(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-503654
(P2024-503654A)
(43)公表日　令和6年1月26日(2024.1.26)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*51/04*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	51/04		４Ｃ０７６
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28	ＺＮＡ	４Ｃ０８４
Ｃ０７Ｋ	*16/46*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/46		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*51/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	51/00	１００	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全210頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-541917(P2023-541917)
(86)(22)出願日　令和4年1月11日(2022.1.11)
(85)翻訳文提出日　令和5年7月31日(2023.7.31)
(86)国際出願番号　PCT/EP2022/050453
(87)国際公開番号　WO2022/152701
(87)国際公開日　令和4年7月21日(2022.7.21)
(31)優先権主張番号　21151407.0
(32)優先日　令和3年1月13日(2021.1.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号　21184780.1
(32)優先日　令和3年7月9日(2021.7.9)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA
最終頁に続く

(71)出願人　514099673
エフ・ホフマン－ラ・ロシュ・アクチェンゲゼルシャフト
スイス国 シーエイチ－４０７０ バーゼル グレンツァッハーシュトラーセ １２４
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　コロンベッティ， サラ
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １０， シー／オー ロッシュ グリクアート アーゲー
(72)発明者　フロスト， ソフィア
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １０， シー／オー ロッシュ グリクアート アーゲー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　併用療法

(57)【要約】
本発明は、事前標的化放射線免疫療法（ＰＲＩＴ）の使用を含む併用療法に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
対象における増殖性障害を処置する方法であって、
ｉ）多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を前記対象に投与することを含む事前標的化放射線免疫療法であって、前記抗体またはスプリット抗体が、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有し、前記放射性標識化合物を前記対象に投与することをさらに含む、事前標的化放射線免疫療法、ならびに
ｉｉ）ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を前記対象に投与することを含む免疫療法
により前記対象を処置することを含む、方法。
【請求項２】
前記方法が、前記多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで前記放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程と、を含む処置サイクルを含み、前記抗ＣＤ４０抗体および前記免疫チェックポイント阻害剤が、同時に、またはいずれかの順序で逐次的に投与される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記方法が、１つ以上の追加の処置サイクルを含み、各追加サイクルが、前記多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで前記放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程と、を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
２、３、４または５つの追加サイクルを含む、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記放射性標識化合物が、^{212}Ｐｂ、^{212}ＢｉまたはＢｉでキレート化されたＤＯＴＡＭである、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記標的抗原がＣＥＡである、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記多重特異性抗体がＦｃドメインを含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記Ｆｃドメインが、エフェクター機能を低下させるか、または排除するように修飾されている、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記方法が、スプリット多重特異性抗体を投与することを含み、前記スプリット抗体が、
ｉ）標的抗原に結合し、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインをさらに含むが、前記放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない、第１のヘミボディと、
ｉｉ）標的抗原に結合し、前記放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインをさらに含むが、前記放射性標識化合物に対する前記抗原結合部位のＶＨドメインを含まない、第２のヘミボディと
を含み、
前記第１のヘミボディの前記ＶＨドメインおよび前記第２のヘミボディの前記ＶＬドメインが一緒になって、前記放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記第１のヘミボディおよび前記第２のヘミボディが、それぞれＦｃドメインを含む、

請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記Ｆｃドメインが、エフェクター機能を低下させるか、または排除するように修飾されている、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＣＤ４０アゴニストが、アゴニスト抗ＣＤ４０抗体である、請求項１～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、ＰＤ１、ＰＤＬ１またはＣＴＬＡ４の阻害剤から選択される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、ＰＤ１に対する抗体、ＰＤＬ１に対する抗体およびＣＴＬＡ４に対する抗体から選択される抗体である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記免疫チェックポイント阻害剤が、ＰＤＬ１に対する抗体である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記増殖性障害ががんである、請求項１～１５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１７】
前記対象がヒトである、請求項１～１６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１８】
前記方法が、前記事前標的化放射線免疫療法および／または前記免疫療法単独による処置よりも、遅い腫瘍成長速度をもたらす、請求項１～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記方法が、前記事前標的化放射線免疫療法および／または前記免疫療法単独による処置よりも、対象の生存の可能性の増加をもたらす、請求項１～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
前記方法が、前記事前標的化放射線免疫療法および／または前記免疫療法単独による処置よりも、活性化腫瘍内ＣＤ８　Ｔ細胞の頻度の増加ならびに／または腫瘍、脾臓および流入領域リンパ節（ＤＬＮ）における活性化形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）および古典的ＤＣ（ｃＤＣ）の頻度の増加をもたらす、請求項１～１９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２１】
前記方法が、前記事前標的化放射線免疫療法および／または前記免疫療法単独による処置よりも、免疫記憶応答の増強をもたらす、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
増殖性障害を処置する方法において使用するための、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体であって、前記処置が、前記多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与することを含み、前記処置が、ｉ）前記放射性標識化合物、ｉｉ）ＣＤ４０アゴニストおよびｉｉｉ）免疫チェックポイント阻害剤を投与することをさらに含む、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体。
【請求項２３】
前記方法が、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法である、請求項２２に記載の使用のための多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体。
【請求項２４】
増殖性障害を処置する方法において使用するためのＣＤ４０アゴニストであって、前記処置が、ｉ）放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）前記放射性標識化合物、なら

びにｉｉｉ）免疫チェックポイント阻害剤を投与することをさらに含む、ＣＤ４０アゴニスト。
【請求項２５】
前記方法が、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法である、請求項２４に記載の使用のためのＣＤ４０アゴニスト。
【請求項２６】
増殖性障害を処置する方法において使用するための免疫チェックポイント阻害剤であって、前記処置が、ｉ）放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）前記放射性標識化合物ならびにｉｉｉ）ＣＤ４０アゴニストを投与することをさらに含む、免疫チェックポイント阻害剤。
【請求項２７】
前記方法が、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法である、請求項２６に記載の免疫チェックポイント阻害剤。
【請求項２８】
増殖性障害を処置する方法において組み合わせて使用するための、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、放射性標識化合物、ＣＤ４０アゴニストならびに免疫チェックポイント阻害剤。
【請求項２９】
前記方法が、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法である、請求項２８に記載の使用のための、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、放射性標識化合物、ＣＤ４０アゴニストならびに免疫チェックポイント阻害剤。
【請求項３０】
増殖性疾患の併用での同時のまたは逐次的な処置のための、Ａ）第１の成分として、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を有効成分として含む組成物、Ｂ）第２の成分として、ＣＤ４０アゴニストを有効成分として含む組成物、ならびにＣ）第３の成分として、免疫チェックポイント阻害剤、好ましくはＰＤ－Ｌ１阻害剤を有効成分として含む組成物を含む、医薬品。
【請求項３１】
前記増殖性疾患ががんである、請求項３０に記載の医薬品。
【請求項３２】
Ｄ）第４の成分として、前記放射性標識化合物を有効成分として含む組成物をさらに含む、請求項３０または請求項３１に記載の医薬品。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、がんの処置において使用するための併用療法に関する。
【背景技術】
【０００２】
薬物をがん細胞に標的化するためのモノクローナル抗体が開発されている。腫瘍関連抗原に結合する抗体に毒性剤を結合させることにより、周囲組織への損傷が少なく、より特異的な腫瘍殺傷を提供する可能性がある。
【０００３】
事前標的化放射線免疫療法（ＰＲＩＴ）では、一方では腫瘍関連抗原に対して、他方では放射性標識化合物に対して親和性を有する抗体コンストラクトが使用される。第１の工程では、抗体を投与し、腫瘍に局在させる。続いて、放射性標識化合物を投与する。放射性標識化合物は小さいため、腫瘍に迅速に送達され得、迅速に除去され、腫瘍外への放射

線曝露を減少させる（Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ　Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ　２０１２，２（５），５２３－５４０）。同様の手順をイメージングにも使用することができる。事前標的化は、アビジン－ビオチンを使用する二重特異性抗体またはシステムを使用することができるが、後者はアビジン／ストレプトアビジンが免疫原性であるという欠点を有する。

【０００４】

本発明は、ＰＲＩＴの使用を含む併用療法に関する。

【発明の概要】

【０００５】

本発明は、ｉ）多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体であって、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）ＣＤ４０アゴニストならびにｉｉｉ）免疫チェックポイント阻害剤の使用を含む併用療法に関する。

【０００６】

一態様では、本発明は、増殖性疾患、好ましくはがんの併用での同時のまたは逐次的な処置のための、Ａ）第１の成分として、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を有効成分として含む組成物、Ｂ）第２の成分として、ＣＤ４０アゴニストを有効成分として含む組成物、ならびにＣ）第３の成分として、免疫チェックポイント阻害剤、好ましくはＰＤ－Ｌ１阻害剤を有効成分として含む組成物を含む、医薬品に関する。いくつかの実施形態では、医薬品は、放射性標識化合物をさらに含み得る。

【０００７】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示される医薬品を、それを使用するための説明書と共に含むキットを提供する。

【０００８】

別の態様では、本発明は、増殖性疾患、例えばがんを処置する方法において使用するための、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体であって、処置が、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与することを含み、処置が、ｉ）放射性標識化合物、ｉｉ）ＣＤ４０アゴニストおよびｉｉｉ）免疫チェックポイント阻害剤を投与することをさらに含む、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体に関する。

【０００９】

別の態様では、本発明は、増殖性疾患、例えばがんを処置する方法において使用するためのＣＤ４０アゴニストであって、処置が、ｉ）放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）放射性標識化合物、ならびにｉｉｉ）免疫チェックポイント阻害剤を投与することをさらに含む、ＣＤ４０アゴニストに関する。

【００１０】

別の態様では、本発明は、増殖性疾患、例えばがんを処置する方法において使用するための免疫チェックポイント阻害剤であって、処置が、ｉ）放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）放射性標識化合物ならびにｉｉｉ）ＣＤ４０アゴニストを投与することをさらに含む、免疫チェックポイント阻害剤に関する。

【００１１】

別の態様では、本発明は、増殖性疾患、例えばがんを処置する方法において組み合わせて使用するための、ｉ）放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）放射性標識化合物、ｉｉｉ）ＣＤ４０アゴニストならびにｉｖ）免疫チェックポイント阻害剤に関する。

【００１２】

別の態様では、本発明は、増殖性疾患、例えばがんを処置する方法であって、ｉ）放射

性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）放射性標識化合物、ｉｉｉ）ＣＤ４０アゴニスト、ならびにｉｖ）免疫チェックポイント阻害剤を患者に投与することを含む、方法に関する。

【００１３】

別の態様では、本発明は、対象における増殖性疾患、例えばがんを処置する方法であって、

ｉ）多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を対象に投与することを含む放射線免疫療法処置であって、当該多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体が、放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有し、放射性標識化合物を対象に投与することをさらに含む、放射線免疫療法処置、ならびに

ｉｉ）ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を対象に投与することを含む免疫療法処置を含む、方法に関する。

【００１４】

放射性標識化合物は、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体の後に患者に投与される。多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体は、標的抗原に結合する。次いで、放射性標識化合物は、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体に結合し、したがって標的細胞に局在する。

【００１５】

抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤は、同時にまたはいずれかの順序で逐次的に投与され得る。それらは、多重特異性抗体／スプリット多重特異性抗体および放射性標識化合物の投与の前または後に投与され得る。好ましくは、それらは、多重特異性抗体／スプリット多重特異性抗体および放射性標識化合物の後に投与される。

【００１６】

一実施形態では、処置のサイクルは、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程と、を含み、抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤は、同時にまたはいずれかの順序で逐次的に投与される。

【００１７】

処置は、１サイクルを含み得るか、または複数サイクル、例えば２、３、４、５もしくは６サイクルを含み得る。

【００１８】

いくつかの実施形態では、処置の全てのサイクルが同じであるわけではない。いくつかの実施形態では、

第１のサイクルは、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程と、を含み、抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤は、同時に、またはいずれかの順序で逐次的に投与され、かつ

１つ以上の後続サイクルは、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程と、を含む。

【００１９】

例えば、上述のように、１、２、３、４または５つの後続サイクルがあり得る。

【００２０】

多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体は、二重特異性抗体またはスプリット二重特異性抗体であり得る。

【００２１】

一実施形態では、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）は、標的抗原に対する少なくとも１つの結合部位と、放射性標識化合物、例えばＰｂ－ＤＯＴＡＭキレートに対する少なくとも１つの結合部位とを含む抗体であり得る。例示的な抗体は、国際公開第２０１９／２０１９５９号に記載されている。

【００２２】

スプリット多重特異性抗体は、本明細書においてヘミボディと呼ばれる２つの異なる部分から構成される。各ヘミボディは、標的抗原に結合することができる抗原結合部分を含む。放射性標識化合物に対する抗原結合部位は、２つのヘミボディが会合した場合にのみ機能的抗原結合部位が形成されるように、２つのヘミボディにわたって分割される。したがって、スプリット抗体は、

ｉ）標的抗原に結合し（すなわち、標的抗原に結合することができる抗原結合部分を含み）、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインをさらに含むが、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない、第１のヘミボディと、

ｉｉ）標的抗原に結合し（すなわち、標的抗原に結合することができる抗原結合部分を含み）、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインをさらに含むが、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まない、第２のヘミボディと、を含み、

第１のヘミボディの当該ＶＨドメインおよび第２のヘミボディの当該ＶＬドメインは一緒になって、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる。

【００２３】

第１のヘミボディも第２のヘミボディも、それ自体では、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を含まない。第１のヘミボディは、放射性標識化合物に対する機能的結合部位からのＶＨドメインのみを有し、ＶＬドメインを有しない。第２のヘミボディは、ＶＨドメインではなくＶＬドメインのみを有する。

【００２４】

第１のヘミボディおよび第２のヘミボディのＶＨドメインおよびＶＬドメインが会合すると、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位が形成される。これは、例えば、第１の抗体および第２の抗体が同じ個々の標的細胞または隣接する細胞に結合している場合に起こり得る。

【００２５】

「ヘミボディ」、「デミボディ」、ＳＰＬＩＴ、および「単一ドメインスプリット抗体」という用語は、互換的に使用され得る。例示的なヘミボディ／デミボディは、同時係属出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６９５６１号に記載されている。

【００２６】

処置が、標的抗原に対する少なくとも１つの結合部位および放射性標識化合物に対する少なくとも１つの結合部位を含む単一の抗体分子を利用する（すなわち、スプリット抗体を利用しない）場合、処置はまた、除去剤の投与を含み得る。除去剤は、多重特異性抗体の後および放射性標識化合物の前に投与される。除去剤は、放射性標識化合物に対する抗原結合部位に結合する。除去剤は、放射性標識化合物に対する抗原結合部位をブロックし、循環抗体がキレート化放射性核種に結合するのを防ぐ。代替的にまたは追加的に、除去剤は、身体からの抗体のクリアランス速度を増加させ得る。「除去剤」は、代替的に「ブロッキング剤」と呼ばれてもよく、これらの用語は、以下の説明で互いに置き換えられ得る。除去剤は、本明細書でさらに論じられるように、除去部分にコンジュゲートされ得る。

【００２７】

処置がヘミボディを利用する場合、処置が除去工程を含む必要はない。すなわち、いくつかの実施形態では、本方法は、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディの投与と放射性標識化合物の投与との間（すなわち、ヘミボディの投与後であるが放射性標識化合物の投与前）に除去剤またはブロッキング剤を投与する工程を含まない。別の実施形態では、任意に放射線増感剤および／または化学療法剤以外の薬剤は、第１のヘミボディおよび第

２のヘミボディの投与と放射性標識化合物の投与との間に投与されない。別の実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディの投与と放射性標識化合物の投与との間に薬剤は投与されない。

【００２８】

いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独による処置と比較して１つ以上の利点をもたらす。事前標的化放射線免疫療法単独による参照処置は、併用療法と同じ事前標的化放射線免疫療法処置を投与すること（すなわち、同じ化合物、用量、投与時間、サイクル数）を含むが、免疫療法は含まない（すなわち、ＣＤ４０アゴニストまたは免疫チェックポイント阻害剤の投与なし）。免疫療法単独による参照処置は、併用療法と同じ免疫療法処置を投与すること（すなわち、同じＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤化合物、用量、投与時間、サイクル数）を含むが、事前標的化放射線免疫療法は含まない（すなわち、多重特異性／スプリット多重特異性抗体、放射性標識化合物および該当する場合は除去剤の投与なし）。いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独よりも、遅い腫瘍成長速度をもたらす。いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独による処置よりも、患者／対象の生存の可能性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独による処置よりも、活性化腫瘍内ＣＤ８Ｔ細胞の頻度の増加（例えば、４１ＢＢ発現のアップレギュレーションによって測定される）、ならびに／または腫瘍、脾臓および流入領域リンパ節（ＤＬＮ）における活性化形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）および古典的ＤＣ（ｃＤＣ）の頻度の増加（例えば、ＣＤ８６発現のアップレギュレーションによって測定される）、ならびに／または全免疫細胞におけるＴ細胞の頻度の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独による処置よりも、免疫記憶応答の増強または腫瘍再発の可能性の低下をもたらす。

【００２９】

いくつかの実施形態では、がんは、免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性である。

【００３０】

いくつかの実施形態では、標的抗原がＣＥＡであることが好ましい場合がある。

【００３１】

いくつかの実施形態では、放射性標識化合物がＰｂ－ＤＯＴＡＭであることが好ましい場合がある。

【図面の簡単な説明】

【００３２】

【図１】標的抗原（ＴＡ）－ＤＯＴＡＭ二重特異性抗体（ＴＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ）および例示的なＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の概略構造を示す図。

【図２】腫瘍細胞上のスプリット－ＶＨ／ＶＬ　ＤＯＴＡＭ結合剤のアセンブリを示す概略図。ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体は、ＤＯＴＡＭ結合剤の２つのドメインが集合されている標的化された細胞上の腫瘍抗原（ＴＡ）に結合しない限り、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに有意に結合しない。

【図３】除去剤の使用を含む３段階ＴＡ－ＰＲＩＴ概念の一例の概略図。

【図４】除去剤が使用されない２段階ＴＡ－ＰＲＩＴ概念の一例の概略図。

【図５】ＣＥＡ結合能を実証するためのスプリット抗体のＭＫＮ４５細胞への結合を示す図。抗体の検出は、ヒトＩｇＧ特異的二次抗体を用いて行う。

【図６】ＤＯＴＡＭ結合能を実証するためのスプリット抗体のＭＫＮ４５細胞への結合を示す図。抗体の検出は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＦＩＴＣを用いて行う。

【図７Ａ】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおいて実施された、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬを用いた２段階ＰＲＩＴの例示的なプロトコルを示す図（ｈ＝時間、ｄ＝日、ｗ＝週）。

【図７Ｂ】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおいて実施された、３段階ＰＲＩＴ対照の例示的なプロトコルを示す図（ｈ＝時間、ｄ＝日、ｗ＝週）。
【図８】ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ単独、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ単独、もしくは組み合わされた２つの相補的抗体のいずれかによって事前標的化された、または標準的な３段階ＰＲＩＴを使用した、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射６時間後の、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける事前標的化された^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの体内分布を示す図（％ＩＤ／ｇ±ＳＤ、ｎ＝４）。
【図９】ＳＣＩＤマウスにおけるＩＶ注射後のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬの薬物動態を示す図。
【図１０】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける２段階（上）または３段階（下）でのＣＥＡ－ＰＲＩＴを含むプロトコル１５８の実験デザインを示す図。＊２／４コンストラクト中のホール／ホール不純物を補償するために調整されたＣＥＡスプリットＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂの用量。
【図１１】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける事前標的化された^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの体内分布（ｐ．ｉ．６時間）を示す図。ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂまたはＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ抗体のバイパラトピックな組合せによって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射６時間後の、腫瘍担持ＳＣＩＤマウスにおける^{212}Ｐｂの分布である。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される（ｎ＝４）。
【図１２】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける３段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴ（上）、２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴ（中）、または１段階ＣＥＡ－ＲＩＴの１サイクルを含むプロトコル１６０の実験スケジュールを示す図。体内分布（ＢＤ）スカウトを放射能注射の２４時間後に安楽死させたが、有効性群のマウスを維持し、終了基準に達するまで慎重にモニターした。
【図１３】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける事前標的化された^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよび^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭの体内分布（ｐ．ｉ．２４時間）を示す図。ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ－事前標的化された^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭまたはプレインキュベートされた^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭの注射から２４時間後の、腫瘍担持ＳＣＩＤマウスにおける^{212}Ｐｂの分布である。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される（ｎ＝３）。
【図１４】ＢｘＰＣ３モデルにおけるＰＲＩＴ処置群および対照（Ａ～Ｅ群）についての標準誤差を伴う腫瘍成長平均を示す図（ｎ＝１０）。曲線はｎ＜５でトランケートした。点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）を示す。
【図１５】ＢｘＰＣ３モデルにおけるＰＲＩＴ処置群および対照（Ａ～Ｅ群）についての個々の腫瘍成長曲線を示す図（ｎ＝１０）。点線の縦線は、^{212}Ｐｂ標識化合物（２０μＣｉ）の投与を示す。
【図１６】ＢｘＰＣ３モデルにおけるＣＥＡ－ＰＲＩＴおよびＣＥＡ－ＲＩＴ（Ａ～Ｅ群、ｎ＝１０）で処置したマウスの平均体重減少を示す図。曲線はｎ＜５でトランケートした。点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する^{212}Ｐｂ標識化合物の投与を示す。
【図１７】^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の２４時間後に　　殺および剖検した、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴを含むプロトコル１７５の実験デザインを示す図。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴの用量を調整して、ホール／ホール不純物を補償した。
【図１８】ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体によって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後の、腫瘍担持ＳＣＩＤマウスにおける^{212}Ｐｂの分布を示す図（プロトコル１７５）。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される（ｎ＝４）。
【図１９】^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の６時間後に　　殺および剖検した、ＳＣ　ＢｘＰ

Ｃ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴを含むプロトコル１８５の実験デザインを示す図。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴ（ＣＨ１Ａ１Ａ）の用量を調整して、ホール／ホール不純物を補償した。

【図２０】ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体によって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後の、腫瘍担持ＳＣＩＤマウスにおける^{212}Ｐｂの分布を示す図（プロトコル１８５）。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される（ｎ＝５）。

【図２１】注射７日後の２つの選択されたＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍におけるＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対（ＶＨおよびＶＬ抗体の組合せ）の分布を示す図。ＡおよびＢは、Ｔ８４．６６を標的とするＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬを注射したマウスＡ３由来の腫瘍の切片を示し、ＡはＣＥＡ発現を示し、Ｂは対応するＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ分布を示す。ＣおよびＤは、ＣＨ１Ａ１Ａを標的とするＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬを注射したマウスＣ５由来の腫瘍切片を示す。ＣはＣＥＡ発現を示し、Ｄは対応するＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ分布を示す。

【図２２】^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の６時間後に　　殺および剖検した、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴを含むプロトコル１８９の実験デザインを示す図。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴ（ＣＨ１Ａ１Ａ）の用量を調整して、ホール／ホール不純物を補償した。

【図２３】陽性対照（ＣＨ１Ａ１Ａのみ）と比較した、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体のバイパラトピック対（Ｔ８４．６６およびＣＨ１Ａ１Ａ）によって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後の、腫瘍担持ＳＣＩＤマウスにおける^{212}Ｐｂの分布を示す図。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される。

【図２４】ＳＰＬＩＴ抗体についてＦＡＣＳによって決定された平均蛍光強度（ＭＦＩ）を示す図。ＦＡＣＳによって決定されるＰｂ－ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣの結合は、両方のＳＰＬＩＴ抗体とＰｂ－ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣとの同時インキュベーションについてのみ示され得る。単一のＳＰＬＩＴ抗体は有意なシグナルを生じなかった。

【図２５】図２５Ａ～図２５Ｃは、スプリット抗体のさらなる例示的なフォーマットを示す図である。

【図２６】チップ上に捕捉されたビオチン化ＤＯＴＡＭへの個々のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体の結合を評価した、実施例８、実験１の結果を示す図。

【図２７】チップ上に捕捉された個々のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体へのＤＯＴＡＭの結合を評価した、実施例８、実験２の結果を示す図。

【図２８】チップ上に捕捉されたＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体（抗体対）へのＤＯＴＡＭの結合を評価した、実施例８、実験３の結果を示す図。

【図２９】Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスにおける同所性Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ腫瘍のＣＥＡ－ＰＲＩＴを評価した、プロトコル１１９の試験概要を示す図（ＩＰＡＮＣ＝膵臓内、ｄ＝日、ｈ＝時間）。

【図３０】ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）（サイクル１）によって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後の、腫瘍担持Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスにおける^{212}Ｐｂの分布を示す図。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±標準偏差（ＳＤ、ｎ＝３）として表される。

【図３１】ＥＬＩＳＡによって決定した、プロトコル１１９のＢ群およびＤ群のマウスへのＩＰ投与（２００μｇ／抗体／マウス）の２４時間後の抗ＣＤ４０抗体および抗ＰＤ－Ｌ１抗体の血清濃度を示す図。グラフは、各処置サイクルについて平均±ＳＤで個々の値を示している。

【図３２】光子（Ｐ）／秒／ｍｍ^{2}±平均の標準誤差（ＳＥＭ、ｎ＝８）として表される

、同所性Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群のバックグラウンドを差し引いた平均ＢＬＩシグナルを示す図。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。

【図３３】光子（Ｐ）／秒／ｍｍ^{2}として表される、同所性Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群における個々のマウスのバックグラウンドを差し引いたＢＬＩシグナルを示す図（ｎ＝８）。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。矢印は、イメージングの最終日である８８日目を示し、この時点まで、Ｄ群の３匹のマウスは依然として生存しており、シグナルはみられなかった。

【図３４】同所性Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群の生存を示すカプラン・マイヤー曲線を示す図（ｎ＝８）。点線および破線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２０μＣｉ）および免疫療法投与をそれぞれ示す。

【図３５】初期ＢＷ±ＳＥＭのパーセンテージとして表される、様々な処置後のＢＷの平均変化を示す図。点線および破線は、処置スキームに応じて、それぞれ^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよび免疫療法投与を示す。

【図３６】Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスにおけるＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ腫瘍のＣＥＡ－ＰＲＩＴを評価した、プロトコル１３６の試験概要を示す図（ｄ＝日、ｈ＝時間）。

【図３７】ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）（サイクル１）によって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後の、腫瘍担持Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスにおける^{212}Ｐｂの分布を示す図。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される（ｎ＝３）。

【図３８】ＥＬＩＳＡによって決定した、Ｂ群およびＤ群のマウスへのＩＰ投与（２００μｇ／抗体／マウス）の２４時間後の抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１の血清濃度を示す図。グラフは、各処置サイクルについて個々の値および平均±ＳＤを示している。右グラフのアスタリスク（＊）は、外れ値（グラフに示さず。サイクル１では１つのデータポイントおよびサイクル３では３つのデータポイント）による歪んだ平均値を示す。

【図３９】ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群についての標準誤差を伴う腫瘍成長平均を示す図（ｎ＝９）。曲線はｎ＜５でトランケートした。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。

【図４０】ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群の個々の腫瘍成長曲線を示す図（ｎ＝９）。破線および点線の縦線は、それぞれ免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２０μＣｉ）の投与を示す。

【図４１】光子（Ｐ）／秒／ｍｍ２±ＳＥＭとして表される、ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群のバックグラウンドを差し引いた平均ＢＬＩシグナルを示す図（ｎ＝９）。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。

【図４２】光子（Ｐ）／秒／ｍｍ^{2}として表される、ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群における個々のマウスのバックグラウンドを差し引いたＢＬＩシグナルを示す図（ｎ＝９）。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。

【図４３】腫瘍体積≧３０００ｍｍ^{3}の終了基準に基づいて、ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおけるＡ～Ｄ群の生存を示すカプラン・マイヤー曲線を示す図（ｎ＝９）。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。

【図４４】Ｔ細胞活性化を示す、２サイクルの免疫療法、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋免疫療法で処置したか、または処置なしのマウスからのＤＬＮ、脾臓、および腫瘍試料のＦＡＣＳ分析を示す図。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ照射の４８時間後に相当する、免疫療法注射の２４時間後に試料を採取した。アスタリスクは有意水準（一元配置ＡＮＯＶＡ、ｐ＜０．０５、ｎ＝４）を示す。

【図４５】ｃＤＣおよびｐＤＣの活性化を示す、２サイクルの免疫療法、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋免疫療法で処置したか、または処置なしのマウスからのＤＬＮ、脾臓、および腫瘍試料のＦＡＣＳ分析を示す図。ｐＤＣ亜集団のマーカー：ＭＨＣＩＩ＋ＣＤ１１ｃ^{int} ＣＤ３１７＋、ＣＤ１１ｂ－ｃＤＣ亜集団（交差提示ＤＣ）のマーカー：ＭＨＣＩＩ＋ＣＤ１１ｃ^{high} ＣＤ１１ｂ－、ＣＤ１１ｂ＋ｃＤＣ亜集団のマーカー：ＭＨＣＩＩ＋ＣＤ１１ｃ^{high} ＣＤ１１ｂ＋。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ照射の４８時間後に相当する、免疫療法注射の２４時間後に試料を採取した。アスタリスクは有意水準（一元配置ＡＮＯＶＡ、ｐ＜０．０５、ｎ＝４）を示す。

【図４６】全体的なＴ細胞頻度を示す、２サイクルの免疫療法、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋免疫療法で処置したか、または処置なしのマウスからのＤＬＮ、脾臓、および腫瘍試料のＦＡＣＳ分析を示す図。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ照射の４８時間後に相当する、免疫療法注射の２４時間後に試料を採取した。アスタリスクは有意水準（一元配置ＡＮＯＶＡ、ｐ＜０．０５、ｎ＝４）を示す。

【図４７】ＳＣ Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおける再チャレンジマウスおよびナイーブＢ６－ｈｕＣＥＡマウスの腫瘍成長曲線を示す図（ｎ＝５）。再チャレンジマウスは、最初は腫瘍キャリアであり、３サイクルのＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ＣＩＴ（抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）の後に腫瘍がなくなった。

【図４８】ＳＣ Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおける再チャレンジマウスおよびナイーブマウスからの血液、脾臓、およびリンパ節（ＬＮ）試料のＦＡＣＳ分析を示す図（ｎ＝５）。再チャレンジマウスは、最初は腫瘍キャリアであり、３サイクルのＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ＣＩＴ（抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）の後に腫瘍がなくなった。アスタリスクは有意水準（対応のないｔ検定、ｐ＜０．０５）を示す。ｄｐ＝二重陽性、ｉｏｎｏ＝イオノマイシン。

【図４９】初期ＢＷ±ＳＥＭのパーセンテージとして表される、様々な処置後のＢＷの平均変化を示す図。点線および破線は、処置スキームに応じて、それぞれ^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよび免疫療法投与を示す。

【図５０】Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスにおけるＳＣ ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ腫瘍のＣＥＡ－ＰＲＩＴを評価した、プロトコル１５０の試験概要を示す図（ｄ＝日、ｈ＝時間）。

【図５１】ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）（サイクル１）によって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後の、ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ腫瘍担持Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスにおける^{212}Ｐｂの分布を示す図。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される（ｎ＝４）。

【図５２】ＥＬＩＳＡによって決定した、Ｂ群、Ｃ群およびＥ群のマウスへのＩＰ投与（２００μｇ／抗体／マウス）の２４時間後の抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１の血清濃度を示す図。グラフは、各処置サイクルについて平均±ＳＤで個々の値を示している。

【図５３】ＳＣ ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡモデルにおけるＡ～Ｅ群についての標準誤差を伴う腫瘍成長平均を示す図（ｎ＝９）。曲線はｎ＜５でトランケートした。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。矢印は免疫ＰＤ分析を示す。

【図５４】ＳＣ ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡモデルにおけるＡ～Ｅ群の個々の腫瘍成長曲線を示す図（ｎ＝９）。破線および点線の縦線は、それぞれ免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２０μＣｉ）の投与を示す。

【図５５】腫瘍体積≧３０００mm^3の終了基準に基づいて、ＳＣ ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡモデルにおけるＡ～Ｅ群の生存を示すカプラン・マイヤー曲線を示す図（ｎ＝９）。記号は、腫瘍体積以外の理由で安楽死させた打切りマウスを表す。破線および点線の縦線は

、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。
【図５６】２サイクルの免疫療法、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋免疫療法で処置したか、または処置なしのマウスからのリンパ節試料のＦＡＣＳ分析を示す図。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ照射の４８時間後に相当する、免疫療法注射の２４時間後に試料を採取した。アスタリスクは有意水準（多重比較［テューキー］のための補正を伴う一元配置ＡＮＯＶＡ、ｐ＜０．０５、ｎ＝４）を示す。ＭＦＩ＝平均蛍光強度。
【図５７】ＳＣ　ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡモデルにおける再チャレンジマウスおよびナイーブ（年齢一致）Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスの腫瘍成長曲線を示す図。再チャレンジマウスは、最初は腫瘍キャリアであり、抗ＣＤ４０、抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、またはＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１で処置した後、腫瘍がなくなった。
【図５８】ＳＣ　ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡモデルにおける再チャレンジマウスおよびナイーブマウスのＦＡＣＳ分析を示す図。再チャレンジマウスは、最初は腫瘍キャリアであり、抗ＣＤ４０、抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、またはＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１で処置した後、腫瘍がなくなった。アスタリスクは有意水準（多重比較［テューキー］のための補正を伴う一元配置ＡＮＯＶＡ、ｐ＜０．０５、ｎ＝４）を示す。ｄｐ＝二重陽性。
【図５９】初期ＢＷ±ＳＥＭのパーセンテージとして表される、様々な処置後のＢＷの平均変化を示す図。点線および破線は、処置スキームに応じて、それぞれ^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよび免疫療法投与を示す。
【図６０】ｈｕＣＥＡＣＡＭ５マウスにおけるＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ腫瘍のＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴおよび／またはＣＩＴを評価した、プロトコル１９５の試験概要を示す図（ｄ＝日、ｈ＝時間）。
【図６１】ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴによって事前標的化された、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後の、Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ腫瘍担持ｈｕＣＥＡＣＡＭ５マウスにおける^{212}Ｐｂの分布を示す図。器官および組織中の放射能含有量は、平均％ＩＤ／ｇ±ＳＤとして表される（ｎ＝３）。
【図６２】ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃモデルにおける Ａ～Ｄ群についての標準誤差を伴う腫瘍成長平均を示す図（ｎ＝１０）（プロトコル１９５）。曲線はｎ＜５でトランケートした。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。
【図６３】ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃモデルにおける Ａ～Ｄ群の個々の腫瘍成長曲線を示す図（ｎ＝１０）（プロトコル１９５）。破線および点線の縦線は、それぞれ免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２０μＣｉ）の投与を示す。
【図６４】腫瘍体積≧２０００ｍｍ３の終了基準に基づいて、ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃモデル（プロトコル１９５）における Ａ～Ｄ群の生存を示すカプラン・マイヤー曲線を示す図（ｎ＝１０）。記号は、腫瘍体積以外の理由で安楽死させた打切りマウスを表す。破線および点線の縦線は、試験デザインに従った、一部または全ての群に対する免疫療法および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与（２０μＣｉ）をそれぞれ示す。
【図６５】ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃモデルにおける再チャレンジマウスおよびナイーブ（年齢一致）ｈｕＣＥＡＣＡＭ５マウスについての標準誤差を伴う腫瘍成長平均を示す図。再チャレンジマウスは、最初は腫瘍キャリアであり、ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１で処置した後、腫瘍がなくなった。再チャレンジ後１３日目に、群あたり３匹のマウスを免疫ＰＤ分析のために安楽死させた（データは示さず）。
【図６６】ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃモデルにおける再チャレンジマウスおよびナイーブ（年齢一致）ｈｕＣＥＡＣＡＭ５マウスの腫瘍成長曲線を示す図。再チャレンジマウスは、最初は腫瘍キャリアであり、ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ

４０＋抗ＰＤ－Ｌ１で処置した後、腫瘍がなくなった。再チャレンジ後１３日目に、群あたり３匹のマウスを免疫ＰＤ分析のために安楽死させた（データは示さず）。
【図６７】初期ＢＷ±ＳＥＭのパーセンテージとして表される、様々な処置後のＢＷの平均変化を示す図。点線および破線は、処置スキームに応じて、それぞれ^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよび免疫療法投与を示す。
【発明を実施するための形態】
【００３３】
Ｉ．定義
本明細書の目的では、「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（ＶＨ）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでもよく、またはそれはアミノ酸配列の変化を含んでもよい。いくつかの態様では、アミノ酸変化の数は、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、または２以下である。いくつかの態様では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。
【００３４】
「親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有相互作用の総和の強度を指す。特に断りのない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、一般に、解離定数（K_D）によって表され得る。親和性は、本明細書に記載のものを含む、当技術分野で公知の一般的な方法により測定され得る。結合親和性を測定するための具体的な実例となる例示的な方法を以下に記載する。
【００３５】
「親和性成熟」抗体とは、１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）において１つ以上の改変を有する抗体を指し、そのような改変を有しない親抗体と比較して、そのような改変は、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす。
【００３６】
「標的細胞の表面上に発現される抗原に対する結合部位」または「標的抗原に対する結合部位」という用語は、抗体が当該抗原を標的とする際の診断剤および／または治療剤として有用であるように十分な親和性で当該抗原に結合することができる結合部位を指す。標的抗原に対する結合部位を含む抗体は、十分な親和性で標的抗原に結合する任意の結合部分を含み得る。いくつかの実施形態では、抗原結合部分は、抗体断片（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖまたはｓｃＦａｂ）；または単一ドメイン抗体（ｄＡｂ）、例えばＶＨＨ）であり得る。他の実施形態では、それは、タンパク質結合足場、例えば、ＤＡＲＰｉｎ（設計されたアンキリンリピートタンパク質）；アフィボディ；Ｓｓｏ７ｄ；モノボディまたはアンチカリンであり得る。
【００３７】
一態様では、無関係な非抗原タンパク質への抗体の結合の程度は、例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定された場合に、抗原への抗体の結合の約１０％未満である。特定の態様では、標的細胞の表面上に発現される抗原に結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（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。抗体は、K_Dが１μＭ以下であれば、標的細胞の表面上に発現される抗原に「特異的に結合する」と言われる。特定の態様では、抗体は、異なる種からの当該抗原間で保存されている当該抗原のエピトープに結合する。

【００３８】
「放射性標識化合物に対する抗原結合部位」または「放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位」という用語は、抗体が放射性標識化合物を抗体と会合させるための診断剤および／または治療剤として有用であるように十分な親和性で放射性標識化合物に結合することができる抗原結合部位を指す。放射性標識化合物に対する抗原結合部位は、好ましくは、ＶＨおよびＶＬドメインを含む。一態様では、無関係な非抗原化合物への抗原結合部位の結合の程度は、例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって測定された場合に、放射性標識化合物への抗体の結合の約１０％未満である。特定の態様では、放射性標識化合物に結合する抗原結合部位は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭまたは≦０．００１ｎＭ（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。１００ｐＭ、５０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭ以下、例えば、０．９ｐＭ以下、０．８ｐＭ以下、０．７ｐＭ以下、０．６ｐＭ以下または０．５ｐＭ以下のK_Dを有することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭまたは５００ｐＭ～１ｎＭのK_Dで放射性標識化合物に結合し得る。抗原結合部位は、抗原結合部位が１μＭ以下のK_Dを有する場合、放射性標識化合物に「特異的に結合する」と言われる。

【００３９】
本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含むがこれらに限定されない、様々な抗体構造を包含する。

【００４０】
「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部分を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖおよびｓｃＦａｂ）；単一ドメイン抗体（ｄＡｂ）；および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。特定の抗体断片の総説については、Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ａｎｄ Ｈｕｄｓｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２３：１１２６－１１３６（２００５）を参照されたい。「Ｆａｂ断片」という用語は、免疫グロブリンの重鎖のＶＨおよびＣＨ１ドメインと、軽鎖のＶＬおよびＣＬドメインとからなるタンパク質を指す。「Ｆａｂ’断片」は、抗体ヒンジ領域からの１つ以上のシステインを含むＣＨ１ドメインのカルボキシ末端の残基の付加によって、Ｆａｂ断片とは異なる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、ｉｎ ｖｉｖｏ半減期が長くなったＦａｂおよびＦ（ａｂ’）$_2$断片の説明については、米国特許第５，８６９，０４６号を参照されたい。

【００４１】
本明細書で使用される場合、「Ｆａｂ断片」への言及は、ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片またはｓｃＦａｂならびに従来のＦａｂ断片（すなわち、ＶＬドメインおよびＣＬドメインを含む軽鎖と、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む重鎖断片とを含むもの）を含むことを意図している。

【００４２】
「ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片」または「ｘＦａｂ断片」または「クロスオーバーＦａｂ断片」という用語は、重鎖および軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されたＦａｂ断片を指す。ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片は、軽鎖可変領域（ＶＬ）および重鎖定常領域１（ＣＨ１）から構成されるポリペプチド鎖と、重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）から構成されるポリペプチド鎖とを含む。明確性のために、Ｆａｂ軽鎖およびＦａｂ重鎖の可変領域が交換されたクロスオーバーＦａｂ分子において、重鎖定常領域を含むペプチド鎖は、本明細書ではクロスオーバーＦａｂ分子の「重鎖」と呼ばれる。逆に

、Ｆａｂ軽鎖およびＦａｂ重鎖の定常領域が交換されたクロスオーバーＦａｂ分子において、重鎖可変領域を含むペプチド鎖は、本明細書ではクロスオーバーＦａｂ分子の「重鎖」と呼ばれる。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「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。一本鎖Ｆａｂ分子は、Ｆａｂ軽鎖とＦａｂ重鎖とがペプチドリンカーによって接続されて単一のペプチド鎖を形成しているＦａｂ分子である。このような特定の実施形態では、一本鎖Ｆａｂ分子においてＦａｂ軽鎖のＣ末端がＦａｂ重鎖のＮ末端に接続されている。

【００４４】

非対称Ｆａｂアームはまた、荷電または非荷電アミノ酸変異をドメイン界面に導入して正しいＦａｂペアリングを指示することによって操作され得る。例えば、国際公開第２０１６／１７２４８５号を参照されたい。

【００４５】

「一本鎖可変断片」または「ｓｃＦｖ」は、ペプチドリンカーによって接続された、抗体の重鎖（ＶＨ）および軽鎖（ＶＬ）の可変ドメインの融合タンパク質である。特に、リンカーは１０～２５個のアミノ酸の短いポリペプチドであり、通常、柔軟性のためにグリシンが豊富であり、溶解性のためにセリンまたはトレオニンが豊富であり、ＶＨのＮ末端をＶＬのＣ末端に接続することも、その逆も可能である。このタンパク質は、定常領域が取り除かれ、リンカーが導入されているにもかかわらず、元の抗体の特異性を保持している。ｓｃＦｖ断片の総説については、例えば、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。また、国際公開第９３／１６１８５号ならびに米国特許第５，５７１，８９４号および同第５，５８７，４５８号を参照されたい。

【００４６】

スプリット抗体とは、抗原に対する結合部位が２つの部分、例えば２つの個々の抗体分子の間で分割されている抗体を指す。２つの部分は、「ヘミボディ」または「デミボディ」と呼ばれ得る。２つの部分が会合すると、抗原に対する機能的結合部位が形成される。本発明において、各ヘミボディは、標的細胞の表面上の抗原に対する抗原結合部分と、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨまたはＶＬのいずれかとを含む。２つのヘミボディが同じまたは隣接する標的細胞に結合すると、ＶＨとＶＬとの間に安定な会合が形成され得、したがって放射性標識化合物に対する機能的結合部位が形成され得る。「ＣＥＡ標的ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」は、ＣＥＡを標的とするスプリット抗体を指す。「ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」という用語はまた、「ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ」という用語と互換的に使用され得る。「ＣＥＡ標的ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」という用語は、「ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ」という用語と互換的に使用され得る。

【００４７】

「除去剤」という用語は、対象の循環からの抗体のクリアランス速度を増加させる、および／またはエフェクター分子、特に放射性標識化合物の、そのエフェクター分子に対する機能的結合部位への結合をブロックする薬剤を指す。一般に、除去剤は抗体に結合し、例えば、抗体に特異的に結合する。それは、エフェクター分子に対する機能的結合部位に結合し得、例えば、当該機能的結合部位に特異的に結合し得る。

【００４８】

本明細書で使用される「除去工程」または「除去段階」という用語は、対象の循環からの抗体のクリアランス速度を増加させる、および／またはエフェクター分子の結合をブロックする薬剤の使用を包含する。いくつかの薬剤は、除去およびブロッキングの両方で機能することができる。

【００４９】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する相手である、タンパク質性または非タンパク質性のいずれかの、抗原上の部位を示す。エピトープは、連続したアミノ酸ストレッチから形成される場合（線状エピトープ）、または、例えば、抗原のフォールディングに起因して、すなわち、タンパク質性抗原の三次フォールディングによって空間的に近接している、非連続のアミノ酸を含む場合（立体構造エピトープ）の両方がある。線状エピトープは、典型的には、タンパク質性抗原を変性剤に曝露した後も依然として抗体によって結合されているが、立体構造エピトープは、典型的には、変性剤での処理により破壊される。エピトープは、少なくとも３個、少なくとも４個、少なくとも５個、少なくとも６個、少なくとも７個、または８～１０個のアミノ酸を、独特な空間的コンフォメーションで含む。

【００５０】

特定のエピトープに結合する抗体（すなわち、同じエピトープに結合する抗体）のスクリーニングは、例えば、限定されないが、アラニンスキャニング、ペプチドブロット（Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４８（２００４）４４３－４６３を参照されたい）、ペプチド切断分析、エピトープ切除、エピトープ抽出、抗原の化学修飾（Ｐｒｏｔ．Ｓｃｉ．９（２０００）４８７－４９６を参照されたい）、およびクロスブロッキング（「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」，Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ．，ＮＹを参照されたい）などの、当技術分野で慣用の方法を用いて行われ得る。

【００５１】

修飾支援プロファイリング（ＭＡＰ）としても知られる抗原構造ベースの抗体プロファイリング（ＡＳＡＰ）は、多数のモノクローナル抗体からの各抗体の、化学的または酵素的に修飾された抗原表面への結合プロファイルに基づいて、抗原に特異的に結合するそれらの抗体をｂｉｎに分類することを可能にする（例えば、米国特許出願公開第２００４／０１０１９２０号を参照されたい）。各ｂｉｎ内の抗体は同じエピトープに結合するが、このエピトープは、別のｂｉｎで表されるエピトープとは明確に異なるか、または部分的に重複する独特なエピトープであり得る。

【００５２】

また、競合結合は、抗体が参照抗体と同じエピトープに結合するか、または参照抗体との結合について競合するかどうかを容易に決定するために使用され得る。例えば、参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体のその抗原に対する結合を５０％以上ブロックする抗体を指し、逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて、抗体のその抗原に対する結合を５０％以上ブロックする。また例えば、抗体が参照抗体と同じエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照抗体を飽和条件下で抗原に結合させる。過剰な参照抗体を除去した後、問題の抗体が抗原に結合する能力を評価する。問題の抗体が参照抗体の飽和結合後に抗原に結合できる場合、問題の抗体は、参照抗体とは異なるエピトープに結合すると結論付けることができる。しかし、問題の抗体が参照抗体の飽和結合後に抗原に結合できない場合、問題の抗体は、参照抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合し得る。問題の抗体が同じエピトープに結合しているのか、または立体的な理由で結合が妨害されているだけなのかを確認するためには、慣用的な実験を用いることができる（例えば、ペプチド変異、およびＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、または当技術分野で利用可能な任意の他の定量的もしくは定性的な抗体結合アッセイを用いた結合分析）。このアッセイは、２つの設定で、すなわち、両方の抗体が飽和抗体である状態で実施されるべきである。両方の設定において、第１の（飽和）抗体のみが抗原に結合することができる場合、問題の抗体と参照抗体は、抗原への結合をめぐって競合すると結論付けることができる。

【００５３】

いくつかの態様では、２つの抗体は、１、５、１０、２０または１００倍過剰の一方の抗体が、競合結合アッセイにおける測定で、他方の結合を少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも９０％、またはさらには９９％以上阻害する場合、同じまたは重複す

るエピトープに結合するとみなされる（例えば、Ｊｕｎｇｈａｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５０（１９９０）１４９５－１５０２を参照されたい）。

【００５４】

いくつかの態様では、２つの抗体は、一方の抗体の結合を低下させるまたは排除する抗原の本質的に全てのアミノ酸変異が、他方の抗体の結合も低下させるか、または排除する場合、同じエピトープに結合するとみなされる。２つの抗体は、一方の抗体の結合を低下させるまたは排除するアミノ酸変異のサブセットのみが、他方の抗体の結合を低下させるか、または排除する場合、「重複エピトープ」を有するとみなされる。

【００５５】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および／または軽鎖の一部分が特定の源または種に由来し、重鎖および／または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

【００５６】

抗体の「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つの主要なクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、およびIgA_2にさらに分けられ得る。特定の態様では、抗体は、IgG_1アイソタイプのものである。特定の態様では、抗体は、Ｆｃ領域エフェクター機能を低下させるためのＰ３２９Ｇ、Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａ変異を有するIgG_1アイソタイプのものである。他の態様では、抗体は、IgG_2アイソタイプのものである。特定の態様では、抗体は、IgG_4抗体の安定性を改善するためのヒンジ領域にＳ２２８Ｐ変異を有するIgG_4アイソタイプのものである。異なるクラスの免疫グロブリン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。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる２つのタイプのうちの１つに割り当てられ得る。

【００５７】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体のＦｃ領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、Ｃ１ｑ結合および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、Ｆｃ受容体結合、抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ＡＤＣＣ）、食作用、細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）のダウンレギュレーション、ならびにＢ細胞活性化が挙げられる。

【００５８】

薬剤、例えば、医薬組成物の「有効量」は、所望の治療結果または予防結果を達成するために必要な投与量および期間で有効な量を指す。

【００５９】

「タンデムＦａｂ」という用語は、ペプチドリンカー／テザーを介して接続された２つのＦａｂ断片を含む抗体を指す。いくつかの実施形態では、タンデムＦａｂは、ペプチドリンカー／テザーによって接続された１つのＦａｂ断片および１つのｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片を含み得る。

【００６０】

本明細書における「Ｆｃ領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。本明細書における「Ｆｃドメイン」という用語は、第１の定常領域を除く２つの重鎖の定常領域を含む免疫グロブリンのＣ末端領域を定義するために使用される。したがって、Ｆｃは、ＩｇＡ、ＩｇＤおよびＩｇＧの最後の２つの定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにＩｇＥおよびＩｇＭの最後の３つの定常領域免疫グロブリンドメインを指す。この用語は、天然配列Ｆｃ領域および変異体Ｆｃ領域を包含する。一態様では、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６から、またはＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、宿主細胞によって産生される抗体は、重鎖のＣ末端から１つ以上、特に１つまたは２つのアミノ酸の翻訳後切断を受けることがある。したがって、完全長重鎖をコードする特定

の核酸分子の発現によって、宿主細胞によって産生される抗体は、完全長重鎖を含み得るか、または完全長重鎖の開裂した変異体を含み得る。これは、重鎖の最後の２つのＣ末端アミノ酸がグリシン（Ｇ４４６）およびリジン（Ｋ４４７、ナンバリングはＥＵインデックスに従う）である場合であり得る。したがって、Ｆｃ領域のＣ末端リジン（Ｌｙｓ４４７）、またはＣ末端グリシン（Ｇｌｙ４４６）およびリジン（Ｌｙｓ４４７）は、存在することも存在しないこともあり得る。一態様では、本発明による抗体に含まれる、本明細書で明記されるＦｃ領域を含む重鎖は、さらなるＣ末端グリシン－リジンジペプチド（Ｇ４４６およびＫ４４７、ナンバリングはＥＵインデックスに従う）を含む。一態様では、本発明による抗体に含まれる、本明細書で明記されるＦｃ領域を含む重鎖は、さらなるＣ末端グリシン残基（Ｇ４４６、ナンバリングはＥＵインデックスに従う）を含む。本明細書で特に明記されない限り、Ｆｃ領域または定常領域におけるアミノ酸残基のナンバリングは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ，１９９１に記載されている、ＥＵインデックスとも呼ばれるＥＵナンバリングシステムに従う。本明細書で使用されるＦｃドメインの「サブユニット」は、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、二量体Ｆｃドメインを形成する２つのポリペプチドの他方と安定に会合することができ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、ＩｇＧ　Ｆｃドメインのサブユニットは、ＩｇＧ　ＣＨ２およびＩｇＧ　ＣＨ３定常ドメインを含む。

【００６１】

「フレームワーク」または「ＦＲ」は、相補性決定領域（ＣＤＲ）以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、一般に、４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、およびＦＲ４からなる。したがって、ＣＤＲおよびＦＲ配列は、一般に、ＶＨ（またはＶＬ）中で以下の配列：ＦＲ１－ＣＤＲ－Ｈ１（ＣＤＲ－Ｌ１）－ＦＲ２－ＣＤＲ－Ｈ２（ＣＤＲ－Ｌ２）－ＦＲ３－ＣＤＲ－Ｈ３（ＣＤＲ－Ｌ３）－ＦＲ４で現れる。

【００６２】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」および「全抗体」という用語は、本明細書で互換的に使用され、天然抗体構造と実質的に類似した構造を有する抗体、または本明細書で定義されるＦｃ領域を含む重鎖を有する抗体を指す。本明細書で使用される場合、「完全長抗体」という用語は、２つの「完全長抗体重鎖」および２つの「完全長抗体軽鎖」からなる抗体を示す。「完全長抗体重鎖」とは、Ｎ末端からＣ末端への方向に、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、抗体重鎖定常ドメイン１（ＣＨ１）、抗体ヒンジ領域（ＨＲ）、抗体重鎖定常ドメイン２（ＣＨ２）、および抗体重鎖定常ドメイン３（ＣＨ３）（ＶＨ－ＣＨ１－ＨＲ－ＣＨ２－ＣＨ３と略記される）、ならびに任意に、サブクラスＩｇＥの抗体の場合には抗体重鎖定常ドメイン４（ＣＨ４）からなるポリペプチドであり得る。好ましくは、「完全長抗体重鎖」とは、Ｎ末端からＣ末端への方向に、ＶＨ、ＣＨ１、ＨＲ、ＣＨ２およびＣＨ３からなるポリペプチドである。ｃｒｏｓｓ－Ｍａｂ形成の可能性は、「完全長」への言及によって排除されることを意図するものではなく、したがって、重鎖は、ＶＬドメインと交換されたＶＨドメイン、またはＣＬドメインと交換されたＣＨ１ドメインを有し得る。「完全長抗体軽鎖」とは、Ｎ末端からＣ末端への方向に、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）（ＶＬ－ＣＬと略記される）からなるポリペプチドであり得る。あるいは、ｃｒｏｓｓ－Ｍａｂの場合、ＶＬドメインはＶＨドメインと交換され得、またはＣＬドメインはＣＨ１ドメインと交換され得る。抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）は、κ（カッパ）またはγ（ラムダ）であり得る。２つの完全長抗体鎖は、ＣＬドメインとＣＨ１ドメインとの間の、および完全長抗体重鎖のヒンジ領域間のポリペプチド間ジスルフィド結合を介して互いに連結される。典型的な完全長抗体の例は、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ１およびＩｇＧ２）、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥのような天然の抗体である。完全長抗体は、単一の種、例えば、ヒトに由来し得、または完全長抗体は、キメラ化抗体もしくはヒト化抗体であり得る。本明細書に記載の完全

長抗体は、それぞれがＶＨおよびＶＬの対によって形成される２つの抗原結合部位を含み、これらは、いくつかの実施形態では、両方とも同じ抗原に特異的に結合し得るか、または異なる抗原に結合し得る。当該完全長抗体の重鎖または軽鎖のＣ末端は、当該重鎖または軽鎖のＣ末端の最後のアミノ酸を示す。

【００６３】

「融合される」とは、成分が、ペプチド結合によって直接的に、または１つ以上のペプチドリンカーを介して連結されることを意味する。

【００６４】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞には、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これらには、初代形質転換細胞と、継代の数に関係なく、それに由来する子孫とが含まれる。子孫は、核酸の含有量が親細胞と完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択されたのと同じ機能または生物活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。

【００６５】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生された抗体のアミノ酸配列、またはヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト源に由来するアミノ酸配列、または他のヒト抗体をコードする配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【００６６】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンＶＬフレームワーク配列またはＶＨフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を示すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンＶＬ配列またはＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからのものである。一般に、配列のサブグループは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２，Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ（１９９１），ｖｏｌｓ．１－３に記載のサブグループである。一態様では、ＶＬについて、該サブグループは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．前掲書に記載のサブグループカッパＩである。一態様では、ＶＨについて、該サブグループは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．前掲書に記載のサブグループＩＩＩである。

【００６７】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトＣＤＲ由来のアミノ酸残基と、ヒトＦＲ由来のアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。特定の態様では、ヒト化抗体は、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全てを含み、ＣＤＲの全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のＣＤＲに対応し、ＦＲの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のＦＲに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでよい。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化型」とは、ヒト化した抗体を指す。

【００６８】

本明細書で使用される「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、配列が超可変であり、かつ抗原結合特異性を決定する抗体可変ドメインの各領域、例えば「相補性決定領域」（「ＣＤＲ」）を指す。

【００６９】

一般に、抗体は、６つのＣＤＲ：ＶＨに３つ（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、ＶＬに３つ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）を含む。本明細書における例示的なＣＤＲとしては、以下のものが挙げられる：

（ａ）アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、および９６～１０１（Ｈ３）に存在する超可変ループ（Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１

－９１７（１９８７））、
（ｂ）アミノ酸残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、８９～９７（Ｌ３）、３１～３５ｂ（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）、および９５～１０２（Ｈ３）に存在するＣＤＲ（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））、ならびに
（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、および９３～１０１（Ｈ３）に存在する抗原接触部位（ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６））。

【００７０】
特に断りのない限り、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．前掲書に従って決定される。当業者であれば、ＣＤＲの呼称はまた、Ｃｈｏｔｈｉａ前掲書、ＭｃＣａｌｌｕｍ前掲書、または任意の他の科学的に認められた命名法に従って決定され得ることを理解するであろう。上記の代わりに、本明細書に記載のＣＤＲ－Ｈ１の配列は、例えば、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ結合可変ドメインについて、Ｋａｂａｔ２６からＫａｂａｔ３５まで及び得る。

【００７１】
一態様では、ＣＤＲ残基は、配列表または本明細書の他の箇所で同定されたものを含む。

【００７２】
特に断りのない限り、可変ドメイン内のＨＶＲ／ＣＤＲ残基および他の残基（例えば、ＦＲ残基）は、本明細書ではＫａｂａｔ ｅｔ ａｌ．前掲書に従ってナンバリングされる。

【００７３】
「イムノコンジュゲート」とは、細胞傷害性剤を含むがそれに限定されない、１つ以上の異種分子にコンジュゲートされた抗体である。

【００７４】
「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒトおよび非ヒト霊長類、例えば、サル）、ウサギ、およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）が含まれるが、これらに限定されない。特定の態様では、個体または対象は、ヒトである。

【００７５】
本明細書に記載の分子は、「単離され」得る。「単離」抗体は、その天然環境の成分から分離されたものである。いくつかの態様では、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点電気泳動（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換または逆相ＨＰＬＣ）法によって決定される場合、純度が９５％または９９％より高くなるまで精製される。抗体純度の評価のための方法の総説については、例えば、Ｆｌａｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ ８４８：７９－８７（２００７）を参照されたい。

【００７６】
「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物および／または物質を含む。各ヌクレオチドは、塩基で構成され、具体的には、プリン塩基またはピリミジン塩基（すなわち、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、アデニン（Ａ）、チミン（Ｔ）またはウラシル（Ｕ））、糖（すなわち、デオキシリボースまたはリボース）、およびリン酸基から構成される。多くの場合、核酸分子は塩基の配列によって記述され、当該塩基は核酸分子の一次構造（線状構造）を表す。塩基の配列は、典型的には、５’から３’に向かって表される。本明細書において、核酸分子という用語は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、例えば、相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）およびゲノムＤＮＡ、リボ核酸（ＲＮＡ）、特に、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＤＮＡまたはＲＮ

Ａの合成形態、および２つ以上のこれらの分子を含む混合ポリマーを包含する。核酸分子は、線状または環状であり得る。これに加え、核酸分子という用語は、センス鎖およびアンチセンス鎖、ならびに一本鎖形態および二本鎖形態の両方を含む。さらに、本明細書に記載の核酸分子は、天然に存在するヌクレオチドまたは天然に存在しないヌクレオチドを含むことができる。天然に存在しないヌクレオチドの例としては、誘導体化された糖またはリン酸骨格結合または化学的に修飾された残基を有する修飾ヌクレオチド塩基が挙げられる。核酸分子はまた、例えば、宿主または患者において、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｖｏで本発明の抗体の直接的な発現のためのベクターとして好適なＤＮＡ分子およびＲＮＡ分子を包含する。そのようなＤＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ）またはＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ベクターは、非修飾であり得るか、または修飾され得る。例えば、ｍＲＮＡは、ｉｎ　ｖｉｖｏで抗体を産生するために対象にｍＲＮＡを注入することができるように、ＲＮＡベクターの安定性および／またはコードされた分子の発現を高めるように化学的に修飾され得る（例えば、Ｓｔａｄｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２０１７，ｐｕｂｌｉｓｈｅｄ　ｏｎｌｉｎｅ　１２　Ｊｕｎｅ　２０１７，ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｍ．４３５６または欧州特許第２１０１８２３（Ｂ１）号を参照されたい）。

【００７７】

「単離された」核酸は、その天然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸には、通常核酸分子を含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、核酸分子は、染色体外、またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【００７８】

「抗体をコードする単離核酸」は、抗体重鎖および軽鎖（またはその断片）をコードする１つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター内のそのような核酸分子（複数可）を含み、そのような核酸分子（複数可）は、宿主細胞内の１つ以上の位置に存在する。

【００７９】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、該集団を構成する個々の抗体が、あり得る変異体抗体（これらは例えば天然に存在する変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製物の製造中に生じ、通常少量存在する）を除き、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の製造を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本発明によるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むがこれらに限定されない様々な技術によって製造され得、このような方法およびモノクローナル抗体を製造するためのその他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

【００８０】

「ネイキッド抗体」とは、異種の部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、医薬組成物中に存在してもよい。

【００８１】

「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合している２つの同一の軽鎖および２つの同一の重鎖から構成される約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端にかけて、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変領域とも呼ばれる可変ドメイン（ＶＨ）と、それに続く３つの定常重鎖ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２およびＣＨ３）とを有する。同様に、Ｎ末端からＣ末端にかけて、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまた

は軽鎖可変領域とも呼ばれる可変ドメイン（ＶＬ）と、それに続く定常軽鎖（ＣＬ）ドメインとを有する。

【００８２】

「添付文書」という用語は、治療用製品の市販パッケージに通例含まれる説明書であって、そのような治療用製品の使用に関する適応症、用法、用量、投与、併用療法、禁忌および／または警告についての情報を含む説明書を指すために使用される。

【００８３】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」とは、配列をアラインメントし、最大の配列同一性パーセントを達成するために必要ならばギャップを導入した後の、アラインメントのためにいかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しない場合の、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当分野の技術の範囲内にある様々な方法で、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗ、Ｍｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアまたはＦＡＳＴＡプログラムパッケージなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成され得る。当業者であれば、比較される配列の完全長にわたる最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。あるいは、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を用いて、同一性パーセント値を生成することもできる。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．によって作成されたものであり、そのソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権局（ワシントンＤ．Ｃ．，２０５５９）に提出されており、そこで米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７として登録されており、かつ国際公開第２００１／００７６１１号に記載されている。

【００８４】

特に断りのない限り、本明細書の目的のために、アミノ酸配列同一性パーセント値は、ＢＬＯＳＵＭ５０比較行列と共にバージョン３６．３．８ｃ以降のＦＡＳＴＡパッケージのｇｇｓｅａｒｃｈプログラムを用いて生成される。ＦＡＳＴＡプログラムパッケージは、Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ ａｎｄ Ｄ．Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９８８），「Ｉｍｐｒｏｖｅｄ Ｔｏｏｌｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ」，ＰＮＡＳ ８５：２４４４－２４４８、Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ（１９９６）「Ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ」Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６：２２７－２５８、およびＰｅａｒｓｏｎ ｅｔ．ａｌ．（１９９７）Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ４６：２４－３６によって作成されたものであり、ｗｗｗ．ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｉｒｇｉｎｉａ．ｅｄｕ／ｆａｓｔａ＿ｗｗｗ２／ｆａｓｔａ＿ｄｏｗｎ．ｓｈｔｍｌまたはｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｓｓｓ／ｆａｓｔａから公的に入手可能である。あるいは、ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｉｒｇｉｎｉａ．ｅｄｕ／ｆａｓｔａ＿ｗｗｗ２／ｉｎｄｅｘ．ｃｇｉでアクセス可能な公的なサーバを使用して、ｇｇｓｅａｒｃｈ（ｇｌｏｂａｌ ｐｒｏｔｅｉｎ：ｐｒｏｔｅｉｎ）プログラムおよびデフォルトオプション（ＢＬＯＳＵＭ５０；オープン：－１０；ｅｘｔ：－２；Ｋｔｕｐ＝２）を用い、ローカルではなくグローバルのアラインメントを確実に行い、配列を比較することができる。アミノ酸同一性パーセントは、出力アラインメントヘッダに示される。

【００８５】

「医薬組成物」または「医薬製剤」という用語は、調製物に含まれる有効成分の生物活性が有効になるような形態をしており、また医薬組成物が投与されるであろう対象に対して容認できないほど毒性のある追加の成分を含まない、調製物を指す。

【００８６】

「薬学的に許容され得る担体」とは、医薬組成物または製剤中の有効成分以外の成分を指し、これは対象にとって非毒性である。薬学的に許容され得る担体には、限定されない

が、緩衝液、賦形剤、安定剤または保存剤が含まれる。

【００８７】

本明細書で使用される標的抗原への言及は、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源からの任意の天然標的抗原を指す。この用語は、「完全長」のプロセシングされていない標的抗原、ならびに細胞内でのプロセシングから生じる任意の形態の標的抗原を包含する。この用語は、標的抗原の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体または対立遺伝子変異体も包含する。例えば、標的抗原ＣＥＡは、ヒトＣＥＡ、特にＵｎｉＰｒｏｔ（ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ）アクセッション番号Ｐ０６７３１（バージョン１１９）、またはＮＣＢＩ（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）ＲｅｆＳｅｑ　ＮＰ＿００４３５４．２に示される癌胎児性抗原関連細胞接着分子５（ＣＥＡＣＡＭ５）のアミノ酸配列を有し得る。

【００８８】

本明細書で使用される場合、「処置（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ）」（およびその文法的な変化形、例えば、「処置する（ｔｒｅａｔ）」または「処置すること（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」）は、処置される個体において疾患の本来の経過を変える試行における臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の経過の間に行われ得る。処置の所望の効果としては、疾患の発症または再発を予防すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減弱、転移を予防すること、疾患進行率を低下させること、病状の寛解または緩和、および回復または予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの態様では、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるために、または疾患の進行を遅らせるために使用される。

【００８９】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨおよびＶＬ）は、一般に類似の構造を有し、各ドメインが４つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）とを含む。（例えば、Ｋｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｋｕｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６th ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．，９１頁（２００７）を参照されたい）。抗原結合特異性を付与するには、単一のＶＨドメインまたはＶＬドメインで十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体のＶＨドメインまたはＶＬドメインを用いて単離し、相補的なＶＬドメインまたはＶＨドメインそれぞれのライブラリをスクリーニングしてもよい。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）、Ｃｌａｒｋｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【００９０】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、自身が連結されている別の核酸を伝播することができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造体としてのベクター、およびそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある種のベクターは、それが作動可能に連結されている核酸の発現を誘導することができる。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

【００９１】

本明細書で使用される「Ｐｂ」または「鉛」という用語は、そのイオン、例えばＰｂ（ＩＩ）を含む。他の金属への言及には、そのイオンも含まれる。したがって、当業者は、例えば、鉛、Ｐｂ、^{212}ＰｂまたはＰｂ^{203}という用語が元素のイオン形態、特にＰｂ（ＩＩ）を包含することを意図していることを理解する。

【００９２】

ＩＩ．組成物および方法

Ａ．放射性標識化合物

本発明によれば、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体は、エフェクター分

子に対する結合部位を含む。（第１のヘミボディおよび第２のヘミボディから形成されたスプリット多重特異性抗体では、第１のヘミボディは、エフェクター分子に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含み、第２のヘミボディは、エフェクター分子に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含み、機能的結合部位は、２つのヘミボディが会合したときに形成される）。

【００９３】

本発明によるエフェクター分子は、放射性同位体を含む放射性標識化合物であり、例えば、放射性標識ハプテンである。

【００９４】

いくつかの実施形態では、エフェクター分子は、キレート化放射性同位体を含み得る。

【００９５】

いくつかの実施形態では、エフェクター分子に対する機能的結合部位は、キレート剤および放射性同位体を含むキレートに結合し得る。他の実施形態では、抗体は、キレート化放射性同位体にコンジュゲートされた部分、例えば、ヒスタミン－スクシニル－グリシン（ＨＳＧ）、ジゴキシゲニン、ビオチンまたはカフェインに結合し得る。

【００９６】

キレート剤は、例えば、アミノポリカルボン酸もしくはアミノポリチオカルボン酸などの多座分子、またはその塩もしくは機能的変異体であり得る。キレート剤は、例えば、二座または三座または四座であり得る。好適な金属キレート剤の例としては、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸、またはＣａＮａ$_2$ＥＤＴＡなどの塩形態）、ＤＴＰＡ（ジエチレントリアミン五酢酸）、ＤＯＴＡ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸）、ＮＯＴＡ（２，２’，２’’－（１，４，７－トリアザノナン－１，４，７－トリイル）三酢酸）、ＩＤＡ（イミノ二酢酸）、ＭＩＤＡ（（メチルイミノ）二酢酸）、ＴＴＨＡ（３，６，９，１２－テトラキス（カルボキシメチル）－３，６，９，１２－テトラ－アザテトラデカン二酸）、ＴＥＴＡ（２，２’，２’’，２’’’－（１，４，８，１１－テトラアザシクロテトラデカン－１，４，８，１１－テトライル）四酢酸）、ＤＯＴＡＭ（１，４，７，１０－テトラキス（カルバモイルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン）、ＨＥＨＡ（１，４，７，１０，１３，１６－ヘキサアザシクロヘキサデカン－１，４，７，１０，１３，１６－六酢酸、テキサス州プレイノのＭａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ，Ｉｎｃ．から入手可能）、ＮＴＡ（ニトリロ三酢酸）、ＥＤＤＨＡ（エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ’－ビス（２－ヒドロキシフェニル酢酸）、ＢＡＬ（２，３，－ジメルカプトプロパノール）、ＤＭＳＡ（２，３－ジメルカプトコハク酸）、ＤＭＰＳ（２，３－ジメルカプト－１－プロパンスルホン酸）、Ｄ－ペニシラミン（Ｂ－ジメチルシステイン）、ＭＡＧ$_3$（メルカプトアセチルトリグリシン）、Ｈｙｎｉｃ（６－ヒドラジノピリジン－３－カルボン酸）、ｐ－イソチオシアナトベンジル－デスフェリオキサミン（例えば、イメージングのためジルコニウムで標識された）、および金属をキレート化することができるその塩または機能的変異体／誘導体を含む分子が挙げられる。いくつかの実施形態では、キレート剤は、ＤＯＴＡもしくはＤＯＴＡＭ、または金属をキレート化することができるその塩もしくは機能的変異体／誘導体であることが好ましい場合がある。したがって、キレート剤は、放射性同位体がキレート化されたＤＯＴＡもしくはＤＯＴＡＭであってもよく、またはＤＯＴＡもしくはＤＯＴＡＭを含んでもよい。

【００９７】

放射性標識化合物は、放射性核種と一緒になって、上記のキレート剤の機能的変異体または誘導体を含み得るか、またはそれらからなり得る。好適な変異体／誘導体は、ある程度異なっている構造を有し、かつキレート剤として機能する能力を保持する（すなわち、本明細書に記載の１つ以上の目的のために使用されるのに十分な活性を保持する）。機能的変異体／誘導体はまた、小分子、ポリペプチドまたは炭水化物を含む１つ以上の追加の部分または置換基にコンジュゲートされた上記のキレート剤を含み得る。この結合は、１つの構成炭素を介して、例えばキレート剤の骨格部分で起こり得る。好適な置換基は、例えば、アルキル、アルケニル、アリールまたはアルキニルなどの炭化水素基；ヒドロキシ

基；アルコール基；ハロゲン原子；ニトロ基；シアノ基；スルホニル基；チオール基；アミン基；オキソ基；カルボキシ基；チオカルボキシ基；カルボニル基；アミド基；エステル基；またはヘテロアリール基を含む複素環であり得る。置換基は、例えば、以下の基「R^1」について定義されるもののうちの１つであり得る。小分子は、例えば、色素（Ａｌｅｘａ６４７またはＡｌｅｘａ４８８など）、ビオチンもしくはビオチン部分、またはフェニルもしくはベンジル部分であり得る。ポリペプチドは、例えばオリゴペプチド、例えば２または３アミノ酸のオリゴペプチドであり得る。例示的な炭水化物としては、デキストラン、直鎖もしくは分岐ポリマーまたはコポリマー（例えば、ポリアルキレン、ポリ（エチレン－リジン）、ポリメタクリレート、ポリアミノ酸、多糖またはオリゴ糖、デンドリマー）が挙げられる。誘導体はまた、上記の化合物がリンカー部分を介して連結されているキレート剤化合物の多量体を含み得る。誘導体はまた、金属イオンをキレート化する能力を保持する上記化合物の機能的断片を含み得る。

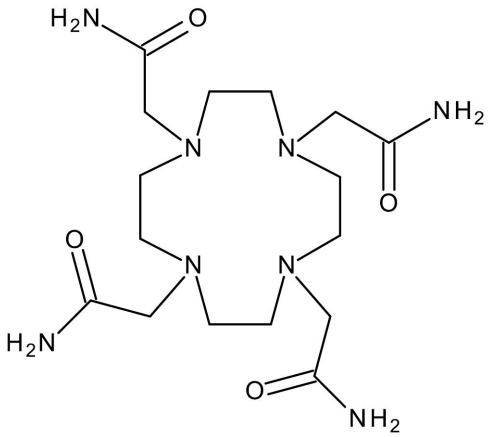
【００９８】

誘導体の特定の例としては、ベンジル－ＥＤＴＡおよびヒドロキシエチル－チオウリド－ベンジルＥＤＴＡ、ＤＯＴＡ－ベンゼン（例えば、（Ｓ－２－（４－アミノベンジル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン四酢酸）、ＤＯＴＡ－ビオチン、ならびにＤＯＴＡ－ＴｙｒＬｙｓ－ＤＯＴＡが挙げられる。

本発明のいくつかの実施形態では、放射性リガンドに対する機能的結合部位は、ＤＯＴＡＭと金属、例えば鉛（Ｐｂ）とを含む金属キレートに結合する。上述のように、「ＤＯＴＡＭ」は、化学名：

１，４，７，１０－テトラキス（カルバモイルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカンを有し、

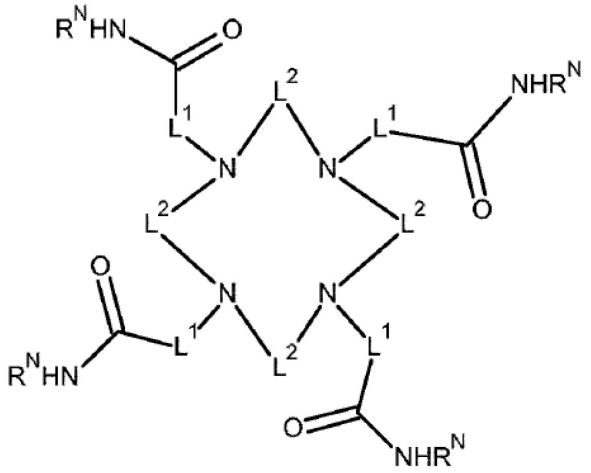
下記式の化合物：



である。

【００９９】

本発明は、特定の態様および実施形態では、金属イオンを組み込んだＤＯＴＡＭの機能的変異体または誘導体も利用し得る。ＤＯＴＡＭの好適な変異体／誘導体は、ＤＯＴＡＭの構造とある程度異なっている構造を有し、かつ機能する能力を保持する（すなわち、本明細書に記載の１つ以上の目的のために使用されるのに十分な活性を保持する）。そのような態様および実施形態では、ＤＯＴＡＭまたはＤＯＴＡＭの機能的変異体／誘導体は、国際公開第２０１０／０９９５３６号に開示されている活性変異体の１つであり得る。好適な機能的変異体／誘導体は、下記式：



（式中、
R^Nは、H、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}－アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、およびC_{1-7}ヘテロアリール－C_{1-4}－アルキルであり、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、およびC_{2-6}アルキニルはそれぞれ、1、2、3、または4個の独立して選択されるR^W基で任意に置換され、当該C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}－アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、およびC_{1-7}ヘテロアリール－C_{1-4}－アルキルはそれぞれ、1、2、3、または4個の独立して選択されるR^X基で任意に置換され、
L^1は、独立して、C_{1-6}アルキレン、C_{1-6}アルケニレン、またはC_{1-6}アルキニレンであり、これらの各々は、独立して選択される1、2、または3個のR^1基で任意に置換され、
L^2は、C_{2-4}直鎖アルキレンであり、これは、独立して選択されるR^1基で任意に置換され、C_{1-4}アルキルおよび／またはC_{1-4}ハロアルキルから独立して選択される1、2、3、または4個の基で任意に置換され、
R^1は、$D^1-D^2-D^3$、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、C_{1-6}アルコキシ、C_{1-6}ハロアルコキシ、C_{1-6}アルキルチオ、C_{1-6}アルキルスルフィニル、C_{1-6}アルキルスルホニル、アミノ、C_{1-6}アルキルアミノ、ジ－C_{1-6}アルキルアミノ、C_{1-4}アルキルカルボニル、カルボキシ、C_{1-6}アルコキシカルボニル、C_{1-6}アルキルカルボニルアミノ、ジ－C_{1-6}アルキルカルボニルアミノ、C_{1-6}アルコキシカルボニルアミノ、C_{1-6}アルコキシカルボニル－（C_{1-6}アルキル）アミノ、カルバミル、C_{1-6}アルキルカルバミル、およびジ－C_{1-6}アルキルカルバミルから独立して選択され、
各D^1は、C_{6-10}アリール－C_{1-4}アルキル、C_{1-9}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキル、C_{3-10}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-9}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{1-8}アルキレン、C_{1-8}アルケニレン、およびC_{1-8}アルキニレンから独立して選択され、当該C_{1-8}アルキレン、C_{1-8}アルケニレン、およびC_{1-8}アルキニレンは、1、2、3、または4個の独立して選択されるR^4基で任意に置換され、当該C_{6-10}アリール－C_{1-4}アルキル、C_{1-9}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキル、C_{3-10}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-9}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキルはそれぞれ、1、2、3、または4個の独立して選択されるR^5基で任意に置換され、

各D^2は、独立して、存在しないか、またはC_{1-20}直鎖アルキレンであり、当該C_{1-20}直鎖アルキレンの１～６個の隣接－しないメチレン基はそれぞれ、独立して選択される－D^4－部分で任意に置き換えられ、ただし、当該C_{1-20}直鎖アルキレン中の少なくとも１つのメチレン単位は、－D^4－部分で任意に置き換えられず、当該C_{1-20}直鎖アルキレンは、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、C_{1-4}アルキル、C_{1-4}ハロアルキル、C_{1-4}アルコキシ、C_{1-4}ハロアルコキシ、アミノ、C_{1-4}アルキルアミノ、ジ－C_{1-4}アルキルアミノ、C_{1-4}アルキルカルボニル、カルボキシ、C_{1-4}アルコキシカルボニル、C_{1-4}アルキルカルボニルアミノ、ジ－C_{1-4}アルキルカルボニルアミノ、C_{1-4}アルコキシカルボニルアミノ、C_{1-4}アルコキシカルボニル－（C_{1-4}アルキル）アミノ、カルバミル、C_{1-4}アルキルカルバミル、およびジ－C_{1-4}アルキルカルバミルから独立して選択される１つ以上の基で任意に置換され、

各D^3は、Ｈ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-14}シクロアルキル、C_{3-14}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-14}ヘテロシクロアルキル、C_{2-14}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{6-14}アリール、C_{6-14}アリール－C_{1-4}アルキル、C_{1-13}ヘテロアリール、C_{1-13}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキルから独立して選択され、当該C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニルはそれぞれ、１、２、３、または４個の独立して選択されるR^6基で任意に置換され、当該C_{3-14}シクロアルキル、C_{3-14}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-14}ヘテロシクロアルキル、C_{2-14}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{6-14}アリール、C_{6-14}アリール－C_{1-4}アルキル、C_{1-13}ヘテロアリール、C_{1-13}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキルはそれぞれ、１、２、３または４個の独立して選択されるR^7基で任意に置換され、

各D^4は、－Ｏ－、－Ｓ－、－NR^aC（＝Ｏ）－、－NR^aC（＝Ｓ）－、－NR^bC（＝Ｏ）NR^c－、－NR^bC（＝Ｓ）NR^c－、－Ｓ（＝Ｏ）－、－Ｓ（＝Ｏ）$_2$－、－Ｓ（＝Ｏ）NR^a－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｓ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（＝Ｏ）NR^a－、－ＯＣ（＝Ｓ）NR^a－、－NR^a－、－NR^bS（＝Ｏ）NR^c－、およびNR^bS（＝Ｏ）$_2NR^O$－から独立して選択され、

各R^4およびR^6は、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、C_{1-4}アルコキシ、C_{1-4}ハロアルコキシ、C_{1-4}アルキルチオ、C_{1-4}アルキルスルフィニル、C_{1-4}アルキルスルホニル、アミノ、C_{1-4}アルキルアミノ、ジ－C_{1-4}アルキルアミノ、C_{1-4}アルキルカルボニル、カルボキシ、C_{1-4}アルコキシカルボニル、C_{1-4}アルキルカルボニルアミノ、ジ－C_{1-4}アルキルカルボニルアミノ、C_{1-4}アルコキシカルボニルアミノ、C_{1-4}アルコキシカルボニル－（C_{1-4}アルキル）アミノ、カルバミル、C_{1-4}アルキルカルバミル、およびジ－C_{1-4}アルキルカルバミルから独立して選択され、

各R^5は、ハロゲン、シアノ、シアネート、イソチオシアネート、ニトロ、ヒドロキシル、C_{1-4}アルキル、C_{2-4}アルケニル、C_{2-4}アルキニル、C_{1-4}アルコキシ、C_{1-4}ハロアルコキシ、C_{1-4}アルキルチオ、C_{1-4}アルキルスルフィニル、C_{1-4}アルキルスルホニル、アミノ、C_{1-4}アルキルアミノ、ジ－C_{1-4}アルキルアミノ、C_{1-4}アルキルカルボニル、カルボキシ、C_{1-4}アルコキシカルボニル、C_{1-4}アルキルカルボニルアミノ、ジ－C_{1-4}アルキルカルボニルアミノ、C_{1-4}アルコキシカルボニルアミノ、C_{1-4}アルコキシカルボニル－（C_{1-4}アルキル）アミノ、カルバミル、C_{1-4}アルキルカルバミル、およびジ－C_{1-4}アルキルカルバミルから独立して選択され、

各R^7は、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、C_{1-7}ヘ

テロアリール－C_{1-4}アルキル、－OR^{O}、－SR^{O}、－S（＝O）R^{P}、－S（＝O）$_2R^{P}$、－S（＝O）$NR^{s}R^{t}$、－C（＝O）R^{P}、－C（＝O）OR^{P}、－C（＝O）$NR^{s}R^{t}$、－OC（＝O）R^{P}、－OC（＝O）$NR^{s}R^{t}$、－$NR^{s}R^{t}$、－$NR^{q}C$（＝O）R^{r}、－$NR^{q}C$（＝O）OR^{r}、－$NR^{q}C$（＝O）NR^{r}、－$NR^{q}S$（＝O）$_2R^{r}$、および－$NR^{P}S$（＝O）$_2NR^{s}R^{t}$から独立して選択され、当該C_{1-6}アルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニルはそれぞれ、１、２、３、または４個の独立して選択されるR’基で任意に置換され、当該C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、C_{1-7}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキルはそれぞれ、１、２、３、または４個の独立して選択されるR’’基で任意に置換され、

各R^{a}、R^{b}、およびR^{c}は、H、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、C_{1-7}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキルから独立して選択され、当該C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニルはそれぞれ、１、２、３、または４個の独立して選択されるR^{w}基で任意に置換され、当該C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、C_{1-7}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキルはそれぞれ、１、２、３、または４個の独立して選択されるR^{x}基で任意に置換され、

各R^{o}、R^{p}、R^{q}、R^{r}、R^{s}およびR^{t}は、H、C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニル、C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、C_{1-7}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキルから独立して選択され、当該C_{1-6}アルキル、C_{1-6}ハロアルキル、C_{2-6}アルケニル、C_{2-6}アルキニルはそれぞれ、１、２、３、または４個の独立して選択されるR^{y}基で任意に置換され、当該C_{3-7}シクロアルキル、C_{3-7}シクロアルキル－C_{1-4}アルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル、C_{2-7}ヘテロシクロアルキル－C_{1-4}アルキル、フェニル、フェニル－C_{1-4}アルキル、C_{1-7}ヘテロアリール、C_{1-7}ヘテロアリール－C_{1-4}アルキルはそれぞれ、１、２、３、または４個の独立して選択されるR^{z}基で任意に置換され、

各R’、R^{w}およびR^{y}は、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、C_{1-4}アルコキシ、C_{1-4}ハロアルコキシ、アミノ、C_{1-4}アルキルアミノ、およびジ－C_{1-4}アルキルアミノから独立して選択され、

各R’’、^{x}R、およびR^{z}は、ヒドロキシル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、C_{1-4}アルキル、C_{1-4}ハロアルキル、C_{1-4}アルコキシ、C_{1-4}ハロアルコキシ、アミノ、C_{1-4}アルキルアミノ、およびジ－C_{1-4}アルキルアミノから独立して選択され、

ただし、任意に置換される部分の各原子の原子価を超えないことを条件とする）の化合物、またはその薬学的に許容され得る塩であり得る。

【０１００】

好適には、上記式の機能的変異体／誘導体は、ＤＯＴＡＭのものと同等またはそれを超える本発明の抗体に対する親和性を有し、ＤＯＴＡＭのものと同等またはそれを超えるＰｂに対する結合強度を有する（「親和性」は、上記の解離定数によって測定されるものである）。例えば、機能的変異体／誘導体と本発明の抗体またはＰｂとの解離定数は、同じ抗体／ＰｂとのＤＯＴＡＭの解離定数の１．１倍以下、１．２倍以下、１．３倍以下、１．４倍以下、１．５倍以下、または２倍以下であり得る。

【０１０１】

各R^{N}は、H、C_{1-6}アルキル、またはC_{1-6}ハロアルキルであり得、好ましくは

、Ｈ、Ｃ$_{1-4}$アルキル、またはＣ$_{1-4}$ハロアルキルであり得る。最も好ましくは、各Ｒ^{N}はＨである。

【０１０２】

ＤＯＴＡＭ変異体の場合、１、２、３または最も好ましくは、各Ｌ^{2}は、Ｃ$_{2}$アルキレンであることが好ましい。有利には、ＤＯＴＡＭのＣ$_{2}$アルキレン変異体は、Ｐｂに対して特に高い親和性を有することができる。Ｌ^{2}の任意の置換基は、Ｒ^{1}、Ｃ$_{1-4}$アルキル、またはＣ$_{1-4}$ハロアルキルであり得る。好適には、Ｌ^{2}の任意の置換基は、Ｃ$_{1-4}$アルキルまたはＣ$_{1-4}$ハロアルキルであり得る。

【０１０３】

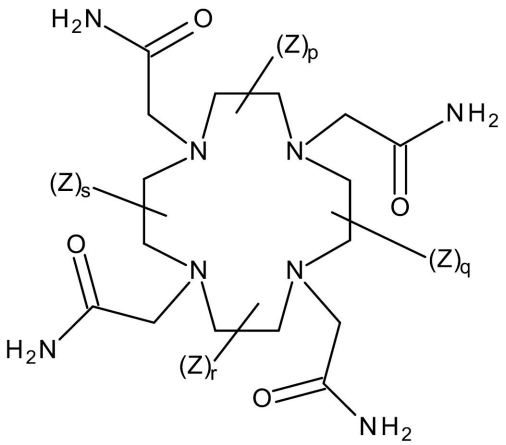
任意に、各Ｌ^{2}は、非置換Ｃ$_{2}$アルキレン－ＣＨ$_{2}$ＣＨ$_{2}$－であってもよい。

【０１０４】

各Ｌ^{1}は、好ましくはＣ$_{1-4}$アルキレン、より好ましくは－ＣＨ$_{2}$－などのＣ$_{1}$アルキレンである。

【０１０５】

ＤＯＴＡＭの機能的変異体／誘導体は、下記式：



（式中、各Ｚは、独立して、上記に定義されるＲ^{1}であり、ｐ、ｑ、ｒ、およびｓは、０、１または２であり、ｐ＋ｑ＋ｒ＋ｓは、１以上である）

の化合物であり得る。好ましくは、ｐ、ｑ、ｒ、およびｓは、０もしくは１であり、かつ／またはｐ＋ｑ＋ｒ＋ｓは、１である。例えば、化合物は、ｐ＋ｑ＋ｒ＋ｓ＝１を有してもよく、Ｚは、ｐ－ＳＣＮ－ベンジル部分であり、そのような化合物は、Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ，Ｉｎｃ．（テキサス州プレイノ）から市販されている。

【０１０６】

本発明で有用な放射性核種には、鉛（Ｐｂ）、ルテチウム（Ｌｕ）、またはイットリウム（Ｙ）などの金属の放射性同位体が含まれ得る。

【０１０７】

治療用途において特に有用な放射性核種は、アルファまたはベータ放射体である放射性核種である。例えば、それらは、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{90}Ｙ、^{177}Ｌｕ、^{225}Ａｃ、^{211}Ａｔ、^{227}Ｔｈ、^{223}Ｒａから選択され得る。

【０１０８】

いくつかの実施形態では、ＤＯＴＡＭ（またはその塩もしくは機能的変異体）は、上記のＰｂまたはＢｉ放射性同位体のうちの１つなどのＰｂまたはＢｉでキレート化されることが好ましい場合がある。他の実施形態では、ＤＯＴＡ（またはその塩もしくは機能的変異体）は、上記のＬｕまたはＹ放射性同位体のうちの１つなどのＬｕまたはＹとキレート化されることが好ましい場合がある。

【０１０９】

いくつかの実施形態では、多価抗体または多価スプリット抗体は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキ

レートに結合し得る。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、多価抗体または多価スプリット抗体は、放射性標識化合物に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、それは、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよび／または標的に対する解離定数（K_D）が、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（例えば10^{-7}Ｍ以下、例えば10^{-7}～10^{-13}Ｍ、10^{-8}Ｍ以下、例えば10^{-8}Ｍ～１０－１３Ｍ、例えば10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）で、放射性標識化合物、例えばＰｂ－ＤＯＴＡＭキレートに結合し得る。いくつかの実施形態では、それは、１００ｐＭ、５０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭ以下、例えば、０．９ｐＭ以下、０．８ｐＭ以下、０．７ｐＭ以下、０．６ｐＭ以下または０．５ｐＭ以下の結合親和性のK_D値で結合することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭまたは５００ｐＭ～１ｎＭのK_Dで金属キレートに結合し得る。

【０１１１】

Ｂ．ＤＯＴＡに対する例示的な抗原結合部位

本発明の特定の一実施形態では、抗体は、ＤＯＴＡ（またはその機能的誘導体もしくは変異体）の機能的結合部位を含むか、または第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは会合して、ＤＯＴＡ（またはその機能的誘導体もしくは変異体）、例えば、ＬｕまたはＹとキレート化されたＤＯＴＡ（例えば、^{177}Ｌｕまたは^{90}Ｙ）に対する機能的結合部位を形成する。例えば、機能的結合部位は、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭまたは５００ｐＭ～１ｎＭのK_Dで放射性標識化合物に結合し得る。

【０１１２】

Ｃ８２５は、^{177}Ｌｕおよび^{90}Ｙなどの放射性金属と複合体化したＤＯＴＡ－Ｂｎ（Ｓ－２－（４－アミノベンジル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン四酢酸）に対して高い親和性を有する公知のｓｃＦｖである（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｈｅａｌ ｅｔ ａｌ ２０１８，Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ ２０１８、および国際公開第２０１００９９５３６号を参照されたい）。Ｃ８２５のＣＤＲ配列ならびにＶＬおよびＶＨ配列は、本明細書に提供される。一実施形態では、放射性標識化合物に対する抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変領域は、（ａ）３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、（ｃ）３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含み得る。代替的な実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、配列ＧＦＳＬＴＤＹＧＶＨを有し得る。放射性標識化合物に対する結合部位の一部を形成する軽鎖可変領域は、（ｄ）３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｆ）４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つまたは３つ全てのＣＤＲを含み得る。

【０１１３】

別の実施形態では、（例えば、スプリット抗体の場合は第１のヘミボディ上の）放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変ドメインは、配列番号４１のアミノ酸配列、または配列番号４１と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む結合部位は、好ましくは本明細書に記載の親和性で、ＬｕまたはＹと複合体化したＤＯＴＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号４１において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、抗

体または第１のヘミボディは、配列番号４１のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号３５のアミノ酸配列または配列ＧＦＳＬＴＤＹＧＶＨを含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１１４】

任意に、（例えば、スプリット抗体の場合は第２のヘミボディ上の）放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位の一部を形成する軽鎖可変ドメインは、配列番号４２のアミノ酸配列、または配列番号４２と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む結合部位は、好ましくは本明細書に記載の親和性で、ＬｕまたはＹと複合体化したＤＯＴＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号４２において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、抗体または第２のヘミボディは、配列番号４２のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１１５】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域に関する実施形態は、組み合わせて明示的に企図される。したがって、機能的抗原結合部位は、上記に定義される重鎖可変領域および上記に定義される軽鎖可変領域から形成され得る。スプリット抗体の場合、これらはそれぞれ第１のヘミボディおよび第２のヘミボディ上にあり得る。

【０１１６】

上記の実施形態のいずれかにおいて、ＤＯＴＡ複合体に対する結合部位を形成する軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、以下でさらに論じるように、１つ以上のＣ末端アラニン残基などの１つ以上のＣ末端残基、またはＣＨ１ドメインのＮ末端からの１つ以上の残基によって伸長され得る。

【０１１８】

Ｃ．ＤＯＴＡＭに対する例示的な抗原結合部位

本発明の別の特定の実施形態では、抗体は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレート（Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）に対する機能的結合部位を含むか、または第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは会合して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレート（Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０１１９】

例示的な抗原結合部位は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／２０１９５９号に記載されている。

【０１２０】

特定の実施形態では、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに結合する機能的抗原結合部位は、以下の１つ以上の特性を有し得る。

● Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよびＢｉ－ＤＯＴＡＭに特異的に結合する、

● Ｃｕ－ＤＯＴＡＭなどの他のキレート化金属と比較して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（および任意にＢｉ－ＤＯＴＡＭ）に対して選択的である、
● 非常に高い親和性でＰｂ－ＤＯＴＡＭに結合する、
● 国際公開第２０１９／２０１９５９号に記載されている抗体、例えばＰＲＩＴ－０２１３もしくはＰＲＩＴ－０２１４と同じＰｂ－ＤＯＴＡＭ上のエピトープに結合する、および／または当該抗体と同じ接触残基を有する。

【０１２１】

Ｐｂの放射性同位体は、治療の方法において有用である。本発明で使用され得る鉛の特定の放射性同位体としては、^{212}Ｐｂが挙げられる。

【０１２２】

α粒子放射体である放射性核種は、短い経路長と高い線エネルギー付与の組合せのために、β放射体よりも周囲組織への損傷が少なく、より特異的な腫瘍細胞殺傷の可能性を有する。^{212}Ｂｉはα粒子放射体であるが、その短い半減期がその直接使用を妨げる。^{212}Ｐｂは^{212}Ｂｉの親放射性核種であり、^{212}Ｂｉのｉｎ ｖｉｖｏ発生剤として機能することができ、それによって、^{212}Ｂｉの短い半減期を効果的に克服する（Ｙｏｎｇ ａｎｄ Ｂｒｅｃｈｂｉｅｌ，Ｄａｌｔｏｎ Ｔｒａｎｓ．２００１ Ｊｕｎｅ ２１；４０（２３）６０６８－６０７６）。

【０１２３】

一般に、放射性金属は、キレート化形態で使用される。本発明の特定の態様では、ＤＯＴＡＭがキレート化剤として使用される。ＤＯＴＡＭは、Ｐｂ（ＩＩ）の安定なキレート剤である（Ｙｏｎｇ ａｎｄ Ｂｒｅｃｈｂｉｅｌ，Ｄａｌｔｏｎ Ｔｒａｎｓ．２００１ Ｊｕｎｅ ２１；４０（２３）６０６８－６０７６、Ｃｈａｐｐｅｌｌ ｅｔ ａｌ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２７，ｐｐ．９３－１００，２０００）。したがって、ＤＯＴＡＭは、^{212}Ｐｂなどの上述の鉛の同位体と併せて特に有用である。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、抗体は、１００ｐＭ、５０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭ以下、例えば、０．９ｐＭ以下、０．８ｐＭ以下、０．７ｐＭ以下、０．６ｐＭ以下または０．５ｐＭ以下の結合親和性のK_D値でＰｂ－ＤＯＴＡＭに結合することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭまたは５００ｐＭ～１ｎＭのK_Dで放射性標識化合物に結合し得る。

【０１２５】

特定の実施形態では、抗体は、ＤＯＴＡＭによってキレート化されたＢｉにさらに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、１ｎＭ、５００ｐＭ、２００ｐＭ、１００ｐＭ、５０ｐＭ、１０ｐＭ以下、例えば、９ｐＭ、８ｐＭ、７ｐＭ、６ｐＭ、５ｐＭ以下の結合親和性のK_D値でＢｉ－ＤＯＴＡＭ（すなわち、本明細書では「Ｂｉ－ＤＯＴＡＭキレート」とも呼ばれる、ビスマスと複合体化したＤＯＴＡＭを含むキレート）に結合することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭまたは５００ｐＭ～１ｎＭのK_Dで金属キレートに結合し得る。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、抗体は、Ｂｉ－ＤＯＴＡＭおよびＰｂ－ＤＯＴＡＭに同様の親和性で結合し得る。例えば、Ｂｉ－ＤＯＴＡＭ／Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する親和性の比、例えばK_D値の比は、０．１～１０、例えば１～１０の範囲内であることが好ましい場合がある。

【０１２７】

一実施形態では、（例えば、スプリット抗体の場合は第１のヘミボディ上の）Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変領域は、（ａ）ＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳ（配列番号１）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹ

ＡＳＷＡＫＧ（配列番号２）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、（ｃ）ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬ（配列番号３）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含み得る。（例えば、スプリット抗体の場合は第２のヘミボディ上の）Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する結合部位の一部を形成する軽鎖可変領域は、（ｄ）ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡ（配列番号４）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）ＱＡＳＫＬＡＳ（配列番号５）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｆ）ＬＧＧＹＤＤＥＳＤＴＹＧ（配列番号６）のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つまたは３つ全てのＣＤＲを含み得る。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号１～６のアミノ酸配列と比較して置換、例えば、１つ、２つもしくは３つの置換を有する、１つ以上のＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２および／もしくはＣＤＲ－Ｈ３、または１つ以上のＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２および／またはＣＤＲ－Ｌ３を含み得る。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書に記載のものと同じ接触残基を共有し得、例えば、これらの残基は不変であり得る。これらの残基は、以下を含み得る：

ａ）重鎖ＣＤＲ２において：Ｐｈｅ５０、Ａｓｐ５６および／またはＴｙｒ５８、また任意にＧｌｙ５２および／またはＡｒｇ５４、

ｂ）重鎖ＣＤＲ３において：Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８、Ｔｙｒ９９、Ａｌａ１００Ｃおよび／またはＴｙｒ１００Ｄ、また任意にＰｒｏ１００Ｅ、

ｃ）軽鎖ＣＤＲ１において：Ｔｙｒ２８および／またはＡｓｐ３２、

ｄ）軽鎖ＣＤＲ３において：Ｇｌｙ９１、Ｔｙｒ９２、Ａｓｐ９３、Ｔｈｒ９５ｃおよび／またはＴｙｒ９６、

ｅ）軽鎖ＣＤＲ２において：任意にＧｌｎ５０、

全てＫａｂａｔに従ってナンバリングされる。

【０１３０】

例えば、いくつかの実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ２は、アミノ酸配列ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号２）、または配列番号２において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み得、これらの置換は、Ｐｈｅ５０、Ａｓｐ５６および／またはＴｙｒ５８を含まず、任意に、Ｇｌｙ５２および／またはＡｒｇ５４も含まず、これらは全てＫａｂａｔに従ってナンバリングされる。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ２は、以下に示すように、１つ以上の位置で置換され得る。ここで、および以下の置換表において、置換は、生殖系列残基（下線）に基づくか、または理論的に立体的に適合し、その部位の結晶化レパートリーにも生じるアミノ酸によるものである。いくつかの実施形態では、上記の残基は、固定されていてもよく、他の残基は、以下の表に従って置換されていてもよく、他の実施形態では、任意の残基の置換は、以下の表に従って行われてもよい。

WolfGuy	Kabat	AA	置換
251	50	F	Y, H
252	51	I	
253	52	G	
254	53	S	A, G, T, I, N
288	54	R	A, D, G, N, S, T, F, Y
289	55	G	D, S, Y, T, A, N, R, V
290	56	D	
291	57	T	K, I, A, P, S
292	58	Y	F, W, H
293	59	Y	N, F, H, L, S
294	60	A	G, N, S, T
295	61	S	A, G, N, Q, T
296	62	W	K, P, S, A, T, D, N, R, Q
297	63	A	F, L, V, M, I
298	64	K	N, Q, R, E
299	65	G	S, T, D, N, A

【０１３２】

任意に、ＣＤＲ－Ｈ３は、アミノ酸配列ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬ（配列番号３）、または配列番号３において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み得、これらの置換は、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８を含まず、任意に、Ａｌａ１００Ｃ、Ｔｙｒ１００Ｄ、および／もしくはＰｒｏ１００Ｅも含まず、かつ／または任意に、Ｔｙｒ９９も含まない。例えば、いくつかの実施形態では、置換は、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８、Ｔｙｒ９９、Ａｌａ１００ＣおよびＴｙｒ１００Ｄを含まない。

【０１３３】

特定の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ３は、以下に示すように、１つ以上の位置で置換され得る。いくつかの実施形態では、上記の残基は、固定されていてもよく、他の残基は、以下の表に従って置換されていてもよく、他の実施形態では、任意の残基の置換は、以下の表に従って行われてもよい。

ＷｏｌｆＧｕｙ	Ｋａｂａｔ	ＡＡ	置換
３５１	９５	Ｅ	
３５２	９６	Ｒ	Ｋ，Ｅ
３５３	９７	Ｄ	
３５４	９８	Ｐ	
３５５	９９	Ｙ	Ｆ，Ｇ，Ｓ，Ｔ，Ｄ
３５６	１００	Ｇ	
３９２	１００Ａ	Ｇ	
３９３	１００Ｂ	Ｇ	
３９４	１００Ｃ	Ａ	Ｓ，Ｔ
３９５	１００Ｄ	Ｙ	Ｆ
３９６	１００Ｅ	Ｐ	
３９７	１００Ｆ	Ｐ	
３９８	１０１	Ｈ	Ａ，Ｔ，Ｖ，Ｄ
３９９	１０２	Ｌ	Ｙ，Ｖ，Ｉ，Ｈ，Ｆ

【０１３４】

任意に、ＣＤＲ－Ｌ１は、アミノ酸配列ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡ（配列番号４）、または配列番号４において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み得、これらの置換は、Ｔｙｒ２８および／またはＡｓｐ３２を含まない（Ｋａｂａｔナンバリング）。

【０１３５】

特定の実施形態では、ＣＤＲ－Ｌ１は、以下に示すように、１つ以上の位置で置換され得る。また、いくつかの実施形態では、上記の残基は、固定されていてもよく、他の残基は、以下の表に従って置換されていてもよく、他の実施形態では、任意の残基の置換は、以下の表に従って行われてもよい。

ＷｏｌｆＧｕｙ	Ｋａｂａｔ	ＡＡ	置換
５５１	２４	Ｑ	Ｒ，Ｋ
５５２	２５	Ｓ	Ａ，Ｇ
５５４	２６	Ｓ	Ｔ
５５５	２７	Ｈ	Ｑ，Ｓ，Ｒ，Ｋ
５５６	２７Ａ	Ｓ	Ｑ
５５７	２７Ｂ	Ｖ	Ｉ，Ｄ，Ｎ
５６１	２８	Ｙ	Ｆ
５６２	２９	Ｓ	Ｔ，Ｖ
５７１	３０	Ｄ	Ｒ，Ｓ，Ｎ，Ｇ
５７２	３１	Ｎ	Ｋ
５９７	３２	Ｄ	
５９８	３３	Ｌ	Ｉ，Ｖ，Ｍ
５９９	３４	Ａ	Ｓ

【０１３６】

任意に、ＣＤＲ－Ｌ３は、アミノ酸配列ＬＧＧＹＤＤＥＳＤＴＹＧ（配列番号６）、または配列番号６において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み得、これらの置換は、Ｇｌｙ９１、Ｔｙｒ９２、Ａｓｐ９３、Ｔｈｒ９５ｃおよび／またはＴｙｒ９６を含まない（Ｋａｂａｔ）。

【０１３７】

特定の実施形態では、ＣＤＲ－Ｌ３は、以下に示されるように、以下の位置で置換され得る。（ほとんどの残基は溶媒にさらされており、抗原と接触していないため、多くの置換が考えられる）。また、いくつかの実施形態では、上記の残基は、固定されていてもよく、他の残基は、以下の表に従って置換されていてもよく、他の実施形態では、任意の残基の置換は、以下の表に従って行われてもよい。

ＷｏｌｆＧｕｙ	Ｋａｂａｔ	ＡＡ	置換
７５１	８９	Ｌ	Ａ，Ｖ，Ｑ
７５２	９０	Ｇ	Ａ
７５３	９１	Ｇ	
７５４	９２	Ｙ	Ａ，Ｄ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ
７５５	９３	Ｄ	Ａ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ
７５６	９４	Ｄ	Ａ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ
７９４	９５	Ｅ	Ａ，Ｄ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ
７９５	９５Ａ	Ｓ	Ａ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｒ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ
７９６	９５Ｂ	Ｄ	Ａ，Ｅ，Ｆ，Ｇ，Ｈ，Ｉ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｓ，Ｔ，Ｖ，Ｗ，Ｙ
７９７	９５Ｃ	Ｔ	Ｓ
７９８	９６	Ｙ	Ｆ，Ｈ，Ｒ
７９９	９７	Ｇ	Ａ，Ｅ，Ｉ，Ｋ，Ｌ，Ｍ，Ｎ，Ｑ，Ｓ，Ｔ，Ｖ

【０１３８】

抗体は、配列番号１もしくは配列番号５の配列をそれぞれ任意に有するＣＤＲ－Ｈ１もしくはＣＤＲ－Ｌ２、またはそれらに対して少なくとも１つ、２つもしくは３つの置換、任意に保存的置換を有するその変異体をさらに含み得る。

【０１３９】

したがって、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変ドメインは、少なくとも以下を含み得る：

ａ）アミノ酸配列ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号２）、または配列番号２において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含む重鎖ＣＤＲ２であって、これらの置換が、Ｐｈｅ５０、Ａｓｐ５６および／またはＴｙｒ５８を含まず、任意に、Ｇｌｙ５２および／またはＡｒｇ５４も含まない、重鎖ＣＤＲ２、

ｂ）アミノ酸配列ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬ（配列番号３）、または配列番号３において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含む重鎖ＣＤＲ３であって、これらの置換が、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８を含まず、任意に、Ａｌａ１００Ｃ、Ｔｙｒ１００Ｄ、および／もしくはＰｒｏ１００Ｅも含まず、かつ／または任意に、Ｔｙｒ９９も含まない、重鎖ＣＤＲ３。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、任意に、

ｃ）アミノ酸配列ＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳ（配列番号１）、または配列番号１において最大１つ、２つもしくは３つの置換を有するその変異体を含む重鎖ＣＤＲ１である重鎖ＣＤＲ１をさらに含む。

【０１４１】

いくつかの実施形態では、重鎖可変ドメインは、遊離ＶＨ領域を認識する既存の抗体の結合を回避するために、Ｃ末端アラニン（例えば、Ｋａｂａｔナンバリングシステムによ

るＡｌａ１１４）をさらに含む。Ｈｏｌｌａｎｄ ＭＣ ｅｔ ａｌ Ｊ．Ｃｌｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ（２０１３）に報告されているように、ＨＡＶＨ自己抗体は、同じＶＨフレームワーク配列を含有するインタクトなＩｇＧもしくはＩｇＧ断片（ｆＡｂまたは修飾ＶＨ分子）、またはＶＫドメイン抗体に結合しないため、遊離Ｃ末端は、ＶＨドメイン抗体へのＨＡＶＨ（ヒト抗ＶＨドメイン）自己抗体の結合に重要であると思われる。Ｃｏｒｄｙ ＪＣ ｅｔ ａｌ Ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｎｄ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２０１５）には、完全なＩｇＧ分子中のＨＡＶＨ抗体が天然にはアクセスできないＶＨ ｄＡｂのＣ末端エピトープにおける潜在性エピトープの存在が記載されている。

【０１４２】

したがって、抗体が遊離ＶＨ領域（そのＣ末端でいかなる他のドメインにも融合されていない）を含む場合、配列は、１つ以上のＣ末端残基によって伸長され得る。この伸長は、遊離ＶＨ領域を認識する抗体の結合を妨げ得る。例えば、伸長は、１～１０残基、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０残基によるものであり得る。一実施形態では、ＶＨ配列は、１つ以上のＣ末端アラニン残基によって伸長され得る。ＶＨ配列はまた、ＣＨ１ドメインのＮ末端部分によって、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１ ＣＨ１ドメインからの１～１０残基によって伸長され得る。（ヒトＩｇＧ１ ＣＨ１ドメインの最初の１０残基はＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰ（配列番号１４９）であるため、一実施形態では、１～１０残基はこの配列のＮ末端から取り出され得る）。例えば、一実施形態では、ペプチド配列ＡＳＴ（ＩｇＧ１ ＣＨ１ドメインの最初の３残基に対応する）が、ＶＨ領域のＣ末端に付加される。

【０１４３】

別の実施形態では、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する抗原結合部位の一部を形成する軽鎖可変ドメインは、少なくとも以下を含む：

ｄ）アミノ酸配列ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡ（配列番号４）、または配列番号４において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含む軽鎖ＣＤＲ１であって、これらの置換が、Ｔｙｒ２８およびＡｓｐ３２を含まない、軽鎖ＣＤＲ１、

ｅ）アミノ酸配列ＬＧＧＹＤＤＥＳＤＴＹＧ（配列番号６）、または配列番号６において最大１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含む軽鎖ＣＤＲ３であって、これらの置換が、Ｇｌｙ９１、Ｔｙｒ９２、Ａｓｐ９３、Ｔｈｒ９５ｃおよびＴｙｒ９６を含まない、軽鎖ＣＤＲ３。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変ドメインは、任意に、

ｆ）アミノ酸配列ＱＡＳＫＬＡＳ（配列番号５）、または配列番号５において少なくとも１つ、２つもしくは３つの置換を有するその変異体を含む軽鎖ＣＤＲ２であって、任意に、Ｇｌｎ５０を含まない、軽鎖ＣＤＲ２である軽鎖ＣＤＲ２をさらに含む。

【０１４５】

（例えば、可変ドメインの）上記のＣＤＲを含む配列の変異体を含む本発明の任意の実施形態では、タンパク質は、上記の１つ以上のＣＤＲ残基において不変であり得る。

【０１４６】

任意に、（例えば、スプリット抗体の場合は第１のヘミボディ上の）Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変ドメインは、配列番号７および配列番号９からなる群から選択されるアミノ酸配列、または配列番号７もしくは配列番号９と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体を含む。（括弧内に示されるこれらの参照配列中のＮ末端アミノ酸は、存在しても存在しなくてもよく、いくつかの実施形態では、任意の変異体配列に保持されてもよい）。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む結合部位は、好ましくは本明細書に記載の親和性で、Ｐｂ

－ＤＯＴＡＭに結合する能力を保持する。ＶＨ配列は、上記の不変残基を保持し得る。特定の実施形態では、配列番号７または配列番号９において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、抗体は、配列番号７または配列番号９のＶＨ配列（括弧内に示されるＮ末端残基ありまたはなし）を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つまたは３つのＣＤＲを含む。

【０１４７】

いくつかの実施形態では、上述のように、いくつかの変異体では、配列番号７または９は、１つ以上の追加のＣ末端残基、例えば、１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基によって伸長され得る。したがって、例えば、１つの特定の変異体では、配列番号７の配列は、伸長されて以下になり得る：

ＶＴＬＫＥＳＧＰＶＬＶＫＰＴＥＴＬＴＬＴＣＴＶＳＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳＷＩＲＱＰＰＧＫＡＬＥＷＬＧＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＬＴＩＳＫＤＴＳＫＳＱＶＶＬＴＭＴＮＭＤＰＶＤＴＡＴＹＹＣＡＲＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬＷＧＲＧＴＬＶＴＶＳＳＡ

【０１４８】

他の実施形態では、伸長は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分による、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基によるものであり得る。例えば、伸長は、ペプチド配列ＡＳＴによるものであり得る。

【０１４９】

任意に、（例えば、スプリット抗体の場合は第２のヘミボディ上の）Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位の一部を形成する軽鎖可変ドメインは、配列番号８のアミノ酸配列、または配列番号８と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体を含む。（括弧内に示されるこの参照配列中のＮ末端アミノ酸は、存在しても存在しなくてもよく、いくつかの実施形態では、任意の変異体に保持されてもよい）。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ結合部位は、好ましくは本明細書に記載の親和性で、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに結合する能力を保持する。ＶＬ配列は、上記の不変残基を保持し得る。特定の実施形態では、配列番号８において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、抗Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ抗体は、配列番号８のＶＬ配列（括弧内に示されるＮ末端残基ありまたはなし）を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１５０】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域に関する実施形態は、組み合わせて明示的に企図される。したがって、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位は、上記に定義される重鎖可変領域および上記に定義される軽鎖可変領域から形成され得る。スプリット抗体の場合、これらはそれぞれ第１のヘミボディおよび第２のヘミボディ上にあり得る。

【０１５１】

任意に、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートに特異的な抗原結合部位は、配列番号７もしくは配列番号９からなる群から選択されるアミノ酸配列（括弧内に示されるＮ末端残基ありまたはなし）、または上記に定義されるその変異体（上述のＣ末端伸長を有する変異体を含む

）を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号８のアミノ酸配列（括弧内に示されるＮ末端残基ありまたはなし）、または上記に定義されるその変異体を含む軽鎖可変ドメインから形成され得る。例えば、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートに特異的な抗原結合部位は、配列番号７のアミノ酸配列またはその変異体を含む重鎖可変ドメインと、配列番号８のアミノ酸配列またはその変異体を含む軽鎖可変ドメインとを含み得、これらにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。別の実施形態では、それは、配列番号９のアミノ酸配列またはその変異体（上述のＣ末端伸長を有する変異体を含む）を含む重鎖可変ドメインと、配列番号８のアミノ酸配列またはその変異体を含む軽鎖可変ドメインとを含み得、これらにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０１５２】

上記の実施形態のいずれかにおいて、抗Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ結合部位を形成する軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。別の実施形態では、軽鎖および／または重鎖可変領域は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、ｖｋ　１　３９および／またはｖｈ　２　２６に由来するフレームワーク領域をさらに含む。ｖｋ　１　３９について、いくつかの実施形態では、復帰変異は存在しない場合がある。ｖｈ　２　２６について、生殖系列Ａｌａ４９残基は、Ｇｌｙ４９に復帰変異される場合がある。

【０１５３】

Ｄ．標的抗原

併用療法で使用される多重特異性抗体（またはスプリット多重特異性抗体）は、標的抗原に結合する。これは、標的細胞の表面上に発現される抗原である。これは、「標的細胞抗原」とも呼ばれ得る。

【０１５４】

処置は、好ましくは腫瘍またはがんの処置である。

【０１５５】

標的抗原は、例えば、腫瘍関連抗原であり得る。

【０１５６】

本明細書で使用される「腫瘍関連抗原」または「腫瘍特異的抗原」という用語は、抗原が腫瘍（複数可）および／またはがん（複数可）に関連するように、腫瘍細胞および／もしくはがん細胞、またはがん関連線維芽細胞などの腫瘍の間質の他の細胞によって単独でまたは優勢に発現または過剰発現される任意の分子（例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物など）を指す。腫瘍関連抗原は、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん性細胞によってさらに発現され得る。しかしながら、そのような場合、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん性細胞による腫瘍関連抗原の発現は、腫瘍細胞またはがん細胞による発現ほど頑強ではない。これに関して、腫瘍細胞またはがん細胞は、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん性細胞による抗原の発現と比較して、抗原を過剰発現するか、または有意に高いレベルで抗原を発現することができる。また、腫瘍関連抗原は、発達または成熟の異なる状態の細胞によってさらに発現され得る。例えば、腫瘍関連抗原は、胚段階または胎児段階の細胞によってさらに発現され得、これらの細胞は通常、成体宿主にはみられない。あるいは、腫瘍関連抗原は、幹細胞または前駆細胞によってさらに発現され得、これらの細胞は通常、成体宿主にはみられない。

【０１５７】

腫瘍関連抗原は、本明細書に記載のがんおよび腫瘍を含む、任意のがんまたは腫瘍の任意の細胞によって発現される抗原であり得る。腫瘍関連抗原は、腫瘍関連抗原が１種類のがんもしくは腫瘍のみに関連する、または１種類のがんもしくは腫瘍のみに特徴的であるような、１種類のがんまたは腫瘍のみの腫瘍関連抗原であり得る。あるいは、腫瘍関連抗原は、２種類以上のがんまたは腫瘍の腫瘍関連抗原であり得る（例えば、それらに特徴的であり得る）。例えば、腫瘍関連抗原は、乳がん細胞および前立腺がん細胞の両方によっ

て発現され得、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん細胞によっては全く発現され得ない。

【０１５８】

本発明の抗体が結合し得る例示的な腫瘍関連抗原としては、限定されるものではないが、黒色腫関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ＭＣＳＰ）、ムチン１（ＭＵＣｌ；腫瘍関連上皮ムチン）、黒色腫優先発現抗原（ｐｒｅｆｅｒｅｎｔｉａｌｌｙ ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ ｏｆ ｍｅｌａｎｏｍａ：ＰＲＡＭＥ）、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、ＰＳＣＡ、ＥｐＣＡＭ、Ｔｒｏｐ２（トロホブラスト－２、ＥＧＰ－１としても知られる）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体（ＧＭ－ＣＳＦＲ）、ＣＤ５６、ヒト上皮成長因子受容体２（ＨＥＲ２／ｎｅｕ）（ｅｒｂＢ－２としても知られる）、ＣＤＳ、ＣＤ７、チロシナーゼ関連タンパク質（ＴＲＰ）Ｉ、およびＴＲＰ２が挙げられる。別の実施形態では、腫瘍抗原は、分化抗原群（ＣＤ）１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＣＤ３３（シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３、骨髄系細胞表面抗原）、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ１２３（インターロイキン３受容体アルファ）、トランスフェリン受容体、ＥＧＦ受容体、メソテリン、カドヘリン、ルイスＹ、グリピカン－３、ＦＡＰ（線維芽細胞活性化タンパク質アルファ）、ＧＰＲＣ５Ｄ（Ｇタンパク質共役受容体クラスＣ群５メンバーＤ）、ＰＳＭＡ（前立腺特異的膜抗原）、ＣＡ９＝ＣＡＩＸ（炭酸脱水酵素ＩＸ）、Ｌｌ ＣＡＭ（神経細胞接着分子Ｌ１）、エンドシアリン、ＨＥＲ３（上皮成長因子受容体ファミリーメンバー３の活性化コンフォメーション）、Ａｌｋｌ／ＢＭＰ９複合体（未分化リンパ腫キナーゼ１／骨形成タンパク質９）、ＴＰＢＧ＝５Ｔ４（トロホブラスト糖タンパク質）、ＲＯＲ１（受容体チロシンキナーゼ様表面抗原）、ＨＥＲ１（上皮成長因子受容体の活性化コンフォメーション）、およびＣＬＬ１（Ｃ型レクチンドメインファミリー１２、メンバーＡ）からなる群から選択され得る。メソテリンは、例えば、卵巣がん、中皮腫、非小細胞肺がん、肺腺癌腫、卵管がん、頭頸部がん、子宮頸がん、および膵臓がんにおいて発現される。ＣＤ２２は、例えば、有毛細胞白血病、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、前リンパ球性白血病（ＰＬＬ）、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、および急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）において発現される。ＣＤ２５は、例えば、有毛細胞白血病およびホジキンリンパ腫を含む白血病およびリンパ腫において発現される。ルイスＹ抗原は、例えば、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、結腸直腸がん、食道がん、胃がん、肺がん、および膵臓がんにおいて発現される。ＣＤ３３は、例えば、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄単球性白血病（ＣＭＬ）、および骨髄増殖性障害において発現される。

【０１５９】

腫瘍関連抗原に特異的に結合する例示的な抗体としては、限定されるものではないが、トランスフェリン受容体に対する抗体（例えば、ＨＢ２１およびその変異体）、ＣＤ２２に対する抗体（例えば、ＲＦＢ４およびその変異体）、ＣＤ２５に対する抗体（例えば、抗Ｔａｃおよびその変異体）、メソテリンに対する抗体（例えば、ＳＳ１、ＭＯＲＡｂ－００９、ＳＳ、ＨＮ１、ＨＮ２、ＭＮ、ＭＢ、およびそれらの変異体）、およびルイスＹ抗原に対する抗体（例えば、Ｂ３およびその変異体）が挙げられる。これに関して、標的化部分（細胞結合剤）は、Ｂ３、ＲＦＢ４、ＳＳ、ＳＳ１、ＭＮ、ＭＢ、ＨＮ１、ＨＮ２、ＨＢ２１、およびＭＯＲＡｂ－００９からなる群から選択される抗体、ならびにその抗原結合部分であり得る。本発明のキメラ分子における使用に好適なさらなる例示的な標的化部分は、例えば、米国特許第５，２４２，８２４号（抗トランスフェリン受容体）；同第５，８４６，５３５号（抗ＣＤ２５）、同第５，８８９，１５７号（抗ルイスＹ）、同第５，９８１，７２６号（抗ルイスＹ）、同５，９９０，２９６号（抗ルイスＹ）、同第７，０８１，５１８号（抗メソテリン）、同第７，３５５，０１２号（抗ＣＤ２２および抗ＣＤ２５）、同第７，３６８，１１０号（抗メソテリン）、同第７，４７０，７７５号（抗ＣＤ３０）、同第７，５２１，０５４号（抗ＣＤ２５）、および同第７，５４１，０３４号（抗ＣＤ２２）、米国特許出願公開第２００７／０１８９９６２号（抗ＣＤ２２）、Ｆｒａｎｋｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，６：３２６－３

３４（２０００）、ならびにＫｒｅｉｔｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ＡＡＰＳ Ｊｏｕｒｎａｌ，８（３）：Ｅ５３２－Ｅ５５１（２００６）に開示されており、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【０１６０】

特異的腫瘍関連抗原を標的とするために、以下のさらなる抗体が産生されている：Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３０、ＣＤ１９、ＣＤ３３、糖タンパク質ＮＭＢ、ＣａｎＡｇ、Ｈｅｒ２（ＥｒｂＢ２／Ｎｅｕ）、ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ２２（Ｓｉｇｌｅｃ２）、ＣＤ３３（Ｓｉｇｌｅｃ３）、ＣＤ７９、ＣＤ１３８、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ（前立腺特異的膜抗原）、ＢＣＭＡ、ＣＤ２０、ＣＤ７０、Ｅ－セレクチン、ＥｐｈＢ２、メラノトランスフェリン、Ｍｕｃ１６およびＴＭＥＦＦ２。これらのいずれかまたはその抗原結合断片は、本発明において有用であり得る、すなわち、本明細書に記載の抗体に組み込まれ得る。

【０１６１】

本発明のいくつかの実施形態では、腫瘍関連抗原が癌胎児性抗原（ＣＥＡ）であることが好ましい場合がある。

【０１６２】

ＣＥＡは、比較的ゆっくりと内在化され、したがって、放射性核種への結合のために、初期処置後に高い割合の抗体が細胞の表面で利用可能なままであるため、本発明の文脈において有利である。他の低内在化標的／腫瘍関連抗原も好ましい場合がある。腫瘍関連抗原の他の例としては、ＣＤ２０またはＨＥＲ２が挙げられる。なおさらなる実施形態では、標的は、ＥＧＰ－１（上皮糖タンパク質－１、トロホブラスト－２としても知られる）、結腸特異的抗原－ｐ（ＣＳＡｐ）または膵臓ムチンＭＵＣ１であり得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれるＧｏｌｄｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ ２０１２（Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ ２（５））を参照されたい。この参考文献はまた、ＣＳＡｐに結合するＭｕ－９（Ｓｈａｒｋｅｙ ｅｔ ａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００３；６３：３５４－６３も参照されたい）、ＭＵＣ１に結合するｈＰＡＭ４（Ｇｏｌｄ ｅｔ ａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００８：６８：４８１９－２６も参照されたい）、ＣＤ２０に結合するバルツズマブ（Ｓｈａｒｋｅｙ ｅｔ ａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２００８；６８：５２８２－９０も参照されたい）、およびＥＧＰ－１に結合するｈＲＳ７（Ｃｕｂａｓ ｅｔ ａｌ Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ ２００９；１７９６：３０９－１４も参照されたい）などの抗体を記載している。これらのいずれかまたはその抗原結合部分は、本発明において有用であり得る、すなわち、本明細書に記載の抗体に組み込まれ得る。ＣＥＡに対して産生されている抗体の一例は、Ｔ８４．６６（ＮＣＢＩアクセッション番号ＣＡＡ３６９８０（重鎖）およびＣＡＡ３６９７９（軽鎖）に示される、または国際公開第２０１６／０７５２７８号の配列番号３１７および３１８に示される）、ならびにそのヒト化バージョンおよびキメラバージョン、例えば国際公開第２０１６／０７５２７８（Ａ１）号および／または国際公開第２０１７／０５５３８９号に記載のＴ８４．６６－ＬＣＨＡである。別の例は、国際公開第２０１２／１１７００２号および国際公開第２０１４／１３１７１２号に記載の抗ＣＥＡ抗体であるＣＨ１Ａ１ａ、ならびにＣＥＡ ｈＭＮ－１４である（米国特許第６６７６９２４号および米国特許第５８７４５４０号も参照されたい）。別の抗ＣＥＡ抗体は、Ｍ．Ｊ．Ｂａｎｆｉｅｌｄ ｅｔ ａｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ １９９７，２９（２），１６１－１７１に記載のＡ５Ｂ７である。マウス抗体Ａ５Ｂ７に由来するヒト化抗体は、国際公開第９２／０１０５９号および国際公開第２００７／０７１４２２号に開示されている。同時係属出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２号も参照されたい。Ａ５Ｂ７のヒト化バージョンの例は、Ａ５Ｈ１ＥＬ１（Ｇ５４Ａ）である。ＣＥＡに対するさらなる例示的な抗体は、米国特許第７６２６０１１号および／または同時係属出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２号に記載のＭＦＥ２３およびそのヒト化バージョンである。ＣＥＡに対する抗体のなおさらなる例は、２８Ａ９である。これらのいずれかまたはその抗原結合断片は、本発明においてＣＥＡ結合部分を形成するのに有用であり得る。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、標的抗原（例えば、本明細書で論じられる標的抗原のいずれか）に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、それらは、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（例えば10^{-7}Ｍ以下、例えば10^{-7}～10^{-13}Ｍ、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）で結合し得る。

【０１６４】

Ｅ．ＣＥＡに対する例示的な抗原結合部位

上述の実施形態、例えば放射性標識化合物およびＤＯＴＡ／ＤＯＴＡＭに対する例示的な結合部位と組み合わせてもよい本発明の特定の実施形態では、多重特異性抗体によって、またはスプリット多重特異性抗体の第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディによって結合される標的抗原は、ＣＥＡ（癌胎児性抗原）であり得る。ＣＥＡに対して産生されている抗体としては、Ｔ８４．６６ならびにそのヒト化バージョンおよびキメラバージョン、例えば、国際公開第２０１６／０７５２７８（Ａ１）号および／または国際公開第２０１７／０５５３８９号に記載のＴ８４．６６－ＬＣＨＡ、ＣＨ１Ａ１ａ、国際公開第２０１２／１１７００２号および国際公開第２０１４／１３１７１２号に記載の抗ＣＥＡ抗体、ならびにＣＥＡ　ｈＭＮ－１４またはラベツジマブ（例えば、米国特許第６６７６９２４号および米国特許第５８７４５４０号に記載の）が挙げられる。ＣＥＡに対する別の例示的な抗体は、Ａ５Ｂ７（例えば、Ｍ．Ｊ．Ｂａｎｆｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　１９９７，２９（２），１６１－１７１に記載の）、または国際公開第９２／０１０５９号および国際公開第２００７／０７１４２２号に記載のマウスＡ５Ｂ７由来のヒト化抗体である。同時係属出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２号も参照されたい。Ａ５Ｂ７のヒト化バージョンの例は、Ａ５Ｈ１ＥＬ１（Ｇ５４Ａ）である。ＣＥＡに対するさらなる例示的な抗体は、米国特許第７６２６０１１号および／または同時係属出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２号に記載のＭＦＥ２３およびそのヒト化バージョンである。抗ＣＥＡ抗体のなおさらなる例は、２８Ａ９である。これらのいずれかまたはその抗原結合断片は、本発明においてＣＥＡ結合部分を形成するのに使用され得る。

【０１６５】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部分は、一価結合について１ｎＭ以下、５００ｐＭ以下、２００ｐＭ以下、または１００ｐＭ以下のK_D値で結合し得る。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性の第１のヘミボディおよび／もしくは第２のヘミボディは、ＣＥＡのＣＨ１Ａ１ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープまたは２８Ａ９エピトープに結合し得る。

【０１６７】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性の第１のヘミボディおよび／もしくは第２のヘミボディは、可溶性ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）上に存在しないＣＥＡエピトープに結合する。可溶性ＣＥＡは、ＧＰＩホスホリパーゼによって切断され、血液中に放出されるＣＥＡ分子の一部である。可溶性ＣＥＡ上にみられないエピトープの例は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープである。任意に、スプリット抗体の場合、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディの一方は、可溶性ＣＥＡ上に存在しないエピトープに結合し、他方は、可溶性ＣＥＡ上に存在するエピトープに結合する。

【０１６８】

ＣＨ１Ａ１ａおよびその親マウス抗体ＰＲ１Ａ３に対するエピトープは、国際公開第２０１２／１１７００２（Ａ１）号およびＤｕｒｂｉｎ　Ｈ．ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ｓｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９１：４３１３－４３１７，１９９４に記載されている。ＣＨ１Ａ１ａエピトープに結合する抗体は、ＣＥＡ分子のＢ３ドメインおよびＧＰＩアンカー内の立体構造エピトープに結合する。一態様では、抗体は、本明細書の配列番号２５のＶＨおよび配列番号２６のＶＬを有するＣＨ１Ａ１ａ抗体と同じエピトープに結

合する。Ａ５Ｂ７エピトープは、同時係属出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２号に記載されている。Ａ５Ｂ７エピトープに結合する抗体は、ＣＥＡのＡ２ドメイン、すなわち配列番号１４１のアミノ酸を含むドメインに結合する：

【０１６９】

ＰＫＰＦＩＴＳＮＮＳＮＰＶＥＤＥＤＡＶＡＬＴＣＥＰＥＩＱＮＴＴＹＬＷＷＶＮＮＱＳＬＰＶＳＰＲＬＱＬＳＮＤＮＲＴＬＴＬＬＳＶＴＲＮＤＶＧＰ　ＹＥＣＧＩＱＮＫＬＳＶＤＨＳＤＰＶＩＬＮ（配列番号１４１）。

【０１７０】

一態様では、抗体は、本明細書の配列番号４９のＶＨおよび配列番号５０のＶＬを有するＡ５Ｂ７抗体と同じエピトープに結合する。

【０１７１】

一態様では、抗体は、国際公開第２０１６／０７５２７８号に記載のＴ８４．６６と同じエピトープに結合する。抗体は、本明細書の配列番号１７のＶＨおよび配列番号１８のＶＬを有する抗体と同じエピトープに結合し得る。

【０１７２】

ＭＦＥ２３エピトープは、同時係属出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２号に記載されている。ＭＦＥ２３エピトープに結合する抗体は、ＣＥＡのＡ１ドメイン、すなわち配列番号１４２のアミノ酸を含むドメインに結合する：

ＰＫＰＳＩＳＳＮＮＳＫＰＶＥＤＫＤＡＶＡＦＴＣＥＰＥＴＱＤＡＴＹＬＷＷＶＮＮＱＳＬＰＶＳＰＲＬＱＬＳＮＧＮＲＴＬＴＬＦＮＶＴＲＮＤＴＡＳ　ＹＫＣＥＴＱＮＰＶＳＡＲＲＳＤＳＶＩＬＮ（配列番号１４２）。

【０１７３】

一態様では、抗体は、本明細書の配列番号１２７のＶＨドメインおよび配列番号１２８のＶＬドメインを有する抗体と同じエピトープに結合し得る。

【０１７４】

スプリット多重特異性抗体のいくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは、互いにＣＥＡの同じエピトープに結合する。したがって、例えば、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、ＣＨ１Ａ１ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープまたは２８Ａ９エピトープに結合し得る。

【０１７５】

いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲおよび／またはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、ＭＦＥ２３もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、２８Ａ９もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得る。例示的な配列が本明細書に開示される。

【０１７６】

他の実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは、ＣＥＡの異なるエピトープに結合する。したがって、例えば、ｉ）一方のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合し得、他方は、Ａ５Ｂ７エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープもしくは２８Ａ９エピトープに結合し得、ｉｉ）一方のヘミボディは、Ａ５Ｂ７エピトープに結合し得、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープ、Ｔ８４．６６エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープもしくは２８Ａ９エピトープに結合し得、ｉｉｉ）一方のヘミボディは、ＭＦＥ２３エピトープに結合し得、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープもしくは２８Ａ９エピトープに結合し得、ｉｖ）一方のヘミボディは、Ｔ８４．６６エピトープに結合し得、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープ、

Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープもしくは２８Ａ９エピトープに結合し得、または、ｖ）一方のヘミボディは、２８Ａ９エピトープに結合し得、他方は、ＣＨ１Ａ１ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、もしくはＴ８４．６６エピトープに結合し得る。

【０１７７】

いくつかの実施形態では、ｉ）一方のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得、他方は、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化バージョン、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化バージョン、ＭＦＥ２３もしくはそのヒト化バージョン、または２８Ａ９もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、ｉｉ）一方のヘミボディは、Ａ５Ｂ７またはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化バージョン、ＭＦＥ２３もしくはそのヒト化バージョン、または２８Ａ９もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、ｉｉｉ）一方のヘミボディは、ＭＦＥ２３またはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化バージョン、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化バージョン、または２８Ａ９もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、ｉｖ）一方のヘミボディは、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化バージョン、ＭＦＥ２３もしくはそのヒト化バージョン、または２８Ａ９もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、ｖ）一方のヘミボディは、２８Ａ９またはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化バージョン、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化バージョン、またはＭＦＥ２３もしくはそのヒト化バージョン由来のＣＥＡ結合配列を有し得る。

【０１７８】

特定の一実施形態では、一方のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合し得、他方は、Ａ５Ｂ７エピトープに結合し得る。第１のヘミボディは、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有し得、第２のヘミボディは、Ａ５Ｂ７（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディは、抗体Ａ５Ｂ７（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得、第２のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有し得る。

【０１７９】

別の特定の実施形態では、一方のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合し得、他方は、Ｔ８４．６６エピトープに結合し得る。第１のヘミボディは、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有し得、第２のヘミボディは、Ｔ８４．６６（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディは、抗体Ｔ８４．６６（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得、第２のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有し得る。いくつかの実施形態では、第１のヘミボディは、Ｔ８４．６６エピトープに結合し得、かつ／または以下の（ｉ）に記載されるような抗原結合部位を有し得、第２のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合し得、かつ／または以下の（ｉｉ）に記載されるような抗原結合部位を有し得る。

【０１８０】

例示的なＣＥＡ結合配列ｉ）～ｖ）を以下に開示する。これらは、ｉ）Ｔ８４．６６、ｉｉ）ＣＨ１Ａ１Ａ、ｉｉｉ）Ａ５Ｂ７、ｉｖ）２８Ａ９およびｖ）ＭＦＥ２３（またはそのヒト化バージョン）由来のＣＥＡ結合配列の例を提供する。

【０１８１】

ｉ）．一実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１

つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含み得る。
【０１８２】
任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含み得る。
【０１８３】
任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。
【０１８４】
任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号１３から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインとを含む。
【０１８５】
別の態様では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１と、（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２と、（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３と、（ｄ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１と、（ｅ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２と、（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３とを含む。
【０１８６】
上記の実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、さらに、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを含む。
【０１８７】
別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号１７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号１７において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号１７のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つまたは３つのＣＤＲを含む。
【０１８８】
別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号１８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む

。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号１８において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号１８のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１８９】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＨと、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＬとを含む。一実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号１７および配列番号１８のＶＨ配列およびＶＬ配列を含み、これらにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０１９０】

ｉｉ）．さらなる特定の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｆ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含み得る。

【０１９１】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含み得る。

【０１９２】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。

【０１９３】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号２１から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインとを含む。

【０１９４】

別の態様では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１と、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２と、（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３と、（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配を含むＣＤＲ－Ｌ１と、（ｅ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２と、（ｆ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３とを含む。

【０１９５】

上記の実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一

実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、さらに、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【０１９６】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号２５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号２５において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号２５のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つまたは３つのＣＤＲを含む。

【０１９７】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号２６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号２６において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号２６のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１９８】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＨと、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＬとを含む。一実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号２５および配列番号２６のＶＨ配列およびＶＬ配列を含み、これらにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０１９９】

ｉｉｉ）さらなる特定の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｆ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含み得る。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、配列ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）を有し得る。

【０２００】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配

列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含み得る。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、配列ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）を有し得る。

【０２０１】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。

【０２０２】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号４５から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインとを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、配列ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）を有し得る。

【０２０３】

別の態様では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１と、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２と、（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３と、（ｄ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１と、（ｅ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２と、（ｆ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３とを含む。いくつかの実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、配列ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）を有し得る。

【０２０４】

上記の実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、さらに、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【０２０５】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号４９のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号４９において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号４９のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列または配列ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２０６】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号５０のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む

。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号５０において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号５０のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２０７】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＨと、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＬとを含む。一実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号４９および配列番号５０のＶＨ配列およびＶＬ配列を含み、これらにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０２０８】

ｉｖ）なおさらなる特定の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｆ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含み得る。

【０２０９】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含み得る。

【０２１０】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。

【０２１１】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号６１から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメインと、（ｂ）（ｉ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインとを含む。

【０２１２】

別の態様では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１と、（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２と、（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３と、（ｄ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１と、（ｅ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２と、（ｆ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３とを含む。

【０２１３】

上記の実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一

実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、さらに、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【０２１４】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号６５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号６５において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号６５のＶＨ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つまたは３つのＣＤＲを含む。

【０２１５】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号６６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、配列番号６６において合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。任意に、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号６６のＶＬ配列を含み、これにはその配列の翻訳後修飾が含まれる。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２１６】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＨと、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＬとを含む。一実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号６５および配列番号６６のＶＨ配列およびＶＬ配列を含み、これらにはそれらの配列の翻訳後修飾が含まれる。

【０２１７】

ｖ）．なおさらなる特定の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１１７または１１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、（ｃ）配列番号１１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３、（ｄ）配列番号１２０、１２１または１２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｅ）配列番号１２３、１２４または１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｆ）配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含み得る。

【０２１８】

任意に、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、

ＶＨ　ＣＤＲ配列（ａ）配列番号１１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１１７もしくは１１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号

１１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３、ならびに／または
ＶＬ　ＣＤＲ配列（ａ）配列番号１２０、１２１もしくは１２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｂ）配列番号１２３、１２４もしくは１２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｃ）配列番号１２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含み得る。

【０２１９】

一実施形態では、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号１２７のアミノ酸配列、または（より好ましくは）配列番号１２９、１３０、１３１、１３２、１３３もしくは１３４から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１２８のアミノ酸配列、または（より好ましくは）配列番号１３５、１３６、１３７、１３８、１３９もしくは１４０から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む。

【０２２０】

上記の実施形態のいずれかにおいて、多重特異性抗体は、ヒト化されていてもよい。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のいずれかにおけるＣＤＲを含み、さらに、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【０２２１】

特定の態様では、ＣＥＡに結合することができる抗原結合ドメインは、
（ａ）配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨドメインおよび配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｂ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＶＨドメインおよび配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｃ）配列番号１３０のアミノ酸配列を含むＶＨドメインおよび配列番号１３９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｄ）配列番号１３４のアミノ酸配列を含むＶＨドメインおよび配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｅ）配列番号１３３のアミノ酸配列を含むＶＨドメインおよび配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｆ）配列番号１３１のアミノ酸配列を含むＶＨドメインおよび配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｇ）配列番号１２９のアミノ酸配列を含むＶＨドメインおよび配列番号１３８のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む。

【０２２２】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記ａ）～ｇ）に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実施形態では、合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。

【０２２３】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記ａ）～ｇ）に記載のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、その配列を含む抗原結合部位は、好ましくは上記の親和性で、ＣＥＡに結合する能力を保持する。特定の実

施形態では、合計で１～１０個のアミノ酸が置換、挿入、および／または欠失されている。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外側の領域で（すなわち、ＦＲで）生じる。

【０２２４】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＨと、上記に提供される実施形態のいずれかにおけるＶＬとを含む。

【０２２５】

Ｆ．例示的な多重特異性抗体

本発明で使用される多重特異性抗体には、様々なフォーマットが可能である。例示的なフォーマットは、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／２０１９５９号に記載されており、そこに記載されているフォーマットのいずれを適用してもよい。具体的な例示的な抗体はまた、国際公開第２０１９／２０１９５９号に記載されており、これらの特異的抗体のいずれもまた、本発明における使用のために選択され得る。

【０２２６】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、Ｆｃドメインを含み得る。Ｆｃ領域の存在は、放射線免疫療法および放射線イメージングの文脈において利点を有し、例えば、タンパク質の循環半減期を延長し、かつ／またはより小さな断片で観察され得るよりも高い腫瘍取込みをもたらす。Ｆｃドメインは、Ｆｃエフェクター機能を低下させるか、または排除するように操作され得る。

【０２２７】

１つの例示的なフォーマットは、第１のヘミボディおよび第２の抗体重鎖ならびに第１のヘミボディおよび第２の抗体軽鎖を含む完全長抗体（例えば、ＩｇＧ）を含み、第１の重鎖および第１の軽鎖は集合して、放射性標識化合物に対する抗原結合部位を形成し、第２の重鎖および第２の軽鎖は集合して、標的抗原に対する抗原結合部位を形成する。

【０２２８】

ヘテロ二量体重鎖の正しいアセンブリは、例えば、ノブ・イントゥ・ホール変異の使用、および／または以下でさらに論じるような他の修飾によって支援され得る。

【０２２９】

軽鎖とそのそれぞれの重鎖との正しいアセンブリは、ｃｒｏｓｓ－ｍａｂ技術を使用することによって支援され得る。このアプローチでは、第１の重鎖と第１の軽鎖、または第２の重鎖と第２の軽鎖のいずれかが集合して、ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片を形成することができる（一方、他のものは集合して従来のＦａｂを形成する）。したがって、一実施形態では、第１の重鎖は、ＶＨドメインの代わりにＶＬドメインを含み得（例えば、ＶＬ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第１の軽鎖は、ＶＬドメインと交換されたＶＨドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ）、または第１の重鎖は、ＨＣ１ドメインの代わりにＣＬドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第１の軽鎖は、ＣＬドメインの代わりにＣＨ１ドメインを含み得る（例えば、ＶＬ－ＣＨ１）。この実施形態では、第２の重鎖および第２の軽鎖は、従来のドメイン構造（例えば、それぞれＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３およびＶＬ－ＣＬ）を有する。代替的な実施形態では、第２の重鎖は、ＶＨドメインの代わりにＶＬドメインを含み得（例えば、ＶＬ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第２の軽鎖は、ＶＬドメインと交換されたＶＨドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ）、または第２の重鎖は、ＨＣ１ドメインの代わりにＣＬドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第２の軽鎖は、ＣＬドメインの代わりにＣＨ１ドメインを含み得る（例えば、ＶＬ－ＣＨ１）。この実施形態では、第１の重鎖および第１の軽鎖は、従来のドメイン構造を有する。

【０２３０】

いくつかの実施形態では、軽鎖とそのそれぞれの重鎖との正しいアセンブリは、以下でさらに論じるように、電荷修飾を使用することによって追加的または代替的に支援され得る。

【０２３１】

上記フォーマットのいくつかの実施形態では、フォーマットは二価であり得る。別の可能な実施形態では、さらなる抗原結合部分を、例えば、第１のヘミボディおよび／または第２の重鎖に融合して、一方または両方の抗原の結合価を増加させてもよい。例えば、標的抗原に対するさらなる抗原結合部分は、重鎖分子の一方または両方のＮ末端に融合され得る。いくつかの実施形態では、抗体は、腫瘍関連抗原に対しては多価、例えば二価であり、放射性標識化合物に対しては一価であり得る。

【０２３２】

さらなる抗原結合部分は、例えば、例えば第１の抗原（例えば、腫瘍関連抗原）に対する抗原結合部位を含む、ｓｃＦａｂであり得る。別の実施形態では、さらなる抗原結合部分は、Ｆａｂまたはｃｒｏｓｓ－Ｆａｂである。例えば、重鎖の１つのＮ末端またはＣ末端は、ポリペプチドリンカーを介して、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインからなる第１のポリペプチドに連結され得、第１のポリペプチドは、ＶＬドメインおよびＣＬドメインからなる第２のポリペプチドと会合して、Ｆａｂを形成する。別の実施形態では、重鎖の１つのＮ末端またはＣ末端は、ポリペプチドリンカーを介して、ＶＬドメインおよびＣＨ１ドメインからなる第１のポリペプチドに連結され得、第１のポリペプチドは、ＶＨドメインおよびＣＬドメインからなる第２のポリペプチドと会合する。別の実施形態では、重鎖の１つのＮ末端またはＣ末端は、ポリペプチドリンカーを介して、ＶＨドメインおよびＣＬドメインからなる第１のポリペプチドに連結され得、第１のポリペプチドは、ＶＬドメインおよびＣＨ１ドメインからなる第２のポリペプチドと会合する。

【０２３３】

このフォーマットでは、同じ抗原特異性の結合アームが、同じ軽鎖との会合によって形成されることが好ましい場合がある。したがって、標的抗原に対する抗原結合部分／アームは、ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂであり得、放射性標識化合物に対する抗原結合部分（複数可）／アーム（複数可）は、従来のＦａｂであり得る。あるいは、標的抗原に対する抗原結合部分／アームは、従来のＦａｂであり得、放射性標識化合物に対する抗原結合部分（複数可）／アーム（複数可）は、ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂであり得る。

【０２３４】

フォーマットはまた、以下でさらに論じるように、電荷修飾を組み込み得る。

【０２３５】

別の例示的なフォーマットは、放射性標識化合物に対する抗原結合部分に連結された、標的抗原に対する抗原結合部位を含む（例えば、標的抗原に対して二価であり得る）ＩｇＧなどの完全長抗体を含む。

【０２３６】

例えば、放射性標識化合物に対する抗原結合部分は、放射性標識化合物（例えば、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレート）に対する抗原結合部位を含むｓｃＦａｂであり得る。いくつかの実施形態では、ｓｃＦａｂは、完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端、例えばそのＣＨ３ドメインのＣ末端に融合され得る。ヘテロ二量体重鎖の正しいアセンブリは、例えば、ノブ・イントゥ・ホール変異の使用、および／または以下でさらに論じるような他の修飾によって支援され得る。

【０２３７】

別の例示的なフォーマットは、標的抗原に対する抗原結合部位を含む（例えば、標的抗原に対して二価であり得る）完全長抗体を含み、重鎖の１つのＮ末端またはＣ末端は、ポリペプチドリンカーを介して第１のポリペプチドに連結されており、第１のポリペプチドは第２のポリペプチドと会合して、放射性標識化合物に対する結合部位を含むＦａｂまたはｃｒｏｓｓ－Ｆａｂを形成する。例えば、このフォーマットは、

ｉ）ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインからなる第１のポリペプチドであって、ＶＬドメインおよびＣＬドメインからなる第２のポリペプチドと会合している第１のポリペプチド、または

ｉｉ）ＶＬドメインおよびＣＨ１ドメインからなる第１のポリペプチドであって、ＶＨドメインおよびＣＬドメインからなる第２のポリペプチドと会合している第１のポリペプ

チド、または
ｉｉｉ）ＶＨドメインおよびＣＬドメインからなる第１のポリペプチドであって、ＶＬドメインおよびＣＨ１ドメインからなる第２のポリペプチドと会合している第１のポリペプチドを、
第１のポリペプチドおよび第２のポリペプチドが一緒になって、放射性標識化合物に対する抗原結合部位を形成するように、含み得る。
【０２３８】
ヘテロ二量体重鎖の正しいアセンブリは、例えば、ノブ・イントゥ・ホール変異の使用、および／または電荷修飾を含む以下でさらに論じるような他の修飾によって支援され得る。例えば、完全長抗体のＦａｂドメインは、電荷修飾を含み得る。
【０２３９】
別の例示的なフォーマットでは、抗体は、
ａ）標的抗原に特異的に結合し、２つの抗体重鎖と２つの抗体軽鎖とからなる完全長抗体と、
ｂ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、またはｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）、または
ｉｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）からなるポリペプチドであって、
当該ポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端によって、ペプチドリンカーを介して、当該完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、
ｃ）
ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または
ｉｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）、または
ｉｉｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）からなるポリペプチドであって、
当該ポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端によって、ペプチドリンカーを介して、当該完全長抗体の２つの重鎖のうちの他方のＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含む、二重特異性抗体であり得、
（ｂ）のペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）および（ｃ）のペプチドの抗体軽鎖可変ドメインは一緒になって、放射性標識化合物に対する抗原結合部位を形成する。
【０２４０】
このフォーマットでは、第１のポリペプチドがｂ（ｉ）に示すとおりである場合、第２のポリペプチドはｃ（ｉ）に示すとおりであり、第１のポリペプチドがｂ（ｉｉ）に示すとおりである場合、第２のポリペプチドはｃ（ｉｉ）に示すとおりであり、第１のポリペプチドがｂ（ｉｉｉ）に示すとおりである場合、第２のポリペプチドはｃ（ｉｉｉ）に示すとおりである。電荷修飾置換は、例えば、完全長抗体のＦａｂにおいても使用され得る。
【０２４１】
任意に、構造を安定化してもよく、それにより、（ｂ）のポリペプチドの抗体重鎖可変領域（ＶＨ）および（ｃ）のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、以下の位置（ナンバリングは常にＫａｂａｔ　ＥＵインデックスに従う）の間にジスルフィド結合を導入することによって、鎖間ジスルフィド架橋を介して連結され、安定化される：
ｉ）重鎖可変ドメインの４４位から軽鎖可変ドメインの１００位まで、
ｉｉ）重鎖可変ドメインの１０５位から軽鎖可変ドメインの４３位まで、または
ｉｉｉ）重鎖可変ドメインの１０１位から軽鎖可変ドメインの１００位まで。
【０２４２】
（ｂ）の抗体がＶＨドメインからなり、（ｃ）の抗体がＶＬドメインからなる上記のフォーマットの例は、国際公開第２０１９／２０１９５９号に記載のＰＲＩＴ２１３（ＰＲＩＴ－０２１３とも呼ばれる）およびＰＲＩＴ２１４（ＰＲＩＴ－０２１４とも呼ばれる

）である。したがって、特定の実施形態では、本発明において使用するための多重特異性抗体は、
ｉ）配列番号２２のアミノ酸配列を有する第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号２３のアミノ酸配列を有する第２の重鎖、および
ｉｉｉ）配列番号２１のアミノ酸配列を有する２つの抗体軽鎖を含み得、
配列ナンバリングは、国際公開第２０１９／２０１９５９号の配列ナンバリングである。

【０２４３】
別の実施形態では、本発明において使用するための多重特異性抗体は、
ｉ）配列番号１９のアミノ酸配列を有する第１の重鎖、
ｉｉ）配列番号２０のアミノ酸配列を有する第２の重鎖、および
ｉｉｉ）配列番号２１のアミノ酸配列を有する２つの抗体軽鎖を含み得、
配列ナンバリングは、国際公開第２０１９／２０１９５９号の配列ナンバリングである。

【０２４４】
Ｇ．スプリット多重特異性抗体の例示的なフォーマット
他の実施形態では、併用療法において使用するための抗体は、スプリット多重特異性抗体であり得る。スプリット多重特異性抗体は、
ｉ）標的細胞の表面上に発現される抗原に結合し、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインをさらに含むが、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない、第１のヘミボディと、
ｉｉ）標的細胞の表面上に発現される抗原に結合し、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインをさらに含むが、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まない、第２のヘミボディと、を含み得、
第１のヘミボディの当該ＶＨドメインおよび第２のヘミボディの当該ＶＬドメインは一緒になって、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる。

【０２４５】
第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは、同じまたは異なるエピトープで同じ標的抗原に結合し得る。

【０２４６】
いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、Ｆｃドメインを含み得る。Ｆｃドメインは、Ｆｃエフェクター機能を低下させるか、または排除するように操作され得る。

【０２４７】
いくつかの実施形態では、上述のように、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインがそのＣ末端において遊離している（例えば、そのＣ末端を介して別のドメインに融合されていない）場合、それは、ＨＡＶＨ自己抗体の結合を回避するために１つ以上の残基によって伸長され得る。例えば、伸長は、１～１０残基、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０残基によるものであり得る。一実施形態では、それは、１つ以上のアラニン残基、任意に１つのアラニン残基によって伸長され得る。ＶＨ配列はまた、ＣＨ１ドメインのＮ末端部分によって、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基によって伸長され得る。（ヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインの最初の１０残基はＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰであるため、一実施形態では、１～１０残基はこの配列のＮ末端から取り出され得る）。例えば、一実施形態では、ペプチド配列ＡＳＴ（ＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインの最初の３残基に対応する）が、ＶＨ領域のＣ末端に付加される。いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原（例えば、腫瘍関連抗原）に対して多価、例えば二価であり得る。これは、アビディティを高めるという利点を有する。

【０２４８】
いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディが会合すると、そ

れらは放射性標識化合物に対して一価である抗体複合体を形成することが好ましい場合がある。したがって、第１のヘミボディは、放射性標識化合物に対する抗原結合部位の１つのみのＶＨドメインを含み得、第２のヘミボディは、放射性標識化合物に対する抗原結合部位の１つのみのＶＬドメインを含み得、その結果、それらは一緒になって、放射性標識化合物に対する１つのみの完全な機能的結合部位を形成する。

【０２４９】

ヘミボディはそれぞれ、ｉ）標的抗原に結合することができる少なくとも１つの抗原結合部分（例えば、抗体断片）と、ｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインのいずれかと、ｉｉｉ）任意にＦｃ領域とを含み得る。抗体断片は、例えば、標的抗原に特異的な抗原結合部位を含む、少なくとも１つのＦｖ、ｓｃＦｖ、Ｆａｂまたはｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片であり得る。抗原結合部分（例えば、抗体断片）は、ａ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインもしくはＶＨドメインのいずれかに、またはｂ）抗体がＦｃ領域を含む場合、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインもしくはＶＨドメインのいずれかに融合されているＦｃ領域に融合され得る。いくつかの実施形態では、Ｆｃ領域のＣ末端は、ＶＬドメインまたはＶＨドメインのＮ末端に融合される。

【０２５０】

融合は、直接的であっても間接的であってもよい。いくつかの実施形態では、融合は、リンカーを介してもよい。例えば、Ｆｃ領域は、ヒンジ領域または別の好適なリンカーを介して、抗体断片に融合され得る。同様に、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬまたはＶＨドメインと抗体構造の残りの部分との接続は、リンカーを介して行われ得る。特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、

ａ）ｓｃＦｖ断片であって、ｓｃＦｖ断片が標的抗原に結合する、ｓｃＦｖ断片と、

ｂ）

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または

ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメインであって、ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメインを含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

当該ポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、ｓｃＦｖ断片のＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得る。

【０２５１】

第２のヘミボディは、

ｃ）標的抗原に結合する第２のｓｃＦｖと、

ｄ）

ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または

ｉｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインであって、ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインを含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

当該ポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、ｓｃＦｖ断片のＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得る。

【０２５２】

第１のヘミボディの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および第２のヘミボディの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は一緒になって、２つのヘミボディの会合時に、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０２５３】

任意に、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含み得る。任意に、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端から

の、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０２５４】

ｓｃＦｖの重鎖および軽鎖の標的抗原認識可変ドメインは、ペプチドテザーによって接続され得る。そのようなペプチドテザーは、１～２５個のアミノ酸、好ましくは１２～２０個のアミノ酸、好ましくは１２～１６個または１５～２０個のアミノ酸を含み得る。上記テザーは、１つ以上の（G_3S）および／または（G_4S）モチーフ、特に１つ、２つ、３つ、４つ、５つまたは６つの（G_3S）および／または（G_4S）モチーフ、好ましくは３つまたは４つの（G_3S）および／または（G_4S）モチーフ、より好ましくは３つまたは４つの（Ｇ４Ｓ）モチーフを含み得る。

【０２５５】

任意に、第１のヘミボディは、上記の成分（ａ）および（ｂ）から本質的になり得るか、またはそれらからなり得、第２のヘミボディは、上記の成分（ｃ）および（ｄ）からなり得るか、またはそれらから本質的になり得る。いずれの場合でも、第１のヘミボディは、第１のヘミボディの成分（ｂ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず、第２のヘミボディは、第２のヘミボディの成分（ｄ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含まない。

【０２５６】

別の特定の実施形態では、第１のヘミボディは、

ａ）標的抗原に結合するＦａｂ断片と、

ｂ）

ｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または

ｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメインであって、ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメインを含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

ポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆａｂ断片のＣＬまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得る。

【０２５７】

第２のヘミボディは、

ｃ）標的抗原に結合するＦａｂ断片と、

ｄ）

ｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または

ｉｖ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインであって、ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインを含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

ポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆａｂ断片のＣＬまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得る。

【０２５８】

（ｂ）のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および（ｄ）のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は一緒になって（すなわち２つのヘミボディの会合時に）、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０２５９】

任意に、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、上記のＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残

基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含み得る。任意に、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０２６０】

任意に、第１のヘミボディは、上記の成分（ａ）および（ｂ）から本質的になり得るか、またはそれらからなり得、第２のヘミボディは、上記の成分（ｃ）および（ｄ）からなり得るか、またはそれらから本質的になり得る。いずれの場合でも、第１のヘミボディは、第１のヘミボディの成分（ｂ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず、第２のヘミボディは、第２のヘミボディの成分（ｄ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含まない。

【０２６１】

ポリペプチドに融合されているＦａｂ断片の鎖は、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディに対して独立して選択され得る。したがって、一実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１のヘミボディのＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されており、（ｄ）のポリペプチドは、第２のヘミボディのＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されている。別の実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１のヘミボディのＦａｂ断片のＣＬドメインのＣ末端に融合されており、（ｄ）のポリペプチドは、第２のヘミボディのＦａｂ断片のＣＬドメインのＣ末端に融合されている。別の実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１のヘミボディのＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されており、（ｄ）のポリペプチドは、第２のヘミボディのＦａｂ断片のＣＬドメインのＣ末端に融合されている。さらなる実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１のヘミボディのＦａｂ断片のＣＬドメインのＣ末端に融合されており、（ｄ）のポリペプチドは、第２のヘミボディのＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されている。

【０２６２】

上記のように、いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原（例えば、腫瘍関連抗原）に対して多価、例えば二価であり得る。これは、アビディティを高めるという利点を有する。ヘミボディは、多価、例えば二価であり得、それぞれ特定のエピトープ（第１のヘミボディおよび第２のヘミボディに対して同じエピトープであってもよく、または第１のヘミボディおよび第２のヘミボディに対して異なっていてもよい）に対して単一特異性であり得る。したがって、いくつかの実施形態では、第１のヘミボディは、ｉ）標的抗原の同じエピトープに結合することができる２つ以上の抗原結合部分（例えば、抗体断片）と、ｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインのいずれか（両方ではない）と、ｉｉｉ）任意にＦｃ領域とを含み得る。第２のヘミボディは、ｉ）標的抗原の同じエピトープに結合することができる２つ以上の抗原結合部分（例えば、抗体断片）と、ｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインのいずれか（両方ではない）と、ｉｉｉ）任意にＦｃ領域とを含み得る。上述のように、エピトープは、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディに対して同じであってもよく、または第１のヘミボディおよび第２のヘミボディに対して異なっていてもよい。

【０２６３】

例えば、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディの各々は、タンデムＦａｂ、すなわち、ペプチドリンカーを介して接続されている２つのＦａｂ断片（Ｆａｂ－リンカー－Ｆａｂ）を含み得、第１のＦａｂは、そのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続されている。

【０２６４】

一実施形態では、第１のヘミボディは、

ａ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、同じ標的抗原（「標的抗原Ａ」）に結合し、第１のＦａｂ断片によって結

合されたエピトープが、第２のＦａｂ断片によって結合されたエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドリンカーを介して接続されており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続されている、タンデムＦａｂと、

ｂ）

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または

ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体定常ドメイン（ＣＨ１）であって、ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体定常ドメイン（ＣＨ１）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

当該ポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２のＦａｂ断片のＣＬまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み、

第２のヘミボディは、

ｃ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、標的抗原Ａに結合し、第１のＦａｂ断片によって結合されたエピトープが、第２のＦａｂ断片によって結合されたエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドリンカーを介して接続されており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続されている、タンデムＦａｂと、

ｄ）

ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または

ｉｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）であって、ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

当該ポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２のＦａｂ断片のＣＬまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含む。

【０２６５】

（第１のヘミボディにおける）部分ｂの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および（第２のヘミボディにおける）部分（ｄ）の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は一緒になって、すなわち２つのヘミボディの会合時に、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０２６６】

任意に、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含み得る。任意に、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０２６７】

ポリペプチドに融合されているＦａｂタンデムの鎖（すなわち、ポリペプチドが第２のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインに融合されているかどうか）は、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディに対して独立して選択され得る。

【０２６８】

上述のように、Ｆａｂタンデムの第１のＦａｂ断片は、第２のＦａｂ断片のＮ末端に接続されている。一実施形態では、第１のＦａｂ断片の重鎖断片のＣ末端は、第２のＦａｂ断片の重鎖断片または軽鎖断片のＮ末端に接続されている。別の実施形態では、第１のＦａｂ断片の軽鎖断片のＣ末端は、第２のＦａｂ断片の重鎖断片または軽鎖断片のＮ末端に接続されている。したがって、いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディのＦａｂタンデムは、以下のように３つの鎖を含み得る：

１）第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１）、ペプチドリンカーを介して第２のＦａｂ断片の重鎖断片に接続された第１のＦａｂ断片の重鎖断片（（ＶＨＣＨ１）１－リンカー－（ＶＨＣＨ１）２）、および第２のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）２）、または

２）第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１）、ペプチドリンカーを介して第２のＦａｂ断片の軽鎖断片に接続された第１のＦａｂ断片の重鎖断片（（ＶＨＣＨ１）１－リンカー－（ＶＬＣＬ）２）、および第２のＦａｂ断片の重鎖断片（（ＶＨ－ＣＨ１）２）、または

３）第１のＦａｂ断片の重鎖断片（ＶＨＣＨ１）、ペプチドリンカーを介して第２のＦａｂ断片の軽鎖断片に接続された第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１－リンカー－（ＶＬＣＬ）２）、および第２のＦａｂ断片の重鎖断片、または

４）第１のＦａｂ断片の重鎖断片（ＶＨＣＨ１）、ペプチドリンカーを介して第２のＦａｂ断片の重鎖断片に接続された第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１－リンカー－（ＶＨＣＨ１）２）、および第２のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）２）。

【０２６９】

別の実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原の２つ以上の、任意に２つの異なるエピトープに結合し得る。したがって、ヘミボディの一方または両方は、標的抗原に対してバイパラトピックであり得る。いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、ｉ）標的抗原の第１のエピトープに結合することができる抗原結合部分（例えば、抗体断片）と、ｉｉ）標的抗原の第２のエピトープに結合することができる抗原結合部分（例えば、抗体断片）と、ｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインのいずれか（両方ではない）と、ｉｖ）任意にＦｃ領域とを含み得る。

【０２７０】

このような実施形態では、軽鎖とそのそれぞれの重鎖との正しいアセンブリは、ｃｒｏｓｓ－ｍａｂ技術を使用することによって支援され得る。例えば、一実施形態では、各ヘミボディは、１つのＦａｂおよび１つのｃｒｏｓｓ－Ｆａｂを含むタンデムＦａｂを含み得、Ｆａｂおよびｃｒｏｓｓ－Ｆａｂから選択される一方の断片は、第１のエピトープに特異的であり、他方は、第２のエピトープに特異的である。

【０２７１】

特定の一例では、第１のヘミボディは、

ａ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端によって、ペプチドリンカーを介して、第２の断片のＮ末端に接続されており、第１の断片が、標的抗原の第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原の第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方がｃｒｏｓｓ－Ｆａｂである、タンデムＦａｂと、

ｂ）

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または

ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）であって、ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

当該ポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得る。

【０２７２】

第２のヘミボディは、

ｃ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端によって、第２の断片のＮ末端に接続されており、第１の断片が、標的抗原の第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原の第２のエピトープに結合し、第１の断

片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方がｃｒｏｓｓ－Ｆａｂである、タンデムＦａｂと、
ｄ）
ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または
ｉｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）であって、ＶＬドメインのＣ末端が軽鎖定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、
当該ポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得る。

【０２７３】
第１のヘミボディの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および第２のヘミボディの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は一緒になって、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０２７４】
任意に、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含み得る。任意に、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０２７５】
タンデムＦａｂが１つの従来のＦａｂおよび１つのｃｒｏｓｓ－Ｆａｂを含む限り、第１または第２の断片のいずれかは、ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂであり得る。

【０２７６】
上記のタンデムＦａｂの実施形態のいずれか（ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂを含むものを含む）において、任意に、第１のヘミボディは、成分（ａ）および（ｂ）から本質的になり得るか、またはそれらからなり得、第２のヘミボディは、成分（ｃ）および（ｄ）からなり得るか、またはそれらから本質的になり得る。いずれの場合でも、第１のヘミボディは、第１のヘミボディの成分（ｂ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず、第２のヘミボディは、第２のヘミボディの成分（ｄ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含まない。

【０２７７】
上記のように、いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、エフェクター機能を低下させるか、または排除するように任意に操作されたＦｃドメインを含み得る。

【０２７８】
一実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディの各々は、ｉ）ＦｃドメインとＩｉ）標的抗原に結合することができる少なくとも１つの抗原結合部分（例えば、抗体断片、例えば、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂまたはｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片）と、ｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインのいずれか（両方ではない）とを含み得る。

【０２７９】
任意に、Ｆｃドメインを含むヘミボディは、標的抗原への結合に関して一価であり得る。他の実施形態では、それらは多価、例えば二価であり得る。第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原の同じエピトープに対して多価および単一特異性であり得る。さらに他の実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原の異なるエピトープに対する結合部位を有し得、例えば、それらはバイパラトピックであり得る。

【０２８０】
抗体断片は、ｓｃＦｖであり得る。したがって、一実施形態では、第１のヘミボディは、
ａ）ｓｃＦｖ断片であって、ｓｃＦｖ断片が標的抗原に結合する、ｓｃＦｖ断片と、
ｂ）Ｆｃドメインと、
ｃ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または
ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）であって、ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
（ａ）のｓｃＦｖは、ＦｃドメインのＮ末端に融合されており、ｃ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、ＦｃドメインのＣ末端に融合されている。
【０２８１】
任意に、部分ｃ（ｉ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含み得る。任意に、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。
【０２８２】
第２のヘミボディは、
ｄ）標的抗原に結合する第２のｓｃＦｖと、
ｅ）Ｆｃドメインと、
ｆ）
ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または
ｉｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）であって、ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
（ｄ）のｓｃＦｖは、ＦｃドメインのＮ末端に融合されており、（ｆ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、ＦｃドメインのＣ末端に融合されている。
【０２８３】
別の実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原に対するＦａｂ（例えば、標的抗原に対する単一のＦａｂ）およびＦｃドメインを含む１アームＩｇＧであり得る。したがって、第１のヘミボディは、
ｉ）完全な軽鎖断片と、
ｉｉ）完全な重鎖と、
ｉｉｉ）Ｆｄを欠くさらなるＦｃ鎖と、
ｉｖ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
（ｉ）の軽鎖および（ｉｉ）の重鎖は一緒になって、標的抗原に対する抗原結合部位を提供し、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドは、そのＮ末端によって、好ましくはリンカーを介して、（ｉｉ）または（ｉｉｉ）のいずれかのＣ末端に融合されている。
【０２８４】
第２のヘミボディは、
ｖ）完全な軽鎖断片と、
ｖｉ）完全な重鎖と、

ｖｉｉ）Ｆｄを欠くさらなるＦｃ鎖と、
ｖｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
（ｖ）の軽鎖および（ｖｉ）の重鎖は一緒になって、標的抗原に対する抗原結合部位を提供し、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドは、そのＮ末端によって、好ましくはリンカーを介して、（ｖｉ）または（ｖｉｉ）のいずれかのＣ末端に融合されている。

【０２８５】

放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドは、

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）であって、この場合、ポリペプチドが、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基、もしくは任意に上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分をさらに含み得る、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または
ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）であって、ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドであり得る。

【０２８６】

放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドは、

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または
ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインであって、ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインを含むか、またはそれらからなるポリペプチドであり得る。

【０２８７】

第１のヘミボディおよび第２のヘミボディがヘテロ二量体である場合、例えば、１アームＩｇＧの場合、それらのアセンブリは、下記にさらに記載されるように、ノブ・イントゥ・ホール技術の使用によって支援され得る。

【０２８８】

別の実施形態では、ヘミボディはそれぞれ、上記のタンデムＦａｂ（例えば、２つのＦａｂ断片を含み、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が両方とも標的抗原Ａの同じエピトープに結合する、またはＦａｂおよびｃｒｏｓｓ－Ｆａｂを含み、その一方が標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、他方が標的抗原Ａの第２のエピトープに結合する）を含み得、Ｆａｂタンデムは、ＦｃドメインのＮ末端に（例えば、そのＣ末端を介して）融合されており、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨまたはＶＬドメインを含むか、またはそれらからなるペプチドは、ＦｃドメインのＣ末端に（例えば、そのＮ末端を介して）融合されている。

【０２８９】

したがって、第１のヘミボディは、

ａ）
ｉ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、標的抗原Ａに結合し、第１のＦａｂ断片によって結合されたエピトープが、第２のＦａｂ断片によって結合されたエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続されており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続されている、タンデムＦａｂ、ならびに
ｉｉ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端によって、ペプチドテザーを介して、第２の断片のＮ末端に接続されており、第１の断片が、標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原Ａの第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａ

ｂであり、他方がｃｒｏｓｓ－ＦａｂであるタンデムＦａｂ、から選択されるタンデムＦａｂと、
ｂ）Ｆｃドメインと、
ｃ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または
ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）であって、ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
タンデムＦａｂは、Ｆｃドメインの鎖の１つのＮ末端に融合されており、ｃ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆｃドメインの鎖の１つのＣ末端に融合されている。

【０２９０】

任意に、部分ｃ（ｉ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含み得る。任意に、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０２９１】

第２のヘミボディは、
ｄ）
ｉ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、標的抗原Ａに結合し、第１のＦａｂ断片によって結合されたエピトープが、第２のＦａｂ断片によって結合されたエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続されており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続されている、タンデムＦａｂ、ならびに
ｉｉ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端によって、ペプチドテザーを介して、第２の断片のＮ末端に接続されており、第１の断片が、標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原Ａの第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方がｃｒｏｓｓ－Ｆａｂである、タンデムＦａｂ、から選択されるタンデムＦａｂと、
ｅ）Ｆｃドメインと、
ｆ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または
ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインであって、ＶＬドメインのＣ末端が軽鎖定常ドメインのＮ末端に融合されている、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメインを含むか、またはそれらからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
（ｄ）のタンデムＦａｂは、Ｆｃドメインの鎖の１つのＮ末端に融合されており、（ｆ）のポリペプチドは、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆｃドメインの鎖の１つのＣ末端に融合されている。

【０２９２】

第１のヘミボディのＶＨドメインおよび第２のヘミボディのＶＬドメインは一緒になって、すなわち２つの抗体の会合時に、放射性標識化合物に対する抗原結合部位を形成する。

【０２９３】

第１のヘミボディが（ａ）（ｉ）によるタンデムＦａｂを含む場合、一般に、第２のヘミボディはｄ（ｉ）によるタンデムＦａｂを含むことになり、第１のヘミボディが（ａ）（ｉｉ）によるタンデムＦａｂを含む場合、一般に、第２のヘミボディはｄ（ｉｉ）によ

るタンデムＦａｂを含むことになる。
【０２９４】
タンデムＦａｂは、一般に上記のとおりであり得る。例えば、タンデムＦａｂは、上記の鎖のセットのいずれかから構成され得る。一般に、第２のＦａｂ（ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂであってもよい）の重鎖断片は、Ｆｃドメインに連結され得る。
【０２９５】
さらなる実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディの各々は、ａ）第１のサブユニットおよび第２のサブユニットを含むＦｃドメインと、ｂ）標的抗原に結合することができる少なくとも１つの抗原結合部分（例えば、標的抗原に対する抗原結合部位を含む、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂまたはｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ断片などの抗体断片）と、ｃ）放射性標識化合物の抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインのいずれかを含むポリペプチドとを含み得、（ｂ）の抗原結合部分（例えば、抗体断片）のＣ末端は、Ｆｃドメインの第１のサブユニットのＮ末端に融合されており、（ｃ）のポリペプチドのＣ末端は、Ｆｃドメインの第２のサブユニットのＮ末端に融合されている。（ｂ）の抗体断片の融合は、好ましくはヒンジ領域を介する。（ｃ）のポリペプチドの融合は、ポリペプチドのＣ末端とＦｃ領域のＮ末端との間に配置されたリンカーを介する、かつ／または上部ヒンジ領域（例えば、ＥＵナンバリングインデックスによるＡｓｐ２２１およびそれに対する残基Ｃ末端）の一部もしくは全部を介するものであり得る。一実施形態では、（ｂ）の抗体断片は、Ｆａｂ断片であり得る。一実施形態では、第１のヘミボディにおいて、（ｃ）のポリペプチドは、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインからなり、第２のヘミボディにおいて、（ｃ）のポリペプチドは、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインからなる。
【０２９６】
したがって、一実施形態では、第１のヘミボディは、
ｉ）完全な軽鎖と、
ｉｉ）完全な重鎖と、
ｉｉｉ）さらなるＦｃ鎖と、
ｉｖ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
（ｉ）の軽鎖および（ｉｉ）の重鎖は一緒になって、標的抗原に対する抗原結合部位を提供し、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドは、そのＣ末端によって、好ましくはリンカーを介して、（ｉｉｉ）のＮ末端に融合されている。
【０２９７】
第２のヘミボディは、
ｖ）完全な軽鎖と、
ｖｉ）完全な重鎖と、
ｖｉｉ）さらなるＦｃ鎖と、
ｖｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドと、を含み得るか、またはそれらからなり得、
（ｖ）の軽鎖および（ｖｉ）の重鎖は一緒になって、標的抗原に対する抗原結合部位を提供し、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはそれからなるポリペプチドは、そのＣ末端によって、好ましくはリンカーを介して、（ｖｉｉ）のＮ末端に融合されている。
【０２９８】
リンカーは、当業者に公知のまたは本明細書に記載の任意の柔軟なリンカー、例えばリンカーＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＳＧＧ（配列番号１５２）を含み得る。リンカーは、上部ヒンジ領域全体の一部をさらに含んでいてもよく、例えば、Ａｓｐ２２１からＦｃ鎖の開始部（例えば、Ｃｙｓ２２６において）まで及んでいてもよい。
【０２９９】

なおさらなる実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原に対する抗原結合部位を有する完全長抗体を含み、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインのいずれかをさらに含む。

【０３００】

特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、

ａ）２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる第１の完全長抗体であって、完全長抗体の少なくとも１つのアームが標的抗原に結合する、第１の完全長抗体と、

ｂ）

ｉ）さらなる抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または

ｉｉ）さらなる抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）およびさらなる抗体定常ドメイン（ＣＨ１）であって、ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合されている、さらなる抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）およびさらなる抗体定常ドメイン（ＣＨ１）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

当該ポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、当該第１の完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得る。

【０３０１】

第２のヘミボディは、

ｃ）２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる第２の完全長抗体であって、完全長抗体の少なくとも１つのアームが標的抗原に結合する、第２の完全長抗体と、

ｄ）

ｉ）さらなる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または

ｉｉ）さらなる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）およびさらなる抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）であって、ＶＬドメインのＣ末端がＣＬドメインのＮ末端に融合されている、さらなる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）およびさらなる抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を含むか、またはそれらからなるポリペプチドであって、

当該ポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、当該第２の完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に融合されている、ポリペプチドと、を含み得る。

【０３０２】

第１のヘミボディの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および第２のヘミボディの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は一緒になって、すなわち２つの抗体の会合時に、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０３０３】

任意に、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含み得る。任意に、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０３０４】

任意に、第１のヘミボディは、上記の成分（ａ）および（ｂ）から本質的になり得るか、またはそれらからなり得、第２のヘミボディは、上記の成分（ｃ）および（ｄ）から本質的になり得るか、またはそれらからなり得る。いずれの場合でも、第１のヘミボディは、第１のヘミボディの成分（ｂ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず、第２のヘミボディは、第２のヘミボディの成分（ｂ）と会合して放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる抗体重鎖可変（ＶＨ）ドメインを含まない。

【０３０５】

完全長抗体の両アームが同じ標的抗原に対して結合特異性を有することが好ましい場合がある。抗体が標的抗原に対して二価である場合、完全長抗体の両アームは、同じ標的抗

原の同じエピトープに結合し得る。
【０３０６】
別の実施形態では、抗体は、標的抗原に対してバイパラトピックであり得、例えば、完全長抗体の１つのアームは、標的抗原の第１のエピトープに結合し得、１つのアームは、標的抗原の第２のエピトープに結合し得る。このような実施形態では、抗体の１つのアームはＦａｂを含み得、１つのアームはｃｒｏｓｓ－Ｆａｂを含み得、軽鎖とそのそれぞれの重鎖との正しいアセンブリを支援する。したがって、一実施形態では、完全長抗体の第１の重鎖は、ＶＨドメインの代わりにＶＬドメインを含み得（例えば、ＶＬ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第１の軽鎖は、ＶＬドメインと交換されたＶＨドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ）、または第１の重鎖は、ＨＣ１ドメインの代わりにＣＬドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第１の軽鎖は、ＣＬドメインの代わりにＣＨ１ドメインを含み得る（例えば、ＶＬ－ＣＨ１）。この実施形態では、第２の重鎖および第２の軽鎖は、従来のドメイン構造（例えば、それぞれＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３およびＶＬ－ＣＬ）を有する。代替的な実施形態では、完全長抗体の第２の重鎖は、ＶＨドメインの代わりにＶＬドメインを含み得（例えば、ＶＬ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第２の軽鎖は、ＶＬドメインと交換されたＶＨドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ）、または第２の重鎖は、ＨＣ１ドメインの代わりにＣＬドメインを含み得（例えば、ＶＨ－ＣＬ－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）、第２の軽鎖は、ＣＬドメインの代わりにＣＨ１ドメインを含み得る（例えば、ＶＬ－ＣＨ１）。この実施形態では、第１の重鎖および第１の軽鎖は、従来のドメイン構造を有する。
【０３０７】
ヘミボディのさらに別の可能なフォーマットでは、
ｉ）第１のヘミボディは、
ａ）標的細胞の表面上に発現される抗原に結合することができる抗原結合部分（例えば、抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片）と、
ｂ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドと、
ｃ）２つのサブユニットを含むＦｃドメインと、を含み、
（ｂ）のポリペプチドは、そのＮ末端によって、（ａ）の抗原結合部分のＣ末端に（例えば、（ａ）のＦａｂ断片の鎖の１つのＣ末端に）融合されており、そのＣ末端によって、（ｃ）のＦｃドメインのサブユニットの１つのＮ末端に融合されており、
第１のヘミボディは、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まず、かつ
ｉｉ）第２のヘミボディは、
ｄ）標的細胞の表面上に発現される抗原に結合することができる抗原結合部分（例えば、抗体断片、例えば、Ｆａｂ）と、
ｅ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドと、
ｆ）２つのサブユニットを含むＦｃドメインと、を含み、
（ｅ）のポリペプチドは、そのＮ末端によって、（ｄ）の抗原結合部分のＣ末端に（例えば、（ｄ）のＦａｂ断片の鎖の１つのＣ末端に）融合されており、そのＣ末端によって、（ｆ）のＦｃドメインのサブユニットの１つのＮ末端に融合されており、
第２のヘミボディは、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まず、
第１のヘミボディの当該ＶＨドメインおよび第２のヘミボディの当該ＶＬドメインは一緒になって、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる。
【０３０８】
融合は、例えばペプチドリンカーを介して、直接的または間接的であり得る。
【０３０９】
いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディは、標的

抗原に結合する別の抗原結合部分（例えば、さらなる抗体断片）、例えば、標的抗原に結合する別のＦａｂ断片をさらに含む。したがって、いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディ（一般に両方）はそれぞれ、標的抗原に結合することができる２つの抗原結合部分を含む。ヘミボディの２つの抗原結合部分は、好ましくは、同じまたは異なるエピトープで、互いに同じ標的抗原に結合することができる。任意に、第１の抗体および第２の抗体はそれぞれ、標的抗原に結合することができる２つ以下の抗原結合部分を含む。他の実施形態では、それらは、標的抗原に結合することができる３つ以上の抗原結合部分を含み得る。

【０３１０】

一実施形態では、このさらなる抗体結合部分（例えば、抗体断片、例えば、Ｆａｂ断片）は、（例えば、その鎖、例えば重鎖の１つの）Ｃ末端によって、Ｆｃドメインの他方のサブユニットのＮ末端に融合されている。したがって、一実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディは、各アームが標的抗原に対する結合部分を有する２アームヘミボディであり得る。

【０３１１】

したがって、一実施形態では、スプリット抗体は、

ｉ）第１のヘミボディであって、

ａ）第１の抗原結合部分（例えば、Ｆａｂ断片）であって、抗原結合部分（例えば、Ｆａｂ断片）が、標的細胞の表面上に発現される抗原に結合する、第１の抗原結合部分と、

ｂ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドと、

ｃ）第１のサブユニットおよび第２のサブユニットを含むＦｃドメインと、を含み、

（ｂ）のポリペプチドが、そのＮ末端によって、（ａ）の抗原結合部分のＣ末端に（例えば、（ａ）のＦａｂ断片の鎖の１つのＣ末端に）融合されており、そのＣ末端によって、（ｃ）のＦｃドメインの第１のサブユニットのＮ末端に融合されており、

標的細胞の表面上に発現される抗原に結合する第２の抗原結合部分（例えば、第２のＦａｂ断片）をさらに含み、第２の抗原結合部分（例えば、Ｆａｂ）が、そのＣ末端によって（例えば、その鎖の１つのＣ末端によって）、（ｃ）のＦｃドメインの第２のサブユニットのＮ末端に融合されており、

第１のヘミボディが、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない、第１のヘミボディと、

ｉｉ）第２のヘミボディであって、

ｄ）第１の抗原結合部分（例えば、Ｆａｂ断片）であって、抗原結合部分（例えば、Ｆａｂ断片）が、標的細胞の表面上に発現される抗原に結合する、第１の抗原結合部分と、

ｅ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドと、

ｆ）第１のサブユニットおよび第２のサブユニットを含むＦｃドメインと、を含み、

（ｅ）のポリペプチドが、そのＮ末端によって、（ｄ）の抗原結合部分のＣ末端に（例えば、（ｄ）のＦａｂ断片の鎖の１つのＣ末端に）融合されており、そのＣ末端によって、（ｆ）のＦｃドメインの第１のサブユニットのＮ末端に融合されており、

標的細胞の表面上に発現される抗原に結合する第２の抗原結合部分（例えば、第２のＦａｂ断片）をさらに含み、第２の抗原結合部分（例えば、Ｆａｂ）が、Ｃ末端によって（例えば、その鎖の１つのＣ末端によって）、（ｆ）のＦｃドメインの第２のサブユニットのＮ末端に融合されており、

第２のヘミボディが、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まない、第２のヘミボディと、を含み、

第１のヘミボディの当該ＶＨドメインおよび第２のヘミボディの当該ＶＬドメインは一緒になって、放射性標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することができる。

【０３１２】
いくつかの例では好ましい場合がある他の実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディはそれぞれ、標的抗原に特異的に結合することができる単一の抗原結合部分を有する。したがって、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディは、標的抗原に対して単一特異性および一価であり得る。好ましくは、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは、同じまたは異なるエピトープで、互いに同じ標的抗原に結合する。
【０３１３】
一実施形態では、第１のヘミボディおよび／または第２のヘミボディは、１アーム抗体である。このような実施形態では、（ｂ）のポリペプチドに融合されていない第１のヘミボディのＦｃサブユニットはまた、いかなる他の抗原結合ドメイン／部分にも融合されておらず、かつ／または（ｅ）のポリペプチドに融合されていない第２のヘミボディのＦｃサブユニットはまた、いかなる他の抗原結合ドメイン／部分にも融合されていない。したがって、Ｆｃドメインは、Ｆｄを欠くサブユニットを含み得る。いくつかの実施形態では、ヘミボディを構成するポリペプチドの１つは、Ｆｃサブユニットからなり得るか、またはそれから本質的になり得る。
【０３１４】
したがって、いくつかの実施形態では、第１のヘミボディは、以下のポリペプチド：
ｉ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、Ｆａｂ重鎖（例えば、ＶＨ－ＣＨ１）、任意のリンカー、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメイン、任意のリンカー、およびＦｃサブユニット（例えば、ＣＨ２－ＣＨ３）を含む、ポリペプチド、
ｉｉ）Ｆａｂ軽鎖ポリペプチド（例えば、ＶＬ－ＣＬ）、ならびに
ｉｉｉ）Ｆｃサブユニットポリペプチド（例えば、ＣＨ２－ＣＨ３）、を含み得、
（ｉ）のＦａｂ重鎖および（ｉｉ）のＦａｂ軽鎖は、標的抗原に結合することができるＦａｂ断片を形成する。
【０３１５】
第２のヘミボディは、以下のポリペプチド：
ｉｖ）Ｎ末端からＣ末端にかけて、Ｆａｂ重鎖（例えば、ＶＨ－ＣＨ１）、任意のリンカー、放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメイン、任意のリンカー、およびＦｃサブユニット（例えば、ＣＨ２－ＣＨ３）を含む、ポリペプチド、
ｖ）Ｆａｂ軽鎖ポリペプチド（例えば、ＶＬ－ＣＬ）、ならびに
ｖｉ）Ｆｃサブユニットポリペプチド（例えば、ＣＨ２－ＣＨ３）、を含み得、
（ｉｖ）のＦａｂ重鎖および（ｖ）のＦａｂ軽鎖は、標的抗原に結合することができるＦａｂ断片を形成する。
【０３１６】
これらの１アームヘミボディのいくつかの実施形態では、（ｉ）および（ｉｖ）のＦａｂ重鎖は、互いに同じ配列を有し得、ｉｉ）および（ｖ）のＦａｂ軽鎖ポリペプチドは、互いに同じ配列を有し得る。
【０３１７】
異なる特異性を有するＦａｂが存在する上記フォーマットのいずれかのいくつかの実施形態では、軽鎖とそのそれぞれの重鎖との正しいアセンブリは、以下でさらに論じるように、電荷修飾を使用することによって支援され得る。
【０３１８】
ヘテロ二量体重鎖の正しいアセンブリは、以下でさらに論じるように、ノブ・イントゥ・ホール技術によって支援され得る。
【０３１９】
Ｈ．例示的なスプリット多重特異性スプリット抗体
標的結合（例えば、ＣＥＡ結合）に関する態様および実施形態ならびにＤＯＴＡ結合に関する態様および実施形態は、いくつかの実施形態において組み合わせられ得る。一実施形態では、多重特異性抗体は、上記の配列のいずれかを有するＣＥＡに対する結合部位と

、上記の配列のいずれかを有するＤＯＴＡキレートに対する結合部位とを含み得る。別の実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、例えば上記の配列のいずれかを含むＣＥＡに対する結合部位を含み、会合して上記の配列のいずれかを有するＤＯＴＡキレートに対する結合部位を形成する。ＣＥＡ結合および／またはＤＯＴＡ結合に関する態様および実施形態は、上記の抗体の好ましいフォーマットと組み合わせられ得、すなわち、好ましいフォーマットのいずれかでは、標的抗原に結合する部分は、上記のＣＤＲもしくは可変領域配列を含むＣＥＡ結合剤であってもよく、かつ／または放射性核種標識化合物に結合する部分は、上記のＣＤＲおよび／もしくは可変領域配列を有するＤＯＴＡ結合剤であってもよいことも明確に企図される。

【０３２０】

スプリット抗体の特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、

ａ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖と２つの抗体軽鎖とからなる第１の完全長抗体と、

ｂ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドであって、重鎖可変ドメインが、配列番号３５～３７の重鎖ＣＤＲを含み（または、ＣＤＲ－Ｈ１が配列ＧＦＳＬＴＤＹＧＶＨを有し）、かつ／または重鎖可変ドメインが、配列番号４１と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する、ポリペプチドと、を含み得、

当該ポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、当該第１の完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に融合されている。

【０３２１】

第１のヘミボディは、（ｂ）のポリペプチドと会合して放射性標識化合物の機能的結合ドメインを形成する軽鎖ドメインを含まない。

【０３２２】

（ｂ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、例えば１～１０残基をさらに含むことが好ましい場合がある。任意に、これらは、１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基であってもよい。別の実施形態では、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０３２３】

いくつかの実施形態では、部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、同一の可変ドメイン、任意に同一の可変ドメイン、ＣＨ１ドメインおよび／またはＣＨ２ドメインを有する。それらは、例えば、ノブ・イントゥ・ホール変異およびヘテロ二量体の正しい会合を促進することを意図した他の変異の作製によって、それらのＣＨ３ドメインのみが任意に異なり得る。

【０３２４】

第２のヘミボディは、

ｃ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖と２つの抗体軽鎖とからなる第２の完全長抗体と、

ｄ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドであって、軽鎖可変ドメインが、配列番号３８～４０のＣＤＲを含み、かつ／または軽鎖可変ドメインが、配列番号４２と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する、ポリペプチドと、を含み得、

当該ポリペプチドは、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、当該第２の完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に融合されており、第２のヘミボディは、（ｄ）のポリペプチドと会合して放射性標識化合物に対する機能的結合ドメインを形成する重鎖ドメインを含まない。

【０３２５】

いくつかの実施形態では、部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、互いに同一の可変ドメイン

、任意に同一の可変ドメイン、ＣＨ１ドメインおよび／またはＣＨ２ドメインを有する。それらは、例えば、ノブ・イントゥ・ホール変異およびヘテロ二量体の正しい会合を促進することを意図した他の変異の作製によって、それらのＣＨ３ドメインのみが任意に異なり得る。

【０３２６】

ＣＥＡ結合部位／配列は、上記のＣＥＡ結合部位／配列のいずれかであり得る。

【０３２７】

特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３２８】

例えば、（ａ）の２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号２６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号１０３と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ａ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。

【０３２９】

部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含み得、かつ／または部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号２５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）の一方の重鎖は配列番号１００の配列を有し、他方は配列番号１０２の配列を有する。

【０３３０】

特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、配列番号１００の第１の重鎖と、配列番号１０１の第２の重鎖（Ｃ末端ＡＳＴは任意であり、存在しなくてもよく、または本明細書に記載の別のＣ末端伸長で置換されていてもよい）と、配列番号１０３の軽鎖とを含み得る。

【０３３１】

第２のヘミボディはまた、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３３２】

例えば、（ｃ）の２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号２６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号１０３と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が、第１のヘミボディの（ａ）の軽鎖と同じ配列を有すること、例えば、部分（ａ）および（ｃ）の全ての当該軽鎖が同じ配列を有することが好ましい場合がある。

【０３３３】

いくつかの実施形態では、部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含み、かつ／または部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号２５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は配列番号９７の配列を有し、他方は配列番号９９の配列を有する。

【０３３４】

特定の一実施形態では、第２のヘミボディは、配列番号９７の第１の重鎖と、配列番号９８の第２の重鎖と、配列番号１０３の軽鎖とを含み得る。

【０３３５】

同様に、標的結合（例えば、ＣＥＡ結合）に関する態様および実施形態ならびにＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合に関する態様および実施形態は、いくつかの実施形態において組み合わせられ得る。一実施形態では、多重特異性抗体は、上記の配列のいずれかを有するＣＥＡに対する結合部位と、上記の配列のいずれかを有するＰｂ－ＤＯＴＡＭキレートに対する結合部位とを含み得る。別の実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディはそれぞれ、例えば上記の配列のいずれかを含むＣＥＡに対する結合部位を含み得、会合して上記の配列のいずれかを有するＰｂ－ＤＯＴＡＭキレートに対する結合部位を形成する。ＣＥＡ結合および／またはＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合に関する態様および実施形態は、上記の抗体の好ましいフォーマットと組み合わせられ得、すなわち、好ましいフォーマットのいずれかでは、標的抗原に結合する部分は、上記のＣＤＲもしくは可変領域配列を含むＣＥＡ結合剤であってもよく、かつ／または放射性核種標識化合物に結合する部分は、上記のＣＤＲおよび／もしくは可変領域配列を有するＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合剤であってもよいことも明確に企図される。

【０３３６】

スプリット抗体の特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、

ａ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖と２つの抗体軽鎖とからなる第１の完全長抗体と、

ｂ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドであって、重鎖可変ドメインが、配列番号１～３の重鎖ＣＤＲを含み、かつ／または重鎖可変ドメインが、配列番号７と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する、ポリペプチドと、を含み得、

当該ポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、当該第１の完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に融合されている。

【０３３７】

第１のヘミボディは、（ｂ）のポリペプチドと会合して放射性標識化合物の機能的結合ドメインを形成する軽鎖ドメインを含まない。

【０３３８】

（ｂ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端に１つ以上の残基、任意に１つ以上のアラニン残基、任意に単一のアラニン残基をさらに含むことが好ましい場合がある。例えば、（ｂ）のポリペプチドは、Ｃ末端アラニン伸長を有する配列番号７、例えば配列

ＶＴＬＫＥＳＧＰＶＬＶＫＰＴＥＴＬＴＬＴＣＴＶＳＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳＷＩＲＱＰＰＧＫＡＬＥＷＬＧＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＬＴＩＳＫＤＴＳＫＳＱＶＶＬＴＭＴＮＭＤＰＶＤＴＡＴＹＹＣＡＲＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬＷＧＲＧＴＬＶＴＶＳＳＡを含み得るか、またはそれからなり得る。

【０３３９】

別の実施形態では、さらなる残基は、上記のＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えばＣＨ１ドメインのＮ末端からの、例えばヒトＩｇＧ１　ＣＨ１ドメインからの１～１０残基であり得る。例えば、さらなる残基はＡＳＴであり得る。

【０３４０】

いくつかの実施形態では、部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、同一の可変ドメイン、任意に同一の可変ドメイン、ＣＨ１ドメインおよび／またはＣＨ２ドメインを有する。それらは、例えば、ノブ・イントゥ・ホール変異およびヘテロ二量体の正しい会合を促進することを意図した他の変異の作製によって、それらのＣＨ３ドメインのみが任意に異なり得る。

【０３４１】

第２のヘミボディは、

ｃ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖と２つの抗体軽鎖とからなる第２の完全長抗体と、

ｄ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含むか、またはそれからなるポリペプチドであって、軽鎖可変ドメインが、配列番号４～６のＣＤＲを含み、かつ／または軽鎖可変ドメイ

ンが、配列番号８と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する、ポリペプチドと、を含み得、
当該ポリペプチドは、ＶＬドメインのＮ末端によって、好ましくはペプチドリンカーを介して、当該第２の完全長抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に融合されており、第２のヘミボディは、（ｄ）のポリペプチドと会合して放射性標識化合物に対する機能的結合ドメインを形成する重鎖ドメインを含まない。

【０３４２】

いくつかの実施形態では、部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、互いに同一の可変ドメイン、任意に同一の可変ドメイン、ＣＨ１ドメインおよび／またはＣＨ２ドメインを有する。それらは、例えば、ノブ・イントゥ・ホール変異およびヘテロ二量体の正しい会合を促進することを意図した他の変異の作製によって、それらのＣＨ３ドメインのみが任意に異なり得る。

【０３４３】

特定の実施形態では、第１のヘミボディは、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３４４】

例えば、（ａ）の２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号２６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号３４と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ａ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。

【０３４５】

部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含み得、かつ／または部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号２５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）の一方の重鎖は配列番号２７の配列を有し、他方は配列番号２８の配列を有する。

【０３４６】

特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、配列番号２８の第１の重鎖と、配列番号３２の第２の重鎖（またはさらなるＣ末端アラニンもしくは本明細書に記載の他のＣ末端伸長、例えばＡＳＴを有する伸長を含むその変異体）と、配列番号３４の軽鎖とを含み得る。Ｃ末端アラニン伸長を有する配列番号３２の変異体を以下に示す：

ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＥＦＧＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＷＩＮＴＫＴＧＥＡＴＹＶＥＥＦＫＧＲＶＴＦＴＴＤＴＳＴＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＲＳＤＤＴＡＶＹＹＣＡＲＷＤＦＡＹＹＶＥＡＭＤＹＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＡＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＧＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＣＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＷＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＶＴＬＫＥＳＧＰＶＬＶＫＰＴＥＴＬＴＬＴＣＴＶＳＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳＷＩＲＱＰＰＧＫＡＬＥＷＬＧＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＬＴＩＳＫＤＴＳＫＳＱＶＶＬＴＭＴＮＭＤＰＶＤＴＡＴＹＹＣＡＲＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬＷＧＲＧＴＬＶＴＶＳＳＡ

【０３４７】

別の特定の実施形態では、第１のヘミボディは、抗体Ａ５Ｂ７（そのヒト化バージョン

を含む）由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３４８】

例えば、（ａ）の２つの軽鎖は、配列番号４６～４８のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号５０と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号５４と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ａ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。

【０３４９】

いくつかの実施形態では、部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号４３～４５のＣＤＲを含み得、かつ／または部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号４９と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）の一方の重鎖は配列番号５１の配列を有し、他方は配列番号５３の配列を有する。

【０３５０】

特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、配列番号５１の第１の重鎖と、配列番号５２の第２の重鎖（またはＣ末端アラニン伸長もしくは本明細書に記載の他のＣ末端伸長、例えばＡＳＴを有する伸長を有するその変異体）と、配列番号５４の軽鎖とを含み得る。

【０３５１】

別の特定の実施形態では、第１のヘミボディは、抗体Ｔ８４．６６（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３５２】

例えば、（ａ）の２つの軽鎖は、配列番号１４～１６のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号１８と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号８９と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ａ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。

【０３５３】

いくつかの実施形態では、部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１１～１３のＣＤＲを含み得、かつ／または部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１７と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）の一方の重鎖は配列番号８６の配列を有し、他方は配列番号８８の配列を有する。

【０３５４】

特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、配列番号８６の第１の重鎖と、配列番号８７の第２の重鎖（またはＣ末端「ＡＳＴ」が存在しないか、もしくは本明細書に開示される異なるＣ末端伸長で置換されているその変異体）と、配列番号８９の軽鎖とを含み得る。

【０３５５】

別の特定の実施形態では、第１のヘミボディは、抗体２８Ａ９（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３５６】

例えば、（ａ）の２つの軽鎖は、配列番号６２～６４のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号６６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態

では、それらは、配列番号９６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ａ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。

【０３５７】

いくつかの実施形態では、部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号５９～６１のＣＤＲを含み得、かつ／または部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号６５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）の一方の重鎖は配列番号９３の配列を有し、他方は配列番号９５の配列を有する。

【０３５８】

特定の一実施形態では、第１のヘミボディは、配列番号９３の第１の重鎖と、配列番号９４の第２の重鎖（またはＣ末端「ＡＳＴ」を有しないか、もしくは本明細書に記載の異なるＣ末端伸長を有するその変異体）と、配列番号９６の軽鎖とを含み得る。

【０３５９】

いくつかの実施形態では、第２のヘミボディは、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３６０】

例えば、（ｃ）の２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号２６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号３４と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が、第１のヘミボディの（ａ）の軽鎖と同じ配列を有すること、例えば、部分（ａ）および（ｃ）の全ての当該軽鎖が同じ配列を有することが好ましい場合がある。

【０３６１】

いくつかの実施形態では、部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含み、かつ／または部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号２５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は配列番号２９の配列を有し、他方は配列番号３０の配列を有する。

【０３６２】

特定の一実施形態では、第２のヘミボディは、配列番号３０の第１の重鎖と、配列番号３３の第２の重鎖と、配列番号３４の軽鎖とを含み得る。

【０３６３】

別の特定の実施形態では、第２のヘミボディは、Ａ５Ｂ７（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３６４】

例えば、（ｃ）の２つの軽鎖は、配列番号４６～４８のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号５０と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号５８と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が、第１のヘミボディの（ａ）の軽鎖と同じ配列を有すること、例えば、部分（ａ）および（ｃ）の全ての当該軽鎖が同じ配列を有することが好ましい場合がある。

【０３６５】

いくつかの実施形態では、部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号４３～４５のＣＤ

Ｒを含み、かつ／または部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号４９と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は配列番号５５の配列を有し、他方は配列番号５７の配列を有する。

【０３６６】

特定の一実施形態では、第２のヘミボディは、配列番号５５の第１の重鎖と、配列番号５６の第２の重鎖と、配列番号５８の軽鎖とを含み得る。

【０３６７】

別の特定の実施形態では、第２のヘミボディは、抗体Ｔ８４．６６（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３６８】

例えば、（ｃ）の２つの軽鎖は、配列番号１４～１６のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号１８と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号８９と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。

【０３６９】

いくつかの実施形態では、部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１１～１３のＣＤＲを含み得、かつ／または部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号１７と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は配列番号８３の配列を有し、他方は配列番号８５の配列を有する。

【０３７０】

特定の一実施形態では、第２のヘミボディは、配列番号８３の第１の重鎖と、配列番号８４の第２の重鎖と、配列番号８９の軽鎖とを含み得る。

【０３７１】

別の特定の実施形態では、第２のヘミボディは、抗体２８Ａ９（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有し得る。

【０３７２】

例えば、（ｃ）の２つの軽鎖は、配列番号６２～６４のＣＤＲを含み得、かつ／または配列番号６６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含み得る。いくつかの実施形態では、それらは、配列番号９６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９または１００％の同一性を有し得る。いくつかの実施形態では、（ｃ）の２つの軽鎖が互いに同一であることが好ましい場合がある。

【０３７３】

いくつかの実施形態では、部分（ｃ）の２つの抗体重鎖は、配列番号５９～６１のＣＤＲを含み得、かつ／または部分（ａ）の２つの抗体重鎖は、配列番号６５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９もしくは１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は配列番号９０の配列を有し、他方は配列番号９２の配列を有する。

【０３７４】

特定の一実施形態では、第２のヘミボディは、配列番号９０の第１の重鎖と、配列番号９１の第２の重鎖と、配列番号９６の軽鎖とを含み得る。

【０３７５】

いくつかの実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは、ＣＥＡの同じエピトープに結合する。したがって、例えば、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディ

は両方とも、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、Ａ５Ｂ７（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、Ｔ８４．６６（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、２８Ａ９（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは両方とも、ＭＦＥ２３（そのヒト化バージョンを含む）由来のＣＥＡ結合配列を有し得る。

【０３７６】

したがって、例えば、

ｉ）第１のヘミボディは、配列番号２８の第１の重鎖と、配列番号３２の第２の重鎖（任意に、本明細書に記載のＣ末端伸長、例えばＡＳＴを有する）と、配列番号３４の軽鎖とを含み得、第２のヘミボディは、配列番号３０の第１の重鎖と、配列番号３３の第２の重鎖と、配列番号３４の軽鎖とを含み得、

ｉｉ）第１のヘミボディは、配列番号５１の第１の重鎖と、配列番号５２の第２の重鎖（任意に、本明細書に記載のＣ末端伸長、例えばＡＳＴを有する）と、配列番号５４の軽鎖とを含み得、第２のヘミボディは、配列番号５５の第１の重鎖と、配列番号５６の第２の重鎖と、配列番号５８の軽鎖とを含み得、

ｉｉｉ）第１のヘミボディは、配列番号８６の第１の重鎖と、配列番号８７の第２の重鎖（Ｃ末端ＡＳＴ残基は任意であり、存在しなくてもよく、または代替のＣ末端伸長によって置換されていてもよい）と、配列番号８９の軽鎖とを含み得、第２のヘミボディ抗体は、配列番号８３の第１の重鎖と、配列番号８４の第２の重鎖と、配列番号８９の軽鎖とを含み得、または

ｉｖ）第１のヘミボディは、配列番号９３の第１の重鎖と、配列番号９４の第２の重鎖（Ｃ末端ＡＳＴ残基は任意であり、存在しなくてもよく、または代替のＣ末端伸長によって置換されていてもよい）と、配列番号９６の軽鎖とを含み得、第２のヘミボディは、配列番号９０の第１の重鎖と、配列番号９１の第２の重鎖と、配列番号９６の軽鎖とを含み得る。

【０３７７】

他の実施形態では、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは、上述のように、ＣＥＡの異なるエピトープに結合する。したがって、例えば、第１のヘミボディは、抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有し得、第２のヘミボディは、Ａ５Ｂ７由来のＣＥＡ結合配列を有し得、または、第１のヘミボディは、抗体Ａ５Ｂ７由来のＣＥＡ結合配列を有し得、第２のヘミボディは、ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有し得る。バイパラトピック（ＣＨ１Ａ１ＡおよびＡ５Ｂ７）対の使用の例は、実施例６ｃに記載されている。

【０３７８】

なおさらなる特定の実施形態では、標的は、例えば抗体ＣＨ１Ａ１Ａ由来のＣＥＡ結合配列を有するＣＥＡであり得、フォーマットは、図２５Ｃに示すとおりであり得る。任意に、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは会合して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレート（Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０３７９】

Ｉ．ポリペプチドリンカー

併用療法で使用される多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体では、成分またはドメイン（例えば、Ｆｃドメイン、抗体結合部分、ＶＨ、ＶＬ）は、ペプチドリンカーを介して間接的に他の成分またはドメインに融合され得る。

【０３８０】

リンカー（例えば、Ｆａｂ断片と放射性標識化合物に対するＶＨ／ＶＬとの間のリンカー、および／または放射性標識化合物に対するＶＨ／ＶＬとＦｃドメインとの間のリンカー）は、少なくとも５個または少なくとも１０個のアミノ酸、好ましくは５～１００個、例えば５～７０個、５～６０個、もしくは５～５０個、または１０～１００個、１０～７

０個、１０～６０個もしくは１０～５０個のアミノ酸のペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、１５～３０アミノ酸長、例えば１５～２５、例えば１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３または２４アミノ酸長であることが好ましい場合がある。リンカーは、剛直なリンカーまたは柔軟なリンカーであり得る。いくつかの実施形態では、それは、Ｔｈｒ、Ｓｅｒ、ＧｌｙおよびまたはＡｌａ残基を含むか、またはそれらからなる柔軟なリンカーである。例えば、それは、ＧｌｙおよびＳｅｒ残基を含み得るか、またはそれらからなり得る。いくつかの実施形態では、それは、（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）ｎなどの反復モチーフを有してもよく、ｎは、例えば１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０である。好適な非免疫原性ペプチドリンカーとしては、例えば、（Ｇ４Ｓ）ｎ、（ＳＧ４）ｎ、（Ｇ４Ｓ）ｎまたは（Ｇ４Ｓ）ｎペプチドリンカーが挙げられ、式中、「ｎ」は一般に、１～１０、典型的には２～４の数である。別の実施形態では、当該ペプチドリンカーは、（ＧｘＳ）ｎまたは（ＧｘＳ）ｎＧｍであり、Ｇ＝グリシン、Ｓ＝セリン、および（ｘ＝３、ｎ＝３、４、５または６、およびｍ＝０、１、２または３）または（ｘ＝４、ｎ＝２、３、４または５およびｍ＝０、１、２または３）、例えばｘ＝４およびｎ＝２または３、例えばｘ＝４、ｎ＝２である。いくつかの実施形態では、リンカーは、配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）であり得るか、またはそれを含み得る。別の実施形態では、リンカーは、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＳＧＧまたはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＳＧＧＳまたはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＳＧＧＧであり得るか、またはそれらを含み得る。別の例示的なペプチドリンカーは、ＥＰＫＳＣ（Ｄ）－（Ｇ４Ｓ）２である。さらに、抗原結合部分は、ＦｃドメインサブユニットのＮ末端に融合される場合、追加のペプチドリンカーの有無に関わらず、免疫グロブリンヒンジ領域またはその一部分を介して融合されてもよい。

【０３８１】

本発明者らは、ｙ個のアミノ酸からなるペプチドリンカーにおいて、ｙ位のＳｅｒ（すなわち、リンカーの最後の／Ｃ末端アミノ酸としてのＳｅｒ）が、ｙ＋２アミノ酸（すなわち、リンカーの最後のアミノ酸からＣ末端方向に２残基に位置するアミノ酸）のグリコシル化を、このｙ＋２アミノ酸の性質に応じて誘導し得ることを決定した。したがって、リンカーの最後のセリン残基がｙ－２位またはｙ－３位に配置されること（すなわち、リンカーの最後のセリン残基が、リンカーの最後のアミノ酸からＮ末端方向に２位または３位のアミノ酸にあること）が好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、リンカーは、ＧｌｙおよびＳｅｒからなる群から選択されるｙ個の連続するアミノ酸残基からなり得、例えば、ｙ＝５以上、例えば、ｙ＝５～１００、５～７０、５～６０、５～５０、または１０～１００、１０～７０、１０～６０もしくは１０～５０、例えば、１５～３１もしくは１５～３０、例えば、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４もしくは２５であり、最後のセリンは、ｙ－２位またはｙ－３位にある。（したがって、ｙ－２位にセリンが存在し、ｙ－１位およびｙ位にグリシンが存在してもよいか、または、ｙ－３位にセリンが存在し、ｙ－２位、ｙ－１位およびｙ位にグリシンが存在してもよい）。いくつかの実施形態では、ｙ＝２０または２１であることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、リンカーは（ＧｘＳ）ｎ（ＧＧＳＧＧ）または（ＧｘＳ）ｎ（ＧＧＳＧＧＧ）であり、Ｇ＝グリシン、Ｓ＝セリン、ｘ＝４およびｎ＝１～２０、または２～２０、または１～１０、または２～１０、例えばｎ＝２、３、４、５、６、７、８、または９、例えばｎ＝２～５、または２～４であることが好ましい場合がある。例えば、リンカーは、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＳＧＧまたはＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＳＧＧＳＧＧＧであり得る。

【０３８２】

Ｊ．ＣＤ４０アゴニスト

本発明の併用療法は、ＣＤ４０アゴニストを含む。

【０３８３】

ヒトＣＤ４０抗原は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦ－Ｒ）ファミリーに属する５０ｋＤ

ａの細胞表面糖タンパク質である（Ｓｔａｍｅｎｋｏｖｉｃ　ｅｔ　ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．８：１４０３－１０（１９８９））。それは、「腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー５」としても知られている。代替の呼称としては、Ｂ細胞表面抗原４０、Ｂｐ５０、ＣＤ４０Ｌ受容体、ＣＤｗ４０、ＣＤＷ４０、ＭＧＣ９０１３、ｐ５０またはＴＮＦＲＳＦ５が挙げられる。それは、例えばＵｎｉＰｒｏｔエントリー番号Ｐ２５９４２で登録されている。一実施形態では、ヒトＣＤ４０抗原は、以下に示す配列を有する（表１参照）。

【表１】

表１：ヒトＣＤ４０抗原のタンパク質配列

ヒトＣＤ４０抗原のタンパク質配列	ＭＶＲＬＰＬＱＣＶＬＷＧＣＬＬＴＡＶＨＰＥＰＰＴＡＣＲ ＥＫＱＹＬＩＮＳＱＣＣＳＬＣＱＰＧＱＫＬＶＳＤＣＴＥＦ ＴＥＴＥＣＬＰＣＧＥＳＥＦＬＤＴＷＮＲＥＴＨＣＨＱＨＫ ＹＣＤＰＮＬＧＬＲＶＱＱＫＧＴＳＥＴＤＴＩＣＴＣＥＥＧ ＷＨＣＴＳＥＡＣＥＳＣＶＬＨＲＳＣＳＰＧＦＧＶＫＱＩＡ ＴＧＶＳＤＴＩＣＥＰＣＰＶＧＦＦＳＮＶＳＳＡＦＥＫＣＨ ＰＷＴＳＣＥＴＫＤＬＶＶＱＱＡＧＴＮＫＴＤＶＶＣＧＰＱ ＤＲＬＲＡＬＶＶＩＰＩＩＦＧＩＬＦＡＩＬＬＶＬＶＦＩＫ ＫＶＡＫＫＰＴＮＫＡＰＨＰＫＱＥＰＱＥＩＮＦＰＤＤＬＰ ＧＳＮＴＡＡＰＶＱＥＴＬＨＧＣＱＰＶＴＱＥＤＧＫＥＳＲ ＩＳＶＱＥＲＱ

【０３８４】

ＣＤ４０は抗原提示細胞（ＡＰＣ）によって発現され、Ｔ細胞上のその天然リガンドの結合が、樹状細胞およびＢ細胞を含むＡＰＣを活性化する。

【０３８５】

本明細書で使用される「ＣＤ４０アゴニスト」は、ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ相互作用をアゴナイズする任意の部分を含む。典型的には、これらの部分は、アゴニストＣＤ４０抗体またはアゴニストＣＤ４０Ｌポリペプチドであろう。「アゴニスト」は、細胞上の受容体と結合し、当該受容体の天然リガンドによって開始されるものと類似のまたは同じ反応または活性を開始する。一態様では、「ＣＤ４０アゴニスト」は、以下の応答のいずれかまたは全てを誘導するが、これらに限定されない：Ｂ細胞の増殖および／または分化；ＩＣＡＭ－１、Ｅ－セレクチン、ＶＣＡＭなどの分子を介した細胞間接着のアップレギュレーション；ＩＬ－１、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＴＮＦなどの炎症促進性サイトカインの分泌；ＴＲＡＦ（例えば、ＴＲＡＦ２および／またはＴＲＡＦ３）、ＭＡＰキナーゼ、例えばＮＩＫ（ＮＦ－ｋＢ誘導キナーゼ）、Ｉ－カッパＢキナーゼ（ＩＫＫ／．ベータ．）、転写因子ＮＦ－ｋＢ、ＲａｓおよびＭＥＫ／ＥＲＫ経路、ＰＩ３Ｋ　ＡＫＴ経路、Ｐ３８　ＭＡＰＫ経路などの経路によるＣＤ４０受容体を介したシグナル伝達；ＸＩＡＰ、ｍｃｌ－１、ｂｃｌ－ｘなどの分子による抗アポトーシスシグナルの形質導入；Ｂおよび／またはＴ細胞記憶の生成；Ｂ細胞抗体産生；Ｂ細胞アイソタイプスイッチング、ＭＨＣクラスＩＩおよびＣＤ８０／８６の細胞表面発現のアップレギュレーションなど。

【０３８６】

例示的なアゴニストとしては、ＣＤ４０リガンドＣＤ４０Ｌ（その機能的変異体を含む）、またはＣＤ４０Ｌもしくはその機能的変異体、例えば、組換えヒトＣＤ４０Ｌ、もしくはアデノウイルスベクター発現ＣＤ４０Ｌを発現する核酸が挙げられる。

【０３８７】

他の実施形態では、アゴニストは、抗ＣＤ４０抗体、例えばモノクローナル抗体であり得る。例えば、抗体は、ヒトもしくはヒト化抗体またはキメラ抗体であり得る。抗体は、ＩｇＧ、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４であり得る。

【０３８８】

いくつかの実施形態では、抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（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）でＣＤ４０に結合し得る。別の実施形態では、抗体は、4×10^{-10}M以下のK_DでヒトＣＤ４０に結合し得る。

【０３８９】

例示的な抗ＣＤ４０アゴニスト抗体は、当技術分野で公知である。本発明の実施形態では、これらのいずれかまたはその機能的変異体が使用され得る。

【０３９０】

ＣＰ－８７０、８９３（Ｐｆｉｚｅｒ）（セリクレルマブとしても知られる）は、腫瘍細胞死に対して免疫媒介および非免疫媒介効果を示す完全ヒトＣＤ４０アゴニストＩｇＧ２ｍＡｂである（Ｖｏｎｄｅｒｈｅｉｄｅ ＲＨ，Ｆｌａｈｅｒｔｙ ＫＴ，Ｋｈａｌｉｌ Ｍ，Ｓｔｕｍａｃｈｅｒ ＭＳ，Ｂａｊｏｒ ＤＬ，Ｈｕｔｎｉｃｋ ＮＡ，ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｃｔｉｖｉｔｙ ａｎｄ ｉｍｍｕｎｅ ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｉｎ ｃａｎｃｅｒ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｔｒｅａｔｅｄ ｗｉｔｈ ＣＰ－８７０，８９３，ａ ｎｏｖｅｌ ＣＤ４０ ａｇｏｎｉｓｔ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２００７；２５：８７６－８３）。

【０３９１】

ダセツズマブ（Ｓｅａｔｔｌｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ）は、ＣＤ４０に対するヒト化ｍＡｂ ＩｇＧ１である（Ｋｈｕｂｃｈａｎｄａｎｉ Ｓ，Ｃｚｕｃｚｍａｎ ＭＳ，Ｈｅｒｎａｎｄｅｚ－Ｉｌｉｚａｌｉｔｕｒｒｉ ＦＪ．Ｄａｃｅｔｕｚｕｍａｂ，ａ ｈｕｍａｎｉｚｅｄ ｍＡｂ ａｇａｉｎｓｔ ＣＤ４０ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｈｅｍａｔｏｌｏｇｉｃａｌ ｍａｌｉｇｎａｎｃｉｅｓ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ Ｄｒｕｇｓ．２００９；１０：５７９－８７．）。

【０３９２】

Ｃｈｉ Ｌｏｂ ７／４（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｓｏｕｔｈａｍｐｔｏｎ）は、キメラＩｇＧ１である（Ｊｏｈｎｓｏｎ ＰＷ，Ｓｔｅｖｅｎ ＮＭ，Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ Ｆ，Ｄｏｂｂｙｎ Ｊ，Ｈａｌｌ Ｅ，Ａｓｈｔｏｎ－Ｋｅｙ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ａ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ＵＫ ｐｈａｓｅ Ｉ ｓｔｕｄｙ ｅｖａｌｕａｔｉｎｇ ｓａｆｅｔｙ，ｔｏｌｅｒａｂｉｌｉｔｙ，ａｎｄ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ｃｈｉｍｅｒｉｃ ａｎｔｉ－ＣＤ４０ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ（ＭＡｂ），Ｃｈｉ Ｌｏｂ ７／４．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ．２０１０；２８：２５０７）。

【０３９３】

ＡＰＸ００５Ｍは、ヒト化ウサギＩｇＧ１である（Ｂｊｏｒｃｋ Ｐ，Ｆｉｌｂｅｒｔ Ｅ，Ｚｈａｎｇ Ｙ，Ｙａｎｇ Ｘ，Ｔｒｉｆａｎ Ｏ．Ｔｈｅ ＣＤ４０ ａｇｏｎｉｓｔｉｃ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ＡＰＸ００５Ｍ ｈａｓ ｐｏｔｅｎｔ ｉｍｍｕｎｅ ｓｔｉｍｕｌａｔｏｒｙ ｃａｐａｂｉｌｉｔｉｅｓ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ Ｃａｎｃｅｒ．２０１５；３：Ｐ１９８．ｄｏｉ：１０．１１８６／２０５１－１４２６－３－Ｓ２－Ｐ１９８．）。

【０３９４】

ＡＤＣ－１０１３は、完全ヒトＩｇＧ１である（Ｍａｎｇｓｂｏ ＳＭ，Ｂｒｏｏｓ Ｓ，Ｆｌｅｔｃｈｅｒ Ｅ，Ｖｅｉｔｏｎｍａｋｉ Ｎ，Ｆｕｒｅｂｒｉｎｇ Ｃ，Ｄａｈｌｅｎ Ｅ，Ｎｏｒｌｅｎ Ｐ，Ｌｉｎｄｓｔｅｄｔ Ｍ，Ｔｏｔｔｅｒｍａｎ ＴＨ，Ｅｌｌｍａｒｋ Ｐ．Ｔｈｅ ｈｕｍａｎ ａｇｏｎｉｓｔｉｃ ＣＤ４０ ａｎｔｉｂｏｄｙ ＡＤＣ－１０１３ ｅｒａｄｉｃａｔｅｓ ｂｌａｄｄｅｒ ｔｕｍｏｒｓ ａｎｄ ｇｅｎｅｒａｔｅｓ Ｔ－ｃｅｌｌ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｔｕｍｏｒ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１５；２１：１１１５－１１２６．ｄｏｉ：１０．１１５８／１０７８－０４３２．ＣＣＲ－１４－０９１３．）。

【０３９５】

ＣＤＸ－１１４０は、完全ヒトＩｇＧ２である（Ｖｉｔａｌｅ ＬＡ，Ｔｈｏｍａｓ ＬＪ，Ｈｅ ＬＺ，Ｏ’Ｎｅｉｌｌ Ｔ，Ｗｉｄｇｅｒ Ｊ，Ｃｒｏｃｋｅｒ Ａ，Ｓｕｎ

ｄａｒａｐａｎｄｉｙａｎ Ｋ，Ｓｔｏｒｅｙ ＪＲ，Ｆｏｒｓｂｅｒｇ ＥＭ，Ｗｅｉｄｌｉｃｋ Ｊ，ｅｔ ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ｏｆ ＣＤＸ－１１４０，ａｎ ａｇｏｎｉｓｔ ＣＤ４０ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２０１９；６８：２３３－２４５．ｄｏｉ：１０．１００７／ｓ００２６２－０１８－２２６７－０．）。

【０３９６】

Ｋ．免疫チェックポイント阻害剤：

本発明の併用療法は、免疫チェックポイント阻害剤を含む。

【０３９７】

例示的な免疫チェックポイント阻害剤としては、ＣＴＬＡ－４、ＰＤＬ１、ＰＤＬ２、ＰＤ１、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＢＴＬＡ、ＨＶＥＭ、ＴＩＭ３、ＧＡＬ９、ＬＡＧ３、ＶＩＳＴＡ、ＫＩＲ、２Ｂ４、ＣＤ１６０、ＣＧＥＮ－１　５０４９、ＣＨＫ１、ＣＨＫ２、Ａ２ａＲ、Ｂ－７またはそれらの組合せの阻害剤が挙げられる。

【０３９８】

いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ＰＤ１、ＰＤＬ１またはＣＴＬＡ４の阻害剤であり得る。

【０３９９】

ヒトＰＤ－Ｌ１（またはＰＤＬ１）抗原は、「プログラム細胞死１リガンド１」またはＣＤ２７４分子とも呼ばれる。代替の呼称としては、Ｂ７－Ｈ、Ｂ７Ｈ１、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７ホモログ１、ＭＧＣ１４２２９４、ＭＧＣ１４２２９６、ＰＤＣＤ１Ｌ１、ＰＤＣＤ１ＬＧ１、ＰＤＣＤ１リガンド１、ＰＤＬ１、ＰＤ－Ｌ１、プログラム死リガンド１が挙げられる。一実施形態では、ヒトＰＤ－Ｌ１抗原は、例えばＵｎｉＰｒｏｔエントリー番号Ｑ９ＮＺＱ７として登録されているように、以下に示す配列（表２）を有する。

【表２】

ヒトＰＤ－Ｌ１抗原のタンパク質配列	ＭＲＩＦＡＶＦＩＦＭＴＹＷＨＬＬＮＡＦＴＶＴＶＰＫＤＬ ＹＶＶＥＹＧＳＮＭＴＩＥＣＫＦＰＶＥＫＱＬＤＬＡＡＬＩ ＶＹＷＥＭＥＤＫＮＩＩＱＦＶＨＧＥＥＤＬＫＶＱＨＳＳＹ ＲＱＲＡＲＬＬＫＤＱＬＳＬＧＮＡＡＬＱＩＴＤＶＫＬＱＤ ＡＧＶＹＲＣＭＩＳＹＧＧＡＤＹＫＲＩＴＶＫＶＮＡＰＹＮ ＫＩＮＱＲＩＬＶＶＤＰＶＴＳＥＨＥＬＴＣＱＡＥＧＹＰＫ ＡＥＶＩＷＴＳＳＤＨＱＶＬＳＧＫＴＴＴＴＮＳＫＲＥＥＫ ＬＦＮＶＴＳＴＬＲＩＮＴＴＴＮＥＩＦＹＣＴＦＲＲＬＤＰ ＥＥＮＨＴＡＥＬＶＩＰＥＬＰＬＡＨＰＰＮＥＲＴＨＬＶＩ ＬＧＡＩＬＬＣＬＧＶＡＬＴＦＩＦＲＬＲＫＧＲＭＭＤＶＫ ＫＣＧＩＱＤＴＮＳＫＫＱＳＤＴＨＬＥＥＴ

【０４００】

いくつかの実施形態では、阻害剤は、例えば、ＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１に結合することができ、ＰＤ１とＰＤ－Ｌ１との会合をブロックすることができる小分子またはペプチドであり得る。

【０４０１】

いくつかの実施形態では、阻害剤は、チェックポイント阻害剤に対する抗体、例えば抗ＰＤ１、抗ＰＤＬ１または抗ＣＴＬＡ４抗体である。抗体は、モノクローナル抗体であり得る。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトもしくはヒト化抗体またはキメラ抗体であり得る。抗体は、ＩｇＧ、例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４であり得る。

【０４０２】

いくつかの実施形態では、抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（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）で、

チェックポイント阻害剤、例えばＰＤ１、ＰＤＬ１またはＣＴＬＡ４に結合し得る。抗体は、ヒトＰＤ１、ＰＤＬ１またはＣＴＬＡ４に結合し得る。

【０４０３】

例示的な抗体は、当技術分野で公知である。本発明の実施形態では、これらのいずれかまたはその機能的変異体が使用され得る。例としては、以下が挙げられる：

ニボルマブ（抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、ＢＭＳ－９３６５５８／ＯＮＯ－４５３８、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ、以前はＭＤＸ－１　１０６）、

ペンブロリズマブ（抗ＰＤ１　ｍＡｂ、ＭＫ－３４７５、ラムブロリズマブ、キイトルーダ（登録商標）、Ｍｅｒｃｋ）、

セミプリマブ（抗ＰＤ－１、Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）、

アテゾリズマブ（抗ＰＤ－Ｌ１　ｍＡｂ、テセントリク（登録商標）、ＭＰＤＬ３２８０Ａ／ＲＧ７４４６、Ｒｏｃｈｅ／Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、

Ｍｅｒｃｋ　ＳｅｒｏｎｏおよびＰｆｉｚｅｒによって開発された完全ヒトＩｇＧ１抗ＰＤ－Ｌ１抗体であるアベルマブ（バベンチオ）、

ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａによって開発された完全ヒトＩｇＧ１抗ＰＤ－Ｌ１抗体であるデュルバルマブ（イミフィンジ）。

【０４０４】

例示的なＰＤ－１阻害剤はまた、Ｊｏｕｎｃｅ　ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓによるＪＴＸ－４０１４；スパルタリズマブ（ＰＤＲ００１）；カムレリズマブ（ＳＨＲ１２１０）；シンチリマブ（ＩＢＩ３０８）；チスレリズマブ（ＢＧＢ－Ａ３１７）；トリパリマブ（ＪＳ　００１）；ドスタリマブ（ＴＳＲ－０４２、ＷＢＰ－２８５）；ＩＮＣＭＧＡ００１２（ＭＧＡ０１２）、ＩｎｃｙｔｅおよびＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓによって開発されたヒト化ＩｇＧ４モノクローナル抗体；ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ／ＭｅｄＩｍｍｕｎｅおよびＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅによるＡＭＰ－２２４；ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａによるＡＭＰ－５１４（ＭＥＤＩ０６８０）から選択され得る。

【０４０５】

例示的なＰＤ－Ｌ１阻害剤はまた、ＫＮ０３５；Ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ　ＴｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓによるＣＫ－３０１；ＡＵＮＰ１２；ＣＡ－１７０；またはＢＭＳ－９８６１８９から選択され得る。

【０４０６】

ＣＤ１５２としても知られるＣＴＬＡ－４（細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４）は、受容体のＣＤ２８ファミリーの別の阻害剤メンバーであり、Ｔ細胞上に発現される。

【０４０７】

ＣＴＬＡ－４に結合して阻害する抗体は、当技術分野で公知である。

一例では、抗体は、ヒトＩｇＧ抗体であるイピリムマブ（商品名ヤーボイ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ

【０４０８】

Ｓｑｕｉｂｂ）である。別の例では、抗ＣＴＬＡ－４抗体は、ヒトＩｇＧ２抗体であるトレメリムマブ（以前はチシリムマブ、ＣＰ－６７５，２０６）である。

【０４０９】

Ｌ．除去剤

上述のように、本発明のいくつかの実施形態では、除去剤が使用され得る。

【０４１０】

例示的な薬剤は、抗体に結合し、身体からのそれらのクリアランス速度を高める。それらには抗イディオタイプ抗体が含まれる。

【０４１１】

他の例示的な薬剤は、放射性標識化合物に対する抗原結合部位に結合するが、それ自体は放射性標識されていない薬剤である。例えば、放射性標識化合物が、特定の化学元素（例えば、金属）の放射性同位体を担持したキレート剤を含む場合、薬剤は、同じ元素（例えば、金属）の非放射性同位体を担持した同じキレート剤を含んでもよく、または抗原結

合部位によって依然として結合され得る限り、非担持キレート剤もしくは異なる非放射性部分（例えば、異なる元素の非放射性同位体）を担持したキレート剤を含んでもよい。

【０４１２】

いくつかの場合、除去／ブロッキング剤は、分子のサイズおよび／または流体力学的半径を増加させる部分をさらに含み得る。これらは、循環中の抗体に結合する分子の能力を妨げることなく、腫瘍にアクセスする分子の能力を妨げる。例示的な部分としては、親水性ポリマーが挙げられる。その部分は、例えばデキストラン、デキストリン、ＰＥＧ、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸、ヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）またはポリ（２－エチル２－オキサゾリン）（ＰＥＯＺ）のポリマーまたはコポリマーであり得る。他の実施形態では、その部分は、非構造化ペプチドまたはタンパク質、例えば、ＸＴＥＮポリペプチド（非構造化親水性タンパク質ポリマー）、ホモアミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、プロリン－アラニン－セリンポリマー（ＰＡＳ）、エラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）であり得る。さらなる例示的な部分としては、アルブミン、例えばウシ血清アルブミン、またはＩｇＧなどのタンパク質が挙げられる。部分／ポリマーに好適な分子量は、例えば、少なくとも５０ｋＤａ、例えば５０ｋＤａ～２０００ｋＤａの範囲であり得る。例えば、分子量は、２００～８００ｋＤａ、任意に３００、３５０、４００または４５０ｋＤａより大きく、任意に７００、６５０、６００または５５０ｋＤａ未満、任意に約５００ｋＤａであり得る。

【０４１３】

例示的な除去剤は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第２０１９／２０２３９９号に記載されている。これは、Ｍ－ＤＯＴＡＭ（Ｍ－ＤＯＴＡＭは、ＤＯＴＡＭまたは金属イオンを組み込んだその機能的変異体である）にコンジュゲートされた、デキストランまたはその誘導体、例えばアミノデキストランを含むデキストランベースの除去剤を記載しており、当該複合体は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する抗原結合部位によって認識される。除去剤中に存在する金属は、鉛の安定（非放射性）同位体であってもよく、または金属イオン－ＤＯＴＡＭ複合体が抗体によって高い親和性で認識される限り、別の金属イオンの安定なもしくは本質的に安定な同位体であってもよい。

【０４１４】

「安定同位体」とは、放射性崩壊を受けない同位体を意味する。「本質的に安定な同位体」とは、非常に長い半減期で放射性崩壊を受け、使用が安全になる同位体を意味する。好ましくは、金属イオンは、Ｐｂ、ＣａおよびＢｉのイオンから選択される。例えば、除去剤は、ＤＯＴＡＭもしくはその機能的変異体と複合体化したＰｂの安定同位体、ＤＯＴＡＭもしくはその機能的変異体と複合体化したＣａ、またはＤＯＴＡＭもしくはその機能的変異体と複合体化した^{209}Ｂｉ（１．９×１０^{19}年の半減期を有する本質的に安定な同位体）を含み得る。Ｐｂは、天然に存在する鉛であり得、これは、安定（非放射性）同位体^{204}Ｐｂ、^{206}Ｐｂ、^{207}Ｐｂおよび^{208}Ｐｂの混合物である。

【０４１５】

Ｍ．治療方法および組成物

特定の態様では、本発明は、個体における増殖性疾患または障害、例えば腫瘍またはがんの処置として本明細書に記載の併用療法を提供する。上記の態様のいずれかによる「個体」または「対象」は、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。

【０４１６】

本明細書で使用される「がん」という用語は、固形がんおよび血液がんの両方、例えば、リンパ腫、リンパ性白血病、肺がん、非小細胞肺（ＮＳＣＬ）がん、細気管支肺胞細胞肺がん、骨がん、膵管腺がん（ＰＤＡＣ）を含む膵臓がん、皮膚がん、頭頸部のがん、皮膚もしくは眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、肛門部のがん、胃がん（ｓｔｏｍａｃｈ ｃａｎｃｅｒ）、胃がん（ｇａｓｔｒｉｃ ｃａｎｃｅｒ）、結腸がんおよび／もしくは直腸がんであり得る結腸直腸がん、乳がん、子宮がん、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰の癌腫、ホジキン病、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟部組織の肉腫、尿道のがん、陰

茎のがん、前立腺がん、膀胱のがん、腎臓もしくは尿管のがん、腎細胞癌腫、腎盂の癌腫、中皮腫、肝細胞がん、胆道がん、中枢神経系（ＣＮＳ）の新生物、脊椎軸腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌腫、下垂体腺腫およびユーイング肉腫（上記がんのいずれかの難治性バージョン、上記がんのいずれかのチェックポイント阻害剤を経験したバージョン、または上記がんの１つ以上の組合せを含む）を含む。一実施形態では、このような「がん」は、乳がん、肺がん、結腸がん、卵巣がん、黒色腫がん、膀胱がん、腎がん、腎臓がん、肝臓がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃癌腫がん、食道がん、中皮腫または前立腺がんから選択される固形腫瘍である。別の実施形態では、このような「がん」は、例えば白血病（ＡＭＬ、ＣＬＬなど）、リンパ腫、骨髄腫などの血液腫瘍である。さらに別の実施形態では、「がん」は、乳がん、肺がん、結腸がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がんまたは前立腺がんである。

【０４１７】

いくつかの実施形態では、がんは、単独療法としての免疫チェックポイント阻害剤に対して抵抗性であり得る。例としては、ヒト黒色腫、腎細胞癌腫（ＲＣＣ）、ＮＳＣＬＣ、胃腸がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、肉腫および結腸直腸がん、例えば膵管腺がんが挙げられ得る。

【０４１８】

増殖性障害またはがんを処置する方法は、ｉ）放射性標識化合物に対する結合部位および標的抗原に対する結合部位を有する多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、ｉｉ）放射性標識化合物、ｉｉｉ）ＣＤ４０アゴニスト、ならびにｉｖ）免疫チェックポイント阻害剤を患者に投与することを含み得る。

【０４１９】

放射性標識化合物は、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体の後に患者に投与される。多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体は、標的抗原に結合する。次いで、放射性標識化合物は、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体に結合し、したがって標的細胞に局在する。

【０４２０】

抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤は、同時にまたはいずれかの順序で逐次的に投与され得る。それらは、多重特異性抗体／スプリット多重特異性抗体および放射性標識化合物の投与の前または後に投与され得る。好ましくは、それらは、多重特異性抗体／スプリット多重特異性抗体および放射性標識化合物の後に投与される。

【０４２１】

一実施形態では、処置は、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程とを、含む処置サイクルを含み、抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤は、同時に、またはいずれかの順序で逐次的に投与される。

【０４２２】

いくつかの実施形態では、第２の工程（免疫療法）は、抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤の一方または両方の反復投与を含み得る。例えば、第２の工程は、抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤の両方の投与（同時にまたはいずれかの順序で逐次的に）と、それに続く免疫チェックポイント阻害剤単独の１回以上の投与とを含み得る。反復投与は、当業者によって決定され得るような好適な間隔で行われ得る。

【０４２３】

処置は、１サイクルを含み得るか、または好ましい実施形態は、複数サイクル、例えば２、３、４、５もしくは６サイクルを含み得る。

【０４２４】

いくつかの実施形態では、処置の全てのサイクルが同じであるわけではない。いくつかの実施形態では、

第１の処置サイクルは、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程と、を含み、抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤は、同時に、またはいずれかの順序で逐次的に投与され、かつ

１つ以上の後続サイクルは、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与し、次いで放射性標識化合物を投与することを含む事前標的化放射線免疫療法の第１の工程と、免疫チェックポイント阻害剤を投与することを含む免疫療法の第２の工程と、を含む。

【０４２５】

例えば、１、２、３、４または５つの後続サイクルがあり得る。放射性標識化合物は、細胞に対して細胞傷害性である放射性同位体で標識される。好適な放射性同位体には、上述のようにアルファおよびベータ放射体が含まれる。

【０４２６】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体が標的細胞に局在するのに好適な期間を与えられると、放射性標識化合物は対象に投与され得る。例えば、いくつかの実施形態では、放射性標識化合物は、多重特異性抗体もしくはスプリット多重特異性抗体の直後に、または多重特異性抗体もしくはスプリット多重特異性抗体の少なくとも４時間後、８時間後、１日後、もしくは２日後に対象に投与され得る。任意に、それは、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体の３日後、５日後、または７日後までに投与され得る。特定の一実施形態では、放射性標識化合物は、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体の２～７日後に対象に投与され得る。

【０４２７】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、放射性標識化合物の後に投与され得る。

【０４２８】

例示的な処置サイクル期間は１４日間であり、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体は、サイクルの１日目に投与され、放射性標識化合物は、サイクルの次の７日間、例えばこの例では遅くとも８日目に投与され、免疫療法（例えば、ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤を含み、ＣＤ４０アゴニストおよび免疫チェックポイント阻害剤が同時にもしくはいずれかの順序で逐次的に投与される、または抗ＣＤ４０なしで免疫チェックポイント阻害剤を含む）は、放射性標識化合物の投与の少なくとも１日後、例えば９日目に投与される。一実施形態では、ＣＤ４０アゴニストは、第１の処置サイクルで１回のみ投与される。抗ＣＤ４０抗体および抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含む併用療法に関与する処置スケジュールは、例えば国際公開第２０１６／０２３８７５号に開示されている。

【０４２９】

二重特異性抗体（すなわち、本発明による「スプリット」抗体ではない）を使用する事前標的化放射線免疫療法の方法では、抗体の投与と放射性標識化合物の投与との間に、除去剤またはブロッキング剤を投与することが一般的に行われている。

【０４３０】

本発明のいくつかの態様では、除去剤は、多重特異性抗体の後および放射性標識化合物の前に投与される。

【０４３１】

いくつかの実施形態では、除去剤は、多重特異性抗体による処置の数時間後または数日後に投与され得る。いくつかの実施形態では、除去剤は、多重特異性抗体の少なくとも２、４、６、８、１０、１２、１６、１８、２２もしくは２４時間後、または少なくとも１、２、３、４、５、６もしくは７日後に投与されることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、除去剤は、抗体の後の１４日以内、例えば１０、９、８、７、６、５、４、３または２日以内に投与されることが好ましい場合がある。

【０４３２】

任意に、除去剤は、多重特異性抗体の後の４～１０日間、４～７日間、２～７日間、または２～４日間の期間に投与される。

【０４３３】

いくつかの実施形態では、放射性核種は、除去剤の数分後、数時間後または数日後に投与される。いくつかの実施形態では、放射性核種は、除去剤の投与の少なくとも３０分後、任意に、除去剤の投与の４８時間、２４時間、８時間または４時間以内に投与されることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、放射性核種は、除去剤の投与の翌日に投与され得る。したがって、例えば、放射性標識化合物がサイクルの８日目に投与される場合、除去剤は７日目に投与され得る。

【０４３４】

本発明の他の態様、例えば、スプリット多重特異性抗体を含むものによれば、除去剤またはブロッキング剤を対象に投与する工程はない。特定の態様では、スプリット抗体の投与と放射性標識化合物の投与との間に、第１のヘミボディもしくは第２のヘミボディまたは第１のヘミボディおよび第２のヘミボディから形成されたスプリット抗体に結合する任意の薬剤を投与する工程はない。特定の態様では、任意に化学療法剤および放射線増感剤から選択される化合物を除いて、スプリット抗体の投与と放射性標識化合物の投与との間に任意の薬剤を投与する工程はない。いくつかの実施形態では、抗体の投与と放射性標識化合物の投与との間に薬剤は投与されない。いくつかの実施形態では、抗体の投与と放射性標識化合物の投与との間に、対象への任意の他の薬剤の注射または注入はない場合がある。

【０４３５】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体は、追加的または代替的に、放射線増感剤と組み合わせて投与され得る。放射線増感剤および抗体は、同時にまたはいずれかの順序で逐次的に投与され得る。

【０４３６】

多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、放射性標識化合物、抗ＣＤ４０抗体および免疫チェックポイント阻害剤は、非経口、肺内および鼻腔内、ならびに局所処置のために所望される場合、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与され得る。非経口注入または注射には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。いくつかの実施形態では、投与は静脈内または皮下注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体、および／または抗ＣＤ４０抗体および／または免疫チェックポイント阻害剤は、ＩＶ注入によって投与され得る。いくつかの実施形態では、放射性標識化合物はＩＶ注射によって投与され得、抗ＣＤ４０抗体および／または免疫チェックポイント阻害剤は皮下（ｓ．ｃ．）投与され得る。

【０４３７】

いくつかの実施形態では、１つ以上の線量測定サイクルが、上記の１つ以上の処置サイクルの前に使用され得る。線量測定サイクルは、ｉ）多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体を投与する工程と、ｉｉ）続いて、ガンマ放射体で放射性標識されたイメージングに好適な化合物を投与する工程（当該放射性標識化合物は、放射性標識化合物に対する機能的結合部位に結合する）とを含み得る。化合物は、アルファまたはベータ放射体ではなくガンマ放射体で標識されることを除いて、後続の処置サイクルで使用される化合物と同じであり得る。例えば、一実施形態では、線量測定サイクルで使用される放射性標識化合物は^{203}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭであり得、処置サイクルで使用される放射性標識化合物は^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭであり得る。患者は、腫瘍内への化合物の取込みを決定するため、および／または化合物の吸収線量を推定するためにイメージングを受けてもよい。この情報は、後続の処置工程で予想される放射線曝露を推定し、処置工程で使用される放射性標識化合物の線量を安全なレベルに調整するために使用され得る。

【０４３８】

Ｎ．医薬製剤

本明細書に記載の抗体の医薬製剤は、所望の程度の純度を有するかかる抗体と、１つ以

上の任意の薬学的に許容され得る担体とを混合することによって（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０））、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製され得る。薬学的に許容され得る担体は、一般に、用いられる投与量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、次のものが含まれるが、これらに限定されない：ヒスチジン、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾール）；低分子量（約１０残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質複合体）；ならびに／または、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、ポロキサマー（例えば、ポロキサマー１８８）およびポリソルベート（例えば、ＰＳ２０、ＰＳ８０、高グレードＰＳ８０、すなわち９８％を超えるオレイン酸を含むＰＳ８０）などの非イオン性界面活性剤。本発明に従って使用されるいくつかのがん免疫療法成分のための医薬組成物は、例えば、国際公開第２００３／０４０１７０号（抗ＣＤ４０抗体について）および国際公開第２０１０／７７６３４号（ＰＤ－Ｌ１抗体について）に開示されているか、または市販の医薬品として入手可能である。

【０４３９】

本明細書における例示的な薬学的に許容され得る担体には、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（ｓＨＡＳＥＧＰ）、例えば、ｒＨｕＰＨ２０（ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）、Ｈａｌｏｚｙｍｅ，Ｉｎｃ．）などのヒト可溶性ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ糖タンパク質など、間質性薬物分散剤がさらに含まれる。ｒＨｕＰＨ２０を含む、特定の例示的なｓＨＡＳＥＧＰおよび使用方法は、米国特許出願公開第２００５／０２６０１８６号および同第２００６／０１０４９６８号に記載されている。一態様では、ｓＨＡＳＥＧＰは、１つ以上のさらなるグリコサミノグリカナーゼ（例えば、コンドロイチナーゼ）と組み合わされる。

【０４４０】

例示的な凍結乾燥された抗体組成物は、米国特許第６，２６７，９５８号に記載されている。水性抗体組成物としては、米国特許第６，１７１，５８６号および国際公開第２００６／０４４９０８号に記載のものが挙げられ、後者の組成物は、ヒスチジン－酢酸緩衝液を含む。

【０４４１】

抗体がスプリット抗体である場合、第１のヘミボディおよび第２のヘミボディは、単一の医薬組成物または別個の医薬組成物に製剤化され得る。

【０４４２】

本明細書における製剤はまた、処置される特定の適応症に必要な２つ以上の有効成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有してもよい。例えば、上述の化学療法剤および／または放射線増感剤をさらに提供することが望ましい場合がある。かかる有効成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせて好適に存在する。

【０４４３】

有効成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ

乳濁液、ナノ粒子、およびナノカプセル）内、またはマクロ乳濁液中に取り込まれ得る。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０）に開示されている。

【０４４４】

徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、これらのマトリクスは、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

【０４４５】

ｉｎ ｖｉｖｏ投与に使用される製剤は、一般に無菌である。無菌は、例えば無菌濾過膜による濾過によって容易に達成され得る。

【０４４６】

Ｏ．抗体変異体

特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体のいずれかのアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって調製されてもよい。このような修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／または抗体のアミノ酸配列内の残基への挿入、および／または抗体のアミノ酸配列内の残基の置換が挙げられる。欠失、挿入、および置換の任意の組合せは、最終コンストラクトが、所望の特徴（例えば、抗原結合）を有する限り、最終コンストラクトに到達するように行われ得る。

【０４４７】

置換、挿入、および欠失変異体

特定の実施形態では、１つ以上のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換変異誘発のための目的の部位には、ＨＶＲ（ＣＤＲ）およびＦＲが含まれる。保存的置換は、表３において「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化を表３に「例示的な置換」の見出しの下に示し、またアミノ酸側鎖クラスに関して下にさらに記載する。目的の抗体中にアミノ酸置換を導入し、その産物を、所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、減少した免疫原性、または低下したもしくは排除されたＡＤＣＣもしくはＣＤＣについてスクリーニングしてもよい。

【表３】

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ａｌａ（A）	Ｖａｌ；Ｌｅｕ；Ｉｌｅ	Ｖａｌ
Ａｒｇ（R）	Ｌｙｓ；Ｇｌｎ；Ａｓｎ	Ｌｙｓ
Ａｓｎ（N）	Ｇｌｎ；Ｈｉｓ；Ａｓｐ，Ｌｙｓ；Ａｒｇ	Ｇｌｎ
Ａｓｐ（D）	Ｇｌｕ；Ａｓｎ	Ｇｌｕ
Ｃｙｓ（C）	Ｓｅｒ；Ａｌａ	Ｓｅｒ
Ｇｌｎ（Q）	Ａｓｎ；Ｇｌｕ	Ａｓｎ
Ｇｌｕ（E）	Ａｓｐ；Ｇｌｎ	Ａｓｐ
Ｇｌｙ（G）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｈｉｓ（H）	Ａｓｎ；Ｇｌｎ；Ｌｙｓ；Ａｒｇ	Ａｒｇ
Ｉｌｅ（I）	Ｌｅｕ；Ｖａｌ；Ｍｅｔ；Ａｌａ；Ｐｈｅ；ノルロイシン	Ｌｅｕ
Ｌｅｕ（L）	ノルロイシン；Ｉｌｅ；Ｖａｌ；Ｍｅｔ；Ａｌａ；Ｐｈｅ	Ｉｌｅ
Ｌｙｓ（K）	Ａｒｇ；Ｇｌｎ；Ａｓｎ	Ａｒｇ
Ｍｅｔ（M）	Ｌｅｕ；Ｐｈｅ；Ｉｌｅ	Ｌｅｕ
Ｐｈｅ（F）	Ｔｒｐ；Ｌｅｕ；Ｖａｌ；Ｉｌｅ；Ａｌａ；Ｔｙｒ	Ｔｙｒ
Ｐｒｏ（P）	Ａｌａ	Ａｌａ
Ｓｅｒ（S）	Ｔｈｒ	Ｔｈｒ
Ｔｈｒ（T）	Ｖａｌ；Ｓｅｒ	Ｓｅｒ
Ｔｒｐ（W）	Ｔｙｒ；Ｐｈｅ	Ｔｙｒ
Ｔｙｒ（Y）	Ｔｒｐ；Ｐｈｅ；Ｔｈｒ；Ｓｅｒ	Ｐｈｅ
Ｖａｌ（V）	Ｉｌｅ；Ｌｅｕ；Ｍｅｔ；Ｐｈｅ；Ａｌａ；ノルロイシン	Ｌｅｕ

【０４４８】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って分類され得る。

（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；

（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０４４９】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【０４５０】

ある種の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の１つ以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる試験のために選択される結果として生じる変異体（複数可）は、親抗体と比較して特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加、免疫原性の低減）の修飾（例えば、改善）を有し、かつ／または親抗体の実質的に保持された特定の生物学的特性を有するであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載のようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技

術を使用して、好都合に生成され得る。簡潔には、１つ以上のＣＤＲ残基が変異され、変異体抗体がファージにディスプレイされ、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【０４５１】

例えば、抗体親和性を改善するために、ＣＤＲにおいて改変（例えば、置換）を行ってもよい。そのような改変は、ＣＤＲ「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２０７：１７９－１９６（２００８）を参照されたい）、および／または抗原に接触する残基で行われてもよく、結果として生じる変異体ＶＨまたはＶＬは、結合親和性について試験される。二次ライブラリの構築およびそこからの再選択による親和性成熟は、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　１７８：１－３７（Ｏ’Ｂｒｉｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ，（２００１））に記載されている。親和性成熟のいくつかの態様では、多様な方法（例えば、エラープローンＰＣＲ、鎖シャッフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性変異誘発）のいずれかによって、成熟のために選択される可変遺伝子に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリが作製される。次いで、このライブラリをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのＣＤＲ残基（例えば、一度に４～６残基）をランダム化する、ＣＤＲ指向性アプローチを含む。抗原結合に関与するＣＤＲ残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発またはモデル化を用いて、特異的に同定され得る。特にＣＤＲ－Ｈ３およびＣＤＲ－Ｌ３が標的とされることが多い。

【０４５２】

特定の態様では、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗体の抗原に結合する能力を実質的に低下させない限り、１つ以上のＣＤＲ内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、本明細書に提供されるような保存的置換）は、ＣＤＲにおいて行われてもよい。そのような改変は、例えば、ＣＤＲ中の抗原接触残基の外側であってもよい。上記に提供される特定の変異体ＶＨおよびＶＬ配列において、各ＣＤＲは、改変されていないか、または１つ、２つもしくは３つ以下のアミノ酸置換を含むかのいずれかである。

【０４５３】

変異誘発の標的となり得る抗体の残基または領域を同定するための有用な方法は、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ　ａｎｄ　Ｗｅｌｌｓ（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１０８１－１０８５に記載されているように「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基または標的残基（例えば、ａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、およびｇｌｕなどの荷電残基）のグループを同定し、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）で置換して、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入されてもよい。代替的に、または追加的に、抗原－抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接触点を特定してもよい。そのような接触残基および隣接残基は、置換の候補として標的とされ得るか、または排除され得る。変異体は、所望の特性を含むかどうかを判定するためにスクリーニングされ得る。

【０４５４】

アミノ酸配列挿入には、１個の残基から１００個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一もしくは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例としては、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、酵素（例えば、ＡＤＥＰＴ（抗体指向性酵素プロドラッグ療法）のための）または抗体の血清半減期を増大させるポリペプチドに対する抗体のＮ末端またはＣ末端への融合が挙げられる。

【０４５５】

グリコシル化変異体

特定の態様では、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、１つ以上のグリコシル化部位が作り出されるか、または除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって、好都合に達成され得る。

【０４５６】

抗体がＦｃ領域を含む場合、それに結合するオリゴ糖は改変され得る。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、Ｎ結合によってＦｃ領域のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７に一般に結合される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Ｗｒｉｇｈｔ　ｅｔ　ａｌ．ＴＩＢＴＥＣＨ　１５：２６－３２（１９９７）を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のＧｌｃＮＡｃに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの態様では、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾は、特定の改善された特性を有する抗体変異体を作製するために行われ得る。

【０４５７】

一態様では、非フコシル化オリゴ糖、すなわちＦｃ領域に（直接的または間接的に）結合したフコースを欠くオリゴ糖構造を有する抗体変異体が提供される。このような非フコシル化オリゴ糖（「アフコシル化」オリゴ糖とも呼ばれる）は特に、二分岐オリゴ糖構造の幹の第１のＧｌｃＮＡｃに結合したフコース残基を欠く、Ｎ結合オリゴ糖である。一態様では、天然抗体または親抗体と比較して、Ｆｃ領域における非フコシル化オリゴ糖の割合が増加した抗体変異体が提供される。例えば、非フコシル化オリゴ糖の割合は、少なくとも約２０％、少なくとも約４０％、少なくとも約６０％、少なくとも約８０％、またはさらには約１００％（すなわち、フコシル化オリゴ糖が存在しない）であり得る。非フコシル化オリゴ糖の割合は、例えば、国際公開第２００６／０８２５１５号に記載されているように、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析法により測定された、Ａｓｎ２９７に結合した全てのオリゴ糖の合計（例えば、複合体、ハイブリッド、およびハイマンノース構造）に対する、フコース残基を欠くオリゴ糖の（平均）量である。Ａｓｎ２９７とは、Ｆｃ領域内の約２９７位（ＥＵナンバリングのＦｃ領域残基）に位置するアスパラギン残基を指すが、Ａｓｎ２９７は、抗体におけるわずかな配列のバリエーションに起因して、２９７位から上流または下流に±３アミノ酸、すなわち２９４位から３００位の間に位置する場合もある。Ｆｃ領域における非フコシル化オリゴ糖の割合が増加したそのような抗体は、改善されたＦｃγＲＩＩＩａ受容体結合および／または改善されたエフェクター機能、特に改善されたＡＤＣＣ機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８号、同第２００４／００９３６２１号を参照されたい。

【０４５８】

フコシル化が低下した抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が不足しているＬｅｃ１３ＣＨＯ細胞（Ｒｉｐｋａ　ｅｔ　ａｌ．Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２４９：５３３－５４５（１９８６）、米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８号、および国際公開第２００４／０５６３１２号、特に実施例１１）、およびノックアウト細胞株、例えばアルファ－１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ細胞（例えば、Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４－６２２（２００４）、Ｋａｎｄａ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．，９４（４）：６８０－６８８（２００６）、および国際公開第２００３／０８５１０７号を参照されたい）、またはＧＤＰ－フコース合成もしくはトランスポータータンパク質の活性が低下もしくは消失した細胞（例えば、米国特許出願公開第２００４２５９１５０号、同第２００５０３１６１３号、同第２００４１３２１４０号、同第２００４１１０２８２号を参照されたい）が挙げられる。

【０４５９】

さらなる態様では、抗体変異体は、例えば、抗体のＦｃ領域に結合した二分岐オリゴ糖

がＧｌｃＮＡｃによって二分されている二分オリゴ糖と共に提供される。そのような抗体変異体は、上記のように、低下したフコシル化および／または改善されたＡＤＣＣ機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、Ｕｍａｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１７，１７６－１８０（１９９９）、Ｆｅｒｒａｒａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎ　Ｂｉｏｅｎｇ　９３，８５１－８６１（２００６）、国際公開第９９／５４３４２号、同第２００４／０６５５４０号、同第２００３／０１１８７８号に記載されている。

【０４６０】

Ｆｃ領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも１つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。そのような抗体変異体は、改善されたＣＤＣ機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、国際公開第１９９７／３００８７号、同第１９９８／５８９６４号、および同第１９９９／２２７６４号に記載されている。

【０４６１】

抗体は、グリコシル化の程度を低下させるように修飾されることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、抗体は、アグリコシル化または脱グリコシル化され得る。抗体は、Ｎ２９７における置換、例えば、Ｎ２９７Ｄ／Ａを含み得る。

【０４６２】

Ｆｃ領域変異体

特定の実施形態では、１つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のＦｃ領域に導入され得、それにより、Ｆｃ領域変異体が生成され得る。Ｆｃ領域変異体は、１つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトＦｃ領域配列（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４　Ｆｃ領域）を含み得る。

【０４６３】

特定の実施形態では、本発明は、エフェクター機能が低下した、例えば、ＣＤＣ、ＡＤＣＣおよび／またはＦｃγＲ結合が低下または排除された抗体変異体を企図する。特定の態様では、本発明は、全てではないがいくつかのエフェクター機能を有することで、ｉｎ　ｖｉｖｏでの抗体の半減期が重要でありながら、特定のエフェクター機能（例えば、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）および抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ＡＤＣＣ））が不必要または有害である用途に対して望ましい候補となる、抗体変異体を企図する。

【０４６４】

ＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ活性の低下／枯渇を確認するために、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｖｏの細胞傷害アッセイを実施することができる。例えば、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合アッセイを実施して、抗体がＦｃγＲ結合を欠く（したがってＡＤＣＣ活性を欠く可能性が高い）が、ＦｃＲｎ結合能を保持していることを確実にすることができる。ＡＤＣＣを媒介する主要な細胞であるＮＫ細胞はＦｃγＲＩＩＩのみを発現するのに対し、単球はＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造血細胞上のＦｃＲの発現については、Ｒａｖｅｔｃｈ　ａｎｄ　Ｋｉｎｅｔ，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－４９２（１９９１）の４６４頁の表３に要約されている。目的の分子のＡＤＣＣ活性を評価するためのｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイの非限定的な例は、米国特許第５，５００，３６２号（例えば、Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８３：７０５９－７０６３（１９８６）を参照されたい）およびＨｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８２：１４９９－１５０２（１９８５）、５，８２１，３３７（Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６６：１３５１－１３６１（１９８７）を参照されたい）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい（例えば、フローサイトメトリーのためのＡＣＴＩ（商標）非放射性細胞傷害アッセイ（ＣｅｌｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．カリフォルニア州マウンテンビュー）、およびＣｙｔｏＴｏｘ９６（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ、ウィスコンシン州マディソン））。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）およびナチュラルキラー（ＮＫ

）細胞を含む。代替的に、または追加的に、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５：６５２－６５６（１９９８）に開示されるような動物モデルにおいて、ｉｎ　ｖｉｖｏで評価され得る。また、抗体がＣ１ｑに結合することができず、したがってＣＤＣ活性を欠くことを確認するために、Ｃ１ｑ結合アッセイを実施してもよい。例えば、国際公開第２００６／０２９８７９号および国際公開第２００５／１００４０２号における、Ｃ１ｑおよび３ｃ結合ＥＬＩＳＡを参照されたい。補体活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイを行ってもよい（例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０２：１６３（１９９６）、Ｃｒａｇｇ，Ｍ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ　１０１：１０４５－１０５２（２００３）、およびＣｒａｇｇ，Ｍ．Ｓ．ａｎｄ　Ｍ．Ｊ．Ｇｌｅｎｎｉｅ，Ｂｌｏｏｄ　１０３：２７３８－２７４３（２００４）を参照されたい）。ＦｃＲｎ結合およびｉｎ　ｖｉｖｏクリアランス／半減期の決定も、当技術分野で公知の方法を使用して行うことができる（例えば、Ｐｅｔｋｏｖａ，Ｓ．Ｂ．ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ’ｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８（１２）：１７５９－１７６９（２００６）；国際公開第２０１３／１２０９２９号Ａｌを参照されたい）。

【０４６５】

エフェクター機能が低下した抗体としては、Ｆｃ領域の残基２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７および３２９のうちの１つ以上の置換（米国特許第６，７３７，０５６号）、例えばＰ３２９Ｇを有するものが挙げられる。このようなＦｃ変異体としては、残基２６５および２９７のアラニンへの置換を有するいわゆる「ＤＡＮＡ」Ｆｃ変異体（米国特許第７，３３２，５８１号）を含む、アミノ酸２６５位、２６９位、２７０位、２９７位および３２７位のうちの２つ以上に置換を有するＦｃ変異体が挙げられる。

【０４６６】

特定の態様では、抗体変異体は、ＦｃγＲ結合を減少させる１つ以上のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の２３４位および２３５位（ＥＵナンバリングの残基）における置換を有するＦｃ領域を含む。一態様では、置換は、Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａ（ＬＡＬＡ）である。特定の態様では、抗体変異体は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に由来するＦｃ領域に、Ｄ２６５Ａおよび／またはＰ３２９Ｇをさらに含む。一態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に由来するＦｃ領域における、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５ＡおよびＰ３２９Ｇ（ＬＡＬＡ－ＰＧ）である。（例えば、国際公開第２０１２／１３０８３１号を参照されたい）。別の態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に由来するＦｃ領域における、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５ＡおよびＤ２６５Ａ（ＬＡＬＡ－ＤＡ）である。代替置換としては、任意にＤ２６５Ａおよび／またはＰ３２９Ｇおよび／またはＰ３３１Ｓと組み合わせた、Ｌ２３４Ｆおよび／またはＬ２３５Ｅが挙げられる。

【０４６７】

他の実施形態では、ＩｇＧ４またはＩｇＧ２などのエフェクター機能が低下したＩｇＧサブタイプを使用することが可能であり得る。

ＦｃＲへの結合が改善または減少した特定の抗体変異体が記載されている。（例えば、米国特許第６，７３７，０５６号、国際公開第２００４／０５６３１２号、およびＳｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１－６６０４（２００１）を参照されたい。）

【０４６８】

いくつかの実施形態では、例えば、米国特許第６，１９４，５５１号、国際公開第９９／５１６４２号、およびＩｄｕｓｏｇｉｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６４：４１７８－４１８４（２０００）に記載されているように、Ｃ１ｑ結合および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）の改変（すなわち、改善または減少のいずれか、好ましくは減少）をもたらすＦｃ領域内で改変が行われる。

【０４６９】

特定の態様では、抗体変異体は、ＦｃＲｎ結合を低下させる１つ以上のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃの領域の２５３位、および／または３１０位、および／または４３５位（Ｅ

Ｕナンバリングの残基）における置換を有するＦｃ領域を含む。特定の態様では、抗体変異体は、２５３位、３１０位および４３５位におけるアミノ酸置換を有するＦｃ領域を含む。一態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に由来するＦｃ領域における、Ｉ２５３Ａ、Ｈ３１０ＡおよびＨ４３５Ａである。例えば、Ｇｒｅｖｙｓ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９４（２０１５）５４９７－５５０８を参照されたい。

【０４７０】

特定の態様では、抗体変異体は、ＦｃＲｎ結合を低下させる１つ以上のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の３１０位、および／または４３３位、および／または４３６位（ＥＵナンバリングの残基）における置換を有するＦｃ領域を含む。特定の態様では、抗体変異体は、３１０位、４３３位および４３６位におけるアミノ酸置換を有するＦｃ領域を含む。一態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域に由来するＦｃ領域における、Ｈ３１０Ａ、Ｈ４３３ＡおよびＹ４３６Ａである。（例えば、国際公開第２０１４／１７７４６０号Ａｌを参照されたい）。例えば、いくつかの実施形態では、正常なＦｃＲｎ結合が使用され得る。

【０４７１】

Ｆｃ領域変異体の他の例に関しては、Ｄｕｎｃａｎ＆Ｗｉｎｔｅｒ，Ｎａｔｕｒｅ　３２２：７３８－４０（１９８８）、米国特許第５，６４８，２６０号、米国特許第５，６２４，８２１号、および国際公開第９４／２９３５１号も参照されたい。

【０４７２】

本明細書に報告される完全長抗体の重鎖のＣ末端は、アミノ酸残基ＰＧＫで終わる完全なＣ末端であり得る。重鎖のＣ末端は、Ｃ末端アミノ酸残基のうちの１つまたは２つが除去された、短縮されたＣ末端であり得る。重鎖のＣ末端は、ＰＧで終わる短縮されたＣ末端であり得る。本明細書に報告される全ての態様のうちの一態様では、本明細書で明記されるＣ末端のＣＨ３ドメインを含む重鎖を含む抗体は、Ｃ末端グリシン残基（Ｇ４４６、ＥＵインデックス・ナンバリングのアミノ酸位置）を含む。これは、本明細書で使用される「完全長抗体」または「完全長重鎖」という用語に依然として明示的に包含される。

【０４７３】

改善されたアセンブリ／安定性のための変異体

多重特異性抗体を作製するために公知の技術を使用して、本明細書に記載の多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体のいずれかを作製することができる。これらには、限定されるものではないが、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え共発現（Ｍｉｌｓｔｅｉｎ　ａｎｄ　Ｃｕｅｌｌｏ，Ｎａｔｕｒｅ　３０５：５３７（１９８３）を参照されたい）および「ノブ・イン・ホール」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号およびＡｔｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７０：２６（１９９７）を参照されたい）が含まれる。他の方法としては、抗体Ｆｃ－ヘテロ二量体分子を作製するための静電ステアリング効果を操作すること（例えば、国際公開第２００９／０８９００４号を参照されたい）、２つ以上の抗体または断片を架橋すること（例えば、米国特許第４，６７６，９８０号、およびＢｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照されたい）、ロイシンジッパーを使用すること（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）および国際公開第２０１１／０３４６０５号を参照されたい）、軽鎖のミスペアリングの問題を回避するために共通の軽鎖技術を使用すること（例えば、国際公開第９８／５０４３１号を参照されたい）が挙げられる。

【０４７４】

上記の多重特異性抗体またはスプリット多重特異性抗体のいずれにおいても、重鎖ヘテロ二量体の正しいアセンブリは、様々な修飾によって支援され得る。

【０４７５】

Ｆｃ領域のＣＨ３ドメインは、「ノブ・イントゥ・ホール」技術によって改変され得、これは、例えば、国際公開第９６／０２７０１１号、Ｒｉｄｇｗａｙ，Ｊ．Ｂ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ　９（１９９６）６１７－６２１、およびＭｅｒｃｈａ

ｎｔ，Ａ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　１６（１９９８）６７７－６８１に、いくつかの例を伴って詳細に記載されている。この方法では、２つのＣＨ３ドメインの相互作用表面が、これら２つのＣＨ３ドメインを含む両方の重鎖のヘテロ二量体化を増加させるように改変される。（２つの重鎖の）２つのＣＨ３ドメインの各々は「ノブ」であり得、他方は「ホール」である。例えば、ＥＵインデックス・ナンバリングに従って、一方は、いわゆる「ノブ変異」（例えば、Ｔ３６６Ｗ、および任意にＳ３５４ＣまたはＹ３４９Ｃのうち１つ、好ましくはＳ３５４Ｃ）を含み、他方は、いわゆる「ホール変異」（例えば、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８ＡおよびＹ４０７Ｖ、ならびに任意にＹ３４９ＣまたはＳ３５４Ｃ、好ましくはＹ３４９Ｃ）を含む（例えば、Ｃａｒｔｅｒ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．２（１９９６）７３を参照されたい）。

【０４７６】

したがって、いくつかの実施形態では、抗体またはヘミボディは、さらに以下のように特徴付けられる：Ｆｃドメインの一方のサブユニットのＣＨ３ドメインおよびＦｃドメインの他方のサブユニットのＣＨ３ドメインはそれぞれ、抗体ＣＨ３ドメイン間の元来の界面を含む界面と接触し、当該界面は、抗体の形成を促進するように改変され、改変は、以下を特徴とする：

ａ）他方のＦｃサブユニットのＣＨ３ドメインの元来の界面と接触する一方のサブユニットのＣＨ３ドメインの元来の界面内で、アミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換されるように、一方のＦｃサブユニットのＣＨ３ドメインが改変され、それにより、一方のＦｃサブユニットのＣＨ３ドメインの界面内に隆起が生成され、これは、他方のＦｃサブユニットのＣＨ３ドメインの界面内の空洞内に配置可能である、および

ｂ）抗体内の第１のＣＨ３ドメインの元来の界面と接触する第２のＣＨ３ドメインの元来の界面内で、アミノ酸残基が、より小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換されるように、他方のＦｃサブユニットのＣＨ３ドメインが改変され、それにより、第２のＣＨ３ドメインの界面内に空洞が生成され、その中に第１のＣＨ３ドメインの界面内の隆起が配置可能である。

【０４７７】

より大きな側鎖体積を有する当該アミノ酸残基は、アルギニン（Ｒ）、フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）からなる群から任意に選択され得る。より小さな側鎖体積を有する当該アミノ酸残基は、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、トレオニン（Ｔ）、バリン（Ｖ）からなる群から任意に選択され得る。

【０４７８】

ジスルフィド架橋の導入は、ヘテロ二量体を安定化し（Ｍｅｒｃｈａｎｔ，Ａ．Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　１６（１９９８）６７７－６８１、Ａｔｗｅｌｌ，Ｓ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７０（１９９７）２６－３５）、収率を増加させるために、追加的または代替的に使用され得る。したがって、任意に、いくつかの実施形態では、両方のＣＨ３ドメインは、両方のＣＨ３ドメイン間にジスルフィド架橋が形成され得るように、各ＣＨ３ドメインの対応する位置にアミノ酸としてシステイン（Ｃ）を導入することによってさらに改変される。例としては、以下の位置の間のジスルフィド結合の導入が挙げられる：

ｉ）重鎖可変ドメインの４４位から軽鎖可変ドメインの１００位まで、

ｉｉ）重鎖可変ドメインの１０５位から軽鎖可変ドメインの４３位まで、または

ｉｉｉ）重鎖可変ドメインの１０１位から軽鎖可変ドメインの１００位まで（ナンバリングは常にＫａｂａｔのＥＵインデックスに従う）。

【０４７９】

追加的または代替的に、抗体は、そこに含まれるＦａｂ分子（ｃｒｏｓｓ－Ｆａｂ分子を含む）にアミノ酸置換を含んでもよく、これは、軽鎖と一致しない重鎖とのミスペアリング（ベンス・ジョーンズ型副産物）を減少させるのに特に有効であり、これは、結合アームの１つ（３つ以上の抗原結合Ｆａｂ分子を含む分子の場合はそれ以上）でのＶＨ／Ｖ

Ｌ交換を伴うＦａｂベースの二重／多重特異性抗原結合分子の産生で生じ得る（ＰＣＴ公開番号国際公開第２０１５／１５０４４７号も参照されたい。特にその中の例は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。望ましくない副産物、特に、結合アームの１つに生じるベンス・ジョーンズ型副産物に対する所望の多重特異性抗体の比は、Ｆａｂ分子のＣＨ１およびＣＬドメインの特定のアミノ酸位置と反対の電荷を有する荷電アミノ酸を導入することによって改善され得る（本明細書では「電荷修飾」と呼ぶことがある）。

【０４８０】

したがって、いくつかの実施形態では、Ｆａｂ分子を含む抗体は、本明細書に記載の電荷修飾を含む重鎖定常ドメインＣＨ　１ドメインおよび本明細書に記載の電荷修飾を含む軽鎖定常ＣＬドメインを有する少なくとも１つのＦａｂを含む。

【０４８１】

電荷修飾は、抗体に含まれる従来のＦａｂ分子（複数可）、または抗体に含まれるクロスオーバーＦａｂ分子（複数可）のいずれかにおいて行われ得る（一般に両方ではない）。特定の実施形態では、電荷修飾は、抗体に含まれる従来のＦａｂ分子（複数可）において行われる。

【０４８２】

いくつかの実施形態では、電荷修飾を含む軽鎖定常ドメインＣＬと電荷修飾を含む重鎖定常ドメインＣＨ１とを含むＦａｂまたはｃｒｏｓｓ－Ｆａｂにおいて、軽鎖定常ドメインＣＬの電荷修飾は、１２４位および任意に１２３位にあり（ナンバリングはＫａｂａｔに従う）、重鎖定常ドメインＣＨ１の電荷修飾は、１４７位および／または２１３位にある（ナンバリングはＫａｂａｔ　ＥＵインデックスに従う）。いくつかの実施形態では、軽鎖定常ドメインＣＬにおいて、１２４位のアミノ酸は、リジン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）またはヒスチジン（Ｈ）によって独立して（ナンバリングはＫａｂａｔに従う）（１つの好ましい実施形態では、リジン（Ｋ）によって独立して）置換され、重鎖定常ドメインＣＨ１において、１４７位のアミノ酸および／または２１３位のアミノ酸は、グルタミン酸（Ｅ）またはアスパラギン酸（Ｄ）によって独立して置換される（ナンバリングはＫａｂａｔ　ＥＵインデックスに従う）。

【０４８３】

抗体誘導体

特定の態様では、本明細書に提供される任意の抗体は、当技術分野で公知であり容易に入手可能なさらなる非タンパク質性部分を含むように、さらに修飾され得る。抗体の誘導体化に好適な部分としては、水溶性ポリマーが挙げられるが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか）、およびデキストランまたはポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレン（ｐｒｏｌｙｐｒｏｐｙｌｅｎｅ）オキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量であってもよく、分岐していても、分岐していなくてもよい。抗体に結合しているポリマーの数は様々であり得、複数のポリマーが結合している場合、それらは同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化のために使用されるポリマーの数および／またはタイプは、限定するものではないが、改善される抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が定義された条件下で治療に使用されるかどうかなどの考慮事項に基づいて決定され得る。

【０４８４】

Ｐ．アッセイ

本明細書に提供される抗体は、当技術分野で公知の様々なアッセイによって、それらの物理的／化学的特性および／または生物学的活性について同定、スクリーニング、または特徴付けされ得る。

【０４８５】

一態様では、本発明の抗体を、例えばＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロットなどの公知の方法によって、その抗原結合活性について試験する。

【０４８６】

抗体親和性

特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（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、または本明細書で他の様式で記載される標的抗原に対する解離定数（K_D）を有する。

【０４８７】

特定の実施形態では、放射性標識化合物に対する抗原結合部位は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（例えば１０－８Ｍ以下、例えば１０－８Ｍ～１０－１３Ｍ、例えば１０－９Ｍ～１０－１３Ｍ）の解離定数（K_D）を有する。いくつかの実施形態では、K_Dは、１ｎＭ以下、５００ｐＭ以下、２００ｐＭ以下、１００ｐＭ以下、５０ｐＭ以下、２０ｐＭ以下、１０ｐＭ以下、５ｐＭ以下もしくは１ｐＭ以下であるか、または本明細書で他の様式で記載されるとおりである。例えば、機能的結合部位は、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭまたは５００ｐＭ～１ｎＭのK_Dで放射性標識化合物／金属キレートに結合し得る。

【０４８８】

一実施形態では、K_Dは、放射性標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）によって測定される。一実施形態では、ＲＩＡは、目的の抗体のＦａｂバージョンおよびその抗原を用いて実施される。例えば、抗原に対するＦａｂの溶液結合親和性は、標識されていない抗原の滴定系列の存在下で、最小濃度の（^{125}Ｉ）標識された抗原でＦａｂを平衡化し、次いで、抗Ｆａｂ抗体でコーティングされたプレートで結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９３：８６５－８８１（１９９９）を参照されたい）。アッセイの条件を確立するために、ＭＩＣＲＯＴＩＴＥＲ（登録商標）マルチウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、５０ｍＭの炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）中の５μｇ／ｍＬの捕捉用抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ Ｌａｂｓ）で一晩コーティングし、その後、ＰＢＳ中の２％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミンで２～５時間にわたって室温（およそ２３℃）でブロッキングする。非吸着性プレート（Ｎｕｎｃ＃２６９６２０）中で、１００ｐＭまたは２６ｐＭの［^{125}Ｉ］－抗原を、目的のＦａｂの段階希釈物と混合する（例えば、Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４５９３－４５９９（１９９７）における抗ＶＥＧＦ抗体Ｆａｂ－１２の評価と一致する）。その後、目的のＦａｂを一晩インキュベートするが、インキュベーションをより長い期間（例えば、約６５時間）続けて、平衡に達することを確実にしてもよい。その後、室温でのインキュベーション（例えば、１時間）のために混合物を捕捉プレートに移す。次に、溶液を除去し、プレートを、ＰＢＳ中０．１％のポリソルベート２０（ＴＷＥＥＮ－２０（登録商標））で８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルのシンチラント（ｓｃｉｎｔｉｌｌａｎｔ）（ＭＩＣＲＯＳＣＩＮＴ－２０（商標）、Ｐａｃｋａｒｄ）を添加し、プレートをＴＯＰＣＯＵＮＴ（商標）ガンマカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ）上で１０分間カウントする。最大結合の２０％以下をもたらす各Ｆａｂの濃度を、競合結合アッセイにおける使用のために選択する。

【０４８９】

別の実施形態によれば、K_Dは、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－２０００またはＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．、ニュージャージー州ピ

スカタウェイ）を使用するアッセイを、約１０反応単位（ＲＵ）で、固定化された抗原ＣＭ５チップによって２５℃で実施する。一実施形態では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ（ＣＭ５、ＢＩＡＣＯＲＥ，Ｉｎｃ．）を、供給業者の説明書に従ってＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）を用いて活性化する。抗原を１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．８で、５μｇ／ｍｌ（約０．２μＭ）に希釈した後、５μｌ／分の流量で注入し、結合タンパク質のおよそ１０反応単位（ＲＵ）を達成する。抗原の注入後、１Ｍのエタノールアミンを注入して、未反応基をブロッキングする。キネティクス測定のために、Ｆａｂ（０．７８ｎＭ～５００ｎＭ）の２倍段階希釈物を、およそ２５μｌ／分の流量で２５℃で０．０５％ポリソルベート２０（ＴＷＥＥＮ－２０（商標））界面活性剤（ＰＢＳＴ）を含むＰＢＳに注入する。会合速度（ｋｏｎ）および解離速度（ｋｏｆｆ）を、単純な１対１Ｌａｎｇｍｕｉｒ結合モデル（ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅバージョン３．２）を使用して、会合センサグラムおよび解離センサグラムを同時に適合することによって、算出する。平衡解離定数（K_D）を、比ｋｏｆｆ／ｋｏｎとして算出する。例えば、Ｃｈｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９３：８６５－８８１（１９９９）を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによりオン速度が１０６Ｍ－１　ｓ－１を超える場合、オン速度を、ストップフローを装備した分光測色計（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）または撹拌キュベットを有する８０００シリーズＳＬＭ－ＡＭＩＮＣＯ（商標）分光測色計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）などの分光計で測定される抗原の増加した濃度の存在下で、ＰＢＳ（ｐＨ７．２）中２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂ形態）の２５℃での蛍光発光強度（励起＝２９５ｎｍ、発光＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域通過）の増加または減少を測定する蛍光クエンチ技術を使用することによって、決定することができる。

【０４９０】

別の実施形態では、K_Dは、ＳＥＴ（溶液平衡滴定）アッセイを使用して測定される。このアッセイによれば、試験抗体は、典型的には、一定の濃度で適用され、試験抗原の段階希釈物と混合される。平衡を確立するためのインキュベーションの後、遊離抗体の一部を抗原でコーティングされた表面上に捕捉し、一般に電気化学発光（例えば、Ｈａｅｎｅｌ　ｅｔ　ａｌ　Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　３３９（２００５）１８２－１８４に記載のもの）を使用して、標識／タグ付き抗種抗体で検出する。

【０４９１】

例えば、一実施形態では、３８４ウェルストレプトアビジンプレート（Ｎｕｎｃ、Ｍｉｃｒｏｃｏａｔ　＃１１９７４９９８００１）を、２０ｎｇ／ｍｌの濃度のＰＢＳ緩衝液中２５μｌ／ウェルの抗原ビオチン－異性体混合物と共に４℃で一晩インキュベートする。遊離抗原を用いた抗体試料の平衡化のために：０．０１ｎＭの－１ｎＭの抗体を、２５００ｎＭ、５００ｎＭまたは１００ｎＭの抗原の濃度で開始する１：３、１：２または１：１．７の希釈工程で関連抗原を用いて滴定する。試料を、密封ＲＥＭＰ保存ポリプロピレンマイクロプレート（Ｂｒｏｏｋｓ）中で、４℃で一晩インキュベートする。一晩インキュベートした後、ストレプトアビジンプレートを１ウェルあたり９０μｌのＰＢＳＴで３回洗浄する。平衡化プレートからの１５μｌの各試料をアッセイプレートに移し、室温で１５分間インキュベートし、続いてＰＢＳＴ緩衝液で３×９０μｌの洗浄工程を行う。検出は、２５μｌのヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体－ＰＯＤコンジュゲート（Ｊａｃｋｓｏｎ、１０９－０３６－０８８、ＯＳＥＰ中１：４０００）を添加し、続いてＰＢＳＴ緩衝液で６×９０μｌの洗浄工程を行うことによって行う。２５μｌのＴＭＢ基質（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＧｍｂＨ、カタログ番号：１１８３５０３３００１）を各ウェルに添加する。測定は、Ｓａｆｉｒｅ２リーダー（Ｔｅｃａｎ）で３７０／４９２ｎｍで行う。

【０４９２】

別の実施形態では、K_Dは、ＫｉｎＥｘＡ（速度論的排除）アッセイを使用して測定される。このアッセイによれば、抗原を、典型的には、一定濃度の抗体結合部位に滴定し、

試料を平衡化させ、次いで、フローセルに迅速に通し、そこで、遊離抗体結合部位が抗原でコーティングされたビーズ上に捕捉され、その一方で、抗原飽和抗体複合体が洗い流される。次いで、ビーズ捕捉抗体を、標識された抗種抗体、例えば蛍光標識された抗種抗体で検出する（Ｂｅｅ　ｅｔ　ａｌ　ＰｌｏＳ　Ｏｎｅ，２０１２；７（４）：ｅ３６２６１）。例えば、一実施形態では、ＫｉｎＥｘＡ実験は、ランニング緩衝液としてＰＢＳ　ｐＨ７．４を使用して室温（ＲＴ）で行われる。試料を、１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを補充したランニング緩衝液中で調製する（「試料緩衝液」）。０．２５ｍｌ／分の流量を使用する。５ｐＭの結合部位濃度を有する一定量の抗体を、１００ｐＭ（濃度範囲０．０４９ｐＭ～１００ｐＭ）で開始する２倍段階希釈によって抗原で滴定する。抗原を含まない抗体の１つの試料は、１００％シグナル（すなわち、阻害なし）として働く。抗原－抗体複合体をＲＴで少なくとも２４時間インキュベートして、平衡に到達させる。次いで、平衡化された混合物を、ＫｉｎＥｘＡシステムの抗原結合ビーズのカラムに５　ｍｌの容量で通して、溶液の平衡状態を乱すことなく未結合抗体をビーズによって捕捉することを可能にする。捕捉された抗体を、試料緩衝液中の２５０ｎｇ／ｍｌのＤｙｌｉｇｈｔ　６５０（登録商標）コンジュゲート抗ヒトＦｃ断片特異的二次抗体を使用して検出する。各試料を、全ての平衡実験について二重反復で測定する。ＫＤは、「標準分析」法を使用して、ＫｉｎＥｘＡソフトウェア（バージョン４．０．１１）に含まれる一部位均一結合モデルを使用したデータの非線形回帰分析から得られる。

【０４９３】

生物活性

いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独よりも、対象において遅い腫瘍成長速度をもたらす。いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独による処置よりも、対象の生存の可能性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独による処置よりも、対象における活性化腫瘍内ＣＤ８　Ｔ細胞の頻度の増加（例えば、４１ＢＢ発現のアップレギュレーションによって測定される）、ならびに／または対象の腫瘍、脾臓および流入領域リンパ節（ＤＬＮ）における活性化形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）および古典的ＤＣ（ｃＤＣ）の頻度の増加（例えば、ＣＤ８６発現のアップレギュレーションによって測定される）、ならびに／または対象の全免疫細胞におけるＴ細胞の頻度の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、対象は、患者、例えばヒト患者であり得る。他の実施形態では、活性が評価される対象は、マウスモデルなどのモデル動物であり得る。

【０４９４】

いくつかの実施形態では、併用療法は、事前標的化放射線免疫療法単独および／または免疫療法単独による処置よりも、対象における免疫記憶応答の増強または腫瘍再発の可能性の低下をもたらす。免疫記憶応答の増強は、マウスモデルにおける腫瘍再チャレンジに対するより大きな耐性によって評価され得る。

【０４９５】

マウスモデルの例は、抗体／スプリット抗体の標的抗原を発現する腫瘍細胞株を接種したマウスであり得る。例は、抗体／スプリット抗体、例えばｈｕＣＥＡの標的抗原を発現するように操作されたＰａｎｃ０２腫瘍細胞株またはＭＣ３８腫瘍細胞株である。腫瘍細胞株はまた、ルシフェラーゼなどのレポーターを発現するように操作され得る。接種は、皮下または同所性（例えば、膵臓内）であり得る。接種されたマウスはまた、標的抗原、例えばｈｕＣＥＡについてトランスジェニックであり得る。免疫療法のモデルとしてのヒトＣＥＡに対するマウストランスジェニックの例は、Ｃｌａｒｋｅ　ｅｔ　ａｌ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５８，１４６９－１４７７，Ａｐｒｉｌ　１，１９９８に考察されている。

【０４９６】

ＩＩＩ．配列

配列番号	説明	配列
1	重鎖ＣＤＲ１、＜Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ＞	GFSLSTYSMS
2	重鎖ＣＤＲ２＜Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ＞	FIGSRGDTYYASWAKG
3	重鎖ＣＤＲ３＜Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ＞	ERDPYGGGAYPPHL
4	軽鎖ＣＤＲ１、＜Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ＞	QSSHSVYSDNDLA
5	軽鎖ＣＤＲ２＜Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ＞	QASKLAS
6	軽鎖ＣＤＲ３＜Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ＞	LGGYDDESDTYG
7	重鎖可変ドメイン	(Q)VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLST

	<Pb-Dotam>PRIT-0213	YSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLT MTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVS S
8	軽鎖可変ドメイン<Pb-Dotam>PRIT-0213	(A)IQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCQSSHSVYS DNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
9	重鎖可変ドメイン<Pb-Dotam>PRIT-0214	(Q)VQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGFSLST YSMSWIRQPPGKGLEWIGFIGSRGDTYYASWAKGRVTISRDTSKNQVSLK LSSVTAADTAVYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSS
10	軽鎖可変ドメイン<Pb-Dotam>PRIT-0214	(A)IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYS DNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
11	重鎖CDR1<CEA>T84.66	GFNIKDTYMH
12	重鎖CDR2<CEA>T84.66	RIDPANGNSKYVPKFQG
13	重鎖CDR3<CEA>T84.6	FGYYVSDYAMAY

14	軽鎖ＣＤＲ１＜ＣＥＡ＞Ｔ８４．６６	RAGESVDIFGVGFLH
15	軽鎖ＣＤＲ２＜ＣＥＡ＞Ｔ８４．６６	RASNRAT
16	軽鎖ＣＤＲ３＜ＣＥＡ＞Ｔ８４．６６	QQTNEDPYT
17	重鎖可変ドメイン＜ＣＥＡ＞Ｔ８４．６６	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS
18	軽鎖可変ドメイン＜ＣＥＡ＞Ｔ８４．６６	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIK
19	重鎖ＣＤＲ１＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	GYTFTEFGMN
20	重鎖ＣＤＲ２＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	WINTKTGEATYVEEFKG
21	重鎖ＣＤＲ３＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	WDFAYYVEAMDY

22	軽鎖ＣＤＲ１＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	KASAAVGTYVA
23	軽鎖ＣＤＲ２＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	SASYRKR
24	軽鎖ＣＤＲ３＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	HQYYTYPLFT
25	重鎖可変ドメイン＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
26	軽鎖可変ドメイン＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK
27	リンカーおよび＜ＤＯＴＡＭ－ＶＨ＞を有しないＰＩＡＤ８７４９の重鎖＜ＣＥＡ＞→リンカーおよび＜ＤＯＴＡＭ＞を欠く、配列番号３２と同じプラスミド	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

28	ＰＩＡＤ８７４９重鎖ホール＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
29	リンカーおよび＜ＤＯＴＡＭ－ＶＬ＞を有しないＰＩＡＤ８５９２の重鎖＜ＣＥＡ→リンカーおよび＜ＤＯＴＡＭ＞を欠く、配列番号３３と同じプラスミド	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	ＰＩＡＤ８５９２重鎖ノブ＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS

10

20

30

40

50

		LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
31	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
32	Ｐ１ＡＤ８７４９重鎖ノブ＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ＜Ｄｏｔａｍ－ＶＨ＞	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALE WLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLV TVSS
33	Ｐ１ＡＤ８５９２重鎖ホール＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ＜Ｄｏｔａｍ－ＶＬ＞	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG**GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS**IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
34	Ｐ１ＡＤ８７４９および２軽鎖＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK

10

20

30

40

50

		VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
35	重鎖ＣＤＲ１、＜Ｃ８２５＞	DYGVH
36	重鎖ＣＤＲ２、＜Ｃ８２５＞	VIWSGGGTAYNTALIS
37	重鎖ＣＤＲ３、＜Ｃ８２５＞	RGSYPYNYFDA
38	軽鎖ＣＤＲ１、＜Ｃ８２５＞	GSSTGAVTASNYAN
39	軽鎖ＣＤＲ２、＜Ｃ８２５＞	GHNNRPP
40	軽鎖ＣＤＲ３、＜Ｃ８２５＞	ALWYSDHWV
41	重鎖可変ドメイン＜Ｃ８２５＞	HVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDNS KNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGQGTTVTVSS
42	軽鎖可変ドメイン、＜Ｃ８２５＞	QAVVIQESALTTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDHLFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAAL TIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTKLTVL
43	重鎖ＣＤＲ１＜ＣＥＡ＞Ａ５Ｂ７	DYYMN

44	重鎖CDR2<CE A>A5B7	FIGNKANAYTTEYSASVKG
45	重鎖CDR3<CE A>A5B7	DRGLRFYFDY
46	軽鎖CDR1<CE A>A5B7	RASSSVTYIH
47	軽鎖CDR2<CE A>A5B7	ATSNLAS
48	軽鎖CDR3<CE A>A5B7	QHWSSKPPT
49	重鎖可変ドメイン< CEA>A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISR DKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS
50	軽鎖可変ドメイン< CEA>A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK

51	P1AE4956重鎖ホール<CEA>A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISR DKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG
52	P1AE4956重鎖ノブ<CEA>A5B7<Dotam−VH>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISR DKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLG FIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSS
53	リンカーおよび<DOTAM−VH>を有しない P1AE4956の重鎖<CEA>→リンカーおよび<DOTAM>を欠く、配列番号52と同じプラスミド	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISR DKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSP

10

20

30

40

50

54	P1AE4956軽鎖<CEA>A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	P1AE4957重鎖ノブ<CEA>A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISR DKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPG
56	P1AE4957重鎖ホール<CEA>A5B7<Dota m－VL>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISR DKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKL LIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
57	リンカーおよび<DOTAM－VL>を有しないP1AE4957の重鎖<CE	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISR DKSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS

	A>→リンカーおよび<DOTAM>を欠く、配列番号56と同じプラスミド	CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSP
58	P1AE4957軽鎖<CEA>A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLE PEDFAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
59	重鎖CDR1<CEA>A9	GGTFSYYAIS
60	重鎖CDR2<CEA>A9	GILPAFGAANYAQKFQG
61	重鎖CDR3<CEA>A9	LPPLPGAGLDY
62	軽鎖CDR1<CEA>A9	RASQSISSWLA

63	軽鎖ＣＤＲ２＜ＣＥＡ＞２８Ａ９	DASSLES
64	軽鎖ＣＤＲ３＜ＣＥＡ＞２８Ａ９	QQNTQYPMT
65	重鎖可変ドメイン＜ＣＥＡ＞２８Ａ９	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSS
66	軽鎖可変ドメイン＜ＣＥＡ＞２８Ａ９	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTE FTLTISSLQPDDFATYYCQQNTQYPMTFGQGTKVEIK
67	重鎖ＣＤＲ１＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	GFTFSKYAMA
68	重鎖ＣＤＲ２＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	SISTGGVNTYYADSVKG
69	重鎖ＣＤＲ３＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	HTGDYFDY

70	軽鎖ＣＤＲ１＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	RASQSVSISGINLMN
71	軽鎖ＣＤＲ２＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	HASILAS
72	軽鎖ＣＤＲ３＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	QQTRESPLT
73	重鎖可変ドメイン＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS
74	軽鎖可変ドメイン＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQQKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
75	重鎖ＣＤＲ１＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	GFTFSSYAMS
76	重鎖ＣＤＲ２＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	AIIGSGASTYYADSVKG

77	重鎖ＣＤＲ３＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	GWFGGFNY
78	軽鎖ＣＤＲ１＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	RASQSVTSSYLA
79	軽鎖ＣＤＲ２＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	VGSRRAT
80	軽鎖ＣＤＲ３＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	QQGIMLPPT
81	重鎖可変ドメイン＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
82	軽鎖可変ドメイン＜ＦＡＰ＞４Ｂ９	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
83	Ｐ１ＡＦ０７０９ＨＣノブ＜ＣＥＡ＞Ｔ８４．６６（Ｄ１	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

10

20

30

40

50

	AE4688)	GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
84	P1AF0709 HCホール<CEA >T84.66 D otam-VL(D 1AA4920)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPK LLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
85	リンカーおよびDO TAMを有しないP 1AF0709 H Cホール<CEA> T84.66 86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
86	P1AF0298 HCホール<CEA >T84.66(D 1AE4687)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP

10

20

30

40

50

		KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
87	ＰＩＡＦ０２９８Ｈ Ｃノブ＜ＣＥＡ＞Ｔ ８４．６６ Ｄｏｔ ａｍ－ＶＨ－ＡＳＴ （Ｄ１ＡＥ３６６ ８）	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWL GFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVS SAST
88	ＰＩＡＦ０２９８ｊ ンカーおよびＤＯＴ ＡＭを有しないＨＣ ノブ＜ＣＥＡ＞Ｔ８ ４．６６	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITA DTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG
89	Ｐ１ＡＦ０７０９お よびＰＩＡＦ０２９ ８軽鎖（Ｄ１ＡＡ４ １２０）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

90	P1AF0710 HCノブ<CEA>28A9（D1AE4690）	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
91	P1AF0710 HCホール<CEA>28A9 Dot am-VL（D1AC3172）	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIY QASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
92	リンカーまたはDOTAMを有しないP1AF0710 HCホール<CEA>28A9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS

10

20

30

40

50

93	P1AF07111H Cホール<CEA>28A9（D1AE4689）	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
94	P1AF07111H Cノブ<CEA>28A9 Dotam-VH-AST（D1AE3671）	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIG SRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSAST
95	P1AF07111J ンカーおよびDOTAMを有しないHCノブ<CEA>28A9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG

10

20

30

40

50

96	P1AF0710および P1AF0711軽鎖（D1AA299）	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPDDFATYYCQQNTQYPMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
97	P1AF0712 HCノブ＜CEA＞ CH1A1A（D1AC4023	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
98	P1AF0712 HCホール＜CEA＞CH1A1A DOTA－VL（D1AE4684）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGSQAVVIQESALTTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDHLF TGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTKLTVL
99	リンカーまたはDOTAを有しないP1AF0712 HCホール＜CEA＞	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

10

20

30

40

50

		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS
		LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
		KSLSLSPG
I00	P1AF0713HCホール<CEA>CH1A1A(D1AC4022)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT
		DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
		LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
		PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS
		LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
		KSLSLSPG
I01	P1AF0713HCノブ<CEA>CH1A1A DOTA−VH−AST(D1AE3670)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT
		DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
		LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
		PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS
		LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
		QKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSHVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGL
		EWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGQGTTVTVS
		SAST
I02	リンカーおよびDOTAを有しないP1AF0713 HCノブ<CEA>CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT
		DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
		LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
		PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK

10

20

30

40

50

		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS
		LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
		QKSLSLSPG
I03	P1AF0712および P1AF0713軽鎖（D1AA384）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
		SLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
		DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
I04	P1AF8284および P1AF8285 HC／＜GPRC5D＞（D1AF6517）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDN
		SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
		DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
		THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
		NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK
		GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
		PGK
I05	P1AF8284HCホール m－VL（D1AG3592）	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
		QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA
		VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
		LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLI
		YQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
I06	P1AF8285Hホール m－VHA（D1AG3591）	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
		QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA
		VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
		LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFI

10

20

30

40

50

		GSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA
107	P1AF8284および P1AF8285軽鎖（D1AF6469）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQQKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
108	P1AF8286およびP1AF8287 HCノブ＜FAP＞4B9（D1AF6515）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK
109	P1AF8286 HCホール Dotam－VL（D1AG35922）	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLI YQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
110	P1AF8287 HCホール Dotam－VHA（D1AG35911）	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFI GSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA

10

20

30

40

50

111	P1AF8286および P1AF8287軽鎖（D1AB974）	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
112	P1AF7782および P1AF7784 HCノブ<CEA>CH1A1A（D1AD3419）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTT DTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK
113	P1AF7782 HCホール Dotam-VL（D1AG2237）	SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGSGGDKTHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	P1AF7784H Cホール Dotam-VH（D1AG2236）	GVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	P1AF7782および P1AF778	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV

	4軽鎖（D1AD34 21）	DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
116	重鎖CDR1<CEA>MFE23	DSYMH
117	重鎖CDR2<CEA>MFE23	WIDPENGDTEYAPKFQG
118	重鎖CDR2<CEA>MFE23−H26	WIDPENGGTNYAQKFQG
119	重鎖CDR3<CEA>MFE23	GTPTGPYYFDY
120	軽鎖CDR1<CEA>MFE23	SASSSVSYMH
121	軽鎖CDR1<CEA>MFE23−L24、L25	RASSSVSYMH

122	軽鎖CDR1<CEA>MFE23-L26	RASQSISSYM
123	軽鎖CDR2<CEA>MFE23	STSNLAS
124	軽鎖CDR2<CEA>MFE23-L26	YTSNLAS
125	軽鎖CDR2<CEA>MFE23-L29	STSSLQS
126	軽鎖CDR3<CEA>MFE23	QQRSSYPLT
127	重鎖可変ドメイン<CEA>MFE23	QVKLQQSGAELVRSGTSVKLSCTASGFNIKDSYMHWLRQGPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKATFTTDT SSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTTVTVSS
128	軽鎖可変ドメイン<CEA>MFE23	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRM EAEDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK

10

20

30

40

50

129	MFE-H24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMT TDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
130	MFE-H25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMT TDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
131	MFE-H26	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGGTNYAQKFQGRVTMT TDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
132	MFE-H27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMT TDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
133	MFE-H28	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMT RDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
134	MFE-H29	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTITT DESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
135	MFE-L24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
136	MFE-L25	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
137	MFE-L26	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
138	MFE-L27	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVPYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSV QPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
139	MFE-L28	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVPYMHWLQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSV QPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK

140	MFE-L29	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVPYMHWLQQKPGKAPKLLIYSTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSV QPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
141	ＣＥＡのＡ２ ドメイン	PKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGP YECGIQNKLSVDHSDPVILN
142	ＣＥＡのＡ１ ドメイン	PKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTAS YKCETQNPVSARRSDSVILN

【実施例】

【０４９７】

ＩＶ．実施例

以下は、本発明の方法および組成物の例である。上記に提供される一般的な説明を考慮すると、種々の他の実施形態が実施されてもよいことが理解される。

【０４９８】

略語の用語集

ＡＤＡ　抗薬物抗体

ＡＳＴ　アラニン、セリン、トレオニン

ＢＬＩ　生物発光イメージング
ＢｓＡｂ　二重特異性抗体
ＢＷ　体重
ＣＡ　除去剤
ｃＤＣ　古典的樹状細胞
ＣＥＡ　癌胎児性抗原
ＣＩＴ　がん免疫療法
ＤＣ　樹状細胞
ＤＬＮ　流入領域リンパ節
ＤＯＴＡＭ　１，４，７，１０－テトラキス（カルバモイルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン
ＩＤ　注入線量
ＥＬＩＳＡ　酵素結合免疫吸着アッセイ
ＦＡＣＳ　蛍光活性化セルソーティング
ＦＡＰ　線維芽細胞活性化タンパク質
ＧＰＲＣ５Ｄ　Ｇタンパク質共役受容体ファミリーＣグループ５メンバーＤ
ｈｕＣＥＡ　ヒト癌胎児性抗原
ＩＤ　注入線量
ＩＦＮ　インターフェロン
ＩＬ　インターロイキン
ＩＰ　腹腔内
ＩＶ　静脈内
Ｌｕｃ　ルシフェラーゼ
ＭＣＨ　主要組織適合遺伝子複合体
ＭＦＩ　平均蛍光強度
ＭＷ　分子量
ＮＢＦ　中性緩衝ホルマリン
ＰＢＳ　リン酸緩衝生理食塩水
ＰＤ　薬力学
ｐＤＣ　形質細胞様樹状細胞
ｐ．ｉ．注射後
ＰＭＡ　ホルボール１２－ミリステート－１３－アセテート
ｐＫ　薬物動態
ＰＲＩＴ　事前標的化放射線免疫療法
ＲＩＴ　放射線免疫療法
ＲＣＦ　相対遠心力（Ｇ力）
ＲＯＩ　関心領域
ＲＴ　室温
ＳＣ　皮下
ＳＣＩＤ　重症複合免疫不全
ＳＤ　標準偏差
ＳＥＭ　平均の標準誤差
ＳＯＰＦ　特定の日和見病原体フリー
ＳＰＬＩＴ　ＳｅＰａｒａｔｅｄ　ｖ－ｄｏｍａｉｎｓ　ＬＩｎｋａｇｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ
ＴＡ　標的抗原
ＴＧＩ　腫瘍成長阻害
ＴＲ　腫瘍退縮
Ｔｒｅｇ　制御性Ｔ細胞

【０４９９】

実施例１：ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ　ＶＨ／ＶＬ抗体の作製

標的抗原に対する結合部位および放射性標識化合物に対する結合部位を有する二重特異性抗体を使用するＰＲＩＴ（事前標的化放射線免疫療法）の方法は、一般に、効果的な標的化および高い腫瘍対正常組織吸収線量比を確実にするために、抗体および放射性リガンドの投与の間に除去剤（ＣＡ）を使用する（図３参照）。１つのそのような方法の例では、注射されたＢｓＡｂは腫瘍に浸透するのに十分な時間、一般に４～１０日間許容され、その後、循環するＢｓＡｂはＰｂ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡを用いて中和される。ＣＡは、腫瘍に浸透することなく非標的化ＢｓＡｂへの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ結合をブロックし、これは事前標的化部位をブロックする。この事前標的化レジメンは、続いて投与される放射性標識キレートである^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの効率的な腫瘍蓄積を可能にする。

【０５００】

しかし、除去剤を含む方法では、ＣＡの使用は、非効率的である方法にさらなる工程を導入する。さらに、複雑な要因であるＣＡ投与のタイミングおよび投与を慎重に選択することが重要であり得る。

【０５０１】

除去剤の使用に関連する問題に対処するために、本発明者らは、ＤＯＴＡＭ　ＶＬおよびＶＨドメインを分割して、それらが別個の抗体上に見出されるようにする戦略を提案した。

【０５０２】

例示的なスプリット－ＤＯＴＡＭ　ＶＨ／ＶＬ抗体の作製については、以下でさらに論じる。

【０５０３】

抗体の重鎖または軽鎖の組換え発現のためのプラスミドの作製

所望のタンパク質を、ヒト胎児腎臓細胞（ＨＥＫ２９３）の一過性トランスフェクションによって発現させた。所望の遺伝子／タンパク質（例えば、完全長抗体重鎖、完全長抗体軽鎖、またはさらなるドメイン（例えば、そのＣ末端における免疫グロブリン重鎖または軽鎖可変ドメイン）を含む完全長抗体重鎖）の発現のために、以下の機能的エレメントを含む転写ユニットを使用した：

－イントロンＡを含む、ヒトサイトメガロウイルス（Ｐ－ＣＭＶ）由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、

－ヒト重鎖免疫グロブリン５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、

－マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列（ＳＳ）、

－発現される遺伝子／タンパク質、ならびに

－ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列ＢＧＨ　ｐＡ）。

【０５０４】

発現される所望の遺伝子を含む発現ユニット／カセットに加えて、基本的／標準的な哺乳動物発現プラスミドは、

－　大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターｐＵＣ１８からの複製起点、および

－　大腸菌におけるアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子を含んでいた。

【０５０５】

ａ）抗体重鎖の発現プラスミド

完全かつ機能的な抗体重鎖と、それに続くさらなる抗体Ｖ重鎖またはＶ軽鎖ドメインとを含むＣ末端融合遺伝子を含む遺伝子をコードする抗体重鎖を、それぞれＧ４Ｓｘ４リンカーによって分離されたそれぞれの配列エレメント（Ｖ重鎖またはＶ軽鎖）をコードするＤＮＡ断片をヒトＩｇＧ分子のＣＨ３ドメインのＣ末端に融合することによって構築した（ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＨまたはＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＬ）。２つのＣＨ３ドメインのＣ末端にそれぞれ１つの

ＶＨドメインおよび１つのＶＬドメインを有する組換え抗体分子を、ノブ・イントゥ・ホール技術を用いて発現させた。

【０５０６】

ＨＥＫ２９３細胞におけるＣ末端ＶＨまたはＶＬドメインを有する抗体重鎖の一過性発現のための発現プラスミドは、Ｃ末端ＶＨまたはＶＬドメイン発現カセットを有する抗体重鎖断片の他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターｐＵＣ１８からの複製起点と、大腸菌におけるアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子とを含んでいた。Ｃ末端ＶＨまたはＶＬドメイン融合遺伝子を有する抗体重鎖断片の転写ユニットは、以下の機能的エレメントを含む：

－　イントロンＡを含む、ヒトサイトメガロウイルス（Ｐ－ＣＭＶ）由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、

－　ヒト重鎖免疫グロブリン５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、

－　マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、

－　核酸をコードする抗体重鎖（ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＨまたはＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＬ）、ならびに

－　ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列ＢＧＨ　ｐＡ）。

【０５０７】

ｂ）抗体軽鎖の発現プラスミド

完全かつ機能的な抗体軽鎖を含む遺伝子をコードする抗体軽鎖を、それぞれの配列エレメントをコードするＤＮＡ断片を融合することによって構築した。

【０５０８】

抗体軽鎖の一過性発現のための発現プラスミドは、抗体軽鎖断片の他に、大腸菌におけるこのプラスミドの複製を可能にするベクターｐＵＣ１８からの複製起点と、大腸菌におけるアンピシリン耐性を付与するベータラクタマーゼ遺伝子とを含んでいた。抗体軽鎖断片の転写ユニットは、以下の機能的エレメントを含む：

－　イントロンＡを含む、ヒトサイトメガロウイルス（Ｐ－ＣＭＶ）由来の前初期エンハンサーおよびプロモーター、

－　ヒト重鎖免疫グロブリン５’非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、

－　マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、

－　核酸をコードする抗体軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）、ならびに

－　ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列ＢＧＨ　ｐＡ）。

【０５０９】

抗体分子の一過性発現

抗体分子を、Ｆ１７培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．）中で培養した一過性トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞（ヒト胎児腎臓細胞株２９３由来）中で作製した。トランスフェクションには、「２９３フリー」トランスフェクション試薬（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用した。上記のそれぞれの抗体重鎖および軽鎖分子を個々の発現プラスミドから発現させた。トランスフェクションは、製造業者の説明書に明記されているように実施した。免疫グロブリン含有細胞培養上清を、トランスフェクションの３～７日後に回収した。上清を、精製するまで低温（例えば、－８０℃）で保存した。

【０５１０】

例えばＨＥＫ２９３細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般情報は、Ｍｅｉｓｓｎｅｒ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．７５（２００１）１９７－２０３に示されている。

【０５１１】

ＰＲＩＴヘミボディ（スプリット抗体）を、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅ（アフィニティークロマトグラフィー）によって精製し、続いてＳｕｐｅｒｄｅｘ　２００（サイズ排除クロマトグラフィー）によって精製した。

【０５１２】

例示的な抗体の配列を以下に要約する。

抗体名	第１の重鎖	第２の重鎖	軽鎖
Ｐ１ＡＤ８５９２	配列番号３０	配列番号３３	配列番号３４
Ｐ１ＡＤ８７４９	配列番号２８	配列番号３２	配列番号３４
Ｐ１ＡＥ４９５６	配列番号５１	配列番号５２	配列番号５４
Ｐ１ＡＥ４９５７	配列番号５５	配列番号５６	配列番号５８

【０５１３】

ＤＯＴＡＭ－ＶＬ－Ｐ１ＡＤ８５９２を有するＰＲＩＴ　スプリット抗体については、分析ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づいて、濃度１．３７２ｍｇ／ｍＬおよび純度＞９６％の５ｍｇを製造した。ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－Ｐ１ＡＤ８７４９を有するＰＲＩＴスプリット抗体については、分析ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づいて、濃度２．０３ｍｇ／ｍＬおよび純度＞９１％の１４ｍｇを製造した。

【０５１４】

抗体Ｐ１ＡＥ４９５６およびＰ１ＡＥ４９５７も作製した。ＤＯＴＡＭ－ＶＬ－Ｐ１ＡＥ４９５７を有するＰＲＩＴスプリット抗体については、分析ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づいて、濃度２．６ｍｇ／ｍＬおよび純度＞８１．６％の１９ｍｇを製造した。ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－Ｐ１ＡＥ４９５６を有するＰＲＩＴスプリット抗体については、分析ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づいて、濃度１．５ｍｇ／ｍＬおよび純度＞９０％の６．９ｍｇを製造した。ＥＳＩ－ＭＳも使用して、ＰＲＩＴヘミボディの同一性を確認した。

【０５１５】

実施例２：スプリット抗体機能性のＦＡＣＳ分析

スプリット抗体またはヘミボディの機能性を評価するために、３７℃で１０分間、アキュターゼを使用してＭＫＮ－４５細胞を培養容器から剥離した。続いて、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、９６ウェルｖ底プレートに４×10^6細胞／ウェルの最終密度まで播種した。

【０５１６】

ヘミボディＰ１ＡＤ８７４９およびＰ１ＡＤ８５９２ならびにヒトＩＳＯ対照を１：１で混合し、図５に示す濃度で細胞に添加した。その後、細胞を氷上で１時間インキュベートし、ＰＢＳで２回洗浄した。細胞ペレットを再懸濁し、ＰＢＳ／５％ＦＣＳ中の＜ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）＞ＦＩＴＣ（１０μｇ／ｍｌ）またはＰｂ＿Ｄｏｔａｍ＿ＦＩＴＣ　１：１００＝＞（１０μｇ／ｍｌ）のいずれかの４０μｌ／ウェルの検出試薬を添加した。氷上で６０分間インキュベートした後、細胞をＰＢＳで２回洗浄し、ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏを使用してＦＩＴＣ蛍光を測定するために、２００μｌのＰＢＳ／５％ＦＣＳに再懸濁した。

【０５１７】

ＭＫＮ－４５細胞上のＣＥＡへのヘミボディの結合能力を評価するために、ヒトＩｇＧ特異的二次抗体を使用した抗体を使用してそれらを検出した（図５）。予想されるように、これらの細胞では、ヒトＩＳＯ対照の有意な結合は観察されない。同じＩｇＧ濃度に調整すると、両方のヘミボディおよび両方の組合せは、ＭＫＮ－４５細胞への用量依存的結合を示し、予想されるように非常に高い濃度で顕著なフック効果を伴う。この実験は、ＣＥＡ結合がヘミボディにおいて機能的であることを実証する。

【０５１８】

ＤＯＴＡＭに対するヘミボディの結合能力を評価するために、それらをヒトＩＳＯ対照の存在下またはそれらのそれぞれのスプリット抗体パートナーの存在下のいずれかで１：１の比で細胞に結合させた。それらがＭＫＮ－４５細胞に結合した後、細胞を洗浄して未結合抗体を除去した。その後、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＦＩＴＣ（蛍光標識Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）を添加して、ＤＯＴＡＭ結合コンピテント細胞結合抗体を検出した（図６）。予想され

るように、スプリット抗体パートナーの１つをヒトＩＳＯ対照と組み合わせた場合、これらの細胞で有意なＦＩＴＣは観察されない。１：１の比の両方のヘミボディの組合せのみが、用量依存性ＦＩＴＣシグナルを示す。この実験は、両方のヘミボディが１つの細胞上で一緒になると、ＤＯＴＡＭ結合部位が機能的になることを示す。

【０５１９】

実施例３：ｉｎ　ｖｉｖｏ試験

実施例３ａ：材料および方法－一般

全ての実験プロトコルは、現地当局（Ｃｏｍｉｔｅ　Ｒｅｇｉｏｎａｌ　ｄ’Ｅｔｈｉｑｕｅ　ｄｅ　ｌ’Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｔｉｏｎ　Ａｎｉｍａｌｅ　ｄｕ　Ｌｉｍｏｕｓｉｎ［ＣＲＥＥＡＬ］，Ｌａｂｏｒａｔｏｉｒｅ　Ｄｅｐａｒｔｅｍｅｎｔａｌ　ｄ’Ａｎａｌｙｓｅｓ　ｅｔ　ｄｅ　Ｒｅｃｈｅｒｃｈｅｓ　ｄｅ　ｌａ　Ｈａｕｔｅ－Ｖｉｅｎｎｅ）によって検討および承認された。倫理ガイドラインに従って、雌重症複合免疫不全（ＳＣＩＤ）マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）を、毎日の明暗サイクル（１２時間／１２時間）を用いて、特定の日和見病原体フリー（ＳＯＰＦ）条件下で飼育した。動物を新しい環境に馴化させるために、到着後の最初の５日間は操作を行わなかった。臨床症状および有害事象の検出のために動物を毎日管理した。

【０５２０】

固形異種移植片を、Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）Ｍａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）基底膜マトリックス（成長因子低減、カタログ番号３５４２３０）と１：１で混合した細胞培養培地中のＣＥＡ発現腫瘍細胞の皮下（ＳＣ）注射によって樹立した。腫瘍体積を、週３回の手動キャリパー測定によって推定し、以下の式に従って算出した：体積＝０．５×長さ×幅^2。腫瘍成長速度に応じて、必要に応じて追加の腫瘍測定を行った。

【０５２１】

マウスが、腫瘍負荷、注射の副作用、または他の原因に起因する耐えられない苦痛または疼痛の徴候を示した場合、予定されたエンドポイントの前にマウスを安楽死させた。疼痛、苦痛、または不快感の指標には、急性体重（ＢＷ）減少、被毛粗剛、下痢、円背姿勢、および嗜眠が含まれるが、これらに限定されない。処置動物のＢＷを週３回測定し、健康状態に応じて必要に応じて追加の測定を行った。放射能注射の翌日から、７日間または全ての個体が任意の急性ＢＷ減少から十分に回復するまで、全てのマウスにウェットフードを与えた。ＢＷ減少が初期ＢＷの２０％を超えたか、または腫瘍体積が３０００ｍｍ^{3}に達したマウスを直ちに安楽死させた。倫理的理由から安楽死のために考慮された他の要因は、腫瘍状態（例えば、壊死領域、血液／液体の漏出、自傷の徴候）および動物の一般的な外観（例えば、被毛、姿勢、動作）であった。

【０５２２】

放射性尿／糞便の再摂取を最小限に抑えるために、全ての有効性試験マウスを、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ投与後４時間、格子床のケージに入れ、その後、標準的な床敷を備えた新しいケージに移した。次いで、全てのケージを注射後（ｐ．ｉ．）２４時間で交換した。この手順は、放射能注射後２４時間以内に体内分布の目的で　殺したマウスには行わなかった。

【０５２３】

プロトコルによって要求されるように、麻酔したマウスの後眼窩出血を使用して静脈洞から安楽死時に血液を採取した後、頸椎脱臼により終了し、続いて放射能測定および／または組織学的分析のために追加の組織採取を行った。予期しないまたは異常な状態が記録された。ホルマリン固定のために回収した組織を直ちに１０％中性緩衝ホルマリン（４℃）に入れ、次いで５日後にリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、４℃）に移した。体内分布の目的で回収された器官および組織を秤量し、２４７０ＷＩＺＡＲＤ^{2}自動ガンマカウンター（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して放射能について測定し、その後、減衰およびバックグラウンドの補正を含めて、組織１グラムあたりの注入線量パーセント（％ＩＤ／ｇ）を算出した。

【０５２４】

統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　７（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．）およびＪＭＰ　１２（ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｉｎｃ．）を使用して行った。腫瘍成長阻害（ＴＧＩ）の曲線分析を、以下の式を使用して平均腫瘍体積に基づいて行った：

$$TGI = 100 - \frac{\overline{v_{処置,d} - v_{処置,0}}}{\overline{v_{参照,d} - v_{参照,0}}} \times 100$$

式中、ｄは試験日を示し、０はベースライン値を示す。ビヒクルを参照群として選択した。腫瘍退縮（ＴＲ）を以下に従って算出した：

$$TR = \frac{\overline{v_{処置,0} - v_{処置,d}}}{v_{処置,0}}$$

ここで、正の値は腫瘍退縮を示し、－１未満の値はベースライン値の２倍を超える成長を示す。

【０５２５】

試験化合物

記載の試験で利用される化合物を、二重特異性抗体、除去剤、および放射性標識キレートについてそれぞれ以下の表に提示する。

【０５２６】

ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７１９８４２７、ＰＲＩ－０２１３）は、ＣＥＡのＴ８４．６６エピトープを標的とする完全ヒト化ＢｓＡｂである（国際公開第２０１９／２０１９５９号も参照されたい）。ＰＲＩＴ－０２１３は、

ｉ）以下に示す第１の重鎖、

ｉｉ）以下に示す第２の重鎖、および

ｉｉｉ）以下に示す２つの抗体軽鎖から構成される。

説明	配列
ＰＲＩＴ－００２１３の軽鎖	１　ｅｉｖｌｔｑｓｐａｔ　ｌｓｌｓｐｇ ｅｒａｔ　ｌｓｃｒａｇｅｓｖｄ　ｉｆｇｖｇｆ ｌｈｗｙ　ｑｑｋｐｇｑａｐｒｌ ５１　ｌｉｙｒａｓｎｒａｔ　ｇｉｐａｒｆ ｓｇｓｇ　ｓｇｔｄｆｔｌｔｉｓ　ｓｌｅｐｅｄ ｆａｖｙ　ｙｃｑｑｔｎｅｄｐｙ １０１　ｔｆｇｑｇｔｋｌｅｉ　ｋｒｔｖａａ ｐｓｖｆ　ｉｆｐｐｓｄｅｑｌｋ　ｓｇｔａｓｖ ｖｃｌｌ　ｎｎｆｙｐｒｅａｋｖ １５１　ｑｗｋｖｄｎａｌｑｓ　ｇｎｓｑｅｓ ｖｔｅｑ　ｄｓｋｄｓｔｙｓｌｓ　ｓｔｌｔｌｓ ｋａｄｙ　ｅｋｈｋｖｙａｃｅｖ ２０１　ｔｈｑｇｌｓｓｐｖｔ　ｋｓｆｎｒｇ ｅｃ
ＰＲＩＴ－０２１３の重鎖１	１　ｑｖｑｌｖｑｓｇａｅ　ｖｋｋｐｇｓ ｓｖｋｖ　ｓｃｋａｓｇｆｎｉｋ　ｄｔｙｍｈｗ ｖｒｑａ　ｐｇｑｇｌｅｗｍｇｒ ５１　ｉｄｐａｎｇｎｓｋｙ　ｖｐｋｆｑｇ ｒｖｔｉ　ｔａｄｔｓｔｓｔａｙ　ｍｅｌｓｓｌ ｒｓｅｄ　ｔａｖｙｙｃａｐｆｇ １０１　ｙｙｖｓｄｙａｍａｙ　ｗｇｑｇｔｌ ｖｔｖｓ　ｓａｓｔｋｇｐｓｖｆ　ｐｌａｐｓｓ ｋｓｔｓ　ｇｇｔａａｌｇｃｌｖ １５１　ｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖ　ｓｗｎｓｇａ ｌｔｓｇ　ｖｈｔｆｐａｖｌｑｓ　ｓｇｌｙｓｌ ｓｓｖｖ　ｔｖｐｓｓｓｌｇｔｑ ２０１　ｔｙｉｃｎｖｎｈｋｐ　ｓｎｔｋｖｄ ｋｋｖｅ　ｐｋｓｃｄｋｔｈｔｃ　ｐｐｃｐａｐ ｅａａｇ　ｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋ ２５１　ｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔ　ｐｅｖｔｃｖ ｖｖｄｖ　ｓｈｅｄｐｅｖｋｆｎ　ｗｙｖｄｇｖ ｅｖｈｎ　ａｋｔｋｐｒｅｅｑｙ ３０１　ｎｓｔｙｒｖｖｓｖｌ　ｔｖｌｈｑｄ ｗｌｎｇ　ｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋ　ａｌｇａｐｉ ｅｋｔｉ　ｓｋａｋｇｑｐｒｅｐ ３５１　ｑｖｙｔｌｐｐｃｒｄ　ｅｌｔｋｎｑ ｖｓｌｗ　ｃｌｖｋｇｆｙｐｓｄ　ｉａｖｅｗｅ ｓｎｇｑ　ｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐ ４０１　ｖｌｄｓｄｇｓｆｆｌ　ｙｓｋｌｔｖ ｄｋｓｒ　ｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓ　ｖｍｈｅａｌ ｈｎｈｙ　ｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇ ４５１　ｇｇｇｇｓｇｇｇｇｓ　ｇｇｇｇｓｇ ｇｇｇｓ　ｖｔｌｋｅｓｇｐｖｌ　ｖｋｐｔｅｔ ｌｔｌｔ　ｃｔｖｓｇｆｓｌｓｔ ５０１　ｙｓｍｓｗｉｒｑｐｐ　ｇｋａｌｅｗ ｌｇｆｉ　ｇｓｒｇｄｔｙｙａｓ　ｗａｋｇｒｌ ｔｉｓｋ　ｄｔｓｋｓｑｖｖｌｔ ５５１　ｍｔｎｍｄｐｖｄｔａ　ｔｙｙｃａｒ ｅｒｄｐ　ｙｇｇｇａｙｐｐｈｌ　ｗｇｒｇｔｌ ｖｔｖｓ　ｓ
ＰＲＩＴ－０２１３の重鎖２	１　ｑｖｑｌｖｑｓｇａｅ　ｖｋｋｐｇｓ ｓｖｋｖ　ｓｃｋａｓｇｆｎｉｋ　ｄｔｙｍｈｗ ｖｒｑａ　ｐｇｑｇｌｅｗｍｇｒ ５１　ｉｄｐａｎｇｎｓｋｙ　ｖｐｋｆｑｇ ｒｖｔｉ　ｔａｄｔｓｔｓｔａｙ　ｍｅｌｓｓｌ ｒｓｅｄ　ｔａｖｙｙｃａｐｆｇ １０１　ｙｙｖｓｄｙａｍａｙ　ｗｇｑｇｔｌ ｖｔｖｓ　ｓａｓｔｋｇｐｓｖｆ　ｐｌａｐｓｓ ｋｓｔｓ　ｇｇｔａａｌｇｃｌｖ

	１５１　ｋｄｙｆｐｅｐｖｔｖ　ｓｗｎｓｇａ ｌｔｓｇ　ｖｈｔｆｐａｖｌｑｓ　ｓｇｌｙｓｌ ｓｓｖｖ　ｔｖｐｓｓｓｌｇｔｑ ２０１　ｔｙｉｃｎｖｎｈｋｐ　ｓｎｔｋｖｄ ｋｋｖｅ　ｐｋｓｃｄｋｔｈｔｃ　ｐｐｃｐａｐ ｅａａｇ　ｇｐｓｖｆｌｆｐｐｋ ２５１　ｐｋｄｔｌｍｉｓｒｔ　ｐｅｖｔｃｖ ｖｖｄｖ　ｓｈｅｄｐｅｖｋｆｎ　ｗｙｖｄｇｖ ｅｖｈｎ　ａｋｔｋｐｒｅｅｑｙ ３０１　ｎｓｔｙｒｖｖｓｖｌ　ｔｖｌｈｑｄ ｗｌｎｇ　ｋｅｙｋｃｋｖｓｎｋ　ａｌｇａｐｉ ｅｋｔｉ　ｓｋａｋｇｑｐｒｅｐ ３５１　ｑｖｃｔｌｐｐｓｒｄ　ｅｌｔｋｎｑ ｖｓｌｓ　ｃａｖｋｇｆｙｐｓｄ　ｉａｖｅｗｅ ｓｎｇｑ　ｐｅｎｎｙｋｔｔｐｐ ４０１　ｖｌｄｓｄｇｓｆｆｌ　ｖｓｋｌｔｖ ｄｋｓｒ　ｗｑｑｇｎｖｆｓｃｓ　ｖｍｈｅａｌ ｈｎｈｙ　ｔｑｋｓｌｓｌｓｐｇ ４５１　ｇｇｇｇｓｇｇｇｇｇｓ　ｇｇｇｇｓｇ ｇｇｇｓ　ｉｑｍｔｑｓｐｓｓｌ　ｓａｓｖｇｄ ｒｖｔｉ　ｔｃｑｓｓｈｓｖｙｓ ５０１　ｄｎｄｌａｗｙｑｑｋ　ｐｇｋａｐｋ ｌｌｉｙ　ｑａｓｋｌａｓｇｖｐ　ｓｒｆｓｇｓ ｇｓｇｔ　ｄｆｔｌｔｉｓｓｌｑ ５５１　ｐｅｄｆａｔｙｙｃｌ　ｇｇｙｄｄｅ ｓｄｔｙ　ｇｆｇｇｇｔｋｖｅｉ　ｋ

【０５２７】

ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０４０１２）は、陰性対照として使用される非ＣＥＡ結合ＢｓＡｂである。

【０５２８】

Ｐ１ＡＤ８７４９、Ｐ１ＡＤ８５９２、Ｐ１ＡＥ４９５６、およびＰ１ＡＥ４９５７は、ＣＥＡのＣＨ１Ａ１ＡまたはＡ５Ｂ７エピトープを標的とするＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体である。それらの配列は上に記載されている。全ての抗体コンストラクトを、注射の日まで－８０℃で保存し、その日に、静脈内（ＩＶ）または腹腔内（ＩＰ）投与のために解凍し、それぞれの最終濃度まで標準ビヒクル緩衝液（２０ｍＭヒスチジン、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０）または０．９％ＮａＣｌで希釈した。

【０５２９】

Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡ（ＲＯ７２０１８６９）を、注射の日まで－２０℃で保存し、ＩＶまたはＩＰ投与のために解凍し、ＰＢＳで希釈した。

【０５３０】

放射標識のためのＤＯＴＡＭキレートは、Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓによって提供され、Ｏｒａｎｏ　Ｍｅｄ（フランスのＲａｚｅｓ）によって実施された放射標識の前に－２０℃に維持された。トリウム発生器からのＤＯＴＡＭでの溶出によって^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０５８３４）を生成し、続いて、標識後にＣａでクエンチした。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ溶液を０．９％ＮａＣｌで希釈して、ＩＶ注射用の所望の^{212}Ｐｂ活性濃度を得た。

【０５３１】

ビヒクル対照群のマウスは、ＢｓＡｂ、ＣＡ、および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの代わりにビヒクル緩衝液の複数回の注射を受けた。

【０５３２】

二重特異性抗体

化合物	標的	プロトコル
ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７１９８４２７、ＰＲＩＴ－０２１３）	Ｔ８４．６６	１４４，１５８，１６０
ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０４０１２）	ジゴキシゲニン	１６０
ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ Ｐ１ＡＤ８７４９	ＣＨ１Ａ１Ａ	１４４，１５８
ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴ Ｐ１ＡＦ０１７１	ＣＨ１Ａ１Ａ	１７５，１８５，１８９
ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ Ｐ１ＡＤ８５９２	ＣＨ１Ａ１Ａ	１４４，１５８，１７５，１８５，１８９
ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ Ｐ１ＡＥ４９５６	Ａ５Ｂ７	１５８
ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ Ｐ１ＡＥ４９５７	Ａ５Ｂ７	１５８
ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴ Ｐ１ＡＦ０２９８	Ｔ８４．６６	１８５，１８９
ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ Ｐ１ＡＦ０７０９	Ｔ８４．６６	１８５，１９０

【０５３３】
除去剤

化合物	プロトコル
Ｃａ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００（ＲＯ７２０１８６９）	１４４，１５８，１６１

【０５３４】
放射性標識キレート

化合物	クエンチ	プロトコル
^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０５８３４）	Ｃａ	１４４，１５８，１６０，１７５，１８５，０００
^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	Ｃａ	１６０

【０５３５】
腫瘍モデル
使用した腫瘍細胞株およびマウスへの接種のための注射量を以下の表に記載する。ＢｘＰＣ３は、ＣＥＡを天然に発現するヒト原発性膵臓腺がん細胞株である。細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｈｙｃｌｏｎｅ　ＳＨ３００８８．０３）

を濃縮したＲＰＭＩ１６４０培地、ＧｌｕｔａＭＡＸ（商標）サプリメント、ＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ、参照番号７２４００－０２１）中で培養した。固形異種移植片を、Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）Ｍａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）基底膜マトリックス（成長因子低減、カタログ番号３５４２３０）と１：１で混合したＲＰＭＩ培地中の細胞を右側腹部に皮下注射することによって、試験０日目に各ＳＣＩＤマウスにおいて樹立した。

【０５３６】

腫瘍細胞株

細胞株	マウスあたりの細胞	注射量	プロトコル	供給業者
ＢｘＰＣ３	5×10^{6}	１００μＬ	１４４，１５８，１６０，１７５，１８５，０００	ＥＣＡＣＣ*

*欧州認証細胞培養コレクション（Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ａｕｔｈｅｎｔｉｃａｔｅｄ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅｓ）（英国ソールズベリー）

【０５３７】

実施例３ｂ：プロトコル１４４

プロトコル１４４の目的は、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ ＢｓＡｂを使用した２段階ＰＲＩＴ後のＳＣ ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける事前標的化された^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＰＫおよびｉｎ ｖｉｖｏ分布データを提供することであった。

【０５３８】

２段階ＰＲＩＴを、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨおよびＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ（Ｐ１ＡＤ８７４９およびＰ１ＡＤ８５９２）を別々にまたは一緒に注射し、７日後に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射することによって行った。放射能注射の６時間後にマウスを 殺し、放射能測定のために血液および器官を採取した。標準ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ二重特異性抗体を使用し、７日後にＣａ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡ、およびＣＡの２４時間後に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを使用して、２段階スキームを３段階ＰＲＩＴと比較した。

【０５３９】

ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬクリアランスのＰＫデータを、抗体注射の１時間後から７日後までの反復採血によって収集し、続いてＥＬＩＳＡによって分析した。

【０５４０】

試験概要を図７に示す。図７ａは、ＳＣ ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおける、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ ＰＫのための採血を含む２段階ＰＲＩＴレジメンの概要を示す。図７ｂは、ＳＣ ＢｘＰＣ３腫瘍を有するＳＣＩＤマウスにおいて行われた３段階ＰＲＩＴレジメンの概要を示す（ｈ＝時間、ｄ＝日）。

【０５４１】

試験デザイン

プロトコル１４４の時間経過およびデザインを以下の表に示す。

【０５４２】

プロトコル１４４の時間経過

試験日	日付	実験手順
0	２０１８－０５－０２	ＢｘＰＣ３細胞の調製およびシリンジの充填
0	２０１８－０５－０２	ＢｘＰＣ３細胞のＳＣ注射
１４	２０１８－０５－１６	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂのＩＶ注射（D群）
１５	２０１８－０５－１７	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂのＩＶ注射（Ａａ群、Ａｂ群、Ｂａ群、Ｂｂ群、Ｃａ群、Ｃｂ群）
１５	２０１８－０５－１７	後眼窩出血（ｐ．ｉ．１および４時間、それぞれＡａ群、Ｂａ群、Ｃａ群、およびＡｂ群、Ｂｂ群、Ｃｂ群）
１６	２０１８－０５－１８	後眼窩出血（ｐ．ｉ．２４時間、Ａａ群、Ｂａ群、Ｃａ群）
１８	２０１８－０５－２０	後眼窩出血（ｐ．ｉ．７２時間、Ａｂ群、Ｂｂ群、Ｃｂ群）
２１	２０１８－０５－２３	ＣＡのＩＶ注射（D群）
２１	２０１８－０５－２３	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２２	２０１８－０５－２４	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射（Ａａ群、Ｂａ群、Ｃａ群、D群）
２２	２０１８－０５－２４	後眼窩出血（ｐ．ｉ．１６８時間）および安楽死（Ａｂ群、Ｂｂ群、Ｃｂ群）
２２	２０１８－０５－２４	安楽死および組織採取、後眼窩出血（ｐ．ｉ．６時間）を含む（ｐ．ｉ．６時間）＋ガンマカウント（Ａａ群、Ｂａ群、Ｃａ群、D群）

【０５４３】

プロトコル１４４の試験群

群	P1AD8749 (VH) CH1A1A (μg)	P1AD8592 (VL) CH1A1A (μg)	CEA－DOTAM BsAb (μg)	PK (p．i．時間)	CA (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (p．i．時間)	n (マウス)
Aa	１００	０	０	１，２４，１６８	０	１０	６	４
Ab	１００	０	０	４，７２，１６８	０	０	－	４
Ba	０	１００	０	１，２４，１６８	０	１０	６	４
Bb	０	１００	０	４，７２，１６８	０	０	－	４
Ca	１００	１００	０	１，２４，１６８	０	１０	６	４
Cb	１００	１００	０	４，７２，１６８	０	０	－	４
D	０	０	１００	－	２５	１０	６	４

【０５４４】

固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の５×１０^{6}個の細胞（継代２６）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各ＳＣＩＤマウスにおいて樹立した。腫瘍細胞注射の１４日後、マウスを平均腫瘍体積１１６ｍｍ^{3}の実験群に分類した。接種後２２日目に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射し、平均腫瘍体積は２１日目に１４０ｍｍ^{3}であった。

【０５４５】

Ａａ群、Ｂａ群、およびＣａ群のマウスからの血液を、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ注射の１時間後（右眼）、２４時間後（左眼）、および１６８時間後（右

眼、終了時）に、麻酔下で後眼窩出血によって採取した。同様に、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ注射の４時間後（右眼）、７２時間後（左眼）、および１６８時間後（右眼、終了時）に、Ａｂ群、Ｂｂ群、およびＣｂ群のマウスから試料を採取した。

【０５４６】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に、Ａａ群、Ｂａ群、Ｃａ群、およびＤ群のマウスを　　殺および剖検し、放射能含有量の測定のために以下の器官および組織を採取した：血液、皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、脳、尾、耳、および腫瘍。

【０５４７】

結果

注射６時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ蓄積およびクリアランスを図８に示す。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨまたはＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬのいずれかのみによる事前標的化は、腫瘍における放射能の蓄積をもたらさなかった。合わせて、２つの相補的抗体は、標準的な３段階ＰＲＩＴレジメンの８７±１５％ＩＤ／ｇと比較して、６５±１２％ＩＤ／ｇの２段階ＰＲＩＴ後の腫瘍取込みをもたらした。テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）は、２つのＰＲＩＴ処置間の腫瘍取込みの差が有意であり、膀胱の差も有意であったことを示した（２段階ＰＲＩＴおよび３段階ＰＲＩＴについてそれぞれ１±２％ＩＤ／ｇおよび３８±１７％ＩＤ／ｇ）。組織蓄積の他の差は、この検定を使用して統計学的に有意ではなかった（ｐ＝０．０５）。

【０５４８】

酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によって分析したＩＶ注射ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトのクリアランスを図９に示す。

【０５４９】

有害事象および毒性

この試験に関連する有害事象または毒性はなかった。

【０５５０】

結論

この試験の結果は、相補的ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用したＣＡ非依存性２段階事前標的化の概念実証を実証した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの高い特異的腫瘍取込みは、２段階ＰＲＩＴおよび標準的な３段階ＰＲＩＴを使用して達成され、相補的ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用した正常組織における放射能の蓄積はほとんどなかった。

【０５５１】

実施例３ｃ：プロトコル１５８

プロトコル１５８の目的は、除去剤非依存性２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴのためのＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体のバイパラトピック（ＣＨ１Ａ１ＡおよびＡ５Ｂ７）対によって事前標的化されたマウスにおける皮下ＢｘＰＣ３腫瘍への^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの会合を評価することであった。腫瘍取込みを標準的な３段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴのものと比較した。

【０５５２】

皮下ＢｘＰＣ３腫瘍を有するマウスに、以下のいずれかを注射した：

● ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体、７日後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２段階ＰＲＩＴ）、または

● ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ、７日後にＣＡ、最後に２４時間後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（３段階ＰＲＩＴ）。

【０５５３】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのｉｎ　ｖｉｖｏ分布を、放射能注射の６時間後に評価した。試験概要を図１０に示す。

【０５５４】

試験デザイン
プロトコル１５８の時間経過およびデザインを以下の表に示す。

【０５５５】
プロトコル１５８の時間経過

試験日	日付	実験手順
０	２０１８－１１－２６	ＢｘＰＣ３細胞の調製およびシリンジの充填
０	２０１８－１１－２６	ＢｘＰＣ３細胞のＳＣ注射
１５	２０１８－１２－１１	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂのＩＶ注射（Ｃ群）
１６	２０１８－１２－１２	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂのＩＶ注射（Ａ群、Ｂ群）
２２	２０１８－１２－１８	ＣＡのＩＶ注射（Ｃ群）
２２	２０１８－１２－１８	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２３	２０１８－１２－１９	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射（全て）
２３	２０１８－１２－１９	安楽死および組織採取、後眼窩出血（ｐ．ｉ．６時間）を含む（ｐ．ｉ．６時間）＋ガンマカウント（全て）

【０５５６】
プロトコル１５８の試験群

群	Ｐ１ＡＤ８７４９（ＶＨ）ＣＨ１Ａ１Ａ（μｇ）	Ｐ１ＡＤ８５９２（ＶＬ）ＣＨ１Ａ１Ａ（μｇ）	Ｐ１ＡＥ４９５６（ＶＨ）Ａ５Ｂ７（μｇ）	Ｐ１ＡＥ４９５７（ＶＬ）Ａ５Ｂ７（μｇ）	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ ＢｓＡｂ（μｇ）	ＣＡ（μｇ）	^{212}Ｐｂ（μＣｉ）	ｎ（マウス）
Ａ	１５４*	０	０	１００	０	０	１０	４
Ｂ	０	１００	１６７**	０	０	０	１０	４
Ｃ	０	０	０	０	１００	２５	１０	４

＊３５％のホール／ホール不純物を補償するために１５４μｇに調整されたＰ１ＡＤ８７４９の用量、
＊＊４０％のホール／ホール不純物を補償するために１６７μｇに調整されたＰ１ＡＤ８５９２の用量。

【０５５７】
固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の５×１０^{6}個の細胞（継代２７）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各ＳＣＩＤマウスにおいて樹立した。腫瘍細胞注射の１４日後、マウスを平均腫瘍体積１７７ｍｍ^{3}の実験群に分類した。接種後２０日目に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射し、平均腫瘍体積は２１日目に２４３ｍｍ^{3}であった。

【０５５８】
^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に、全群のマウスを　　殺および剖検し、放射能含有量の測定のために以下の器官および組織を採取した：血液、皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、脳、尾、および腫瘍。

【０５５９】
結果
注射６時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ分布を図１１に示す。テューキ

ーの多重比較検定を用いた二元配置ＡＮＯＶＡは、膀胱を除いて、３つの処置間で^{212}Ｐｂの正常組織取込みに有意差がなかったことを示し、バイパラトピックＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対の両方は、標準的な３段階ＰＲＩＴよりも低い蓄積をもたらした。腎臓取込みは、３つの処置全てについて３～４％ＩＤ／ｇであった。どちらのバイパラトピックな組合せも、３段階ＰＲＩＴの６７％ＩＤ／ｇと比較して、およそ５６％ＩＤ／ｇの腫瘍蓄積をもたらした。２段階ＰＲＩＴと３段階ＰＲＩＴとの間の差は統計学的に有意であった（ｐ＜０．０００１）。

【０５６０】

有害事象および毒性

この試験に関連する有害事象または毒性はなかった。

【０５６１】

結論

この試験では、標準的な３段階ＰＲＩＴと比較して、ＣＡ非依存性２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴのためのＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体のバイパラトピック対によって事前標的化されたマウスにおけるＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍への^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの会合を評価した。注射６時間後の^{212}Ｐｂの分布は、２段階ＰＲＩＴおよび３段階ＰＲＩＴで同等であり、腫瘍において高い蓄積がみられ、健康な組織ではほとんど放射能がなかった。これにより、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用した２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴに対するＣＥＡ発現腫瘍のバイパラトピックな事前標的化の概念実証が実証された。

【０５６２】

実施例３ｄ：プロトコル１６０

プロトコル１６０の目的は、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するマウスにおいて、相補的ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用したＣＡ非依存性２段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴの３サイクル後の治療有効性を、標準的な３段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴの治療有効性と比較することであった。注射前に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭとプレインキュベートしたＢｓＡｂを使用して、１段階ＣＥＡ－ＲＩＴとの比較も行った。

【０５６３】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するマウスに、以下のいずれかを注射した：

● ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ、７日後にＣＡ、最後に２４時間後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（３段階ＰＲＩＴ）、

● ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体、７日後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２段階ＰＲＩＴ）、または

【０５６４】

● ^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ（プレインキュベート、１段階ＲＩＴ）。

【０５６５】

治療は、非ＣＥＡ結合対照抗体（ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ）および処置なし（ビヒクル）との比較も含めて、２０μＣｉの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの３反復サイクルで投与した。各処置サイクルで^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ標的化およびクリアランスを確認するために、専用のマウスを体内分布の目的で　　殺した。処置有効性をＴＧＩおよびＴＲに関して評価し、マウスを試験期間中慎重にモニターして、処置の忍容性を評価した。試験概要を図１２に示す。

【０５６６】

プロトコル１６０の時間経過およびデザインを以下の表に示す。

【０５６７】

プロトコル１６０の時間経過

試験日	日付	実験手順
０	２０１９－０１－２９	ＢｘＰＣ３細胞の調製およびシリンジの充填
０	２０１９－０１－２９	ＢｘＰＣ３細胞のＳＣ注射
１５	２０１９－０２－１３	ＢｓＡｂまたはヒスチジン緩衝液のＩＰ注射（A群、B群、C群、F群、G群、H群、Ｉ群）
１６	２０１９－０２－１４	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬまたはヒスチジン緩衝液のＩＰ注射（D群、Ｊ群、K群、Ｌ群）
２２	２０１９－０２－２０	ＣＡまたはＰＢＳのＩＰ注射（A群、B群、C群、F群、G群、H群、Ｉ群）
２３	２０１９－０２－２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２３	２０１９－０２－２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭまたはヒスチジン緩衝液のＩＶ注射（Ｅ群、M群）
２３	２０１９－０２－２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭまたは０．９％ＮａＣｌのＩＶ注射（B群、C群、D群、F群、G群、H群、Ｉ群、Ｊ群、K群、Ｌ群）
２４	２０１９－０２－２２	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント（F群、G群、Ｊ群、M群）
２９	２０１９－０２－２７	ＰＲＩＴ　ＢｓＡｂまたはＰＢＳのＩＰ注射（A群、B群、C群、H群、Ｉ群）
３０	２０１９－０２－２８	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬまたはヒスチジン緩衝液のＩＰ注射（D群、K群、Ｌ群）
３６	２０１９－０３－０６	ＣＡまたはＰＢＳのＩＰ注射（A群、B群、C群、H群、Ｉ群）
３７	２０１９－０３－０７	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
３７	２０１９－０３－０７	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭまたは０．９％ＮａＣｌのＩＶ注射（B群、C群、D群、H群、Ｉ群、K群、Ｌ群）
３８	２０１９－０３－０８	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント（H群、K群）
４３	２０１９－０３－１３	ＰＲＩＴ　ＢｓＡｂまたはＰＢＳのＩＰ注射（A群、B群、C群、Ｉ群）
４４	２０１９－０３－１４	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬまたはヒスチジン緩衝液のＩＰ注射（D群、Ｌ群）
５０	２０１９－０３－２０	ＣＡまたはＰＢＳのＩＰ注射（A群、B群、C群、Ｉ群）
５１	２０１９－０３－２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
５１	２０１９－０３－２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭまたは０．９％ＮａＣｌのＩＶ注射（B群、C群、D群、Ｉ群、Ｌ群）
５２	２０１９－０３－２２	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント（Ｉ群、Ｌ群）

【０５６８】

プロトコル１６０の試験群

群	ＢｓＡｂ	ＢｓＡｂ １サイクルあたり （μｇ）	ＣＡ １サイクルあたり （μｇ）	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ １サイクルあたり （μＣｉ）	サイクル （＃）	ｎ （マウス）
Ａ	－	０	０	０	３	１０
Ｂ	ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	３	１０
Ｃ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	３	１０
Ｄ	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ	１５４*＋１００**	０	２０	３	１０
Ｅ	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１００	０	２０	１***	１０
Ｆ	ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	１	３
Ｇ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	１	３
Ｈ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	２	３
Ｉ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	３	３
Ｊ	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ	１５４*＋１００**	０	２０	１	３
Ｋ	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ	１５４*＋１００**	０	２０	２	３
Ｌ	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ	１５４*＋１００**	０	２０	３	３
Ｍ	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１００	０	２０	１	３

＊Ｐ１ＡＤ８７４９：原液中の３５％のホール／ホール不純物を補償するために１５４μｇに調整された用量、＊＊Ｐ１ＡＤ８５９２、＊＊＊第１の処置サイクルでの急性放射線誘発毒性のために３サイクルから１サイクルに調整した。

【０５６９】

固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の５×１０^{6}個の細胞（継代２４）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目にＳＣＩＤマウスにおいて樹立した。腫瘍細胞注射の１５日後、マウスを平均腫瘍体積１２２ｍｍ^{3}の実験群に分類した。接種後２３日目に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射し、平均腫瘍体積は２２日目に１５５ｍｍ^{3}であった。

【０５７０】

ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭおよびＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ抗体を、上記の表に従ってＩＰ投与のためにビヒクル緩衝液で２００μＬあたり１００μｇの最終濃度に希釈した（プロトコル１６０の試験群）。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を一緒に混合して、２００μＬあたり１００μｇの各コンストラクトを含有するＩＰ投与用の１つの単回注射液にした。Ｐ１ＡＤ８７４９については、投与量を１５４μｇに調整して、原液中の３５％のホール／ホール不純物（ＶＨ／ＶＬを有しない分子の側）を補償した。図１２の実験スケジュールに従って、Ｃａ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡを、ＢｓＡｂ注射の７日後にＩＰ投与し（２００μＬのＰＢＳあたり２５μｇ）、続いて２４時間後に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０５８３４）を投与した。ＰＲＩＴ処置マウス（２段階お

よび３段階）に、１００μＬのＣａクエンチした^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ溶液（１００μＬの０．９％ＮａＣｌ中２０μＣｉ）をＩＶ注射した。

【０５７１】

１段階ＲＩＴで処置したマウスは、１回の注射のみを受けた：事前に結合した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ＩＶ注射用の１００μＬの０．９％ＮａＣｌ中２０μＣｉ／２０μｇのＢｓＡｂ）。直接標識抗体を、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭをＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ ＢｓＡｂと共に３７℃で１０分間インキュベートすることによって調製した。

【０５７２】

以下の器官および組織を、安楽死時にＡ～Ｅ群のマウスから採取した：血清、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、および腫瘍。安楽死の前に、生存マウスを後眼窩採血のために麻酔した。採取した血液試料を１００００ｒｃｆで５分間遠心分離し、得られた血清画分を単離し、凍結し、－２０℃で保存した。切除した組織を直ちに１０％中性緩衝ホルマリン（４℃）に入れ、次いで２４時間後に１×ＰＢＳ（４℃）に移した。ホルマリン固定試料は、さらなる処理および分析のために、Ｒｏｃｈｅ Ｐｈａｒｍａ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｅａｒｌｙ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ，Ｒｏｃｈｅ Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ Ｃｅｎｔｅｒ Ｂａｓｅｌに出荷した。

【０５７３】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭまたは^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＢｓＡｂの初回および唯一の注射の２４時間後に、Ｆ群、Ｇ群、Ｊ群、およびＭ群のマウスを　　殺および剖検した。２回目の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の２４時間後に、Ｈ群およびＫ群を　　殺および剖検した。３回目の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の２４時間後に、Ｉ群およびＬ群を　　殺および剖検した。麻酔したマウスの後眼窩出血を使用して静脈洞から安楽死時に血液を採取した後、頸椎脱臼により終了した。以下の器官および組織も体内分布の目的で採取した：膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾、皮膚、および腫瘍。

【０５７４】

結果

注射２４時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ蓄積およびクリアランスを、各治療および処置サイクルについて図１３に示す。陰性対照は、腫瘍における取込みをもたらさなかった（０．４％ＩＤ／ｇ）。テューキーの多重比較検定を用いた二元配置分散分析（ＡＮＯＶＡ）は、分布が２段階ＰＲＩＴおよび３段階ＰＲＩＴについていずれのサイクルでも有意に異ならないことを示した。しかしながら、差は全てのサイクルで陰性対照および１段階ＲＩＴと比較して統計学的に有意であった（ｐ＜０．０５）。腫瘍取込みは、３段階ＰＲＩＴでは２５～４５％ＩＤ／ｇ、２段階ＰＲＩＴでは２５～３０％ＩＤ／ｇであり、処置またはサイクルのいずれかの間に統計学的に有意な差はなかった。１段階ＲＩＴでは、腫瘍取込みは、唯一の処置サイクルで９９％であった。正常組織における取込みは、両方のＰＲＩＴレジメンについて非常に低かったが、小さな放射性標識ＤＯＴＡＭキレートと比較してプレインキュベートした抗体のはるかに長い循環時間のために、１段階ＲＩＴ後の全ての器官および組織で有意に高かった。

【０５７５】

平均腫瘍発達および個々の腫瘍成長曲線をそれぞれ図１４および図１５に示す。非処置ビヒクル群およびＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ群の腫瘍は着実に成長したが、第３の処置後の後者では倍加率がわずかに低かった。対照的に、ＰＲＩＴ群およびＲＩＴ群の腫瘍は第１の処置サイクル後にサイズが減少し、腫瘍がサイズが増加し始めた接種後およそ１０週間まで腫瘍制御を維持した。２段階および３段階ＰＲＩＴ処置は、ほぼ同一の腫瘍制御をもたらした。腫瘍は完全には退縮しなかった。

【０５７６】

全ての処置群を平均に基づいて分析することができた最終日である試験８３日目に、ＴＧＩは、ビヒクル対照と比較して、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（３段階）およびＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ（２段階）を使用したＰＲＩＴについてそれぞれ９１．７％および８８．４％であった。１段階ＲＩＴの対応する数は７２．６％であったが、非特

異的ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ対照についてはＴＧＩは－５９．７％であった。同日に、平均に基づくＴＲは、３段階ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＰＲＩＴでは－１．９、２段階ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＰＲＩＴでは－２．９、１段階ＲＩＴでは－４．７、ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ　ＰＲＩＴでは－２８．８、ビヒクル対照では－３９．３であった。

【０５７７】

以下に記載の有害事象のために、生存分析は統計学的に関連があるとはみなされなかった。

【０５７８】

有害事象および毒性

全ての治療群におけるＢＷ推移を図１６に示す。２０μＣｉの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを用いた２段階ＰＲＩＴおよび３段階ＰＲＩＴの複数サイクルは忍容性が良好であったが、１段階ＲＩＴを受けたマウスで急性ＢＷ減少が起こり、Ｅ群の８／１０のマウスを、２０％以上のＢＷの低下のために第１のＲＩＴサイクル後（^{212}Ｐｂ照射後６～１１日）に安楽死させた。残りの２匹のＲＩＴマウスには、さらなる^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ注射は行わなかったが、腫瘍成長評価のために継続的に追跡した。

【０５７９】

さらに、腫瘍状態の低下、すなわち腫瘍の開放または漏出のために、多数のマウスを倫理的理由で　殺した。ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ群では、この理由により、腫瘍体積が３０００mm^3に達する前に、９／１０のマウスを安楽死させた。非処置ビヒクル対照については、対応する数は５／１０であった。この問題は、ＰＲＩＴ群およびＲＩＴ群ではさほど顕著ではなく、３段階ＰＲＩＴ群、２段階ＰＲＩＴ群、および１段階ＲＩＴ群において、それぞれ１／１０、２／１０、および２／１０のマウスをこの理由のために安楽死させた。これは、図１５の個々の腫瘍成長曲線に反映されている。

【０５８０】

最後に、Ｃ群の１匹のマウスを、肛門下の創傷の悪化のために安楽死させた。

【０５８１】

全ての有害事象を以下の表に列挙する。

【０５８２】

プロトコル１６０の有害事象

群	屠殺したマウス（ｎ／群）	試験日	終了の理由
Ａ：ビヒクル	５（１０）	５３、７１、７１、７３、７５	腫瘍状態の低下
Ｂ：ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ	９（１０）	５５、５５、５５、６１、７３、７３	腫瘍状態の低下
Ｃ：ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１（１０）	８３	肛門下の創傷
Ｃ：ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	１（１０）	８５	腫瘍状態の低下
Ｄ：ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ	２（１０）	８３、８３	腫瘍状態の低下
Ｅ：^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	８（１０）	２９，２９，３０，３１，３１，３２，３２，３４	ＢＷ減少≧２０％
Ｅ：^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ	２（１０）	８３、８３	腫瘍状態の低下

^{212}Ｐｂ照射を、試験２３日目（サイクル１）、３７日目（サイクル２）、および５１日目（サイクル３）に行った。

【０５８３】

結論

３段階スキームを使用したＣＥＡ－ＰＲＩＴ（ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ、ＣＡ、

および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）と２段階スキームを使用したＣＥＡ－ＰＲＩＴ（ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）との間に差はみられなかった。ＴＧＩは有意であり、２つの処置についてほぼ同一であり、２０μＣｉの３サイクルを両方の場合において安全に投与することができた。対照的に、注射前のＣＥＡ－ＤＯＴＡＭに事前に結合した２０μＣｉの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（１段階ＲＩＴ）は、処置マウスの大多数で忍容性が示されなかった。

【０５８４】

したがって、この試験は、開発されたＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトを使用して、ＣＡ非依存性２段階ＰＲＩＴの忍容性および治療有効性を実証した。

【０５８５】

実施例４：プロトコル１７５

プロトコル１７５の目的は、腫瘍および健康な組織におけるその後の^{212}Ｐｂ蓄積に対する注射された事前標的化抗体量の増加の影響を評価することであった。２つの異なる用量のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を比較した：標準量（１００μｇ）および２．５倍高用量（２５０μｇ）。さらに、抗薬物抗体（ＡＤＡ）形成を回避するためにそのＶＨを伸長させるようにＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨコンストラクトを修飾した（これを以前に試験したＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬコンストラクトと一緒に使用した）。ＶＨを、抗体ＣＨ１ドメイン由来の最初の３つのアミノ酸：アラニン、セリン、およびトレオニン（ＡＳＴ）と、以下ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴと呼ばれるコンストラクトとを含むように伸長させた。

【０５８６】

抗体Ｐ１ＡＤ８５９２は、実施例１において既に上に記載されている。Ｐ１ＡＦ０１７１は、融合ＨＣが残基ＡＳＴによって伸長されることを除いて、Ｐ１ＡＤ８７４９と同じであり、したがって、抗体Ｐ１ＡＤ０１７１は、上記の軽鎖Ｄ１ＡＡ３３８４（配列番号３４）、上記の第１の重鎖Ｄ１ＡＣ４０２２（配列番号２８）、および以下に示す第２の重鎖Ｄ１ＡＥ３６６９からなる。

【０５８７】

Ｄ１ＡＥ３６６９（ＨＣノブ＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ　Ｄｏｔａｍ－ＶＨ－ＡＳＴ）

ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＥＦＧＭＮＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＷＩＮＴＫＴＧＥＡＴＹＶＥＥＦＫＧＲＶＴＦＴＴＤＴＳＴＳＴＡＹＭＥＬＲＳＬＲＳＤＤＴＡＶＹＹＣＡＲＷＤＦＡＹＹＶＥＡＭＤＹＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＡＡＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＧＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＣＲＤＥＬＴＫＮＱＶＳＬＷＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＶＴＬＫＥＳＧＰＶＬＶＫＰＴＥＴＬＴＬＴＣＴＶＳＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳＷＩＲＱＰＰＧＫＡＬＥＷＬＧＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧＲＬＴＩＳＫＤＴＳＫＳＱＶＶＬＴＭＴＮＭＤＰＶＤＴＡＴＹＹＣＡＲＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬＷＧＲＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴ

【０５８８】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するマウスに、以下のいずれかを注射した：

● ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂの標準用量の１倍、７日後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ、または

● ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂの標準用量の２．５倍、７日後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ。

【０５８９】
２１２Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのｉｎ　ｖｉｖｏ分布を、放射能注射の２４時間後に評価した。試験概要を図１７に示す。
【０５９０】
試験デザイン
プロトコル１７５の時間経過およびデザインを以下に示す。
【０５９１】
プロトコル１７５の時間経過

試験日	実験手順
０	ＢｘＰＣ３細胞の調製およびシリンジの充填
０	ＢｘＰＣ３細胞のＳＣ注射
２２	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂのＩＰ*注射
２９	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２９	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
３０	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント

＊低化合物濃度のためにＩＰ注射が必要であった（コンストラクトあたり２００μＬ、＝合計４００μＬ）
【０５９２】
プロトコル１７５の試験群

群	Ｐ１ＡＦ０１７１（ＶＨ－ＡＳＴ）（μｇ）	Ｐ１ＡＤ８５９２（ＶＬ）（μｇ）	^{212}Ｐｂ（μＣｉ）	ＢＤ（ｐ．ｉ．時間）	ｎ（マウス）
Ａ	１４３*	１００	１０	２４	４
Ｂ	３５７*	２５０	１０	２４	４

＊約３０％のホール／ホール不純物を補償するために１４３および３５７μｇに調整されたＰ１ＡＦ０１７１の用量。
【０５９３】
固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の５×１０^{6}個の細胞（継代２４）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各ＳＣＩＤマウスにおいて樹立した。腫瘍細胞注射の２１日後、マウスを平均腫瘍体積３１０ｍｍ^{3}の実験群に分類した。接種後２９日目に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射し、平均腫瘍体積は３０日目に４６２ｍｍ^{3}であった。
【０５９４】
２１２Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後に、全てのマウスを　　殺および剖検し、放射能含有量の測定のために以下の器官および組織を採取した：血液、皮膚、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、筋肉、尾、および腫瘍。
【０５９５】
結果
注射２４時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ分布を図１８に示す。２つの用量レベル間で^{212}Ｐｂの腫瘍または正常組織取込みに有意差はなかった。腫瘍蓄積は両処置群について３０～３１％ＩＤ／ｇであり、この時点で２％ＩＤ／ｇの腎臓取込みがみられた。１匹のマウスは、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の問題のために尾に約１％ＩＤ

／ｇを有していたが、他の回収された健康な組織は、認識可能な^{212}Ｐｂ蓄積を示さなかった。

【０５９６】

有害事象および毒性

【０５９７】

この試験に関連する有害事象または毒性はなかった。

【０５９８】

結論

事前標的化ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の用量を２．５倍増加させても、このｉｎ　ｖｉｖｏモデルにおいて、続いて投与された^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの腫瘍蓄積は改善されなかった。しかしながら、それはまた、正常組織における放射能の蓄積を増加させず、この２段階事前標的化レジメンを使用して達成された強い特異性が強調された。最後に、結果は、伸長ＶＨ　ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴコンストラクトの機能を検証するものであった。

【０５９９】

実施例５：プロトコル１８５

プロトコル１８５の目的は、Ｔ８４．６６エピトープを標的とするＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬを評価することであった。Ｐ１ＡＦ０７０９およびＰ１ＡＦ０２９８の配列を本明細書に提供する。Ｐ１ＡＦ０７０９は、Ｄ１ＡＥ４６８８（配列番号８３）の第１の重鎖およびＤ１ＡＡ４９２０（配列番号８４）の第２の重鎖を有する。Ｐ１ＡＦ０２９８は、Ｄ１ＡＥ４６８７（配列番号８６）の第１の重鎖およびＤ１ＡＥ３６６８（配列番号８７）の第２の重鎖を有する。両方とも、Ｄ１ＡＡ４１２０（配列番号８９）の軽鎖を有する。

【０６００】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するマウスに、標準用量のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂ（抗体あたり１００μｇ）を注射し、６日後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのｉｎ　ｖｉｖｏ分布を、放射能注射の６時間後に評価した。試験概要を図１９に示す。

【０６０１】

試験デザイン

プロトコル１８５の時間経過およびデザインを以下に示す。

【０６０２】

プロトコル１８５の時間経過

試験日	日付	実験手順
０	２０２０－０３－０４	ＢｘＰＣ３細胞の調製およびシリンジの充填
０	２０２０－０３－０４	ＢｘＰＣ３細胞のＳＣ注射
２２	２０２０－０３－２６	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂのＩＶ注射
２７	２０２０－０３－３１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２８	２０２０－０４－０１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
２８	２０２０－０４－０１	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．６時間）＋ガンマカウント

【０６０３】

プロトコル１８５の試験群

群	P1AF0298 T84．66 (VH－AST) (μg)	P1AF0709 T84．66 (VL) (μg)	P1AF0171 CH1A1A (VH－AST) (μg)	P1AD8592 CH1A1A (VL) (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (p．i．時間)	n (マウス)
A	１００	１００	０	０	１０	６	５
B	０	０	１４３*	１００	１０	６	５

*約３０％のホール／ホール不純物を補償するために１４３μｇに調整されたＰ１ＡＦ０１７１の用量。

【０６０４】

固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の５×１０^{6}個の細胞（継代２７）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各ＳＣＩＤマウスにおいて樹立した。腫瘍細胞注射の２２日後、マウスを平均腫瘍体積２２４ｍｍ^{3}の実験群に分類した。接種後２８日目に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射し、その時点で平均腫瘍体積は３８５ｍｍ^{3}に達していた。

【０６０５】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に、全てのマウスを　　殺および剖検し、放射能含有量の測定のために以下の器官および組織を採取した：血液、皮膚、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、筋肉、尾、および腫瘍。回収した腫瘍を２つに分割し、一方を放射能含有量について測定し、他方をＴｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ（登録商標）最適切断温度（ＯＣＴ）包埋培地を含むクライオモールドに入れ、ドライアイス上に置いて急速凍結させた。ＯＣＴ中の凍結試料を凍結切片化、免疫蛍光染色、およびＺｅｉｓｓ　Ａｘｉｏ　Ｓｃｏｐｅ．Ａ１モジュール式顕微鏡を用いた分析の前に－８０℃に維持した。

【０６０６】

結果

注射６時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ分布を図２０に示す。腫瘍蓄積は、４０％ＩＤ／ｇ（ＣＨ１Ａ１Ａ）または４４％ＩＤ／ｇ（Ｔ８４．６６）であった。放射能の唯一の他の認識可能な蓄積が、腎臓でみられた：２群についてｐ．ｉ．６時間で３～５％ＩＤ／ｇ。

【０６０７】

Ｔ８４．６６（Ａ群）またはＣＨ１Ａ１Ａ（Ｂ群）のいずれかを標的とするＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対の腫瘍内分布の例を図２１に示す。パネルＡおよびＣは、ＣＥＡ発現がＢｘＰＣ３腫瘍において高く均一であることを示し、パネルＢおよびＤは、注射７日後の抗体分布が同様に分布することを示している。しかしながら、Ａ群からの試料は、Ｂ群からの腫瘍試料と比較して、全体的により強いシグナルを示し、Ｔ８４．６６がＣＨ１Ａ１Ａよりも強い結合剤であるという証拠が提供された。

【０６０８】

有害事象および毒性

この試験に関連する有害事象または毒性はなかった。

【０６０９】

結論

結果は、ＣＥＡのＴ８４．６６エピトープを標的とするＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトの機能を検証するものであった。事前標的化されたＣＥＡ発現腫瘍における２１２Ｐｂの結果として生じた蓄積は高く特異的であり、ＣＨ１Ａ１AまたはＴ８４．６６エピトープのいずれかを標的化するＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対は、ＣＥＡ発現腫瘍の内部に均一に分布していた。

【０６１０】

実施例６：プロトコル１８９

プロトコル１８９の目的は、ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＨ－ＡＳＴ／ＶＬを標的とする陽性対照対と比較して、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ／ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬおよびＴ８４．６６　ＶＬ／ＣＨ１Ａ１　ＶＨ－ＡＳＴを標的とするバイパラトピックＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体対を評価することであった。このバイパラトピックな組合せは、２つのエピトープのうちの１つ（例えば、Ｔ８４．６６）のみを発現する可溶性ＣＥＡ上の完全なＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合剤の形成を妨げ、それにより、循環放射能の増加および関連する放射線誘発毒性、ならびに腫瘍外標的との競合による有効性の低下など、その潜在的な有害作用を軽減する。

【０６１１】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を有するマウスに、標準用量のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂ（抗体あたり１００μｇ）を注射し、７日後に放射標識した^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのｉｎ　ｖｉｖｏ分布を、放射能注射の６時間後に評価した。試験概要を図２２に示す。

【０６１２】

試験デザイン

プロトコル１８９の時間経過およびデザインを以下に示す。

【０６１３】

プロトコル１８９の時間経過

試験日	実験手順
０	ＢｘＰＣ３細胞の調製およびシリンジの充填
０	ＢｘＰＣ３細胞のＳＣ注射
１５	ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂのＩＶ注射
２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２２	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
２２	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．６時間）＋ガンマカウント

【０６１４】

プロトコル１８９の試験群

群	Ｐ１ＡＦ０２９８Ｔ８４．６６（ＶＨ－ＡＳＴ）（μｇ）	Ｐ１ＡＦ０７０９Ｔ８４．６６（ＶＬ）（μｇ）	Ｐ１ＡＦ０１７１ＣＨ１Ａ１Ａ（ＶＨ－ＡＳＴ）（μｇ）	Ｐ１ＡＤ８５９２ＣＨ１Ａ１Ａ（ＶＬ）（μｇ）	^{212}Ｐｂ（μＣｉ）	ＢＤ（ｐ．ｉ．時間）	ｎ（マウス）
Ａ	１００	０	０	１００	１０	６	５
Ｂ	０	１００	１４３*	０	１０	６	５
Ｃ	０	０	１４３*	１００	１０	６	３

*約３０％のホール／ホール不純物を補償するために１４３μｇに調整されたＰ１ＡＦ０１７１の用量。

【０６１５】

固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の５×１０^{6}個の細胞（継代３１）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各ＳＣＩＤマウスにおいて樹立した。腫瘍細胞注射の１４日後、マウスを平均腫瘍体積３４３ｍｍ^{3}の実験群に分類した。接種後２２日目に^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射し、平均腫瘍体積は２１日目に５５７ｍ

m^3に達した。

【０６１６】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に、全てのマウスを　　殺および剖検し、放射能含有量の測定のために以下の器官および組織を採取した：血液、皮膚、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、筋肉、尾、および腫瘍。

【０６１７】

結果

注射６時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ分布を図２３に示す。バイパラトピックバリエーションの腫瘍蓄積は、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬおよびＴ８４．６６　ＶＬ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＨ－ＡＳＴについてそれぞれ７１％ＩＤ／ｇおよび４６％ＩＤ／ｇであった。陽性ＣＨ１Ａ１Ａ対照は、３７％ＩＤ／ｇをもたらした。テューキーの多重比較検定を用いた二元配置ＡＮＯＶＡは、３つの群全てが腫瘍取込みに関して互いに有意に異なることを示した（他の２群と比較したＴ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬに対してｐ＜０．０００１、ＣＨ１Ａ１Ａのみと比較したＴ８４．６６　ＶＬ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＨ－ＡＳＴに対してｐ＝０．００２０）。他の器官は群間で統計学的に有意な差を示さなかったが、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬの組合せでは、他の２群と比較して血液中のわずかに高い保持が示された：＜１％ＩＤ／ｇと比較して２％ＩＤ／ｇ。腎臓取込みも同様にわずかに高かったが、統計学的に有意ではなかった：他の２つについての３％ＩＤ／ｇと比較して、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａについて４．５％ＩＤ／ｇ。

【０６１８】

有害事象および毒性

この試験に関連する有害事象または毒性はなかった。しかしながら、ＢｘＰＣ３腫瘍成長は、標準的な成長速度と比較して、この試験では有意に速く、変動性が大きかった。剖検では、大きな腫瘍（大部分）は液体で満たされており、放射能測定の前に腫瘍を半分に切断すると空になり、この液体は、成長速度の加速を引き起こした可能性が高いが、腫瘍を切開した後に秤量して測定したため、％ＩＡ／ｇに大きな影響を及ぼさなかったと結論付けられた。

【０６１９】

結論

結果は、試験したＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトを使用して、ＣＥＡのＴ８４．６６およびＣＨ１Ａ１Ａエピトープのバイパラトピック標的化の機能を検証するものであり、陽性ＣＨ１Ａ１Ａ対照と比較して、この組合せについて驚くほど高い有効性を実証した。事前標的化されたＣＥＡ発現腫瘍における^{212}Ｐｂの結果として生じた蓄積は高く特異的であり、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬ対に対する特定の利点が示された。

【０６２０】

実施例７

これらの実施例は、本明細書に記載のスプリット抗体による細胞へのＰｂ－ＤＯＴＡの動員を検討する。

【０６２１】

Ｐ１ＡＦ０７１２は、配列番号９７の第１の重鎖、配列番号９８の第２の重鎖、および配列番号１０３の軽鎖を有する。Ｐ１ＡＦ０７１３は、配列番号１００の第１の重鎖、配列番号１０１の第２の重鎖、および配列番号１０３の軽鎖を有する。

【０６２２】

ＭＫＮ－４５細胞をトリプシンを使用して培養瓶から剥離し、Ｃａｓｙセルカウンターを使用してカウントした。４℃でペレット化した後、３００ｇの細胞をＦＡＣＳ緩衝液（ＰＢＳ中２．５％ＦＣＳ）に再懸濁し、２．０Ｅ＋０６細胞／ｍＬに調整し、９６ウェルＰＰ　Ｖ底プレート（２５μＬ／ウェル＝５．０Ｅ＋０４ゼレン／ウェル）に分注した。

【０６２３】

ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣを用いたＦＡＣＳ染色

ＣＥＡ特異的スプリット抗体（それぞれＰ１ＡＦ０７１２またはＰ１ＡＦ０７１３）は、ＦＡＣＳ緩衝液中で４０μｇ／ｍＬに調整され、最終濃度は１０μｇ／ｍＬになった。両方の抗体を細胞に添加し、合わせたかまたは分離し、続いて緩衝液を添加し、４℃で１時間インキュベートした。その後、ＦＩＴＣで標識されたＰｂ－ＤＯＴＡを、抗体に対して等モル比で細胞に添加し、４℃で１時間インキュベートした。次に、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ（ＢＤ、Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を使用して測定するために、７０μｌ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。スプリット半分のいずれも蛍光シグナルを生じず、Ｐｂ－ＤＯＴＡ結合能力の欠如を示していることが示された（図２４）。両方のスプリット半分の組合せのみが、標的細胞にＰｂ－ＤＯＴＡＭ－ＦＩＴＣを動員することができた（図２４）。

【０６２４】

＜ｈｕＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）Ａ４８８＞を用いたＦＡＣＳ染色

ＣＥＡ特異的スプリット抗体（それぞれＰ１ＡＦ０７１２またはＰ１ＡＦ０７１３）は、ＦＡＣＳ緩衝液中で４０μｇ／ｍＬに調整され、最終濃度は１０μｇ／ｍＬになった。両方の抗体を細胞に添加し、分離して続いて緩衝液を添加したか、または合わせ、４℃で１時間インキュベートした。次に、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄した。洗浄後、細胞を二次抗体を含む５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液（＜ｈｕＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）＞－Ａｌｅｘａ４８８、ｃ＝１０μｇ／ｍＬ）に再懸濁し、４℃で１時間インキュベートした。次に、細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ（ＢＤ、Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を使用して測定するために、７０μｌ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁した。両方のスプリット抗体のＥＣ５０は同等であり、両方のスプリット抗体のＣＥＡ特異的細胞結合が示された。混合物中の抗体の量が多いため、以下の表に示すように、これらの状況下ではより低いＥＣ５０が得られた。

【０６２５】

スプリット抗体のＥＣ５０決定

		ＥＣ５０ μｇ／ｍｌ 絶対
＜ｈｕ＞Ａ４８８	Ｐ１ＡＦ０７１２＋ＰＢＳ	２．７
	Ｐ１ＡＦ０７１３＋ＰＢＳ	２．３
	Ｐ１ＡＦ０７１２＋Ｐ１ＡＦ０７１３	０．９
	ｈｕ　ＩＳＯ＋ＰＢＳ	
ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣ	Ｐ１ＡＦ０７１２＋ＰＢＳ	該当なし
	Ｐ１ＡＦ０７１３＋ＰＢＳ	該当なし
	Ｐ１ＡＦ０７１２＋Ｐ１ＡＦ０７１３	２．４
	ｈｕ　ＩＳＯ＋ＰＢＳ	

【０６２６】

二次抗体ベースの検出（＜ｈｕ＞４８８、上のパネル）またはＰｂ－ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣ（ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣ、下のパネル）のいずれかを使用して、スプリット抗体のＥＣ５０を決定した。

【０６２７】

実施例８：Ｂｉａｃｏｒｅ結合実験

この実施例は、参照抗体ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７１９８４２７、ＰＲＩ－０２１３）と比較して、ＤＯＴＡＭへのＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨおよびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬの結合を個々に試験する。それはさらに、参照抗体と比較して、ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対へのＤＯＴＡＭの結合を試験する。

【０６２８】

これらの実施例で使用されるコードと本出願の他の箇所で使用されるタンパク質番号との対応を以下に示す。配列も提供される。参照抗体は、この実施例では「ＰＲＩＴ＿ＲＳ」としてコードされている。

標的結合剤	ＳＰＲコード（プロドラッグＡ＋Ｂ）	ＳＰＲコード	ＤＯＴＡＭ	タンパク質	ＬＣ（配列番号）	ＨＣ（配列番号）	融合ＨＣ（配列番号）
＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	Ｐ１＿ＡＢ	Ｐ１＿Ａ	ＶＬ	Ｐ１ＡＤ８５９２	３４	３０	３３
		Ｐ１＿Ｂ	ＶＨ	Ｐ１ＡＤ８７４９	３４	２８	３２
＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	Ｐ２＿ＡＢ	Ｐ２＿Ａ	ＶＬ	Ｐ１ＡＤ８５９２	３４	３０	３３
		Ｐ２＿Ｂ	ＶＨ	Ｐ１ＡＦ０１７１	３４	２８	１４７
＜ＣＥＡ＞Ｔ８４．６６	Ｐ３＿ＡＢ	Ｐ３＿Ａ	ＶＬ	Ｐ１ＡＦ０７０９	８９	８３	８４
		Ｐ３＿Ｂ	ＶＨ	Ｐ１ＡＦ０２９８	８９	８６	８９
＜ＣＥＡ＞２８Ａ９	Ｐ４＿ＡＢ	Ｐ４＿Ａ	ＶＬ	Ｐ１ＡＦ０７１０	９６	９０	９１
		Ｐ４＿Ｂ	ＶＨ	Ｐ１ＡＦ０７１１	９６	９３	９４
＜ＣＥＡ＞Ａ５Ｈ１ＥＬ１（Ｇ５４Ａ）	Ｐ５＿ＡＢ	Ｐ５＿Ａ	ＶＬ	Ｐ１ＡＥ４９５７	５８	５５	５６
		Ｐ５＿Ｂ	ＶＨ	Ｐ１ＡＥ４９５６	５４	５１	５２
＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ	Ｐ６＿ＡＢ	Ｐ６＿Ａ	ＶＬ	Ｐ１ＡＦ０７１２	１０３	９７	９８
		Ｐ６＿Ｂ	ＶＨ	Ｐ１ＡＦ０７１３	１０３	１００	１０１
＜ＧＰＲＣ５Ｄ＞	Ｐ７＿ＡＢ	Ｐ７＿Ａ	ＶＬ	Ｐ１ＡＦ８２８４	１０７	１０４	１０５
		Ｐ７＿Ｂ	ＶＨ	Ｐ１ＡＦ８２８５	１０７	１０４	１０６

【０６２９】

これらの実験のために、ＰＲＩＴスプリット抗体を、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅ（アフィニティークロマトグラフィー）の第１の工程およびイオン交換クロマトグラフィー（例えば、ＰＯＲＯＳ　ＸＳ）の第２の工程によって精製し、次いで、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００（サイズ排除クロマトグラフィー）によってポリッシュした。

【０６３０】

実験は、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００を用いて２５℃の測定温度で行った。全てのＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００実験は、ＨＢＳ－Ｐ＋（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｂｒ－１００８－２７）ｐＨ７．４ランニング緩衝液中で行った。異なるＤＯＴＡＭ画分を使用して、各試験抗体／抗体対について２つの実験を行った。

【０６３１】

１．第１の実験では、チップ上に捕捉されたビオチン化ＤＯＴＡＭへの個々のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体の結合を、参照抗体と比較して評価した。

【０６３２】

ＤＯＴＡＭ（ＨＢＳ－Ｐ＋中１２０ｎＭ溶液）をＣＡＰチップ表面上に高密度で捕捉した（１０μｌ／分、６０秒）。次いで、プロドラッグ＿Ａまたはプロドラッグ＿ＢのＨＢ

Ｓ－Ｐ＋中６００ｎＭ溶液をＤＯＴＡＭ表面上に注射した（１０μｌ／分、９０秒）。解離を１０μｌ／分の流量で２４０秒間モニターした。相対最大応答決定を、Ｔ２００評価ソフトウェアを使用して評価した。

【０６３３】

結果を図２６に示す。個々の抗体のいずれも、捕捉されたＤＯＴＡＭへの結合を示さなかった。

【０６３４】

２．第２の実験では、個々のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体を、固定化抗ｈＦａｂを使用して最初にチップに捕捉し、次いでＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体（ＤＯＴＡＭ＋モノストレプトアビジンカップリング６００ｎＭ、１：１ｍｏｌ、室温で１時間）の結合を評価した。

【０６３５】

プロドラッグ＿ＡまたはプロドラッグＢのＨＢＳ－Ｐ＋中６００ｎＭ溶液を抗ｈＦａｂ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＢＲ－１００８－２７）ＣＭ５チップ表面上に注射した（１０μｌ／分、１２０秒）。プロドラッグＡまたはＢ溶液の高密度捕捉後、ＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体を注射した（２０μｌ／分、９０秒）。解離を２０μｌ／分の流量で１８０秒間モニターした。新しいサイクルのために、Ｇｌｙｃｉｎ　２．１を使用することによって、１０μｌ／分の再生時間７５秒で表面を再生した。相対最大応答決定を、Ｔ２００評価ソフトウェアを使用して評価した。

【０６３６】

結果を図２７に示す。低いパーセンテージの最大応答（図中に＊で示す）は、「痕跡」またはＤＯＴＡＭ－ＳＡとの非特異的相互作用であると考えられており、アッセイを最適化する必要性を反映している。

【０６３７】

３．第３の実験では、ＤＯＴＡＭへのＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対の結合を、参照抗体と比較して評価する。抗体を、固定化抗ｈＦａｂを使用して最初にチップに捕捉し、次いでＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体（ＤＯＴＡＭ＋モノストレプトアビジンカップリング６００ｎＭ、１：１ｍｏｌ、室温で１時間）の結合を評価した。

【０６３８】

プロドラッグ＿ＡおよびプロドラッグＢのＨＢＳ－Ｐ＋中３００ｎＭ溶液を抗ｈＦａｂ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＢＲ－１００８－２７）ＣＭ５チップ表面上に注射した（１０μｌ／分、１２０秒）。プロドラッグＡおよびＢ溶液の高密度捕捉後、ＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体を注射した（２０μｌ／分、９０秒）。解離を２０μｌ／分の流量で１８０秒間モニターした。新しいサイクルのために、Ｇｌｙｃｉｎ　２．１を使用することによって、１０μｌ／分の再生時間７５秒で表面を再生した。相対最大応答決定を、Ｔ２００評価ソフトウェアを使用して評価した。

【０６３９】

結果を図２８に示す。全てのＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対は、ＤＯＴＡ結合剤であるＰ６＿ＡＢ（Ｐ１ＡＦ０７１２／Ｐ１ＡＦ０７１３）対を除いて、ＤＯＴＡＭに対して有意な量の結合を示した。

【０６４０】

ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対に対しては有意な量のＤＯＴＡＭ結合を示すが、この対の個々のメンバーに対しては示さない同様の結果もまた、ＦＡＰ結合剤Ｐ１ＡＦ８２８６およびＰ１ＡＦ８２８７に対して得られた。Ｐ１ＡＦ８２８６は、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１０９の第２の重鎖、および配列番号１１１の軽鎖から構成され、Ｐ１ＡＦ８２８７は、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１１０の第２の重鎖、および配列番号１１１の軽鎖から構成される。しかしながら、このアッセイは依然として最適化される必要がある。

【０６４１】

実施例９：併用療法
実施例９ａ：材料および方法、一般
健康モニタリングおよび終了基準
全ての実験プロトコルは、現地当局（Comite Regional d’Ethique de l’Experimentation Animale du Limousin［CREEAL］，Laboratoire Departemental d’Analyses et de Recherches de la Haute－Vienne）によって検討および承認された。Charles Riverからの雌トランスジェニックC57BL／6J－TgN（CEAGe）18 FJP［Clarke P，Mann J，Simpson JF，Rickard－Dickson K，Primus FJ．Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy．Cancer Res．1998；58（7）：1469－77］（「B6－huCEA」）およびC57BL／6J－Tg（CEACAM5）2682Wzm［Eades－Perner AM，van der Putten H，Hirth A，Thompson J，Neumaier M，von Kleist S，Zimmermann W．Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern．Cancer Res．1994；54（15）：4169－76］（「huCEACAM5」）マウスを、倫理ガイドラインに従って、毎日の明暗サイクル（12時間／12時間）で特定の日和見病原体フリー（SOPF）条件下で飼育した。動物を新しい環境に馴化させるために、到着後の最初の５日間は操作を行わなかった。
【0642】
初代固形異種移植片を、癌胎児性抗原（CEA）発現腫瘍細胞の皮下（SC）または膵臓内注射によって、試験０日目に各B6－huCEAまたはhuCEACAM5マウスにおいて樹立した。臨床症状および有害事象の検出のために動物を毎日管理し、動物が、腫瘍負荷、注射もしくは手術の副作用、または他の原因に起因する耐えられない苦痛または疼痛の徴候を示した場合、予定されたエンドポイントの前に動物を安楽死させた。疼痛、苦痛、または不快感の指標には、急性体重（BW）減少、被毛粗剛、下痢、円背姿勢、皮膚の蒼白、および腰高歩行が含まれるが、これらに限定されない。SC腫瘍状態不良（例えば、潰瘍形成、歯痕、または開放創）はまた、安楽死を促し得る。同所性モデルでは、腹部腫脹は腫瘍負荷の増加を示し、これは安楽死を促し得る。
【0643】
SC腫瘍体積を、週３回の手動キャリパー測定によって推定し、以下の式に従って算出した：体積＝０．５×長さ×幅^2。腫瘍成長速度に応じて、必要に応じて追加の腫瘍測定を行った。同所性モデルでは、腫瘍の進行を生物発光イメージング（BLI）によって定期的に評価した。動物のBWを少なくとも週３回測定し、健康状態に応じて必要に応じて追加の測定を行った。BW減少が初期BWの２０％を超えたか、または腫瘍体積が３０００mm^3（プロトコル１１９、１３６、１５０）または２０００mm^3（プロトコル１９５）に達したマウスを直ちに安楽死させた。
【0644】
放射性尿／糞便の再摂取を最小限に抑えるために、マウスを、^{212}Pb－１，４，７，１０－テトラキス（カルバモイルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン（DOTAM）投与後４時間、格子床のケージに入れ、その後、標準的な床敷を備えた新しいケージに移した。次いで、全てのケージを注射後（p．i．）２４時間で交換した。放射能注射の翌日から、７日間または全ての個体が任意の急性BW減少から十分に回復するまで、全てのマウスにウェットフードを与えた。
【0645】
生物発光イメージング

腫瘍の進行を、Ｂｒｕｋｅｒ　Ｉｎ－Ｖｉｖｏ　ＦＸ　ＰＲＯシステムを使用して反復ＢＬＩによって評価した。シグナルとの干渉を制限するために、電気かみそりを使用してイメージングの前に、注射領域の上および周囲の被毛を可能な限り除去した。イメージングのために、マウスの背部に１００μＬのルシフェリン（Ｄ－ルシフェリン、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、参照番号８８２９４）をＳＣ注射した。溶液をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で１５ｍｇ／ｍＬに希釈し、０．２μｍフィルタにかけ、使用するまで－２０℃で保存した。イメージング中、注射部位を下にしてマウスを横並びにした。装置の光学写真を撮影し、続いて１分間のＢＬＩ取得を行った。シグナルを最大化するために、ルシフェリン注射の１０分後に取得を開始した。次いで、視覚的評価のために画像を重ね合わせた。長方形の関心領域（ＲＯＩ）を描画し、ＲＯＩ内のバックグラウンド補正シグナルを各マウスについて比較して腫瘍の進行を評価した。

【０６４６】

組織採取

免疫療法投与後のマウスから血液を採取し、それぞれの血清濃度を測定することによって抗体注射を検証した。試料を１００００ＲＣＦで５分間遠心分離し、得られた血清画分を単離し、凍結し、Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ、Ｒｏｃｈｅ　Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ　Ｃｅｎｔｅｒ　Ｚｕｒｉｃｈによって実施された酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）によるその後の分析のために－２０℃で保存した。

【０６４７】

麻酔したマウスの後眼窩出血を使用して静脈洞から安楽死時にも血液を採取した後、頸椎脱臼により終了した。これに続いて、プロトコルによって要求されるように、放射能測定および／または組織学的分析のための追加の組織採取を行った。予期しないまたは異常な状態が記録された。ホルマリン固定のために回収した組織を直ちに１０％中性緩衝ホルマリン（ＮＢＦ、４℃）に入れ、次いで２４時間後にＰＢＳ（４℃）に移した。体内分布の目的で回収された器官および組織を秤量し、２４７０ＷＩＺＡＲＤ^{2}自動ガンマカウンター（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して放射能について測定し、その後、減衰およびバックグラウンドの補正を含めて、組織１グラムあたりの注入線量パーセント（％ＩＤ／ｇ）を算出した。

【０６４８】

統計分析

統計分析を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　７（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．）、ＪＭＰ　１２（ＳＡＳ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｉｎｃ．）、およびＤＯＰｓａ（社内アプリケーション）を使用して行った。腫瘍成長阻害（ＴＧＩ）の曲線分析を、以下の式を使用して平均腫瘍体積に基づいて行った：

$$TGI = 100 - \frac{\overline{v_{処置,d}} - \overline{v_{処置,0}}}{\overline{v_{参照,d}} - \overline{v_{参照,0}}} \times 100$$

式中、ｄは試験日を示し、０はベースライン値を示す。「ビヒクル」を参照群として選択した。

【０６４９】

１．１　試験化合物

ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）（Ｐ１ＡＤ８７５８）は、ＣＥＡのＣＨ１Ａ１Ａエピトープを標的とするマウス化ＢｓＡｂである。それは以下のポリペプチド鎖から構成される：

＞ＬＣ

ＤＩＱＭＴＱＳＰＳＳＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＫＡＳＡＡＶＧＴＹＶＡＷＹＱＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬＩＹＳＡＳＹＲＫＲＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰＥＤＦＡＴＹＹＣＨＱＹＹＴＹＰＬＦＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱＮＧ

VLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATH
KTSTSPIVKSFNRNEC

＞HC　1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQ
APGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTA
YMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTV
SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVT
VTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSE
TVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVF
IFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDD
VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKC
RVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD
KVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTD
GSYFVYSDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSL
SHSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQSVEESGGRLVTPGT
PLTLTCTVSGFSLSTYSMSWVRQAPGKGLEWIGFIGSRGD
TYYASWAKGRFTVSRTSTTVDLKITSPTTEDTATYFCARE
RDPYGGGAYPPHLWGPGTLVTVSS

＞HC　2C

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQ
APGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTA
YMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTV
SSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVT
VTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSE
TVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVF
IFPPKPKDVLTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDD
VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKC
RVNSAAFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKD
KVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTD
GSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSL
SHSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVLTQTPSPVSPAVG
GTVTISCQSSHSVYSDNDLAWYQQKLGQPPKLLIYQASKL
ASGVSSRFSGSGSGTQFTLTISGVQSDDAATYYCLGGYDD
ESDTYGFGGGTEVVVK

【０６５０】

プロトコル１９５で使用されるＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬは、本出願の他の箇所に記載されているＰ１ＡＤ８５９２である（例えば、実施例１を参照されたい）。プロトコル１９５で使用されるＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴは、本出願の他の箇所に記載されているＰ１ＡＦ０１７１である（例えば、実施例４を参照されたい）。

【０６５１】

ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０４０１２）は、陰性対照として使用される非ＣＥＡ結合ＢｓＡｂ（標的＝ジゴキシゲニン）である。

【０６５２】

抗ＣＤ４０抗体は、ｍｕＩｇＧ１　ＣＤ４０　ＦＧＫ４．５　Ｂ６　ＣＨＯ　Ｗ（９）である。それは、国際公開第２０１８／１８９２２０号に教示されているように、その文献の配列ナンバリングを使用して、配列番号６１の重鎖および配列番号６２の軽鎖を有する。プロトコル１１９で使用される抗ＰＤ－Ｌ１は、６Ｅ１１　ｍｕＩｇＧ１　ＧＮＥｗ（１）（「マウスＩｇＧ１、クローン６Ｅ１１、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ」とも呼ばれる）である。例えば、国際公開第２０１８／０５５１４５号を参照されたい。プロトコル１３

６および１９５で使用される抗ＰＤ－Ｌ１は、６Ｅ１１．ｍＩｇＧ２ａ．ＬＡＬＡＰＧである。

【０６５３】

全ての抗体コンストラクトを、注射の日まで－８０℃で保存し、その日に、静脈内（ＩＶ）または腹腔内（ＩＰ）投与のために解凍し、それぞれの最終濃度まで標準ビヒクル緩衝液（２０ｍＭヒスチジン、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ６．０）または０．９％ＮａＣｌで希釈した。同様に、抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１抗体を－８０℃で保存し、ＩＰ注射の日にヒスチジン緩衝液で２００μｇ／２００μＬに希釈した。

【０６５４】

Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００およびＣａ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡ（ＲＯ７２０１８６９）を、注射の日まで－２０℃で保存し、ＩＶまたはＩＰ投与のために解凍し、ＰＢＳで希釈した。

【０６５５】

放射標識のためのＤＯＴＡＭキレートは、Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓによって提供され、Ｏｒａｎｏ　Ｍｅｄ（フランスのＲａｚｅｓ）によって実施された放射標識の前に－２０℃に維持された。トリウム発生器からのＤＯＴＡＭでの溶出によって^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０５８３４）を生成し、続いて、標識後にＣｕまたはＣａでクエンチした。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ溶液をＰＢＳまたは０．９％ＮａＣｌで希釈して、ＩＶ注射用の所望の^{212}Ｐｂ活性濃度を得た。

【０６５６】

ビヒクル対照群のマウスは、ＢｓＡｂ、ＣＡ、および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの代わりにビヒクル緩衝液の複数回の注射を受けた。

【０６５７】

腫瘍モデル

マウスへの接種に使用される腫瘍細胞株は、Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃまたはＭＣ３８－ｈｕＣＥＡである。

【０６５８】

Ｐａｎｃ０２は、Ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｔｅｘａｓ　ＭＤ　Ａｎｄｅｒｓｏｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｎｔｅｒ（テキサス州ヒューストン）から入手した、ヒトＣＥＡ（ｈｕＣＥＡ）およびルシフェラーゼ（ｌｕｃ）を発現するようにＲｏｃｈｅによって操作され、Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃを産生する、マウス膵管腺がん細胞に由来する細胞株である。細胞を、１％ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号７２４００－０２１）、１０％ウシ胎児血清（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号ＳＨ３００８８．０３）、４μｇ／ｍＬのピューロマイシン（ＶＷＲ、カタログ番号Ｊ５９３）、および５０μｇ／ｍＬのハイグロマイシン（Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、カタログ番号１４２９１）を濃縮したＲＰＭＩ－１６４０培地で培養した。

【０６５９】

ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡは、米国カリフォルニア州のＣｉｔｙ　ｏｆ　Ｈｏｐｅから入手した、ｈｕＣＥＡを発現するように操作されたマウス結腸腺がん細胞株である。細胞を、ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号６１９６５－０２６）、１０％ウシ胎児血清（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号ＳＨ３００８８．０３）、および５００μｇ／ｍＬのジェネティシン（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１０１３１－０２７）を濃縮したＤＭＥＭ培地で培養した。

【０６６０】

ＳＣ異種移植片を、Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）Ｍａｔｒｉｇｅｌ（登録商標）基底膜マトリックス（成長因子低減、カタログ番号３５４２３０）と１：１で混合した培地中の細胞を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各マウスにおいて樹立した。同所性モデルでは、初代固形膵臓内異種移植片を、培地中の細胞を膵臓に直接注射することによって各マウスにおいて樹立した。

【０６６１】

実施例９ｂ：プロトコル１１９

プロトコル１１９の目的は、膵臓腺がんの同系同所性マウスモデルにおける処置のための、単独でおよびがん免疫療法（ＣＩＴ）と組み合わせた、３サイクルのＣＥＡ事前標的化放射線免疫療法（ＰＲＩＴ）後の有効性を評価することであった。

【０６６２】

免疫担当トランスジェニックＢ６－ｈｕＣＥＡマウスに、Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ腫瘍細胞（１０μＬ中０．２×10^6細胞）を膵臓に注射し、腫瘍を発達させ、続いてＢＬＩを行った。ＣＥＡ－ＰＲＩＴレジメンは、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）ＢｓＡｂ（１００μＬ中１００μｇ）のＩＶ注射と、それに続く４日後のＰｂ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡ（１００μＬ中２５μｇ）のＩＶ投与と、それに続くＣｕクエンチした^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭエフェクター分子（１００μＬ中２０μＣｉ）のＣＡの２時間後のＩＶ注射とを含んだ。ＣＩＴ処置は、抗ＣＤ４０抗体の１回投与および抗ＰＤ－Ｌ１抗体の複数回注射（２００μＬ中２００μｇの各抗体）からなり、放射能注射の２４時間後にＩＰ投与した。スカウトマウスを体内分布評価のために採取して、第１の処置サイクル中の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ標的化およびクリアランスを確認した。処置有効性を、ＴＧＩ（ＢＬＩに基づく）および生存に関して評価した。

【０６６３】

試験概要を図２９に示す。

【０６６４】

プロトコル１１９の時間経過およびデザインを以下の表に示す。

【０６６５】

プロトコル１１９の時間経過

試験日	日付	実験手順
０	２０１７－０６－０８	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞の調製およびシリンジの充填
０	２０１７－０６－０８	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞のＳＣ注射
６	２０１７－０６－１４	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
７	２０１７－０６－１５	ＢｓＡｂのＩＶ注射
１１	２０１７－０６－１９	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
１１	２０１７－０６－１９	ＣＡのＩＶ注射
１１	２０１７－０６－１９	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
１１	２０１７－０６－１９	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
１２	２０１７－０６－２０	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント
１２	２０１７－０６－２０	抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
１３	２０１７－０６－２１	後眼窩出血
１４	２０１７－０６－２２	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
１８	２０１７－０６－２６	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
２１	２０１７－０６－２９	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
２２	２０１７－０６－３０	ＢｓＡｂのＩＶ注射
２５	２０１７－０７－０３	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
２６	２０１７－０７－０４	ＣＡのＩＶ注射
２６	２０１７－０７－０４	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２６	２０１７－０７－０４	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
２７	２０１７－０７－０５	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
２８	２０１７－０７－０６	後眼窩出血
２８	２０１７－０７－０６	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
３２	２０１７－０７－１０	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
３５	２０１７－０７－１３	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
３６	２０１７－０７－１４	ＢｓＡｂのＩＶ注射
３９	２０１７－０７－１７	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
４０	２０１７－０７－１８	ＣＡのＩＶ注射
４０	２０１７－０７－１８	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
４０	２０１７－０７－１８	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
４１	２０１７－０７－１９	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
４２	２０１７－０７－２０	後眼窩出血
４３	２０１７－０７－２１	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
４６	２０１７－０７－２４	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）

４９	２０１７－０７－２７	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
５３	２０１７－０７－３１	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
５３	２０１７－０８－０３	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
６０	２０１７－０８－０７	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
６３	２０１７－０８－１０	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）

【０６６６】
プロトコル１１９の試験群

群	ＢｓＡｂ	ＢｓＡｂ（μｇ）	ＣＡ（μｇ）	^{212}Ｐｂ（μＣｉ）	抗ＣＤ４０*（μｇ）	抗ＰＤ－Ｌ１（μｇ）	サイクル	ｎ（マウス）
Ａ	－	０	０	０	０	０	３	８
Ｂ	－	０	０	０	２００	２００	３	８
Ｃ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	３	８
Ｄ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	２００	２００	３	８
Ｅ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	１	３
Ｆ	ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	０	０	１	３

＊抗ＣＤ４０を１回のみ、第１の処置サイクルで投与

【０６６７】
初代固形異種移植片を、ＲＰＭＩ－１６４０培地中のＰａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞（継代１９）（１０μＬ中０．２×１０^{6}個の細胞）を膵臓に直接注射することによって、試験０日目に各Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウス（１０週齢）において樹立した。腫瘍の進行を、接種後６、１１、１４、１８、２１日目に、次いで６３日目まで週２回測定して、ＢＬＩを通して全てのマウスで評価した。

【０６６８】
Ａ～Ｄ群のマウスを、試験の最後まで、または終了基準の１つまたはいくつかに達するまで、治療有効性を評価するために追跡した。免疫療法の投与の２４時間後にＢ群およびＤ群のマウスから血液を採取して、ＥＬＩＳＡによる血清画分の分析によって抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１注射を検証した。血清もまた、後眼窩採血による安楽死の前に単離し、次いで凍結し、－２０℃で保存した。組織学的処理および分析のために以下の組織を回収し、直ちに１０％ＮＢＦに２４時間入れた後、１×ＰＢＳ溶液に移した：血清、肝臓、脾臓、腎臓、および腫瘍を有する膵臓。

【０６６９】
^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の２４時間後に、Ｅ群およびＦ群のマウスを　　殺および剖検し、腫瘍取込みおよび正常組織からのクリアランスを確認した。したがって、以下の器官および組織を採取し、放射能について測定した：血液、膀胱、脾臓、膵臓（腫瘍なし）、腎臓、肝臓、筋肉、皮膚、尾、および腫瘍。

【０６７０】
結果
体内分布およびＥＬＩＳＡ
最初の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射２４時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ蓄積およびクリアランスを図３０に示す。腫瘍取込みは特異的であり、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）による事前標的化後の腫瘍では、ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭによる０．６％ＩＤ／ｇと比較して１６．５％ＩＤ／ｇであった。腫瘍のない膵臓組織では、^{212}Ｐｂ蓄積は１．９％ＩＤ／ｇであった。

【０６７１】
免疫療法投与の２４時間後の抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１抗体の血清濃度を図３１に示す。

【０６７２】
腫瘍発達および生存
ＣＥＡ－ＰＲＩＴおよび対照処置後のバックグラウンドを差し引いた平均ＢＬＩシグナルを、光子／秒／ｍｍ^{2}として表して図３２に示す。対応する個々の曲線を図３３に示す

。平均シグナルは、非処置対照マウスでは指数関数的に増強したが、増加はより遅く、単独療法（免疫療法またはＣＥＡ－ＰＲＩＴ）のいずれかで処置したマウスでは個体変動がより大きかった。ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法併用群では、ＢＬＩシグナルは、他の群と比較してより遅い速度で増加したか、またはバックグラウンドレベルまで減少した。イメージングの最終日である８８日目に、３／８のＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法処置マウスにおいてバックグラウンドノイズと識別可能なシグナルはみられなかった。

【０６７３】

生存曲線を図３４に示す。この試験は、細胞注射後１０３日目に終了し、その時点でＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法併用群の２／８のマウスが生存しており、腫瘍がなかった。他の群は、腫瘍のないマウスまたは生存マウスを有していなかった。個々の処置群についての事象までの時間の統計量（事象＝安楽死／死亡）を以下の表に示し、９５％信頼限界の上限および下限を伴う生存期間中央値を、四分位生存期間（２５％および７５％）と一緒に示す。

【０６７４】

事象までの時間＊の統計量を伴う分位点（日）

群	期間中央値	９５％下限	９５％上限	２５％失敗	７５％失敗
ビヒクル	２７．５	１１	３３	２３．５	３３
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	３６．５	１１	４６	２７．５	４６
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	４６．５	１４	６０	３０	５６
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	７３	５０	－	５９	－

＊事象＝安楽死／腫瘍負荷による死亡。

【０６７５】

ペアワイズ検定を実施して、どちらの群が生存に関して有意に異なっていたかを特定した：ログランク検定（後の生存事象に対するより大きな重み）およびウィルコクソン検定（初期生存期間に対するより大きな重み）、両方とも多重検定のためのボンフェローニ補正を使用した。結果を以下の表に示す。ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せは、単独療法およびビヒクル群のいずれと比較しても生存を有意に増加させた。

【０６７６】

ペアワイズ・ログランク検定（多重検定水準＝０．００８３３）

群	ビヒクル	抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１
ビヒクル	１．０００	０．０３４１	０．０１３１	＜０．０００１＊
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．０３４１	１．０００	０．７１００	０．０００４＊
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	０．０１３１	０．７１００	１．０００	０．００２９＊
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	＜０．０００１＊	０．０００４＊	０．００２９＊	１．０００

【０６７７】

ペアワイズ・ウィルコクソン検定（多重検定水準＝０．００８３３）

群	ビヒクル	抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１
ビヒクル	１．０００	０．０８６４	０．０３９６	０．０００２*
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．０８６４	１．０００	０．５２５０	０．０００７*
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	０．０３９６	０．５２５	１．０００	０．００６５*
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．０００２*	０．０００７*	０．００６５*	１．０００

【０６７８】
有害事象および毒性
【０６７９】
全ての治療群における平均ＢＷ推移を図３５に示す。抗ＣＤ４０の投与は、注射マウスにおいて予想される急性体重減少を誘発し、これは注射後およそ１週間以内に回復した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射は、放射線照射マウスにおいて一過性の体重減少を引き起こし、これは抗ＣＤ４０注射後の体重減少よりも軽度であった。注射後の急性ＢＷ減少のためにマウスを安楽死させることはなかった。
【０６８０】
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ単独療法群では、１匹のマウスが、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の失敗のために第３の処置サイクル中にプロトコルから除外された。同じ群の１匹のマウスが、ＢＬＩ取得中に麻酔下で死亡した。ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法併用群では、１匹のマウスを尾の壊死のため安楽死させた。
【０６８１】
プロトコル１１９の有害事象

群	屠殺したマウス（ｎ／群）	試験日	終了の理由
Ｃ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	１（８）	４２	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射失敗
Ｃ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	１（８）	５６	麻酔／ＢＬＩ取得中のマウスの死亡
Ｄ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	１（８）	５３	尾の壊死

^{212}Ｐｂ照射（２０μＣｉ）を試験１１、２６、および４０日目に行った。免疫療法を試験１２日目（抗ＣＤ－４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）、２７日目（抗ＰＤ－Ｌ１）、および４１日目（抗ＰＤ－Ｌ１）に投与した。
【０６８２】
組織病理学的検査
全てのマウスにおいて、以下の組織を調べた：腎臓、肝臓、肺、脾臓、および原発腫瘍（膵臓内）。組織切片をヘマトキシリンおよびエオシン（Ｈ＆Ｅ）または過ヨウ素酸－シッフ（ＰＡＳ、腎臓のみ）で染色し、Ｌｅｉｃａ　Ｄｉａｐｌａｎ顕微鏡で光学顕微鏡法によって調べた。組織病理学的所見を、最小（グレード１）、軽微（グレード２）、中等度（グレード３）、顕著（グレード４）または重度（グレード５）の５点システムを使用して重症度に等級分けした。
【０６８３】
腫瘍

Ａ群、Ｂ群、およびＣ群の全てのマウス（８／８）は、膵臓内に移植された腫瘍の存在を示したが、Ｄ群については対応する数は５／８であった。転移性移植が、Ｂ群、Ｃ群およびＤ群の１／８のマウスの肝臓ならびにＢ群の１匹のマウスの脾臓において記録された。サイズ、壊死および出血は、群間で全体的に類似していた（以下の表）。有糸分裂像の数は以下の通りであった：Ａ群＞Ｂ群＞Ｃ群＞Ｄ群、一方、アポトーシス像は、Ｃ群およびＤ群と比較した場合、Ａ群およびＢ群においてより低かった。

【０６８４】

移植膵臓腫瘍における出血、有糸分裂像およびアポトーシス像のサイズおよび平均スコア＊

群	Ａ： ビヒクル	Ｂ： 抗ＣＤ４０＋ 抗ＰＤ－Ｌ１	Ｃ： ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	Ｄ： ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ 抗ＣＤ４０＋ 抗ＰＤ－Ｌ１
検討したｎ	*8*	*8*	*8*	*5*
平均サイズ（ｃｍ）±ＳＤ	１１．１３±１．８９	１４．１３±５．６９	１０．６３±４．１４	１４．００±３．３９
壊死	２．５	２．５	２．１	２．６
出血	１．９	０．９	１．３	１．２
有糸分裂像	４	２．９	２．５	０．８
アポトーシス像	１．５	１．４	２．５	２．４

＊平均スコア＝Σ動物の数ｘ重症度／群における腫瘍の数

【０６８５】

器官

主な処置関連効果は、Ｃ群およびＤ群のマウスの腎臓に存在し、主に髄質外層の外帯内の近位尿細管（Ｓ３セグメント）が関与する変性／再生および核大小不同からなっていた。

【０６８６】

Ｃ群およびＤ群の腎臓における近位尿細管の変性／再生および核大小不同

群	C： CEA－PRIT	D： CEA－PRIT＋ 抗CD40＋ 抗PD－L1
検討したn	8	5
	変性／再生、近位尿細管	
最小	4	5
軽微	0	1
中等度	0	2
平均スコア*	0．5	1．6
	核大小不同、近位尿細管	
最小	3	0
軽微	3	5
中等度	1	2
顕著	0	1
平均スコア*	1．5	2．5

＊平均スコア＝Σ動物の数x重症度／群における腫瘍の数

【0687】

結論

ＣＥＡ－ＰＲＩＴとＣＩＴ（抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）との組合せは、ビヒクルおよびいずれかの単独療法と比較して生存を有意に増加させ、最初に同所性腫瘍を樹立した２／８のＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法処置マウスは、試験終了時に腫瘍がなかった。ＢＬＩにより、併用処置を用いた腫瘍制御の改善が確認された。

【0688】

ＢＷ減少のためにいずれの群のマウスも安楽死させることはなく、処置の良好な忍容性が示された。しかしながら、多くの動物は、反復イメージングセッション中にイソフルラン媒介麻酔を受け、覚醒／回復するのに長時間を要し、見かけ上、より早く老化した（被毛の灰色化）。１匹のマウスは麻酔から覚醒せず、画像取得後に死亡した。

【0689】

ＣＥＡ－ＰＲＩＴによる処置は、腎臓（近位尿細管）内の尿細管変性／再生および核大小不同を誘発し、免疫療法と組み合わせた後の腎臓所見の重症度はわずかに高かった。腫瘍に対する主な効果は、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法併用処置による発生率の低下、ＣＥＡ－ＰＲＩＴおよび／または免疫療法処置による有糸分裂像の減少、ならびにＣＥＡ－ＰＲＩＴによるアポトーシス像の増加であった。

【0690】

実施例９ｃ：プロトコル１３６

プロトコル１３６の目的は、免疫担当トランスジェニックマウスにおけるＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ腫瘍の処置のための、単独およびＣＩＴと組み合わせたＣＥＡ－ＰＲＩＴの３サイクル後の有効性を評価することであった。

【0691】

ＰＲＩＴレジメンを、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）ＢｓＡｂ（２００μＬ中１００μｇ）のＩＰ注射と、それに続く７日後のＰｂ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡ（

２００μＬ中２５μｇ）のＩＰ投与と、それに続く２４時間後のエフェクター分子^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２０μＣｉ）のＩＰ投与とを含む３反復サイクルで投与した。

【０６９２】

免疫療法処置は、抗ＣＤ４０抗体の１回投与および抗ＰＤ－Ｌ１抗体の複数回注射（２００μＬ中２００μｇの各抗体）からなり、放射能注射の２４時間後にＩＰ投与した。第２のサイクル後の免疫薬力学（免疫ＰＤ）効果のフローサイトメトリー分析のために　殺したマウスに加えて、第１の処置サイクル中の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ標的化およびクリアランスを確認するために、スカウトマウスを体内分布評価のために採取した。ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せ、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ単独、免疫療法単独、および処置なしの間で比較を行った。処置有効性を、ＴＧＩ、生存、および免疫記憶に関して評価した。キャリパー測定に加えて、ＢＬＩによって腫瘍成長を追跡した。

【０６９３】

試験概要を図３６に示す。

【０６９４】

プロトコル１３６の時間経過およびデザインを以下の表に示す。

【０６９５】

プロトコル１３６の時間経過

試験日	日付	実験手順
０	２０１８－０１－１２	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞の調製およびシリンジの充填
０	２０１８－０１－１２	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞のＳＣ注射
１０	２０１８－０１－２２	ＢｓＡｂのＩＰ注射
１１	２０１８－０１－２３	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
１４	２０１８－０１－２６	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
１７	２０１８－０１－２９	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
１７	２０１８－０１－２９	ＣＡのＩＰ注射
１８	２０１８－０１－３０	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
１８	２０１８－０１－３０	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
１９	２０１８－０１－３１	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント
１９	２０１８－０１－３１	抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
２０	２０１８－０２－０１	後眼窩出血
２０	２０１８－０２－０１	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
２４	２０１８－０２－０５	ＢｓＡｂのＩＰ注射
２４	２０１８－０２－０５	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
２７	２０１８－０２－０８	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
３１	２０１８－０２－１２	ＣＡのＩＰ注射
３１	２０１８－０２－１２	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
３１	２０１８－０２－１２	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
３２	２０１８－０２－１３	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
３３	２０１８－０２－１４	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
３４	２０１８－０２－１５	後眼窩出血
３４	２０１８－０２－１５	免疫ＰＤ（ＦＡＣＳ）のための安楽死および組織採取
３５	２０１８－０２－１６	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
３８	２０１８－０２－１９	ＢｓＡｂのＩＰ注射
３８	２０１８－０２－１９	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
４１	２０１８－０２－２２	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
４５	２０１８－０２－２６	ＣＡのＩＰ注射
４５	２０１８－０２－２６	Ｄ－ルシフェリンのＳＣ注射＋イメージング（ＢＬＩ）
４６	２０１８－０２－２７	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
４６	２０１８－０２－２７	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
４７	２０１８－０２－２８	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
４８	２０１８－０３－０１	後眼窩出血

【０６９６】

プロトコル１３６の試験群

群	ＢｓＡｂ	ＢｓＡｂ（μｇ）	ＣＡ（μｇ）	^{212}Ｐｂ（μＣｉ）	抗ＣＤ４０*（μｇ）	抗ＰＤ－Ｌ１（μｇ）	サイクル	ｎ（マウス）
Ａ	－	０	０	０	０	０	３	９
Ｂ	－	０	０	０	２００	２００	３	９
Ｃ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	３	９
Ｄ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	２００	２００	３	９
Ｅ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	１	３
Ｆ	ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	０	０	１	３
Ｇ	－	０	０	０	０	０	２	４
Ｈ	－	０	０	０	２００	２００	２	４
Ｉ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	２	４
Ｊ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	２００	２００	２	４

＊抗ＣＤ４０を１回のみ、第１の処置サイクルで投与

【０６９７】

初代固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の０．５×１０^{5}個の細胞（継代１８）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウス（１１～１２週齢）において樹立した。腫瘍細胞注射の１０日後、マウスを平均腫瘍体積１１４ｍｍ^{3}の実験群に分類した。接種後１７日目にＣＡを注射し、その時点で平均腫瘍体積は２３３ｍｍ^{3}であった。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の翌日の１９日目に、平均腫瘍体積は３２６ｍｍ^{3}であった。

【０６９８】

Ａ～Ｄ群のマウスを、試験の最後まで、または終了基準の１つまたはいくつかに達するまで、治療有効性を評価するために追跡した。免疫療法の投与の２４時間後にＢ群およびＤ群のマウスから血液を採取して、ＥＬＩＳＡによる血清画分の分析によって抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１注射を検証した。血清もまた、後眼窩採血による安楽死の前に全てのマウスから単離し、次いで凍結し、－２０℃で保存した。組織学的処理および分析のために以下の組織を回収し、直ちに１０％ＮＢＦに２４時間入れた後、１×ＰＢＳ溶液に移した：血清、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、および腫瘍。

【０６９９】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の２４時間後に、Ｅ群およびＦ群のマウスを　　殺および剖検し、腫瘍取込みおよび正常組織からのクリアランスを確認した。したがって、以下の器官および組織を採取し、放射能について測定した：血液、膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾、皮膚、および腫瘍。

【０７００】

Ｇ～Ｊ群は、異なる区画からのＴ細胞およびＤＣの機能および表現型の特徴付けによって抗腫瘍Ｔ細胞および樹状細胞（ＤＣ）応答の生成を評価するために、２回目の抗ＰＤ－Ｌ１注射の２４時間後に、後眼窩出血後に　　殺および剖検した免疫ＰＤスカウトマウスを含んでいた。全ての免疫ＰＤマウスから、腫瘍、脾臓、および流入領域リンパ節（ＤＬＮ、腫瘍側から）を採取した。

【０７０１】

Ｔ細胞エフェクターおよび記憶の生成を評価するために、脾臓試料に対して、ｅｘ　ｖｉｖｏ　ＰＭＡ／イオノマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号００－４

９７０－０３、００－４９８０－０３）再刺激アッセイを実施した。また、ＭＡＣＳＱｕａｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてフローサイトメトリー（蛍光活性化セルソーティング［ＦＡＣＳ］）を行い、ＦｌｏｗＪｏ １０．５．３ソフトウェアを用いて結果の解析を行った。染色パネルデザインを以下の表に示す。

【０７０２】

プロトコル１３６のためのＦＡＣＳパネルデザイン

Ｔ細胞	ＤＣ	五量体	Ｔｒｅｇ	ＰＭＡ／ イオノマイシン
マーカー	マーカー	マーカー	マーカー	マーカー
生存／死亡	生存／死亡	生存／死亡	生存／死亡	生存／死亡
ＣＤ４５	ＣＤ４５	五量体ｐ１５Ｅ	ＣＤ４５	ＣＤ４５
ＣＤ３	ネガティブ選択 （ＣＤ１９、Ｇｒ１、 Ｆ４／８０）	ＣＤ４５	ＣＤ３	ＣＤ３
ＣＤ４	ＣＤ１１ｃ	ＣＤ３	ＣＤ４	ＣＤ４
ＣＤ８ａ	ＭＨＣクラスＩＩ	ＣＤ８	ＣＤ８	ＣＤ８
４１ＢＢ	ＣＤ８６	ＣＤ４	ＣＤ２５	ＣＤ４４
Ｌａｇ３	ＣＤ１１ｂ	ＣＤ１１ｂ	ＣＤ１１ｂ	ＩＦＮγ
ＰＤ－１	ＣＤ３１７	Ｂ２２０	ＦｏｘＰ３	ＩＬ－２

ＩＦＮγ＝インターフェロンガンマ、ＩＬ－２＝インターロイキン－２、ＭＣＨ＝主要組織適合遺伝子複合体、ＰＭＡ＝ホルボール１２－ミリステート－１３－アセテート、Ｔｒｅｇ＝制御性Ｔ細胞

【０７０３】

結果

体内分布およびＥＬＩＳＡ

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射（サイクル１）２４時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ蓄積およびクリアランスを図３７に示す。腫瘍取込みは特異的であり、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）による事前標的化後の腫瘍では、回収した全ての正常組織の＜２．５％ＩＤ／ｇと比較して１４．７％ＩＤ／ｇであった。ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭを使用すると、得られた腫瘍蓄積は１．９％ＩＤ／ｇであった。

【０７０４】

免疫療法投与の２４時間後の抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１抗体の血清濃度を図３８に示す。

【０７０５】

腫瘍発達および生存

ＣＥＡ－ＰＲＩＴ処置および対照処置後の平均Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ腫瘍発達を図３９に示し、全ての処置群の個々の腫瘍成長曲線を図４０に示す。単独療法（ＣＩＴまたはＣＥＡ－ＰＲＩＴ）のいずれかで処置したマウスの腫瘍は、着実に成長したが、ビヒクル対照と比較して遅延がみられた。ＣＥＡ－ＰＲＩＴは、免疫療法よりも強い効果を有していた。ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法併用群では、８／９のマウスが腫瘍体積の減少に関して処置に対して初期応答を示した。応答の強度／持続時間と治療開始時の腫瘍サイズとの間に相関はみられなかった。

【０７０６】

全ての処置群を平均に基づいて分析することができた最終日である４７日目に、ＴＧＩは、ビヒクル対照と比較して、免疫療法、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、およびＣＥＡ－ＰＲＩＴと免疫療法との組合せについてそれぞれ３４．０％、８１．４％、および８９．７％であった。主要試験は、細胞注射後１４０日目に終了し、その時点でＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法併用群の４／９のマウスが生存しており、腫瘍がなかった。ＰＲＩＴ単独療法群では、１／９のマウスが完全に退縮した腫瘍を有していたが、ＢＷ減少のためにマウスを１１７日目に安楽死させた。

【０７０７】

ＣＥＡ－ＰＲＩＴおよび対照処置後のバックグラウンドを差し引いた平均ＢＬＩシグナルを、光子／秒／ｍｍ^{2}として表して図４１に示す。対応する個々の曲線を図４２に示す。対応する同所性腫瘍モデル（プロトコル１１９）と比較して、結果はより可変的であった。免疫療法ありおよびなしのＣＥＡ－ＰＲＩＴは、個々のマウスにおいてＢＬＩシグナルの強い減少を示したが、免疫療法マウスは初期シグナルが低く、いずれの減少も区別することが困難であった。

【０７０８】

全生存を、腫瘍体積≧３０００ｍｍ^{3}の終了基準に基づいて図４３に示す。個々の処置群についての事象までの時間（３０００ｍｍ^{3}を超える腫瘍体積）を以下の表に示し、９５％信頼限界の上限および下限を伴う生存期間中央値を、四分位生存期間（２５％および７５％）と一緒に示す。

【０７０９】

事象までの時間＊の統計量を伴う分位点（日）

群	期間中央値	９５％下限	９５％上限	２５％失敗	７５％失敗
ビヒクル	３８	３３	４８	３８	４５
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	５４	４７	７０	４８	６０
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	７３	７０	９１	７０	９１
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ 抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	１０３	５９	－	８０	－

＊事象＝腫瘍体積≧３０００ｍｍ^3。

【０７１０】

ペアワイズ検定を実施して、どちらの群が生存に関して有意に異なっていたかを特定した：ログランク検定（後の生存事象に対するより大きな重み）およびウィルコクソン検定（初期生存期間に対するより大きな重み）、両方とも多重検定のためのボンフェローニ補正を使用した。結果を以下の表に示す。全ての処置は、ビヒクル群と比較して生存を有意に増加させた。

【０７１１】

ペアワイズ・ログランク検定（多重検定水準＝０．００８３３）

群	ビヒクル	抗CD４０＋ 抗PD－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ 抗CD４０＋ 抗PD－Ｌ１
ビヒクル	１．００００	０．００２３*	０．０００２*	０．０００１*
抗CD４０＋抗PD－Ｌ１	０．００２３*	１．００００	０．０００６*	０．０００１*
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	０．０００２*	０．０００６*	１．００００	０．１２４２
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ 抗CD４０＋抗PD－Ｌ１	０．０００１*	０．０００１*	０．１２４２	１．００００

【０７１２】
ペアワイズ・ウィルコクソン検定（多重検定水準＝０．００８３３）

群	ビヒクル	抗CD４０＋ 抗PD－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ 抗CD４０＋ 抗PD－Ｌ１
ビヒクル	１．００００	０．００１８*	０．０００５*	０．０００３*
抗CD４０＋抗PD－Ｌ１	０．００１８*	１．００００	０．００１１*	０．０００４*
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	０．０００５*	０．００１１*	１．００００	０．１０８５
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ 抗CD４０＋抗PD－Ｌ１	０．０００３*	０．０００４*	０．１０８５	１．００００

【０７１３】
免疫薬力学
制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）または五量体染色を使用して有意な結果は達成されなかった。ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋ＣＩＴの組合せは、他の全ての処置と比較して、活性化腫瘍内ＣＤ８　Ｔ細胞（４１ＢＢ発現のアップレギュレーションによって測定）、腫瘍、脾臓および流入領域リンパ節（ＤＬＮ）における活性化形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）および古典的ＤＣ（ｃＤＣ）（ＣＤ８６発現のアップレギュレーションによって測定）の頻度の有意な増加、ならびに全免疫細胞におけるＴ細胞の頻度の増加と相関した。重要な結果を図４４、図４５および図４６に示す。
【０７１４】
再チャレンジ
原発腫瘍に対する抗腫瘍免疫記憶応答の発生を評価するために、処置後の腫瘍のないマウスに、一次注射とは反対側の側腹部にＰａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞を再チャレンジした。１１週齢のＢ６－ｈｕＣＥＡマウスと、再チャレンジマウス（３３週齢）と年齢が一致するＢ６－ｈｕＣＥＡマウスとの、２つの非処置対照群に接種した。再チャレンジは、最初の腫瘍細胞注射後１４０日目に行った。
【０７１５】
５匹の処置（腫瘍のない）マウス（３１週齢～３２週齢）および５匹の対照マウス（１１週齢）の再チャレンジのために、腫瘍移植片を、０．５×10^5個の細胞（継代１８）の左側腹部へのＳＣ注射によって樹立した。その後の時点で、５匹の年齢一致（３３週齢）非処置対照マウスに、０．５×10^5個の細胞（継代２２）を左側腹部にＳＣ注射した。試験群および再チャレンジ／対照の時間経過を以下の表に示す。
【０７１６】
プロトコル１３６の試験群（再チャレンジ）

群	受けた処置	年齢 （週）	細胞株	細胞／マウス	n （マウス）
D*	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ×３＋ 抗ＣＤ４０×１＋ 抗ＰＤ－Ｌ１×３	３１－３２	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ	０．５×１０^{6}	４＋１**
Ｋ	非処置対照	１１	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ	０．５×１０^{6}	５
Ｌ	非処置の年齢一致対照	３３	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ	０．５×１０^{6}	５

＊プロトコル１３６からの群指定を保持、＊＊群Ｄのマウスと同様に処置したが、主要有効性試験には含めなかった追加のマウス。

【０７１７】

プロトコル１３６の時間経過（再チャレンジ）

試験日	日付	実験手順
１４０	２０１８－０６－０１	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞の調製およびシリンジの充填
１４０	２０１８－０６－０１	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞のＳＣ注射（D群*およびK群）
１７２	２０１８－０７－０３	安楽死および組織採取（D群*およびK群）
－	２０１８－１２－０４	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞の調製およびシリンジの充填
－	２０１８－１２－０４	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ細胞のＳＣ注射（Ｌ群）
－	２０１９－０１－０３	安楽死（Ｌ群）

【０７１８】

終了時のフローサイトメトリー分析のために、血液、脾臓、およびＤＬＮをＤ群およびＫ群から回収した。Ｔ細胞の特徴付けを血液、脾臓およびＤＬＮで行い、ｅｘ ｖｉｖｏ ＰＭＡ／イオノマイシン再刺激アッセイを脾臓で行った。

【０７１９】

再チャレンジの結果

再チャレンジマウスおよびナイーブマウスにおける腫瘍成長を図４７に示す。全ての非処置マウス（５／５＋５／５）が腫瘍を発症したが、成長速度は年齢一致対照マウスでより遅かった。再チャレンジマウスのうち、４／５が、２回目の接種の３２日後（最初の接種の１７２日後）である実験の終了まで腫瘍がないままであり、１／５が、再チャレンジの２８日後に成長を開始した腫瘍を有していた。２回目の接種後２４日目（最初の接種の１６４日後）に、ＢＷの突然の低下のため、１匹の腫瘍のない再チャレンジマウスを安楽死させた。

【０７２０】

再チャレンジマウスおよびナイーブ（年齢一致ではない）マウスからの試料のＦＡＣＳ分析により、対照と比較して再チャレンジ群の血液および脾臓におけるＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の集団の増加が明らかになった。他の所見には、ｅｘ ｖｉｖｏ ＰＭＡ／イオノマイシン刺激時にインターロイキン－２（ＩＬ－２）を産生する脾臓におけるＣＤ４＋エフェクター記憶細胞集団（ＣＤ４４＋）の増加、ならびにｅｘ ｖｉｖｏ ＰＭＡ／イオノマイシン刺激時にＩＬ－２およびインターフェロンガンマ（ＩＦＮγ）を産生するＤＬＮにおけるＣＤ４＋エフェクター記憶細胞集団（ＣＤ４４＋）の増加が含まれた。重要な結果を図４８に示す。

【０７２１】

有害事象および毒性

全ての治療群における平均ＢＷ推移を図４９に示す。抗ＣＤ４０の投与は、注射マウスにおいて予想される急性体重減少を誘発し、これは注射後１週間以内に回復した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射は、放射線照射マウスにおいて一過性の体重減少を引き起こし、これは抗ＣＤ４０による体重減少よりも軽度であった。注射後の急性ＢＷ減少のためにマウスを安楽死させることはなかった。１匹の腫瘍のないＣＥＡ－ＰＲＩＴマウスを、全体的な状態の突然の低下後、１１７日目に安楽死させた。

【０７２２】

全群から、合計２匹のマウスを、腫瘍状態の低下（悪化のリスクを伴う開放腫瘍）のために安楽死させた。さらなる１匹のマウスを、全体的な状態の低下と組み合わせて、腫瘍の悪化のために安楽死させた。試験の主要パートおよび再チャレンジパートにおける全ての有害事象を以下の表に記載する。

【０７２３】

プロトコル１３６および１３６ｂの有害事象

群	屠殺したマウス（ｎ／群）	試験日	終了の理由
Ａ：ビヒクル	１（９）	４８	腫瘍／全体的な状態の低下
Ｃ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	２（９）	４４、４６	腫瘍状態の低下
Ｃ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	１（９）	１１７	ＢＷ減少≧２０％
Ｄ*：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	１（５）	１６４	ＢＷ減少≧２０％

^{212}Ｐｂ照射（２０μＣｉ）を試験１８、３２、および４６日目に行った。免疫療法を試験１９日目（抗ＣＤ－４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）、３３日目（抗ＰＤ－Ｌ１）、および４７日目（抗ＰＤ－Ｌ１）に投与した。

＊１４０日目に再チャレンジした。

【０７２４】

結論

ＣＥＡ－ＰＲＩＴとＣＩＴ（抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）との組合せは、対照マウスおよび免疫療法単独で処置したマウスと比較して、生存の有意な改善をもたらした。併用処置は、いくつかの腫瘍のないマウスをもたらし、免疫ＰＤおよび再チャレンジマウスにおける腫瘍発達の減少によって実証された免疫記憶の強い徴候をもたらした。

【０７２５】

実施例９ｄ：プロトコル１５０

プロトコル１５０の目的は、免疫担当トランスジェニックマウスにおけるＳＣ　ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ腫瘍の処置のための、単独およびＣＩＴと組み合わせたＣＥＡ－ＰＲＩＴの３サイクル後の有効性を評価することであった。

【０７２６】

ＰＲＩＴレジメンを、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）ＢｓＡｂ（２００μＬ中１００μｇ）のＩＰ注射と、それに続く７日後のＣａ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ＣＡ（２００μＬ中２５μｇ）のＩＰ投与と、それに続く２４時間後のエフェクター分子^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２０μＣｉ）のＩＰ投与とを含む３反復サイクルで投与した。

【０７２７】

免疫療法処置は、抗ＣＤ４０抗体の１回投与、または抗ＣＤ４０抗体の１回投与とそれに続く抗ＰＤ－Ｌ１抗体の複数回注射（２００μＬ中２００μｇの各抗体）からなり、放射能注射の２４時間後にＩＰ投与した。第２のサイクル後の免疫ＰＤ効果のフローサイトメトリー分析のために　　殺したマウスに加えて、第１の処置サイクル中の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ標的化およびクリアランスを確認するために、スカウトマウスを体内分布評価の

ために採取した。ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せ、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ単独、免疫療法単独、および処置なしの間で比較を行った。処置有効性を、ＴＧＩ、生存、および免疫記憶に関して評価した。

【０７２８】

試験概要を図５０に示す。

【０７２９】

プロトコル１５０の時間経過およびデザインを以下の表に示す。

【０７３０】

プロトコル１５０の時間経過

試験日	日付	実験手順
０	２０１８－０９－０５	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ細胞の調製およびシリンジの充填
０	２０１８－０９－０５	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ細胞のＳＣ注射
１３	２０１８－０９－１８	ＢｓＡｂのＩＰ注射
２０	２０１８－０９－２５	ＣＡのＩＰ注射
２１	２０１８－０９－２６	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２１	２０１８－０９－２６	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
２２	２０１８－０９－２７	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント
２２	２０１８－０９－２７	抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
２３	２０１８－０９－２８	舌下出血
２７	２０１８－１０－０２	ＢｓＡｂのＩＰ注射
３３	２０１８－１０－０８	ＣＡのＩＰ注射
３３	２０１８－１０－０８	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
３４	２０１８－１０－０９	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
３５	２０１８－１０－１０	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
３６	２０１８－１０－１１	舌下出血
３６	２０１８－１０－１１	免疫ＰＤ（ＦＡＣＳ）のための安楽死および組織採取
４１	２０１８－１０－１６	ＢｓＡｂのＩＰ注射
４８	２０１８－１０－２３	ＣＡのＩＰ注射
４８	２０１８－１０－２３	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
４９	２０１８－１０－２４	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
５０	２０１８－１０－２５	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
５１	２０１８－１０－２６	後眼窩出血

【０７３１】

プロトコル１５０の試験群

群	ＢｓＡｂ	ＢｓＡｂ（μｇ）	ＣＡ（μｇ）	^{212}Ｐｂ（μＣｉ）	抗ＣＤ４０* （μｇ）	抗ＰＤ－Ｌ１（μｇ）	サイクル	ｎ（マウス）
Ａ	－	０	０	０	０	０	３	９
Ｂ	－	０	０	０	２００	０	３	９
Ｃ	－	０	０	０	２００	２００	３	９
Ｄ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	３	９
Ｅ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	２００	２００	３	９
Ｆ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	１	４
Ｇ	ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ	１００	２５	２０	０	０	１	４
Ｈ	－	０	０	０	０	０	２	４
Ｉ	－	０	０	０	２００	０	２	４
Ｊ	－	０	０	０	２００	２００	２	４
Ｋ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	０	０	２	４
Ｌ	ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）	１００	２５	２０	２００	２００	２	４

＊抗ＣＤ４０を１回のみ、第１の処置サイクルで投与

【０７３２】

初代固形異種移植片を、ＤＭＥＭ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の０．５×１０^{6}個の細胞（継代１７）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウス（１０～１２週齢）において樹立した。腫瘍細胞注射の１２日後、マウスを平均腫瘍体積１０３ｍｍ^{3}の実験群に分類した。ＣＡを１週間後に注射した。１９日目の平均腫瘍体積は、有効性群（Ａ～Ｅ）では２８４ｍｍ^{3}、体内分布スカウト群（Ｆ、Ｇ）では３０３ｍｍ^{3}、および免疫ＰＤスカウト群（Ｈ～Ｌ）では２６２ｍｍ^{3}であった。

【０７３３】

Ａ～Ｅ群のマウスを、試験の最後まで、または終了基準の１つまたはいくつかに達するまで、治療有効性を評価するために追跡した。免疫療法の投与の２４時間後にＢ群、Ｃ群およびＥ群のマウスから血液を採取して、ＥＬＩＳＡによる血清画分の分析によって抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１注射を検証した。血清もまた、後眼窩採血による安楽死の前に全てのマウスから単離し、次いで凍結し、－２０℃で保存した。組織学的処理および分析のために以下の組織を回収し、直ちに１０％ＮＢＦに２４時間入れた後、１×ＰＢＳ溶液に移した：血清、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、および腫瘍。

【０７３４】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の２４時間後に、Ｆ群およびＧ群のマウスを　　殺および剖検し、腫瘍取込みおよび正常組織からのクリアランスを確認した。以下の器官および組織を採取し、放射能について測定した：血液、皮膚、膀胱、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、筋肉、尾、および腫瘍。

【０７３５】

Ｈ～Ｌ群は、異なる区画からのＴ細胞およびＤＣの機能および表現型の特徴付けによって抗腫瘍Ｔ細胞およびＤＣ応答の生成を評価するために、２回目の抗ＰＤ－Ｌ１注射の２４時間後に、後眼窩出血後に　　殺および剖検した免疫ＰＤスカウトマウスを含んでいた。全ての免疫ＰＤマウスから、腫瘍、脾臓、およびＤＬＮ（腫瘍側から）を採取した。

【０７３６】

Ｔ細胞記憶を評価するために、脾臓試料に対して、ｅｘ　ｖｉｖｏ　ＰＭＡ／イオノマイシン（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ、カタログ番号００－４９７０－０３、００－４９

８０－０３）再刺激アッセイを実施した。また、ＭＡＣＳＱｕａｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ）を用いてＦＡＣＳを行い、ＦｌｏｗＪｏ １０．５．３ソフトウェアを用いて結果の解析を行った。染色パネルデザインを以下の表に示す。

【０７３７】

プロトコル１５０のためのＦＡＣＳパネルデザイン

T細胞	DC	Ｔｒｅｇ	PMA／イオノマイシン	分化
マーカー	マーカー	マーカー	マーカー	マーカー
生存／死亡	生存／死亡	生存／死亡	生存／死亡	生存／死亡
ＣＤ４５	ＣＤ４５	ＣＤ４５	ＣＤ４５	ＣＤ４５
ＣＤ３	ネガティブ選択（ＣＤ１９、Ｇｒ１、Ｆ４／８０）	ＣＤ３	ＣＤ３	ＣＤ３
ＣＤ４	ＣＤ１１ｃ	ＣＤ４	ＣＤ４	ＣＤ４
ＣＤ８ａ	ＭＨＣクラスＩＩ	ＣＤ８	ＣＤ８	ＣＤ８ａ
４１ＢＢ	ＣＤ８６	ＣＤ２５	ＣＤ４４	ＣＤ６２Ｌ
Ｌａｇ３	ＣＤ１１ｂ	ＣＤ１１ｂ	ＩＦＮγ	ＣＤ１２７
ＰＤ－１	ＣＤ３１７	ＦｏｘＰ３	ＩＬ－２	ＣＤ４４

ＩＦＮγ＝インターフェロンガンマ、ＩＬ－２＝インターロイキン－２、ＭＣＨ＝主要組織適合遺伝子複合体、ＰＭＡ＝ホルボール１２－ミリステート－１３－アセテート、Ｔｒｅｇ＝制御性Ｔ細胞

【０７３８】

結果

体内分布およびＥＬＩＳＡ

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射（サイクル１）２４時間後の全ての回収組織における平均^{212}Ｐｂ蓄積およびクリアランスを図５１に示す。腫瘍取込みは特異的であり、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ミュー）による事前標的化後の腫瘍では、回収した全ての正常組織の＜２．０％ＩＤ／ｇと比較して１６．９％ＩＤ／ｇであった。ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭを使用すると、得られた腫瘍蓄積は１．８％ＩＤ／ｇであった。

【０７３９】

免疫療法投与の２４時間後の抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１抗体の血清濃度を図５２に示す。

【０７４０】

腫瘍発達および生存

ＣＥＡ－ＰＲＩＴ処置および対照処置後の平均ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ腫瘍発達を図５３に示し、全ての処置群の個々の腫瘍成長曲線を図５４に示す。全ての処置群を平均に基づいて分析することができた最終日である４２日目に、ＴＧＩは、ビヒクル対照と比較して、抗ＣＤ４０、抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、およびＣＥＡ－ＰＲＩＴと抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１との組合せについてそれぞれ５７．８％、５４．５％、８２．８％および９９．６％であった。主要試験は細胞注射後１０３日目に終了し、その時点で、抗ＣＤ４０群では２／９のマウスが生存しており、腫瘍がなかった（または微小腫瘍を有していた）。対応する数は、抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１群およびＣＥＡ－ＰＲＩＴ群においてそれぞれ２／９および１／９であった。ＣＥＡ－ＰＲＩＴと抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ

－Ｌ１との組合せにより、対応する数の７／９のマウスが得られた。

【０７４１】

全生存を、腫瘍体積≧３０００ｍｍ^{3}の終了基準に基づいて図５５に示す。個々の処置群についての事象までの時間（３０００ｍｍ^{3}を超える腫瘍体積）を以下の表に示し、９５％信頼限界の上限および下限を伴う生存期間中央値を、四分位生存期間（２５％および７５％）と一緒に示す。

【０７４２】

事象までの時間＊の統計量を伴う分位点（日）

群	期間中央値	９５％下限	９５％上限	２５％失敗	７５％失敗
ビヒクル	３９	３３	４１	３５	４１
抗ＣＤ４０	４３	３６	－	３９	７０
抗ＣＤ４０＋ＰＤ－Ｌ１	５１	３７	－	４３	－
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	８３	４４	－	７７	－
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	－	６１	－	－	－

＊事象＝腫瘍体積≧３０００ｍｍ^3。

【０７４３】

ペアワイズ検定を実施して、どちらの群が生存に関して有意に異なっていたかを特定した：ログランク検定（後の生存事象に対するより大きな重み）およびウィルコクソン検定（初期生存期間に対するより大きな重み）、両方とも多重検定のためのボンフェローニ補正を使用した。結果を以下の表に示す。後の生存期間をみると、抗ＣＤ４０単独を除く全ての処置は、ビヒクル群と比較して生存を有意に増加させた。

【０７４４】

ペアワイズ・ログランク検定（多重検定水準＝０．００５）

群	ビヒクル	抗ＣＤ４０	抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１
ビヒクル	１．０００	０．０２１０	０．０００８＊	＜０．０００１＊	＜０．０００１＊
抗ＣＤ４０	０．０２１０	１．０００	０．６３４９	０．１３００	０．００７５
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．０００８＊	０．６３４９	１．０００	０．２７９２	０．０１６７
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	＜０．０００１＊	０．１３００	０．２７９２	１．０００	０．０９９２
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	＜０．０００１＊	０．００７５	０．０１６７	０．０９９２	１．０００

【０７４５】

ペアワイズ・ウィルコクソン検定（多重検定水準＝０．００５）

群	ビヒクル	抗ＣＤ４０	抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１
ビヒクル	１．０００	０．０４７０	０．００１９*	＜０．０００１*	＜０．０００１*
抗ＣＤ４０	０．０４７０	１．０００	０．４４２８	０．０２９７	０．００６３
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．００１９*	０．４４２８	１．０００	０．１０５２	０．０１２９
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	＜０．０００１*	０．０２９７	０．１０５２	１．０００	０．１５５
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	＜０．０００１*	０．００６３	０．０１２９	０．１５５	１．０００

【０７４６】

免疫薬力学

ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せは、プロトコル１３６（Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ）からの所見と一致して、リンパ節におけるｐＤＣ、活性化ｐＤＣ、およびｃＤＣ（ＣＤ８６表面発現の増加によって測定される）の増加と相関した。これを図５６に示す。

【０７４７】

再チャレンジ

原発腫瘍に対する抗腫瘍免疫記憶応答の発生を評価するために、処置後の腫瘍のないマウスに、一次注射とは反対側の側腹部にＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ細胞を再チャレンジした。対照として、非処置の年齢一致Ｂ６－ｈｕＣＥＡマウスを同時に注射した。

【０７４８】

プロトコル１５０の最初の開始後９８日目に、合計１２匹の処置（腫瘍のない）マウスを再チャレンジした：２匹は抗ＣＤ４０で処置し、２匹は抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１で処置し、１匹はＣＥＡ－ＰＲＩＴ単独で処置し、７匹はＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せで処置した。異種移植片を、0.5×10^{5}個の細胞（継代１７）を左側腹部にＳＣ注射することによって樹立した。試験群および再チャレンジ／対照の時間経過を以下の表に示す。

【０７４９】

プロトコル１５０の試験群（再チャレンジ）

群	受けた処置	年齢（週）	細胞株	細胞／マウス	n（マウス）
B*	抗ＣＤ４０×１	２４－２６	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ	0.5×10^{6}	２
C*	抗ＣＤ４０×１＋抗ＰＤ－Ｌ１×３	２４－２６	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ	0.5×10^{6}	２
D*	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ×３	２４－２６	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ	0.5×10^{6}	１
E*	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ×３＋抗ＣＤ４０×１＋抗ＰＤ－Ｌ１×３	２４－２６	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ	0.5×10^{6}	７
M	非処置の年齢一致対照	２４－２６	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ	0.5×10^{6}	５

*プロトコル１５０からの群指定を保持

【０７５０】

プロトコル１５０の時間経過（再チャレンジ）

試験日	日付	実験手順
９８	２０１８－１２－１２	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ細胞の調製およびシリンジの充填
９８	２０１８－１２－１２	ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡ細胞のＳＣ注射（Ｂ群*、Ｃ群*、Ｄ群*、Ｅ群*およびM群）
１２５	２０１９－０１－０８	免疫ＰＤ（ＦＡＣＳ）のための安楽死および組織採取（Ｂ群*、Ｃ群*、およびM群）
１２７	２０１９－０１－１０	免疫ＰＤ（ＦＡＣＳ）のための安楽死および組織採取（Ｄ群*およびＥ群*）

【０７５１】
終了時のフローサイトメトリー分析のために、血液、脾臓、およびＤＬＮを全てのマウスから回収した。Ｔ細胞の特徴付けを血液およびＤＬＮで行い、ｅｘ　ｖｉｖｏ　ＰＭＡ／イオノマイシン再刺激アッセイを脾臓およびＤＬＮで行った。
【０７５２】
再チャレンジの結果
再チャレンジマウスおよびナイーブマウスにおける腫瘍成長を図５７に示す。ナイーブ対照マウスのうち、３／５のみが腫瘍を発症した（このｉｎ　ｖｉｖｏモデルにおける公知の変動性）。再チャレンジマウスのうち、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ群の１匹のマウスのみが、２回目の接種の２８日後に実験を終了したときに１００mm^3を超えた体積の腫瘍を有していた。他の全ての再チャレンジマウスは、本質的に腫瘍がないままであった。
【０７５３】
再チャレンジマウスおよびナイーブマウスからの試料のＦＡＣＳ分析により、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せで処置したマウスのＤＬＮにおけるＣＤ４４＋／ＩＬ－２およびＣＤ４４＋／ＩＦＮγＣＤ４＋細胞の増加が明らかにされ、図５８に示すプロトコル１３６（Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ）からの所見と一致して、エフェクター記憶Ｔ細胞応答の生成が示された。
【０７５４】
有害事象および毒性
全ての治療群における平均ＢＷ推移を図５９に示す。抗ＣＤ４０の投与は、注射マウスにおいて予想される急性体重減少を誘発し、これは注射後１週間以内に回復した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射は、放射線照射マウスにおいて一過性の体重減少を引き起こし、これは抗ＣＤ４０による体重減少よりも軽度であった。注射後の急性ＢＷ減少のためにマウスを安楽死させることはなかった。
【０７５５】
第３のサイクルの抗ＰＤ－Ｌ１を単独でまたはＣＥＡ－ＰＲＩＴの後で受けた全ての動物（１４／１４）は、Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルでは以前にはみられなかった（プロトコル１１９および１３６）注射後数分以内に強い反応を示した。反応には、１／１４のマウスにおける緩慢行動、傾眠、および死亡が含まれた。抗ＰＤ－Ｌ１注射のおよそ１５～４０分後に回復。注射後２０～３０分で単一の死亡が生じた。
【０７５６】
全ての群から、ＰＲＩＴ群の１匹のマウスを、腫瘍状態の低下（悪化のリスクを伴う開放腫瘍）のために安楽死させた。ＰＲＩＴ群の別のマウスは、尾の問題のために試験から除外され、さらなるＩＶ注射が妨げられた。全ての有害事象を以下の表に記載する。
【０７５７】
プロトコル１５０の有害事象

群	影響を受けたマウス（ｎ／群）	試験日	観察
Ｃ：抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	５（５）	５０	３回目の抗ＰＤ－Ｌ１注射後の傾眠、嗜眠、死亡（マウス１匹）
Ｄ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	１（９）	４４	腫瘍状態の低下→安楽死
Ｄ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	１（９）	４９	尾の損傷→安楽死
Ｅ：ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	９（９）	５０	３回目の抗ＰＤ－Ｌ１注射後の傾眠、嗜眠

^{212}Ｐｂ照射（２０μＣｉ）を試験２１、３４、および４９日目に行った。免疫療法を試験２２日目（抗ＣＤ－４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）、３５日目（抗ＰＤ－Ｌ１）、および５０日目（抗ＰＤ－Ｌ１）に投与した。

【０７５８】

結論

Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃと比較して、免疫療法単独はＭＣ３８－ｈｕＣＥＡモデルにおいてより効率的であった。どちらの単独療法（免疫療法またはＣＥＡ－ＰＲＩＴ）も多数の腫瘍のないマウスをもたらしたが、抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１を放射線処置と組み合わせることによる腫瘍制御の点で明らかな利点があった。

【０７５９】

再チャレンジ実験の結果は、ＭＣ３８－ｈｕＣＥＡのより可変的な腫瘍取り込みのため、Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃ等価物と比較して解釈がより困難であった。さらに、単独療法処置群からの低い試料数が、ＣＥＡ－ＰＲＩＴ／免疫療法併用群とのその後の比較を解釈するのを困難にした。

【０７６０】

実施例９ｅ：プロトコル１９５

プロトコル１９５の目的は、免疫担当トランスジェニックマウスにおけるＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ腫瘍の処置のための、ＳｅＰａｒａｔｅｄ　ｖ－ｄｏｍａｉｎｓ　ＬＩｎｋａｇｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＳＰＬＩＴ）事前標的化抗体（「ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」）を単独でおよびＣＩＴと組み合わせて使用するＣＡ（除去剤）非依存性ＰＲＩＴ後の有効性を評価することであった。

【０７６１】

ＰＲＩＴ処置は、相補的ＳＰＬＩＴ　ＢｓＡｂ（合計２００μＬ中それぞれ１００μｇ）のＩＰ注射と、それに続く７日後のエフェクター分子^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２０μＣｉ）のＩＶ投与とを含んだ。

【０７６２】

免疫療法処置は、抗ＣＤ４０抗体の１回投与および抗ＰＤ－Ｌ１抗体の複数回注射（２００μＬ中２００μｇの各抗体）からなり、放射能注射の２４時間後にＩＰ投与した。スカウトマウスを体内分布評価のために採取して、ＰＲＩＴ処置後の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ標的化を確認した。ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せ、ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ単独、免疫療法単独、および処置なしの間で比較を行った。処置有効性を、ＴＧＩ、生存、および免疫記憶（再チャレンジ）に関して評価した。

【０７６３】

試験概要を図６０に示す。

【０７６４】

プロトコル１９５の時間経過およびデザインを以下の表に示す。

【０７６５】

プロトコル１９５の時間経過

試験日	実験手順
０	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ細胞の調製およびシリンジの充填
０	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ細胞のＳＣ注射
１４	スプリット抗体のＩＰ注射
２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの溶出およびシリンジの充填
２１	^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのＩＶ注射
２２	安楽死および組織採取（ｐ．ｉ．２４時間）＋ガンマカウント
２２	抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
２３	ＥＬＩＳＡのための顎下出血
３６	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
３７	ＥＬＩＳＡのための顎下出血
５０	抗ＰＤ－Ｌ１のＩＰ注射
５１	ＥＬＩＳＡのための顎下出血

【０７６６】

プロトコル１９５の試験群

群	Ｐ１ＡＤ８５９２（ＶＬ）（μｇ）	Ｐ１ＡＦ０１７１（ＶＨ－ＡＳＴ）（μｇ）	^{212}Ｐｂ（μＣｉ）	ＰＲＩＴサイクル	抗ＣＤ４０*（μｇ）	抗ＰＤ－Ｌ１（μｇ）	ＣＩＴサイクル	ｎ（マウス）
Ａ	０	０	０	０	０	０	０	１０
Ｂ	０	０	０	０	２００	２００	３	１０
Ｃ	１００	１４３	２０	１	０	０	０	１０
Ｄ	１００	１４３	２０	１	２００	２００	３	１０
Ｅ	１００	１４３	２０	１	０	０	０	３

*抗ＣＤ４０を１回のみ、第１のＣＩＴサイクルで投与

【０７６７】

初代固形異種移植片を、ＲＰＭＩ／Ｍａｔｒｉｇｅｌ中の０．５×１０^{6}個の細胞（継代２８）を右側腹部にＳＣ注射することによって、試験０日目に各ｈｕＣＥＡＣＡＭ５マウス（９～１２週齢）において樹立した。腫瘍細胞注射の１４日後、マウスを平均腫瘍体積１０２ｍｍ^{3}の実験群に分類した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを７日後に注射した。２０日目の平均腫瘍体積は、有効性群（Ａ～Ｄ）では１９６ｍｍ^{3}、および体内分布スカウト群（Ｅ）では１８７ｍｍ^{3}であった。

【０７６８】

Ａ～Ｄ群のマウスを、試験の最後まで、または終了基準の１つまたはいくつかに達するまで、治療有効性を評価するために追跡した。免疫療法の投与の２４時間後にＢ群およびＤ群のマウスから血液を採取して、ＥＬＩＳＡによる血清画分の分析によって抗ＣＤ４０および抗ＰＤ－Ｌ１注射を検証した。

【０７６９】

２１２Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射の２４時間後に、Ｅ群のマウスを　　殺および剖検し、腫瘍取込みおよび正常組織からのクリアランスを確認した。以下の器官および組織を採取し、放射能について測定した：血液、脾臓、胃、小腸、結腸、膵臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾、および腫瘍。

【０７７０】

結果

体内分布

２１２Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ注射２４時間後の全ての回収組織における平均２１２Ｐｂ蓄積およびクリアランスを図６１に示す。腫瘍取込みは特異的であり、ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ後の腫瘍では、回収した全ての正常組織の＜１．４％ＩＤ／ｇと比較して５．４％ＩＤ／ｇであった。

【０７７１】

腫瘍発達および生存

全ての処置群の平均Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ腫瘍発達を図６２に示し、個々の腫瘍成長曲線を図６３に示す。全ての処置群を平均に基づいて分析することができた最終日である４８日目に、ＴＧＩは、ビヒクル対照と比較して、抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１、ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ、およびＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴと抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１との組合せについてそれぞれ７８．９％、５８．６％および１００％であった。主要試験は細胞注射後９４日目に終了し、その時点で、抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１群およびＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１群では、それぞれ１０／１０および６／１０のマウスが生存しており、腫瘍がなかった（または微小腫瘍を有していた）。ビヒクル群およびＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ群には腫瘍のないマウスはいなかった。

【０７７２】

全生存を、腫瘍体積≧２０００ｍｍ^{3}の終了基準に基づいて図６４に示す。

【０７７３】

個々の処置群についての事象までの時間（２０００ｍｍ^{3}を超える腫瘍体積）を以下の表に示し、９５％信頼限界の上限および下限を伴う生存期間中央値を、四分位生存期間（２５％および７５％）と一緒に示す。

【０７７４】

事象までの時間＊の統計量（日）

群	ｎ	事象	中央値	９５％下限	９５％上限
ビヒクル	１０	１０	４５．５	４３	－
抗ＣＤ４０＋ＰＤ－Ｌ１	１０	７	６２	６１	－
ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	１０	９	５４．５	４６	－
ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	１０	４	－	７１	－

＊事象＝腫瘍体積≧２０００ｍｍ^3。

【０７７５】

ペアワイズ検定を実施して、どちらの群が生存に関して有意に異なっていたかを特定した：ログランク検定（後の生存事象に対するより大きな重み）およびウィルコクソン検定（初期生存期間に対するより大きな重み）、両方とも多重検定のためのボンフェローニ補正を使用した。結果を以下の２つの表に示す。後の生存期間をみると、抗ＣＤ４０単独を除く全ての処置は、ビヒクル群と比較して生存を有意に増加させた。

【０７７６】

ペアワイズ・ログランク検定（多重検定水準＝０．００５）

群	ビヒクル	抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１
ビヒクル	１．０００	０．０００３*	０．００１*	０*
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．０００３*	１．０００	０．０４５３	０．０２９１
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	０．００１*	０．０４５３	１．０００	０．０００４*
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．０００１*	０．０２９１	０．０００４*	１．０００

【０７７７】

ペアワイズ・ウィルコクソン検定（多重検定水準＝０．００５）

群	ビヒクル	抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１
ビヒクル	１．０００	０．００１９*	０．００３５*	０．０００１*
抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．００１９*	１．０００	０．０４６９	０．０３０１
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	０．００３５*	０．０４６９	１．０００	０．００１１*
ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	０．０００１*	０．０３０１	０．００１１*	１．０００

【０７７８】

再チャレンジ

原発腫瘍に対する抗腫瘍免疫記憶応答の発生を評価するために、処置後の腫瘍のないマウスに、一次注射とは反対側の側腹部にＰａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ細胞を再チャレンジした。対照として、非処置の年齢一致ｈｕＣＥＡＣＡＭ５マウスを同時に注射した。

【０７７９】

プロトコル１９５の最初の開始後９４日目に、合計６匹の処置（腫瘍のない）マウスを再チャレンジした。全て、ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ／免疫療法の組合せで処置した。異種移植片を、０．５×10^5個の細胞（継代３０）を左側腹部にＳＣ注射することによって樹立した。試験群および再チャレンジ／対照の時間経過を以下の２つの表に示す。再チャレンジの１３日後、群あたり３匹のマウスを免疫ＰＤ分析のために安楽死させ、試料を採取した（データは示さず）。したがって、群あたり３匹のマウスのみを試験終了まで追跡した。

【０７８０】

プロトコル１９５の試験群（再チャレンジ）

群	受けた処置	年齢（週）	細胞株	細胞／マウス	ｎ（マウス）
Ｄ*	ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ×１＋抗ＣＤ４０×１＋抗ＰＤ－Ｌ１×３	２２－２５	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ	０．５×10^6	６
Ｆ	非処置の年齢一致対照	２６－２７	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ	０．５×10^6	６

＊以前のプロトコル１９５からの群指定を保持

【０７８１】

プロトコル１９５の時間経過（再チャレンジ）

試験日	実験手順
９４	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ細胞の調製およびシリンジの充填
９４	Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－Ｆｌｕｃ細胞のＳＣ注射（一次注射とは反対側の側腹部）
１０７	免疫ＰＤ分析のための群あたり３匹のマウスの安楽死および組織採取（データは示さず）
１５７	試験の終了

【０７８２】

再チャレンジの結果

再チャレンジマウスおよびナイーブマウスにおける腫瘍成長を図６５および図６６に示す。ナイーブ対照マウスのうち、６／６が腫瘍を発症した。再チャレンジマウスのうち、６／６のマウスは本質的に腫瘍がないままであった。

【０７８３】

有害事象および毒性

全ての治療群における平均ＢＷ推移を図６７に示す。抗ＣＤ４０の投与は、注射マウスにおいて予想される急性体重減少を誘発し、これは注射後１週間以内に回復した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射は、それ自体では有意な体重減少を引き起こさなかった。注射後の急性ＢＷ減少のためにマウスを安楽死させることはなかった。

【０７８４】

抗ＰＤ－Ｌ１を単独でまたはＣＥＡ－ＰＲＩＴの後で複数回投与したマウスは、注射後およそ１０分以内に反応を示した。２回目および３回目の投与後、それぞれ約４０％および８０％であった。最初の抗ＰＤ－Ｌ１注射後に特異的反応はみられなかった。反応には、皮膚刺激、発赤、活動低下、攣縮、立毛、円背が含まれた。全てのマウスは、抗ＰＤ－Ｌ１注射の１～２時間後に回復した。

【０７８５】

全ての群から、２匹のマウスを、腫瘍状態の低下（悪化のリスクを伴う開放腫瘍）のために安楽死させた。さらに、抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１群の１匹のマウスは、理由は不明であるが、３回目の抗ＰＤ－Ｌ１注射の１日後に死亡したことが判明した。全ての有害事象を以下の表に記載する。

【０７８６】

プロトコル１９５の有害事象

群	影響を受けたマウス（ｎ／群）	試験日	観察
Ｂ：抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	１（１０）	４７	腫瘍状態の低下
Ｂ：抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	約４０～８０％	３６、５１	抗ＰＤ－Ｌ１の反復注射後の反応
Ｂ：抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	１（１０）	５１	マウスは死亡したことが判明した。明らかな理由なし
Ｂ：抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１		３６、５０	
Ｃ：ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ	１（１０）	６２	腫瘍状態の低下
Ｄ：ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴ＋抗ＣＤ４０＋抗ＰＤ－Ｌ１	約４０～８０％	３６、５１	抗ＰＤ－Ｌ１の反復注射後の反応

^{212}Ｐｂ照射（２０μＣｉ）を試験２１日目に行った。免疫療法を試験２２日目（抗ＣＤ－４０＋抗ＰＤ－Ｌ１）、３６日目（抗ＰＤ－Ｌ１）、および５０日目（抗ＰＤ－Ｌ１）に投与した。

【０７８７】

結論

【０７８８】

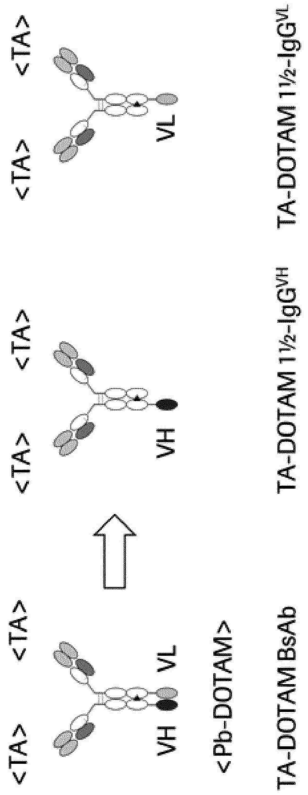
１サイクルの２段階ＳＰＬＩＴ　ＣＥＡ－ＰＲＩＴと３サイクルの免疫療法との組合せは、ＳＣ　Ｐａｎｃ０２－ｈｕＣＥＡ－ｌｕｃモデルにおいて免疫療法と組み合わせた３サイクルの３段階ＣＥＡ－ＰＲＩＴの全サイクルと同程度に効率的であり（プロトコル１３６を参照されたい）、６０％（６／１０）の治癒マウスをもたらした。免疫記憶の存在は、ナイーブ対照マウスの１００％と比較して、前処置再チャレンジマウスのいずれも腫瘍を発症しなかった再チャレンジ実験によって強く示された。

【０７８９】

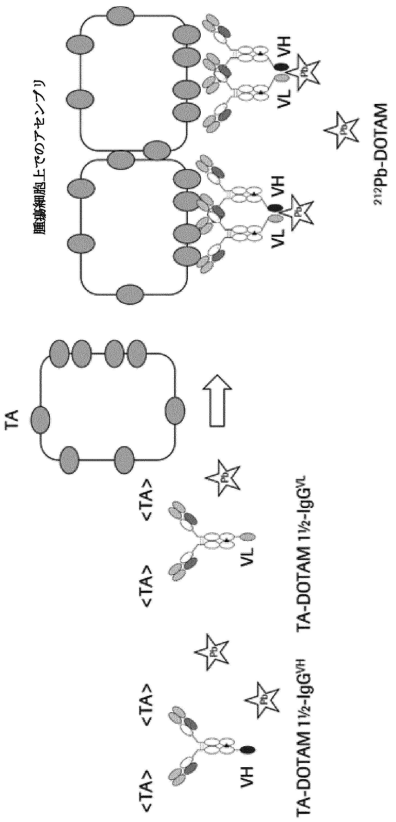
上述の発明を、理解を明確にする目的で、説明および実施例によって、ある程度詳細に説明してきたが、説明および実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に引用される全ての特許および科学文献の開示は、参照によりその全体が明示的に組み込まれる。

【図面】

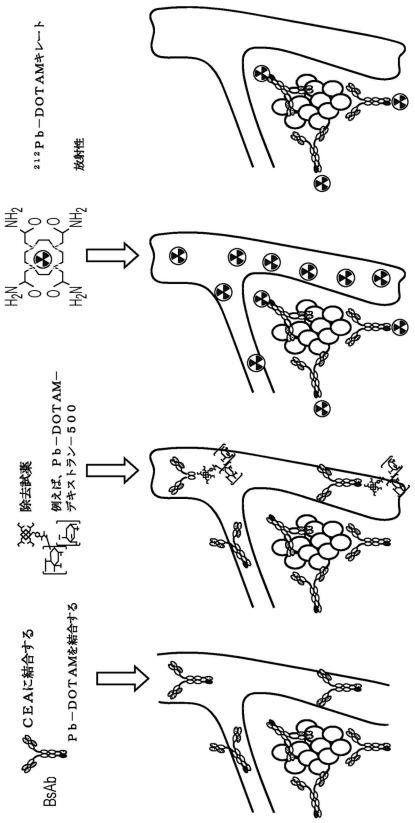
【図１】


<TA>
VL
VH
<Pb-DOTAM>
TA-DOTAM BsAb
TA-DOTAM 1½-IgG^VH
TA-DOTAM 1½-IgG^VL

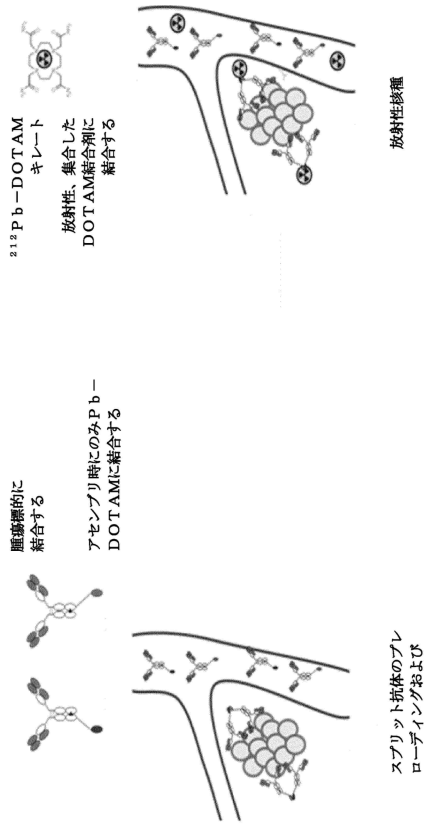
【図２】


腫瘍細胞上でのアセンブリ
TA
VH
VL
^{212}Pb-DOTAM
TA-DOTAM 1½-IgG^VH
TA-DOTAM 1½-IgG^VL

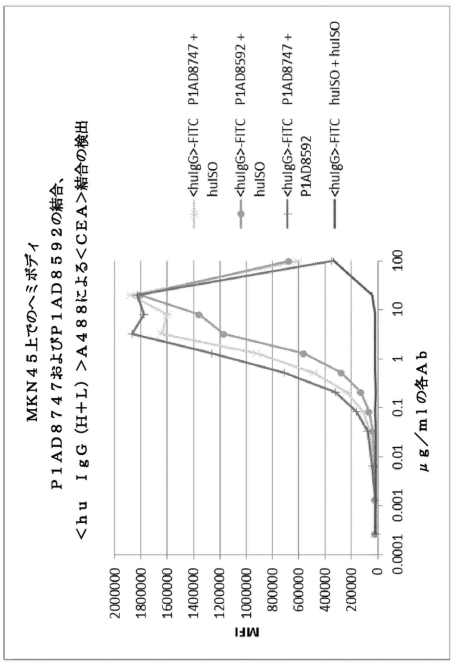
【図３】


CEAに結合する
BsAb
Pb−DOTAMを結合する
除去試薬
例えば、Pb−DOTAM−
デキストラン−500
放射性

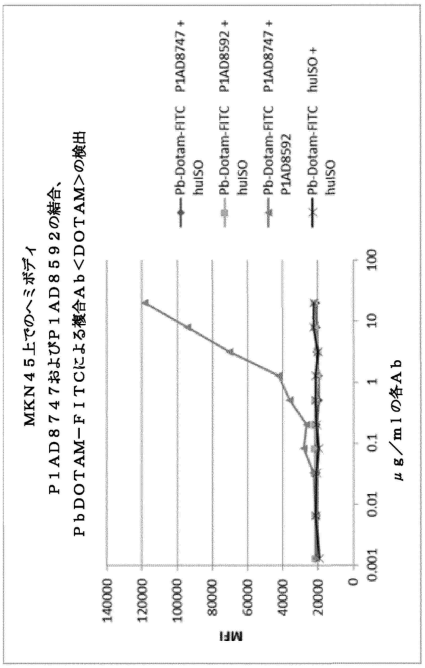
【図４】


腫瘍標的に
結合する
アセンブリ時にのみPb−
DOTAMに結合する
放射性、集合した
DOTAM結合剤に
結合する
放射性核種
スプリット抗体のプレ
ローディングおよび
再編成

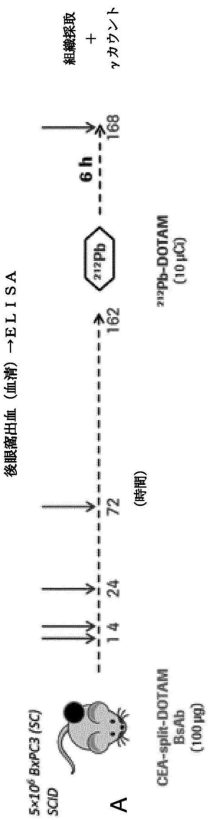
【図５】


MKN45上でのヘミボディ
P1AD8747およびP1AD8592の結合、
<hu IgG (H+L) >A488による<CEA>結合の検出
<huIgG>-FITC P1AD8747 + huISO
<huIgG>-FITC P1AD8592 + huISO
<huIgG>-FITC P1AD8747 + P1AD8592
<huIgG>-FITC huISO + huISO
MFI
μg/mlの各Ab

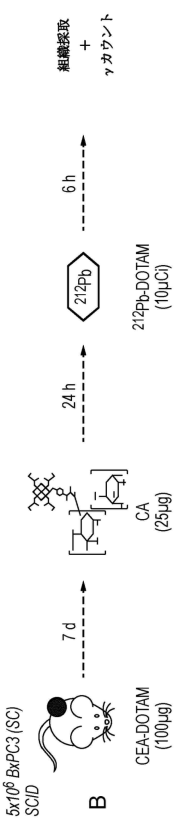
【図６】


MKN45上でのヘミボディ
P1AD8747およびP1AD8592の結合、
PbDOTAM−FITCによる複合Ab<DOTAM>の検出
Pb-Dotam-FITC P1AD8747 + huISO
Pb-Dotam-FITC P1AD8592 + huISO
Pb-Dotam-FITC P1AD8747 + P1AD8592
Pb-Dotam-FITC huISO + huISO
MFI
μg/mlの各Ab

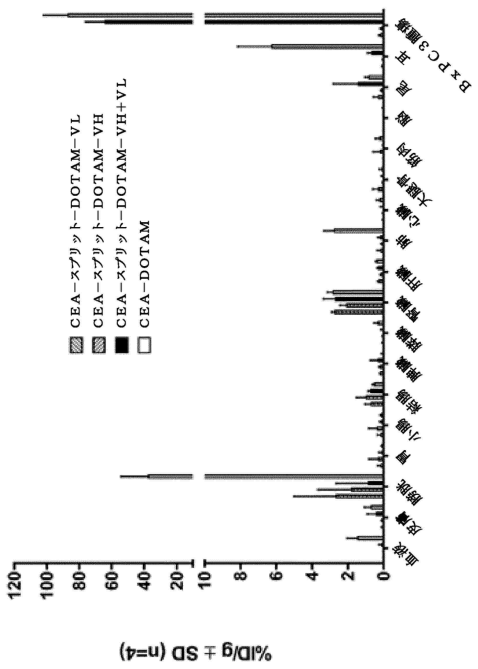
【図７Ａ】


後眼窩出血（血液）→ＥＬＩＳＡ
組織採取
＋
γカウント
6 h
168
162
72
24
14
(時間)
212Pb
212Pb-DOTAM
(10 μCi)
CEA-split-DOTAM
BsAb
(100 μg)
5×10⁶ BxPC3 (SC)
SCID
A

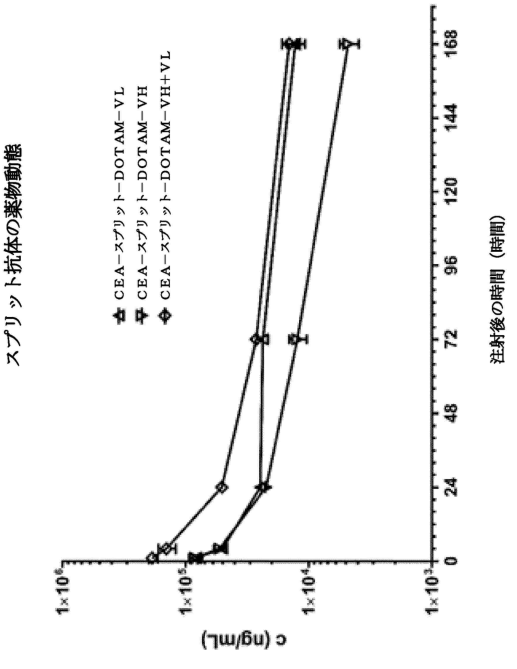
【図７Ｂ】


組織採取
＋
γカウント
6 h
212Pb
212Pb-DOTAM
(10μCi)
24 h
CA
(25μg)
7 d
CEA-DOTAM
(100μg)
5x10⁶ BxPC3 (SC)
SCID
B

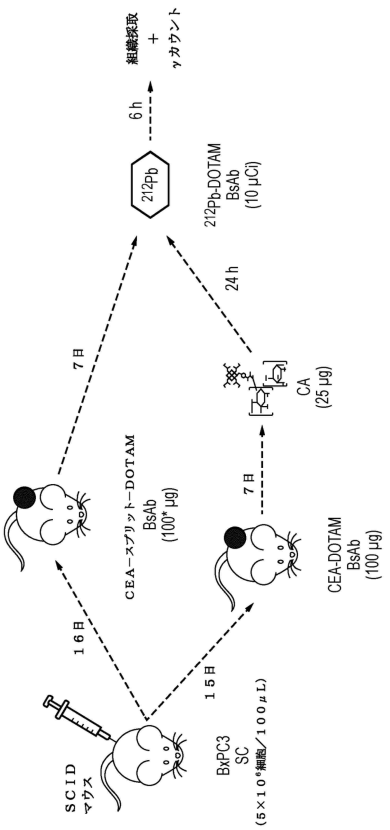
【図８】


CEA−スプリット−DOTAM−VL
CEA−スプリット−DOTAM−VH
CEA−スプリット−DOTAM−VH+VL
CEA−DOTAM
%ID/g ± SD (n=4)
BxPC3 腫瘍
牛
脾臓
大腸
小腸
胃
膵臓
肺臓
筋肉
脳
血液

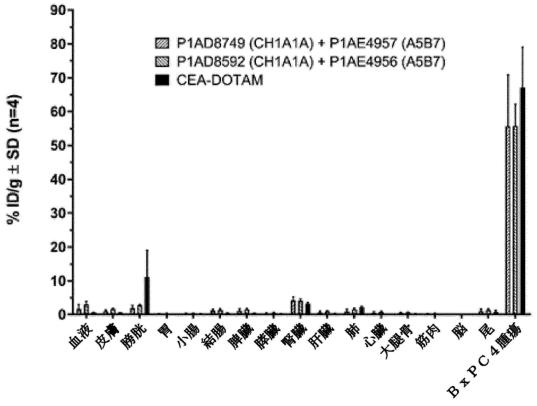
【図９】


スプリット抗体の薬物動態
CEA−スプリット−DOTAM−VL
CEA−スプリット−DOTAM−VH
CEA−スプリット−DOTAM−VH+VL
c (ng/mL)
注射後の時間（時間）
1×10⁶
1×10⁵
1×10⁴
1×10³
0
24
48
72
96
120
144
168

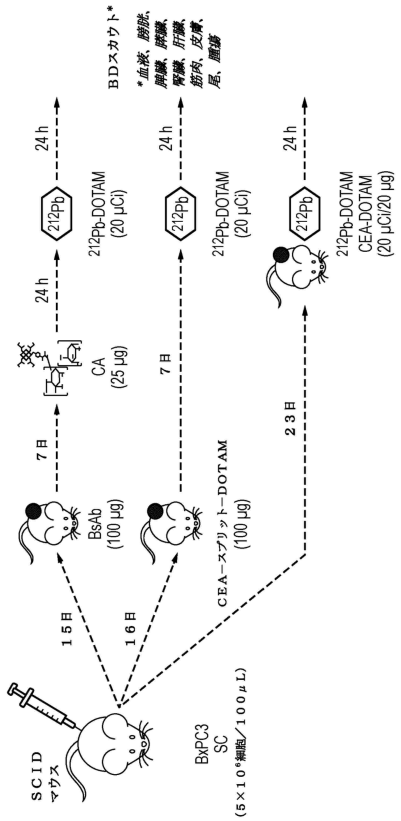
【図１０】



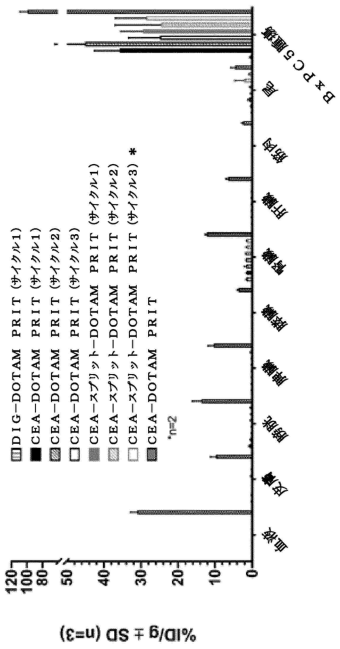
【図１１】



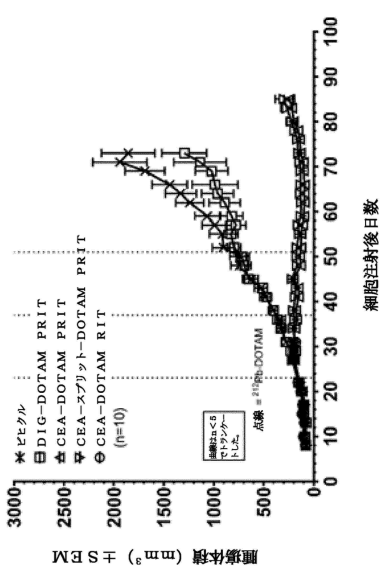
【図１２】



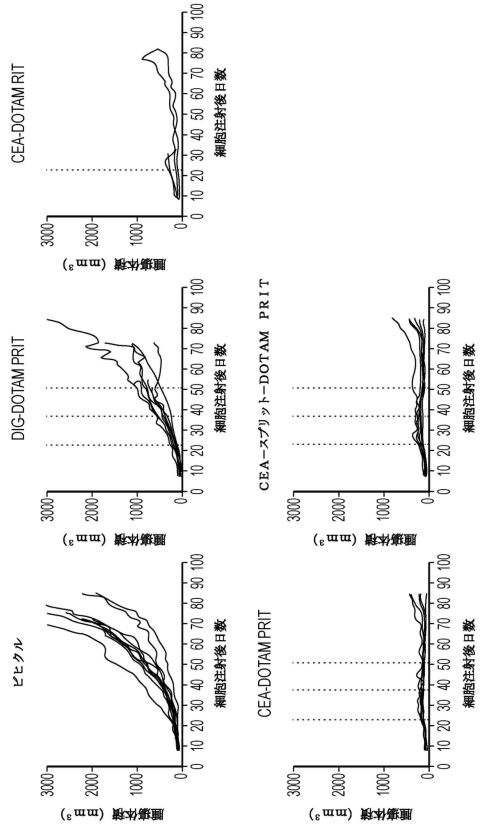
【図１３】



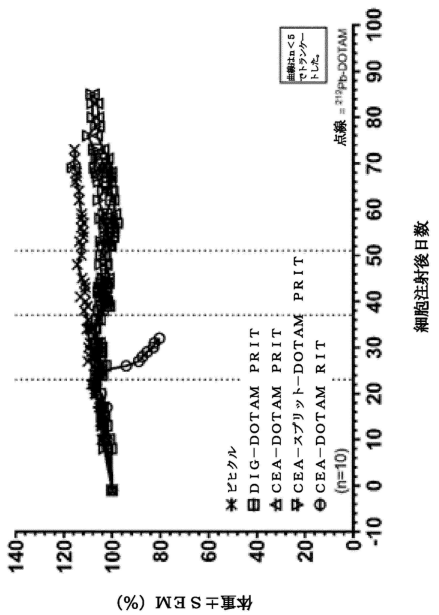
【図１４】



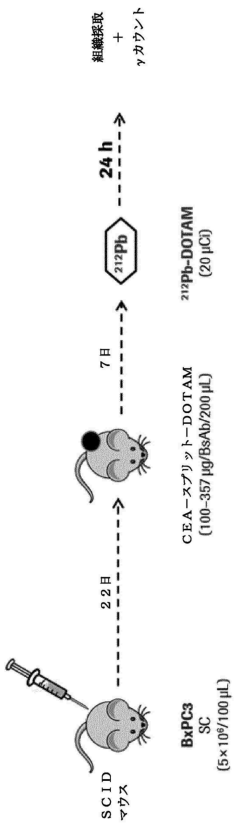
【図１５】



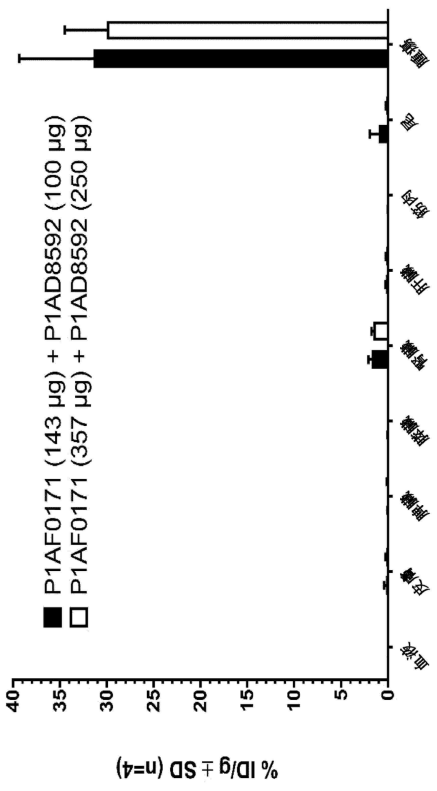
【図１６】



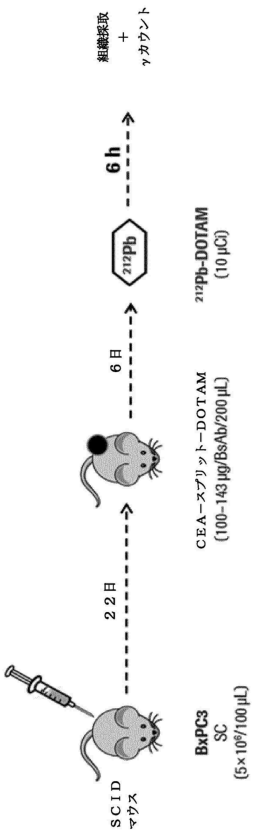
【図１７】



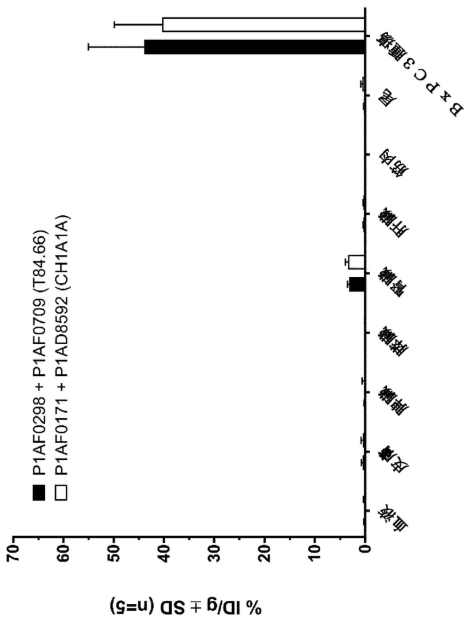
【図１８】



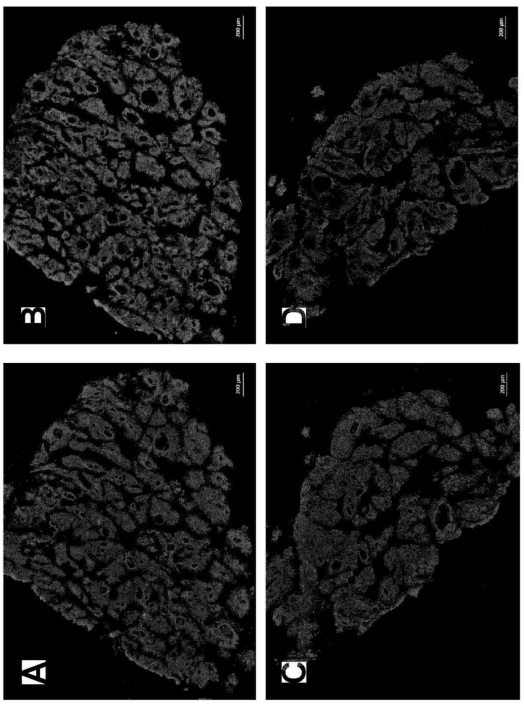
【図１９】



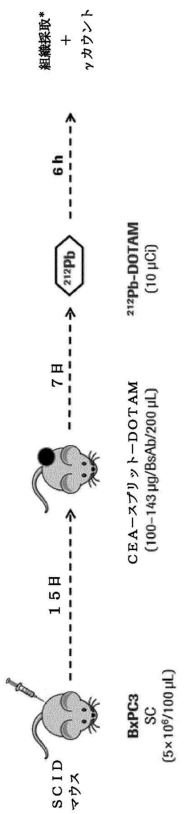
【図２０】



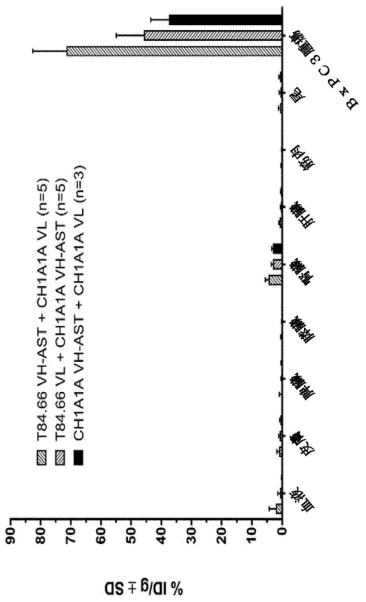
【図２１】



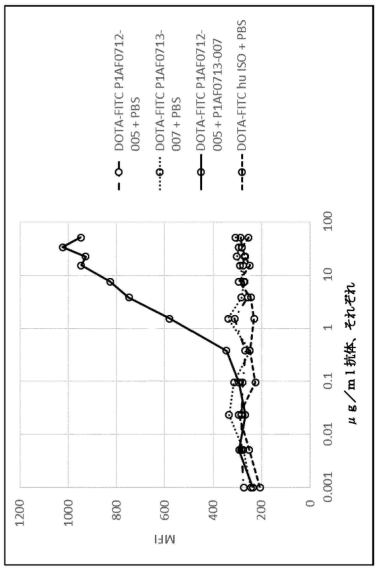
【図２２】



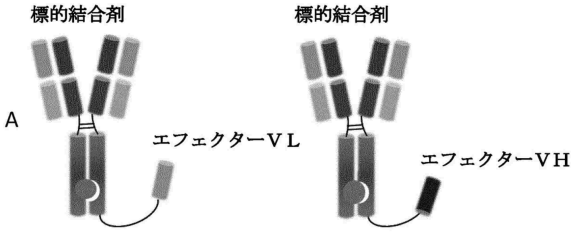
【図２３】



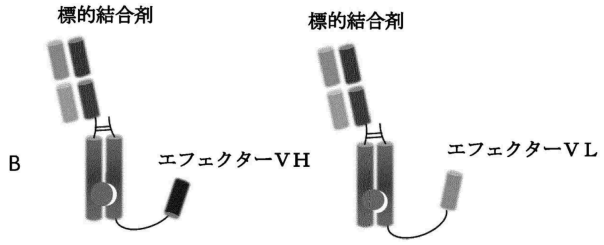
【図２４】



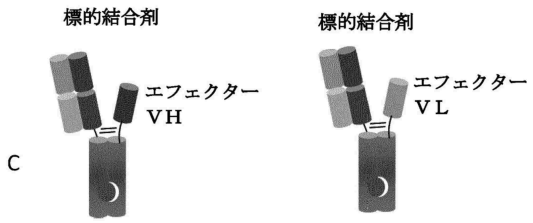
【図２５Ａ】



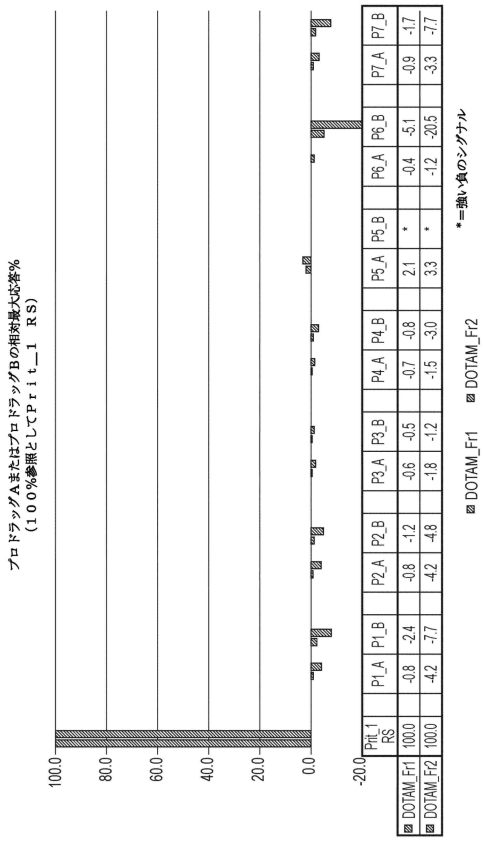
【図２５Ｂ】



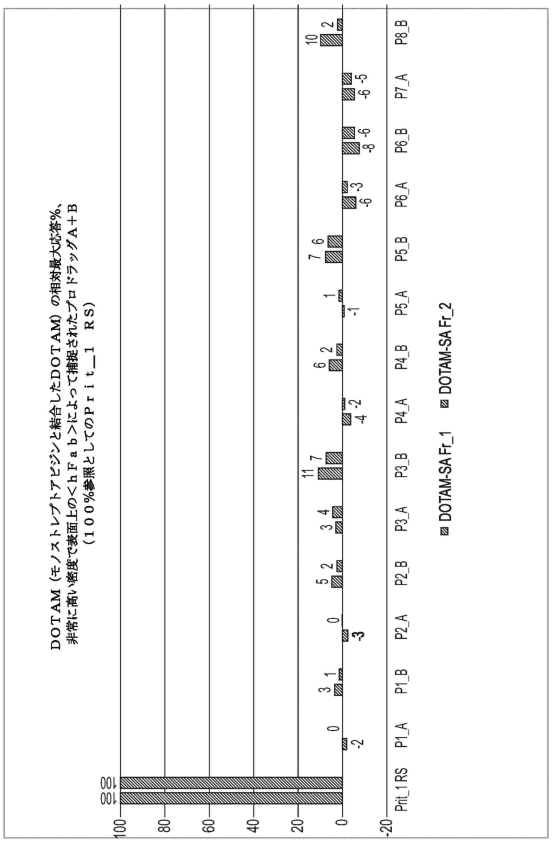
【図２５Ｃ】



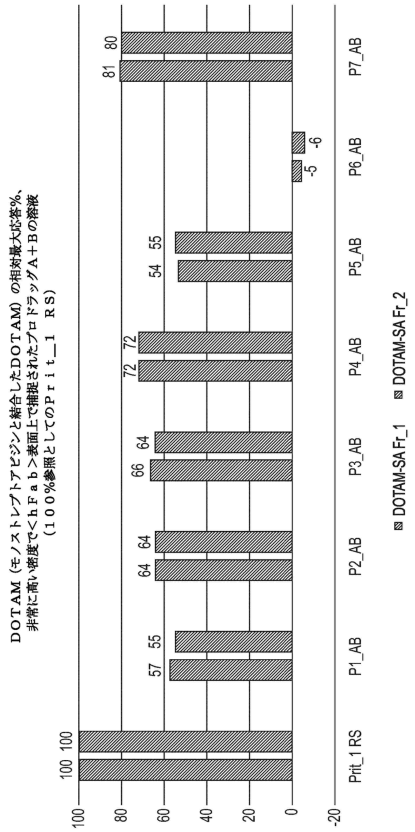
【図２６】



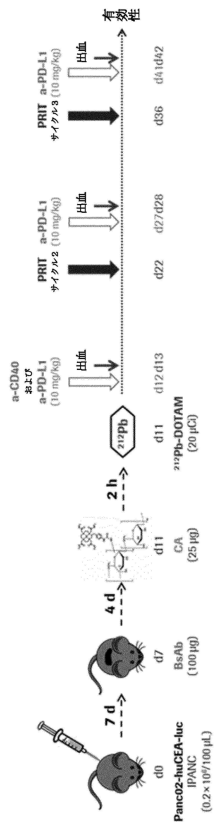
【図２７】



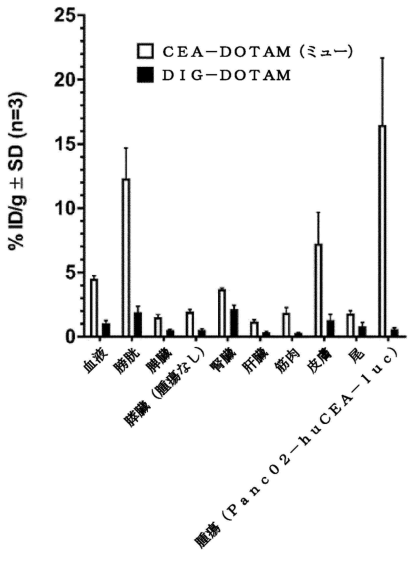
【図２８】



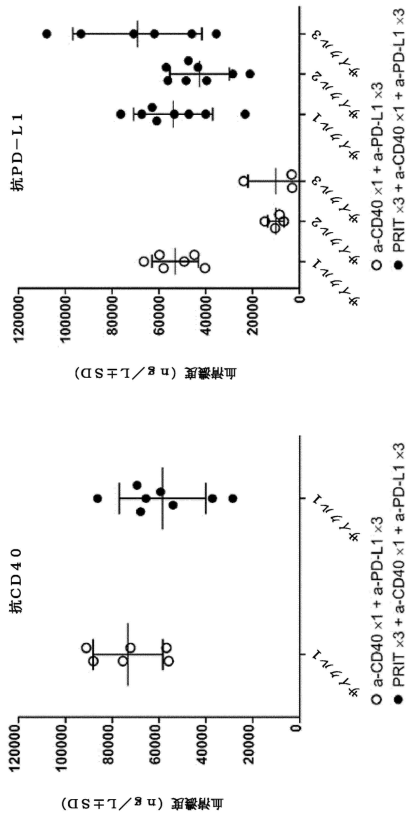
【図２９】



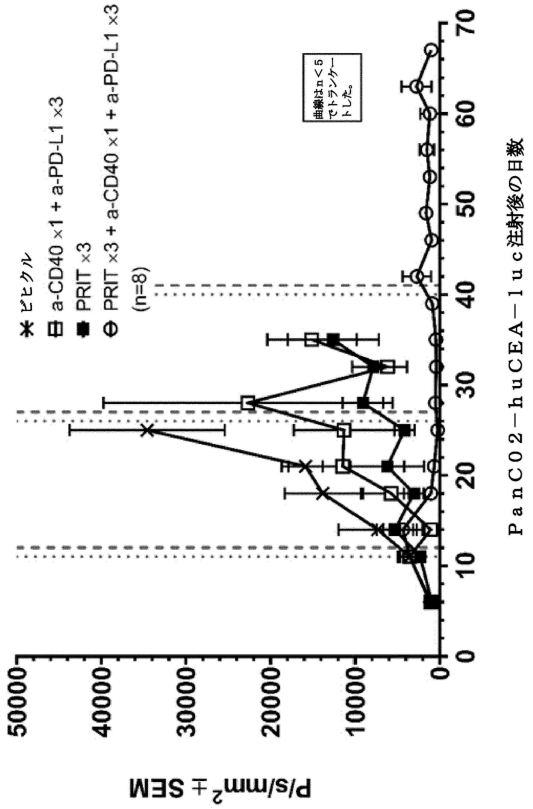
【図３０】



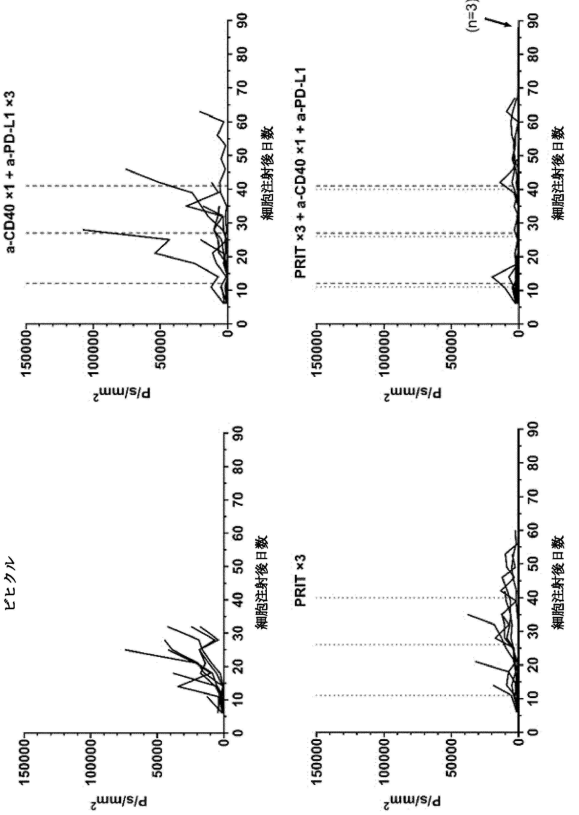
【図３１】



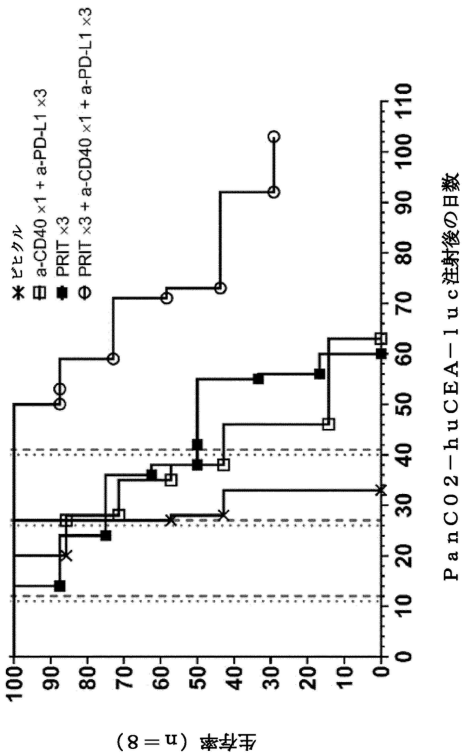
【図３２】



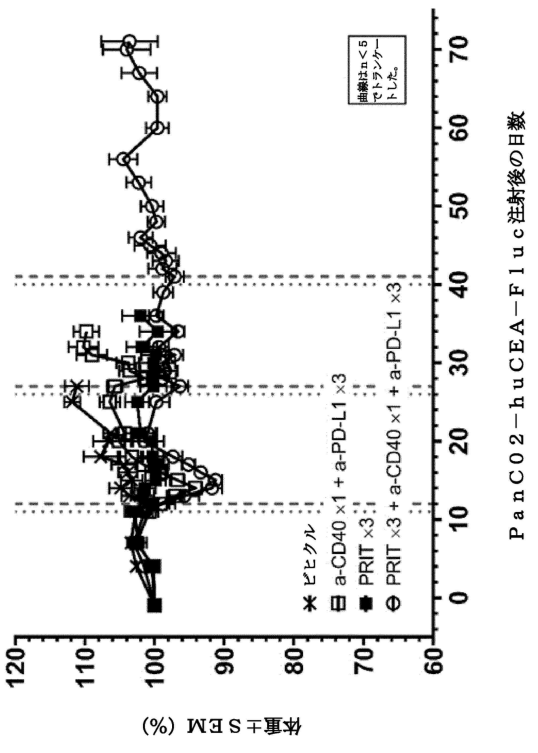
【図３３】



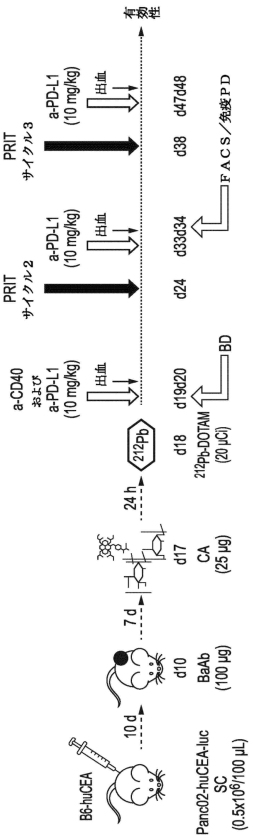
【図３４】



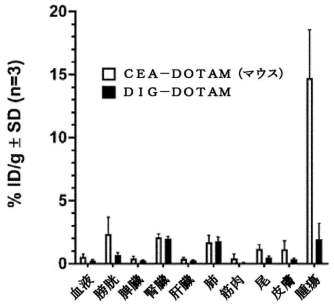
【図３５】



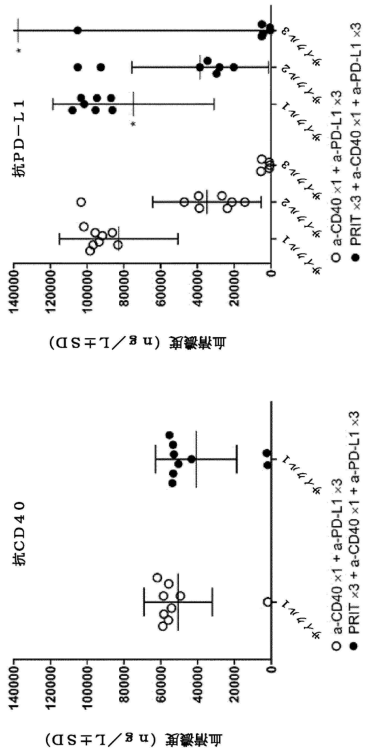
【図３６】



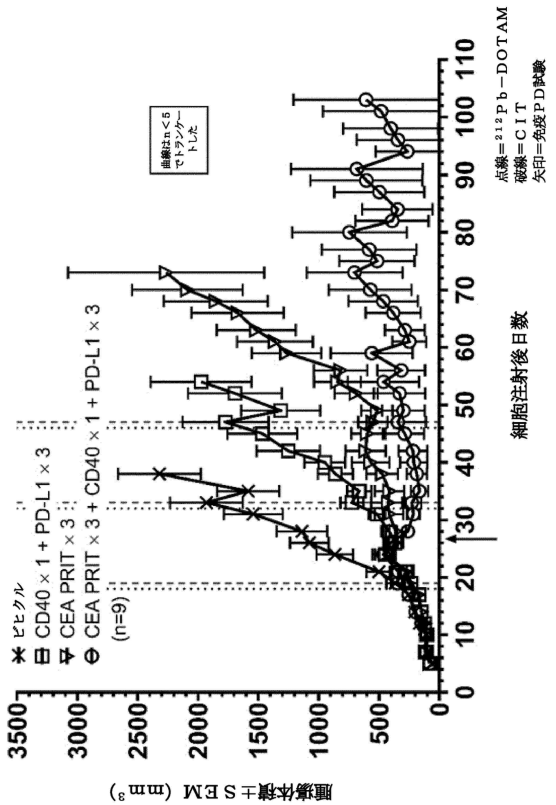
【図３７】



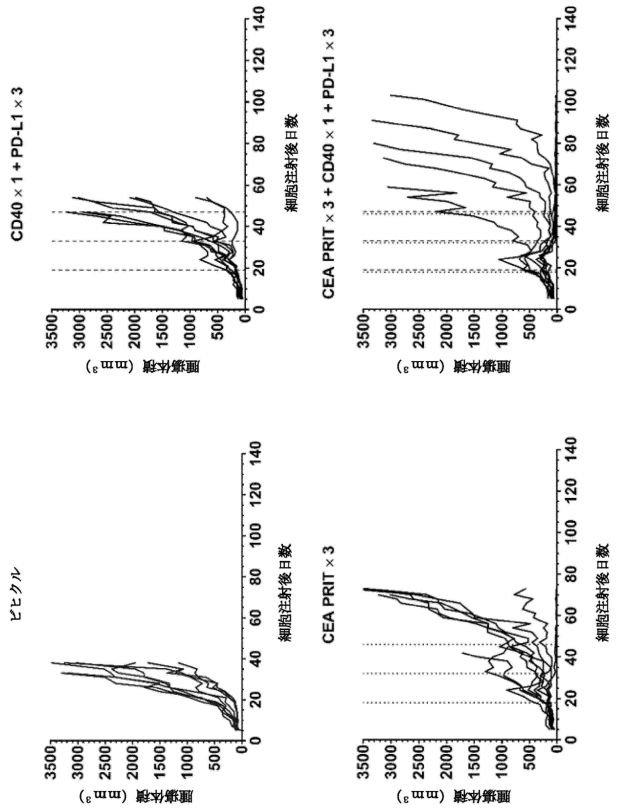
【図３８】



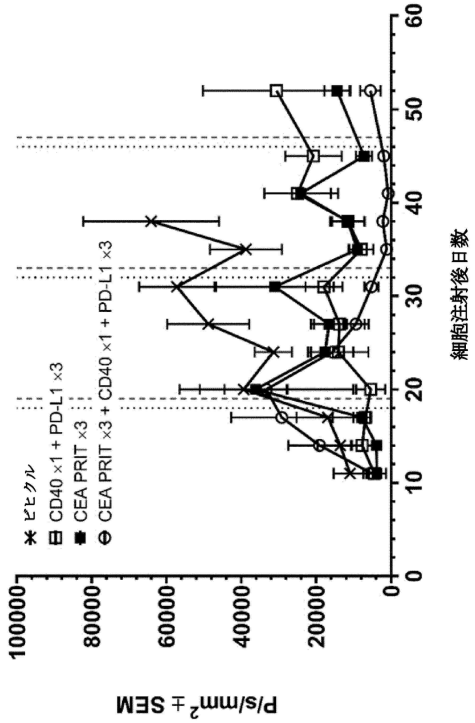
【図３９】



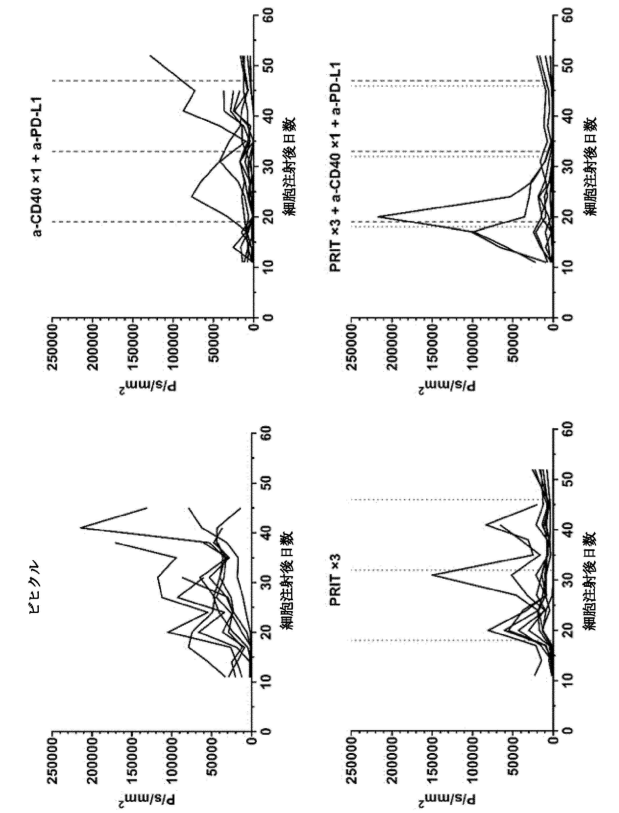
【図４０】



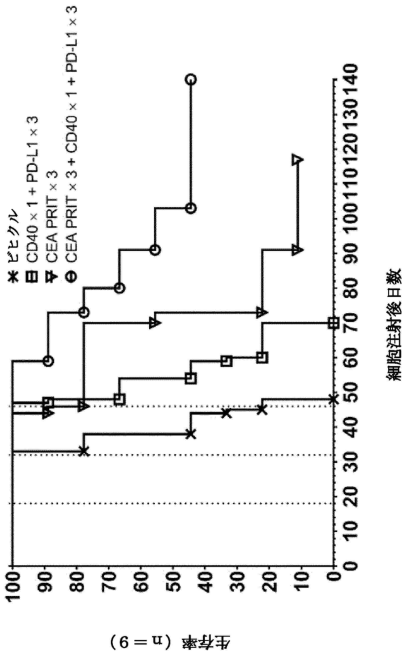
【図４１】



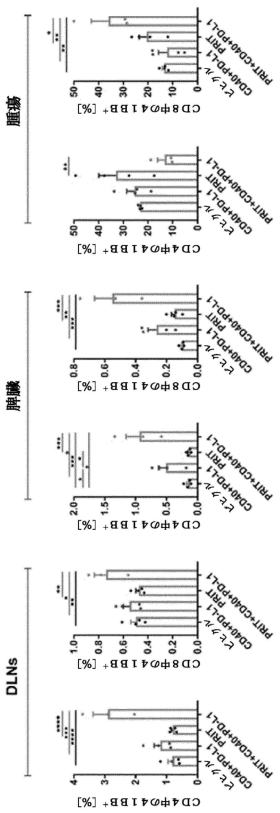
【図４２】



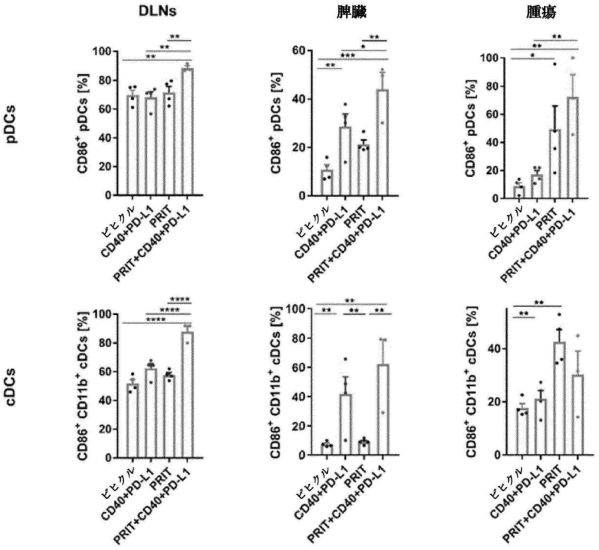
【図４３】



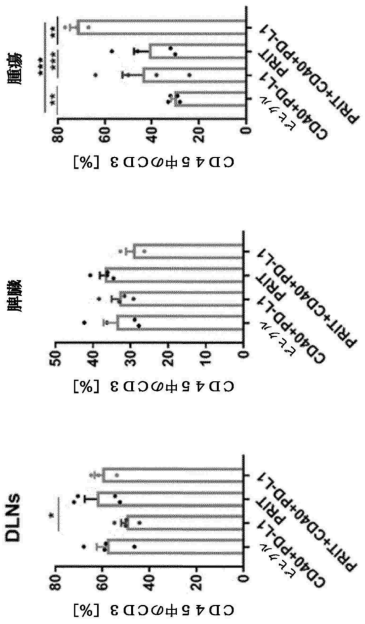
【図４４】



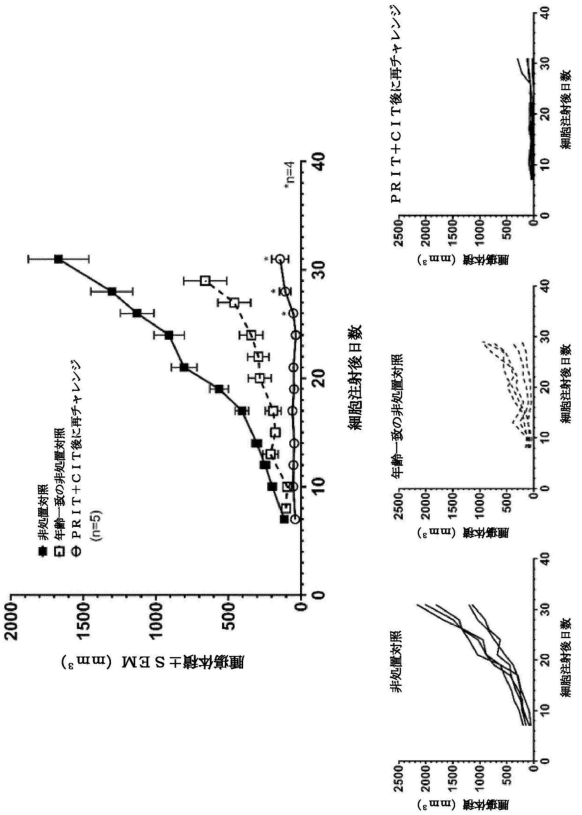
【図４５】



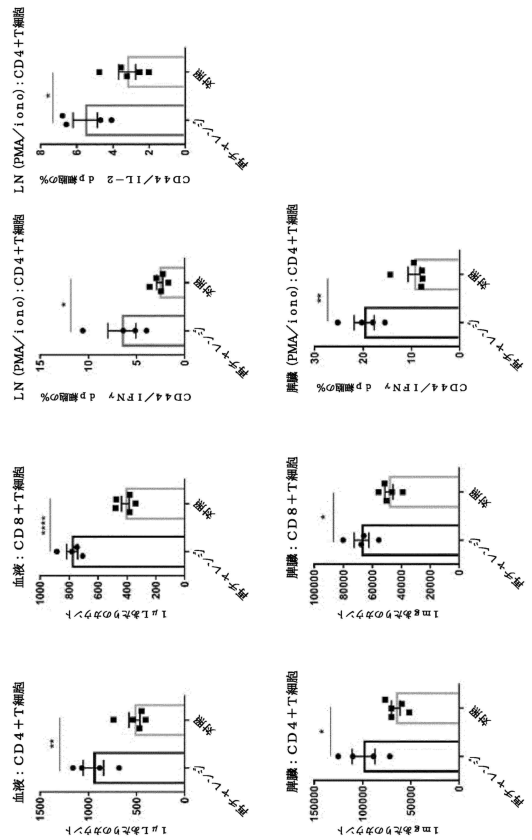
【図４６】



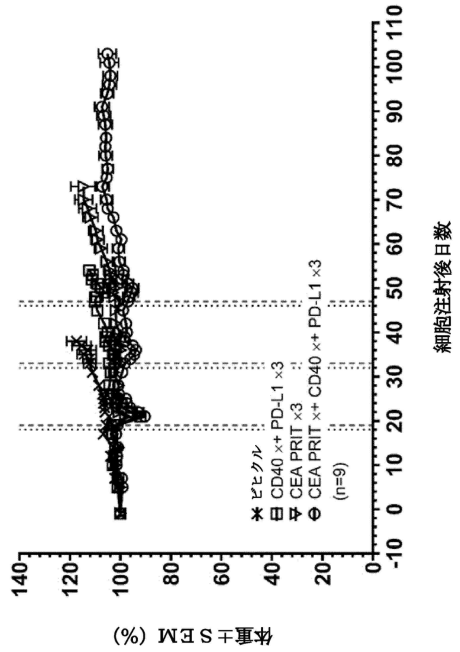
【図４７】



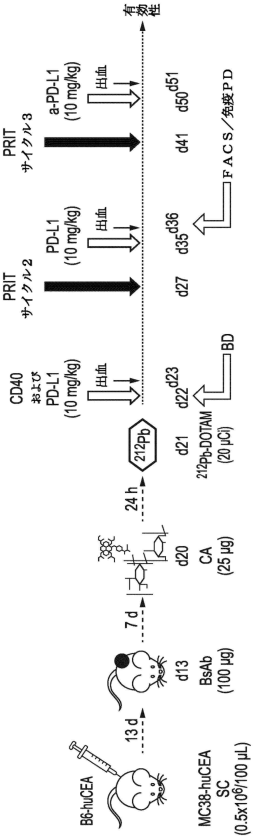
【図４８】



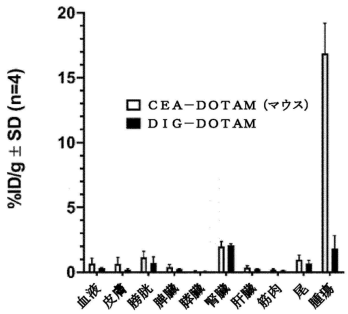
【図４９】



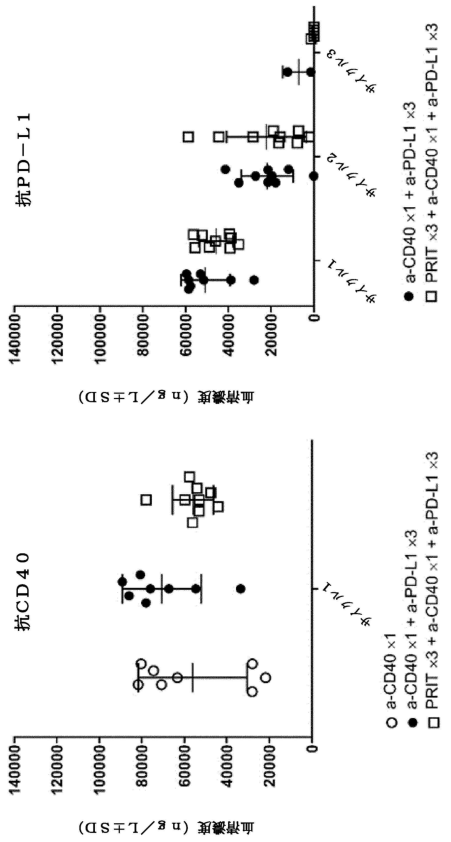
【図５０】



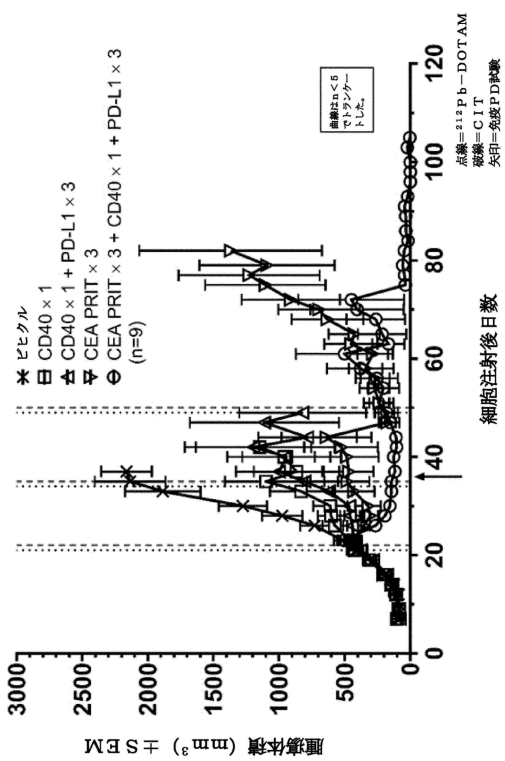
【図５１】



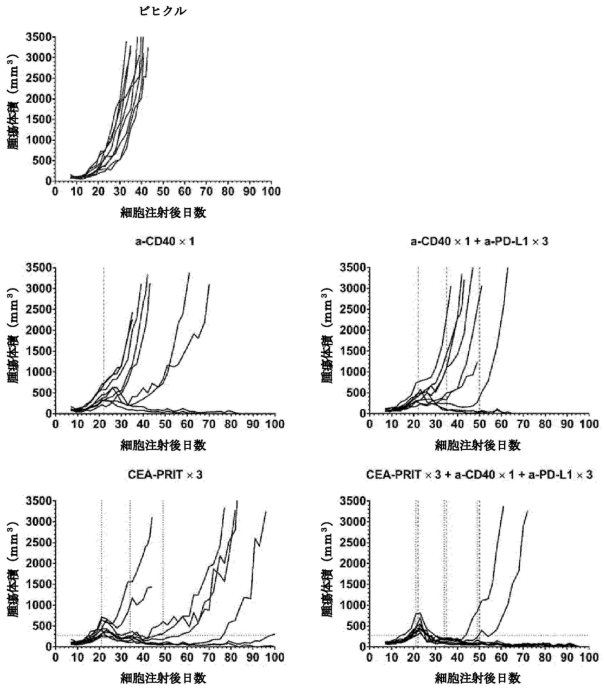
【図５２】



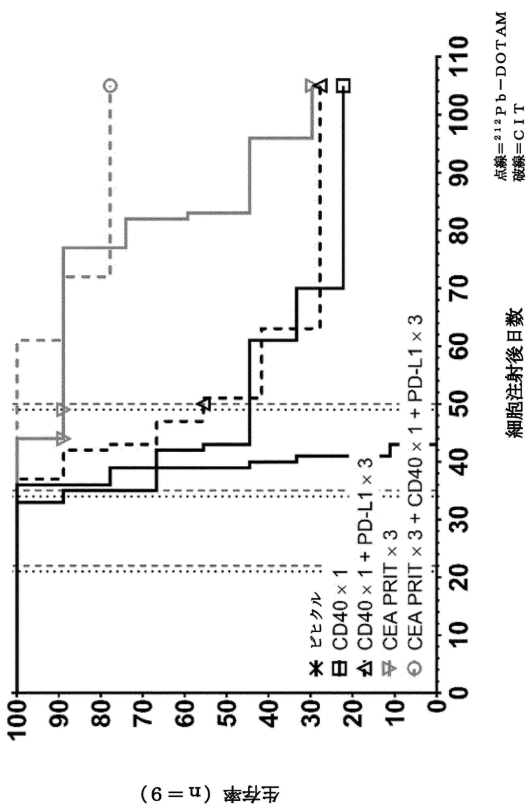
【図５３】



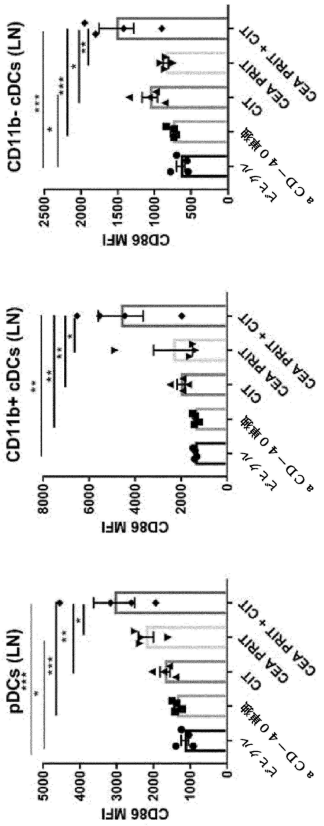
【図５４】



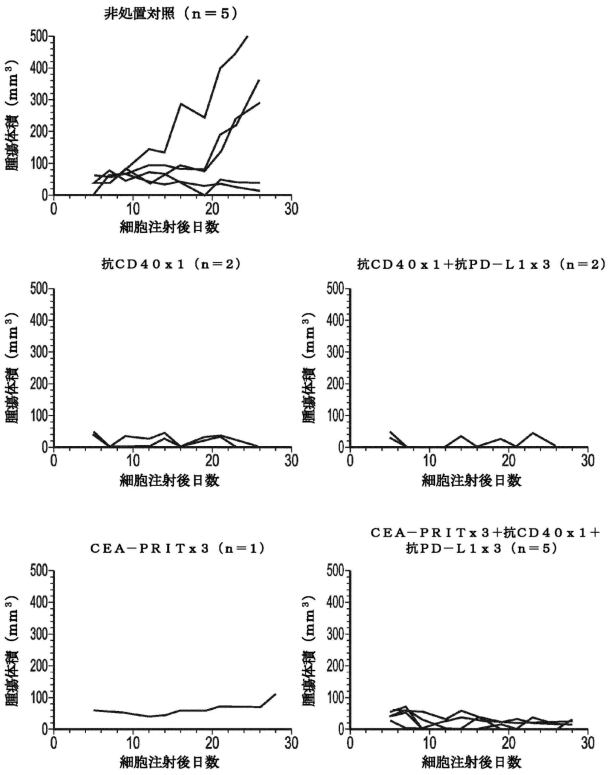
【図５５】



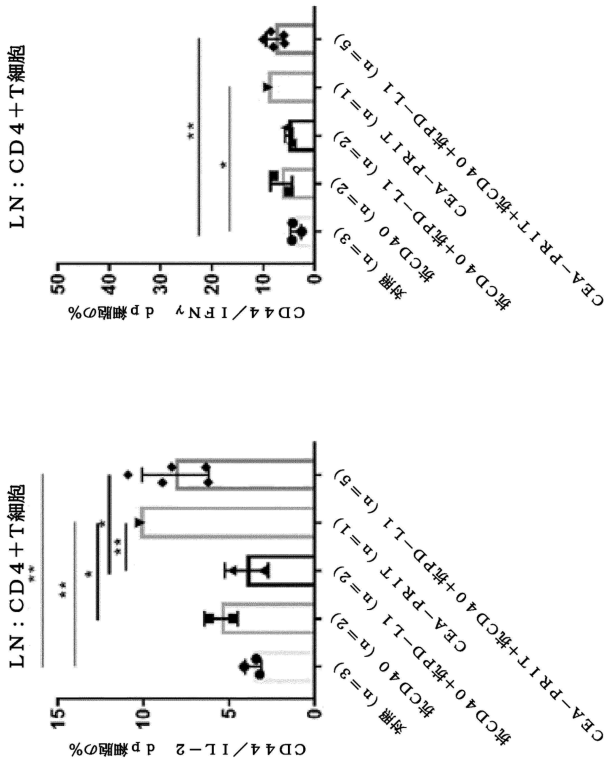
【図５６】



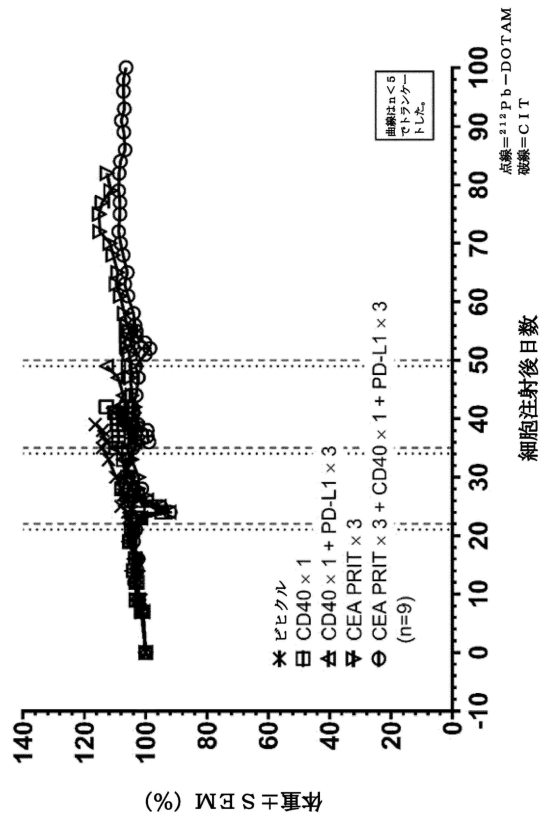
【図５７】



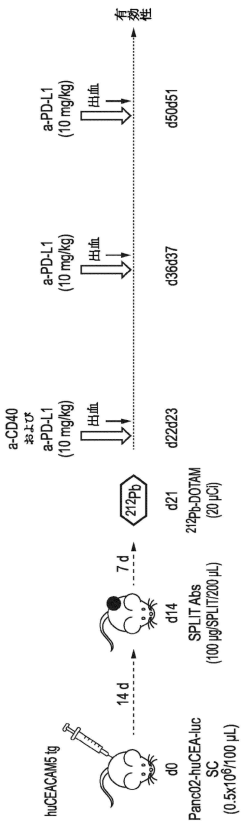
【図５８】



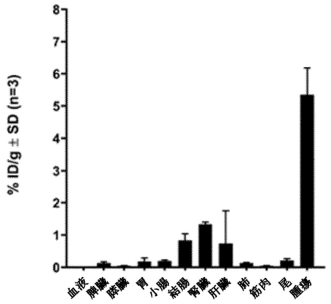
【図５９】



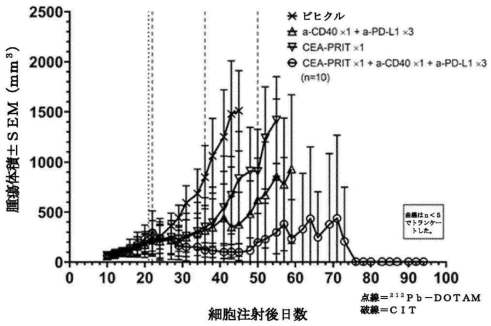
【図６０】



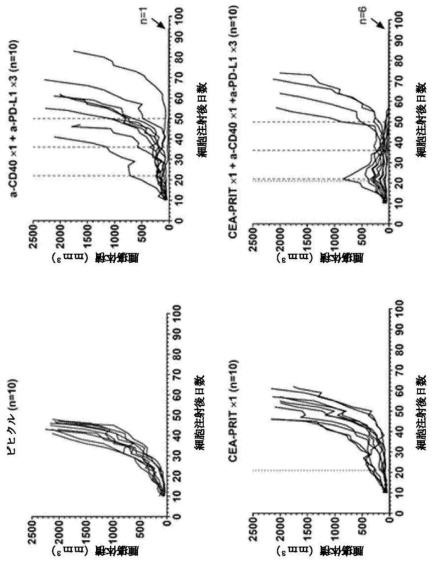
【図６１】



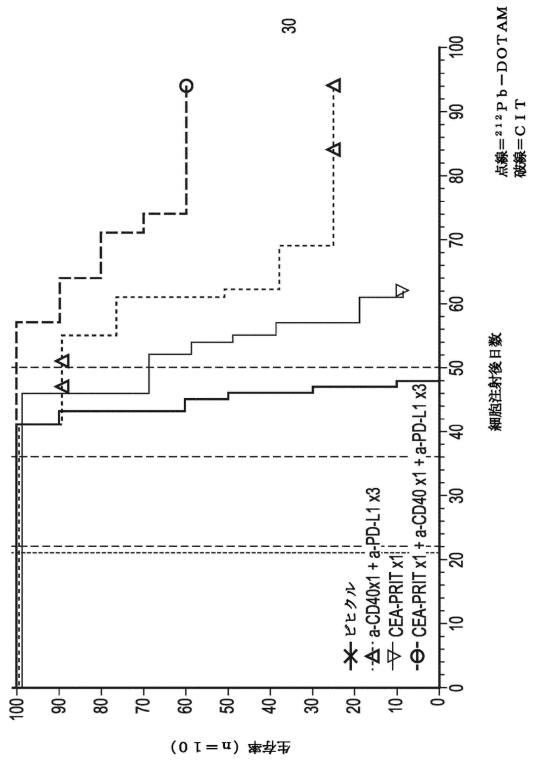
【図６２】



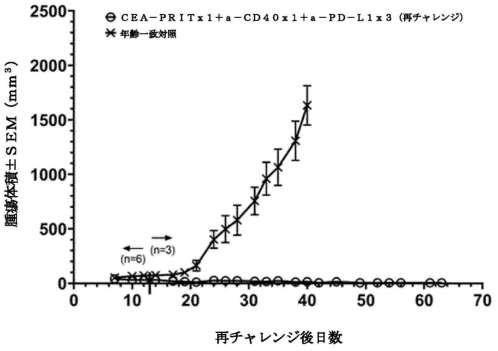
【図６３】



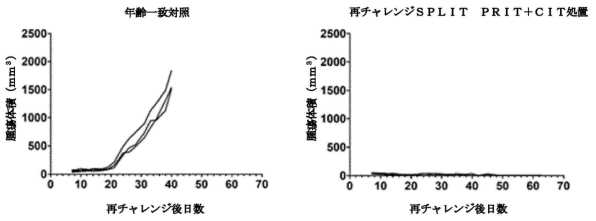
【図６４】



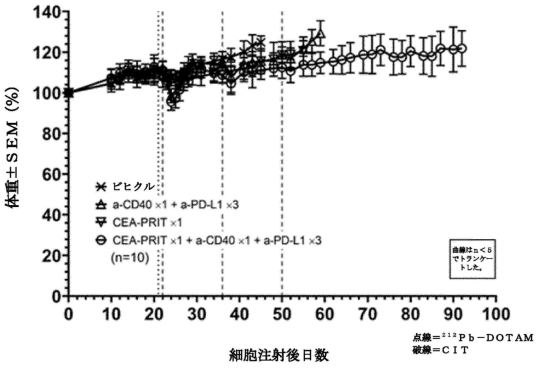
【図６５】



【図６６】



【図６７】



【配列表】
20245036540000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2022/050453

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/050453

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K51/04 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/201959 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 24 October 2019 (2019-10-24) cited in the application claims 1-10	1-32
Y	WO 2019/010299 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US]) 10 January 2019 (2019-01-10) claims 1-10, 39	1-32

-/--

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

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 March 2022	07/04/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Langer, Miren

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/050453

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BARLESI FABRICE ET AL: "291?Phase Ib study of selicrelumab (CD40 agonist) in combination with atezolizumab (anti-PD-L1) in patients with advanced solid tumors", REGULAR AND YOUNG INVESTIGATOR AWARD ABSTRACTS, vol. 8, 1 November 2020 (2020-11-01), pages A178.1-A178, XP055905731, DOI: 10.1136/jitc-2020-SITC2020.0291 Retrieved from the Internet: URL:https://jitc.bmj.com/content/jitc/8/Suppl_3/A178.1.full.pdf> abstract -----	1-32
A	VERHOEVEN ET AL: "Therapeutic Applications of Pretargeting", PHARMACEUTICS, vol. 11, no. 9, 1 September 2019 (2019-09-01), page 434, XP055905820, DOI: 10.3390/pharmaceutics11090434 Retrieved from the Internet: URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6781323/pdf/pharmaceutics-11-00434.pdf> chapter 4, combination therapy; page 13, paragraph 2 -----	1-32
A	Watering F.C.J. ET AL: "Pretargeted imaging and radioimmunotherapy of cancer using antibodies and bioorthogonal chemistry", Frontiers in medicine, 1 January 2014 (2014-01-01), pages 1-11, XP055905151, Switzerland DOI: 10.3389/fmed.2014.00044 Retrieved from the Internet: URL:10.3389/fmed.2014.00044 [retrieved on 2022-03-24] -----	1-32

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2022/050453

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019201959 A1	24-10-2019	AR 115053 A1	25-11-2020
		AU 2019254537 A1	29-10-2020
		BR 112020021061 A2	17-02-2021
		CA 3096338 A1	24-10-2019
		CL 2020002680 A1	12-02-2021
		CN 112261952 A	22-01-2021
		CR 20200548 A	20-01-2021
		EP 3781200 A1	24-02-2021
		JP 2021520832 A	26-08-2021
		KR 20210005885 A	15-01-2021
		MA 52545 A	24-02-2021
		PE 20210442 A1	08-03-2021
		SG 11202010066T A	27-11-2020
		TW 202011987 A	01-04-2020
		WO 2019201959 A1	24-10-2019
WO 2019010299 A1	10-01-2019	AU 2018297272 A1	30-01-2020
		CA 3069140 A1	10-01-2019
		CN 111050808 A	21-04-2020
		EP 3648801 A1	13-05-2020
		JP 2020526522 A	31-08-2020
		US 2021145988 A1	20-05-2021
		WO 2019010299 A1	10-01-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　39/395 (2006.01)		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ａ６１Ｋ　47/68　(2017.01)		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｋ　45/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	47/68		
Ａ６１Ｐ　43/00　(2006.01)		Ａ６１Ｋ	45/00		
Ｃ０７Ｄ 257/02　(2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
		Ｃ０７Ｄ	257/02		

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

Ｆターム（参考）
4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59 FF34
4C084 AA19 MA02 NA05 NA13 NA14 ZB26 ZC75
4C085 AA13 AA14 EE03 HH03 KA03 KA09 KA11 KA29 KB02 KB56 LL18
4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 BA71 CA40 DA75 EA20 FA74