

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6177231号
(P6177231)

(45) 発行日 平成29年8月9日 (2017.8.9)

(24) 登録日 平成29年7月21日 (2017.7.21)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K	16/28	(2006.01)	C O 7 K	16/28	Z N A
C O 7 K	16/46	(2006.01)	C O 7 K	16/46	
C O 7 K	19/00	(2006.01)	C O 7 K	19/00	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	

請求項の数 39 (全 161 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-505654 (P2014-505654)
(86) (22) 出願日	平成24年4月20日 (2012.4.20)
(65) 公表番号	特表2014-517823 (P2014-517823A)
(43) 公表日	平成26年7月24日 (2014.7.24)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/057303
(87) 国際公開番号	W02012/143523
(87) 国際公開日	平成24年10月26日 (2012.10.26)
審査請求日	平成27年4月17日 (2015.4.17)
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2011/056388
(32) 優先日	平成23年4月20日 (2011.4.20)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)
(31) 優先権主張番号	PA201100312
(32) 優先日	平成23年4月20日 (2011.4.20)
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)

(73) 特許権者	507316398
	ゲンマブ エー/エス
	デンマーク ディーケー-1560 コペ
	ンハーゲン ブイ カルヴェボー ブリッ
	ゲ 43
(74) 代理人	100102978
	弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118
	弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923
	弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507
	弁理士 刑部 俊
(74) 代理人	100142929
	弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER2に対する二重特異性抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第1および第2の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2 (HER2) 上の異なるエピトープと結合し、第1の抗原結合領域が

(a) それぞれSEQ ID NO: 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO: 6、DASおよびSEQ ID NO: 7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (169)

を含み、第2の抗原結合領域が

(b) それぞれSEQ ID NO: 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO: 68、DASおよびSEQ ID NO: 69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (153)；または

(c) それぞれSEQ ID NO: 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO: 27、AASおよびSEQ ID NO: 28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (025)

を含む、二重特異性抗体。

【請求項2】

第2の抗原結合領域が

(b) それぞれSEQ ID NO: 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO: 68、DASおよびSEQ ID NO: 69であるCDR1、CDR2およびC

10

20

DR3配列を含むVL領域（153）

を含む、請求項1記載の二重特異性抗体。

【請求項3】

第2の抗原結合領域が

（c）それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）

を含む、請求項1記載の二重特異性抗体。

【請求項4】

SEQ ID NO：64、65および66であるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列と、SEQ ID NO：68および69であるVL CDR1およびCDR3配列と、DASであるVL CDR2配列と（153）を含む第1の抗原結合領域；ならびにSEQ ID NO：2、3および4であるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列と、SEQ ID NO：6および7であるVL CDR1およびCDR3配列と、DASであるVL CDR2配列と（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

【請求項5】

SEQ ID NO：63を含むVH領域およびSEQ ID NO：67を含むVL領域（153）を含む第1の抗原結合領域、ならびにSEQ ID NO：1を含むVH領域およびSEQ ID NO：5を含むVL領域（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

【請求項6】

SEQ ID NO：23、24および25であるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列と、SEQ ID NO：27および28であるVL CDR1およびCDR3配列と、AASであるVL CDR2配列と（025）を含む第1の抗原結合領域；ならびにSEQ ID NO：2、3および4であるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列と、SEQ ID NO：6および7であるVL CDR1およびCDR3配列と、DASであるVL CDR2配列と（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

【請求項7】

SEQ ID NO：22を含むVH領域およびSEQ ID NO：26を含むVL領域（025）を含む第1の抗原結合領域、ならびにSEQ ID NO：1を含むVH領域およびSEQ ID NO：5を含むVL領域（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

【請求項8】

第1のFc領域および第2のFc領域をさらに含む、請求項1～7のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項9】

第1の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第2の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、請求項1～8のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項10】

第2の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第1の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、請求項1～7のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項11】

第1および第2のFabアームのアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から独立に選択される、請求項8～10のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項12】

第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1およびIgG4から独立に選択される、請求項11記載の二重特異性抗体。

【請求項13】

第1および第2のFc領域の一方がIgG1アイソタイプのものであり、一方がIgG4アイソタイプのものである、請求項12記載の二重特異性抗体。

【請求項14】

第1および第2のFc領域のアイソタイプがIgG1アイソタイプである、請求項12記載の二

10

20

30

40

50

重特異性抗体。

【請求項 1 5】

第1のFc領域が、409、366、368、370、399および405からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ該第1のFc領域および該第2のFc領域が同じ位置では置換されておらず、かつ該アミノ酸の位置がKabatらが記載したEUインデックスに従う、請求項 8 ~ 1 4 のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項 1 6】

(a) 第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有するか；

10

(b) 第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を有するか；

(c) 第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を有するか；

(d) 第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を、位置409にLysを含むか；

(e) 第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含むか；

20

(f) 第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含むか；

(g) 第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含むか；

(h) 第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含むか；

(i) 第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含むか；

(j) 第1のFc領域が位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含むか；

30

(k) 第1のFc領域が、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含むか；

(l) 第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を有するか；

(m) 第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有するか；

(n) 第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有するか；

(o) 第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有するか；

40

(p) 第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有するか；

(q) 第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有するか；

(r) 第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを

50

有するか；

(s)第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有するか；

(t)第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有するか；

(u)第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、

(i)位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、

(ii)位置370にTrp、

(iii)位置399にAsp、Cys、Pro、GluもしくはGln以外のアミノ酸、または

(iv)位置366にLys、Arg、Ser、ThrもしくはTrp以外のアミノ酸

を有するか；

(v)第1のFc領域が、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のFc領域が、

(i)位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii)位置370にTrp、または

(iii)位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv)位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetもしくはTyr

を有するか；あるいは

(w)第1のFc領域が位置409にArgを有し、第2のFc領域が、

(i)位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii)位置370にTrp、または

(iii)位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv)位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln

を有し、該アミノ酸の位置がKabatらが記載したEUインデックスに従う、請求項8～15のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項17】

第1および第2のFc領域が、SEQ ID NO：236の配列(IgG1m(a))を含む、請求項8～16のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項18】

第1のFc領域も第2のFc領域もヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まないか；または

第1のFc領域および第2のFc領域の両方がヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む、請求項8～17のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項19】

第1および第2のFc領域がヒト抗体のFc領域である、請求項8～18のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項20】

第1および第2のFabアームが、SEQ ID NO：234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244および245からなる群より選択される配列を含む、請求項9～19のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項21】

第1および第2の抗原結合領域が、ヒト抗体のVH配列、およびヒト抗体のVL配列を含む、請求項1～20のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項22】

第1および第2の抗原結合領域が第1および第2の軽鎖を含む、請求項1～21のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項23】

10

20

30

40

50

第1および第2の軽鎖が異なる、請求項 2 2 記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 4】

第1および / または第2のFc領域が、Asn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含む、請求項 8 ~ 2 3 のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 5】

1つもしくは複数の治療部分と結合体化されているか、またはそれに対する1つもしくは複数のアクセプター基を含有する、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 6】

1つもしくは複数の治療部分が、薬物、放射性同位体、サイトカインまたは細胞傷害性部分を含む、請求項 2 5 記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 7】

(a)メイタンシン、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、ラケルマイシン (CC-1065)、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンFまたはそれらのいずれかの類似体、誘導体、もしくはプロドラッグからなる群より選択される少なくとも1つの細胞傷害性部分と結合体化されているか；

(b)IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN、IFN、IFN、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチムおよびTNF からなる群より選択されるサイトカインと結合体化されているか；あるいは

(c)放射性同位体と結合体化されている、請求項 2 4 記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 8】

放射性同位体がアルファ放射体である、請求項 2 7 記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 9】

請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に定義された二重特異性抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に定義された二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 3 1】

医薬として用いるための、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項記載の二重特異性抗体を含む、薬学的組成物。

【請求項 3 2】

癌の治療に用いるための、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項記載の二重特異性抗体を含む、薬学的組成物。

【請求項 3 3】

癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群より選択される、請求項 3 2 記載の薬学的組成物。

【請求項 3 4】

二重特異性抗体が、1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて癌の治療に用いるためのものである、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項記載の薬学的組成物。

【請求項 3 5】

治療剤が化学療法剤である、請求項 3 4 記載の薬学的組成物。

【請求項 3 6】

癌の治療用の医薬を製造するための、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項記載の二重特異性抗体の使用。

【請求項 3 7】

癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群

10

20

30

40

50

より選択される、請求項 3 6 記載の使用。

【請求項 3 8】

HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害する薬学的組成物であって、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項記載の二重特異性抗体を含む、薬学的組成物。

【請求項 3 9】

(a) 請求項 2 9 記載の宿主細胞を培養する段階、および

(b) 二重特異性抗体を培地から精製する段階

を含む、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項記載の二重特異性抗体を作製する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、ヒト上皮細胞成長因子受容体2 (HER2) に対する二重特異性抗体およびこのような抗体の使用、特に、癌の治療におけるこのような抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

HER2は185kDa細胞表面受容体型チロシンキナーゼであり、4つの異なる受容体：EGFR/ErbB-1、HER2/ErbB-2、HER3/ErbB-3、およびHER4/ErbB-4を含む上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) ファミリーのメンバーである。EGFRファミリーの4つのメンバーによってホモ二量体およびヘテロ二量体がどちらも形成され、HER2は、他のErbB受容体の好ましくかつ最も強力な二量体化パートナーである (Graus-Porta et al., *Embo J* 1997; 16: 1647-1655 (非特許文献1); Tao et al., *J Cell Sci* 2008; 121: 3207-3217 (非特許文献2))。HER2は過剰発現によって活性化することができる、またはリガンド結合によって活性化可能な他のErbBとのヘテロ二量体化によって活性化することができる (Riese and Stern, *Bioessays* 1998; 20: 41-48 (非特許文献3))。HER2のリガンドは特定されていない。HER2が活性化されると受容体リン酸化が起こり、これによって複数のシグナル伝達経路、例えば、MAPK、ホスホイノシトール3-キナーゼ/AKT、JAK/STAT、およびPKCを介した下流シグナルカスケードが誘発され、最終的に増殖、生存、および分化などの複数の細胞機能が調節される (Huang et al., *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 97-110 (非特許文献4))。

【0 0 0 3】

腫瘍におけるHER2への関心の多くは乳癌におけるHER2の役割に集中してきた。乳癌では症例の約20%においてHER2過剰発現が報告されており、予後不良と相関づけられている (Reese et al., *Stem Cells* 1997; 15: 1-8 (非特許文献5); Andrechek et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3444-3449 (非特許文献6); およびSlamon et al., *Science* 1987; 235: 177-182 (非特許文献7))。乳癌に加えて、HER2発現は、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸癌、食道癌、および頭頸部の扁平上皮癌を含む他のヒト癌腫型とも関連づけられている (Garcia de Palazzo et al., *Int J Biol Markers* 1993; 8: 233-239 (非特許文献8); Ross et al., *Oncologist* 2003; 8: 307-325 (非特許文献9); Osman et al., *J Urol* 2005; 174: 2174-2177 (非特許文献10); Kapitanovic et al., *Gastroenterology* 1997; 112: 1103-1113 (非特許文献11); Turken et al., *Neoplasma* 2003; 50: 257-261 (非特許文献12); およびOshima et al., *Int J Biol Markers* 2001; 16: 250-254 (非特許文献13))。

【0 0 0 4】

トラスツズマブ (ハーセプチン (Herceptin) (登録商標)) はHER2タンパク質ドメインIVに対する組換えヒト化モノクローナル抗体であり、それによって、HER2が大幅に過剰発現している細胞においてリガンド非依存性HER2ホモ二量体化を阻止し、さらに低い程度でHER2と他のファミリーメンバーとのヘテロ二量体化を阻止する (Cho et al., *Nature* 2003; 421: 756-760 (非特許文献14) およびWehrman et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*

10

20

30

40

50

2006 ; 103 : 19063-19068 (非特許文献15))。HER2発現レベルが中程度の細胞においては、トラスツズマブはHER2/EGFRヘテロ二量体の形成を阻害することが見出された (Wehrman et al., (2006)、前記 ; Schmitz et al., Exp Cell Res 2009 ; 315 : 659-670 (非特許文献16))。トラスツズマブは抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を媒介し、外部ドメインシェディングを阻止する。外部ドメインシェディングが阻止されなければ、HER2過剰発現細胞において切断型常時活性型タンパク質が形成されるだろう。トラスツズマブについては、高レベルのHER2を発現する腫瘍細胞のインビトロ増殖およびインビボ増殖の阻害も報告されている (Nahta and Esteva, Oncogene 2007 ; 26 : 3637-3643 (非特許文献17))において概説されている)。ハーセプチン (登録商標) は、化学療法と併用した、または1種類もしくは複数種の化学療法後の単一薬剤として、HER2過剰発現転移乳癌のファーストライン療法および補助療法に認可されている。トラスツズマブはHER2過剰発現乳腺腫瘍患者の20 ~ 50%にしか有効でないことが見出されており、初期応答者の多くは数ヶ月後に再発する (Dinh et al., Clin Adv Hematol Oncol 2007 ; 5 : 707-717 (非特許文献18))。ハーセプチン (登録商標) は、転移性疾患に対する治療歴のない、HER2を過剰発現する転移性の胃腺癌または胃食道 (GE) 接合部腺癌の患者の治療に対しても、シスプラチンおよびフルオロピリミジン (カペシタピンまたは5-フルオロウラシルのいずれか) との併用下で承認されている。

【 0 0 0 5 】

ペルツズマブ (オムニターグ (Omnitarg) (商標)) は別のヒト化モノクローナル抗体である。当該抗体は、HER2タンパク質ドメインIIに対して作られ、リガンド誘導性ヘテロ二量体化 (すなわち、リガンドが結合している別のErbBファミリーメンバーとのHER2二量体化) ; 高いHER2発現レベルを厳格に必要としないと報告されている機構を阻害する (Franklin et al., Cancer Cell 2004 ; 5 : 317-328 (非特許文献19))。ペルツズマブもADCを媒介するが、ペルツズマブの主な作用機構はその二量体化の阻止に依存している (Hughes et al., Mol Cancer Ther 2009 ; 8 : 1885-1892 (非特許文献20))。さらに、ペルツズマブは、EGFR/HER2ヘテロ二量体の形成を阻害することによってEGFRの内部移行およびダウンレギュレーションを増強することが見出された。EGFR/HER2ヘテロ二量体の形成が阻害されなければ、EGFRは原形質膜に繋ぎ止められる (Hughes et al., 2009、前記)。これは、EGFRホモ二量体がEGFR/HER2二量体より有効に内部移行するという観察と関連する (Pedersen et al., Mol Cancer Res 2009 ; 7 : 275-284 (非特許文献21))。

【 0 0 0 6 】

HER2に基づく治療アプローチとして提唱されている別のものは、複数の異なるHER2エピトープに対するHER2抗体の組み合わせであり、これはインビトロおよびインビボの腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を減少させる上で個々のHER2抗体よりも有効であることが報告されている (Emde et al., Oncogene 2011;30:1631-1642 (非特許文献22) ; Spiridon et al., Clin Cancer res 2002;8:1720-1730 (非特許文献23))。例えば、先に行われたトラスツズマブによる治療の間に進行した患者に、ペルツズマブおよびトラスツズマブを併用すると、それらの補完的な作用機序により、抗腫瘍効果および有効性の強化をもたらすことが報告されている (Baselga et al., J Clin Oncol 2010;28:1138-1144 (非特許文献24))。第III相試験 (CLEOPATRA) で、治療歴のないHER2陽性転移性乳癌の患者において、ペルツズマブ + トラスツズマブという抗体の組み合わせとドセタキセルとの併用により、トラスツズマブとドセタキセルとを併用した場合と比較して無増悪生存期間の延長がもたらされることが示されている。

【 0 0 0 7 】

標的抗体療法を改良するための代替的なアプローチの1つは、抗原を発現する癌細胞に対して、細胞傷害性の細胞または薬物を特異的に送達することによる。

【 0 0 0 8 】

HER2抗体薬物結合体 (HER2 antibody drug conjugate) (ADC) は現在、臨床開発中である。T-DM1は、トラスツズマブが真菌毒素メイタンシンと結合体化されたものからなる。第II相試験では、トラスツズマブおよび / またはラパチニブによる前治療を受けた者を

10

20

30

40

50

含む、高度の前治療を受けた患者コホートにおける奏効が報告されている (Burris et al., 2011, J Clin Oncol 29: 398-405 (非特許文献25) および Lewis Phillips et al., Cancer Res 2008;68:9280-9290 (非特許文献26))。転移性疾患に対する化学療法歴がないHER2陽性転移性乳癌患者におけるT-DM1の有効性および安全性をトラスツズマブ+ドセタキセルと比較して判定する第II相試験による予備的データが報告されている (Perez et al., Abstract BA3, European Society for Medical Oncology meeting 201 (非特許文献27) 0)。トラスツズマブによる前治療を受けたHER2陽性の局所進行性または転移性乳癌の患者におけるT-DM1の有効性および安全性をカペシタビン+ラパチニブと比較して評価する第III相試験 (EMILIA) が進行中である。HER2陽性乳癌の患者における第一選択治療としてのT-DM1を評価する第III相試験 (MARIANNE) が、2010年7月に開始されている。

10

【0009】

HER2標的療法に適する抗体の選択には多くの要因がかかわるが、抗体結合時にHER2抗体複合体が有効に内部移行するならば、典型的にはADCアプローチにとって有利である。マウスHER2抗体に関する諸研究により、抗体のある種の組み合わせはHER2エンドサイトーシスを誘発することが示されている (Ben-Kasus et al., PNAS 2009;106:3294-9 (非特許文献28))。ヒトHER2抗体であるF5およびC1は、HER2抗原と結合すると比較的急速に内部移行して、同じエピトープと結合することが報告されている (WO 99/55367号およびWO 2006/116107号)。しかし、HER2の内部移行はEGFRと比較して損なわれている。事実、EGFRホモ二量体はHER2ホモ二量体よりもはるかに有効に内部移行する (Dinh et al., Clin Adv Hematol Oncol 2007;5:707-717 (非特許文献18))。EGFRは、HER3も同様であるが、それ

20

【0010】

または、2種類の異なるFabアーム、すなわち腫瘍細胞上の抗原と結合する1つのFabアームと細胞傷害性T細胞 (CTL) 上のCD3と結合する1つのFabアームとを1つの分子中に組み合わせることにより、二重特異性抗体を利用して、標的細胞の死滅を媒介させることもできる。例えば、いわゆる三機能性 (trifunctional) 抗体は、Fc領域によるFc受容体結合に加えて、Fabアームによる二重特異性抗原結合ももたらす。二重特異性抗原結合が起こると、T細胞 (CD3) が腫瘍細胞 (腫瘍抗原) へと動員され、さらにエフェクター細胞が三機能性抗体のFcドメインと結合する。形成された複合体は腫瘍細胞の死滅を導く (Muller and Kontermann, BioDrugs 2010;24:89-98 (非特許文献30))。エルツマキシマブ (ertumaxomab) は、HER2発現が少ない細胞株において細胞傷害性を誘導する、そのようなHER2xC

30

D3三機能性抗体の1つである (Jones et al., Lancet Oncol 2009;10: 1179-1187 (非特許文献31) および Kiewe et al., Clin Cancer Res 2006; 12:3085-3091 (非特許文献32))。または、T細胞と腫瘍細胞との複合体を形成させて、二重標的指向性抗体断片 (例えば、二重標的指向性単鎖抗体) によって腫瘍細胞の死滅を導くこともできる (Muller and Kontermann, BioDrugs 2010;24:89-98 (非特許文献30), Baeuerle and Reinhardt 2009, Cancer Research 96: 4941 (非特許文献33))。プリナツモマブ (blinatumomab) (Bargou et al., Science 2008, 321:974-976 (非特許文献34)) は、CD19およびCD3を標的とする

40

ることによって細胞傷害性を誘導する、BiTEと名付けられた単鎖抗体構築物である。抗体断片を基にしたT細胞係合性の他の二重特異性薬 (bispecifics) も記載されている (Moore et al. 2011, Blood 117:4542-4551 (非特許文献35), Baeuerle et al., Current opinion in Molecular Therapeutics 2009, 11:22-30 (非特許文献36))。

【0011】

HER2とEGFRファミリーの第2のメンバーとを同時に標的とする他の二重特異性構築物も、HER2標的療法の効率および選択性を高めるための有望な戦略として考察されている。そのような構築物の例には、HER2xEGFRアフィボディ (affibody) (Friedman et al., Biotechnol Appl Biochem. 2009 Aug 21;54(2):121-31 (非特許文献37)) およびHER2xHER3タンデム単鎖FvのMM-111 (Robinson et al., Br.J.Cancer 2008;99:1415-25 (非特許文献38

50

）；WO 2005/117973号（特許文献1））が含まれる。

【0012】

HER2の機能を調節している複雑な機構は、この癌原遺伝子に対する最適化された新たな治療戦略に関するさらなる研究に値する。したがって、癌などのHER2関連疾患を治療するための有効かつ安全な製品に対しては未だに需要がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0013】

【特許文献1】WO 2005/117973号

【非特許文献】

10

【0014】

【非特許文献1】Graus-Porta et al., Embo J 1997 ; 16 : 1647-1655

【非特許文献2】Tao et al., J Cell Sci 2008 ; 121 : 3207-3217

【非特許文献3】Riese and Stern、Bioessays 1998 ; 20 : 41-48

【非特許文献4】Huang et al., Expert Opin Biol Ther 2009 ; 9 : 97-110

【非特許文献5】Reese et al., Stem Cells 1997 ; 15 : 1-8

【非特許文献6】Andrechek et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2000 ; 97 : 3444-3449

【非特許文献7】Slamon et al., Science 1987 ; 235 : 177-182

【非特許文献8】Garcia de Palazzo et al., Int J Biol Markers 1993 ; 8 : 233-239

【非特許文献9】Ross et al., Oncologist 2003 ; 8 : 307-325

20

【非特許文献10】Osman et al., J Urol 2005 ; 174 : 2174-2177

【非特許文献11】Kapitanovic et al., Gastroenterology 1997 ; 112 : 1103-1113

【非特許文献12】Turken et al., Neoplasma 2003 ; 50 : 257-261

【非特許文献13】Oshima et al., Int J Biol Markers 2001 ; 16 : 250-254

【非特許文献14】Cho et al., Nature 2003 ; 421 : 756-760

【非特許文献15】Wehrman et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ; 103 : 19063-19068

8

【非特許文献16】Schmitz et al., Exp Cell Res 2009 ; 315 : 659-670

【非特許文献17】Nahta and Esteva, Oncogene 2007 ; 26 : 3637-3643

【非特許文献18】Dinh et al., Clin Adv Hematol Oncol 2007 ; 5 : 707-717

30

【非特許文献19】Franklin et al., Cancer Cell 2004 ; 5 : 317-328

【非特許文献20】Hughes et al., Mol Cancer Ther 2009 ; 8 : 1885-1892

【非特許文献21】Pedersen et al., Mol Cancer Res 2009 ; 7 : 275-284

【非特許文献22】Emde et al., Oncogene 2011;30:1631-1642

【非特許文献23】Spiridon et al., Clin Cancer res 2002;8:1720-1730

【非特許文献24】Baselga et al., J Clin Oncol 2010;28:1138-1144

【非特許文献25】Burris et al, 2011, J Clin Oncol 29: 398-405

【非特許文献26】Lewis Phillips et al., Cancer Res 2008;68:9280-9290

【非特許文献27】Perez et al, Abstract BA3, European Society for Medical Oncology meeting 201

40

【非特許文献28】Ben-Kasus et al., PNAS 2009;106:3294-9

【非特許文献29】Baulida et al., J Biol Chem 1996;271:5251-5257

【非特許文献30】Muller and Kontermann, BioDrugs 2010;24:89-98

【非特許文献31】Jones et al., Lancet Oncol 2009;10: 1179-1187

【非特許文献32】Kiewe et al., Clin Cancer Res 2006 ; 12:3085-3091

【非特許文献33】Baeuerle and Reinhardt 2009, Cancer Research 96: 4941

【非特許文献34】Bargou et al, Science 2008, 321:974-976

【非特許文献35】Moore et al. 2011, Blood 117:4542-4551

【非特許文献36】Baeuerle et al., Current opinion in Molecular Therapeutics 2009, 11:22-30

50

【非特許文献 3 7】Friedman et al., Biotechnol Appl Biochem. 2009 Aug 21;54(2):121-31

【非特許文献 3 8】Robinson et al., Br.J.Cancer 2008;99:1415-25

【発明の概要】

【0015】

2種類の異なるHER2抗体由来の抗原結合領域を含む有効な二重特異性抗体、およびそれらの医学的使用を提供することが、本発明の1つの目的である。本明細書に示されているように、二重特異性HER2 x HER2抗体は、より高度のHER2ダウンモジュレーション、インビボ腫瘍成長のより有効な阻害、内部移行の向上、および/または、対応する単一特異性HER2抗体を上回る他の利点を特徴とする。1つの局面において、単一特異性HER2抗体の少なくとも1つは、当技術分野で記載されている抗体とは異なるHER2結合特性または可変領域配列を呈する。

10

【0016】

好ましい態様において、本発明の二重特異性抗体は、完全ヒト型であるかもしくはヒト化されたHER2抗体から調製され、新規エピトープと結合し、かつ/または、ヒト患者における治療用途にとって有利な特性を有する。二重特異性抗体の各FabアームはFc領域をさらに含んでもよく、任意で、二重特異性抗体の形成を促進する修飾、Fc媒介性エフェクター機能に影響を及ぼす修飾、結合体化された薬物、またはこれらの任意の組み合わせ、および/または本明細書に記載された他の特徴を含む。

20

【0017】

[本発明1001]

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第1および第2の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2 (HER2) 上の異なるエピトープと結合し、第1および第2の抗原結合領域のそれぞれが、以下からなる群より独立に選択される参照抗体の、HER2に対する結合、任意で可溶性HER2に対する結合をブロックする、二重特異性抗体：

(a) SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域を含む抗体 (153)、

(b) SEQ ID NO : 165の配列を含む重鎖可変 (VH) 領域およびSEQ ID NO : 169の配列を含む軽鎖可変 (VL) 領域を含む抗体 (005)、

30

(c) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域を含む抗体 (169)、ならびに

(d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域を含む抗体 (025)。

[本発明1002]

第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1つが、(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、本発明1001の二重特異性抗体。

[本発明1003]

第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1つが、(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

40

[本発明1004]

第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1つが、(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1005]

第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1つが、(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1006]

(i) 第1の抗原結合領域が(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックしかつ第2の抗原結合領域が(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

50

(ii) 第1の抗原結合領域が(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックしかつ第2の抗原結合領域が(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(iii) 第1の抗原結合領域が(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックしかつ第2の抗原結合領域が(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(iv) 第1の抗原結合領域が(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックしかつ第2の抗原結合領域が(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(v) 第1の抗原結合領域が(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックしかつ第2の抗原結合領域が(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(vi) 第1の抗原結合領域が(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックしかつ第2の抗原結合領域が(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である、

前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1007]

第1および第2の抗原結合領域それぞれが、

(a) それぞれSEQ ID NO : 64、65および66 (153) ；

(b) それぞれSEQ ID NO : 43、44および45 (127) ；

(c) それぞれSEQ ID NO : 50、51および52 (159) ；

(d) それぞれSEQ ID NO : 57、58および59 (098) ；

(e) それぞれSEQ ID NO : 71、72および73 (132) ；

(f) それぞれSEQ ID NO : 166、167および168 (005) ；

(g) それぞれSEQ ID NO : 173、174および175 (006) ；

(h) それぞれSEQ ID NO : 180、181および182 (059) ；

(i) それぞれSEQ ID NO : 187、188および189 (060) ；

(j) それぞれSEQ ID NO : 194、195および196 (106) ；

(k) それぞれSEQ ID NO : 201、202および203 (111) ；

(l) それぞれSEQ ID NO : 2、3および4 (169) ；

(m) それぞれSEQ ID NO : 9、10および11 (050) ；

(n) それぞれSEQ ID NO : 16、17および18 (084) ；

(o) それぞれSEQ ID NO : 23、24および25 (025) ；

(p) それぞれSEQ ID NO : 30、163および31 (091) ；

(q) それぞれSEQ ID NO : 36、37および38 (129) ；

(r) トラスツズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列；ならびに

(s) ペルツズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列

からなる群より独立に選択されるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、

ただし、第1の抗原結合領域がトラスツズマブ由来である場合には第2の抗原結合領域はペルツズマブ由来でないこと、およびその逆も同様であることを条件とする、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1008]

第1および第2の抗原結合領域それぞれが、

(a) それぞれSEQ ID NO : 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 68、DASおよびSEQ ID NO : 69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (153) ；

(b) それぞれSEQ ID NO : 43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 47、AASおよびSEQ ID NO : 48であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (127) ；

(c) それぞれSEQ ID NO : 50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領

10

20

30

40

50

域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：54、AASおよびSEQ ID NO：55であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（159）；

（d）それぞれSEQ ID NO：57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：60、AASおよびSEQ ID NO：61であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（098）；

（e）それぞれSEQ ID NO：71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：75、DASおよびSEQ ID NO：76であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（132）；

（f）それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）；

（g）それぞれSEQ ID NO：173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：177、DASおよびSEQ ID NO：178であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（006）；

（h）それぞれSEQ ID NO：180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：184、GASおよびSEQ ID NO：185であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（059）；

（i）それぞれSEQ ID NO：187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：191、GASおよびSEQ ID NO：192であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（060）；

（j）それぞれSEQ ID NO：194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：198、GASおよびSEQ ID NO：199であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（106）；

（k）それぞれSEQ ID NO：201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：205、GASおよびSEQ ID NO：206であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（111）；

（l）それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；

（m）それぞれSEQ ID NO：9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：13、AASおよびSEQ ID NO：14であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（050）；

（n）それぞれSEQ ID NO：16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：20、VASおよびSEQ ID NO：21であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（084）；

（o）それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）；

（p）それぞれSEQ ID NO：30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：33、AASおよびSEQ ID NO：34であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（091）；

（q）それぞれSEQ ID NO：36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：40、DASおよびSEQ ID NO：41であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（129）；

（t）トラスツズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびにトラスツズマブのVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域；ならびに

（u）ベルツズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびにベルツズマブのVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域
からなる群より独立に選択されるVH領域およびVL領域を含み、

ただし、第1の抗原結合領域がトラスツズマブ由来である場合には第2の抗原結合領域は

10

20

30

40

50

ペルツズマブ由来でないこと、およびその逆も同様であることを条件とする、本発明1007の二重特異性抗体。

[本発明1009]

第1および第2の抗原結合領域それぞれが、

(a) それぞれSEQ ID NO : 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 68、DASおよびSEQ ID NO : 69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（153）

(b) それぞれSEQ ID NO : 166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 170、GASおよびSEQ ID NO : 171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）；

(c) それぞれSEQ ID NO : 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 6、DASおよびSEQ ID NO : 7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；ならびに

(d) それぞれSEQ ID NO : 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 27、AASおよびSEQ ID NO : 28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）

からなる群より独立に選択されるVH領域およびVL領域を含む、本発明1008の二重特異性抗体。

[本発明1010]

SEQ ID NO : 66であるVH CDR3配列（153）を含む第1の抗原結合領域およびSEQ ID NO : 168であるVH CDR3配列（005）を含む第2の抗原結合領域を含むか、またはその逆を含む、二重特異性抗体。

[本発明1011]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 69であるVL CDR3配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 171であるVL CDR3配列（005）をさらに含む、本発明1010の二重特異性抗体。

[本発明1012]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 64であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 65であるVH CDR2配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 166であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 167であるVH CDR2配列（005）をさらに含む、本発明1010および1011のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1013]

SEQ ID NO : 63を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67を含むVL領域（153）を含む第1の抗原結合領域、ならびにSEQ ID NO : 165を含むVH領域およびSEQ ID NO : 169を含むVL領域（005）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1014]

SEQ ID NO : 66であるVH CDR3配列（153）を含む第1の抗原結合領域およびSEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1015]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 69であるVL CDR3配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 7であるVL CDR3配列（169）をさらに含む、本発明1014の二重特異性抗体。

[本発明1016]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 64であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 65であるVH CDR2配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 2であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 3であるVH CDR2配列（169）をさらに含む、本発明1014および1015のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1017]

SEQ ID NO : 63を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67を含むVL領域（153）を含む第1の抗原

10

20

30

40

50

結合領域、ならびにSEQ ID NO：1を含むVH領域およびSEQ ID NO：5を含むVL領域（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1018]

SEQ ID NO：168であるVH CDR3配列（005）を含む第1の抗原結合領域およびSEQ ID NO：4であるVH CDR3配列（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1019]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO：171であるVL CDR3配列（005）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：7であるVL CDR3配列（169）をさらに含む、本発明1018の二重特異性抗体。

[本発明1020]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO：166であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：167であるVH CDR2配列（005）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：2であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：3であるVH CDR2配列（169）をさらに含む、本発明1018および1019のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1021]

SEQ ID NO：165を含むVH領域およびSEQ ID NO：169を含むVL領域（005）を含む第1の抗原結合領域、ならびにSEQ ID NO：1を含むVH領域およびSEQ ID NO：5を含むVL領域（169）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1022]

SEQ ID NO：25であるVH CDR3配列（025）を含む第1の抗原結合領域およびSEQ ID NO：168であるVH CDR3配列（005）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1023]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO：28であるVL CDR3配列（025）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：171であるVL CDR3配列（005）をさらに含む、本発明1022の二重特異性抗体。

[本発明1024]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO：23であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：24であるVH CDR2配列（025）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：166であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：167であるVH CDR2配列（005）をさらに含む、本発明1022および1023のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1025]

SEQ ID NO：22を含むVH領域およびSEQ ID NO：26を含むVL領域（025）を含む第1の抗原結合領域、ならびにSEQ ID NO：165を含むVH領域およびSEQ ID NO：169を含むVL領域（005）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1026]

SEQ ID NO：25であるVH CDR3配列（025）を含む第1の抗原結合領域およびSEQ ID NO：66であるVH CDR3配列（153）を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1027]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO：28であるVL CDR3配列（025）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：69であるVL CDR3配列（153）をさらに含む、本発明1026の二重特異性抗体。

[本発明1028]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO：23であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：24であるVH CDR2配列（025）をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：64であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：65であるVH CDR2配列（153）をさらに含む、本発明1026および1027のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1029]

10

20

30

40

50

SEQ ID NO : 22を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26を含むVL領域 (025) を含む第1の抗原結合領域、ならびにSEQ ID NO : 63を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67を含むVL領域 (153) を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1030]

SEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列 (025) を含む第1の抗原結合領域およびSEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列 (169) を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

[本発明1031]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 28であるVL CDR3配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 7であるVL CDR3配列 (169) をさらに含む、本発明1030の二重特異性抗体。

10

[本発明1032]

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 23であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 24であるVH CDR2配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 2であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 3であるVH CDR2配列 (169) をさらに含む、本発明1030および1031のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1033]

SEQ ID NO : 22を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26を含むVL領域 (025) を含む第1の抗原結合領域、ならびにSEQ ID NO : 1を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5を含むVL領域 (169) を含む第2の抗原結合領域、またはその逆のものを含む、二重特異性抗体。

20

[本発明1034]

HER2ドメインII内のエピトープと結合する第1の抗原結合領域、およびHER2ドメインIIIまたはIV内のエピトープと結合する第2の抗原結合領域を含む、二重特異性抗体。

[本発明1035]

第2の抗原結合領域がHER2ドメインIII内のエピトープと結合する、本発明1034の二重特異性抗体。

[本発明1036]

第2の抗原結合領域がHER2ドメインIV内のエピトープと結合する、本発明1034の二重特異性抗体。

[本発明1037]

30

第1の抗原結合領域が、SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域を含む参照抗体 (153) の可溶性HER2に対する結合をブロックする、本発明1034 ~ 1036のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1038]

第1および / または第2の抗原結合領域が、本発明1001 ~ 1033のいずれかのVH領域、および任意でVL領域を含む、本発明1034 ~ 1037のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1039]

第1のFc領域および第2のFc領域をさらに含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1040]

40

第1の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第2の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1041]

第2の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第1の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、本発明1001 ~ 1038のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1042]

第1および第2のFabアームのアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から独立に選択される、本発明1039 ~ 1041のいずれかの二重特異性抗体。

50

[本発明1043]

第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1およびIgG4から独立に選択される、本発明1042の二重特異性抗体。

[本発明1044]

第1および第2のFc領域の一方がIgG1アイソタイプのものであり、一方がIgG4アイソタイプのものである、本発明1043の二重特異性抗体。

[本発明1045]

第1および第2のFc領域のアイソタイプがIgG1アイソタイプである、本発明1043の二重特異性抗体。

[本発明1046]

第1のFc領域が、409、366、368、370、399、405および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ該第1のFc領域および該第2のFc領域が同じ位置では置換されていない、本発明1039～1045のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1047]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する、本発明1039～1045のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1048]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1049]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1050]

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1051]

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1052]

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1053]

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1054]

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1055]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1056]

第1のFc領域が位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを

10

20

30

40

50

、位置405にLeuを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1057]

第1のFc領域が、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1058]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1059]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1060]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1061]

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1062]

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1063]

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1064]

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1065]

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1066]

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1067]

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、
(i) 位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、
(ii) 位置370にTrp、
(iii) 位置399にAsp、Cys、Pro、GluもしくはGln以外のアミノ酸、または
(iv) 位置366にLys、Arg、Ser、ThrもしくはTrp以外のアミノ酸
を有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1068]

第1のFc領域が、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のFc領域が、

10

20

30

40

50

(i) 位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、Val
もしくはTrp、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、Ar
gもしくはTyr、または

(iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、Metもし
くはTyr

を有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1069]

第1のFc領域が位置409にArgを有し、第2のFc領域が、

(i) 位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln

を有する、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1070]

第1および第2のFc領域が、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：236の配列 (IgG1m(a))
を含む、本発明1039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1071]

第1のFc領域も第2のFc領域もヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない、本発明1
039～1046のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1072]

第1および第2のFc領域の両方がヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む、本発明103
9～1070のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1073]

第1および第2のFc領域がヒト抗体のFc領域である、本発明1039～1072のいずれかの二重
特異性抗体。

[本発明1074]

第1および第2のFabアームが、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：234、235、236、237
、238、239、240、241、242、243、244および245からなる群より選択される配列を含む、
本発明1040～1073のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1075]

第1および第2の抗原結合領域が、ヒト抗体のVH配列、および任意でヒト抗体のVL配列を
含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1076]

第1および第2の抗原結合領域が重鎖抗体由来である、前記本発明のいずれかの二重特異
性抗体。

[本発明1077]

第1および第2の抗原結合領域が第1および第2の軽鎖を含む、本発明1001～1075のいづれ
かの二重特異性抗体。

[本発明1078]

第1および第2の軽鎖が異なる、本発明1077の二重特異性抗体。

[本発明1079]

第1および / または第2のFc領域が、Asn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去
する変異を含む、本発明1034～1078のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1080]

薬物、放射性同位体、サイトカインもしくは細胞傷害性部分などの1つもしくは複数の
他の部分と結合体化されているか、またはそれに対する1つもしくは複数のアクセプター
基を含有する、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1081]

10

20

30

40

50

少なくとも1つの細胞傷害性部分が、タキソール；サイトカラシンB；グラミシジンD；臭化エチジウム；エメチン；マイトマイシン；エトポシド；テニポシド；ピンクリスチン；ビンブラスチン；コルヒチン；ドキソルビシン；ダウノルビシン；ジヒドロキシアントラシンジオン；チューブリン阻害剤、例えばメイタンシンまたはその類似体もしくは誘導体；ミトキサントロン；ミトラマイシン；アクチノマイシンD；1-デヒドロテストステロン；グルココルチコイド；プロカイン；テトラカイン；リドカイン；プロプラノロール；ピューロマイシン；カリチアマイシンまたはその類似体もしくは誘導体；代謝拮抗物質、例えばメトトレキサート、6メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5フルオロウラシル、ダカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタピンまたはクラドリピン；アルキル化剤、例えばメクロレタミン、チオテパ、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、カルボプラチン、デュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、ラケルマイシン（CC-1065）またはそれらの類似体もしくは誘導体；抗生物質、例えばダクチノマイシン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（AMC）；有糸分裂阻害剤、例えばモノメチルアウリスタチンEもしくはFまたはそれらの類似体もしくは誘導体；ジフテリア毒素および関連分子、例えばジフテリアA鎖およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子、リシン毒素、例えばリシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素など、コレラ毒素、志賀毒素様毒素、例えばSLT I、SLT II、SLT IIIVなど、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズBowman-Birkプロテアーゼインヒビター、シュードモナス属（*Pseudomonas*）エキソトキシン、アロリン（alorin）、サポリン、モデシン、ゲラニン（gelanin）、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質、例えばPAPI、PAPII、およびPAP Sなど、ニガウリ（*Momordica charantia*）インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ（*Saponaria officinalis*）インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシンおよびエノマイシン毒素など；リボヌクレアーゼ（RNアーゼ）；DNアーゼI、ブドウ球菌（*Staphylococcal*）エンテロトキシンA；ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質；ジフテリア毒素；ならびにシュードモナス属エンドトキシンからなる群より選択される、本発明1080の二重特異性抗体。

[本発明1082]

メイタンシン、カリチアマイシン、デュオカルマイシン、ラケルマイシン（CC-1065）、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンFまたはそれらのいずれかの類似体、誘導体、もしくはプロドラッグからなる群より選択される少なくとも1つの細胞傷害性部分と結合体化されている、本発明1080の二重特異性抗体。

[本発明1083]

IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチムおよびTNF α からなる群より選択されるサイトカインと結合体化されている、本発明1080の二重特異性抗体。

[本発明1084]

アルファ放射体などの放射性同位体と結合体化されている、本発明1080の二重特異性抗体。

[本発明1085]

二重特異性抗体を作製するためのインビトロ方法であって、

(a) 第1のFc領域を含む第1のHER2抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第1のCH3領域を含む段階、

(b) 第2のFc領域を含む第2のHER2抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第2のCH3領域を含む段階、

10

20

30

40

50

(c) 該第1のHER2抗体を該第2のHER2抗体とともに還元条件下でインキュベートする段階、および

(d) 該二重特異性抗体を入手する段階

を含み、該第1および第2のCH3領域の配列が異なり、かつ該第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が、該第1および第2のCH3領域の各ホモ二量体相互作用よりも強い、方法。

[本発明1086]

(a) SEQ ID NO : 165の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 169の配列を含むVL領域 (005)、

(b) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (025)、

(c) SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域 (153)、ならびに

(d) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (169)を含む抗体の、可溶性ヒト上皮成長因子受容体2 (HER2) に対する結合を、第1および第2の抗体の少なくとも1つがブロックする、本発明1085の方法。

[本発明1087]

第1および第2のFc領域が、本発明1039 ~ 1064のいずれかのアミノ酸置換を含む、本発明1085および1086のいずれかの方法。

[本発明1088]

本発明1086 ~ 1087のいずれかの方法によって入手しうる二重特異性抗体。

[本発明1089]

本発明1001 ~ 1088のいずれか一項に定義された二重特異性抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞。

[本発明1090]

本発明1001 ~ 1084のいずれか一項に定義された二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1091]

医薬として用いるための、本発明1001 ~ 1084のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1092]

癌の治療に用いるための、本発明1001 ~ 1084のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1093]

癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群より選択される、本発明1092の使用のための二重特異性抗体。

[本発明1094]

化学療法剤などの1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて癌の治療に用いるためのものである、本発明1091 ~ 1093のいずれかの使用のための二重特異性抗体。

[本発明1095]

本発明1092および / または93のさらなる特徴を任意で含む、癌の治療用の医薬を製造するための、本発明1001 ~ 1084のいずれかの二重特異性抗体の使用。

[本発明1096]

HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および / または増殖を阻害する方法であって、それを必要とする個体に本発明1001 ~ 1084のいずれかの二重特異性抗体を投与する段階を含む、方法。

[本発明1097]

(a) HER2を発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、および

(b) 本発明1001 ~ 1084のいずれかの抗体または本発明1090の薬学的組成物を該対象に投与する段階を含む、癌を治療する方法。

10

20

30

40

50

[本発明1098]

癌が、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌／子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、精巣癌、滑膜肉腫などの軟部組織腫瘍、および膀胱癌からなる群より選択される、本発明1097の方法。

[本発明1099]

(a) 本発明1089の宿主細胞を培養する段階、および

(b) 二重特異性抗体を培地から精製する段階

を含む、本発明1001～1084のいずれかの二重特異性抗体を作製する方法。

本発明のこれらの局面および他の局面について、以下にさらに詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】【0018】

【図1】HuMab重鎖可変領域（VH）配列と生殖系列（参照）配列（A～O）とのアラインメント。それぞれのVH配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。コンセンサスVH配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（各位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVH配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図2】HuMab軽鎖可変領域（VL）配列と生殖系列（参照）配列（パネルA～H）とのアラインメント。それぞれのVL配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。図2Aにおいて、全てのVL配列は同じVセグメント（IgKV1-12-01）に由来するが、最も近いJセグメントは抗体間で異なった。コンセンサスVL配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（示された位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVL配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

【図3】実施例12に記載のように確かめられた時の、HER2抗体と、（A、B、E）高（AU565）HER2発現細胞株および（C、D、F）低（A431）HER2発現細胞株との結合曲線。示したデータは、それぞれの細胞株を対象にした1回の代表的な実験の平均蛍光強度（MFI）である。EC₅₀値はみかけの親和性を示す。

【図4】アカゲザル上皮細胞上で発現しているHER2に対するHER2抗体の結合。示したデータは、実施例13に記載の1回の実験の平均蛍光強度（MFI）である。

【図5】HER2抗体のクロム放出（ADCC）アッセイ。HER2抗体とインキュベートした後の、⁵¹Cr標識SK-BR-3細胞のPBMCによって媒介される溶解を示す。示した値は、SK-BR-3細胞を用いた1回の代表的なインビトロADCC実験からの最大パーセント⁵¹Cr放出の平均±標準偏差である。詳細については実施例15を参照されたい。

【図6】未処理細胞（100％に設定した）と比較した、AU565細胞の増殖に対するHER2抗体の効果。示したデータは、3回の独立した実験において測定された、未処理細胞と比較したAU565細胞の増殖パーセント±標準偏差である。*有意（P<0.05）詳細については実施例16を参照されたい。

【図7】ヘレグリン-1のみで刺激した細胞と対比した、ヘレグリン-1で刺激して表記のHER2抗体で処理した生存MCF7細胞のパーセンテージ。対照として、非刺激細胞（なし）の増殖率を示している。データは3回の独立した実験から入手し、±標準偏差とした。*ヘレグリン-1で誘導される増殖の有意な阻害（P<0.05）。詳細については実施例17参照。

【図8】抗-ETA'結合HER2抗体を介したAU565細胞（A、B）またはA431細胞（C、D）の死滅を示しているADCアッセイ。（A、B）示されているデータは、非結合体化HER2抗体および抗-ETA'結合HER2抗体で処理したAU565細胞を用いた1つの代表的な実験の蛍光強度（FI）である。（C、D）示されているデータは、非結合体化HER2抗体および抗-ETA'結合HER2抗体で処理したA431細胞を用いた1つの代表的な実験の平均蛍光強度（MFI）である。詳細については実施例18参照。

10

20

30

40

50

【図 9】抗 -ETA' とともにブレインキュベートしたHER2 x HER2二重特異性抗体によって誘導されたA431細胞の死滅。抗 -ETA' とともにブレインキュベートしたHER2抗体との3日間のインキュベーション後のA431細胞の生存度。細胞生存度はAlamarblueを用いて定量した。示されているデータは、抗 -ETA' 結合HER2抗体およびHER2 x HER2二重特異性抗体で処理したA431細胞を用いた1つの実験の蛍光強度 (FI) である。スタウロスポリンを陽性対照として用い、アイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。

【図 10】HER2 x HER2二重特異性分子はHER2受容体のダウンモジュレーションを誘導した。10 μ g/mL mAbとの3日間のインキュベーション後のAU565細胞溶解物におけるHER2発現レベルの相対的パーセンテージ。HER2の量をHER2特異的捕捉ELISAを用いて定量し、非処理細胞と比較した阻害率として示した。アイソタイプ対照はIgG1-3G8-QITLとした。示されているデータは2回の実験の平均値 + 標準偏差であるが、ただし、単一特異性IgG1抗体の組み合わせについては1回のみ試験した。

【図 11】HER2 x HER2二重特異性抗体 (FITC) とリソソームマーカーLAMP1 (Cy5) との共局在分析。さまざまな単一特異性HER2抗体およびHER2 x HER2二重特異性抗体に関する、Cy5と重なり合うFITCのピクセル強度 (A)。各被験抗体に関して、3つの異なる画像のLAMP1 / Cy5陽性ピクセルにおけるFITCピクセル強度をプロットしている。単一特異性体は、二重特異性体と比較して、LAMP1 / Cy5陽性ピクセルでより低いFITCピクセル強度を示している。(B) 3つの異なる画像から算出した、LAMP1 / Cy5陽性ピクセル当たりのFITCピクセル強度の平均値。以上を総合すると、これらの結果は、二重特異性抗体は単一特異性抗体と比較してより高いレベルで、内部移行後にLamp1 / Cy5陽性小胞に局在することを指し示している。

【図 12】HER2単一特異性抗体および二重特異性抗体による増殖の障害。AU565細胞を、無血清細胞培地中にて10 μ g/mLのHER2抗体またはHER2 x HER2二重特異性抗体の存在下で播種した。3日後に、生細胞の量をAlamarblueを用いて定量し、細胞生存度を非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとして提示した。アイソタイプ対照抗体 (IgG1-b12) を陰性対照として用いた。示されているデータは、非処理細胞と比較した生存AU565細胞の5回の測定によるパーセンテージ \pm 標準偏差である。* は1つのデータポイントのみを示していることを指し示している。

【図 13】抗体はHER2のダウンモジュレーションを誘導した。10 μ g/mL抗体との3日間のインキュベーション後にAU565細胞溶解液において発現されたHER2の相対的パーセンテージ。HER2の量をHER2特異的捕捉ELISAを用いて定量し、非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとしてプロットした。示したデータは、3回の実験の平均 \pm 標準偏差である。

【図 14】HER2抗体 (FITC) とリソソームマーカーLAMP1 (Cy5) との共局在分析。さまざまな単一特異性HER2抗体に関して、FITCピクセル強度がCy5と重複している。各抗体に関して、3つの異なる画像のLAMP1 / Cy5陽性ピクセルにおけるFITCピクセル強度をプロットしている。群3抗体である098および153は、群2の抗体025およびベルツズマブ、ならびに群1の抗体169およびハーセプチンと比較して、LAMP1 / Cy5陽性区画において、より高いFITCピクセル強度を示している。

【図 15】フローサイトメトリーを用いて分析した、異なるHER2 ECD構築物をトランスフェクトしたCHO-S細胞に対するHER2抗体の結合。Hu-HER2 = 完全ヒトHER2、Hu-HER2-ch (I) CR1 = ニワトリドメインIを有するhu-HER2、Hu-HER2-ch (II) = ニワトリドメインIIを有するhu-HER2、hu-HER2-ch (III) = ニワトリドメインIIIを有するhu-HER2、およびHu-HER2-ch (IV) = ニワトリドメインIVを有するhu-HER2。示したデータは、1つの代表的な抗体であるTH1014-153の平均蛍光強度 (MFI) である。詳細については実施例27参照。

【図 16】雌性CB.17重症複合型免疫不全症 (SCID) マウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植モデルに対するHER2-HuMabのインビボ効果。示したデータは、各群当たりの平均腫瘍サイズ \pm S.E.M. (n = 各群当たりマウス10匹) (A、C) および生存 (B、D) である。詳細については実施例28参照。

【図 17】Balb / CヌードマウスにおけるBT-474乳腺腫瘍異種移植片に対するHER2 HuMabのインビボ効果。示されているデータは、各群当たりの平均腫瘍サイズ \pm S.E.M. (n = 各

10

20

30

40

50

群当たりマウス8匹)(A)および生存率(B)である。詳細については実施例29参照。

【図18】抗体で誘導されるHER2表面発現のダウンモジュレーション。HER2の表面発現を、再利用を阻止するモネンシンを伴ってまたは伴わずに、最終濃度10 µg/mLの表記の抗体と共に3時間インキュベーションした後に決定した。受容体の表面発現はQIFIKIT(登録商標)分析によって定量した。単一特異性HER2抗体は、非処理細胞との比較で、細胞表面に存在するHER2分子の数に影響を及ぼさなかった。二重特異性HER2 x HER2抗体は表面からのHER2ダウンモジュレーションをもたらし、それは対応する2つの単一特異性親抗体の組み合わせと同等であった。モネンシンは試料のすべてで表面発現に対してはわずかな影響しか及ぼさず、このことは、内部移行したHER2分子のうち表面に戻って再利用されるのはごくわずかであることを示唆する。グラフは平均+/-標準偏差を提示している。

10

【図19】AU565細胞上でのHER2 x HER2二重特異性抗体によるPBMC媒介性細胞傷害性。二重特異性抗体(凡例中にxで表記)の死滅活性を、親単一特異性抗体およびそれらの組み合わせ(凡例中に+で表記)と比較した。PBMC媒介性細胞傷害性アッセイにおけるHER2抗体によるAU565細胞の用量依存的死滅は、二重特異性HER2 x HER2抗体では保たれていた。ハーセプチンおよびIgG1-KLH(無関係な抗体)を、それぞれ陽性対照抗体および陰性対照抗体として用いた。N297Q突然変異の導入による2つのFcドメインのうち一方の不活性化は、IgG1-153-ITL x IgG1-153-K409R-N297Qに対するADCCの喪失をもたらした。

【図20】SCIDマウスのNCI-N87異種移植モデルにおける腫瘍成長を阻害するHER2 x HER2二重特異性抗体の有効性。マウスに対して、腫瘍接種後の第7日、14日および21日に飽和用量の抗体を投与した。各投与群当たりの第41日時点の平均腫瘍サイズを示している。試験したHER2 x HER2二重特異性抗体はいずれも、それらの単一特異性対応物およびこれらの2つの単一特異性抗体の組み合わせと比較して、より優れたインビボ有効性を明らかに示した。

20

【図21】SCIDマウスのNCI-N87異種移植モデルにおける腫瘍成長を阻害するHer2 x Her2二重特異性抗体の有効性。(A)には、腫瘍接種後の第7日および第14日に飽和用量の抗体を投与した、NCI-NS7皮下異種移植片を有するマウスにおける腫瘍発育(平均値および平均値の標準誤差)が示されている。Her2 x Her2二重特異性IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R抗体は、それらの単一特異性対応物およびこれらの2つの単一特異性抗体の組み合わせと比較して、より優れたインビボ有効性を明らかに示した。(B)には、腫瘍サイズが400 mm³未満であるマウスのパーセンテージが、Kaplan-Meierプロットの形で示されている。

30

【図22】ヒトIgG4-7D8とのFabアーム交換による二重特異性抗体の作製における、三重突然変異型(ITL)、二重突然変異型(IT、IL、TL)および単一突然変異型(L)のヒトIgG1-2F8間の比較。ヒトIgG1-2F8三重および二重突然変異体と、CPSCヒンジを有する野生型IgG4-7D8との間(A)、もしくは安定化されたヒンジを有する突然変異型IgG4-7D8-CPPCとの間(B)、または野生型CPSCもしくは安定化されたCPPCヒンジを有する単一突然変異型IgG1-2F8-F405LとIgG4-7D8との間(C)での、2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。二重および単一突然変異体を含む実験に関して、それぞれ0~20 µg/mLまたは0~10 µg/mLの濃度系列(全抗体)をELISAで分析した。二重突然変異型IgG1-2F8-ILと-TLとの組み合わせでは、三重突然変異型IgG1-ITLに類似した二重特異性EGFR/CD20結合が生じる。IgG1-2F8-ITとの組み合わせでは、二重特異性産物が生じない。単一突然変異型IgG1-2F8-F405Lとの組み合わせでは、二重特異性EGFR/CD20結合が生じる。

40

【図23】IgG1-2F8-ITL突然変異体とIgG1-7D8-K409X突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-ITL突然変異体と表記のIgG1-7D8-K409X突然変異体との間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。(A)0~20 µg/mLの濃度系列(全抗体)を分析した。陽性対照は、IgG1-2F8-ITL x IgG4-7D8-CPPCに由来する二重特異性抗体の精製バッチである。(B)交換は、陽性対照(黒のバー)と対比した、20 µg/mLでの二重特異性結合として提示されている。ダークグレーのバーは、IgG4対照(IgG4-7D8 x IgG4-2F8)の間、陰性対照(IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R)の間、およびIgG1-2F8-ITLとIgG4-7D8-CPPCとの間の二重特異性結合を表し

50

ている。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-7D8-K409X突然変異体とIgG1-2F8-ITLとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。

【図24】IgG1-2F8-F405X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。表記のIgG1-2F8-F405X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEAで誘導されるインビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。(A) 0~20 µg/mLの濃度系列(全抗体)をELISAで分析した。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409Rに由来する二重特異性抗体の精製バッチである。(B) 交換は、陽性対照(黒のバー)と対比した、抗体濃度20 µg/mLでの二重特異性結合として提示されている。ダークグレーのバーは、IgG4対照(IgG4-7D8 x IgG4-2F8)の間および陰性対照(IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R)の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-F405X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rまたは対照との間でのFabアーム交換反応による結果を表している。

10

【図25】IgG1-2F8-Y407X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。表記のIgG1-2F8-Y407X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。(A) 0~20 µg/mLの濃度系列(全抗体)をELISAで分析した。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409Rに由来する、二重特異性抗体の精製バッチである。(B) 交換は、陽性対照(黒のバー)と対比した、20 µg/mL抗体濃度での二重特異性結合として提示されている。ダークグレーのバーは、IgG4対照(IgG4-7D8 x IgG4-2F8)の間および陰性対照(IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R)の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-Y407X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rまたは対照との間でのFabアーム交換反応による結果を表している。

20

【図26】表記のIgG1-2F8-L368X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0~20 µg/mLの濃度系列(全抗体)を用いてELISAによって判定した(A)。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409Rに由来する二重特異性抗体の精製バッチである。(B) 陽性対照(黒のバー)と対比した、20 µg/mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照(IgG4-7D8 x IgG4-2F8)の間および陰性対照(IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R)の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-L368X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。

30

【図27】表記のIgG1-2F8-K370X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0~20 µg/mLの濃度系列(全抗体)を用いてELISAによって判定した(A)。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L x IgG1-7D8-K409Rに由来する、二重特異性抗体の精製バッチである。(B) 陽性対照(黒のバー)と対比した、20 µg/mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照(IgG4-7D8 x IgG4-2F8)の間および陰性対照(IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R)の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-D370X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。

【図28】表記のIgG1-2F8-D399X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0~20 µg/mLの濃度系列(全抗体)を用いてELISAによって判定した(A)。(B) 陽性対照(黒のバー)と対比した、抗体濃度20 µg/mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照(IgG4-7D8 x IgG4-2F8)の間および陰性対照(IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R)の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-D399X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。

40

【図29】表記のIgG1-2F8-T366X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0~20 µg/mLの濃度系列(全抗体)を用いてELISAによって判定した(A)。(B) 陽性対照(黒のバー)と対比した、抗体濃度20 µg/mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照(IgG4-7D8 x IgG4-2F8)の間および陰性対照(IgG1-2F8 x IgG1-7D8-K409R)の間での二重特異性結

50

合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-T366X突然変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。

【発明を実施するための形態】

【0019】

発明の詳細な説明

定義

「HER2」(ErbB-2、NEU、HER-2、およびCD340とも知られる)という用語は、本明細書において用いられる時には、ヒト上皮細胞成長因子受容体2(SwissProt P04626)を指し、腫瘍細胞を含む細胞によって天然に発現されたHER2、またはHER2遺伝子もしくはDNAでトランスフェクトされた細胞上に発現されたHER2の任意の変種、アイソフォーム、および種ホモログを含む。種ホモログには、アカゲザルHER2(アカゲザル(*macaca mulatta*); GenBankアクセッション番号GI:109114897)が含まれる。

【0020】

「免疫グロブリン」という用語は、一対が低分子量の軽鎖(L)、一対が重鎖(H)の二対のポリペプチド鎖からなり、4本全てがジスルフィド結合で相互接続されている構造的に関連する糖タンパク質のクラスをいう。免疫グロブリンの構造は詳細に特徴づけられている。例えば、Fundamental Immunology Ch.7(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.(1989))を参照されたい。簡単に述べると、それぞれの重鎖は、典型的には、重鎖可変領域(本明細書ではV_HまたはVHと省略する)および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、C_H1、C_H2、およびC_H3からなる。それぞれの軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域(本明細書ではV_LまたはVLと省略する)および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメインC_Lからなる。V_H領域およびV_L領域は、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる超可変性領域(または配列が著しく変化し得る、および/もしくは構造が規定されたループの形をとり得る超可変領域)にさらに細分することができ、超可変性領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる保存領域と共に散在している。それぞれのV_HおよびV_Lは、典型的には、3つのCDRおよび4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で並べられている(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917(1987)も参照されたい)。特に定めのない限り、または文脈によって明らかに否定されない限り、本明細書のCDR配列はIMGT規則に従って特定される(Brochet X., Nucl Acids Res.2008;36:W503-508 およびLefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27:209-212; インターネットhttpアドレス imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanlgも参照されたい)。しかしながら、抗体配列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)に記載の方法によって行うこともできる(本明細書における「Kabatと同様の可変ドメイン残基ナンバリング」、「Kabat位置」、または「Kabatによる」などの句は、このナンバリングシステムをいう)。特に、定常領域におけるアミノ酸のナンバリングの場合、EUインデックスナンバリングシステム(Kabatら、前記)を使用することができる。Kabat残基ナンバリングは、ある特定の抗体について、Kabatら、前記において記載されている。

【0021】

本発明において、アミノ酸位置に対する言及は、文脈と矛盾する場合を除き、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)に準拠している。

【0022】

本発明の文脈において「抗体」(Ab)という用語は、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそのいずれかの誘導体を指し、これらは、代表的な生理学的条件下で、相当な長さの半減期、例えば少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間以上、約48時間以上、約3日、4日、5日、6日、7日以上など、あるいは他の

任意の関連する、機能によって規定された期間（例えば、抗体と抗原との結合に関連する生理学的応答を誘導する、促進する、増強する、および/もしくは調節するのに十分な時間、ならびに/または抗体がエフェクター活性を高めるのに十分な時間）で抗原に特異的に結合する能力を有する。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体（Ab）の定常領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および補体系成分、例えば補体活性化の古典経路の第1の成分であるC1qを含む、宿主組織または宿主因子との結合を媒介することができる。HER2抗体はまた、二重特異性抗体、ダイアボディ（diabody）、または類似の分子などの多重特異性抗体でもよい（例えば、ダイアボディの説明については、PNAS USA 90（14），6444-8（1993）を参照されたい）。実際には、本発明によって提供される二重特異性抗体、ダイアボディなどは、HER2の一部に加えて、任意の適切な標的に結合することができる。前記のように、本明細書において抗体という用語は、特に定めのない限り、または文脈によって明らかに否定されない限り、抗原結合断片である抗体断片、すなわち抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体断片を含む。抗体の抗原結合機能は完全長抗体の断片によって果たし得ることも示されている。「抗体」という用語の中に含まれる抗原結合断片の例には、（i）Fab'またはFab断片、 V_L 、 V_H 、 C_L 、および C_H1 ドメインからなる一価断片、またはWO2007059782（Genmab）に記載の一価抗体；（ii） $F(ab')_2$ 断片、2つのFab断片がヒンジ領域でのジスルフィド架橋によって連結された二価断片；（iii） V_H および C_H1 ドメインから本質的になるFd断片；（iv）抗体のシングルアームの V_L および V_H ドメインから本質的になるFv断片、（v） V_H ドメインから本質的になり、ドメイン抗体（Holt et al；Trends Biotechnol. 2003 Nov；21（11）：484-90）とも呼ばれる、dAb断片（Ward et al.，Nature 341，544-546（1989））；（vi）キャメルド（camelid）またはナノボディ（nanobody）（Reverts et al；Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan；5（1）：111-24）、ならびに（vii）単離された相補性決定領域（CDR）が含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメインである V_L および V_H は別々の遺伝子によってコードされるが、 V_L および V_H 領域が対形成して一価分子（単鎖抗体または単鎖Fv（scFv））と知られる。例えば、Bird et al.，Science 242，423-426（1988）およびHuston et al.，PNAS USA 85，5879-5883（1988）を参照されたい）を形成する1本のタンパク質鎖として作られるのを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いて接続されてもよい。このような単鎖抗体は、特に定めのない限り、または文脈によって明らかに示されない限り、抗体という用語の中に含まれる。このような断片は、一般的に、抗体の意味の中に含まれるが、ひとまとめでして、およびそれぞれ独立して、本発明の独特の特徴であり、異なる生物学的な特性および有用性を示す。本発明の文脈における、これらの抗体断片および他の有用な抗体断片は、そのような断片の二重特異性抗体の形態と同様、本明細書においてさらに議論される。抗体という用語は、特に定めのない限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（mAb）、抗体様ポリペプチド、例えばキメラ抗体およびヒト化抗体、ならびに任意の公知の技法、例えば酵素切断、ペプチド合成、および組換え技法によって提供される抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体断片（抗原結合断片）も含むことも理解すべきである。作製される抗体は任意のアイソタイプを有してよい。

【0023】

「二重特異性抗体」という用語は、本発明の文脈において、（配列情報に基づいて）2種類の異なる抗原結合領域を有する抗体と解釈されることとする。これは異なる標的との結合を意味するが、1つの標的内の異なるエピトープとの結合も同様に含む。

【0024】

本明細書で用いる場合、「Fabアーム」または「アーム」という用語は、文脈と矛盾する場合を除き、1つの重鎖-軽鎖ペアのことを指す。

【0025】

本明細書で用いる場合、「Fc領域」という用語は、文脈と矛盾する場合を除き、少なくともヒンジ領域、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む抗体領域のことを指す。

【0026】

本明細書で使用する「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリンクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM）をいう。

【0027】

「一価抗体」という用語は、本発明の文脈では、抗体分子が1種類の抗原分子にしか結合できない、従って、抗原架橋できないことを意味する。

【0028】

「エフェクター機能が欠損している抗体」または「エフェクター機能欠損性抗体」は、1つまたは複数のエフェクター機構、例えば補体活性化もしくはFc受容体結合を活性化する能力が大幅に低下しているかまたはその能力が無い抗体をいう。従って、エフェクター機能欠損性抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）および/もしくは補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介する能力が大幅に低下しているかまたはその能力が無い。このような抗体の一例はIgG4である。別の例は、補体タンパク質およびFc受容体との相互作用を強く減少させることのできる、Fc領域内への突然変異の導入である。例えば、Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23:403-411; Oganessian, Acta Crys. 2008, D64, 700-704; およびShields et al., JBC 2001, 276: 6591-6604を参照のこと。

【0029】

「HER2抗体」または「抗HER2抗体」とは、抗原HER2と特異的に結合する、上記のような抗体のことである。

【0030】

「HER2 x HER2抗体」または「抗HER2 x HER2抗体」とは、2種類の抗原結合領域を含み、そのいずれもが抗原HER2と、任意で異なる複数のHER2エピトープと特異的に結合する、多重特異性抗体、任意で二重特異性抗体のことである。

【0031】

本明細書で使用する「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インピト口でのランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発によって、またはインピボで体細胞変異によって導入された変異）を含んでもよい。しかしながら、本明細書で使用する「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体を含むことは意図されない。

【0032】

本明細書中で使用するヒト抗体は、その抗体がヒト免疫グロブリン配列を用いた系から、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを免疫することによって、またはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって獲得される場合、特定の生殖系列配列に「由来」し、ここで、選択されたヒト抗体は、アミノ酸配列において、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列と少なくとも90%、例えば少なくとも95%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも97%、例えば少なくとも98%、または例えば、少なくとも99%同一である。典型的には、特定のヒト生殖系列配列由来のヒト抗体は、重鎖CDR3外では、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によりコードされるアミノ酸配列と、20個以下のアミノ酸の違い、例えば10個以下のアミノ酸の違い、例えば9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、または5個以下、例えば4個以下、3個以下、2個以下、または1個以下のアミノ酸の違いを示す。

【0033】

本明細書で用いる場合、「重鎖（heavy chain）抗体」または「重鎖（heavy-chain）抗体」という用語は、2つの重鎖のみからなり、抗体に通常認められる2つの軽鎖を欠く抗体のことを指す。例えばラクダ科動物（camelid）などに天然に存在する重鎖抗体は、VLドメインを持たないにもかかわらず、抗原と結合することができる。

【0034】

好ましい態様において、本発明の抗体は単離されている。本明細書で使用する「単離さ

10

20

30

40

50

れた抗体」は、抗原特異性の異なる他の抗体を実質的に含まない抗体をいうことが意図される（例えば、HER2に特異的に結合する単離された抗体は、HER2以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、HER2のエピトープ、アイソフォーム、または変種に特異的に結合する単離された抗体は、他の関連抗原、例えば他の種に由来する抗原（例えば、HER2の種ホモログ）との交差反応性を有することがある。さらに、単離された抗体は、他の細胞の材料および/または化学物質を実質的に含まないことがある。本発明の1つの態様では、詳細に明らかにされた組成物において、抗原結合特異性の異なる、2種類以上の「単離された」モノクローナル抗体が組み合わせられる。

【0035】

2種類以上の抗体の文脈に関して本明細書において用いられる場合、「と競合する」または「とクロス競合する」という用語は、2種類以上の抗体がHER2との結合において競合する、例えば、実施例14に記載のアッセイにおいてHER2との結合において競合することを示す。抗体は、好ましくは、実施例14のアッセイを用いて確かめられた時に、1つまたは複数の他の抗体と25%以上競合すれば、1つまたは複数の他の抗体とHER2との結合を「ブロック」または「クロスブロック」し、25%~74%は「部分ブロック」に相当し、75%~100%は「完全ブロック」に相当する。一部の抗体対については、実施例のアッセイにおける競合またはブロッキングは一方の抗体がプレート上にコーティングされ、他方の抗体が競合に用いられた時のみに観察され、逆は同じではない。特に定めのない限り、または文脈によって明らかに否定されない限り、「と競合する」、「とクロス競合する」、「ブロックする」、または「クロスブロックする」という用語は、本明細書において用いられる場合、このような抗体対をカバーすることも意図される。

【0036】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定基を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸または糖側鎖などの分子の表面群からなり、通常、特異的な三次元構造特性ならびに特異的な電荷特性を有する。コンホメーションエピトープおよび非コンホメーションエピトープは、変性溶媒の存在下では前者への結合が失われるが、後者への結合が失われないという点で区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、および結合に直接関与しない他のアミノ酸残基、例えば特異的に抗原に結合するペプチドによって効果的にブロックされるかまたは覆われるアミノ酸残基（言い換えると、このアミノ酸残基は、特異的に抗原に結合するペプチドのフットプリント（footprint）の中にある）を含むことがある。

【0037】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、分子組成が1種類しかない抗体分子の調製物をいう。モノクローナル抗体組成物は、ある特定のエピトープに対して結合特異性および親和性を1つしか示さない。従って、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する、結合特異性を1つしか示さない抗体をいう。ヒトモノクローナル抗体は、トランスジェニック非ヒト動物またはトランスクロモソーム非ヒト動物、例えばヒト重鎖トランスジェニックおよび軽鎖トランスジェニックを含むゲノムを有するトランスジェニックマウスから得られたB細胞が不死化細胞と融合したハイブリドーマによって作製することができる。

【0038】

抗体と所定の抗原またはエピトープとの結合に関して本明細書で使用する「結合」という用語は、典型的には、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって、BIAcore 3000 機器において、リガンドとして抗原、分析物として抗体を用いて確かめられた時に、約 10^{-7} M以下、例えば約 10^{-8} M以下、例えば約 10^{-9} M以下、約 10^{-10} M以下、または約 10^{-11} Mまたはさらにそれ未満の K_D に対応する親和性での結合であり、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）との結合の親和性の少なくとも1/10以下、例えば少なくとも1/100以下、例えば少なくとも1/1,000以下、例えば少なくとも1/10,000以下、例えば少なくとも1/100,000以下の K_D に対応する親和性で所定の抗原に結合する。親和性が小さくなる量は抗体の K_D に依存し、その結果、抗体の K_D が非常に低

い（すなわち、抗体が高特異性である）場合、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも小さくなる量は少なくとも $1/10,000$ 以下であり得る。

【0039】

本明細書で使用する「 k_d 」（ sec^{-1} ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数をいう。この値は、 k_{off} 値とも呼ばれる。

【0040】

本明細書で使用する「 k_a 」（ $\text{M}^{-1}\text{xsec}^{-1}$ ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数をいう。

【0041】

本明細書で使用する「 K_D 」（ M ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数をいう。

10

【0042】

本明細書で使用する「 K_A 」（ M^{-1} ）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数をいい、 k_a を k_d で割ることによって得られる。

【0043】

本明細書で用いる場合、「第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用」という用語は、第1のCH3 / 第2のCH3ヘテロ二量体タンパク質における第1のCH3領域と第2のCH3領域との間の相互作用のことを指す。

【0044】

本明細書で用いる場合、「第1および第2のCH3領域間のホモ二量体相互作用」とは、第1のCH3 / 第1のCH3ホモ二量体タンパク質における第1のCH3領域ともう1つの第1のCH3領域との間の相互作用、および、第2のCH3 / 第2のCH3ホモ二量体タンパク質における第2のCH3領域ともう1つの第2のCH3領域との間の相互作用のことを指す。

20

【0045】

「還元条件」または「還元環境」という用語は、基質、本明細書においては抗体のヒンジ領域内のシステイン残基が、酸化されるよりも還元される可能性の方が高い条件または環境のことを指す。

【0046】

本明細書で使用する「増殖を阻害する」（例えば、腫瘍細胞などの細胞を指している場合）という用語は、例えば、実施例（例えば実施例16）におけるアッセイによって確かめられた時に、細胞とHER2抗体が接触した時に、HER2抗体と接触していない同じ細胞の増殖と比較して任意の実質的な細胞増殖減少、例えば、細胞培養増殖の少なくとも約10%、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、またはトラスツズマブなどの参照抗体と少なくとも同程度の阻害を含むことが意図される。

30

【0047】

本明細書で使用する「増殖を促進する」（例えば、腫瘍細胞などの細胞を指している場合）という用語は、例えば、実施例におけるアッセイによって確かめられた時に、細胞とHER2抗体が接触した時に、HER2抗体と接触していない同じ細胞の増殖と比較して任意の実質的な細胞増殖増加、例えば、細胞培養増殖の少なくとも約10%、少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、またはF5などの参照抗体と少なくとも同程度の促進を含むことが意図される。

40

【0048】

本明細書で使用する「内部移行」という用語は、HER2抗体に関して用いられた時に、抗体が細胞表面および/または周囲媒体から、例えば、エンドサイトーシスを介してHER2発現細胞に内部移行される任意の機構を含む。抗体の内部移行は、内部移行された抗体の量を測定する直接アッセイ（例えば、実施例19に記載のfab-CypHer5Eアッセイ）、または内部移行された抗体-毒素結合体の作用が測定される間接アッセイ（例えば、実施例18の抗-ETA'アッセイ）を用いて評価することができる。

【0049】

本発明はまた、実施例の抗体のVL領域、VH領域、または1つもしくは複数のCDRの機能的

50

変種を含む抗体を提供する。HER2抗体に関して用いられるVL、VH、またはCDRの機能的変種は依然として、親抗体の親和性／アピディティおよび／または特異性／選択性の少なくとも相当な部分（少なくとも約50％、60％、70％、80％、90％、95％以上）を抗体が保持することを可能にする。場合によっては、このようなHER2抗体は、親抗体より高い親和性、選択性、および／または特異性に関連することがある。

【0050】

このような機能的変種は、典型的には、親抗体と大きな配列同一性を保持している。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適アラインメントのために導入される必要のある、ギャップの数およびそれぞれのギャップの長さを考慮に入れた、これらの配列が共有する同一の位置の数の関数（すなわち、%相同性＝同一の位置の数／位置の総数×100）である。2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）の中に組み込まれている、E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4, 11-17 (1988) のアルゴリズムを使用し、PAM120ウエイト残基表、12のギャップレングスペナルティ、および4のギャップペナルティを用いて決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970) アルゴリズムを用いて決定することができる。

【0051】

例示的な変種には、対応するコンセンサス配列中に「X」で示された1つまたは複数の「変種」アミノ酸位置において、図1および図2に示した親抗体VH配列および／またはVL配列とは異なる変種が含まれる。好ましい変種は、新たなアミノ酸が、図1および図2のアラインメント配列の1つの対応する位置にあるアミノ酸より選択される変種である（CDR配列変種に関する詳細については、表4を参照されたい）。または、もしくはさらに、VH変種、VL変種、またはCDR変種の配列は、主に、保存的置換によって親抗体配列のVH、VL、またはCDRの配列と異なってもよい。例えば、変種における置換の少なくとも10個、例えば、少なくとも9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個、または1個は保存的アミノ酸残基交換である。

【0052】

本発明の文脈において、保存的置換は、以下の表に反映されるアミノ酸クラスの中の置換によって定義することができる。

【0053】

保存的置換のためのアミノ酸残基クラス

酸性残基	Asp (D) および Glu (E)
塩基性残基	Lys (K), Arg (R), および His (H)
親水性非荷電残基	Ser (S), Thr (T), Asn (N), および Gln (Q)
脂肪族非荷電残基	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), および Ile (I)
非極性非荷電残基	Cys (C), Met (M), および Pro (P)
芳香族残基	Phe (F), Tyr (Y), および Trp (W)

【0054】

本発明の文脈においては、別に指定のある場合を除き、突然変異を記述するのに、以下の表記法を用いる；i) 所定の位置におけるアミノ酸の置換は例えばK405Rなどと記述され、これは位置405におけるリジンのアルギニンによる置換を意味する；およびii) 特定の変異体に関しては、任意のアミノ酸残基を指し示すために、コードXaaおよびXを含む特定の3文字コードまたは1文字コードが用いられる。すなわち、位置405におけるリジンのアルギニンによる置換はK405Rと表記され、または位置405におけるリジンの任意のアミノ酸残基による置換はK405Xと表記される。位置405におけるリジンの欠失の場合には、それは

K405*によって指し示される。

【 0 0 5 5 】

本明細書で使用する「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）という用語は、発現ベクター、例えば本発明の抗体をコードする発現ベクターが導入されている細胞をいうことが意図される。組換え宿主細胞には、例えばトランスフェクトマ（transfectoma）、例えばCHO細胞、HEK293細胞、NS/O細胞、およびリンパ球細胞が含まれる。

【 0 0 5 6 】

「トランスジェニック非ヒト動物」という用語は、1つまたは複数のヒト重鎖および/または軽鎖のトランスジーンまたはトランスクロモソーム（transchromosome）を含む（動物の天然ゲノムDNAに組み込まれた、または組み込まれていない）ゲノムを有し、完全なヒト抗体を発現することができる非ヒト動物をいう。例えば、トランスジェニックマウスは、HER2抗原および/またはHER2発現細胞で免疫した時にヒトHER2抗体を産生するように、ヒト軽鎖トランスジーンおよびヒト重鎖トランスジーンまたはヒト重鎖トランスクロモソームを有することができる。ヒト重鎖トランスジーンは、トランスジェニックマウス、例えばHuMab（登録商標）マウス、例えばHCo7、HCo12、もしくはHCo17マウスのようにマウスの染色体DNAに組み込まれてもよく、または、ヒト重鎖トランスジーンは、WO02/43478に記載のトランスクロモソームKMマウスのように染色体外に維持されてもよい。さらに大きなヒトAb遺伝子レパートリーを有する類似のマウスにはHCo7およびHCo20が含まれる（例えば、WO2009097006を参照されたい）。このようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウス（総称して本明細書において「トランスジェニックマウス」と呼ばれる）は、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチを受けることによって、ある特定の抗原に対して、複数のアイソタイプのヒトモノクローナル抗体（例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、および/またはIgE）を産生することができる。トランスジェニック非ヒト動物はまた、このような特異的抗体をコードする遺伝子を導入することによって、例えばこれらの遺伝子と、動物の乳の中に発現される遺伝子とを機能的に連結することによって、ある特定の抗原に対する抗体を産生するのに使用することもできる。

【 0 0 5 7 】

「治療」とは、症状または疾患状態を緩和する、寛解させる、抑止する、または根絶する（治癒する）目的で、治療活性のある有効量の本発明の化合物を投与することという。

【 0 0 5 8 】

「有効量」または「治療的有效量」とは、望ましい治療結果を得るために必要な投与および時間で効果を示す量をいう。HER2抗体の治療的有效量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに個体においてHER2抗体が望ましい応答を誘発する能力などの要因に応じて変わることがある。治療的有效量はまた、抗体または抗体部分の治療に有益な作用が毒性作用または有害作用を上回る量でもある。

【 0 0 5 9 】

「抗イディオタイプ」抗体は、概して抗体の抗原結合部位に結合する独特の決定基を認識する抗体である。

【 0 0 6 0 】

本発明のさらなる局面および態様

上記のように、本発明は、HER2と結合する2種類の異なる抗原結合領域を含む二重特異性抗体に関する。

【 0 0 6 1 】

1つの局面において、本発明は、HER2の重複しないエピトープに対する結合特異性のよう異なる結合特異性を有する、本明細書に記載のHER2抗体由来の第1の抗原結合部位および本明細書に記載のHER2抗体由来の第2の抗原結合部位を含む二重特異性分子、すなわち、例えば実施例14に記載したように試験した場合に、第1および第2の抗原結合領域がHER2に対する結合をめぐって互いにクロスブロックすることのない二重特異性抗体に関する。

【 0 0 6 2 】

1つの態様において、二重特異性抗体は、以下に述べるクロスブロック群1、2、3または4の抗体に由来する少なくとも1つの抗原結合領域を含む。1つの態様において、二重特異性抗体は、クロスブロック群1、2、3および4、例えばクロスブロック群4から選択された参照抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合する抗体に由来する少なくとも1つの抗原結合領域を含む。1つの態様において、二重特異性抗体は、クロスブロック群1、2、3および4の抗体、任意で複数の異なるクロスブロック群の抗体に由来する、2種類の異なる抗原結合領域を含む。1つの態様において、二重特異性抗体は、クロスブロック群1、2、3および4の、任意で複数の異なるクロスブロック群の参照抗体と同じエピトープとそれぞれがクロスブロックするかまたは結合する抗体に由来する、2種類の異なる抗原結合領域を含む。例えば、二重特異性抗体は、クロスブロック群1、2、3または4の抗体由来の1つの抗原結合領域、およびトラスツズマブまたはペルツズマブに由来する1つの抗原結合領域を含みうる。

10

【0063】

したがって、本発明の二重特異性抗体は、第1および第2の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2 (HER2) 上の異なるエピトープと結合する、第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含みうる。

【0064】

本発明の二重特異性抗体の第1および第2の抗原結合領域は、クロスブロック群1、2、3および4のいずれかに由来する抗原結合領域を含みうる。本発明の二重特異性抗体は、HER2と結合する2種類の異なる抗原結合領域を含む。その上、以下に述べるように、本発明の二重特異性抗体を生産するための1つの方法は、第1および第2のHER2抗体を還元条件下でインキュベートすることに基づく。

20

【0065】

本発明の二重特異性抗体の抗原結合領域および本発明の第1または第2のHER2抗体の抗原結合領域は、本明細書に記載のクロスブロック群1、2、3および4のいずれかに属しうる。したがって、本発明の第1または第2のHER2抗体は、以下に述べるクロスブロック群1、2、3および4のHER2抗体のいずれかの抗原結合領域を含みうる。

【0066】

本発明のさらなる、または代替的な態様において、二重特異性抗体は、クロスブロック1、2、3または4のヒト抗体のうちの1つまたは複数の抗原結合領域を含み、これがHER2に対する結合をブロックする。

30

【0067】

本発明のさらなる、または代替的な態様において、二重特異性抗体は、可溶性HER2上の、クロスブロック1、2、3または4のヒト抗体のうちの1つまたは複数と同じエピトープに対する結合をブロックする、抗原結合領域を含む。

【0068】

本発明のさらなる、または代替的な態様において、二重特異性抗体は、HER2上の、クロスブロック1、2、3または4のヒト抗体のうちの1つまたは複数と同じエピトープと結合する、抗原結合領域を含む。

【0069】

40

HER2抗体および / または抗原結合領域 クロスブロック群1

1つの局面において、本発明の二重特異性抗体は、本明細書に記載のクロスブロック群1のヒト抗体のうちの1つもしくは複数の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、または本明細書に記載のクロスブロック群1のヒト抗体のうちの1つもしくは複数と同じ、HER2上のエピトープと結合する、1つの抗原結合領域を含む。別の具体的な態様において、二重特異性抗体はその場合、クロスブロック群2、3または4の抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合する、第2の抗原結合領域を含む。

【0070】

50

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載したように判定した場合に、トラスツマブの可溶性HER2に対する結合をクロスブロックする。

【0071】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域を含む参照抗体（169）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0072】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：12の配列を含むVL領域を含む参照抗体（050）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

10

【0073】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域を含む参照抗体（084）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0074】

1つの態様において、抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む参照抗体の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する：

- (a) SEQ ID NO：77の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：78の配列を含むVL領域（049）；
- (b) SEQ ID NO：79の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：80の配列を含むVL領域（051）；
- (c) SEQ ID NO：81の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：82の配列を含むVL領域（055）；
- (d) SEQ ID NO：83の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：84の配列を含むVL領域（123）；
- (e) SEQ ID NO：85の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：86の配列を含むVL領域（161）；ならびに
- (f) SEQ ID NO：87の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：88の配列を含むVL領域（124）。

20

30

【0075】

本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、1つの抗原結合領域はHER2と結合し、かつ、本明細書に記載の抗体におけるそのような配列と類似または同一のVH CDR3、VH領域および／またはVL領域配列を含む。

【0076】

1つの態様において、抗原結合領域は、以下からなる群より選択される配列を有するVH CDR3領域を含む：

SEQ ID NO：11（050、049、051、055）、ここで任意でVH領域はIgHV3-21-1生殖細胞系列配列に由来する；

SEQ ID NO：130、例えばSEQ ID NO：18の配列（084）、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-04生殖細胞系列配列に由来する；

40

SEQ ID NO：133（169、123、161、124）、例えばSEQ ID NO：4の配列（169）、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列配列に由来する。

【0077】

1つの態様において、抗原結合領域は、図1に示されているように、抗体123、161または124のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列に由来する。

【0078】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVH領域を含む：

50

(a) SEQ ID NO : 9、127および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (050) を含むVH領域 ; ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する ;

(b) それぞれSEQ ID NO : 128、129および130であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (084) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-04生殖細胞系列に由来する ; ならびに

(c) それぞれSEQ ID NO : 131、132および133であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (169) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列に由来する。

【0079】

10

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様(a)または(b)から選択されるVH領域、ならびに、それぞれSEQ ID NO : 13、XAS (ここでXはAまたはVである) およびSEQ ID NO : 155であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えば、SEQ ID NO : 13または20から選択されるCDR1配列、AASまたはVASであるCDR2、ならびにSEQ ID NO : 14および21から選択されるCDR3配列を含むVL領域 (050、084) を含み ; ここで任意でVL領域はIgKV1-12-01生殖細胞系列に由来する。

【0080】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様(c)であるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO : 6、DXS (ここでX=AまたはT) およびSEQ ID NO : 156であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (169) を含み、ここで任意でVL領域はIgKV3-11-01に由来する。

20

【0081】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 6、DASおよびSEQ ID NO : 7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (169) を含む。

【0082】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 13、AASおよびSEQ ID NO : 14であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (050) を含む。

30

【0083】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 20、VASおよびSEQ ID NO : 21であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (084) を含む。

【0084】

別の態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものを含む :

(a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (169) ;

(b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (050) ;

40

(c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (084) ;

(d) SEQ ID NO : 77の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 78の配列を含むVL領域 (049) ;

(e) SEQ ID NO : 79の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 80の配列を含むVL領域 (051) ;

(f) SEQ ID NO : 81の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 82の配列を含むVL領域 (055) ;

(g) SEQ ID NO : 83の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 84の配列を含む

50

むVL領域（123）；

（h）SEQ ID NO：85の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：86の配列を含むVL領域（161）；

（i）SEQ ID NO：87の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：88の配列を含むVL領域（124）；ならびに／または

（j）前記の抗体もしくは抗原結合領域のいずれかの変異体であって、好ましくは最大で1つ、2つもしくは3つのアミノ酸修飾、より好ましくはアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換、および、新たなアミノ酸が、図1もしくは2におけるアラインメントを行った配列において同じ位置のアミノ酸、特に対応するコンセンサス配列において「X」と示された位置のアミノ酸であるような置換）を有する、前記変異体。

10

【0085】

クロスブロック群2

本発明の抗体の1つの局面において、二重特異性抗体は、本明細書に記載のクロスブロック群2のヒト抗体のうちの1つもしくは複数の、HER2に対する結合をブロックするか、または本明細書に記載のクロスブロック群2のヒト抗体のうちの1つもしくは複数と同じ、HER2上のエピトープと結合する、1つの抗原結合領域を含む。

【0086】

別の具体的な態様において、二重特異性抗体はその場合、クロスブロック群1、3または4の抗体の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をクロスブロックする、ブロックする、またはそれと同じエピトープと結合する、第2の抗原結合領域を含む。

20

【0087】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載したように判定した場合に、ペルツズマブの可溶性HER2に対する結合をクロスブロックする。

【0088】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む参照抗体（025）の、可溶性HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0089】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域を含む参照抗体（091）の、可溶性HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

30

【0090】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：39の配列を含むVL領域を含む参照抗体（129）の、可溶性HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0091】

1つの態様において、抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む参照抗体の、可溶性HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する：

（a）SEQ ID NO：89の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：90の配列を含むVL領域（001）；

40

（b）SEQ ID NO：91の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：92の配列を含むVL領域（143）；

（c）SEQ ID NO：93の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：94の配列を含むVL領域（019）；

（d）SEQ ID NO：95の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：96の配列を含むVL領域（021）；

（e）SEQ ID NO：97の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：98の配列を含むVL領域（027）；

（f）SEQ ID NO：99の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：100の配列を含むVL領域（03

50

2)

(g) SEQ ID NO : 101の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 102の配列を含むVL領域 (035) ;

(h) SEQ ID NO : 103の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 104の配列を含むVL領域 (036) ;

(i) SEQ ID NO : 105の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 106の配列を含むVL領域 (054) ; ならびに

(j) SEQ ID NO : 107の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 108の配列を含むVL領域 (094) 。

【 0 0 9 2 】

本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、本明細書に記載の新規抗体の配列と類似または同一のVH CDR3、VH領域および/またはVL領域配列を含む。

【 0 0 9 3 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択される配列を有するVH CDR3領域を含む :

SEQ ID NO : 136、例えばSEQ ID NO : 25の配列 (025) 、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-1生殖細胞系列配列に由来する ;

SEQ ID NO : 139、例えばSEQ ID NO : 31の配列 (091) 、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-01生殖細胞系列配列に由来する ; および

SEQ ID NO : 142、例えばSEQ ID NO : 38の配列 (129) 、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-01生殖細胞系列配列に由来する。

【 0 0 9 4 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、図1に示されているような抗体001、143、019、021、027、032、035、036、054または094のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-1生殖細胞系列に由来する。

【 0 0 9 5 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVH領域を含む :

(a) SEQ ID NO : 134、135および136であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (025) を含むVH領域 ; ここで任意でVH領域はIgHV4-34-1生殖細胞系列に由来する ;

(b) それぞれSEQ ID NO : 137、138および139であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (091) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-01生殖細胞系列に由来する ; ならびに

(c) それぞれSEQ ID NO : 140、141および142であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (129) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-01生殖細胞系列に由来する。

【 0 0 9 6 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様(a)から選択されるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO : 157、AASおよびSEQ ID NO : 164であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばそれぞれSEQ ID NO : 27、AASおよびSEQ ID NO : 28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (025) を含むVL領域を含み ; ここで任意でVL領域はIgKV1D-16-01生殖細胞系列に由来する。

【 0 0 9 7 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様(b)から選択されるVH領域、ならびに、それぞれSEQ ID NO : 33、AX₁X₂ (ここでX₁はAまたはT、好ましくはAであり ; X₂はSまたはF、好ましくはSである) およびSEQ ID NO : 158であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばそれぞれSEQ ID NO : 33、AASおよびSEQ ID NO : 34であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含み (091) ; ここで任意でVL領域はIg

10

20

30

40

50

KV1D-16-01生殖細胞系列に由来する。

【 0 0 9 8 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様(c)であるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO : 40、DASおよびSEQ ID NO : 41であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含み(129)、ここで任意でVL領域はIgKV3-11-01に由来する。

【 0 0 9 9 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 27、AASおよびSEQ ID NO : 28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む(025)。

10

【 0 1 0 0 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 33、AASおよびSEQ ID NO : 34であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む(091)。

【 0 1 0 1 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 40、DASおよびSEQ ID NO : 41であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む(129)。

20

【 0 1 0 2 】

別の態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものを含む：

(a) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域(025)；

(b) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 32の配列を含むVL領域(091)；

(c) SEQ ID NO : 35の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 39の配列を含むVL領域(129)；

(d) SEQ ID NO : 89の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 90の配列を含むVL領域(001)；

30

(e) SEQ ID NO : 91の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 92の配列を含むVL領域(143)；

(f) SEQ ID NO : 93の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 94の配列を含むVL領域(019)；

(g) SEQ ID NO : 95の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 96の配列を含むVL領域(021)；

(h) SEQ ID NO : 97の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 98の配列を含むVL領域(027)；

(i) SEQ ID NO : 99の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 100の配列を含むVL領域(032)；

40

(j) SEQ ID NO : 101の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 102の配列を含むVL領域(035)；

(k) SEQ ID NO : 103の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 104の配列を含むVL領域(036)；

(l) SEQ ID NO : 105の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 106の配列を含むVL領域(054)；

(m) SEQ ID NO : 106の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO : 108の配列を含むVL領域(094)；ならびに/または

(n) 前記の抗体もしくは抗原結合領域のいずれかの変異体であって、好ましくは最大で1つ、2つもしくは3つのアミノ酸修飾、より好ましくはアミノ酸置換(例えば、保存的

50

アミノ酸置換、および、新たなアミノ酸が、図1もしくは2の中のアラインメントを行った配列において同じ位置のアミノ酸、特に対応するコンセンサス配列において「X」と示された位置のアミノ酸であるような置換)を有する、前記変異体。

【0103】

クロスブロック群3

本発明の二重特異性抗体の1つの局面において、二重特異性抗体は、本明細書に記載のクロスブロック群3のヒト抗体のうちの1つもしくは複数の、HER2に対する結合をブロックするか、または本明細書に記載のクロスブロック群3のヒト抗体のうちの1つもしくは複数と同じ、HER2上のエピトープと結合する、抗原結合領域を含む。別の具体的な態様において、二重特異性抗体は、その場合、クロスブロック群1、2または4の抗体の、HER2に対する(例えば可溶性HER2に対する)結合をクロスブロックする、ブロックする、またはそれと同じエピトープと結合する第2の抗原結合領域を含む。

10

【0104】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載したように判定した場合に、F5および/またはC1の可溶性HER2に対する結合をクロスブロックする。

【0105】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO: 46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 49の配列を含むVL領域を含む参照抗体(127)の、HER2に対する(例えば可溶性HER2に対する)結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0106】

20

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO: 49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 53の配列を含むVL領域を含む参照抗体(159)の、HER2に対する(例えば可溶性HER2に対する)結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0107】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO: 56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 60の配列を含むVL領域を含む参照抗体(098)の、HER2に対する(例えば可溶性HER2に対する)結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0108】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO: 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 67の配列を含むVL領域を含む参照抗体(153)の、HER2に対する(例えば可溶性HER2に対する)結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

30

【0109】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO: 70の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 74の配列を含むVL領域を含む参照抗体(132)の、HER2、例えば、可溶性HER2に結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。

【0110】

1つの態様において、抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVHおよびL領域を含む参照抗体の、HER2に対する(例えば可溶性HER2に対する)結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する:

(a) SEQ ID NO: 109の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 110の配列を含むVL領域(105);

40

(b) SEQ ID NO: 111の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 112の配列を含むVL領域(100);

(c) SEQ ID NO: 113の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 114の配列を含むVL領域(125);

(d) SEQ ID NO: 115の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 116の配列を含むVL領域(162);

(e) SEQ ID NO: 117の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 118の配列を含むVL領域(033);

(f) SEQ ID NO: 119の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 120の配列を含むVL領域(1

50

60)

(g) SEQ ID NO : 121の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 122の配列を含むVL領域 (166) ;

(h) SEQ ID NO : 123の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 124の配列を含むVL領域 (152) ; ならびに

(i) SEQ ID NO : 125の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 126の配列を含むVL領域 (167) 。

【 0 1 1 1 】

本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、本明細書に記載の新規抗体の配列と類似または同一のVH CDR3、VH領域および / またはVL領域配列を含む。

10

【 0 1 1 2 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択される配列を有するVH CDR3領域を含む ;

SEQ ID NO : 148、例えばSEQ ID NO : 48の配列 (127) 、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列配列に由来する ;

SEQ ID NO : 52 (159) 、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列配列に由来する ;

SEQ ID NO : 145、例えばSEQ ID NO : 59の配列 (098) 、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-01生殖細胞系列配列に由来する ;

20

SEQ ID NO : 154、例えばSEQ ID NO : 66の配列 (153) 、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-03-01生殖細胞系列配列に由来する ; ならびに

SEQ ID NO : 151、例えばSEQ ID NO : 73の配列 (132) 、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-01生殖細胞系列配列に由来する。

【 0 1 1 3 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、図1に示されているような抗体105、100、125または162のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する。

【 0 1 1 4 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、図1に示されているような抗体033、160、166、152または167のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-3-01生殖細胞系列に由来する。

30

【 0 1 1 5 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVH領域を含む ;

(a) SEQ ID NO : 146、147および148であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (127) を含むVH領域 ; ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する ;

(b) それぞれSEQ ID NO : 149、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (159) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する ;

40

(c) それぞれSEQ ID NO : 143、144および145であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (098) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-01生殖細胞系列に由来する ;

(d) それぞれSEQ ID NO : 152、153および154であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (153) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-03-01生殖細胞系列に由来する ; ならびに

(e) それぞれSEQ ID NO : 71、150および151であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO : 71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (132) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-01生殖細胞系列に由来する。

50

【 0 1 1 6 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様（a）から選択されるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO：47、AASおよびSEQ ID NO：48であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含み（127）；ここで任意でVL領域はIgKV1D-8-01生殖細胞系列に由来する。

【 0 1 1 7 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様（b）から選択されるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO：54、AASおよびSEQ ID NO：55であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含み（159）；ここで任意でVL領域はIgKV1D-16-01生殖細胞系列に由来する。

10

【 0 1 1 8 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様（c）であるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO：159、AASおよびSEQ ID NO：160であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：61、AASおよびSEQ ID NO：62であるVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含み（098）、ここで任意でVL領域はIgKV1D-16-01に由来する。

【 0 1 1 9 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様（d）であるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO：161、XAS（ここでX=DまたはA、好ましくはD）およびSEQ ID NO：162であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：68、DASおよび69であるVL CDR配列を含むVL領域を含み（153）、ここで任意でVL領域はIgKV1D-16-01に由来する。

20

【 0 1 2 0 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様（e）であるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO：75、DASおよびSEQ ID NO：76であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含み（132）、ここで任意でVL領域はIgKV3-11-01に由来する。

【 0 1 2 1 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：47、AASおよびSEQ ID NO：48であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（127）。

30

【 0 1 2 2 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：54、AASおよびSEQ ID NO：55であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（159）。

【 0 1 2 3 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにSEQ ID NO：60、AASおよびSEQ ID NO：61であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（098）。

40

【 0 1 2 4 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（153）。

【 0 1 2 5 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：75、DASおよびSEQ ID NO：76であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（132）。

50

【0126】

別の態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものを含む：

(a) SEQ ID NO：46の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：49の配列を含むVL領域（127）；

(b) SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：53の配列を含むVL領域（159）；

(c) SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）；

(d) SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）；

(e) SEQ ID NO：70の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：74の配列を含むVL領域（132）；

(f) SEQ ID NO：109の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：110の配列を含むVL領域（105）；

(g) SEQ ID NO：111の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：112の配列を含むVL領域（100）；

(h) SEQ ID NO：113の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：114の配列を含むVL領域（125）；

(i) SEQ ID NO：115の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：116の配列を含むVL領域（162）；

(j) SEQ ID NO：117の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：118の配列を含むVL領域（033）；

(k) SEQ ID NO：119の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：120の配列を含むVL領域（160）

(l) SEQ ID NO：121の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：122の配列を含むVL領域（166）；

(m) SEQ ID NO：123の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：124の配列を含むVL領域（152）；

(o) SEQ ID NO：125の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：126の配列を含むVL領域（167）；ならびに／または

(p) 前記の抗体のいずれかの変異体、ここで前記変異体は好ましくは多くとも1個、2個もしくは3個のアミノ酸修飾を有し、より好ましくはアミノ酸置換（例えば保存的アミノ酸置換、および、新たなアミノ酸が、図1もしくは2におけるアラインメントを行った配列において同じ位置のアミノ酸、特に対応するコンセンサス配列において「X」と示された位置のアミノ酸であるような置換）を有する。

【0127】

クロスブロック群4

本発明の二重特異性抗体の1つの局面において、二重特異性抗体は、実施例14に記載したように判定した場合に、HER2と結合するが、トラスツズマブ、ペルツズマブ、F5およびC1のいずれかのVHおよびVL配列を含む任意で固定化形態にある第2の抗体の可溶性HER2に対する結合はブロックしない、抗原結合領域を含む。

【0128】

本発明の抗体の追加的または代替的な局面において、抗原結合領域は、クロスブロック群4のヒト抗体の1つまたは複数の、可溶性HER2に対する結合をブロックするかまたはクロスブロックする。別の具体的な態様において、二重特異性抗体はその場合、クロスブロック群1、2または3の抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合する、第2の抗原結合領域を含む。

【0129】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体

10

20

30

40

50

はSEQ ID NO：165の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含み（005）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【0130】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO：172の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：176の配列を含むVL領域とを含み（006）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【0131】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO：179の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：183の配列を含むVL領域とを含み（009）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【0132】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO：186の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：190の配列を含むVL領域とを含み（060）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【0133】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO：193の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：197の配列を含むVL領域とを含み（106）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【0134】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO：200の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：204の配列を含むVL領域とを含み（111）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【0135】

別個および具体的な態様において、抗原結合領域は、前記の態様の2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの参照抗体、例えば、抗体005および111、抗体005および006；抗体059および106；抗体006および059；抗体059、106、005および060；抗体006、59、060および111；または抗体059、106、005、060、111および006などの結合をブロックする。

【0136】

1つの態様において、本抗体は、固定化された場合、実施例14に記載した通りに判定した場合に、可溶性HER2に対する結合に関して、前記の態様において定義されたすべての抗体と、25%またはそれ以上、好ましくは50%またはそれ以上競合する。

【0137】

本発明の抗体の1つの局面において、本抗体は、本明細書に記載の新規ヒト抗体の1つまたは複数と、HER2上の同じエピトープに結合する。

【0138】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）と、同じエピトープに結合する。

【0139】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：172の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：176の配列を含むVL領域とを含む抗体（006）と、同じエピトープに結合する。

【0140】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：179の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：183の配列を含むVL領域とを含む抗体（059）と、同じエピトープに結合する。

【0141】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：186の配列を含むVH領域とSEQ ID NO

10

20

30

40

50

: 190の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060) と、同じエピトープに結合する。

【 0 1 4 2 】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO : 193の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 197の配列を含むVL領域とを含む抗体 (106) と、同じエピトープに結合する。

【 0 1 4 3 】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO : 200の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 204の配列を含むVL領域とを含む抗体 (111) と、同じエピトープに結合する。

【 0 1 4 4 】

1つの態様において、抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの抗体と、同じエピトープに結合する：

(a) SEQ ID NO : 207の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 208の配列を含むVL領域とを含む抗体 (041)

(b) SEQ ID NO : 209の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 210の配列を含むVL領域とを含む抗体 (150)、ならびに

(c) SEQ ID NO : 211の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 212の配列を含むVL領域とを含む抗体 (067)；

(d) SEQ ID NO : 213の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 214の配列を含むVL領域とを含む抗体 (072)；

(e) SEQ ID NO : 215の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 216の配列を含むVL領域とを含む抗体 (163)；

(f) SEQ ID NO : 217の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 218の配列を含むVL領域とを含む抗体 (093)；

(g) SEQ ID NO : 219の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 220の配列を含むVL領域とを含む抗体 (044)。

【 0 1 4 5 】

本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、本明細書に記載のHER2抗体と類似するかまたは同一である配列を含むVH CDR3、VH領域および/またはVL領域の配列を含む。

【 0 1 4 6 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR3領域を含む：

SEQ ID NO : 223、例えばSEQ ID NO : 168、189、196の配列 (005、060、106)、ここで任意でVH領域がIgHV5-51-1生殖系列に由来する；

SEQ ID NO : 226、例えばSEQ ID NO : 175の配列 (006)、ここで任意でVH領域がIgHV3-23-1生殖系列配列に由来する；

SEQ ID NO : 229、例えばSEQ ID NO : 182の配列 (059)、ここで任意でVH領域がIgHV1-18-1生殖系列配列に由来する；または

SEQ ID NO : 231、例えばSEQ ID NO : 203の配列 (111)、ここで任意でVH領域がIgHV1-69-4生殖系列配列に由来する。

【 0 1 4 7 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO : 223のアミノ酸配列を含むVH CDR3領域を含み、式中、X1 = Q、HまたはL；X2 = R、A、TまたはK；X3 = G；X4 = D；X5 = Rまたは無し；X6 = Gまたは無し；X7 = YまたはF；X8 = YまたはD；X9 = Y、FまたはH；X10 = Y、D、S、FまたはN；X11 = MまたはL；およびX12 = VまたはIであり；好ましくは、式中、X1 = Q、X2 = RまたはA；X5 = X6 = 無し；X7 = YまたはF；X8 = Y；X9 = F；X10 = Y；およびX12 = Vである。特定の態様において、本抗体は、SEQ ID NO : 223のアミノ酸配列を含むVH CDR3領域を含み、式中、X1 = Q、X2 = K；X3 = G；X4 = D、X5 = X6 = 無し；X7 = F；X8 = Y；X9 = X10 = F；X11 = L；およびX12 = Vで

10

20

30

40

50

ある ; または $X1 = Q$; $X2 = A$; $X3 = G$; $X4 = D$; $X5 = X6 = \text{無し}$; $X7 = X8 = Y$; $X9 = Y$; $X10 = N$; $X11 = M$; および $X12 = V$ である ; または $X1 = Q$; $X2 = K$; $X3 = G$; $X4 = D$; $X5 = X6 = \text{無し}$; $X7 = X8 = Y$; $X9 = H$; $X10 = Y$; $X11 = L$; および $X12 = V$ である ; または $X1 = Q$; $X2 = K$; $X3 = G$; $X4 = D$; $X5 = X6 = \text{無し}$; $X7 = Y$; $X8 = Y$; $X9 = F$; $X10 = N$; $X11 = L$; および $X12 = V$ である ; または $X1 = Q$; $X2 = R$; $X3 = G$; $X4 = D$; $X5 = X6 = \text{無し}$; $X7 = Y$; $X8 = Y$; $X9 = F$; $X10 = N$; $X11 = L$; および $X12 = V$ である ; または $X1 = Q$; $X2 = R$; $X3 = G$; $X4 = D$; $X5 = X6 = \text{無し}$; $X7 = Y$; $X8 = Y$; $X9 = X10 = F$; $X11 = L$; および $X12 = I$ である ; または $X1 = Q$; $X2 = A$; $X3 = G$; $X4 = D$; $X5 = X6 = \text{無し}$; $X7 = X8 = Y$; $X9 = Y$; $X10 = N$; $X11 = M$; および $X12 = V$ である。

【 0 1 4 8 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、図1に示すように、抗体04 10
1、150、067、072、163または093のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖系列に由来する。

【 0 1 4 9 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVH領域を含む：

(a) SEQ ID NO : 221、222および223であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えば、

a . SEQ ID NO : 166、187および194から選択されるCDR1配列 ; 167、188および195から選択されるCDR2配列 ; ならびに168、189および196から選択されるCDR3配列 (005、060、106) 、 20

b . それぞれSEQ ID NO : 166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (005)

c . それぞれSEQ ID NO : 187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (060)

d . それぞれSEQ ID NO : 196、197および198であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (106)

ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖系列に由来する；

(b) SEQ ID NO : 224、225および226であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばそれぞれSEQ ID NO : 173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (006) などを含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖系列に由来する；ならびに 30

(c) SEQ ID NO : 227、228および229であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばそれぞれSEQ ID NO : 180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (059) などを含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖系列に由来する；ならびに

(d) SEQ ID NO : 230、202および231であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばそれぞれSEQ ID NO : 201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (111) などを含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-4生殖系列に由来する。

【 0 1 5 0 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様 (a) 、 (c) または (d) から選択されるVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 232、GASおよびSEQ ID NO : 233であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 170、184、191、198および205から選択されるCDR1配列、GASであるCDR2、ならびに171、85、192、199および206から選択されるCDR3配列 (005、059、060、106、111) などを含むVL領域とを含み、ここで任意でVL領域はIgKV3-20-01生殖系列に由来する。 40

【 0 1 5 1 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、前記の態様 (b) であるVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 177、DASおよびSEQ ID NO : 178であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含み (006) 、ここで任意でVL領域はIgKV3-11-01に由来する。

【 0 1 5 2 】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 1 50

70、GASおよびSEQ ID NO : 171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む (005)。

【0153】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 177、DASおよびSEQ ID NO : 178であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む (006)。

【0154】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 184、GASおよびSEQ ID NO : 185であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む (009)。

【0155】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 191、GASおよびSEQ ID NO : 192であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む (010)。

【0156】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 198、GASおよびSEQ ID NO : 199であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む (011)。

【0157】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO : 201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO : 205、GASおよびSEQ ID NO : 206であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む (012)。

【0158】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO : 221のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = T、およびX3 = S ; SEQ ID NO : 226のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = H ; ならびにSEQ ID NO : 227のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = K、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = F、X8 = Y、X9 = X10 = F、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 232のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 233のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む (041)。

【0159】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO : 221のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 222のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = H ; ならびにSEQ ID NO : 223のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = A、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = X8 = Y、X9 = Y、X10 = N、X11 = M、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 232のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 233のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む (150)。

【0160】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO : 221のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S ; SEQ ID NO : 222のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D ; ならびにSEQ ID NO : 223のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = K、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = X8 = Y、X9 = H、X10 = Y、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO : 232のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S ; CDR2配列GAS ; ならびにSEQ ID NO : 233のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = P、X4 = RおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む (067)。

【0161】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO : 221のCDR1配

10

20

30

40

50

列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S；SEQ ID NO：222のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D；ならびにSEQ ID NO：223のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = K、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = Y、X8 = Y、X9 = F、X10 = N、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO：232のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S；CDR2配列GAS；ならびにSEQ ID NO：233のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = P、X4 = RおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む（072）。

【0162】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO：221のCDR1配列、式中、X1 = R、X2 = IおよびX3 = S；SEQ ID NO：222のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D；ならびにSEQ ID NO：223のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = R、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = Y、X8 = Y、X9 = F、X10 = N、X11 = L、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO：232のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S；CDR2配列GAS；ならびにSEQ ID NO：233のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む（163）。

【0163】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO：221のCDR1配列、式中、X1 = S、X2 = TおよびX3 = S；SEQ ID NO：222のCDR2配列、式中、X1 = YおよびX2 = D；ならびにSEQ ID NO：223のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = R、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = Y、X8 = Y、X9 = X10 = F、X11 = L、およびX12 = Iを含むVH領域と、SEQ ID NO：232のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S；CDR2配列GAS；ならびにSEQ ID NO：233のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む（093）。

【0164】

1つの態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、SEQ ID NO：221のCDR1配列、式中、X1 = R、X2 = SおよびX3 = S；SEQ ID NO：222のCDR2配列、式中、X1 = FおよびX2 = D；ならびにSEQ ID NO：223のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = A、X3 = G、X4 = D、X5 = X6 = 無し、X7 = X8 = Y、X9 = Y、X10 = N、X11 = M、およびX12 = Vを含むVH領域と、SEQ ID NO：232のCDR1配列、式中、X1 = X2 = S；CDR2配列GAS；ならびにSEQ ID NO：233のCDR3配列、式中、X1 = Q、X2 = S、X3 = X4 = 無しおよびX5 = Lを含むVL領域とを含む（044）。

【0165】

別の態様において、二重特異性抗体または抗原結合領域は、以下のものを含む：

(a) SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域（005）、

(b) SEQ ID NO：172の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：176の配列を含むVL領域（006）、

(c) SEQ ID NO：179の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：183の配列を含むVL領域（059）、

(d) SEQ ID NO：186の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：190の配列を含むVL領域（060）、

(e) SEQ ID NO：193の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：197の配列を含むVL領域（106）、

(f) SEQ ID NO：200の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：204の配列を含むVL領域（111）、

(g) SEQ ID NO：297の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：208の配列を含むVL領域（041）、

(h) SEQ ID NO：209の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：210の配列を含むVL領域（150）、

(i) SEQ ID NO：211の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：212の配列を含むVL領域（067）、

(j) SEQ ID NO：213の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：214の配列を含むVL領域（072）、

(k) SEQ ID NO：215の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：216の配列を含むVL領域（163）、

(l) SEQ ID NO : 217の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 218の配列を含むVL領域 (093)、

(m) SEQ ID NO : 219の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO : 220の配列を含むVL領域 (044)、ならびに/または

(n) 好ましくは多くとも1個、2個もしくは3個のアミノ酸修飾を有し、より好ましくはアミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換、および新たなアミノ酸が図1もしくは2におけるアラインメントされた配列中で同じ位置に、特に対応するコンセンサス配列中で「X」によって示された位置にある置換などを有する、前記のいずれかの抗体の変種。

【 0 1 6 6 】

クロスブロック群1、2、3および4の抗原結合領域またはHER2抗体の機能的特性

10

別の局面において、抗原結合領域、例えば、本発明の二重特異性抗体の第1もしくは第2の抗原結合領域、または本明細書に開示された第1もしくは第2のHER2抗体は、好ましくは実施例14に記載したように判定した場合に、本明細書に記載のクロスブロック群1、2、3もしくは4の抗原結合領域もしくは抗体の1つもしくは複数の、HER2に対する結合をブロックするか、またはそれらと同じHER2エピトープと結合し；かつ、下記の、または実施例12、13、15、16、17、18および19に記載されたようにして決定される、1つまたは複数の特性によって特徴づけられる。

【 0 1 6 7 】

したがって、本発明の二重特異性抗体の第1および/または第2の抗原結合領域は、以下の特性の1つを有する抗体または抗HER2抗体の抗原結合領域と同じであってもよい。別の態様において、本発明の第1および/または第2のHER2抗体は、以下の特性の1つまたは複数

20

【 0 1 6 8 】

1つの態様において、抗HER2抗体は、実施例12に記載した通りに判定した場合に、A431細胞に対する結合に関してトラスツズマブよりも低いEC₅₀値（半数効果濃度）、好ましくは0.80 μg/ml、0.50 μg/mlまたは0.30 μg/mlよりも低いEC₅₀値を有し、かつ、好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する：

- (a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (169) ;
 - (b) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (084) ;
 - (c) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (025) ;
 - (d) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 32の配列を含むVL領域 (091) ;
 - (e) SEQ ID NO : 46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 49の配列を含むVL領域 (127) ;
 - (f) SEQ ID NO : 49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 53の配列を含むVL領域 (159) ;
 - (g) SEQ ID NO : 56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 60の配列を含むVL領域 (098) ;
 - (h) SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域 (153) ;
 - (i) SEQ ID NO : 70の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 74の配列を含むVL領域 (132) ;
 - (j) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (005) ;
 - (k) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 11の配列を含むVL領域 (006) ;
- ならびに

30

40

50

(1) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (059)。

【0169】

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、実施例13に記載した通りに判定した場合に、HER2陽性アカゲザル上皮細胞と特異的に結合し、かつ好ましくは、抗体169、050、084、025、091、129、127、159、098、153、132、005、006、059、060、106および111のいずれかのVHおよびVL領域からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する。

【0170】

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体はADCC (抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用) を有効に誘導し、実施例15に記載した通りに判定した場合に、好ましくは、少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%の特異的⁵¹Cr放出を達成し、かつ好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する：

- (a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (169) ;
- (b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (050) ;
- (c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (084) ;
- (d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (025) ;
- (e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 32の配列を含むVL領域 (091) ;
- (f) SEQ ID NO : 35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 39の配列を含むVL領域 (129) ;
- (g) SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域、好ましくは、SEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域 (153) 。

【0171】

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合するが、実施例16に記載した通りに判定した場合に、細胞のリガンド非依存的増殖をF5およびC1のいずれよりも促進せず、かつ好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する：

- (a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (169) ;
- (b) SEQ ID NO : 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 12の配列を含むVL領域 (050) ;
- (c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (084) ;
- (d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (025) ;
- (e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 32の配列を含むVL領域 (091) ;
- (f) SEQ ID NO : 35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 39の配列を含むVL領域 (129) ;
- (g) SEQ ID NO : 46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 49の配列を含むVL領域 (127) ;
- (h) SEQ ID NO : 49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 53の配列を含むVL領域 (159) ;
- (i) SEQ ID NO : 56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 60の配列を含むVL領域 (098) ;

10

20

30

40

50

-);
- (j) SEQ ID NO: 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 67の配列を含むVL領域 (153);
- (k) SEQ ID NO: 70の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 74の配列を含むVL領域 (132);
- (l) SEQ ID NO: 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 5の配列を含むVL領域 (005);
- ならびに
- (m) SEQ ID NO: 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 26の配列を含むVL領域 (060)。

【0172】

10

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合して、細胞のリガンド非依存的増殖を阻害し、実施例16に記載した通りに判定した場合に、好ましくは増殖を少なくとも20%、より好ましくは少なくとも25%阻害し、かつ好ましくは、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する:

- (a) SEQ ID NO: 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 5の配列を含むVL領域 (169);
- ならびに
- (b) SEQ ID NO: 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 12の配列を含むVL領域 (050)。

【0173】

20

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合するが、リガンドで誘導される細胞の増殖に対して著しい影響を及ぼすこともそれを促進することもなく、実施例17に記載した通りに判定した場合に、好ましくは増殖を25%以下、より好ましくは15%以下阻害し、かつ、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する:

- (a) SEQ ID NO: 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 5の配列を含むVL領域 (169);
- ;
- (b) SEQ ID NO: 8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 12の配列を含むVL領域 (050);
- ;
- (c) SEQ ID NO: 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 19の配列を含むVL領域 (084);
- ならびに
- (d) SEQ ID NO: 56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 60の配列を含むVL領域 (098)。

【0174】

30

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、HER2を発現するMCF-7細胞と特異的に結合して、リガンドで誘導される増殖を阻害し、例えば、実施例17に記載した通りに判定した場合に、それはリガンドで誘導される作用を完全に阻害するか、または細胞の全増殖を50%、例えば、60%もしくは70%もしくは80%阻害することができ、かつ、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する:

- (a) SEQ ID NO: 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 26の配列を含むVL領域 (025);
- ;
- (b) SEQ ID NO: 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 32の配列を含むVL領域 (091);
- ;
- (c) SEQ ID NO: 35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO: 39の配列を含むVL領域 (129);
- ならびに
- (d) SEQ ID NO: 63の配列を含むVH領域、好ましくは、SEQ ID NO: 67の配列を含むVL領域 (153)。

【0175】

40

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、治療用部分、例えば短縮型のシュ

50

ードモナス-エキソトキシンAなどと直接的または間接的に結合体化されると、実施例18に記載した通りに判定した場合に、AU565細胞、A431細胞、またはAU565細胞およびA431細胞の両方を死滅させる上でトラスツズマブよりも有効である。

【0176】

1つの態様において、結合体化された抗HER2抗体は、実施例18に記載した通りに判定した場合に、AU565細胞および/またはA431細胞を死滅させることに関するEC₅₀値が70ng/ml未満、50ng/ml未満または30ng/ml未満であり、抗体169、091、050、084、098、05、153、129、132、127および159からなる群より選択される抗体；好ましくは抗体153、129、098、091および025から選択される抗体のVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する。

10

【0177】

1つの態様において、結合体化された抗HER2抗体は、実施例18に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブおよびペルツズマブよりもAU565細胞の死滅のパーセンテージが高いか、または高いパーセンテージでの死滅をもたらし、それは好ましくはAU565細胞の少なくとも49%、より好ましくは少なくとも60%の死滅であり、かつ、169、091、050、084、098、025、153、129、132、127および159からなる群より選択される抗体；好ましくは抗体153、132、127、129、159および025から選択される抗体のVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する。

【0178】

好ましい態様において、結合体化された抗HER2抗体は、SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：53の配列を含むVL領域を含む参照抗体（159）と同じエピトープと結合する。

20

【0179】

1つの態様において、結合体化された抗HER2抗体は、実施例18に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブおよびペルツズマブよりもAU431細胞の死滅のパーセンテージが高く、好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも70%を死滅させ、かつ、025、084、091、098、129および153からなる群より選択される抗体；好ましくは抗体025、091、098、129および153から選択される抗体のVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する。

【0180】

好ましい態様において、抗HER2結合抗体は、SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域を含む参照抗体（098）と同じエピトープと結合する。

30

【0181】

追加的または代替的な態様において、第1または第2のHER2抗体または抗HER2抗体は、好ましくは実施例18に従って判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞、例えばAU565細胞などによる内部移行を、トラスツズマブおよびペルツズマブよりも高度に、好ましくは内部移行を受けるトラスツズマブの量の2倍または3倍を上回って受け、かつ、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：

(a) SEQ ID NO：46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：49の配列を含むVL領域（127）；

40

(b) SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：53の配列を含むVL領域（159）；

(c) SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）；

(d) SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）；ならびに

(e) SEQ ID NO：70の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：74の配列を含むVL領域（132）。

【0182】

好ましくは、抗体は、

50

(a) SEQ ID NO : 46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 49の配列を含むVL領域 (127) ならびに

(b) SEQ ID NO : 56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 60の配列を含むVL領域 (098) 、

から選択されるVHおよびVL領域と同じエピトープと結合する。

【0183】

さらなる態様において、抗HER2抗体はHER2のドメインIIまたはIVと結合し、ここで好ましくは抗体はHER2発現細胞の増殖を著しく促進することではなく、好ましくは実施例に、例えばそれぞれ実施例16および19に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞内に、トラスツズマブまたはペルツズマブよりも有効に内部移行を受けるか、またはより高度に内部移行を受ける。

10

【0184】

さらなる態様において、抗HER2抗体は、実施例22に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブよりもHER2ダウンモジュレーションを増強し、例えば、抗体はHER2ダウンモジュレーションを30%超、例えば40%超または50%超というように増強したが、ここで好ましくは抗体は本発明のクロスブロック群3の抗体と同じエピトープと結合し、例えば、抗体は、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：

(a) SEQ ID NO : 56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 60の配列を含むVL領域 (098) ；

20

(b) SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域 (153) 。

【0185】

別の、または代替的な態様において、抗HER2抗体は、実施例28に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブよりもインビボでの腫瘍成長を低下させて生存性を改善したが、ここで好ましくは抗体は、本発明のクロスブロック群1またはクロスブロック群2の抗体と同じエピトープと結合し、例えば、抗体は、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：

(a) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域 (169) ；

30

(b) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域 (084) ；ならびに

(c) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 32の配列を含むVL領域 (091) 。

【0186】

別の、または代替的な態様において、抗HER2抗体は、実施例29に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブよりもインビボでの腫瘍成長を低下させて生存性を改善したが、ここで好ましくは抗体は、本発明のクロスブロック群2またはクロスブロック群3の抗体と同じエピトープと結合し、例えば、抗体は、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：

40

(a) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域 (025) ；

(b) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 32の配列を含むVL領域 (091) ；

(c) SEQ ID NO : 35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 39の配列を含むVL領域 (129) ；ならびに

(d) SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域 (153) 。

【0187】

より詳細には、ここで抗HER2抗体は、以下のものからなる群より選択されるVHおよびVL

50

領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：

(a) SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）；ならびに

(b) SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域（091）。

【0188】

1つの態様において、結合体化された抗HER2抗体は、実施例18に記載した通りに判定した場合に、AU565細胞またはA431細胞の少なくとも60%、好ましくは少なくとも70%を死滅させ、以下のものから選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

(a) SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）、

(b) SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域とを含む抗体（060）、

(c) SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域とを含む抗体（059）、ならびに

(d) SEQ ID NO：36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：40の配列を含むVL領域とを含む抗体（111）。

【0189】

別の具体的な態様において、前記の態様の抗HER2抗体は、抗体005、060、059、111またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくは、それらと同じエピトープと結合する。

【0190】

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、治療用部分と直接的にまたは間接的に結合体化された場合に、好ましくは実施例17に記載した通りに判定した場合に、非結合体化抗体が細胞の死滅を誘導しない濃度で、発現される細胞当たりのHER2コピーの平均量がAU565細胞よりも少ない、例えば、細胞当たりのHER2が平均で約500,000コピーもしくはそれ未満、100,000コピーもしくはそれ未満、または30,000コピーもしくはそれ未満（例えば、実施例12に言及されたように決定した場合に）である腫瘍細胞を死滅させることができる。

【0191】

1つの態様において、前記の態様の抗体は、実施例18に記載した通りに判定した場合に、A431細胞の少なくとも80%を死滅させ、かつ、以下のものから選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

(a) SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）、ならびに

(b) SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域とを含む抗体（060）。

【0192】

別の具体的な態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、060またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。

【0193】

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、好ましくは実施例19に従って判定した場合に、トラスツズマブよりも、HER2を発現する腫瘍細胞、例えばAU565細胞などによる内部移行を受け、好ましくは、内部移行を受けるトラスツズマブの量の2倍または3倍を上回る内部移行を受け、かつ、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：

(a) SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）

(b) SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：11の配列を含むVL領域とを含む抗体（006）

10

20

30

40

50

(c) SEQ ID NO : 15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 19の配列を含むVL領域とを含む抗体 (059)

(d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域とを含む抗体 (060)

(e) SEQ ID NO : 29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 33の配列を含むVL領域とを含む抗体 (106)

(f) SEQ ID NO : 36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO : 40の配列を含むVL領域とを含む抗体 (111)。

【0194】

別の具体的な態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、006、059、060、106、111またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。

【0195】

例示的な二重特異性抗体

1つの態様において、抗体は、(i) 本明細書に定義したような第1のHER2抗体の第1の抗原結合領域、および(ii) 本明細書に定義したような第2のHER2抗体の第2の抗原結合領域を含み、第1の抗原結合領域が第2の抗原結合領域とは異なるエピトープと結合する、二重特異性抗体である。

【0196】

1つの態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したようなクロスブロック群1、2、3または4の抗体、例えばSEQ ID NO : 4、25、66または168などのCDR3配列を含むVH領域を含む(169、025、153または005)。

【0197】

1つの態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したようなクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み、例えば、SEQ ID NO : 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(169)、またはSEQ ID NO : 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(025)、またはSEQ ID NO : 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(153)、またはSEQ ID NO : 166、167および168であるCDR1、CDR2、CDR3配列(005)を含むVH領域を含む。

【0198】

さらなる、または代替的な態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したようなクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR3配列を含むVH領域を含み、例えば、SEQ ID NO : 11(050)もしくはSEQ ID NO : 18(084)であるクロスブロック群1の抗体のCDR3配列；またはSEQ ID NO : 31(091)もしくはSEQ ID NO : 38(129)であるクロスブロック群2の抗体のCDR3配列、またはSEQ ID NO : 45(127)もしくはSEQ ID NO : 52(159)もしくはSEQ ID NO : 59(098)もしくはSEQ ID NO : 73(132)であるクロスブロック群3の抗体のCDR3配列、またはSEQ ID NO : 175(006)、SEQ ID NO : 182(059)、SEQ ID NO : 189(060)、SEQ ID NO : 196(106)もしくはSEQ ID NO : 203(111)であるクロスブロック群4の抗体のCDR3配列を含むVH領域を含む。

【0199】

1つの態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したようなクロスブロック群1、2または3の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み、例えば、SEQ ID NO : 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(169)、またはSEQ ID NO : 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(025)、またはSEQ ID NO : 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(153)、またはSEQ ID NO : 170、GASおよび171であるCDR1、CDR2、CDR3配列(005)を含むVH領域を含む。

【0200】

1つの態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したようなクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、ならびに本明細書に定義したようなクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含

10

20

30

40

50

むVL領域を含む。

【 0 2 0 1 】

さらなる、または代替的な態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したようなクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み、例えば、SEQ ID NO : 9、10および11 (050) もしくはSEQ ID NO : 16、17および18 (084) であるクロスブロック群1の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列 ; またはSEQ ID NO : 30、163および31 (091) もしくはSEQ ID NO : 36、37および38 (129) であるクロスブロック群2の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列、またはSEQ ID NO : 43、44および45 (127) もしくはSEQ ID NO : 50、51および52 (159) もしくはSEQ ID NO : 57、58および59 (098) もしくはSEQ ID NO : 71、72および73 (132) であるクロスブロック群3の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列、またはSEQ ID NO : 173、174および175 (006) 、SEQ ID NO : 180、181および182 (059) 、SEQ ID NO : 187、188および189 (060) 、SEQ ID NO : 194、195および196 (106) もしくはSEQ ID NO : 201、202および203 (111) といったクロスブロック群4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含む。

10

【 0 2 0 2 】

1つの態様において、第1の抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む :

(a) SEQ ID NO : 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域 ; ならびにそれぞれSEQ ID : 6、DASおよびSEQ ID NO : 7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (169) ;

20

(b) SEQ ID NO : 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域 ; ならびにそれぞれSEQ ID NO : 27、AASおよびSEQ ID NO : 28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (025) ;

(c) SEQ ID NO : 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域 ; ならびにSEQ ID NO : 68、DASおよびSEQ ID NO : 69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (153) ; ならびに

(d) SEQ ID NO : 166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域 ; ならびにSEQ ID NO : 170、GASおよびSEQ ID NO : 171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (005) 。

【 0 2 0 3 】

30

さらなる、または代替的な態様において、第1の抗原結合領域は、以下のものからなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む :

(a) SEQ ID NO : 9、127および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (050) を含むVH領域 ; ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する ;

(b) それぞれSEQ ID NO : 128、129および130であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (084) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-04生殖細胞系列に由来する ; ならびに

(c) それぞれSEQ ID NO : 137、138および139であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (091) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-01生殖細胞系列に由来する ; ならびに

40

(d) それぞれSEQ ID NO : 140、141および142であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (129) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-01生殖細胞系列に由来する、

(e) SEQ ID NO : 146、147および148であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (127) を含むVH領域 ; ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する ;

(f) それぞれSEQ ID NO : 149、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列 (159) を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する ;

50

(g) それぞれSEQ ID NO : 143、144および145であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(098)を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-01生殖細胞系列に由来する；

(h) それぞれSEQ ID NO : 71、150および151であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(132)を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-01生殖細胞系列に由来する；

(i) それぞれSEQ ID NO : 221、222および223であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(060)を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖細胞系列に由来する；

(j) それぞれSEQ ID NO : 194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(106)を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖細胞系列に由来する；

(k) それぞれSEQ ID NO : 224、225および226であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(006)を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する；

(l) それぞれSEQ ID NO : 227、228および229であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(059)を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列に由来する；ならびに

(m) それぞれSEQ ID NO : 230、202および231であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO : 201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列(111)を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-4生殖細胞系列に由来する。

【0204】

1つの態様において、第2の抗原結合領域は、第1の抗原結合領域について述べた前出の態様の1つであるが、ここで第2の抗原結合領域は、第1の抗原結合領域とは異なるエピートープと結合する。別の態様において、第2の抗原結合領域はトラスツズマブまたはペルツズマブに由来し、トラスツズマブまたはペルツズマブのVHおよび/もしくはVL CDR1、2および3配列、またはVHおよび/もしくはVL配列を含む。

【0205】

1つの態様において、二重特異性抗体は、第1および第2の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2(HER2)上の異なるエピートープと結合する、第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含み、ここで第1および第2の抗原結合領域のそれぞれは、以下のものからなる群より独立に選択される参照抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする；

(a) SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域を含む抗体(153)、

(b) SEQ ID NO : 165の配列を含む重鎖可変(VH)領域およびSEQ ID NO : 169の配列を含む軽鎖可変(VL)領域を含む抗体(005)、

(c) SEQ ID NO : 1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5の配列を含むVL領域を含む抗体(169)、ならびに

(d) SEQ ID NO : 22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26の配列を含むVL領域を含む抗体(025)。

【0206】

二重特異性抗体のさらなる態様では、前記第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1つが、(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする。

【0207】

二重特異性抗体のさらなる態様では、前記第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1つが、(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする。

【0208】

二重特異性抗体のさらなる態様では、前記第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1つが、(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする。

【0209】

二重特異性抗体のさらなる態様では、前記第1および第2の抗原結合領域の少なくとも1

10

20

30

40

50

つが、(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする。

【0210】

二重特異性抗体のさらなる態様では、

(i) 第1の抗原結合領域が(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、第2の抗原結合領域が(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(ii) 第1の抗原結合領域が(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、第2の抗原結合領域が(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(iii) 第1の抗原結合領域が(a)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、第2の抗原結合領域が(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(iv) 第1の抗原結合領域が(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、第2の抗原結合領域が(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(v) 第1の抗原結合領域が(b)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、第2の抗原結合領域が(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である；

(vi) 第1の抗原結合領域が(c)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックし、第2の抗原結合領域が(d)の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックするか、またはその逆である。

【0211】

二重特異性抗体のさらなる態様では、第1および第2の抗原結合領域がそれぞれ、

(a) それぞれSEQ ID NO: 64、65および66 (153)；

(b) それぞれSEQ ID NO: 43、44および45 (127)；

(c) それぞれSEQ ID NO: 50、51および52 (159)；

(d) それぞれSEQ ID NO: 57、58および59 (098)；

(e) それぞれSEQ ID NO: 71、72および73 (132)；

(f) それぞれSEQ ID NO: 166、167および168 (005)；

(g) それぞれSEQ ID NO: 173、174および175 (006)；

(h) それぞれSEQ ID NO: 180、181および182 (059)；

(i) それぞれSEQ ID NO: 187、188および189 (060)；

(j) それぞれSEQ ID NO: 194、195および196 (106)；

(k) それぞれSEQ ID NO: 201、202および203 (111)；

(l) それぞれSEQ ID NO: 2、3および4 (169)；

(m) それぞれSEQ ID NO: 9、10および11 (050)；

(n) それぞれSEQ ID NO: 16、17および18 (084)；

(o) それぞれSEQ ID NO: 23、24および25 (025)；

(p) それぞれSEQ ID NO: 30、163および31 (091)；

(q) それぞれSEQ ID NO: 36、37および38 (129)；

(r) トラストズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列；ならびに

(s) ペルツズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列、

からなる群より独立に選択されるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、ただし、第1の抗原結合領域がトラストズマブ由来である場合には第2の抗原結合領域はペルツズマブ由来でないこと、およびその逆も同様であることを条件とする。

【0212】

例えば、第1および第2の抗原結合領域はそれぞれ、

(a) それぞれSEQ ID NO: 64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO: 68、DASおよびSEQ ID NO: 69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (153)；

(b) それぞれSEQ ID NO : 43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 47、AASおよびSEQ ID NO : 48であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (127) ；

(c) それぞれSEQ ID NO : 50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 54、AASおよびSEQ ID NO : 55であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (159) ；

(d) それぞれSEQ ID NO : 57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 60、AASおよびSEQ ID NO : 61であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (098) ；

(e) それぞれSEQ ID NO : 71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 75、DASおよびSEQ ID NO : 76であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (132) ；

10

(f) それぞれSEQ ID NO : 166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 170、GASおよびSEQ ID NO : 171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (005) ；

(g) それぞれSEQ ID NO : 173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 177、DASおよびSEQ ID NO : 178であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (006) ；

(h) それぞれSEQ ID NO : 180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 184、GASおよびSEQ ID NO : 185であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (059) ；

20

(i) それぞれSEQ ID NO : 187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 191、GASおよびSEQ ID NO : 192であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (060) ；

(j) それぞれSEQ ID NO : 194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 198、GASおよびSEQ ID NO : 199であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (106) ；

(k) それぞれSEQ ID NO : 201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 205、GASおよびSEQ ID NO : 206であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (111) ；

30

(l) それぞれSEQ ID NO : 2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 6、DASおよびSEQ ID NO : 7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (169) ；

(m) それぞれSEQ ID NO : 9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 13、AASおよびSEQ ID NO : 14であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (050) ；

(n) それぞれSEQ ID NO : 16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 20、VASおよびSEQ ID NO : 21であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (084) ；

(o) それぞれSEQ ID NO : 23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 27、AASおよびSEQ ID NO : 28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (025) ；

40

(p) それぞれSEQ ID NO : 30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 33、AASおよびSEQ ID NO : 34であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (091) ；

(q) それぞれSEQ ID NO : 36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO : 40、DASおよびSEQ ID NO : 41であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域 (129) ；

(t) トラスツズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびにトラスツズマブのVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域；ならびに

50

(u) ペルツズマブのVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびにペルツズマブのVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域；
からなる群より独立に選択されるVH領域およびVL領域を含んでよく、ただし、第1の抗原結合領域がトラスツマブ由来である場合には第2の抗原結合領域はペルツズマブ由来でないこと、およびその逆も同様であることを条件とする。

【0213】

さらにより詳細には、第1および第2の抗原結合領域はそれぞれ、以下のものからなる群より独立に選択されるVH領域およびVL領域を含みうる：

(a) それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（153）

10

(b) それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）；

(c) それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；ならびに

(d) それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）。

20

【0214】

それ故に、1つの態様において、本発明は、SEQ ID NO：66であるVH CDR3配列を含む第1の抗原結合領域（153）およびSEQ ID NO：168であるVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（005）、またはその逆のものを含む二重特異性抗体に関する。

【0215】

さらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：69であるVL CDR3配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：171であるVL CDR3配列（005）をさらに含む。

【0216】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：64であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：65であるVH CDR2配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：166であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO：167であるVH CDR2配列（005）をさらに含む。

30

【0217】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：68であるVL CDR1配列およびDASであるVL CDR2配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：170であるVL CDR1配列およびGASであるVL CDR2配列（005）をさらに含む。

【0218】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO：63を含むVH領域およびSEQ ID NO：67を含むVL領域を含む第1の抗原結合領域（153）、ならびにSEQ ID NO：165を含むVH領域およびSEQ ID NO：169を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域（005）、またはその逆のものを含む。

40

【0219】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO：66であるVH CDR3配列を含む第1の抗原結合領域（153）およびSEQ ID NO：4であるVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（169）、またはその逆のものを含む二重特異性抗体に関する。

【0220】

さらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：69であるVL CDR3配列（153）をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：7であるVL CDR3配列（169）をさらに含む。

50

【 0 2 2 1 】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 64であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 65であるVH CDR2配列 (153) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 2であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 3であるVH CDR2配列 (169) をさらに含む。

【 0 2 2 2 】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 68であるVL CDR1配列およびDASであるVL CDR2配列 (153) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 6であるVL CDR1配列およびDASであるVL CDR2配列 (169) をさらに含む。

【 0 2 2 3 】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO : 63を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67を含むVL領域を含む第1の抗原結合領域 (153) 、ならびにSEQ ID NO : 1を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域 (169) 、またはその逆のものを含む。

【 0 2 2 4 】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 168であるVH CDR3配列を含む第1の抗原結合領域 (005) およびSEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域 (169) 、またはその逆のものを含む二重特異性抗体に関する。

【 0 2 2 5 】

さらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 171であるVL CDR3配列 (005) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 7であるVL CDR3配列 (169) をさらに含む。

【 0 2 2 6 】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 166であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 167であるVH CDR2配列 (005) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 2であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 3であるVH CDR2配列 (169) をさらに含む。

【 0 2 2 7 】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 170であるVL CDR1配列およびGASであるVL CDR2配列 (005) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 6であるVL CDR1配列およびDASであるVL CDR2配列 (169) をさらに含む。

【 0 2 2 8 】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO : 165を含むVH領域およびSEQ ID NO : 169を含むVL領域を含む第1の抗原結合領域 (005) 、ならびにSEQ ID NO : 1を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域 (169) 、またはその逆のものを含む。

【 0 2 2 9 】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列を含む第1の抗原結合領域 (025) およびSEQ ID NO : 168であるVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域 (005) 、またはその逆のものを含む二重特異性抗体に関する。

【 0 2 3 0 】

さらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 28であるVL CDR3配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 171であるVL CDR3配列 (005) をさらに含む。

【 0 2 3 1 】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 23であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 24であるVH CDR2配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 166であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 167であるVH CDR2配列 (005) をさらに含む。

【 0 2 3 2 】

10

20

30

40

50

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 27であるVL CDR1配列およびAASであるVL CDR2配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 170であるVL CDR1配列およびGASであるVL CDR2配列 (005) をさらに含む。

【0233】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO : 22を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26を含むVL領域を含む第1の抗原結合領域 (025) 、ならびにSEQ ID NO : 165を含むVH領域およびSEQ ID NO : 169を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域 (005) 、またはその逆のものを含む。

【0234】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列を含む第1の抗原結合領域 (025) およびSEQ ID NO : 66であるVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域 (153) 、またはその逆のものを含む二重特異性抗体に関する。

10

【0235】

さらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 28であるVL CDR3配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 69であるVL CDR3配列 (153) をさらに含む。

【0236】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 23であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 24であるVH CDR2配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 64であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 65であるVH CDR2配列 (153) をさらに含む。

20

【0237】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 27であるVL CDR1配列およびAASであるVL CDR2配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 68であるVL CDR1配列およびDASであるVL CDR2配列 (153) をさらに含む。

【0238】

別の態様において、二重特異性抗体は、SEQ ID NO : 22を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26を含むVL領域を含む第1の抗原結合領域 (025) 、ならびにSEQ ID NO : 63を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域 (153) 、またはその逆のものを含む。

30

【0239】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列を含む第1の抗原結合領域 (025) およびSEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域 (169) 、またはその逆のものを含む二重特異性抗体に関する。

【0240】

さらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 28であるVL CDR3配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 7であるVL CDR3配列 (169) をさらに含む。

【0241】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 23であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 24であるVH CDR2配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 2であるVH CDR1配列およびSEQ ID NO : 3であるVH CDR2配列 (169) をさらに含む。

40

【0242】

なおさらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 27であるVL CDR1配列およびAASであるVL CDR2配列 (025) をさらに含み、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 6であるVL CDR1配列およびDASであるVL CDR2配列 (169) をさらに含む。

【0243】

別の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 22を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26を含むVL領域を含む第1の抗原結合領域 (025) 、ならびにSEQ ID NO : 1を含むVH領域およびSEQ

50

ID NO : 5を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域 (169)、またはその逆のものを含む二重特異性抗体に関する。

【 0 2 4 4 】

本発明はまた、HER2ドメインII内のエピトープと結合する第1の抗原結合領域、およびHER2ドメインIII内またはIV内のエピトープと結合する第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体に関する。

【 0 2 4 5 】

さらなる態様において、第2の抗原結合領域は、HER2ドメインIII内のエピトープと結合する。

【 0 2 4 6 】

1つの代替的なさらなる態様において、第2の抗原結合領域HER2ドメインIV内のエピトープと結合する。

【 0 2 4 7 】

さらなる態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO : 63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67の配列を含むVL領域を含む参照抗体 (153) の可溶性HER2に対する結合をブロックする。

【 0 2 4 8 】

さらなる態様において、第1および/または第2の抗原結合領域は、上記の態様のいずれかのVH領域、および任意でVL領域を含む。

【 0 2 4 9 】

本発明はまた、第1および第2の抗原結合領域がヒト抗体VH配列、および任意でヒト抗体VL配列を含む、二重特異性抗体に関する。

【 0 2 5 0 】

さらなる態様において、本発明は、第1および第2の抗原結合領域が重鎖抗体由来である二重特異性抗体に関する。

【 0 2 5 1 】

さらなる態様において、本発明は、第1および第2の抗原結合領域が第1および第2の軽鎖を含む二重特異性抗体に関する。

【 0 2 5 2 】

さらなる態様において、本発明は、前記第1および第2の軽鎖が異なる二重特異性抗体に関する。

【 0 2 5 3 】

さらなる態様において、二重特異性抗体はHER2ダウンモジュレーションを、特にそれらの単一特異性対応物よりも増強し、例えば、抗体は、実施例22に記載した通りに判定した場合に、HER2ダウンモジュレーションを20%超、例えば30%超または40%超というように増強したが、ここで好ましくは抗体は、IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R、IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R ; およびIgG1-153-ITL x IgG1-169-K409Rからなる群より選択される二重特異性抗体と同じエピトープと結合する。

【 0 2 5 4 】

追加的または代替的な態様において、二重特異性抗体は、実施例24に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合して、リガンドで誘導される細胞の増殖を阻害し、かつ、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの二重特異性抗体と同じエピトープと結合する : IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R、IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R ; およびIgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R。特に、二重特異性抗体は、AU565細胞の増殖をそれらの単一特異性対応物よりも阻害し、IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409RおよびIgG1-025-ITL x IgG1-005-K409Rからなる群より選択される。

【 0 2 5 5 】

1つの追加的な態様において、二重特異性抗体は、実施例31に記載した通りに判定した

10

20

30

40

50

場合に、PBMC媒介性の細胞傷害性を誘導し、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの二重特異性抗体と同じエピトープと結合する：IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R およびIgG1-005-ITL x IgG1-153-K409R。特に、二重特異性抗体は、PBMC媒介性の細胞傷害性をそれらの単一特異性対応物よりも高いレベルで、任意でそれらの単一特異性対応物の組み合わせを上回って誘導する。

【0256】

1つの追加的な態様において、二重特異性抗体は、実施例32に記載したNCI-N87ヒト胃癌異種移植モデルにおいて腫瘍成長を低下させ、および/またはマウスのより優れた生存性をもたらす、かつ、以下のものからなる群より選択される少なくとも1つの二重特異性抗体と同じエピトープと結合する：IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409RおよびIgG1-005-ITL x IgG1-153-K409R。特に、二重特異性抗体は、腫瘍成長をそれらの単一特異性対応物よりも高いレベルで、任意でそれらの単一特異性対応物の組み合わせを上回って低下させる。

【0257】

Fc領域

1つの局面において、本発明の二重特異性HER2 x HER2抗体は第1および第2のFc領域をさらに含み、当該Fc領域は第1および第2のFabアームの中に含まれ得、当該Fabアームは、それぞれ上記の第1および第2の抗原結合領域をさらに含む（またはその逆である）。それ故に、1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、1つの態様において、第1の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第2の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含み得る。または、本発明の二重特異性抗体が、第1の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第2の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第2のFabアームを含み得る。

【0258】

Fabアームの第1および第2のFc領域は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を非限定的に含む、任意のアイソタイプのものであってよい。1つの態様において、第1および第2のFc領域のそれぞれは、IgG4アイソタイプのものであるか、またはそれに由来し、任意で1つまたは複数の突然変異または修飾を伴う。1つの態様において、第1および第2のFc領域のそれぞれはIgG1アイソタイプのものであるか、またはそれに由来し、任意で1つまたは複数の突然変異または修飾を伴う。別の態様において、Fc領域の一方はIgG1アイソタイプのものであってもう一方はIgG4アイソタイプのものであるか、またはそれらはそのような各々のアイソタイプに由来し、任意で1つまたは複数の突然変異または修飾を伴う。

【0259】

1つの態様において、一方または両方のFc領域はIgG1野生型配列（SEQ ID NO：234）を含む。

【0260】

1つの態様において、Fc領域の一方または両方は、Asn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含むか、またはグリコシル化特性が変化するように他の様式で操作される。例えば、IgG1 Fc領域では、N297Q突然変異を利用してAsn結合型グリコシル化部位を除去することができる。したがって、1つの具体的な態様において、一方または両方のFc領域は、N297Q突然変異を有するIgG1野生型配列（SEQ ID NO：235）を含む。

【0261】

さらなる態様において、Fc領域の一方または両方は、例えば、US2009317869号に記載されたように、もしくはvan Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350に記載されたように抗体産生中に培地に化合物を添加することによって、または例えばYamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614に記載されたようにFUT8ノックアウト細胞を用いることによって、フコースを減少させ、そのためADCCを増強するような糖質操作を受けている（glyco-engineered）。または、ADCCを、Umana et al. (1999) Nature Biotech 17:176によって記載された方法を用いて最適化することもできる。さらなる態様において、Fc領域の一方または両方は、例えば、Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411に記載されたように、補体活性化を強化するように操作されている。

【0262】

本発明の1つの態様において、第1または第2の抗原結合領域またはその一部、例えば1つまたは複数のCDRは、ラクダ科の種のもの（WO 2010001251号参照）であるか、または軟骨魚類の種（例えばテンジクザメ）のものである。1つの態様において、第1および第2の抗原結合領域または重鎖は、重鎖抗体由来である。

【0263】

1つの態様において、第1および/または第2のFc領域は、薬物、プロドラッグもしくは毒素と結合体化されているか、またはそれに対するアクセプター基を含む。そのようなアクセプター基は、例えば、非天然アミノ酸であってよい。

【0264】

1つの局面において、本発明の二重特異性抗体は、第1のCH3領域を含む第1のFc領域、および第2のCH3領域を含む第2のFc領域を含み、ここで第1および第2のCH3領域の配列は異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強い。これらの相互作用、およびそれらをいかにして達成しうるかに関するこれ以上の詳細は、WO 11/131746号として公開されたPCT/EP2011/056388号に提示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0265】

本明細書および実施例で説明しているように、CH3領域内に少数の極めて保存的な非対称突然変異のみを含む2種のホモ二量体の出発HER2抗体に基づく特定の方法を用いて、安定した二重特異性HER2 x HER2分子を高収率で入手することができる。非対称突然変異とは、前記第1および第2のCH3領域の配列がアミノ酸置換を同一でない位置に含むことを意味する。

【0266】

1つの態様において、第1のFc領域は、366、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ、第1および第2のFc領域は同じ位置では置換されていない。

【0267】

1つの態様において、第1のFc領域は位置366にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。1つの態様において、位置366のアミノ酸は、Ala、Asp、Glu、His、Asn、ValまたはGlnから選択される。

【0268】

1つの態様において、第1のFc領域は位置368にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0269】

1つの態様において、第1のFc領域は位置370にアミノ酸置換を有し、第2のHER2抗体は、366、368、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0270】

1つの態様において、第1のFc領域は位置399にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0271】

1つの態様において、第1のFc領域は位置405にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0272】

10

20

30

40

50

1つの態様において、第1のFc領域は位置407にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、405および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0273】

1つの態様において、第1のFc領域は位置409にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0274】

したがって、1つの態様において、前記第1および第2のCH3領域の配列は、非対称突然変異、すなわち、例えば、CH3領域の一方における位置405の突然変異およびもう一方のCH3領域内の位置409の突然変異といった、2つのCH3領域内の異なる位置にある突然変異を含む。

10

【0275】

1つの態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。1つのそのような態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置405にPhe以外のアミノ酸、例えば、Lys、Leu、Met、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCysを有する。さらなる態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸、例えば、Lys、Leu、Met、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCysを有する。

20

【0276】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを含み、前記第2のFc領域は、位置405にPhe以外のアミノ酸、例えば、Lys、Leu、Met、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCysを含み、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1のFc領域は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを含み、前記第2のFc領域は、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸、例えば、Lys、Leu、Met、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCysを含み、位置409にLysを含む。

30

【0277】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを含み、前記第2のFc領域は、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1のFc領域は、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸、例えば、Lys、Leu、Met、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Pro、Ala、Val、Ile、Tyr、TrpまたはCysを含み、位置409にLysを含む。別の態様において、前記第1のFc領域は、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

40

【0278】

さらなる態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、P

50

he、Tyr、TrpまたはCysを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。さらなる態様において、前記第1のFc領域は位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0279】

なおさらなる態様において、前記第1のFc領域は、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0280】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを含み、かつ：a) 位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb) 位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

10

【0281】

別の態様において、前記第1のFc領域は位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを含み、かつ：a) 位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb) 位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0282】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを含み、かつ：a) 位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb) 位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

20

【0283】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

【0284】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸、例えば、His、Asn、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Trp、Leu、MetまたはCysを有する。別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する。

30

【0285】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する。

【0286】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸、例えば、His、Asn、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Trp、Leu、MetまたはCysを、位置409にLysを有する。

40

【0287】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

50

【 0 2 8 8 】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【 0 2 8 9 】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のFc領域は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸、例えば、His、Asn、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Trp、Leu、MetまたはCysを、位置409にLysを有する。

10

【 0 2 9 0 】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のFc領域は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【 0 2 9 1 】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のFc領域は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【 0 2 9 2 】

1つの態様において、第1のFc領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、TrpまたはCysを有し、第2のFc領域は、

20

(i) 位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Lys、Tyr、TrpもしくはCys、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にAsp、Cys、Pro、GluもしくはGln以外のアミノ酸、例えば、Arg、His、Ser、Thr、Asn、Gly、Ala、Val、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、LeuもしくはMet、または

(iv) 位置366にLys、Arg、Ser、ThrもしくはTrp以外のアミノ酸、例えば、Leu、Met、His、Asp、Glu、Asn、Glu、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、TyrもしくはCysを有する。

【 0 2 9 3 】

30

1つの態様において、第1のFc領域は、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のFc領域は、

(i) 位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetもしくはTyr

を有する。

40

【 0 2 9 4 】

1つの態様において、第1のFc領域は位置409にArgを有し、第2のFc領域は、

(i) 位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln

を有する。

【 0 2 9 5 】

上記に特定されたアミノ酸置換に加えて、前記第1および第2のFc領域が、野生型Fc配列に比してのアミノ酸置換、欠失または挿入をさらに含んでもよい。

50

【 0 2 9 6 】

さらなる態様において、第1および第2のFc領域を含む前記第1および第2のFabアーム（または重鎖定常ドメイン）は、明記した変異を除いて、以下のものから独立に選択される配列を含む：

a) (IgG1m(a)):

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:236);

b) (IgG1m(f)):

GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:237); および

10

c) (IgG1m(ax)):

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:238)

【 0 2 9 7 】

1つの態様において、前記第1のFc領域も前記第2のFc領域も、（コア）ヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない。

【 0 2 9 8 】

さらなる態様において、前記第1および前記第2のFc領域は両方とも、（コア）ヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む。

20

【 0 2 9 9 】

1つの別の具体的な態様において、一方または両方のFabアームは、以下のものから別々に選択される配列を含む。

a) IgG1 野生型配列 (SEQ ID NO:234):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

30

b) IgG1 N297Q (SEQ ID NO:235)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

c) IgG1- LFLEDANQPS 変異 (SEQ ID NO:239)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

10

d) IgG1- F405L N297Q (SEQ ID NO:240)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

20

e) IgG1- K409R N297Q (SEQ ID NO:241)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

30

f) IgG1- F405L LFLEDANQPS (SEQ ID NO:242)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK, および

40

g) IgG1 – K409R LFLEDANQPS (SEQ ID NO:243)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK;

h) IgG1 Fc 領域 – ITL (SEQ ID NO:244)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKISKAKGQPREPQVYILPPSREEMTKNQVSLTCL
 VTGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
 EALHNHYTQKSLSLSPGK, および

10

i) IgG1 Fc 領域 – K409R (SEQ ID NO:245)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
 SLSPGK

20

【 0 3 0 0 】

1つの態様において、抗体は、以下のものを含む二重特異性抗体である：(i) Fc領域およびVHおよびVL配列を含む第1のFabアーム、ここでFabアームは(005)、(025)、(153)または(169)のVH領域配列および任意でVL領域配列を含み、FabアームはIgG1野生型Fc領域を含み、CH3領域は位置405にLeuを、ならびに任意で位置350にIleを、位置370にThrを含む、ならびに(ii) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアーム、ここでFabアームは(005)、(025)、(153)または(169)のVHおよびVL領域配列を含み、FabアームはIgG1野生型Fc領域を含み、CH3領域は位置409にArgを含む。具体的な態様は実施例に開示されている。

30

【 0 3 0 1 】

特定の態様において(005)のVHおよびVL領域配列は、以下のものからなる群より選択されうる：

- (a) SEQ ID NO : 168であるVH CDR3配列(005)、
- (b) SEQ ID NO : 168であるVH CDR3配列およびSEQ ID NO : 171であるVL CDR3配列(005)、
- (c) SEQ ID NO : 166であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 167であるVH CDR2配列およびSEQ ID NO : 168であるVH CDR3配列(005)、
- (d) SEQ ID NO : 64であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 65であるVH CDR2配列、SEQ ID NO : 168であるVH CDR3配列、SEQ ID NO : 170であるVL CDR1配列、GASであるVL CDR2配列およびSEQ ID NO : 171であるVL CDR3配列(005)、ならびに
- (e) SEQ ID NO : 165を含むVH領域およびSEQ ID NO : 169を含むVL領域(005)。

40

【 0 3 0 2 】

特定の態様において、(025)のVHおよびVL領域配列は、以下のものからなる群より選択されうる：

- (a) SEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列(025)、

50

- (b) SEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列およびSEQ ID NO : 28であるVL CDR3配列 (025)、
- (c) SEQ ID NO : 23であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 24であるVH CDR2配列およびSEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列 (025)、
- (d) SEQ ID NO : 23であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 24であるVH CDR2配列、SEQ ID NO : 25であるVH CDR3配列、SEQ ID NO : 27であるVL CDR1配列、AASであるVL CDR2配列およびSEQ ID NO : 28であるVL CDR3配列 (025)、ならびに
- (e) SEQ ID NO : 22を含むVH領域およびSEQ ID NO : 26を含むVL領域 (025)。

【0303】

特定の態様において、(153)のVHおよびVL領域配列は、以下のものからなる群より選択されうる：

- (a) SEQ ID NO : 66であるVH CDR3配列 (153)、
- (b) SEQ ID NO : 66であるVH CDR3配列およびSEQ ID NO : 69であるVL CDR3配列 (153)、
- (c) SEQ ID NO : 64であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 65であるVH CDR2配列およびSEQ ID NO : 66であるVH CDR3配列 (153)、
- (d) SEQ ID NO : 64であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 65であるVH CDR2配列、SEQ ID NO : 66であるVH CDR3配列、SEQ ID NO : 68であるVL CDR1配列、DASであるVL CDR2配列およびSEQ ID NO : 69であるVL CDR3配列 (153)、ならびに
- (e) SEQ ID NO : 63を含むVH領域およびSEQ ID NO : 67を含むVL領域 (153)。

【0304】

特定の態様において、(169)のVHおよびVL領域配列は、以下のものからなる群より選択されうる：

- (a) SEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列 (169)、
- (b) SEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列およびSEQ ID NO : 7であるVL CDR3配列 (169)、
- (c) SEQ ID NO : 2であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 3であるVH CDR2配列およびSEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列 (169)、
- (d) SEQ ID NO : 2であるVH CDR1配列、SEQ ID NO : 3であるVH CDR2配列、SEQ ID NO : 4であるVH CDR3配列、SEQ ID NO : 6であるVL CDR1配列、DASであるVL CDR2配列およびSEQ ID NO : 7であるVL CDR3配列 (169)、ならびに
- (e) SEQ ID NO : 1を含むVH領域およびSEQ ID NO : 5を含むVL領域 (169)。

【0305】

実施例34に示されているように、F405L突然変異は、示されたFabアーム交換にヒトIgG1を関与させるのに十分であるように思われる。その上、実施例の項で示されているように、突然変異の他の組み合わせも適している可能性がある。

【0306】

1つの態様において、抗体は、以下のものを含む二重特異性抗体である：(i) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 165のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 169のアミノ酸配列を含み (005)、任意で第1のFabアームはIgG1、Fc領域を含み、CH3領域は位置405にLeuを、ならびに任意で位置350にIleを、位置370にThrを含む；ならびに(ii) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 1のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 5のアミノ酸配列を含み (169)、任意で第2のFabアームは位置409にArgを有するIgG1、Fc領域を含む。

【0307】

1つの態様において、二重特異性抗体は以下のものを含む：(i) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 22のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 26のアミノ酸配列を含み (025)、任意で第1のFabアームはIgG1、Fc領域を含み、CH3領域は位置405にLeuを含み、かつ任意で位置350にIleを、位置370にThrを含む；ならびに(ii) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアーム、こ

10

20

30

40

50

ここでVH領域はSEQ ID NO : 165のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 169のアミノ酸配列を含み(005)、任意で第2のFabアームは位置409にArgを有するIgG1、Fc領域を含む。

【0308】

1つの態様において、二重特異性抗体は、以下のものを含む：(i) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 22のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 26のアミノ酸配列を含み(025)、任意で第1のFabアームはIgG1、Fc領域を含み、CH3領域は位置405にLeuを、かつ任意で位置350にIleを、位置370にThrを含む；ならびに(ii) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 63のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 37のアミノ酸配列を含み(153)、任意で第2のFabアームは位置409にArgを有するIgG1、Fc領域を含む。

10

【0309】

1つの態様において、二重特異性抗体は以下のものを含む：(i) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 22のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 26のアミノ酸配列を含み(025)、任意で第1のFabアームはIgG1、Fc領域を含み、CH3領域は位置405にLeuを、かつ任意で位置350にIleを、位置370にThrを含む；ならびに(ii) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 1のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 5のアミノ酸配列を含み(169)、任意で第2のFabアームは位置409にArgを有するIgG1、Fc領域を含む。

20

【0310】

1つの態様において、二重特異性抗体は以下のものを含む：(i) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 63のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 67のアミノ酸配列を含み(153)、任意で第1のFabアームはIgG1、Fc領域を含み、CH3領域は位置405にLeuを、かつ任意で位置350にIleを、位置370にThrを含む；ならびに(ii) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 165のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 169のアミノ酸配列を含み(005)、任意で第2のFabアームは位置409にArgを有するIgG1、Fc領域を含む。

【0311】

1つの態様において、二重特異性抗体は以下のものを含む：(i) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 63のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 67のアミノ酸配列を含み(153)、任意で第1のFabアームはIgG1、Fc領域を含み、CH3領域は位置405にLeuを、かつ任意で位置350にIleを、位置370にThrを含む；ならびに(ii) Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアーム、ここでVH領域はSEQ ID NO : 1のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO : 5のアミノ酸配列を含み(169)、ここで任意で第2のFabアームは位置409にArgを有するIgG1、Fc領域を含む。

30

【0312】

上記の態様の任意のものにおいて、第1および/または第2のFabアームが、CH1および/またはCL配列をさらに含んでもよい。

【0313】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R、IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R、IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R；およびIgG1-153-ITL x IgG1-169-K409Rからなる群より選択されてよく、ここでIgG1-005-ITLとは、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを有する005IgG1、を意味し、IgG1-005-K409Rとは、位置409にArgを有する005IgG1、を意味し、IgG1-025-ITLとは、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを有する025IgG1、を意味する。IgG1-153-ITLとは、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを有する153IgG1、を意味し、IgG1-153-K409Rとは、位置409にArgを有する153IgG1、を意味し、IgG1-169-K409Rとは、位置409にArgを有する169IgG1、を意味し、ここで太字の数字は、表1に記載された配列を含むVHおよびVL領域を有する本明細書に記載の抗体のことを指す。

40

50

【0314】

二重特異性抗体の形式

本発明は、HER2を発現する腫瘍細胞と有効に結合して、任意でその中に内部移行し、典型的には細胞のリガンド非依存的増殖を著しく促進することのない、二重特異性HER2 x HER2抗体を提供する。個々の用途に望まれる機能特性に応じて、特定の抗原結合領域を、本発明によって提供される抗体もしくは抗原結合領域のセットから、または例えば、本発明によって提供される抗体もしくは抗原結合領域とエピトープまたはクロスブロック領域が共通している抗体もしくは抗原結合領域から選択することができる。二重特異性抗体の形式および用途は数多くのさまざまなものが当技術分野において公知であり、最近、Cham

es and Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276によって総説が行われている。

10

【0315】

本発明の例示的な二重特異性抗体分子には、以下のものが含まれる：(i) HER2エピトープに対する特異性を有する異なる抗原結合領域をそれぞれ含む2つのアームを有する単一の抗体、(ii) 第1のHER2エピトープに対して特異的な1つの抗原結合領域またはアーム、および第2のHER2エピトープに対して特異的な第2の鎖またはアームを有する単一の抗体、(iii) 例えば追加のペプチドリンカーによって縦列に連結された2つのscFvを介して、第1のHER2エピトープおよび第2のHER2エピトープに対する特異性を有する、単鎖抗体；(iv) 各軽鎖および重鎖が短いペプチドによる結合を介して縦列になった2つの可変ドメインを含有する二重可変ドメイン (dual-variable-domain) 抗体 (DVD-Ig) (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig (商標)) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010))；(v) 化学的に結合した二重特異性 (Fab')₂断片；(vi) 2つの単鎖ダイアボディの融合の結果、標的抗原のそれぞれに対して2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体が生じるタンダブ (Tandab)；(vii) scFvとダイアボディの組み合わせの結果、多価分子が生じるフレキシボディ (flexibody)；(viii) プロテインキナーゼAの中の「二量体化・ドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「ドック・アンド・ロック (dock and lock)」分子、これはFabに適用されると、2つの同一なFab断片が1つの異なるFab断片と連結したも

のからなる三価の二重特異性結合タンパク質を生じうる；(ix) 例えば、2つのscFvがヒトFabアームの両端と融合したものを含む、いわゆるスコルピオン (Scorpion) 分子；ならびに(x) ダイアボディ。

20

30

【0316】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、ダイアボディ、クロスボディ (cross-body)、または本発明に記載したもののような制御下でのFabアーム交換を介して入手する二重特異性抗体である。

【0317】

さまざまなクラスの二重特異性抗体の例には、以下のものが非限定的に含まれる：

- ・ヘテロ二量体化を強制的に行わせる相補的CH3ドメインを有するIgG様分子
- ・分子の両側がそれぞれ、少なくとも2種類の異なる抗体のFab断片またはFab断片の一部を含む、組換えIgG様二重標的指向性分子；
- ・完全長IgG抗体が追加のFab断片またはFab断片の一部と融合されたIgG融合分子；
- ・単鎖Fv分子または安定化されたダイアボディが重鎖定常ドメイン、Fc領域またはそれら
- の一部と融合されたFc融合分子；
- ・複数の異なるFab断片が融合して1つになったFab融合分子；
- ・複数の異なる単鎖Fv分子または異なるダイアボディまたは異なる重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）が互いに、または別のタンパク質もしくは担体分子と融合された、ScFvおよびダイアボディを基にした抗体ならびに重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）。

40

【0318】

相補的CH3ドメイン分子を有するIgG様分子の例には、Triomab / Quadroma (Trion Pharma / Fresenius Biotech)、Knobs-into-Holes (Genentech)、CrossMAb (Roche) およびel

50

electrostatically-matched (Amgen)、LUZ-Y (Genentech)、Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono)、Biclonic (Merus) ならびに DuoBody (Genmab A/S) が非限定的に含まれる。

【0319】

組換えIgG様二重標的指向性分子の例には、Dual Targeting (DT) -Ig (GSK/Domantis)、Two-in-one抗体 (Genentech)、Cross-linked Mab (Karmanos Cancer Center)、mAb² (F-Star) およびCovX-body (CovX/Pfizer) が非限定的に含まれる。

【0320】

IgG融合分子の例には、Dual Variable Domain (DVD) -Ig (Abbott)、IgG-like Bispecific (ImClone/Eli Lilly)、Ts2Ab (MedImmune/AZ) およびBsAb (Zymogenetics)、HE

10

RCULES (Biogen Idec) ならびにTvAb (Roche) が非限定的に含まれる。

【0321】

Fc融合分子の例には、ScFv/Fc融合体 (Academic Institution)、SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion、Zymogenetics/BMS)、Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics) およびDual(ScFv)₂-Fab (National Research Center for Antibody Medicine-China) が非限定的に含まれる。

【0322】

Fab融合二重特異性抗体の例には、F(ab)₂ (Medarex/AMGEN)、Dual-ActionまたはBis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics)、二価二重特異性 (Bivalent Bispecific) (Biotechnol) およびFab-Fv (UCB-Celltech) が非限定的に含まれる。

20

【0323】

ScFvに基づく抗体、ダイアボディに基づく抗体およびドメイン抗体の例には、Bispecific T Cell Engager (BiTE) (Micromet)、Tandem Diabody (Tandab) (Affimed)、Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics)、単鎖ダイアボディ (Single-chain Diabody) (Academic)、TCR様抗体 (TCR-like Antibodies) (AIT, ReceptorLogics)、ヒト血清アルブミンscFv融合体 (Human Serum Albumin ScFv Fusion) (Merrimack) およびCOMBODY (Epigen Biotech)、二重標的ナノボディ (dual targeting nanobody) (Ablynx)、二重標的性の重鎖のみのドメイン抗体 (dual targeting heavy chain only domain antibody) が非限定的に含まれる。

【0324】

30

二重特異性抗体を調製するための方法

本発明の二重特異性抗体を調製する方法には、WO 2008119353号 (Genmab)、WO 2011131746号 (Genmab) に記載されたもの、およびvan der Neut-Kolfschoten et al. (Science, 2007 Sep 14;317(5844):1554-7) によって報告されたものが含まれる。二重特異性抗体を調製するために有用な他のプラットフォームの例には、BiTE (Micromet)、DART (MacroGenics)、FcabおよびMab² (F-star)、Fc-engineered IgG1 (Xencor) またはDuoBody (Fabアーム交換に基づく、Genmab、本出願では以下および例えば実施例20に記載) が非限定的に含まれる。

【0325】

ハイブリッドハイブリドーマ法および化学的結合法などの従来の方法 (Marvin and Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26: 649) を用いることもできる。異なる重鎖および軽鎖からなる2つの抗体を宿主細胞に共発現させることにより、所望の二重特異性抗体に加えて、可能な抗体産物の混合物が生じ、それらを通じて、例えばアフィニティークロマトグラフィーまたは類似の方法によって単離することができる。

40

【0326】

複数の異なる抗体構築物の共発現による機能的な二重特異性産物の形成にとって有利な戦略、例えば、Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219) によって記載された方法を用いることもできる。複数の異なる抗体を産生するラットおよびマウスのハイブリドーマの融合では、種に拘束された選好的な重鎖/軽鎖対合が理由で、限られた数のヘテロ二量体タンパク質しか得られない。ホモ二量体を上回るヘテロ二量体の形成を促進するための

50

別の戦略は、第1の重鎖ポリペプチドに出っ張り (protuberance) を、対応するくぼみ (cavity) を第2の重鎖ポリペプチドに導入し、それにより、これらの2つの重鎖の境界部にあるくぼみの中に出っ張りが位置し、ヘテロ二量体形成を促進してホモ二量体形成を妨げるようにする「knob-into-hole」戦略である。「出っ張り」は、第1のポリペプチドの境界部にある小さなアミノ酸側鎖を、それよりも大きい側鎖で置き換えることによって構築される。埋め合わせとなる、出っ張りと同じまたは類似のサイズの「くぼみ」は、第2のポリペプチドの境界部で大きなアミノ酸側鎖をそれよりも小さいもので置き換えることによって作り出される (米国特許第5,731,168号)。EP1870459号 (Chugai) およびWO 2009089004号 (Amgen) は、宿主細胞における複数の異なる抗体ドメインの共発現によるヘテロ二量体形成のために有利な他の戦略を記載している。これらの方法では、両方のCH3ドメインにおいてCH3-CH3境界部を構成する1つまたは複数の残基を荷電アミノ酸で置き換えて、ホモ二量体形成が静電的に不利でヘテロ二量体化が静電的に有利になるようにする。WO 2007110205 (Merck) は、IgAとIgGのCH3ドメインの違いを利用してヘテロ二量体化を助長する、もう1つの別の戦略を記載している。

【0327】

二重特異性抗体を生産するための別のインビトロ方法は、WO 2008119353号 (Genmab) およびWO 2011131746号 (Genmab) に記載されており、この場合には、還元条件下でのインキュベーションによる2つの単一特異性IgG4抗体またはIgG4様抗体の間の「Fabアーム」または「半分子 (half-molecule)」の交換 (1つの重鎖および付属する軽鎖の交換) によって二重特異性抗体が形成される。結果的に生じる産物は、異なる配列を含む可能性のある2つのFabアームを有する二重特異性抗体である。

【0328】

本発明の二重特異性HER2 x HER2抗体を調製するための1つの好ましい方法には、WO 2011131746 (Genmab) に記載された方法が含まれ、それは以下の段階を含む：

(a) 第1のFc領域を含む第1のHER2抗体を用意する段階であって、前記Fc領域が第1のCH3領域を含む段階、

(b) 第2のFc領域を含む第2のHER2抗体を用意する段階であって、前記Fc領域が第2のCH3領域を含む段階、ここで前記第1および第2のCH3領域の配列は異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は、前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強い、

(c) 前記第1の抗体を前記第2の抗体とともに還元条件下でインキュベートする段階、ならびに

(d) 前記二重特異性HER2 x HER2抗体を入手する段階。

【0329】

第1および/または第2のFc領域は、免疫グロブリンのFc領域であってもよい。

【0330】

理論に限定されるわけではないが、段階c)において、親抗体のヒンジ領域内の重鎖ジスルフィド結合は還元され、その結果生じるシステインは、別の親抗体分子 (元から異なる特異性を有するもの) のシステイン残基と重鎖間ジスルフィド結合を形成することができる。この方法の1つの態様において、段階c)における還元条件は、還元剤、例えば、2-メルカプトエチルアミン (2-MEA)、ジチオトレイトール (DTT)、ジチオエリトリトール (DTE)、グルタチオン、トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP)、L-システインおよび -メルカプトエタノールからなる群より選択される還元剤の添加を含み、好ましくは、2-メルカプトエチルアミン、ジチオトレイトールおよびトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンからなる群より選択される還元剤の添加を含む。さらなる態様において、段階c) は、例えば脱塩などによる還元剤の除去によって、条件を非還元性またはより低い還元性に戻すことを含む。

【0331】

典型的には、この方法において、第1および第2の抗体は、HER2の異なるエピトープと結合する、および/または異なる抗原結合配列を含む、第1および第2のHER2抗体である。1

10

20

30

40

50

つの態様において、前記第1および／または第2のホモ二量体タンパク質は完全長抗体である。

【0332】

この方法に対しては、第1および／または第2のFc領域を含む第1および第2のHER2抗体を含む、上記の第1および第2のHER2抗体のいずれを用いてもよい。そのような第1および第2のFc領域の組み合わせを含む、そのような第1および第2のFc領域の例には、上記のものの任意のものが含まれる。特定の態様において、第1および第2のHER2抗体を選択して、本明細書に記載のような二重特異性抗体を入手することができる。

【0333】

典型的には、この方法において、第1および第2の抗体は、HER2の異なるエピトープと結合し、かつ／または異なる抗原結合配列を含む、第1および第2のHER2抗体である。1つの態様において、前記第1および／または第2のホモ二量体タンパク質は完全長抗体である。

【0334】

この方法の1つの態様において、前記第1および前記第2の抗体のFc領域は両方とも、IgG1アイソタイプのものである。別の態様において、前記抗体のFc領域の一方はIgG1アイソタイプのものであり、もう一方はIgG4アイソタイプのものである。後者の態様において、その結果得られる二重特異性抗体はIgG1のFc領域およびIgG4のFc領域を含み、そのため、エフェクター機能の活性化に関連して興味深い中間的特性を有する。前記第1および／または前記第2の抗体がAsn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含むか、またはグリコシル化特性が変化するように他の様式で操作されている場合に、類似の産物を入手することができる。

【0335】

この方法のさらなる態様において、抗体の一方または両方は、例えば、US2009317869号に記載されたように、もしくはvan Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350に記載されたように抗体産生中に培地に化合物を添加することによって、または例えばYamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614に記載されたようにFUT8ノックアウト細胞を用いることによって、フコースが減少し、そのためADCCを増強するような糖質操作を受けている (glyco-engineered)。または、ADCCを、Umana et al. (1999) Nature Biotech 17:176によって記載された方法を用いて最適化することもできる。さらなる態様において、抗体の一方または両方は、例えば、Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411に記載されたように、補体活性化を強化するように操作されている。

【0336】

この方法のさらなる態様において、抗体の一方または両方は、ヘテロ二量体タンパク質の血清中半減期を操作する目的で、新生児Fc受容体 (FcRn) に対する結合性を低下させるかまたは増大させるように操作されている。さらなる態様において、出発抗体タンパク質の一方は、プロテインAと結合せず、それ故に、産物をプロテインAカラムに通過させることによってヘテロ二量体タンパク質を前記のホモ二量体の出発タンパク質と分離することが可能のように操作されている。

【0337】

この方法の特定の態様において、抗体またはその一部、例えば1つまたは複数のCDRは、ラクダ科の種 (WO 2010001251号参照) もしくは軟骨魚類の種 (例えばテンジクザメ) のものであるか、または重鎖抗体もしくはドメイン抗体である。

【0338】

1つの態様において、第1および／または第2のHER2抗体は、薬物、プロドラッグもしくは毒素と結合体化されているか、またはそれに対するアクセプター基を含む。そのようなアクセプター基は、例えば、非天然アミノ酸であってよい。

【0339】

上記のように、出発HER2抗体の第1および第2のCH3領域の配列は異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強い。WO 2011131746号 (Genmab)。これらの相互作用、およびそ

10

20

30

40

50

れらをいかにして達成しうるかに関するこれ以上の詳細は、PCT / EP2011/056388号に記載されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0340】

特に、本明細書および実施例で説明しているように、CH3領域内に少数の極めて保存的な非対称突然変異のみを含む2つのホモ二量体の出発HER2抗体に基づく特定の方法を用いて、安定した二重特異性HER2 x HER2分子を高収率で入手することができる。非対称突然変異とは、前記第1および第2のCH3領域の配列がアミノ酸置換を同一でない位置に含むことを意味する。

【0341】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は、366、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のHER2抗体は、366、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ第1および第2のHER2抗体は同じ位置では置換されていない。

10

【0342】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は位置366にアミノ酸置換を有し、前記第2のHER2抗体は、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。1つの態様において、位置366のアミノ酸は、Ala、Asp、Glu、His、Asn、ValまたはGlnから選択される。

【0343】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体タンパク質は位置368にアミノ酸置換を有し、前記第2のHER2抗体は、366、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

20

【0344】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は位置370にアミノ酸置換を有し、前記第2のHER2抗体は、366、368、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0345】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は位置399にアミノ酸置換を有し、前記第2のHER2抗体は、366、368、370、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

30

【0346】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は位置405にアミノ酸置換を有し、前記第2のHER2抗体は、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0347】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は位置407にアミノ酸置換を有し、前記第2のHER2抗体は、366、368、370、399、405および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【0348】

本方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は位置409にアミノ酸置換を有し、前記第2のHER2抗体は、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

40

【0349】

したがって、この方法の1つの態様において、前記第1および第2のCH3領域の配列は、非対称突然変異、すなわち、例えば、CH3領域の一方では位置405の突然変異、もう一方のCH3領域内では位置409の突然変異というような、2つのCH3領域内の異なる位置にある突然変異を含む。

【0350】

この方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、366、368、370、399、405および407からなる群

50

より選択される位置にアミノ酸置換を有する。1つのそのような態様において、前記第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は位置405にPhe以外のアミノ酸を有する。このさらなる態様において、前記第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を有する。

【0351】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、前記第2のHER2抗体は、位置405にPhe以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1のHER2抗体は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、前記第2のHER2抗体は、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む。

10

【0352】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、前記第2のHER2抗体は、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1のHER2抗体は、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は、位置405にPhe、ArgまたはGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む。別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

【0353】

この方法のさらなる態様において、前記第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、前記第2のホモ二量体タンパク質は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。さらなる態様において、前記第1のホモ二量体タンパク質は位置409にArgを含み、前記第2のホモ二量体タンパク質は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

20

【0354】

この方法のなおさらなる態様において、前記第1のHER2抗体は、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0355】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を含み、前記第2のHER2抗体は、位置409にLysを含み、かつ、a) 位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb) 位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

30

【0356】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は、位置409にLysを含み、かつ、a) 位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb) 位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【0357】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は、位置409にLysを含み、かつ、a) 位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、またはb) 位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

40

【0358】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

【0359】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を有する。別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にAla

50

a、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する。

【0360】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する。

【0361】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する。

【0362】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0363】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0364】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerまたはThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する。

【0365】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0366】

この方法の別の態様において、前記第1のHER2抗体は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のHER2抗体は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【0367】

この方法の1つの態様において、第1のHER2抗体は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、第2のHER2抗体は、

(i) 位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にAsp、Cys、Pro、GluもしくはGln以外のアミノ酸、または

(iv) 位置366にLys、Arg、Ser、ThrもしくはTrp以外のアミノ酸、例えば、Leu、Met、His、Asp、Glu、Asn、Glu、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Phe、TyrもしくはCysを有する。

【0368】

1つの態様において、第1のHER2抗体は、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のホモ二量体タンパク質は、

(i) 位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または

(ii) 位置370にTrp、または

(iii) 位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または

(iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetもしくはTyrを有する。

【0369】

10

20

30

40

50

1つの態様において、第1のHER2抗体は、位置409にArgを有し、第2のホモ二量体タンパク質は、

- (i) 位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
- (ii) 位置370にTrp、または
- (iii) 位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
- (iv) 位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln

を有する。

【0370】

その他の具体的な組み合わせには、Fc領域に関する項に記載されたものの任意のものが含まれる。

10

【0371】

上記に特定されたアミノ酸置換に加えて、前記第1および第2のホモ二量体タンパク質が、野生型Fc配列に比してさらなるアミノ酸置換、欠失または挿入を含んでもよい。

【0372】

この方法のさらなる態様において、前記第1および第2のCH3領域は、明記した変異を除いて、IgG1m(a)(SEQ ID NO:236)、IgG1m(f)(SEQ ID NO:237)またはIgG1m(ax)(SEQ ID NO:238)の配列を含む。

【0373】

したがって、1つの態様において、前記第1のHER2抗体も前記第2のHER2抗体も、(コア)ヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない。

20

【0374】

さらなる態様において、前記第1および前記第2のHER2抗体は両方とも、(コア)ヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む。

【0375】

また、本発明の二重特異性抗体を、第1および第2のポリペプチドをコードする構築物の、単一細胞における共発現によって入手することもできる。したがって、1つのさらなる局面において、本発明は、二重特異性抗体を生産するための方法であって、以下の段階を含む方法に関する：

(a) 免疫グロブリンの第1のFc領域および第1の抗原結合領域を含む第1のポリペプチドをコードする第1の核酸構築物を用意する段階であって、前記第1のFc領域が第1のCH3領域を含む段階、

30

(b) 第2のFc領域および第2の抗原結合領域を含む第2のポリペプチドをコードする第2の核酸構築物を用意する段階であって、前記第2のFc領域が第2のCH3領域を含み、

前記第1および第2のCH3領域の配列が異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強く、

前記第1のホモ二量体タンパク質が、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のホモ二量体タンパク質が、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、

任意で前記第1および第2の核酸構築物が前記第1および第2のHER2抗体の軽鎖配列をコードしている、段階、

40

(c) 前記第1および第2の核酸構築物を宿主細胞内で共発現させる段階、ならびに

(d) 前記ヘテロ二量体タンパク質を細胞培養物から入手する段階。

【0376】

第1の抗原結合領域は、本発明の第1のHER2抗体由来であってよい。さらなる態様において、第2の抗原結合領域は本発明の第2のHER2抗体由来であってよい。

【0377】

プロモーター、エンハンサーなどを含む適した発現ベクター、および抗体の産生のために適した適した宿主細胞は、当技術分野において周知である。宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞および哺乳動物細胞(例えばCHO細胞またはHEK細胞)が含まれる。

50

【0378】

この方法の1つの態様において、前記第1のCH3領域は、位置409にLys、LeuまたはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のCH3領域は、位置405にPhe以外のアミノ酸を有する。

【0379】

この方法の別の態様において、前記第1のCH3領域は、位置409にLys、LeuもしくはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のCH3領域は、位置405にPhe以外、例えば位置405にPhe、ArgもしくはGly以外のアミノ酸を有するか；または前記第1のCH3領域は、位置409にLys、LeuもしくはMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のCH3領域は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerもしくはThr以外のアミノ酸を有する。

【0380】

いくつかの態様において、前記第1および第2のポリペプチドは、異なるエピトープと結合する2つの抗体の完全長重鎖であり（すなわち、前記第1および第2の核酸構築物は、異なるエピトープと結合する2つの抗体の完全長重鎖をコードし）、それ故にヘテロ二量体タンパク質は二重特異性抗体である。この二重特異性抗体は重鎖抗体であってもよく、または前記宿主細胞が、軽鎖をコードする1つまたは複数の核酸構築物をさらに発現してもよい。1種のための軽鎖構築物を重鎖構築物と共発現させる場合には、機能的な二重特異性抗体は、軽鎖配列が重鎖のそれぞれと機能的抗原結合ドメインを形成しうる場合にのみ形成される。2種またはそれ以上の異なる軽鎖構築物を重鎖と共発現させる場合には、複数の産物が形成されると考えられる。

【0381】

さらなる態様において、本発明による共発現方法は、上記のインビトロ方法の項に記載された任意のさらなる特徴を含む。さらなる局面において、本発明は、上記に指定された第1および第2の核酸構築物を含む発現ベクターに関する。さらなる態様において、発現ベクターは、抗体（例えばヒト抗体）の軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の両方の定常領域をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【0382】

本発明の文脈において発現ベクターは、染色体核酸ベクター、非染色体核酸ベクター、および合成核酸ベクター（適切な一組の発現制御エレメントを含む核酸配列）を含む任意の適切なベクターでよい。このようなベクターの例には、SV40、細菌プラスミド、ファージDNA、パキウウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ならびにウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターの誘導体が含まれる。1つの態様において、HER2抗体をコードする核酸は、例えば直鎖発現エレメントを含む、裸のDNAベクターもしくはRNAベクター（例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997) に記載）、圧縮された核酸ベクター（例えば、US6,077,835および/もしくはWO00/70087に記載）、プラスミドベクター、例えばpBR322、pUC19/18、もしくはpUC118/119、「midge」最小サイズ核酸ベクター（例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001) に記載）、または沈殿された核酸ベクター構築物、例えばCaPO4によって沈殿された構築物（例えば、WO00/46147、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 95-51-55 (1986)、Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)、およびCoraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981) に記載）の中に含まれる。このような核酸ベクターおよびその利用は当技術分野において周知である（例えば、US5,589,466およびUS5,973,972を参照されたい）。

【0383】

本発明の抗体のための例示的な発現ベクターは、実施例2および3にも記載する。

【0384】

1つの態様において、ベクターは、細菌細胞におけるHER2抗体の発現に適している。このようなベクターの例には、発現ベクター、例えばBlueScript (Stratagene)、pINベクター (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)、pETベクター (Novagen, Madison WI) など) が含まれる。

【0385】

同様にまたは代替として、発現ベクターは、酵母系における発現に適したベクターでもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを使用することができる。適切なベクターには、例えば構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば 因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHを含むベクターが含まれる (F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)、およびGrant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987) に概説)。

【0386】

同様にまたは代替として、発現ベクターは、哺乳動物細胞における発現に適したベクター、例えば選択マーカーとしてグルタミン合成酵素を含むベクター、例えばBebbington (1992) *Biotechnology (NY)* 10: 169-175に記載のベクターでもよい。

【0387】

核酸および/またはベクターはまた、分泌配列/局在化配列をコードする核酸配列を含んでもよい。分泌配列/局在化配列は、ポリペプチド、例えば新生ポリペプチド鎖を細胞周辺腔にまたは細胞培地中に標的化することができる。このような配列は当技術分野において公知であり、分泌リーダーまたはシグナルペプチドを含む。

【0388】

発現ベクターには、HER2抗体をコードする核酸は、任意の適切なプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進エレメントを含んでもよく、これらと結合してもよい。このようなエレメントの例には、強発現プロモーター (例えば、ヒトCMV IEプロモーター/エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター)、有効なポリ(A)終結配列、大腸菌におけるプラスミド産物用の複製起点、選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、ならびに/または便利なクローニングサイト (例えば、ポリリンカー) が含まれる。核酸はまた、構成的プロモーターと相対する誘導性プロモーター、例えばCMV IEを含んでもよい。

【0389】

1つの態様において、HER2抗体をコードする発現ベクターを、ウイルスベクターを介して、宿主細胞または宿主動物の中に配置すること、および/または送達することができる。

【0390】

1つのさらなる別の局面において、本発明は、上記に指定された第1および第2の核酸構築物を含む宿主細胞に関する。

【0391】

したがって、本発明はまた、本発明の二重特異性抗体を産生する組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞 (例えばトランスフェクトマ) にも関する。宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞および哺乳動物細胞 (例えばCHO細胞またはHEK細胞) が含まれる。例えば、1つの態様において、宿主細胞は、細胞ゲノム中に安定的に組み込まれた第1および第2の核酸構築物を含みうる。別の態様において、本発明は、上記に指定したような第1および第2の核酸構築物を含む、プラスミド、コスミド、ファージミドまたは線状発現エレメントなどの非組み込み型の核酸を含む細胞を提供する。

【0392】

1つのさらなる別の局面において、本発明は、ヒト重鎖およびヒト軽鎖の1つまたは2つのセットをコードする核酸を含むトランスジェニック非ヒト動物または植物であって、本発明の二重特異性抗体を産生する動物または植物に関する。

【0393】

本発明はまた、本発明の二重特異性抗体を生産するための方法であって、

(a) 本発明の宿主細胞を培養する段階、および

(b) 二重特異性抗体を培地から精製する段階、

を含む方法にも関する。その上、本発明はまた、本発明の方法によって入手しうる二重特異性抗体にも関する。

【0394】

抗体の調製

例えばクロスブロック群1、2、3または4の抗体と共通のエピトープ領域またはクロスブロック領域を有する抗原結合領域を提供するといった目的で、本発明に用いるための第1および第2のHER2抗体などのモノクローナル抗体は、例えば、Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって生産することができ、または組換えDNA方法によって生産することもできる。モノクローナル抗体はまた、例えばClackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)に記載の技法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。モノクローナル抗体は任意の適切な供給源から得ることができる。従って、例えばモノクローナル抗体は、関心対象の抗原、例えば表面上に抗原を発現する細胞、または関心対象の抗原をコードする核酸の形をした抗原で免疫したマウスから得られたマウス脾臓B細胞から調製されたハイブリドーマから得られてもよい。モノクローナル抗体はまた、免疫したヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えばラット、イヌ、霊長類などの抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得られてもよい。

10

【0395】

1つの態様において、本発明の抗体はヒト抗体である。HER2に対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを用いて作製することができる。このようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウスは、本明細書において、それぞれ、HuMAb (登録商標)マウスおよびKMマウスと呼ばれるマウスを含み、本明細書において総称して「トランスジェニックマウス」と呼ばれる。

20

【0396】

HuMAb (登録商標)マウスは、再編成されていないヒト重鎖(μおよび)免疫グロブリン配列ならびに 軽鎖免疫グロブリン配列と、内因性μ鎖および 鎖遺伝子座を不活化する標的変異をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含有する(Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994))。従って、このマウスはマウスIgMまたはの低発現を示し、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランスジーンはクラススイッチおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgG, モノクローナル抗体を産生する(Lonberg, N. et al. (1994), 前出; Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol.13 65-93 (1995)、およびHarding, F. and Lonberg, N. Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)に概説)。HuMAb (登録商標)マウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)、Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に詳述されている。US5,545,806、US5,569,825、US5,625,126、US5,633,425、US5,789,650、US5,877,397、US5,661,016、US5,814,318、US5,874,299、US5,770,429、US5,545,807、WO98/24884、WO94/25585、WO93/1227、WO92/22645、WO92/03918、およびWO01/09187も参照されたい。

30

40

【0397】

HCo7、HCo12、HCo17、およびHCo20マウスは、内因性軽鎖()遺伝子におけるJKD破壊(Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)に記載)、内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊(WO01/14424の実施例1に記載)、およびKCo5ヒト 軽鎖トランスジーン(Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載)を有する。さらに、HCo7マウスはHCo7ヒト重鎖トランスジーン(US5,770,429に記載)を有し、HCo12マウスはHCo12ヒト重鎖トランスジーン(WO01/14424の実施例2に記載)を有し、HCo17マウスはHCo17ヒト重鎖トランスジーン(WO01/09187の実施例2に記載)を有し、HCo20マウスはHCo20ヒト重鎖トランスジーンを有する。結果として生じたマウスは、内因性マウス重鎖遺伝子座および 軽鎖遺伝子座がホモで破壊されたバックグラウンドでヒト免疫グロブリン重鎖トラ

50

ンスジーンおよび 軽鎖トランスジーンを発現する。

【0398】

KMマウス系統では、内因性マウス 軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)に記載のようにホモで破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、W001/09187の実施例1に記載のようにホモで破壊されている。このマウス系統は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)に記載のように、ヒト 軽鎖トランスジーンであるKCo5を有する。このマウス系統はまた、W002/43478に記載のように、第14番染色体断片hCF (SC20) からなるヒト重鎖トランスクロモソームも有する。HCo12-Balb/Cマウスは、WO/2009/097006に記載のように、HCo12をKCo5[J/K] (Balb) と交雑することによって作製することができる。

10

【0399】

これらのトランスジェニックマウスに由来する脾細胞を用いると、周知の技法に従って、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製することができる。

【0400】

さらに、HER2抗原結合領域は、ヒト抗体または他の種に由来する抗体から得ることができ、当技術分野において周知の技法を用いた、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、および他の技法を含むが、それに限定されるわけではないディスプレイ型技術によって特定することができ、得られた分子は、このような技法が当技術分野において周知のように親和性成熟などのさらなる成熟に供することができる(例えば、Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (ファージディスプレイ)、Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (ファージディスプレイ)、Hanes and Pluczhau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (リボソームディスプレイ)、Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (ファージディスプレイ)、Scott TIBS 17, 241-245 (1992)、Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990)、Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993)、Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992)、Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)、およびUS5,733,743を参照されたい)。非ヒト抗体を作製するためにディスプレイ技術が用いられるのであれば、このような抗体をヒト化することができる。

20

【0401】

本発明の二重特異性抗体はいかなるアイソタイプでもよい。アイソタイプの選択は、典型的には、ADCC誘導などの望ましいエフェクター機能によって導かれる。例示的なアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4である。ヒト軽鎖定常領域である または のどちらか一方を使用することができる。本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療用途に合わせて、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体へのアイソタイプスイッチによって変えることができる。1つの態様において、本発明の抗体の両Fc領域は、IgG1アイソタイプ、例えば、IgG1、である。1つの態様において、二重特異性抗体の2つのFc領域は、それぞれIgG1およびIgG4アイソタイプである。任意で、Fc領域は、本明細書の他の箇所で述べたように、ヒンジ領域および/またはCH3領域において改変されていてもよい。

30

【0402】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、完全長抗体であり、好ましくは、IgG1抗体、特に、IgG1、抗体またはそれらの変種である。別の態様において、本発明の二重特異性抗体は抗体断片または単鎖抗体を含む。抗体断片は、例えば、従来の技法を用いた断片化によって得ることができ、この断片は、抗体全体について本明細書で説明されたものと同じやり方で有用性についてスクリーニングすることができる。例えば、 $F(ab')_2$ 断片は、抗体をペプシンで処理することによって作製することができる。ジスルフィド架橋が少なくなるように、得られた $F(ab')_2$ 断片をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して、Fab'断片を作製することができる。Fab断片は抗体をパパイニンで処理することによって得ることができる。 $F(ab')_2$ 断片はまた、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介してFab'断片を結合させることによって作製することもできる。抗体断片はま

40

50

た、組換え細胞において、このような断片をコードする核酸を発現させることによって作製することもできる（例えば、Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995) を参照されたい）。このような切断型抗体断片分子を生じるために、 $F(ab')_2$ 断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、H鎖の C_H1 ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列の後に翻訳停止コドンを含んでもよい。

【0403】

本発明のHER2×HER2二重特異性抗体は、単鎖抗体から調製され得る。単鎖抗体は、重鎖Fv領域および軽鎖Fv領域が接続されているペプチドである。1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、1本のペプチド鎖において、本発明のHER2抗体のFvの重鎖および軽鎖が可動性ペプチドリinker（典型的には、約10個、12個、15個以上のアミノ酸残基からなる）とつながっている単鎖Fv（scFv）を含む。このような抗体を作製する方法は、例えばUS4,946,778、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)、Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)、Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)、およびMcCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990) に記載されている。さらに、二重特異性抗体は、異なる単鎖HER2抗体に由来する2つの V_H 鎖および V_L 鎖から形成され得、または3種類以上の V_H 鎖および V_L 鎖から形成された多価抗体であり得る。

【0404】

1つの態様において、本発明のHER2×HER2二重特異性抗体のFc領域の一方または両方はエフェクター機能が欠損している。1つの態様において、エフェクター機能欠損性のHER2抗体は、Fabアーム交換を阻止するように修飾されている、安定化されたヒトIgG4抗体である（van der Neut Kolfschoten et al. (2007) Science 317 (5844) : 1554-7）。適切な安定化されたヒトIgG4抗体の例は、Kabat et al., のようにEUインデックスで示されたヒトIgG4の重鎖定常領域の位置409にあるアルギニンが、リジン、スレオニン、メチオニン、もしくはロイシン、好ましくはリジンで置換されている抗体（WO2006033386 (Kirin) に記載）、および/またはヒンジ領域がCys-Pro-Pro-Cys配列を含むように修飾されている抗体である。

【0405】

1つの態様において、安定化されたIgG4 HER2抗体は、重鎖および軽鎖を含むIgG4抗体であり、前記重鎖は、409に対応する位置に、Lys、Ala、Thr、Met、およびLeuからなる群より選択される残基、ならびに/または405に対応する位置に、Ala、Val、Gly、Ile、およびLeuからなる群より選択される残基を有するヒトIgG4定常領域を含み、前記抗体は、任意で1つまたは複数のさらなる置換、欠失、および/または挿入を含むが、ヒンジ領域にCys-Pro-Pro-Cys配列を含まない。好ましくは、前記抗体は、409に対応する位置にLysもしくはAla残基を含むか、または抗体のCH3領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、もしくはヒトIgG3のCH3領域で置換されている。WO2008145142 (Genmab) およびWO2011131746 (Genmab) も参照されたい。

【0406】

なおさらなる態様において、安定化されたIgG4 HER2抗体は、重鎖および軽鎖を含むIgG4抗体であり、前記重鎖は、409に対応する位置に、Lys、Ala、Thr、Met、およびLeuからなる群より選択される残基、ならびに/または405に対応する位置に、Ala、Val、Gly、Ile、およびLeuからなる群より選択される残基を有するヒトIgG4定常領域を含み、前記抗体は、任意で1つまたは複数のさらなる置換、欠失、および/または挿入を含む、ヒンジ領域にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む。好ましくは、前記抗体は、409に対応する位置にLysもしくはAla残基を含むか、または抗体のCH3領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、もしくはヒトIgG3のCH3領域で置換されている。

【0407】

さらなる態様において、エフェクター機能欠損性のHER2抗体は、ADCCなどのエフェクター機能を媒介する能力が低下するように、さらにはエフェクター機能がなくなるように変異されている、非IgG4型、例えばIgG1、IgG2、またはIgG3の抗体である。このような変異

は、例えばDall'Acqua WF et al., J Immunol. 177 (2) : 1129-1138 (2006) およびHezar eh M, J Virol. ; 75 (24) : 12161-12168 (2001) に記載されている。

【0408】

結合体

さらなる局面において、本発明は、1つまたは複数の治療部分（例えば細胞毒、化学療法薬、サイトカイン、免疫抑制剤、および/または放射性同位体）と結合または結合体化されたHER2×HER2二重特異性抗体を提供する。このような結合体は本明細書において「免疫結合体」または「薬物結合体」と呼ばれる。1種類または複数種の細胞毒を含む免疫結合体は「免疫毒素」と呼ばれる。

【0409】

細胞毒または細胞傷害剤には、細胞に有害な（例えば、細胞を死滅させる）任意の薬剤が含まれる。本発明の免疫結合体を形成するための適切な治療剤には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド（tenoposide）、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、メイタンシンまたはそれらの類似体もしくは誘導体、エンジン抗腫瘍抗生物質（例えば、ネオカルジノスタチン、カリケアミシン、エスペラミシン、ダイネミシン、リダマイシン、ケダルシジンまたはそれらの類似体もしくは誘導体）、アンスラサイクリン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロ-テストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン（decarbazine）、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリビン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ（thioepa）、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチンおよび他の白金誘導体、例えば、カルボプラチン；ならびにデュオカルマイシンA、デュオカルマイシンSA、CC-1065（a.k.a. ラケルマイシン）またはCC-1065の類似体もしくは誘導体）、ドラスタチン、ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン（PDB）またはそれらの類似体、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前はアクチノマイシン）、プレオマイシン、ダウノルピシン（以前はダウノマイシン）、ドキシソルピシン、イダルピシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン（AMC））、有糸分裂阻害剤（例えば、チューブリン阻害剤）、例えば、モノメチルアウリスタチンE、モノメチルアウリスタチンF、またはドラスタチン10の他の類似体もしくは誘導体；ヒドロキサム酸であるトリコスタチンA、ポリノスタット（SAHA）、ベリノスタット、LAQ824およびパノピノスタット、さらにはベンズアミド類、エンチノスタット、CI 994、モセチノスタット、ならびにフェニルブチレートおよびバルプロ酸などの脂肪族系酸化合物といったヒストンデアセチラーゼ阻害薬、ダノプレビル（Danoprevir）、ボルテゾミブなどのプロテアソーム阻害薬、 α -アマンチンなどのアマトキシン類ジフテリア毒素および関連分子（例えば、ジフテリアA鎖およびその活性断片、ならびにハイブリッド分子）、リシン毒素（例えば、リシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素）、コレラ毒素、志賀毒素様毒素（SLT-I、SLT-II、SLT-IIIV）、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、ダイズBowman-Birkプロテアーゼインヒビター、シュードモナス属エキソトキシン、アロリン（alorin）、サポリン、モデシン、ゲラニン（gelanin）、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 β -サルシン、シナアブラギリ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチンタンパク質、アメリカヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、ニガウリ（*Momordica charantia*）インヒビター、クルシン、クロチン、サボンソウ（*Saponaria officinalis*）インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、およびエノマイシン毒素が含まれる。他の適切な結合体化分子には、抗菌性/溶解性ペプチド、例えば、CLIP、マガイニン2、メリチン、セ

10

20

30

40

50

クロピン、およびP18；リボヌクレアーゼ（RNアーゼ）、DNアーゼI、ブドウ球菌エンテロトキシン-A、ヨウシュヤマゴボウ（pokeweed）抗ウイルスタンパク質、ジフテリン毒素、およびシュードモナス属エンテロトキシンが含まれる。例えば、Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) およびGoldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994) を参照されたい。本明細書の他の場所で説明されるように本発明のHER2抗体と組み合わせて投与され得る治療剤、例えば、抗癌サイトカインまたはケモカインは、本発明の抗体と結合体化するのに有用な治療部分の候補である。

【0410】

1つの態様において、本発明の薬物結合体は、本明細書に開示された二重特異性抗体がオーリスタチン類またはオーリスタチンペプチドの類似体および誘導体と結合体化されたものを含む（US5635483号；US5780588号）。オーリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、ならびに核分裂および細胞分裂（Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584）を妨げるほか、抗癌活性（US5663149号）および抗真菌活性（Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965）を有することが示されている。オーリスタチンの薬物部分は、このペプチド性薬物部分のN（アミノ）末端またはC（末端）を通じて、リンカーを介して抗体と結びつけることができる。

【0411】

例示的なオーリスタチンの態様には、2004年3月28日に発表されたSenter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, abstract number 623に開示され、US 2005/0238649号に記載されている、N末端結合型モノメチルオーリスタチンの薬物部分DEおよびDFが含まれる。

【0412】

例示的なオーリスタチンの態様の1つは、MMAE（モノメチルオーリスタチンE）である。別の例示的なオーリスタチン態様は、MMAF（モノメチルオーリスタチンF）である。

【0413】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、結合体化された核酸または核酸関連分子を含む。1つのこのような態様において、結合体化される核酸は、細胞傷害性リボヌクレアーゼ、アンチセンス核酸、抑制性RNA分子（例えば、siRNA分子）、または免疫賦活性核酸（例えば、免疫賦活性CpGモチーフ含有DNA分子）である。別の態様において、本発明のHER2×HER2抗体はアプタマーまたはリボザイムに結合体化される。

【0414】

1つの態様において、1つまたは複数の放射標識アミノ酸を含む二重特異性抗体が提供される。放射標識された二重特異性抗体は、診断目的および治療目的で 사용할 ことができる（放射標識分子との結合体化は別の可能性のある特徴である）。ポリペプチドの標識の非限定的な例には、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、および¹²⁵I、¹³¹I、ならびに¹⁸⁶Reが含まれる。放射性標識アミノ酸および関連したペプチド誘導体を調製するための方法は当技術分野において公知である（例えば、Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2nd Ed., Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996) を参照）、ならびにU.S. 4,681,581号、U.S. 4,735,210号、U.S. 5,101,827号、U.S. 5,102,990号（US RE35,500号）、U.S. 5,648,471号およびU.S. 5,697,902号。例えば、放射性同位体をクロラミン-T法によって結合体化することができる。

【0415】

1つの態様において、二重特異性抗体は、放射性同位体または放射性同位体含有キレートと結合体化される。例えば、二重特異性抗体は、キレート剤リンカー、例えば、DOTA、DTPA、チウキセタンと結合体化することができる。キレート剤リンカーがあると、二重特異性抗体と放射性同位体との複合体化が可能になる。二重特異性抗体は同様にまたは代替として、1つまたは複数の放射標識アミノ酸または他の放射標識分子を含んでもよくまたはそれらと結合体化されてもよい。放射標識されたHER2×HER2抗体は診断目的および治療目的で 사용할 ことができる。1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、放出体に結合されている。放射性同位体の非限定的な例には、³H、¹⁴C、¹⁵N、³⁵S、⁹⁰Y、⁹⁹Tc

、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bs 、 ^{225}Ac 、および ^{227}Th が含まれる。

【0416】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN、IFN、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム、およびTNFからなる群より選択されるサイトカインと結合体化されていてもよい。

【0417】

二重特異性抗体はまた、例えば、循環半減期を延ばすために、ポリマーと共有結合することによって化学修飾されてもよい。例示的なポリマーおよびポリマーをペプチドに取り付ける方法は、例えば、US4,766,106、US4,179,337、US4,495,285、およびUS4,609,546に例示されている。さらなるポリマーには、ポリオキシエチル化ポリオールおよびポリエチレングリコール(PEG)(例えば、約1,000~約40,000、例えば、約2,000~約20,000の分子量を有するPEG)が含まれる。

【0418】

Hunter et al., Nature 144, 945 (1962)、David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974)、Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)、およびNygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)に記載の方法を含む、二重特異性抗体を結合体化分子、例えば前記の結合体化分子と結合体化するための、当技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。このような二重特異性抗体は、他の部分を二重特異性抗体またはその断片(例えば、HER2二重特異性抗体H鎖またはL鎖)のN末端側またはC末端側を化学的に結合体化することによって作製することができる(例えば、Antibody Engineering Handbook, 編集Osamu Kanemitsu, 出版社Chijin Shokan (1994)を参照されたい)。このような結合体化された二重特異性抗体誘導体はまた、適切な場所にある内部の残基または糖における結合体化によって作製することもできる。

【0419】

前記薬剤は、本発明の二重特異性抗体に直接的または間接的に結合されてもよい。第2の薬剤の間接的な結合の一例は、スペーサー部分またはリンカー部分を介した、二重特異性抗体にあるシステイン残基またはリジン残基への結合である。1つの態様において、HER2×HER2抗体は、スペーサーまたはリンカーを介して、インビボで活性化されて治療用薬物になることができるプロドラッグ分子と結合体化される。いくつかの態様において、リンカーは細胞内条件下で切断可能であり、リンカーの切断により、二重特異性抗体由来の薬物単位が細胞内環境に放出される。いくつかの態様において、リンカーは、細胞内環境(例えば、リソソームまたはエンドソームまたはカベオラの中)に存在する切断能を有する作用物質によって切断可能である。例えば、スペーサーまたはリンカーが、腫瘍細胞に付随する酵素、または活性薬物が形成される他の腫瘍特異的条件によって切断されてもよい。そのようなプロドラッグ技術およびリンカーの例は、Syntarga BV, et al.によるWO02083180号、WO2004043493号、WO2007018431号、WO2007089149号、WO2009017394号およびWO201062171号に記載されている。適した抗体プロドラッグ技術およびデュオカルマイシン類似体については米国特許第6,989,452号(Medarex)にも記載があり、これは参照により本明細書に組み入れられる。また、リンカーがしかも、または代替的に、例えば、リソソームまたはエンドソームプロテアーゼを非限定的に含む細胞内ペプチダーゼまたはプロテアーゼ酵素によって切断されるペプチジルリンカーであってもよい。いくつかの態様において、ペプチジルリンカーは少なくとも2アミノ酸の長さまたは少なくとも3アミノ酸の長さである。切断物質にはカテプシンBおよびDならびにプラスミンを含めることができ、これらはすべて、ジペプチド薬物誘導体を加水分解して、標的細胞内で活性薬物の放出を生じさせることが知られている(例えば、Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123を参照)。1つの具体的な態様において、細胞内プロテアーゼによって切断されうるペプチジルリンカーは、Val-Cit(バリン-シトルリン)リンカーまたはPhe-Lys(フェニルアラニン-リジン)リンカーである(例えば、Val-Citリンカーおよび種々のPhe-Lysリンカーの例を用いたドキソルピシンの合成を記載しているUS6214345号を参照)。

Val-CitリンカーおよびPhe-Lysリンカー構造の例には、以下に述べるMC-vc-PAB、MC-vc-GABA、MC-Phe-Lys-PABまたはMC-Phe-Lys-GABAが非限定的に含まれ、ここでMCはマレイミドカプロイルの略号であり、vcはVal-Citの略号であり、PABはp-アミノベンジルカルバメートの略号であり、GABAはγ-アミノ酪酸の略号である。治療薬の細胞内タンパク分解放出を用いることの利点の1つは、薬剤が結合体化されると典型的には弱毒化され、かつ結合体の血清中安定性が一般に高くなることである。

【0420】

さらに別の態様において、リンカー単位は切断不能であり、薬物は抗体分解によって放出される（US 2005 / 0238649号参照）。典型的には、そのようなリンカーは細胞外環境に対して実質的に感受性ではない。本明細書で用いる場合、リンカーの文脈における「細胞外環境に対して実質的に感受性でない」とは、抗体薬物結合体化合物が細胞外環境内（例えば、血漿中）に存在する場合に、抗体薬物結合体化合物の試料中のリンカーの20%以下、典型的には約15%以下、より典型的には約10%以下、さらにより典型的には約5%以下、約3%以下または約1%以下しか切断されないことを意味する。リンカーが細胞外環境に対して実質的に感受性でないか否かは、例えば、抗体薬物結合体化合物を血漿とともに所定の期間（例えば、2、4、8、16または24時間）にわたってインキュベートし、続いて血漿中に存在する遊離薬物の量を定量することによって判定することができる。MMAEまたはMMAF、およびさまざまなリンカー構成要素を含む例示的な態様は、以下の構造を有する（ここでAbは抗体を意味し、薬物負荷（または抗体分子1つ当たりの細胞増殖抑制薬または細胞傷害性薬物の平均数）を表すpは1～約8であり、例えば、pは4～6、例えば3～5などであってよく、またはpは1、2、3、4、5、6、7もしくは8であってよい）。

【0421】

切断可能なリンカーがオーリスタチンと組み合わせられた例には、MC-vc-PAB-MMAF（vcMMAFとも命名）およびMC-vc-PAB-MMAF（vcMMAEとも命名）が含まれ、ここでMCはマレイミドカプロイルの略号であり、vcはVal-Cit（バリン-シトルリン）を基にしたリンカーの略号であり、PABはp-アミノベンジルカルバメートの略号である。

【0422】

他の例には、切断不可能なリンカーと組み合わせられたオーリスタチン、例えばmcMMAFなどが含まれる（mc（MCはこの文脈ではmcと同じである）は、マレイミドカプロイルの略号である）。

【0423】

1つの態様において、薬物リンカー部分はvcMMAEである。vcMMAE薬物リンカー部分および結合体化の方法は、WO2004010957号、US7659241号、US7829531号、US7851437号およびUS 11/833,028号（Seattle Genetics, Inc.）に開示されており（これらは参照により本明細書に組み入れられる）、vcMMAE薬物リンカー部分は、それらの中で開示されたものに類似した方法を用いて、システインの箇所では抗HER2二重特異性抗体と結合している。

【0424】

1つの態様において、薬物リンカー部分はmcMMAFである。mcMMAF薬物リンカー部分および結合体化の方法は、US7498298号、US 11/833,954号およびWO2005081711号（Seattle Genetics, Inc.）に開示されており（これらは参照により本明細書に組み入れられる）、mcMMAF薬物リンカー部分は、それらの中で開示されたものに類似した方法を用いて、システインの箇所では抗HER2二重特異性抗体と結合している。

【0425】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、二重特異性抗体を放射性同位体と結合体化することを可能にするキレート剤リンカー、例えばチウキセタンと結合している。

【0426】

1つの態様において、二重特異性抗体の各アーム（またはFabアーム）は、同じ1つまたは複数の治療用部分と直接的にまたは間接的に連結されている。

【0427】

1つの態様においては、二重特異性抗体の1つのアームのみが、1つまたは複数の治療用

10

20

30

40

50

部分と直接的にまたは間接的に連結されている。

【0428】

1つの態様において、二重特異性抗体の各アームは異なる治療用部分と直接的にまたは間接的に連結されている。例えば、本明細書に記載したような2種類の単一特異性HER2抗体、例えば第1および第2のHER2抗体の制御下でのFabアーム交換によって二重特異性抗体が調製される態様において、そのような二重特異性抗体は、異なる治療用部分と結合体化されたかまたは会合している単一特異性抗体を用いることによって入手することができる。したがって、本発明は、二重特異性HER2 x HER2抗体を調製する方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

(a) 免疫グロブリンのFc領域および第1の治療用部分を含む第1のHER2抗体を用意する段階であって、前記Fc領域が第1のCH3領域を含む段階、

(b) 免疫グロブリンのFc領域および第2の治療用部分を含む第2のHER2抗体を用意する段階であって、前記Fc領域が第2のCH3領域を含み、

前記第1および第2のCH3領域の配列が異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれよりも強い、段階、

(c) 前記第1のHER2抗体を該第2のHER2抗体とともに還元条件下でインキュベートする段階、および

(d) 前記二重特異性HER2 x HER2抗体を入手する段階。

【0429】

この方法の1つの態様において、第1および第2の治療用部分は同じである。この方法の別の態様において、第1および第2の治療用部分は異なる。

【0430】

組成物

さらなる主な局面において、本発明は、
本明細書において定義されたHER2 x HER2二重特異性抗体、および
薬学的に許容される担体
を含む、薬学的組成物に関する。

【0431】

本発明の薬学的組成物は、本発明の1種類の二重特異性抗体または本発明の異なる二重特異性抗体の組み合わせを含有してもよい。

【0432】

薬学的組成物は、従来の技法、例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示される技法に従って処方することができる。本発明の薬学的組成物は、例えば希釈剤、増量剤、塩、緩衝液、界面活性剤（例えば、非イオン性界面活性剤、例えばTween-20もしくはTween-80）、安定剤（例えば、糖もしくはタンパク質を含まないアミノ酸）、防腐剤、組織固定液、可溶化剤、および/または薬学的組成物に含めるのに適した他の材料を含んでもよい。

【0433】

薬学的に許容される担体には、本発明の二重特異性抗体と生理学的に適合する、任意のおよび全ての適切な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが含まれる。本発明の薬学的組成物において使用することができる適切な水性および非水性の担体の例には、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、および適切なその混合物、植物油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチル、ならびに/または様々な緩衝液が含まれる。薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。適切な流動性は、例えばコーティング材料、例えばレシチンを使用す

10

20

30

40

50

ることによって、分散液の場合、必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。

【0434】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば、(1)水溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；(2)油溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなど；および(3)金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含んでもよい。

10

【0435】

本発明の薬学的組成物はまた、組成物中に、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロール、または塩化ナトリウムを含んでもよい。

【0436】

本発明の薬学的組成物はまた、薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を増強することができる、選択された投与経路に適した1種類または複数種の佐剤、例えば防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、防腐剤、または緩衝液を含んでもよい。本発明の二重特異性抗体は、急速に放出されないように二重特異性抗体を保護する担体、例えば移植片、経皮パッチ、およびマイクロカプセルに閉じ込めた送達系を含む徐放製剤を用いて調製されてもよい。このような担体は、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリン、生分解性生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のみもしくはポリ乳酸とろう、または当技術分野において周知の他の材料を含んでもよい。このような製剤を調製するための方法は一般的に当業者に公知である。

20

【0437】

滅菌注射液は、必要とされる量の活性化合物を、必要に応じて、例えば前記で列挙された成分の1つまたは組み合わせと共に適切な溶媒中に組み込んだ後に、滅菌精密濾過を行うことによって調製することができる。一般的に、分散液は、活性化合物を、基本分散媒、および必要とされる他の成分、例えば前記で列挙されたものを含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌散剤の場合、調製方法の例は、活性成分+任意のさらなる望ましい成分の散剤をそれらの予め濾過滅菌した溶液から生じさせる真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。

30

【0438】

薬学的組成物における活性成分の実際の投与量レベルは、患者への毒性無く、特定の患者、組成物、および投与方法について望ましい治療応答を実現するのに有効な活性成分量を得るように変えることができる。選択される投与量レベルは、使用される本発明の特定の組成物またはそのアミドの活性、投与経路、投与時間、使用されている特定の化合物の排出速度、治療期間、使用される特定の組成物と併用される他の薬物、化合物、および/または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、身体全体の健康、および前病歴、ならびに医学分野において周知の同様の要因を含む様々な薬物動態要因に依存する。

40

【0439】

薬学的組成物は、任意の適切な経路および方法によって投与することができる。1つの態様において、本発明の薬学的組成物は非経口投与される。本明細書で使用する「非経口投与される」とは、経腸投与および局所投与以外の投与方法、通常、注射による投与方法を意味し、表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外、および胸骨内への注射および注入を含む。

【0440】

1つの態様において、薬学的組成物は、静脈内または皮下への注射または注入によって

50

投与される。

【0441】

使用

さらなる主な局面において、本発明は、医薬として使用するための本発明のHER2×HER2二重特異性抗体に関する。

【0442】

本発明の二重特異性抗体は多くの目的に使用することができる。特に、本発明の抗体は、転移性癌および難治性癌を含む様々な形態の癌の治療に使用することができる。

【0443】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、原発性乳癌、転移性乳癌、および難治性乳癌を含む乳癌の治療に用いられる。

10

【0444】

1つの態様において、本発明の二重特異性2抗体は、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵臓癌、精巣癌、悪性黒色腫、および軟部組織癌（例えば、滑膜肉腫）からなる群より選択される癌の一形態の治療に用いられる。

【0445】

同様に本発明は、それを必要とする個体に、有効量の本発明の抗体、例えば抗体薬物結合体（ADC）を投与する段階を含む、HER2発現腫瘍細胞を死滅させるための方法に関する。

20

【0446】

本発明はまた、HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するための方法であって、それを必要とする個体に対する本発明の二重特異性抗体を投与する段階を含む方法に関する。

【0447】

本発明はまた、癌を治療するための方法であって、

(a) HER2を発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、ならびに

(b) 本発明の二重特異性抗体または本発明の薬学的組成物を該対象に投与する段階を含む方法に関する。

【0448】

30

1つの態様において、前記腫瘍細胞は、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌および頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵臓癌、精巣癌、悪性黒色腫、ならびに軟部組織癌（例えば、滑膜肉腫）からなる群より選択される癌の一形態に關与する。

【0449】

1つの態様において、腫瘍細胞は、HER2およびEGFRファミリーの少なくとも1つの他のメンバー、好ましくは、EGFR、HER3、またはEGFRおよびHER3の両方を同時発現する腫瘍細胞であり、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍（例えば、滑膜肉腫）、または膀胱癌に關与する腫瘍細胞である。

40

【0450】

1つの局面において、本発明は、HER2ならびにEGFRおよび/またはHER3を同時発現する腫瘍細胞を含む癌に罹患している対象を選択する段階、ならびに本発明の抗体、任意で、細胞傷害剤または薬物と結合体化されている二重特異性抗体の形をした本発明の二重特異性抗体を対象に投与する段階を含む、対象において癌を治療するための方法に関する。1つの態様において、対象は、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍（例えば、滑膜肉腫）、または膀胱癌からなる群より選択される癌に罹患している。

【0451】

また、本発明は、癌、例えば、前述された特定の癌適応症の1つを治療するための医用

50

薬剤を調製するための、ヒトHER2に結合する二重特異性抗体の使用に関する。

【0452】

さらに、本発明は、癌、例えば、前述された特定の癌適応症の1つの治療において使用するための二重特異性抗体に関する。

【0453】

本発明の治療方法のさらなる態様において、治療の効力は、療法中に、例えば所定の時点で、関連腫瘍細胞における腫瘍量またはHER2発現レベルを確かめることによってモニタリングされる。

【0454】

前記の治療方法および使用における投与計画は、最適な望ましい応答（例えば、治療応答）をもたらすように調節される。例えば、単一コースを投与してもよく、いくつかの分割量を、ある期間にわたって投与してもよく、その用量は、治療状況の難局により示されるように比例して減少または増加してもよい。投与の容易さおよび投薬の均一性のために単位剤形で非経口組成物が処方されてもよい。

【0455】

二重特異性抗体の有効な投与量および投与計画は、治療しようとする疾患または状態に左右され、当業者によって決定することができる。本発明の化合物の治療的有效量の例示的で非限定的な範囲は、約0.1~100mg/kg、例えば約0.1~50mg/kg、例えば約0.1~20mg/kg、例えば約0.1~10mg/kg、例えば約0.5 mg/kg、例えば約0.3mg/kg、約1mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、または約8mg/kgである。

【0456】

当技術分野において通常の知識を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定および処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物において用いられる二重特異性抗体の用量を、望ましい治療効果を達成するのに必要とされる用量より低いレベルで開始し、望ましい効果が達成されるまで投与量を段々と増やすことができる。一般的に、本発明の組成物の適切な一日量は、治療効果を生じるのに有効な最小用量である二重特異性抗体の量である。投与は、例えば非経口投与、例えば静脈内投与、筋肉内投与、または皮下投与でもよい。1つの態様において、二重特異性抗体は、10~500mg/m²、例えば200~400mg/m²の毎週投与量で注入されることによって投与されてもよい。このような投与は、例えば1~8回、例えば3~5回繰り返されてもよい。投与は、2~24時間、例えば2~12時間の期間にわたる連続注入によって行われてもよい。1つの態様において、毒性副作用を弱めるために、二重特異性抗体は、長期間にわたる、例えば24時間を超える、ゆっくりとした連続注入によって投与されてもよい。

【0457】

1つの態様において、二重特異性抗体は、250mg~2000mg、例えば300mg、500mg、700mg、1000mg、1500mg、または2000mgの毎週投与量で、8回まで、例えば週に1回与えられる場合に4~6回、投与されてもよい。このようなレジメンは、例えば6ヶ月後または12ヶ月後に、必要に応じて1回または複数回、繰り返されてもよい。投与量は、投与の際の本発明の二重特異性抗体の血中量を測定することによって、例えば、生物学的試料を採取し、本発明のHER2二重特異性抗体の抗原結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を使用することによって決定または調節されてもよい。

【0458】

二重特異性抗体にとっての有効な用法用量および投薬レジメンは、治療しようとする疾患または病状に応じて決まり、それは当業者によって決定される。本発明の化合物の治療的有效量に関する例示的で非限定的な範囲は、約0.1~100mg/kg、例えば約0.1~50mg/kg、例えば約0.1~20mg/kg、例えば約0.1~10mg/kg、例えば約0.5、例えば約0.3、約1、約3、約5または約8mg/kgである。

【0459】

1つの態様において、二重特異性抗体は、維持療法によって、例えば、6ヶ月以上にわたって1週間に1回、投与することができる。

【0460】

二重特異性抗体はまた、癌を発症するリスクを下げるために、癌進行における事象の発生の開始を遅延するために、および／または癌が軽快している時の再発のリスクを下げるために予防的に投与することもできる。

【0461】

本発明の二重特異性抗体はまた併用療法で投与することができる、すなわち、治療しようとする疾患または状態に関連する他の治療剤と組み合わせて投与することができる。従って、1つの態様において、二重特異性抗体を含有する医薬は、1種類または複数種のさらなる治療剤、例えば細胞傷害剤、化学療法剤、または抗血管新生剤と併用するためのものである。

10

【0462】

このような併用投与は同時に行われてもよく、別々に行われてもよく、連続して行われてもよい。同時投与の場合、薬剤は、適宜、1つの組成物として投与されてもよく、別々の組成物として投与されてもよい。従って、本発明はまた、前記のHER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、下記の1種類または複数種のさらなる治療剤と組み合わせて本発明の二重特異性抗体を投与する段階を含む。

【0463】

1つの態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体、および任意で少なくとも1種類のさらなる化学療法剤、または当該HER2エピトープとは異なるエピトープに結合する抗体を、障害の治療を必要とする対象に投与する段階を含む。

20

【0464】

1つの態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体および少なくとも1種類のさらなる化学療法剤を、癌の治療または予防を必要とする対象に投与する段階を含む。

【0465】

1つの態様において、このようなさらなる治療剤は、代謝拮抗剤、例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオウラシル、デカルバジン (decarbazine)、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、またはクラドリピンにより選択されてもよい。

30

【0466】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、アルキル化剤、例えばメクロレタミン、チオエパ (thioepa)、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン (BSNU)、ロムスチン (CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン (DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチンおよび他の白金誘導体、例えばカルボプラチンにより選択されてもよい。

【0467】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、有糸分裂阻害剤、例えばタキサン、例えばドセタキセルおよびパクリタキセル、ならびにビンカアルカロイド、例えばビンデシン、ピンクリスチン、ビンブラスチン、およびビノレルピンにより選択されてもよい。

40

【0468】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、トポイソメラーゼ阻害剤、例えばトポテカンもしくはイリノテカン、または細胞分裂停止薬、例えばエトポシドおよびテニポシドにより選択されてもよい。

【0469】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、成長因子阻害剤、例えばErbB1 (EGFR) 阻害剤 (例えば、EGFR抗体、例えばザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブもしくはニモツズマブ (nimotuzumab)、または他のEGFR阻害剤、例えばゲフィチニブもしくはエルロチニブ)、ErbB2 (HER2 / neu) の別の阻害剤 (例えば、HER2抗体、例えばトラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、またはペルツズマブ)、あるいはEGFRおよびHER2両方の

50

阻害剤、例えばラパチニブにより選択されてもよい。

【0470】

別の態様において、このようなさらなる治療剤は、チロシンキナーゼ阻害剤、例えばイマチニブ (Glivec、Gleevec STI571) またはラパチニブ、PTK787 / ZK222584により選択されてもよい。

【0471】

別の態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体、ならびに血管形成、新血管新生、および／または他の血管新生の少なくとも1種類の阻害剤を、障害の治療を必要とする対象に投与する段階を含む。

10

【0472】

このような血管形成阻害剤の例は、ウロキナーゼ阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤 (例えば、マリマスタット、ネオバスタット (neovastat)、BAY12-9566、AG3340、BMS-275291、および類似の薬剤)、内皮細胞の遊走および増殖の阻害剤 (例えば、TNF-470、スクアラミン、2-メトキシエストラジオール、コンプレタスタチン、エンドスタチン、アンギオスタチン、ペニシラミン、SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ)、R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ)、および類似の薬剤)、血管新生成長因子のアンタゴニスト (例えば、ZD6474、SU6668、血管新生剤および／またはその受容体 (例えば、VEGF (例えば、ベパシズマブ)、bFGF、およびアンジオポエチン-1) に対する抗体、サリドマイド、サリドマイド類似体 (例えば、CC-5013)、Sugen5416、SU5402、抗血管新生リボザイム (例えば、アンギオザイム (angiozyme))、インターフェロン (例えば、インターフェロン 2a)、スラミン、および類似の薬剤)、VEGF-Rキナーゼ阻害剤および他の抗血管新生性のチロシンキナーゼ阻害剤 (例えば、SU011248)、内皮特異的インテグリン / 生存シグナル伝達の阻害剤 (例えば、ビタキシン (vitaxin) および類似の薬剤)、銅アンタゴニスト / キレート剤 (例えば、テトラチオモリブデート (tetrathiomolybdate)、カプトプリル、および類似の薬剤)、カルボキシアミド-トリアゾール (CAI)、ABT-627、CM101、インターロイキン-12 (IL-12)、IM862、PNU145156E、ならびに血管形成を阻害するヌクレオチド分子 (例えば、アンチセンス-VEGF-cDNA、アンギオスタチンをコードするcDNA、p53をコードするcDNA、および欠損VEGF受容体-2をコードするcDNA) である。

20

30

【0473】

血管形成、新血管新生、および／または他の血管新生のこのような阻害剤の他の例は、抗血管新生性のヘパリン誘導体 (例えば、ヘペリナーゼ (heparinase) III)、テモゾロミド、NK4、マクロファージ遊走阻害因子、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、低酸素誘導性因子1の阻害剤、抗血管新生性のダイズイソフラボン、オルチプラズ、フマギリンおよびその類似体、ソマトスタチン類似体、多流酸ペントサン、テコガランナトリウム、ダルテパリン、タムスタチン、トロネボスポンジン、NM-3、コンプレスタチン (combestatin)、カンスタチン (canstatin)、アバスタチン (avastatin)、他の標的に対する抗体、例えば抗 α -v / β -3インテグリンおよび抗キニノスタチン抗体である。

【0474】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗癌免疫原、例えば癌抗原 / 腫瘍関連抗原 (例えば、上皮細胞接着分子 (EpCAM / TACSTD1)、ムチン1 (MUC1)、癌胎児抗原 (CEA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (タグ-72)、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7、癌関連ウイルスワクチン (例えば、ヒトパピローマウイルスワクチン)、または腫瘍由来熱ショックタンパク質でもよい。

40

【0475】

1つの態様において、前記の障害を治療するためにHER2二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗癌性サイトカイン、ケモカイン、またはその組み合わせでもよい。適切なサイトカインおよび成長因子の例には、IFN、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN (

50

例えば、INF 2b)、IFN、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム、およびTNFが含まれる。適切なケモカインは、Glu-Leu-Arg (ELR) ネガティブケモカイン、例えばヒトCXCおよびC-CケモカインファミリーからのIP-10、MCP-3、MIG、およびSDF-1を含んでもよい。適切なサイトカインには、サイトカイン誘導体、サイトカイン変種、サイトカイン断片、およびサイトカイン融合タンパク質が含まれる。

【0476】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、細胞周期制御/アポトーシス制御因子(または「制御剤」)でもよい。細胞周期制御/アポトーシス制御因子は、細胞周期制御/アポトーシス制御因子を標的とし、調節する分子、例えば、(i)cdc-25(例えば、NSC663284)、(ii)細胞周期を過度に刺激するサイクリン依存性キナーゼ(例えば、フラボピリドール(L868275、HMR1275)、7-ヒドロキシスタウロスポリン(UCN-01、KW-2401)、およびロスコピチン(R-ロスコピチン、CYC202))、ならびに(iii)テロメラゼモジュレーター(例えば、BIBR1532、SOT-095、GRN163、ならびに例えば、US6,440,735およびUS6,713,055に記載の組成物)を含んでもよい。アポトーシス経路に干渉する分子の非限定的な例には、TNF関連アポトーシス誘発リガンド(TRAIL)/アポトーシス-2リガンド(Apo-2L)、TRAIL受容体を活性化する抗体、IFN、およびアンチセンスBcl-2が含まれる。

【0477】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、ホルモン制御剤、例えば抗アンドロゲン療法および抗エストロゲン療法に有用な薬剤でもよい。このようなホルモン制御剤の例は、タモキシフェン、イドキシフェン、フルベストラント、ドロキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ジエチルスチルベストロール、エチニルエストラジオール/エスチニル(estinyl)、抗アンドロゲン(例えば、フルタミンド(flutamide)/エルレキシン(eulexin))、プロゲステロン(例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシ-プロゲステロン/プロベラ、酢酸メゲストロール/メゲース)、副腎皮質ステロイド(例えば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン)、黄体形成ホルモン放出ホルモン(およびその類似体、ならびに他のLHRHアゴニスト、例えばブセレリンおよびゴセレリン)、アロマターゼ阻害剤(例えば、アナストラゾール(anastrozole)/アリミデックス、アミノグルテチミド/シトラデン(cytrade n)、エキセメスタン)、またはホルモン阻害剤(例えば、オクトレオチド/サンドスタチン)である。

【0478】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗アレルギー剤、例えばCTLA-4の活性をブロックする分子、例えばイピリムマブでもよい。

【0479】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗癌性核酸または抗癌性抑制性RNA分子でもよい。

【0480】

前記の障害を治療するために本発明の二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、分化誘導剤、レチノイン酸類似体(例えば、オールトランスレチノイン酸、13-cisレチノイン酸、および類似の薬剤)、ビタミンD類似体(例えば、セオカルシトール(seocalcitol)および類似の薬剤)、ErbB3、ErbB4、IGF-1R、インシュリン受容体、PDGFRα、PDGFR、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、RON(例えば、抗RON抗体)、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7の阻害剤、および類似の薬剤である。

【0481】

前記の障害を治療するために本発明の二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、エストラムスチンおよびエピルピシンである。

【0482】

10

20

30

40

50

前記の障害を治療するために本発明の二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、HSP90阻害剤、例えば17-アリルアミノゲルダナマイシン、腫瘍抗原、例えばPSA、CA125、KSAなどに対する抗体、インテグリン、例えばインテグリン1、またはVCAM阻害剤である。

【0483】

前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、カルシニューリン阻害剤（例えば、バルスポダル（valspodar）、PSC833および他のMDR-1またはp-糖タンパク質阻害剤）、TOR阻害剤（例えば、シロリムス、エベロリムス、およびラパミン（rapamcyin））、ならびに「リンパ球ホーミング」機構の阻害剤（例えば、FTY720）、ならびに細胞シグナル伝達に作用する薬剤、例えば接着分子阻害剤（例えば、抗LFAなど）である。

10

【0484】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、1種類または複数種の他の治療用抗体、例えば、オファツムマブ、ザノリムマブ（zanolimumab）、ダラツムマブ（daratumumab）、ラニビズマブ、ニモツズマブ、パニツムマブ、hu806、ダクリズマブ（ゼナパックス）、パシリキシマブ（シムレクト）、インフリキシマブ（レミケード）、アダリムマブ（ヒュミラ）、ナタリズマブ（タイサブリ）、オマリズマブ（ゾレア）、エファリズマブ（ラプティバ）、イピリムマブ、および/またはリツキシマブと併用するためのものである。

【0485】

20

別の態様において、本明細書に記載の2つ以上の異なる本発明の抗体またはその治療用結合体は、疾患の治療のために併用される。特に興味深い組み合わせには2種類以上の非ブロック抗体が含まれる。このような併用療法によって、細胞1個あたり多数の抗体分子が結合することがあり、それによって、効力が増大する、例えば、補体媒介性溶解の活性化を介して効力が増大することがある。

【0486】

前記に加えて、本発明の併用療法の他の態様は、以下を含む：

乳癌の治療の場合、本発明の二重特異性抗体またはその治療用結合体と、メトトレキサート、パクリタキセル、ドキソルビシン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダウノルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、イクサベピロン、ムタマイシン（mutamycin）、ミトキサントロン、ビノレルビン、ドセタキセル、チオテパ、ビンクリスチン、カペシタビン、EGFR抗体（例えば、ザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、もしくはニモツズマブ（nimotuzumab））、または他のEGFR阻害剤（例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ）、別のHER2抗体もしくはHER2結合体（例えば、トラスツズマブ、例えば、トラスツズマブ-DM1もしくはペルツズマブ）、EGFRおよびHER2両方の阻害剤（例えば、ラパチニブ）との併用、ならびに/あるいはHER3阻害剤との併用；

30

非小細胞肺癌の治療の場合、本発明の二重特異性抗体またはその治療用結合体と、EGFR阻害剤、例えば、EGFR抗体、例えば、ザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、もしくはニモツズマブ、または他のEGFR阻害剤（例えば、ゲフィチニブもしくはエルロチニブ）との組み合わせ、あるいは別のHER2薬剤（例えば、HER2抗体、例えば、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1もしくはペルツズマブ）との組み合わせ、あるいはEGFRおよびHER2両方の阻害剤、例えば、ラパチニブとの併用、あるいはHER3阻害剤との併用；

40

結腸直腸癌の治療の場合、本発明の二重特異性抗体またはその治療用結合体と、ゲムシタビン、ペバシズマブ、FOLFOX、FOLFIRI、XELOX、IFL、オキサリプラチン、イリノテカン、5-FU/LV、カペシタビン、UFT、EGFR標的剤、例えばセツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ；VEGF阻害剤、またはチロシンキナーゼ阻害剤、例えばスニチニブより選択される1種類または複数種の化合物との併用；

前立腺癌の治療の場合、本発明の二重特異性抗体またはその治療用結合体と、ホルモン/抗ホルモン療法；例えば、抗アンドロゲン、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト、および化学療法剤、例えばタキサン、ミトキサントロン、エストラムスチン、

50

5FU、ビンブラスチン、およびイクサベピロンより選択される1種類または複数種の化合物との併用。

【0487】

放射線療法-外科手術

1つの態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に關与する障害を治療するための方法を提供するものであり、この方法は、それを必要とする対象への、治療的有効量の二重特異性抗体、例えば本発明のHER2×HER2抗体および放射線療法の投与を含む。

【0488】

1つの態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供するものであり、この方法は、それを必要とする対象への、治療的有効量の二重特異性抗体、例えば本発明のHER2×HER2抗体および放射線療法の投与を含む。

10

【0489】

1つの態様において、本発明は、放射線療法と組み合わせて投与される癌を治療するための薬学的組成物を調製するための、本発明の二重特異性抗体の使用を提供する。

【0490】

放射線療法は放射線を含む場合があり、または患者への放射性医薬品の關連する投与が提供される。放射線源は、治療を受けている患者の外部にあってもよく、内部にあってもよい（放射線治療は、例えば外部ビーム放射線療法（EBRT）または近接照射療法（BT）の形をとってもよい）。このような方法の実施において使用することができる放射性元素には、例えばラジウム、セシウム-137、イリジウム-192、アメリカシウム-241、金-198、コバルト-57、銅-67、テクネチウム-99、ヨウ素-123、ヨウ素-131、およびインジウム-111が含まれる。

20

【0491】

さらなる態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供し、本方法は、癌の治療または予防を必要とする対象に、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体を外科手術と組み合わせて投与する段階を含む。

【0492】

診断用途

本発明の二重特異性抗体は診断目的でも使用することができる。従って、さらなる局面において、本発明は、本明細書において定義されたHER2×HER2二重特異性抗体を含む診断用組成物に關する。

30

【0493】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、HER2を発現する活性化細胞が発病において積極的な役割を果たしている疾患を診断するために、HER2レベルまたは膜表面にHER2を含有する細胞のレベルを検出することによってインビボまたはインビトロで使用することができる。これは、例えば試験しようとする試料と二重特異性抗体とを、任意で対照試料と共に、二重特異性抗体とHER2との複合体が形成する条件下で接触させることによって達成することができる。

【0494】

40

従って、さらなる局面において、本発明は、試料中のHER2抗原またはHER2を発現する細胞の存在を検出するための方法に關し、本方法は、

試料と本発明のHER2×HER2二重特異性抗体とを、二重特異性抗体とHER2との複合体が形成する条件下で接触させる段階；および

複合体が形成したかどうか分析する段階を含む。

【0495】

1つの態様において、前記方法はインビトロで行われる。

【0496】

さらに具体的には、本発明は、浸潤細胞および浸潤組織、ならびに本発明の二重特異性

50

抗体によって標的化される他の細胞を特定および診断するための方法、ならびに治療処置の進行、治療後の状況、癌が発症するリスク、癌の進行などをモニタリングための方法を提供する。

【0497】

このような技法において用いられる二重特異性抗体および/または二次抗体に適した標識は当技術分野において周知である。

【0498】

さらなる局面において、本発明は、

本発明のHER2×HER2二重特異性抗体または本発明の二重特異性分子；および

キットを使用するための説明書

を含む、試料中のHER2抗原またはHER2を発現する細胞の存在を検出するためのキットに関する。

【0499】

1つの態様において、本発明は、HER2×HER2二重特異性抗体、および二重特異性抗体とHER2との結合を検出するための1種類または複数種の試薬を含む容器を含む、癌を診断するためのキットを提供する。試薬は、例えば蛍光タグ、酵素タグ、または他の検出可能なタグを含んでもよい。試薬はまた、二次もしくは三次の抗体または酵素反应用試薬を含んでもよく、酵素反応によって、視覚化可能な産物が産生される。

【0500】

本発明は以下の実施例によってさらに例示される。実施例は、本発明の範囲を限定するものであると解釈してはならない。

【実施例】

【0501】

実施例1-HER2およびHER2変種のための発現構築物

完全長HER2 (1255aa、Swissprot P04626)、HER2細胞外ドメイン (ECD) (Her2-ECDHis、C末端His6タグを有するaa1~653)、天然HER2スプライスバリエント (Her2-delex16、エキソン16欠失から生じ、aa633~648を欠く)、および切断型HER2受容体 (Her2-stumpy、aa648~1256) を発現させるために、完全にコドン最適化された構築物を作製した。これらの構築物は、クローニングに適した制限部位および最適Kozak配列 (Kozak, M., Gene 1999; 234 (2): 187-208) を含んだ。これらの構築物を、哺乳動物発現ベクターpEE13.4 (Lonza Biologics; Bebbington, C.R., et al., Biotechnology (NY) 1992; 10 (2): 169-75) にクローニングし、構築物が正しいことを確認するために全配列決定した。

【0502】

実施例2-ペルツズマブ、トラツツマブ、C1、およびF5のための発現構築物

HEK細胞においてIgG1抗体ペルツズマブ、C1、およびF5の重鎖 (HC) および軽鎖 (LC) を発現させるために、完全にコドン最適化された構築物を作製した。これらの構築物によってコードされる可変領域は、ペルツズマブ重鎖および軽鎖については米国特許第6,949,245号ならびにC1およびF5重鎖および軽鎖については米国特許第7,244,826号と同一である。C1およびF5については、ヒトIgG1重鎖 (アロタイプf) の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターp33G1f、ヒト軽鎖またはヒト軽鎖の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターp33Kまたはp33L (pcDNA3.3 (Invitrogen)) を使用した。ペルツズマブについては、ヒトIgG1重鎖 (アロタイプf) の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターpG1f (pEE12.4 (Lonza Biologics))、およびヒト軽鎖の完全にコドン最適化された定常領域を含有するpKap pa (pEE6.4 (Lonza Biologics)) を使用した。

【0503】

トラツツズマブ (ハーセプチン (Herceptin) (登録商標)) は、例えば、米国特許第7,632,924号に記載の重鎖配列および軽鎖配列を用いて同じやり方で生成することができる。

【0504】

米国特許第6,949,245号、7,244,826号および7,632,924号に開示の配列は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0505】

実施例3-HEK-293細胞またはCHO細胞におけるHER2およびHER2変種の一過性発現

Freestyle (商標) 293-F (懸濁増殖および既知組成のFreestyle培地に順応させたHEK-293サブクローン、(HEK-293F))細胞をInvitrogenから入手し、適切なプラスミドDNAと293fectin (Invitrogen)を用いて製造業者の説明書に従ってトランスフェクトした。抗体発現の場合、適切な重鎖発現ベクターおよび軽鎖発現ベクターを同時発現させた。

【0506】

pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16、およびpEE13.4Her2-stumpyを、Freestyle (商標) CHO-S (Invitrogen)細胞株においてFreestyle MAXトランスフェクション試薬 (Invitrogen)を用いて一過性にトランスフェクトした。HER2およびHer2-delex16の発現を、下記のようにFACS分析によって試験した。

【0507】

実施例4-NSOにおけるHER2およびHER2変種の安定ポリクローナルプール発現

pEE13.4 HER2、pEE13.4 HER2-delex16、およびpEE13.4 HER2-stumpyを、ヌクレオフェクション (nucleofection) (Amaxa)によってNSO細胞に安定的にトランスフェクトした。組み込まれたグルタミン合成酵素選択マーカー (Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 2000; 32(2): 109-123)に基づくグルタミン依存性増殖による選択後に、安定的にトランスフェクトされた細胞のプールを樹立した。

【0508】

実施例5-Hisタグ化HER2の精製

HER2ECDHisをHEK-293F細胞において発現させた。HER2ECDHisの中にあるHisタグは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィーを用いた精製を可能にした。なぜなら、Hisタグ化タンパク質は樹脂ビーズに強く結合するが、培養上清中に存在する他のタンパク質は強く結合しないからである。

【0509】

このプロセスでは、クロマトグラフィー樹脂上に固定化されたキレート剤に Co^{2+} カチオンが充填されている。バッチモードで(すなわち、溶液中で)、HER2ECDHisを含有する上清を樹脂とインキュベートした。インキュベーション後、ビーズを上清から取り出し、カラムに詰めた。弱く結合しているタンパク質を除去するためにカラムを洗浄した。次いで、強く結合しているHER2ECDHisタンパク質を、Hisと Co^{2+} との結合において競合するイミダゾールを含有する緩衝液で溶出した。脱塩カラムにおける緩衝液交換によって溶出剤をタンパク質から除去した。

【0510】

実施例6 トランスジェニックHuMAb (登録商標) マウスの免疫処置手順

抗体001、019、021、025、027、032、033、035、036、049、050、051、054、055、084、091、094、098、100、105、123および124は、以下の免疫処置によって得た：3匹の雌性HCo12マウス、1匹の雄性および2匹の雌性HCo12-Balb/Cマウス、1匹の雄性HCo17マウスならびに1匹の雄性HCo20マウス (Medarex, San Jose, CA, USA)に対して、HER2ECDを安定的にトランスフェクトした 5×10^6 個のNSO細胞の腹腔内 (IP) 免疫処置と、ハプテンであるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と連結させた20 μg のHER2ECDHisタンパク質の尾基部への皮下 (SC) 免疫処置とを、交互に14日毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った (4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置)。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中にて行った。他の免疫処置についてはすべて、細胞はPBS中にてIP注射し、KLHと連結させたHER2ECDは不完全フロイントアジュバント (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用いてSC注射した。

【0511】

抗体125、127、129、132、152、153および159は、以下の免疫処置によって得た：1匹の

10

20

30

40

50

雄性および2匹の雌性HCo12-Balb / Cマウス、1匹の雌性HCo20マウス、ならびに1匹の雌性HCo12マウス (Medarex) に対して、HER2delex16を安定的にトランスフェクトした 5×10^6 個のNS0細胞のIP免疫処置と、ハプテンであるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と連結させた20 μ gのHER2ECDHisタンパク質の尾基部へのSC免疫処置とを、交互に14日毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った (4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置)。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中にて行った。他の免疫処置についてはすべて、細胞はPBS中にてIP注射し、KLHと連結させたHER2ECDは不完全フロイントアジュバント (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用いてSC注射した。

【 0 5 1 2 】

10

抗体143、160、161、162、166および169は、以下の免疫処置によって得た：1匹の雄性および1匹の雌性HCo12マウス、1匹のHCo12-Balb / Cマウス、1匹の雄性HCo17マウス、ならびに1匹の雄性HCo20マウス (Medarex) に対して、ハプテンであるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と連結させた20 μ gのHER2ECDHisタンパク質のIP免疫処置と尾基部へのSC免疫処置とを、交互に14日毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った (4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置)。初回免疫処置は完全フロイントアジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中にて行った。他の免疫処置はすべて、不完全フロイントアジュバント (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用いて注射した。

【 0 5 1 3 】

20

抗体005、006、041、044、059、060、067、072、093、106および111を、以下の免疫処置手順によって得た：2匹の雌性HCo12マウス、1匹の雌性および1匹の雄性HCo12-Balb / Cマウス、1匹の雌性および1匹の雄性HCo17マウス、ならびに2匹の雄性HCo20マウス (Medarex, San Jose, CA, USA) に対して、HER2ECDを安定的にトランスフェクトした 5×10^6 個のNS0細胞の腹腔内 (IP) 免疫処置、およびハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合させた20 μ gのHER2ECDHisタンパク質を一過性にトランスフェクトした 5×10^6 個のNS0細胞の尾基部への皮下 (SC) 免疫処置を、交互に2週間毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った (4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置)。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中で行った。他の免疫処置についてはすべて、細胞をPBS中にてIP注射し、KLHを結合させたHER2ECDを、不完全フロイントアジュバント (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用いてSC注射した。

30

【 0 5 1 4 】

抗体150は、1匹の雄性HCo17マウス (Medarex) に対する、HER2delex16を安定的にトランスフェクトした 5×10^6 個のNS0細胞のIP免疫処置、およびハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合させた20 μ gのHER2ECDHisタンパク質を一過性にトランスフェクトした 5×10^6 個のNS0細胞の尾基部へのSC免疫処置を、14日の間隔をおいて交互に行うことによって得た。最大で8回の免疫処置を行った (4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置)。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中で行った。他の免疫処置についてはすべて、PBS中にある細胞をIP注射し、KLHと結合させたHER2ECDは不完全フロイントアジュバント (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用いてSC注射した。

40

【 0 5 1 5 】

抗体163は、1匹の雄性HCo20マウス (Medarex) に対する、ハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) と結合させた20 μ gのHER2ECDHisタンパク質による、14日間隔でのIPおよび尾基部へのSCの交互の免疫処置によって得た。最大で8回の免疫処置を行った (4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置)。初回免疫処置は完全フロイントアジュバント (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中でIPで行った。他の免疫処置は、不完全フロイントアジュバント (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用いて注射した。

50

【0516】

抗原特異的FMATスクリーニングアッセイ（実施例7に記載）においてTC1014-Her2、TC1014-HER2delex16、またはTC1014-HER2stumpyに対する力価が少なくとも2回連続して認められたマウスを陽性とみなし、融合した。

【0517】

実施例7：抗原特異的HER2抗体を検出するためのホモジニアススクリーニングアッセイ

免疫マウス（実施例6）の血清中またはHuMab（ヒトモノクローナル抗体）ハイブリドーマ（実施例8）もしくはトランスフェクトーマ（実施例10）の培養上清中にあるHER2抗体の存在を、ホモジニアス抗原特異的スクリーニングアッセイ（4クワドラント（four quadrant））によってFluorometric Micro volume Assay Technology（FMAT； Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて確かめた。このために、4種類の細胞ベースのアッセイの組み合わせを使用した。TC1014-HER2（HER2受容体を一過性に発現するCHO-S細胞；前記のように作製された）、TC1014-HER2delex16（Her2-delexの細胞外ドメインを一過性に発現するCHO-S細胞（HER2受容体の16アミノ酸欠失変異体；前記のように作製された）、およびTC1014-HER2stumpy（HER2受容体の細胞外stumpyドメインを一過性に発現するHEK-293F細胞；前記のように作製された）、ならびにCHO-S野生型細胞（HER2を発現しない負の対照細胞）との結合を確かめた。HER2と結合させるために、試料を細胞に添加した。その後、蛍光結合体（ヤギ抗ヒトIgG-Cy5； Jackson ImmunoResearch）を用いて、HuMabの結合を検出した。TH1014-ペルツズマブ（HEK-293F細胞において作製された）を正の対照として使用し、HuMab（登録商標）-マウスプール血清およびHuMab-KLHを負の対照として使用した。試料を、Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System（8200 CDS）を用いてスキャンし、「カウントx蛍光」を読み取り値として使用した。カウントが50を超えた時に試料は陽性と示され、カウントx蛍光は、負の対照の少なくとも3倍であった。

【0518】

実施例8：HuMabハイブリドーマの作製

十分な抗原特異的力価（前記で定義した）が発生したHuMab（登録商標）マウスを屠殺し、脾臓ならびに腹大動脈および大静脈に隣接するリンパ節を収集した。脾細胞およびリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞株を、CEEF 50 Electrofusion System（Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA）を用いて、本質的に製造業者の説明書に従って融合した。次に、一次ウェルを、ClonePixシステム（Genetix, Hampshire, UK）を用いてサブクロニングした。この目的のために、特異的な一次ウェルハイブリドーマを、40%CloneMedia（Genetix, Hampshire, UK）および60%HyQ 2x完全培地（Hyclone, Waltham, USA）から作られた半固体培地に播種した。実施例7に記載のように抗原特異的結合アッセイにおいてサブクローンを再試験した。さらに増殖させるために、Octet（Fortebio, Menlo Park, USA）を用いてIgGレベルを測定して、一次ウェル1個につき最も特異的かつ最も産生しているクローンを選択した。結果として生じたHuMabハイブリドーマのさらなる増殖および培養は、標準的なプロトコル（例えば、Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006に記載のプロトコル）に基づいて行った。このプロセスによって得られたクローンをPC1014と名付けた。

【0519】

実施例9-抗体の質量分析

6ウェルまたはHyperflask段階からの抗体含有上清の小さな0.8mlアリコートをし、Sciclone ALH 3000ワークステーション（Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA）においてプロテインG樹脂（PhyNexus Inc., San Jose, USA）を含有するPhyTipカラムを用いて精製した。PhyTipカラムを製造業者の説明書に従って使用したが、緩衝液を、Binding Buffer PBS（B.Braun, Medical B.V., Oss, Netherlands）およびElution Buffer 0.1Mグリシン-HCl pH2.7（Fluka Riedel-de Haen, Buchs, Germany）と交換した。精製後、試料を2M Tris-HCl pH9.0（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands）によって中和した。または

、場合によっては、さらに多量の培養上清を、MabSelect SuReカラム (GE Health Care) を用いて精製した。

【0520】

精製後、試料を384ウェルプレート (Waters, 100 μ l角型ウェルプレート, 部品番号18600 2631) に入れた。N-グリコシダーゼF (Rocheカタログ番号11365177001) を用いて、試料を37 で一晩、脱グリコシルした。DTT (15mg/mL) を添加し (1 μ l/ウェル)、37 で1時間インキュベートした。試料 (5 μ lまたは6 μ l) を、Acquity UPLC (商標) (Waters, Milford, USA) においてBEH300 C18、1.7 μ m、2.1x50mmカラムを用いて60 で脱塩した。0.1%ギ酸 (Fluka, カタログ番号56302, Buchs, Germany) を含むMQ水および0.1%ギ酸 (Fluka, カタログ番号56302, Buchs, Germany) を含むLC-MS等級のアセトニトリル (Biosolve, カタログ番号01204101, Valkenswaard, The Netherlands) を、それぞれ、溶出剤 (Eluents) AおよびBとして使用した。飛行時間型エレクトロスプレーイオン化質量スペクトルを、陽イオンモードで動いているmicroTOF (商標) 質量分析計 (Bruker, Bremen, Germany) においてオンラインで記録した。分析の前に、900~3000m/zスケールを、ESチューニングミックス (tuning mix) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) を用いて校正した。DataAnalysis (商標) ソフトウェアv.3.4 (Bruker) と5~80kDaの分子量を探すMaximal Entropyアルゴリズムを用いて、質量スペクトルをデコンボリューションした。

10

【0521】

デコンボリューション後、重複する抗体を見つけるために、全ての試料について、得られた重鎖および軽鎖の質量を比較した。これは時として余分な軽鎖の存在によるものであったが、重鎖の比較では、C末端リジン変種が存在する可能性があることも考慮に入れた。これにより、重複しない抗体、すなわち、ある特定の重鎖および軽鎖の重複しない組み合わせのリストが得られた。重複する抗体が見つかった場合には、他の試験からの結果に基づいて、1つの重複しない抗体が選択された。

20

【0522】

実施例10-HER2抗体可変ドメインの配列分析および発現ベクターへのクローニング

HER2 HuMabの全RNAを5x10⁶個のハイブリドーマ細胞から調製し、SMART RACE cDNA Amplificationキット (Clontech) を用いて製造業者の説明書に従って、100ngの全RNAから5'-RACE-Complementary DNA (cDNA) を調製した。VHコード領域およびVLコード領域をPCR増幅し、連結非依存クローニング (ligation independent cloning) (Aslanidis, C. and P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18 (20): 6069-74) によって、pG1f発現ベクターおよびpKappa発現ベクターにインフレームで直接クローニングした。適切な重鎖ベクターおよび軽鎖ベクターが、293fectinを用いてFreestyle (商標) 293-F細胞に一過性に共発現された。このプロセスによって得られたクローンをTH1014と名付けた。それぞれの抗体について、16個のVLクローンおよび8個のVHクローンを配列決定した。さらなる研究および発現のために、重鎖質量および軽鎖質量の推定値が (質量分析によって求められた) 同じ抗体のハイブリドーマ由来材料の質量と一致するクローンを選択した。

30

【0523】

結果として生じた配列を図1および図2ならびに配列表に示した。選択された配列を下記においてもさらに詳細に説明する。CDR配列を、IMGT (Lefranc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999およびBrochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008)) に従って定義した。表1、表2、および表3は抗体配列情報または生殖系列配列の概要を示す。表4はコンセンサス配列を示す。

40

【0524】

(表1Aおよび1B) HuMabs 169、050、084、025、091、129、127、159、098、153、および132 (表1A)、ならびにHuMab 005、006、059、060、106、および111 (表1B) の重鎖可変領域 (VH)、軽鎖可変領域 (VL)、およびCDR配列

1A:

SEQ ID No:1	VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYGISW VRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMT TDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:2	VH 169, CDR1	GYTFTNYG
SEQ ID No:3	VH 169, CDR2	LSAYSGNT
SEQ ID No:4	VH 169, CDR3	ARDRIVVRPDYFDY
SEQ ID No:5	VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLT SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:6	VL 169, CDR1	QSVSSY
	VL 169, CDR2	DAS
SEQ ID No:7	VL 169, CDR3	QQRSNWPRT

SEQ ID No:8	VH 050	EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M N W V R Q A P G K G L E W V S A I S G R G G T T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M S S L R A E D T A V Y Y C A K A R A N W D Y F D Y W G Q G T L V T V S S
SEQ ID No:9	VH 050, CDR1	G T F F S S Y A
SEQ ID No:10	VH 050, CDR2	I S G R G G T T
SEQ ID No:11	VH 050, CDR3	A K A R A N W D Y F D Y
SEQ ID No:12	VL 050	D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q H K P G K A P K L L I Y A A S I L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P I T F G Q G T R L E I K
SEQ ID No:13	VL 050, CDR1	Q G I S S W
	VL 050, CDR2	A A S
SEQ ID No:14	VL 050, CDR3	Q Q A N S F P I T
SEQ ID No:15	VH 084	Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F R T Y A I N W V R Q A P G Q G L E W M G R I N T V L G I V N H A Q K F Q G R V T I T A D K S T N T A Y M E L N S L R S E D T A V Y Y C A R E K G V D Y Y Y G I E V W G Q G T T V T V S S
SEQ ID No:16	VH 084, CDR1	G G T F R T Y A
SEQ ID No:17	VH 084, CDR2	I N T V L G I V
SEQ ID No:18	VH 084, CDR3	A R E K G V D Y Y Y G I E V
SEQ ID No:19	VL 084	D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q H K P G K A P K L L I Y V A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P L T F G G G T K V E I K
SEQ ID No:20	VL 084, CDR1	Q G I S S W
	VL 084, CDR2	V A S
SEQ ID No:21	VL 084, CDR3	Q Q A N S F P L T
SEQ ID No:22	VH 025	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S D Y Y W N W I R Q P P G K G L E W I G E I H H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R G Y Y D S G V Y Y F D Y W A Q G T L V T V S S
SEQ ID No:23	VH 025, CDR1	G G S F S D Y Y
SEQ ID No:24	VH 025, CDR2	I H H S G S T
SEQ ID No:25	VH 025, CDR3	A R G Y Y D S G V Y Y F D Y
SEQ ID No:26	VL 025	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S R W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L R S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P I T F G Q G T R L E I K
SEQ ID No:27	VL 025, CDR1	Q G I S R W
	VL 025, CDR2	A A S
SEQ ID No:28	VL 025, CDR3	Q Q Y N S Y P I T
SEQ ID No:29	VH 091	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V S G G S F S G Y Y W T W I R Q P P G K G L E W I G E I Y H S G D T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L K L Y S V T A A D T A V Y Y C A R L Y F G S G I Y Y L D Y W G Q G T L V T V S S
SEQ ID No:30	VH 091, CDR1	G G S F S G Y Y

10

20

30

40

SEQ ID No:163	VH 091, CDR2	IYHSGDT	
SEQ ID No:31	VH 091, CDR3	ARLYFGSGIYYLDY	
SEQ ID No:32	VL 091	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLWVY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK	
SEQ ID No:33	VL 091, CDR1	QGISSW	
	VL 091, CDR2	AAS	
SEQ ID No:34	VL 091, CDR3	QQYNSFPPT	
SEQ ID No:35	VH 129	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSTFAIHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGGHKFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARGLGVWGAFD YWGQGTLLTVSS	10
SEQ ID No:36	VH 129, CDR1	GFTTFSTA	
SEQ ID No:37	VH 129, CDR2	ISYDGGHK	
SEQ ID No:38	VH 129, CDR3	ARGLGVWGAFDY	
SEQ ID No:39	VL 129	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTKVEIK	
SEQ ID No:40	VL 129, CDR1	QSVSSY	
	VL 129, CDR2	DAS	20
SEQ ID No:41	VL 129, CDR3	QQRSNWWT	
SEQ ID No:42	VH 127	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKGSGYSFSIYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIFPGDSDIRYSPSFQGGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSPRH WYFDLWGRGTLTVSS	
SEQ ID No:43	VH 127, CDR1	GYSFSIYW	
SEQ ID No:44	VH 127, CDR2	IFPGDSDI	
SEQ ID No:45	VH 127, CDR3	ARQPGDWSPRHWYFDL	
SEQ ID No:46	VL 127	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWY QQKPGKAPELLIYAASLTQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISYLSQSEDFATYYCQQYYSFPLTFGGGTKVEIK	30
SEQ ID No:47	VL 127, CDR1	QGISSY	
	VL 127, CDR2	AAS	
SEQ ID No:48	VL 127, CDR3	QQYYSFPLT	
SEQ ID No:49	VH 159	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIPGDS DTRYSPSFQGGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYDILT GFNWFDPWGQGTLLTVSS	
SEQ ID No:50	VH 159, CDR1	GYNFTSYW	
SEQ ID No:51	VH 159, CDR2	IYPGDSDT	
SEQ ID No:52	VH 159, CDR3	ARWGTYDILTGYFN	40

SEQ ID No:53	VL 159	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYYIYPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:54	VL 159, CDR1	QGISSW
	VL 159, CDR2	AAS
SEQ ID No:55	VL 159, CDR3	QQYYIYPWT
SEQ ID No:56	VH 098	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSNYGMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYY TLFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No:57	VH 098, CDR1	GFTFSNYG
SEQ ID No:58	VH 098, CDR2	ISGSAYST
SEQ ID No:59	VH 098, CDR3	AKAHYHGSGSYYTLFDY
SEQ ID No:60	VL 098	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No:61	VL 098, CDR1	QGISSW
	VL 098, CDR2	AAS
SEQ ID No:62	VL 098, CDR3	QQYNSYPYT
SEQ ID No:63	VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVIHW VRQAPGKGLEWVTVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLSAEDTAMYYCARGGITGTTGVF DYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No:64	VH 153, CDR1	GFTFSDYV
SEQ ID No:65	VH 153, CDR2	ISYDGSNK
SEQ ID No:66	VH 153, CDR3	ARGGITGTTGVFDY
SEQ ID No:67	VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGYGTDFSL TISSLQPEDFAIYYCQQYKSYPTFGQGTRLEIK
SEQ ID No:68	VL 153, CDR1	QGISSW
	VL 153, CDR2	DAS
SEQ ID No:69	VL 153, CDR3	QQYKSYPT
SEQ ID No:70	VH 132	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGNSNYVQKFQGRVTM TTDTTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCAREYSYDSGT FYGMMDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID No:71	VH 132, CDR1	GYTFTSYG
SEQ ID No:72	VH 132, CDR2	ISAYNGNS
SEQ ID No:73	VH 132, CDR3	AREYSYDSGTIFYGMMDV
SEQ ID No:74	VL 132	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPMYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No:75	VL 132, CDR1	QSVSSY

10

20

30

40

	VL 132, CDR2	DAS
SEQ ID No:76	VL 132, CDR3	QQRSNWPMYT

1B)

SEQ ID No: 165	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDS DTRYRPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWTS LKASDTAIYYCARQRGDYYYFYGM DVWGQGT TVTVSS
SEQ ID No: 166	VH 005, CDR1	GYSFHFYW
SEQ ID No: 167	VH 005, CDR2	IYPGDS DT
SEQ ID No: 168	VH 005, CDR3	ARQRGDYYYFYGM DV
SEQ ID No: 169	VL 005	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQVPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQY GSSSLTFGGG TKVEIK
SEQ ID No: 170	VL 005, CDR1	QSVSSSY
	VL 005, CDR2	GAS
SEQ ID No: 171	VL 005, CDR3	QQYGSSLT
SEQ ID No: 172	VH 006	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYALIWW RQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKARIWG PLFDYW GQGT LVTVSS
SEQ ID No: 173	VH 006, CDR1	GFTFSNYA
SEQ ID No: 174	VH 006, CDR2	IRGGAGST
SEQ ID No: 175	VH 006, CDR3	AKARIWG PLFDY
SEQ ID No: 176	VL 006	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQR SNWPPLTFGGG TKVEIK
SEQ ID No: 177	VL 006, CDR1	QSVSSSY
	VL 006, CDR2	DAS
SEQ ID No: 178	VL 006, CDR3	QQRSNWPPLT
SEQ ID No: 179	VH 059	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTRYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYA QKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELY FDYW GQGT LVTVSS
SEQ ID No: 180	VH 059, CDR1	GYTFTRYG
SEQ ID No: 181	VH 059, CDR2	ISAYNGKT
SEQ ID No: 182	VH 059, CDR3	ARSPLLWFEELYFDY
SEQ ID No: 183	VL 059	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQY GTS LFTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 184	VL 059, CDR1	QSVSSSY
	VL 059, CDR2	GAS

10

20

30

40

SEQ ID No: 185	VL 059, CDR3	QQYGTSFLT	10
SEQ ID No: 186	VH 060	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSPSFQGQVTISA DKSIATAYLQWNSLKASDTAMYYCARHAGDFYYFDG LDVWGQGTTTVTVSS	
SEQ ID No: 187	VH 060, CDR1	GYRFTTSYW	
SEQ ID No: 188	VH 060, CDR2	IYPGDSYT	
SEQ ID No: 189	VH 060, CDR3	ARHAGDFYYFDGLDV	
SEQ ID No: 190	VL 060	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGTTRLEIK	
SEQ ID No: 191	VL 060, CDR1	QSVSSSY	
	VL 060, CDR2	GAS	
SEQ ID No: 192	VL 060, CDR3	QQYGSSPIT	
SEQ ID No: 193	VH 106	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYY SGMDVWGQGTTTVTVSS	20
SEQ ID No: 194	VH 106, CDR1	GYSFTRYW	
SEQ ID No: 195	VH 106, CDR2	IYPGDSDT	
SEQ ID No: 196	VH 106, CDR3	ARLTGDRGFDYYSGMDV	
SEQ ID No: 197	VL 106	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSFTFGPGTKVDIK	
SEQ ID No: 198	VL 106, CDR1	QSVSSSY	
	VL 106, CDR2	GAS	
SEQ ID No: 199	VL 106, CDR3	QQYGSSFT	
SEQ ID No: 200	VH 111	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYGISW VRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITAD KSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSNWYYW GQGTLTVTVSS	
SEQ ID No: 201	VH 111, CDR1	GGTFSSYG	30
SEQ ID No: 202	VH 111, CDR2	IIPILGIA	
SEQ ID No: 203	VH 111, CDR3	ARDQEYSSNWYY	
SEQ ID No: 204	VL 111	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQLYGSSPTFGPGTKVDIK	
SEQ ID No: 205	VL 111, CDR1	QSVRSSY	
	VL 111, CDR2	GAS	
SEQ ID No: 206	VL 111, CDR3	QLYGSSPT	

【 0 5 2 5 】

(表 2) 選択されたHuMabのマウス起源ならびに重鎖配列相同性および軽鎖配列相同性

10

20

30

40

HuMab:	マウス:	種:	生殖系列VH:	生殖系列VL:
169	361494	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
050	350633	HCo12	IgHV3-23-01	IgKV1-12-01
084	350615	HCo12-BalbC	IgHV1-69-04	IgKV1-12-01
025	350631	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
091	350630	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
129	359783	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV3-11-01
127	359783	HCo12-BalbC	IgHV5-51-01	IgKV1D-8-01
159	363503	HCo12	IgHV5-51-01	IgKV1D-16-01
098	350659	HCo17	IgHV3-23-01	IgKV1D-16-01
153	359785	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV1D-16-01
132	361487	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
005	350611	HCo12-BalbC	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
006	350611	HCo12-BalbC	IgHV3-23-1	IgKV3-11-01
059	350654	HCo17	IgHV1-18-1	IgKV3-20-01
060	350654	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
106	350660	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
111	350660	HCo17	IgHV1-69-4	IgKV3-20-01

10

20

【 0 5 2 6 】

(表 3 A および 3 B) HuMabs 049、051、055、123、161、124、001、143、019、021、027、032、035、036、054、094、ならびにHuMab 041、150、067、072、163、093、および044 (3B) の重鎖可変領域 (VH) 配列、軽鎖可変領域 (VL) 配列。それぞれのCDRは、図1において下線が引かれたVH配列のCDRおよび図2において下線が引かれたVL配列のCDRに対応する。

3A:

SEQ ID No: 77	VH 049	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNSKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 78	VL 049	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 79	VH 051	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNSKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 80	VL 051	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 81	VH 055	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYADSVKGRFTISRDNSKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS

30

40

SEQ ID No: 82	VL 055	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 83	VH 123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAAGYTFTNYGISWVRQAPG QALEWMGWITTYSSNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRVVVRPDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 84	VL 123	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ QRSHWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 85	VH 161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWMGWLAYSNGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 86	VL 161	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 87	VH 124	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCAAGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWMGWITTYNGNTIYAQRFQDRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 88	VL 124	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 89	VH 001	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGNYGSGYYFDLWGRGTQVTVSS
SEQ ID No: 90	VL 001	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYISFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 91	VH 143	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSSTNYPNPSLMSRTISVDTSKNQFSLQLSSV TAADTAVYYCARGYYGSGYYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 92	VL 143	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 93	VH 019	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSSTNYPNPSLKSRTISVDTSKQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYYDSGVYFDYWAQGLTVTVSS
SEQ ID No: 94	VL 019	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISRWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 95	VH 021	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYYASGVYFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 96	VL 021	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 97	VH 027	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLNLSSVT AADTAVYYCARGLIGSGYYFDYWDQGLTVTVSS
SEQ ID No: 98	VL 027	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 99	VH 032	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYPNPSLTSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYGSIGYFDYWGQGLTVTVSS

10

20

30

40

SEQ ID No: 100	VL 032	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 101	VH 035	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYPNPSLTSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYGSIGIYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 102	VL 035	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 103	VH 036	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLYYGSIGIYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 104	VL 036	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLWYQQKPEKA PKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 105	VH 054	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLWYGSIGIYFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 106	VL 054	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 107	VH 094	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLYSVT AADTAVYYCAHYFGSIGIYLDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 108	VL 094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 109	VH 105	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLWLQMNS LRAEDTAVYYCAKAHYHGSIGIYTLFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 110	VL 105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 111	VH 100	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMNWVRQAPG KGLEWVSAISGTGYSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKAHYFGSIGIYTLFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 112	VL 100	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 113	VH 125	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMNWWVRQAPG KGLEWVSTISGSGYATYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKHTLGSIGIYTLFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 114	VL 125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 115	VH 162	EVQLWESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMWVRQAP GKGLEWVSGISGSGYSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGYHGSIGIYTSFDYWGGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 116	VL 162	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 117	VH 033	QVQLVESGGGVVQTGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVAISYDGSNKKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGDYISSGVSFDYWGGQGLTVTVSS

10

20

30

40

SEQ ID No: 118	VL 033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTREIK
SEQ ID No: 119	VH 160	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVAISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTMYLQMN SLRAEDTAMCYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 120	VL 160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTREIK
SEQ ID No: 121	VH 166	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNEYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGSIIIGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 122	VL 166	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTREIK
SEQ ID No: 123	VH 152	QVQVVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSYKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 124	VL 152	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGINSWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPENFATYY CQQYNSYPITFGQGTREIK
SEQ ID No: 125	VH 167	QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGLTVTVSS
SEQ ID No: 126	VL 167	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTREIK

10

20

3B:

SEQ ID No: 207	VH 041	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQKGDYFFGLDVWGQGTAITVSS
SEQ ID No: 208	VL 041	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 209	VH 150	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQAGDYNNYNGMDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID No: 201	VL 150	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 211	VH 067	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYPGDS TRYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQKGDYYYHYGLDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID No: 212	VL 067	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPRLTFGGGTKEIK
SEQ ID No: 213	VH 072	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYPGDS TRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQKGDYYYFNGLDVWGQGTITVTVSS
SEQ ID No: 214	VL 072	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPRLTFGGGTKEIK

30

40

SEQ ID No: 215	VH 163	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGSQGYRFISYWIGWVRQMPG KGLEWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISVDKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQRGDYYYFNGLDVWGQGT TTVTVSS
SEQ ID No: 216	VL 163	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 217	VH 093	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSITTAYLQWSS LRASDTAMYYCARQRGDYYYFFGLDIWGQGT TTVTVSL
SEQ ID No: 218	VL 093	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 219	VH 044	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWVRQMPG KGLEWMGSIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSITTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQAGDYYYNGMDVWGQGT TTVTVSS
SEQ ID No: 220	VL 044	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK

10

【 0 5 2 7 】

(表4) 図1および2に示された配列アラインメントに基づくコンセンサスCDR

SEQ ID No: 9 050-049-051- 055	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSSYA	
SEQ ID No: 127 050-049-051- 055	IgHV3-23-1	VH CDR2	ISGX1GGX2T	式中, X1=R または S, および X2=T または S; 好ましくは, 式中, X1=R および X2=T
SEQ ID No: 11 050-049-051- 055	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKARANWDYFD Y	
SEQ ID No: 128 084	IgHV1-69-04	VH CDR1	GGTFX1X2YA	式中, X1=R または S, および X2=T または S; 好ましくは, 式中, X1=R および X2=T
SEQ ID No: 129 084	IgHV1-69-04	VH CDR2	IX1X2X3LGIX4	式中, X1=Nまたは I, X2=Tまたは P, X3=Vまたは I, および X4=Vまたは A, 好ましくは, 式中, X1=N, X2=T, X3=V, および X4=V
SEQ ID No: 130 084	IgHV1-69-04	VH CDR3	AREKGVDYYYG X1X2	式中, X1=Iまたは M, X2=Eまたは D; 好ましくは, 式中, X1=I, X2=E
SEQ ID No: 131 169-123-161- 124	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	式中, X=N または S, 好ましくは, N
SEQ ID No: 132 169-123-161- 124	IgHV1-18-1	VH CDR2	IX1X2YX3GNT	式中, X1=S, T, または I; X2=A または T; X3=S または N; 好ましくは, 式中, X1=S, X2=A, および X3=S
SEQ ID No: 133 169-123-161- 124	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARDRX1X2VRP DYFDY	式中, X1=I または V, X2=Vまたは I; 好ましくは, 式中, X1=I および X2=V
SEQ ID No: 134 025-001-143- 019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGFSFX1YX2	式中, X1=D または G および X2=Yまたは F; 好ましくは, 式中, X1=D および X2=Y

20

30

40

SEQ ID No: 135 025-001-143- 019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HX2GSX3	式中, X1=HまたはN, X2=Sまたは V, および X3=TまたはA; 好ましくは, 式中, X1=H, X2=S, および X3=T	10
SEQ ID No:136 025-001-143- 019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARGX1X2X3SG X4YYFDX5	式中, X1=Y, NまたはL; X2=Y またはI, X3=D, GまたはA; X4=Vまたは Y; および X5=YまたはL; 好ましくは, 式中, X1=Y, X2=Y, X3=D, X4=V, および X5=Y	
SEQ ID No:137 091-032-035- 036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGSF SX1YY	式中, X1=GまたはD, 好ましくは, G	
SEQ ID No:138 091-032-035- 036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HSGX2T	式中, X1=Y, NまたはH; および X2=DまたはS; 好ましくは, 式中, X1=Y および X2=D	
SEQ ID No:139 091-032-035- 036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARLX1X2GSGX 3YYX4DY	式中, X1=Y, FまたはW; X2=F またはY; X3=I, TまたはS; および X4=L またはF; 好ましくは, 式中, X1=Y, X2=F, X3=I, および X4=L	
SEQ ID No:140 129	IgHV3-30-01	VH CDR1	GFTFSX1X2A	式中, X1=TまたはF, X2=Fまたは Y; 好ましくは, 式中, X1=T および X2=F	20
SEQ ID No:141 129	IgHV3-30-01	VH CDR2	ISYDGX1X2K	式中, X1=GまたはS, X2=Hまたは N; 好ましくは, 式中, X1=G および X2=H	
SEQ ID No:142 129	IgHV3-30-01	VH CDR3	ARGLGVWGX1F DY	式中, X1=AまたはY, 好ましくは, A	
SEQ ID No:143 098-105-100- 125-162	IgHV3-23-01	VH CDR1	GFTFX1X2YX3	式中, X1=S, NまたはT; X2=N, DまたはS; および X3=GまたはA; 好ましくは, 式中, X1=S, X2=N および X3=G	
SEQ ID No:144 098-105-100- 125-162	IgHV3-23-01	VH CDR2	ISGX1X2X3X4T	式中, X1=SまたはT, X2=Aまたは G, X3=YまたはG, X4=SまたはA; 好ましくは, 式中, X1=S, X2=A, X3=Y, X4=S	
SEQ ID No:145 098-105-100- 125-162	IgHV3-23-01	VH CDR3	AKX1X2X3X4G SGSYTX5FDY	式中, X1=AまたはG; X2=Hまたは Y; X3=YまたはT; X4=H, FまたはL; X5=LまたはS; 好ましくは, 式中, X1=A; X2=H; X3=Y; X4=H; X5=L	30
SEQ ID No:146 127	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYSFX1X2YW	式中, X1=SまたはT, X2=Iまたは S; 好ましくは, 式中, X1=S, X2=I	
SEQ ID No:147 127	IgHV5-51-01	VH CDR2	IX1PGDSDX2	式中, X1=FまたはY, X2=Iまたは T; 好ましくは, 式中, X1=F, X2=I	
SEQ ID No:148 127	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARQPGDWSPR HWYFDL		
SEQ ID No:149 159	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYXFTSYW	式中, X=NまたはS, 好ましくは, N	
SEQ ID No:51 159	IgHV5-51-01	VH CDR2	IYPGDSDT		
SEQ ID No:52 159	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARWGTYYDILT GYFN		

SEQ ID No:71 132	IgHV1-18-01	VH CDR1	GYTFTSYG		
SEQ ID No:150 132	IgHV1-18-01	VH CDR2	ISAYNGNX	式中, X=S または T, 好ましくは, S	
SEQ ID No:151 132	IgHV1-18-01	VH CDR3	AREYSYDSGT FYYGMDV		
SEQ ID No:152 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR1	GFTFSX1X2X3	式中, X1=D または S, X2=Y または H, X3=V または A; 好ましくは, 式中, X1=D, X2=Y, X3=V	
SEQ ID No:153 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR2	ISYDGSX1X2	式中, X1=N または Y, X2=K または E, 好ましくは, 式中, X1=N および X2=K	
SEQ ID No:154 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR3	ARGX1X2X3X4 X5X6GX7FDY	式中, X1=G, D または S; X2=I または Y; X3=T または I; X4=G または S; X5=T または S; X6=T または S; X7=Y または V; 好ましくは, 式中, X1=G; X2=I; X3=T; X4=G; X5=T; X6=T; および X7=V	10
SEQ ID No:13 050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR1	QGISSW		
050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR2	XAS	式中, X=A または V	
SEQ ID No:155 050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR3	QQANSFPXT	式中, X=I または L	
SEQ ID No:6 169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY		20
169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR2	DXS	式中, X=A または T, 好ましくは, A	
SEQ ID No:156 169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRXWPRT	式中, X=N または H, 好ましくは, N	
SEQ ID No:157 025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR1	QGISXW	式中, X=R または S, 好ましくは, R	
025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR2	AAS		
SEQ ID No:164 025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR3	QQYNSXPIT	式中, X=Y または F, 好ましくは, Y	30
SEQ ID No:33 091-032-035- 036-054-094	IgKV1D-16- 01	VL CDR1	QGISSW		
091-032-035- 036-054-094	IgKV1D-16- 01	VL CDR2	AX1X2	式中, X1=A または T, および X2=S または F; 好ましくは, 式中, X1=A および X2=S	
SEQ ID No:158 091-032-035- 036-054-094	IgKV1D-16- 01	VL CDR3	QQYNSFPPT		
SEQ ID No:159 098-100-105- 125-162	IgKV1D-16- 01	VL CDR1	QGIXSW	式中, X=S または N, 好ましくは, S	40

098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID No:160 098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSYPXT	式中, X=Y または L, 好ましくは, Y
SEQ ID No:161 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIX1X2W	式中, X1=S または N; X2=S または N; 好ましくは, 式中, X1=X2=S
153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR2	XAS	式中, X=D または A, 好ましくは, D
SEQ ID No:162 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYXSYPIT	式中, X=K または N, 好ましくは, K
SEQ ID No: 221 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR1	GYX1FX2X3YW	式中, X1=S または R; X2=S, T, H, または I; および X3=S, R, または F; 好ましくは, 式中, X2=H または T
SEQ ID No: 222 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR2	IX1PGDSX2T	式中, X1=Y または F; X2=D, Y, または H 好ましくは, 式中, X2=D または Y
SEQ ID No: 223 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR3	ARX1X2X3X4X5X6X7X8YX9X10GX11DX12	式中, X1=Q, H, または L; X2=R, A, T, または K; X3=G; X4=D; X5=R または無し; X6=G または無し; X7=Y または F; X8=Y または D; X9=Y, F, または H; X10=Y, D, S, F, または N; X11=M または L; および X12=V または I; 好ましくは, 式中, X1=Q, X2=R または A; X5=X6=無し; X7=Y または F; X8=Y; X9=F; X10=Y; および X12=V
SEQ ID No: 224 006	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSXYA	式中, X=N または S, 好ましくは, N
SEQ ID No: 225 006	IgHV3-23-1	VH CDR2	IX1GX2X3GST	式中, X1=R または S; X2=G または S; および X3=A または G, 好ましくは, 式中, X1=R; X2=G; および X3=A
SEQ ID No: 226 006	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKRIWGPXFDY	式中, X=L または Y, 好ましくは, L
SEQ ID No: 227 059	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	式中, X=R または S, 好ましくは, R
SEQ ID No: 228 059	IgHV1-18-1	VH CDR2	ISAYNGXT	式中, X=K または N, 好ましくは, K
SEQ ID No: 229 059	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARSPLLWFEELYFDY	
SEQ ID No:230 111	IgHV1-69-4	VH CDR1	GGTFSSYX	式中, X=G または A, 好ましくは, G
SEQ ID No: 202 111	IgHV1-69-4	VH CDR2	IIPILGIA	

10

20

30

SEQ ID No: 231 111	IgHV1-69-4	VH CDR3	ARDQEYSSX1X 2X3	式中, X1=NまたはY; X2=Wまたは F; および X3=YまたはD, 好ましくは, 式中, X1=N; X2=W; および X3=Y
SEQ ID No: 232 005-059-060- 106-111-041- 150-067-072- 163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR1	QSVX1SX2Y	式中, X1=SまたはR および X2=S またはT
005-059-060- 106-111-041- 150-067-072- 163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR2	GAS	
SEQ ID No: 233 005-059-060- 106-111-041- 150-067-072- 163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR3	QX1YGX2SX3X 4X5T	式中, X1=QまたはL; X2=Sまたは T; X3=Pまたは無し; X4=P, L, R, または無し; および X5=L, F, I, または 無し; 好ましくは, 式中, X4=P, L, または無し
SEQ ID No: 177 006	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY	
006	IgKV3-11-01	VL CDR2	DAS	
SEQ ID No: 178 006	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRSNWPLT	

【 0 5 2 8 】

実施例11-抗体の精製

培養上清を0.2 μ mデッドエンドフィルターで濾過し、5mLのMabSelect SuReカラム (GE Health Care) にロードし、0.1Mクエン酸ナトリウム-NaOH, pH3を用いて溶出した。すぐに、溶出液を2M Tris-HCl, pH9で中和し、12.6mM NaH₂PO₄、140mM NaCl, pH7.4 (B.Braun) に対して一晚、透析した。または、精製後、溶出液をHiPrep Desaltingカラムにロードし、抗体を12.6mM NaH₂PO₄、140mM NaCl, pH7.4 (B.Braun) 緩衝液に交換した。透析後または緩衝液交換後、試料を0.2 μ mデッドエンドフィルターで滅菌濾過した。純度をSDS-PAGEによって求め、濃度を比濁分析および280nmでの吸光度によって測定した。精製抗体を4で保管した。実施例9に記載のように、ハイブリドーマによって発現された抗体重鎖および軽鎖の分子量を特定するために、質量分析を行った。

【 0 5 2 9 】

実施例12 FACS分析を利用して測定した、膜結合型HER2を発現する腫瘍細胞に対するHER2抗体クローンの結合

AU565細胞 (ATCCで購入、CRL-2351) およびA431細胞 (ATCCで購入、CRL-1555) に対するHER2抗体の結合を、フローサイトメトリーを用いて試験した (FACS Canto II, BD Biosciences)。Qifi分析 (Dako, Glostrup, Denmark) により、AU565細胞が細胞当たり平均1,000,000コピーのHER2タンパク質を発現し、一方、A431細胞は細胞当たり平均15,000コピーを発現したことが判明した。HER2抗体の結合は、フィコエリトリン (PE) 結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Jackson) を用いて検出した。トラスツズマブ (臨床グレードのハーセプチン (登録商標)) を陽性対照として用い、アイソタイプ対照抗体を陰性対照抗体として用いた。EC₅₀値は、非線形回帰 (傾きが変化するS字形用量反応) を利用して、GraphPad Prism V4.03ソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて決定した。

【 0 5 3 0 】

被験HER2抗体はすべて、AU565細胞およびA431細胞のいずれで発現されたHER2とも用量依存的な様式で結合した。クロスブロック群1、2および3の抗体の場合、結合に関するEC₅₀値は、AU565細胞については0.336 ~ 2.290 μ g / mL、A431細胞については0.068 ~ 1.135 μ g / mLの幅があった (図3A ~ D)。クロスブロック群4の抗体の場合、結合に関するEC₅₀値は、AU565細胞については0.304 ~ 2.678 μ g / mL、A431細胞については0.106 ~ 1.982 μ g / mLの幅があった (図3EおよびF)。特にA431細胞に関しては、試験した抗体の間でEC₅₀値の大きな違いが観察された。しかし、抗体098はいずれの種類の細胞においてもEC₅₀値が最も優れていた (すなわち、最も低かった)。また、AU565細胞およびA431細胞のいずれで

10

20

30

40

50

も、異なる抗体間では最大結合レベルのある程度の違いが観察された。試験したクロスブロック群1~3の抗体の中では、AU565細胞での最大結合レベルは抗体098がやはり最も高かったが、一方、A431細胞での最大結合レベルは抗体025が最も高かった。クロスブロック群4の抗体に関しては、抗体005および006が、他のHER2抗体と比較してA431での最大結合レベルがより高いことが明らかに示された。

【0531】

実施例13-FACS分析によって測定された、HER2抗体と、アカゲザル上皮細胞上に発現している膜結合型HER2との結合

アカゲザルHER2との交差反応性を確かめるために、フローサイトメトリー（FACS Canto II, BD Biosciences）を用いて、HER2抗体とHER2陽性アカゲザル上皮細胞（4MBr-5、ATC Cで購入）との結合を試験した。フィコエリトリン結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson）を二次結合体として使用した。アイソタイプ対照抗体を負の対照抗体として使用した。

【0532】

試験した全てのHER2抗体がアカゲザルHER2と交差反応した（図4AおよびB）。どちらの試験濃度（1 µg/mLおよび10 µg/mL）でもHER2抗体はアカゲザルHER2に特異的に結合することができた。抗体127は、1 µg/mL濃度では弱い結合を示したが、10 µg/mL濃度では良好な結合を示した。抗体098は、両方の抗体濃度で結合レベルが最大であった。アイソタイプ対照抗体を用いた場合、結合は観察されなかった。

【0533】

実施例14-サンドイッチELISAにおいて測定された、可溶性HER2ECDHisとの結合におけるHER2抗体の競合

最適な試験HER2抗体コーティング濃度および最適なHER2ECDHis濃度を以下のように求めた。ELISAウェルを、PBSで連続希釈したHER2 HuMab（2倍希釈で0.125~8 µg/mL）で4で一晩コーティングした。次に、ELISAウェルをPBST（0.05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands]を添加したPBS）で洗浄し、PBSTC（2% [v/v] ニワトリ血清 [Gibco, Paisley, Scotland]を添加したPBST）で室温（RT）で1時間ブロックした。次いで、ELISAウェルをPBSTで洗浄し、PBSTCで連続希釈したHER2ECDHis（2倍希釈で0.25~2 µg/mL）とRTで1時間インキュベートした。結合しなかったHER2ECDHisをPBSTで洗い流し、結合したHER2ECDHisを、0.25 µg/mL ビオチン化ウサギ抗6xhis-biot（Abcam, Cambridge, UK）とRTで1時間インキュベートした。その後、プレートをPBSTで洗浄し、PBSTで希釈した0.1 µg/mL ストレプトアビジン-ポリ-HRP（Sanquin, Amsterdam, The Netherlands）と1時間インキュベートした。洗浄後、光から保護しながら、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)（ABTS：1個のABTS錠剤を50mL ABTS緩衝液（Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands）で希釈した）とRTで15分間インキュベートすることによって、反応を視覚化した。等量のシュウ酸（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）を添加することによって発色を止めた。405nmでの蛍光をマイクロタイタープレートリーダー（Biotek Instruments, Winooski, USA）によって測定した。それぞれの抗体の最適以下の結合をもたらした抗体濃度を求め、以下のクロスブロック実験に使用した。

【0534】

各HER2抗体を、上記の通りに決定した準最適用量でELISAウェルにコーティングした。ELISAウェルのブロッキングの後に、ウェルを、過剰な第2の（競合用）HER2抗体の存在下または非存在下で、1 µg/mLという所定濃度のビオチン化HER2ECDHisとともにインキュベートした。続いてELISAを、上記の通りに行った。コーティングされた抗体に対するHER2ECDHisの残留結合を、競合用抗体の非存在下で観察された結合に対する相対的なパーセンテージとして表した。続いて、競合率を、100から阻害率を差し引いたものとして求めた。75%の競合は完全なクロスブロックと見なし、一方、25~74%の競合は部分的ブロックと見なし、0~24%の競合はブロックなしと見なしした。

【0535】

クロスブロック群1、2および3：

表5Aに示されているように、これらの群のHER2抗体はすべて、HER2ECDHisに対する結合

に関して、少なくとも部分的には競合することが見いだされた。抗体を3つの主なクロスブロック群に分けた後に、すべての抗体を、各群の少なくとも1つの代表的な抗体との競合に関して試験した。

【0536】

第1の群はトラスツズマブならびに抗体169、050および084で構成され、これらはHER2ECDHisに対する結合をめぐって互いにブロックしたが、他の群の抗体はクロスブロックしなかった。

【0537】

第2の群はペルツズマブならびに抗体025、091および129で構成され、これらはHER2ECDHisに対する結合をめぐって互いにブロックしたが、ただし抗体129および091は、いずれもペルツズマブおよび025をクロスブロックしたものの、互いに対してはそうでなかった。第2群の抗体はいずれも、他の群の抗体をブロックしなかった。

【0538】

第3の群は抗体C1、F5、127、098、132、153および159で構成され、これらは他の群のいかなる抗体もクロスブロックしなかった。この第3群の中では、ある程度の差異が観察された。抗体127は、HER2ECDHisに対する結合をめぐって、この群の中の他のすべての抗体をクロスブロックすることができた唯一の抗体であった；抗体159は、132を除き、この群の中の他のすべての抗体をクロスブロックした；クローン098は、132および153を除き、第3群のすべての抗体をクロスブロックした；抗体153は、HER2ECDHisに対する結合をめぐって127、132および159をクロスブロックしたが、098、C1またはF5はクロスブロックしなかった；クローン132は127、132および153をクロスブロックした。競合用抗体として加えた場合に、互いにクロスブロックを明らかに示したのはF5およびC1のみであった。しかし、逆の反応により、抗体127、098および159との競合も明らかになったが、153および132についてはそうでなかった。おそらく、これらの違いはHER2ECDHisに対する抗体C1およびF5の親和性がより低いことに起因すると考えられる。

【0539】

100%よりも高い値は、アビディティー効果、および2つの非競合性抗体を含む抗体-HER2ECDHis複合体の形成によって説明することができる。

【0540】

クロスブロック群4：

表5Bに示すように、本群のHER2抗体はすべて、HER2ECDHisに対する結合に関して、それら自体と少なくとも部分的には競合した。トラスツズマブ（臨床グレードのハーセプチン（登録商標））およびペルツズマブ（TH1014-pert、HEK-293細胞において一過性に産生）は、それら自体と競合することのみが可能であり、クロスブロック群4の列記した他のHER2抗体のいずれとも競合することができなかった。C1およびF5（どちらもHEK-293細胞において一過性に産生）は、HER2ECDHisに対する結合に関して互いに競合したが、クロスブロック群4の他のHER2抗体とは競合しなかった。

【0541】

抗体005、006、059、060、106および111はすべて、HER2ECDHisに対する結合に関して互いに競合したが、トラスツズマブ、ペルツズマブ、C1またはF5のいずれともクロスブロックは行わなかった。クローン005、059、060および106は、006が競合用抗体である場合にのみ006をブロックした。006を固定化した逆反応では、005、059、060または106によるブロックは全く見られなかった。これは、クローン006の見かけの親和性が、005、059、060、106および111と比較して、より高い結果である可能性がある。100%よりも高い値は、結合活性効果、および2つの非ブロッキング抗体を含む抗体-HER2ECDHis複合体の形成によって説明することができる。

【0542】

（表5）HER2ECDHisに対する結合に関するHER2抗体の競合およびクロスブロック

5A:

固定化された mAb ↓	競合 mAb →														
	tras	169	050	084	pert	025	091	129	C1	F5	127	159	098	153	132
トラスツズマブ	6	15	6	51	100	107	100	85	103	99	115	90	101	101	101
TH1014-169	19	45	21	73	101	98	105	106	ND	ND	ND	ND	105	102	ND
TH1014-050	13	30	12	74	95	104	98	110	ND	ND	ND	ND	102	104	ND
TH1014-084	74	73	76	20	101	106	104	104	ND	ND	ND	ND	109	98	ND
TH1014-pert	104	100	94	95	9	20	19	39	106	125	116	81	103	100	109
TH1014-025	98	98	100	104	8	18	21	15	ND	ND	ND	ND	102	99	ND
TH1014-091	99	99	95	100	5	13	15	78	ND	ND	ND	ND	98	98	ND
TH1014-129	93	99	97	92	22	55	76	12	ND	ND	ND	ND	106	98	ND
TH1014-C1	89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65	58	73	53	58	77	90
TH1014-F5	197	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70	21	62	15	16	80	125
TH1014-127	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	112	88	11	8	58	21	44
TH1014-159	111	ND	ND	ND	112	ND	ND	ND	96	86	15	6	11	40	79
TH1014-098	107	102	100	103	104	108	104	107	125	96	21	9	17	110	142
TH1014-153	134	111	103	107	121	97	102	106	257	96	27	23	115	28	33
TH1014-132	353	ND	ND	ND	288	ND	ND	ND	422	379	30	131	309	41	32
クロスブロック群	1	1	1	1	2	2	2	2b	3a	3a	3a	3a	3a	3b	3b

10

20

5B:

固定化された mAb ↓	競合 mAb: →									
	Tras	Pert	C1	F5	106	111	005	006	059	060
トラスツズマブ	6	100	103	99	114	166	137	110	120	119
TH1014-pert	104	9	106	125	115	145	151	125	132	118
TH1014-C1	89	85	65	58	84	86	98	99	89	93
TH1014-F5	197	178	70	21	129	183	178	192	165	185
PC1014-106	323	275	471	495	26	21	25	25	25	23
PC1014-111	110	102	122	119	75	14	51	10	65	36
PC1014-005	126	115	157	227	54	32	18	15	22	12
PC1014-006	163	136	136	153	127	47	148	20	129	125
PC1014-059	117	107	78	128	23	12	13	11	12	11
PC1014-060	106	99	108	126	37	35	30	6	14	19
クロスブロック群	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4

30

75 - >100% 競合

40

25 - 74% 競合

0 - 24% 競合

【 0 5 4 3 】

示した値は、2回の独立した実験の、競合用抗体の非存在下で観察された結合に対する相対的な結合の平均割合である。HEKにより産生されたTH1014-C1およびTH1014-F5を用いる競合実験は1回行った。トラスツズマブ（臨床グレードのハーセプチン（登録商標））およびHEKにより産生されたペルツズマブ（TH1014-pert）についても試験した。

【 0 5 4 4 】

実施例15-HER2抗体の抗体依存性細胞傷害（ADCC）

50

SK-BR-3細胞（ATCCで購入、HTB-30）を収集し（ 5×10^6 個の細胞）、洗浄し（PBSで1500rpm、5分間、2回）、10% コスミック（cosmic）仔ウシ血清（CCS）（HyClone, Logan, UT, USA）を添加したRPMI1640培地1mLに収集した。これに、 $200 \mu\text{Ci}^{51}\text{Cr}$ （クロム-51；Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands）を添加した。振盪している水浴中で、混合物を37℃で1.5時間インキュベートした。細胞を（PBSで1500rpm、5分間、2回）洗浄した後に、10% CCSを添加したRPMI1640培地に再懸濁し、トリパンブルー排除によって計数し、 1×10^5 細胞/mLの濃度まで希釈した。

【0545】

その間、末梢血単核球（PBMC）を、標準的なFicoll密度遠心分離を用いて製造業者の説明書（リンパ球分離培地；Lonza, Verviers, France）に従って、新鮮なバフィーコート（Sanquin, Amsterdam, The Netherlands）から単離した。細胞を、10% CCSを添加したRPMI1640培地に再懸濁した後に、トリパンブルー排除によって計数し、 1×10^7 細胞/mLまで濃縮した。

【0546】

トラスツズマブはCHO細胞で産生され、その結果、12.4%という（高い）非コアフコシル化グレードをもたらしたが、一方、他のHER2抗体はHEK細胞で産生され、その結果、平均4%という非コアフコシル化をもたらした。

【0547】

ADCC実験のために、96ウェルマイクロタイタープレートの中で、 $50 \mu\text{L}$ の ^{51}Cr 標識SK-BR-3細胞（5,000個の細胞）を、総体積 $100 \mu\text{L}$ の10% CCS添加RPMI培地に溶解した $15 \mu\text{g/mL}$ H ER2抗体（IgG1, ）とプレインキュベートした。RTで15分後に、 $50 \mu\text{L}$ のPBMC（500,000個の細胞）を添加して、100:1のエフェクター:標的比にした。細胞溶解の最大量は、 $50 \mu\text{L}$ の ^{51}Cr 標識SK-BR-3細胞（5,000個の細胞）を $100 \mu\text{L}$ の5% Triton-X100とインキュベートすることによって確かめられた。自然溶解量は、抗体またはエフェクター細胞を含まない $150 \mu\text{L}$ の培地中で5,000個の ^{51}Cr 標識SK-BR-3細胞をインキュベートすることによって確かめられた。抗体非依存性細胞溶解のレベルは、抗体を使用せずに5000個のSK-BR-3細胞を500,000個のPBMCとインキュベートすることによって確かめられた。その後細胞を、37℃、5% CO_2 で4時間インキュベートした。細胞溶解量を確かめるために、細胞を遠心分離（1200rpm、3分）し、 $75 \mu\text{L}$ の上清をマイクロニックチューブ（micronic tube）に移し、この後に、放出された ^{51}Cr を、ガンマカウンターを用いてカウントした。測定されたカウント毎分（cpm）を用いて、以下のように抗体性溶解のパーセントを計算した：

$$(\text{cpm試料} - \text{cpm Ab非依存性溶解}) / (\text{cpm最大溶解} - \text{cpm自然溶解}) \times 100\%$$

【0548】

クロスブロック群1および2のHER2抗体は、ADCCを介したSK-BR-3細胞の有効な溶解を誘導した（図5A）。第3群では、有効なADCCを誘導したのは抗体153が唯一の抗体であり、抗体132は約10%のADCCを誘導し、クローン098、159および127はADCCを誘導しなかった。クロスブロック群4のHER2抗体はすべて、ADCCを介したSK-BR-3細胞の有効な溶解を誘導した（図5B）。クロスブロック群4の種々の抗体による平均溶解率には15%～28%の幅があり、平均41%の溶解を示したトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））とは対照的であった。理論に拘束されるものではないが、トラスツズマブによるより高い溶解率は、HEKにより産生された他のHER2抗体上のほぼ4%の非コア（non-core）フコシル化と比較して、そのCHO産生に起因する非コアフコシル化グレードの増大（12.4%）が原因で、またはHER2受容体-抗体複合体の、より少ない内部移行を誘導するエピトープを認識することによって、起こった可能性がある。

【0549】

実施例16-HER2抗体による、AU565細胞のリガンド非依存性増殖の阻害

HER2抗体がインビトロでAU565細胞の増殖を阻害する能力を試験した。AU565細胞上でのHER2発現レベルが高いために（実施例12に記載のように細胞1個あたり約1,000,000コピー）、これらの細胞においてHER2は常時活性型であり、従って、リガンド誘導性ヘテロ二量体化に依存しない。

10

20

30

40

50

【 0 5 5 0 】

96ウェル組織培養プレート (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) の中に、1ウェルにつき9000個のAU565細胞を、無血清細胞培地に溶解した10 µg/mL HER2抗体の存在下で播種した。対照として、細胞を、抗体を含まない無血清培地に播種した。3日後に、Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) を用いて製造業者の説明書に従って、生細胞量を定量した。EnVision 2101 Multilabelリーダー (PerkinElmer, Turku, Finland) と標準的なAlamarblue設定を用いて、蛍光をモニタリングした。抗体処理細胞のAlamarblueシグナルを未処理細胞に対するパーセントでプロットした。統計解析にはダネット検定を適用した。

【 0 5 5 1 】

HER2抗体処理後のAU565細胞の増殖率を、100%に設定した非処理細胞と比較した。HER2抗体処理後のAU565細胞の増殖率を、100%に設定した非処理細胞と比較した。試験した第1群の抗体のうち、トラスツズマブ、050および169はAU565細胞の増殖の有意な阻害を明らかに示したが ($P < 0.05$)、一方、084は全く効果を有さなかった。第2群の被験抗体 (ペルツズマブ、025、092および129) はいずれも、AU565細胞の増殖を阻害することができなかった。第3群の被験抗体 (098および153) は、AU565の増殖を阻害しなかった。対照的に、どちらの抗体もAU565細胞の増殖を非処理細胞と比較して強化した (098の方が153を上回る)。図6参照。トラスツズマブおよびペルツズマブに関しては、これはJuntilla et al. (Cancer Cell 2009;15(5):353-355) によって記載された結果に一致していた。

【 0 5 5 2 】

クロスブロック群4では、TH1014-F5がAU565細胞の増殖を有意に強化し、このことはこれがアゴニスト抗体であることを指し示しており、一方、試験したクロスブロック群4の他の抗体 (005、060およびペルツズマブ) はいずれも、AU565増殖に対して実質的な効果を及ぼさなかった (データは提示せず)。増殖を強化することは、例えば、薬物の細胞傷害作用が細胞増殖に依拠しているか、またはそれによって強化される場合というような、ADC結合体のある種の治療応用においては利点となる可能性がある。

【 0 5 5 3 】

実施例17 リガンドで誘導されるMCF-7細胞の増殖の、HER2抗体による阻害

HER2はオーファン受容体であるため、そのシグナル伝達の主として、EGFRおよびHer3といった、ErbBファミリーの他のメンバーの活性化に依存する。リガンド結合が起こると、これらの2つの受容体はHER2受容体と結合してそれを活性化し、その結果、例えば増殖を引き起こすことができる。さまざまな刊行物が、ヘレグリン-1で誘導される増殖をペルツズマブが有効に阻害することを記載している (Franklin MC. Cancer Cell 2004 / Landgraf R. BCR 2007)。トラスツズマブに関しては、ヘレグリン-1で誘導されるHER2 / HER3ヘテロ二量体化および増殖に対してそれがほとんど影響を及ぼさないことが記載されている (Larsen SS., et al., Breast Cancer Res Treat 2000;58:41-56; Agus DB., et al., Cancer Cell 2002;2:127-137; Wehrman et al. (2006)、前記)。

【 0 5 5 4 】

本ヒトHER2抗体が、ヘレグリン-1で誘導されるHER2 / HER3ヘテロ二量体と干渉する能力を調べるために、ヘレグリン-1で誘導される増殖アッセイを行った。このために、細胞1個当たりおよそ20,000個のHER2分子を発現するMCF7細胞 (ATCCで購入、HTB-22) を、完全細胞培地中にて、96ウェル組織培養プレート (Greiner bio-one) (細胞2,500個 / ウェル) に播種した。4時間後に、細胞培地を、1% Cosmic Calf Serum (CCS) および10 µg / mLのHER2抗体を含む飢餓培地に置き換えた。次に、1% CCSを含む飢餓培地中に希釈したヘレグリン-1 (PeproTech, Princeton Business Park, US) を、ウェルに最終濃度1.5ng / mLで添加した。4日間のインキュベーション後に、生細胞の量を、Alamarblue (BioSource International) を製造元の指示に従って用いて定量した。蛍光は、EnVision 2101 Multilabelリーダー (PerkinElmer) をAlamarblue用の標準的な設定で用いてモニターした。HER2抗体で処理した、リガンドで誘導された細胞のAlamarblueシグナルを、HER2抗体を伴わずにインキュベートした、リガンドで誘導された細胞のシグナルのパーセンテージ

と比較した。統計分析にはDunnett検定を利用した。

【0555】

ヘレグリン- 1で刺激して指定のHER2抗体で処理した生存MCF7細胞のパーセンテージを、HER2抗体の非存在下におけるヘレグリン- 1による刺激後の生細胞に対して相対的に算出した。ヘレグリン- 1および抗体の両方の非存在下ではMCF-7増殖はみられなかった。図7に示されているように、抗体025、091、129、153およびペルツズマブ (TH1014-pert) は、ヘレグリン- 1で誘導されるMCF-7増殖の有意な阻害 ($P < 0.05$) を明らかに示した。トラスツズマブも、ヘレグリン- 1で誘導されるMCF-7細胞の増殖のある程度の阻害を示したが、試験した他のHER2抗体ほどには有効ではなかった。HER2のドメインIVはEGFR / HER2ヘテロ二量体の安定化に参与することが報告されているが、HER2 / HER3ヘテロ二量体に対するその寄与についての詳細は不明である (Wehrman et al., 前記)。抗体050、084、169および098は、ヘレグリン- 1で誘導されるMCF-7細胞の増殖に対して統計的に有意な効果を及ぼさなかった。理論に限定されるわけではないが、このことは、これらの抗体がリガンドで誘導されるHER2 / HER3ヘテロ二量体化を阻害しないことを示唆する。

10

【0556】

実施例18-抗 -ETA' アッセイにより試験したHER2抗体

抗体-薬物結合体アプローチへのHER2抗体の適性を調べるために、指向性シュードモナス属エキソトキシンA (抗 -ETA') を用いた商標登録で保護されていない (generic) インビトロ細胞ベース殺傷アッセイを開発した。このアッセイでは、切断型シュードモナス属エキソトキシンAと結合体化された高親和性抗 ドメイン抗体を使用する。抗 -ETA' ドメイン抗体は内部移行するとタンパク質分解され、ジスルフィド結合が還元されて、触媒ドメインと結合ドメインは分離される。触媒ドメインはKDEL保留モチーフを介してゴルジ体から小胞体に輸送され、その後にサイトゾルに移動される。サイトゾルにおいて触媒ドメインはタンパク質合成を阻害し、アポトーシスを誘導する (参考、Kreitman RJ. Bio Drugs 2009 ; 23 (1) : 1-13)。このアッセイにおいて、内部移行および毒素による死滅を可能にするHER2抗体を特定するために、HER2抗体は抗 -ETA' と先に結合体化された後に、HER2陽性細胞とインキュベートされる。

20

【0557】

最初に、それぞれの細胞株に最適な抗 -ETA' 濃度、すなわち、非特異的細胞死を誘導しない最大投与可能量を求めた。AU565細胞 (7500細胞/ウェル) およびA431細胞 (2500細胞/ウェル) を正常細胞培地が入っている96ウェル組織培養プレート (Greiner bio-one) に播種し、少なくとも4時間、付着させた。次に、細胞を、正常細胞培地で溶解した100 μ g/mL、10 μ g/mL、1 μ g/mL、0.1 μ g/mL、0.01 μ g/mL、0.001 μ g/mL、および0 μ g/mLの抗 -ETA' 希釈液とインキュベートした。3日後に、Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) を用いて製造業者の説明書に従って、生細胞量を定量した。EnVision 2101 Multilabelリーダー (PerkinElmer, Turku, Finland) と標準的なAlamarblue設定を用いて、蛍光をモニタリングした。単独で細胞を死滅させなかった抗 -ETA' 最高濃度を以下の実験に使用した (AU565の場合、0.5 μ g/mL、A431の場合、1 μ g/mL)。

30

【0558】

次に、異なるHER2抗体について、抗体によって媒介された内部移行および毒素による死滅を試験した。細胞を前記のように播種した。HER2抗体の希釈シリーズを所定の濃度の抗 -ETA' と30分間プレインキュベートした後に、細胞に添加した。3日間インキュベートした後に、生細胞量を前記のように定量した。抗 -ETA' 結合抗体で処理された細胞のAlamarblueシグナルを、抗体のみで処理された細胞と比較してプロットした。細胞死滅については正の対照として23.4 μ g/mLのスタウロスポリンを使用した。負の対照としてアイソタイプ対照抗体を使用した。

40

【0559】

クロスブロック群1、2および3:

図8A、Bおよび表6Aに示されているように、抗 -ETA' 結合HER2抗体はすべて、AU565細胞を用量依存的な様式で死滅させることができた。試験した抗 -ETA' 結合HER2抗体はす

50

べて、抗 -ETA' 結合トラスツズマブ (31.9%) および抗 -ETA' 結合ペルツズマブ (TH10 14-pert) (47.51%) のいずれと比較してもAU565細胞のより優れた死滅 (70.3 ~ 49.9%) を明らかに示し、 EC_{50} 値が向上した (12.12 ~ 46.49ng / mL、これに対して抗 -ETA' 結合トラスツズマブでは78.49ng / mL、抗 -ETA' 結合ペルツズマブでは117.8ng / mL)。抗体159は細胞死滅率が最も高く、098は EC_{50} が最も低かった。

【0560】

図8C、Dおよび表7Aに示されているように、抗体025、091、098、129および153は、A431細胞の効果的な死滅 (75%以上) を誘導することができた。最も高い細胞死滅率および最も低い EC_{50} は抗体098によって示された。抗 -ETA' と結合体化された場合に、トラスツズマブおよびアイソタイプ対照抗体はA431細胞の死滅を誘導しなかった。抗体169、084およびペルツズマブは約50%以下のパーセンテージで細胞死滅を誘導した。非結合体化HER2抗体では細胞死滅は観察されなかった。

10

【0561】

クロスブロック群4:

表6Bに示されているように、クロスブロック群4の抗 -ETA' 結合HER2抗体はすべて、AU 565細胞を用量依存的な様式で死滅させることができた (50 ~ 72%の細胞死滅)。抗体005および111は、トラスツズマブ (78.49ng / mL) と比較して、 EC_{50} 値 (それぞれ15.13ng / mLおよび24.20ng / mL) を3倍を超えて向上させることが明らかに示された。クロスブロック群4の非結合体化HER2抗体は、試験した濃度ではAU565細胞の死滅を誘導しなかった。

【0562】

20

表7Bに示されているように、抗体005および060は、抗 -ETA' と結合体化させた場合にA 431細胞の効果的な死滅 (85%以上) を誘導することができた。抗体005および111は、低い抗体濃度 (10ng / mL) で既にA431細胞を死滅させることが明らかに示され、 EC_{50} 値はおよそ10ng / mLであった。クロスブロック群4の非結合体化HER2抗体では細胞死滅は観察されなかった。

【0563】

(表6) 示されているデータは、1つの代表的な実験で測定した、抗 -ETA' 結合HER2抗体で処理したAU565細胞の EC_{50} 値および最大細胞死滅率である (A、クロスブロック群1、2および3; B、クロスブロック群4)。スタウロスポリンによって誘導された細胞死滅を100%に設定し、非処理細胞のMFIを0%に設定した。Ndet = 検出されず。

30

A:

抗体	細胞死滅率	EC50 ng/mL
PC1014-159	70.3	34.93
PC1014-127	69.0	34.46
PC1014-132	61.6	39.35
PC1014-129	60.8	30.85
PC1014-153	60.3	32.26
PC1014-025	60.0	16.71
PC1014-098	58.7	12.12
PC1014-084	58.1	26.97
PC1014-050	52.4	12.71
PC1014-091	50.6	46.49
PC1014-169	49.9	35.62
TH1014-pert	47.5	117.8
トラスツズマブ	31.9	78.49
アイソタイプ対照	Ndet	Ndet

10

B:

抗体	細胞死滅率	EC50 ng/mL
PC1014-111	72.0	24.2
PC1014-005	69.7	15.13
PC1014-059	67.0	67.65
PC1014-060	64.3	79.38
PC1014-106	59.1	107.9
PC1014-006	50.4	45.14
トラスツズマブ	31.9	78.49
アイソタイプ対照	Ndet	Ndet

20

【 0 5 6 4 】

(表7) 示されているデータは、1つの代表的な実験で測定した、抗-ETA'結合HER2抗体で処理したA431細胞のEC₅₀値および最大細胞死滅率である(A、クロスブロック群1、2および3; B、クロスブロック群4)。スタウロスポリンによって誘導された細胞死滅を100%に設定し、非処理細胞のMFIを0%に設定した。「Ndet」は、検出されなかったことを意味する。

30

A:

抗体	細胞死滅率	EC50 ng/mL
PC1014-025	86.7	約9.77
PC1014-084	50.5	ND
PC1014-091	83.3	約9.86
PC1014-098	87.2	1.65
PC1014-129	75.9	約10.60
PC1014-153	82.4	約10.11
PC1014-169	34.0	ND
TH1014-pert	37.0	61.58
トラスツズマブ	Ndet	Ndet
アイソタイプ対照	NDet	NDet

40

B:

抗体	細胞死滅率	EC50 ng/mL
PC1014-005	88.5	約 10.07
PC1014-060	85.0	約 10.03
トラスツズマブ	NDet	NDet
アイソタイプ対照	NDet	NDet

50

【0565】

実施例19 FMATに基づくfab-CypHer5Eアッセイを用いて測定したHER2抗体の内部移行

前の実施例で記載した「毒素-ETA'アッセイにおける、トラスツズマブ（ハーセプチン）およびベルツズマブと比較したHER2抗体によるAU565細胞の死滅の強化が、HER2抗体の内部移行の強化と相関するか否かを調べるために、fab-CypHer5Eに基づく内部移行アッセイを行った。CypHer5Eは、塩基性pH（細胞外：培地）では非蛍光性であって酸性pH（細胞内：リソソーム）では蛍光性であるpH感受性色素であり、酸解離定数（pKa）は7.3である。

【0566】

AU565細胞を、240ng/mLのfab-CypHer5E（ヤギfab-抗ヒトIgG [Jackson] とCypHer5E [GE Healthcare, Eindhoven, The Netherlands] との結合体化を製造元の指示に従って行った）を加えた通常の細胞培地中にて、384ウェル組織培養プレート（Greiner bio-one）に細胞3,000個/ウェルの密度で播種した。次に、HER2抗体を通常の細胞培地中に系列希釈した上で細胞に添加し、室温で9時間そのまま置いた。細胞内CypHer5Eの平均蛍光強度（MFI）を8200 FMAT（Applied Biosystems, Nieuwerkerk A/D IJssel, The Netherlands）を用いて測定し、「カウント数×蛍光」を読み取り値として用いた。アイソタイプ対照抗体を陰性対照抗体として用いた。EC₅₀値および最大MFIは、非線形回帰（傾きを変化させたS字状用量反応）を利用して、GraphPad Prism V4.03ソフトウェア（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて決定した。

【0567】

クロスブロック群1、2および3：

結果は表8Aに示されており、これは、AU565細胞を用いたCypHer5E内部移行アッセイにおいて試験したクロスブロック群1、2および3のHER2抗体すべてに関するEC₅₀値および最大MFI値を示している。最大MFI値は、抗体結合が起こるとどの程度の数のHER2受容体が内部移行を受けるかを指し示している。HER2抗体はすべて、トラスツズマブ（35,000）およびベルツズマブ（TH1014-pert）（32,366）と比較してより高い最大MFI値（137,904～38,801）を示し、このことは試験したHER2抗体が受容体内部移行の強化を誘導したことを指し示している。注目されることに、HER2結合をめぐってトラスツズマブまたはTH1014-pertと競合しなかった抗体は、トラスツズマブおよびTH1014-pertと競合した抗体と比較して、受容体内部移行をより誘導し、最も高いMFIは抗体098および127によって達成された。理論に限定されるわけではないが、このことは、HER2ヘテロ二量体化を阻害する能力がないことに固有なものである可能性がある。

【0568】

クロスブロック群4：

結果は表8Bに示されており、これはAU565細胞を用いたCypHer5E内部移行アッセイにおける試験したクロスブロック群4のHER2抗体すべてに関するEC₅₀値および最大MFIを示している。最大MFI値は、結合に際してどの程度の数のHER2抗体が内部移行を受けたかを反映している。試験したクロスブロック群4のヒトHER2抗体はすべて、トラスツズマブ（35,000）およびTH1014-pert（35,323）よりも高い最大MFI値（130,529～57,428）を示し、このことはこれらの抗体が強化された受容体内部移行を誘導したことを示している。TH1014-F5の強化された内部移行は、そのアゴニスト活性およびHER2-HER2二量体化の誘導の結果である可能性がある（実施例16参照）。

【0569】

（表8）HER2抗体のCypher-5に基づく内部移行アッセイ。示したデータは、fab-CypHer5E標識HER2抗体で処理したAU565細胞を用いた2回の実験のうちの1つの代表的な実験のMFIおよびEC₅₀値である。いくつかのEC₅₀値は計算できなかった（ND）

A:

Cypher 5			
抗体	EC ₅₀ ng/mL	最大MFI	
PC1014-025	30.05	63428	ハーセプチンと競合するmAb
PC1014-091	32.99	50711	
PC1014-129	7.15	60302	
TH1014-pert	530	32366	TH1014-pertと競合するmAb
PC1014-169	ND	38801	
PC1014-084	30.51	71059	TH1014-F5と競合するmAb
トラスツズマブ	21.70	35000	
PC1014-098	13.77	134575	
PC1014-127	約9.68	137904	非競合性mAb
PC1014-159	ND	92427	
TH1014-F5	22.65	113116	
PC1014-132	11.42	112270	
PC1014-153	約14.91	87531	

10

20

B:

Cypher 5		
抗体	EC ₅₀ ng/mL	最大MFI
PC1014-006	23.08	130829
PC1014-005	21.37	95117
PC1014-111	35.22	81680
PC1014-059	14.77	77123
PC1014-060	36.16	68184
PC1014-106	68.60	57428
TH1014-F5	22.65	113116
TH1014-pert	約1041	35323
トラスツズマブ	21.70	35000

30

【 0 5 7 0 】

実施例20：2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性HER2 x HER2抗体の作製

二重特異性HER2 x HER2抗体（実施例21～24、30～33で使用）は、この実施例でさらに説明するような二重特異性抗体の作製の工程においてヘテロ二量体化が可能になるように、そのFc領域が改変されたIgG1、抗体（K409Rまたは以下でITLと称するT350I / K370T / F405Lのいずれか）から得た。以下のFc改変IgG1、抗体を用いた：IgG1-HER2-005-ITL、IgG1-HER2-025-ITL、IgG1-HER2-153-ITL、IgG1-HER2-005-K409R、IgG1-HER2-153-K409R、IgG1-HER2-169-K409R。また、IgG1-HER2-153-N297Q-K409Rも用いた。N297Q突然変異は、抗体のFcドメインを不活性にする。不活性なFcドメインは、抗体が、例えば単球上に存在するFc受容体と相互作用するのを防止する。

40

【 0 5 7 1 】

HER2抗体005、025、153および169の重鎖および軽鎖可変領域の配列は実施例10に記載されている。

50

【 0 5 7 2 】

種々のFc変種について、以下の重鎖定常ドメイン配列を用いた（抗体配列は、IMGT（Le franc MP. et al., Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999およびBrochet X. Nucl . Acids Res. 36, W503-508 (2008)）に従って定義した）。

IgG1 Fc 領域 - WT (SEQ ID NO:234)

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

IgG1 Fc 領域 - ITL (SEQ D NO:244)

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYILPPSREEMTKNQVSLTCLVIGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

IgG1 Fc 領域 - K409R (SEQ ID NO:245)

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRILTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1 Fc 領域 - K409R N297Q (SEQ ID NO:241)

30

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRILTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 5 7 3 】

HIV gp120特異的陰性対照抗体b12について、以下の重鎖および軽鎖可変領域配列（Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23.によって記載された配列）を用いた。

VH b12 (SEQ ID NO:246)

40

>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWVRQAPGQRFQFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQ
DRVFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTIVIVSS

VL b12 (SEQ ID NO:247)

>EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHISRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGS
GTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK

【 0 5 7 4 】

陰性対照抗体IgG1-KLHについて、以下の重鎖および軽鎖可変領域配列を用いた

VH KLH (SEQ ID NO:248)

>QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIGRFDGSNKYYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGPHRIAAAGNFDYWGGQGLTVTVSSAS

VL KLH (SEQ ID NO:249)

>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASHRATGIPARFSGSGSGT
DFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPWTFGGQGTKVEIK

【 0 5 7 5 】

CD16特異的陰性対照抗体IgG1-3G8-QITLについて、以下の配列を用いた。

10

VH 3G8 (SEQ ID NO:250)

>QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLRTSGMGVGVIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKRYNPALK
SRLTISKDTSSNQVFLKIASVDTADTATYYCAQINPAWFAYWGQGLTVTVSA

VL 3G8 (SEQ ID NO:251)

>DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSEFMNWWYQQKPGQPPKLLIYTTSNLESGIPARFSA
SGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEL K

IgG1 Fc 領域 - QITL (SEQ ID NO:252)

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYILPPSREEMTKNQVSLTCLVIGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【 0 5 7 6 】

対照抗体トラスツズマブ（ハーセプチン）について、以下の配列（例えば、米国特許第7,632,924号に記載された配列）を用いた。

VH ハーセプチン (SEQ ID NO:253)

>MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV
ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTV
TVSS

30

VL ハーセプチン (SEQ ID NO:254)

>MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP
KLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

【 0 5 7 7 】

単一特異性親抗体は、該当する重鎖および軽鎖発現ベクターを、293fectin (Invitrogen) を製造元の指示に従って用いて、HEK-293F細胞 (Invitrogen) において一過的にコト
ランスフェクションを行うことによって、無血清条件下で産生させた。IgG1抗体は、プロ
テインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。細胞培養上清を0.20 μMの
デッドエンド・フィルター上で濾過し、引き続いて5mLのプロテインAカラム (rProtein A
FF, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) へのローディングおよび0.1Mクエン酸-NaOH, pH
3によるIgGの溶出を行った。溶出液を2M Tris-HCl, pH 9で直ちに中和し、12.6mMリン酸
ナトリウム、140mM NaCl、pH 7.4 (B. Braun, Oss, The Netherlands) に対して一晚透析
した。透析後、試料を0.20 μMのデッドエンド・フィルター上で滅菌濾過した。精製され
たIgGの濃度を比濁法および280nmでの吸光度によって決定した。精製タンパク質をSDS-PA
GE、IEF、質量分析および糖分析によって分析した。

40

【 0 5 7 8 】

50

安定な二重特異性IgG1抗体は、WO 2008119353号 (Genmab) およびNeut-Kolfschoten et al. (Science. 2007 Sep 14;317(5844):1554-7) に記載されたようなIgG4 Fabアーム交換の自然な工程に基づく方法を用いて、インビトロで作製した。二重特異性IgG1抗体を作製するためのこの新規方法の基盤は、相補的CH3ドメインを用いて、特定のアッセイ条件下でのヘテロ二量体の形成を促進することである (WO 2011131746号)。相補的CH3ドメインは、以下の手順に従って、二重特異性抗体の生産のために組み合わせる2つの「親」単一特異性IgG1分子の第1のものにT350I-K370T-F405Lまたは代替的にF405Lを、第2のものにK409Rを導入することによって入手した。第1の段階では、2つの親抗体の1:1混合物を穏やかな還元条件下でインキュベートした。すなわち、抗体混合物を、PBS中25mMの2-メルカプトエチルアミン-HCl (2-MEA) 100 μ L中にて37 °Cで90分間インキュベートした (各親抗体の最終濃度0.5mg/mL)。ホモ二量体の特別な設計により、この還元段階の間に還元産物は二重特異性ヘテロ二量体と自然に組換えを行う。次に、Zeba脱塩スピンプレート (7K, Thermo Fisher Scientific) を製造元のプロトコールに従って用いることによって還元剤2-MEAを除去することにより、還元反応を停止させた。二重特異性試料の濃度は、Nanodrop ND-1000分光光度計 (Isogen Life Science, Maarssen, The Netherlands) を用いて280nmの吸光度を測定することによって決定した。

【0579】

実施例21 インビトロでの を標的とするETA'死滅アッセイで試験したHER2 x HER2二重特異性抗体

この実施例では、HER2 x HER2二重特異性抗体が内部移行後に腫瘍細胞内に細胞傷害作用性薬剤を送達しうることを、 を標的とするシュドモナス-エキソトキシンA (抗-ETA') を用いる実施例18に記載したような汎用的なインビトロでの細胞に基づく死滅アッセイにおいて示す。このアッセイは、短縮型のシュドモナス-エキソトキシンAと結合体化された高い親和性の抗 ドメイン抗体を利用する。抗体結合タンパク質 (連鎖球菌プロテインAまたはタンパク質G由来のIgG結合モチーフ) とジフテリア毒素またはシュドモナスエキソトキシンAとの類似の融合タンパク質が既に用いられている (Mazor Y. et al., J. Immunol. Methods 2007;321:41-59); Kuo SR. et al., 2009 Bioconjugate Chem. 2009;20:1975-1982)。これらの分子は抗-ETA'とは対照的に、完全抗体のFc部分と結合した。内部移行およびエンドサイトーシス選別を受けると、抗-ETA'ドメイン抗体はタンパク質分解およびジスルフィド結合の還元を受けて、触媒ドメインが結合ドメインから分離する。続いて触媒ドメインはKDEL保持モチーフによってゴルジから小胞体に輸送され、その後、サイトゾルに移行し、そこでタンパク質合成を阻害してアポトーシスを誘導する (Kreitman RJ. et al., BioDrugs 2009; 23:1-13)。二重特異性抗体は実施例20に記載した手順に従って生成させた。HER2 x HER2二重特異性抗体を抗-ETA'とともにプレインキュベートし、その後にA431細胞とのインキュベーションを行った。A431細胞は細胞1個あたりおよそ15,000個のHER2分子を発現し (Qifi分析により決定)、「裸の」HER2抗体による処理に対する感受性がない。

【0580】

アッセイは実施例18に記載した通りに行った。

【0581】

まず、各細胞株について抗-ETA'の最適濃度、すなわち、非特異的な細胞死の誘導をもたらさない最大耐用量を決定した。A431細胞 (細胞2500個/ウェル) を96ウェル組織培養プレート (Greiner bio-one) 中の通常の細胞培地に播種し、少なくとも4時間かけて接着させた。これらの細胞を、通常の細胞培地中での抗-ETA'の希釈系列100、10、1、0.1、0.01、0.001および0 μ g/mLとともにインキュベートした。3日後に、Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) を製造元の使用説明書に従って用いて、生細胞の量を定量した。蛍光は、EnVision 2101 Multilabelリーダー (PerkinElmer, Turku, Finland) をAlamarblue用の標準的な設定で用いてモニターした。細胞をそれ自体では死滅させなかった抗-ETA'の最大濃度 (A431細胞の場合には1 μ g/mL) を、以下の実験に用いた。

【 0 5 8 2 】

次に、抗 -ETA'とともにブレインキュベートしたHER2 x HER2二重特異性抗体およびHER2単一特異性抗体の効果を、細胞死滅を誘導するその能力に関して試験した。A431細胞を上記のように播種した。HER2特異的抗体（単一特異性抗体および二重特異性抗体）の希釈系列を作り、所定濃度の抗 -ETA'とともに30分間ブレインキュベートした後に、それらを細胞に加えた。37 °Cでの3日間のインキュベーションの後に、生細胞の量を上記の通りに定量化した。抗体とともにブレインキュベートした抗 -ETA'で処理した細胞のAlamarBlueシグナルを、抗体処理を行わずに処理した細胞と比較してプロットした。EC₅₀値および最大の細胞死は、GraphPad Prism 5ソフトウェアを用いて計算した。スタウロスポリン（23.4 μg/mL）を細胞死滅に関する陽性対照として用いた。アイソタイプ対照抗体（IgG 1 / ；IgG1-3G8-QITL）を陰性対照として用いた。

10

【 0 5 8 3 】

図9および表9は、抗 -ETA'とブレインキュベートしたHER2二重特異性抗体がすべて、A431細胞を用量依存的に死滅させることができたことを示している。これらの結果は、試験したHER2二重特異性抗体が、この抗 -ETA'アッセイにおける組み合わせの中に存在した親単一特異性抗体のうち最も有効な1つと同等に有効であったことを明らかに示している。加えて、二重特異性抗体005 x 169、025 x 169および153 x 169の有効性からは、このインビトロでのETA'死滅アッセイにおいて活性を欠く単一特異性抗体、すなわちHER2特異的抗体（169）の有効性を、別のHER2特異的抗体との二重特異的組み合わせを介して高められることも示された。

20

【 0 5 8 4 】

（表9）抗 -ETA'結合HER2 x HER2二重特異性抗体で処理したAU565細胞のEC₅₀値および最大細胞死滅率。「Ndet」は検出されなかったことを意味する。

抗体	死滅率	EC50 [ng/mL]
ハーセプチン	2.79	Ndet
IgG1-005-ITL	79.34	2.57
IgG1-005-K409R	79.83	2.87
IgG1-025-ITL	69.81	3.76
IgG1-153-ITL	70.66	12.45
IgG1-153-K409R	72.84	15.47
IgG1-169-K409R	16.45	3.45
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	59.94	4.28
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	63.45	4.27
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	80.82	7.66
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	45.88	7.97
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	80.05	4.51
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	84.68	29.14

30

【 0 5 8 5 】

実施例22 異なるHER2エピトープを標的とする二重特異性抗体とのインキュベーションによるHER2受容体のダウンモジュレーション

HER2 x HER2二重特異性抗体は、空間的に異なる2つのHER2受容体上の2種類の異なるエピトープと結合することができる。これにより、他のHER2 x HER2二重特異性抗体がこれらの受容体上の残りのエピトープと結合することが可能になる。これは多価受容体架橋（単一特異性抗体によって誘導される二量体化と比較して）を引き起こして、その結果、受容体ダウンモジュレーションを強化しうる可能性がある。HER2 x HER2二重特異性抗体がHER2のダウンモジュレーションの強化を誘導するか否かについて調べるために、AU565細胞を抗体および二重特異性抗体とともに3日間インキュベートした。HER2の全レベルおよび抗体と結合したHER2のレベルを決定した。

40

【 0 5 8 6 】

AU565細胞を通常の細胞培地中にて24ウェル組織培養プレートに播種して（細胞100,000個/ウェル）、ITLもしくはK409R突然変異のいずれかを有する10 μg/mLのHER2抗体、ま

50

たはHER2 x HER2二重特異性抗体の存在下にて37℃で3日間培養した。対照として、非改変IgG1骨格を有する2つの単一特異性HER2抗体の組み合わせも最終濃度10 µg/mLで試験した(1:1)。PBSで洗浄した後に、それらを25 µLのSurefire Lysis緩衝液(Perkin Elmer, Turku, Finland)とともに室温で30分間インキュベートすることにより、細胞を溶解させた。全タンパク質レベルは、ピシンコニン酸(BCA)タンパク質アッセイ試薬(Pierce)を製造元のプロトコールに従って用いて定量した。溶出液中のHER2タンパク質レベルは、HER2特異的サンドイッチELISAを用いて分析した。HER2の捕捉にはウサギ-抗ヒトHER2細胞内ドメイン抗体(Cell Signaling)を用い、ビオチン化ヤギ抗ヒトHER2ポリクローナル抗体R&D systems, Minneapolis, USA)、続いてストレプトアビジン-ポリ-HRPを用いて、結合したHER2を検出した。反応を2,2'-アジノ-ビス3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS錠1錠を50mLのABTS緩衝液[Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands]中に希釈)によって可視化させ、シュウ酸(Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands)で停止させた。405nmでの蛍光をマイクロタイタープレートリーダー(Biotek Instruments, Winooski, USA)で測定し、HER2の量を非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとして表した。

【0587】

図10および表10に示された結果は、試験したHER2 x HER2二重特異性抗体がすべて、HER2のダウンモジュレーションを誘導したことを明らかに示している。興味深いことに、HER2 x HER2二重特異性抗体はすべて、それらの単一特異性対応物の両方と比較して、HER2ダウンモジュレーションの増大を明らかに示した。

【0588】

(表10) HER2非処理細胞と比較したパーセンテージとして示した、HER2 x HER2二重特異性で誘導されるHER2のダウンモジュレーション

抗体	非処理細胞と比較したHER2のパーセンテージ
ハーセプチン	71
IgG1-005-ITL	54
IgG1-005-K409R	50
IgG1-025-ITL	64
IgG1-153-ITL	43
IgG1-153-K409R	40
IgG1-169-K409R	64
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	29
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	38
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	29
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	34
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	23
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	28
IgG1-005 + IgG1-169	28
IgG1-025 + IgG1-005	28
IgG1-025 + IgG1-153	23
IgG1-025 + IgG1-169	25
IgG1-153 + IgG1-005	23
IgG1-153 + IgG1-169	23
アイソタイプ対照	108

【0589】

実施例23 共焦点顕微鏡検査によって分析した、HER2 x HER2二重特異性抗体とリソソームマーカーLAMP1との共局在

実施例22に記載したHER2のダウンモジュレーションにより、HER2 x HER2二重特異性抗体がHER2のリソソーム分解を増加させうることが示された。これらの所見を確かめるために、共焦点顕微鏡検査技術を適用した。AU565細胞を標準的な組織培地中にてカバーガラス(厚さ1.5ミクロン、ThermoFisher Scientific, Braunschweig, Germany)上にて37℃で3日間増殖させた。リソソーム活性をブロックするために細胞を50 µg/mLのロイペプチン(Sigma)とともに1時間プレインキュベートし、その後に10 µg/mLのHER2単一特異性

抗体またはHER2 x HER2二重特異性抗体を添加した。また、2つの単一特異性IgG1抗体の組み合わせ(1:1)も最終濃度10 µg/mLで試験した。細胞を37 °Cでさらに3時間または18時間インキュベートした。その後、それらをPBSで洗浄した上で、4%ホルムアルデヒド(KI inipath)とともに室温で30分間インキュベートした。スライドをブロック用緩衝液(0.1%サポニン[Roche]および2% BSA[Roche]を加えたPBS)で洗浄し、20mM NH₄Clを含むブロック用緩衝液中で20分間インキュベートしてホルムアルデヒドを失活させた。スライドを再びブロック用緩衝液で洗浄した上で、リソソームを同定するためのマウス-抗ヒトCD107a(LAMP1)(BD Pharmingen)とともに室温で45分間インキュベートした。ブロック用緩衝液で洗浄した後に、スライドを、二次抗体の混合液;ヤギ抗マウスIgG-Cy5(Jackson)およびヤギ抗ヒトIgG-FITC(Jackson)とともに室温で30分間インキュベートした。スライドを再びブロック用緩衝液で洗浄して、20 µLの封入剤(6グラムのグリセロール[Sigma]および2.4グラムのMowiol 4-88[Omnilabo])を6mL蒸留水に溶解させ、それに12mLの0.2M Tris[Sigma] pH8.5を添加して、その後、50 ~ 60 °Cで10分間インキュベートした。封入剤を等分して-20 °Cで保存した)を用いて顕微鏡用スライド上にマウントした。スライドを、63x 1.32-0.6油浸対物レンズを装着したLeica SPE-II共焦点顕微鏡(Leica Microsystems)およびLAS-AFソフトウェアによって画像化した。重複ピクセル強度の定量を可能にするには、ピクセルの飽和を避けるべきである。このため、FITCレーザー強度を10%に減少させ、スマートゲインを830Vに設定し、スマートオフセットを-9.48%に設定した。これらの設定を用いることにより、二重特異性抗体はピクセル飽和を伴わずに明瞭に可視化されたが、単一特異性抗体は検出することが困難なこともあった。単一特異性抗体と二重特異性抗体との間でリソソームとの共局在を比較するために、これらの設定を、分析するすべての共焦点スライドで同一に保った。

【0590】

12ビットのグレースケールTIFF画像を、MetaMorph(登録商標)ソフトウェア(バージョンMeta Series 6.1, Molecular Devices Inc, Sunnyvale California, USA)を用いて、共局在に関して分析した。FITC画像およびCy5画像をスタックとして取り込み、バックグラウンドを減算した。すべてのFITC画像およびすべてのCy5画像に関して、同一の閾値設定を用いた(手動で設定)。共存は重複領域(ROI)におけるFITCのピクセル強度として示したが、ここでROIはすべてのCy5陽性領域で構成される。いくつかのHER2抗体、HER2 x HER2二重特異性抗体、または2種類の異なる単一特異性抗体の組み合わせで染色した異なるスライドを比較するために、Cy5のピクセル強度を用いて画像を標準化した。リソソームマーカーLAMP1(CD107a)の染色にはヤギ抗マウスIgG-Cy5を用いた。LAMP1のピクセル強度は、試験したさまざまなHER2抗体またはHER2 x HER2二重特異性抗体の間で異なるはずである(細胞1個はおおよそ200,000のCy5ピクセル強度を有していた)。

【0591】

FITCとCy5との共局在に対する標準化値 =

$$[(\text{TPI-FITC} \times \text{FITC-Cy5の共局在率}) / 100] \times [200,000 / \text{TPI-Cy5}]$$

この式において、TPIは総ピクセル強度のことである。

【0592】

図11および表11は、さまざまな単一特異性HER2抗体およびHER2 x HER2二重特異性抗体に関して、Cy5と重複するFITCのピクセル強度によって測定した共局在を示している。示した各抗体または二重特異性分子に関して、おおよそ1個、3個または5個を上回る細胞を含む1枚のスライドからの3つの異なる画像を分析した。各スライド内の異なる画像間で有意な差異が観察された。しかし、HER2 x HER2二重特異性抗体はすべて、それらの単一特異性対応物と比較した場合、リソソームマーカーLAMP1との共局在の増加を明らかに示すことが明白であった。これらの結果は、ひとたび内部移行を受けると、HER2 x HER2二重特異性抗体はリソソーム区画に向けて有効に選別されることを示しており、このことからみて、それらは二重特異性抗体の薬物結合体アプローチにとって特に好適である。

【0593】

(表11) 任意単位として示した、Cy5と重複するFITCの平均ピクセル強度

抗体	リソソーム中のFITCピクセル強度 [任意単位]
ハーセプチン	0.218
IgG1-005-ITL	0.070
IgG1-025-ITL	0.268
IgG1-153-ITL	0.102
IgG1-169-K409R	0.220
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	0.531
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	0.347
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	0.582
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	0.439
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	0.494
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	0.604
IgG1-025 + IgG1-169	0.576
IgG1-153 + IgG1-005	0.636
IgG1-153 + IgG1-169	0.626

10

【 0 5 9 4 】

実施例24 HER2単一特異性抗体またはHER2 x HER2二重特異性抗体とのインキュベーション時のAU565細胞の増殖の阻害

HER2 x HER2二重特異性抗体を、インビトロでAU565細胞の増殖を阻害するその能力について試験した。AU565細胞における高いHER2発現レベル (Qifiキットによる判定では細胞1個当たりおよそ1,000,000コピー) により、HER2はこれらの細胞において構成的に活性であり、それ故、リガンドで誘導されるヘテロ二量体化に依存しない。96ウェル組織培養プレート (Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany) に、1ウェル当たり9,000個のAU565細胞を、無血清細胞培地中にある10 µg / mLのHER2抗体またはHER2 x HER2二重特異性抗体の存在下にて播種した。対照として、抗体または二重特異性抗体を伴わない無血清培地中に細胞を播種した。3日後に、Alamarblue (BioSource International, San Francisco, US) を製造元の指示に従って用いて、生細胞の量を定量化した。蛍光は、EnVision 2101 Multilabelリーダー (PerkinElmer, Turku, Finland) をAlamarblue用の標準的な設定で用いてモニターした。抗体で処理した細胞のAlamarblueシグナルを、非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとしてプロットした。

20

【 0 5 9 5 】

図12および表12は、HER2抗体およびHER2 x HER2二重特異性抗体とのインキュベーション後のAU565細胞のAlamarblueの蛍光強度を示している。ハーセプチン (登録商標) (トラスツマブ) を陽性対照として含めたが、これはJuntilla TT. et al., Cancer Cell 2009;15: 429-440によって記載されているように増殖の阻害を明らかに示した。HER2 x HER2二重特異性抗体はすべて、AU565細胞の増殖を阻害することができた。このアッセイにおいて、二重特異性抗体: IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409RおよびIgG1-025-ITL x IgG1-005-K409Rは、それらの単一特異性抗体対応物と比較してより有効であった。

30

【 0 5 9 6 】

(表12) HER2 x HER2二重特異性抗体による処理後の生存AU565細胞のパーセンテージ

抗体	生細胞のパーセンテージ
ハーセプチン	62
IgG1-005-ITL	91
IgG1-005-K409R	96
IgG1-025-ITL	79
IgG1-153-ITL	98
IgG1-153-K409R	97
IgG1-169-K409R	63
IgG1-005-ITL x IgG1-169-K409R	49
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	61
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	74
IgG1-025-ITL x IgG1-169-K409R	76
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	71
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	77
アイソタイプ対照	95

10

【 0 5 9 7 】

実施例25 HER2のダウンモジュレーション

第3群抗体098および153ならびに第4群抗体005によって誘導されたHER2内部移行の強化が、受容体ダウンモジュレーションももたらすか否かを調べるために、AU565細胞をHER2抗体とともに3日間インキュベートして、HER2の存在に関して分析した。AU565細胞を通常の細胞培地中にて24ウェル組織培養プレート（細胞100,000個/ウェル）に播種し、10 μ g / mLのHER2抗体の存在下で37 $^{\circ}$ Cにて3日間培養した。PBSで洗浄した後に、細胞を、25 μ LのSurefire溶解緩衝液（Perkin Elmer, Turku, Finland）とともに室温で30分間インキュベートすることによって溶解させた。全タンパク質レベルは、ピシンコニン酸（BCA）タンパク質アッセイ試薬（Pierce）を製造元のプロトコールに従って用いて定量した。溶出液中のHER2タンパク質レベルは、HER2特異的サンドイッチELISAを用いて分析した。HER2の捕捉にはウサギ-抗ヒトHER2細胞内ドメイン抗体（Cell Signaling）を用い、ビオチン化ヤギ抗ヒトHER2ポリクローナル抗体（R&D）、続いてストレプトアビジン-ポリ-HRPを用いて、結合したHER2を検出した。反応を2,2'-アジノ-ビス3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS：ABTS錠1錠を50mLのABTS緩衝液 [Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands] 中に希釈）によって可視化させ、シュウ酸（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）で停止させた。405nmでの蛍光をマイクロタイタープレートリーダー（Biotek Instruments, Winooski, USA）で測定し、HER2の量を非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとして表した。

20

30

【 0 5 9 8 】

図13および表13に示された結果は、試験した第3群抗体（098および153）が両方とも、50%を上回るHER2ダウンモジュレーションを誘導したことを明らかに示している。対照的に、抗体025、169およびハーセプチンはダウンモジュレーションをほとんど誘導せず（非処理細胞のおよそ20%）、一方、抗体005は中程度のダウンモジュレーション（非処理細胞のおよそ30%）を誘導した。これは、抗体098、153および005によって観察された内部移行の強化と一致する。

40

【 0 5 9 9 】

（表13）非処理細胞と比較したHER2のパーセンテージとして示した、抗体で誘導されたHER2のダウンモジュレーション

抗体	非処理細胞と比較したHER2のパーセンテージ
ハーセプチン	80
IgG1-1014-169	82
IgG1-1014-025	85
IgG1-1014-098	44
IgG1-1014-153	50
IgG1-1014-005	70
アイソタイプ対照	108

【 0 6 0 0 】

実施例26 共焦点顕微鏡検査によって分析した、HER2抗体とリソソームマーカーLAMP1との共局在

10

実施例25に記載したHER2のダウンモジュレーションアッセイおよび実施例19に記載したCypHer-5Eに基づく内部移行アッセイにより、第3群および第4群のHER2抗体は、第1群および第2群の抗体と比較して、より有効に内部移行してリソソームに標的化されることが示された。第3群および第4群の抗体のリソソーム輸送の強化を確かめるために、AU565細胞をカバーガラス上で培養し、指定の抗体によって18時間処理した。細胞を固定し、透過処理を行った上で、抗体を可視化するためにFITC結合ヤギ抗ヒトIgG1で染色し、さらにリソソームを同定するためにマウス抗ヒトCD107a (LAMP1) および続いてヤギ抗マウスIgG-Cy5で染色した。

【 0 6 0 1 】

20

その結果は図14および表14に示されており、これらはさまざまな単一特異性HER2抗体に関してCy5と重複するFITCのピクセル強度を示している。各スライドから、およそ1個、3個または5個を上回る細胞を含む3つの異なる画像を分析した。各スライド内の異なる画像間で有意な差異が観察された。やはり、抗体005、098および153は、025、ペルツズマブ、169およびハーセプチンと比較して、より有効にリソソーム区画に標的化されることが明白であった。このことは、これらの抗体によって誘導される内部移行および受容体分解の強化とよく関連した。

【 0 6 0 2 】

(表14) 任意単位として示した、Cy5と重複するFITCの平均ピクセル強度

抗体	リソソーム中のFITCピクセル強度 [任意単位]
TH1014-005	0.619
TH1014-098	0.522
TH1014-153	0.409
TH1014-025	0.248
TH1014-pert	0.214
TH1014-169	0.255
ハーセプチン	0.236

30

【 0 6 0 3 】

実施例27-ヒトとニワトリとのHER2細胞外ドメインシャッフル

実施例14に記載した4つの異なるクロス競合群の抗体によって認識されるHER2結合領域をさらに規定するために、HER2細胞外ドメインシャッフル実験を行った。この目的のために、ヒトHER2細胞外ドメインのドメインI、II、III、またはIVの配列を、ニワトリHER2 (ニワトリ (Gallus gallus) アイソフォームB NCBI: NP_001038126.1) の対応する配列と交換した5つの構築物を用いて小さな遺伝子合成ライブラリーを作製した: 1) 完全ヒトHER2 (Uniprot P04626)、以下hu-HER2と呼ぶ、2) ニワトリドメインIを有するhu-HER2 (ヒトHER2のアミノ酸 (aa) 1~203を対応するニワトリHER2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (I) と呼ぶ、3) ニワトリドメインIIを有するhu-HER2 (ヒトHER2のアミノ酸 (aa) 204~330を対応するニワトリHER2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (II) と呼ぶ、4) ニワトリドメインIIIを有するhu-HER2 (ヒトHER2のaa331~507を対応するニワトリHER2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (III) と呼ぶ、および5) ニワトリドメインIVを有するhu-H

40

50

ER2 (ヒトHER2のaa508 ~ 651を対応するニワトリHER2領域と交換した)、以下hu-HER2-ch (IV) と呼ぶ。ヒトHER2オルソログおよびニワトリHER2オルソログは細胞外ドメインでは67%の相同性、ドメインIでは62%の相同性、ドメインIIでは72%の相同性、ドメインIIIでは63%の相同性、ドメインIVでは68%の相同性を示す。これらの構築物を、Freestyle (商標) CHO-S (Invitrogen) 細胞株において、Freestyle MAXトランスフェクション試薬 (Invitrogen) を用いて製造業者の説明書に従って一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を20時間、培養した。トランスフェクトされた細胞に対するHER2抗体の結合をフローサイトメトリーによって分析した。トランスフェクトされたCHO-S細胞を収集し、FACS緩衝液で洗浄し、10 μ g/mL HER2抗体と (氷上で30分間) インキュベートした。HER2抗体の結合を、フィコエリトリン (PE) 結合ヤギ抗ヒトIgG抗体 (Jackson) を用いて検出した。異なるバッチ間で発現が同一であるかどうか調べるために、細胞を固定し、Cytotfix/Cytoperm溶液 (BD) を用いて製造業者の説明書に従って透過処理し、ウサギ抗ヒト細胞内HER2抗体 (DAKO) と二次PE結合ヤギ抗ウサギ抗体 (Jackson) の組み合わせを用いて染色した。アイソタイプ対照抗体を負の対照として使用した。蛍光をFACSCanto-II (BD) によって測定し、GraphPad Prism V4.03ソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて、結合曲線を非線形回帰によって作成した (傾きが変化するS字形用量反応)。異なる抗体によって、どのHER2ドメインが認識されるのかを特定するために、結合の消失を読み取り値として使用した。

【 0 6 0 4 】

抗体153に関する例示的な結合曲線を図15に示している。結合結果はすべて表15に示されている。第1群HER2抗体050、084、169およびハーセプチンは、Hu-HER2-ch (IV) に対する結合のみの喪失を示したが、シャッフリングを受けた残りのドメインの1つを有するタンパク質に対してはそうでなく、このことは第1群mAbのエピトープがHER2ドメインIV内にあることを指し示している。第2群抗体025、091、129およびベルツズマブは、Hu-HER2-ch (II) に対する結合のみの喪失を示し、このことはエピトープがHER2ドメインII内にあることを指し示している。抗体098および153はいずれもクロス競合アッセイ (提示せず) では第3群に定められたが、シャッフリング実験ではある程度の差異を示した。抗体098は、Hu-HER2-ch (I) に対する結合の喪失およびHu-HER2-ch (II) に対する結合の軽度の低下を明らかに示したが、一方、153はHu-HER2-ch (II) に対する結合の喪失のみを示した。これらのデータは、第3群mAbの098および153は少なくとも部分的にはHER2ドメインIIとも結合することができ、エピトープがおそらく、098の場合がそうであるように、HER2ドメインI内に伸びていることを示唆する。抗体005、006、060および111はHER2ドメインIIIの置換後に結合の喪失を示したが、このことはエピトープがHER2ドメインIII内にあることを明らかに示している。興味深いことに、抗体059および106は、hu-HER2-ch (III) およびhu-HER2-ch (I) の両方に対する結合の喪失を明らかに示したが、このことは抗体059および106がこれらの2つのドメイン内の立体構造エピトープを認識することを意味する。

【 0 6 0 5 】

(表 1 5) 種々のHER2ECD受容体構築物に対するHER2抗体の結合の概要。FL ; hu-HER2、I ; hu-HER2-ch (I)、II ; hu-HER2-ch (II)、III ; hu-HER2-ch (III)、IV ; hu-HER2-ch (IV)。+++は正常な結合を指し示し、++はhu-HER2に対して観察された結合と比較してEC₅₀は低下しているが最大結合は同程度であることを指し示し、+はhu-HER2に対して観察された結合と比較してEC₅₀の低下および結合の低下を指し示し、-は全く結合がないことを指し示す

抗体	群	シャッフリングしたHER2ドメイン				
		FL	I	II	III	IV
ハーセプチン	1	+++	+++	+++	+++	
050	1	+++	+++	+++	+++	
084	1	+++	+++	+++	+++	
169	1	+++	+++	+++	+++	+
ペルツズマブ	2	+++	+++	+	+++	+++
025	2	+++	+++		+++	+++
091	2	+++	+++		+++	+++
129	2	+++	+++		+++	+++
153	3	+++	+++		+++	+++
098	3	+++		++	+++	+++
005	4	+++	+++	+++		+++
006	4	+++	+++	+++		+++
059	4	+++		+++		+++
060	4	+++	+++	+++		+++
106	4	+++		+++		+++
111	4	+++	+++	+++		+++

10

20

【0606】

実施例28 SCIDマウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植片に対するHER2 HuMab 005、091、084および169のインビボ有効性

雌性CB.17重症複合免疫不全症（SCID）マウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植モデルの腫瘍成長および生存に対するHER2-HuMab 091（クロス競合群2）、084および169（いずれもクロス競合群1）ならびに005（クロスブロック群4）のインビボ効果を判定した。50%マトリゲル中の 10×10^6 個のNCI-N87腫瘍細胞を、雌性SCIDマウスに、各群当たりマウス10匹ずつ皮下注射した。腫瘍接種から8日後に、HER2-HuMab 005、091、084および169または対照抗体HuMab-HepCの静脈内投与を開始した。図16（A）および（C）中で、これは第1日、治療開始日として指し示されている。初回用量は40mg/kgとし、その後、治療開始後の第4日、8日、11日、15日、18日、22日および25日には10mg/kgとした。腫瘍体積を毎週少なくとも2回測定した。体積（ mm^3 ）は、キャリパー（PLEXX）測定値から（幅²×長さ）/2として算出した。

30

【0607】

結果は図16A、16B、16Cおよび16Dに示されており、これらは、HuMab 005、084、169および091を投与されたマウスが、陰性対照抗体HuMab-HepCを投与されたマウスよりも、より緩徐な腫瘍成長（A）およびより優れた生存（B）を明らかに示したことを示している。処置はすべて忍容性が良好であった。

40

【0608】

実施例29 Balb/CヌードマウスにおけるBT-474乳腫瘍異種移植片の治療的処置

Balb/Cヌードマウスにおけるヒト皮下BT-474乳腫瘍異種移植片に対する5種類のHER2 HuMabによる治療的処置の効果について判定した。線源（1.8Gy、Co60、BioMep, France）を全身照射して24～72時間後に、BT-474腫瘍細胞を注射した。マトリゲルを含むRPMI 1640（50:50, v:v; BD Biosciences）200 μ l中の 2×10^7 個のBT-474細胞を、雌性Balb/Cヌードマウスの右側腹部に皮下注射した。マウスの体重および腫瘍体積を週2回記録した。腫瘍体積（ mm^3 ）は、キャリパー（PLEXX）測定値から（幅²×長さ）/2として算出した。

【0609】

50

腫瘍の平均体積が $100 \sim 200\text{mm}^3$ に達した時に、HER2 HuMabを用いる処置を開始した。腫瘍を有するマウスを、8匹のマウスからなる群に無作為割り付けした。1つの群には、対照mAb HuMab-HepCを週2回、静脈内(i.v.)注射した。他の4つの群には、HER2 HuMab 025、129、153および091を初回用量 20mg/kg およびその後9回、 5mg/kg の用量で週2回i.v.注射した。

【0610】

その結果は図17Aおよび図17Bに示されており、これらはBT-474腫瘍成長がHuMab 129およびHuMab 153処置によって部分的に阻害されたことを示している(HuMab-HepC対照処置と比較して約30%および50%の阻害)。HuMab-025およびHuMab-091はBT-474腫瘍成長を強く阻害し、これらの抗体によって、腫瘍体積 800mm^3 に到達する時間が極めて遅くなった。HER2 HuMabが投与されたマウスでは生存性も向上した。

10

【0611】

実施例30 異なるHER2エピトープを標的とする二重特異性抗体とのインキュベーションによるHER2表面発現のダウンモジュレーション

二重特異性HER2 x HER2抗体による多価受容体架橋は、受容体ダウンモジュレーションの強化をもたらすことができる。この実施例では、SKOV3細胞の細胞表面上での受容体の発現に対するそのような二重特異性抗体の効果について分析した。SKOV3(ATCC)は、細胞1個当たりのHER2コピー数がおよそ 2×10^5 個である卵巣癌細胞株である。

【0612】

SKOV3細胞を、無血清培地中にて96ウェル非結合性プレートに播種し(細胞 $100,000$ 個/ウェル)、37℃で30分間インキュベートした。次に、細胞を、受容体の再利用を阻止する $100 \mu\text{M}$ モネンシン(Dako)の存在下または非存在下で、 $10 \mu\text{g/mL}$ の抗体とともに37℃で3時間インキュベートした。2つの単一特異性IgG1抗体の組み合わせ(1:1)についても試験した(最終的な全抗体濃度 $10 \mu\text{g/mL}$)。細胞表面に発現されたHER2分子の定量は、QIAGEN IKIT(登録商標)(Dako)を製造元の指示に従って用いる間接免疫蛍光染色およびフローサイトメトリーによって行った。手短に述べると、細胞を非競合マウス抗HER2抗体(R&D、cat:IBD0207061、1:50)とともに4℃で30分間インキュベートした。次に、ヤギ抗マウスIgG-FITC(Dako、cat:F0479、1:50)を4℃で30分間用いて検出を行った。FITCの平均蛍光強度(MFI)は、FACS-Canto-II(BD Pharmingen)でのフローサイトメトリーによって測定した。校正のために、ヤギ抗マウスIgG-FITC検出用抗体を、ビーズ1個当たり所定数のマウスIgG分子を有する一連のビーズ集団に適用した。個々のビーズ集団で測定されたMFIを、ビーズ上の既知数の抗体分子に対してプロットして校正曲線を得て、それを用いて、測定されたMFIから細胞1個当たりのHER2分子数を推定した。

20

30

【0613】

図18および表16は、単一特異性HER2抗体が単独ではSKOV3細胞におけるHER2表面発現に対して有意な効果を及ぼさないことを示している。しかし、2つの単一特異性HER2抗体またはHER2 x HER2二重特異性抗体の組み合わせを用いた処理は、表面発現されるHER2の量を明らかに減少させた。モネンシンの添加は、すべての試料で、モネンシンを伴わないものと比較して、表面発現HER2レベルのごくわずかな低下しかもたらさなかった。このことは、内部移行したHER2分子の大半は再利用されるのではなく、細胞内で分解されることを示唆する。

40

【0614】

(表16)

	- モネンシン	+ モネンシン
非処理	169923	135108
IgG1-b12	153217	132255
IgG1-005	150486	122154
IgG1-025	136833	121230
IgG1-153	161516	102301
IgG1-005 + IgG1-025	87435	67858
IgG1-005 + IgG1-153	96817	66815
IgG1-025 + IgG1-153	100981	77325
IgG1-025-ITL x IgG1-005-K409R	114429	103408
IgG1-025-ITL x IgG1-153-K409R	95912	63770
IgG1-153-ITL x IgG1-005-K409R	83028	62407

10

【 0 6 1 5 】

20

実施例31：二重特異性HER2 x HER2抗体によるPBMC媒介性の細胞傷害作用の誘導

HER2 x HER2抗体を、末梢血単核細胞（PBMC）をエフェクター細胞としてAU565細胞を用いるインビトロ細胞傷害作用アッセイにおいて試験し、それらの親単一特異性HER2抗体およびそれらの組み合わせと比較した。AU565細胞をほぼ集密化するまで培養した。細胞をPBSで2回洗浄し、37℃で5分間トリプシン処理した。培地12mLを加えてトリプシンを不活性化し、細胞を800rpmで5分間遠心沈殿させた。細胞を培地10mL中に再懸濁させ、細胞濾過器に細胞を通すことによって単細胞懸濁液を作った。細胞 5×10^5 個/mLの懸濁液100 μ Lを96ウェル培養プレートの各ウェルに添加し、細胞を37℃、5% CO₂で3時間インキュベートして、プレートに接着させた。PBMCは、Leucosep 30mL試験管を製造元のプロトコール（Greiner Bio-one）に従って用いて、健康志願者の血液から単離した。単離した細胞を細胞培地中に再懸濁させて、最終濃度を 10×10^6 個/mLにした。接着したAU565細胞から培地を除去し、50 μ L/ウェルの2倍濃縮抗体希釈液および50 μ L/ウェルのPBMC懸濁液（ 10×10^6 個/mL）と置き換えた。プレートを37℃、5% CO₂で3日間インキュベートした。上清を除去し、プレートをPBSで2回洗浄した。各ウェルに培地150 μ LおよびalarmarBlue溶液15 μ Lを添加した。プレートを37℃、5% CO₂で4時間インキュベートし、吸光度を測定した（Envision, Perkin Elmer）。

30

【 0 6 1 6 】

図19は、PBMC媒介性の細胞傷害作用を誘導する単一特異性HER2抗体の能力が、二重特異性HER2 x HER2抗体でも保たれていることを示している。HER2 x HER2二重特異性抗体の有効性は、単一特異性親抗体またはそれらの組み合わせと同等であるか（025-ITL x 169-K409R；005-ITL x 169-K409R；025-ITL x 005-K409R）、またはより優れている傾向があった（153-ITL x 005-K409Rおよび153-ITL x 169-K409R）。さらに、HER2 x HER2抗体におけるPBMC媒介性の細胞傷害作用の誘導が可能となるためには、HER2 x HER2抗体を作製するために用いられる親抗体が両方とも活性化Fcドメイン、すなわちFc受容体との適正な相互作用を含む必要があることが求められることも示された。抗体のFcグリコシル化はIgG-Fc受容体相互作用にとって、それ故に抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）にとって決定的に重要なことが知られている。IgG1-153-K409RにおけるN297Q突然変異の導入による脱グリコシル化は、IgG1-153-K409R-N297QおよびIgG1-153-ITL x IgG1-153-K409R-N297Qのいずれにおいても、PBMC媒介性の細胞傷害作用の喪失をもたらした。

40

【 0 6 1 7 】

50

実施例32：SCIDマウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植片に対するHER2 x HER2二重特異性抗体のインビボ有効性

SCIDマウスにおけるヒト胃癌NCI-N87異種移植腫瘍モデルに対するHER2 x HER2二重特異性抗体のインビボ抗腫瘍有効性を、対応する親単一特異性HER2抗体およびそれらの組み合わせと比較した。6～11週齢の雌性SCID (C.B-17 / lcrPrkdc-scid / CRL) マウスを用いた。第0日に、 5×10^6 個のNCI-N87細胞を各マウスの右側腹部に200 μ L皮下接種した。腫瘍接種から7日後に、平均腫瘍サイズが同等になるようにマウスを8群 (n=7) に選別し、処置を開始した。飽和用量の抗体 (HER2単一特異性抗体、HER2 x HER2二重特異性抗体、または2つのHER2単一特異性抗体の組み合わせ) を腹腔内注射した (i.p.)。IgG1-b12をアイソタイプ対照抗体として用いた。マウスの処置は、表17に示した用量で腫瘍接種後の第7日、14日および21日に行った。

【0618】

(表17)

	1回目の用量	2回目の用量	3回目の用量
IgG1-005	800 μ g	400 μ g	200 μ g
IgG1-153	1000 μ g	500 μ g	250 μ g
IgG1-169	600 μ g	300 μ g	150 μ g
IgG1-169 + IgG1-153	300 μ g (169) + 500 μ g (153)	150 μ g (169) + 250 μ g (153)	75 μ g (169) + 125 μ g (153)
IgG1-005 + IgG1-153	400 μ g (005) + 500 μ g (153)	200 μ g (005) + 250 μ g (153)	100 μ g (005) + 125 μ g (153)
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	800 μ g	400 μ g	200 μ g
IgG1-005-ITL x IgG1-153-K409R	800 μ g	400 μ g	200 μ g
IgG1-b12	800 μ g	400 μ g	200 μ g

【0619】

1500mm³というエンドポイント腫瘍体積に到達するまで、または試験終了時 (第63日) まで、キャリパーを用いて腫瘍を週2回測定した。図20は、実験の第41日の時点で、単一特異性HER2抗体のいずれも、陰性対照抗体b12と比較して腫瘍成長を有意に阻害せず、IgG1-005およびIgG1-153はこのモデルではアゴニスト性に向かう傾向さえ示していることを示している。試験した二重特異性HER2 x HER2抗体であるIgG1-153-ITL x IgG1-169-K409RおよびIgG1-005-ITL x IgG1-153-K409Rは両方とも、それらの単一特異性対応物と比較して、腫瘍成長の有意な阻害を示した。さらに、どちらの二重特異性HER2 x HER2抗体も、第41日の時点で単一特異性対応物の組み合わせよりも少ない平均腫瘍体積を示し、IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409Rに関しては統計的に有意であった。

【0620】

実施例33：SCIDマウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植片に対するHer2 x Her2二重特異性抗体のインビボ有効性

Her2 x Her2二重特異性抗体IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409Rのインビボ抗腫瘍有効性を、実施例32に記載したSCIDマウスにおけるヒト胃癌NCI-N87異種移植腫瘍モデルにて試験した。第0日に、 5×10^6 個のNCI-N87細胞を各マウスの右側腹部に200 μ L皮下接種した。腫瘍接種から7日後に、平均腫瘍サイズが同等になるようにマウスを複数の群 (n=9) に選別した。マウスへの処置は、腫瘍接種後の第7日および第14日に、抗体の飽和用量の腹腔内注射によって行った。処置群は表18に示されている。

【0621】

(表18) 処置群および投薬

	1回目の用量	2回目の用量
IgG1-153-K409R	800 μ g (40 mg/kg)	400 μ g (20 mg/kg)
IgG1-169	800 μ g (40 mg/kg))	400 μ g (20 mg/kg)
IgG1-169 + IgG1-153	320 μ g 153 (16 mg/kg) + 400 μ g 169 (20 mg/kg)	130 μ g 153 (8 mg/kg) + 200 μ g 169 (10 mg/kg)
IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R	800 μ g (40 mg/kg)	400 μ g (20 mg/kg)
ハーセプチン	800 μ g (40 mg/kg)	400 μ g (20 mg/kg)
IgG1-b12	800 μ g (40 mg/kg)	400 μ g (20 mg/kg)

10

【 0 6 2 2 】

1500mm³というエンドポイント腫瘍体積に到達するまで、または試験終了時まで、キャリアパーを用いて腫瘍を週2回測定した。図21Aは、単一特異性HER2抗体のいずれも、陰性対照抗体b12と比較して腫瘍成長を有意に阻害しなかったことを示している。二重特異性HER2 x HER2抗体IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409Rに関しては、アイソタイプ対照抗体b12と比較して腫瘍成長の有意な阻害が見いだされた。図21Bは、400mm³未満の腫瘍を有するマウスのパーセンテージを提示しているKaplan-Meierプロットである。HER2 x HER2二重特異性IgG1-153-ITL x IgG1-169-K409R抗体を投与された群は、対照群および他のすべての群と比較して有意な腫瘍阻害を示している。

20

【 0 6 2 3 】

実施例34：ヒトIgG1のFabアーム交換への関わりのためのT350I、K370TおよびF405L置換の必要性の解明

IgG1がFabアーム交換に関わるために必要なIgG1 CH3ドメインにおける決定基をさらに特定するために、三重突然変異T350I-K370T-F405L (ITL)を含むIgG1を、WO 02/100348号およびWO 04/035607号にそれぞれ記載された抗体2F8および7D8を用いて試験されている二重突然変異体T350I-K370T (IT)、T350I-F405L (IL)およびK370T-F405L (TL)と比較した。また、単一突然変異体F405L (L)も試験した。2-MEAを還元剤として用い、インビトロでのFabアーム交換を誘導した (PBS / 25 mM 2-MEA 100 μ L中にて各抗体50 μ gを37 °Cで90分間)。単一突然変異体F405L抗体の場合、一過性トランスフェクションの上清由来の未精製抗体を、Amicon Ultra遠心分離器具 (30k, Millipore, カタログ番号UFC803096)を用いて緩衝液をPBSに交換した後に用いた。還元反応を停止させるために、スピнкаラムを用いて試料を脱塩することによって還元剤2-MEAを除去した。二重特異性抗体の生成については、ELISAで測定した二重特異性結合によって判定した。

30

【 0 6 2 4 】

三重突然変異 (ITL)、二重突然変異 (IT、ILおよびTL) および単一突然変異 (L) をIgG1-2F8に導入した。これらの突然変異体を、25mM 2-MEAを用いたFabアーム交換のために、CPSCヒンジを含むIgG4-7D8 (野生型)、または安定化されたヒンジを含むIgG4-7D8 (IgG4-7D8-CPPC) と37 °Cで90分間組み合わせた。図22A ~ Bは、IgG1-2F8-IL突然変異体およびIgG1-2F8-TL突然変異体が、組み合わせられたIgG4-7D8 (CPSCまたはCPPCヒンジ) に関係なく、三重突然変異体ITLと同じレベルまでFabアーム交換を示したことを示している。対照的に、IgG1-2F8-IT突然変異体との組み合わせでは二重特異性結合が見いだされなかった。図22Cは、同様にIgG1-2F8-F405L突然変異体が、組み合わせられたIgG4-7D8 (CPSCまたはCPPCヒンジ) に関係なく、Fabアーム交換を示したことを示している。これらのデータは、上述した条件下では、Fabアーム交換にヒトIgG1に関わらせるにはF405L突然変異で十分であることを指し示している。

40

【 0 6 2 5 】

実施例35：IgG1-ITLとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置409の決定基

2-MEAは、ヒトIgG1-ITLとIgG4-CPPCとの間のFabアーム交換を誘導することができる。

50

ヒトIgG1およびIgG4のCH3境界部残基は位置409でのみ異なる：IgG1ではリジン（K）であり、IgG4ではアルギニン（R）である。このため、位置409のリジンのアルギニンまたは他の任意のアミノ酸による置換（K409X）により、IgG1をIgG1-ITLとの2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わらせうるか否かについて試験した。PBS / 25mM 2-MEA 20 μ l 中でヒトIgG1-2F8-ITL 10 μ gおよびIgG1-7D8-K409X 10 μ gの組み合わせ（各抗体について最終濃度0.5mg / mL）を、37 で90分間インキュベートした。一過性トランスフェクションの上清由来の未精製抗体を、Amicon Ultra遠心分離器具（30k, Millipore, カタログ番号UFC803096）を用いて緩衝液をPBSに交換した後に用いた。Fabアーム交換反応の後に、PBS 20 μ Lを各試料に加え、スピン脱塩プレートを用いて試料を脱塩することによって還元剤を除去した。抗体の希釈系列（3倍希釈にて総抗体濃度0～20 μ g / mL）をELISAで用いて、二重特異性結合を測定した。

【 0 6 2 6 】

図23Aは、IgG1-2F8-ITL x IgG1-7D8-K409X間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。図23Bにおいては、交換が、100%に設定した、IgG1-2F8-ITLとIgG4-7D8-CPPCとの間の2-MEA誘導性Fabアーム交換に由来する二重特異性抗体の精製バッチと対比した二重特異性結合として提示されている。また、これらのデータを、表19に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度のFabアーム交換、（+）中程度のFabアーム交換、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-7D8における位置409がK（＝野生型IgG1）、LまたはMであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-7D8における位置409がF、I、NまたはYであった場合には中程度（+）であることが見いだされ、IgG1-7D8における位置409がA、D、E、G、H、Q、R、S、T、VまたはWであった場合には高度（++）であることが見いだされた。

【 0 6 2 7 】

（表19）IgG1-2F8-ITL突然変異体とIgG1-7D8-K409X突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-ITL突然変異体とIgG1-7D8-K409X突然変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

	Fabアーム交換
IgG1-7D8-K409X	x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-
L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

【 0 6 2 8 】

実施例36：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置405の決定基

実施例34では、F405L突然変異が、IgG4-7D8と組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に關与させるために十分であることを記載した。ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせにおいて2-MEA誘導性Fabアーム交換における關与に關するIgG1の位置405の決定基をさらに検討するために、考えうるすべてのIgG1-2F8-F405X突然変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。この手順は、実施例35に記載した通りに精製抗体を用いて行った。

【 0 6 2 9 】

図24は、IgG1-2F8-F405X x IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表20に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置405がF（=野生型IgG1）であった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置405がGまたはRであった場合には軽度（+/-）であることが見いだされた。IgG1-2F8における位置405がA、D、E、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V、WまたはYであった場合には、Fabアーム交換は高度（++）であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置405での特定の突然変異により、IgG1-K409Rと組み合わされた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に關与することが可能になることを指し示している。

【 0 6 3 0 】

（表 2 0 ） IgG1-2F8-F405X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-F405X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-F405X	Fabアーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

【 0 6 3 1 】

実施例37：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に關与するためのIgG1の位置407の決定基

前の実施例では、位置F405での特定の単一の突然変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に關与させるために十分であることを記載した。CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に關係する他の決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介しうるか否かについて検討するために、IgG1の位置407での突然変異誘発を行い、突然変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせにおける2-MEA誘導性Fabアーム交換への關与に關して

試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-Y407X突然変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は精製抗体を用いて行った。

【 0 6 3 2 】

図25は、IgG1-2F8-Y407X x IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表21に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置407がY（＝野生型IgG1）、E、K、QまたはRであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置407がD、F、I、SまたはTであった場合には軽度（+/-）であり、IgG1-2F8における位置407がA、H、NまたはVであった場合には中程度（+）であり、IgG1-2F8における位置407がG、L、MまたはWであった場合には高度（++）であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置407での特定の突然変異により、IgG1-K409Rと組み合わされた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【 0 6 3 3 】

（表 2 1）IgG1-2F8-Y407X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-Y407X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-Y407X	Fabアーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-
V	+
W	++
Y	-

【 0 6 3 4 】

実施例38：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置368の決定基

実施例34および37は、位置F405およびY407での特定の単一の突然変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置368の突然変異誘発を行い、突然変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-L368X突然変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は精製抗体を用いて行った。

【 0 6 3 5 】

図26は、IgG1-2F8-L368X x IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表22に提示されているように、(-) Fabアーム交換なし、(+/-) 軽度、(+) 中程度、または(++) 高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置368がL (= 野生型IgG1)、FまたはMであった場合には、Fabアーム交換はない(-)と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置368がYであった場合には軽度(+/-)であることが見いだされた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置368がKであった場合には中程度(+)であり、IgG1-2F8における位置368がA、D、E、G、H、I、N、Q、R、S、T、VまたはWであった場合には高度(++)であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置368での特定の突然変異により、IgG1-K409Rと組み合わせられた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることを可能になることを指し示している。

10

【 0 6 3 6 】

(表22) IgG1-2F8-F368X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-F368X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。(-) なし、(+/-) 軽度、(+) 中程度、(++) 高度のFabアーム交換。

Fabアーム交換	
IgG1-2F8-L368X	x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++

20

30

【 0 6 3 7 】

実施例39：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置370の決定基

実施例34、37および38は、位置F405、Y407またはL368での特定の単一の突然変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc:Fc境界部位位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置370の突然変異誘発を行い、突然変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-K370X突然変異体(CおよびPを除く)を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は精製抗体を用いて行った。

40

【 0 6 3 8 】

図27は、IgG1-2F8-K370X x IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表23に提示されているように、(-

50

）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置370がK（＝野生型IgG1）、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、R、S、T、VまたはYであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。中程度のFabアーム交換（+）をもたらしたのは、K370のWによる置換のみであった。これらのデータは、IgG1の位置370での唯一の突然変異（K370W）のみが、IgG1-K409Rと組み合わせられた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることを可能にすることを指し示している。

【 0 6 3 9 】

（表 2 3）IgG1-2F8-K370X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-K370X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

	Fabアーム交換
IgG1-2F8-K370X	x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-
G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

【 0 6 4 0 】

実施例40：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置399の決定基

以前の実施例は、位置F405、Y407、L368またはK370での特定の単一の突然変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置399の突然変異誘発を行い、突然変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-D399X突然変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は精製抗体を用いて行った。

【 0 6 4 1 】

図28は、IgG1-2F8-D399X x IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらの結果を、表24に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置399がD（＝野生型IgG1）、EおよびQであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置399がVであった場合には軽度（+/-）であり、IgG1-2F8における位置399がG、I、L、M

、N、S、TまたはWであった場合には中程度(+)であった。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置399がA、F、H、K、RまたはYであった場合には高度(++)であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置399での特定の突然変異により、IgG1-K409Rと組み合わせられた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【0642】

(表24) IgG1-2F8-D399X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-D399X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。(-)なし、(+/-)軽度のFabアーム交換、(+)中程度のFabアーム交換、(++)高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-D399X	Fabアーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

【0643】

実施例41：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置366の決定基

実施例34～40は、位置F405、Y407、L368、K370またはD399での特定の単一の突然変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置366の突然変異誘発を行い、突然変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-T366X突然変異体(CおよびPを除く)を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせ

【0644】

図29は、IgG1-2F8-T366X x IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表25に提示されているように、(-) Fabアーム交換なし、(+/-)軽度、(+)中程度、または(++)高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置366がT(= 野生型IgG1)、K、R、SまたはWであった場合には、Fabアーム交換はない(-)と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置366がF、G、I、L、MまたはYであった場合には軽度(+/-)であり、IgG1-2F8における位置366がA、D、E、H、N、VまたはQであった場合には中程度(+)であった。これらのデータは、IgG1の位置366での特定の突然変異により、IgG1-K409Rと組み合わせられ

た場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【 0 6 4 5 】

(表 2 5) IgG1-2F8-T366X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-T366X突然変異体とIgG1-7D8-K409R突然変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。(-) なし、(+/-) 軽度、(+) 中程度、(++) 高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-T366X	Fabアーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+
E	+
F	+/-
G	+/-
H	+
I	+/-
K	-
L	+/-
M	+/-
N	+
Q	+
R	-
S	-
T	-
V	+
W	-
Y	+/-

10

20

【図 1 A】

IgHV3-23-01 / IGHJ4-02 - VHアラインメント (第1群)

IgHV1-23-01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKG
TH1014-050 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKG
VH1014-049 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKG
VH1014-051 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKG
VH1014-055 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKG
コンセンサス EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSTYYADSVKG

IgHV1-23-01 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGTFLTVVSS

TH1014-050 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAKANMWDYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-049 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAKANMWDYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-051 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAKANMWDYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-055 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAKANMWDYFDYWGQGTFLTVVSS

コンセンサス RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAKANMWDYFDYWGQGTFLTVVSS

【図 1 B】

IgHV1-69-04 / IGHJ6-02 - VHアラインメント (第1群)

IgHV1-69-04 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFTSYAISWVRQAPQGQLEWMGRIIPILIGIANYAQKPGQ
TH1014-084 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFTSYAISWVRQAPQGQLEWMGRIIPILIGIANYAQKPGQ
コンセンサス QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFTSYAISWVRQAPQGQLEWMGRIIPILIGIANYAQKPGQ

IgHV1-69-04 RVTITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYYCAR-----GMDVWGQGTITVTVSS

TH1014-084 RVTITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYYCAREKGVDDYYGKXVWGQGTITVTVSS

コンセンサス RVTITADKSTSTAYMELSLRSEDVAVYYCAREKGVDDYYGKXVWGQGTITVTVSS

【図 1 C】

IgHV1-18-01 / IGHJ4-02 - VHアラインメント (第1群)

IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYNGNTYIAQKLGQ
TH1014-169 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYSGNTYIAQKLGQ
VH1014-123 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAAGYFTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYSGNTYIAQKLGQ
VH1014-161 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYSGNTYIAQKLGQ
VH1014-124 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKAAGYFTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYSGNTYIAQKLGQ
コンセンサス QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYSGNTYIAQKLGQ

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCAR-----YFDYWGQGTFLTVVSS

TH1014-169 RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCARDFIVVRPFDYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-123 RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCARDFIVVRPFDYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-161 RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCARDFIVVRPFDYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-124 RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCARDFIVVRPFDYFDYWGQGTFLTVVSS

コンセンサス RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCARDFIVVRPFDYFDYWGQGTFLTVVSS

【図 1 F】

IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 - VHアラインメント (第2群)

IgHV1-30-... QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
TH1014-129 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
コンセンサス QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ

IgHV3-30-... FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----YFDYWGQGTFLTVVSS

TH1014-129 FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLGVMGAFDYWGQGTFLTVVSS

コンセンサス FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGLGVMGAFDYWGQGTFLTVVSS

【図 1 G】

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 - VHアラインメント (第3群)

IgHV3-23-1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGSGSTYYADSVKG
TH1014-098 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGASTYYADSVKG
VH1014-105 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGASTYYADSVKG
VH1014-100 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGASTYYADSVKG
VH1014-125 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGASTYYADSVKG
VH1014-162 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGASTYYADSVKG
コンセンサス EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGASTYYADSVKG

IgHV3-23-1 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGTFLTVVSS

TH1014-098 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYITLFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-105 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYITLFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-100 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYITLFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-125 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGHTLGSGSYITLFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-162 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGHYHGSGSYITLFDYWGQGTFLTVVSS

コンセンサス RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKXXXXGSGSYITLFDYWGQGTFLTVVSS

【図 1 H】

IgHV5-51-01 / IGHJ2-01 - VHアラインメント (第3a群, No.1)

IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSTSYIIGWVRQMPGKGLEWMGIITYFGSDSTRYSPSPGQ
TH1014-127 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSTSYIIGWVRQMPGKGLEWMGIITYFGSDSTRYSPSPGQ
コンセンサス EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSTSYIIGWVRQMPGKGLEWMGIITYFGSDSTRYSPSPGQ

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSFRHWYFDLWGRGTLTVVSS

TH1014-127 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSFRHWYFDLWGRGTLTVVSS

コンセンサス QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSFRHWYFDLWGRGTLTVVSS

【図 1 D】

IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 - VHアラインメント (第2群, No.1)

IgHV4-34-01 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
TH1014-025 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-001 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-143 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-019 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-021 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-027 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
コンセンサス QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR-----YFDYWGQGTFLTVVSS

TH1014-025 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGVYSGVYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-001 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGNYSGSYIYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-143 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGVYSGVYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-019 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGVYSGVYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-021 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGVYSGVYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-027 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGLIGSGVYFDYWGQGTFLTVVSS

コンセンサス VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGXXSGVYFDYWGQGTFLTVVSS

【図 1 E】

IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 - VHアラインメント (第2群, No.2)

IgHV4-34-01 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
TH1014-091 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-032 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-035 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-036 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-054 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-094 QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR
コンセンサス QVQLQQWAGGLLKPSSETLSLTCAVYGGSTSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGFINHSGSTNYNPSLKSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR-----YFDYWGQGTFLTVVSS

TH1014-091 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLFGSGTYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-032 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLFGSGTYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-035 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLFGSGTYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-036 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLFGSGTYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-054 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLFGSGTYFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-094 VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLFGSGTYFDYWGQGTFLTVVSS

コンセンサス VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLXXGSGTYFDYWGQGTFLTVVSS

【図 1 I】

IgHV5-51-01-01 / IGHJ5-02 - VHアラインメント (第3a群, No.2)

IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSTSYIIGWVRQMPGKGLEWMIITYFGSDSTRYSPSPGQ
TH1014-159 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSTSYIIGWVRQMPGKGLEWMIITYFGSDSTRYSPSPGQ
コンセンサス EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSTSYIIGWVRQMPGKGLEWMIITYFGSDSTRYSPSPGQ

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----NWDFPWGQGTFLTVVSS

TH1014-159 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGWYTYDILLGYNFDFPWGQGTFLTVVSS

コンセンサス QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGWYTYDILLGYNFDFPWGQGTFLTVVSS

【図 1 J】

IgHV1-18-01 / IGHJ6-02 - VHアラインメント (第3b群)

IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYNGNTYIAQKLGQ
TH1014-132 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYNGNTYIAQKLGQ
コンセンサス QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWSAYNGNTYIAQKLGQ

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCAR-----GMDVWGQGTITVTVSS

TH1014-132 RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCAREYYSYDGTTFYFGMDVWGQGTITVTVSS

コンセンサス RVTMTTDTSTSTAYMELSLRSDTAVYYCAREYYSYDGTTFYFGMDVWGQGTITVTVSS

【図 1 K】

IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 - VHアラインメント (第3b群)

IgHV3-30-... QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
TH1014-153 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
VH1014-033 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
VH1014-160 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
VH1014-166 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
VH1014-152 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
VH1014-167 QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ
コンセンサス QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTTSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISYDGSNKYYADSPSPGQ

IgHV3-30-... RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----YFDYWGQGTFLTVVSS

TH1014-153 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGITGTITVFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-033 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDITSSGCVFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-160 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDITSSGCVFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-166 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDITSSGCVFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-152 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDITSSGCVFDYWGQGTFLTVVSS

VH1014-167 RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDITSSGCVFDYWGQGTFLTVVSS

コンセンサス RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGXXXXXXGCVFDYWGQGTFLTVVSS

【図 1 L】

IgHV5-51-1 / IGHJ6-02 - VHアラインメント

IgHV5-51-1 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDTRYSPSFQ
TH1014-005 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
TH1014-060 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
TH1014-106 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
VH1014-041 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
VH1014-150 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
VH1014-067 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
VH1014-072 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
VH1014-163 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
VH1014-093 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
VH1014-044 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ
コンセンサス EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGSDTRYSPSFQ

IgHV5-51-1 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----GMDVWGQGITTVTVSS
TH1014-005 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYFYGMDVWGQGITTVTVSS
TH1014-060 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHAGD--FYFDGLDVWGQGITTVTVSS
TH1014-106 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYYSGMDVWGQGITTVTVSS
VH1014-041 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYFFGLDVWGQGITTVTVSS
VH1014-150 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYYNNGMDVWGQGITTVTVSS
VH1014-067 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYFYGLDVWGQGITTVTVSS
VH1014-072 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYFNGLDVWGQGITTVTVSS
VH1014-163 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYFNGLDVWGQGITTVTVSS
VH1014-093 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYFFGLDVWGQGITTVTVSS
VH1014-044 GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYYNNGMDVWGQGITTVTVSS
コンセンサス GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARXXXXXXXXXXGLXGQGITTVTVSS

【図 1 M】

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 - VHアラインメント

IgHV3-23-1 EVQLLESGGGLVQPGSILRLSCAASGFTTSSYAMSVWRQAPGKGLEWSAISGGSGSTYYADSVKG
TH1014-006 EVQLLESGGGLVQPGSILRLSCAASGFTTSSYALVWRQAPGKGLEWSIIRKAGSTYYADSVKG
コンセンサス EVQLLESGGGLVQPGSILRLSCAASGFTTSSYAMSVWRQAPGKGLEWSIXIKXGSTYYADSVKG
IgHV3-23-1 RFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGITVTVSS
TH1014-006 RFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAKARIWGPFDYWGQGITVTVSS
コンセンサス RFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYYCAKARIWGPFDYWGQGITVTVSS

【図 2 B】

IgKV3-11-01 / IKGJ1-01 - VLアラインメント (第1群)

IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSG
VL1014-169 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSG
VL1014-124 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSG
VL1014-161 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSG
VL1014-123 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSG
コンセンサス EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSG
IgKV3-11-01 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRSNWPFYFGGTKVEIK
VL1014-169 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRSNWPFYFGGTKVEIK
VL1014-124 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRSNWPFYFGGTKVEIK
VL1014-161 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRSNWPFYFGGTKVEIK
VL1014-123 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRSNWPFYFGGTKVEIK
コンセンサス SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQRSNWPFYFGGTKVEIK

【図 2 C】

IgKV1D-16-01 / IKGJ5-01 - VLアラインメント (第2群, No. 1)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-025 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-001 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-019 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-143 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-021 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-027 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFITFGGTRLEIK
VL1014-025 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFITFGGTRLEIK
VL1014-001 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFITFGGTRLEIK
VL1014-019 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFITFGGTRLEIK
VL1014-143 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFITFGGTRLEIK
VL1014-021 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFITFGGTRLEIK
VL1014-027 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFITFGGTRLEIK
コンセンサス SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFITFGGTRLEIK

【図 1 N】

IgHV1-18-1 / IGHJ4-02 - VHアラインメント

IgHV1-18-1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGYFTTSYGISWVRQAPGGGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-059 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGYFTTSYGISWVRQAPGGGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
コンセンサス QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGGYFTTSYGISWVRQAPGGGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
IgHV1-18-1 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----YFDYWGQGITVTVSS
TH1014-059 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGITVTVSS
コンセンサス RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGITVTVSS

【図 1 O】

IgHV1-69-4 / IGHJ4-02 - VHアラインメント

IgHV1-69-4 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFTSSYALSWVRQAPGGGLEWMGRIIPILGLIANYAQKFGQ
TH1014-111 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFTSSYALSWVRQAPGGGLEWMGRIIPILGLIANYAQKFGQ
コンセンサス QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFTSSYALSWVRQAPGGGLEWMGRIIPILGLIANYAQKFGQ
IgHV1-69-4 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCAR-----YFDYWGQGITVTVSS
TH1014-111 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARQDEYSSNWWYWGQGITVTVSS
コンセンサス RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARQDEYSSXXXVWGQGITVTVSS

【図 2 A】

IgKV1-12-01 / IKGJ5-01 - VLアラインメント (第1群)

IgKV1-12-01 DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-050 DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-084 DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-049 DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-051 DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-055 DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス DIQMTQSPSSVSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSG
IgKV1-12-01 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFITFGGTRLEIK
VL1014-050 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFITFGGTRLEIK
VL1014-084 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFITFGGTRLEIK
VL1014-049 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFITFGGTRLEIK
VL1014-051 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFITFGGTRLEIK
VL1014-055 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFITFGGTRLEIK
コンセンサス SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFITFGGTRLEIK

【図 2 D】

IgKV1D-16-01 / IKGJ1-01 - VLアラインメント (第2群, No. 2)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-091 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-032 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-035 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-036 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-054 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-094 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK
VL1014-091 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPTFGGTRLEIK
VL1014-032 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPTFGGTRLEIK
VL1014-035 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPTFGGTRLEIK
VL1014-036 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPTFGGTRLEIK
VL1014-054 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPTFGGTRLEIK
VL1014-094 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPTFGGTRLEIK
コンセンサス SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPTFGGTRLEIK

【図 2 E】

IgKV1D-16-01 / IKGJ2-01 - VLアラインメント (第3a群)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-098 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-100 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-105 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-125 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
VL1014-162 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSG
IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK
VL1014-098 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK
VL1014-100 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK
VL1014-105 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK
VL1014-125 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK
VL1014-162 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK
コンセンサス SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYFPTFGGTRLEIK

【図 2 F】

IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01 - VHアラインメント (第3b群)

IgKV1D-16 ... DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-153 DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-152 DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-166 DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-167 DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-160 DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQDISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-033 DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス DIQMTQSPSSLSASVGDGVITTCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 ... SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK
VL1014-153 SGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK
VL1014-152 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK
VL1014-166 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK
VL1014-167 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK
VL1014-160 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK
VL1014-033 SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK
コンセンサス SGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGGTRLEIK

【図 2 G】

IgKV3-20-01 / IGKJ4-01 - VLアラインメント

IgKV3-20-01 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-005 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-059 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-060 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-106 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-111 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-041 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-150 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-067 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-072 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-163 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-093 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-044 EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
コンセンサス EIVLTQSPGTLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS

IgKV3-20-01 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-005 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-059 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-060 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-106 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-111 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-041 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-150 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-067 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-072 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-163 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-093 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
VL1014-044 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK
コンセンサス GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYVSSP-LITFGGKVEIK

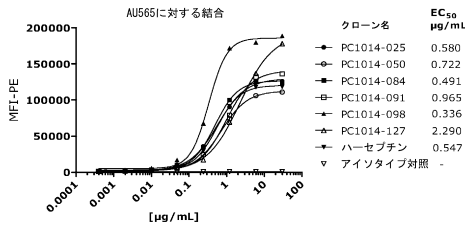
【図 2 H】

IgKV3-11-01 / IGKJ4-01 - VLアラインメント

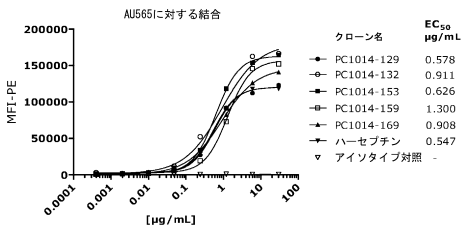
IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
VL1014-006 EIVLTQSPATLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
コンセンサス EIVLTQSPATLSTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKFGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS

IgKV3-11-01 GSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRNWPFLITFGGKVEIK
VL1014-006 GSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRNWPFLITFGGKVEIK
コンセンサス GSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQRNWPFLITFGGKVEIK

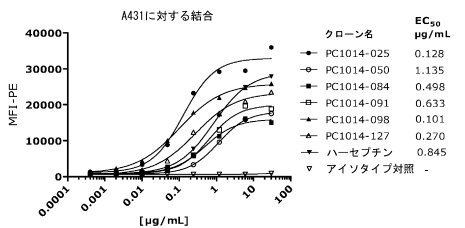
【図 3 A】



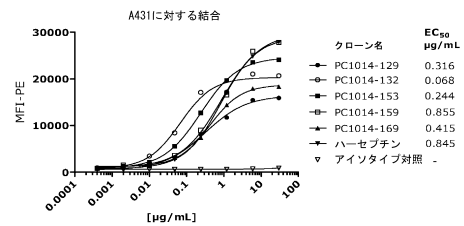
【図 3 B】



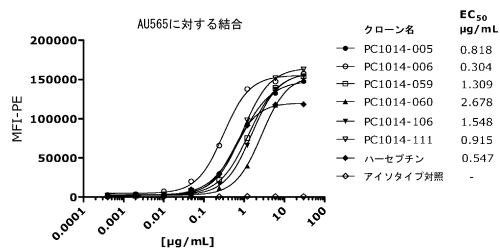
【図 3 C】



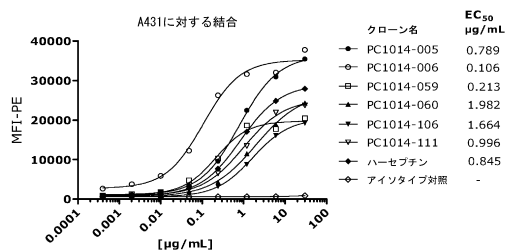
【図 3 D】



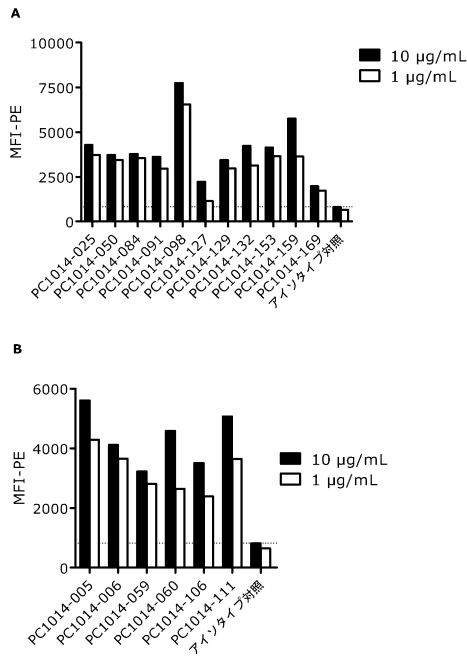
【図 3 E】



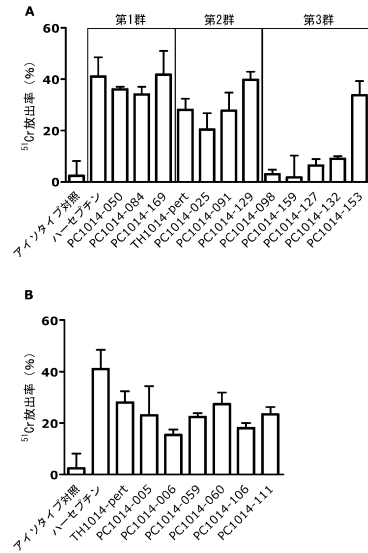
【図 3 F】



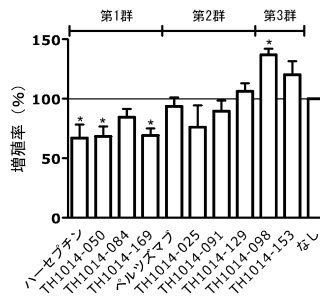
【図 4】



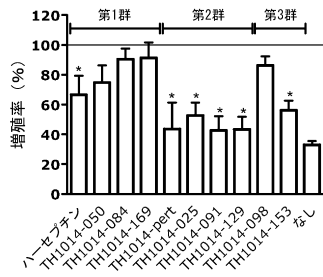
【図 5】



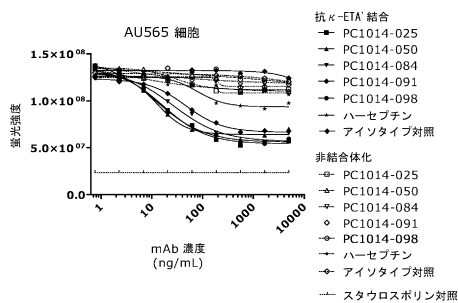
【図 6】



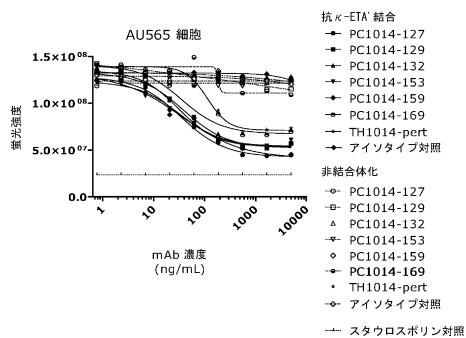
【図 7】



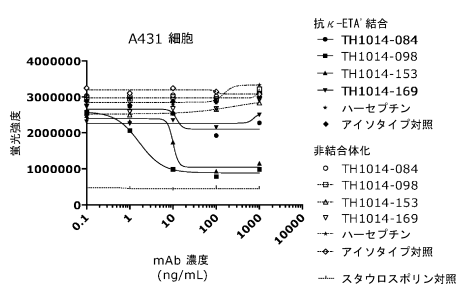
【図 8 A】



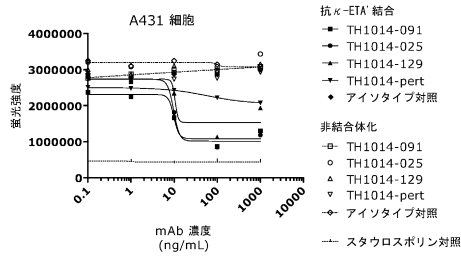
【図 8 B】



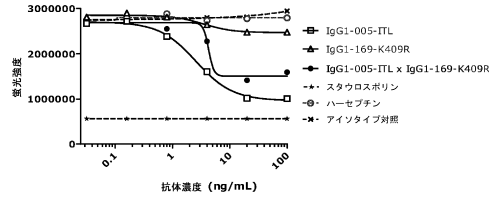
【図 8 C】



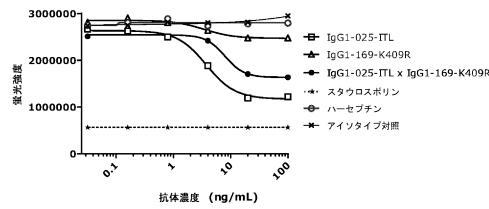
【図 8 D】



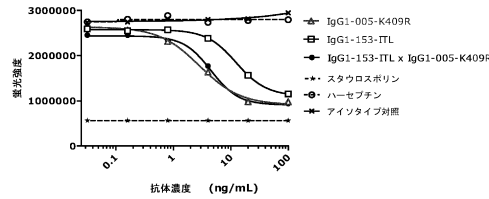
【図 9 A】



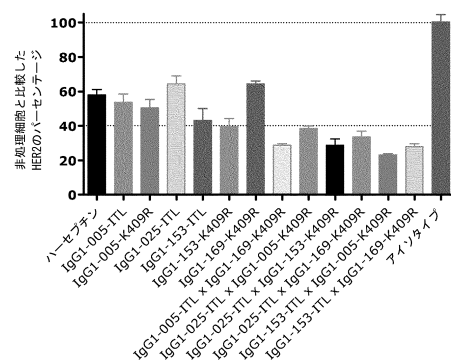
【図 9 B】



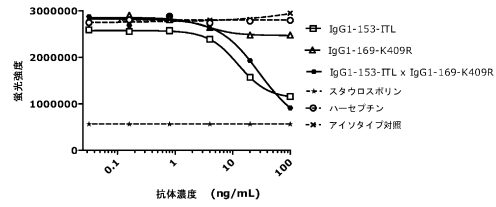
【図 9 F】



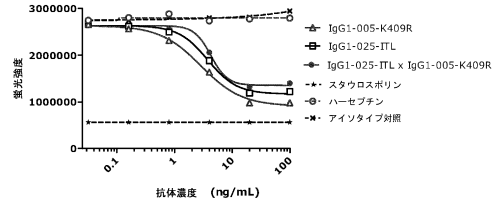
【図 10】



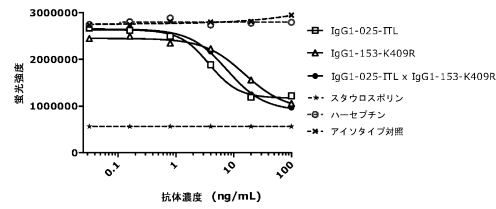
【図 9 C】



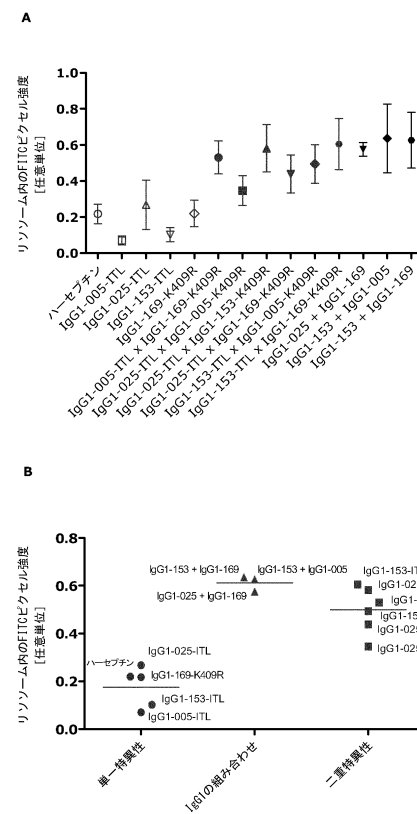
【図 9 D】



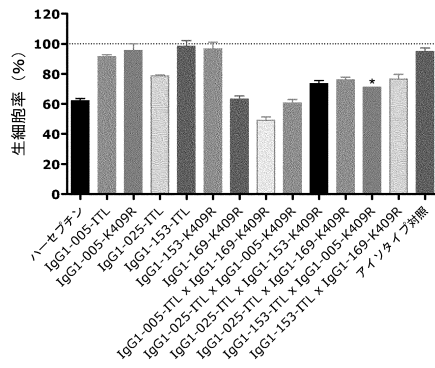
【図 9 E】



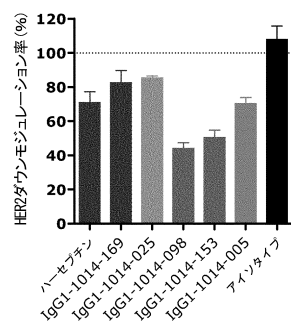
【図 11】



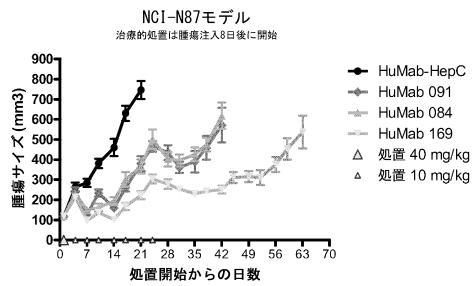
【図 1 2】



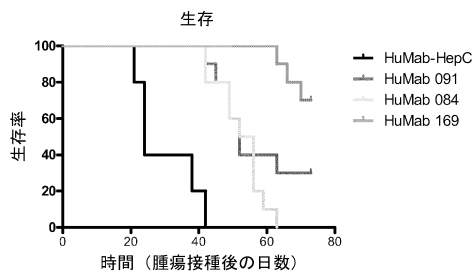
【図 1 3】



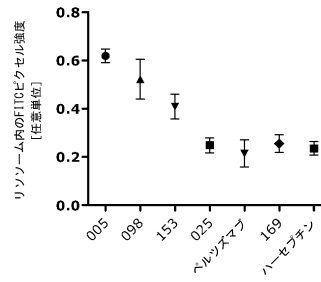
【図 1 6 A】



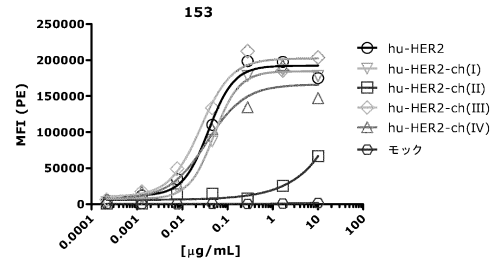
【図 1 6 B】



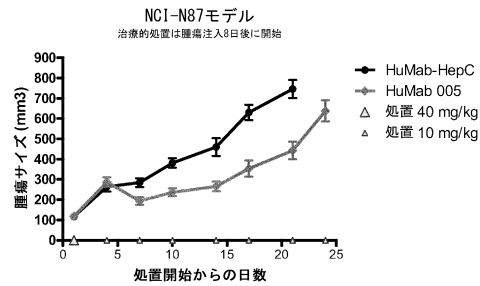
【図 1 4】



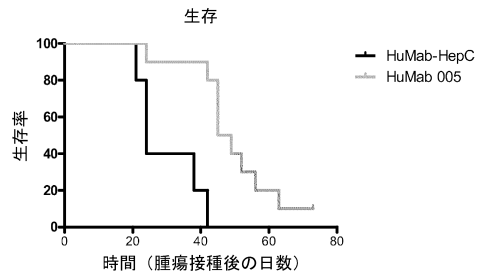
【図 1 5】



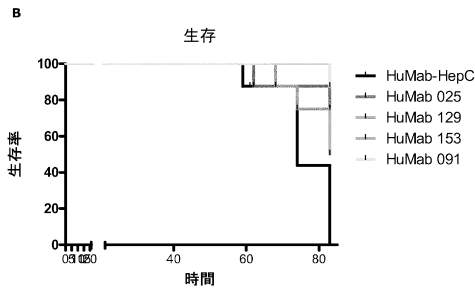
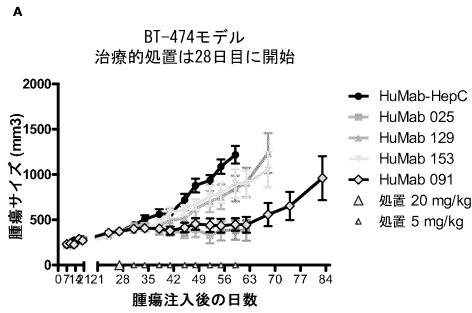
【図 1 6 C】



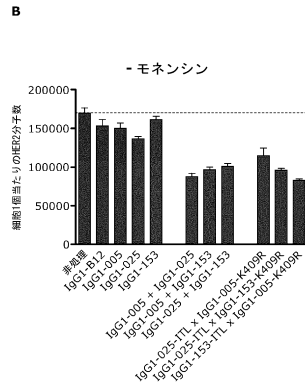
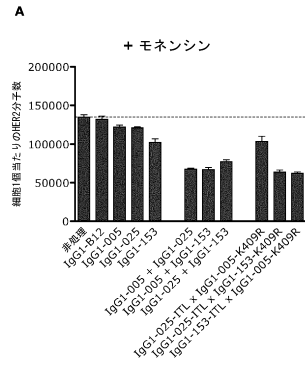
【図 1 6 D】



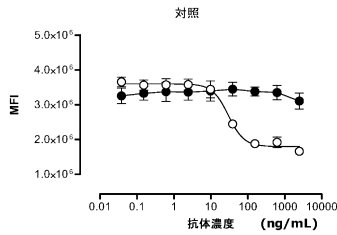
【図 17】



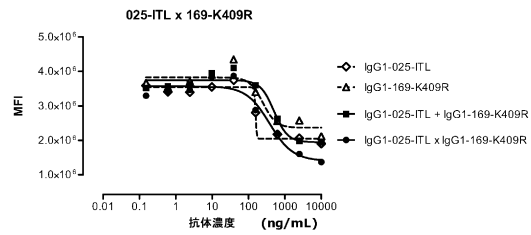
【図 18】



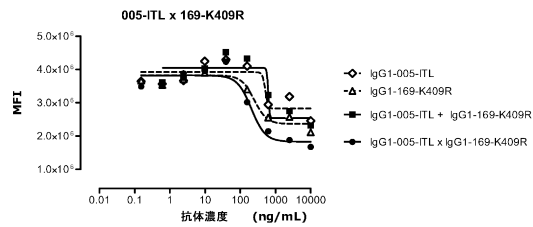
【図 19 A】



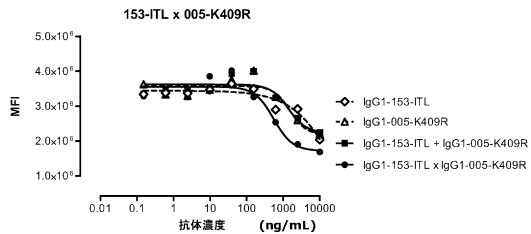
【図 19 D】



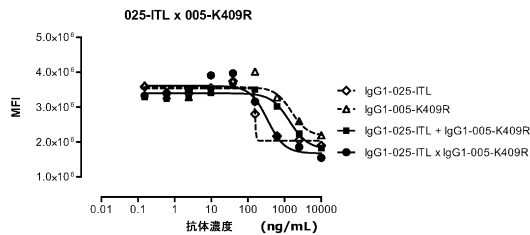
【図 19 B】



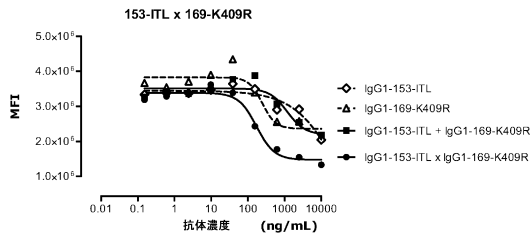
【図 19 E】



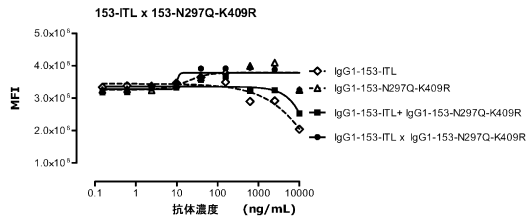
【図 19 C】



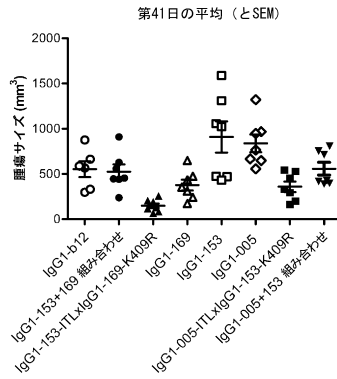
【図 19 F】



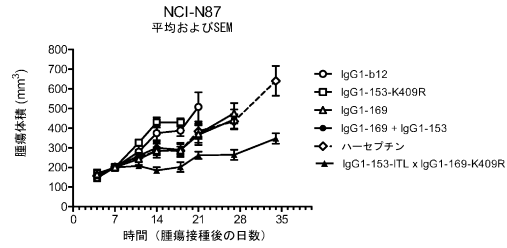
【図 19 G】



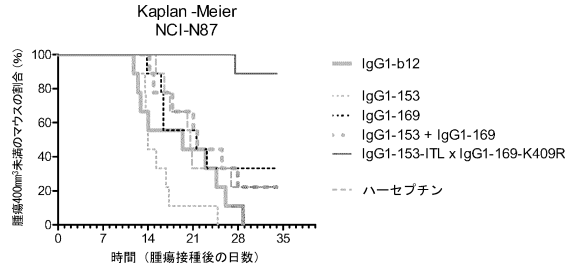
【図 20】



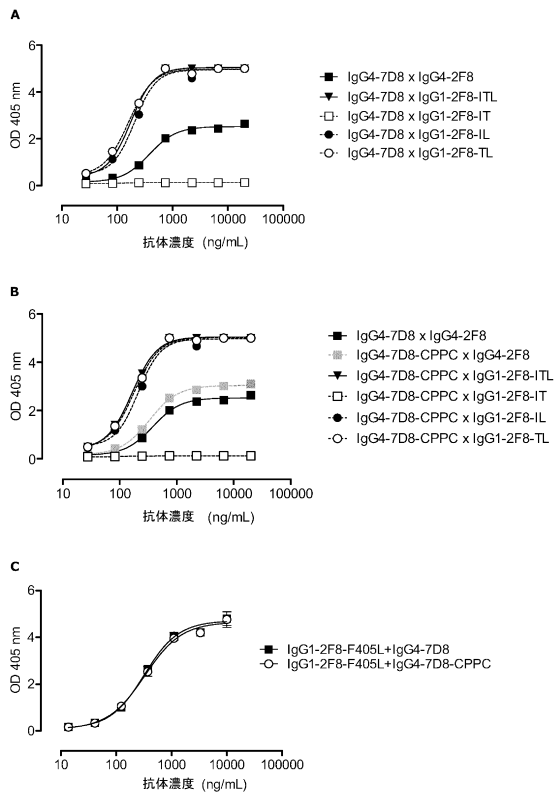
【図 21 A】



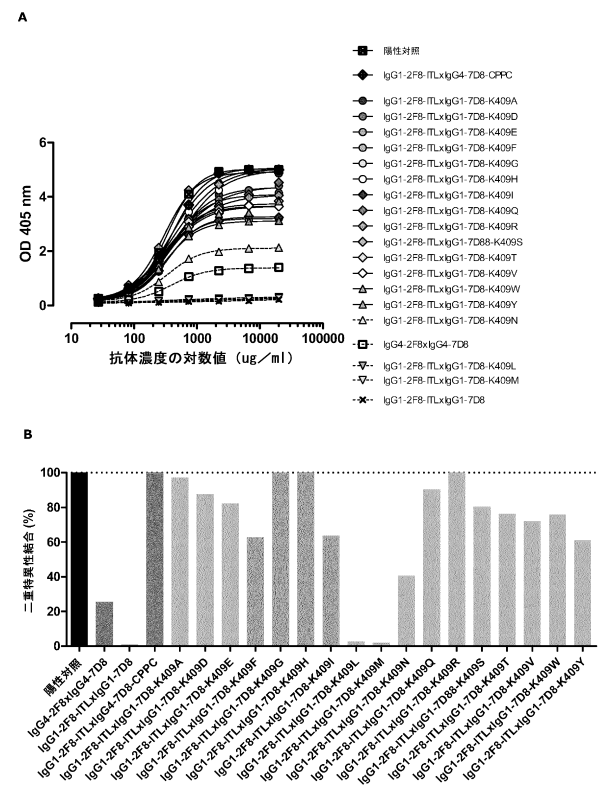
【図 21 B】



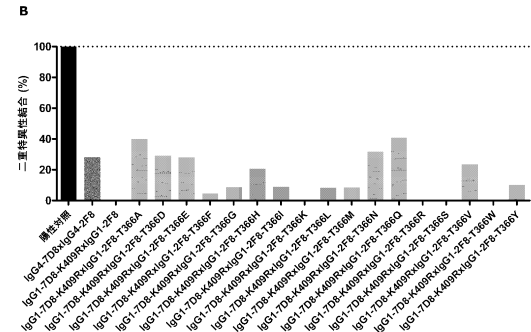
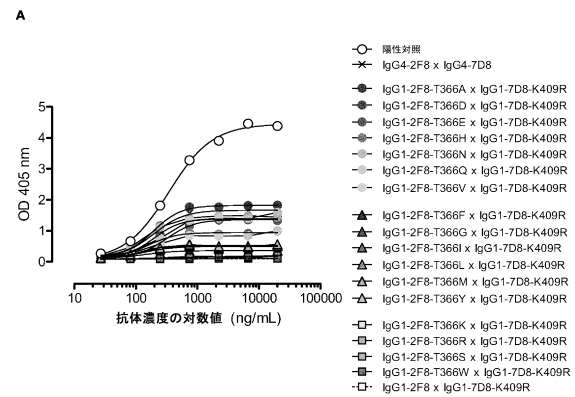
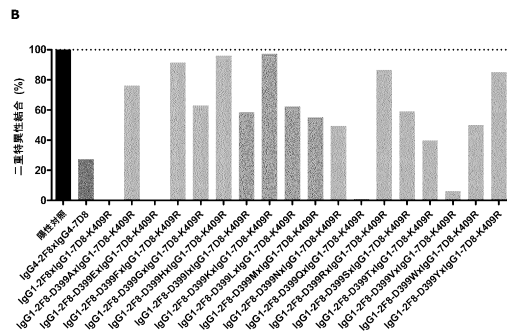
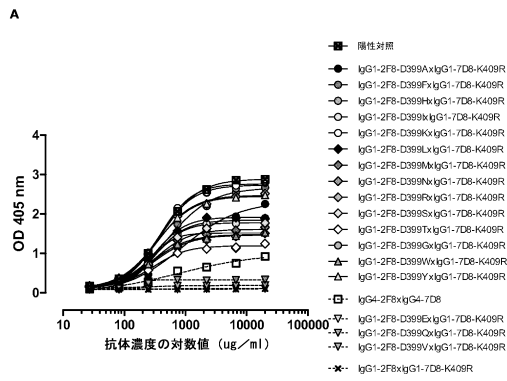
【図 22】



【図 23】



【 図 2 9 】



【配列表】

0006177231000001.app

フロントページの続き

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 K	47/66	(2017.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	51/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/66	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 K	51/10	1 0 0
			C 1 2 N	15/00	A

- (31)優先権主張番号 PCT/EP2011/058772
 (32)優先日 平成23年5月27日(2011.5.27)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 PCT/EP2011/058779
 (32)優先日 平成23年5月27日(2011.5.27)
 (33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31)優先権主張番号 PA201100822
 (32)優先日 平成23年10月27日(2011.10.27)
 (33)優先権主張国 デンマーク(DK)
 (31)優先権主張番号 61/552,267
 (32)優先日 平成23年10月27日(2011.10.27)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

- (72)発明者 デ ゴー ジ パート
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー・ブイ・内
 (72)発明者 ヴァン ベルケル パトリック
 オランダ王国 ユトレヒト デルデ ウエスターパークラーン 3 2 1
 (72)発明者 ストルメイン クリスティン
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー・ブイ・内
 (72)発明者 ラブレイン アラン フランク
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー・ブイ・内
 (72)発明者 ネイセン ヨースト ジェイ・
 オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 6 0 ゲンマブ ビー・ブイ・内
 (72)発明者 メーステルス ヨイセ アイ・

- オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 60 ゲンマブ ビー・ブイ・内
(72)発明者 パルレン パウル
オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 60 ゲンマブ ビー・ブイ・内
(72)発明者 スフルマン ジャニーヌ
オランダ王国 ユトレヒト イアレラーン 60 ゲンマブ ビー・ブイ・内

審査官 伊藤 良子

- (56)参考文献 国際公開第2009/154651(WO, A1)
国際公開第2010/066803(WO, A1)
国際公開第2007/108152(WO, A1)
国際公開第2010/002862(WO, A1)
特表2005-503768(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00
C12N 15/00 - 15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed