓｃＦｖが、抗原結合について所望の構造を形成することを可能にするポリペプチドリンカーをさらに含む。ｓｃＦｖの総説については、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ、Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．２６９－３１５（１９９４）を参照されたい。ＨＥＲ２抗体ｓｃＦｖ断片は、ＷＯ９３／１６１８５；米国特許第５，５７１，８９４号；および米国特許第５，５８７，４５８号において記載されている。

【００３２】

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

【００３３】

抗原結合性コンストラクトの形式および機能

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

【００３４】

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

【００３５】

本明細書における例は、抗原結合性コンストラクトの形式（ｓｃＦｖ／ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ／Ｆａｂ、またはＦａｂ／Ｆａｂ）が、その機能プロファイルの決定において重要であることを示している。ある特定の実施形態では、抗ＨＥＲ２結合性コンストラクトは、ＥＣＤ２およびＥＣＤ４結合性ポリペプチドコンストラクトの両方がＦａｂである基準抗原結合性コンストラクトと比較して、ＨＥＲ２発現腫瘍細胞によって内部移行される能力の増大を示す。抗ＨＥＲ２抗原結合性コンストラクトの内部移行の程度は、ＥＣＤ２またはＥＣＤ４についての一方または両方の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトの親和性を増大させることによってさらに改善され得ることが企図される。ＥＣＤ２およびＥＣＤ４結合性ポリペプチドの両方がｓｃＦｖである一実施形態は、Ｆａｂ／ｓｃＦｖ形式を有する同等の親和性のコンストラクト（これも、Ｆａｂ／Ｆａｂ形式を有する同等の親和性のコンストラクトよりは効率的に内部移行される）よりも、１＋、２＋、または３＋のレベルでＨＥＲ２を発現する腫瘍細胞によって、より大規模に内部移行される。容易に内部移行される実施形態は、死滅をもたらすために腫瘍細胞による内部移行が必要な抗体－薬物コンジュゲートのための良好な候補物質である。逆に、ある特定の実施形態では、容易に内部移行されない抗原結合性コンストラクトが、Ｆａｂ／Ｆａｂ形式を有する同等の親和性のコンストラクトと比較して、低レベルのＨＥＲ２を発現する腫瘍細胞のＡＤＣＣ死滅において効力の増大を示す。一実施形態では、Ｆａｂ／ｓｃＦｖ形式を有する抗原結合性コンストラクトは、低レベルのＨＥＲ２（ＨＥＲ２　０－１＋または１＋）を発現する腫瘍細胞のＡＤＣＣ死滅において、Ｆａｂ／Ｆａｂ形式を有する抗ＨＥＲ２コンストラクト（これも、ｓｃＦｖ／ｓｃＦｖ形式を有する抗原結合性コンストラクトよりは効力がある）よりも効力がある。いくつかの実施形態のＡＤＣＣ効力の増強は、１）低ＨＥＲ２受容体密度を有する細胞に積極的に結合し、続いて、ターゲット細胞表面上でＨＥＲ２受容体をクラスター化し、下流の細胞媒介性死滅を媒介するそれらの能力の増大；および／または２）（内部移行をもたらすのではなく）細胞表面上に残存するそれらの能力の増大によるものであり得；したがって、それらは、細胞媒介性エフェクター死滅にさらに利用可能である。

【００３６】

ＨＥＲ２

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

【００３７】

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

【００３８】

ＨＥＲ２はＨＥＲ受容体である。「ＨＥＲ受容体」は、ヒト上皮成長因子受容体（ＨＥＲ）ファミリーに属する受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、これには、ＥＧＦＲ

、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、およびＨＥＲ４受容体が含まれる。ＨＥＲ受容体は一般に、ＨＥＲリガンドに結合し得る細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびリン酸化され得る複数個のチロシン残基を収容しているカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含むであろう。「ＨＥＲリガンド」とは、ＨＥＲ受容体に結合し、かつ／またはそれを活性化するポリペプチドを意味する。

【００３９】

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

【００４０】

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

```
  1 tqvctgtdmk lrlpaspeth ldmlrhlyqg cqvvqgnlel tylptnasls flqdiqevqg
 61 yvliahnqvr qvplqrlriv rgtqlfedny alavldngdp lnnttpvtga spgglrelql
121 rslteilkgg vliqrnpqlc yqdtilwkdi fhknnqlalt lidtnrsrac hpcspmckgs
181 rcwgessedc qsltrtvcag gcarckgplp tdccheqcaa gctgpkhsdc laclhfnhsg
241 icelhcpalv tyntdtfesm pnpegrytfg ascvtacpyn ylstdvgsct lvcplhnqev
301 taedgtqrce kcskpcarvc yglgmehlre vravtsaniq efagckkifg slaflpesfd
361 gdpasntapl qpeqlqvfet leeitgylyi sawpdslpdl svfqnlqvir grilhngays
421 ltlqglgisw lglrslrelg sglalihhnt hlcfvhtvpw dqlfrnphqa llhtanrped
481 ecvgeglach qlcarghcwg pgptqcvncs qflrgqecve ecrvlqglpr eyvnarhclp
541 chpecqpqng svtcfgpead qcvacahykd ppfcvarcps gvkpdlsymp iwkfpdeega
601 cqpcpin (SEQ ID NO:xxx)
```

【００４１】

「エピトープ２Ｃ４」は、抗体２Ｃ４が結合するＨＥＲ２の細胞外ドメインの領域である。エピトープ２Ｃ４は、ＨＥＲ２の細胞外ドメインのドメインＩＩからの残基を含む。２Ｃ４およびペルツズマブは、ドメインＩ、ＩＩ、およびＩＩＩの接続部でＨＥＲ２の細胞外ドメインに結合する。Ｆｒａｎｋｌｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ５：３１７－３２８（２００４）。２Ｃ４エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ（１９８８）において記載されているアッセイなどの常套的なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。別法では、当技術分野で公知の方法を使用して、その抗体がＨＥＲ２の２Ｃ４エピトープに結合するかどうかを評価するために、エピトープマッピングを行うことができ、かつ／またはＨＥＲ２のどのドメイン（複数可）が抗体に結合するかを調べるために、抗体－ＨＥＲ２構造を研究することができる（Ｆｒａｎｋｌｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ５：３１７－３２８（２００４））。

【００４２】
「エピトープ４Ｄ５」は、抗体４Ｄ５（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１０４６３）およびトラスツズマブが結合するＨＥＲ２の細胞外ドメイン中の領域である。このエピトープは、ＨＥＲ２の膜貫通ドメインに近く、かつＨＥＲ２のドメインＩＶ内にある。４Ｄ５エピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，　Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ，　Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，　Ｅｄ　Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｄａｖｉｄ　Ｌａｎｅ　（１９８８）において記載されているアッセイなどの常套的なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。別法では、その抗体がＨＥＲ２の４Ｄ５エピトープ（例えば、両端を含めてほぼ残基５２９からほぼ残基６２５の領域にある任意の１個または複数個の残基（米国特許出願公開第２００６／００１８８９９号の図１を参照されたい））に結合するかどうかを評価するために、エピトープマッピングを行うことができる。

【００４３】
「特異的に結合する」、「特異的結合」、または「選択的結合」は、その結合がその抗原について選択的であり、望ましくないか、または非特異的相互作用とは区別され得ることを意味する。特異的抗原決定基に結合する抗原結合性コンストラクトの能力は、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）または当業者が熟知する他の技術、例えば、表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）技術（ＢＩＡｃｏｒｅ機器で分析）（Ｌｉｊｅｂｌａｄ　ｅｔ　ａｌ，　Ｇｌｙｃｏ　Ｊ　１７，　３２３－３２９　（２０００））、および従来の結合アッセイ（Ｈｅｅｌｅｙ，　Ｅｎｄｏｃｒ　Ｒｅｓ　２８，　２１７－２２９　（２００２））によって測定することができる。一実施形態では、例えば、ＳＰＲによって測定した場合、無関係タンパク質への抗原結合性部分の結合規模は、その抗原への抗原結合性コンストラクトの結合の約１０％未満である。ある特定の実施形態では、その抗原に結合する抗原結合性コンストラクト、またはその抗原結合性部分を含む抗原結合性分子は、１μＭ未満、１００ｎＭ未満、１０ｎＭ未満、１ｎＭ未満、０．１ｎＭ未満、０．０１ｎＭ未満、または０．００１ｎＭ未満（例えば、10^{-8}Ｍ以下、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（K_D）を有する。

【００４４】
「ヘレグリン」（ＨＲＧ）は、本明細書において使用する場合、米国特許第５，６４１，８６９号またはＭａｒｃｈｉｏｎｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ，　３６２：３１２－３１８　（１９９３）において開示されているとおりのヘレグリン遺伝子産物によってコードされるポリペプチドを指す。ヘレグリンの例には、ヘレグリン－α、ヘレグリン－β１、ヘレグリン－β２、およびヘレグリン－β３（Ｈｏｌｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２５６：１２０５－１２１０　（１９９２）；および米国特許第５，６４１，８６９号）；ｎｅｕ分化因子（ＮＤＦ）（Ｐｅｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．　Ｃｅｌｌ　６９：　２０５－２１６　（１９９２））；アセチルコリン受容体誘導活性（ＡＲＩＡ）（Ｆａｌｌｓ　ｅｔ　ａｌ．　Ｃｅｌｌ　７２：８０１－８１５　（１９９３））；グリア成長因子（ＧＧＦ）（Ｍａｒｃｈｉｏｎｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ，　３６２：３１２－３１８　（１９９３））；感覚・運動ニューロン由来因子（ＳＭＤＦ）（Ｈｏ　ｅｔ　ａｌ．　Ｊ．　Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．　２７０：１４５２３－１４５３２　（１９９５））；γ－ヘレグリン（Ｓｃｈａｅｆｅｒ　ｅｔ　ａｌ．　Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　１５：１３８５－１３９４　（１９９７））が含まれる。この用語は、そのＥＧＦ様ドメイン断片（例えば、ＨＲＧβ１１７７－２４４）など、天然の配列ＨＲＧポリペプチドの生物学的に活性な断片および／またはアミノ酸配列変異体を含む。

【００４５】
「ＨＥＲ活性化」または「ＨＥＲ２活性化」は、任意の１種または複数種のＨＥＲ受容体またはＨＥＲ２受容体の活性化またはリン酸化を指す。一般に、ＨＥＲ活性化は、シグナル伝達をもたらす（例えば、ＨＥＲ受容体または基質ポリペプチド中のチロシン残基をリン酸化するＨＥＲ受容体の細胞内キナーゼドメインに起因するもの）。ＨＥＲ活性化は、対象ＨＥＲ受容体を含むＨＥＲ二量体へのＨＥＲリガンドの結合によって媒介され得る。

ＨＥＲ二量体へのＨＥＲリガンドの結合は、その二量体中のＨＥＲ受容体の１つまたは複数のキナーゼドメインを活性化させ得、それによって、ＨＥＲ受容体の１つもしくは複数中のチロシン残基のリン酸化、および／またはＡｋｔもしくはＭＡＰＫ細胞内キナーゼなどの追加の基質ポリペプチド（複数可）中のチロシン残基のリン酸化をもたらす。

【００４６】

誘導型抗原結合性ポリペプチドコンストラクト

抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、ドメインの種類に関わらず、公知の抗ＨＥＲ２抗体または抗ＨＥＲ２結合性ドメインから誘導され得る。ドメインの種類の例には、Ｆａｂ断片、ｓｃＦｖ、およびｓｄＡｂが含まれる。さらに、公知の抗ＨＥＲ２抗体の抗原結合性部分または結合性ドメインがＦａｂであるならば、そのＦａｂを、ｓｃＦｖに変換することができる。同様に、公知の抗ＨＥＲ２抗体の抗原結合性部分または結合性ドメインがｓｃＦｖであるならば、そのｓｃＦｖをＦａｂに変換することができる。抗原結合性ドメインの種類を変換する方法は、当技術分野で公知である（例えば、例えばＺｈｏｕ　ｅｔ　ａｌ　（２０１２）　Ｍｏｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ　１１：１１６７－１１７６に記載のｓｃＦｖをＦａｂ形式に変換するための方法を参照されたい。そこに記載の方法は、参照によって組み込まれる）。

【００４７】

本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、ＥＣＤ２またはＥＣＤ４に結合する公知の抗ＨＥＲ２抗体に由来し得る。本明細書の他の箇所において記載しているとおり、ＥＣＤ２またはＥＣＤ４に結合する抗体は、当技術分野で公知であり、それらには、例えば、２Ｃ４またはペルツズマブ（ＥＣＤ２に結合する）、４Ｄ５またはトラスツズマブ（ＥＣＤ４に結合する）が含まれる。ＨＥＲ２のＥＣＤ２またはＥＣＤ４に結合する他の抗体も、当技術分野において、例えば、ＷＯ２０１１／１４７９８２（Ｇｅｎｍａｂ　Ａ／Ｓ）において記載されている。

【００４８】

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、ＨＥＲ２のＥＣＤ４への抗体４Ｄ５またはトラスツズマブの結合を５０％以上遮断する抗体から誘導されている。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトの抗原結合性ポリペプチドコンストラクトは、ＨＥＲ２のＥＣＤ２への抗体２Ｃ４またはペルツズマブの結合を５０％以上遮断する抗体から誘導されている。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、ＨＥＲ２のＥＣＤ２への抗体２Ｃ４またはペルツズマブの結合を３０％以上遮断する抗体から誘導されている。

【００４９】

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

【００５０】

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

【００５１】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有するキメラ抗体である。大部分について、ヒト化抗体は、そのレシピエントの超可変領域からの残基が所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域からの残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（ＦＲ）残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に存在しない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに改良するために成される。一般に、ヒト化抗体は、その超可変ループのすべてか、または実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつそのＦＲのすべてか、または実質

的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のＦＲである少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的にすべてを含む。ヒト化抗体は任意選択によりまた、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－ ５２５ （１９８６）； Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．, Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－３２９ （１９８８）；およびＰｒｅｓｔａ, Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．２：５９３－５９６（１９９２）を参照されたい。

【００５２】

ヒト化ＨＥＲ２抗体には、参照によって本明細書に明らかに組み込まれる米国特許第５，８２１，３３７号の表３において記載されているとおりのｈｕＭＡｂ４Ｄ５－１、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－２、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－３、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－４、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－５、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－６、ｈｕＭＡｂ４Ｄ５－７、およびｈｕＭＡｂ４Ｄ５－８またはトラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標））；米国特許出願公開第２００６／００１８８９９号において記載されているとおりのヒト化５２０Ｃ９（ＷＯ９３／２１３１９）および２０'ヒト化２Ｃ４抗体が含まれる。

【００５３】

親和性成熟

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、親和性成熟を使用する公知のＨＥＲ２結合抗体から誘導されている。

【００５４】

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

【００５５】

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

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

変異	報告された改善
H_D102W (H_D98W)	3.2X
H_D102Y	3.1X
H_D102K	2.3X
H_D102T	2.2X
H_N55K	2.0X
H_N55T	1.9X
L_H91F	2.1X
L_D28R	1.9X

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

変異	報告された改善
L_I31A	1.9X
L_Y96A	2.1X
L_Y96F	2.5X
H_T30A	2.1X
H_G56A	8.3X
H_F63V	1.9X

【００５６】

抗原結合性コンストラクトのＦｃ

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

【００５７】

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

【００５８】

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

【００５９】

いくつかの態様では、Ｆｃは、少なくとも１つまたは２つのＣＨ３配列を含む。いくつ

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

【００６０】

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

【００６１】

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

【００６２】

修飾ＣＨ３ドメイン

いくつかの態様では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、非対称に修飾されている修飾ＣＨ３ドメインを含むヘテロ二量体Ｆｃを含む。ヘテロ二量体Ｆｃは、２つの重鎖定常ドメインポリペプチド、すなわち、第１のＦｃポリペプチドおよび第２のＦｃポリペプチドを含むことができ、これらは、Ｆｃが１つの第１のＦｃポリペプチドおよび１つの第２のＦｃポリペプチドを含むという条件で、互換的に使用され得る。一般に、第１のＦｃポリペプチドは、第１のＣＨ３配列を含み、第２のＦｃポリペプチドは、第２のＣＨ３配列を含む。

【００６３】

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

【００６４】

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

【００６５】

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

表Ａ：ＩｇＧ１　Ｆｃ配列

ヒトIgG1 Fc配列 231～447（EU付番）	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: xxx)

変異IgG1 Fc配列 (231-447)	鎖	変異
1	A	L351Y_F405A_Y407V
1	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
2	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
3	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
4	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
5	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

【００６６】

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

【００６７】

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

【００６８】

一実施形態では、ヘテロ二量体Ｆｃは、第１のＣＨ３配列がＬ３５１、Ｆ４０５、およびＹ４０７位にアミノ酸修飾を有し、第２のＣＨ３配列がＴ３６６、Ｋ３９２、およびＴ３９４位にアミノ酸修飾を有し、上記第１または第２のＣＨ３配列の一方がＤ３９９ＲまたはＤ３９９Ｋのアミノ酸修飾をさらに含み、他方のＣＨ３配列がＴ４１１Ｅ、Ｔ４１１Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、およびＫ３９２Ｄの１つまたは複数を含む修飾ＣＨ３ドメインを含む。別の実施形態では、ヘテロ二量体Ｆｃは、第１のＣＨ３配列がＬ３５１、Ｆ４０５、およびＹ４０７位にアミノ酸修飾を有し、第２のＣＨ３配列がＴ３

６６、Ｋ３９２、およびＴ３９４位にアミノ酸修飾を有し、上記第１または第２のＣＨ３配列の一方がＤ３９９ＲまたはＤ３９９Ｋのアミノ酸修飾をさらに含み、他方のＣＨ３配列がＴ４１１Ｅ、Ｔ４１１Ｄ、Ｋ４０９Ｅ、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ３９２Ｅ、およびＫ３９２Ｄの１つまたは複数を含み、上記ＣＨ３配列の一方または両方がアミノ酸修飾Ｔ３５０Ｖをさらに含む修飾ＣＨ３ドメインを含む。

【００６９】

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

【００７０】

一実施形態では、ヘテロ二量体Ｆｃは、次のアミノ酸修飾を含む修飾ＣＨ３ドメインを含む（ここで、「Ａ」は、第１のＣＨ３配列に対するアミノ酸修飾を表し、「Ｂ」は、第２のＣＨ３配列に対するアミノ酸修飾を表す）：Ａ：Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｂ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ、Ａ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｓ４００Ｅ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、および／またはＢ：Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｎ３９０Ｒ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ。

【００７１】

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

【００７２】

一実施形態では、ＣＨ３ドメインの安定性は、ＣＨ３ドメインの融解温度を測定することによって、例えば、示差走査熱分析（ＤＳＣ）によって評価することができる。したがって、さらなる一実施形態では、ＣＨ３ドメインは、約６８℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、ＣＨ３ドメインは、約７０℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、ＣＨ３ドメインは、約７２℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、ＣＨ３ドメインは、約７３℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、ＣＨ３ドメインは、約７５℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、ＣＨ３ドメインは、約７８℃以上の融解温度を有する。いくつかの態様では、二量化ＣＨ３配列は、約６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７７．５、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、または８５℃以上の融解温度（Ｔｍ）を有する。

【００７３】

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

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

【００７４】

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

【００７５】

ＣＨ２ドメイン

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

【００７６】

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

ｔｈｏｄｓ　４：２５－３４　（１９９４）；およびｄｅ　Ｈａａｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．　１２６：３３０－４１　（１９９５）において総説されている。本明細書において「ＦｃＲ」という用語には、将来同定されるものを含む他のＦｃＲが内包される。この用語はまた、胎児への母系ＩｇＧの移行を担う新生児型受容体ＦｃＲｎを包含する（Ｇｕｙｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７　（１９７６）；およびＫｉｍ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９　（１９９４））。

【００７７】

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

【００７８】

ＦｃへのＦｃｒの結合を変更する例示的な変異を、下記に列挙する。

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

Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｖ３０５Ｉ／Ｐ３９６Ｌ、Ｆ２４３Ｌ／Ｒ２９２Ｐ／Ｙ３００Ｌ／Ｌ２３５Ｖ／Ｐ３９６Ｌ（Ｓｔａｖｅｎｈａｇｅｎ　ＪＢ，Ｇｏｒｌａｔｏｖ　Ｓ，Ｔｕａｉｌｌｏｎ　Ｎ，ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２００７　Ｓｅｐ　１５；６７（１８）：８８２－９０；Ｎｏｒｄｓｔｒｏｍ　ＪＬ，Ｇｏｒｌａｔｏｖ　Ｓ，Ｚｈａｎｇ　Ｗ，ｅｔ　ａｌ．Ｂｒｅａｓｔ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．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　ＵＳＡ．　２００６　Ｍａｒ　１４；１０３（１１）：４００５－１０）；

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

Ｓ２３９Ｄ／Ｄ２６５Ｓ／Ｓ２９８Ａ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｅ／Ｓ２９８Ａ／Ｋ３２６Ａ／Ａ３２７Ｈ、Ｇ２３７Ｆ／Ｓ２９８Ａ／Ａ３３０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｄ／Ｉ３３２Ｅ／Ｓ２９８Ａ、Ｓ２３９Ｄ／Ｋ３２６Ｅ／Ａ３３０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ／Ｓ２９８Ａ、Ｇ２３６Ａ／Ｓ２３９Ｄ／Ｄ２７０Ｌ／Ｉ３３２Ｅ、Ｓ２３９Ｅ／Ｓ２６７Ｅ／Ｈ２６８Ｄ、Ｌ２３４Ｆ／Ｓ２６７Ｅ／Ｎ３２５Ｌ、Ｇ２３７Ｆ／Ｖ２６６Ｌ／Ｓ２６７Ｄ、ならびに参照によって本明細書に組み込まれるＷＯ２０１１／１２０１３４およびＷＯ２０１１／１２０１３５に列挙されている他の変異。Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ（Ｗｉｌｌｉａｍ　Ｒ．Ｓｔｒｏｈｌ　ａｎｄ　Ｌｉｌａ　Ｍ．Ｓｔｒｏｈｌ，Ｗｏｏｄｈｅａｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　ｓｅｒｉｅｓ　ｉｎ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ　Ｎｏ　１１，ＩＳＢＮ　１　９０７５６８　３７　９，Ｏｃｔ　２０１２）は、２８３頁において変異を列挙している。

【００７９】

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

する二量体Ｆｃとを含む。いくつかの実施形態では、ＣＨ２ドメインは、１つまたは複数の非対称アミノ酸修飾を含む。例示的な非対称変異が、国際特許出願ＰＣＴ／ＣＡ２０１４／０５０５０７において記載されている。

【００８０】

エフェクター機能を改善するための追加の修飾

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、エフェクター機能を媒介するその能力を改善するための修飾を含む。そのような修飾は、当技術分野で公知であり、それらには、非フコシル化、またはＡＤＣＣのための受容体、主にＦＣＧＲ３ａの活性化およびＣＤＣのためのＣ１ｑに向けてのＦｃの親和性の操作が含まれる。次の表Ｂに、エフェクター機能を操作するために文献において報告された様々な設計をまとめる。

【００８１】

アミノ酸配列を変更することなく、Ｆｃ糖鎖形成部位（ＥＵ付番でＡｓｎ２９７）上にフコースをほとんど有さないか、またはフコースを有さない抗原結合性コンストラクトを生成する方法は、当技術分野で周知である。ＧｌｙｍａＸ（登録商標）技術（ＰｒｏＢｉｏＧｅｎ　ＡＧ）は、フコース生合成の細胞経路を偏向させる酵素のための遺伝子を、抗原結合性コンストラクト生成のために使用される細胞に導入することに基づく。これによって、抗原結合性コンストラクト産生細胞によるＮ連結抗体炭水化物部分への糖「フコース」の付加が妨げられる（ｖｏｎ　Ｈｏｒｓｔｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ．２０１０　Ｄｅｃ；２０（１２）：１６０７－１８）。フコシル化のレベルを低下させた抗原結合性コンストラクトを得るための別の手法を、米国特許第８，４０９，５７２号において見出すことができ、これは、抗原結合性コンストラクト上でより低いレベルのフコシル化をもたらすそれらの能力について、抗原結合性コンストラクト生成のための細胞系を選択することを教示している。抗原結合性コンストラクトは、完全に非フコシル化されていてよいか（検出可能なフコースを含まないことを意味する）、または部分的に非フコシル化されていてよい（その単離抗体が、哺乳動物発現系によって産生された同様の抗体で通常検出されるフコースの量の９５％未満、８５％未満、７５％未満、６５％未満、５５％未満、４５％未満、３５％未満、２５％未満、１５％未満、または５％未満を含有することを意味する）。

【００８２】

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

表Ｂ：ＣＨ２ドメインおよびエフェクター機能操作

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

【００８３】

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

【００８４】

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

表Ｃ：ＦｃへのＦｃγＲまたは補体結合を低減するための修飾

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

【００８５】

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

【００８６】

リンカーおよびリンカーポリペプチド

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

【００８７】

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

を参照されたい）。

【００８８】

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

【００８９】

他の実施形態では、リンカーポリペプチドは、Ｆｃ以外の骨格に機能的に連結されている。いくつかの代替タンパク質または分子ドメインが当技術分野で公知であり、２個の異なる抗原結合性ポリペプチドからなる選択的対を形成するために使用することができる。例は、一緒に選択的に対になるＦｏｓおよびＪｕｎなどのロイシンジッパードメインである［Ｓ Ａ Ｋｏｓｔｅｌｎｙ, Ｍ Ｓ Ｃｏｌｅ, ａｎｄ Ｊ Ｙ Ｔｓｏ. Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ｏｆ ａ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｂｙ ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｌｅｕｃｉｎｅ ｚｉｐｐｅｒｓ. Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １９９２ １４８：１５４７－５３； Ｂｅｍｄ Ｊ. Ｗｒａｎｉｋ, Ｅｒｉｎ Ｌ. Ｃｈｒｉｓｔｅｎｓｅｎ, Ｇａｂｒｉｅｌｅ Ｓｃｈａｅｆｅｒ, Ｊａｎｅｔ Ｋ. Ｊａｃｋｍａｎ, Ａｎｄｒｅｗ Ｃ. Ｖｅｎｄｅｌ, ａｎｄ Ｄａｎ Ｅａｔｏｎ. ＬＵＺ－Ｙ, ａ Ｎｏｖｅｌ Ｐｌａｔｆｏｒｍ ｆｏｒ ｔｈｅ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｆｕｌｌ－ｌｅｎｇｔｈ ＩｇＧ－ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ Ｊ. Ｂｉｏｌ. Ｃｈｅｍ. ２０１２ ２８７： ４３３３１－４３３３９］。別法では、バルナーゼ－バルスターの対［Ｄｅｙｅｖ, Ｓ. Ｍ., Ｗａｉｂｅｌ, Ｒ., Ｌｅｂｅｄｅｎｋｏ, Ｅ. Ｎ., Ｓｃｈｕｂｉｇｅｒ, Ａ. Ｐ., ａｎｄ Ｐｌｉｉｃｋｔｈｕｎ, Ａ. （２００３）. Ｄｅｓｉｇｎ ｏｆ ｍｕｌｔｉｖａｌｅｎｔ ｃｏｍｐｌｅｘｅｓ ｕｓｉｎｇ ｔｈｅ ｂａｍａｓｅ＊ｂａｒｓｔａｒ ｍｏｄｕｌｅ. Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２１, １４８６－１４９２］、ＤＮＡ鎖対［Ｚａｈｉｄａ Ｎ. Ｃｈａｕｄｒｉ, Ｍｉｃｈａｅｌ Ｂａｒｔｌｅｔ－Ｊｏｎｅｓ, Ｇｅｏｒｇｅ Ｐａｎａｙｏｔｏｕ, Ｔｈｏｍａｓ Ｋｌｏｎｉｓｃｈ, Ｉｖａｎ Ｍ. Ｒｏｉｔｔ, Ｔｏｒｂｅｎ Ｌｕｎｄ, Ｐｅｔｅｒ Ｊ. Ｄｅｌｖｅｓ, Ｄｕａｌ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ｕｓｉｎｇ ａ ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｂｒｉｄｇｅ, ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ, Ｖｏｌｕｍｅ ４５０, Ｉｓｓｕｅｓ １－２, ３０ Ａｐｒｉｌ １９９９, Ｐａｇｅｓ ２３－２６］、分割蛍光タンパク質対［Ｕｌｒｉｃｈ Ｂｒｉｎｋｍａｎｎ, Ａｌｅｘａｎｄｅｒ Ｈａａｓ. Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎ, ｉｔｓ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｕｓｅ, ＷＯ ２０１１１３５０４０ Ａ１］などの他の選択的対リング分子対を使用することもできる。

【００９０】

解離定数（K_D）および最大結合（Ｂｍａｘ）

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

【００９１】

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

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

【００９２】

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

【００９３】

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

【００９４】

「Ｂｍａｘ」または最大結合という用語は、抗原結合性コンストラクトの飽和濃度での、細胞における最大抗原結合性コンストラクトの結合レベルを指す。このパラメータは、相対比較のための任意の単位ＭＦＩで報告し得るか、または標準曲線を使用して、細胞に結合した抗原結合性コンストラクトの数に対応する絶対値に変換することができる。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、基準抗原結合性コンストラクトのＢｍａｘの１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、または２．０倍のＢｍａｘを示す。

【００９５】

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

【００９６】

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

Ｂｍａｘの約１１０％超である。
【００９７】
エフェクター機能の増大
一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、それぞれ対応する単一特異性二価抗原結合性コンストラクトと比較して（すなわち、ＥＣＤ２に結合する単一特異性二価抗原結合性コンストラクトまたはＥＣＤ４に結合する単一特異性二価抗原結合性コンストラクトと比較して）、かつ／または２つの単一特異性二価抗原結合性コンストラクトの組み合わせと比較して、エフェクター機能の増大を示す。抗体「エフェクター機能」は、抗体のＦｃドメイン（天然配列Ｆｃドメインまたはアミノ酸配列変異型Ｆｃドメイン）に帰せられる生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例には、Ｃ１ｑ結合；補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ＡＤＣＣ）；抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）；細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体；ＢＣＲ）のダウンレギュレーションなどが含まれる。
【００９８】
ＡＤＣＣ
したがって一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式であり、ＡＤＣＣアッセイにおいて、１＋レベルでＨＥＲ２を発現する細胞において、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも高い効力を示す。
【００９９】
一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、ＡＤＣＣアッセイにおいて、トラスツズマブまたはその類似体である基準抗原結合性コンストラクトよりも大きな最大細胞溶解を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式であり、ＡＤＣＣアッセイにおいて、トラスツズマブもしくはその類似体である基準抗原結合性コンストラクト、またはトラスツズマブまたはペルツズマブ類似体の組み合わせよりも、大きな最大細胞溶解を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式であり、ＡＤＣＣアッセイにおいて、１＋以上のレベルでＨＥＲ２を発現する細胞において、トラスツズマブまたはその類似体である基準抗原結合性コンストラクトよりも大きな最大細胞溶解を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式であり、ＡＤＣＣアッセイにおいて、ＨＥＲ２　２＋／３＋細胞において、トラスツズマブまたはその類似体である基準抗原結合性コンストラクトよりも高い効力を示す。
【０１００】
内部移行
本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、受容体ＨＥＲ２への結合によって、ＨＥＲ２＋細胞に内部移行される。したがって、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、ＨＥＲ２＋細胞において受容体内部移行を誘導し得る。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式であり、３＋レベルでＨＥＲ２を発現する細胞において、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも大きいＨＥＲ２内部移行を誘導する。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式であり、２＋または３＋レベルでＨＥＲ２を発現する細胞において、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも大きなＨＥＲ２内部移行を誘導する。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式であり、１＋、２＋、または３＋レベルでＨＥＲ２を発現する細胞において、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式である形式基準抗原結合性コンストラクトよりも大きなＨＥＲ２内部移行を誘導する。
【０１０１】
細胞傷害活性
二重特異性抗原結合性コンストラクトは、本明細書の他の箇所で記載されているとおりＡＤＣとして調製され得、細胞に対して細胞傷害性である。一実施形態では、二重特異性

抗原結合性コンストラクトＡＤＣは、ＨＥＲ２＋乳癌細胞における細胞傷害性または細胞生存アッセイにおいて、ＨＥＲ２　１＋、２＋、２＋／３＋、または３＋細胞において、トラスツズマブもしくはその類似体である基準抗原結合性コンストラクト、またはＴ－ＤＭ１およびペルツズマブの組み合わせである基準抗原結合性コンストラクトよりも高い効力を示す。

【０１０２】

ＦｃγＲへの結合能の増大

いくつかの実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、１種または複数種のＦｃγＲへの、より高い結合能（Ｒｍａｘ）を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、ホモ二量体Ｆｃを有するｖ５０６またはｖ６２４６である基準抗原結合性コンストラクトと比較して約１．３～２倍の１種または複数種のＦｃγＲに対するＲｍａｘの増大を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、基準二価抗原結合性コンストラクトと比較して約１．３～１．８倍のＣＤ１６　ＦｃγＲに対するＲｍａｘの増大を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、基準二価抗原結合性コンストラクトと比較して約１．３～１．８倍のＣＤ３２　ＦｃγＲに対するＲｍａｘの増大を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、基準二価抗原結合性コンストラクトと比較して約１．３～１．８倍のＣＤ６４　ＦｃγＲに対するＲｍａｘの増大を示す。

【０１０３】

ＦｃγＲについての親和性の増大

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

【０１０４】

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

【０１０５】

ＦｃＲｎ結合およびＰＫパラメータ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、ＦｃＲｎに結合し得る。当技術分野で公知のとおり、ＦｃＲｎへの結合は、細胞内取り込みされた抗体をエンドソームから血流へと戻して再循環させる（Ｒａｇｈａｖａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ　１２：１８１－２２０；Ｇｈｅｔｉｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０００，Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　１８：７３９－７６６）。このプロセスは、全長分子のサイズが大きいことによる腎臓濾過の除外と結びついて、１～３週間の範囲の好ましい抗体血清半減期をもたらす。ＦｃＲｎへのＦｃの結合も、抗体輸送において重要な役割を果たす。

【０１０６】

薬物動態パラメータ

ある特定の実施形態では、本明細書において提供する二重特異性抗原結合性コンストラクトは、市販の治療用抗体に匹敵する薬物動態（ＰＫ）特性を示す。一実施形態では、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性コンストラクトは、血清濃度、ｔ１／２、ベータ半減期、および／またはＣＬに関して既知の治療用抗体と同等のＰＫ特性を示す。一実施形態では、二重特異性抗原結合性コンストラクトは、上記単一特異性二価抗原結合性コンストラクトに匹敵するか、それ以上のｉｎ　ｖｉｖｏ安定性を示す。そのようなｉｎ　ｖｉｖｏ安定性パラメータには、血清濃度、ｔ１／２、ベータ半減期、および／またはＣＬが

含まれる。

【０１０７】

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

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

【０１０８】

抗原結合性コンストラクトの試験：ＨＥＲ２結合

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

【０１０９】

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

表Ｄ　対象細胞系におけるＨＥＲ２の相対的発現レベル

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

【０１１０】

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

【０１１１】

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

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】

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

【０１１５】

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

【０１１６】
対象抗体が結合するＥｒｂＢ２上のエピトープに結合する抗原結合性コンストラクトをスクリーニングするために、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ（１９８８）において記載されているものなどの常套的なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。別法では、または加えて、当技術分野で公知の方法によって、エピトープマッピングを行うことができる。
【０１１７】
抗原結合性コンストラクト間の競合は、試験中の抗原結合性コンストラクトが、共通の抗原への基準抗原結合性コンストラクトの特異的な結合を阻害また遮断するアッセイによって決定することができる（例えば、Ｊｕｎｇｈａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５０：１４９５，１９９０；Ｆｅｎｄｌｙ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５０：１５５０－１５５８；米国特許第６，９４９，２４５号を参照されたい）。競合結合アッセイにおいて測定した場合に、過剰な試験抗原結合性コンストラクト（例えば、少なくとも２倍、５倍、１０倍、２０倍、または１００倍）が、基準抗原結合性コンストラクトの結合を例えば、少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％阻害または遮断する場合に、試験抗原結合性コンストラクトは、基準抗原結合性コンストラクトと競合する。競合アッセイ（抗原結合性コンストラクトと競合）によって同定される抗原結合性コンストラクトには、基準抗原結合性コンストラクトと同じエピトープに結合する抗原結合性コンストラクト、および基準抗原結合性コンストラクトが結合するエピトープに、立体障害が生じるほど十分に近接して隣接するエピトープに結合する抗原結合性コンストラクトが含まれる。例えば、ＨＥＲ２への結合について、本明細書に記載の第１の抗原結合性コンストラクトと競合する第２の競合性抗原結合性コンストラクトが同定され得る。ある特定の場合には、第２のコンストラクトは、競合結合アッセイにおいて測定した場合に、第１のコンストラクトの結合を例えば、少なくとも５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％遮断または阻害し得る。ある特定の場合には、第２のコンストラクトは、５０％、６０％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、または９９％超で、第１のコンストラクトに置き換わり得る。
【０１１８】
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、ｉｎ ｖｉｖｏで、例えば、動物モデルにおいて、機能についてアッセイする。いくつかの実施形態では、動物モデルは、表Ｅに記載の動物モデルである。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、基準抗原結合性コンストラクトと比較して、動物モデルにおける処置の有効性の増大を示す。
表Ｅ：ＨＥＲ２結合性抗原結合性コンストラクトを試験するための動物モデル

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

【０１１９】

基準抗原結合性コンストラクト

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

【０１２０】

抗原結合性コンストラクトおよび抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）

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

【０１２１】

いくつかの実施形態では、薬物は、メイタンシン、オーリスタチン、カリケアマイシン、またはそれらの誘導体から選択される。他の実施形態では、薬物は、ＤＭ１およびＤＭ４から選択されるメイタンシンである。さらなる例を下記に記載する。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、薬物は、ＳＭＣＣリンカー（ＤＭ１）またはＳＰＤＢリンカー（ＤＭ４）で、単離抗原結合性コンストラクトにコンジュゲートされている。追加の例を下記に記載する。抗原結合性タンパク質に対する薬物の比（ＤＡＲ）は、例えば、１．０～６．０または３．０～５．０、または３．５～４．２であり得る。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、細胞傷害性薬物にコンジュゲートされている。「細胞傷害性薬物」という用語は、本明細書において使用する場合、細胞の機能を阻害もしくは阻止し、かつ／または細胞の破壊をもたらす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、Ａｔ２１１、Ｉ１３１、Ｉ１２５、Ｙ９０、Ｒｅ１８６、Ｒｅ１８８、Ｓｍ１５３、Ｂｉ２１２、Ｐ３２、およびＬｕ１７７）、化学療法薬、ならびにその断片および／または変異体を含む細菌、真菌、植物、または動物由来の小分子毒素または酵素活性な毒素などの毒素を含むことが意図されている。さらなる例を下記に記載する。

【０１２４】

薬物

ＡＤＣの様々な実施形態において使用される薬物またはペイロードの非限定的例には、ＤＭ１（メイタンシン、Ｎ２'－デアセチル－Ｎ２'－（３－メルカプト－１－オキソプロピル）－またはＮ２'－デアセチル－Ｎ２'－（３－メルカプト－１－オキソプロピル）－メイタンシン）、ｍｃ－ＭＭＡＤ（６－マレイミドカプロイル－モノメチルオーリスタチン－ＤまたはＮ－メチル－Ｌ－バリル－Ｎ－［（１Ｓ，２Ｒ）－２－メトキシ－４－［（２Ｓ）－２－［（１Ｒ，２Ｒ）－１－メトキシ－２－メチル－３－オキソ－３－［［（１Ｓ）－２－フェニル－１－（２－チアゾリル）エチル］アミノ］プロピル］－１－ピロリジニル］－１－［（１Ｓ）－１－メチルプロピル］－４－オキソブチル］－Ｎ－メチル－（９Ｃｌ）－Ｌ－バリンアミド）、ｍｃ－ＭＭＡＦ（マレイミドカプロイル－モノメチルオーリスタチンＦまたはＮ－［６－（２，５－ジヒドロ－２，５－ジオキソ－１Ｈ－ピロル－１－イル）－１－オキソヘキシル］－Ｎ－メチル－Ｌ－バリル－Ｌ－バリル－（３Ｒ，４Ｓ，５Ｓ）－３－メトキシ－５－メチル－４－（メチルアミノ）ヘプタノイル－（αＲ，βＲ，２Ｓ）－β－メトキシ－α－メチル－２－ピロリジンプロパノイル－Ｌ－フェニルアラニン）およびｍｃ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＰＡＢＡ－ＭＭＡＥ（６－マレイミドカプロイル－ＶａｌｃＣｉｔ－（ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル）－モノメチルオーリスタチンＥまたはＮ－［［［４－［［Ｎ－［６－（２，５－ジヒドロ－２，５－ジオキソ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－１－オキソヘキシル］－Ｌ－バリル－Ｎ５－（アミノカルボニル）－Ｌ－オルニチル］アミノ］フェニル］メトキシ］カルボニル］－Ｎ－メチル－Ｌ－バリル－Ｎ－［（１Ｓ，２Ｒ）－４－［（２Ｓ）－２－［（１Ｒ，２Ｒ）－３－［［（１Ｒ，２Ｓ）－２－ヒドロキシ－１－メチル－２－フェニルエチル］アミノ］－１－メトキシ－２－メチル－３－オキソプロピル］－１－ピロリジニル］－２－メトキシ－１－［（１Ｓ）－１－メチルプロピル］－４－オキソブチル］－Ｎ－メチル－Ｌ－バリンアミド）が含まれる。ＤＭ１は、チューブリン阻害薬メイタンシンの誘導体であり、ＭＭＡＤ、ＭＭＡＥ、およびＭＭＡＦは、オーリスタチン誘導体である。

【０１２５】

メイタンシノイド薬物部分

上で示したとおり、いくつかの実施形態では、薬物はメイタンシノイドである。例示的なメイタンシノイドには、ＤＭ１、ＤＭ３（Ｎ^{2}'－デアセチル－Ｎ^{2}'－（４－メルカプト－１－オキソペンチル）メイタンシン）、およびＤＭ４（Ｎ^{2}'－デアセチル－Ｎ^{2}'－（４－メチル－４－メルカプト－１－オキソペンチル）メチルメイタンシン）（米国特許出願公開第２００９０２０２５３６を参照されたい）が含まれる。

【０１２６】

メイタンシン化合物上の多くの位置が、連結の種類に応じて、連結位置として有用であることが公知である。例えば、エステル連結を形成するためには、ヒドロキシル基を有するＣ－３位、ヒドロキシメチルで修飾されたＣ－１４位、ヒドロキシル基で修飾されたＣ－１５位、およびヒドロキシル基を有するＣ－２０位がすべて適している。

【０１２７】

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

【０１２８】

オーリスタチン

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

【０１２９】

化学療法薬

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

【０１３０】

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

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

【０１３１】

コンジュゲートリンカー

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

【０１３２】

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

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

【０１３３】

ＡＤＣの調製

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

【０１３４】

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

【０１３５】

抗原結合性コンストラクトの調製方法

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

【０１３６】

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

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

【０１４０】

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

【０１４１】

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

【０１４２】

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

【０１４３】

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

【０１４４】

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

【０１４５】

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

【０１４６】

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

【０１４７】

脊椎動物細胞も、宿主として使用することができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合させた哺乳動物細胞系が有用である。有用な哺乳動物宿主細胞系の他の例は、ＳＶ４０によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１系（ＣＯＳ－７）；ヒト胎児由来腎臓系（例えば、Ｇｒａｈａｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ Ｖｉｒｏｌ．３６：５９（１９７７）において記載されているとおりの２９３または２９３細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）；マウスセルトリ細胞（例えば、Ｍａｔｈｅｒ，Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．２３：２４３－２５１（１９８０）において記載されているとおりのＴＭ４細胞）；サル腎臓細胞（ＣＶ１）；アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ ３Ａ）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８）；ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ Ｇ２）；マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ ０６０５６２）；例えば、Ｍａｔｈｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎａｌｓ Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．３８３：４４－６８（１９８２）において記載されているとおりのＴＲＩ細胞；ＭＲＣ５細胞；およびＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞系には、ＤＨＦＲ－ ＣＨＯ細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（Ｕｒｌａｕｂ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７７：４２１６（１９８０））；ならびにＹ０、ＮＳ０、およびＳｐ２／０などの骨髄腫細胞系が含まれる。抗原結合性コンストラクト生成に適したある特定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えば、Ｙａｚａｋｉ ａｎｄ Ｗｕ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，Ｎ．Ｊ．

），ｐｐ．２５５－２６８（２００３）を参照されたい。

【０１４８】

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

【０１４９】

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

【０１５０】

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

【０１５１】

必要な場合には、抗原結合性コンストラクトを、発現の後に精製または単離することができる。タンパク質は、当業者に知られている様々な方法で単離または精製することができる。標準的な精製方法には、ＦＰＬＣおよびＨＰＬＣなどのシステムを使用して常圧または高圧で実施するイオン交換、疎水性相互作用、親和性、サイジングまたはゲル濾過、および逆相を含むクロマトグラフィー技術が含まれる。精製方法には、電気泳動、免疫学的、沈殿、透析、およびクロマトフォーカシング技術も含まれる、限外濾過および透析濾過技術も、タンパク質濃度と併せて有用である。当技術分野で周知のとおり、様々な天然タンパク質が、Ｆｃおよび抗体に結合し、これらのタンパク質を、抗原結合性コンストラクトを精製するために本発明において使用することができる。例えば、細菌プロテインＡおよびＧは、Ｆｃ領域に結合する。同様に、細菌プロテインＬは、数種の抗体のＦａｂ領域に結合する。精製は多くの場合に、特定の融合パートナーによって可能になり得る。例えば、ＧＳＴ融合を使用する場合には、グルタチオン樹脂を、Ｈｉｓタグを使用する場合には、Ni^{+2}アフィニティークロマトグラフィーを、またはフラッグタグを使用する場合には、固定化抗フラッグ抗体を使用して、抗体を精製することができる。適切な精製技術における一般的なガイダンスについては、例えば、全体が参照によって本明細書に組み込まれるＰｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，３rdＥｄ．，Ｓｃｏｐｅｓ，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，ＮＹ，１９９４を参照されたい。必要な精製程度は、抗原結合性コンストラクトの使用に応じて様々であろう。場合によっては、精製は必要ない。

【０１５２】

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

【０１５３】

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

ン交換クロマトグラフィーを使用して精製する。

【０１５４】

加えて、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトは、当技術分野で公知の技術を使用して化学的に合成することができる（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，１９８３，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ & Ｃｏ．，Ｎ．Ｙ ａｎｄ Ｈｕｎｋａｐｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３１０：１０５－１１１（１９８４）を参照されたい）。例えば、ポリペプチドの断片に対応するポリペプチドは、ペプチドシンセサイザーの使用によって合成することができる。さらに、所望の場合には、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸類似体を、ポリペプチド配列に置換または付加として導入することができる。非古典的アミノ酸には、限定されないが、一般的なアミノ酸のＤ－異性体、２，４－ジアミノ酪酸、アルファ－アミノイソ酪酸、４アミノ酪酸、Ａｂｕ、２－アミノ酪酸、ｇ－Ａｂｕ、ｅ－Ａｈｘ、６アミノヘキサン酸、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、Ｃα－メチルアミノ酸、Ｎα－メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、およびアミノ酸類似体が一般に含まれる。さらに、アミノ酸は、Ｄ（右旋性）またはＬ（左旋性）であってよい。

【０１５５】

翻訳後修飾：

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

【０１５６】

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

【０１５７】

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

【０１５８】

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

【０１５９】

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

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

【０１６０】

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

【０１６１】

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

【０１６２】

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

【０１６３】

薬学的組成物

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

【０１６４】

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

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

【０１６５】

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

【０１６６】

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

【０１６７】

治療方法

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

【０１６８】

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

【０１６９】
「対象」という用語は、処置、観察、または実験の対象である動物、いくつかの実施形態では、哺乳動物を指す。動物は、ヒト、非ヒト霊長類、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコなど）、牧場動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）、または実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモットなど）であってよい。
【０１７０】
「哺乳動物」という用語には、本明細書において使用する場合、限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、マウス、ウシ、ウマ、およびブタが含まれる。
【０１７１】
「処置」は、処置を受ける個体または細胞の自然の経過を変更しようとする臨床的介入を指し、予防のためか、または臨床病理の経過中に行うことができる。処置の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患のいずれかの直接的または間接的病的帰結の減弱、転移の予防、疾患進行の減速、病態の改善または寛解、および緩解または予後の改善が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、疾患または障害の発生を遅延させるために使用する。一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトおよび方法は、腫瘍を退縮させる。一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトおよび方法は、腫瘍／癌の増殖を阻害する。
【０１７２】
処置の望ましい効果には、限定されないが、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患のいずれかの直接的または間接的病的帰結の減弱、転移の予防、疾患進行の減速、病態の改善または寛解、生存率の改善、および緩解または予後の改善が含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、疾患の発生を遅延させるか、または疾患の進行を減速させるために使用する。
【０１７３】
「有効量」という用語は、本明細書において使用する場合、列挙された方法の目標を達成する、例えば、処置を受けている疾患、状態、または障害の症状の１つまたは複数をある程度軽減する、コンストラクトの投与量を指す。治療上のタンパク質の異常な発現および／または活性に関連する疾患または障害を処置、阻害、および予防する際に有効であろう本明細書に記載の組成物の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。加えて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイを、任意選択により、最適な投薬量範囲を同定する助けとするために使用することができる。製剤において使用される正確な用量はまた、投与経路、疾患または障害の重篤性に左右されるはずであり、従事者および各患者の状況の判断によって決定されるべきである。有効な用量を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたは動物モデル試験系に由来する用量反応曲線から外挿する。
【０１７４】
抗原結合性コンストラクトを対象に投与する。様々な送達系、例えば、リポソーム、マイクロ粒子、マイクロカプセルへの封入、化合物を発現し得る組換え細胞、受容体媒介細胞内取り込み作用（例えば、Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗｕ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２　（１９８７）を参照されたい）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸のコンストラクションなどが公知であり、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクト製剤を投与するために使用することができる。導入方法には、限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が含まれる。化合物または組成物を、任意の簡便な経路によって、例えば、注入または大量注射によって、上皮性または粘膜皮膚内層（例えば、口腔粘膜、直腸、および腸管粘膜など）を介しての吸収によって投与することができ、他の生物学的活性薬剤と一緒に投与することができる。投与は、全身でも局所でもよい。加えて、ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクト組成物を、脳室内および髄腔内注射を含む任意の適切な経路によって中枢神経系へと導入することが望ましく；脳室内注射は、例えば、Ｏｍｍａｙａレザバーなどのレザバーに取り付けられた脳室内カテーテルによって促

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

【０１７５】

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

【０１７６】

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

【０１７７】

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

【０１７８】

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

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

【０１７９】

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

【０１８０】

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

【０１８１】

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

【０１８２】

癌を処置する方法

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

【０１８３】

ＨＥＲ２＋癌とは、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトがその癌に結合し得るような、ＨＥＲ２を発現する癌を意味する。当技術分野で公知のとおり、ＨＥＲ２＋癌は、ＨＥＲ２を様々なレベルで発現する。癌におけるＥｒｂＢ、例えば、ＥｒｂＢ２（ＨＥＲ２）発現を決定するために、様々な診断／予後アッセイが利用可能である。一実施形態では、ＥｒｂＢ２過剰発現を、ＩＨＣによって、例えば、ＨＥＲＣＥＰＴＥＳＴ（登録商標）（Ｄａｋｏ）を使用して分析することができる。腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をＩＨＣアッセイに掛け、次のとおりのＥｒｂＢ２タンパク質染色強度基準を与えることができる：

スコア０

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

スコア１＋

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

スコア２＋

弱から中程度の膜全体の染色が、腫瘍細胞の１０％超において観察される。

スコア３＋

中程度から強度の膜全体の染色が、腫瘍細胞の１０％超において観察される。

【０１８４】

ＥｒｂＢ２過剰発現評価について０または１＋のスコアを示す腫瘍は、ＥｒｂＢ２を過剰発現していないと特徴づけられ得るが、２＋または３＋のスコアを示す腫瘍は、ＥｒｂＢ２を過剰発現していると特徴づけられ得る。

【０１８５】
別法では、または加えて、腫瘍におけるＥｒｂＢ２過剰発現の規模（もしあるならば）を決定するために、ＩＮＦＯＲＭ（商標）（Ｖｅｎｔａｎａ（Ａｒｉｚ．）によって販売）またはＰＡＴＨＶＩＳＩＯＮ（商標）（Ｖｙｓｉｓ（Ｉｌｌ．））などの蛍光ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）アッセイをホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍組織において実施することができる。ＩＨＣアッセイと比較して、ＨＥＲ２遺伝子増幅を測定するＦＩＳＨアッセイは、ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）での処置に対する患者の応答とより良好に相関しているようであり、ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）処置から利益を受け得る患者を特定するために好ましいアッセイであると現在判断されている。
【０１８６】
表Ｄに、いくつかの代表的な乳癌および他の癌細胞系でのＨＥＲ２の発現レベルを記載している（Ｓｕｂｉｋ ｅｔ ａｌ．（２０１０）Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ：Ｂａｓｉｃ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ：４；３５－４１；Ｐｒａｎｇ ｅｔ ａ．（２００５）Ｂｒｉｔｉｓｈ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ：９２；３４２－３４９）。表において示すとおり、ＭＣＦ－７およびＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞は、低ＨＥＲ２発現細胞であると判断され；ＪＩＭＴ－１およびＺＲ－７５－１細胞は、中程度ＨＥＲ２発現細胞であると判断され、ＳＫＢＲ３およびＢＴ－４７４細胞は、高度ＨＥＲ２発現細胞であると判断される。ＳＫＯＶ３（卵巣癌）細胞は、中程度ＨＥＲ２発現細胞であると判断される。
【０１８７】
ＨＥＲ２＋癌または腫瘍を有する対象を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む有効量の薬学的組成物を提供することを含む方法を本明細書において記載する。
【０１８８】
また、癌または腫瘍を処置するための医薬品を製造するための、本明細書に記載のＨＥＲ２抗原結合性コンストラクトの使用を本明細書において記載する。また、癌または腫瘍の処置において使用するためのＨＥＲ２抗原結合性コンストラクトを本明細書において記載する。
【０１８９】
具体的な実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、ｖ１００００、ｖ７０９１、ｖ５０１９、またはｖ５０２０である。一実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、ｖ１００００である。いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトは、メイタンシン（ＤＭ１）にコンジュゲートされている。ＤＭ１にコンジュゲートされている抗原結合性コンストラクトが腫瘍細胞に内部移行されると、ＤＭ１は、細胞内でコンストラクトから切断されて、腫瘍細胞を死滅させる。
【０１９０】
いくつかの実施形態では、処置を受ける対象は、膵臓癌、頭頸部癌、胃癌、結腸直腸癌、乳癌、腎臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、脳癌、子宮内膜癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、または表皮由来癌を有する。いくつかの実施形態では、腫瘍は転移性である。
【０１９１】
一般に、処置を受ける対象における腫瘍は、腫瘍細胞１個当たり平均１０，０００以上のＨＥＲ２のコピーを発現する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、ＩＨＣによって判定した場合にＨＥＲ２　０～１＋、１＋、ＨＥＲ２　２＋、またはＨＥＲ２　３＋である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、ＨＥＲ２　２＋以下、またはＨＥＲ２　１＋以下である。
【０１９２】
いくつかの実施形態では、抗原結合性コンストラクトでの処置を受ける対象の腫瘍は、乳癌である。具体的な一実施形態では、乳癌は、ＨＥＲ２を２＋レベル以下で発現する。具体的な一実施形態では、乳癌は、ＨＥＲ２を１＋レベル以下で発現する。いくつかの実施形態では、乳癌は、エストロゲン受容体（ＥＲ＋）および／またはプロゲステロン受容

体（ＰＲ＋）を発現する。いくつかの実施形態では、乳癌は、ＥＲ－およびまたはＰＲ－である。いくつかの実施形態では、乳癌は、増幅ＨＥＲ２遺伝子を有する。いくつかの実施形態では、乳癌は、ＨＥＲ２　３＋、エストロゲン受容体陰性（ＥＲ－）、プロゲステロン受容体陰性（ＰＲ－）、トラスツズマブ抵抗性、化学療法抵抗性の侵襲性導管性乳癌である。別の実施形態では、乳癌は、ＨＥＲ２　３＋、ＥＲ－、ＰＲ－、トラスツズマブ抵抗性の炎症性乳癌である。別の実施形態では、乳癌は、ＨＥＲ２　３＋、ＥＲ－、ＰＲ－の侵襲性腺管癌である。別の実施形態では、乳癌は、ＨＥＲ２　２＋、ＨＥＲ２遺伝子増幅トラスツズマブおよびペルツズマブ抵抗性の乳癌である。いくつかの実施形態では、乳癌は、三重陰性（ＥＲ－、ＰＲ－、および低ＨＥＲ２発現）である。

【０１９３】

一実施形態では、腫瘍は、増幅ＨＥＲ２遺伝子を有するＨＥＲ２　２／３＋卵巣上皮性腺癌である。

【０１９４】

他の標準治療療法に対して抵抗性であるか、または抵抗性になりつつあるＨＥＲ２＋腫瘍を有する対象を処置する方法であって、対象に、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む薬学的組成物を投与することを含む方法を本明細書において提供する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを、現行の治療に対して応答しない対象に、任意選択により１種または複数種の現行の抗ＨＥＲ２治療と組み合わせて提供する。いくつかの実施形態では、現行の抗ＨＥＲ２治療には、限定されないが、抗ＨＥＲ２または抗ＨＥＲ３単一特異性二価抗体、トラスツズマブ、ペルツズマブ、Ｔ－ＤＭ１、二重特異性ＨＥＲ２／ＨＥＲ３　ｓｃＦｖ、またはそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態では、癌は、タキサンなどの様々な化学療法薬に対して抵抗性である。いくつかの実施形態では、癌は、トラスツズマブに対して抵抗性である。いくつかの実施形態では、癌は、ペルツズマブに対して抵抗性である。一実施形態では、癌は、ＴＤＭ１（ＤＭ１にコンジュゲートされたトラスツズマブ）に対して抵抗性である。いくつかの実施形態では、対象は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、またはＤＭ１などの抗ＨＥＲ２抗体で以前に処置されている。いくつかの実施形態では、対象は、抗ＨＥＲ２抗体で以前に処置されている。一実施形態では、患者が以前の抗ＨＥＲ２療法で進行している場合に、抗原結合性コンストラクトを転移癌の処置のために対象に与える。

【０１９５】

ＨＥＲ２＋腫瘍を有する対象を処置する方法であって、本明細書に記載の抗原結合性コンストラクトを含む有効量の薬学的組成物を、追加の抗腫瘍薬と併せて与えることを含む方法を本明細書において提供する。追加の抗腫瘍薬は、上述のとおりの治療用抗体または化学療法薬であってよい。本発明の抗原結合性コンストラクトと併用するために有用な化学療法薬には、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、アルブミン結合パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタビン、ビノレルビン、イリノテカン、エトポシド、ビンブラスチン、ペメトレキセド、５－フルオロウラシル（フォリン酸を含むか、または含まない）、カペシタビン、カルボプラチン、エピルビシン、オキサリプラチン、フォルフィリノックス（ｆｏｌｆｉｒｉｎｏｘ）、アブラキサン、およびシクロホスファミドが含まれる。

【０１９６】

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

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

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

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

【０２００】

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

【０２０１】

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

【０２０２】

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

【０２０３】

いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、次の細胞系（図３７および３８において図示）の１種または複数種であってよい：膵臓腫瘍細胞系のＢｘＰＣ３、Ｃａｐａｎ－１、ＭｉａＰａｃａ２；肺腫瘍細胞系のＣａｌｕ－３、ＮＣＩ－Ｈ３２２；頭頸部腫瘍細胞系のＤｅｔｒｏｉｔ　５６２、ＳＣＣ－２５、ＦａＤｕ；結腸直腸腫瘍細胞系のＨＴ２９、ＳＮＵ－Ｃ２Ｂ；胃腫瘍細胞系のＮＣＩ－Ｎ８７；乳房腫瘍細胞系のＭＣＦ－７、ＭＤＡＭＢ１７５、ＭＤＡＭＢ３６１、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１、ＢＴ－２０、ＪＩＭＴ－１、ＳｋＢｒ３、ＢＴ－４７４；子宮腫瘍細胞系のＴＯＶ－１１２Ｄ；皮膚腫瘍細胞系のＭａｌｍｅ－３Ｍ；子宮頸部腫瘍細胞系のＣａｓｋｉ、ＭＳ７５１；膀胱腫瘍細胞系のＴ２４、卵巣腫瘍細胞系のＣａＯＶ３およびＳＫＯＶ３。

【０２０４】

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

【０２０５】

キットおよび製品

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

【０２０６】

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

【０２０７】

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

【０２０８】

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

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

【０２０９】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチド

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

【０２１０】

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

【０２１１】

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

【０２１２】

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

にアミノ酸に特徴的であると当技術分野で公知の特性を有する化学的に合成された化合物が含まれる。天然に存在しないアミノ酸の例には、限定されないが、α－メチルアミノ酸（例えば、α－メチルアラニン）、Ｄ－アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（例えば、２－アミノ－ヒスチジン、β－ヒドロキシ－ヒスチジン、ホモヒスチジン）、側鎖に外部メチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、および側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置き換えられているアミノ酸（例えば、システイン酸）が含まれる。本発明のタンパク質に、合成非天然アミノ酸、置換アミノ酸、または１個もしくは複数個のＤ－アミノ酸を含む非天然アミノ酸を導入することが、いくつかの異なる方法において有利であり得る。Ｄ－アミノ酸含有ペプチドなどは、Ｌ－アミノ酸－含有対応物と比較して、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏで安定性の増大を示す。したがって、Ｄ－アミノ酸を組み込むペプチドなどの構築は、より大きな細胞内安定性が望まれるか、または必要な場合には、特に有用であり得る。より具体的には、Ｄ－ペプチドなどは、内在性ペプチダーゼおよびプロテアーゼに対して抵抗性があり、それによって、そのような特性が望ましい場合には、ｉｎ ｖｉｖｏでの分子の生物学的利用能の改善および長時間の寿命をもたらす。加えて、Ｄ－ペプチドなどは、ヘルパーＴ細胞に対する主要組織適合性複合体クラスＩＩ制限提示について効率的にプロセシングされ得ず、したがって、生体全体における体液性免疫応答を誘導する可能性が低い。

【０２１３】

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

【０２１４】

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

【０２１５】

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

【０２１６】

「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に当てはまる。特定の核酸配列に関して、「保存的に修飾された変異体」は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指すか、本質的に同一の配列に対してアミノ酸配列をコードしない核酸を指す。遺伝コードの縮重によって、多数の機能的に同一の核酸が、いずれか

の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンＧＣＡ、ＧＣＣ、ＧＣＧ、およびＧＣＵはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって規定されているいずれの位置においても、コードされるポリペプチドを変更することなく、そのコドンを、記載されている対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸変異は、「サイレント変異」であり、これは、保存的に修飾された変異の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書に記載のいずれの核酸配列も、核酸の考えられるあらゆるサイレント変異を記載するものである。当業者であれば、核酸中の各コドン（通常、メチオニンのための唯一のコドンであるＡＵＧ、および通常、トリプトファンのための唯一のコドンであるＴＧＧ以外）を修飾して、機能的に同一の分子を得ることができることを認めるであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が、それぞれ記載の配列において暗示されている。

【０２１７】

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

【０２１８】

機能的に同様のアミノ酸をもたらす保存置換表は、当業者に公知である。次の８つの群はそれぞれ、相互に保存的置換であるアミノ酸を含む：１）アラニン（Ａ）、グリシン（Ｇ）；２）アスパラギン酸（Ｄ）、グルタミン酸（Ｅ）；３）アスパラギン（Ｎ）、グルタミン（Ｑ）；４）アルギニン（Ｒ）、リシン（Ｋ）；５）イソロイシン（Ｉ）、ロイシン（Ｌ）、メチオニン（Ｍ）、バリン（Ｖ）；６）フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）；７）セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）；および［０１３９］８）システイン（Ｃ）、メチオニン（Ｍ）（例えば、Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ Ｈ Ｆｒｅｅｍａｎ & Ｃｏ．；２ｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｄｅｃｅｍｂｅｒ １９９３）を参照されたい）。

【０２１９】

２つ以上の核酸またはポリペプチド配列の内容における「同一」または「同一」率という用語は、同じである２つ以上の配列またはサブ配列に関する。次の配列比較アルゴリズム（または当業者が利用可能な他のアルゴリズム）の１つを使用して測定して、または手動のアラインメントおよび目視検査によって、比較ウィンドウまたは指定の領域にわたって最大対応について比較およびアラインした場合に、同じ（すなわち、規定の領域にわたって同一性約６０％、約６５％、約７０％、約７５％、約８０％、約８５％、約９０％、または約９５％）であるアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージを有するならば、それらの配列は「実質的に同一」である。この定義はまた、試験配列の補体に関する。同一性は、少なくとも約５０アミノ酸またはヌクレオチド長である領域にわたって、または７５～１００アミノ酸またはヌクレオチド長である領域にわたって、または規定されていない場合には、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列全体を通して存在し得る。ヒト以外の種からの同族体を含めて、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、ライブラリを、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはその断片を有する標識プローブでスクリーニングするステップと、上記ポリヌクレオチド配列を含有する全長ｃＤＮＡおよびゲノムクローンを単離するステップとを含むプロセスによって得ることができる。そのようなハイブリダイゼーション技術は、当業者に周知である。

【０２２０】

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

【０２２１】

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

【０２２２】

配列同一率および配列類似率を決定するために適したアルゴリズムの一例は、ＢＬＡＳＴおよびＢＬＡＳＴ ２．０アルゴリズムであり、これらはそれぞれ、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ. （１９９７） Ｎｕｃ. Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ. ２５：３３８９－３４０２、およびＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ. （１９９０） Ｊ. Ｍｏｌ. Ｂｉｏｌ. ２１５：４０３－４１０において記載されている。ＢＬＡＳＴ分析を実行するためのソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センターを通じて公に利用可能であり、ワールドワイドウェブのｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖにおいて入手することができる。ＢＬＡＳＴアルゴリズムのパラメータW、T、およびXによって、アラインメントの感度および速度が決まる。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列で）は、初期設定値として、ワード長（Ｗ）１１、期待値（Ｅ）１０、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、および両ストランドの比較を使用する。アミノ酸配列では、ＢＬＡＳＴＰプログラムは、初期設定値として、ワード長３、期待値（Ｅ）１０、およびＢＬＯＳＵＭ６２スコアマトリクス（ＨｅｎｉｋｏｆｆおよびＨｅｎｉｋｏｆｆ（１９９２）Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ８９：１０９１５を参照されたい）アラインメント（Ｂ）５０、期待値（Ｅ）１０、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、および両ストランドの比較を用いる。ＢＬＡＳＴアルゴリズムを典型的には、「低複雑性」フィルターをオフにして行う。

【０２２３】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムはまた、２つの配列間の類似性の統計的解析を実行する（例えば、Ｋａｒｌｉｎ ａｎｄ Ａｌｔｓｃｈｕｌ （１９９３） Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ９０：５８７３－５７８７を参照されたい）。ＢＬＡＳＴアルゴリズムによって得られる類似性の測定値の１つは、最小合計確率（ｓｍａｌｌｅｓｔ ｓｕｍ ｐｒｏｂａｂｉｌｉｔｙ）（Ｐ（Ｎ））であり、これは、２つのヌクレオチド配列間か、または２つのアミノ酸配列間の一致が偶然に生じる確率を示す。例えば、核酸は、試験核酸と基準核酸との比較において最小合計確率が約０．２未満、または約０．０１未満、または約０．００１未満である場合に、基準配列と類似しているとみなさ

れる。
【０２２４】
「～と選択的に（または特異的に）ハイブリダイズする」という表現は、その配列が複雑な混合物（限定されないが、全細胞またはライブラリＤＮＡまたはＲＮＡを含む）中に存在する場合に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で分子が特定のヌクレオチド配列のみと結合、二重鎖化、またはハイブリダイズすることを指す。
【０２２５】
「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という表現は、当技術分野で公知のとおりの低いイオン強度および高温の条件下でのＤＮＡ、ＲＮＡ、もしくは他の核酸、またはそれらの組み合わせの配列のハイブリダイゼーションに関する。典型的には、ストリンジェントな条件下で、核酸の複雑な混合物（限定されないが、全細胞またはライブラリＤＮＡまたはＲＮＡを含む）中で、プローブはその標的サブ配列とハイブリダイズするが、その複雑な混合物中の他の配列とはハイブリダイズしない。ストリンジェントな条件は配列依存性であり、種々の状況において異なる。比較的長い配列は特に高い温度でハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションについての広範な指針は、Ｔｉｊｓｓｅｎ，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ-Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ｐｒｏｂｅｓ，"Ｏｖｅｒｖｉｅｗ ｏｆ ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ ａｎｄ ｔｈｅ ｓｔｒａｔｅｇｙ ｏｆ ｎｕｃｌｅｉｃ ａｃｉｄ ａｓｓａｙｓ"（１９９３）において見出される。
【０２２６】
本明細書において使用する場合、「操作する、操作された、操作すること」という用語は、天然に存在するか、もしくは組換えのポリペプチドまたはその断片のペプチド主鎖の任意の操作または翻訳後修飾を含むことが考慮される。操作には、アミノ酸配列、糖鎖形成パターン、または個々のアミノ酸の側鎖基の修飾、さらには、これらの手法の組み合わせが含まれる。操作されたタンパク質を、標準的な分子生物学技術によって発現および生成する。
【０２２７】
「単離核酸分子またはポリヌクレオチド」では、その天然環境から取り出されている核酸分子、ＤＮＡ、またはＲＮＡが意図されている。例えば、ベクター中に含有される、ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、単離されているとみなされる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例には、異種の宿主細胞中で維持されている組換えポリヌクレオチド、または溶液中の（部分的に、または実質的に）精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離ポリヌクレオチドには、ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞中に含まれるポリヌクレオチド分子が含まれるが、そのポリヌクレオチド分子は、染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。単離ＲＮＡ分子には、ｉｎ ｖｉｖｏまたはｉｎ ｖｉｔｒｏ ＲＮＡ転写物、さらには、ポジティブおよびネガティブストランド形態、ならびに二本鎖形態が含まれる。本明細書に記載の単離ポリヌクレオチドまたは核酸にはさらに、例えば、ＰＣＲまたは化学合成によって、合成されたそのような分子が含まれる。加えて、ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸には、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターなどの調節エレメントが含まれる。
【０２２８】
「ポリメラーゼ連鎖反応」または「ＰＣＲ」という用語は一般に、例えば、米国特許第４，６８３，１９５号において記載されているとおりのｉｎ ｖｉｔｒｏで所望のヌクレオチド配列を増幅するための方法を指す。一般に、ＰＣＲ方法は、テンプレート核酸に優先的にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドプライマーを使用するプライマー伸長合成の繰り返しサイクルを必要とする。
【０２２９】
本発明の基準ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば、９５％「同一な」ヌクレオチド

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

【０２３０】

ポリペプチドの誘導体または変異体は、その誘導体または変異体のアミノ酸配列が元のペプチドからの１００アミノ酸配列と少なくとも５０％の同一性を有する場合に、そのペプチドと「相同性」を共有しているか、それと「相同」であると記載される。ある特定の実施形態では、誘導体または変異体は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも７５％同じである。ある特定の実施形態では、誘導体または変異体は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも８５％同じである。ある特定の実施形態では、誘導体のアミノ酸配列は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも９０％同じである。いくつかの実施形態では、誘導体のアミノ酸配列は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも９５％同じである。ある特定の実施形態では、誘導体または変異体は、その誘導体と同じ数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片と少なくとも９９％同じである。

【０２３１】

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

【０２３２】

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

【０２３３】

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

【０２３４】

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

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

【０２３５】

参照文献

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

【実施例】

【０２３６】

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

【０２３７】

本発明の実行では、別段に示さない限り、当分野の技能の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組換えＤＮＡ技術、および薬理学の従来の方法を使用する。そのような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ（Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９３）；Ａ．Ｌ．Ｌｅｈｎｉｎｇｅｒ，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（Ｗｏｒｔｈ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｉｎｃ．，ｃｕｒｒｅｎｔ ａｄｄｉｔｉｏｎ）；Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（２ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９）；Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ｓ．Ｃｏｌｏｗｉｃｋ ａｎｄ Ｎ．Ｋａｐｌａｎ ｅｄｓ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）；Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｅａｓｔｏｎ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ：Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）；Ｃａｒｅｙ ａｎｄ Ｓｕｎｄｂｅｒｇ Ａｄｖａｎｃｅｄ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ３ｒｄ Ｅｄ．（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ）Ｖｏｌｓ Ａ ａｎｄ Ｂ（１９９２）を参照されたい。

【０２３８】

実施例１：　例示的な抗ＨＥＲ２二重特異性抗体および対照の調製

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

【０２３９】

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

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

【０２４０】

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

【０２４１】

例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体

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

（表１）例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体

変異体		鎖A	鎖B
5019	エピトープを含有するドメイン	ECD2	ECD4
	形式	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	CH3配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y407V	T366I_N390R_K392M_T394W
5020	エピトープを含有するドメイン	ECD4	ECD2
	形式	scFv	Fab
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ
	CH3配列置換	L351Y_S400E_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W
7091	エピトープを含有するドメイン	ECD2	ECD4
	形式	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ

	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W
10000	エピトープを 含有する ドメイン	ECD2	ECD4
	形式	Fab	scFv
	抗体名	ペルツズマブ - VL領域中にY96A およびVH領域中にT30A/A49G/L69F を含む	トラスツズマブ
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W
6902	エピトープを 含有する ドメイン	ECD2	ECD4
	形式	Fab	Fab
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ
	Fab 置換	HC: L143E_K145T LC: Q124R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W
6903	エピトープを 含有する ドメイン	ECD2	ECD4
	形式	Fab	Fab
	Fab 置換	HC: L143E_K145T LC: Q124R_Q1160K_T178R	HC: D146G_Q179K LC: Q124E_Q160E_T180E
	抗体名	トラスツズマブ	ペルツズマブ
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T350V_T366L_K392L_T394W
6717	エピトープを 含有する ドメイン	ECD4	ECD2
	形式	scFv	scFv
	抗体名	ペルツズマブ	トラスツズマブ
	CH3 配列置換	T350V_L351Y_F405A_Y405V	T366I_N390R_K392M_T394W

注釈：
・ＥＵ抗体の付番を参照しての、ＫａｂａｔでのＥＵインデックスによるＣＨ３付番（Ｅｄｅｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，１９６９，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ６３：７８－８５）；
・ＫａｂａｔによるＦａｂまたは可変ドメイン付番（Ｋａｂａｔ ａｎｄ Ｗｕ，１９９１；Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ．５ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ － ＵＳ Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ，ＮＩＨ ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ｎ° ９１－３２４２，ｐ ６４７（１

９９１））；
・「エピトープを含有するドメイン」＝抗原結合性部分が結合するＨＥＲ２のドメイン；
・「抗体名称」＝抗原結合性部分が由来する抗体は、存在する場合には野生型と比較される置換を含む；
・「Ｆａｂ置換」＝正確な軽鎖対形成を促進する、Ｆａｂにおける置換；
・「ＣＨ３配列置換」＝ヘテロ二量体Ｆｃの形成を促進する、ＣＨ３ドメインにおける置換。
【０２４２】
例示的な抗ＨＥＲ２一価対照抗体
ｖ１０４０：ＨＥＲ２結合性ドメインが、鎖Ａ上の、トラスツズマブから誘導されたＦａｂであり、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異を有し、鎖ＢにＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの変異を有するヘテロ二量体であり、鎖Ｂのヒンジ領域がＣ２２６Ｓの変異を有し；抗原結合性ドメインがＨＥＲ２のドメイン４に結合する一価抗ＨＥＲ２抗体。
【０２４３】
ｖ６３０：ＨＥＲ２結合性ドメインが、鎖Ａ上の、トラスツズマブから誘導されたｓｃＦｖであり、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＬ３５１Ｙ＿Ｓ４００Ｅ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異を有し、鎖ＢにＴ３６６Ｉ＿Ｎ３９０Ｒ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗの変異を有するヘテロ二量体であり；ヒンジ領域が両方の鎖にＣ２２６Ｓの変異（ＥＵ付番）を有し；抗原結合性ドメインがＨＥＲ２のドメイン４に結合する一価抗ＨＥＲ２抗体。
【０２４４】
ｖ４１８２：ＨＥＲ２結合性ドメインが、鎖Ａ上の、ペルツズマブから誘導されたＦａｂであり、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異を有し、鎖ＢにＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの変異を有するヘテロ二量体であり、鎖Ｂのヒンジ領域がＣ２２６Ｓの変異を有し；抗原結合性ドメインが、ＨＥＲ２のドメイン２に結合する一価抗ＨＥＲ２抗体。
【０２４５】
例示的な抗ＨＥＲ２単一特異性二価抗体対照（フルサイズ抗体、ＦＳＡ）
ｖ５０６は、対照として、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞において自家生成した野生型抗ＨＥＲ２である。ＨＥＲ２結合性ドメインは両方とも、Ｆａｂ形式でトラスツズマブから誘導されており、Ｆｃは、野生型ホモ二量体であり；抗原結合性ドメインは、ＨＥＲ２のドメイン４に結合する。この抗体は、トラスツズマブ類似体とも称される。
【０２４６】
ｖ７９２は、ＨＥＲ２結合性ドメインが両方とも、Ｆａｂ形式でトラスツズマブから誘導されており、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異および鎖ＢにＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの変異を有するヘテロ二量体であり；抗原結合性ドメインがＨＥＲ２のドメイン４に結合する、ＩｇＧ１ヒンジを備えた野生型トラスツズマブである。この抗体は、トラスツズマブ類似体とも称される。
【０２４７】
ｖ４１８４、ＨＥＲ２結合性ドメインが両方とも、Ｆａｂ形式でペルツズマブから誘導されており、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異および鎖ＢにＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの変異を有するヘテロ二量体である、二価抗ＨＥＲ２抗体。抗原結合性ドメインは、ＨＥＲ２のドメイン２に結合する。この抗体は、ペルツズマブ類似体とも称される。
【０２４８】
ｈＩｇＧは、市販の非特異的ポリクローナル抗体対照である（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、＃　００９－０００－００３）。
【０２４９】

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

【０２５０】

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

【０２５１】

ＣＨＯ細胞を、指数増殖期（１．５～２百万細胞／ｍｌ）において、２．５：１のＰＥＩ：ＤＮＡ比でｌｍｇ／ｍｌ ２５ｋＤａポリエチレンイミン水溶液（ＰＥＩ、ｐｏｌｙｓｃｉｅｎｃｅｓ）でトランスフェクトした（Ｒａｙｍｏｎｄ Ｃ. ｅｔ ａｌ. Ａ ｓｉｍｐｌｉｆｉｅｄ ｐｏｌｙｅｔｈｙｌｅｎｉｍｉｎｅ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ ｐｒｏｃｅｓｓ ｆｏｒ ｌａｒｇｅ－ｓｃａｌｅ ａｎｄ ｈｉｇｈ－ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ. Ｍｅｔｈｏｄｓ. ５５（１）：４４－５１ （２０１１））。ヘテロ二量体の形成に最適な濃度範囲を決定するために、ＤＮＡを、ヘテロ二量体形成を可能にする重鎖（ＨＣ－Ａ）、軽鎖（ＬＣ）、および重鎖Ｂ（ＨＣ－Ｂ）の最適なＤＮＡ比においてトランスフェクトした（例えば、ＨＣ－Ａ／ＨＣ－Ｂ／ＬＣ比＝３０：３０：４０（ｖ５０１９）。５～６日間の後に、トランスフェクトした細胞を培養培地と一緒に採集し、４０００ｒｐｍで遠心した後に収集し、０．４５μｍフィルターを使用して清澄化した。

【０２５２】

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

【０２５３】

プロテインＡ抗体溶離液を、ゲル濾過（ＳＥＣ）によってさらに精製した。ゲル濾過のために、抗体混合物３．５ｍｇを１．５ｍＬまで濃縮し、１ｍＬ／分の流速でＡＫＴＡ Ｅｘｐｒｅｓｓ ＦＰＬＣによってＳｅｐｈａｄｅｘ ２００ ＨｉＬｏａｄ １６／６００ ２００ｐｇカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に装填した。ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）を１ｍＬ／分の流速で使用した。精製抗体に対応する画分を収集し、約１ｍｇ／ｍＬに濃縮した。

【０２５４】
種々の分子形式を有する例示的な抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体（例えば、ｖ６７１７ではｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ　ＩｇＧ１；ｖ６９０３およびｖ６９０２ではＦａｂ－Ｆａｂ　ＩｇＧ１；ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００ではＦａｂ－ｓｃＦｖ　ＩｇＧ１）を上記のとおりクローニングし、発現させ、精製した。
【０２５５】
抗体純度を定量し、標的ヘテロ二量体タンパク質ならびに考えられ得るホモ二量体および／または半抗体および／または誤った対の軽鎖混入物の量を決定するために、ＬＣ－ＭＳインタクト質量分析（ｉｎｔａｃｔ　ｍａｓｓ　ａｎａｌｙｓｉｓ）を行った。ＬＣ－ＭＳインタクト質量分析は、ＡＤＣ分子のために使用されるＤＡＲ分析計算を除いて、実施例２において記載するとおりに行った。
【０２５６】
データを表２において示す。表２は、これらの二重パラトピック抗体の発現および精製が、ｖ６７１７では所望の生成物１００％、ｖ６９０３では所望のヘテロ二量体生成物９１％、およびｖ６９０２では所望の生成物６２％をもたらしたことを示している。括弧内の数値は、メインピークおよび＋８１Ｄａのサイドピークの合計量を示している。このサイドピークは典型的には、Ｃ末端ＨＡタグを含む変異体（ｖ６９０３およびｖ６９０２など）で検出される。メインピークおよびサイドピークを合わせると、ｖ６９０３およびｖ６９０３では、約９８％および６７％のヘテロ二量体純度が得られる。高いヘテロ二量体純度に基づき、ｖ６９０３を、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖおよびＦａｂ－ｓｃＦｖ形式と直接的に比較するための代表的なＦａｂ－Ｆａｂ抗ＨＥＲ２二重パラトピック変異体と特定した。ｖ６９０３は、すべての形式比較アッセイに含まれた。
（表２）抗体の発現および精製

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

【０２５７】
実施例２：　例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の調製
次の抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体薬物コンジュゲート（抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ）を調製した。変異体５０１９、７０９１、１００００、および５０６のＡＤＣを調製した。これらのＡＤＣは、次のとおりに特定される：
ｖ６３６３（ＤＭ１にコンジュゲートさせたｖ５０１９）
ｖ７１４８（ＤＭ１にコンジュゲートさせたｖ７０９１）
ｖ１０５５３（ＤＭ１にコンジュゲートさせたｖ１００００）
ｖ６２４６（ＤＭ１にコンジュゲートさせたｖ５０６、Ｔ－ＤＭ１、トラスツズマブ－エムタンシンと類似）
ｖ６２４９（ＤＭ１にコンジュゲートさせたヒトＩｇＧ）。
【０２５８】
ＡＤＣを、メイタンシンへの直接的なカップリングによって調製した。実施例１において記載したとおりにプロテインＡおよびＳＥＣによって精製した抗体（純度＞９５％）を、ＡＤＣ分子の調製において使用した。ＡＤＣを、Ｋｏｖｔｕｎ　ＹＶ，　Ａｕｄｅｔｔｅ　ＣＡ，　Ｙｅ　Ｙ，　ｅｔ　ａｌ．　Ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｒｕｇ　ｃｏｎｊｕｇａｔｅｓ　ｄｅｓｉｇｎｅｄ　ｔｏ　ｅｒａｄｉｃａｔｅ　ｔｕｍｏｒｓ　ｗｉｔｈ　ｈｏｍｏｇｅｎｅｏｕｓ　ａｎｄ　ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｏｕｓ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｏｆ　ｔｈｅ　ｔａｒｇｅｔ　ａｎｔｉｇｅｎ．　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２００６；６６：３２１４－２１において記載されている方法に従ってコンジュゲートさせた。ＡＤＣは

、ＬＣ／ＭＳによって決定されるとおり、また下記のとおり、抗体１個当たり３．０個のメイタンシノイド分子の平均モル比を有した。

【０２５９】

ＡＤＣコンジュゲーション反応において使用される試薬の詳細は次のとおりである：コンジュゲーション緩衝液１：５０ｍＭリン酸カリウム／５０ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ６．５、２ｍＭ　ＥＤＴＡ。コンジュゲーション緩衝液２：５０ｍＭコハク酸ナトリウム、ｐＨ５．０。ＡＤＣ調製緩衝液：２０ｍＭコハク酸ナトリウム、６％（ｗ／ｖ）トレハロース、０．０２％ポリソルベート２０、ｐＨ５．０。ジメチルアセトアミド（ＤＭＡ）；ＤＭＡ中の１０ｍＭ　ＳＭＣＣ（コンジュゲーションの前に調製）、ＤＭＡ中の１０ｍＭ　ＤＭ１－ＳＨ（コンジュゲーションの前に調製）、ＰＢＳ中の１ｍＭ　ＤＴＮＢ、緩衝液中の１ｍＭシステイン、２０ｍＭコハク酸ナトリウム、ｐＨ５．０。ＵＶ－ＶＩＳ分光光度計（Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ製のＮａｎｏ　ｄｒｏｐ　１００）、ＰＤ－１０カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）。

【０２６０】

ＡＤＣを次のとおりに調製した。出発抗体溶液を、コンジュゲーション緩衝液１　２５ｍＬで予め平衡化させておいたＰＤ－１０カラムに装填し、続いて、コンジュゲーション緩衝液１　０．５ｍｌを装填した。抗体溶離液を収集し、濃度をA_{280}で測定し、濃度を２０ｍｇ／ｍＬに調節した。ＤＭＡ中の１０ｍＭ　ＳＭＣＣ－ＤＭ１溶液を調製した。抗体に対して７．５モル当量のＳＭＣＣ－ＤＭ１を抗体溶液に添加し、ＤＭＡを１０％ｖ／ｖの最終ＤＭＡ体積まで添加した。反応物を短時間混合し、室温で２時間にわたってインキュベートした。第２のＰＤ－１０カラムをコンジュゲーション緩衝液１　２５ｍｌで平衡化させ、抗体－ＭＣＣ－ＤＭｌ溶液を、続いて、緩衝液１　０．５ｍｌをカラムに添加した。抗体－ＭＣＣ－ＤＭｌ溶離液を収集し、抗体溶液のA_{252}およびA_{280}を測定した。抗体－ＭＣＣ－ＤＭｌ濃度を算出した（$\varepsilon = 1.45\ mg^{-1}\ cm^{-1}$、または$217500\ M^{-1}\ cm^{-1}$）。ＡＤＣを、高ＭＷ分析のためのＳＥＣ－ＨＰＬＣカラムで分析した（ＳＥＣ－ＨＰＬＣカラムＴＯＳＯＨ、Ｇ３０００－ＳＷＸＬ、７．８ｍｍ×３０ｃｍ、緩衝液、１００ｍＭリン酸ナトリウム、３００ｍＭ塩化ナトリウム、ｐＨ７．０、流速：１ｍｌ／分）。

【０２６１】

ＡＤＣ薬－抗体比（ＤＡＲ）を、Ｔｏｓｏｈ　ＴＳＫゲルＢｕｔｙｌ－ＮＰＲカラム（４．６ｍｍ×３．５ｍｍ×２．５ｍｍ）を使用するＨＩＣ－ＨＰＬＣによって分析した。溶離を、２５分かけての１０～９０％緩衝液Ｂの勾配、続く、４分間の１００％緩衝液Ｂを使用して１ｍｌ／分で行った。緩衝液Ａは、２０ｍＭリン酸ナトリウム、１．５Ｍ硫酸アンモニウム、ｐＨ７．０を含む。緩衝液Ｂは、２０ｍＭリン酸ナトリウム、２５％ｖ／ｖイソプロパノール、ｐＨ７．０を含む。

【０２６２】

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

【０２６３】

流速：１ｍＬ／分、カラムの後に分流してＭＳには１００μＬ／分。溶媒：Ａ＝ｄｄＨ２Ｏ中の０．１％ギ酸、Ｂ＝６５％アセトニトリル、２５％ＴＨＦ、９．９％ｄｄＨ２０、０．１％ギ酸。カラム：２．１×３０ｍｍ　ＰｏｒｏｓＲ２。カラム温度：８０℃；溶媒も予め加熱。勾配：２０％Ｂ（０～３分）、２０～９０％Ｂ（３～６分）、９０～２０％Ｂ（６～７分）、２０％Ｂ（７～９分）。

【０２６４】

引き続いて、質量分析法（ＭＳ）を次の条件下で、Ｉｏｎ　Ｍａｘ　Ｅｌｅｃｔｒｏｓｐｒａｙを使用するイオン化法でＬＴＱ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ　ＸＬ質量分析計で実施した。校正およびチューニング方法：ＣｓＩの２ｍｇ／ｍＬ溶液を１０μＬ／分の流速で注入する。Ｏｒｂｉｔｒａｐを、Ａｕｔｏｍａｔｉｃ　Ｔｕｎｅ機能を使用してｍ／ｚ２２１

１にチューニングした（観察された全ＣｓＩイオン範囲：１６９０～２８００）。コーン電圧：４０Ｖ；チューブレンズ：１１５Ｖ；ＦＴ分解：７，５００；走査範囲ｍ／ｚ４００～４０００；走査遅延：１．５分。データの分子量プロファイルを、Ｔｈｅｒｍｏ'ｓ Ｐｒｏｍａｓｓデコンボリューションソフトウェアを使用して生成した。試料の平均ＤＡＲを、各画分ピークで観察されたＤＡＲの関数として決定した（計算式：Σ（ＤＡＲ×画分ピーク強度）を使用）。

【０２６５】

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

（表３）

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

【０２６６】

実施例３：　抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の発現およびベンチスケール精製

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

【０２６７】

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

【０２６８】

プロテインＡ抗体溶離液を、ゲル濾過（ＳＥＣ）によってさらに精製した。ゲル濾過のために、抗体混合物３．５ｍｇを１．５ｍＬに濃縮し、１ｍＬ／分の流速でＡＫＴＡ Ｅｘｐｒｅｓｓ ＦＰＬＣによって、Ｓｅｐｈａｄｅｘ ２００ ＨｉＬｏａｄ １６／６００ ２００ｐｇカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に装填した。ＰＢＳ緩衝液（ｐＨ７．４）を１ｍＬ／分の流速で使用した。精製抗体に対応する画分を収集し、約１ｍｇ／ｍＬに濃縮した。精製タンパク質を、実施例２において記載したとおりにＬＣ－ＭＳによって分析した。

【０２６９】

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

【０２７０】

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

Ｅゲルは、ｖ１００００が純粋であり、非還元条件下で約１２５ｋＤａの正確な予測ＭＷで泳動することを示している。還元条件下では、ＣＨ－Ａ重鎖（約４９ｋＤａ）およびＣＨ－Ｂ重鎖（約５２．５ｋＤａ）に対応する２つの重鎖バンドを視認することができ；ＣＨ－Ａ軽鎖を視認することができ、これは、約２３．５ｋＤａの正確な予測質量で泳動する。これらの結果は、抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が発現されること、およびプロテインＡによるワンステップ精製が純粋なタンパク質試料をもたらすことを示している。さらなる定量を、ＵＰＬＣ－ＳＥＣおよびＬＣ－ＭＳ分析によって行い、実施例４において記載する。

【０２７１】

実施例４：　ＵＰＬＣ－ＳＥＣおよびＬＣ－ＭＳによる二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の純度の分析

例示的なプロテインＡおよびＳＥＣ精製された二重パラトピック抗ＨＥＲ２ヘテロ多量体の純度および凝集率を、上記の方法によるＵＰＬＣ－ＳＥＣによって決定した。

【０２７２】

ＵＰＬＣ－ＳＥＣ分析を、３０℃に設定したＷａｔｅｒｓ　ＢＥＨ２００　ＳＥＣカラム（２．５ｍＬ、４．６×１５０ｍｍ、ステンレス鋼、１．７μｍ粒子）を使用して０．４ｍｌ／分で行った。泳動時間は７分であり、２５ｍＭリン酸ナトリウム、１５０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ７．１；および１５０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ６．４～７．１からなる泳動緩衝液を用いて、注入１回当たりの全体積は２．８ｍＬであった。吸光度による検出を、１９０～４００ｎｍで蛍光によって容易にし、２８０ｎｍで励起し、発光を３００～３６０ｎｍで収集した。ピーク積分をＥｍｐｏｗｅｒ３　ソフトウェアによって分析した。

【０２７３】

貯留ｖ５０１９ＳＥＣ画分のＵＰＬＣ－ＳＥＣ結果を図３Ａにおいて示す。これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が、プロテインＡおよびＳＥＣクロマトグラフィーによってＨＭＷ種１％未満で純度９９％超まで精製されたことを示している。

【０２７４】

ｖ１００００の貯留プロテインＡ画分のＵＰＬＣ－ＳＥＣ結果を図３Ｂにおいて示す。これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が、プロテインＡおよびクロマトグラフィーによってＨＭＷ種１％未満で純度９６％超まで精製されたことを示している。

【０２７５】

例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の純度を、実施例２において記載した方法によって、標準的な条件下でＬＣ－ＭＳを使用して決定した。ｖ５０１９の貯留ＳＥＣ画分のＬＣ－ＭＳ分析からの結果を図４Ａにおいて示す。このデータは、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２ヘテロ二量体が１００％のヘテロ二量体純度を有することを示している。ｖ１００００の貯留プロテインＡ画分のＬＣ－ＭＳ分析からの結果を図４Ｂにおいて示す。このデータは、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２ヘテロ二量体が、ワンステッププロテインＡ精製後に、９８％のヘテロ二量体純度を有することを示している。

【０２７６】

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

【０２７７】

実施例５．プロテインＡおよびＣＥＸクロマトグラフィーによって精製された二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の大規模発現および製造可能性の評価

実施例１に記載の例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体ｖ５０１９を２５Ｌ規模で発現させ、次のとおりに精製した。

【０２７８】

抗体を上清から得、記載のプロトコルによるプロテインＡ精製（ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）樹脂；ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）、続く、カチオン交換クロマトグラフィー（

ＨｉＴｒａｐ（商標）ＳＰ　ＦＦ樹脂；ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）からなる２ステップ精製方法を続けた。

【０２７９】

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

【０２８０】

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

【０２８１】

精製タンパク質を、実施例１に記載のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、および実施例４に記載の方法によるヘテロ二量体純度のためのＬＣ－ＭＳによって分析した。結果を、図５Ａおよび５Ｂにおいて示す。図５Ａは、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）およびＨｉＴｒａｐ（商標）ＳＰ　ＦＦ精製後のｖ５０１９のＳＤＳ－ＰＡＧＥ結果を示しており：レーンＭはタンパク質マーカーを含み；レーン１は還元条件下でのｖ５０１９（３μｇ）を含み；レーン２は非還元条件下のｖ５０１９を含む（２．５μｇ）。ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルは、ｖ５０１９が、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ（商標）およびＨｉＴｒａｐ（商標）ＳＰ　ＦＦ精製後に相対的に純粋であり、非還元条件下で、約１２５ｋＤａの正確な予測ＭＷで泳動することを示している。還元条件下では、ＣＨ－Ａ重鎖（約４９ｋＤａ）およびＣＨ－Ｂ重鎖（約５２．５ｋＤａ）に対応する２つの重鎖バンドを視認することができ；ＣＨ－Ａ軽鎖を視認することができ、これは、約２３．５ｋＤａの正確な予測質量で泳動する。

【０２８２】

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

【０２８３】

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

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

ＳＫＯＶ３（ＨＥＲ２　２＋／３＋）、ＪＩＭＴ－１（ＨＥＲ２　２＋）、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（ＨＥＲ２　０／１＋）、およびＭＣＦ７（ＨＥＲ２　１＋）であった。試験した二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体には、ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００が含まれる。ＨＥＲ２発現（ＨＥＲ２＋）細胞に結合する二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を、B_{max}および見掛けK_D（平衡解離定数）の具体的な測定と共に、以下に記載するとおりに決定した。

【０２８４】

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

【０２８５】

結果を図６Ａ～６Ｇにおいて示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）が、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と比較して約１．５倍高いＢｍａｘで、ＨＥＲ２＋細胞に結合し得ることを実証している。図６Ａ～６Ｇにおける結果も、二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）が、２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して同様のＢｍａｘで、ＨＥＲ２＋細胞に結合し得ることを示している。

【０２８６】

ＨＥＲ２＋　ＳＫＯＶ３細胞（ＨＥＲ２　２／３＋）での結合結果を図６Ａ、６Ｅ、ならびに表４および表５において示す。図６Ａおよび表４における結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、ＳＫＯＶ３細胞への結合において、２種の異なる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６またはｖ４１８４）と比較して約１．５倍高いＢｍａｘを表すことを示している。これらの結果はまた、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して同等のＢｍａｘを表すことを示している。ＳＫＯＶ３への結合についてのｖ５０１９の見掛けK_Dは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ単独（ｖ５０６またはｖ４１８４）、または２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して約２～４倍高かった。

（表４）ＳＫＯＶ３細胞への結合

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

【０２８７】

図６Ｅおよび表５における結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、７０９１、およびｖ１００００）が、ＳＫＯＶ３細胞への結合において、２種の異

なる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６またはｖ４１８４）と比較して約１．５～１．６倍高いＢｍａｘを表すことを示している。これらの結果はまた、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、７０９１、およびｖ１００００）が、２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して同等のＢｍａｘを表すことを示している。ＳＫＯＶ３への結合についてのｖ５０１９、ｖ７０９１、ｖ１００００、および２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）の見掛けK_Dは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ単独（ｖ５０６またはｖ４１８４）のいずれかと比較して約２～３倍高かった。

（表５）ＳＫＯＶ３への結合

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

【０２８８】

ＪＩＭＴ－１細胞系（ＨＥＲ２　２＋）における結合曲線を図６Ｂおよび表６において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、ＪＩＭＴ－１細胞への結合において、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と比較して約１．５倍高いＢｍａｘを表すことを示している。これらの結果はまた、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して同等のＢｍａｘを表すことを示している。ＪＩＭＴ－１への結合についてのｖ５０１９の見掛けK_Dは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と比較して約２倍高く、２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して同等であった（約１．２倍高い）。

（表６）ＪＩＭＴ－１細胞への結合

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

【０２８９】

ＭＣＦ７細胞系（ＨＥＲ２　１＋）における結合曲線を図６Ｃ、６Ｆ、ならびに表７および８において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、７０９１、およびｖ１００００）が、ＭＣＦ７細胞への結合において、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と比較して約１．５倍高いＢｍａｘを表すことを示している。図６Ｃにおける結果はまた、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して同等のＢｍａｘを表すことを示している。ＭＣＦ７への結合についてのｖ５０１９の見掛けK_Dは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）および２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と同様であった。

（表７）ＭＣＦ７細胞への結合

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

【０２９０】

図６Ｆおよび表８における結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）が、ＦＳＡ単一特異性ｖ５０６と比較して約１．６～１．７倍大きいＢｍａｘを表すことを示している。ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００の見掛けK_Dは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と同等であった。

（表８）ＭＣＦ７細胞への結合

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

【０２９１】

ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞系（ＨＥＲ２　０／１＋）における結合曲線を図６Ｄおよび表９において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞への結合において、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と比較して約１．５倍高いＢｍａｘを表すことを示している。結果はまた、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して同等のＢｍａｘを表すことを示している。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１への結合についてのｖ５０１９の見掛けK_Dは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と比較して約２．４分の１であり、２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）と比較して約１．７倍高かった。

（表９）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞への結合

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

【０２９２】

ＷＩ－３８肺線維芽細胞細胞系における結合曲線を図６Ｇおよび表１０において示す。ＷＩ－３８細胞系は、基礎レベル（ＨＥＲ２　０＋、約１０，０００受容体／細胞）のＨＥＲ２を発現する正常な肺上皮細胞である（Ｃａｒｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．　１９９２，ＰＮＡＳ，　８９：４２８５－４２８９；　Ｙａｒｄｅｎ　２０００，　ＨＥＲ２：Ｂａｓｉｃ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ，　Ｐｒｏｇｎｏｓｉｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｙ）。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、ｖ１００００）が、ＷＩ－３８細胞への結合において、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と比較して同等の細胞表面装飾（Ｂｍａｘ）を表すことを示しているが；しかしながら、ｖ５０６での結合は、飽和に達しているとは考えられず、したがって、ＫＤを決定することはできなかったことに留意されたい。例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体のなかでの見掛けK_Dは同等であった。

（表１０）ＷＩ－３８細胞への結合

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

【０２９３】

これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体が、抗ＨＥＲ２単一特異性ＦＳＡよりも約１．５～１．６倍高いレベルでＨＥＲ２　１＋、２＋、および３＋腫瘍細胞に結合し得ること、および例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体が、異なるエピトープ特異性を有する２種の単独の単一特異性抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせと比較して同等のレベルでＨＥＲ２　１＋、２＋、および３＋腫瘍細胞に結合し得ることを示している。これらの結果はまた、二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体が約１０，０００以下のＨＥＲ２受容体／細胞を発現する基礎ＨＥＲ２発現細胞への結合の増大（すなわち、単一特異性抗ＨＥＲ２抗体ｖ５０６と比較）を示さないこと、およびＨＥＲ２受容体レベルが約１０，０００受容体／細胞超であると、二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体への細胞表面結合の増大のための閾値が生じることを示している。このデータに基づき、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体は、ＨＥＲ２　３＋、２＋、および１＋腫瘍細胞への細胞表面結合を増大させるであろうが、約１０，０００受容体以下でＨＥＲ２受容体の基礎レベルを発現する非腫瘍細胞への細胞表面結合は増大させないであろうことが予測されるであろう。

【０２９４】

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

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

【０２９５】

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

【０２９６】

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

（表１１Ａ）ＨＥＲ２　３＋癌細胞の増殖阻害

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

【０２９７】

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

（表１１Ｂ）ＨＥＲ２　３＋癌細胞の増殖阻害

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

【０２９８】

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

【０２９９】

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

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

【０３００】

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

７６～６０ｎＭの範囲の濃度で、ＨＥＲ２固定化チップの表面上に通過させた。ＨＥＲ２－Ｆｃへの結合を、次の方法によって決定した。１０ｍｍ　Ｈｅｐｅｓ（ｐＨ６．８）中のＨＥＲ２－Ｆｃを４３ＲＵのレベルまで、アミンカップリングによってＣＭ５上に固定化した。一価抗ＨＥＲ２抗体を０．７６～６０ｎＭの範囲の濃度で、ＨＥＲ２固定化チップの表面上に通過させた。抗体濃度を、結合について三つ組で分析した。平衡解離結合定数（K_D）および反応速度（ｋａおよびｋｄ）を、単一サイクル反応速度法を使用して決定した。センソグラム（ｓｅｎｓｏｇｒａｍｓ）を、１：１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデルに全体的にフィットさせた。すべての実験を室温で行った。

【０３０１】

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

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

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

【０３０２】

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

（表１１Ｄ）

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

【０３０３】

これらのデータは、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のパラトープのそれぞれが、膜結合ＨＥＲ２の代表である二量体ＨＥＲ２抗原への結合について、ＨＥＲ２　ＥＣＤと比較して低いK_D値を有することを示している。このデータに基づき、例示的な抗ＨＥＲ２抗体は、膜結合ＨＥＲ２抗原について、罹患患者の血清中に存在し、かつ治療用抗体のためのシンク（ｓｉｎｋ）として作用し得る脱離ＨＥＲ２　ＥＣＤと比較して高い結合親和性を有すると予測されるであろう（Ｂｒｏｄｏｗｉｃｚ　Ｔ，ｅｔ　ａｌ．Ｓｏｌｕｂｌｅ　ＨＥＲ－２／ｎｅｕ　ｎｅｕｔｒａｌｉｚｅｓ　ｂｉｏｌｏｇｉｃ　ｅｆｆｅｃｔｓ　ｏｆ　ａｎｔｉ－ＨＥＲ－２／ｎｅｕ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｏｎ　ｂｒｅａｓｔ　ｃａｎｃｅｒ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ．Ｉｎｔ　Ｊ　Ｃａｎｃｅｒ．１９９７；７３：８７５－８７９）。例えば、基線ＨＥＲ２　ＥＣＤレベル１５ｎｇ／ｍＬ以下に対して、進行性疾患の患者は、ＥＣＤ３８ｎｇ／ｍＬ以上のＨＥＲ２を有する。

【０３０４】

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

ＨＥＲ２　２＋細胞へ内部移行される例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の能力を評価するために、この実験を行った。直接的な内部移行方法は、Ｓｃｈｍｉｄｔ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｋｉｎｅｔｉｃｓ　ｏｆ　ａｎｔｉ－ｃａｒｃｉｎｏｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ａｎｔｉｇｅｎ　ａｎｔｉｂｏｄｙ　ｉｎｔｅｒｎａｌｉｚａｔｉｏｎ：ｅｆｆｅｃｔｓ　ｏｆ　ａｆｆｉｎｉｔｙ，ｂｉｖａｌｅｎｃｙ，ａｎｄ　ｓｔａｂｉｌｉｔｙ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ（２００８）５７：１８７９－１８９０において詳述されているプロトコルに従った。具体的には、抗体を、製造元指示書に従ってＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（登録商標）４８８　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｌａｂｅｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、ｃａｔ．ｎｏ．Ａ１０２３５）を使用して直接的に標識した。

【０３０５】

内部移行アッセイのために、１２ウェルプレートに1×10^5細胞／ウェルを播種し、３７℃＋５％ＣＯ２で終夜インキュベートした。翌日、標識抗体をＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ中の２００ｎＭで添加し、３７℃＋５％ＣＯ２で２４時間インキュベートした。暗条件下で、培地を吸引し、ウェルをＰＢＳ２×５００μＬで洗浄した。細胞を採取するために、細胞解離緩衝液（２５０μＬ）を３７℃で添加した。細胞をペレット化し、抗Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８、ウサギＩｇＧ画分（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ａ１１０９４）（５０μｇ／ｍＬ）を含むか、または含まないＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ１００μＬ中に再懸濁させ、氷上で３０分間にわたってインキュベートした。分析の前に、ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ３００μＬ、濾過試料、ヨウ化プロピジウム４μｌを添加した。試料を、ＬＳＲＩＩフローサイトメーターを使用して分析した。

【０３０６】

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

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

【０３０７】

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

【０３０８】

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

【０３０９】

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

【０３１０】

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

【０３１１】

図１０Ｅは、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００とインキュベートした後のＳＫＯＶ３細胞における結果を示している。これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のインキュベーションが、ＳＫＯＶ３細胞では、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ対照と比較して１．５～１．８倍多い内部移行抗体をもたらすことを示している。２４時間にわたる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ対照とのインキュベーションは、細胞全体の表面上で検出される抗体の最大の低減（約７７％）をもたらすことを示している。

【０３１２】

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

びｖ１００００とインキュベートした後のＪＩＭＴ－１細胞における結果を示している。これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のインキュベーションが、ＪＩＭＴ－１細胞では、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ対照と比較して１．４～１．８倍多い内部移行抗体をもたらすことを示している。２４時間にわたる抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体（ｖ５０１９およびｖ１００００）とのインキュベーションは、細胞全体の表面上で検出される抗体の最大の低減（約６４％）をもたらした。

【０３１３】

これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が、ＨＥＲ２＋細胞において、単一特異性抗ＨＥＲ２　ＦＳＡと比較して優れた内部移行特性を有することを示している。３７℃での２４時間のインキュベーション後に検出される表面抗体の低減は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が、ＨＥＲ２＋細胞においてインキュベーション後に、細胞表面ＨＥＲ２受容体の量を低減することができること、およびインキュベーション後の表面ＨＥＲ２低減が、ＨＥＲ２　２＋腫瘍細胞において最大であることを示している。

【０３１４】

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

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

【０３１５】

ＪＩＭＴ－１細胞を、３７℃＋５％CO_2で１時間、３時間、および１６時間にわたって無血清ＤＭＥＭ中２００ｎＭの抗体（ｖ５０６、ｖ４１８４、ｖ５０１９、またはｖ５０６およびｖ４１８４の組み合わせ）と共にインキュベートした。細胞を、温めた滅菌ＰＢＳ（５００ｍｌ／ウェル）で穏やかに２回洗浄した。細胞を、室温で１０分間にわたって１０％ホルマリン／ＰＢＳ溶液２５０ｍｌで固定した。固定した細胞をＰＢＳ（５００μｌ／ウェル）で３回洗浄し、５分間にわたって０．２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を含有するＰＢＳ２５０μｌ／ウェルで透過処理し、ＰＢＳ５００μｌ／ウェルで３回洗浄した。細胞を、室温で１時間にわたってＰＢＳ＋５％ヤギ血清５００μｌ／ウェルで遮断した。遮断緩衝液を除去し、二次抗体３００μｌ／ウェル（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８にコンジュゲートしたＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｆａｂ断片ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）；Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｌａｂｏｒｉｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．；１０９－５４７－００３）を室温で１時間わたってインキュベートした。細胞をＰＢＳ５００μｌ／ウェルで３回洗浄し、次いで、固定細胞を含むカバーガラスを、Ｐｒｏｌｏｎｇ　ｇｏｌｄ　ａｎｔｉ－ｆａｄｅ　ｗｉｔｈ　ＤＡＰＩ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ；　＃Ｐ３６９３１）を使用してスライド上に載せた。Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＦＶ１０００　Ｃｏｎｆｏｃａｌ顕微鏡を使用して、６０倍単一画像を得た。

【０３１６】

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

【０３１７】

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

【０３１８】

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

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

【０３１９】

ターゲット細胞を、３０分間にわたって試験抗体（４５μｇ／ｍｌから１／１０漸減濃度）と共に予めインキュベートし、続いて、エフェクター細胞を５：１のエフェクター／ターゲット細胞比で添加し、インキュベーションを３７℃＋５％CO_2で６時間にわたって継続した。試料を、４５μｇ／ｍｌから１／１０漸減していく８つの濃度で試験した。ＬＤＨ放出を、ＬＤＨアッセイキットを使用して測定した。

【０３２０】

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

【０３２１】

細胞を、マッコイ５ａ完全培地中、３７℃／５％CO_2で維持し、ＡＴＣＣからのプロトコルに従って、１０％ＦＢＳを補充した適切な培地で定期的にサブ培養した。ｐ１０未満の継代数の細胞をこのアッセイでは使用した。試料を、アッセイにおいて使用する前に、１％ＦＢＳおよび１％ｐｅｎ／ｓｔｒｅｐを補充したフェノールレッド非含有ＤＭＥＭ培地で、０．３～３００ｎＭの濃度に希釈した。

【０３２２】

５：１のエフェクター細胞とターゲット細胞との比での、ＨＥＲ２＋　ＳＫＯＶ３細胞におけるＡＤＣＣ結果を図１１Ａおよび表１２において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ７９２）および２種の異なる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ７９２＋ｖ４１８４）と比較した場合に、最大パーセンテージの、ＡＤＣＣによる最大ターゲット細胞溶解を媒介することを示している。例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体によって媒介される最大細胞溶解における差異は、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡと比較して約１．６倍大きく、２種の異なる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ７９２＋ｖ４１８４）と比較して約１．２倍大きかった。

（表１２）

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

【０３２３】

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

おける差異は、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡと比較して約１．３倍大きく、２種の異なる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ７９２＋ｖ４１８４）と比較して約１．８倍大きかった。

（表１３）

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

【０３２４】

１：１のエフェクター細胞とターゲット細胞の比でのＨＥＲ２＋　ＳＫＯＶ３細胞におけるＡＤＣＣ結果を、図１１Ｃおよび表１４において示す。これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ７９２）および２種の異なる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ７９２＋ｖ４１８４）と比較した場合に、最大パーセンテージの、ＡＤＣＣによる最大ターゲット細胞溶解を媒介したことを示している。例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体によって媒介される最大細胞溶解における差異は、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡと比較して約１．８倍大きく、２種の異なる抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ７９２＋ｖ４１８４）と比較して約１．１３倍大きかった。

（表１４）

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

【０３２５】

図１１および表１２～１４における結果は、例示的な二重パラトピックＨＥＲ２抗体が、種々のＥ：Ｔ比で、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡおよび２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせと比較した場合に最大のＳＫＯＶ３細胞のＡＤＣＣを媒介することを示している。抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体によって媒介されるＡＤＣＣの増大の観察が、化学療法後に循環エフェクター細胞の変動および／または低減を表すＨＥＲ２＋罹患患者において予測されるであろう（Ｓｕｚｕｋｉ　Ｅ．ｅｔａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２００７；１３：１８７５－１８８２）。図１１における観察は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体への細胞結合において、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡと比較して約１．５倍の増大を示す実施例６において提示した細胞全体結合Ｂｍａｘデータと一致する。

【０３２６】

実施例１２：ＨＥＲ２ＥＣＤに結合する例示的な抗ＨＥＲ２抗体の能力

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

【０３２７】

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

のＴ２００システム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用してＳＰＲによって測定した。５～１０μｇ／ｍｌの濃度で注入した抗ヒトＦｃ２０００～４０００ＲＵを、標準的なアミンカップリングを使用してＣＭ５チップ上に固定化した。一価抗ＨＥＲ２抗体（ｖ６３０またはｖ４１８２）および例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）を、３５０～１５ＲＵの範囲の応答レベルで抗ヒトＦｃ上に捕捉した（ＰＢＳＴ中０．０８～８μｇ／ｍｌの範囲の濃度で注入、１０μｌ／分で１分）。組換えヒトＨＥＲ２をＰＢＳＴ中で希釈し、１２０ｎＭ、２００ｎＭ、または３００ｎＭのいずれかの出発濃度で、3倍希釈で注入し、５０μｌ／分の流速で3分間にわたって注入し、続いて、最終の注入の終了時にさらに３０分間にわたって解離させた。ＨＥＲ２希釈を二つ組（ｄｕｐｌｉｃａｔｅ）で分析した。センソグラムを、１：１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデルに全体的にフィットさせた。すべての実験を２５℃で行った。

【０３２８】

結果を、図１２および図１３において示す。

【０３２９】

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

【０３３０】

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

【０３３１】

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

【０３３２】

図１３Ａにおける結果は、抗体捕捉レベルの範囲にわたる、組換えヒトＨＥＲ２への結合についての例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）のｋｄ（１／ｓ）を示している。これらの結果は、ｋｄ値が、チップの表面上に捕捉される抗体のＲＵの上昇と逆比例する（すなわち、抗体捕捉レベルが高いほど、オフ速度は遅くなる）ことを示している。この結果は、抗体捕捉レベルが高いほど、オフ速度が低下することによって証拠づけられるとおり、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）が、２個の別々のＨＥＲ２分子上のＨＥＲ２　ＥＣＤ２およびＨＥＲ２　ＥＣＤ４に結合（すなわち、トランス結合）し得ることを示している。このデータは、図４７において提示されていて、実施例４３において考察されている同様の実験によって裏付けられ、その実験では、二価単一特異性抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）は、この分子で予測されたとおり、抗体捕捉レベルが上昇してもｋｄ（１／ｓ）およびK_D（Ｍ）値が一定のままであるシス結合（抗体とＨＥＲ２とが１：１）を実証した。

【０３３３】

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

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

【０３３４】

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

【０３３５】

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

【０３３６】

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

ＢＴ－４７４細胞においてｐＡＫＴシグナル伝達を低減する例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を、ＡＫＴ　Ｃｏｌｏｒｉｍｅｔｒｉｃ　Ｉｎ－Ｃｅｌｌ　ＥＬＩＳＡ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｉｃ；ｃａｔ　ｎｏ．　６２２１５）を製造元指示書に従って、ただし次の変更を加えて使用して試験した。細胞を５×１０^{3}／ウェルで播種し、３７℃＋５％CO_2で２４時間にわたってインキュベートした。細胞を、１００ｎＭ抗体と共に３０分間にわたってインキュベートし、続いて、ｒｈＨＲＧ－β１と共に１５分間にわたってインキュベートした。細胞を洗浄し、固定化し、指示書に従って透過処理した。二次抗体（１：５０００；Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅａｓｅａｒｃｈ、ＨＲＰ－ロバ抗マウスＩｇＧ、ＪＩＲ、Ｃａｔ＃７１５－０３６－１５０、ＨＲＰ－ロバ抗ウサギＩｇＧ、ＪＩＲ、Ｃａｔ＃７１１－０３６－４５２）を添加し、アッセイを、製造元指示書に従ってプロセシングした。

【０３３７】

図１５における結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体とのインキュベーションが、ＨＲＧβ１の存在下でのｐ－Ａｋｔレベルにおいて、ヒトＩｇＧ対照（ＣＴＬ）に対して約１．２分の１の低下を媒介したことを示している。２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）は、ヒトＩｇＧ対照と比較して約１．５分の１であるＨＲＧβ１存在下でのｐ－Ａｋｔレベルの最大の低減を媒介した。リガンド（ＨＲＧβ１）の不在下で、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体では、ヒトＩｇＧ対照抗体と比較して、ｐ－Ａｋｔの僅かな低下が検出された。

【０３３８】

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

【０３３９】

実施例１４：　心筋細胞生存率に対する二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の効果

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

【０３４０】

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

使用した。アッセイを、次のとおりに行った。細胞を９６ウェルプレート（１５，０００細胞／ウェル）に播種し、４８時間にわたって維持した。細胞培地を維持培地に取り換え、細胞を７２時間にわたって維持した。抗体誘発性心臓毒性の作用にアクセスするために、細胞を単独か、または組み合わせの１０ｎＭおよび１００ｎＭの変異体で７２時間にわたって処理した。アンスラサイクリン誘発性心臓毒性の作用にアクセスするために（単独か、または例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体と組み合わせて）、細胞を、３μＭ（約IC_{20}）のドキソルビシンで１時間にわたって処理し、続いて、単独か、または組み合わせの抗体変異体１０ｎＭおよび１００ｎＭで７２時間にわたって処理した。製造元指示書に従ってＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）Ｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｃｅｌｌ ＶｉａｂｉｌｉｔｙＡｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｇ７５７０）および／またはＳｕｌｐｈｏｒｈｏｄａｍｉｎｅ（Ｓｉｇｍａ ２３０１６２－５Ｇ）を用いて細胞ＡＴＰレベルを定量化することによって、細胞生存率を評価した。

【０３４１】

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

【０３４２】

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

【０３４３】

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

【０３４４】

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

比較して大きな心臓毒性作用を有することはないであろうと予測される。

【０３４５】

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

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

【０３４６】

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

【０３４７】

図１７Ａならびに表１５および１６における結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ（ｖ６３６３）が、ＪＩＭＴ－１において、抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ（ｖ６２４６）および抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ＋抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ６２４６＋ｖ４１８４）と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ対照と比較して約１３分の１である優れたEC_{50}を有した。

【０３４８】

図１７Ｂおよび表１５における結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ（ｖ６３６３）が、ＳＫＯＶ３において、抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ（ｖ６２４６）および抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ＋抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ６２４６＋ｖ４１８４）と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ対照と比較して約５分の１である優れたEC_{50}を有した。

【０３４９】

図１７Ｃおよび表１５における結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ（ｖ６３６３）が、ＭＣＦ７において、抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ（ｖ６２４６）および抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ＋抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせ（ｖ６２４６＋ｖ４１８４）と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ対照と比較して約２分の１である優れたEC_{50}を有した。

【０３５０】

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

２４６＋ｖ４１８４）と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ対照と比較して約２分の１である優れたＥＣ$_{50}$を有した。

（表１５）

v6246	0.9225	5.942	122.0	約1075
v6246 + 4184	3.146	12.68	約24432	136.4
v6363	0.1776	0.4443	58.55	141.0

【０３５１】

図１７Ｅおよび表１６における結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ（ｖ６３６３、ｖ７１４８、およびｖ１０５５３）が、ＳＫＯＶ３卵巣腫瘍細胞において、抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ（ｖ６２４６）と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ対照と比較して、約２分の１～約７分の１である優れたＥＣ$_{50}$値を有した。

【０３５２】

図１７Ｆおよび表１６における結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ（ｖ６３６３、ｖ７１４８、およびｖ１０５５３）が、ＪＩＭＴ－１乳房腫瘍細胞において、抗ＨＥＲ２－ＦＳＡ－ＡＤＣ（ｖ６２４６）と比較して、より細胞毒性であることを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ対照と比較して約６分の１～約９分の１である優れたＥＣ$_{50}$値を有した。

【０３５３】

図１７Ｇおよび表１６における結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ（ｖ６３６３、ｖ７１４８、およびｖ１０５５３）が、ＮＣＩ－Ｎ８７胃腫瘍細胞において細胞毒性であることを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ対照と比較してほぼ同等のＥＣ$_{50}$値を有した。

（表１６）

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

【０３５４】

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

【０３５５】

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

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

【０３５６】
雌の無胸腺ヌードマウスに、１ｍｍ^{3}腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。２２０ｍｍ^{3}の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を３つの処理群、すなわち、ＩｇＧ対照、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）、および二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９）に無作為割当した。
【０３５７】
各群には、１５匹の動物が含まれた。各群への投与は次のとおりである：
【０３５８】
Ａ）ＩｇＧ対照を、試験１日目に３０ｍｇ／ｋｇの初回負荷量で、次いで、試験３９日目まで週２回、２０ｍｇ／ｋｇの維持用量で静脈内投与した。
【０３５９】
Ｂ）抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）を、試験１日目に１５ｍｇ／ｋｇの初回負荷量で、次いで、試験１８日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇの維持用量で静脈内投与した。２２日目から３９日目には、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ５ｍｇ／ｋｇを週２回、静脈内投与した。抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ４１８４）を、週２回、５ｍｇ／ｋｇで同時に腹腔内投与した。
【０３６０】
Ｃ）二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体を、試験１日目に１５ｍｇ／ｋｇの初回負荷量で、次いで、研究３９日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇの維持用量で静脈内投与した。
【０３６１】
腫瘍体積を、試験の経過にわたって週２回測定し、応答動物数および生存期間中央値を２２日目に評価した。結果を、図１８および表１７において示す。
【０３６２】
二重パラトピック抗ＨＥＲ２および抗ＨＥＲ２　ＦＳＡは、ＩｇＧ対照と比較して優れた腫瘍増殖阻害を実証した。二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体は、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組合せと比較して優れた腫瘍増殖阻害を誘発した（図１８Ａ）。二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体は、２２日目において、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ　ｖ５０６と比較して、応答腫瘍の数の増大と関連した（それぞれ１１および５）（表１７）。例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体および抗ＨＥＲ２　ＦＳＡは、ＩｇＧ対照と比較して優れた生存率を実証した。二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体は、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（３６日間）と比較して、優れた生存期間中央値（６１日間）を有した（図１８Ｂおよび表１７）。試験２２日目に、第２の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ４１８４）を、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）と組み合わせて加えた。２種の抗ＨＥＲ２　ＦＳＡの組み合わせは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）単独と比較して、さらなる腫瘍増殖阻害を誘発した。
（表１７）

n=15, 22日目	IgG	v506	v5019
平均腫瘍体積 (mm3)（基線からの変化%）	1908 (+766%)	1291 (+486%)	697 (+217%)
% TGI	0	32	63
応答動物 （腫瘍体積が対照の50%未満）	0/15	5/15	11/15
生存期間中央値（日数）	22	36	61

【０３６３】
実施例１７：　ヒト卵巣癌細胞系異種移植片モデルにおける二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の効果
ＤＭ１にコンジュゲートさせた例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ６３６３）の抗腫瘍有効性を評価するために、ヒト卵巣癌細胞由来の樹立された異種移植片モデルＳＫＯＶ３を使用した。
【０３６４】

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

【０３６５】

各群には、１５匹の動物が含まれた。各群への投与は次のとおりである：

【０３６６】

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

【０３６７】

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

【０３６８】

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

【０３６９】

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

【０３７０】

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

（表１８）

n=15, 22日目	IgG	v6246	v6363
平均腫瘍体積 (mm3) (基線からの変化%)	1908 (+766%)	873 (+297%)	632 (+187%)
% TGI	0	54%	67%
応答動物 (腫瘍体積が対照の50%未満)	0/15	9/15	11/15
生存期間中央値(日数)	22	36	61

【０３７１】

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

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

【０３７２】

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

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

【０３７３】

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

【０３７４】

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

【０３７５】

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

【０３７６】

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

【０３７７】

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

（表１９）

n=7, 50日目	v506	v6246	v6363
平均腫瘍体積 (mm3) (基線からの変化%)	1149 (+1018%)	262 (+153%)	26 (-75%)
% TGI	0%	77%	98%
完全応答 (10%超の基線からの退縮)	0	4/7	7/7
ゼロ残留疾患 (腫瘍体積20㎜3未満)	0	2/7	5/7

【０３７８】

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

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

【０３７９】

雌の無胸腺ヌードマウスに、２０ｍｍ^{3}腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。１００ｍｍ^{3}の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を４つの処理群、すなわち、ＩｇＧ対照（ｎ＝１５）、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６；ｎ＝１５）、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ（ｖ６２４６；ｎ＝１６）、および二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣコンジュゲート（ｖ６３６３；ｎ＝１６）に無作為割当した。各群への投与は次のとおりである：

【０３８０】

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

【０３８１】
Ｂ）抗ＨＥＲ２　ＦＳＡを試験１日目に１５ｍｇ／ｋｇの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験４、８、１１、１５、１８、２２、および２５日目に１０ｍｇ／ｋｇの維持用量を投与した。
【０３８２】
Ｃ）抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣを試験１日目および１５日目に５ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。
【０３８３】
Ｄ）二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣコンジュゲートを試験１日目および１５日目に５ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。
【０３８４】
腫瘍体積を、試験経過を通じて測定し、平均腫瘍体積および完全応答パラメータを３１日目に評価した。結果を図２１において示す。結果の概要を表２０において示す。
【０３８５】
二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣおよび抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣは、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）およびＩｇＧ対照と比較して良好な腫瘍増殖阻害を実証した。例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣは、このモデルにおいて、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣと比較して同等の腫瘍増殖阻害および完全基線退縮を誘発した（図２１および表２０）。
（表２０）

31日目	IgG (n=13)	v506 (n=13)	v6246 (n=16)	v6363 (n=16)
平均腫瘍体積 (mm3) (基線からの変化%)	1797 (+1728%)	1611 (+1573)	422 (+332%)	572 (+483%)
% TGI (対 hIgG)	0%	11%	77%	68%
完全応答 (10%超の基線からの退縮)	0/13	0/14	1/16	1/16

【０３８６】
実施例２０：　ヒト一次細胞異種移植片モデル（ＨＢＣｘ－５）における二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）の効果
例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣの抗腫瘍有効性を評価するために、患者由来のヒト乳癌からのトラスツズマブ抵抗性異種移植片モデルＨＢＣｘ－５（侵襲性腺管癌、ルミナールＢ）を使用した。
【０３８７】
雌の無胸腺ヌードマウスに、２０ｍｍ^{3}腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。１００ｍｍ^{3}の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を４つの処理群、すなわち、ＩｇＧ対照（ｎ＝１５）、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６；ｎ＝１５）、抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ－ＡＤＣ（ｖ６２４６；ｎ＝１６）、および二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣ（ｖ６３６３；ｎ＝１６）に無作為割当した。各群への投与は次のとおりであった：
【０３８８】
Ａ）ＩｇＧ対照を試験１日目に１５ｍｇ／ｋｇの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験４、８、１１、１５、１８、２２、および２５日目に１０ｍｇ／ｋｇの維持用量を投与した。
【０３８９】
Ｂ）抗ＨＥＲ２　ＦＳＡを試験１日目に１５ｍｇ／ｋｇの初回負荷量で静脈内投与し、かつ試験４、８、１１、１５、１８、２２、および２５日目に１０ｍｇ／ｋｇの維持用量

を投与した。

【０３９０】

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

【０３９１】

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

【０３９２】

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

【０３９３】

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

（表２１）

43日目	IgG (n=4)	Herceptin (n=5)	T-DM1 (n=7)	6363 (n=7)
平均腫瘍体積 (mm3) (基線からの変化%)	922 (+693%)	815 (+598%)	193 (+65%)	241 (+106%)
T/C (IgG) 比	1	0.88	0.21	0.26
応答動物 (腫瘍体積が対照の50%未満)	0/4	1/5	6/7	7/7
完全応答 (10%超の基線からの退縮)	0/4	0/5	1/7	0/7
ゼロ残留疾患 (腫瘍体積20㎜3未満)	0/4	0/5	0/7	0/7

【０３９４】

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

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

【０３９５】

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

【０３９６】

腫瘍体積を、実験経過を通じて、週２回測定した。

【０３９７】

結果を図２３において示すが、これは、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣ

（ｖ６３６３）で処置した群は、２２０ｍｍ^{3}の当初平均出発体積未満の平均腫瘍体積までの腫瘍退縮を示したことを示している。

【０３９８】

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

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

【０３９９】

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

【０４００】

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

【０４０１】

実施例２３：　例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体のフコース含有率の分析

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

【０４０２】

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

【０４０３】

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

（表２２）ＦｃＮ－連結グリコペプチド分析

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

【０４０４】
これらの結果は、ＣＨＯ細胞において一過性に発現させた二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ヘテロ二量体Ｆｃを含む）が、Ｎ－グリカンにおいて、市販のＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）と比較して約３％高いフコース含有率を有することを示している。ＣＨＯ細胞において一過性に発現させたホモ二量体抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）は、約９６％の最も高いフコース含有率を有する。
【０４０５】
実施例２４：　例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の熱安定性
例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）およびＡＤＣ（ｖ６３６３、ｖ７１４８、およびｖ１０５３３）の熱安定性を、下記のとおりにＤＳＣによって測定した。
【０４０６】
ＤＳＣを、ＰＢＳ中で約０．３ｍｇ／ｍｌに調節した精製タンパク質試料（抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣ）を使用して、ＭｉｃｒｏＣａｌ（商標）ＶＰ－Ｃａｐｉｌｌａｒｙ　ＤＳＣ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）で行った。試料を６０℃／時の速度、低フィードバック、８秒フィルター、５分の事前温度調節（ｐｒｅＴｓｔａｔ）、および窒素圧７０ｐｓｉで、２０℃から１００℃まで走査した。得られたサーモグラムを、Ｏｒｉｇｉｎ　７ソフトウェアを使用して分析した。
【０４０７】
例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）の熱安定性結果を図２５Ａ～Ｃにおいて示す。図２５Ａは、ｖ５０１９でのサーモグラムを示しており；５０１９のそれぞれのＦｃおよび鎖Ａ　Ｆａｂは、７５℃のT_mを有し、鎖Ｂ　ｓｃＦｖは、６９℃のT_mを有する。図２５Ｂは、ｖ１００００でのサーモグラムを示しており；Ｆｃ　ＣＨ３ドメインは、８２℃のT_mを有し、Ｆａｂ鎖Ａは、７６．５℃のT_mを有し、鎖Ｂ　ｓｃＦｖは、６９．５℃のT_mを有する。図２５Ｃは、ｖ７０９１でのサーモグラムを示しており；Ｆｃ　ＣＨ３ドメインは、８２℃のT_mを有し、Ｆａｂ鎖Ａは、７６．７℃のT_mを有し、鎖Ｂ　ｓｃＦｖは、６９．５℃のT_mを有する。
【０４０８】
例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２　ＡＤＣ（ｖ６３６３、ｖ７１４８、およびｖ１０５３３）の熱安定性結果を図２６Ａ～Ｃにおいて示す。図２６Ａは、ｖ６３６３でのサーモグラムを示しており；Ｆｃは、７５℃のT_mを有し、鎖Ａ　ＦａｂおよびＦｃ　ＣＨ３ドメインは、７５℃のT_mを有する。６３６３の鎖Ｂ　ｓｃＦｖは、６９℃のT_mを有する。図２６Ｂは、ｖ１０５５３でのサーモグラムを示しており；Ｆｃ　ＣＨ３ドメインは、８３℃のT_mを有し、鎖Ａ　Ｆａｂは、７５．７℃のT_mを有し、鎖Ｂ　ｓｃＦｖは、６６．２℃のT_mを有する。図２６Ｃは、ｖ７１４８でのサーモグラムを示し；Ｆｃ　ＣＨ３ドメインは、８２．６℃のT_mを有し、鎖Ａ　Ｆａｂは、７４．８℃のT_mを有し、鎖Ｂ　ｓｃＦｖは、６６．６℃のT_mを有する。
【０４０９】
例示的な二重パラトピック抗体およびＡＤＣは、野生型ＩｇＧに匹敵する熱安定性を有

する。

【０４１０】

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

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

【０４１１】

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

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

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

【０４１２】

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

【０４１３】

実施例２６：　ＡＤＣＣに対する抗体非フコシル化の効果

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

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

【０４１４】

図２８Ａ、図２８Ｂ、および表２４は、非フコシル化ｖ５０１９（ｖ５０１９－ａｆｕｃｏ）が、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）よりも約１．５～１．７倍高い最大細胞溶解で、ＨＥＲ　２／３＋および０／１＋　ＨＥＲ２発現乳癌細胞のＡＤＣＣを誘発することを示している。

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

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

【０４１５】

図２８Ｃおよび表２５における結果は、ｖ１００００が、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）よりも約１．３倍大きい最大細胞溶解でＨＥＲ２　２＋　ＺＲ－７５－１乳癌細胞のＡＤＣＣを誘発し、非フコシル化ｖ１００００が、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）よりも約１．５倍大きい最大細胞溶解を誘発することを示している。

（表２５）ＨＥＲ２　２／３＋乳癌細胞のＡＤＣＣ

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

【０４１６】

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

【０４１７】

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

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

【０４１８】

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

【０４１９】

結果を、図２９および表２６において示す。結果は、例示的な二重パラトピック抗体ｖ５０１９が、増殖刺激リガンド（７０％阻害）の不在下で、さらには、ＥＧＦ（４０％阻害）またはＨＲＧ（約１０％阻害）の存在下で、ＨＥＲ２　３＋乳癌細胞の増殖を阻害することを示している。抗ＨＥＲ２単一特異性ＦＳＡ（ｖ５０６）は、他のｅｒｂＢ受容体ＥＧＦＲおよびＨＥＲ３によるＥＧＦまたはＨＲＧ誘発性腫瘍細胞増殖を遮断しない。ｖ５０１９は、ＨＥＲ２およびリガンド依存性二量化および他のコンパニオンｅｒｂＢ受容体による増殖の阻害において、ｖ５０６よりも優れている。

（表２６）ＨＥＲ２　３＋癌細胞の増殖阻害

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

【０４２０】

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

【０４２１】

実施例２８：　侵襲性腺管乳房癌のトラスツズマブ抵抗性および化学療法抵抗性ＨＥＲ２３＋患者由来（ＰＤＸ）の転移性乳癌異種移植片モデルにおける二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体の効果

侵襲性腺管ヒト乳癌からのＨＥＲ２　３＋（ＥＲ－ＰＲ陰性）患者由来の異種移植片モデルＨＢＣｘ－１３Ｂを、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体ｖ７１８７の抗腫瘍有効性を評価するために使用した。ｖ７１８７は、ｖ５０１９の非フコシル化バージョンである。

【０４２２】

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

【０４２３】

雌の無胸腺ヌードマウスに、２０ｍｍ^{3}腫瘍断片を皮下接種した。次いで、１４０ｍｍ３の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターした。次いで、各群に動物８匹で、動物を２つの処置群、すなわち、ビヒクル対照およびｖ７１８７に無作為割当した。静脈内投与は次のとおりであった。ビヒクル対照を、試験４３日目まで週２回、製剤緩衝液５ｍｌ／ｋｇで静脈内投与した。ｖ７１８７を、試験４３日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。表２７において示すとおり、腫瘍体積を、試験を通じて測定し、他のパラメータを４３日目に評価した。

【０４２４】

結果を図３０および表２７において示す。結果は、ビヒクル対照で処置した腫瘍は、継続した進行を示し、試験４３日目までに１６００ｍｍ^{3}を超えたことを示している。ｖ７１８７で処置したマウスは、４３日目に７４０ｍｍ^{3}の平均腫瘍体積で、有意により大きな腫瘍増殖阻害（Ｔ／Ｃ－０．４４）を示した。ｖ７１８７は、腫瘍の５／８において応答を誘発し、その際、ただ１つの腫瘍が、試験４３日目に、ゼロ残留疾患で完全な退縮を示した。ｖ７１８７で処置した動物は、優れた奏功率を有し、その際、ビヒクル対照で処置したマウスの０／８と比較して、腫瘍の５／８が治療に応答した。加えて、ｖ７１８７での処置は、ビヒクル対照と比較して、腫瘍進行を有意に遅延したが、その際、倍加時間はそれぞれ、１９および１１日であった。

（表２７）

腫瘍応答		ビヒクル	V7087
43日目	平均腫瘍体積(mm3) (基線からの変化%)	1683 (+1079%)	740 (+422%)
	T/C 比	1	0.44
	応答動物(腫瘍体積が対照の50%未満)	0/8	5/8
	PR (10%超の基線からの退縮)	0/8	1/8
	ZRD (腫瘍体積20mm3未満)	0/8	1/8
進行までの時間	倍加時間(日数)	11	19

【０４２５】

これらのデータは、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック（ｖ７１８７）がトラスツズマブ＋ペルツズマブ抵抗性ＨＥＲ２　３＋転移性乳癌腫瘍異種移植片モデルにおいて有効であることを示している。Ｖ７１８７処理は、高い奏功率を有し、標準治療抵抗性ＨＥＲ２　３＋乳癌の腫瘍進行を有意に減速させ得る。

【０４２６】

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

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

【０４２７】

データを図３１において示す。図３１Ａは、ｖ６３６３が、飽和濃度で、Ｔ－ＤＭ１（ｖ６２４６）よりも約２．０倍大きなＢｍａｘ（ＭＦＩ）で、ＳＫＯＶ３腫瘍細胞系に結合することを示している。図３１Ｂは、ｖ６３６３が、飽和濃度で、Ｔ－ＤＭ１（ｖ６２４６）よりも約１．６倍大きなＢｍａｘ（ＭＦＩ）で、ＪＩＭＴ－１腫瘍細胞系に結合することを示している。これらのデータは、ｖ６３６３（ＡＤＣ）が、コンジュゲートされていない親のｖ５０１９抗体と比較して、同様の、細胞表面結合の増大という腫瘍細胞結合特性を有することを示している（実施例６）。ＳＭＣＣ－ＤＭ１（ｖ６３６３）とのｖ５０１９のコンジュゲーションは、抗体の抗原結合性特性を変えるものではない。

【０４２８】

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

【０４２９】

これらのデータは、ＳＭＣＣ－ＤＭ１との例示的な二重パラトピック抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）のコンジュゲーションが、結合特性を変えないことを示している。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗ＨＥＲ２　ＡＤＣ（ｖ６３６３、ｖ７１４８、およびｖ１０５５３）は、単一特異性抗ＨＥＲ２　ＡＤＣ（ｖ６２４６、Ｔ－ＤＭ１）と比較して約１．５倍（またはそれ以上）の細胞表面結合の増大を有する。

【０４３０】

実施例３０：　ＨＥＲ２　３＋（ＥＲ－ＰＲ陰性）患者由来の異種移植片モデルにおける例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの用量依存性腫瘍増殖阻害

例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２　ＡＤＣ、ｖ６３６３の抗腫瘍有効性を評価する

ために、ＨＥＲ２　３＋（ＥＲ－ＰＲ陰性）患者由来の侵襲性腺管ヒト乳癌からの異種移植片モデルＨＢＣｘ－１３Ｂを使用した。このモデルは、単一薬剤のトラスツズマブ、トラスツズマブおよびペルツズマブの組み合わせ（実施例３１を参照されたい）、カペシタビン、ドセタキセル、ならびにアドリアマイシン／シクロホスファミドに対して抵抗性である。

【０４３１】

雌の無胸腺ヌードマウスに、２０ｍｍ^{3}腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。次いで、１６０ｍｍ^{3}の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を５つの処置群、すなわち、非特異的ヒトＩｇＧ対照、および４群のｖ６３６３の漸増用量に無作為割当した。各群には、８～１０匹の動物が含まれた。各群での投与は次のとおりであった。ＩｇＧ対照を、試験２９日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。ｖ６３６３を、試験１、１５、および２９日目に、０．３、１、３、または１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。表２９に示すとおりに、腫瘍体積を、試験を通じて評価し、パラメータを評価した。

【０４３２】

結果を図３２および表２８において示す。これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックＡＤＣ（ｖ６３６３）が、トラスツズマブ抵抗性ＨＢＣｘ－１３ｂ　ＰＤＸモデルにおいて、用量依存性腫瘍増殖阻害を媒介することを示している（図３２Ａ）。加えて、ｖ６３６３は、ＩｇＧ対照での４３日間と比較して、３ｍｇ／ｋｇおよび１０ｍｇ／ｋｇ用量では、６３日間超の生存期間中央値時間で、用量依存的に全体生存率を改善した（図３２Ｂおよび表２８）。３ｍｇ／ｋｇ用量は、対照（０／８）と比較して、奏功率の上昇（５／１０）と関連した。１０ｍｇ／ｋｇ用量のｖ６３６３で処理したマウスはすべて、治療（９／９）に応答しただけではなく、腫瘍進行の予防も示した。さらに、腫瘍の大部分が、客観的な部分的応答（７／９）を有し、試験の終了時には、多くが、ゼロ残留疾患（６／９）を有した。ｖ６３６３は、すべての用量で忍容性が良好であり、有害事象は観察されず、体重減少は観察されなかった。

（表２８）

腫瘍応答		IgG	6363 0.3 mg/kg	6363 1 mg/kg	6363 3 mg/kg	6363 10 mg/kg
43日目	平均腫瘍体積 (mm3) (基線からの 変化%)	1963 (+1119%)	1916 (+1073%)	1613 (+895%)	1268 (+682%)	84 (-49%)
	T/C (IgG) 比	1	0.97	0.82	0.64	0.04
	応答動物 (腫瘍体積が 対照の50%未満)	0/8	0/10	2/10	5/10	9/9
	PR (10%超の 基線からの 退縮)	0/8	0/10	0/10	0/10	7/9
	ZRD (腫瘍体積 20mm3未満)	0/8	0/10	0/10	0/10	6/9
進行までの 時間	腫瘍倍加時間 (日数)	9	9	14	17	52
生存応答	中央生存日数	43	41	50	>63	>63
体重	基線からの 変化%	+10%	+10%	+9%	+5%	+0%

【０４３３】

これらのデータは、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックＡＤＣ（ｖ６３６３）が、トラスツズマブ＋ペルツズマブ抵抗性ＨＥＲ２　３＋転移性乳癌腫瘍異種移植片モデルにおいて有効であることを示している。ｖ６３６３処置は、標準治療抵抗性ＨＥＲ２　３＋乳癌において、高い奏功率と関連し、腫瘍進行を有意に減速させ、生存期間を延長させる。

【０４３４】

実施例３１：　トラスツズマブ抵抗性ＰＤＸ　ＨＢＣｘ－１３ｂにおける二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣと標準治療の組み合わせとの比較

ＥＲ－ＰＲ陰性トラスツズマブ抵抗性患者由来のＨＥＲ２　３＋乳癌異種移植片モデル（ＨＢＣｘ－１３ｂ）におけるｖ６３６３の有効性を評価し、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋Ｐｅｒｊｅｔａ（商標）；およびＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋ドセタキセルの組み合わせと比較した。

【０４３５】

雌の無胸腺ヌードマウスに、２０ｍｍ３腫瘍断片を皮下挿入することによって、腫瘍を接種した。１００ｍｍ３の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を４つの処理群（動物８～１０匹／群）、すなわち、非特異的ヒトＩｇＧ対照、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋ドセタキセル、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋Ｐｅｒｊｅｔａ（商標）、およびｖ６３６３に無作為割当した。各群での投与は次のとおりであった。ＩｇＧ対照

を、試験２９日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋ドセタキセルの組み合わせでは、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）を、試験２９日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与し、ドセタキセルを、試験１日目および２２日目に２０ｍｇ／ｋｇで腹腔内投与した。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋Ｐｅｒｊｅｔａ（商標）の組み合わせでは、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎを、試験２９日目まで週２回、５ｍｇ／ｋｇで静脈内投与し、Ｐｅｒｊｅｔａ（商標）を、試験２９日目まで週２回、５ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）およびＰｅｒｊｅｔａ（商標）の投与は同時であった。ｖ６３６３を、試験１、１５、および２９日目に１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。

【０４３６】

結果を図３３および表２９において示す。図３３Ａは、腫瘍体積を経時的に示しており、図３３Ｂは、生存率のプロットを示している。これらの結果は、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋Ｐｅｒｊｅｔａ（商標）の組み合わせが、対照ＩｇＧと比較して何らの腫瘍増殖阻害も生じず、３９日目には１８００ｍｍ^{3}を超えたことを示している。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）＋ドセタキセルの組み合わせは、腫瘍増殖を有意に低減することはなかったが、生存期間中央値を、ＩｇＧ対照での４３日間と比較して５３日間まで延長した。ｖ６３６３は、有意な腫瘍増殖阻害（Ｔ／Ｃは０．０４）を生じ、その際、すべての腫瘍が治療に応答し、腫瘍の７／１０が、完全な退縮（ゼロ残留疾患）を経験した。ｖ６３６３は、併用療法の両方と比較して、生存率を有意に延長した。コホート全体で、体重は、処理によって有意な影響を受けなかった。

（表２９）

腫瘍応答		IgG	Herceptin(商標) + Perjeta(商標)	Herceptin(商標) + ドセタキセル	v6363 10mg/kg
39日目	平均腫瘍体積(㎜3) (基線からの 変化%)	1809 (+1023%)	1975 (+1085%)	1328 (+714%)	76 (-54%)
	T/C (IgG) 比	1.0	1.10	0.73	0.04
	応答動物 (腫瘍体積が 対照の50%未満)	0/8	0/8	1/10	9/9
	PR (10%超の 基線からの退縮)	0/8	0/8	0/10	8/9
	ZRD (腫瘍体積20㎜3未満)	0/8	0/8	0/10	6/9
生存応答	中央生存日数	43	39	53	>63
体重	基線からの 変化%	+10%	+7%	+3%	-2%

【０４３７】

これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックＡＤＣ（ｖ６３６３）が、この

異種移植片モデルにおいて試験したすべてのパラメータに関して、標準治療の組み合わせよりも優れていることを示している。

【０４３８】

実施例３２：　ＨＥＲ２＋トラスツズマブ抵抗性乳癌細胞由来の腫瘍異種移植片モデルにおける二重パラトピック抗ＨＥＲ２－ＡＤＣの有効性

ＨＥＲ２　３＋トラスツズマブ抵抗性乳癌細胞由来の（ＪＩＭＴ－１、ＨＥＲ２　２＋）異種移植片モデルにおけるｖ６３６３の有効性を評価した（Ｔａｎｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．　２００４．　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ　３：　１５８５－１５９２）。

【０４３９】

雌のＲＡＧ２マウスに、腫瘍を皮下接種した。次いで、１１５ｍｍ^{3}の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし；次いで、動物を２つの処理群、すなわち、トラスツズマブ（ｎ＝１０）およびｖ６３６３に無作為割当した。各群での投与は次のとおりであった。トラスツズマブを試験１日目に１５ｍｇ／ｋｇで、かつ試験２６日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。ｖ６３６３を、試験１日目および１５日目に５ｍｇ／ｋｇで、かつ２３日目および３０日目に１０ｍｇ／ｋｇで、かつ３７および４４日目に９ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。

【０４４０】

結果を、図３４および表３０において示す。これらの結果は、ｖ６３６３が、試験３６日目に、トラスツズマブと比較して腫瘍増殖を有意に阻害した（Ｔ／Ｃは０．７４）ことを示している。ｖ６３６３およびトラスツズマブ処理は、体重を有意に変化させなかった。ｖ６３６３血清曝露は、初回の１０ｍｇ／ｋｇ用量から７日後に、１７．９μｇ／ｍｌであった。

（表３０）

腫瘍応答		トラスツズマブ	6363
36日目	平均腫瘍体積 (㎜3) (基線からの 変化%)	718 (+541)	532 (+335%)
	T/C (Tras) 比	1	0.74
	応答動物 (腫瘍体積が 対照の50%未満)	1/10	2/13
	PR (10%超の 基線からの退縮)	0/10	0/13
	ZRD (腫瘍体積 20㎜3未満)	0/10	0/13
体重	基線からの 変化%	+5.8%	+3.1%
薬物曝露 (7日目)	平均血清濃度 (μg/ml)	187.2	17.9

【０４４１】

これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックＡＤＣ（ｖ６３６３）がトラスツズマブ抵抗性乳癌において有効であり、現行の標準治療に対して抵抗性である乳癌の処置において潜在的な有用性を有することを示している。

【０４４２】

実施例３３：　抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣのヘテロ二量体ＦｃへのＦｃγＲ結合

ヒトＦｃγＲへの、ヘテロ二量体Ｆｃを有する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体（ｖ５０１９、ｖ７０１９、ｖ１００００）およびＡＤＣ（ｖ６３６３、ｖ７１４８、およびｖ１０５５３）の結合を評価し、ホモ二量体Ｆｃを有する抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）およびＡＤＣ（ｖ６２４６）と比較した。

【０４４３】

抗体Ｆｃ領域へのＦｃγＲの親和性を、ＰｒｏｔｅＯｎ　ＸＰＲ３６（ＢＩＯ－ＲＡＤ）を使用してＳＰＲによって測定した。ＨＥＲ２を、標準的なアミンカップリングによってＣＭ５チップ上に固定化した（３０００ＲＵ）。抗体は、ＨＥＲ２表面上で抗原捕捉された。精製したＦｃγＲを、様々な濃度（２０～３０μｌ／分）で２分間にわたって注入し、続いて、４分間解離させた。センソグラムを、１：１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデルに全体的にフィットさせた。実験を２５℃で行った。

【０４４４】

結果を表３１において示す。例示的なヘテロ二量体抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体およびＡＤＣは、同等の親和性でＣＤ１６ａＦ、ＣＤ１６ａＶ１５８、ＣＤ３２ａＨ、ＣＤ３２ａＲ１３１、ＣＤ３２ｂＹ１６３、およびＣＤ６４Ａに結合した。ＳＭＣＣ－ＤＭ１との抗体のコンジュゲーションは、ＦｃγＲ結合にマイナスの影響を及ぼさない。ヘテロ二量体抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体は、ＣＤ１６ａＦ、ＣＤ３２ａＲ１３１、ＣＤ３２ａＨに対して、ホモ二量体抗ＨＥＲ２　ＦＳＡ（ｖ５０６）およびＡＤＣ（ｖ６２４６）と比較して約１．３～２倍高い親和性を有する。これらの結果は、ヘテロ二量体抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体およびＡＤＣが、野生型ホモ二量体ＩｇＧ１と同様か、またはそれよりも高い親和性で、免疫エフェクター細胞上のＦｃγＲの異なる多形形態に結合することを示している。

（表３１）ＳＰＲによるヒトＦｃγＲ結合

変異体	10uM CD16a v158		10uM CD16aF		10uM CD32aR131		10uM CD32aH		10uM CD32b Y163		100nM CD64A	
	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD	KD平均	SD
v506	1.5E-07	2E-08	7.1E-07	1.E-08	7.6E-07	1.E-07	6.3E-07	2E-08	2.4E-06	1.E-07	8.64E-10	4.33E-10
v6246	1.6E-07	2E-08	7.0E-07	9.E-09	7.4E-07	7.E-08	6.3E-07	2E-08	2.1E-06	7.E-08	1.08E-09	5.13E-10
v10000	1.2E-07	1E-08	4.8E-07	2.E-08	5.1E-07	9.E-08	4.6E-07	2E-08	1.5E-06	7.E-08	8.41E-10	4.74E-10
v10553	1.2E-07	2E-08	4.9E-07	2.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.6E-07	4E-09	1.2E-06	7E-08	4.95E-10	1.41E-10
v7091	1.2E-07	1E-08	5.1E-07	2.E-08	5.6E-07	9.E-08	5.0E-07	3E-08	1.7E-06	8E-08	9.68E-10	5.05E-10
v7148	1.2E-07	2E-08	5.4E-07	2.E-07	3.7E-07	1.E-07	4.2E-07	1E-08	1.5E-06	1.E-07	5.77E-10	2.02E-10
v5019	1.3E-07	1E-08	5.2E-07	1.E-08	5.6E-07	6.E-08	4.7E-07	2E-08	1.6E-06	2.E-07	8.44E-10	4.88E-10
v6363	1.2E-07	2E-08	4.5E-07	1.E-07	3.5E-07	1.E-07	3.4E-07	1E-08	1.2E-06	5.E-08	4.58E-10	1.13E-10

【０４４５】

実施例３４：　トラスツズマブ感受性卵巣癌細胞由来の腫瘍異種移植片モデルにおけるｉｎ　ｖｉｖｏでの例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の有効性

例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１０００００の抗腫瘍有効性を評価するために、実施例１７において記載したヒト卵巣癌細胞由来の確立された異種移植片モデルＳＫＯＶ３を使用した。

【０４４６】

雌の無胸腺ヌードマウスに、左側腹部で、ＨＢＳＳ中の３２５，０００細胞の腫瘍懸濁液を皮下接種した。次いで、１９０ｍｍ^{3}の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし、無作為割当および交互様式で、４つの処置群、すなわち、非特異的ヒトＩｇＧ対照、ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００に登録した。各群での投与は次のとおりであった。非特異的ヒトＩｇＧを、試験１日目に開始して、試験２６日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。Ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００を、試験１日目

に開始して、試験２６日目まで週２回、３ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。腫瘍体積を、試験を通じて測定し、表３２において列挙するパラメータを２９日目に測定した。

【０４４７】

データを図３５Ａ（腫瘍増殖）、図３５Ｂ（生存率プロット）、および表３２において提示するが、これらは、ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００での処置が、ＩｇＧ対照と比較して匹敵する腫瘍増殖阻害（Ｔ／Ｃ：０．５３～０．７１）、応答腫瘍数、進行までの時間、および試験２９日目での生存率をもたらしたことを示している。ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００の血清曝露は、試験７日目で、同様であった（３１～４１μｇ／ｍｌ）。

（表３２）

腫瘍応答		IgG (n=8)	v5019 (n=11)	V7091 (n=11)	V10000 (n=11)
29日目	平均腫瘍体積 (㎜3) (基線からの変化%)	1903 (+899%)	1001 (+416%)	1354 (+618%)	1114 (+503%)
	T/C (Tras)比	1	0.53	0.71	0.58
	応答動物 (腫瘍体積が対照の50%未満)	1/8	5/11	4/11	6/11
	PR (10%超の基線からの退縮)	0/8	1/11	0/11	0/11
	ZRD (腫瘍体積20㎜3未満)	0/8	0/11	0/11	0/11
進行するまでの時間	腫瘍倍加時間 (日数)	12	15	16	15
生存率	中央生存日数	29	Na	37	41
薬物曝露 (7日目)	平均血清濃度 (ug/ml)	na	31.2	41.0	31.2

【０４４８】

これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）が、中等度トラスツズマブ感受性ＨＥＲ２過剰発現卵巣癌の処置において、潜在的な有用性を有することを示している。

【０４４９】

実施例３５：　例示的な二重パラトピック抗ｈｅｒ２抗体は、トラスツズマブ感受性卵巣癌細胞由来の腫瘍異種移植片において、腫瘍増殖を用量依存的に阻害する

例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体ｖ１００００の用量依存性有効性を評価するために、実施例１７において記載したヒト卵巣癌細胞由来の樹立された異種移植片モデルＳＫＯＶ３を使用した。

【０４５０】

雌の無胸腺ヌードマウスに、左側腹部で、ＨＢＳＳ中の３２５，０００細胞の腫瘍懸濁液を皮下接種した。次いで、１９０ｍｍ^{3}の平均体積に達するまで、腫瘍をモニターし、無作為割当および交互様式で、６つの処置群、すなわち、非特異的ヒトＩｇＧ対照およびｖ１００００の５つの漸増用量に登録した。各群は、動物９～１３匹を含んだ。各群での投与は次のとおりであった。ＩｇＧ対照を、試験２６日目まで週２回、１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。Ｖ１００００を、週２回、０．１、０．３、１、３、または１０ｍｇ／ｋｇで静脈内投与した。

【０４５１】

データを、図３６および表３３において提示するが、これらは、ｖ１００００での処置が、対照ＩｇＧと比較して、腫瘍増殖阻害（Ｔ／Ｃ：０．２８～０．７３）を用量依存的に誘発することを示している。加えて、ｖ１００００は、研究２９日目で、応答腫瘍（１０ｍｇ／ｋｇで７／９、および０．１ｍｇ／ｋｇで３／１１）と用量依存的に関連し、進行するまでの時間を増大させた（１０ｍｇ／ｋｇでは２４日間、および０．１ｍｇ／ｋｇでは１２日間）。７日目でのｖ１００００の血清曝露は、用量依存的であり、０．１ｍｇ／ｋｇ用量での０．４６μｇ／ｍｌから、１０ｍｇ／ｋｇ用量での７９．３μｇ／ｍｌまで増大した。

（表３３）

腫瘍応答		IgG (n=8)	V10000, 10 mg/kg (n=9)	V10000, 3 mg/kg (n=11)	V10000, 1 mg/kg (n=11)	V10000, 0.3 mg/kg (n=13)	V10000, 0.1 mg/kg (n=11)
29日目	平均腫瘍体積(㎜3)（基線からの変化%）	1903 (+899%)	543 (+281%)	1114 (+503%)	1534 (+688%)	1535 (+694%)	1385 (+643%)
	T/C 比	1	0.28	0.58	0.81	0.81	0.73
	応答動物（腫瘍体積が対照の50%未満）	1/8	7/9	6/11	2/11	3/13	3/11
	PR（10%超の基線からの退縮）	0/8	1/9	0/11	0/11	0/13	0/11
	ZRD（腫瘍体積20㎜3未満）	0/8	0/9	0/11	0/11	0/13	0/11
進行するまでの時間	腫瘍倍加時間（日数）	12	24	15	14	12	12
薬物曝露（7日目）	平均血清濃度 (ug/ml)	na	79.3	31.2	4.7	1.5	0.46

【０４５２】

これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体ｖ１００００が、用量依存的に腫瘍進行を阻害することを示している。

【０４５３】

実施例３６：　ＨＥＲ２、ならびにＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ３を３＋、２＋、または１＋レベルで発現する細胞系の増殖を阻害する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体および抗ＨＥＲ２二重パラトピック－ＡＤＣの能力

ＩＨＣによって定義されているとおり、ＨＥＲ２、ならびにＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ３を３＋、２＋、１＋、または０＋レベルで発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頸部、子宮、および膀胱腫瘍細胞系から選択されたものの増殖を阻害する例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体（ｖ１００００）および対応する二重パラトピック抗ＨＥＲ２　ＡＤＣ（ｖ１０５５３）の能力を測定するために、次の実験を行った。

【０４５４】
実験を、次のとおりに行った。各細胞系について最適な播種密度を独自に決定して、７２時間のアッセイ後に、集密度約６０～９０％をもたらす播種密度を特定した。各細胞系を、９６ウェルプレート内で細胞系ごとに適切な増殖培地中に最適な播種密度で播種し、３６℃および５％CO_2で、２４℃にわたってインキュベートした。陽性対照およびビヒクル対照のほかに、抗体を、３つの濃度で（ｖ１００００は３００、３０、および０．３ｎＭで；ｖ１０５５３は３００、１、０．１ｎＭで）添加した。陽性対照である化学療法薬カクテル（ｃｈｅｍｏｃｏｃｋｔａｉｌ）薬物組合せは、５－ＦＵ（５－フルオロウラシル）、パクリタキセル、シスプラチン、エトポシド（２５μＭ）からなり、ビヒクル対照は、ＰＢＳからなった。抗体処理および対照を、細胞培養インキュベーター中、３６℃および５％CO_2で、７２時間にわたって細胞と共にインキュベートした。プレートを１２００ＲＰＭで１０分間にわたって遠心し、培養培地を吸引によって完全に除去した。ＲＰＭＩ　ＳＦＭ培地（２００μＬ）およびＭＴＳ（２０μＬ）を各ウェルに添加し、３６℃および５％CO_2で３時間にわたってインキュベートした。光学密度を４９０ｎＭで読取り、増殖阻害率を、ビヒクル対照に対して決定した。

【０４５５】
結果を図３７において示し、すべての試験結果の概要を図３８において示す。図３７Ａは、ｖ１００００の増殖阻害結果を示している。これらの結果は、ｖ１００００が、ＨＥＲ２ならびに同時発現のＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ３を３＋、２＋、１＋、または０＋レベルで発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頚部、子宮、および子宮内膜腫瘍細胞系の増殖を阻害し得ることを示している。３００ｎＭでのｖ１００００およびｖ１０５５３の活性を図３８においてまとめているが、この際、「＋」は、３００ｎＭで、ビヒクル対照の５％超である細胞生存率の低減を示した細胞系を示し、「－」は、ビヒクル対照の５％以下の生存率を示している。

【０４５６】
図３７Ｂは、ｖ１０５５３の増殖阻害結果を示している。これらの結果は、ｖ１０５５３が、ＨＥＲ２、ならびに同時発現のＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ３を３＋、２＋、１＋、または０＋レベルで発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頚部、子宮、および膀胱腫瘍細胞系の増殖を阻害し得ることを示している（図３８も参照されたい）。図３７Ｂにおいてプロットした結果は、３００および１ｎＭで最低の用量依存性増殖阻害を示した細胞系によって定義されており、１ｎＭでの増殖阻害は、５％以上である（図３７Ｂ）。

【０４５７】
これらの結果は、例示的な二重パラトピック抗体ｖ１００００およびＡＤＣのｖ１０５５３が、ＨＥＲ２を３＋、２／３＋、２＋、１＋、および０／１＋レベルで発現し、かつＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ３を２＋、１＋レベルで同時発現する乳房、結腸直腸、胃、肺、皮膚、卵巣、腎臓、膵臓、頭頚部、子宮、および膀胱組織に由来する腫瘍細胞の増殖を阻害し得ることを示している。

【０４５８】
実施例３７：　ＨＥＲ２　２＋、１＋、および０／１＋癌細胞のＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力

ＨＥＲ２を２＋、１＋、および／または０／１＋レベルで発現し、かつＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ３を２＋または１＋レベルで同時発現する腫瘍細胞のＡＤＣＣを媒介する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の能力を決定するために、次の実験を行った。試験した抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体は、対照としてのＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）およびｖ５０６と共に、５０１９、１００００、および１０１５４（ｖ１００００の非フコシル化バージョン）であった。

【０４５９】
ＡＤＣＣ実験を、ＮＫ－９２エフェクター細胞を用いて５：１のＥ／Ｔで実施例１１および実施例２５において記載されているとおりに（図３９）、かつＰＢＭＣエフェクター

細胞を用いて３０：１のＥ／Ｔで実施例２６において記載されているとおりに行った。

【０４６０】

結果を、図３９（ＮＫ－９２エフェクター細胞）および図４０（ＰＢＭＣエフェクター細胞）において示す。図３９Ａは、ＨＥＲ２　２＋頭頸部腫瘍細胞系（下咽頭癌）ＦａＤｕのＡＤＣＣ結果を示しており、この際、抗ＨＥＲ２二重パラトピックは、約１５％の最大細胞溶解を誘発している。図３９Ｃは、ＨＥＲ２　１＋　ＢｘＰＣ３膵臓腫瘍細胞系のＡＤＣＣ結果を示しており、図３９Ｄは、ＨＥＲ２　２＋　ＭｉａＰａｃａ２膵臓腫瘍細胞系の結果を示している。図３９Ｂは、ＨＥＲ２　０／１＋　Ａ５４９　ＮＳＣＬＣ（非小細胞肺癌）腫瘍細胞系のＡＤＣＣ結果を示している。ＢｘＰＣ３、ＭｉａＰａｃａ２、およびＡ５４９腫瘍細胞系において、ｖ１００００は、約５％の最大腫瘍細胞溶解を媒介した。

【０４６１】

図４０は、Ａ５４９、ＮＣＩ－Ｎ８７、およびＨＣＴ－１１６細胞におけるＡＤＣＣ結果を示しており、この際、ＰＢＭＣをエフェクター細胞として使用した。図４０Ａは、ＨＥＲ２　０／１＋　Ａ５４９　ＮＳＣＬＣ腫瘍細胞系のＡＤＣＣ結果を示しており、この際、ｖ１００００は、約２８％の最大細胞溶解を誘発し、これは、Ｎ－連結グリカンにおいて同等レベルのフコース含有率を有するＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（商標）に匹敵した。例示的な１００％非フコシル化（フコース０％）二重パラトピックｖ１０１５４は、Ｎ－連結グリカン中にフコース約８８％を有するｖ１００００およびＨｅｒｃｅｐｔｉｎと比較して、最大細胞溶解の増大（４０％の最大細胞溶解）および効力の増大を示している。

【０４６２】

図４０Ｂは、ＨＥＲ２　３＋胃腫瘍細胞系ＮＣＩ－Ｎ８７のＡＤＣＣ結果を示している。図４０Ｂは、例示的な二重パラトピックｖ５０１９（約８８％フコシル化）が約２３％の最大細胞溶解を媒介し、トラスツズマブｖ５０６（約９８％フコシル化）と比較して低いＥＣ５０を有することを示している。

【０４６３】

図４０Ｃは、ＨＥＲ２　１＋　ＨＣＴ－１１６結腸直腸腫瘍細胞系のＡＤＣＣ結果を示している。図４０Ｃは、例示的な二重パラトピックｖ５０１９（約８８％フコシル化）が約２５％の最大細胞溶解を媒介し、トラスツズマブｖ５０６（約９８％フコシル化）と比較して効力があることを示している。

【０４６４】

これらの結果は、例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が、頭頸部、胃、ＮＳＣＬＣ、および膵臓腫瘍病理に由来するＨＥＲ２　０１／＋、２＋、および３＋腫瘍細胞のＡＤＣＣを誘発し得ることを示している。エフェクター細胞としてのＮＫ－９２細胞の存在下でのＡＤＣＣは、比較的高い（５％超）パーセンテージの最大細胞溶解を示すために、明らかなＨＥＲ２　２＋受容体レベル要求（すなわち、２＋以上）を示した。しかしながら、ＰＢＭＣ細胞をエフェクター細胞として使用した場合には、比較的高いレベルの最大細胞溶解が達成され（それぞれｖ１００００およびｖ１０１５４で、５％超および最高２８％または４０％）、かつこれは、０／１＋、１＋、および３＋のＨＥＲ２受容体密度レベルでも５％超ＡＤＣＣが見られたので、ＨＥＲ２受容体密度には依存していなかった。

【０４６５】

実施例３８：　ＳＰＲによって測定したＨＥＲ２結合親和性および反応速度

実施例１において示したとおり、種々の抗原結合性部分の形式を有する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体を、表１において記載したとおりに構築した。それらの形式には、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式（ｖ６７１７）、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式（ｖ６９０２およびｖ６９０３）の他にも、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）が含まれた。次の実験を、これらの例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式のＨＥＲ２結合親和性および反応速度を比較するために行った。

【０４６６】

マウスＨＥＲ２　ＥＣＤ（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ５０７１４－Ｍ０８Ｈ）へ

の親和性および結合反応速度を、Ｂｉａｃｏｒｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）製のＴ２００　ＳＰＲシステムを用いて単一サイクル反応速度によって測定した。抗ヒトＦｃ２０００～４０００ＲＵを、標準的なアミンカップリングを使用してＣＭ５チップ上に固定化した。５０１９は、５０ＲＵで抗ヒトＦｃ表面上に捕捉された。組換えＨＥＲ２　ＥＣＤ（１．８～１２０ｎＭ）を５０μｌ／分で３分間にわたって注入し、最終の注入後に、３０分の解離を続けた。ＨＥＲ２希釈を二つ組で分析した。センサーグラムを、１：１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデルに全体的にフィットさせた。すべての実験を室温の２５℃で行った。

【０４６７】

表３４における結果は、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ二重パラトピック抗体（ｖ５０１９およびｖ７０９１）、Ｆａｂ－Ｆａｂ変異体（ｖ６９０２およびｖ６９０３）、およびｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ変異体（ｖ６７１７）が同等の結合親和性（１～４ｎＭ）を有することを示している。Ｆａｂ－ｓｃＦｖ変異体ｖ１００００は、約０．６ｎＭの比較的高い結合親和性（低いＫＤ）を示した。単一特異性抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ４抗体（ｖ５０６）および抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２抗体（ｖ４１８４）は、対照としてアッセイに含まれた。これらの結果は、ｖ６７１７、ｖ６９０２、ｖ６９０３、ｖ５０１９、および／またはｖ７０９１を含む分子形式が、同等の結合親和性を有し、したがって、これらの抗体間での機能の差違は、形式の差異から生じていると考えることができることを示している。

（表３４）

	平均			標準偏差		
抗体変異体	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
v506	7.34E+04	4.08E-05	5.56E-10	1.13.E+03	3.04E-06	3.28E-11
v4184	3.61E+04	5.46E-04	1.56E-08	7.78.E+03	2.80E-05	4.12E-09
v5019	6.01E+04	7.77E-05	1.29E-09	1.30.E+03	8.56E-07	4.24E-11
v7091	5.17E+04	1.19E-04	2.31E-09	2.70.E+03	1.49E-05	4.09E-10
v10000	6.44E+04	3.69E-05	5.79E-10	6.18.E+03	6.72.E-06	1.42.E-10
v6902	6.83E+04	1.72E-04	2.72E-09	1.93E+04	4.49E-05	1.43E-09
v6903	7.10E+04	1.71E-04	2.75E-09	3.60E+04	3.96E-06	1.34E-09
v6717	1.50E+05	5.33E-04	4.45E-09	1.28E+05	2.54E-04	2.11E-09

【０４６８】

実施例３９：　ＨＥＲ２＋腫瘍細胞への結合に対する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式の効果

次の実験を、種々の分子形式（例えば、ｖ６７１７ではｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ　ＩｇＧ１；ｖ６９０３およびｖ６９０２ではＦａｂ－Ｆａｂ　ＩｇＧ１；ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００ではＦａｂ－ｓｃＦｖ　ＩｇＧ１）を有する例示的な抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体の細胞全体結合特性（Ｂｍａｘおよび見掛けＫ$_D$）を比較するために行った。

【０４６９】

実験を、実施例６において記載したとおりに行った。結果を、図４１および表３５～３８において示す。図４１Ａおよび表３５は、ＢＴ４７４　ＨＥＲ２　３＋乳房腫瘍細胞系への例示的な二重パラトピック抗体のＦＡＣＳ結合結果を示している。結果は、すべての抗ＨＥＲ２抗体が、単一特異性二価抗ＨＥＲ２抗体ｖ５０６と比較した場合に高いＢｍａｘ（１．５～１．７倍高い）を有することを示している。Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００）およびＦａｂ－Ｆａｂ（ｖ６９０３）形式は、ｖ５０６と比較して、約１．７倍増大したＢｍａｘを有し、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式（ｖ６７

１７）は、１．５倍増大したＢｍａｘを有した。ｖ５０６およびｖ４１８４のＦＳＡの等モルの組み合わせは、Ｂｍａｘにおいて１．７倍の増大をもたらした。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体の見掛けＫ$_D$は、単一特異性ｖ５０６と比較して約２～３倍高かった。

（表３５）ＦＡＣＳ結合ＢＴ－４７４

抗体変異体	K_D (nM)	Bmax
v506	9.0	23536
v10000	16	39665
v506+ v4184	16	40320
v5019	21	39727
v7091	22	36718
v6717	30	36392
v6903	31	40321

【０４７０】

図４１Ｂおよび表３６は、ＪＩＭＴ－１　ＨＥＲ２　２＋乳房腫瘍細胞系へのＦＡＣＳ結合結果を示している。結果は、すべての抗ＨＥＲ２抗体が、単一特異性二価抗ＨＥＲ２抗体ｖ５０６と比較した場合に、高いＢｍａｘ（１．５～１．８倍高い）を有することを示している。ｖ５０６と比較して、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（ｖ７０９１およびｖ１００００）およびＦａｂ－Ｆａｂ（ｖ６９０３）形式は、約１．７倍増大したＢｍａｘを有し、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式（ｖ６７１７）は、１．５倍増大したＢｍａｘを有し、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（ｖ５０１９）およびＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）は、１．８倍増大したＢｍａｘを有した。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックＦａｂ－ｓｃＦｖ抗体の見掛けＫ$_D$は、単一特異性ｖ５０６と比較して約２～４倍高く；Ｆａｂ－Ｆａｂ（ｖ６９０３）およびｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ（ｖ６７１７）のＫ$_D$は、ｖ５０６と比較して約８倍高かった。

（表３６）ＦＡＣＳ結合ＪＩＭＴ－１

抗体変異体	K_D (nM)	Bmax
v506	3.5	2574
v10000	7.6	4435
v506+ v4184	8.0	4617
v5019	12	4690
v7091	14	4456
v6717	26	3769
v6903	28	4452

【０４７１】

図４１Ｃおよび表３７は、ＨＥＲ２　１＋　ＭＣＦ７乳房腫瘍細胞系への例示的な二重

パラトピック抗体のＦＡＣＳ結合結果を示している。結果は、抗ＨＥＲ２抗体ｖ１０００００およびＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）が、単一特異性二価抗ＨＥＲ２抗体ｖ５０６と比較して１．６倍高いＢｍａｘを有することを示している。ｖ５０６と比較して、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（ｖ５０１９、ｖ７０９１）は、約１．４倍；ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式（ｖ６７１７）は、１．３倍、かつＦａｂ－Ｆａｂ形式（ｖ６９０３）は、１．２倍増大したＢｍａｘを有した。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックＦａｂ－ｓｃＦｖ、Ｆａｂ－Ｆａｂ（ｖ６９０３）、およびＦＳＡの組合せ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）の見掛けＫ$_D$は、ｖ５０６と比較して約２～３分の１であったが；ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ（ｖ６７１７）のＫ$_D$は、ｖ５０６と比較して約３倍高かった。

（表３７）ＦＡＣＳ結合ＭＣＦ７

抗体変異体	K_D (nM)	Bmax
v506+ v4184	4.5	1410
v7091	6.1	1216
v5019	6.3	1201
v10000	6.8	1381
v6903	7.1	1105
v506	12	889
v6717	32	1167

【０４７２】

図４１Ｄおよび表３８は、ＨＥＲ２　０／１＋　ＭＤＡ－ＭＤ－２３１乳房腫瘍細胞系への例示的な二重パラトピック抗体のＦＡＣＳ結合結果を示している。結果は、例示的な二重パラトピック抗ＨＥＲ２抗体が、単一特異性二価抗ＨＥＲ２抗体ｖ５０６と比較して約１．３～１．４倍増大したＢｍａｘを有したことを示している。ＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）は、１．７倍増大したＢｍａｘを有した。例示的な抗ＨＥＲ２二重パラトピックＦａｂ－ｓｃＦｖ抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、ｖ１００００）およびＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）の見掛けＫ$_D$は、ｖ５０６と比較してほぼ同等のＫＤを有し；Ｆａｂ－Ｆａｂ（ｖ６９０３）およびｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ（ｖ６７１７）は、ｖ５０６と比較してそれぞれ約４および１６倍高いＫ$_D$であった。

（表３８）ＦＡＣＳ結合ＭＤＡ－ＭＢ－２３１

抗体変異体	K_D (nM)	Bmax
v506	4.8	395
v10000	5.6	558
v506+ v4184	7.3	662
v7091	7.9	525
v5019	8.7	548
v6903	17	534
v6717	77	524

【０４７３】

腫瘍細胞結合結果は、種々の分子形式を有する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が、Ｈ

ＥＲ２　３＋、２＋、１＋、および０／１＋腫瘍細胞に対して、二価単一特異性　抗ＨＥＲ２抗体と比較して増大したＢｍａｘを有することを示している。種々の抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体のうち、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式は、ＨＥＲ２　３＋、２＋、１＋、および０／１＋腫瘍細胞に対して、ｖ５０６と比較して、最も低いＢｍａｘの増大を有した。これらの結果はまた、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖおよびＦａｂ－Ｆａｂ形式が、ＨＥＲ２　３＋、２＋、１＋、および０／１＋腫瘍細胞に対して、単一特異性ｖ５０６（３～１６倍の上昇）および二重パラトピックＦａｂ－ｓｃＦｖ形式（約２倍以上）と比較して、K_Dの最大の増大を有することを示している。K_Dの増大は、積極的な結合の低減の指標であり、種々の二重パラトピック形式が、細胞表面上のＨＥＲ２への結合について特有の機構を有することを示唆している。

【０４７４】

実施例４０：　ＨＥＲ２＋細胞における内部移行に対する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式の効果

様々なレベルでＨＥＲ２を発現するＨＥＲ２＋細胞において内部移行する、種々の分子形式（例えば、ｖ６７１７ではｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ　ＩｇＧ１；ｖ６９０３およびｖ６９０２ではＦａｂ－Ｆａｂ　ＩｇＧ１；ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００ではＦａｂ－ｓｃＦｖ　ＩｇＧ１）を有する例示的な抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体の能力を比較するために、次の実験を行った。

【０４７５】

実施例９において詳述したとおりに、実験を行った。結果を図４２および表３９～４１において示す。図４２Ａおよび表３９は、ＨＥＲ２　３＋　ＢＴ－４７４における内部移行結果を示している。これらの結果は、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式（ｖ１００００）およびＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）が、単一特異性抗ＨＥＲ２　ｖ５０６と比較して２．２倍多い量の細胞内抗体を有していることを示している。ｖ５０６と比較して、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式（ｖ６７１７）は１．９倍多い量；Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式（ｖ５０１９およびｖ７０９１）は１．５～１．７倍多い量；かつＦａｂ－Ｆａｂ形式（ｖ６９０２およびｖ６９０３）は１．２～１．３倍多い量の細胞内抗体蓄積を有した。

（表３９）内部移行ＢＴ－４７４

抗体変異体	表面 4°C	表面 37°C	内部 37°C
v506	2156	1590	3453
v6902	2407	2077	4035
v6903	2717	986	4573
v7091	2759	2227	5111
v5019	2867	2675	5710
v6717	2006	1212	6498
v10000	3355	2851	7528
v506 + v4184	3998	2326	7569

【０４７６】

図４２Ｂおよび表４０は、ＨＥＲ２　２＋　ＪＩＭＴ－１における内部移行結果を示している。これらの結果は、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式（ｖ１００００）およびＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）が、単一特異性抗ＨＥＲ２　ｖ５０６と比較して、それぞれ１．８倍および１．９倍多い量の細胞内抗体を有することを示している。ｖ５０６と比較して、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ（ｖ６７１７）およびＦａｂ－ｓｃＦｖ形式（ｖ５０１９）は１．４倍多い量；Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（ｖ７０９１）およびＦａｂ－Ｆａｂ形式（ｖ６９０２およびｖ６９０３）は１．２倍多い量の細胞内抗体蓄積を有する。

（表４０）内部移行ＪＩＭＴ－１

抗体変異体	表面 4°C	表面 37°C	内部 37°C
v506	337	-7.1	759
v6902	389	152	926
v7091	426	102	935
v6903	392	130	945
v5019	437	5.2	1035
v6717	247	31	1082
v10000	474	103	1375
v506 + v4184	583	89	1449

【０４７７】

図４２Ｃおよび表４１は、ＨＥＲ２　１＋　ＭＣＦ７における内部移行結果を示している。これらの結果は、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式およびＦａｂ－ｓｃＦｖ形式が、単一特異性抗ＨＥＲ２　ｖ５０６と比較して３．０および２．８倍多い量の細胞内抗体を有することを示している。ｖ５０６と比較して、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ形式（ｖ１００００）およびＦＳＡの組み合わせ（ｖ５０６＋ｖ４１８４）は約２．０倍；Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（ｖ７０９１）およびＦａｂ－Ｆａｂ（ｖ６９０３）形式は１．８倍多い量の細胞内抗体蓄積を有する。

（表４１）内部移行ＭＣＦ７

抗体変異体	表面 4°C	表面 37°C	内部 37°C
v506	48	10	48
v7091	77	27	87
v6903	81	35	89
v10000	78	20	96
v506 + v4184	87	19	103
v5019	81	17	134
v6717	48	31	145

【０４７８】

これらの結果は、抗原結合性ドメインの構造および形式に関して異なる種々の分子形式を有する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体が、ＨＥＲ２　３＋、２＋、および１＋腫瘍細胞において、特有の程度の内部移行を有することを示している。一般に、ｖ５０６およびｖ４１８４の単一特異性ＦＳＡの組み合わせ、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ（ｖ１００００、ｖ７０９１、およびｖ５０１９）およびｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ（ｖ６７１７）二重パラトピック形式は、ＨＥＲ２　３＋、２＋、および１＋腫瘍細胞において比較的高い内部移行値を有した。それに対して、Ｆａｂ－Ｆａｂ二重パラトピック形式（ｖ６９０２およびｖ６９０３）は、ＨＥＲ２　３＋、２＋、および１＋腫瘍細胞において、最も低い内部移行値を有した。これらのデータは、抗原結合性ドメインの分子形式および幾何学的スペーシングが、ＨＥＲ２受容体を架橋し、引き続いて、ＨＥＲ２＋腫瘍細胞に内部移行する二重パラトピ

ック抗体の能力に対して影響を有することを示唆している。２つの抗原結合性ドメインの間の距離が最大であるＦａｂ－Ｆａｂ二重パラトピック形式は、最も低い内部移行程度をもたらしたが、抗原結合性ドメインの間の距離がより短いＦａｂ－ｓｃＦｖおよびｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式は、ＨＥＲ２＋細胞においてより多い内部移行を有した。これは、Ｊｏｓｔ ｅｔ ａｌ ２０１３，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ２１，１９７９－１９９１）において記載されたとおりの効力および比較的短いリンカー長さの相関と一致している。

【０４７９】

実施例４１：ＨＥＲ２＋細胞におけるＡＤＣＣに対する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式の効果

ＨＥＲ２を様々なレベルで発現するＨＥＲ２＋細胞においてＡＤＣＣを媒介する、種々の分子形式を有する例示的な抗ＨＥＲ２ ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体（例えば、ｖ６７１７ではｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ ＩｇＧ１；ｖ６９０３およびｖ６９０２ではＦａｂ－Ｆａｂ ＩｇＧ１；ｖ５０１９、ｖ７０９１、およびｖ１００００ではＦａｂ－ｓｃＦｖ ＩｇＧ１）の能力を比較するために、次の実験を行った。

【０４８０】

ＡＤＣＣアッセイを行う前に、Ｎ－連結グリコペプチドにおけるフコース含有率を定量化するために、グリコペプチド分析を抗体試料で行った。実施例２３において記載したとおりに、方法を行った。結果を表４２において示す；データは、例示的な二重パラトピック変異体ｖ５０１９、ｖ６７１７、ｖ６９０３が、Ｎ－連結グリカンにおいて同等のフコース含有率（９１～９３％）を有することを示している。ＡＤＣＣアッセイ結果を解釈する際にフコース含有率を正規化するために、Ｎ－グリカン中に同等レベルのフコースを有する抗体試料をＡＤＣＣアッセイのために選択した。

（表４２）ＬＣ－ＭＳトリプシンペプチド分析

変異体	フコースを伴って観察されたグリコペプチドのパーセンテージ	フコースを伴わずに観察されたグリコペプチドのパーセンテージ
v6903	90.7	9.3
v6717	92.8	7.2
v5019	91.3	8.7

【０４８１】

ＮＫ－９２エフェクター細胞を用いて５：１のＥ／Ｔで実施例１１において記載したとおりに、ＡＤＣＣ実験を行った。ＡＤＣＣ結果を、図４３および表４３～４５において示す。図４３Ａおよび表４３は、ＨＥＲ２ ２＋ ＪＩＭＴ－１乳房腫瘍細胞におけるＡＤＣＣ結果を示している。これらのデータは、ｖ５０１９、ｖ６７１７、およびｖ６９０３が同様のレベルの最大細胞溶解を誘発すること、およびＨＥＲ２ ２＋腫瘍細胞がターゲットである場合、ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式（ｖ６７１７）が、ｖ５０１９およびｖ６９０３と比較して低い効力を有することを示している。

（表４３）ＪＩＭＴ－１ ＡＤＣＣ

抗体変異体	EC50 (nM)	最大細胞溶解%
v6903	約0.03	48
v5019	約0.16	47
v6717	約0.72	51

【０４８２】

図４３Ｂおよび表４４は、ＨＥＲ２　１＋　ＭＣＦ７乳房腫瘍細胞におけるＡＤＣＣ結果を示している。これらのデータは、ｖ５０１９およびｖ６７１７が、ｖ６９０３（２４％）と比較してやや高い最大細胞溶解（２７～３０％）を有することを示している。これらのデータはまた、ｖ６７１７が最も効力が低く、より低いＥＣ５０値を有するｖ６９０３およびｖ５０１９が続くことを示している。

（表４４）ＭＣＦ７　ＡＤＣＣ

抗体変異体	EC_{50} (nM)	最大細胞溶解%
v5019	約0.69	27
v6717	109	30
v6903	0.94	24

【０４８３】

図４３Ｃおよび表４５は、ＨＥＲ２　０／１＋　ＭＤＡ－ＭＢ－２３１乳房腫瘍細胞におけるＡＤＣＣ結果を示している。これらのデータは、ｖ５０１９がｖ６９０３（６２％）およびｖ６７１７（６３％）と比較してやや高い最大細胞溶解（７７％）を示すことを示している。これらのデータはまた、ｖ６７１７が、効力が最も低く、より低いＥＣ$_{50}$値を有するｖ６９０３およびｖ５０１９が続くことを示している。

（表４５）ＭＤＡ－ＭＢ－２３１　ＡＤＣＣ

抗体変異体	EC_{50} (nM)	最大細胞溶解%（トップのみ）
v5019	0.20	71
v6717	10	63
v6903	0.79	62

【０４８４】

これらのデータは、例示的な抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体がＨＥＲ２　２＋および１＋腫瘍細胞において、ＡＤＣＣによる同様のレベルの最大細胞溶解を誘発することを示している。最大細胞溶解における類似性にもかかわらず、これらのデータはまた、種々の分子形式が特有のＡＤＣＣ効力を有することを示している。ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖは、ＨＥＲ２　２＋およびＨＥＲ２　１＋において効力が最も低かった（最大のＥＣ$_{50}$値）。これら３つの形式での効力の差が、ＨＥＲ２　１＋細胞をターゲットとするＡＤＣＣデータにおいて見られ、ＥＣ５０値は、ｖ６７１７＞ｖ６９０３＞ｖ５０１９であった。これらのデータは、実施例４０（ＦＡＣＳ結合）において示された観察と一致し、K_Dの増大（親和性の低下）が、Ｆａｂ－ＦａｂおよびｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ形式で見られた。

【０４８５】

実施例４２：　ＨＥＲ２＋腫瘍細胞の増殖に対する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式の効果

基礎増殖か、またはリガンド刺激されたＨＥＲ２　３＋、２＋、および１＋腫瘍細胞の増殖に対する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式の効果を比較するために、次の実験を行った。基礎増殖は、実施例１５において記載したとおりに測定し、リガンド刺激増殖は、実施例２７において記載したとおりに測定した。両方の種類の実験において、増殖を、対照処理に対する生存％として測定した。

【０４８６】

図４４および表４６は、外因性増殖刺激リガンド（ＥＧＦおよびＨＲＧ）の存在下での

ＨＥＲ２　３＋乳癌細胞（ＢＴ－４７４）の増殖に対する例示的な抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体の効果を示している。ＥＧＦまたはＨＲＧの不在下では、抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体は、ＢＴ－４７４細胞の増殖を阻害することができ、各処理群の生存％は、次のとおりにランキングされた：ｖ６９０３＜ｖ５０６＋ｖ４１８４＜５０６＜ｖ７０９１＜ｖ５０１９＜ｖ１００００＜ｖ６７１７。ＨＲＧの存在下では、偽対照に対する増殖阻害は、ｖ５０６＋ｖ４１８４のＦＳＡの組み合わせでのみ達成された。ＥＧＦの存在下では、偽対照に対する増殖阻害が達成され、各処理群の生存％は、次のとおりにランキングされた：ｖ６９０３＜ｖ５０６＋ｖ４１８４＜７０９１＜ｖ１０００＜５０１９。

（表４６）

処理	生存%		
	抗体のみ	+HRG	+EGF
偽	100	143	131
v6717	113	126	129
v10000	70	118	78
v5019	67	133	81
v7091	61	119	61
v506	53	141	118
v506 + v4184	43	89	45
v6903	32	120	39

【０４８７】

図４５は、ＳＫＢｒ３　ＨＥＲ２　３＋細胞系の増殖阻害に対する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式の用量依存性効果を示している。データは、図４４において示されている結果と一致し、二重パラトピック形式の効力／有効性の順位序列は、ＨＥＲ２　３＋腫瘍細胞では、Ｆａｂ－Ｆａｂ＞Ｆａｂ－ｓｃＦｖ＞ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖのとおりである。

【０４８８】

ＨＥＲ２＋細胞の生存に対する抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式の効果を図４６において示し、この際、図４６Ａは、３００ｎＭでのトラスツズマブ感受性ＳＫＯＶ３　ＨＥＲ２　２＋／３＋細胞系における結果を示しており；図４６Ｂは、３００ｎＭでのＪＩＭＴ－１　ＨＥＲ２　２＋（トラスツズマブ抵抗性）細胞における結果を示しており、図４６Ｃは、３００ｎＭでのＭＣＦ７　ＨＥＲ２　１＋細胞系における結果を示している。ＳＫＯＶ３細胞系では、増殖阻害の規模において、二重パラトピック形式のうちでわずかな差異しか観察されず、ＪＩＭＴ－１およびＭＣＦ７細胞では、いずれの試験抗体によっても、増殖阻害は観察されなかった。

【０４８９】

図４４および図４５におけるデータは、Ｆａｂ－ｓｃＦｖおよびＦａｂ－Ｆａｂ形式を有する抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体（ｖ５０１９、ｖ７０９１、ｖ１００００、ｖ６９０３）が、ＥＧＦまたはＨＲＧの不在下、および存在下で、ＨＥＲ２　３＋腫瘍細胞を増殖阻害し得ることを示している。ＨＥＲ２　３＋細胞系ＢＴ－４７４およびＳＫＢＲ３では、偽対照に対する増殖阻害は、次のとおりに順位序列された：ｖ５０６＋ｖ４１８４＞ｖ６９０３＞ｖ７０９１＞ｖ１００００＞ｖ５０１９＞ｖ５０６＞ｖ６７１７。抗原結合性ドメイン間の距離（Ｆａｂ－Ｆａｂ＞Ｆａｂ－ｓｃＦｖ＞ｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ）が、ＨＥＲ２　３＋腫瘍細胞における増殖阻害の順位序列と相関する。トラスツズマブ感受性腫瘍細胞ＢＴ－４７４およびＳＫＢｒ３におけるデータに基づき、

形式による増殖阻害の差違は、ＨＥＲ２　３＋レベルにおいては有意であるが、ＨＥＲ２　２＋またはＨＥＲ２　１＋レベルではそれほど有意ではないと予測され得る。

【０４９０】

実施例４３：　様々な抗体捕捉レベルでのＨＥＲ２結合親和性および反応速度の評価

ＳＰＲによって、様々な表面密度で捕捉された場合の例示的な抗ＨＥＲ２　ＥＣＤ２×ＥＣＤ４二重パラトピック抗体のＨＥＲ２結合反応速度（ｋｄ、オフ速度）を比較するために、次の実験を行った。オフ速度が低下する（ゆっくりになる）と、抗体捕捉レベル（表面密度）が上昇するという相関が、トランス結合（すなわち、実施例１２において記載されている、２個のＨＥＲ２分子への１個の抗体分子結合）の指標である。この実験において、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式（ｖ６９０３）をＦａｂ－ｓｃＦｖ形式（ｖ７０９１）と比較して、変異体の内で、トランス結合における潜在的な差異を決定した。抗原結合性ドメイン間の比較的広い空間的距離に起因して、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式はシス結合し得る（１個のＨＥＲ２分子上のＥＣＤ２および４を連結する）のに対して；Ｆａｂ－ｓｃＦｖは、その抗原結合性ドメイン間の比較的短い距離に起因して、シス結合し得ないであろうと仮定される。抗ＨＥＲ２単一特異性ｖ５０６が、対照として含まれた。

【０４９１】

実験を、実施例１２において記載したとおりにＳＰＲによって行った。データを図４７において示す。図４７Ａは、ｖ６９０３およびｖ７０９１の種々の抗体捕捉レベルでのｋｄ（１／ｓ）のプロットおよび線形回帰分析を示している。ｖ７０９１およびｖ６０９３は両方とも、表面捕捉レベルの上昇につれてオフ速度が低下する傾向を示しているが；しかしながら、この相関は、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ変異体（ｖ７０９１；Ｐ値＝０．０２３）では有意であるが、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式（ｖ６０９３；Ｐ値＝０．０５３）では有意ではない。オフ速度は、抗ＨＥＲ２単一特異性対照ｖ５０６では様々な抗体捕捉レベルで、変化しないままであった。

【０４９２】

図４７Ｂは、ｖ６９０３およびｖ７０９１の種々の抗体捕捉レベルでのK_D（Ｍ）のプロットおよび線形回帰分析を示している。オフ速度比較と同様に、ｖ７０９１およびｖ６０９３は両方とも、表面捕捉レベルの上昇につれて親和性が増大する傾向を示している（より低いK_D値）。しかしながら、この相関は、Ｆａｂ－ｓｃＦｖ変異体（ｖ７０９１；Ｐ値＝０．０４）では有意であるが、Ｆａｂ－Ｆａｂ形式（ｖ６０９３；Ｐ値＝０．５１）では有意ではない。K_Dは、抗ＨＥＲ２単一特異性対照ｖ５０６では様々な抗体捕捉レベルで、変化しないままであった。図４７におけるデータは、Ｆａｂ－ＦａｂおよびＦａｂ－ｓｃＦｖ抗ＨＥＲ２二重パラトピック抗体形式が、抗体表面捕捉レベルの上昇につれてオフ速度が低下する傾向を示すことを示しており；これらの傾向は、単一特異性抗Ｈｅｒ２抗体と比較して特有である。

【０４９３】

実施例４４：　ペルツズマブＦａｂの親和性および安定性の操作

表１において示したとおり、１種の変異体（ｖ１００００）は、ペルツズマブＦａｂにおいて変異を含む。このＦａｂは、ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏでの尽力による親和性および安定性の操作に由来し、一価またはワンアーム（Ｏｎｅ－Ａｒｍｅｄ）抗体（ＯＡＡ）として実験的に測定された。

【０４９４】

変異体９９９６：　ＨＥＲ２結合性ドメインが、ＶＬ領域にＹ９６Ａを有し、かつＶＨ領域にＴ３０Ａ／Ａ４９Ｇ／Ｌ６９Ｆ（Ｋａｂａｔ付番）を有する鎖Ａ上の、ペルツズマブから誘導されたＦａｂであり、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異（ＥＵ付番）を有し、鎖ＢにＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの変異（ＥＵ付番）を有するヘテロ二量体であり、鎖Ｂのヒンジ領域がＣ２２６Ｓの変異を有し；抗原結合性ドメインがＨＥＲ２のドメイン４に結合する一価抗ＨＥＲ２抗体。

【０４９５】

変異体１００１４：　ＨＥＲ２結合性ドメインが、ＶＬ領域にＹ９６Ａを有し、かつＶＨ領域にＴ３０Ａ（Ｋａｂａｔ付番）を有する鎖Ａ上の、ペルツズマブから誘導されたＦａｂであり、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異（ＥＵ付番）を有し、鎖ＢにＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの変異（ＥＵ付番）を有するヘテロ二量体であり、鎖Ｂのヒンジ領域がＣ２２６Ｓの変異を有し；抗原結合性ドメインがＨＥＲ２のドメイン４に結合する一価抗ＨＥＲ２抗体。

【０４９６】

変異体１００１３：　ＨＥＲ２結合性ドメインが、鎖Ａ上の、野生型ペルツズマブから誘導されたＦａｂであり、Ｆｃ領域が、鎖ＡにＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖの変異（ＥＵ付番）を有し、鎖ＢにＴ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗの変異（ＥＵ付番）を有するヘテロ二量体であり、鎖Ｂのヒンジ領域がＣ２２６Ｓの変異を有し；抗原結合性ドメインがＨＥＲ２のドメイン４に結合する一価抗ＨＥＲ２抗体。

【０４９７】

次の実験を、操作されたペルツズマブ変異体のＨＥＲ２結合親和性および安定性を比較するために行った。

【０４９８】

ＯＡＡ変異体を、実施例１において記載したとおりにクローニングし、発現させた。

【０４９９】

ＯＡＡを、実施例１において記載したとおりにプロテインＡクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【０５００】

ヘテロ二量体純度（すなわち、ヘテロ二量体Ｆｃを含むＯＡＡの量）を、Ｃａｌｉｐｅｒ　ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　＃７６０４９９）を使用する非還元型ハイスループットタンパク質発現アッセイによって評価した。ＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　ＬａｂＣｈｉｐ　Ｕｓｅｒ　Ｇｕｉｄｅ　ｖｅｒｓｉｏｎ２　ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩ　Ｕｓｅｒ　Ｍａｎｕａｌに従って、ただし、次の変更を加えて、手順を実施した。２μｌまたは５μｌ（濃度範囲は５～２０００ｎｇ／μｌ）のいずれでも、ヘテロ二量体試料を、９６ウェルプレート（ＢｉｏＲａｄ　＃　ＨＳＰ９６０１）の別々のウェルに、ＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｓａｍｐｌｅ　Ｂｕｆｆｅｒ７μｌ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　＃　７６０３２８）と共に添加した。次いで、ヘテロ二量体試料を、７０℃で１５分間にわたって変性した。ＬａｂＣｈｉｐ機器を、ＨＴ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｃｈｉｐ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　＃７６０４９９）およびＡｂ－２００アッセイ設定を使用して操作する。使用後に、チップをＭｉｌｌｉＱ水で洗浄し、４℃で貯蔵した。

【０５０１】

実施例２４において示したプロトコルでＤＳＣによって決定されるとおりに融解温度またはＴｍを測定することによって、試料の安定性を評価した。ＤＳＣを、ＳＥＣ精製の前後に測定した。

【０５０２】

試料のＨＥＲ２　ＥＣＤに対する親和性を、実施例１２によるプロトコルに従ってＳＰＲによって測定した。ＳＰＲを、ＳＥＣ精製の前後に測定した。表４７Ａおよび４７Ｂにおいてまとめるとおり、可変ドメインにおける変異は、野生型安定性を維持しつつ、野生型ペルツズマブと比較して、ＦａｂのＨＥＲ２親和性を増大させている。（[1]　Ｃａｌｉｐｅｒ　ＬａｂＣｈｉｐによって決定された純度；[2]　ＫＤ（野生型）／ＫＤ（変異体）（表４７Ａ）

OAA 変異体	Fab HC 変異	LC 変異	プロテインA 収量 (mg/L)	SEC前のSPR				SEC後の Het 純度[1]	SEC後のSPR			
				KD 平均 (nM)	KD 標準偏差 (nM)	n	野生型に対する倍数[2]		KD 平均 (nM)	KD 標準偏差 (nM)	n	野生型に対する倍数
v9996	T30A/A49G /L69F	Y96A	22	1.7E-09	1.7E-10	5	9.6	93%	1.8E-09	1.6E-11	2	8.4
v10014	T30A	Y96A	20	2.0E-09	3.1E-10	4	8.1	81%	2.1E-09	5.2E-10	3	7.0
v10013	WT	WT	18	1.6E-08	5.1E-09	16	1.0	91%	1.5E-08	3.5E-09	4	1.0

（表４７Ｂ）

OAA 変異体	SEC前のDSC		SEC後のDSC	
	Tm (C)	野生型に対するΔTm (C)	Tm (C)	野生型に対するΔTm (C)
v9996	77.2	-0.2	77.2	-0.7
v10014	75.5	-1.9	75.5	-2.4
v10013	77.4	0.0	77.9	0.0

【０５０３】

実施例において使用した試薬は一般に、市販されているか、または当技術分野で公知の市販の計器、方法、または試薬を使用して調製することができる。上述の実施例は、本明細書に記載の様々な態様および本明細書に記載の方法の実行を例示している。これらの実施例は、本発明の多くの種々の実施形態の包括的な記載を提供することを意図したものではない。したがって、前述の発明は、理解を明瞭にすることを目的として実例および実施例によって多少詳細に記載されているが、当業者であれば、添付の請求の範囲に記載の意図および範囲から逸脱することなく、本明細書に多くの変化および変更を成すことができることを容易に了解するであろう。

【０５０４】

本明細書において言及されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個々の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個別に、参照によって本明細書に組み込まれると示されている場合と同程度に、参照によって本明細書に組み込まれる。

【０５０５】

配列の表

変異体	H1 クローン名	H2 クローン名	L1 クローン名	L2 クローン名
792	1011	1015	-2	-2
5019	3057	720	1811	NA
5020	719	3041	NA	1811
7091	3057	5244	1811	NA
10000	6586	5244	3382	NA
6903	5065	3468	5037	3904
6902	5065	3468	5034	3904
6717	3317	720	NA	NA
1040	4560	4553	NA	4561
630	719	716	NA	NA
4182	4560	3057	NA	1811
506	642	642	-2	-2
4184	3057	3041	1811	1811
9996	4372	6586	NA	3382

SEQ ID NO.	クローン	説明	配列（アミノ酸または
1	642	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	642	全長	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAA TCCACCTCTGGAGGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGT

			GAGTTGGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAAC GTGAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG AGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTC CTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
3	642	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
4	642	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCC
5	642	H1	GFNIKDTY
6	642	H1	GGATTCAACATCAAGGACACCTAC
7	642	H3	SRWGGDGFYAMDY
8	642	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
9	642	H2	IYPTNGYT
10	642	H2	ATCTATCCCACTAATGGATACACC
11	642	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
12	642	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAACTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
13	642	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
14	642	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCC ACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
15	642	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
16	642	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
17	3468	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV

			NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
18	3468	全長	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTC TGGTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTC TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGCTGAAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACCCATAC ATGCCCCCCTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTCAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTG TATAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCACCAGGG
19	3468	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
20	3468	VH	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTC TGGTCACCGTGAGCTCC
21	3468	H1	GFTFTDYT
22	3468	H1	GGCTTCACTTTTACCGACTACACC
23	3468	H3	ARNLGPSFYFDY
24	3468	H3	GCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
25	3468	H2	VNPNSGGS
26	3468	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC
27	3468	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKGYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLKSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
28	3468	CH1	GCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGGCTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGCTGAAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
29	3468	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
30	3468	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTG

			CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAA
31	3468	CH3	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	3468	CH3	GGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGT CAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC AGCCTGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCAGTCATGCACGAGGC ACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCACCAGGG
33	1811	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
34	1811	全長	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCT CCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTG AACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGA GCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCCTCTCCT GTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
35	1811	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK
36	1811	VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCATATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
37	1811	L1	QDVSIG
38	1811	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
39	1811	L3	QQYYIYPYT
40	1811	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCATATACC
41	1811	L2	SAS
42	1811	L2	AGCGCCTCC
43	1811	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
44	1811	CL	AGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGC CAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTG TCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACA TCAGGGGCTGTCCTCTCCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
45	5034	全長	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDERLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
46	5034	全長	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGT GGGCGATAGGGTCACTATTACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGC AGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGC CGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGATTTCACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTT TGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATACCACACCCCCTACTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGA

			TCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGC ACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGA CAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATA GTCTGTCAAGCACCCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTC ACACATCAGGGGCTGTCATCACCAGTCACCAAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
47	5034	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
48	5034	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTATTACCTG CCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGATTTCACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
49	5034	L1	QDVNTA
50	5034	L1	CAGGACGTGAACACCGCA
51	5034	L3	QQHYTTPPT
52	5034	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCCTACT
53	5034	L2	SAS
54	5034	L2	AGTGCATCA
55	5034	CL	RTVAAPSVFIFPPSDERLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56	5034	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGACAACG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATAGTCTG TCAAGCACCCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACACA TCAGGGGCTGTCATCACCAGTCACCAAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
57	5037	全長	DYKDDDDKDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDERLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDSTYSLSSRLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
58	5037	全長	GACTACAAAGACGACGATGACAAAGATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGT GGGCGATAGGGTCACTATTACCTGCCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGC AGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGC CGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGCACCGATTTCACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTT TGCCACATACTATTGCCAGCAGCACTATACCACACCCCCTACTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGA TCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGC ACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGA CAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATA GTCTGTCAAGCAGACTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTC ACACATCAGGGGCTGTCATCACCAGTCACCAAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
59	5037	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
60	5037	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGATAGGGTCACTATTACCTG CCGCGCATCTCAGGACGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGATTTCACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGACTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
61	5037	L1	QDVNTA
62	5037	L1	CAGGACGTGAACACCGCA
63	5037	L3	QQHYTTPPT
64	5037	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCCTACT

65	5037	L2	SAS
66	5037	L2	AGTGCATCA
67	5037	CL	RTVAAPSVFIFPPSDERLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSKESVTEQDSKDSTYSL SSRLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	5037	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGATGAAAGACTGAAGTCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTTTACCCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGACAACG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCAAGGAGAGCGTGACAGAACAGGATTCCAAAGACTCTACTTATAGTCTG TCAAGCAGACTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTCACACA TCAGGGGCTGTCATCACCAGTCACCAAATCATTCAATCGGGGGGAGTGC
69	3382	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
70	3382	全長	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAGAGGACTGTGGCCGCTCCCT CCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTG AACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAACAG CCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTGTCAAGCACACTGACTCTGA GCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCCTCTCCT GTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
71	3382	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPATFGQGTKVEIK
72	3382	VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACCGGTATACCGGCGTGCCCTCTAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGA ACAGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCAGCCACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
73	3382	L1	QDVSIG
74	3382	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
75	3382	L3	QQYYIYPAT
76	3382	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCAGCCACC
77	3382	L2	SAS
78	3382	L2	AGCGCCTCC
79	3382	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
80	3382	CL	AGGACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAAAGTGGCACAGC CAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCTCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGTCTGTGACTGAACAGGACAGTAAAGATTCAACCTATAGCCTG TCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACACA TCAGGGGCTGTCCTCTCCTGTGACTAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
81	5065	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFA LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
82	5065	全長	GAGGTGCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGC

			AGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGGCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTTCTGCAGATACAAGTAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC AGCCGTGTACTATTGCAGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCCGCATCAACAAAGGGGCCTAGCGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGGGGAACAGCAGCCCTGGGATGTGAGGTGACCGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACTGT GAGCTGGAACTCCGGCGCCCTGACATCTGGGGTCCATACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGCC TGTACAGCCTGTCCTCTGTGGTCACTGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCATCCAATACCAAAGTCGACAAGAAAGTGGAAACCCAAGTCTTGTGATAAAACACA TACTTGCCCCCCTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGC CTAAAGACACCCTGATGATTAGTAGGACTCCAGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAG GACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAG GGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGTCTGTCCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCC AAGGCTAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCATCTAGGGACGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGTCTGACATGTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAAT CCAATGGACAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAAGTTTCGCC CTGGTGAGTAAGCTGACCGTCGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCAGTGAT GCACGAAGCACTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGGC
83	5065	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
84	5065	VH	GAGGTGCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGC AGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGAAAAGGCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTTCTGCAGATACAAGTAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC AGCCGTGTACTATTGCAGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCC
85	5065	H1	GFNIKDTY
86	5065	H1	GGCTTCAACATCAAGGACACCTAC
87	5065	H3	SRWGGDGFYAMDY
88	5065	H3	AGCCGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTAT
89	5065	H2	IYPTNGYT
90	5065	H2	ATCTATCCAACTAATGGATACACC
91	5065	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCEVTDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
92	5065	CH1	GCATCAACAAAGGGGCCTAGCGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGGGGAACAGC AGCCCTGGGATGTGAGGTGACCGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACTGTGAGCTGGAACTCCGGCGCCC TGACATCTGGGGTCCATACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCTCTGTG GTCACTGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACCAAAGTCGACAAGAAAGTG
93	5065	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
94	5065	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGAT TAGTAGGACTCCAGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACTCC ACTTATCGCGTCGTGTCTGTCCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCTAAA
95	5065	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	5065	CH3	GGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTACCCTCCATCTAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGTCTGACATGTCTGGTGAAAGGGTTCTATCCCAGCGATATCGCAGTGGAGTGGGAATCCAATGGAC

			AGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAAGTTTCGCCCTGGTGAGT AAGCTGACCGTCGATAAATCACGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCAGTGATGCACGAAGC ACTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCTGTCCCCCGGC
97	6586	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMDWVRQAPGKGLEWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRF TFSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
98	6586	全長	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGAGGGGGCCTGGTGCAGCCCGGAGGGTCTCTGCGACTGTCATGTGC CGCTTCTGGGTTCACTTTCGCAGACTACACAATGGATTGGGTGCGACAGGCCCCCGGAAAGGGACTGG AGTGGGTGGGCGATGTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGTATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGGAGATTC ACTTTTTCAGTGGACAGAAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAAGATAC CGCTGTCTACTATTGCGCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACCC TGGTGACAGTCAGCTCCGCTAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAG TTGGAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGT ACTCCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTA AAGACACCCTGATGATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGGA GGAACAGTACAACTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GGAAGGAGTATAAGTGTAAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGCCCCAATCGAAAAAACAATCTCTAAA GCAAAAGGACAGCCTCGCGAACCACAGGTCTACGTCTACCCCCCATCAAGAGATGAACTGACAAAAAA TCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTA ACGGCCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTCCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTG GTGTCAAAGCTGACCGTCGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGCTCCGTCATGCA CGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
99	6586	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFADYTMDWVRQAPGKGLEWVGDVNPNSGGSIYNQRFKGRF TFSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
100	6586	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAATCAGGAGGGGGCCTGGTGCAGCCCGGAGGGTCTCTGCGACTGTCATGTGC CGCTTCTGGGTTCACTTTCGCAGACTACACAATGGATTGGGTGCGACAGGCCCCCGGAAAGGGACTGG AGTGGGTGGGCGATGTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGTATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGGAGATTC ACTTTTTCAGTGGACAGAAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAAGATAC CGCTGTCTACTATTGCGCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACCC TGGTGACAGTCAGCTCC
101	6586	H1	GFTFADYT
102	6586	H1	GGGTTCACTTTCGCAGACTACACA
103	6586	H3	ARNLGPSFYFDY
104	6586	H3	GCTCGCAATCTGGGCCCCAGTTTCTACTTTGACTAT
105	6586	H2	VNPNSGGS
106	6586	H2	GTCAACCCTAATTCTGGCGGGAGT
107	6586	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
108	6586	CH1	GCTAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGC TGCACTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGGAACTCAGGGGCTC TGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG

109	6586	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
110	6586	CH2	GCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGAT TTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGGAGGAACAGTACAACTCT ACCTATAGAGTCGTGAGTGTCCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAGTG TAAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGCCCCAATCGAAAAAACAATCTCTAAAGCAAAA
111	6586	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
112	6586	CH3	GGACAGCCTCGCGAACCACAGGTCTACGTCTACCCCCCATCAAGAGATGAACTGACAAAAAATCAGGT CTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGCC AGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTCCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCA AAGCTGACCGTCGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGCTCCGTCATGCACGAAGC CCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC
113	3904	全長	YPYDVPDYATGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYT GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEE LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSEESVTEQDSKDSTYSLSSTLELSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
114	3904	全長	TATCCCTACGATGTGCCTGACTACGCTACTGGCTCCGATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCT GAGTGCATCAGTGGGGGACCGAGTCACCATCACATGCAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCG CATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGCTGCTGATCTACAGCGCCTCCTACCGGTATACT GGGGTGCCTTCCAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGAACCGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCA GCCCGAGGATTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTACTATATCTACCCTTATACCTTTGGCCAGGGGA CAAAAGTGGAGATCAAGAGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCCCCTTCCGACGAAGAG CTGAAAAGTGGAACTGCTTCAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCCGCGAAGCCAAAGTGCA GTGGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGCGGCAATTCCGAGGAGTCTGTGACAGAACAGGACAGTAAAG ATTCAACTTATAGCCTGTCAAGCACACTGGAGCTGTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTAT GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGGCTGTCCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
115	3904	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK
116	3904	VL	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCCTGAGTGCATCAGTGGGGGACCGAGTCACCATCACATG CAAGGCTTCCCAGGATGTGTCTATTGGAGTCGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTACAGCGCCTCCTACCGGTATACTGGGGTGCCTTCCAGATTCTCTGGCAGTGGGTCAGGA ACCGACTTTACTCTGACCATCTCTAGTCTGCAGCCCGAGGATTTCGCCACCTACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCTTATACCTTTGGCCAGGGGACAAAAGTGGAGATCAAG
117	3904	L1	QDVSIG
118	3904	L1	CAGGATGTGTCTATTGGA
119	3904	L3	QQYYIYPYT
120	3904	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCTTATACC
121	3904	L2	SAS
122	3904	L2	AGCGCCTCC
123	3904	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEELKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSEESVTEQDSKDSTYSL SSTLELSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
124	3904	CL	AGGACAGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCCCCTTCCGACGAAGAGCTGAAAAGTGGAACTGC TTCAGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCCGCGAAGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACG CTCTGCAGAGCGGCAATTCCGAGGAGTCTGTGACAGAACAGGACAGTAAAGATTCAACTTATAGCCTG TCAAGCACACTGGAGCTGTCTAAGGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGCGAAGTCACCCA TCAGGGGCTGTCCTCTCCCGTGACAAAGAGCTTTAACAGAGGAGAGTGT
125	4553	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN

			VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFA LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
126	4553	全長	GAAGTCCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGAAAAGGCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAACTAATGGATACACCCGGTATGCAGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTAGCGCAGATACATCCAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCAGTCGGTGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCCGCATCTACAAAGGGGCCTAGTGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAA TCCACCTCTGGGGGAACAGCAGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCAGAGCCCGTCACTGT GAGTTGGAACTCAGGCGCCCTGACATCCGGGGTCCATACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGCC TGTACTCTCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAAC GTGAATCACAAGCCAAGCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCAAGAGCTGTGATAAAACACA TACTTGCCCCCCTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGC CTAAAGACACCCTGATGATTTCCAGGACTCCAGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAG GGAGGAACAGTACAACTCAACTTATCGCGTCGTGAGCGTCCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTAGC AAGGCCAAAGGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAA GAACCAGGTCTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGGTTTTACCCCAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCTGAAAACAATTATAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCT CTGGTCTCCAAGCTGACTGTGGATAAATCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTAGTTGTTCAGTGAT GCATGAGGCACTGCACAATCATTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
127	4553	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
128	4553	VH	GAAGTCCAGCTGGTCGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGCTTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGCCAGGCTCCTGGAAAAGGCCTGG AGTGGGTGGCACGAATCTATCCAACTAATGGATACACCCGGTATGCAGACAGCGTGAAGGGCCGGTTC ACCATTAGCGCAGATACATCCAAAAACACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCAGTCGGTGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTATTGGGGGCAGGGAA CCCTGGTCACAGTGAGCTCC
129	4553	H1	GFNIKDTY
130	4553	H1	GGCTTCAACATCAAGGACACCTAC
131	4553	H3	SRWGGDGFYAMDY
132	4553	H3	AGTCGGTGGGGAGGCGACGGCTTCTACGCTATGGATTAT
133	4553	H2	IYPTNGYT
134	4553	H2	ATCTATCCAACTAATGGATACACC
135	4553	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
136	4553	CH1	GCATCTACAAAGGGGCCTAGTGTGTTTCCACTGGCCCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGGGGAACAGC AGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCAGAGCCCGTCACTGTGAGTTGGAACTCAGGCGCCC TGACATCCGGGGTCCATACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGGACTCAGACCTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAAGCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
137	4553	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
138	4553	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGAT TTCCAGGACTCCAGAAGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACTCA ACTTATCGCGTCGTGAGCGTCCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG

			CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACCATTAGCAAGGCCAAA
139	4553	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
140	4553	CH3	GGGCAGCCTAGAGAACCACAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGGTTTTACCCCAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCTGAAAACAATTATAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCTCTGGTCTCC AAGCTGACTGTGGATAAATCTCGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAGGC ACTGCACAATCATTACACCCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
141	716	全長	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
142	716	全長	GAGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACC TAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAA GTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGC CTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTG CCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGATCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCC TAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAG TGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAG GGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTC CCTGTCTCCCGGCAAA
143	716	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
144	716	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCC ACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
145	716	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
146	716	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGATCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
147	719	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDEDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
148	719	全長	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTT CTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAAGATAC

			TTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCGCACGTATTTATCCCACAA ATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAAC ACCGCGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGG CGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCGCCG AGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCT AGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAG TGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACATACC CACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCT AGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGT GCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGG GGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCC CTGTCTCCCGGCAAA
149	719	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
150	719	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAA
151	719	L1	QDVNTA
152	719	L1	CAGGACGTTAACACCGCT
153	719	L3	QQHYTTPPT
154	719	L3	CAACAGCATTACACTACCCCACCCACT
155	719	L2	SAS
156	719	L2	TCTGCATCC
157	719	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
158	719	VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCAACATTAAAGATACTTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCACGTATTTATCCCACAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAACACCGCGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC GGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
159	719	H1	GFNIKDTY
160	719	H1	GGATTCAACATTAAAGATACTTAT
161	719	H3	SRWGGDGFYAMDY
162	719	H3	TCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC
163	719	H2	IYPTNGYT
164	719	H2	ATTTATCCCACAAATGGTTACACA
165	719	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
166	719	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCC ACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
167	719	CH3	GQPREPQVYTYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDEDGSFALVS

			KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
168	719	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACATACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACGAGGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
169	720	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
170	720	全長	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAAGGTGGTTCTGGTGGTGGTT CTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTTCTGGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAACATTAAAGATAC TTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCGCACGTATTTATCCCACAA ATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAAC ACCGCGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGG CGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCGCCG AGCCCAAGAGCAGCGATAAGACCCACACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCT AGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTG CGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAG TGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCC TGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGC CACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGATCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCT AGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGACAGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGT GCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGG GGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCC CTGTCTCCCGGCAAA
171	720	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
172	720	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAA
173	720	L1	QDVNTA
174	720	L1	CAGGACGTTAACACCGCT
175	720	L3	QQHYTTPPT
176	720	L3	CAACAGCATTACACTACCCCACCCACT
177	720	L2	SAS
178	720	L2	TCTGCATCC
179	720	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS

180	720	VH	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCAACATTAAAGATACTTATATCCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCACGTATTTATCCCACAAATGGTTACACACGGTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTC ACCATCTCCGCAGACACTTCCAAGAACACCGCGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACAC GGCCGTTTATTACTGTTCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGA CCCTGGTCACCGTCTCCTCA
181	720	H1	GFNIKDTY
182	720	H1	GGATTCAACATTAAAGATACTTAT
183	720	H3	SRWGGDGFYAMDY
184	720	H3	TCAAGATGGGGCGGAGACGGTTTCTACGCTATGGACTAC
185	720	H2	IYPTNGYT
186	720	H2	ATTTATCCCACAAATGGTTACACA
187	720	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
188	720	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCC ACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
189	720	CH3	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
190	720	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACACACTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGATCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAGATACATGACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
191	4561	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
192	4561	全長	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGGGTCACTATCACCTG CCGCGCATCTCAGGATGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAGCGAACTGTGGCCGCTCCAA GTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGCACAGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTG AACAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCTCTGCAGAGTGGCAACAG CCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTCTGTCAAGCACCCTGACACTGA GCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTGACCCATCAGGGGCTGTCTTCTCCC GTGACCAAGTCTTTCAACCGAGGCGAATGT
193	4561	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
194	4561	VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCTAGCTCCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGGGTCACTATCACCTG CCGCGCATCTCAGGATGTGAACACCGCAGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAAGCTCCAAAGC TGCTGATCTACAGTGCATCATTCCTGTATTCAGGAGTGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCAGATCTGGC ACCGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTGCCACATACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACTTTCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATCAAG
195	4561	L1	QDVNTA
196	4561	L1	CAGGATGTGAACACCGCA
197	4561	L3	QQHYTTPPT

198	4561	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCCTACT
199	4561	L2	SAS
200	4561	L2	AGTGCATCA
201	4561	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
202	4561	CL	CGAACTGTGGCCGCTCCAAGTGTCTTCATTTTTCCACCCAGCGACGAACAGCTGAAATCCGGCACAGC TTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACG CTCTGCAGAGTGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTCTG TCAAGCACCCTGACACTGAGCAAGGCAGACTACGAAAAGCATAAAGTGTATGCCTGTGAGGTGACCCA TCAGGGGCTGTCTTCTCCCGTGACCAAGTCTTTCAACCGAGGCGAATGT
203	3041	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
204	3041	全長	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTC TGGTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTC TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACCCATAC ATGCCCCCCTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTCAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTG TATAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCACCAGGG
205	3041	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
206	3041	VH	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTC TGGTCACCGTGAGCTCC
207	3041	H1	GFTFTDYT
208	3041	H1	GGCTTCACTTTTACCGACTACACC
209	3041	H3	ARNLGPSFYFDY
210	3041	H3	GCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
211	3041	H2	VNPNSGGS
212	3041	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC

213	3041	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
214	3041	CH1	GCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
215	3041	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
216	3041	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAA
217	3041	CH3	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
218	3041	CH3	GGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGCTGCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGT CAGCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC AGCCTGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCAGTCATGCACGAGGC ACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCACCAGGG
219	3057	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFAL VSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
220	3057	全長	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTC TGGTCACCGTGAGCTCCGCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCC ACATCTGGGGGAACTGCAGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTC TTGGAACAGTGGCGCTCTGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGT ACAGCCTGTCCTCTGTGGTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTG AATCACAAGCCATCCAATACAAAAGTCGACAAGAAAGTGGAACCCAAGTCTTGTGATAAAACCCATAC ATGCCCCCCTTGTCCTGCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTA AAGATACACTGATGATTAGTAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGAC CCCGAAGTCAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGA GGAACAGTACAACAGTACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACG GGAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAG GCAAAAGGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTATCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAA CCAGGTCAGCCTGACTTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCGCGCTG GTGAGCAAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCAGTCATGCA CGAGGCACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCACCAGGG
221	3057	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
222	3057	VH	GAAGTGCAGCTGGTCGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGCGCCTGTCTTGCGC CGCTAGTGGCTTCACTTTTACCGACTACACCATGGATTGGGTGCGACAGGCACCTGGAAAGGGCCTGG

			AGTGGGTCGCCGATGTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAGGGCCGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAAAACACCCTGTATCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACTC TGGTCACCGTGAGCTCC
223	3057	H1	GFTFTDYT
224	3057	H1	GGCTTCACTTTTACCGACTACACC
225	3057	H3	ARNLGPSFYFDY
226	3057	H3	GCCCGGAATCTGGGGCCCTCCTTCTACTTTGACTAT
227	3057	H2	VNPNSGGS
228	3057	H2	GTGAACCCAAATAGCGGAGGCTCC
229	3057	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
230	3057	CH1	GCCTCCACCAAGGGACCTTCTGTGTTCCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCACATCTGGGGGAACTGC AGCCCTGGGCTGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCCGTCACAGTGTCTTGGAACAGTGGCGCTC TGACTTCTGGGGTCCACACCTTTCCTGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACAGCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGAACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAA TACAAAAGTCGACAAGAAAGTG
231	3057	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
232	3057	CH2	GCACCAGAGCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGTAGGACCCCAGAAGTCACATGCGTGGTCGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTTA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCCAGGGAGGAACAGTACAACAGT ACCTATCGCGTCGTGTCAGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGGAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAATAAGGCTCTGCCCGCACCTATCGAGAAAACAATTTCCAAGGCAAAA
233	3057	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
234	3057	CH3	GGACAGCCTAGAGAACCACAGGTGTACGTGTATCCTCCATCAAGGGATGAGCTGACAAAGAACCAGGT CAGCCTGACTTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCCTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAAAGTAATGGCC AGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCAGATGGCAGCTTCGCGCTGGTGAGC AAGCTGACCGTCGACAAATCCCGGTGGCAGCAGGGGAATGTGTTTAGTTGTTCAGTCATGCACGAGGC ACTGCACAACCATTACACCCAGAAGTCACTGTCACTGTCACCAGGG
235	1011	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFA LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
236	1011	全長	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAA TCCACCTCTGGAGGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGT GAGTTGGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAAC GTGAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG

			AGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCC CTGGTGTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
237	1011	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
238	1011	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCC
239	1011	H1	GFNIKDTY
240	1011	H1	GGATTCAACATCAAGGACACCTAC
241	1011	H3	SRWGGDGFYAMDY
242	1011	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
243	1011	H2	IYPTNGYT
244	1011	H2	ATCTATCCCACTAATGGATACACC
245	1011	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
246	1011	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAACTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
247	1011	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
248	1011	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCC ACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
249	1011	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
250	1011	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACGTGTACCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGACATGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCGCCCTGGTGTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
251	4560	全長	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVL PPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
252	4560	全長	GAACCTAAAAGCAGCGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACC AAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGATCAGCCGAACTCCCGAGGTCACCT GCGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAA GTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACTCTACATATAGAGTCGTGAGTGTCCT GACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGC

			CTGCTCCAATCGAGAAAACTATTAGTAAGGCAAAAGGGCAGCCCAGGGAACCTCAGGTCTACGTGCTG CCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCTCACTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCC TTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAG GGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAG TCTGTCACCTGGCAAA
253	4560	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
254	4560	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGAT CAGCCGAACTCCCGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACTCT ACATATAGAGTCGTGAGTGTCCTGACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAAACTATTAGTAAGGCAAAA
255	4560	CH3	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
256	4560	CH3	GGGCAGCCCAGGGAACCTCAGGTCTACGTGCTGCCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCACTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCTTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCA AAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGC CCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCACCTGGC
257	3317	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
258	3317	全長	GACATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTCGGGGACAGGGTGACTATCACCTG CAAGGCTTCACAGGATGTCAGCATTGGCGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCACCCAAGC TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACAGGTATACAGGCGTGCCATCCCGCTTCTCTGGCAGTGGGTCAGGA ACTGACTTTACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCTTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATTAAGGGCGGAGGAGGCTCCGGAG GAGGAGGGTCTGGAGGAGGAGGAAGTGAGGTCCAGCTGGTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCA GGAGGGTCCCTGAGGCTGTCTTGTGCCGCTAGTGGCTTCACCTTTACAGACTACACAATGGATTGGGT GCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAATGGGTCGCTGATGTGAACCCTAATAGCGGAGGCTCCATCT ACAACCAGCGGTTCAAAGGACGGTTCACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAGAACACCCTGTATCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATACTGCTGTGTACTATTGCGCCAGGAATCTGGGCCCAAGCTTCTA CTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACACTGGTCACTGTGTCAAGCGCAGCCGAACCCAAATCCTCTGATA AGACTCACACCTGCCCACCTTGTCCAGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCA CCCAAGCCAAAAGACACTCTGATGATTTCTAGAACCCCTGAAGTGACATGTGTGGTCGTGGACGTCAG TCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACCA AACCCCGAGAGGAACAGTACAACTCAACCTATCGGGTCGTGAGCGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGAGCAACAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAGAC CATTTCCAAGGCTAAAGGGCAGCCCCGCGAACCTCAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCCGAGATGAGC TGACAAAAAACCAGGTCTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCAAGTGACATCGCAGTGGAG TGGGAATCAAATGGCCAGCCCGAAAACAATTATAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAG TTTCGCACTGGTCTCCAAACTGACCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACACAGAAATCTCTGAGTCTGTCACCTGGCAAG
259	3317	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK
260	3317	VL	GACATTCAGATGACCCAGAGCCCTAGCTCCCTGAGTGCCTCAGTCGGGGACAGGGTGACTATCACCTG CAAGGCTTCACAGGATGTCAGCATTGGCGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCACCCAAGC

			TGCTGATCTATAGCGCCTCCTACAGGTATACAGGCGTGCCATCCCGCTTCTCTGGCAGTGGGTCAGGA ACTGACTTTACACTGACTATTTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTCGCCACATACTATTGCCAGCAGTA CTATATCTACCCTTATACTTTTGGCCAGGGGACCAAAGTGGAGATTAAG
261	3317	L1	QDVSIG
262	3317	L1	CAGGATGTCAGCATTGGC
263	3317	L3	QQYYIYPYT
264	3317	L3	CAGCAGTACTATATCTACCCTTATACT
265	3317	L2	SAS
266	3317	L2	AGCGCCTCC
267	3317	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRF TLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
268	3317	VH	GAGGTCCAGCTGGTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGGTCCCTGAGGCTGTCTTGTGC CGCTAGTGGCTTCACCTTTACAGACTACACAATGGATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGG AATGGGTCGCTGATGTGAACCCTAATAGCGGAGGCTCCATCTACAACCAGCGGTTCAAAGGACGGTTC ACCCTGTCAGTGGACCGGAGCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATAC TGCTGTGTACTATTGCGCCAGGAATCTGGGCCCAAGCTTCTACTTTGACTATTGGGGGCAGGGAACAC TGGTCACTGTGTCAAGC
269	3317	H1	GFTFTDYT
270	3317	H1	GGCTTCACCTTTACAGACTACACA
271	3317	H3	ARNLGPSFYFDY
272	3317	H3	GCCAGGAATCTGGGCCCAAGCTTCTACTTTGACTAT
273	3317	H2	VNPNSGGS
274	3317	H2	GTGAACCCTAATAGCGGAGGCTCC
275	3317	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
276	3317	CH2	GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCTAGAACCCCTGAAGTGACATGTGTGGTCGTGGACGTCAGTCACGAGGACCCCGAAGTCAAATTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGAGAGGAACAGTACAACTCA ACCTATCGGGTCGTGAGCGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGAGCAACAAGGCTCTGCCTGCACCAATCGAGAAGACCATTTCCAAGGCTAAA
277	3317	CH3	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
278	3317	CH3	GGGCAGCCCCGCGAACCTCAGGTCTACGTGTATCCTCCAAGCCGAGATGAGCTGACAAAAAACCAGGT CTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGATTTTACCCAAGTGACATCGCAGTGGAGTGGGAATCAAATGGCC AGCCCGAAAACAATTATAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGGAGTTTCGCACTGGTCTCC AAACTGACCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAATCATTACACACAGAAATCTCTGAGTCTGTCACCTGGC
279	1015	全長	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
280	1015	全長	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCCGCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAA

10 20 30 40

			TCCACCTCTGGAGGGACAGCCGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGT GAGTTGGAACTCAGGCGCCCTGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGC TGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAAC GTGAATCATAAGCCCTCAAATACAAAAGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAGACCCA CACCTGCCCTCCCTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGC CAAAAGACACTCTGATGATTTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAG GACCCCGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAG AGAGGAACAGTACAACTCCACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCT AAGGCCAAAGGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAAT CAAATGGACAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTC CTGTATTCCAAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGAT GCATGAAGCCCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGCAAA
281	1015	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
282	1015	VH	GAGGTGCAGCTGGTGGAAAGCGGAGGAGGACTGGTGCAGCCAGGAGGATCTCTGCGACTGAGTTGCGC CGCTTCAGGATTCAACATCAAGGACACCTACATTCACTGGGTGCGACAGGCTCCAGGAAAAGGACTGG AGTGGGTGGCTCGAATCTATCCCACTAATGGATACACCCGGTATGCCGACTCCGTGAAGGGGAGGTTT ACTATTAGCGCCGATACATCCAAAAACACTGCTTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCCGAAGATAC CGCTGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTATTGGGGACAGGGGA CCCTGGTGACAGTGAGCTCC
283	1015	H1	GFNIKDTY
284	1015	H1	GGATTCAACATCAAGGACACCTAC
285	1015	H3	SRWGGDGFYAMDY
286	1015	H3	AGTCGATGGGGAGGAGACGGATTCTACGCTATGGATTAT
287	1015	H2	IYPTNGYT
288	1015	H2	ATCTATCCCACTAATGGATACACC
289	1015	CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
290	1015	CH1	GCCTCTACCAAGGGCCCCAGTGTGTTTCCCCTGGCTCCTTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGGACAGC CGCTCTGGGATGTCTGGTGAAGGACTATTTCCCCGAGCCTGTGACCGTGAGTTGGAACTCAGGCGCCC TGACAAGCGGAGTGCACACTTTTCCTGCTGTGCTGCAGTCAAGCGGGCTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTGACAGTGCCAAGTTCAAGCCTGGGCACACAGACTTATATCTGCAACGTGAATCATAAGCCCTCAAA TACAAAAGTGGACAAGAAAGTG
291	1015	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
292	1015	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCCCCTAAGCCAAAAGACACTCTGATGAT TTCCAGGACTCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGATGGCGTGGAAGTGCATAATGCTAAGACAAAACCAAGAGAGGAACAGTACAACTCC ACTTATCGCGTCGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGGAAGGAGTATAAGTG CAAAGTCAGTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAAAAAACCATCTCTAAGGCCAAA
293	1015	CH3	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
294	1015	CH3	GGCCAGCCAAGGGAGCCCCAGGTGTACGTGCTGCCACCCAGCAGAGACGAACTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCTAGTGATATTGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGAC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCTCCAGTGCTGGACAGCGATGGCAGCTTCTTCCTGTATTCC AAGCTGACAGTGGATAAATCTCGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTAGTTGTTCAGTGATGCATGAAGC CCTGCACAATCATTACACTCAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCGGC
295	5244	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGG

			GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSAAEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
296	5244	全長	GACATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAGTCGGCGACAGGGTGACTATCACCTG CCGCGCATCCCAGGATGTCAACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCAAAGC TGCTGATCTACAGCGCTTCCTTCCTGTATTCTGGCGTGCCAAGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGC ACTGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACATTCGGACAGGGCACTAAAGTGGAGATTAAGGGCGGGTCAGGCGGAGGGA GCGGAGGAGGGTCCGGAGGAGGGTCTGGAGGAGGGAGTGGAGAGGTCCAGCTGGTGGAATCTGGAGGA GGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCACTGCGACTGAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTTAACATCAAAGACAC ATACATTCATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGGAAGGGACTGGAATGGGTGGCCCGCATCTATCCCACAA ATGGGTACACTCGATATGCCGACAGCGTGAAAGGACGGTTTACCATTTCTGCTGATACCAGTAAGAAC ACAGCATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCAGAGGATACAGCCGTGTACTATTGCAGTCGATGGGG GGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACCGTGTCAAGCGCAGCCG AACCTAAATCCTCTGACAAGACCCACACATGCCCACCCTGTCCTGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCA TCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGATTAGCCGCACTCCCGAAGTCACCTG TGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGG TGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGAGAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTCGTGAGCGTCCTG ACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCC CGCTCCTATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGGGAACCCCAGGTCTACGTGCTGC CCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAAAACCAGGTCTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCT AGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGGCAGCCAGAAAACAATTACCTGACATGGCCACCCGT GCTGGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCCAAACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGG GAAACGTCTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGT CTGTCACCCGGC
297	5244	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
298	5244	VL	GACATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCTCCCTGAGTGCTTCAGTCGGCGACAGGGTGACTATCACCTG CCGCGCATCCCAGGATGTCAACACCGCTGTGGCATGGTACCAGCAGAAGCCTGGAAAAGCCCCAAAGC TGCTGATCTACAGCGCTTCCTTCCTGTATTCTGGCGTGCCAAGTCGGTTTTCTGGAAGTAGATCAGGC ACTGACTTCACACTGACTATCTCTAGTCTGCAGCCCGAAGATTTTGCCACCTACTATTGCCAGCAGCA CTATACCACACCCCCTACATTCGGACAGGGCACTAAAGTGGAGATTAAG
299	5244	L1	QDVNTA
300	5244	L1	CAGGATGTCAACACCGCT
301	5244	L3	QQHYTTPPT
302	5244	L3	CAGCAGCACTATACCACACCCCCTACA
303	5244	L2	SAS
304	5244	L2	AGCGCTTCC
305	5244	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
306	5244	VH	GAGGTCCAGCTGGTGGAATCTGGAGGAGGACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCACTGCGACTGAGCTGTGC CGCTTCCGGCTTTAACATCAAAGACACATACATTCATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGGAAGGGACTGG AATGGGTGGCCCGCATCTATCCCACAAATGGGTACACTCGATATGCCGACAGCGTGAAAGGACGGTTT ACCATTTCTGCTGATACCAGTAAGAACACAGCATACCTGCAGATGAACAGCCTGCGCGCAGAGGATAC AGCCGTGTACTATTGCAGTCGATGGGGGGGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTATTGGGGCCAGGGGA CTCTGGTCACCGTGTCAAGC
307	5244	H1	GFNIKDTY
308	5244	H1	GGCTTTAACATCAAAGACACATAC

309	5244	H3	SRWGGDGFYAMDY
310	5244	H3	AGTCGATGGGGGGGAGACGGCTTCTACGCCATGGATTAT
311	5244	H2	IYPTNGYT
312	5244	H2	ATCTATCCCACAAATGGGTACACT
313	5244	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
314	5244	CH2	GCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCATCCGTGTTCCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGAT TAGCCGCACTCCCGAAGTCACCTGTGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGAGAGGAACAGTACAATTCA ACCTATAGGGTCGTGAGCGTCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAA
315	5244	CH3	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
316	5244	CH3	GGGCAGCCACGGGAACCCCAGGTCTACGTGCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCAAAAACCAGGT CTCCCTGCTGTGTCTGGTGAAGGGCTTTTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGGC AGCCAGAAAACAATTACCTGACATGGCCACCCGTGCTGGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCC AAACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCACCCGGC
317	-2	全長	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
318	-2	全長	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCAT CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC CCAAGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
319	-2	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
320	-2	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTG CCGGGCAAGTCAGGACGTTAACACCGCTGTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGC TCCTGATCTATTCTGCATCCTTTTTGTACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTCGATCTGGG ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGCA TTACACTACCCCACCCACTTTCGGCCAAGGGACCAAAGTGGAGATCAAA
321	-2	L1	QDVNTA
322	-2	L1	CAGGACGTTAACACCGCT
323	-2	L3	QQHYTTPPT
324	-2	L3	CAACAGCATTACACTACCCCACCCACT
325	-2	L2	SAS
326	-2	L2	TCTGCATCC
327	-2	CL	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
328	-2	CL	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACG CCCTCCAATCGGGTAACTCCCAAGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC

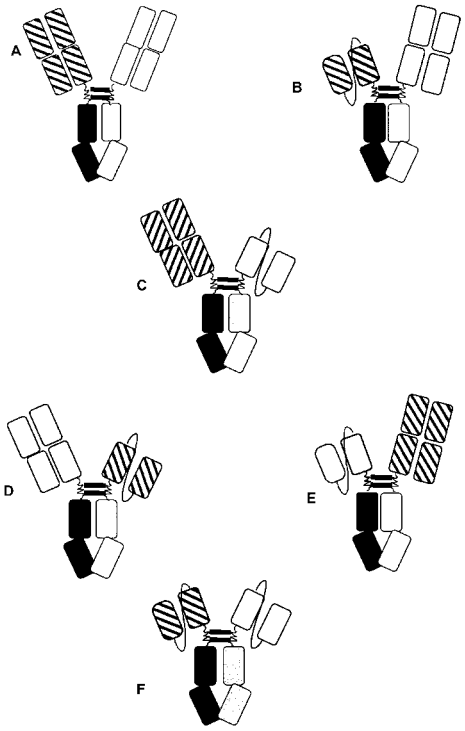
			AGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
329	4372	全長	EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVL PPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
330	4372	全長	GAACCTAAATCCAGCGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGACC AAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGATCAGCCGAACTCCCGAGGTCACCT GCGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTCGAA GTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACTCTACATATAGAGTCGTGAGTGTCCT GACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTGCAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGC CTGCTCCAATCGAGAAAACTATTAGTAAGGCAAAAGGGCAGCCCAGGGAACCTCAGGTCTACGTGCTG CCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTCTCACTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCC TTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCCAGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTG TGCTGGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAG GGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAG TCTGTCACCTGGC
331	4372	CH2	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
332	4372	CH2	GCTCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAAGATACACTGATGAT CAGCCGAACTCCCGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTCGAAGTGCATAATGCAAAGACTAAACCACGGGAGGAACAGTACAACTCT ACATATAGAGTCGTGAGTGTCCTGACTGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTATAAGTG CAAAGTGTCTAATAAGGCCCTGCCTGCTCCAATCGAGAAAACTATTAGTAAGGCAAAA
333	4372	CH3	GQPREPQVYVLPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
334	4372	CH3	GGGCAGCCCAGGGAACCTCAGGTCTACGTGCTGCCTCCAAGTCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGT CTCACTGCTGTGTCTGGTGAAAGGATTCTATCCTTCCGATATTGCCGTGGAGTGGGAATCTAATGGCC AGCCAGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCA AAGCTGACAGTGGACAAAAGCAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTTAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGC CCTGCACAATCATTACACCCAGAAGTCTCTGAGTCTGTCACCTGGC

SEQ ID NO:	*ペルツズマブ WT CDR*	配列
335	CDR-H2	VNPNSGGS
336	CDR-H3	ARNLGPSFYFDY
337	CDR-H1	GFTFTDYT
338	CDR-L2	SAS
339	CDR-L3	QQYYIYPYT
340	CDR-L1	QDVSIG

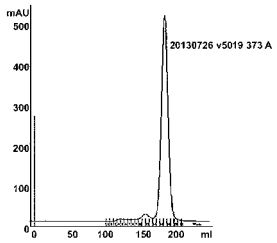
SEQ ID NO:	*トラスツズマブ WT CDR*	配列
341	CDR-H2	IYPTNGYT
342	CDR-H3	SRWGGDGFYAMDY
343	CDR-H1	GFNIKDTY
344	CDR-L2	SAS
345	CDR-L3	QQHYTTPPT
346	CDR-L1	QDVNTA

ペルツズマブ変異体ＣＤＲ－Ｌ３：　ＱＱＹＹＩＹＰＡＴ
クローン３３８２、変異体１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４７）
ペルツズマブ変異体ＣＤＲ－Ｈ１：　ＧＦＴＦＡＤＹＴ
クローン６５８６、変異体１００００（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４８）

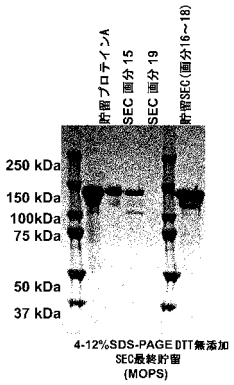
【図１】



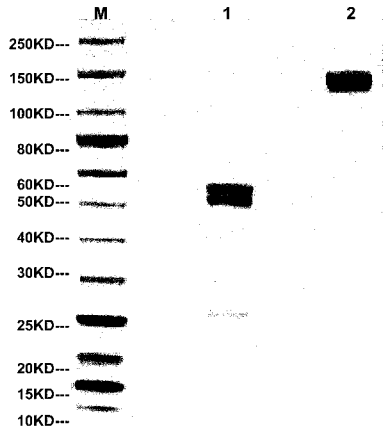
【図２Ａ】



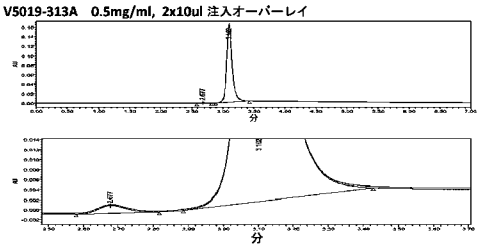
【図２Ｂ】



【図２Ｃ】

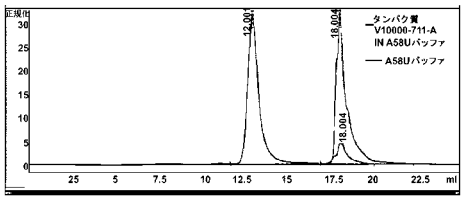


【図３Ａ】



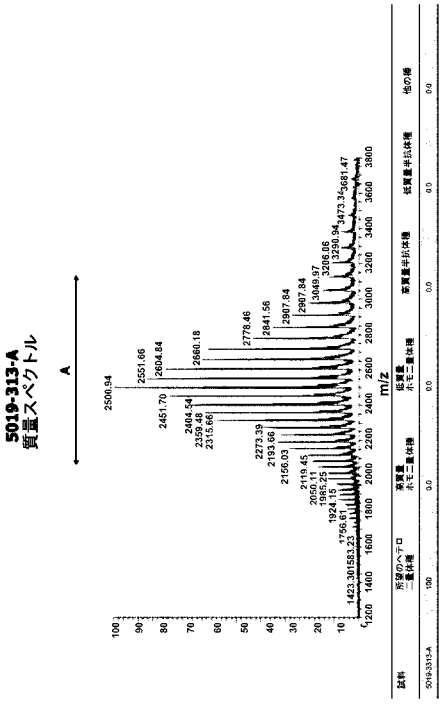
v5019-313A	推定分子量	log分子量	保持時間	%ピーク面積
ピーク1	300902	5.478426	2.677	0.83
	298938	5.475581	2.680	0.82
ピーク2	118957	5.075391	3.102	99.17
	118957	5.075391	3.102	99.18

【図３Ｂ】

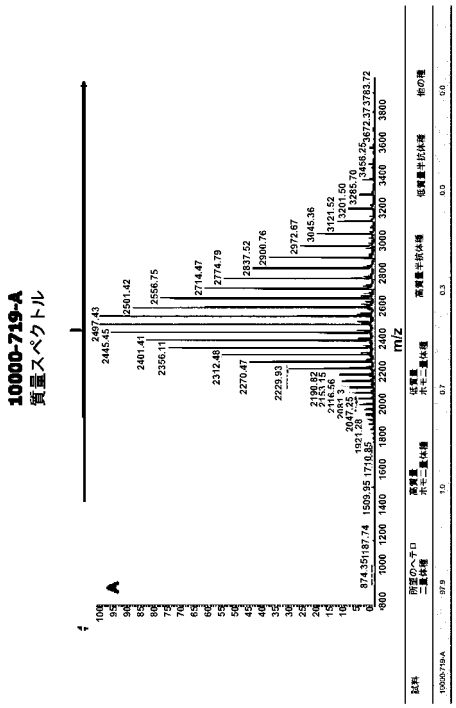


ピーク #	保持時間(分)	種類	高さ	面積	面積 %
1	8.022	MF R	0.183	22.103	1.508
2	11.059	MF R	0.179	9.708	0.662
3	12.961	MF R	30.701	1416.498	96.619
4	15.419	FM R	0.299	17.759	1.211

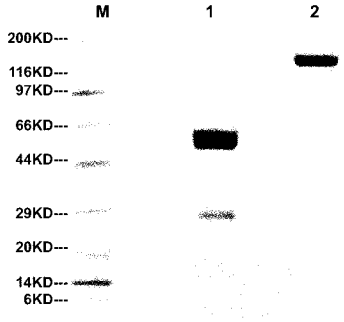
【図４Ａ】



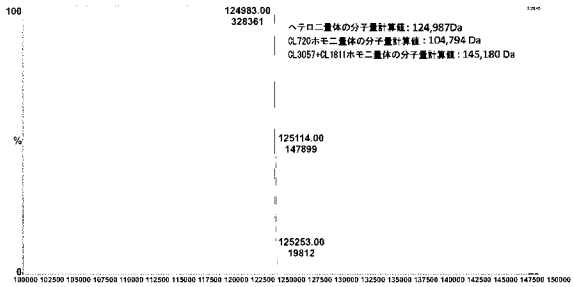
【図４Ｂ】



【図５Ａ】



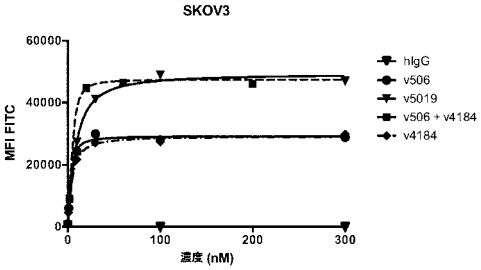
【図５Ｂ】



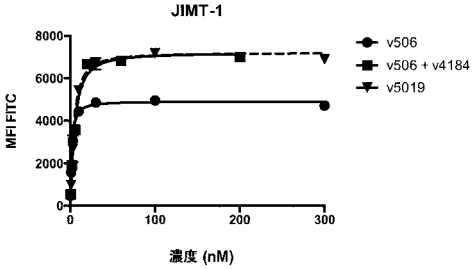
	全定量物に対するパーセンテージとしてのそれぞれの種の量				
	ヘテロ二量体	CH-A ホモ二量体	CH-B ホモ二量体	CH-B 単量体	CH-A 半抗体
v5019	99.4	0.3	0.1	0	0.2

*：リシン及び0-グリカンサイドピークはこの計算に含まれなかった

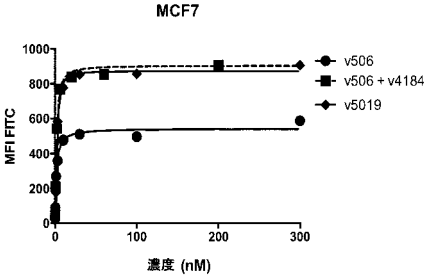
【図６Ａ】



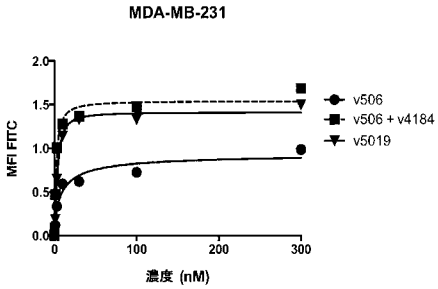
【図６Ｂ】



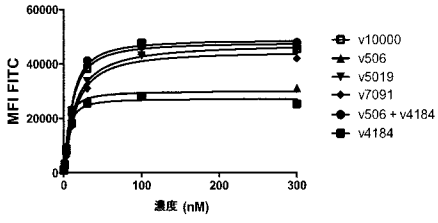
【図６Ｃ】



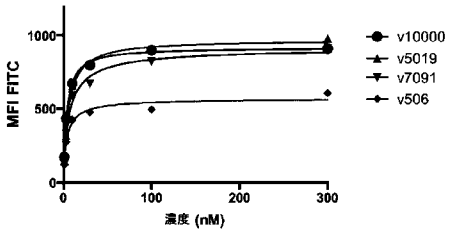
【図６Ｄ】



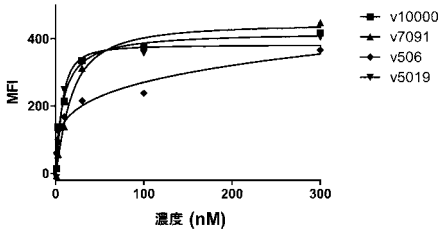
【図６Ｅ】



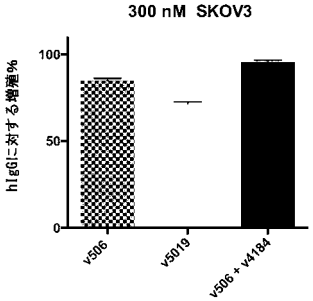
【図６Ｆ】



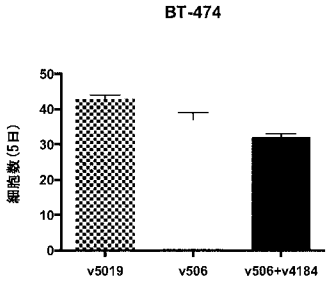
【図６Ｇ】



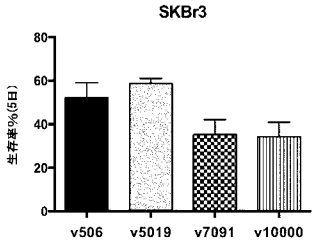
【図７Ａ】



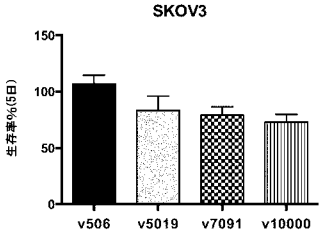
【図７Ｂ】



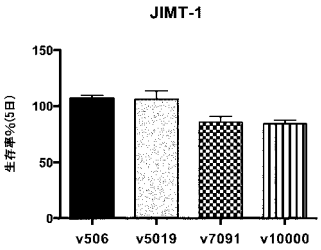
【図７Ｃ】



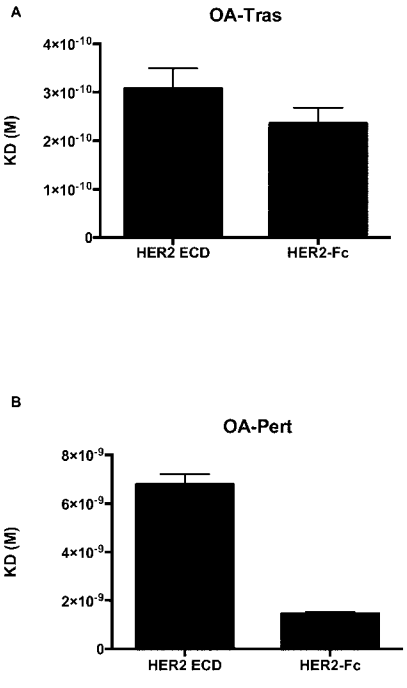
【図７Ｄ】



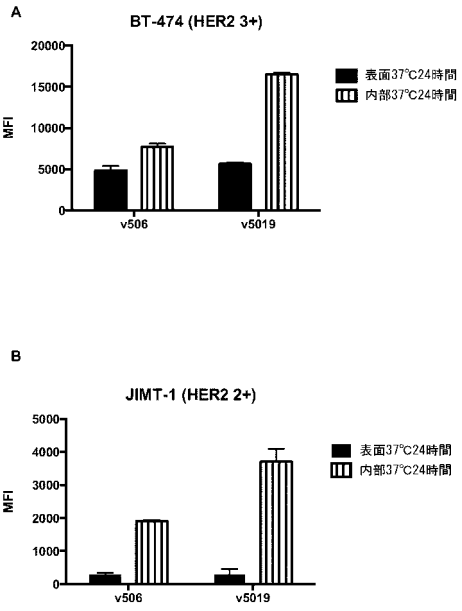
【図７Ｅ】



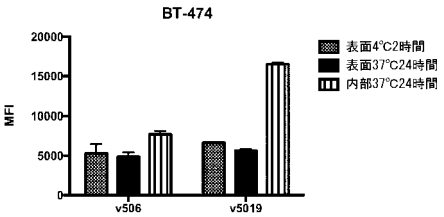
【図８】



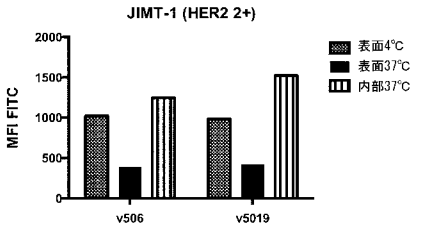
【図９】



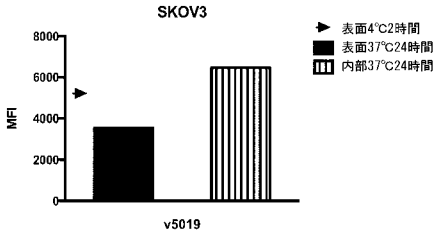
【図１０Ａ】



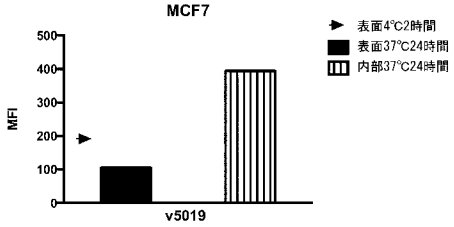
【図１０Ｂ】



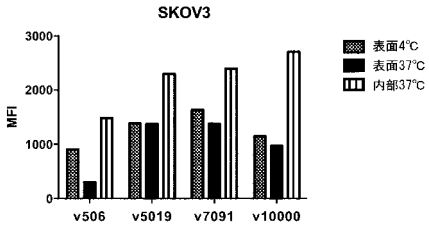
【図１０Ｃ】



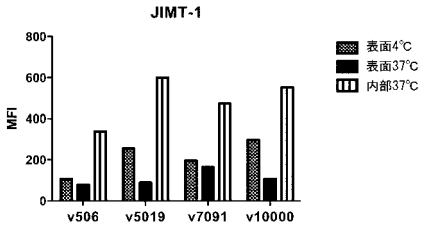
【図１０Ｄ】



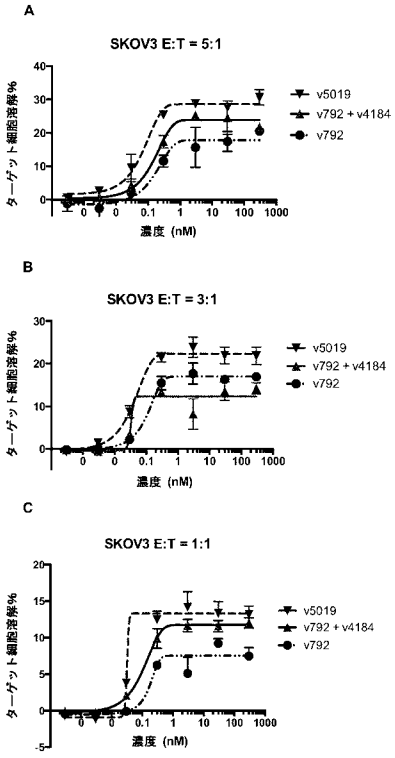
【図１０Ｅ】



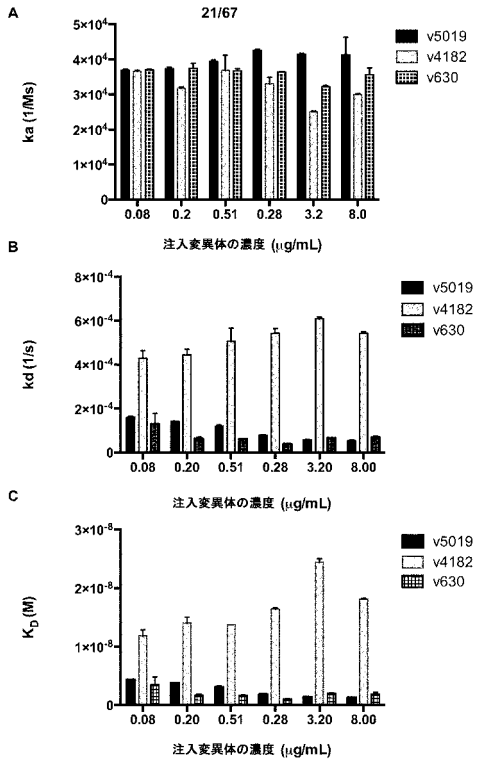
【図１０Ｆ】



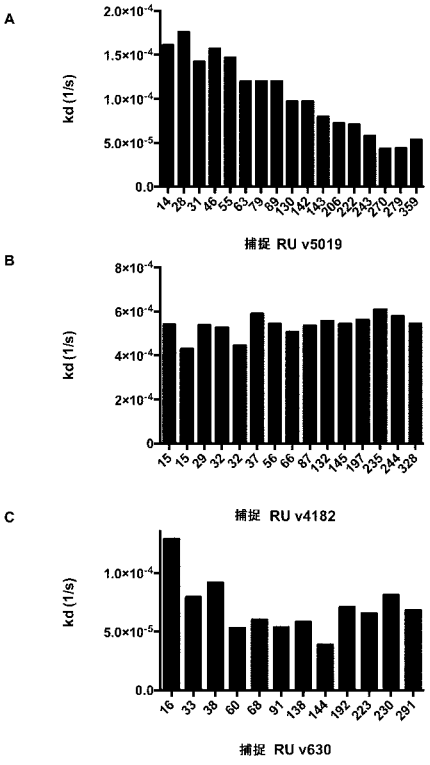
【図１１】



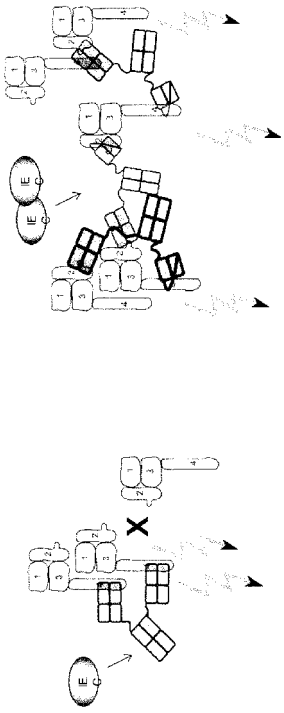
【図１２】



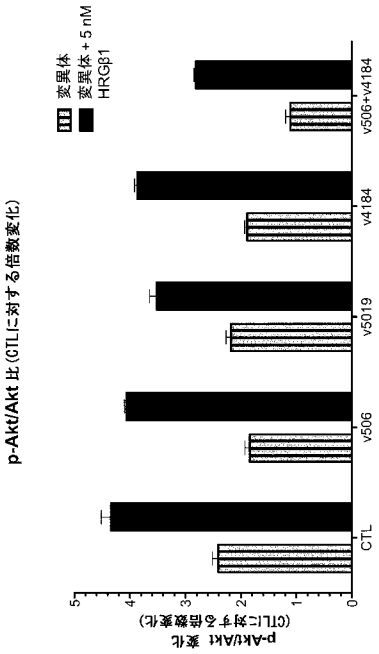
【図１３】



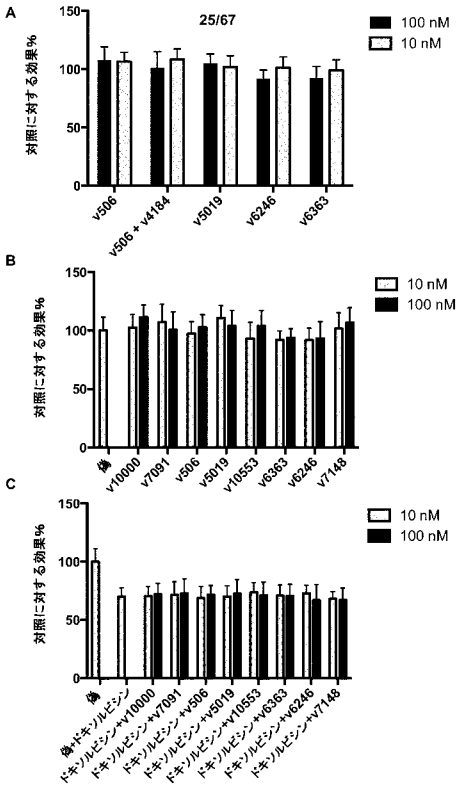
【図１４】



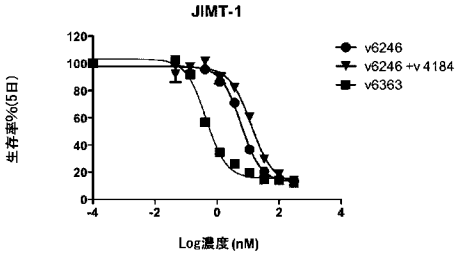
【図１５】



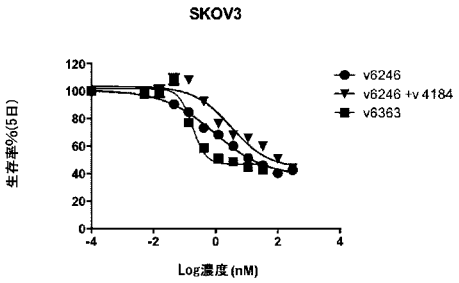
【図１６】



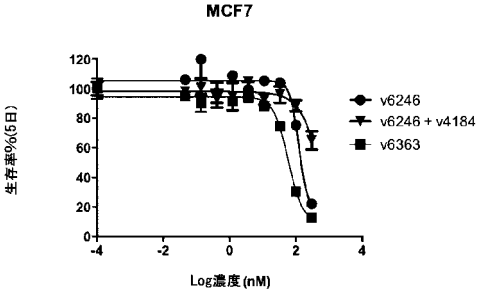
【図１７Ａ】



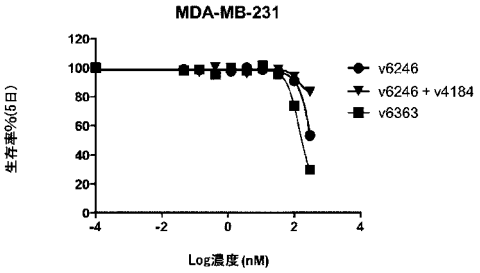
【図１７Ｂ】



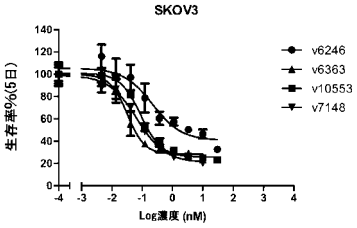
【図１７Ｃ】



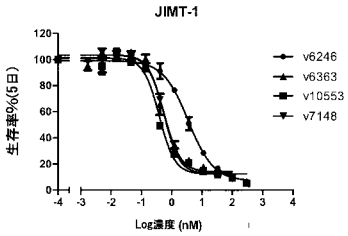
【図１７Ｄ】



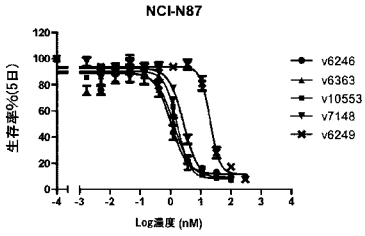
【図１７Ｅ】



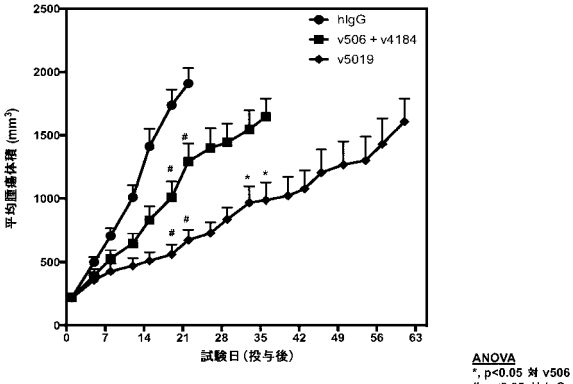
【図１７Ｆ】



【図１７Ｇ】

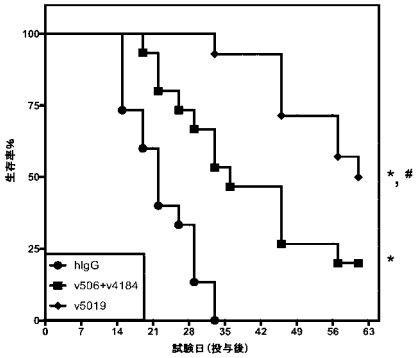


【図１８Ａ】



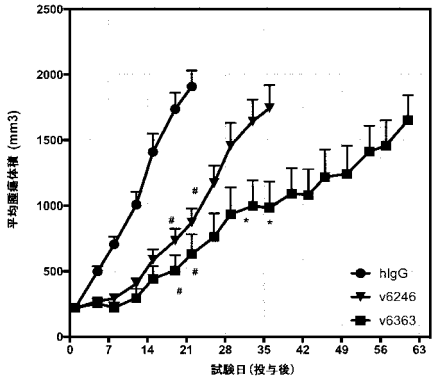
ANOVA
*, p<0.05 対 v506
#, p<0.05 対 IgG

【図１８Ｂ】



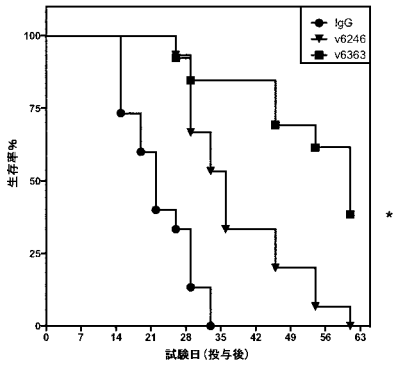
ログランク検定
*, p<0.05 対 IgG
#, p<0.05 対 v506+v4184

【図１９Ａ】



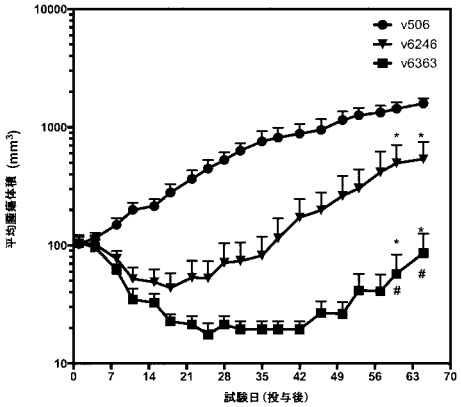
ANOVA
*, p<0.05 対 v6246
#, p<0.05 対 IgG

【図１９Ｂ】



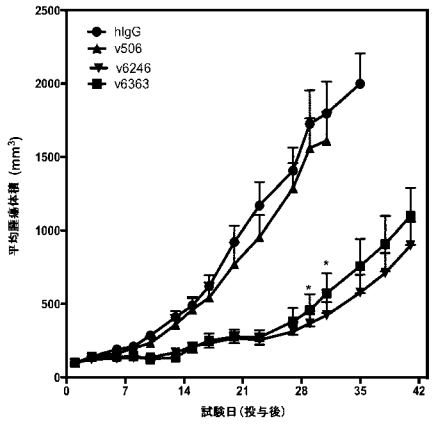
ログランク検定
*, p<0.05 対 v6246

【図２０】



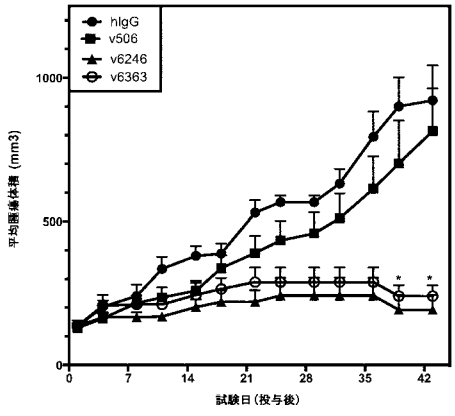
Mann-Whitney
*, p<0.05 対 v506
#, p<0.05 対 v6246

【図２１】



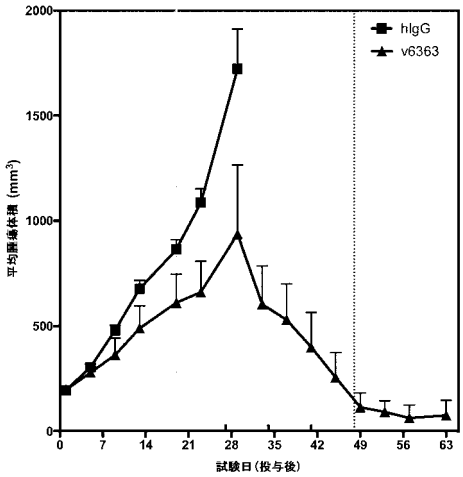
Kruskat-Wallis
*, p<0.05 対 v506

【図２２】

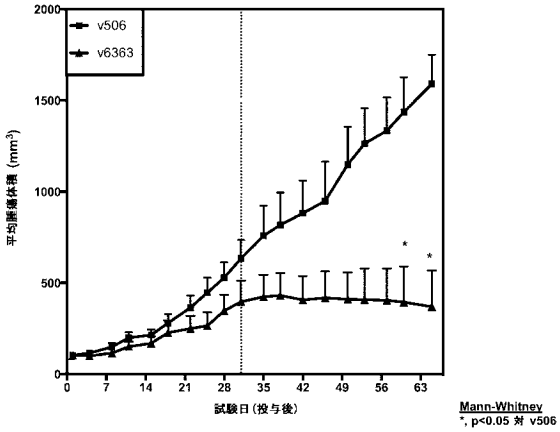


ANOVA
*, p<0.05 対 v506

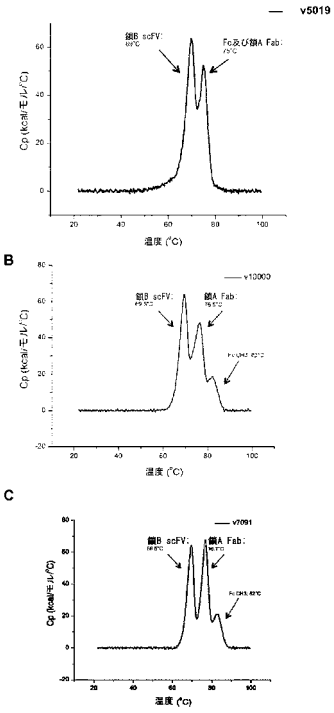
【図２３】



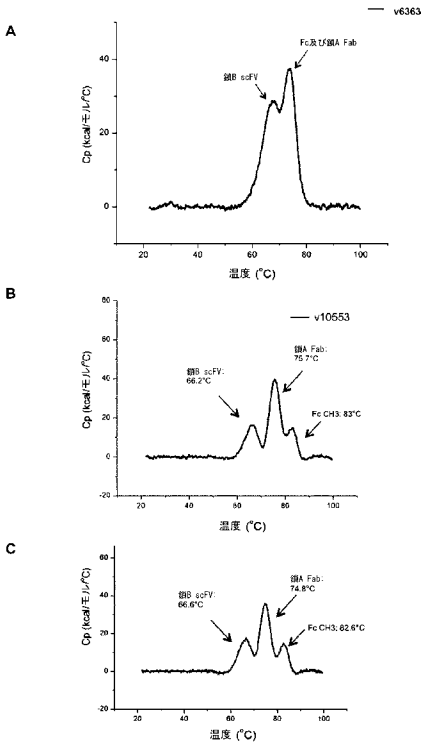
【図２４】



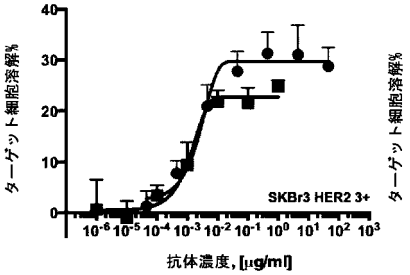
【図２５】



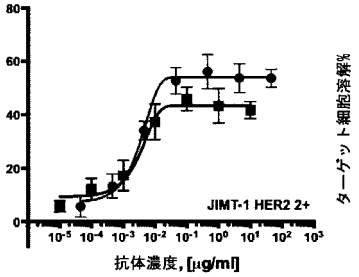
【図２６】



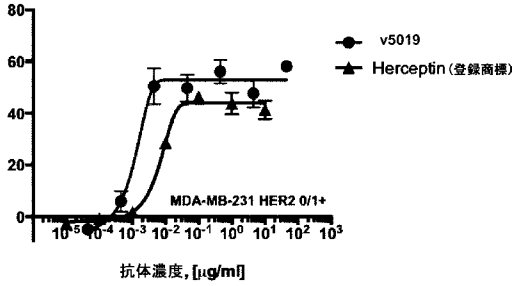
【図２７Ａ】



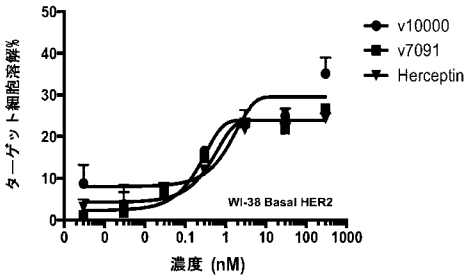
【図２７Ｂ】



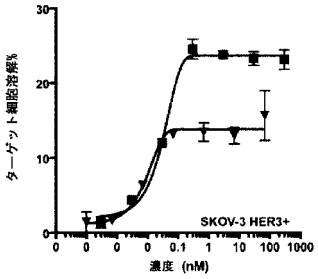
【図２７Ｃ】



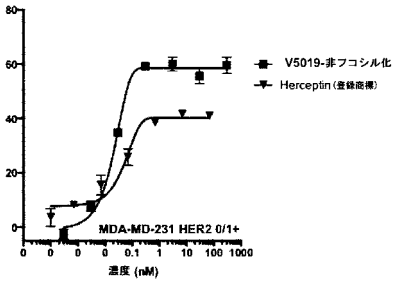
【図２７Ｄ】



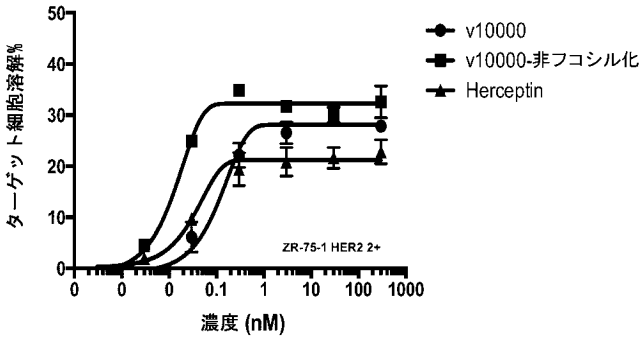
【図２８Ａ】



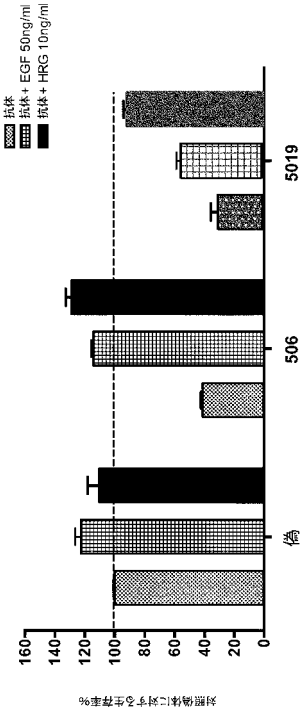
【図２８Ｂ】



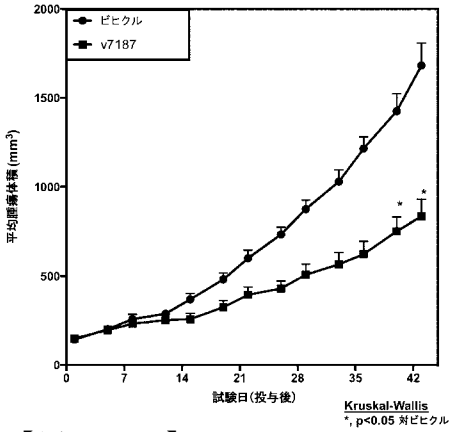
【図２８Ｃ】



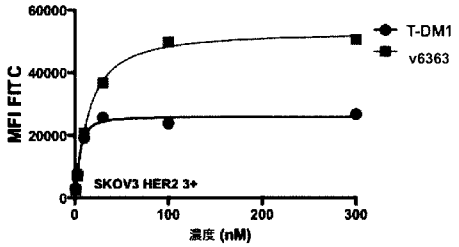
【図２９】



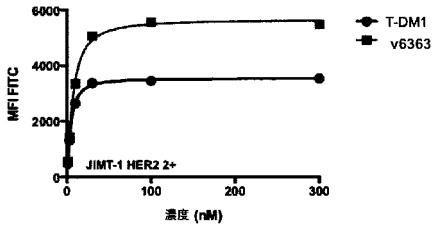
【図３０】



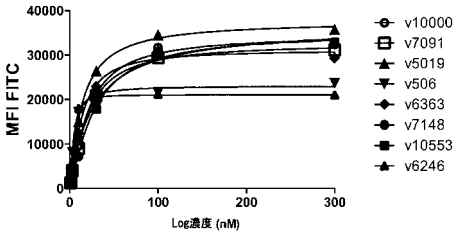
【図３１Ａ】



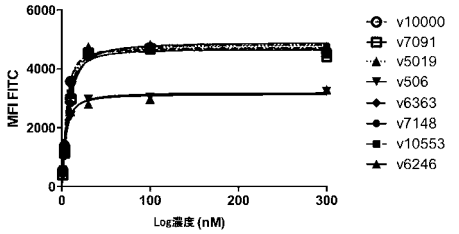
【図３１Ｂ】



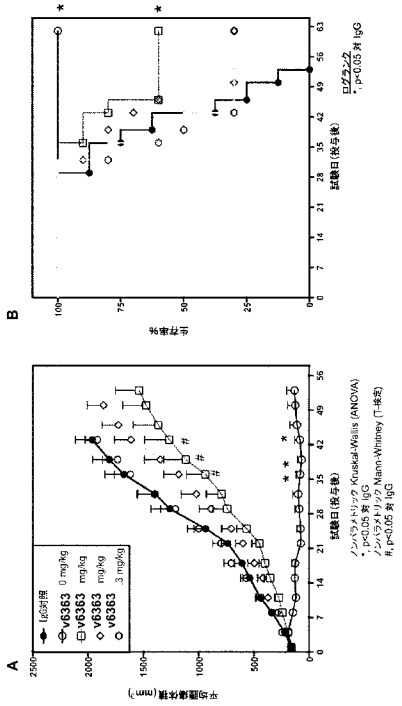
【図３１Ｃ】



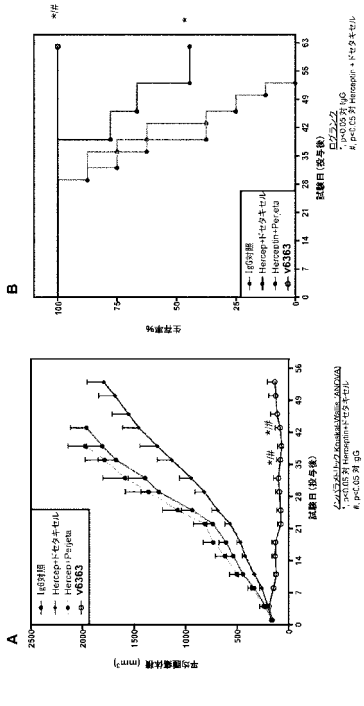
【図３１Ｄ】



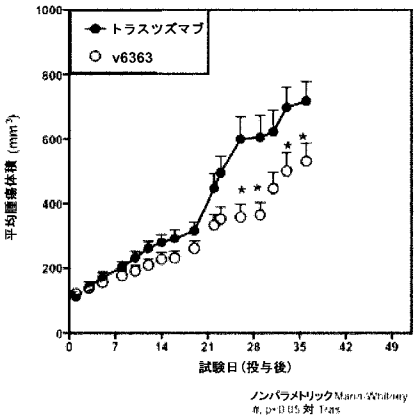
【図３２】



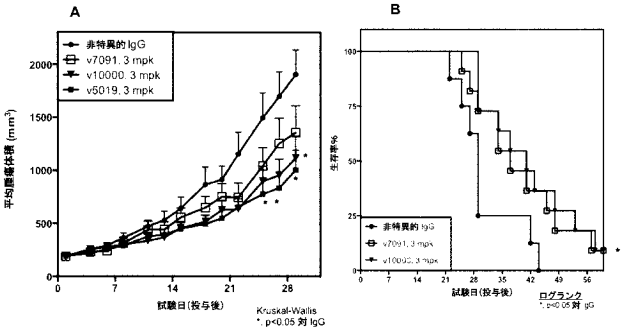
【図３３】



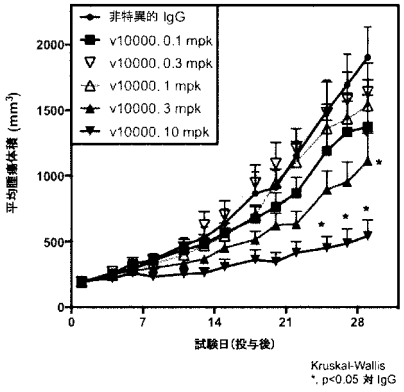
【図３４】



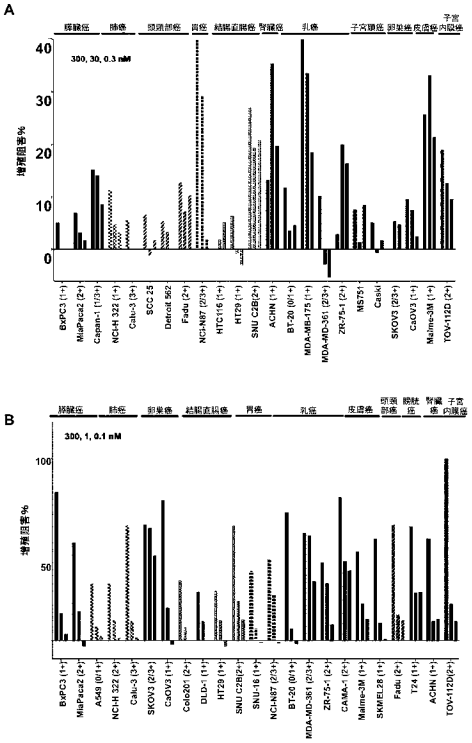
【図３５】



【図３６】



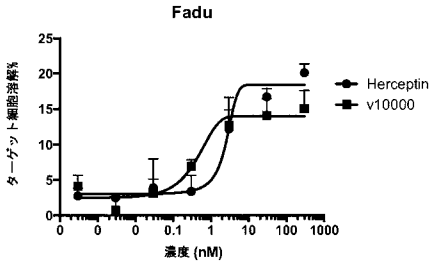
【図３７】



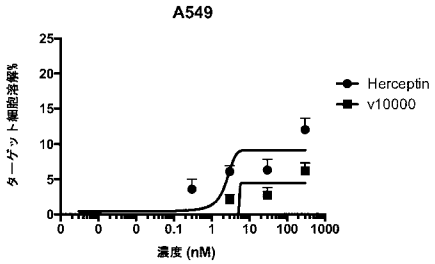
【図３８】

細胞系	細胞系の説明	DHC 受容体			V1000	V10553	参照文献
		HER2	EGFR	HER3	活性	活性	
BxPC3	ヒト膵臓腺癌	1	2	1	−	+	1,2,3
Capan-1	ヒト膵臓腺癌	1/3	1	0	−	+	1,4,5
MiaPaca2	ヒト膵臓癌	2	1/2	0	+	+	3,4
SW 1990	転移性ヒト膵臓腺癌	2	1	0	+	+	2,4
Panc1	ヒト膵臓癌	1	1/2		+	+	4
A549	ヒト肺癌	0/1	1		-	+	6,7
Calu-3	ヒト肺腺癌	3	2	1	-	+	6,8,9
Calu-6	ヒト未分化肺癌	0			-	+	6
NCI-H2126	ヒト腺癌：非小細胞肺癌				-	+	10
NCI-H322	ヒト肺色入楔気管支肺胞癌	2	2		+	+	6,7,11
Detroit 562	ヒト咽頭癌				-	+	12
SCC-15	ヒト舌扁平上皮細胞癌		2		-	+	12
SCC-25	ヒト舌扁平上皮細胞癌		2		-	+	12
FaDu	咽頭扁平上皮細胞癌	2	2		+	+	
Colo201	ヒト結腸直腸腺癌	2	1		-	+	13
DLD-1	ヒト結腸直腸腺癌、Duke型C	1	0/1		-	+	14
HCT116	ヒト結腸直腸癌	1	0/1		-	+	14
HT 29	ヒト結腸直腸腺癌：	1	0		−	+	14
SNU-C2B	ヒト直腸結腸直腸癌	2*			−	+	
SNU-1	ヒト胃癌	0			-	+	15
SNU-16	ヒト胃癌	1			-	+	15
NCI-N87	ヒト胃癌	3	2	1	+	+	15
MDAMB175	ヒト乳房腺管癌、ER+	1	1	0/1	-	+	8,16
MDAMB361	ヒト乳房腺癌、ER+、HER2増幅	2/3	1	1	-	+	9,15,17
ZR-75-1	ヒト乳房腺管上皮腺管癌、ER+、ルミナールA	2	1	1	+	+	9
BT-20	ヒト乳癌、Basal A、TNBC	0/1	2	1	−	+	18
BT549	ヒト乳房腺管癌、Basal B、間葉様TNBC、ER−	0	0/1	0	-	+	18
CAMA-1	ヒト乳房腺癌、ER+	2	0	1	-	+	
MDAMB453	ヒト転移性乳癌、ER−、HER2増幅、ルミナールA、TNBC	0	0/1	0	-	+	18
T47D	ヒト乳房腺管癌、ER+	1	0	1	-	+	19
SK-UT-1	ヒト子宮中胚葉腫瘍（混合）グレードIII				-	+	
TOV-112D	ヒト原発性悪性腺癌、子宮内膜様癌	2	1	2	-	+	20
A431	ヒト皮膚類表皮癌	1	3		-	+	21
Malme-3M	ヒト悪性黒色腫、肺転移	1	1	1	-	+	9, 22
SKMEL28	ヒト悪性黒色腫	1	0		+	+	22
Caski	ヒト子宮頸癌	1			−	+	23
MS751	ヒト子宮頸部表皮癌				−	+	
T24	ヒト膀胱癌	1	0		-	+	19,21,24
ACHN	ヒト腎臓細胞腺癌	1	2	0/1	-	+	9, 25
CaOV3	ヒト卵巣腺癌	1	1		-	+	26
Ovcar-3	ヒト卵巣腺癌	1/2	2	2	-	+	20, 26
SKOV3	ヒト卵巣腺癌	2/3	2	0/1	-	−	

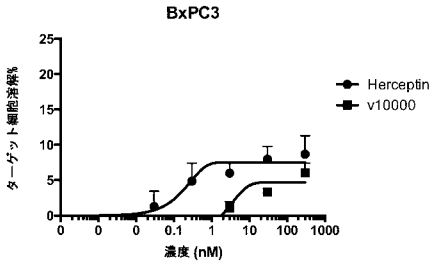
【図３９Ａ】



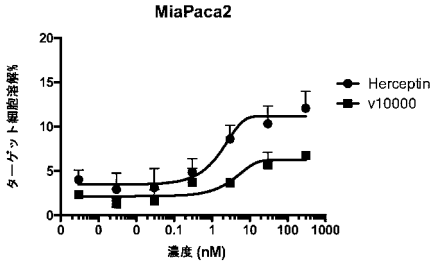
【図３９Ｂ】



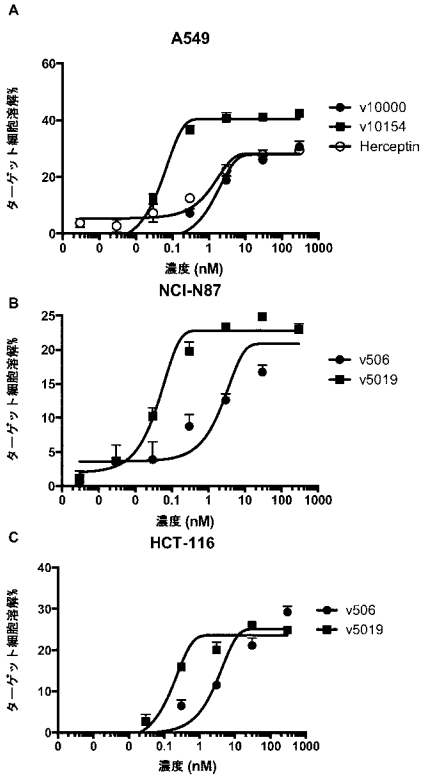
【図３９Ｃ】



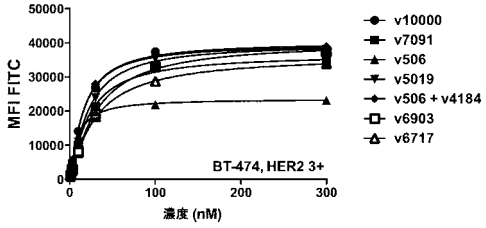
【図３９Ｄ】



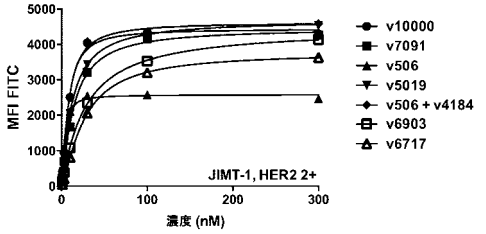
【図４０】



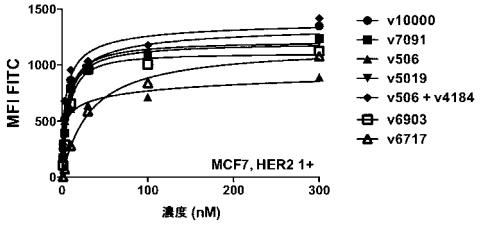
【図４１Ａ】



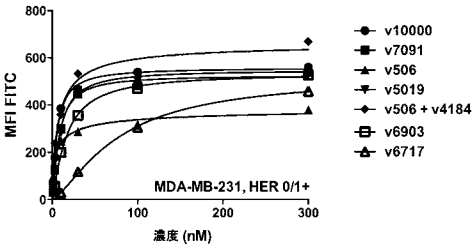
【図４１Ｂ】



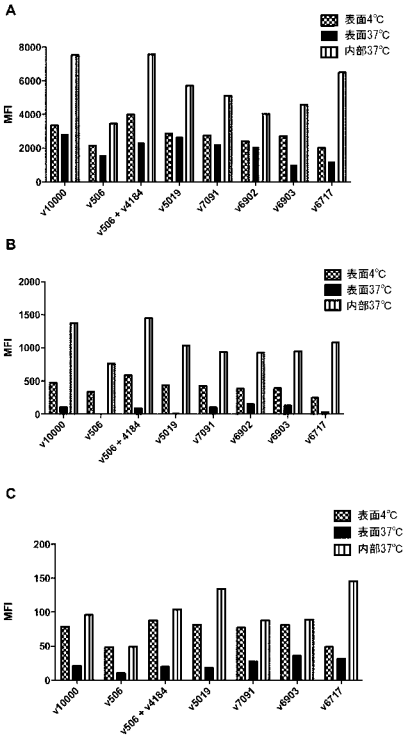
【図４１Ｃ】



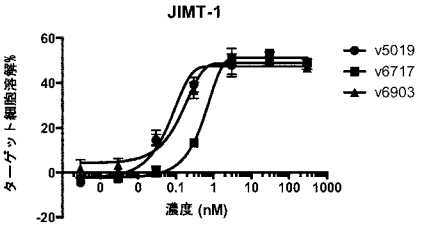
【図４１Ｄ】



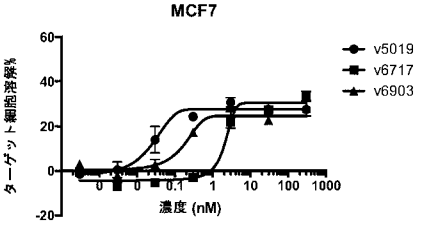
【図４２】



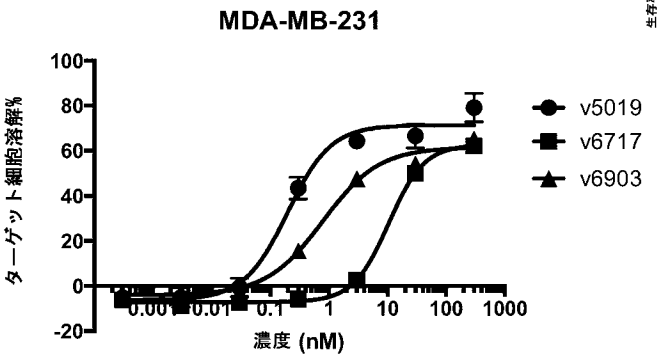
【図４３Ａ】



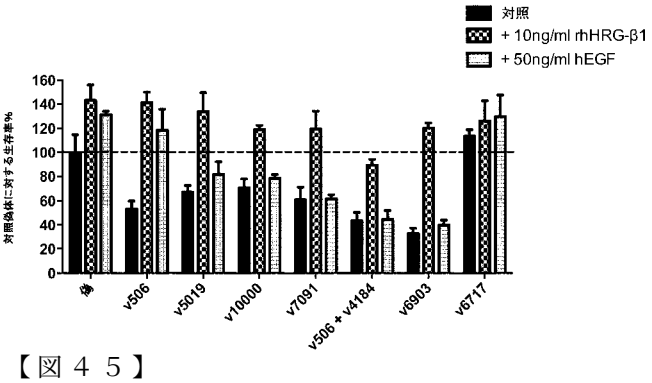
【図４３Ｂ】



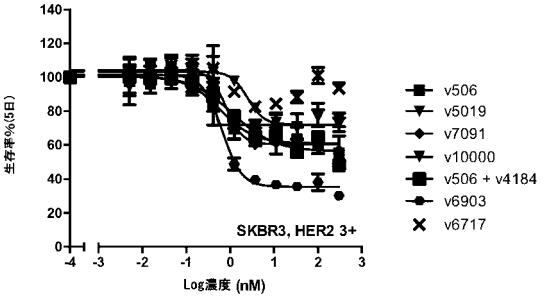
【図４３Ｃ】



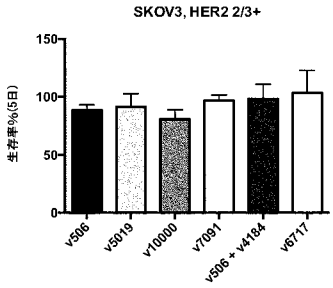
【図４４】



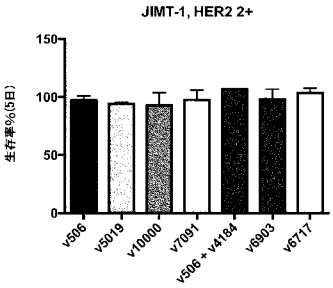
【図４５】



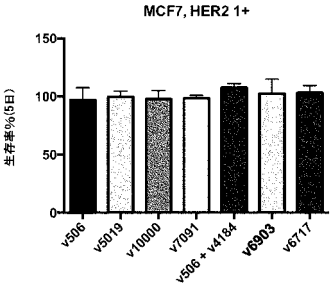
【図４６Ａ】



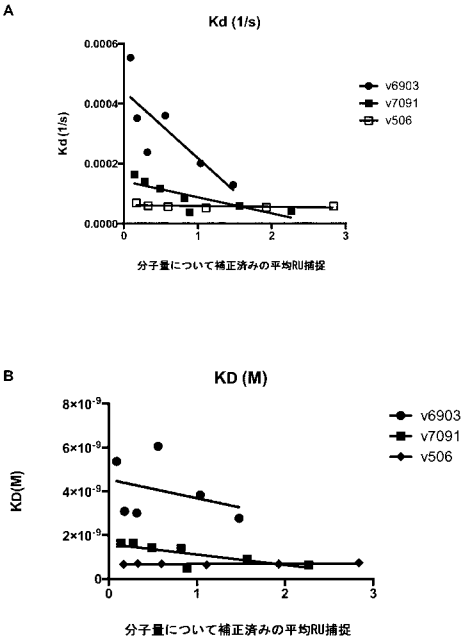
【図４６Ｂ】



【図４６Ｃ】



【図４７】



【配列表】
2019205432000001.app
【手続補正書】
【提出日】令和1年7月5日(2019.7.5)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ．重鎖１（Ｈ１）が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０１、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０３、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５で示されるＣＤＲ配列を含み；
ｂ．重鎖２（Ｈ２）が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９９、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０１、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０７、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０９、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１１で示されるＣＤＲ配列を含み；および
ｃ．軽鎖１（Ｌｌ）が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７３、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７５、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７７で示されるＣＤＲ配列を含む、
Ｈ１、Ｈ２、およびＬｌを含む、抗原結合性コンストラクト。
【請求項２】
ａ．Ｈ１が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９９で示されるＶＨ配列を含み；
ｂ．Ｈ２が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３０５で示されるＶＨ配列、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２９７で示されるＶＬ配列を含み；および
ｃ．Ｌ１が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１で示されるＶＬ配列を含む、
請求項１に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項３】
ａ．Ｈ１が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９７で示される配列を含み；
ｂ．Ｈ２が、ＳＥＱ　ＩＤＮＯ：２９５で示される配列を含み；および
ｃ．Ｌ１が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６９で示される配列を含む、
請求項２に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項４】
ａ．Ｈ１が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９７で示される配列からなり；
ｂ．Ｈ２が、ＳＥＱ　ＩＤＮＯ：２９５で示される配列からなり；および
ｃ．Ｌ１が、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６９で示される配列からなる、
請求項３に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項５】
グリコシル化されている、請求項１乃至４のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項６】
非フコシル化されている、請求項１乃至５のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項７】
薬物にコンジュゲートされている、請求項１乃至６のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項８】
前記薬物が、メイタンシン（ＤＭ１）である、請求項７に記載の抗原結合性コンストラクト。
【請求項９】
ＳＭＣＣリンカーでＤＭ１にコンジュゲートされている、請求項８に記載の抗原結合性コンストラクト。

【請求項１０】
請求項１乃至９のいずれか一項に記載のコンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１１】
前記薬学的担体が、緩衝剤、抗酸化剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート化剤、安定剤、または添加剤を含む、請求項１０の薬学的組成物。
【請求項１２】
請求項２に記載のコンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１３】
請求項３に記載のコンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１４】
請求項４に記載のコンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１５】
請求項７に記載のコンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１６】
請求項８に記載のコンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１７】
請求項９に記載のコンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項１８】
請求項１乃至４のいずれか一項に記載の抗原結合性コンストラクトをコードする、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１９】
請求項１８に記載の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を含む、ベクターまたはベクターのセット。
【請求項２０】
請求項１８に記載の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を含む、単離細胞。
【請求項２１】
ＶＨが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３５、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３６、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４８の３つのＶＨ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む３つのＣＤＲ配列を含み、および
ＶＬが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３８、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４７、およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３４０の３つのＶＬ　ＣＤＲ配列のアミノ酸配列を含む３つのＣＤＲ配列を含む、
ＶＨおよびＶＬを含み、ＨＥＲ２　ＥＣＤ２に一価で特異的に結合する１つまたは複数の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトを含む、修飾コンストラクト。
【請求項２２】
一価、二価、または多価である、請求項２１に記載の修飾コンストラクト。
【請求項２３】
（ｉ）一価であり、ＦａｂまたはｓｃＦｖを含むか、（ｉｉ）二価であり、ＦａｂおよびｓｃＦｖを含むか、または（ｉｉｉ）二価であり、２つのｓｃＦｖを含む、請求項２１に記載の修飾コンストラクト。
【請求項２４】
リンカーを用いてまたは用いずに１つまたは複数の抗原結合性ポリペプチドコンストラクトに連結されているＦｃを含む、請求項２１に記載の修飾コンストラクト。
【請求項２５】
ポリペプチドリンカーを含む、請求項２４に記載の修飾コンストラクト。
【請求項２６】
前記リンカーが、ＩｇＧ１ヒンジ領域を含む、請求項２５に記載の修飾コンストラクト

。
【請求項２７】
前記Ｆｃが、ヒトＦｃである、請求項２４に記載の修飾コンストラクト。
【請求項２８】
前記ヒトＦｃが、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃである、請求項２７に記載の修飾コンストラクト。
【請求項２９】
請求項２１に記載の修飾コンストラクトおよび薬学的担体を含む、薬学的組成物。
【請求項３０】
請求項２１に記載の修飾コンストラクト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。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	*5/09*	*(2010.01)*	C12N	5/09		
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	T	
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61K	39/395	E	
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
			G01N	33/53	Y	
			G01N	33/53	D	

(31)優先権主張番号 62/009,125
(32)優先日 平成26年6月6日(2014.6.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＲＩＴＯＮ

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ウェイサー ニーナ イー.
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 デルタ クレセント ドライブ ５９９５
(72)発明者 エング ゴードン イウ コン
カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト ６４ス アベニュー １５３５
(72)発明者 ウィックマン グラント レイモンド
カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー トゥルッチ ストリート ２２５１
(72)発明者 ディキシット スールジット ビーマラオ
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 リッチモンド キングフィッシャー ドライブ １１６５１ ＃５１
(72)発明者 エスコバル - カブレラ エリック
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バーナビー ウッドリッジ プレイス ８５６２
(72)発明者 サンチェス マリオ
カナダ国 ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト ７ス アベニュー ３１５７

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 BD39 BD50 CA25 CA44
CA46
4C084 AA19 MA66 NA05 NA14 ZB051 ZB091 ZB261 ZB262 ZC751 ZC752
4C085 AA13 AA14 BB01 BB36 BB41 BB44 CC21 DD62 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 EA51 FA74

专利名称(译)	具有her2作为靶标的双特异性抗原结合构建体		
公开(公告)号	JP2019205432A	公开(公告)日	2019-12-05
申请号	JP2019105971	申请日	2019-06-06
[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	ウェイサーニーナイー エングゴードンイウコン ウィックマングラントレイモンド ディキシットスールジットビーマラオ エスコバルカブレラエリック サンチェスマリオ		
发明人	ウェイサー ニーナ イー. エング ゴードン イウ コン ウィックマン グラント レイモンド ディキシット スールジット ビーマラオ エスコバル-カブレラ エリック サンチェス マリオ		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/63 C07K16/28 C12N5/10 C12P21/08 C12N5/09 C07K16/46 A61K39/395 A61P35/00 A61K45/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61K47/6803 A61K47/6855 A61K2039/505 A61P35/00 A61K47/6851 A61K47/6869 C07K16/32 C07K2317/35 C07K2317/732 C07K2317/41 C07K2317/526 C07K2317/622 A61K39/39558 A61K45/06 C07K16/3015 C07K16/3069 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/52 C07K2317/524 C07K2317/55 C07K2317/73 C07K2317/77 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/57492		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/63.Z C07K16/28 C12N5/10 C12P21/08 C12N5/09 C07K16/46 A61K39/395.T A61K39/395.E A61P35/00 A61K45/00 G01N33/53.Y G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD39 4B065/BD50 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB051 4C084/ZB091 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC751 4C084/ZC752 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB36 4C085/BB41 4C085/BB44 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十岚弘		
优先权	61/910026 2013-11-27 US 62/000908 2014-05-20 US 62/009125 2014-06-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

为了提供与HER2特异性结合的双原位抗原结合构建体。解决方案：双原位抗原结合构建体包括与HER2的ECD2结合的单个抗原结合部分，与HER2的ECD4结合的第二抗原结合部分， 和Fc。 抗原结合部分中的至少一个是scFv。 双对位抗原结合构建体可用于癌症治疗。选图：图1