(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2022-540610
(P2022-540610A)
(43)公表日　令和4年9月16日(2022.9.16)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13	ZNA	4B065
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4C084
C07K 16/30 (2006.01)		C07K	16/30		4C085
C07K 16/46 (2006.01)		C07K	16/46		4H045
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全198頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-501132(P2022-501132)
(86)(22)出願日　令和2年7月10日(2020.7.10)
(85)翻訳文提出日　令和4年3月8日(2022.3.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2020/069561
(87)国際公開番号　WO2021/009047
(87)国際公開日　令和3年1月21日(2021.1.21)
(31)優先権主張番号　19186135.0
(32)優先日　令和1年7月12日(2019.7.12)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　306021192
エフ・ホフマン－ラ・ロシュ・アクチェンゲゼルシャフト
スイス、ツェハー－４０７０バーゼル、グレンツァッハーシュトラーセ１２４番
(74)代理人　110002077園田・小林弁理士法人
(72)発明者　ウマーニャ， パブロ
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １０， シー／オー ロッシュ グリクアート アーゲー
(72)発明者　イムホフ－ユング， ザビーネ
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク，ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　がん細胞に結合し、放射性核種を前記細胞にターゲティングする抗体

(57)【要約】
本発明は、標的細胞上の抗原に結合し、放射性核種を前記細胞にターゲティングする抗体、およびこの抗体を使用する方法に関する。
【選択図】図１

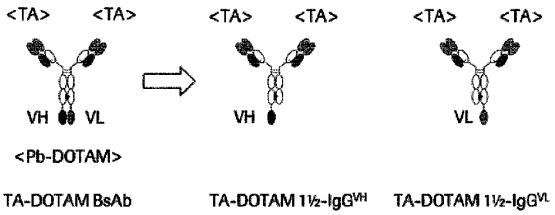


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ）標的細胞の表面上で発現される抗原に結合する第１の抗体であって、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインをさらに含むが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない、第１の抗体；および
ｉｉ）標的細胞の表面上で発現される前記抗原に結合する第２の抗体であって、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインをさらに含むが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まない、第２の抗体
を含み；
第１の抗体の前記ＶＨドメインおよび第２の抗体の前記ＶＬドメインが、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、
抗体のセット。
【請求項２】
第１の抗体および第２の抗体が、各々、ｉ）標的細胞の表面上で発現される前記抗原に特異的な抗原結合部位を含む抗体断片、およびｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインを含む、請求項１に記載の抗体のセット。
【請求項３】
抗体断片が、少なくとも１つのＦｖ断片、ｓｃＦｖ断片、もしくはＦａｂ断片、または交差Ｆａｂ断片から選択される、請求項２に記載の抗体のセット。
【請求項４】
第１の抗体が、
ａ）前記抗原に結合するＦａｂ断片、ならびに
ｂ）
ｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または
ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、放射標識化合物に対する抗原結合部位の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＨドメインのＮ末端により、Ｆａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含むか、またはこれらからなり、
第２の抗体が、
ｃ）前記抗原に結合するＦａｂ断片、ならびに
ｄ）
ｉｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または
ｉｖ）ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、放射標識化合物に対する抗原結合部位の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＬドメインのＮ末端により、Ｆａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含むか、またはこれらからなり、
（ｂ）のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および（ｄ）のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、
請求項３に記載の抗体のセット。
【請求項５】
（ｂ）のポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して（ａ）のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しており；（ｄ）のポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して（ｃ）のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合している、請求項４に記載

の抗体のセット。
【請求項６】
第１の抗体が、
ａ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が各々、前記抗原の同じエピトープに結合し、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続しており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続している、タンデムＦａｂ；ならびに
ｂ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または
ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体定常ドメイン（ＣＨ１）
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＨドメインのＮ末端により、第２のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含み；
第２の抗体が、
ｃ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が各々、前記抗原の同じエピトープに結合し、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続しており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続している、タンデムＦａｂ；ならびに
ｄ）
ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または
ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＬドメインのＮ末端により、第２のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含み、
（ｂ）のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および（ｄ）のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、
請求項３に記載の抗体のセット。
【請求項７】
（ｂ）のポリペプチドが、ＶＨドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して（ａ）の第２のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しており；（ｄ）のポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して（ｃ）の第２のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合している、請求項６に記載の抗体のセット。
【請求項８】
第１の抗体が、
ａ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端により、ペプチドテザーを介して第２の断片のＮ末端に接続しており、第１の断片が、前記抗原の第１のエピトープに結合し、第２の断片が、前記抗原の第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方が交差Ｆａｂである、タンデムＦａｂ；
ｂ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または
ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、

ＶＨドメインのＮ末端により、第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含み；
第２の抗体が、
ｃ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端により、第２の断片のＮ末端に接続しており、第１の断片が、前記抗原の第１のエピトープに結合し、第２の断片が、前記抗原の第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方が交差Ｆａｂである、タンデムＦａｂ；ならびに
ｄ）
ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または
ｉｉ）ＶＬドメインのＣ末端が軽鎖定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＬドメインのＮ末端により、第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含み；
（ｂ）のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および（ｄ）のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、
請求項３に記載の抗体のセット。
【請求項９】
（ｂ）のポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して（ａ）の第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合しており；（ｄ）のポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して（ｃ）の第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合している、請求項８に記載の抗体のセット。
【請求項１０】
第１の抗体および第２の抗体が、各々、Ｆｃドメインをさらに含む、請求項１から３のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項１１】
第１の抗体および第２の抗体が、各々、ｉ）標的細胞の表面上で発現される前記抗原に特異的な抗原結合部位を含む抗体断片、ｉｉ）Ｆｃ領域、およびｉｉｉ）Ｆｃ領域に融合している、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインを含む、請求項１０に記載の抗体のセット。
【請求項１２】
Ｆｃドメインが、エフェクター機能を低減するか、または消失させるように修飾される、請求項１０または１１に記載の抗体のセット。
【請求項１３】
第１の抗体が、
ｉ）完全軽鎖断片；
ｉｉ）完全重鎖；
ｉｉｉ）Ｆｄを欠くさらなるＦｃ鎖；および
ｉｖ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド
を含むか、またはこれらからなり；
（ｉ）の軽鎖および（ｉｉ）の重鎖が、併せて、前記抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドが、そのＮ末端により、（ｉｉ）または（ｉｉｉ）のＣ末端に融合しており；
第２の抗体が、

ｖ）完全軽鎖断片；
ｖｉ）完全重鎖；
ｖｉｉ）Ｆｄを欠くさらなるＦｃ鎖；および
ｖｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド
を含むか、またはこれらからなり；
（ｖ）の軽鎖および（ｖｉ）の重鎖が、併せて、前記抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドが、そのＮ末端により、（ｖｉ）または（ｖｉｉ）のＣ末端に融合しており；
（ｉｖ）のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および（ｖｉｉｉ）のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）が、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、
請求項１０から１２のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項１４】
（ｉｖ）のポリペプチドが、そのＮ末端により、リンカーを介して、（ｉｉ）または（ｉｉｉ）のＣ末端に融合しており；（ｖｉｉｉ）のポリペプチドが、そのＮ末端により、リンカーを介して、（ｖｉ）または（ｖｉｉ）のＣ末端に融合している、請求項１３に記載の抗体のセット。
【請求項１５】
第１の抗体および第２の抗体の各々が、ａ）Ｆｃドメイン、ｂ）標的抗原に対する抗原結合部位を含む、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、または交差Ｆａｂ断片など、少なくとも１つの抗体断片、およびｃ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインを含むポリペプチドを含み、（ｂ）の抗体断片のＣ末端が、Ｆｃドメインの一方の鎖のＮ末端に融合しており、（ｃ）のポリペプチドのＣ末端が、Ｆｃドメインの他方の鎖のＮ末端に融合している、請求項１０から１２のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項１６】
第１の抗体が、
ｉ）完全軽鎖；
ｉｉ）完全重鎖；
ｉｉｉ）さらなるＦｃ鎖；および
ｉｖ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド
を含み；
（ｉ）の軽鎖および（ｉｉ）の重鎖が、併せて、標的抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドが、そのＣ末端により、リンカーを介して、（ｉｉｉ）のＮ末端に融合しており；
第２の抗体が、
ｖ）完全軽鎖；
ｖｉ）完全重鎖；
ｖｉｉ）さらなるＦｃ鎖；および
ｖｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド
を含み；
（ｖ）の軽鎖および（ｖｉ）の重鎖が、併せて、標的抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドが、そのＣ末端により、リンカーを介して、（ｖｉｉ）のＮ末端に融合している、
請求項１５に記載の抗体のセット。

【請求項１７】
ｉ）第１の抗体が、配列番号１１２の第１の重鎖、配列番号１１４の第２の重鎖、および配列番号１１５の軽鎖を含み；
ｉｉ）第２の抗体が、配列番号１１２の第１の重鎖、配列番号１１３の第２の重鎖、および配列番号１１５の軽鎖を含む、
請求項１６に記載の抗体のセット。
【請求項１８】
第１の抗体が、
ａ）２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる第１の完全長抗体であって、完全長抗体の少なくとも１つのアームが前記抗原に結合する、第１の完全長抗体；ならびに
ｂ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または
ｉｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体定常ドメイン（ＣＨ１）
からなるポリペプチドであって、
ＶＨドメインのＮ末端により、前記第１の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含み、
第２の抗体が、
ｃ）２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる第２の完全長抗体であって、抗体の少なくとも１つのアームが前記抗原に結合する、第２の完全長抗体；ならびに
ｄ）
ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または
ｉｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）
からなるポリペプチドであって、
ＶＬドメインのＮ末端により、前記第２の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含み、
（ｂ）のポリペプチドおよび（ｄ）のポリペプチドが、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、
請求項１０から１２のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項１９】
ポリペプチド（ｂ）が、ＶＨドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して前記第１の完全長抗体の、２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しており；（ｄ）のポリペプチドが、ＶＬドメインのＮ末端により、ペプチドリンカーを介して前記第２の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合している、請求項１８に記載の抗体のセット。
【請求項２０】
第１の抗体および第２の抗体の各々が、前記抗原について二価である、請求項１８または１９に記載の抗体のセット。
【請求項２１】
完全長抗体の両方のアームが、前記抗原の同じエピトープに結合する、請求項２０に記載の抗体のセット。
【請求項２２】
第１の抗体および第２の抗体の各々が、前記抗原について二重パラトープ性である、請求項１８または１９に記載の抗体のセット。
【請求項２３】
第１の抗体の２つのアームが各々、前記抗原上のエピトープに結合し、互いと異なるエピトープに結合し；第２の抗体の２つのアームが各々、前記抗原上のエピトープに結合し、互いと異なるエピトープに結合する、請求項２２に記載の抗体のセット。
【請求項２４】
放射標識化合物が、放射標識ＤＯＴＡまたはその塩もしくは機能的変異体を含む、請求

項１から２３のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項２５】
放射標識化合物が、ＬｕまたはＹの放射性同位体で放射標識されたＤＯＴＡまたはその塩もしくは機能的変異体である、請求項１から２４のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項２６】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインが、（ａ）配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項２４または２５に記載の抗体のセット。
【請求項２７】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインが、配列番号４１、または配列番号４１に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体のアミノ酸配列を含む、請求項２４から２６のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項２８】
１つまたは複数のアラニン残基が、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインのＣ末端に付加されているか、またはＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する１つまたは複数の残基が、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインのＣ末端に付加されている、請求項２７に記載の抗体のセット。
【請求項２９】
残基ＡＳＴが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインのＣ末端に付加されている、請求項２８に記載の抗体のセット。
【請求項３０】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインが、（ｄ）配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む、請求項２４から２９のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項３１】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインが、配列番号４２、または配列番号４２に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体のアミノ酸配列を含む、請求項２４から３０のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項３２】
放射標識化合物が、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを含む、請求項１から２３のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項３３】
Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的結合部位が、結合親和性についての、１００ｐＭ、５０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭもしくはこれ未満、例えば、０．９ｐＭもしくはこれ未満、０．８ｐＭもしくはこれ未満、０．７ｐＭもしくはこれ未満、０．６ｐＭもしくはこれ未満、または０．５ｐＭもしくはこれ未満のＫｄ値で結合する、請求項３２に記載の抗体のセット。
【請求項３４】
Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的結合部位が、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよびＢｉ－ＤＯＴＡＭに結合する、請求項３２または請求項３３に記載の抗体のセット。
【請求項３５】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインが、
ａ）ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧのアミノ酸配列（配列番号２）、または配列番号２内に最大で１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、これらの置換が、Ｐｈｅ５０、Ａｓｐ５６、および／またはＴｙｒ５８を含まず、任意選択でまた、

Ｇｌｙ５２および／またはＡｒｇ５４も含まない、重鎖ＣＤＲ２；
ｂ）ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬのアミノ酸配列（配列番号３）、または配列番号３内に最大で１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、これらの置換が、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８を含まず、任意選択でまた、Ａｌａ１００Ｃ、Ｔｙｒ１００Ｄ、および／もしくはＰｒｏ１００Ｅも含まず、かつ／または、任意選択でまた、Ｔｙｒ９９も含まない、重鎖ＣＤＲ３；
ならびに任意選択で、
ｃ）ＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳのアミノ酸配列（配列番号１）、または配列番号１内に最大で１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含む重鎖ＣＤＲ１
を含む、請求項３２から３４のいずれか一項に記載の抗体のセット。

【請求項３６】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインが、（ａ）ＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳのアミノ酸配列（配列番号１）を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧのアミノ酸配列（配列番号２）を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬのアミノ酸配列（配列番号３）を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む、請求項３５に記載の抗体のセット。

【請求項３７】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインが、配列番号７および配列番号９、または配列番号７または配列番号９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むこれらの変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項３２から３６のいずれか一項に記載の抗体のセット。

【請求項３８】
１つもしくは複数のアラニン残基が、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインのＣ末端に付加されているか、またはＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する１つまたは複数の残基が、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインのＣ末端に付加されている、請求項３７に記載の抗体のセット。

【請求項３９】
残基ＡＳＴが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインのＣ末端に付加されている、請求項３８に記載の抗体のセット。

【請求項４０】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインが、
ｄ）ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡのアミノ酸配列（配列番号４）、または配列番号４内に最大で１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、これらの置換がＴｙｒ２８およびＡｓｐ３２を含まない、軽鎖ＣＤＲ１；
ｅ）ＬＧＧＹＤＤＥＳＤＴＹＧのアミノ酸配列（配列番号６）、または配列番号６内に最大で１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、これらの置換がＧｌｙ９１、Ｔｙｒ９２、Ａｓｐ９３、Ｔｈｒ９５ｃ、およびＴｙｒ９６を含まない、軽鎖ＣＤＲ３
ならびに任意選択で、
ｆ）ＱＡＳＫＬＡＳのアミノ酸配列（配列番号５）、または配列番号５内に少なくとも１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、任意選択でＧｌｎ５０を含まない軽鎖ＣＤＲ２
を含む、請求項３２から３９のいずれか一項に記載の抗体のセット。

【請求項４１】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインが、（ｄ）ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡのアミノ酸配列（配列番号４）を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）ＱＡＳＫＬＡＳのアミノ酸配列（配列番号５）を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）ＬＧＧＹＤＤＥＳＤＴＹＧのアミノ酸配列（配列番号６）を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む、請求項４０に記載の抗体のセット。

【請求項４２】
放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインが、配列番号８、または配列番号８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体のアミノ酸配列を含む、請求項３２から４１のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項４３】
第１の抗体および第２の抗体が、標的細胞の表面上で発現される抗原の同じエピトープに結合する、請求項１から４２のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項４４】
第１の抗体が、第２の抗体と異なる抗原のエピトープに結合する、請求項１から４２のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項４５】
標的細胞の表面上で発現される抗原が、腫瘍関連抗原である、請求項１から４４のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項４６】
標的細胞の表面上で発現される抗原が、がん胎児性抗原（ＣＥＡ）、ＣＤ２０、ＨＥＲ２、ＥＧＰ－１（トロホブラスト２としてもまた公知の上皮糖タンパク質１）、結腸特異的抗原ｐ（ＣＳＡｐ）、膵ムチンＭＵＣ１、ＧＰＲＣ５Ｄ、およびＦＡＰからなる群から選択される、請求項１から４５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項４７】
標的細胞の表面上で発現される抗原が、ＣＥＡ、ＧＰＲＣ５Ｄ、およびＦＡＰからなる群から選択される、請求項１から４６のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項４８】
ｉ）第１の抗体が、配列番号１０４の第１の重鎖、配列番号１０６の第２の重鎖であって、配列番号１０６のＣ末端アラニンが、任意選択であり存在しなくてもよく、代替的Ｃ末端伸長で置きかえられていてもよい、第２の重鎖、および配列番号１０７の軽鎖を含み；
ｉｉ）第２の抗体が、配列番号１０４の第１の重鎖、配列番号１０５の第２の重鎖、および配列番号１０７の軽鎖を含む、
請求項４７に記載の抗体のセット。
【請求項４９】
ｉ）第１の抗体が、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１１０の第２の重鎖であって、配列番号１１０のＣ末端アラニンが、任意選択であり存在しなくてもよく、代替的Ｃ末端伸長で置きかえられていてもよい、第２の重鎖、および配列番号１１１の軽鎖を含み；
ｉｉ）第２の抗体が、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１０９の第２の重鎖、および配列番号１１１の軽鎖を含む、
請求項４７に記載の抗体のセット。
【請求項５０】
標的細胞の表面上で発現される抗原が、ＣＥＡである、請求項１から４７のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項５１】
第１の抗体が、
（ａ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに
（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域
を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０に記載の抗体のセット。

【請求項５２】
第１の抗体が、配列番号２５、または配列番号２５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から５１のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項５３】
第１の抗体が、配列番号２６、または配列番号２６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から５２のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項５４】
第１の抗体が、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに（ｄ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０に記載の抗体のセット。
【請求項５５】
第１の抗体が、配列番号４９、または配列番号４９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０または５４に記載の抗体のセット。
【請求項５６】
第１の抗体が、配列番号５０、または配列番号５０に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０、５４、または５５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項５７】
第１の抗体が、
（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに
（ｄ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域
を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０に記載の抗体のセット。
【請求項５８】
第１の抗体が、配列番号１７、または配列番号１７に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０または５７に記載の抗体のセット。
【請求項５９】
第１の抗体が、配列番号１８、または配列番号１８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０、５７、または５８のいずれか一項に記載の抗体のセット。

【請求項６０】
第１の抗体が、
（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに
（ｄ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域
を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０に記載の抗体のセット。
【請求項６１】
第１の抗体が、配列番号６５、または配列番号６５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、その変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０または請求項６０に記載の抗体のセット。
【請求項６２】
第１の抗体が、配列番号６６、または配列番号６６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０、６０、または６１のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項６３】
第１の抗体が、（ａ）配列番号１５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１５７、または１５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに（ｄ）配列番号１６０、１６１、または１６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号１６３、１６４、または１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０に記載の抗体のセット。
【請求項６４】
第１の抗体が、配列番号１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、もしくは１７４、またはこれらに対して、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；および配列番号１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、もしくは１８０、またはこれらに対して、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０または６３に記載の抗体のセット。
【請求項６５】
第１の抗体が、
（ａ）配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｂ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｃ）配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｄ）配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｅ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または
（ｆ）配列番号１７１のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｇ）配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン
を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０、６３、または６４のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項６６】
第２の抗体が、
（ａ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに
（ｄ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域
を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項６７】
第２の抗体が、配列番号２５、または配列番号２５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、その変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６６のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項６８】
第２の抗体が、配列番号２６、または配列番号２６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６７のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項６９】
第２の抗体が、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに（ｄ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７０】
第２の抗体が、配列番号４９、または配列番号４９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５または６９のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７１】
第２の抗体が、配列番号５０、または配列番号５０に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５、６９、または７０のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７２】
第２の抗体が、
（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに

（ｄ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域
を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７３】
第２の抗体が、配列番号１７、または配列番号１７に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５または７２のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７４】
第２の抗体が、配列番号１８、または配列番号１８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５、７２、または７３のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７５】
第２の抗体が、
（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに
（ｄ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域
を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７６】
第２の抗体が、配列番号６５、または配列番号６５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＨ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５または７５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７７】
第２の抗体が、配列番号６６、または配列番号６６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＶＬ配列を含むＣＥＡに対する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５、７５、または７６のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７８】
第２の抗体が、（ａ）配列番号１５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１５７、または１５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域；ならびに（ｄ）配列番号１６０、１６１、または１６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号１６３、１６４、または１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項７９】
第２の抗体が、配列番号１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、もしくは１７４、またはこれらに対して、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、また

は９９％の同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；および配列番号１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、もしくは１８０、またはこれらに対して、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、または９９％の同一性を有する配列から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５または７８のいずれか一項に記載の抗体のセット。

【請求項８０】

第２の抗体が、

（ａ）配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｂ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｃ）配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｄ）配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｅ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｆ）配列番号１７１のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｇ）配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン

を含む、ＣＥＡに結合する抗原結合部位を含む、請求項５０から６５、７８、または７９のいずれか一項に記載の抗体のセット。

【請求項８１】

第１の抗体が、請求項５７から５９のいずれか一項に記載の抗体であり、第２の抗体が、請求項６６から６８のいずれか一項に記載の抗体である、請求項５０に記載の抗体のセット。

【請求項８２】

第１の抗体が、配列番号２８の第１の重鎖、配列番号３２の第２の重鎖、および配列番号３４の軽鎖を含む、請求項１に記載の抗体のセット。

【請求項８３】

１つもしくは複数のアラニン残基が、配列番号３２のＣ末端に付加されているか、またはＡＳＴの配列が、配列番号３２のＣ末端に付加されている、請求項８２に記載の抗体のセット。

【請求項８４】

第１の抗体が、配列番号５１の第１の重鎖、および配列番号５２の第２の重鎖、および配列番号５４の軽鎖を含む、請求項１に記載の抗体のセット。

【請求項８５】

１つもしくは複数のアラニン残基が、配列番号５２のＣ末端に付加されているか、またはＡＳＴの配列が、配列番号３２のＣ末端に付加されている、請求項８４に記載の抗体のセット。

【請求項８６】

第１の抗体が、配列番号８６の第１の重鎖、配列番号１１０の第２の重鎖であって、Ｃ末端のＡＳＴ残基が、任意選択であり存在しなくてもよく、代替的Ｃ末端伸長で置きかえられていてもよい、第２の重鎖、および配列番号８９の軽鎖を含む、請求項１に記載の抗体のセット。

【請求項８７】

第１の抗体が、配列番号９３の第１の重鎖、配列番号９４の第２の重鎖であって、Ｃ末端のＡＳＴ残基が、任意選択であり存在しなくてもよく、代替的Ｃ末端伸長で置きかえら

れていてもよい、第２の重鎖、および配列番号９６の軽鎖を含む、請求項１に記載の抗体のセット。
【請求項８８】
第２の抗体が、配列番号３０の第１の重鎖、配列番号３３の第２の重鎖、および配列番号３４の軽鎖を含む、請求項１または８２から８７のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項８９】
第２の抗体が、配列番号５５の第１の重鎖、および配列番号５６の第２の重鎖、および配列番号５８の軽鎖を含む、請求項１または８２から８７のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項９０】
第２の抗体が、配列番号８３の第１の重鎖、および配列番号８４の第２の重鎖、および配列番号８９の軽鎖を含む、請求項１または８２から８７のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項９１】
第２の抗体が、配列番号９０の第１の重鎖、および配列番号９１の第２の重鎖、および配列番号９６の軽鎖を含む、請求項１または８２から８７のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項９２】
請求項１から９１のいずれか一項に記載の抗体のセットを発現する核酸のセット。
【請求項９３】
請求項９２に記載の核酸のセットを含む、発現ベクターまたは発現ベクターのセット。
【請求項９４】
請求項９３に記載の発現ベクターまたは発現ベクターのセットを含む、宿主細胞または宿主細胞のセット。
【請求項９５】
放射免疫療法をプレターゲティングする方法であって、
ｉ）対象に、請求項１から９１のいずれか一項に記載の抗体のセットを投与することであり、第１の抗体および第２の抗体が、いずれかの順序で、同時に、または逐次的に投与され、抗体が、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化し；第１の抗体と第２の抗体との会合が、放射標識化合物に対する機能的結合部位を形成する、請求項１から９１のいずれか一項に記載の抗体のセットを投与すること；
ならびに
ｉｉ）続いて、放射標識化合物に対する機能的結合部位に結合する放射標識化合物を投与すること
を含む方法。
【請求項９６】
除去剤またはブロッキング剤を投与する工程を含まない、請求項９５に記載の方法。
【請求項９７】
対象が、ヒトである、請求項９５または９６に記載の方法。
【請求項９８】
標的抗原が、がん関連抗原または腫瘍関連抗原であり、腫瘍またはがんに対する放射免疫療法である、請求項９５から９７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９９】
請求項９５から９８のいずれか一項に記載の放射免疫療法をプレターゲティングする方法における使用のための請求項１から９１のいずれか一項に記載の抗体のセット。
【請求項１００】
放射線イメージングのために、放射性同位体を組織または臓器にターゲティングする方法であって、
ｉ）対象に、請求項１から９１のいずれか一項に記載の抗体のセットを投与することで

あり、第１の抗体および第２の抗体が、いずれかの順序で、同時に、または逐次的に投与され、抗体が、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化し；第１の抗体と、第２の抗体との会合が、放射標識化合物に対する機能的結合部位を形成する、請求項１から９１のいずれか一項に記載の抗体のセットを投与すること；
ならびに
ｉｉ）続いて、放射標識化合物に対する機能的結合部位に結合する放射標識化合物を投与すること
を含む方法。
【請求項１０１】
除去剤またはブロッキング剤を投与する工程を含まない、請求項１００に記載の方法。
【請求項１０２】
イメージングする工程をさらに含む、請求項１００または１０１に記載の方法。
【請求項１０３】
標的抗原が、がん関連抗原または腫瘍関連抗原であり、腫瘍またはがんをイメージングする方法である、請求項１０２に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、標的細胞上の抗原に結合し、放射性核種を前記細胞にターゲティングする抗体、およびこの抗体を使用する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
モノクローナル抗体は、薬物をがん細胞にターゲティングするために開発された。毒性薬剤を、腫瘍関連抗原に結合する抗体にコンジュゲートすることにより、周囲組織への損傷を低減した、より特異的な腫瘍殺滅をもたらす、潜在的可能性が存在する。
【０００３】
プレターゲティング放射免疫療法（ＰＲＩＴ）では、一方では、腫瘍関連抗原に対する親和性を有し、他方では、放射標識化合物に対する親和性を有する、抗体コンストラクトが使用される。第１の工程では、抗体が投与され、腫瘍に局在化する。その後、放射標識化合物が投与される。放射標識化合物は、低分子であるため、腫瘍に、迅速に送達され、急速に除去される可能性があり、これにより、腫瘍の外部における照射への曝露量を低減する（Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇら、Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ、２０１２、２（５）、５２３～５４０）。同様の手順はまた、イメージングのためにも使用されうる。プレターゲティングは、二重特異性抗体またはアビジン－ビオチンを使用するシステムを使用しうるが、後者は、アビジン／ストレプトアビジンが、免疫原性であることの欠点を有する。
【０００４】
プレターゲティング放射免疫療法またはイメージングは、一般に、抗体を投与する工程と、放射標識化合物を投与する工程との間に投与される、除去剤またはブロッキング剤を使用する。目的は、抗体を、血液から除去し、かつ／または放射標識化合物に対する循環抗体の結合部位をブロックすることである（例えば、Ｋａｒａｃａｙら、Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．、１３（５）、１０５４～１０７０（２００２）を参照されたい）。除去剤またはブロッキング剤の使用は、有害な毒性を制限しながら、効率的な処置に十分なレベルの放射能が投与されることを可能とするが、タイミングおよび投与量を、注意して選び出さなければならない。したがって、除去相の使用は、プレターゲティング法における複雑な側面である。
【発明の概要】
【０００５】
本発明は、プレターゲティング法において有用な抗体のセット、およびこの抗体を使用する方法を提供する。
【０００６】

一態様では、本発明は、
ｉ）標的細胞の表面上で発現される抗原に結合する第１の抗体であって、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインをさらに含むが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない、第１の抗体；および
ｉｉ）標的細胞の表面上で発現される抗原に結合する第２の抗体であって、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインをさらに含むが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まない、第２の抗体
を含み；
第１の抗体の前記ＶＨドメインおよび第２の抗体の前記ＶＬドメインが、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、
抗体のセットを提供する。

【０００７】

第１の抗体も第２の抗体も、それら自体の上に、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を含まない。第１の抗体は、放射標識化合物に対する機能的結合部位に由来するＶＨドメインだけを有し、ＶＬドメインを有さない。第２の抗体は、ＶＬドメインだけを有し、ＶＨドメインを有さない。

【０００８】

放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位は、第１の抗体のＶＨドメインと、第２の抗体のＶＬドメインとが会合している場合に形成される。これは、例えば、第１の抗体と、第２の抗体とが、同じ個別の標的細胞または隣接細胞に結合している場合に生じうる。

【０００９】

本明細書では、本明細書で記載される第１の抗体および第２の抗体は、「単一ドメインスプリット抗体」、「スプリット抗体」、または「デミボディー」と称されうる。併せて、放射標識化合物に結合することが可能な抗原結合部位を形成する、ＶＨドメインと、ＶＬドメインとは、２つの抗体の間に分配され、同じ抗体の一部として存在しない。

【００１０】

スプリットドメインフォーマットとは、放射標識化合物が、それ自体の上における第１の抗体、またはそれ自体の上における第２の抗体に結合しえないことを意味する。血中では、第１の抗体と第２の抗体との間で、安定的な会合が、ほとんどまたは全くなされないので、放射標識化合物への安定的な結合も、ほとんどまたは全くなされない。

【００１１】

本明細書では、標的細胞の表面上で発現される抗原は、「標的抗原」または「ＴＡ」と称されうる。本発明に従い、上記で記載された、第１の抗体および第２の抗体は、同じ標的抗原に対する結合部位を有する（疑義を回避するために、抗体が、同じ標的抗原に結合すると言明される場合、これは、抗体が、同じ標的抗原に結合することが可能な結合部位を有することを意味し、抗体が、互いと同じである、２つの個別の抗原分子に結合しうる可能性を含む）。例えば、一実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の両方は、ＣＥＡに結合する。

【００１２】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、標的抗原の同じエピトープに結合しうる（これらに対する結合部位を有する）。他の実施形態では、第１の抗体は、標的抗原の、第２の抗体と異なるエピトープに結合しうる（これらに対する結合部位を有する）。

【００１３】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、標的抗原に対する、同じ抗原結合部位を含むことができる。すなわち、第１の抗体および第２の抗体は、ＶＬ配列およびＶＨ配列を含む、標的抗原に結合することが可能な抗原結合部位を含むことができ、この抗原結合部位を形成するＶＬ配列およびＶＨ配列は、第１の抗体と第２の抗体とにおいて、同じである。

【００１４】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の各々は、標的抗原について二価である。一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、各々、エピトープについて、二価であり、かつ、単一特異性である。他の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の各々は、標的抗原について二重パラトープ性である、すなわち、第１の抗体および第２の抗体は、各々、標的抗原の２つの異なるエピトープに対する結合部位を有する。

【００１５】

一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、Ｆｃ領域を含むことが好ましい場合がある。Ｆｃ領域の存在は、放射免疫療法および放射線イメージングの文脈では、利益を有する、例えば、タンパク質の循環半減期を延長し、かつ／または小断片により観察される場合より高度の、腫瘍への取込みを結果としてもたらす。本明細書で記載される「スプリットドメイン」フォーマットは、そうでなければ、循環抗体の存在の延長に起因して生じる、放射標識化合物との会合の可能性の増大を緩和するので、この文脈では、特に有利でありうる。

【００１６】

一部の実施形態では、Ｆｃドメインは、エフェクター機能を低減するか、または消失させるように修飾される。

【００１７】

別の態様では、本発明は、本明細書で記載される抗体のセットを含む薬学的組成物を提供する。別の態様では、本発明は、各々が、本明細書で記載される抗体のうちの１つ（すなわち、第１の抗体および第２の抗体のそれぞれ）を含む、２つの個別の薬学的組成物を含むキットを提供する。

【００１８】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で記載される抗体または抗体のセットのうちのいずれかをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットに関する。別の態様では、本発明は、前記１つまたは複数のポリヌクレオチドを含むベクターまたはベクターのセット、任意選択で、発現ベクターまたは発現ベクターのセットに関する。さらなる目的では、本発明は、本発明のベクターもしくはベクターのセットを含む、原核宿主細胞もしくは真核宿主細胞または宿主細胞のセットに関する。加えて、抗体を作製する方法であって、抗体が産生されるように、宿主細胞を培養することを含む方法が提供される。

【００１９】

一部の実施形態では、本明細書で記載される抗体は、プレターゲティング放射免疫療法（ＰＲＩＴ）、またはプレターゲティング放射線イメージング法において使用される。

【００２０】

一態様では、本発明は、

ｉ）対象に、上記で記載された第１の抗体および第２の抗体を投与すること；ならびに

ｉｉ）続いて前記対象に放射標識化合物を投与すること

を含む、プレターゲティング放射免疫療法を提供する。

【００２１】

別の態様では、本発明は、第１の抗体および第２の抗体を対象に投与すること、ならびに続いて、前記対象に放射標識化合物を投与することを含む処置法における使用のための、上記で記載された第１の抗体および第２の抗体を提供する。別の態様では、本発明は、第１の抗体および第２の抗体を対象に投与すること、ならびに続いて、前記対象に放射標識化合物を投与することを含む処置法における使用のための、上記で記載された第１の抗体を提供する。別の態様では、本発明は、第１の抗体および第２の抗体を対象に投与すること、ならびに続いて、前記対象に放射標識化合物を投与することを含む処置法における使用のための、上記で記載された第２の抗体を提供する。

【００２２】

別の態様では、本発明は、

ｉ）対象に、本明細書で記載される第１の抗体および第２の抗体を投与することであり

、抗体が、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化し、本明細書で記載される、第１の抗体および第２の抗体を投与すること；
ｉｉ）続いて、放射標識化合物を投与すること；ならびに任意選択で、
ｉｉｉ）放射性核種が局在化している組織または臓器をイメージングすること
を含む、放射線イメージング法を提供する。

【００２３】

別の態様では、本発明は、ヒトまたは動物の身体において実行される診断法であって、
ｉ）対象に、本明細書で記載される第１の抗体および第２の抗体を投与することであり、抗体が、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化し、本明細書で記載される、第１の抗体および第２の抗体を投与すること；
ｉｉ）続いて、放射標識化合物を投与すること；ならびに任意選択で、
ｉｉｉ）放射性核種が局在化している組織または臓器をイメージングすること
を含む診断法における使用のための、本明細書で記載される第１の抗体および第２の抗体を提供する。

【００２４】

イメージングする工程に続き、診断を形成する工程、および任意選択で、この診断を対象に配信する工程を行う。一部の実施形態では、方法は、適切な処置を決定すること、および任意選択で、この処置を対象に投与することをさらに含むことができる。

【００２５】

上記の方法／使用の各々では、第１の抗体および第２の抗体の、同じ標的細胞または隣接する標的細胞への結合は、放射標識化合物に対する抗原結合部位の、ＶＨドメインとＶＬドメインとの会合、および放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位の形成を結果としてもたらす。したがって、放射標識化合物の投与の後、放射標識化合物は、ＶＨとＶＬとの会合により形成される機能的抗原結合部位に結合する。

【００２６】

本明細書で記載される方法および使用のうちのいずれかでは、第１の抗体および第２の抗体は、いずれかの順序で、同時に、または逐次的に投与されうる。

【００２７】

当技術分野では、しばしば、ＰＲＩＴ法または放射線イメージング法は、除去工程を伴う。除去工程は、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、薬剤を投与することを含み、薬剤は、抗体の、血液からの除去の速度を増大させ、かつ／または放射標識化合物の、抗体への結合をブロックする。

【００２８】

本明細書で記載される方法および使用についての、ある実施形態では、方法は、除去工程を含まない。すなわち、方法は、第１の抗体および第２の抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に（すなわち、抗体の投与の後であるが、放射標識化合物の投与の前に）、除去剤またはブロッキング剤を投与する工程を含まない。別の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、任意選択の、放射性増感剤、免疫療法剤、および／または化学療法剤以外の薬剤が投与されない。別の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間で、薬剤が投与されない。

【００２９】

一部の実施形態では、本明細書で記載される抗体は、併用療法の一部として投与されうる。例えば、本明細書で記載される抗体は、１つまたは複数の放射性増感剤、免疫療法剤、および／または化学療法剤と組み合わせて投与されうる：放射性増感剤、免疫療法剤、または化学療法剤と、抗体とは、いずれかの順序で、同時に、または逐次的に投与されうる。

【００３０】

本明細書で記載される、放射線イメージング法、および放射免疫療法は、任意選択で、本明細書でさらに論じられる通りに組み合わされうる。

【００３１】
さらなる態様では、本発明は、
ｉ）本明細書で記載される、第１の抗体および第２の抗体；
ｉｉ）第１の抗体と、第２の抗体との会合により形成される抗原結合部位に結合する放射標識化合物
を含むキットを提供する。
【００３２】
任意選択で、キットは、本明細書で記載される、除去剤またはブロッキング剤を除外しうる（すなわち、これらを含まない場合がある）。
【００３３】
任意選択で、キットは、放射性増感剤、免疫療法剤、または化学療法剤をさらに含むことができる。
【００３４】
一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、同じ薬学的組成物中に存在しうる。他の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、個別の薬学的組成物中に存在しうる。一部の実施形態では、放射標識化合物は、抗体とは別個の薬学的組成物中に存在する。
【図面の簡単な説明】
【００３５】
【図１】比較例に属する、標的抗原（ＴＡ）－ＤＯＴＡＭ二重特異性抗体（ＴＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ）、および例示的な、本発明に従うＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の概略的構造を示す図である。
【図２】腫瘍細胞上の、スプリット－ＶＨ／ＶＬ　ＤＯＴＡＭ結合剤のアセンブリーを示す概略図である。ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体は、ＤＯＴＡＭ結合剤の２つのドメインがアセンブルされる標的細胞上の腫瘍抗原（ＴＡ）に結合していない限りにおいて、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに、著明には結合しないであろう。
【図３】除去剤の使用を伴う、３工程ＴＡ－ＰＲＩＴ概念の例についての概観を示す図である。
【図４】除去剤が使用されない、２工程ＴＡ－ＰＲＩＴ概念の例についての概観を示す図である。
【図５】ＣＥＡ結合能を裏付ける、スプリット抗体の、ＭＫＮ４５細胞への結合を示す図である。抗体の検出は、ヒトＩｇＧに特異的な二次抗体を使用して行う。
【図６】ＤＯＴＡＭ結合能を裏付ける、スプリット抗体の、ＭＫＮ４５細胞への結合を示す図である。抗体の検出は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＦＩＴＣを使用して行う。
【図７Ａ】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおいて実行される、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬによる２工程ＰＲＩＴのための例示的プロトコール（ｈ＝時間、ｄ＝日、ｗ＝週）を示す図である。
【図７Ｂ】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおいて実行される、３工程ＰＲＩＴ対照のための例示的プロトコール（ｈ＝時間、ｄ＝日、ｗ＝週）を示す図である。
【図８】ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ単独、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ単独、もしくは２つの相補的抗体の組合せによりプレターゲティングされるか、または標準的３工程ＰＲＩＴを使用する、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後における、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、プレターゲティング^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの生体内分布を示す図である（１ｇ当たりのＩＤ％±ＳＤ、ｎ＝４）。
【図９】ＳＣＩＤマウスにおけるＩＶ注射の後の、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬの薬物動態を示す図である。
【図１０】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、２工程（上）または３工程（下）のＣＥＡ－ＰＲＩＴを含む、プロトコール１５８の実験デザインを示す図

である。＊ＣＥＡスプリットＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂの用量は、２／４コンストラクトにおけるホール／ホール不純物について補償するように調整した。
【図１１】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウス（注射の６時間後）における、プレターゲティング^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの生体内分布を示す図である。分布は、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ、またはＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ抗体の二重パラトープの組合せによりプレターゲティングされた^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後の、腫瘍保有ＳＣＩＤマウスにおける、^{212}Ｐｂの分布である。臓器内および組織内の放射性物質の含有量は、１ｇ当たりの平均ＩＤ％±ＳＤとして表される（ｎ＝４）。
【図１２】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、１サイクルの３工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴ（上）、２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴ（中）、または１工程ＣＥＡ－ＲＩＴを含む、プロトコール１６０の実験スケジュールを示す図である。生体内分布（ＢＤ）探索例を、放射性物質注射の２４時間後に安楽死させるのに対し、有効性群におけるマウスは、維持し、終結基準に達するまで、注意深くモニタリングした。
【図１３】ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウス（注射の２４時間後）における、プレターゲティング^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ、および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭの生体内分布を示す図である。分布は、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ－プレターゲティング^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ、またはプレインキュベート^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後の、腫瘍保有ＳＣＩＤマウスにおける、^{212}Ｐｂの分布である。臓器内および組織内の放射性物質の含有量は、１ｇ当たりの平均ＩＤ％±ＳＤとして表される（ｎ＝３）。
【図１４】ＢｘＰＣ３モデルにおける、ＰＲＩＴ処置群およびコントロール（群Ａ～Ｅ）について、標準誤差を伴う腫瘍増殖平均（ｎ＝１０）を示す図である。曲線は、ｎ＜５で切断した。垂直方向の点線は、研究デザインに従う、一部の群または全ての群について、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの投与（２０μＣｉ）を指し示す。
【図１５】ＢｘＰＣ３モデルにおける、ＰＲＩＴ処置群およびコントロール（群Ａ～Ｅ）について、個別の腫瘍増殖曲線（ｎ＝１０）を示す図である。垂直方向の点線は、^{212}Ｐｂ標識化合物の投与（２０μＣｉ）を指し示す。
【図１６】ＢｘＰＣ３モデルにおいて、ＣＥＡ－ＰＲＩＴおよびＣＥＡ－ＲＩＴで処置されたマウスについて、平均体重減少（群Ａ～Ｅ、ｎ＝１０）を示す図である。曲線は、ｎ＜５で切断した。垂直方向の点線は、研究デザインに従う、一部の群または全ての群について、^{212}Ｐｂ標識化合物の投与を指し示す。
【図１７】^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後における　殺および剖検を伴う、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴを含む、プロトコール１７５の実験デザインを示す図である。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴの用量は、ホール／ホール不純物について補償するように調整した。
【図１８】ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体によりプレターゲティングされた、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後の、腫瘍保有ＳＣＩＤマウスにおける、^{212}Ｐｂの分布を示す図である（プロトコール１７５）。臓器内および組織内の放射性物質の含有量は、１ｇ当たりの平均ＩＤ％±ＳＤとして表される（ｎ＝４）。
【図１９】^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後における　殺および剖検を伴う、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴを含む、プロトコール１８５の実験デザインを示す図である。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴ（ＣＨ１Ａ１Ａ）の用量は、ホール／ホール不純物について補償するように調整した。
【図２０】ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体によりプレターゲティングされた、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後の、腫瘍保有ＳＣＩＤマウスにおける、^{212}Ｐｂの分布を示す図である（プロトコール１８５）。臓器内および組織内の放射性物質の含有量は、１ｇ当たりの平均ＩＤ％±ＳＤとして表される（ｎ＝５）。
【図２１】注射の７日後における、２つの選択されたＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍内のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対（ＶＨ抗体とＶＬ抗体との組合せ）の分布を示す

図である。ＡおよびＢは、Ｔ８４．６６をターゲティングする、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬを注射されたマウスＡ３に由来する腫瘍の切片を示し、この場合、Ａは、ＣＥＡの発現を示し、Ｂは、対応するＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬの分布を示す。ＣおよびＤは、ＣＨ１Ａ１Ａをターゲティングする、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬを注射されたマウスＣ５に由来する腫瘍の切片を示し、この場合、Ｃは、ＣＥＡの発現を示し、Ｄは、対応するＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬの分布を示す。

【図２２】^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後における　殺および剖検を伴う、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴを含む、プロトコール１８９の実験デザインを示す図である。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴ（ＣＨ１Ａ１Ａ）の用量は、ホール／ホール不純物について補償するように調整した。

【図２３】ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の二重パラトープ対（Ｔ８４．６６およびＣＨ１Ａ１Ａ）によりプレターゲティングされた、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後の、腫瘍保有ＳＣＩＤマウスにおける、^{212}Ｐｂの、ポジティブコントロール（ＣＨ１Ａ１Ａだけ）と比較した分布を示す図である。臓器内および組織内の放射性物質の含有量は、１ｇ当たりの平均ＩＤ％±ＳＤとして表される。

【図２４】スプリット抗体について、ＦＡＣＳにより決定される、平均値蛍光強度（ＭＦＩ）を示す図である。ＦＡＣＳにより決定されるＰｂ－ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣの結合は、両方のスプリット抗体の、Ｐｂ－ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣとのコインキュベーションだけについて示されうる。単一のスプリット抗体は、著明なシグナルをもたらさなかった。

【図２５Ａ－Ｃ】本明細書で記載される抗体の例示的フォーマットを示す図である。

【図２６】チップ上において捕捉されたビオチン化ＤＯＴＡＭへの、個別のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体、およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体の結合について評価する、実施例１１の実験１からの結果を示す図である。

【図２７】チップ上において捕捉された、個別のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体、およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体への、ＤＯＴＡＭの結合について評価する、実施例１１の実験２からの結果を示す図である。

【図２８】チップ上において捕捉されたＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体（抗体対）への、ＤＯＴＡＭの結合について評価する、実施例１１の実験３からの結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

Ｉ．定義

本明細書の目的のための「ヒトアクセプターフレームワーク」は、下記で規定される通り、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）フレームワーク、または重鎖可変ドメイン（ＶＨ）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」ヒトアクセプターフレームワークは、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークの、同じアミノ酸配列を含むことができ、アミノ酸配列変化を含有する場合もある。一部の態様では、アミノ酸変化の数は、１０もしくはこれ未満、９もしくはこれ未満、８もしくはこれ未満、７もしくはこれ未満、６もしくはこれ未満、５もしくはこれ未満、４もしくはこれ未満、３もしくはこれ未満、または２もしくはこれ未満である。一部の態様では、ヒトＶＬアクセプターフレームワークは、ヒト免疫グロブリンＶＬフレームワーク配列、またはヒトＶＬコンセンサスフレームワーク配列と、配列が同一である。

【００３７】

「親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原）との、非共有結合性相互作用の総合計による強度を指す。別途指示されない限り、本明細書で使用される、「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体お

よび抗原）の間における、１：１の相互作用を反映する、固有の結合親和性を指す。分子Ｘの、そのパートナーＹに対する親和性は、一般に、解離定数（ＫＤ）により表されうる。親和性は、当技術分野で公知の、本明細書で記載される方法を含む、一般的な方法により測定されうる。結合親和性を測定するための、具体的な例示的（ｉｌｌｕｓｔｒａｔｉｖｅおよびｅｘｅｍｐｌａｒｙ）方法については、以下において記載される。

【００３８】

「親和性成熟」抗体とは、１つまたは複数の相補性決定領域（ＣＤＲ）内に、このような変更を保有しない親抗体と比較して、１つまたは複数の変更を伴う抗体であって、このような変更が、抗体の、抗原に対する親和性の改善を結果としてもたらす抗体を指す。

【００３９】

「標的細胞の表面上で発現される抗原に結合する抗体」という用語は、抗体が、前記抗原のターゲティングにおいて、診断剤および／または治療剤として有用であるように、十分な親和性で、前記抗原に結合することが可能な抗体を指す。一態様では、抗体の、非類縁である、非抗原タンパク質への結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により測定される、抗体の、抗原への結合の、約１０％未満である。ある特定の態様では、標的細胞の表面上で発現される抗原に結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭもしくは≦０．００１ｎＭ（例えば、10^{-8}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（ＫＤ）を有する。抗体は、抗体が、１μＭ、またはこれ未満のＫＤを有する場合に、標的細胞の表面上で発現される抗原「に特異的に結合する」といわれる。ある特定の態様では、抗体は、異なる種に由来する前記抗原の間で保存された、前記抗原のエピトープに結合する。

【００４０】

「放射標識化合物に対する抗原結合部位」または「放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位」という用語は、抗体が、放射標識化合物を、抗体と会合させる診断剤および／または治療剤として有用であるように、十分な親和性で、放射標識化合物に結合することが可能なＶＨおよびＶＬドメインを含む抗原結合部位を指す。一態様では、抗原結合部位の、非類縁である、非抗原化合物への結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により測定される、抗体の、放射標識化合物への結合の、約１０％未満である。ある特定の態様では、放射標識化合物に結合する抗原結合部位は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭもしくは≦０．００１ｎＭ（例えば、10^{-8}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（ＫＤ）を有する。放射標識化合物に結合する抗原結合部位は、１００ｐＭ、５０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭもしくはこれ未満、例えば、０．９ｐＭもしくはこれ未満、０．８ｐＭもしくはこれ未満、０．７ｐＭもしくはこれ未満、０．６ｐＭもしくはこれ未満、または０．５ｐＭもしくはこれ未満のＫＤを有することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、放射標識化合物に、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭ、または５００ｐＭ～１ｎＭのＫｄで結合しうる。抗原結合部位は、抗原結合部位が、１μＭ、またはこれ未満のＫＤを有する場合に、放射標識化合物「に特異的に結合する」といわれる。

【００４１】

本明細書における、「抗体」という用語は、最広義において使用され、それらが、所望の抗原結合活性を呈する限りにおいて、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含むがこれらに限定されない、多様な抗体構造を包摂する。

【００４２】

「抗体断片」とは、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の部分を含むインタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例は、Ｆｖ、Ｆａｂ、交差Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）$_2$; ダイアボディー；直鎖状抗体；単鎖抗体分子（

例えば、ｓｃＦｖおよびｓｃＦａｂ）；単一ドメイン抗体（ｄＡｂ）；および抗体断片から形成される多重特異性抗体を含むがこれらに限定されない。ある特定の抗体断片の総説については、ＨｏｌｌｉｇｅｒおよびＨｕｄｓｏｎ、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２３：１１２６～１１３６（２００５）を参照されたい。したがって、「Ｆａｂ断片」という用語は、ＶＬドメインおよびＣＬドメインを含む軽鎖と、ＶＨドメインおよびＣＨ１ドメインを含む重鎖断片とを含む抗体断片を指す。「Ｆａｂ’断片」は、ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端における、抗体のヒンジ領域に由来する、１つまたは複数のシステインを含む残基の添加により、Ｆａｂ断片と異なる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける半減期を延長させる、Ｆａｂ断片およびＦ（ａｂ’）$_2$断片の考察については、米国特許第５，８６９，０４６号を参照されたい。「交差Ｆａｂ断片」または「ｘＦａｂ断片」または「クロスオーバーＦａｂ断片」という用語は、重鎖の可変領域または定常領域と、軽鎖の可変領域または定常領域とが交換されたＦａｂ断片を指す。交差Ｆａｂ断片は、軽鎖可変領域（ＶＬ）および重鎖定常領域１（ＣＨ１）から構成されるポリペプチド鎖、ならびに重鎖可変領域（ＶＨ）および軽鎖定常領域（ＣＬ）から構成されるポリペプチド鎖を含む。非対称Ｆａｂアームはまた、荷電アミノ酸突然変異または非荷電アミノ酸突然変異を、ドメイン接触面に導入して、適正なＦａｂペアリングを方向付けることによっても操作されうる。例えば、ＷＯ２０１６／１７２４８５を参照されたい。

【００４３】

「単鎖可変断片」または「ｓｃＦｖ」とは、ペプチドリンカーにより接続された、抗体の重鎖（ＶＨ）および軽鎖（ＶＬ）の可変ドメインの融合タンパク質である。特に、リンカーは、１０～２５アミノ酸の短いポリペプチドであり、通例、可撓性のためのグリシンのほか、溶解度のためのセリンまたはスレオニンに富み、ＶＨのＮ末端を、ＶＬのＣ末端と接続しうるか、またはこの逆である。このタンパク質は、定常領域の除去、およびリンカーの導入にもかかわらず、元の抗体の特異性を保持する。ｓｃＦｖ断片の総説については、例えば、Ｐｌｕｅｃｋｔｈｕｎ、「Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ｏｆ　Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、１１３巻、ＲｏｓｅｎｂｕｒｇおよびＭｏｏｒｅ編（Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ）、２６９～３１５頁（１９９４）を参照されたい；また、ＷＯ９３／１６１８５；ならびに米国特許第５，５７１，８９４号および同第５，５８７，４５８号も参照されたい。

【００４４】

「ブロッキング剤」という用語は、エフェクター分子、特に、放射標識化合物の、このエフェクター分子に対する機能的結合部位への結合をブロックする薬剤を指す。一般に、前記ブロッキング剤は、エフェクター分子に対する機能的結合部位に結合する、例えば、前記機能的結合部位に特異的に結合する。

【００４５】

「除去剤」という用語は、対象の循環からの、抗体のクリアランスの速度を増大させる薬剤を指す。一般に、除去剤は、抗体に結合する、例えば、抗体に特異的に結合する。

【００４６】

本明細書で使用される「除去工程」または「除去相」という用語は、ブロッキング剤または除去剤の使用を包摂する。一部の薬剤は、除去剤およびブロッキング剤の両方として機能しうる。

【００４７】

「エピトープ」という用語は、抗体が結合する、タンパク質性または非タンパク質性である抗原上の部位を表示する。エピトープは、近接アミノ酸の連なり（直鎖状エピトープ）および、例えば、抗原のフォールディングに起因して、すなわち、タンパク質抗原の三次フォールディングにより、空間的に近接する、非近接アミノ酸（コンフォメーションエピトープ）のいずれからも形成されうる。直鎖状エピトープが、典型的に、タンパク質抗原の、変性剤への曝露の後でもなお、抗体が結合するのに対し、コンフォメーションエピトープは、典型的に、変性剤による処理時に破壊される。エピトープは、固有の空間コン

フォメーションにある、少なくとも３、少なくとも４、少なくとも５、少なくとも６、少なくとも７、または８～１０アミノ酸を含む。

【００４８】

特定のエピトープに結合する抗体（すなわち、同じエピトープに結合する抗体）についてのスクリーニングは、例えば、限定せずに述べると、アラニンスキャニング、ペプチドブロット（Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２４８（２００４）、４４３～４６３を参照されたい）、ペプチド切断解析、エピトープ切出し、エピトープ抽出、抗原の化学修飾（Ｐｒｏｔ．Ｓｃｉ．９（２０００）、４８７～４９６を参照されたい）、および交差ブロッキング（「Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、ＨａｒｌｏｗおよびＬａｎｅ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ．、ＮＹを参照されたい）など、当技術分野で常套的な方法を使用してなされうる。

【００４９】

ＭＡＰ（Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ－Ａｓｓｉｓｔｅｄ Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ）としてもまた公知のＡＳＡＰ（Ａｎｔｉｇｅｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｂａｓｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ）は、多数に由来する抗体の各々の、化学的に、または酵素的に修飾された抗原表面に対する結合プロファイルに基づき、抗原に特異的に結合する、多数のモノクローナル抗体をビニングすることを可能とする（例えば、ＵＳ２００４／０１０１９２０を参照されたい）。各ビン内の抗体は、別のビンにより表されるエピトープと顕著に異なるか、または部分的に重複する、固有のエピトープでありうる、同じエピトープに結合する。

【００５０】

また、競合的結合も、抗体が参照抗体と同じエピトープに結合するのか、結合について、参照抗体と競合するのかを容易に決定するのに使用されうる。例えば、参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて、参照抗体の、その抗原への結合を、５０％、またはこれを超えてブロックする抗体を指し、逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて、抗体の、その抗原への結合を、５０％、またはこれを超えてブロックする。また、例えば、抗体が、参照抗体と同じエピトープに結合するのかどうかを決定するために、飽和条件下で、参照抗体を抗原に結合させる。過剰量の参照抗体を除去した後で、問題の抗体が、抗原に結合する能力を評価する。問題の抗体が、参照抗体の飽和的結合の後で、抗原に結合することが可能である場合、問題の抗体は、参照抗体と異なるエピトープに結合すると結論づけられうる。しかし、問題の抗体が、参照抗体の飽和的結合の後で、抗原に結合することが可能でない場合、問題の抗体は、参照抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合しうる。問題の抗体が、同じエピトープに結合するのか、立体的理由で結合を妨げられるだけであるのかを確認するために、常套的実験（例えば、ペプチド突然変異法、およびＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリー、または当技術分野で利用可能な、他の任意の定量的抗体結合アッセイもしくは定性的抗体結合アッセイを使用する結合解析）が使用されうる。このアッセイは、２つの設定、すなわち、両方の抗体を飽和抗体とする設定で実行されるものとする。両方の設定において、第１の（飽和）抗体だけが、抗原に結合することが可能である場合、問題の抗体と、参照抗体とは、抗原への結合について競合すると結論づけられうる。

【００５１】

一部の態様では、２つの抗体は、１、５、１０、２０、または１００倍過剰量の、一方の抗体が、競合的結合アッセイ（例えば、Ｊｕｎｇｈａｎｓら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．、５０（１９９０）、１４９５～１５０２を参照されたい）において測定される通り、他方の抗体の結合を、少なくとも５０％、少なくとも７５％、少なくとも９０％、なおもしくは９９％、またはこれを超えて阻害する場合に、同じエピトープまたは重複エピトープに結合すると考えられる。

【００５２】

一部の態様では、２つの抗体は、一方の抗体の結合を低減するか、または消失させる、抗原内の、本質的に全てのアミノ酸突然変異がまた、他方の抗体の結合も低減するか、ま

たは消失させる場合に、同じエピトープに結合すると考えられる。２つの抗体は、一方の抗体の結合を低減するか、または消失させる、アミノ酸突然変異のサブセットだけが、他方の抗体の結合を低減するか、または消失させる場合に、「重複エピトープ」を有すると考えられる。

【００５３】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の供給源または種に由来する一方、重鎖および／または軽鎖の残りは、異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

【００５４】

抗体の「クラス」とは、その重鎖により保有される定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。抗体の５つの主要なクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、およびＩｇＭが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1、およびIgA_2にさらに分けられうる。ある特定の態様では、抗体は、IgG_1アイソタイプの抗体である。ある特定の態様では、抗体は、Ｆｃ領域のエフェクター機能を低減するように、Ｐ３２９Ｇ、Ｌ２３４Ａ、およびＬ２３５Ａの突然変異を伴う、IgG_1アイソタイプの抗体である。他の態様では、抗体は、IgG_2アイソタイプの抗体である。ある特定の態様では、抗体は、IgG_4抗体の安定性を改善するように、ヒンジ領域内に、Ｓ２２８Ｐ突然変異を伴う、IgG_4アイソタイプの抗体である。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ばれる。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる、２つ種類のうちの１つに割り当てられうる。

【００５５】

「エフェクター機能」とは、抗体アイソタイプと共に変動する、抗体のＦｃ領域に帰せられうる生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例は、Ｃ１ｑへの結合および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体への結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）の下方調節；およびＢ細胞活性化を含む。

【００５６】

薬剤、例えば、薬学的組成物の「有効量」とは、所望の治療結果または予防結果を達成するのに必要な投与量で、これに必要な時間にわたり有効な量を指す。

【００５７】

「タンデムＦａｂ」という用語は、ペプチドリンカー／テザーを介して接続された、２つのＦａｂ断片を含む抗体を指す。一部の実施形態では、タンデムＦａｂは、ペプチドリンカー／テザーにより接続された、１つのＦａｂ断片、および１つの交差Ｆａｂ断片を含むことができる。

【００５８】

本明細書では、「Ｆｃ領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する、免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を規定するのに使用される。「Ｆｃ領域」という用語は、天然配列によるＦｃ領域、および変異Ｆｃ領域を含む。一態様では、ヒトＩｇＧ重鎖のＦｃ領域は、重鎖のＣｙｓ２２６またはＰｒｏ２３０から、カルボキシル末端に伸びる。しかし、宿主細胞により産生される抗体は、重鎖のＣ末端に由来する、１つまたは複数のアミノ酸、特に、１つまたは２つのアミノ酸の翻訳後切断を経る場合がある。したがって、完全長重鎖をコードする、特異的な核酸分子の発現を介して、宿主細胞により産生される抗体は、完全長重鎖を含むことができ、完全長重鎖の切断型変異体を含むことができる。これは、重鎖の、最終的な２つのＣ末端アミノ酸が、グリシン（Ｇ４４６）およびリジン（Ｋ４４７；ＥＵインデックスに従う番号付け）である場合でありうる。したがって、Ｆｃ領域のＣ末端のリジン（Ｌｙｓ４４７）、またはＣ末端のグリシン（Ｇｌｙ４４６）およびリジン（Ｌｙｓ４４７）は、存在する場合もあり、存在しない場合もある。一態様では、本発明に従う抗体内に含まれる、本明細書で指定されるＦｃ領域を含む重鎖は、さら

なるＣ末端のグリシン－リジンジペプチド（Ｇ４４６およびＫ４４７；ＥＵインデックスに従う番号付け）を含む。一態様では、本発明に従う抗体内に含まれる、本明細書で指定されるＦｃ領域を含む重鎖は、さらなるＣ末端のグリシン残基（Ｇ４４６；ＥＵインデックスに従う番号付け）を含む。本明細書で別途に指定されない限り、Ｆｃ領域内または定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ、１９９１において記載されている、また、ＥＵインデックスとも呼ばれる、ＥＵ番号付けシステムに従う。

【００５９】

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

【００６０】

本明細書では、「完全長抗体」、「インタクト抗体」、および「全抗体」という用語は、天然の抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書で規定されるＦｃ領域を含有する重鎖を有する抗体を指すように、互換的に使用される。

【００６１】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性核酸が導入された細胞であって、このような細胞の子孫細胞を含む細胞を指す。宿主細胞は、初代形質転換細胞、および、継代数に関わらない、これらに由来する子孫細胞を含む、「形質転換体」および「形質転換細胞」を含む。子孫細胞は、核酸含有量において、親細胞と完全に同一ではない場合があり、突然変異を含有しうる。本明細書には、元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択される機能または生物活性と、同じ機能または生物活性を有する、突然変異体子孫細胞も含まれる。

【００６２】

「ヒト抗体」とは、ヒトもしくはヒト細胞により産生されるか、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を保有する抗体である。ヒト抗体についてのこの定義は、とりわけ、非ヒト抗原結合残基を含む、ヒト化抗体を除外する。

【００６３】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」とは、ヒト免疫グロブリンのＶＬまたはＶＨのフレームワーク配列の選択において、最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンのＶＬ配列またはＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列の亜群に由来する。一般に、配列の亜群は、Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、５版、ＮＩＨ刊行物第９１－３２４２号、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ（１９９１）、１～３巻における亜群のような亜群である。一態様では、ＶＬについて、亜群は、Ｋａｂａｔら、前出における亜群のような亜群カッパＩである。一態様では、ＶＨについて、亜群は、Ｋａｂａｔら、前出における亜群のような亜群ＩＩＩである。

【００６４】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトＣＤＲに由来するアミノ酸残基と、ヒトＦＲに由来するアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。ある特定の態様では、ヒト化抗体は、ＣＤＲの全てまたは実質的に全てが、非ヒト抗体のＣＤＲに対応し、ＦＲの全てまたは実質的に全てが、ヒト抗体のＦＲに対応する、少なくとも１つの可変ドメイン、典型的に２つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。ヒト化抗体は、任意選択で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含むことができる。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト

化形態」とは、ヒト化を経た抗体を指す。
【００６５】
本明細書で使用される「超可変領域」または「ＨＶＲ」という用語は、配列内で超可変性であり、抗原結合特異性を決定する、抗体可変ドメインの領域、例えば、「相補性決定領域」（「ＣＤＲ」）の各々を指す。
【００６６】
一般に、抗体は、６つのＣＤＲ：ＶＨ内の３つ（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、およびＶＬ内の３つ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）を含む。本明細書における例示的ＣＤＲは、
（ａ）アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）、および９６～１０１（Ｈ３）において生じる、超可変ループ（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、１９６：９０１～９１７（１９８７））；
（ｂ）アミノ酸残基２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）、８９～９７（Ｌ３）、３１～３５ｂ（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）、および９５～１０２（Ｈ３）において生じるＣＤＲ（Ｋａｂａｔら、「Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ（１９９１））；ならびに
（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ～３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）、および９３～１０１（Ｈ３）において生じる抗原接触部（ＭａｃＣａｌｌｕｍら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２～７４５（１９９６））
を含む。
【００６７】
別途指示がない限り、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔら、前出に従い決定される。当業者は、ＣＤＲの表示法はまた、Ｃｈｏｔｈｉａ、前出、ＭｃＣａｌｌｕｍ、前出、または他の任意の、学術的に許容される用語法システムに従っても決定されうることを理解するであろう。上記に代えて、本明細書で記載されるＣＤＲ－Ｈ１の配列は、例えば、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに結合する可変ドメインについて、カバット２６からカバット３５に伸びる場合もある。
【００６８】
一態様では、ＣＤＲ残基は、配列表または本明細書の別の箇所において同定されるＣＤＲ残基を含む。
【００６９】
別途指示がない限り、本明細書では、ＨＶＲ／ＣＤＲ残基および可変ドメイン（例えば、ＦＲ残基）内の他の残基は、Ｋａｂａｔら、前出に従い番号付けされる。
【００７０】
「イムノコンジュゲート」とは、細胞傷害剤を含むがこれらに限定されない、１つまたは複数の異種分子（複数可）にコンジュゲートしている抗体である。
【００７１】
「個体」または「対象」とは、哺乳動物である。哺乳動物は、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒトおよびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）を含むがこれらに限定されない。ある特定の態様では、個体または対象は、ヒトである。
【００７２】
本明細書で記載される分子は、「単離」分子でありうる。「単離」抗体とは、その天然環境の構成要素から分離された抗体である。一部の態様では、抗体は、例えば、電気泳動法（例えば、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点電気泳動法（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動）、またはクロマトグラフィー法（例えば、イオン交換または逆相ＨＰＬＣ）により決定さ

れる、９５％または９９％を超える純度まで精製される。抗体純度を評価するための方法の総説については、例えば、Ｆｌａｔｍａｎら、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．、Ｂ８４８：７９～８７（２００７）を参照されたい。

【００７３】

「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのポリマーを含む、任意の化合物および／または物質を含む。各ヌクレオチドは、塩基、具体的に、プリン塩基またはピリミジン塩基（すなわち、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、アデニン（Ａ）、チミン（Ｔ）、またはウラシル（Ｕ））、糖（すなわち、デオキシリボースまたはリボース）、およびリン酸基から構成される。核酸分子は、塩基の配列により記載され、この場合、前記塩基は、核酸分子の一次構造（直鎖状構造）を表すことが多い。塩基の配列は、典型的に、５’から３’に表される。本明細書に、核酸分子という用語は、例えば、相補性ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）およびゲノムＤＮＡ、リボ核酸（ＲＮＡ）、特に、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＤＮＡまたはＲＮＡの合成型、およびこれらの分子のうちの、２つまたはこれを超える分子を含む混合ポリマーを含むデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）を包摂する。核酸分子は、直鎖状の場合もあり、環状の場合もある。加えて、核酸分子という用語は、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方のほか、一本鎖形態および二本鎖形態の両方を含む。さらに、本明細書で記載される核酸分子は、天然に存在するヌクレオチドを含有する場合もあり、非天然ヌクレオチドを含有する場合もある。非天然ヌクレオチドの例は、糖類またはリン酸骨格連結が誘導体化された修飾ヌクレオチド塩基、または化学修飾残基を含む。核酸分子はまた、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｖｏ、例えば、宿主または患者における、本発明の抗体の直接的な発現のためのベクターとして適する、ＤＮＡ分子およびＲＮＡ分子も包摂する。このようなＤＮＡ（例えば、ｃＤＮＡ）ベクターまたはＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）ベクターは、非改変ベクターの場合もあり、改変ベクターの場合もある。例えば、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、抗体を発生させるよう、ｍＲＮＡが、対象に注入されうるように、ｍＲＮＡは、ＲＮＡベクターの安定性および／またはコードされる分子の発現を増強するように化学修飾されうる（例えば、Ｓｔａｄｌｅｒら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、２０１７、２０１７年６月１２日オンライン公開、ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｍ．４３５６またはＥＰ２１０１８２３Ｂ１を参照されたい）。

【００７４】

「単離」核酸とは、その天然環境の構成要素から分離された核酸分子を指す。単離核酸は通常、核酸分子を含有するが、核酸分子が、染色体外に存在するか、またはその天然の染色体内位置と異なる染色体内位置に存在する細胞内に含有される核酸分子を含む。

【００７５】

「抗体をコードする単離核酸」とは、抗体の重鎖および軽鎖（またはその断片）をコードする、１つまたは複数の核酸分子であって、単一のベクター内または別個のベクター内のこのような核酸分子（複数可）、および宿主細胞内の、１つまたは複数の位置に存在する、このような核酸分子（複数可）を含む核酸分子を指す。

【００７６】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す、すなわち、例えば、天然に存在する突然変異またはモノクローナル抗体調製物の作製時に発生する突然変異であって、一般に、少量で存在する、このような変異体を含有する、可能な変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対して、異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体調製物と対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定群に対して方向付けられている。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一の抗体集団から得られた抗体の性格を指し示し、任意の特定の方法による抗体の作製を要求するとは考えられない。例えば、本発明に従うモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子の全部または一部を含有する

トランスジェニック動物を利用する方法、本明細書で記載されるモノクローナル抗体を作製するためのこのような方法および他の例示的方法を含むがこれらに限定されない、様々な技法により作製されうる。

【００７７】

「ネイキッド抗体」とは、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射性標識にコンジュゲートしていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、薬学的組成物中に存在しうる。

【００７８】

「天然抗体」とは、構造を変動させる、天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然のＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合している、２つの同一な軽鎖と、２つの同一な重鎖とから構成された、約１５０，０００ドルトンのヘテロテトラマー糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端に、各重鎖は、また、重鎖可変ドメインまたは重鎖可変領域も呼ばれる、可変ドメイン（ＶＨ）、に続き、３つの重鎖定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２、およびＣＨ３）を有する。同様に、Ｎ末端からＣ末端に、各軽鎖は、また、軽鎖可変ドメインまたは軽鎖可変領域も呼ばれる、可変ドメイン（ＶＬ）、に続き、軽鎖定常（ＣＬ）ドメインを有する。

【００７９】

「添付文書」という用語は、通常、医薬品の市販のパッケージに含まれる指示書であって、このような医薬品の使用に関する適応、用法、投与量、投与、併用療法、禁忌、および／または警告についての情報を含有する指示書を指すのに使用される。

【００８０】

参照ポリペプチド配列に照らした「アミノ酸配列の同一性パーセント（％）」とは、最大の配列同一性パーセントを達成するように、配列をアライメントし、必要な場合に、ギャップを導入し、アライメントを目的とする保存的置換を、配列同一性の一部と考えずにおいた後で、参照ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一な、候補配列内のアミノ酸残基の百分率として規定される。アミノ酸配列の同一性パーセントを決定することを目的とするアライメントは、当技術分野の技術の範囲内にある、多様な方式で、例えば、ＢＬＡＳＴソフトウェア、ＢＬＡＳＴ－２ソフトウェア、Ｃｌｕｓｔａｌ Ｗソフトウェア、Ｍｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェア、またはＦＡＳＴＡプログラムパッケージなど、公開されているコンピュータソフトウェアを使用して達成されうる。当業者は、比較される配列の完全長にわたる、最大限のアライメントを達成するのに必要とされる、配列をアライメントするための任意のアルゴリズムを含む、適切なパラメータ配列を決定することができる。代替的に、配列同一性パーセントの値は、配列比較コンピュータプログラムである、ＡＬＩＧＮ－２を使用して生成されうる。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．により作製され、ソースコードが、ユーザー文書と共に、Ｕ．Ｓ．Ｃｏｐｙｒｉｇｈｔ Ｏｆｆｉｃｅ、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．、２０５５９に提出され、ここで、米国著作権登録番号第ＴＸＵ５１００８７号の下に登録されており、ＷＯ２００１／００７６１１において記載されている。

【００８１】

別途指示がない限り、本明細書の目的では、アミノ酸配列の同一性パーセント値は、ＦＡＳＴＡパッケージｖｅｒｓｉｏｎ ３６．３．８ｃのｇｇｓｅａｒｃｈプログラム、または、その後で、ＢＬＯＳＵＭ５０比較マトリックスを使用して生成される。ＦＡＳＴＡプログラムパッケージは、Ｗ．Ｒ．ＰｅａｒｓｏｎおよびＤ．Ｊ．Ｌｉｐｍａｎ（１９８８）、「Ｉｍｐｒｏｖｅｄ Ｔｏｏｌｓ ｆｏｒ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ」、ＰＮＡＳ、８５：２４４４～２４４８；Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ（１９９６）、「Ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ」、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．、２６６：２２７～２５８；およびＰｅａｒｓｏｎら（１９９７）、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、４６：２４～３６により作製され、ｗｗｗ．ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｉｒｇｉｎｉａ．ｅｄｕ／ｆａｓｔａ＿ｗｗｗ２／ｆａｓｔａ＿ｄｏｗｎ．ｓｈｔｍｌまたはｗｗｗ．ｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／Ｔｏｏｌｓ／ｓｓｓ／ｆａｓｔａから公開されている。代替的に、ｆａｓｔａ．ｂｉｏｃｈ．ｖｉｒｇｉｎｉ

ａ．ｅｄｕ／ｆａｓｔａ＿ｗｗｗ２／ｉｎｄｅｘ．ｃｇｉにおいてアクセス可能な公開サーバーは、ローカルではなく、グローバルなアライメントが確保されるように、ｇｇｓｅａｒｃｈ（ｇｌｏｂａｌ　ｐｒｏｔｅｉｎ：ｐｒｏｔｅｉｎ）プログラムおよびデフォルトのオプション（ＢＬＯＳＵＭ５０；ｏｐｅｎ：－１０；ｅｘｔ：－２；Ｋｔｕｐ＝２）を使用して、配列を比較するのに使用されうる。アミノ酸同一性パーセントは、出力のアライメントヘッダーに示される。

【００８２】

「薬学的組成物」または「薬学的製剤」という用語は、その中に含有される有効成分の生物活性が有効であることを可能とするような形態にあり、薬学的組成物が投与される対象に対して、許容不可能な程度に毒性である、さらなる構成要素を含有しない調製物を指す。

【００８３】

「薬学的に許容される担体」とは、対象に対して非毒性である、薬学的組成物または製剤中の、有効成分以外の成分を指す。薬学的に許容される担体は、バッファー、添加物、安定剤、または防腐剤を含むがこれらに限定されない。

【００８４】

本明細書で使用される標的抗原への言及は、別途指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源に由来する、任意の天然の標的抗原を指す。標的抗原という用語は、プロセシングされていない、「完全長」の標的抗原のほか、細胞内のプロセシングから生じる、標的抗原の任意の形態を包摂する。標的抗原という用語はまた、標的抗原の、天然に存在する変異体、例えば、スプライスバリアントまたは対立遺伝子変異体も包摂する。例えば、標的抗原ＣＥＡは、ＵｎｉＰｒｏｔ（ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ）受託番号：Ｐ０６７３１（ｖｅｒｓｉｏｎ　１１９）、またはＮＣＢＩ（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）ＲｅｆＳｅｑ：ＮＰ＿００４３５４．２に示されている、ヒトＣＥＡ、特に、がん胎児性抗原関連細胞接着分子５（ＣＥＡＣＡＭ５）のアミノ酸配列を有しうる。標的抗原の別の例は、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）である。ヒトＦＡＰのアミノ酸配列は、ＵｎｉＰｒｏｔ（ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ）受託番号：Ｑ１２８８４（ｖｅｒｓｉｏｎ　１４９）、またはＮＣＢＩ（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）ＲｅｆＳｅｑ：ＮＰ＿００４４５１．２に示されている。標的抗原の別の例は、ＧＰＲＣ５Ｄ（ヒト配列については、ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号：Ｑ９ＮＺＤ１（ｖｅｒｓｉｏｎ　１１５）；ＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ受託番号：ＮＰ＿０６１１２４．１を参照されたい）である。

【００８５】

本明細書で、「スプリット抗体」、「スプリット抗体」、「単一ドメインスプリット抗体」、または「ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」と称される用語は、併せて、放射標識化合物に結合することが可能な抗原結合部位を形成する、ＶＨドメインと、ＶＬドメインとは、２つの抗体の間に分配され、同じ抗体の一部として存在しないこと（ｉｎ　ｖｉｖｏにおけるアセンブリーの前に）を意味する。「ＣＥＡターゲティングＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」とは、ＣＥＡをターゲティングするスプリット抗体を指す。「ＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」という用語はまた、「ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ」という用語（例えば、「ＴＡ」または標的抗原が、ＣＥＡ、ＦＡＰ、またはＧＰＲＣ５Ｄである場合）と互換的にも使用されうる。「ＣＥＡターゲティングＳＰＬＩＴ　ＰＲＩＴ」という用語は、「ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ」という用語と互換的に使用されうる。

【００８６】

本明細書で使用される、「処置」という用語（および「～を処置する」または「～を処置すること」など、その文法的変化形）は、処置される個体において疾患の天然の経過を変更しようとする試みにおける臨床的介入を指し、臨床病態の予防のために実施される場合もあり、臨床病態の経過中に実施される場合もある。処置の所望の効果は、疾患の発生または再発の防止、症状の緩和、疾患の任意の直接的な病理学的帰結または間接的な病理

学的帰結の減弱、転移の防止、疾患の進行速度の減殺、病状の改善（ａｍｅｌｉｏｒａｔｉｎｇ）または緩和、および寛解または予後の改善（ｉｍｐｒｏｖｅｄ）を含む。一部の態様では、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか、または疾患の進行を緩徐化するのに使用される。

【００８７】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の、抗原への結合に関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれ、ＶＨおよびＶＬ）は一般に、各ドメインが、４つの保存的フレームワーク領域（ＦＲ）と、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）とを含む、類似の構造を有する（例えば、Ｋｉｎｄｔら、「Ｋｕｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ」、６版，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．、９１頁（２００７）を参照されたい）。単一のＶＨドメインまたはＶＬドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分でありうる。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、相補性ＶＬまたは相補性ＶＨドメインのライブラリーのそれぞれをスクリーニングするように、抗原に結合する抗体に由来するＶＨドメインまたはＶＬドメインを使用して単離されうる。例えば、Ｐｏｒｔｏｌａｎｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１５０：８８０～８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ、３５２：６２４～６２８（１９９１）を参照されたい。

【００８８】

本明細書で使用される、「ベクター」という用語は、それが連結された、別の核酸を伝搬することが可能な核酸分子を指す。「ベクター」という用語は、自己複製型核酸構造としてのベクターのほか、それが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動的に連結された核酸の発現を方向付けることが可能である。本明細書では、このようなベクターは、「発現ベクター」と言及される。

【００８９】

本明細書で使用される「Ｐｂ」または「鉛」という用語は、そのイオン、例えば、Ｐｂ（ＩＩ）を含む。他の金属への言及もまた、そのイオンを含む。したがって、当業者は、例えば、鉛、Ｐｂ、^{212}Ｐｂ、または^{203}Ｐｂという用語が、元素、特に、Ｐｂ（ＩＩ）のイオン形態を包摂するように意図されることを理解する。

【００９０】

ＩＩ．組成物および方法

一態様では、本発明は、部分的に、第１の抗体および第２の抗体を含む、抗体のセットに基づき、この場合、各抗体が、標的細胞上の抗原に結合しうるが、エフェクター剤に対する機能的抗原結合部位が、第１の抗体と、第２の抗体とが、互いと会合している場合に限り形成される。本発明の抗体は、例えば、プレターゲティング型免疫療法および／またはプレターゲティング型イメージング法に有用である。好ましい態様では、方法は、除去剤またはブロッキング剤を投与する工程を消滅させる。

【００９１】

Ａ．標的抗原

本明細書では、標的細胞の表面上で発現される抗原はまた、「標的抗原」とも称される。

【００９２】

本発明が、処置法および処置法における使用のための医薬品に関する限りにおいて、本発明は、患者の細胞、例えば、罹患細胞にターゲティングされた細胞傷害活性により処置可能な、任意の状態に対して適用可能である。したがって、標的細胞は、それに対して細胞傷害性をターゲティングすることが所望される任意の細胞、例えば、任意の罹患細胞である。処置は、好ましくは、腫瘍またはがんの処置である。しかし、本発明の適用可能性は、腫瘍およびがんに限定されない。例えば、処置はまた、ウイルス感染の処置（感染細胞をターゲティングすることによる）、またはＴ細胞駆動性自己免疫疾患の処置（Ｔ細胞をターゲティングすることによる）でもありうる。感染細胞の表面において発現されるウイルス抗原に対して方向付けられたイムノトキシンが、ＨＩＶ、狂犬病、ＥＢＶなど、様

々なウイルス感染のために探索されている。ＣａｉおよびＢｅｒｇｅｒ、２０１１、Ａｎｔｉｖｉｒａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、９０（３）：１４３～５０は、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスに感染した細胞のターゲティング型殺滅のために、ＰＥ３８を含有するイムノトキシンを使用した。加えて、Ｒｅｓｉｍｍｕｎｅ（登録商標）（Ａ－ｄｍＤＴ３９０－ｂｉｓＦｖ（ＵＣＨＴ１））は、ヒト悪性Ｔ細胞を、選択的に死滅させ、正常Ｔ細胞を一過性に枯渇させ、多発性硬化症および移植片対宿主病などのＴ細胞駆動性自己免疫疾患のほか、臨床治験を経つつあるＴ細胞性血液がんの処置に対する潜在的可能性を有すると考えられる。同様に、本発明の方法は、それについての放射線イメージングが所望される任意の細胞型であって、がん細胞または腫瘍細胞を含むがこれらに限定されない細胞型に対して適用可能でありうる。

【００９３】

したがって、適切な標的抗原は、がん細胞抗原、ウイルス抗原、または微生物性抗原を含むことができる。

【００９４】

抗原は、通例、異常時に過剰発現または発現される、正常な細胞表面抗原である。標的抗原は、罹患細胞（腫瘍細胞など）だけにおいて発現されることが理想的であるが、これが実際に観察されることは稀である。結果として、標的抗原は、通例、罹患組織と健常組織との示差的発現に基づき選択される。

【００９５】

細胞表面マーカーまたは標的抗原は、例えば、腫瘍関連抗原でありうる。

【００９６】

本明細書で使用される「腫瘍関連抗原」または「腫瘍特異的抗原」という用語は、抗原が、腫瘍（複数可）および／またはがん（複数可）と関連するように、腫瘍細胞および／もしくはがん細胞、またはがん関連線維芽細胞など、他の腫瘍間質細胞により、もっぱらまたは主に発現または過剰発現される、任意の分子（例えば、タンパク質、ペプチド、脂質、炭水化物など）を指す。加えて、腫瘍関連抗原は、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん性細胞によっても発現されうる。しかし、このような場合に、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん性細胞による腫瘍関連抗原の発現は、腫瘍細胞またはがん細胞による発現ほど頑健ではない。この点で、腫瘍細胞またはがん細胞は、抗原を過剰発現する場合もあり、抗原を、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん性細胞による抗原の発現と比較して、著明に高レベルで発現する場合もある。加えて、腫瘍関連抗原はまた、発生状態または成熟状態が異なる細胞によっても発現されうる。例えば、加えて、腫瘍関連抗原は、胚段階または胎児段階の細胞であって、正常の成体宿主では見出されない細胞により発現される場合もある。代替的に、加えて、腫瘍関連抗原は、正常の成体宿主では見出されない、幹細胞または前駆細胞により発現される場合もある。

【００９７】

腫瘍関連抗原は、本明細書で記載されるがんおよび腫瘍を含む、任意のがんまたは腫瘍の任意の細胞により発現される抗原でありうる。腫瘍関連抗原は、腫瘍関連抗原が、唯一の種類のがんまたは腫瘍と関連するか、またはこれに特徴的であるように、唯一の種類のがんまたは腫瘍の腫瘍関連抗原でありうる。代替的に、腫瘍関連抗原は、１つを超える種類のがんまたは腫瘍の腫瘍関連抗原でありうる（例えば、これらに特徴的でありうる）。例えば、腫瘍関連抗原は、乳がん細胞および前立腺がん細胞のいずれによっても発現されうるが、正常細胞、非腫瘍細胞、または非がん性細胞によっては、全く発現されない。

【００９８】

本発明の抗体が結合しうる、例示的腫瘍関連抗原は、ムチン１（ＭＵＣ１；ｔｕｍｏｕｒ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ ｍｕｃｉｎ）、ＰＲＡＭＥ（ｐｒｅｆｅｒｅｎｔｉａｌｌｙ ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ ａｎｔｉｇｅｎ ｏｆ ｍｅｌａｎｏｍａ）、がん胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、ＰＳＣＡ、ＥｐＣＡＭ、Ｔｒｏｐ２（また、ＥＧＰ－１としても公知の、トロホブラスト２）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体（ＧＭ－ＣＳＦＲ）、ＣＤ５６、ヒト上皮増殖因子受

容体２（ＨＥＲ２／ｎｅｕ）（また、ｅｒｂＢ－２としても公知である）、ＣＤＳ、ＣＤ７、チロシンキナーゼ関連タンパク質（ＴＲＰ）Ｉ、およびＴＲＰ２を含むがこれらに限定されない。別の実施形態では、腫瘍抗原は、分化抗原群（ＣＤ）１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＣＤ３３（骨髄細胞表面抗原である、シアル酸結合Ｉｇ様レクチン３）、ＣＤ７９ｂ、ＣＤ１２３（インターロイキン３受容体アルファ）、トランスフェリン受容体、ＥＧＦ受容体、メソテリン、カドヘリン、Ｌｅｗｉｓ　Ｙ、グリピカン３、ＦＡＰ（線維芽細胞活性化タンパク質アルファ）、ＧＰＲＣ５Ｄ（Ｇタンパク質共役受容体クラスＣ群５メンバーＤ）、ＰＳＭＡ（前立腺特異的な膜抗原）、ＣＡ９＝ＣＡＩＸ（炭酸脱水酵素ＩＸ）、ＬｌＣＡＭ（神経細胞接着分子Ｌ１）、エンドシアリン、ＨＥＲ３（上皮増殖因子受容体ファミリーメンバー３の活性化コンフォメーション）、Ａｌｋ１／ＢＭＰ９複合体（未分化リンパ腫キナーゼ１／骨形成タンパク質９）、ＴＰＢＧ＝５Ｔ４（トロホブラスト糖タンパク質）、ＲＯＲ１（受容体チロシンキナーゼ様表面抗原）、ＨＥＲ１（上皮増殖因子受容体の活性化コンフォメーション）、およびＣＬＬ１（Ｃ型レクチンドメインファミリー１２メンバーＡ）からなる群から選択されうる。メソテリンは、例えば、卵巣がん、中皮腫、非小細胞肺がん、肺腺癌、ファロピウス管がん、頭頸部がん、子宮頸がん、および膵臓がんにおいて発現される。ＣＤ２２は、例えば、毛様細胞白血病、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、前リンパ球性白血病（ＰＬＬ）、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、および急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）において発現される。ＣＤ２５は、例えば、毛様細胞白血病およびホジキンリンパ腫を含む、白血病およびリンパ腫において発現される。Ｌｅｗｉｓ　Ｙ抗原は、例えば、膀胱がん、乳がん、卵巣がん、結腸直腸がん、食道がん、胃がん、肺がん、および膵臓がんにおいて発現される。ＣＤ３３は、例えば、急性骨髄白血病（ＡＭＬ）、慢性骨髄単球性白血病（ＣＭＬ）、および骨髄増殖性疾患において発現される。

【００９９】

腫瘍関連抗原に特異的に結合する例示的抗体は、トランスフェリン受容体に対する抗体（例えば、ＨＢ２１およびその変異体）、ＣＤ２２に対する抗体（例えば、ＲＦＢ４およびその変異体）、ＣＤ２５に対する抗体（例えば、抗Ｔａｃおよびその変異体）、メソテリンに対する抗体（例えば、ＳＳ１、ＭＯＲＡｂ－００９、ＳＳ、ＨＮ１、ＨＮ２、ＭＮ、ＭＢおよびこれらの変異体）、およびＬｅｗｉｓ　Ｙ抗原に対する抗体（例えば、Ｂ３およびその変異体）を含むがこれらに限定されない。この点で、ターゲティング部分（細胞結合剤）は、Ｂ３、ＲＦＢ４、ＳＳ、ＳＳ１、ＭＮ、ＭＢ、ＨＮ１、ＨＮ２、ＨＢ２１、およびＭＯＲＡｂ－００９、ならびにこれらの抗原結合部分からなる群から選択される抗体でありうる。本発明のキメラ分子における使用に適する、さらなる例示的ターゲティング部分は、例えば、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第５，２４２，８２４号（抗トランスフェリン受容体）；同第５，８４６，５３５号（抗ＣＤ２５）；同第５，８８９，１５７号（抗Ｌｅｗｉｓ　Ｙ）；同第５，９８１，７２６号（抗Ｌｅｗｉｓ　Ｙ）；同第５，９９０，２９６号（抗Ｌｅｗｉｓ　Ｙ）；同第７，０８１，５１８号（抗メソテリン）；同第７，３５５，０１２号（抗ＣＤ２２および抗ＣＤ２５）；同第７，３６８，１１０号（抗メソテリン）；同第７，４７０，７７５号（抗ＣＤ３０）；同第７，５２１，０５４号（抗ＣＤ２５）；および同第７，５４１，０３４号（抗ＣＤ２２）；米国特許出願公開第２００７／０１８９９６２号（抗ＣＤ２２）；Ｆｒａｎｋｅｌら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、６：３２６～３３４（２０００）；およびＫｒｅｉｔｍａｎら、ＡＡＰＳ　Ｊｏｕｒｎａｌ、８（３）：Ｅ５３２～Ｅ５５１（２００６）において開示されている。

【０１００】

Ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ３０、ＣＤ１９、ＣＤ３３、糖タンパク質であるＮＭＢ、ＣａｎＡｇ、Ｈｅｒ２（ＥｒｂＢ２／Ｎｅｕ）、ＣＤ５６（ＮＣＡＭ）、ＣＤ２２（Ｓｉｇｌｅｃ２）、ＣＤ３３（Ｓｉｇｌｅｃ３）、ＣＤ７９、ＣＤ１３８、ＰＳＣＡ、ＰＳＭＡ（前立腺特異的膜抗原）、ＢＣＭＡ、ＣＤ２０、ＣＤ７０、Ｅ－セレクチン、ＥｐｈＢ２、メラノトランスフェリン、Ｍｕｃ１６、およびＴＭＥＦＦ２を含む、標的特異的な腫瘍関連抗

原に対して、さらなる抗体が惹起されている。これらの抗体のうちのいずれか、またはその抗原結合断片は、本発明において有用でありうる、すなわち、本明細書で記載される抗体に組み込まれうる。

【０１０１】

本発明についての、一部の実施形態では、腫瘍関連抗原は、がん胎児性抗原（ＣＥＡ）であることが好ましい場合がある。

【０１０２】

ＣＥＡは、本発明の文脈では、比較的緩徐に内部化され、したがって、抗体のうちの高百分率は、初期処置の後、放射性核種への結合のために、細胞の表面上で、依然としてアベイラブルであるため、有利である。他の低内部化標的／腫瘍関連抗原もまた、好ましい場合がある。腫瘍関連抗原の他の例は、ＣＤ２０またはＨＥＲ２を含む。なおさらなる実施形態では、標的は、ＥＧＰ－１（トロホブラスト２としてもまた公知の上皮糖タンパク質１）、結腸特異的抗原ｐ（ＣＳＡｐ）、または膵ムチンＭＵＣ１でありうる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇら、２０１２（Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ、２（５））を参照されたい。この参考文献はまた、ＣＳＡｐに結合するミュー９（また、Ｓｈａｒｋｅｙら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、２００３；６３：３５４～６３も参照されたい）、ＭＵＣ１に結合するｈＰＡＭ４（また、Ｇｏｌｄら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、２００８、６８：４８１９～２６も参照されたい）、ＣＤ２０に結合するバルツズマブ（また、Ｓｈａｒｋｅｙら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．、２００８、６８：５２８２～９０も参照されたい）、およびＥＧＰ－１に結合するｈＲＳ７（また、Ｃｕｂａｓら、Ｂｉｏｃｈｉｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ａｃｔａ、２００９、１７９６：３０９～１４も参照されたい）などの抗体についても記載する。これらの抗体、またはこれらの抗原結合部分のうちのいずれかは、本発明において有用でありうる、すなわち、本明細書で記載される抗体に組み込まれうる。ＣＥＡに対して惹起されている抗体の１つの例は、Ｔ８４．６６（重鎖について、ＮＣＢＩ受託番号：ＣＡＡ３６９８０、および軽鎖について、同ＣＡＡ３６９７９において示されるか、またはＷＯ２０１６／０７５２７８の配列番号３１７および３１８において示されている）、ならびにＷＯ２０１６／０７５２７８Ａ１および／またはＷＯ２０１７／０５５３８９において記載されている、Ｔ８４．６６－ＬＣＨＡなど、そのヒト化形およびキメラ形である。別の例は、ＷＯ２０１２／１１７００２およびＷＯ２０１４／１３１７１２において記載されている抗ＣＥＡ抗体である、ＣＨ１Ａ１ａ、ならびにＣＥＡ　ｈＭＮ－１４である（また、ＵＳ６６７６９２４およびＵＳ５８７４５４０も参照されたい）。別の抗ＣＥＡ抗体は、Ｍ．Ｊ．Ｂａｎｆｉｅｌｄら、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、１９９７、２９（２）、１６１～１７１において記載されているＡ５Ｂ７である。マウス抗体であるＡ５Ｂ７に由来するヒト化抗体については、ＷＯ９２／０１０５９およびＷＯ２００７／０７１４２２において開示されている。また、同時係属出願である、ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２も参照されたい。Ａ５Ｂ７のヒト化型の例は、Ａ５Ｈ１ＥＬ１（Ｇ５４Ａ）である。ＣＥＡに対する、さらなる例示的抗体は、ＵＳ７６２６０１１および／または同時係属出願である、ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２において記載されているＭＦＥ２３、およびそのヒト化形である。ＣＥＡに対する抗体の、なおさらなる例は、２８Ａ９である。これらの抗体、またはこれらの抗原結合断片のうちのいずれかは、本発明におけるＣＥＡ結合部分を形成するのに有用でありうる。

【０１０３】

一部の実施形態では、ＦＡＰ（線維芽細胞活性化タンパク質アルファ）またはＧＰＲＣ５Ｄ（Ｇタンパク質共役受容体クラスＣ群５メンバーＤ）もまた好ましい場合がある。ＦＡＰとは、多数の腫瘍型、例えば、膵臓がん、乳がん、および肺がんの微小環境における、その広範な発現のために、イメージングおよび治療のために確立された標的である（Ｌｉｎｄｎｅｒ，Ｔ．、Ｌｏｋｔｅｖ，Ａ．、Ｇｉｅｓｅｌ，Ｆ．ら、「Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｏｆ　ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ　ｆｏｒ　ｉｍａｇｉｎｇ　ａｎｄ　ｔｈｅｒａｐｙ」、ＥＪＮＭＭＩ　ｒａｄｉｏｐｈａｒｍ．ｃｈｅｍ、４、１６（２０１９））。したがって、ＦＡＰ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用す

るＳＰＬＩＴ ＰＲＩＴであれば、活性化がん関連線維芽細胞において、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの特異的な蓄積をもたらすことが予測されるであろう。結果として、放出アルファ線であれば、隣接する腫瘍細胞に対する、直接的な腫瘍殺滅効果の制限に加えて、ＦＡＰ発現悪性腫瘍による免疫抑制に対して、否定的な影響を及ぼすことが予測されるであろう。Ｇタンパク質共役受容体ファミリーＣ５群メンバーＤ（ＧＰＲＣ５Ｄ）は、多発性骨髄腫形質細胞上で、過剰発現され（Ａｔａｍａｎｉｕｋ Ｊ、Ｇｌｅｉｓｓ Ａ、Ｐｏｒｐａｃｚｙ Ｅ、Ｋａｉｎｚ Ｂ、Ｇｒｕｎｔ ＴＷ、Ｒａｄｅｒｅｒ Ｍら、「Ｏｖｅｒｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ Ｇ ｐｒｏｔｅｉｎ－ｃｏｕｐｌｅｄ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ５Ｄ ｉｎ ｔｈｅ ｂｏｎｅ ｍａｒｒｏｗ ｉｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｐｏｏｒ ｐｒｏｇｎｏｓｉｓ ｉｎ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｍｙｅｌｏｍａ」、Ｅｕｒ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．、２０１２、４２：９５３～６０）、確立されたＳＣ（皮下）ｉｎ ｖｉｖｏモデル、例えば、ＯＰＭ－２およびＮＣＩ－Ｈ９２９は、多発性骨髄腫患者において見出される発現を反映する（Ｋｏｄａｍａ Ｔ、Ｋｏｃｈｉ Ｙ、Ｎａｋａｉ Ｗ、Ｍｉｚｕｎｏ Ｈ、Ｂａｂａ Ｔ、Ｈａｂｕ Ｋら、「Ａｎｔｉ－ＧＰＲＣ５Ｄ／ＣＤ３ ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ－ｃｅｌｌ－ｒｅｄｉｒｅｃｔｉｎｇ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｍｙｅｌｏｍａ」、Ｍｏｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．（２０１９）、１８：１５５５～６４）。したがって、本発明者らは、ＧＰＲＣ５Ｄ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用するＳＰＬＩＴ ＰＲＩＴが、２１２Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの腫瘍特異的蓄積に続き、照射誘導性腫瘍細胞死をもたらすことを期待する。

【０１０４】

一部の実施形態では、本発明の抗体は、標的抗原（例えば、本明細書で論じられる標的抗原のうちのいずれか）に特異的に結合しうる。一部の実施形態では、本発明の抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭもしくは≦０．００１ｎＭ（例えば、10^{-7}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-7}～10^{-13}、10^{-8}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（ＫＤ）で結合しうる。

【０１０５】

第１の抗体および第２の抗体は、各々、「抗原Ａ」と称されうる、同じ標的抗原に結合する（すなわち、第１の抗体および第２の抗体は、同じ標的抗原に対する結合特異性を有する）。第１の抗体および第２の抗体は、抗原Ａ上の、同じエピトープに対する結合特異性を有しうる。代替的に、第１の抗体は、抗原Ａ上の第１のエピトープに結合することが可能であり、第２の抗体は、抗原Ａ上の、異なる第２のエピトープに結合しうる。例えば、一実施形態では、抗体のうちの一方は、ＣＥＡのＴ８４．６６エピトープに結合することが可能であり、他方は、ＣＥＡのＡ５Ｂ７エピトープに結合しうる。

【０１０６】

一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体の一方または両方は、抗原Ａに対して、二重パラトープ性でありうる（すなわち、個々の抗体の各々は、抗原Ａの、２つの異なるエピトープに結合しうる）。第１の抗体は、抗原Ａの第１のエピトープおよび第２のエピトープのそれぞれに結合する、第１の結合部位および第２の結合部位を含むことができ、第１のエピトープおよび第２のエピトープは、互いと異なる。代替的に、または加えて、第２の抗体は、抗原Ａの第１のエピトープおよび第２のエピトープに結合する、第１の結合部位および第２の結合部位を含むことができ、第１のエピトープおよび第２のエピトープは、互いと異なる。一部の実施形態では、第１の抗体が結合するエピトープの一方または両方は、第２の抗体が結合するエピトープの一方または両方と異なりうる。他の実施形態では、第１の抗体が結合する２つのエピトープは、第２の抗体が結合する２つのエピトープと同じでありうる。

【０１０７】

Ｂ．放射性標識化合物

本発明に従い、第１の抗体と第２の抗体との会合は、エフェクター分子に対する機能的

結合部位を形成する。本発明に従うエフェクター分子は、放射性同位体を含む放射標識化合物である、例えば、放射標識ハプテンである。

【０１０８】

一部の実施形態では、エフェクター分子は、キレート化放射性同位体を含むことができる。

【０１０９】

一部の実施形態では、エフェクター分子に対する機能的結合部位は、キレート剤および放射性同位体を含むキレートに結合しうる。他の実施形態では、抗体は、キレート化放射性同位体、例えば、ヒスタミン－スクシニル－グリシン（ＨＳＧ）、ジゴキシゲニン、ビオチン、またはカフェインにコンジュゲートしている部分に結合しうる。

【０１１０】

キレート剤は、例えば、アミノポリカルボン酸もしくはアミノポリチオカルボン酸、またはこれらの塩もしくは機能的変異体などの多座配位分子でありうる。キレート剤は、例えば、二座配位キレート剤または三座配位キレート剤または四座配位キレート剤でありうる。適切な金属キレート剤の例は、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸または$CaNa_2$ＥＤＴＡなどの塩形態）、ＤＴＰＡ（ジエチレントリアミン五酢酸）、ＤＯＴＡ（１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン－１，４，７，１０－四酢酸）、ＮＯＴＡ（２，２’，２’’－（１，４，７－トリアザノナン－１，４，７－トリイル）三酢酸）、ＩＤＡ（イミノ二酢酸）、ＭＩＤＡ（（メチルイミノ）二酢酸）、ＴＴＨＡ（３，６，９，１２－テトラキス（カルボキシメチル）－３，６，９，１２－テトラ－アザテトラデカン二酸）、ＴＥＴＡ（２，２’，２’’，２’’’－（１，４，８，１１－テトラアザシクロテトラデカン－１，４，８，１１－テトライル）四酢酸）、ＤＯＴＡＭ（１，４，７，１０－テトラキス（カルバモイルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン）、ＨＥＨＡ（１，４，７，１０，１３，１６－ヘキサアザシクロヘキサデカン－１，４，７，１０，１３，１６－ヘキサ酢酸；Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ，Ｉｎｃ．、Ｐｌａｎｏ、Ｔｅｘａｓから市販されている）、ＮＴＡ（ニトリロ三酢酸）ＥＤＤＨＡ（エチレンジアミン－Ｎ、Ｎ’－ビス（２－ヒドロキシフェニル酢酸）、ＢＡＬ（２，３，－ジメルカプトプロパノール）、ＤＭＳＡ（２，３－ジメルカプトコハク酸）、ＤＭＰＳ（２，３－ジメルカプト－１－プロパンスルホン酸）、Ｄ－ペニシラミン（Ｂ－ジメチルシステイン）、ＭＡＧ３（メルカプトアセチルトリグリシン）、Ｈｙｎｉｃ（６－ヒドラジノピリジン－３－カルボン酸）、ｐ－イソチオシアナトベンジル－デスフェリオキサミン（例えば、イメージングのために、ジルコニウムで標識された）、および金属をキレート化することが可能な、これらの塩または機能的変異体／誘導体を含む分子を含む。一部の実施形態では、キレート剤は、ＤＯＴＡもしくはＤＯＴＡＭ、または金属をキレート化することが可能な、これらの塩もしくは機能的変異体／誘導体であることが好ましい場合がある。したがって、キレート剤は、放射性同位体がこれらにキレート化された、ＤＯＴＡまたはＤＯＴＡＭでありうるか、またはこれらを含むことができる。

【０１１１】

エフェクター分子は、放射性核種と併せて、上記のキレート剤の機能的変異体または機能的誘導体を含むか、またはこれらからなることができる。適する変異体／誘導体は、ある限定された程度に異なる構造を有し、キレート剤として機能する能力を保持する（すなわち、本明細書で記載される目的のうちの１つまたは複数のために使用されるのに十分な活性を保持する）。機能的変異体／誘導体はまた、低分子、ポリペプチド、または炭水化物を含む、１つまたは複数のさらなる部分または置換基にコンジュゲートしている、上記で記載されたキレート剤も含むことができる。この接合は、例えば、キレート剤の骨格部分における、構成要素である炭素のうちの１つを介して生じうる。適切な置換基は、例えば、アルキル、アルケニル、アリールまたはアルキニル；ヒドロキシ基；アルコール基；ハロゲン原子；ニトロ基；シアノ基；スルホニル基；チオール基；アミン基；オキソ基；カルボキシ基；チオカルボキシ基；カルボニル基；アミド基；エステル基；またはヘテロアリール基を含む複素環などの炭化水素基でありうる。置換基は、例えば、下記で「Ｒ１

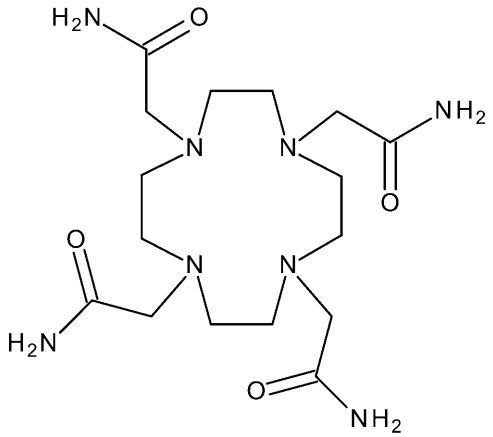
」基について規定される置換基のうちの１つでありうる。低分子は、例えば、染料（Ａｌｅｘａ　６４７またはＡｌｅｘａ　４８８など）、ビオチンもしくはビオチン部分、またはフェニル部分もしくはベンジル部分でありうる。ポリペプチドは、例えば、オリゴペプチド、例えば、２または３アミノ酸のオリゴペプチドでありうる。例示的炭水化物は、デキストラン、直鎖状または分枝状のポリマーまたはコポリマー（例えば、ポリアルキレン、ポリ（エチレン－リジン）、ポリメタクリレート、ポリアミノ酸、多糖またはオリゴ糖、デンドリマー）を含む。誘導体はまた、上記で明示された化合物が、リンカー部分を介して連結された、キレート剤化合物の多量体も含むことができる。誘導体はまた、金属イオンをキレート化する能力を保持する、上記の化合物の機能的断片も含むことができる。

【０１１２】

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

【０１１３】

本発明についての、一部の実施形態では、第１の抗体と第２の抗体との会合により形成される、機能的結合部位は、ＤＯＴＡＭと、金属、例えば、鉛（Ｐｂ）とを含む金属キレートに結合する。上記で言及された通り、「ＤＯＴＡＭ」は、以下の式：

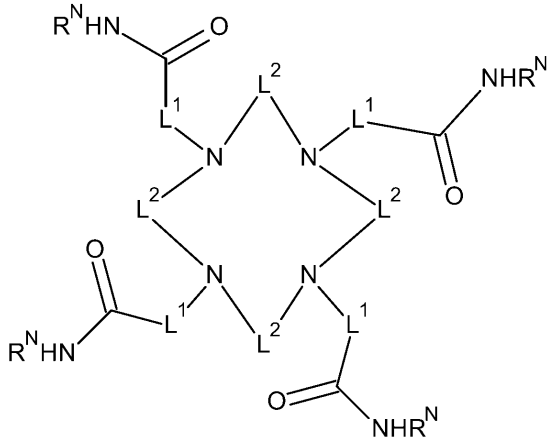


の化合物である、化学名：

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

【０１１４】

ある特定の態様および実施形態では、本発明はまた、金属イオンを組み込む、ＤＯＴＡＭの機能的変異体または機能的誘導体も使用しうる。ＤＯＴＡＭの適切な変異体／誘導体は、ＤＯＴＡＭの構造と、ある限定された程度に異なる構造を有し、機能する能力を保持する（すなわち、本明細書で記載される目的のうちの１つまたは複数のために使用されるのに十分な活性を保持する）。このような態様および実施形態では、ＤＯＴＡＭまたはＤＯＴＡＭの機能的変異体／誘導体は、ＷＯ２０１０／０９９５３６において開示されている、活性変異体のうちの１つでありうる。適切な機能的変異体／誘導体は、以下の式：



の化合物、またはその薬学的に許容される塩［式中、
置換されていてもよい部分における各原子の価数が超過されないことを条件として
R^Nは、H、C_1－C_6アルキル、C_1－C_6ハロアルキル、C_2－C_6アルケニル、C_2－C_6アルキニル、C_3－C_7シクロアルキル、C_3－C_7シクロアルキル－C_1－C_4アルキル、C_2－C_7ヘテロシクロアルキル、C_2－C_7ヘテロシクロアルキル－C_1－C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1－C_4アルキル、C_1－C_7ヘテロアリール、およびC_1－C_7ヘテロアリール－C_1－C_4アルキル［式中、C_1－C_6アルキル、C_1－C_6ハロアルキル、C_2－C_6アルケニル、およびC_2－C_6アルキニルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR^W基により置換されていてもよく；前記C_3－C_7シクロアルキル、C_3－C_7シクロアルキル－C_1－C_4アルキル、C_2－C_7ヘテロシクロアルキル、C_2－C_7ヘテロシクロアルキル－C_1－C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1－C_4アルキル、C_1－C_7ヘテロアリール、およびC_1－C_7ヘテロアリール－C_1－C_4アルキルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR^x基により置換されていてもよい］であり；
L^1は、独立して、それらの各々が、１つ、２つ、または３つの、独立して選択されたR^1基により置換されていてもよい、C_1－C_6アルキレン、C_1－C_6アルケニレン、またはC_1－C_6アルキニレンであり；
L^2は、独立して選択されたR^1基により置換されていてもよく；C_1－C_4アルキル、および／またはC_1－C_4ハロアルキルから独立して選択される、１つ、２つ、３つ、または４つの基により置換されていてもよい、C_2－C_4直鎖アルキレンであり；
R^1は、独立して、D^1－D^2－D^3、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、C_1～$_6$アルコキシ、C_1～$_6$ハロアルコキシ、C_1～$_6$アルキルチオ、C_1～$_6$アルキルスルフィニル、C_1～$_6$アルキルスルホニル、アミノ、C_1～$_6$アルキルアミノ、ジ－C_1～$_6$アルキルアミノ、C_1～$_4$アルキルカルボニル、カルボキシ、C_1～$_6$アルコキシカルボニル、C_1～$_6$アルキルカルボニルアミノ、ジ－C_1～$_6$アルキルカルボニルアミノ、C_1～$_6$アルコキシカルボニルアミノ、C_1～$_6$アルコキシカルボニル－（C_1～$_6$アルキル）アミノ、カルバミル、C_1～$_6$アルキルカルバミル、およびジ－C_1～$_6$アルキルカルバミルから選択され；
各D^1は、独立して、C_6－C_{10}アリール－C_1－C_4アルキル、C_1－C_9ヘテロアリール－C_1－C_4アルキル、C_3－C_{10}シクロアルキル－C_1－C_4アルキル、C_2－C_9ヘテロシクロアルキル－C_1－C_4アルキル、C_1－C_8アルキレン、C_1－C_8アルケニレン、およびC_1－C_8アルキニレン［式中、前記C_1－C_8アルキレン、C_1－C_8アルケニレン、およびC_1－C_8アルキニレンは、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR^4基により置換されていてもよく；前記C_6－C_{10}アリール－C_1－C_4アルキル、C_1－C_9ヘテロアリール－C_1－C_4アルキル、C_3－C_{10}シクロアルキル－C_1－C_4アルキル、C_2－C_9ヘテロシクロアルキル－C_1－C_4アルキ

ルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたＲ^{5}基により置換されていてもよい］から選択され；

各Ｄ^{2}は、独立して、非存在であるか、またはＣ$_{1}$－Ｃ$_{20}$直鎖アルキレン［式中、前記Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$直鎖アルキレンの、１つ～６つの非隣接メチレン基は、前記Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$直鎖アルキレン内の、少なくとも１つのメチレン単位が、任意選択で、－Ｄ^{4}－部分［式中、前記Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{20}$直鎖アルキレンは、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、Ｃ$_{1～4}$アルキル、Ｃ$_{1～4}$ハロアルキル、Ｃ$_{1～4}$アルコキシ、Ｃ$_{1～4}$ハロアルコキシ、アミノ、Ｃ$_{1～4}$アルキルアミノ、ジ－Ｃ$_{1～4}$アルキルアミノ、Ｃ$_{1～4}$アルキルカルボニル、カルボキシ、Ｃ$_{1～4}$アルコキシカルボニル、Ｃ$_{1～4}$アルキルカルボニルアミノ、ジ－Ｃ$_{1～4}$アルキルカルボニルアミノ、Ｃ$_{1～4}$アルコキシカルボニルアミノ、Ｃ$_{1～4}$アルコキシカルボニル－（Ｃ$_{1～4}$アルキル）アミノ、カルバミル、Ｃ$_{1～4}$アルキルカルバミル、およびジ－Ｃ$_{1～4}$アルキルカルバミルから独立して選択される、１つまたは複数の基により置換されていてもよい］により置きかえられないことを条件として、各々、任意選択で、独立して選択された－Ｄ４－部分により置きかえられる］であり；

各Ｄ^{3}は、独立して、Ｈ、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ハロアルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルケニル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルキニル、Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{14}$シクロアルキル、Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{14}$シクロアルキル－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{14}$ヘテロシクロアルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{14}$ヘテロシクロアルキル－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキル、Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{14}$アリール、Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{14}$アリール－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{13}$ヘテロアリール、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{13}$ヘテロアリール－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキル［式中、前記Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$アルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{6}$ハロアルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルケニル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{6}$アルキニルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたＲ^{6}基により置換されていてもよく；前記Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{14}$シクロアルキル、Ｃ$_{3}$－Ｃ$_{14}$シクロアルキル－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{14}$ヘテロシクロアルキル、Ｃ$_{2}$－Ｃ$_{14}$ヘテロシクロアルキル－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキル、Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{14}$アリール、Ｃ$_{6}$－Ｃ$_{14}$アリール－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキル、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{13}$ヘテロアリール、Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{13}$ヘテロアリール－Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{4}$アルキルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたＲ^{7}基により置換されていてもよい］から選択され；

各Ｄ^{4}は、独立して、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｏ）－、－ＮＲ^{a}Ｃ（＝Ｓ）－、－ＮＲ^{b}Ｃ（＝Ｏ）ＮＲ^{c}－、－ＮＲ^{b}Ｃ（＝Ｓ）ＮＲ^{c}－、－Ｓ（＝Ｏ）－、－Ｓ（＝Ｏ）$_{2}$－、－Ｓ（＝Ｏ）ＮＲ^{a}－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｓ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＲ^{a}－、－ＯＣ（＝Ｓ）ＮＲ^{a}－、－ＮＲ^{a}－、－ＮＲ^{b}Ｓ（＝Ｏ）ＮＲ^{c}－、およびＮＲ^{b}Ｓ（＝Ｏ）２ＮＲ^{O}－から選択され；

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

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

各R^7は、独立して、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシル、C_1-C_6アルキル、C_2-C_6アルケニル、C_2-C_6アルキニル、C_3-C_7シクロアルキル、C_3-C_7シクロアルキル－C_1-C_4アルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル－C_1-C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1-C_4アルキル、C_1-C_7ヘテロアリール、C_1-C_7ヘテロアリール－C_1-C_4アルキル、－OR^O、－SR^O、－S（＝O）R^P、－S（＝O）$_2R^P$、－S（＝O）NR^sR^t、－C（＝O）R^P、－C（＝O）OR^P、－C（＝O）NR^sR^t、－OC（＝O）R^P、－OC（＝O）NR^sR^t、－NR^sR^t、－NR^qC（＝O）R^r、－NR^qC（＝O）OR^r、－NR^qC（＝O）NR^r、－NR^qS（＝O）$_2R^r$、および－NR^PS（＝O）$_2NR^sR^t$［式中、前記C_1-C_6アルキル、C_2-C_6アルケニル、C_2-C_6アルキニルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR’基により置換されていてもよく；前記C_3-C_7シクロアルキル、C_3-C_7シクロアルキル－C_1-C_4アルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル－C_1-C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1-C_4アルキル、C_1-C_7ヘテロアリール、C_1-C_7ヘテロアリール－C_1-C_4アルキルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR’’基により置換されていてもよい］から選択され；

各R^a、R^b、およびR^cは、独立して、H、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6ハロアルキル、C_2-C_6アルケニル、C_2-C_6アルキニル、C_3-C_7シクロアルキル、C_3-C_7シクロアルキル－C_1-C_4アルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル－C_1-C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1-C_4アルキル、C_1-C_7ヘテロアリール、C_1-C_7ヘテロアリール－C_1-C_4アルキル［式中、前記C_1-C_6アルキル、C_1-C_6ハロアルキル、C_2-C_6アルケニル、C_2-C_6アルキニルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR^w基により置換されていてもよく；前記C_3-C_7シクロアルキル、C_3-C_7シクロアルキル－C_1-C_4アルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル－C_1-C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1-C_4アルキル、C_1-C_7ヘテロアリール、C_1-C_7ヘテロアリール－C_1-C_4アルキルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR^x基により置換されていてもよい］から選択され；

各R^O、R^P、R^q、R^r、R^s、およびR^tは、独立して、H、C_1-C_6アルキル、C_1-C_6ハロアルキル、C_2-C_6アルケニル、C_2-C_6アルキニル、C_3-C_7シクロアルキル、C_3-C_7シクロアルキル－C_1-C_4アルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル－C_1-C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1-C_4アルキル、C_1-C_7ヘテロアリール、C_1-C_7ヘテロアリール－C_1-C_4アルキル［式中、前記C_1-C_6アルキル、C_1-C_6ハロアルキル、C_2-C_6アルケニル、C_2-C_6アルキニルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR^y基により置換されていてもよく；前記C_3-C_7シクロアルキル、C_3-C_7シクロアルキル－C_1-C_4アルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル、C_2-C_7ヘテロシクロアルキル－C_1-C_4アルキル、フェニル、フェニル－C_1-C_4アルキル、C_1-C_7ヘテロアリール、C_1-C_7ヘテロアリール－C_1-C_4アルキルは、各々、１つ、２つ、３つ、または４つの、独立して選択されたR^z基により置換されていてもよい］から選択され；

各R’、R^w、およびR^yは、独立して、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、C_1-C_4アルコキシ、C_1-C_4ハロアルコキシ、アミノ、C_1-C_4アルキルアミノ、およびジC_1-C_4アルキルアミノ
から選択され；

各R’’、R^x、およびR^zは、独立して、ヒドロキシル、ハロゲン、シアノ、ニトロ、C_1-C_4アルキル、C_1-C_4ハロアルキル、C_1-C_4アルコキシ、C_1-C_4ハロアルコキシ、アミノ、C_1-C_4アルキルアミノ、およびジ－C_1-C_4アルキルアミノ
から選択される］

でありうる。

【０１１５】

適切には、上記の式の機能的変異体／誘導体は、本発明の抗体に対して、ＤＯＴＡＭの親和性と同等であるか、またはこれを超える親和性を有し、Ｐｂに対して、ＤＯＴＡＭの親和性と同等であるか、またはこれを超える結合強度（上記で記載された解離定数により測定されるものとしての「親和性」）を有する。例えば、機能的変異体／誘導体の、本発明の抗体／Ｐｂに対する解離定数は、ＤＯＴＡＭの、同じ抗体／Ｐｂに対する解離定数の１．１分の１もしくはこれ未満、１．２分の１もしくはこれ未満、１．３分の１もしくはこれ未満、１．４分の１もしくはこれ未満、１．５分の１もしくはこれ未満、または２分の１もしくはこれ未満でありうる。

【０１１６】

各R^Nは、Ｈ、C_1－C_6アルキル、またはC_1－C_6ハロアルキル；好ましくは、Ｈ、C_1－C_4アルキル、またはC_1－C_4ハロアルキルでありうる。最も好ましくは、各R^Nは、Ｈである。

【０１１７】

ＤＯＴＡＭ変異体について述べると、１つ、２つ、３つ、または、最も好ましくは、各L^2は、C_2アルキレンであることが好ましい。ＤＯＴＡＭのC_2アルキレン変異体は、特に、Ｐｂに対する高親和性を有しうると有利である。L^2に対する、任意選択の置換基は、R^1、C_1－C_4アルキル、またはC_1－C_4ハロアルキルでありうる。適切には、L^2に対する、任意選択の置換基は、C_1－C_4アルキルの場合もあり、C_1－C_4ハロアルキルの場合もある。

【０１１８】

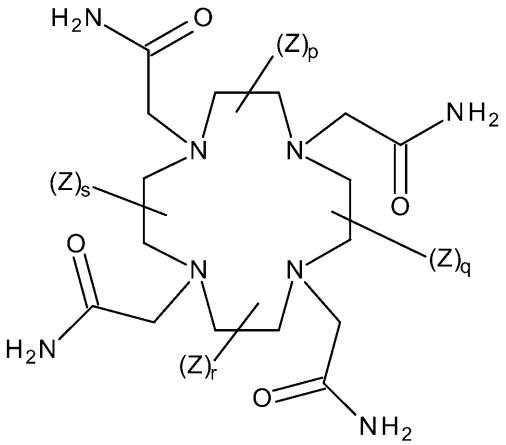
任意選択で、各L^2は、非置換C_2アルキレン－CH_2CH_2－でありうる。

【０１１９】

各L^1とは、好ましくは、C_1－C_4アルキレン、より好ましくは、－CH_2－などのC_1アルキレンである。

【０１２０】

ＤＯＴＡＭの機能的変異体／誘導体は、以下の式：



［式中、各Ｚは、独立して、上記で規定されたR^1であり；ｐ、ｑ、ｒ、およびｓは、０、１、または２であり、ｐ＋ｑ＋ｒ＋ｓは、１またはこれを超える。好ましくは、ｐ、ｑ、ｒ、およびｓは、０または１であり、かつ／またはｐ＋ｑ＋ｒ＋ｓは、１である。例えば、化合物は、ｐ＋ｑ＋ｒ＋ｓ＝１［式中、Ｚは、ｐ－ＳＣＮ－ベンジル部分（このような化合物は、Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓ，Ｉｎｃ．（Ｐｌａｎｏ、Ｔｅｘａｓ）から市販されている）である］を有しうる］

の化合物でありうる。

【０１２１】

本発明において有用な放射性核種は、鉛（Ｐｂ）、ルテチウム（Ｌｕ）、またはイットリウム（Ｙ）などの金属の放射性同位体を含むことができる。

【０１２２】

イメージング適用において特に有用な放射性核種は、ガンマ放射体である放射性核種でありうる。例えば、放射性核種は、^{203}Ｐｂまたは^{205}Ｂｉから選択されうる。

【０１２３】

治療適用において特に有用な放射性核種は、アルファ放射体またはベータ放射体である放射性核種でありうる。例えば、放射性核種は、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{90}Ｙ、^{177}Ｌｕ、^{225}Ａｃ、^{211}Ａｔ、^{227}Ｔｈ、^{223}Ｒａから選択されうる。

【０１２４】

一部の実施形態では、ＤＯＴＡＭ（またはその塩もしくは機能的変異体）は、上記で列挙された、ＰｂまたはＢｉの放射性同位体のうちの１つなど、ＰｂまたはＢｉと共にキレート化されることが好ましい場合がある。他の実施形態では、ＤＯＴＡ（またはその塩もしくは機能的変異体）は、上記で列挙された、ＬｕまたはＹの放射性同位体のうちの１つなど、ＬｕまたはＹと共にキレート化されることが好ましい場合がある。

【０１２５】

一部の実施形態では、方法および使用は、放射性同位体の混合物、例えば、治療に適する放射性同位体と、イメージングに適する放射性同位体との混合物を使用する、治療とイメージングとの組合せ法を含むことができる。例えば、これらは、同じキレート剤によりキレート化された、同じ金属の、異なる放射性同位体でありうる。一実施形態では、方法は、^{203}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ、および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、混合物として投与することを含むことができる。別の実施形態では、方法は、^{203}Ｐｂまたは^{205}Ｂｉなどのガンマ放射体を使用する第１の線量測定サイクルに続き、^{212}Ｐｂ、^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ、^{90}Ｙ、^{177}Ｌｕ、^{225}Ａｃ、^{211}Ａｔ、^{227}Ｔｈ、または^{223}Ｒａなどのアルファ放射体またはベータ放射体を使用する１つまたは複数のラウンドにわたる処置を含むことができる。このような方法については、下記でさらに記載される。

【０１２６】

一部の実施形態では、第１の抗体と第２の抗体との会合により形成される、機能的結合部位は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートに結合しうる。

【０１２７】

一部の実施形態では、第１の抗体と第２の抗体との会合により形成される、機能的結合部位は、放射標識化合物に特異的に結合しうる。一部の実施形態では、機能的結合部位は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートなどの放射標識化合物に、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよび／または標的に対する、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭもしくは≦０．００１ｎＭ（例えば、10^{-7}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-7}～10^{-13}、10^{-8}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（ＫＤ）で結合しうる。一部の実施形態では、機能的結合部位は、結合親和性についての、１００ｐＭ、５０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭもしくはこれ未満、例えば、０．９ｐＭもしくはこれ未満、０．８ｐＭもしくはこれ未満、０．７ｐＭもしくはこれ未満、０．６ｐＭもしくはこれ未満、または０．５ｐＭもしくはこれ未満のＫｄ値で結合することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、金属キレートに、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭ、または５００ｐＭ～１ｎＭのＫｄで結合しうる。

【０１２８】

Ｃ．ＤＯＴＡに対する例示的抗原結合部位

本発明についての特定の一実施形態では、第１の抗体と第２の抗体とは、会合して、ＤＯＴＡ（またはその機能的誘導体もしくは機能的変異体）、例えば、ＬｕまたはＹ（例えば、^{177}Ｌｕまたは^{90}Ｙ）と共にキレート化されたＤＯＴＡに対する機能的結合部位を形成する。例えば、機能的結合部位は、放射標識化合物に、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば

、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭ、または５００ｐＭ～１ｎＭのＫｄで結合しうる。

【０１２９】

Ｃ８２５とは、^{177}ＬｕおよびY^{90}などの放射性金属と錯体化しているＤＯＴＡ－Ｂｎ（Ｓ－２－（４－アミノベンジル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン四酢酸）に対する高親和性を伴う、公知のｓｃＦｖである（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Ｃｈｅａｌら、２０１８、Ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ、２０１８、およびＷＯ２０１００９９５３６を参照されたい）。本明細書には、Ｃ８２５ＣＤＲ配列ならびにＶＬ配列およびＶＨ配列が提示される。一実施形態では、放射標識化合物に対する抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変領域は、（ａ）配列番号３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含むことができる。代替的実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、ＧＦＳＬＴＤＹＧＶＨ（配列番号１４８）の配列を有しうる。放射標識化合物に対する結合部位の一部を形成する軽鎖可変領域は、（ｄ）配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含むことができる。

【０１３０】

別の実施形態では、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変ドメイン（第１の抗体上の）は、配列番号４１、または配列番号４１に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む結合部位は、ＬｕまたはＹと錯体化しているＤＯＴＡに、好ましくは、本明細書で記載される親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号４１内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗体は、配列番号４１内のＶＨ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号３５のアミノ酸配列またはＧＦＳＬＴＤＹＧＶＨ（配列番号１４８）の配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１３１】

任意選択で、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位の一部を形成する軽鎖可変ドメイン（第２の抗体上の）は、配列番号４２、または配列番号４２に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含む、その変異体のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む結合部位は、ＬｕまたはＹと錯体化しているＤＯＴＡに、好ましくは、本明細書で記載される親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号４２内の合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗体は、配列番号４２内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号４０のアミノ

酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。
【０１３２】
重鎖可変領域および軽鎖可変領域に関する実施形態は、明示的に、組合せで想定される。したがって、機能的抗原結合部位は、第１の抗体および第２の抗体のそれぞれにおいて、上記で規定された重鎖可変領域と、上記で規定された軽鎖可変領域とから形成されうる。
【０１３３】
上記の実施形態のうちのいずれかでは、ＤＯＴＡ錯体に対する結合部位を形成する、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、ヒト化されうる。一実施形態では、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。
【０１３４】
一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、下記でさらに論じられる通り、１つまたは複数のＣ末端アラニン残基、またはＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する１つまたは複数の残基など、１つまたは複数のＣ末端残基により伸長されうる。
【０１３５】
Ｄ．ＤＯＴＡＭに対する、例示的な抗原結合部位
本発明についての別の特定の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、会合して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位キレート（Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）を形成する。
【０１３６】
ある特定の実施形態では、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに結合する、機能的抗原結合部位は、以下の特性：
・Ｐｂ－ＤＯＴＡＭおよびＢｉ－ＤＯＴＡＭに特異的に結合する特性；
・Ｃｕ－ＤＯＴＡＭなど、他のキレート化金属と比較して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（および、任意選択で、Ｂｉ－ＤＯＴＡＭ）に対して選択的である特性；
・Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに、極めて高度の親和性で結合する特性；
・Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ上の、本明細書で記載される抗体、例えば、ＰＲＩＴ－０２１３もしくはＰＲＩＴ－０２１４と同じエピトープに結合する特性、および／または前記抗体と同じ接触残基を有する特性
のうちの１つまたは複数を有しうる。
【０１３７】
Ｐｂの放射性同位体は、診断法および治療において有用である。本発明において有用でありうる鉛の、特定の放射性同位体は、^{212}ＰｂおよびＰｂを含む。
【０１３８】
α粒子放射体である放射性核種は、短い経路長と、高度な線エネルギー転移との組合せのために、周囲組織への損傷が、β放射体より小さく、より特異的な腫瘍細胞の殺滅の潜在的可能性を有する。^{212}Ｂｉは、α粒子放射体であるが、その短い半減期は、その直接的な使用を妨げる。^{212}Ｐｂは、^{212}Ｂｉの親放射性核種であり、ｉｎ ｖｉｖｏにおける^{212}Ｂｉの発生源として用いられ、これにより、^{212}Ｂｉの短い半減期を、効果的に克服しうる（ＹｏｎｇおよびＢｒｅｃｈｂｉｅｌ、Ｄａｌｔｏｎ Ｔｒａｎｓ．、２００１年６月２１日、４０（２３）６０６８～６０７６）。
【０１３９】
Ｐｂは、イメージング同位体として有用である。したがって、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに結合している抗体は、ラジオイムノイメージング（ＲＩＩ）において、有用性を有しうる。
【０１４０】
一般に、放射性金属は、キレート化形態で使用される。本発明のある特定の態様では、ＤＯＴＡＭは、キレート剤として使用される。ＤＯＴＡＭは、Ｐｂ（ＩＩ）の安定的なキ

レート剤（ＹｏｎｇおよびＢｒｅｃｈｂｉｅｌ、Ｄａｌｔｏｎ Ｔｒａｎｓ．、２００１年６月２１日、４０（２３）６０６８～６０７６；Ｃｈａｐｐｅｌｌら、Ｎｕｃｌｅａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｙ、２７巻、９３～１００頁、２０００）である。したがって、ＤＯＴＡＭは、^{212}ＰｂおよびＰｂなど、上記で論じられた鉛の同位体を伴う場合に、特に有用である。

【０１４１】

一部の実施形態では、抗体が、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに、結合親和性についての、１００ｐＭ、５０ｐＭ、２０ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭもしくはこれ未満、例えば、０．９ｐＭもしくはこれ未満、０．８ｐＭもしくはこれ未満、０．７ｐＭもしくはこれ未満、０．６ｐＭもしくはこれ未満、または０．５ｐＭもしくはこれ未満のＫｄ値で結合することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、放射標識化合物に、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭ、または５００ｐＭ～１ｎＭのＫｄで結合しうる。

【０１４２】

ある特定の実施形態では、抗体は、加えて、ＤＯＴＡＭによりキレート化されたＢｉに結合する。一部の実施形態では、抗体は、Ｂｉ－ＤＯＴＡＭ（すなわち、本明細書ではまた、「Ｂｉ－ＤＯＴＡＭキレート」とも称する、ビスマスと錯体化しているＤＯＴＡＭを含むキレート）に、結合親和性についての、１ｎＭ、５００ｐＭ、２００ｐＭ、１００ｐＭ、５０ｐＭ、１０ｐＭもしくはこれ未満、例えば、９ｐＭ、８ｐＭ、７ｐＭ、６ｐＭ、５ｐＭもしくはこれ未満のＫｄ値で結合することが好ましい場合がある。例えば、機能的結合部位は、金属キレートに、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭ、または５００ｐＭ～１ｎＭのＫｄで結合しうる。

【０１４３】

一部の実施形態では、抗体は、Ｂｉ－ＤＯＴＡＭおよびＰｂ－ＤＯＴＡＭに、同様の親和性で結合しうる。例えば、Ｂｉ－ＤＯＴＡＭ／Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する親和性の比、例えば、Ｋｄ値の比は、０．１～１０、例えば、１～１０の範囲にあることが好ましい場合がある。

【０１４４】

一実施形態では、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのための抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変領域は、（ａ）ＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳのアミノ酸配列（配列番号１）を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧのアミノ酸配列（配列番号２）を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬのアミノ酸配列（配列番号３）を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含むことができる。Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのための抗原結合部位の一部を形成する軽鎖可変領域は、（ｄ）ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡのアミノ酸配列（配列番号４）を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）ＱＡＳＫＬＡＳのアミノ酸配列（配列番号５）を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）ＬＧＧＹＤＤＥＳＤＴＹＧのアミノ酸配列（配列番号６）を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、または３つ全てのＣＤＲを含むことができる。

【０１４５】

一部の実施形態では、抗体は、配列番号１～６のアミノ酸配列と比較した置換、それぞれ、例えば、１つ、２つ、または３つの置換を有する、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、および／またはＣＤＲ－Ｈ３のうちの１つまたは複数、またはＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、および／またはＣＤＲ－Ｌ３のうちの１つまたは複数を含むことができる。

【０１４６】

一部の実施形態では、抗体は、本明細書で記載される接触残基と同じ接触残基を共有しうる：例えば、これらの残基は、不変でありうる。これらの残基は、以下を含むことができる：全てが、カバットに従い番号付けされる、

ａ）重鎖ＣＤＲ２内に、Ｐｈｅ５０、Ａｓｐ５６、および／またはＴｙｒ５８を含むことができ、任意選択でまた、Ｇｌｙ５２および／またはＡｒｇ５４も含むことができる；

ｂ）重鎖ＣＤＲ３内に、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８、Ｔｙｒ９９、Ａｌａ１００Ｃ、および／またはＴｙｒ１００Ｄを含むことができ、任意選択でまた、Ｐｒｏ１００Ｅも含むことができる；

ｃ）軽鎖ＣＤＲ１内に、Ｔｙｒ２８および／またはＡｓｐ３２を含むことができる；

ｄ）軽鎖ＣＤＲ３内に、Ｇｌｙ９１、Ｔｙｒ９２、Ａｓｐ９３、Ｔｈｒ９５ｃ、および／またはＴｙｒ９６を含むことができる；

ｅ）軽鎖ＣＤＲ２内に、任意選択で、Ｇｌｎ５０を含むことができる。

【０１４７】

例えば、一部の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ２は、ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧ（配列番号２）のアミノ酸配列、または配列番号２内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含むことができ、この場合、これらの置換は、全てが、カバットに従い番号付けされる、Ｐｈｅ５０、Ａｓｐ５６、および／またはＴｙｒ５８を含まず、任意選択で、また、Ｇｌｙ５２および／またはＡｒｇ５４も含まない。

【０１４８】

一部の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ２は、下記に示される、１つまたは複数の位置において置換されうる。本明細書、および以下の置換表において、置換は、生殖系列残基（下線を付された）に基づくか、または理論的に、立体適合し、また、結晶レパートリーのこの部位においても生じるアミノ酸による。一部の実施形態では、上記で言及された残基は、固定され、他の残基が、下記の表に従い置換される場合もあり、他の実施形態では、任意の残基の置換が、下記の表に従いなされる場合もある。

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

【０１４９】
任意選択で、ＣＤＲ－Ｈ３は、ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬ（配列番号３）のアミノ酸配列、または配列番号３内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含むことができ、この場合、これらの置換は、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８を含まず、任意選択でまた、Ａｌａ１００Ｃ、Ｔｙｒ１００Ｄ、および／もしくはＰｒｏ１００Ｅも含まず、かつ／または、任意選択でまた、Ｔｙｒ９９も含まない。例えば、一部の実施形態では、置換は、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８、Ｔｙｒ９９、Ａｌａ１００Ｃ、およびＴｙｒ１００Ｄを含まない。
【０１５０】
ある特定の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ３は、下記に示される、１つまたは複数の位置において置換されうる。一部の実施形態では、上記で言及された残基は、固定され、他の残基が、下記の表に従い置換される場合もあり、他の実施形態では、任意の残基の置換が、下記の表に従いなされる場合もある。

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

【０１５１】
任意選択で、ＣＤＲ－Ｌ１は、ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡ（配列番号４）のアミノ酸配列、または配列番号４内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含むことができ、この場合、これらの置換は、Ｔｙｒ２８および／またはＡｓｐ３２（カバット番号付け）を含まない。
【０１５２】
ある特定の実施形態では、ＣＤＲ－Ｌ１は、下記に示される、１つまたは複数の位置において置換されうる。ここでもまた、一部の実施形態では、上記で言及された残基は、固定され、他の残基が、下記の表に従い置換される場合もあり、他の実施形態では、任意の

残基の置換が、下記の表に従いなされる場合もある。

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

【０１５３】

任意選択で、ＣＤＲ－Ｌ３は、ＬＧＧＹＤＤＥＳＤＴＹＧ（配列番号６）のアミノ酸配列、または配列番号６内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含むことができ、この場合、これらの置換は、Ｇｌｙ９１、Ｔｙｒ９２、Ａｓｐ９３、Ｔｈｒ９５ｃ、および／またはＴｙｒ９６（カバット）を含まない。

【０１５４】

ある特定の実施形態では、ＣＤＲ－Ｌ３は、下記に示される、以下の位置において置換されうる（大半の残基は、溶媒に曝露され、抗原との接触部を伴わないので、多くの置換が想定できる）。ここでもまた、一部の実施形態では、上記で言及された残基は、固定され、他の残基が、下記の表に従い置換される場合もあり、他の実施形態では、任意の残基の置換が、下記の表に従いなされる場合もある。

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

【０１５５】

抗体は、任意選択で、配列番号１または配列番号５のそれぞれの配列、またはこれらに対して、少なくとも１つ、２つ、もしくは３つの置換、任意選択で、保存的置換を有する、これらの変異体を有する、ＣＤＲ－Ｈ１またはＣＤＲ－Ｌ２をさらに含むことができる。

【０１５６】

したがって、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのための抗原結合部位の一部を形成する重鎖可変ドメインは、少なくとも：

ａ）ＦＩＧＳＲＧＤＴＹＹＡＳＷＡＫＧのアミノ酸配列（配列番号２）、または配列番

号２内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、これらの置換が、Ｐｈｅ５０、Ａｓｐ５６、および／またはＴｙｒ５８を含まず、任意選択でまた、Ｇｌｙ５２および／またはＡｒｇ５４も含まない、重鎖ＣＤＲ２；

ｂ）ＥＲＤＰＹＧＧＧＡＹＰＰＨＬのアミノ酸配列（配列番号３）、または配列番号３内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、これらの置換が、Ｇｌｕ９５、Ａｒｇ９６、Ａｓｐ９７、Ｐｒｏ９８を含まず、任意選択でまた、Ａｌａ１００Ｃ、Ｔｙｒ１００Ｄ、および／もしくはＰｒｏ１００Ｅも含まず、かつ／または、任意選択でまた、Ｔｙｒ９９も含まない重鎖ＣＤＲ３

を含むことができる。

【０１５７】

一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、加えて、任意選択で、

ｃ）ＧＦＳＬＳＴＹＳＭＳのアミノ酸配列（配列番号１）、または配列番号１内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含む重鎖ＣＤＲ１

である重鎖ＣＤＲ１を含む。

【０１５８】

一部の実施形態では、重鎖可変ドメインは、加えて、遊離ＶＨ領域を認識する、既存の抗体の結合を回避するように、Ｃ末端アラニン（例えば、カバット番号付けシステムに従う、Ａｌａ　１１４）を含む。Ｈｏｌｌａｎｄ　ＭＣら、Ｊ．Ｃｌｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ（２０１３）において報告されている通り、ＨＡＶＨ自己抗体は、インタクトのＩｇＧ、もしくは同じＶＨフレームワーク配列を含有するＩｇＧ断片（ｆＡｂまたは修飾ＶＨ分子）、またはＶＫドメイン抗体に結合しないので、遊離Ｃ末端は、ＨＡＶＨ（ヒト抗ＶＨドメイン）自己抗体の、ＶＨドメイン抗体への結合に重要であると考えられる。ＣｏｒｄｙＪＣら、Ｃｌｉｎｉｃａｌ　ａｎｄ　Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（２０１５）は、完全ＩｇＧ分子内のＨＡＶＨ抗体に、天然ではアクセスできない、ＶＨｄＡｂのＣ末端エピトープにおける、クリプティックエピトープの存在に言及している。

【０１５９】

したがって、抗体が、遊離ＶＨ領域（そのＣ末端において、他の任意のドメインに融合していないＶＨ領域）を含む場合、配列は、１つまたは複数のＣ末端残基により伸長されうる。伸長は、遊離ＶＨ領域を認識する抗体の結合を防止しうる。例えば、伸長は、１つ～１０の残基、例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０の残基による伸長でありうる。一実施形態では、ＶＨ配列は、１つまたは複数のＣ末端アラニン残基により伸長されうる。ＶＨ配列はまた、ＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基によっても伸長されうる（ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインの、最初の１０の残基は、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰ（配列番号１４９）であるので、一実施形態では、１つ～１０の残基は、この配列のＮ末端から採取されうる）。例えば、一実施形態では、ペプチドであるＡＳＴの配列（ＩｇＧ１のＣＨ１ドメインの、最初の３つの残基に対応する）は、ＶＨ領域のＣ末端に付加されている。

【０１６０】

別の実施形態では、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのための抗原結合部位の一部を形成する軽鎖可変ドメインは、少なくとも：

ｄ）ＱＳＳＨＳＶＹＳＤＮＤＬＡのアミノ酸配列（配列番号４）、または配列番号４内に、最大で、１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、これらの置換が、Ｔｙｒ２８およびＡｓｐ３２を含まない、軽鎖ＣＤＲ１；

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

【０１６１】

一部の実施形態では、軽鎖可変ドメインは、加えて、任意選択で、

ｆ）ＱＡＳＫＬＡＳのアミノ酸配列（配列番号５）、または配列番号５内に少なくとも１つ、２つ、もしくは３つの置換を有するその変異体を含み、任意選択でＧｌｎ５０を含まない、軽鎖ＣＤＲ２
である、軽鎖ＣＤＲ２
を含む。

【０１６２】

上記で明示されたＣＤＲ（例えば、可変ドメインの）を含む配列の変異体を含む、本発明の任意の実施形態では、タンパク質は、上記で明示されたＣＤＲ残基のうちの１つまたは複数において、不変でありうる。

【０１６３】

任意選択で、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位（第１の抗体上の）の一部を形成する重鎖可変ドメインは、配列番号７および配列番号９、または配列番号７または配列番号９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むこれらの変異体からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む結合部位は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに、好ましくは、本明細書で記載される親和性で結合する能力を保持する。ＶＨ配列は、上記で明示された不変残基を保持しうる。ある特定の実施形態では、配列番号７または配列番号９における、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗体は、配列番号７または配列番号９におけるＶＨ配列であって、任意選択で、Ｃ末端のＡｌａを伴う、この配列の翻訳後修飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１６４】

上記で言及された、一部の実施形態の、一部の変異体では、配列番号７または９は、１つまたは複数のさらなるＣ末端残基により、例えば、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基により伸長されうる。したがって、例えば、具体的な一変異体では、配列番号７の配列は、
VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTY
YASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWG
RGTLVTVSSA（配列番号１５０）
となるように伸長されうる。

【０１６５】

他の実施形態では、伸長は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分による伸長、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、１つ～１０の残基による伸長でありうる。例えば、伸長は、ペプチドであるＡＳＴの配列による伸長でありうる。

【０１６６】

任意選択で、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位（第２の抗体上の）の一部を形成する軽鎖可変ドメインは、配列番号８、または配列番号８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、もしくは９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むその変異体のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ結合部位は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに、好ましくは、本明細書で記載される親和性で結合する能力を保持する。Ｖ

Ｌ配列は、上記で明示された不変残基を保持しうる。ある特定の実施形態では、配列番号８内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＣＤＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、抗Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ抗体は、配列番号８内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１６７】

重鎖可変領域および軽鎖可変領域に関する実施形態は、明示的に、組合せで想定される。したがって、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位は、第１の抗体および第２の抗体のそれぞれにおいて、上記で規定された重鎖可変領域と、上記で規定された軽鎖可変領域とから形成されうる。

【０１６８】

任意選択で、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートに特異的な抗原結合部位は、上記で規定された通り、配列番号７もしくは配列番号９からなる群から選択されるアミノ酸配列、または上記で規定されたこれらの変異体（上記で論じられたＣ末端伸長を伴う変異体を含む）を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号８のアミノ酸配列またはその変異体を含む軽鎖可変ドメインから形成されうる。例えば、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートに特異的な抗原結合部位は、これらの配列の翻訳後修飾を含む、配列番号７のアミノ酸配列またはその変異体を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号８のアミノ酸配列またはその変異体を含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。別の実施形態では、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートに特異的な抗原結合部位は、これらの配列の翻訳後修飾を含む、配列番号９のアミノ酸配列またはその変異体（上記で論じられたＣ末端伸長を伴う変異体を含む）を含む重鎖可変ドメイン、および配列番号８のアミノ酸配列またはその変異体を含む軽鎖可変ドメインを含むことができる。

【０１６９】

上記の実施形態のうちのいずれかでは、抗Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ結合部位を形成する、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、ヒト化されうる。一実施形態では、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。別の実施形態では、軽鎖可変領域および／または重鎖可変領域は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ｖｋ　１～３９および／またはｖｈ　２～２６に由来するフレームワーク領域をさらに含む。一部の実施形態では、ｖｋ　１～３９について、復帰突然変異は存在しない場合がある。ｖｈ　２～２６について、生殖系列Ａｌａ４９残基は、Ｇｌｙ４９に復帰突然変異する場合がある。

【０１７０】

Ｅ．ＣＥＡに対する例示的抗原結合部位

上記で論じられた実施形態と組み合わされうる、本発明の、別の特定の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体が結合する標的抗原は、ＣＥＡ（がん胎児性抗原）でありうる。ＣＥＡに対して惹起されている抗体は、Ｔ８４．６６、ならびにＷＯ２０１６／０７５２７８Ａ１および／またはＷＯ２０１７／０５５３８９において記載されている、Ｔ８４．６６－ＬＣＨＡなど、そのヒト化形およびキメラ形、ＷＯ２０１２／１１７００２およびＷＯ２０１４／１３１７１２において記載されている抗ＣＥＡ抗体である、ＣＨ１Ａ１ａ、ならびにＣＥＡ　ｈＭＮ－１４またはラベツズマブ（例えば、ＵＳ６６７６９２４およびＵＳ５８７４５４０において記載されている）を含む。ＣＥＡに対する、別の例示的抗体は、Ａ５Ｂ７（例えば、Ｍ．Ｊ．Ｂａｎｆｉｅｌｄら、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ、１９９７、２９（２）、１６１～１７１において記載されている）、またはＷＯ９２／０１０５９およびＷＯ２００７／０７１４２２において記載されているマウスＡ５Ｂ７に由来するヒト化抗体である。また、同時係属出願である、ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２も

参照されたい。Ａ５Ｂ７のヒト化型の例は、Ａ５Ｈ１ＥＬ１（Ｇ５４Ａ）である。ＣＥＡに対する、さらなる例示的抗体は、ＵＳ７６２６０１１および／または同時係属出願である、ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２において記載されているＭＦＥ２３、およびそのヒト化形である。抗ＣＥＡ抗体の、なおさらなる例は、２８Ａ９である。これらの抗体、またはこれらの抗原結合断片のうちのいずれかは、本発明におけるＣＥＡ結合部分を形成するのに使用されうる。

【０１７１】

任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、一価の結合についての、１ｎＭもしくはこれ未満、５００ｐＭもしくはこれ未満、２００ｐＭもしくはこれ未満、または１００ｐＭもしくはこれ未満のＫｄ値で結合しうる。

【０１７２】

一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、ＣＥＡのＣＨ１Ａ１ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープ、または２８Ａ９エピトープに結合しうる。

【０１７３】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体のうちの少なくとも１つは、可溶型ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）上に存在しないＣＥＡエピトープに結合する。可溶型ＣＥＡは、ＧＰＩホスホリパーゼにより切断され、血液に放出される、ＣＥＡ分子の一部である。可溶型ＣＥＡ上で見出されないエピトープの例は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープである。任意選択で、第１の抗体および／または第２の抗体のうちの１つは、可溶型ＣＥＡ上に存在しないエピトープに結合し、他方は、可溶型ＣＥＡ上に存在するエピトープに結合する。

【０１７４】

ＣＨ１Ａ１ａおよびその親マウス抗体であるＰＲ１Ａ３のエピトープについては、ＷＯ２０１２／１１７００２Ａ１、およびＤｕｒｂｉｎ　Ｈ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ｓｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１：４３１３～４３１７、１９９４において記載されている。ＣＨ１Ａ１ａエピトープに結合する抗体は、ＣＥＡ分子のＢ３ドメイン内およびＧＰＩアンカー内のコンフォメーションエピトープに結合する。一態様では、抗体は、本明細書における配列番号２５のＶＨおよび配列番号２６のＶＬを有するＣＨ１Ａ１ａ抗体と同じエピトープに結合する。Ａ５Ｂ７エピトープについては、同時係属出願である、ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２において記載されている。Ａ５Ｂ７エピトープに結合する抗体は、ＣＥＡのＡ２ドメイン、すなわち、配列番号１５４：

ＰＫＰＦＩＴＳＮＮＳＮＰＶＥＤＥＤＡＶＡＬＴＣＥＰＥＩＱＮＴＴＹＬＷＷＶＮＮＱＳＬＰＶＳＰＲＬＱＬＳＮＤＮＲＴＬＴＬＬＳＶＴＲＮＤＶＧＰ　ＹＥＣＧＩＱＮＫＬＳＶＤＨＳＤＰＶＩＬＮ（配列番号１５４）

のアミノ酸を含むドメインに結合する。

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

【０１７５】

一態様では、抗体は、ＷＯ２０１６／０７５２７８において記載されているＴ８４．６６と同じエピトープに結合する。抗体は、本明細書における配列番号１７のＶＨおよび配列番号１８のＶＬを有する抗体と同じエピトープに結合しうる。

【０１７６】

ＭＦＥ２３エピトープについては、同時係属出願である、ＰＣＴ／ＥＰ２０２０／０６７５８２において記載されている。ＭＦＥ２３エピトープに結合する抗体は、ＣＥＡのＡ１ドメイン、すなわち、配列番号１５５：

ＰＫＰＳＩＳＳＮＮＳＫＰＶＥＤＫＤＡＶＡＦＴＣＥＰＥＴＱＤＡＴＹＬＷＷＶＮＮＱＳＬＰＶＳＰＲＬＱＬＳＮＧＮＲＴＬＴＬＦＮＶＴＲＮＤＴＡＳＹＫＣＥＴＱＮＰＶＳＡＲＲＳＤＳＶＩＬＮ（配列番号１５５）

のアミノ酸を含むドメインに結合する。

一態様では、抗体は、本明細書における配列番号１６７のＶＨドメインおよび配列番号１

６８のＶＬドメインを有する抗体と同じエピトープに結合しうる。

【０１７７】

一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、本明細書で提示される抗体、例えば、Ｐ１ＡＤ８７４９、Ｐ１ＡＤ８５９２、Ｐ１ＡＥ４９５６、Ｐ１ＡＥ４９５７、Ｐ１ＡＦ０７０９、Ｐ１ＡＦ０２９８、Ｐ１ＡＦ０７１０、またはＰ１ＡＦ０７１１と同じＣＥＡエピトープに結合しうる。

【０１７８】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、ＣＥＡの、互いと同じエピトープに結合する。したがって、例えば、第１の抗体および第２の抗体の両方は、ＣＨ１Ａ１ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープ、または２８Ａ９エピトープに結合しうる。

【０１７９】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の両方は、ＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲおよび／またはＶＨ／ＶＬドメイン）を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、Ａ５Ｂ７またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、Ｔ８４．６６またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、ＭＦＥ２３またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、２８Ａ９またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もある。例示的配列は、本明細書で開示される。

【０１８０】

他の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、ＣＥＡの異なるエピトープに結合する。したがって、例えば、ｉ）一方の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合することが可能であり、他方の抗体は、Ａ５Ｂ７エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、または２８Ａ９エピトープに結合する場合もあり；ｉｉ）一方の抗体は、Ａ５Ｂ７エピトープに結合することが可能であり、他方の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープ、Ｔ８４．６６エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、または２８Ａ９エピトープに結合する場合もあり；ｉｉｉ）一方の抗体は、ＭＦＥ２３エピトープに結合することが可能であり、他方の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、Ｔ８４．６６エピトープ、または２８Ａ９エピトープに結合する場合もあり；ｉｖ）一方の抗体は、Ｔ８４．６６エピトープに結合することが可能であり、他方の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、または２８Ａ９エピトープに結合する場合もあり；ｖ）一方の抗体は、２８Ａ９エピトープに結合することが可能であり、他方の抗体は、ＣＨ１Ａ１ａエピトープ、Ａ５Ｂ７エピトープ、ＭＦＥ２３エピトープ、またはＴ８４．６６エピトープに結合する場合もある。

【０１８１】

一部の実施形態では、ｉ）一方の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有することが可能であり、他方は、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化型、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化型、ＭＦＥ２３もしくはそのヒト化型、または２８Ａ９もしくはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり；ｉｉ）一方の抗体は、Ａ５Ｂ７またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化型、ＭＦＥ２３もしくはそのヒト化型、または２８Ａ９もしくはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり；ｉｉｉ）一方の抗体は、ＭＦＥ２３またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化型、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化型、または２８Ａ９もしくはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり；ｉｖ）一方の抗体は、Ｔ８４．６６またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化型、ＭＦＥ２３もしくはそのヒト化型、または２８Ａ９もしくはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有す

ることが可能であり；ｖ）一方の抗体は、２８Ａ９またはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、他方は、ＣＨ１Ａ１Ａ、Ａ５Ｂ７もしくはそのヒト化型、Ｔ８４．６６もしくはそのヒト化型、またはＭＦＥ２３もしくはそのヒト化型に由来するＣＥＡ結合配列を有しうる。

【０１８２】

１つの特定の実施形態では、一方の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合することが可能であり、他方は、Ａ５Ｂ７エピトープに結合しうる。第１の抗体は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、第２の抗体は、Ａ５Ｂ７（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体は、抗体であるＡ５Ｂ７（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、第２の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もある。

【０１８３】

別の特定の実施形態では、一方の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合することが可能であり、他方は、Ｔ８４．６６エピトープに結合しうる。第１の抗体は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、第２の抗体は、Ｔ８４．６６（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体は、抗体であるＴ８４．６６（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、第２の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もある。一部の実施形態では、第１の抗体は、Ｔ８４．６６エピトープに結合することが可能であり、かつ／または下記の（ｉ）に記載された抗原結合部位を有することが可能であり、第２の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープに結合することが可能であり、かつ／または下記の（ｉｉ）に記載された抗原結合部位を有することが可能である。

【０１８４】

例示的ＣＥＡ結合配列であるｉ）～ｖ）は、下記に開示される。これらは、ｉ）Ｔ８４．６６、ｉｉ）ＣＨ１Ａ１Ａ、ｉｉｉ）Ａ５Ｂ７、ｉｖ）２８Ａ９、およびｖ）ＭＦＥ２３（またはそのヒト化型に由来する）に由来するＣＥＡ結合配列の例を提示する。

【０１８５】

ｉ）一実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含むことができる。

【０１８６】

任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むことができる。

【０１８７】

任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。

【０１８８】

任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号１３から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメイン；ならびに（ｂ）（ｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｉｉｉ）配列番号１６の

アミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインを含む。

【０１８９】

別の態様では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む。

【０１９０】

上記の実施形態のうちのいずれかでは、多重特異性抗体は、ヒト化されうる。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０１９１】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号１７のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号１７内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号１７内のＶＨ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１９２】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号１８のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号１８内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号１８内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０１９３】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＨ、および上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＬを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号１７および配列番号１８のそれぞれにおける、ＶＨ配列およびＶＬ配列であって、これらの配列の翻訳後修飾を含む、ＶＨ配列お

よびＶＬ配列を含む。

【０１９４】

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

【０１９５】

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

【０１９６】

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

【０１９７】

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

【０１９８】

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

【０１９９】

上記の実施形態のうちのいずれかでは、多重特異性抗体は、ヒト化されうる。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０２００】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号２５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号２５内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号２５内のＶＨ配列であって、この配列の翻訳後修

飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２０１】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号２６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号２６内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号２６内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２０２】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＨ、および上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＬを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号２５および配列番号２６のそれぞれにおける、ＶＨ配列およびＶＬ配列であって、これらの配列の翻訳後修飾を含む、ＶＨ配列およびＶＬ配列を含む。

【０２０３】

ｉｉｉ）さらなる特定の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含むことができる。一部の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）の配列を有しうる。

【０２０４】

任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むことができる。一部の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）の配列を有しうる。

【０２０５】

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

【０２０６】

任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号４５から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択さ

れる、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメイン；ならびに（ｂ）（ｉ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｉｉｉ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインを含む。一部の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）の配列を有しうる。

【０２０７】

別の態様では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む。一部の実施形態では、ＣＤＲ－Ｈ１は、ＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）の配列を有しうる。

【０２０８】

上記の実施形態のうちのいずれかでは、多重特異性抗体は、ヒト化されうる。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０２０９】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号４９のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号４９内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号４９内のＶＨ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号４３のアミノ酸配列またはＧＦＴＦＴＤＹＹＭＮ（配列番号１５１）の配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号４４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２１０】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号５０のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号５０内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号５０内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２１１】
別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＨ、および上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＬを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号４９および配列番号５０のそれぞれにおける、ＶＨ配列およびＶＬ配列であって、これらの配列の翻訳後修飾を含む、ＶＨ配列およびＶＬ配列を含む。
【０２１２】
ｉｖ）なおさらなる特定の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含むことができる。
【０２１３】
任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むことができる。
【０２１４】
任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。
【０２１５】
任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号６１から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメイン；ならびに（ｂ）（ｉ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｉｉｉ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインを含む。
【０２１６】
別の態様では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む。
【０２１７】
上記の実施形態のうちのいずれかでは、多重特異性抗体は、ヒト化されうる。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。
【０２１８】
別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号６５のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列

と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号６５内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号６５内のＶＨ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号６０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号６１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２１９】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、配列番号６６のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号６６内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号６６内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号６３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号６４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２２０】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＨ、および上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＬを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号６５および配列番号６６のそれぞれにおける、ＶＨ配列およびＶＬ配列であって、これらの配列の翻訳後修飾を含む、ＶＨ配列およびＶＬ配列を含む。

【０２２１】

ｖ）なおさらなる特定の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号１５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１５７、または１５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号１６０、１６１、または１６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号１６３、１６４、または１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含むことができる。

【０２２２】

任意選択で、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、

（ａ）配列番号１５６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号１５７、または１５８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号１５９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３である、ＶＨ　ＣＤＲ配列；ならびに／または

（ａ）配列番号１６０、１６１、または１６２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号１６３、１６４、または１６５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号１６６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３である、ＶＬ　ＣＤＲ配列

を含むことができる。

【０２２３】

一実施形態では、ＣＥＡに対する抗原結合部位は、配列番号１６７のアミノ酸配列を含むか、または（より好ましくは）配列番号１６９、１７０、１７１、１７２、１７３、もしくは１７４から選択される重鎖可変領域（ＶＨ）、および配列番号１６８のアミノ酸配列を含むか、または（より好ましくは）配列番号１７５、１７６、１７７、１７８、１７９、もしくは１８０から選択される軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０２２４】

上記の実施形態のうちのいずれかでは、多重特異性抗体は、ヒト化されうる。一実施形態では、抗ＣＥＡ抗原結合部位は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０２２５】

特定の態様では、ＣＥＡに結合することが可能な抗原結合ドメインは、

（ａ）配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｂ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｃ）配列番号１７０のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７９のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｄ）配列番号１７４のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｅ）配列番号１７３のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｆ）配列番号１７１のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、または

（ｇ）配列番号１６９のアミノ酸配列を含むＶＨドメイン、および配列番号１７８のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン

を含む。

【０２２６】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記のａ）～ｇ）で言及されたアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１つ～１０のアミノ酸は、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。

【０２２７】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記のａ）～ｇ）で言及されたアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＣＥＡに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、合計１つ～１０のアミノ酸は、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。

【０２２８】

別の実施形態では、ＣＥＡに結合する抗原結合部位は、上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＨ、および上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＬを含む。

【０２２９】

Ｆ．他の標的に対する、例示的抗原結合部位

上記で論じられた実施形態（例えば、ＤＯＴＡまたはＤＯＴＡＭに対する結合部位）と組み合わされうる、本発明の別の特定の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体が結合する標的抗原は、ＧＰＲＣ５ＤまたはＦＡＰでありうる。

【０２３０】

任意選択で、ＧＰＲＣ５ＤまたはＦＡＰに結合する抗原結合部位は、一価の結合についての、１ｎＭもしくはこれ未満、５００ｐＭもしくはこれ未満、２００ｐＭもしくはこれ未満、または１００ｐＭもしくはこれ未満のＫｄ値で結合しうる。

【０２３１】

下記では、例示的ＧＰＲＣ５Ｄ結合配列について記載される。

【０２３２】

一実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号６９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号７０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号７１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号７２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含むことができる。

【０２３３】

任意選択で、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号６９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むことができる。

【０２３４】

任意選択で、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号７０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号７１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号７２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。

【０２３５】

任意選択で、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号６９から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメイン；ならびに（ｂ）（ｉ）配列番号７０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号７１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｉｉｉ）配列番号７２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインを含む。

【０２３６】

別の態様では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号６９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号７０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号７１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号７２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む。

【０２３７】

上記の実施形態のうちのいずれかでは、多重特異性抗体は、ヒト化されうる。一実施形態では、抗ＧＰＲＣ５Ｄ抗原結合部位は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワー

ク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０２３８】

別の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、配列番号７３のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＧＰＲＣ５Ｄに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号７３内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、配列番号７３内のＶＨ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号６７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号６８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号６９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２３９】

別の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、配列番号７４のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＧＰＲＣ５Ｄに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号７４内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＧＰＲＣ５Ｄに対する抗原結合部位は、配列番号７４内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号７０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号７１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号７２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２４０】

別の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する抗原結合部位は、上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＨ、および上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＬを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号７３および配列番号７４のそれぞれにおける、ＶＨ配列およびＶＬ配列であって、これらの配列の翻訳後修飾を含む、ＶＨ配列およびＶＬ配列を含む。

【０２４１】

下記では、例示的ＦＡＰ結合配列について記載される。

【０２４２】

一実施形態では、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号７９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号８０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つのＣＤＲを含むことができる。

【０２４３】

任意選択で、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号７５のアミノ酸配列を

含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；および（ｃ）配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むことができる。

【０２４４】

任意選択で、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号７９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号８０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含む。

【０２４５】

任意選択で、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、（ａ）（ｉ）配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｉｉｉ）配列番号７７から選択されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＨ　ＣＤＲ配列を含むＶＨドメイン；ならびに（ｂ）（ｉ）配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｉｉ）配列番号７９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、および（ｉｉｉ）配列番号８０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、少なくとも１つ、少なくとも２つ、または３つ全てのＶＬ　ＣＤＲ配列を含むＶＬドメインを含む。

【０２４６】

別の態様では、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、（ａ）配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１；（ｂ）配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２；（ｃ）配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３；（ｄ）配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｅ）配列番号７９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｆ）配列番号８０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む。

【０２４７】

上記の実施形態のうちのいずれかでは、多重特異性抗体は、ヒト化されうる。一実施形態では、抗ＦＡＰ抗原結合部位は、上記の実施形態のうちのいずれかにおけるＣＤＲを含み、ヒトアクセプターフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、またはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【０２４８】

別の実施形態では、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、配列番号８１のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（ＶＨ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＨ配列は、参照配列と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＦＡＰに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号８１内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、配列番号８１内のＶＨ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＨ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＨは、（ａ）配列番号７５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｂ）配列番号７６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、および（ｃ）配列番号７７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２４９】

別の実施形態では、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、配列番号８２のアミノ酸配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）配列を含む。ある特定の実施形態では、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有するＶＬ配列は、参照配列

と比べた置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含有するが、この配列を含む抗原結合部位は、ＦＡＰに、好ましくは、上記で明示された親和性で結合する能力を保持する。ある特定の実施形態では、配列番号８２内の、合計１つ～１０のアミノ酸が、置換され、挿入され、かつ／または欠失している。ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、ＨＶＲの外部の領域内で（すなわち、ＦＲ内で）生じる。任意選択で、ＦＡＰに対する抗原結合部位は、配列番号８２内のＶＬ配列であって、この配列の翻訳後修飾を含むＶＬ配列を含む。特定の実施形態では、ＶＬは、（ａ）配列番号７８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１；（ｂ）配列番号７９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２；および（ｃ）配列番号８０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３から選択される、１つ、２つ、または３つのＣＤＲを含む。

【０２５０】

別の実施形態では、ＦＡＰに結合する抗原結合部位は、上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＨ、および上記で提示された実施形態のうちのいずれかにおけるＶＬを含む。一実施形態では、抗体は、配列番号８１および配列番号８２のそれぞれにおける、ＶＨ配列およびＶＬ配列であって、これらの配列の翻訳後修飾を含む、ＶＨ配列およびＶＬ配列を含む。

【０２５１】

Ｇ．抗体のフォーマット

上記で記載された通り、本発明は、

ｉ）標的細胞の表面上で発現される抗原に結合する第１の抗体であって、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインをさらに含むが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない、第１の抗体；および

ｉｉ）標的細胞の表面上で発現される抗原に結合する第２の抗体であって、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインをさらに含むが、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まない、第２の抗体

を含み；

第１の抗体の前記ＶＨドメインおよび第２の抗体の前記ＶＬドメインが、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能である、

抗体のセットに関する。

【０２５２】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は各々、Ｆｃドメインを含むことができる。Ｆｃ領域の存在は、放射免疫療法および放射線イメージングの文脈では、利益を有する、例えば、タンパク質の循環半減期を延長し、かつ／または小断片により観察される場合より高度の、腫瘍への取込みを結果としてもたらす。

【０２５３】

一部の実施形態では、Ｆｃ領域が、存在する場合、Ｆｃ領域は、エフェクター機能を低減するか、または消失させるように操作されることが好ましい場合がある。これは、Ｆｃ領域の残基２３４、２３５、２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７、および／または３２９のうちの１つまたは複数、例えば、２３４、２３５、および／または３２９のうちの１つまたは複数の置換を含むことができる。一部の実施形態では、Ｆｃ領域は、Ｐｒｏ３２９からＧｌｙへの置換、Ｌｅｕ２３４からＡｌａへの置換、および／またはＬｅｕ２３５からＡｌａへの置換（ＥＵインデックスに従う番号付け）を含むように操作されうる。

【０２５４】

一部の実施形態では、上記で論じられた通り、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインが、そのＣ末端において、遊離である（例えば、そのＣ末端を介して、別のドメインに融合していない）場合、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインは、ＨＡＶＨ自己抗体の結合を回避するように、１つまたは複数の残基により伸長されうる。例えば、伸長は、１つ～１０の残基、例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つ、９つ、または１０の残基による伸長でありうる。一実施形態では、放射標

識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインは、１つまたは複数のアラニン残基により、任意選択で、１つのアラニン残基により伸長されうる。ＶＨ配列はまた、ＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基によっても伸長されうる（ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインの、最初の１０の残基は、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰ（配列番号１４９）であるので、一実施形態では、１つ～１０の残基は、この配列のＮ末端から採取されうる）。例えば、一実施形態では、ペプチドであるＡＳＴの配列（ＩｇＧ１のＣＨ１ドメインの、最初の３つの残基に対応する）は、ＶＨ領域のＣ末端に付加されている。一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、各々、標的抗原（例えば、腫瘍関連抗原）について多価、例えば、二価でありうる。これは、アビディティーを増大させる利点を有する。

【０２５５】

一部の実施形態では、第１の抗体と、第２の抗体とが会合している場合、第１の抗体と、第２の抗体とは、放射標識化合物について一価である抗体複合体を形成することが好ましい場合がある。したがって、第１の抗体および第２の抗体が、併せて、放射標識化合物に対する、１つの完全な機能的結合部位だけを形成するように、第１の抗体は、放射標識化合物に対する抗原結合部位の１つのＶＨドメインだけを含むことができ、第２の抗体は、放射標識化合物に対する抗原結合部位の１つのＶＬドメインだけを含むことができる。

【０２５６】

抗体は、各々、ｉ）標的抗原に対して特異的な抗原結合部位を含む少なくとも１つの抗体断片、ｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメイン、およびｉｉｉ）任意選択でＦｃ領域を含むことができる。抗体断片は、例えば、標的抗原に対して特異的な抗原結合部位を含む、少なくとも１つのＦｖ断片、ｓｃＦｖ断片、Ｆａｂ断片、または交差Ｆａｂ断片でありうる。抗体断片は、ａ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメイン、またはｂ）抗体が、Ｆｃ領域を含む場合、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインに融合しているＦｃ領域に融合していてもよい。一部の実施形態では、Ｆｃ領域のＣ末端は、ＶＬドメインまたはＶＨドメインのＮ末端に融合している。

【０２５７】

融合は、直接的な場合もあり、間接的な場合もある。一部の実施形態では、融合は、リンカーを介しうる。例えば、Ｆｃ領域は、ヒンジ領域または別の適切なリンカーを介して、抗体断片に融合していてもよい。同様に、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインの、抗体構造の残りの部分への接続は、リンカーを介してなされうる。リンカーは、少なくとも５アミノ酸、好ましくは、５～１００、より好ましくは、１０～５０または２５～５０アミノ酸のペプチドでありうる。リンカーは、非可撓性リンカーまたは可撓性リンカーでありうる。一部の実施形態では、リンカーは、Ｔｈｒ残基、Ｓｅｒ残基、Ｇｌｙ残基、および／またはＡｌａ残基を含むか、またはこれらからなる可撓性リンカーである。例えば、リンカーは、Ｇｌｙ残基およびＳｅｒ残基を含むか、またはこれらからなることができる。一部の実施形態では、リンカーは、（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒ）ｎ［式中、ｎは、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０である］などの反復モチーフを有しうる。別の実施形態では、前記ペプチドリンカーは、Ｇ＝グリシン、Ｓ＝セリンとし、（ｘ＝３、ｎ＝３、４、５、または６、およびｍ＝０、１、２、または３）、または（ｘ＝４、ｎ＝２、３、４、または５、およびｍ＝０、１、２、または３）、例えば、ｘ＝４、およびｎ＝２または３、例えば、ｘ＝４、ｎ＝２とする、（ＧｘＳ）ｎまたは（ＧｘＳ）ｎＧｍである。一部の実施形態では、リンカーは、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）の配列でありうるか、またはこれらを含むことができる。他のリンカーも使用される場合があり、当業者により同定されうる。

【０２５８】

１つの特定の実施形態では、第１の抗体は、

ａ）標的抗原に結合するｓｃＦｖ断片；および
ｂ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または
ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、ｓｃＦｖ断片のＣ末端に融合しているポリペプチド
を含むか、またはこれらからなることができる。

【０２５９】

第２の抗体は、
ｃ）標的抗原に結合する第２のｓｃＦｖ断片；および
ｄ）
ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または
ｉｉ）ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、ｓｃＦｖ断片のＣ末端に融合しているポリペプチド
を含むか、またはこれらからなることができる。

【０２６０】

第１の抗体の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および第２の抗体の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、２つの抗体が会合すると、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０２６１】

任意選択で、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、加えて、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基を含むことができる。任意選択で、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。

【０２６２】

標的抗原を認識する、ｓｃＦｖの重鎖および軽鎖の可変ドメインは、ペプチドテザーにより接続されうる。このようなペプチドテザーは、１～２５アミノ酸、好ましくは、１２～２０アミノ酸、好ましくは、１２～１６または１５～２０アミノ酸を含むことができる。上記で記載されたテザーは、１つまたは複数の（Ｇ３Ｓ）モチーフおよび／または（Ｇ４Ｓ）モチーフ、特に、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、または６つの（Ｇ３Ｓ）モチーフおよび／または（Ｇ４Ｓ）モチーフ、好ましくは、３つまたは４つの（Ｇ３Ｓ）モチーフおよび／または（Ｇ４Ｓ）モチーフ、より好ましくは、３つまたは４つの（Ｇ４Ｓ）モチーフを含むことができる。

【０２６３】

任意選択で、第１の抗体は、上記で列挙された構成要素（ａ）および（ｂ）から本質的になるか、またはこれらからなることができ、第２の抗体は、上記で列挙された構成要素（ｃ）および（ｄ）からなるか、またはこれらから本質的になることができる。いずれにせよ、第１の抗体は、第１の抗体の構成要素（ｂ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず；第２の抗体は、第２の抗体の構成要素（ｄ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含まない。

【０２６４】

別の特定の実施形態では、第１の抗体は、

ａ）標的抗原に結合するＦａｂ断片、ならびに
ｂ）
ｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、または
ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、放射標識化合物に対する抗原結合部位の、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含むか、またはこれらからなることができる。

【０２６５】

第２の抗体は、
ｃ）標的抗原に結合するＦａｂ断片、ならびに
ｄ）
ｉｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、または
ｉｖ）ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、放射標識化合物に対する抗原結合部位の、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含むか、またはこれらからなることができる。

【０２６６】

（ｂ）のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および（ｄ）のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位（すなわち、２つの抗体が会合すると）を形成する。

【０２６７】

任意選択で、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、加えて、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基を含むことができる。任意選択で、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。

【０２６８】

任意選択で、第１の抗体は、上記で列挙された構成要素（ａ）および（ｂ）から本質的になるか、またはこれらからなることができ、第２の抗体は、上記で列挙された構成要素（ｃ）および（ｄ）からなるか、またはこれらから本質的になることができる。いずれにせよ、第１の抗体は、第１の抗体の構成要素（ｂ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず；第２の抗体は、第２の抗体の構成要素（ｄ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含まない。

【０２６９】

ポリペプチドに融合しているＦａｂ断片の鎖は、第１の抗体および第２の抗体について、独立に選択されうる。したがって、一実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１の抗体のＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しており、（ｄ）のポリペプチドは、第２の抗体のＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合している。別の実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１の抗体のＦａｂ断片のＣＬドメインのＣ末端に融合しており、（ｄ）のポリペプチドは、第２の抗体のＦａｂ断片のＣＬドメインのＣ末端に融合している。別の実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１の抗体のＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しており、（ｄ）のポリペプチドは、第２の抗体のＦａｂ断片の

ＣＬドメインのＣ末端に融合している。さらなる実施形態では、（ｂ）のポリペプチドは、第１の抗体のＦａｂ断片のＣＬドメインのＣ末端に融合しており、（ｄ）のポリペプチドは、第２の抗体のＦａｂ断片のＣＨ１ドメインのＣ末端に融合している。

【０２７０】

上記で言及された通り、一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、各々、標的抗原（例えば、腫瘍関連抗原）について多価、例えば、二価でありうる。これは、アビディティーを増大させる利点を有する。抗体は、多価、例えば、二価であることが可能であり、各々、特定のエピトープについて、単一特異性（第１の抗体および第２の抗体に対する、同じエピトープの場合もあり、第１の抗体および第２の抗体に対する、異なる同じエピトープの場合もある）でありうる。したがって、一部の実施形態では、第１の抗体は、ｉ）標的抗原の同じエピトープに特異的な抗原結合部位を含む、２つまたはこれを超える抗体断片、ｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメイン（ただし、これらの両方ではない）、およびｉｉｉ）任意選択でＦｃ領域を含むことができる。第２の抗体は、ｉ）標的抗原の同じエピトープに特異的な抗原結合部位を含む、２つまたはこれを超える抗体断片、ｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメイン（ただし、これらの両方ではない）、およびｉｉｉ）任意選択で、Ｆｃ領域を含むことができる。上記で言明された通り、エピトープは、第１の抗体および第２の抗体に対して、同じ場合もあり、第１の抗体および第２の抗体に対して、異なる場合もある。

【０２７１】

例えば、第１の抗体および第２の抗体の各々は、タンデムＦａｂ、すなわち、ペプチドテザーを介して接続される、２つのＦａｂ断片（Ｆａｂ－テザー－Ｆａｂ）を含むことができ、第１のＦａｂは、そのＣ末端を介して、第２のＦａｂのＮ末端に接続している。

【０２７２】

一実施形態では、第１の抗体は、

ａ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、同じ標的抗原（「標的抗原Ａ」）に結合し、第１のＦａｂ断片が結合するエピトープが、第２のＦａｂ断片が結合するエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続しており、第１のＦａｂがそのＣ末端を介して第２のＦａｂのＮ末端に接続している、タンデムＦａｂ；ならびに

ｂ）

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または

ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体定常ドメイン（ＣＨ１）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、

ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド

を含み、第２の抗体は、

ｃ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、標的抗原Ａに結合し、第１のＦａｂ断片が結合するエピトープが、第２のＦａｂ断片が結合するエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続しており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して、第２のＦａｂのＮ末端に接続している、タンデムＦａｂ；ならびに

ｄ）

ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または

ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、

ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２のＦａｂ断片のＣＬドメインまたはＣＨ１ドメインのＣ末端に融合しているポリペプチド

を含む。
【０２７３】
部分ｂ（第１の抗体内の）の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および部分（ｄ）（第２の抗体内の）の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、併せて、すなわち、２つの抗体が会合すると、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。
【０２７４】
任意選択で、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、加えて、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基を含むことができる。任意選択で、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。
【０２７５】
ポリペプチドに融合しているＦａｂタンデムの鎖（すなわち、ポリペプチドが、第２のＦａｂ断片のＣＬドメインに融合しているのであれ、ＣＨ１ドメインに融合しているのであれ）は、第１の抗体および第２の抗体について、独立に選択されうる。
【０２７６】
上記で記載された通り、Ｆａｂタンデムの第１のＦａｂ断片は、第２のＦａｂ断片のＮ末端に接続している。一実施形態では、第１のＦａｂ断片の重鎖断片のＣ末端は、第２のＦａｂ断片の重鎖断片または軽鎖断片のＮ末端に接続している。別の実施形態では、第１のＦａｂ断片の軽鎖断片のＣ末端は、第２のＦａｂ断片の重鎖断片または軽鎖断片のＮ末端に接続している。したがって、一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体のＦａｂタンデムは、以下の通りの３つの鎖：
１）第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１）、ペプチドテザーを介して、第２のＦａｂ断片の重鎖断片に接続している、第１のＦａｂ断片の重鎖断片（（ＶＨＣＨ１）１－テザー－（ＶＨＣＨ１）２）、および第２のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）２）；または
２）第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１）、ペプチドテザーを介して、第２のＦａｂ断片の軽鎖断片に接続している、第１のＦａｂ断片の重鎖断片（（ＶＨＣＨ１）１－テザー－（ＶＬＣＬ）２）、および第２のＦａｂ断片の重鎖断片（（ＶＨ－ＣＨ１）２）；または
３）第１のＦａｂ断片の重鎖断片（ＶＨＣＨ１）、ペプチドテザーを介して、第２のＦａｂ断片の軽鎖断片に接続している、第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１－テザー－（ＶＬＣＬ）２）、および第２のＦａｂ断片の重鎖断片；または
４）第１のＦａｂ断片の重鎖断片（ＶＨＣＨ１）、ペプチドテザーを介して、第２のＦａｂ断片の重鎖断片に接続している、第１のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）１－テザー－（ＶＨＣＨ１）２）、および第２のＦａｂ断片の軽鎖断片（（ＶＬＣＬ）２）
を含むことができる。
【０２７７】
別の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、各々、標的抗原の、１つを超える異なるエピトープ、任意選択で、２つの異なるエピトープに結合しうる。したがって、抗体の一方または両方は、標的抗原について二重パラトープ性でありうる。一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、各々、ｉ）標的抗原Ａの第１のエピトープに特異的な抗原結合部位を含む抗体断片；ｉｉ）標的抗原Ａの第２のエピトープに対する抗原結合部位を含む抗体断片、ｉｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメイン（ただし、これらの両方ではない）、およびｉｖ）任意選択でＦｃ領域を含むことができる。
【０２７８】
このような実施形態では、軽鎖の、それらのそれぞれの重鎖との適正なアセンブリーは、交差ｍａｂ技術を使用することにより支援されうる。例えば、一実施形態では、各抗体

は、１つのＦａｂと、１つの交差Ｆａｂとを含む、タンデムＦａｂを含むことができ、Ｆａｂおよび交差Ｆａｂから選択される、一方の断片は、第１のエピトープに特異的であり、他方は、第２のエピトープに特異的である。

【０２７９】

１つの特定の例では、第１の抗体は、

ａ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端により、ペプチドテザーを介して、第２の断片のＮ末端に接続しており、第１の断片が、標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原Ａの第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方が交差Ｆａｂである、タンデムＦａｂ；

ｂ）

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または

ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、

ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド

を含むことができる。

【０２８０】

第２の抗体は、

ｃ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端により、第２の断片のＮ末端に接続しており、第１の断片が、標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原Ａの第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方が交差Ｆａｂである、タンデムＦａｂ；ならびに

ｄ）

ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または

ｉｉ）ＶＬドメインのＣ末端が軽鎖定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、

ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、第２の断片の鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド

を含むことができる。

【０２８１】

第１の抗体の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および第２の抗体の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、併せて、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。

【０２８２】

任意選択で、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、加えて、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基を含むことができる。任意選択で、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。

【０２８３】

第１の断片または第２の断片は、タンデムＦａｂが、１つの従来型Ｆａｂおよび１つの交差Ｆａｂを含む限りにおいて、交差Ｆａｂでありうる。

【０２８４】

上記で記載された、タンデムＦａｂについての実施形態のうちのいずれか（交差Ｆａｂを伴う実施形態を含む）では、任意選択で、第１の抗体は、構成要素（ａ）および（ｂ）から本質的になるか、またはこれらからなることができ、第２の抗体は、構成要素（ｃ）

および（ｄ）からなるか、またはこれらから本質的になることができる。いずれにせよ、第１の抗体は、第１の抗体の構成要素（ｂ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず；第２の抗体は、第２の抗体の構成要素（ｄ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含まない。

【０２８５】

タンデムＦａｂについての実施形態のうちのいずれか（交差Ｆａｂを伴う実施形態を含む）では、第１の抗体におけるＦａｂ断片と、第２の抗体におけるＦａｂ断片とを接続するペプチドテザーは、少なくとも５アミノ酸の長さ、好ましくは、５～１００、より好ましくは、１０～５０アミノ酸の長さであるアミノ酸配列を伴うペプチドでありうる。一実施形態では、前記ペプチドリンカーは、Ｇ＝グリシン、Ｓ＝セリンとし、（ｘ＝３、ｎ＝３、４、５、または６、およびｍ＝０、１、２、または３）、または（ｘ＝４、ｎ＝２、３、４、または５、およびｍ＝０、１、２、または３）、好ましくは、ｘ＝４、およびｎ＝２または３、より好ましくは、ｘ＝４、ｎ＝２とする、（ＧｘＳ）ｎまたは（ＧｘＳ）ｎＧｍである。一実施形態では、前記ペプチドテザーは、$(G_4S)_2$である。

【０２８６】

上記で言及された通り、一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、各々、任意選択で、エフェクター機能を低減するか、または消失させるように操作された、Ｆｃドメインを含むことができる。

【０２８７】

一実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の各々は、ｉ）Ｆｃドメイン、ｉｉ）標的抗原に対して特異的な抗原結合部位を含む、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、または交差Ｆａｂ断片など、少なくとも１つの抗体断片、およびｉｉｉ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメイン（ただし、これらの両方ではない）を含むことができる。

【０２８８】

任意選択で、Ｆｃドメインを含む抗体は、標的抗原への結合に関して、一価でありうる。他の実施形態では、Ｆｃドメインを含む抗体は、多価、例えば、二価でありうる。第１の抗体および第２の抗体は、各々、標的抗原の同じエピトープに対して、多価であり、かつ、単一特異性でありうる。さらに他の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、各々、標的抗原の異なるエピトープに対する結合部位を有しうる（例えば、第１の抗体および第２の抗体は、二重パラトープ性でありうる）。

【０２８９】

抗体断片は、ｓｃＦｖでありうる。したがって、一実施形態では、第１の抗体は、

ａ）標的抗原に結合するｓｃＦｖ断片；

ｂ）Ｆｃドメイン；および

ｃ）

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または

ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むか、またはこれらからなることができ、

（ａ）のｓｃＦｖは、ＦｃドメインのＮ末端に融合しており、ｃ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、ＦｃドメインのＣ末端に融合している。

【０２９０】

任意選択で、部分ｃ（ｉ）のポリペプチドは、加えて、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基を含むことができる。任意選択で、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例え

ば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。

【０２９１】

第２の抗体は、

ｄ）標的抗原に結合する、第２のｓｃＦｖ；

ｅ）Ｆｃドメイン；ならびに

ｆ）

ｉ）抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または

ｉｉ）ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むか、またはこれらからなることができ、

（ｄ）のｓｃＦｖは、ＦｃドメインのＮ末端に融合しており、（ｆ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、ＦｃドメインのＣ末端に融合している。

【０２９２】

別の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、各々、標的抗原に対するＦａｂ（例えば、標的抗原に対する単一のＦａｂ）を含む、単一アームＩｇＧおよびＦｃドメインでありうる。したがって、第１の抗体は、

ｉ）完全軽鎖断片；

ｉｉ）完全重鎖；

ｉｉｉ）Ｆｄを欠くさらなるＦｃ鎖；および

ｉｖ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むか、またはこれらからなることができ、

（ｉ）の軽鎖および（ｉｉ）の重鎖は、併せて、標的抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドは、そのＮ末端により、好ましくは、リンカーを介して、（ｉｉ）または（ｉｉｉ）のＣ末端に融合している。

【０２９３】

第２の抗体は、

ｖ）完全軽鎖断片；

ｖｉ）完全重鎖；

ｖｉｉ）Ｆｄを欠くさらなるＦｃ鎖；および

ｖｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むか、またはこれらからなることができ、

（ｖ）の軽鎖および（ｖｉ）の重鎖は、併せて、標的抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドは、そのＮ末端により、好ましくは、リンカーを介して、（ｖｉ）または（ｖｉｉ）のＣ末端に融合している。

【０２９４】

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

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）であって、ポリペプチドが、加えて、ＶＨドメインのＣ末端におけるつもしくは複数の残基、任意選択で１つもしくは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基、または任意選択で上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分を含むことができる抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；あるいは

ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチド
でありうる。
【０２９５】
放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドは、
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または
ｉｉ）ＶＬドメインのＣ末端が定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン
を含むか、またはこれらからなるポリペプチド
でありうる。
【０２９６】
第１の抗体および第２の抗体が、例えば、単一アームＩｇＧのためのヘテロダイマーである場合、第１の抗体および第２の抗体のアセンブリーは、下記でさらに記載される通り、ノブ・イントゥー・ホール技術の使用により支援されうる。
【０２９７】
別の実施形態では、抗体は、各々、上記で記載されたタンデムＦａｂ（例えば、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片の両方が、標的抗原Ａの同じエピトープに結合する、２つのＦａｂ断片を含むか；またはそれらのうちの一方が標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、他方が標的抗原Ａの第２のエピトープに結合する、Ｆａｂおよび交差Ｆａｂを含む）を含むことができ、Ｆａｂタンデムは、（例えば、そのＣ末端を介して）ＦｃドメインのＮ末端に融合しており、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインまたはＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるペプチドは（例えば、そのＮ末端を介して）、ＦｃドメインのＣ末端に融合している。
【０２９８】
したがって、第１の抗体は、
ａ）
ｉ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、標的抗原Ａに結合し、第１のＦａｂ断片が結合するエピトープが、第２のＦａｂ断片が結合するエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続しており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して、第２のＦａｂのＮ末端に接続している、タンデムＦａｂ；ならびに
ｉｉ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端により、ペプチドテザーを介して第２の断片のＮ末端に接続しており、第１の断片が、標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原Ａの第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方が交差Ｆａｂである、タンデムＦａｂ
から選択されるタンデムＦａｂ；
ｂ）Ｆｃドメイン；ならびに
ｃ）
ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または
ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および抗体重鎖定常ドメイン（ＣＨ１）
を含むか、またはこれらからなるポリペプチド
を含むか、またはこれらからなることができ、
タンデムＦａｂは、Ｆｃドメインの鎖のうちの１つのＮ末端に融合しており、ｃ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆｃドメインの鎖のうちの１つのＣ末端に融合している。
【０２９９】
任意選択で、部分ｃ（ｉ）のポリペプチドは、加えて、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単

一のアラニン残基を含むことができる。任意選択で、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。

【０３００】

第２の抗体は、

ｄ）

ｉ）２つのＦａｂ断片を含むタンデムＦａｂであって、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、標的抗原Ａに結合し、第１のＦａｂ断片が結合するエピトープが、第２のＦａｂ断片が結合するエピトープと同じであり、第１のＦａｂ断片および第２のＦａｂ断片が、ペプチドテザーを介して接続しており、第１のＦａｂが、そのＣ末端を介して、第２のＦａｂのＮ末端に接続している、タンデムＦａｂ；ならびに

ｉｉ）第１の断片および第２の断片を含むタンデムＦａｂであって、第１の断片が、そのＣ末端により、ペプチドテザーを介して、第２の断片のＮ末端に接続しており、第１の断片が、標的抗原Ａの第１のエピトープに結合し、第２の断片が、標的抗原Ａの第２のエピトープに結合し、第１の断片および第２の断片から選択される断片の一方がＦａｂであり、他方が交差Ｆａｂである、タンデムＦａｂ

から選択されるタンデムＦａｂ；

ｅ）Ｆｃドメイン；ならびに

ｆ）

ｉ）抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または

ｉｉ）ＶＬドメインのＣ末端が軽鎖定常ドメインのＮ末端に融合している、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＬ）および抗体軽鎖定常ドメイン

を含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むか、またはこれらからなることができ、

（ｄ）のタンデムＦａｂは、Ｆｃドメインの鎖のうちの１つのＮ末端に融合しており、（ｆ）のポリペプチドは、ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、Ｆｃドメインの鎖のうちの１つのＣ末端に融合している。

【０３０１】

第１の抗体のＶＨドメインおよび第２の抗体のＶＬドメインは、併せて、すなわち、２つの抗体が会合すると放射標識化合物に対する抗原結合部位を形成する。

【０３０２】

第１の抗体が、（ａ）（ｉ）に従うタンデムＦａｂを含む場合は、一般に、第２の抗体が、ｄ（ｉ）に従うタンデムＦａｂを含む場合となり；第１の抗体が、（ａ）（ｉｉ）に従うタンデムＦａｂを含む場合は、一般に、第２の抗体が、ｄ（ｉｉ）に従うタンデムＦａｂを含む場合となる。

【０３０３】

タンデムＦａｂは、一般に、上記で記載された通りでありうる。例えば、タンデムＦａｂの２つ断片の、テザーによる連結は、上記で記載された通りでありうる。タンデムＦａｂは、上記で明示された鎖のセットのうちのいずれかから構成されうる。一般に、第２のＦａｂ（交差Ｆａｂでありうる）の重鎖断片は、Ｆｃドメインに連結されうる。

【０３０４】

さらなる実施形態では、第１の抗体および第２の抗体の各々は、ａ）Ｆｃドメイン、ｂ）標的抗原に対する抗原結合部位を含む、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、Ｆａｂ、または交差Ｆａｂ断片など、少なくとも１つの抗体断片、およびｃ）放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインを含むポリペプチド（ただし、これらの両方ではない）を含むことができ、（ｂ）の抗体断片のＣ末端は、Ｆｃドメインの一方の鎖のＮ末端に融合しており、（ｃ）のポリペプチドのＣ末端は、Ｆｃドメインの他方の鎖のＮ末端に融合している。（ｂ）の抗体断片の融合は、好ましくは、ヒンジ領域を介する。（ｃ）のポリペプチドの融合は、ポリペプチドのＣ末端と、Ｆｃ領域のＮ末端との間に位置しているリ

ンカーを介する場合もあり、かつ／または上部ヒンジ領域の一部または全部を介する（例えば、ＥＵ番号付けインデックスに従う、Ａｓｐ２２１およびＣ末端残基）場合もある。一実施形態では、（ｂ）の抗体断片は、Ｆａｂ断片でありうる。一実施形態では、第１の抗体において、（ｃ）のポリペプチドは、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインからなり；第２の抗体において、（ｃ）のポリペプチドは、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインからなる。

【０３０５】

したがって、一実施形態では、第１の抗体は、

ｉ）完全軽鎖；

ｉｉ）完全重鎖；

ｉｉｉ）さらなるＦｃ鎖；および

ｉｖ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むか、またはこれらからなることができ、

（ｉ）の軽鎖および（ｉｉ）の重鎖は、併せて、標的抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドは、そのＣ末端により、好ましくは、リンカーを介して、（ｉｉｉ）のＮ末端に融合している。

【０３０６】

第２の抗体は、

ｖ）完全軽鎖；

ｖｉ）完全重鎖；

ｖｉｉ）さらなるＦｃ鎖；および

ｖｉｉｉ）放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むか、またはこれらからなることができ、

（ｖ）の軽鎖および（ｖｉ）の重鎖は、併せて、標的抗原に対する抗原結合部位をもたらし；放射性標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むか、またはこれらからなるポリペプチドは、そのＣ末端により、好ましくは、リンカーを介して、（ｖｉｉ）のＮ末端に融合している。

【０３０７】

リンカーは、当業者に公知である、任意の可撓性リンカー、例えば、リンカーＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＳＧＧ（配列番号１５２）を含むことができる。リンカーは、ヒンジ領域の上部全てをさらに含むことができる、例えば、Ａｓｐ２２１から、Ｆｃ鎖の始点（例えば、Ｃｙｓ２２６における）に伸びうる。

【０３０８】

なおさらなる実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、各々、標的抗原に対する抗原結合部位を有する、完全長抗体を含み、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインまたはＶＨドメインをさらに含む。

【０３０９】

１つの特定の実施形態では、第１の抗体は、

ａ）２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなり、完全長抗体の、少なくとも１つのアームが、標的抗原Ａに結合する、第１の完全長抗体；ならびに

ｂ）

ｉ）さらなる抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）；または

ｉｉ）ＶＨドメインのＣ末端がＣＨ１ドメインのＮ末端に融合している、さらなる抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）およびさらなる抗体定常ドメイン（ＣＨ１）

を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、

ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくは、ペプチドリンカーを介して、前記第１の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド

を含むことができる。
【０３１０】
第２の抗体は、
ｃ）２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなり、完全長抗体の、少なくとも１つのアームが、標的抗原Ａに結合する、第２の完全長抗体；ならびに
ｄ）
ｉ）さらなる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）；または
ｉｉ）ＶＬドメインのＣ末端がＣＬドメインのＮ末端に融合している、さらなる抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、およびさらなる抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）
を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、
ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、前記第２の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド
を含むことができる。
【０３１１】
第１の抗体の抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）および第２の抗体の抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）は、併せて、すなわち、２つの抗体が会合すると、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成する。
【０３１２】
任意選択で、部分ｂ（ｉ）のポリペプチドは、加えて、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基を含むことができる。任意選択で、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。
【０３１３】
任意選択で、第１の抗体は、上記で列挙された構成要素（ａ）および（ｂ）から本質的になりうか、またはこれらからなることができ、第２の抗体は、上記で列挙された構成要素（ｃ）および（ｄ）から本質的になるか、またはこれらからなることができる。いずれにせよ、第１の抗体は、第１の抗体の構成要素（ｂ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含まず；第２の抗体は、第２の抗体の構成要素（ｂ）と会合して、放射標識化合物に対する機能的抗原結合部位を形成することが可能な、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含まない。
【０３１４】
完全長抗体の両方のアームは、標的抗原Ａに対する結合特異性を有することが好ましい場合がある。抗体が、標的抗原について二価である場合、完全長抗体の両方のアームは、標的抗原Ａの同じエピトープに結合しうる。
【０３１５】
別の実施形態では、抗体は、標的抗原について二重パラトープ性でありうる；例えば、完全長抗体の１つのアームは、標的抗原Ａの第１のエピトープに結合することができ、１つのアームは、標的抗原Ａの第２のエピトープに結合することができる。このような実施形態では、抗体の１つのアームは、Ｆａｂを含むことができ、１つのアームは、軽鎖の、それらのそれぞれの重鎖との適正なアセンブリーを支援するように、交差Ｆａｂを含むことができる。したがって、一実施形態では、完全長抗体の第１の重鎖は、ＶＨドメインの代わりに、ＶＬドメイン（例えば、ＶＬ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）を含むことができ、第１の軽鎖は、ＶＬドメインと交換されるＶＨドメイン（例えば、ＶＨ－ＣＬ）を含むことができるか、または第１の重鎖は、ＨＣ１ドメインの代わりに、ＣＬドメイン（例えば、ＶＨ－ＣＬ－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）を含むことができ、第１の軽鎖は、ＣＬドメインの代わりに、ＣＨ１ドメイン（例えば、ＶＬ－ＣＨ１）を含むことができる。この実施形態では、第２の重鎖および第２の軽鎖は、従来型のドメイン構造（例えば、それぞれ、ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３およびＶＬ－ＣＬ）を有する。代替的実

施形態では、完全長抗体の第２の重鎖は、ＶＨドメインの代わりに、ＶＬドメイン（例えば、ＶＬ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）を含むことができ、第２の軽鎖は、ＶＬドメインと交換されるＶＨドメイン（例えば、ＶＨ－ＣＬ）を含むことができるか、または第２の重鎖は、ＨＣ１ドメインの代わりに、ＣＬドメイン（例えば、ＶＨ－ＣＬ－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３）を含むことができ、第２の軽鎖は、ＣＬドメインの代わりに、ＣＨ１ドメイン（例えば、ＶＬ－ＣＨ１）を含むことができる。この実施形態では、第１の重鎖および第１の軽鎖は、従来型のドメイン構造を有する。

【０３１６】

加えて、または代替的に、一部の実施形態では、軽鎖の、それらのそれぞれの重鎖との適正なアセンブリーは、下記でさらに論じられる電荷修飾を使用することにより支援されうる。

【０３１７】

ヘテロダイマー重鎖の適正なアセンブリーは、ノブ・イントゥー・ホール技術により支援されうる。

【０３１８】

本明細書で使用される、「完全長抗体」という用語は、２つの「完全長抗体重鎖」と、２つの「完全長抗体軽鎖」とからなる抗体を表示する。「完全長抗体重鎖」は、Ｎ末端からＣ末端の方向に、ＶＨ－ＣＨ１－ＨＲ－ＣＨ２－ＣＨ３と略記される、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、抗体定常重鎖ドメイン１（ＣＨ１）、抗体のヒンジ領域（ＨＲ）、抗体重鎖定常ドメイン２（ＣＨ２）、および抗体重鎖定常ドメイン３（ＣＨ３）；ならびに、任意選択で、サブクラスＩｇＥの抗体の場合における、抗体重鎖定常ドメイン４（ＣＨ４）から構成されるポリペプチドでありうる。好ましくは、「完全長抗体重鎖」とは、Ｎ末端からＣ末端の方向に、ＶＨ、ＣＨ１、ＨＲ、ＣＨ２、およびＣＨ３から構成されるポリペプチドである。「完全長」への言及により、交差Ｍａｂ形成の可能性が除外されることは意図されない（したがって、重鎖は、ＶＬドメインと交換されたＶＨドメイン、またはＣＬドメインと交換されたＣＨ１ドメインを有しうる）。「完全長抗体軽鎖」は、Ｎ末端からＣ末端の方向に、ＶＬ－ＣＬと略記される、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、および抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）から構成されるポリペプチドでありうる。代替的に、交差Ｍａｂの場合、ＶＬドメインが、ＶＨドメインと交換される場合もあり、ＣＬドメインが、ＣＨ１ドメインと交換される場合もある。抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）は、κ（カッパ）ドメインの場合もあり、λ（ラムダ）ドメインの場合もある。２つの完全長抗体鎖は、ＣＬドメインと、ＣＨ１ドメインとの間、および完全長抗体重鎖のヒンジ領域間における、ポリペプチド間ジスルフィド結合を介して、一体に連結される。典型的な完全長抗体の例は、天然抗体様ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ１およびＩｇＧ２）、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＥ）である。本発明に従う完全長抗体は、単一の種、例えば、ヒトに由来する場合もあり、キメラ抗体またはヒト化抗体の場合もある。本明細書で記載される完全長抗体は、一部の実施形態では、いずれもが、同じ抗原に特異的に結合する場合もあり、異なる抗原に結合する場合もある、ＶＨおよびＶＬの対により、各々が形成される、２つの抗原結合部位を含む。前記完全長抗体の重鎖または軽鎖のＣ末端は、前記重鎖または軽鎖のＣ末端における、最後のアミノ酸を表示する。

【０３１９】

ｂ）下におけるポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、およびｄ）下におけるポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）のＮ末端は、ＶＨドメインまたはＶＬドメインのＮ末端における最後のアミノ酸を表示する。

【０３２０】

多重特異性抗体を作製するための公知の技法はまた、本明細書で記載されるヘテロダイマーのうちのいずれかを作製するのにも使用されうる。これらは、異なる特異性を有する、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え共発現（ＭｉｌｓｔｅｉｎおよびＣｕｅｌｌｏ、Ｎａｔｕｒｅ、３０５：５３７（１９８３）を参照されたい）、および「ノブ・イントゥー・ホール」操作（例えば、米国特許第５，７３１，１６８号；およびＡｔｗｅｌ

ｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２７０：２６（１９９７）を参照されたい）を含むがこれらに限定されない。他の方法は、抗体Ｆｃヘテロダイマー分子を作製するための、静電ステアリング効果の操作（例えば、ＷＯ２００９／０８９００４を参照されたい）；２つまたはこれを超える抗体または断片の架橋（例えば、米国特許第４，６７６，９８０号；およびＢｒｅｎｎａｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２２９：８１（１９８５）を参照されたい）；ロイシンジッパーの使用（例えば、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１４８（５）：１５４７～１５５３（１９９２）およびＷＯ２０１１／０３４６０５を参照されたい）；および軽鎖ミスペアリング問題を回避するための一般的な軽鎖技術の使用（例えば、ＷＯ９８／５０４３１を参照されたい）を含む。

【０３２１】

上記で記載された完全長抗体のＣＨ３ドメインは、例えば、ＷＯ９６／０２７０１１、Ｒｉｄｇｗａｙ，Ｊ．Ｂ．ら、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｎｇ、９（１９９６）、６１７～６２１；およびＭｅｒｃｈａｎｔ，Ａ．Ｍ．ら、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ、１６（１９９８）、６７７～６８１において、いくつか例と共に、詳細に記載されている、「ノブ・イントゥー・ホール」技術により変更されうる。この方法では、２つのＣＨ３ドメインの相互作用表面が、これらの２つのＣＨ３ドメインを含有する、両方の重鎖のヘテロ二量体化を増大させるように変更される。２つのＣＨ３ドメイン（２つの重鎖の）の各々が、「ノブ」でありうるのに対し、他方は、「ホール」である。例えば、一方は、いわゆる「ノブ突然変異」（Ｔ３６６Ｗ、および、任意選択で、Ｓ３５４ＣまたはＹ３４９Ｃのうちの１つ）を含み、他方は、ＥＵインデックスによる番号付けに従う、いわゆる「ホール突然変異」（Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ、およびＹ４０７Ｖ、ならびに、任意選択で、Ｙ３４９ＣまたはＳ３５４Ｃ）（例えば、Ｃａｒｔｅｒ，Ｐ．ら、Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌ．２（１９９６）７３を参照されたい）を含む。

【０３２２】

加えて、または代替的に、ジスルフィド架橋の導入が、ヘテロダイマーを安定化させ（Ｍｅｒｃｈａｎｔ，Ａ．Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、１６（１９９８）、６７７～６８１；Ａｔｗｅｌｌ，Ｓ．ら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２７０（１９９７）、２６～３５）、収量を増大させるのに使用されうる。

【０３２３】

したがって、一部の実施形態では、第１の抗体および／または第２の抗体は、完全長抗体の一方の重鎖のＣＨ３ドメイン、および完全長抗体の他方の重鎖のＣＨ３ドメインの各々が、元の抗体のＣＨ３ドメインの間の接触面を含む接触面において遭遇するという点で、さらに特徴づけられ、この場合、前記接触面は、抗体の形成を促進するように変更され、変更は、

ａ）一方の重鎖のＣＨ３ドメインが、抗体内の他方の重鎖のＣＨ３ドメインの元の接触面と遭遇する一方の重鎖のＣＨ３ドメインの元の接触面内で、アミノ酸残基が、側鎖の体積が大きなアミノ酸残基で置きかえられ、これにより、一方の重鎖のＣＨ３ドメインの接触面内に、凸部を作出し、これが、他方の重鎖のＣＨ３ドメインの接触面内の凹部内に配置されるように変更され；

ｂ）他方の重鎖のＣＨ３ドメインが、抗体内の第１のＣＨ３ドメインの元の接触面と遭遇する第２のＣＨ３ドメインの元の接触面内で、アミノ酸残基が、側鎖の体積が小さなアミノ酸残基で置きかえられ、これにより、第２のＣＨ３ドメインの接触面内に、凹部を作出し、この中に、第１のＣＨ３ドメインの接触面内の凸部が配置されるように変更されるという点で特徴づけられる。

【０３２４】

大側鎖容量を有する、前記アミノ酸残基は、任意選択で、アルギニン（Ｒ）、フェニルアラニン（Ｆ）、チロシン（Ｙ）、トリプトファン（Ｗ）からなる群から選択されうる。小側鎖容量を有する、前記アミノ酸残基は、任意選択で、アラニン（Ａ）、セリン（Ｓ）、スレオニン（Ｔ）、バリン（Ｖ）からなる群から選択されうる。

【０３２５】

任意選択で、一部の実施形態では、両方のＣＨ３ドメインは、両方のＣＨ３ドメインの間に、ジスルフィド架橋が形成されうるように、各ＣＨ３ドメインの対応する位置におけるアミノ酸としてのシステイン（Ｃ）の導入によりさらに変更される。

【０３２６】

本発明の多重特異性（例えば、二重パラトープ性）抗体は、それらの結合アームのうちの１つ（または、２つを超える抗原結合Ｆａｂ分子を含む分子の場合、１つを超える）において、ＶＨ／ＶＬ交換を伴う、Ｆａｂベースの二重／多重特異性抗原結合分子の作製において生じうる、軽鎖の、マッチしない重鎖とのミスペアリング（ベンス－ジョーンズ型副産物）の低減において、特に、効率的である、その中に含まれるＦａｂ分子（交差Ｆａｂ分子を含む）内に、アミノ酸置換を含むことができる（また、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、ＰＣＴ公開第２０１５／１５０４４７号、特に、その中の実施例も参照されたい）。所望される多重特異性抗体の、所望されない副産物、特に、それらの結合アームのうちの１つにおいて生じる、ベンス－ジョーンズ型副産物と比較した比は、Ｆａｂ分子の、ＣＨ１ドメイン内およびＣＬドメイン内の特異的なアミノ酸位置において、反対の電荷を伴う、荷電アミノ酸の導入（本明細書では、場合によって、「電荷修飾」と称される）により改善されうる。

【０３２７】

したがって、一部の実施形態では、Ｆａｂ分子を含む、本発明の抗体は、本明細書で記載される電荷修飾を含む重鎖定常ドメインである、ＣＨ１ドメイン、および本明細書で記載される電荷修飾を含む軽鎖定常ドメインである、ＣＬドメインを伴う、少なくとも１つのＦａｂを含む。

【０３２８】

電荷修飾は、本発明の抗体に含まれる、従来型のＦａｂ分子（複数可）内、または本発明の抗体に含まれる、クロスオーバーＦａｂ分子（複数可）内に（ただし、これらの両方においてではない）施されうる。特定の実施形態では、電荷修飾は、本発明の抗体に含まれる、従来型のＦａｂ分子（複数可）内に施される。

【０３２９】

一部の実施形態では、電荷修飾を含む軽鎖定常ドメインであるＣＬと、電荷修飾を含む重鎖定常ドメインであるＣＨ１とを含むＦａｂまたは交差Ｆａｂにおいて、軽鎖定常ドメインであるＣＬ内の電荷修飾は、１２４位であり、任意選択で、１２３位（カバットに従う番号付け）であり、重鎖定常ドメインであるＣＨ１内の電荷修飾は、１４７および／または２１３位（カバットＥＵインデックスに従う番号付け）である。一部の実施形態では、軽鎖定常ドメインであるＣＬの、１２４位におけるアミノ酸は、独立して、リジン（Ｋ）、アルギニン（Ｒ）またはヒスチジン（Ｈ）（カバットに従う番号付け）により（好ましい一実施形態では、独立して、リジン（Ｋ）により）置換され、重鎖定常ドメインであるＣＨ１の、１４７位におけるアミノ酸および／または２１３位におけるアミノ酸は、独立して、グルタミン酸（Ｅ）またはアスパラギン酸（Ｄ）（カバットＥＵインデックスに従う番号付けにより置換される。

【０３３０】

Ｈ．例示的抗体

一部の実施形態では、標的への結合（例えば、ＣＥＡへの結合、ＦＡＰへの結合、またはＧＰＲＣ５Ｄへの結合）に関する態様および実施形態と、ＤＯＴＡへの結合に関する態様および実施形態とは、組み合わされうる。すなわち、第１の抗体および第２の抗体は、各々、例えば、上記で記載された配列のうちのいずれかを含む、ＣＥＡ、ＦＡＰ、またはＧＰＲＣ５Ｄに対する結合部位を含み、第１の抗体および第２の抗体は、会合して、上記で記載された配列のうちのいずれかを有する、ＤＯＴＡキレートに対する結合部位を形成することが好ましい場合がある。また、ＣＥＡ、ＦＡＰ、もしくはＧＰＲＣ５Ｄへの結合に関する態様および実施形態、および／またはＤＯＴＡへの結合は、上記で記載された抗体のための好ましいフォーマット（すなわち、好ましいフォーマットのうちのいずれかでは、標的抗原に結合する部分は、上記で記載された、ＣＤＲまたは可変領域配列を含むこ

とができ、かつ／または放射性核種標識化合物に結合する部分は、上記で記載されたＣＤＲおよび／または可変領域配列を有するＤＯＴＡ結合剤でありうる）と組み合わされうることも明示的に想定される。

【０３３１】

１つの特定の実施形態では、第１の抗体は、

ａ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる、第１の完全長抗体；および

ｂ）配列番号３５～３７の重鎖ＣＤＲを含み（またはＣＤＲ－Ｈ１が、ＧＦＳＬＴＤＹＧＶＨ（配列番号１４８）の配列を有し）、かつ／または配列番号４１に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、もしくは１００％の同一性を有する、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含むか、またはこれらからなるポリペプチドであって、

ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、前記第１の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド

を含むことができる。

【０３３２】

第１の抗体は、（ｂ）のポリペプチドと会合して、放射標識化合物に対する機能的結合ドメインを形成する、軽鎖ドメインを含まない。

【０３３３】

（ｂ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、例えば、１つ～１０の残基をさらに含むことが好ましい場合がある。任意選択で、これらは、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基でありうる。別の実施形態では、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。

【０３３４】

一部の実施形態では、部分（ａ）における、２つの抗体重鎖は、同一な可変ドメイン、任意選択で、同一な可変ＣＨ１ドメインおよび／または可変ＣＨ２ドメインを有する。部分（ａ）における、２つの抗体重鎖は、任意選択で、例えば、ノブ・イントゥー・ホール突然変異、およびヘテロダイマーの適正な会合を促進することが意図される他の突然変異の創出により、それらのＣＨ３ドメインだけにおいて異なりうる。

【０３３５】

第２の抗体は、

ｃ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる、第２の完全長抗体；および

ｄ）配列番号３８～４０のＣＤＲを含み、かつ／または配列番号４２に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、もしくは１００％の同一性を有する、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むことができ、

前記ポリペプチドは、ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、前記第２の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しており、第２の抗体は、（ｄ）のポリペプチドと会合して、放射標識化合物に対する機能的結合ドメインを形成する、重鎖ドメインを含まない。

【０３３６】

一部の実施形態では、部分（ｃ）における、２つの抗体重鎖は、互いと同一な可変ドメイン、任意選択で、同一な可変ＣＨ１ドメインおよび／または可変ＣＨ２ドメインを有する。部分（ｃ）における、２つの抗体重鎖は、任意選択で、例えば、ノブ・イントゥー・ホール突然変異、およびヘテロダイマーの適正な会合を促進することが意図される他の突然変異の創出により、それらのＣＨ３ドメインだけにおいて異なりうる。

【０３３７】
ＣＥＡ結合部位／配列は、上記で記載されたＣＥＡ結合部位／配列のうちのいずれかでありうる。
【０３３８】
１つの特定の実施形態では、第１の抗体は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。
【０３３９】
例えば、（ａ）における、２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含むことができ、かつ／または配列番号２６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ａ）における、２つの軽鎖は、配列番号１０３に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ａ）における、２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。
【０３４０】
部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含むことができ、かつ／または部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号２５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）における一方の重鎖は、配列番号１００の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号１０２の配列を有する。
【０３４１】
具体的な一実施形態では、第１の抗体は、配列番号１００の第１の重鎖、および配列番号１０１の第２の重鎖（この場合、Ｃ末端のＡＳＴは、任意選択であり存在しなくてもよく、本明細書で記載される別のＣ末端伸長で置換されていてもよい）、および配列番号１０３の軽鎖を含むことができる。
【０３４２】
第２の抗体はまた、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）も有しうる。
【０３４３】
例えば、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含むことができ、かつ／または、配列番号２６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号１０３に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖が、第１の抗体の（ａ）における軽鎖と同じ配列を有する、例えば、部分（ａ）および（ｃ）における前記軽鎖の全てが、同じ配列を有することが好ましい場合がある。
【０３４４】
一部の実施形態では、部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含み、かつ／または部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号２５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は、配列番号９７の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号９９の配列を有する。
【０３４５】
具体的な一実施形態では、第２の抗体は、配列番号９７の第１の重鎖、および配列番号９８の第２の重鎖、および配列番号１０３の軽鎖を含むことができる。
【０３４６】
同様に、一部の実施形態では、標的への結合（例えば、ＣＥＡへの結合、ＦＡＰへの結合、またはＧＰＲＣ５Ｄへの結合）に関する態様および実施形態と、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭへ

の結合に関する態様および実施形態とは、組み合わされうる。すなわち、第１の抗体および第２の抗体は、各々、例えば、上記で記載された配列のうちのいずれかを含む、ＣＥＡ、ＦＡＰ、またはＧＰＲＣ５Ｄに対する結合部位を含み、第１の抗体および第２の抗体は、会合して、上記で記載された配列のうちのいずれかを有する、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭキレートに対する結合部位を形成することが好ましい場合がある。また、ＣＥＡ、ＦＡＰ、もしくはＧＰＲＣ５Ｄへの結合、および／またはＰｂ－ＤＯＴＡＭへの結合に関する態様および実施形態は、上記で記載された抗体のための好ましいフォーマット（すなわち、好ましいフォーマットのうちのいずれかでは、標的抗原に結合する部分は、上記で記載された、ＣＤＲまたは可変領域配列を含むことができ、かつ／または放射性核種標識化合物に結合する部分は、上記で記載されたＣＤＲおよび／または可変領域配列を有するＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合剤でありうる）と組み合わされうることも明示的に想定される。

【０３４７】

１つの特定の実施形態では、第１の抗体は、

ａ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる、第１の完全長抗体；および

ｂ）配列番号１～３の重鎖ＣＤＲを含み、かつ／または配列番号７に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含むか、またはこれらからなり；

ＶＨドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、前記第１の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しているポリペプチド

を含むことができる。

【０３４８】

第１の抗体は、（ｂ）のポリペプチドと会合して、放射標識化合物に対する機能的結合ドメインを形成する、軽鎖ドメインを含まない。

【０３４９】

（ｂ）のポリペプチドは、ＶＨドメインのＣ末端における、１つまたは複数の残基、任意選択で、１つまたは複数のアラニン残基、任意選択で、単一のアラニン残基をさらに含むことが好ましい場合がある。例えば、（ｂ）のポリペプチドは、Ｃ末端アラニンの伸長を伴う配列番号７、すなわち、配列

VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTY
YASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWG
RGTLVTVSSA（配列番号１５０）

を含むか、またはこれらからなることができる。

【０３５０】

別の実施形態では、さらなる残基は、上記で記載されたＣＨ１ドメインのＮ末端部分、例えば、ヒトＩｇＧ１のＣＨ１ドメインに由来する、例えば、ＣＨ１ドメインのＮ末端に由来する、１つ～１０の残基でありうる。例えば、さらなる残基は、ＡＳＴでありうる。

【０３５１】

一部の実施形態では、部分（ａ）における、２つの抗体重鎖は、同一な可変ドメイン、任意選択で、同一な可変ＣＨ１ドメインおよび／または可変ＣＨ２ドメインを有する。部分（ａ）における、２つの抗体重鎖は、任意選択で、例えば、ノブ・イントゥー・ホール突然変異、およびヘテロダイマーの適正な会合を促進することが意図される他の突然変異の創出により、それらのＣＨ３ドメインだけにおいて異なりうる。

【０３５２】

第２の抗体は、

ｃ）ＣＥＡに特異的に結合し、２つの抗体重鎖および２つの抗体軽鎖からなる、第２の完全長抗体；および

ｄ）配列番号４～６のＣＤＲを含み、かつ／または配列番号８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、もしくは１００％の同一性を有する、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含むか、またはこれらからなるポリペプチド

を含むことができ、
前記ポリペプチドは、ＶＬドメインのＮ末端により、好ましくはペプチドリンカーを介して、前記第２の完全長抗体の２つの重鎖の１つのＣ末端に融合しており、第２の抗体は、（ｄ）のポリペプチドと会合して、放射標識化合物に対する機能的結合ドメインを形成する、重鎖ドメインを含まない。
【０３５３】
一部の実施形態では、部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、互いと同一な可変ドメイン、任意選択で、同一な可変ＣＨ１ドメインおよび／または可変ＣＨ２ドメインを有する。部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、任意選択で、例えば、ノブ・イントゥー・ホール突然変異、およびヘテロダイマーの適正な会合を促進することが意図される他の突然変異の創出により、それらのＣＨ３ドメインだけにおいて異なりうる。
【０３５４】
特定の実施形態では、第１の抗体は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。
【０３５５】
例えば、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含むことができ、かつ／または配列番号２６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号３４に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ａ）における、２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。
【０３５６】
部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含むことができ、かつ／または部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号２５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）における一方の重鎖は、配列番号２７の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号２８の配列を有する。
【０３５７】
具体的な一実施形態では、第１の抗体は、配列番号２８の第１の重鎖、および配列番号３２の第２の重鎖（またはさらなるＣ末端アラニン、もしくはＡＳＴを伴う伸長など、本明細書で記載される、他のＣ末端伸長を含むその変異体）、ならびに配列番号３４の軽鎖を含むことができる。Ｃ末端アラニンの伸長を伴う、配列番号３２の変異体を、下記：
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINT
KTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMD
YWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSW
IRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTAT
YYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA（配列番号１５３）
に示す。
【０３５８】
別の特定の実施形態では、第１の抗体は、抗体であるＡ５Ｂ７（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。
【０３５９】
例えば、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号４６～４８のＣＤＲを含むことができ

、かつ／または、配列番号５０に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号５４に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ａ）における、２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。

【０３６０】

一部の実施形態では、部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号４３～４５のＣＤＲを含むことができ、かつ／または部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号４９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）における一方の重鎖は、配列番号５１の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号５３の配列を有する。

【０３６１】

具体的な一実施形態では、第１の抗体は、配列番号５１の第１の重鎖、および配列番号５２の第２の重鎖（またはＣ末端アラニンの伸長、もしくはＡＳＴを伴う伸長など、本明細書で記載される、他のＣ末端伸長を伴うその変異体）、および配列番号５４の軽鎖を含むことができる。

【０３６２】

別の特定の実施形態では、第１の抗体は、抗体であるＴ８４．６６（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。

【０３６３】

例えば、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号１４～１６のＣＤＲを含むことができ、かつ／または配列番号１８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号８９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ａ）における２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。

【０３６４】

一部の実施形態では、部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１１～１３のＣＤＲを含むことができ、かつ／または部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１７に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）における、一方の重鎖は、配列番号８６の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号８８の配列を有する。

【０３６５】

具体的な一実施形態では、第１の抗体は、配列番号８６の第１の重鎖、および配列番号８７の第２の重鎖（またはＣ末端の「ＡＳＴ」が、非存在であるか、本明細書で開示される、異なるＣ末端伸長で置換される、その変異体）、および配列番号８９の軽鎖を含むことができる。

【０３６６】

別の特定の実施形態では、第１の抗体は、抗体である２８Ａ９（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。

【０３６７】

例えば、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号６２～６４のＣＤＲを含むことができ、かつ／または、配列番号６６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ａ）における２つの軽鎖は、配列番号９６に対して

少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ａ）における２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。

【０３６８】

一部の実施形態では、部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号５９～６１のＣＤＲを含むことができ、かつ／または部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号６５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ａ）における一方の重鎖は、配列番号９３の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号９５の配列を有する。

【０３６９】

具体的な一実施形態では、第１の抗体は、配列番号９３の第１の重鎖、および配列番号９４の第２の重鎖（またはＣ末端の「ＡＳＴ」を伴わないか、本明細書で記載される、異なるＣ末端伸長で置換される、その変異体）、および配列番号９６の軽鎖を含むことができる。

【０３７０】

一部の実施形態では、第２の抗体は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。

【０３７１】

例えば、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号２２～２４のＣＤＲを含むことができ、かつ／または、配列番号２６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号３４に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖が、第１の抗体の（ａ）における軽鎖と同じ配列を有する、例えば、部分（ａ）および（ｃ）における前記軽鎖の全てが、同じ配列を有することが好ましい場合がある。

【０３７２】

一部の実施形態では、部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１９～２１のＣＤＲを含み、かつ／または部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号２５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は、配列番号２９の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号３０の配列を有する。

【０３７３】

具体的な一実施形態では、第２の抗体は、配列番号３０の第１の重鎖、および配列番号３３の第２の重鎖、および配列番号３４の軽鎖を含むことができる。

【０３７４】

別の特定の実施形態では、第２の抗体は、Ａ５Ｂ７（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。

【０３７５】

例えば、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号４６～４８のＣＤＲを含むことができ、かつ／または配列番号５０に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号５８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖が、第１の抗体の（ａ）における軽鎖と同じ配列を有する、例えば、部分（ａ）および（ｃ）における前記軽鎖の全てが、同じ配列を有することが好ましい場合がある。

【０３７６】
一部の実施形態では、部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号４３～４５のＣＤＲを含み、かつ／または部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号４９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）の一方の重鎖は、配列番号５５の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号５７の配列を有する。
【０３７７】
具体的な一実施形態では、第２の抗体は、配列番号５５の第１の重鎖、および配列番号５６の第２の重鎖、および配列番号５８の軽鎖を含むことができる。
【０３７８】
別の特定の実施形態では、第２の抗体は、抗体であるＴ８４．６６（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。
【０３７９】
例えば、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号１４～１６のＣＤＲを含むことができ、かつ／または、配列番号１８に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号８９に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。
【０３８０】
一部の実施形態では、部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１１～１３のＣＤＲを含むことができ、かつ／または部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号１７に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）における一方の重鎖は、配列番号８３の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号８５の配列を有する。
【０３８１】
具体的な一実施形態では、第２の抗体は、配列番号８３の第１の重鎖、および配列番号８４の第２の重鎖、および配列番号８９の軽鎖を含むことができる。
【０３８２】
別の特定の実施形態では、第２の抗体は、抗体である２８Ａ９（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列（すなわち、ＣＤＲまたはＶＨ／ＶＬドメイン）を有しうる。
【０３８３】
例えば、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号６２～６４のＣＤＲを含むことができ、かつ／または配列番号６６に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する軽鎖可変ドメインを含むことができる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、配列番号９６に対する、して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有しうる。一部の実施形態では、（ｃ）における２つの軽鎖は、互いと同一であることが好ましい場合がある。
【０３８４】
一部の実施形態では、部分（ｃ）における２つの抗体重鎖は、配列番号５９～６１のＣＤＲを含むことができ、かつ／または部分（ａ）における２つの抗体重鎖は、配列番号６５に対して少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９、または１００％の同一性を有する可変ドメインを含む。一実施形態では、部分（ｃ）における一方の重鎖は、配列番号９０の配列を有し、他方の重鎖は、配列番号９２の配列を有する。
【０３８５】

具体的な一実施形態では、第２の抗体は、配列番号９０の第１の重鎖、および配列番号９１の第２の重鎖、および配列番号９６の軽鎖を含むことができる。

【０３８６】

一部の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、ＣＥＡの同じエピトープに結合する。したがって、例えば、第１の抗体および第２の抗体の両方は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、Ａ５Ｂ７（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、Ｔ８４．６６（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、２８Ａ９（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体および第２の抗体の両方は、ＭＦＥ２３（そのヒト化型を含む）に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もある。

【０３８７】

したがって、例えば、

ｉ）第１の抗体は、配列番号２８の第１の重鎖、配列番号３２の第２の重鎖（任意選択で、本明細書で記載されるＣ末端伸長、例えば、ＡＳＴを有する）、および配列番号３４の軽鎖を含むことができ；第２の抗体は、配列番号３０の第１の重鎖、配列番号３３の第２の重鎖、および配列番号３４の軽鎖を含むことができ；

ｉｉ）第１の抗体は、配列番号５１の第１の重鎖、配列番号５２の第２の重鎖（任意選択で、本明細書で記載されるＣ末端伸長、例えば、ＡＳＴを有する）、および配列番号５４の軽鎖を含むことができ；第２の抗体は、配列番号５５の第１の重鎖、配列番号５６の第２の重鎖、および配列番号５８の軽鎖を含むことができ；

ｉｉｉ）第１の抗体は、配列番号８６の第１の重鎖、配列番号８７の第２の重鎖（この場合、Ｃ末端のＡＳＴ残基は、任意選択であり存在しなくてもよく、代替的Ｃ末端伸長により置換されていてもよい）、および配列番号８９の軽鎖を含むことができ；第２の抗体は、配列番号８３の第１の重鎖、配列番号８４の第２の重鎖、および配列番号８９の軽鎖を含むことができ；

ｉｖ）第１の抗体は、配列番号９３の第１の重鎖、配列番号９４の第２の重鎖（この場合、Ｃ末端のＡＳＴ残基は、任意選択であり存在しなくてもよく、代替的Ｃ末端伸長により置換されていてもよい）、および配列番号９６の軽鎖を含むことができ；第２の抗体は、配列番号９０の第１の重鎖、配列番号９１の第２の重鎖、および配列番号９６の軽鎖を含むことができる。

【０３８８】

他の実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、上記で論じられた、ＣＥＡの異なるエピトープに結合する。したがって、例えば、第１の抗体は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、第２の抗体は、Ａ５Ｂ７に由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もあり；第１の抗体は、抗体であるＡ５Ｂ７に由来するＣＥＡ結合配列を有することが可能であり、第２の抗体は、ＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有する場合もある。二重パラトープ（ＣＨ１Ａ１ＡおよびＡ５Ｂ７）対の使用の例については、実施例６ｃにおいて記載されている。

【０３８９】

なおさらなる具体的な実施形態では、標的抗原は、ＧＰＲＣ５ＤまたはＦＡＰであることが可能であり、フォーマットは、図２５Ｂに示される通りでありうる。任意選択で、第１の抗体および第２の抗体は、会合して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位キレート（Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）を形成する。

【０３９０】

したがって、一実施形態（標的抗原がＧＰＲＣ５Ｄである場合）では、

ｉ）第１の抗体は、配列番号１０４の第１の重鎖、配列番号１０６の第２の重鎖（この場合、Ｃ末端アラニンは、任意選択であり存在しなくてもよく、本明細書で記載される代替的Ｃ末端伸長で置きかえられていてもよい）、および配列番号１０７の軽鎖を含み；

ｉｉ）第２の抗体は、配列番号１０４の第１の重鎖、配列番号１０５の第２の重鎖、および配列番号１０７の軽鎖を含む。

【０３９１】

別の実施形態（標的抗原は、ＦＡＰである場合）では、

ｉ）第１の抗体は、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１１０の第２の重鎖（この場合、Ｃ末端アラニンは、任意選択であり存在しなくてもよく、本明細書で記載される代替的Ｃ末端伸長で置きかえられていてもよい）、および配列番号１１１の軽鎖を含み；

ｉｉ）第２の抗体は、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１０９の第２の重鎖、および配列番号１１１の軽鎖を含む。

【０３９２】

なおさらなる具体的な実施形態では、標的は、ＣＥＡであることが可能であり、例えば、抗体は、抗体であるＣＨ１Ａ１Ａに由来するＣＥＡ結合配列を有し、フォーマットは、図２５Ｃに示される通りでありうる。任意選択で、第１の抗体および第２の抗体は、会合して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対する機能的抗原結合部位キレート（Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）を形成する。したがって、具体的な一実施形態では、

ｉ）第１の抗体は、配列番号１１２の第１の重鎖、配列番号１１４の第２の重鎖、および配列番号１１５の軽鎖を含み；

ｉｉ）第２の抗体は、配列番号１１２の第１の重鎖、配列番号１１３の第２の重鎖、および配列番号１１５の軽鎖を含む。

【０３９３】

Ｉ．抗体変異体

ある特定の実施形態では、本明細書で提示される抗体のアミノ酸配列変異体が想定される。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改善することが所望でありうる。抗体のアミノ酸配列変異体は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列に導入することにより調製される場合もあり、ペプチド合成により調製される場合もある。このような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／または抗体のアミノ酸配列内の残基への挿入、および／または抗体のアミノ酸配列内の残基の置換を含む。最終的なコンストラクトが、所望の特性、例えば、抗原への結合を保有することを条件として、最終的なコンストラクトに到達するように、欠失、挿入、および置換の任意の組合せが施されうる。

【０３９４】

置換変異体、挿入変異体、および欠失変異体

ある特定の実施形態では、１つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異誘発のための目的の部位は、ＨＶＲ（ＣＤＲ）およびＦＲを含む。保存的置換を、表１の「好ましい置換」の見出しの下に示す。表１の「例示的置換」の見出しの下には、下記で、アミノ酸側鎖クラスを参照しながらさらに記載される通り、より実質的な変化が提示される。アミノ酸置換が、目的の抗体に導入される場合があり、産物は、所望の活性、例えば、抗原への結合の保持／改善、免疫原性の低下、またはＡＤＣＣもしくはＣＤＣの低減もしくは消失についてスクリーニングされうる。

表１

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

【０３９５】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性：

（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；

（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ

に従い群分けされうる。

【０３９６】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを、別のクラスのメンバーと

交換することを伴うであろう。

【０３９７】

置換変異体の１つの種類は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の１つまたは複数の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、結果としてもたらされ、さらなる研究のために選択される（１つまたは複数の）変異体は、ある特定の生物学的特性（例えば、親和性の増大、免疫原性の低減）の、親抗体と比べた改変（例えば、改善）を有し、かつ／または親抗体のある特定の生物学的特性も実質的に保持するであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であって、例えば、本明細書で記載される親和性成熟法など、ファージディスプレイベースの親和性成熟法を使用して簡便に作出されうる抗体である。略述すると、１つまたは複数のＣＤＲ残基を突然変異させ、変異体抗体をファージ上に提示し、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。

【０３９８】

変更（例えば、置換）は、例えば、抗体親和性を改善するように、ＣＤＲ内でなされうる。このような変更は、ＣＤＲの「ホットスポット」、すなわち、体細胞の成熟過程において突然変異を高頻度で経るコドンによりコードされる残基（例えば、Ｃｈｏｗｄｈｕｒｙ、Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２０７：１７９～１９６（２００８）を参照されたい）、および／または抗原に接触する残基においてなされる場合があり、結果としてもたらされる変異体のＶＨまたはＶＬは、結合親和性について調べられる。二次ライブラリーからの構築および再選択による親和性成熟については、例えば、Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」、１７８：１～３７（Ｏ’Ｂｒｉｅｎら編、Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ、（２００１））において記載されている。親和性成熟についての一部の態様では、様々な方法（例えば、エラープローンＰＣＲ、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指定突然変異）のうちのいずれかにより、成熟について選び出された可変遺伝子に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリーが創出される。次いで、所望の親和性を伴う任意の抗体の変異体を同定するように、ライブラリーがスクリーニングされる。多様性を導入する別の方法は、ＣＤＲ指定法を伴うが、この場合、いくつかのＣＤＲ残基（例えば、一度に４～６残基）がランダム化される。抗原結合に関与するＣＤＲ残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発またはモデル化を用いて、具体的に同定されうる。ＣＤＲ－Ｈ３およびＣＤＲ－Ｌ３は、特に、ターゲティングされることが多い。

【０３９９】

ある特定の態様では、置換、挿入、または欠失は、このような変更が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減しない限りにおいて、１つまたは複数のＣＤＲ内でなされうる。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的変更（例えば、本明細書で提示される保存的置換）は、ＣＤＲ内でなされうる。このような変更は、例えばＣＤＲ内の抗原接触残基の外部でありうる。上記で提示された、ある特定の変異体のＶＨ配列およびＶＬ配列では、各ＣＤＲは、変更されないか、または１つ、２つ、もしくは３つを超えないアミノ酸置換を含有する。

【０４００】

突然変異誘発のためにターゲティングされうる抗体の残基または領域を同定するために有用な方法は、ＣｕｎｎｉｎｇｈａｍおよびＷｅｌｌｓ（１９８９）、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１０８１～１０８５により記載されている通り、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、抗体の抗原との相互作用が影響を受けるのかどうかを決定するように、残基または標的残基群（例えば、ａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、およびｇｌｕなどの荷電残基）が同定され、中性アミノ酸または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）で置きかえられる。さらなる置換は、初期の置換に対して機能的な感受性を顕示するアミノ酸位置に導入されうる。代替的に、または加えて、抗体と抗原との間の接触点を同定するのに、抗原－抗体複合体の結晶構造が使用されうる。このような接触残基および近傍残基は、置換のための候補残基としてターゲティングされる場合もあり、消失させされられる場合もある。変異体は、それらが所望の特性を

含有するのかどうかを決定するようにスクリーニングされうる。

【０４０１】

アミノ酸配列の挿入は、アミノ末端および／またはカルボキシル末端における、長さが１残基～百またはこれを超える残基を含有するポリペプチドの範囲の融合のほか、配列内における単一または複数のアミノ酸残基の挿入も含む。末端における挿入の例は、Ｎ末端のメチオニル残基を伴う抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、酵素に対する抗体（例えば、ＡＤＥＰＴ（ａｎｔｉｂｏｄｙ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ｅｎｚｙｍｅ ｐｒｏｄｒｕｇ ｔｈｅｒａｐｙ）のための）のＮ末端もしくはＣ末端への融合体、または抗体の血清半減期を延長するポリペプチドのＮ末端もしくはＣ末端への融合体を含む。

【０４０２】

グリコシル化変異体

ある特定の態様では、本明細書で提示される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増大または低下させるように変更される。グリコシル化部位の、抗体への付加または欠失は、１つまたは複数のグリコシル化部位が、創出または除去されるように、アミノ酸配列を変更することにより、簡便に達せられうる。

【０４０３】

抗体がＦｃ領域を含む場合、抗体に接合しているオリゴ糖は、変更されうる。哺乳動物細胞により産生される天然抗体は、典型的に、一般に、Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７に、Ｎ連結により接合している、分枝状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Ｗｒｉｇｈｔら、ＴＩＢＴＥＣＨ、１５：２６～３２（１９９７）を参照されたい。オリゴ糖は、多様な炭水化物、例えば、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ガラクトース、およびシアル酸のほか、二分岐オリゴ糖構造の「ステム部」内のＧｌｃＮＡｃに接合しているフコースを含むことができる。一部の態様では、本発明の抗体内のオリゴ糖の修飾は、ある特定の特性が改善された抗体変異体を創出するためになされうる。

【０４０４】

一態様では、非フコシル化オリゴ糖、すなわち、Ｆｃ領域に接合している（直接的に、または間接的に）フコースを欠くオリゴ糖構造を有する抗体変異体が提供される。このような非フコシル化オリゴ糖（また、「アフコシル化」オリゴ糖とも称される）は、特に、二分岐オリゴ糖構造のステム部における、第１のＧｌｃＮＡｃに接合しているフコース残基を欠く、Ｎ結合型オリゴ糖である。一態様では、Ｆｃ領域内の非フコシル化オリゴ糖の比率を、天然抗体または親抗体と比較して増大させた抗体変異体が提供される。例えば、非フコシル化オリゴ糖の比率は、少なくとも約２０％、少なくとも約４０％、少なくとも約６０％、少なくとも約８０％、なおまたは約１００％（すなわち、フコシル化オリゴ糖が存在しない）でありうる。非フコシル化オリゴ糖の百分率は、例えば、ＷＯ２００６／０８２５１５において記載されている通り、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ質量分析により測定される、Ａｓｎ２９７に接合している全てのオリゴ糖（例えば、複合マンノース構造、ハイブリッドマンノース構造、および高マンノース構造）の合計と比べた、フコース残基を欠くオリゴ糖の（平均）量である。Ａｓｎ２９７とは、Ｆｃ領域内の約２９７位（Ｆｃ領域の残基についてのＥＵ番号付け）に位置するアスパラギン残基を指すが；Ａｓｎ２９７はまた、抗体内の微細な配列差異に起因して、２９７位から、約±３アミノ酸上流または下流に、すなわち、２９４～３００位の間に位置する場合もある。Ｆｃ領域内の非フコシル化オリゴ糖の比率を増大させた、このような抗体は、ＦｃγＲＩＩＩａ受容体への結合が改善される場合があり、かつ／またはエフェクター機能、特に、ＡＤＣＣ機能が改善される場合がある。例えば、ＵＳ２００３／０１５７１０８；ＵＳ２００４／００９３６２１を参照されたい。

【０４０５】

フコシル化が低減された抗体を作製することが可能な細胞株の例は、タンパク質のフコシル化が欠損するＬｅｃ１３ ＣＨＯ細胞（Ｒｉｐｋａら、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．、２４９：５３３～５４５（１９８６）；ＵＳ２００３／０１５７１０

８；およびとりわけ、実施例１１における、ＷＯ２００４／０５６３１２）、およびアルファ－１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子であるＦＵＴ８がノックアウトされたＣＨＯ細胞（例えば、Ｙａｍａｎｅ－Ｏｈｎｕｋｉら、Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．、８７：６１４～６２２（２００４）；Ｋａｎｄａ，Ｙ．ら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．、９４（４）：６８０～６８８（２００６）；およびＷＯ２００３／０８５１０７を参照されたい）などのノックアウト細胞株、またはＧＤＰ－フコース合成タンパク質またはＧＤＰ－フコース輸送体タンパク質の活性が低減されるか、または消失している細胞（例えば、ＵＳ２００４２５９１５０、ＵＳ２００５０３１６１３、ＵＳ２００４１３２１４０、ＵＳ２００４１１０２８２を参照されたい）を含む。

【０４０６】

さらなる態様では、オリゴ糖が二分された抗体変異体であって、例えば、抗体のＦｃ領域に接合している二分岐オリゴ糖が、ＧｌｃＮＡｃにより二分された抗体変異体が提供される。このような抗体変異体は、上記で記載された通り、フコシル化が低減されている場合もあり、かつ／またはＡＤＣＣ機能が改善されている場合もある。このような抗体変異体の例については、例えば、Ｕｍａｎａら、Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ、１７、１７６～１８０（１９９９）；Ｆｅｒｒａｒａら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎ　Ｂｉｏｅｎｇ、９３、８５１～８６１（２００６）；ＷＯ９９／５４３４２、ＷＯ２００４／０６５５４０、ＷＯ２００３／０１１８７８において記載されている。

【０４０７】

オリゴ糖内の少なくとも１つのガラクトース残基が、Ｆｃ領域に接合している、抗体変異体もまた提供される。このような抗体変異体は、ＣＤＣ機能が改善されている場合がある。このような抗体変異体については、例えば、ＷＯ１９９７／３００８７；ＷＯ１９９８／５８９６４；およびＷＯ１９９９／２２７６４において記載されている。

【０４０８】

抗体は、グリコシル化の程度を低減するように修飾されることが好ましい場合がある。一部の実施形態では、抗体は、非グリコシル化される場合もあり、脱グリコシル化される場合もある。抗体は、Ｎ２９７における置換、例えば、Ｎ２９７Ｄ／Ａを含むことができる。

【０４０９】

Ｆｃ領域変異体

ある特定の実施形態では、１つまたは複数のアミノ酸修飾が、本明細書で提示される抗体のＦｃ領域に導入され、これにより、Ｆｃ領域変異体を作出する場合がある。Ｆｃ領域変異体は、１つまたは複数のアミノ酸位置におけるアミノ酸修飾（例えば、置換）を含む、ヒトＦｃ領域配列（例えば、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、ヒトＩｇＧ３、またはヒトＩｇＧ４のＦｃ領域）を含むことができる。

【０４１０】

ある特定の実施形態では、本発明は、エフェクター機能が低減された抗体変異体、例えば、ＣＤＣ、ＡＤＣＣ、および／またはＦｃγＲへの結合が低減されるか、または消失している抗体変異体を想定する。ある特定の態様では、本発明は、エフェクター機能の一部を保有するが、全部は保有しない抗体変異体を想定し、これを、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける抗体の半減期は、重要であるが、ある特定のエフェクター機能（補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）など）は、不要または有害である適用に所望の候補物質とする。

【０４１１】

ＣＤＣ活性および／またはＡＤＣＣ活性の低減／枯渇を確認するように、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ　ｖｉｖｏ細胞傷害アッセイが行われうる。例えば、抗体が、ＦｃγＲへの結合を欠く（よって、ＡＤＣＣ活性を欠く可能性が高い）が、ＦｃＲｎへの結合能を保持することを確認するように、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）結合アッセイが行われうる。ＡＤＣＣを媒介するための主要な細胞であるＮＫ細胞が、ＦｃγＲＩＩＩだけを発現するのに対し、単球は、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、およびＦｃγＲＩＩＩを発現する。造

血細胞上のＦｃＲ発現については、ＲａｖｅｔｃｈおよびＫｉｎｅｔ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、９：４５７～４９２（１９９１）の４６４頁の表３にまとめられている。目的の分子のＡＤＣＣ活性について評価するｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイの非限定例については、米国特許第５，５００，３６２号（例えば、Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８３：７０５９～７０６３（１９８６）を参照されたい）およびＨｅｌｌｓｔｒｏｍ，Ｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８２：１４９９～１５０２（１９８５）；同第５，８２１，３３７号（Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ，Ｍ．ら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．、１６６：１３５１～１３６１（１９８７）を参照されたい）において記載されている。代替的に、非放射性アッセイ法も援用されうる（例えば、フローサイトメトリーのためのＡＣＴＩ（商標）非放射性細胞傷害アッセイ（Ｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ．、ＭｏｕｎｔａｉｎＶｉｅｗ、ＣＡ；およびＣｙｔｏＴｏｘ　９６（登録商標）非放射性細胞傷害アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を参照されたい。アッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を含む。代替的に、または加えて、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、例えば、Ｃｌｙｎｅｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９５：６５２～６５６（１９９８）において開示されている動物モデルなどの動物モデルにおいて評価されうる。抗体が、Ｃ１ｑに結合することが不可能であり、よって、ＣＤＣ活性を欠くことを確認するように、Ｃ１ｑ結合アッセイもまた、実行されうる。例えば、ＷＯ２００６／０２９８７９およびＷＯ２００５／１００４０２における、Ｃ１ｑ結合ＥＬＩＳＡおよびＣ３ｃ結合ＥＬＩＳＡを参照されたい。補体活性化について評価するために、ＣＤＣアッセイが実施されうる（例えば、Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ、２０２：１６３（１９９６）；Ｃｒａｇｇ，Ｍ．Ｓ．ら、Ｂｌｏｏｄ、１０１：１０４５～１０５２（２００３）；およびＣｒａｇｇ，Ｍ．Ｓ．およびＭ．Ｊ．Ｇｌｅｎｎｉｅ、Ｂｌｏｏｄ、１０３：２７３８～２７４３（２００４）を参照されたい）。当技術分野で公知の方法を使用して、ＦｃＲｎへの結合およびｉｎ　ｖｉｖｏにおけるクリアランス／半減期の決定もまた、実施されうる（例えば、Ｐｅｔｋｏｖａ，Ｓ．Ｂ．ら、Ｉｎｔ’ｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１８（１２）：１７５９～１７６９（２００６）；ＷＯ２０１３／１２０９２９　Ａ１を参照されたい）。

【０４１２】

エフェクター機能が低減された抗体は、Ｆｃ領域の残基２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７、および３２９のうちの１つまたは複数の置換を伴う抗体（米国特許第６，７３７，０５６号）、例えば、Ｐ３２９Ｇを含む。このようなＦｃ突然変異体は、アミノ酸位置２６５、２６９、２７０、２９７、および３２７のうちの、２つまたはこれを超える位置における置換を伴うＦｃ突然変異体であって、残基２６５および２９７の、アラニンへの置換を伴う、いわゆる「ＤＡＮＡ」Ｆｃ突然変異体を含むＦｃ突然変異体（米国特許第７，３３２，５８１号）を含む。

【０４１３】

ある特定の態様では、抗体変異体は、ＦｃγＲへの結合を減弱させる、１つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の２３４および２３５位（残基のＥＵ番号付け）における置換を伴うＦｃ領域を含む。一態様では、置換は、Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａ（ＬＡＬＡ）である。ある特定の態様では、抗体変異体は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域に由来する、Ｆｃ領域内のＤ２６５Ａおよび／またはＰ３２９Ｇをさらに含む。一態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域に由来する、Ｆｃ領域内のＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、およびＰ３２９Ｇ（ＬＡＬＡ－ＰＧ）である（例えば、ＷＯ２０１２／１３０８３１を参照されたい）。別の態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域に由来する、Ｆｃ領域内のＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、およびＤ２６５Ａ（ＬＡＬＡ－ＤＡ）である。

【０４１４】

他の実施形態では、ＩｇＧ４またはＩｇＧ２など、エフェクター機能が低減されたＩｇＧ亜型を使用することが可能でありうる。

【０４１５】
ＦｃＲへの結合が改善されるか、または減弱している、ある特定の抗体変異体については、記載されている（例えば、米国特許第６，７３７，０５６号；ＷＯ２００４／０５６３１２；およびＳｈｉｅｌｄｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、９（２）：６５９１～６６０４（２００１）を参照されたい）。
【０４１６】
一部の実施形態では、例えば、米国特許第６，１９４，５５１号；ＷＯ９９／５１６４２；およびＩｄｕｓｏｇｉｅら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１６４：４１７８～４１８４（２０００）において記載されている、Ｃ１ｑへの結合および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）の変更（すなわち、改善または減弱、好ましくは、減弱）を結果としてもたらすＦｃ領域内の変更が施される。
【０４１７】
ある特定の態様では、抗体変異体は、ＦｃＲｎへの結合が低減する、１つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の２５３および／または３１０および／または４３５位（残基のＥＵ番号付け）における置換を伴うＦｃ領域を含む。ある特定の態様では、抗体変異体は、２５３、３１０、および４３５位におけるアミノ酸置換を伴うＦｃ領域を含む。一態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域に由来する、Ｆｃ領域内のＩ２５３Ａ、Ｈ３１０ＡおよびＨ４３５Ａである。例えば、Ｇｒｅｖｙｓ，Ａ．ら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１９４（２０１５）５４９７～５５０８を参照されたい。
【０４１８】
ある特定の態様では、抗体変異体は、ＦｃＲｎへの結合が低減する、１つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Ｆｃ領域の３１０および／または４３３および／または４３６位（残基のＥＵ番号付け）における置換を伴うＦｃ領域を含む。ある特定の態様では、抗体変異体は、３１０、４３３、および４３６位におけるアミノ酸置換を伴うＦｃ領域を含む。一態様では、置換は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域に由来する、Ｆｃ領域内のＨ３１０Ａ、Ｈ４３３ＡおよびＹ４３６Ａである。（例えば、ＷＯ２０１４／１７７４６０　Ａ１を参照されたい）。例えば、一部の実施形態では、通常のＦｃＲｎへの結合が使用されうる。
【０４１９】
また、Ｆｃ領域変異体の他の例に関するＤｕｎｃａｎおよびＷｉｎｔｅｒ、Ｎａｔｕｒｅ、３２２：７３８～４０（１９８８）；米国特許第５，６４８，２６０号；米国特許第５，６２４，８２１号；およびＷＯ９４／２９３５１も参照されたい。
【０４２０】
本明細書で報告される完全長抗体の重鎖Ｃ末端は、アミノ酸残基ＰＧＫを終端とする、完全Ｃ末端でありうる。重鎖のＣ末端は、Ｃ末端アミノ酸残基のうちの１つまたは２つが除去された、短縮Ｃ末端でありうる。重鎖のＣ末端は、ＰＧを終端とする、短縮Ｃ末端でありうる。本明細書で報告される全ての態様のうちの一態様では、本明細書で指定される、Ｃ末端ＣＨ３ドメインを含む重鎖を含む抗体は、Ｃ末端のグリシン残基（Ｇ４４６；ＥＵインデックスによるアミノ酸位置の番号付け）を含む。これは、本明細書で使用される「完全長抗体」または「完全長重鎖」という用語によっても、やはり、明示的に包摂されている。
【０４２１】
抗体誘導体
ある特定の態様では、本明細書で提示される抗体は、当技術分野で公知であり、たやすく入手可能である、さらなる非タンパク質性部分を含有するようにさらに改変されうる。抗体の誘導に適する部分は、水溶性ポリマーを含むがこれらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定例は、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１、３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダム共重合体）、およびデキストランまたはポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレン

グリコール、プロピレングリコールホモポリマー、酸化ポリプロピレン／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物を含むがこれらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中におけるその安定性のために、製造において、利点を有しうる。ポリマーは、任意の分子量のポリマーであることが可能であり、分枝状の場合もあり、非分枝状の場合もある。抗体に接合しているポリマーの数は、変動する場合があり、１つを超えるポリマーが接合している場合、同じ分子の場合もあり、異なる分子の場合もある。一般に、導出のために使用されるポリマーの数および／または種類は、改善される抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が、規定された条件下で、治療において使用されるのかどうかなどを含むがこれらに限定されない検討事項に基づき決定されうる。

【０４２２】

Ｊ．組換え法および組換え組成物

抗体は、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号において記載されている、組換え法および組換え組成物を使用して作製されうる。一実施形態では、本明細書で記載される抗体のセットをコードする単離核酸または単離核酸のセットが提供される。

【０４２３】

例えば、核酸のセットは、第１の抗体をコードする以下の核酸：

ｉ）第１の抗体の第１の重鎖をコードする核酸であって、前記第１の重鎖が、そのＣ末端を介して、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含むポリペプチドに融合している、標的抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖を含む、核酸；

ｉｉ）第１の抗体の第２の重鎖をコードする核酸であって、前記第２の重鎖が、標的抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖を含み、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含まない（任意選択で、第２の重鎖が、標的抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖からなる）、核酸；

ｉｉｉ）第１の抗体の軽鎖をコードする核酸

を含むことができる。

【０４２４】

加えて、または代替的に、本発明に従う核酸のセットは、第２の抗体をコードする以下の核酸：

ｉｖ）第２の抗体の第１の重鎖をコードする核酸であって、前記第１の重鎖が、そのＣ末端を介して、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＬドメインを含むポリペプチドに融合している、標的抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖を含む、核酸；

ｖ）第２の抗体の第２の重鎖をコードする核酸であって、前記第２の重鎖が、標的抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖を含み、放射標識化合物に対する抗原結合部位のＶＨドメインを含まない（任意選択で、第２の重鎖が、標的抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖からなる）、核酸；

ｖｉ）第２の抗体の軽鎖をコードする核酸

を含むことができる。

【０４２５】

一部の実施形態では、これらの核酸のうちの、ある特定の核酸は、互いと同じでありうる。例えば、（ｉｉｉ）における核酸は、セットの全体が、５つの顕著に異なる核酸配列だけを含むように、（ｖｉ）における核酸と同じでありうる。

【０４２６】

核酸は、１つまたは複数の核酸分子内または発現ベクター内に組み入れられうる。

【０４２７】

したがって、さらなる実施形態では、このような核酸（複数可）を含む１つまたは複数のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。一実施形態では、それぞれの重鎖および軽鎖の各々は、個々のプラスミドから発現される。

【０４２８】

さらなる実施形態では、このような核酸（複数可）またはベクター（複数可）を含む宿

主細胞または宿主細胞のセットが提供される。一実施形態では、第１の抗体を発現する第１の宿主細胞が提供され、第２の抗体を発現する第２の宿主細胞が提供される。

【０４２９】

このような一実施形態では、第１の宿主細胞は、（１）上記の核酸（ｉ）～（ｉｉｉ）を含むベクター、または（２）核酸（ｉ）を含む第１のベクター、核酸（ｉｉ）を含む第２のベクター、および核酸（ｉｉｉ）を含む第３のベクター；または（３）上記の核酸（ｉ）～（ｉｉｉ）を併せて含む２つのベクターを含む（例えば、これらにより形質転換されている）。第２の宿主細胞は、（１）上記の核酸（ｉｖ）～（ｖｉ）を含むベクター、または（２）核酸（ｉｖ）を含む第１のベクター、核酸（ｖ）を含む第２のベクター、および核酸（ｖｉ）を含む第３のベクター；または（３）上記の核酸（ｉｖ）～（ｖｉ）を併せて含む２つのベクターを含む（例えば、これらにより形質転換されている）。

【０４３０】

一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはリンパ球（例えば、Ｙ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）である。一実施形態では、本発明に従う抗体を作製する方法であって、上記で提示された抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を、抗体の発現に適する条件下で培養することと、任意選択で、抗体を、宿主細胞（または宿主細胞培地）から回収することとを含む方法が提供される。

【０４３１】

組換えによる抗体の作製のために、例えば、上記で記載された抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内のさらなるクローニングおよび／または発現のために、１つまたは複数のベクターに挿入される。このような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）、たやすく単離およびシーケンシングされうる。

【０４３２】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適する宿主細胞は、本明細書で記載される、原核細胞または真核細胞を含む。例えば、抗体は、特に、グリコシル化およびＦｃエフェクター機能が必要とされない場合、細菌内で作製されうる。細菌内の、抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、ＵＳ５，６４８，２３７、ＵＳ５，７８９，１９９、およびＵＳ５，８４０，５２３を参照されたい（また、大腸菌内の抗体断片の発現について記載する、Ｃｈａｒｌｔｏｎ，Ｋ．Ａ．、「Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ」、２４８巻、Ｌｏ、Ｂ．Ｋ．Ｃ．（編）、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ（２００３）、２４５～２５４頁も参照されたい）。発現の後、抗体は、可溶型画分中の細菌細胞ペーストから単離され、さらに精製されうる。

【０４３３】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物であって、グリコシル化経路が「ヒト化」された結果として、部分的であるか、または完全なヒトグリコシル化パターンを伴う抗体の作製をもたらす真菌株および酵母株を含む真核微生物も、抗体をコードするベクターに適する、クローニング宿主または発現宿主である。Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ，Ｔ．Ｕ．、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．、２２（２００４）、１４０９～１４１４；およびＬｉ，Ｈ．ら、Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．２４（２００６）、２１０～２１５を参照されたい。

【０４３４】

（グリコシル化）抗体の発現に適する宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例は、植物細胞および昆虫細胞を含む。特に、ヨトウガ（Ｓｐｏｄｏｐｔｅｒａ ｆｒｕｇｉｐｅｒｄａ）細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と共に使用されうる、多数のバキュロウイルス株が同定されている。

【０４３５】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用されうる。例えば、ＵＳ５，９５９，１７７、

ＵＳ６，０４０，４９８、ＵＳ６，４２０，５４８、ＵＳ７，１２５，９７８、およびＵＳ６，４１７，４２９（トランスジェニック植物内で抗体を作製するための、ＰＬＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳＴＭ技術について記載する）を参照されたい。

【０４３６】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用されうる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合している哺乳動物細胞株は、有用でありうる。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、ＳＶ４０（ＣＯＳ－７）により形質転換された、サル腎臓ＣＶ１細胞株；ヒト胎児性腎臓細胞株（例えば、Ｇｒａｈａｍ，Ｆ．Ｌ．ら、Ｊ．Ｇｅｎ　Ｖｉｒｏｌ．、３６（１９７７）、５９～７４において記載されている、２９３細胞または２９３Ｔ細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）；マウスセルトリ細胞（例えば、Ｍａｔｈｅｒ，Ｊ．Ｐ．、Ｂｉｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．、２３（１９８０）、２４３～２５２において記載されている、ＴＭ４細胞）；サル腎臓細胞（ＣＶ１）；アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ３Ａ）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８）；ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ　Ｇ２）；マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２）；ＴＲＩ細胞（例えば、Ｍａｔｈｅｒ，Ｊ．Ｐ．ら、Ａｎｎａｌｓ　Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、３８３（１９８２）、４４～６８において記載されている）；ＭＲＣ５細胞；およびＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、ＤＨＦＲ－ＣＨＯ細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞（Ｕｒｌａｕｂ，Ｇ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、７７（１９８０）、４２１６～４２２０）；およびＹ０、ＮＳ０、およびＳｐ２／０などの骨髄腫細胞株を含む。抗体の作製に適する、ある特定の哺乳動物宿主細胞株の総説については、例えば、Ｙａｚａｋｉ，Ｐ．およびＷｕ，Ａ．Ｍ．、「Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ」、２４８巻、Ｌｏ，Ｂ．Ｋ．Ｃ．（編）、Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ　（２００４）、２５５～２６８頁を参照されたい。

【０４３７】

一態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞またはリンパ球（例えば、Ｙ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）である。

【０４３８】

Ｋ．アッセイ

本明細書で提示される抗体は、当技術分野で公知の多様なアッセイにより同定されうるか、それらの物理的／化学的特性、および／または生物活性についてスクリーニングされうるか、またはこれらについて特徴づけられうる。

【０４３９】

一態様では、本発明の抗体は、例えば、ＥＬＩＳＡ、ウエスタンブロットなど、公知の方法により、その抗原結合活性について調べられる。

【０４４０】

抗体の親和性

ある特定の実施形態では、本明細書で提示される抗体は、標的抗原に対する、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭもしくは≦０．００１ｎＭ（例えば、10^{-8}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）、または本明細書の他の箇所で言明される通りの解離定数（ＫＤ）を有する。

【０４４１】

ある特定の実施形態では、放射標識化合物に対する抗原結合部位は、放射標識化合物に対する、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭもしくは≦０．００１ｎＭ（例えば、10^{-8}Ｍ、またはこれ未満、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（ＫＤ）を有する。一部の実施形態では、Ｋｄとは、１ｎＭもしくはこれ未満、５００ｐＭもしくはこれ未満、２００ｐＭもしくはこれ未満、１００ｐＭもしくはこれ未満、５０ｐＭもしくはこれ未満、２０ｐＭもしくはこれ未満、１０ｐＭもしくはこれ未満、５ｐＭもしくはこれ未満、ま

たは１ｐＭもしくはこれ未満、または本明細書の他の箇所で言明される通りである。例えば、機能的結合部位は、放射標識化合物／金属キレートに、約１ｐＭ～１ｎＭ、例えば、約１～１０ｐＭ、１～１００ｐＭ、５～５０ｐＭ、１００～５００ｐＭ、または５００ｐＭ～１ｎＭのＫｄで結合しうる。

【０４４２】

一実施形態では、Ｋｄは、放射標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）により測定される。一実施形態では、ＲＩＡは、目的の抗体のＦａｂ変化形およびその抗原により実施される。例えば、溶液中における、Ｆａｂの、抗原に対する結合親和性は、非標識抗原の滴定系列の存在下において、Ｆａｂを、最小濃度の（^{125}Ｉ標識）抗原で平衡化し、次いで、抗Ｆａｂ抗体でコーティングされたプレートで、結合している抗原を捕捉することにより測定される（例えば、Ｃｈｅｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２９３：８６５～８８１（１９９９）を参照されたい）。アッセイのための条件を確立するために、ＭＩＣＲＯＴＩＴＥＲ（登録商標）マルチウェルプレート（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を、５０ｍＭの炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）中に５μｇ／ｍｌの捕捉用抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ Ｌａｂｓ）で一晩にわたりコーティングするのに続き、ＰＢＳ中に２％（ｗ／ｖ）のウシ血清アルブミンにより、室温（約２３℃）で、２～５時間にわたりブロックする。非吸着型プレート（Ｎｕｎｃ；型番２６９６２０）、１００ｐＭまたは２６ｐＭの［^{125}Ｉ］－抗原を、目的のＦａｂの段階希釈液と共に混合する（例えば、Ｐｒｅｓｔａら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．、５７：４５９３～４５９９（１９９７）における、抗ＶＥＧＦ抗体である、Ｆａｂ－１２の評価に準拠する）。次いで、目的のＦａｂを、一晩にわたりインキュベートするが、インキュベーションをいっそう長時間（例えば、約６５時間）にわたり持続して、平衡に達したことを確認することもできる。その後、混合物を、室温での（例えば、１時間にわたる）インキュベーションのための捕捉用プレートに移す。次いで、溶液を除去し、プレートを、ＰＢＳ中に０．１％のポリソルベート２０（ＴＷＥＥＮ－２０（登録商標））で８回にわたり洗浄する。プレートが乾燥したら、ウェル１つ当たり１５０μｌの閃光物質（ＭＩＣＲＯＳＣＩＮＴ－２０（商標）；Ｐａｃｋａｒｄ）を添加し、プレートを、ＴＯＰＣＯＵＮＴ（商標）ガンマカウンター（Ｐａｃｋａｒｄ）上で、１０分間にわたりカウントする。最大の結合の２０％以下を示す濃度の各Ｆａｂを、競合的結合アッセイにおける使用のために選び出す。

【０４４３】

別の実施形態に従い、Ｋｄは、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－２０００またはＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－３０００（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を使用するアッセイは、２５℃で、約１０反応単位（ＲＵ）の固定化抗原ＣＭ５チップにより実施される。一実施形態では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（ＣＭ５；ＢＩＡＣＯＲＥ，Ｉｎｃ）を、供給元の指示書に従い、Ｎ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）およびＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）で活性化する。抗原を、１０ｍＭの酢酸ナトリウム、ｐＨ４．８で、５μｇ／ｍｌ（約０．２μＭ）に希釈してから、５μｌ／分の流量で注入して、約１０反応単位（ＲＵ）のタンパク質のカップリングを達成する。抗原を注入した後、１Ｍのエタノールアミンを注入して、非反応基をブロックする。反応速度を測定するために、Ｆａｂの２倍段階希釈液（０．７８ｎＭ～５００ｎＭ）を、０．０５％のポリソルベート２０（Ｔｗｅｅｎ－２０（商標））界面活性剤（ＰＢＳＴ）と共に、２５℃、約２５μｌ／分の流量でＰＢＳ中に注入する。会合速度（k_{on}）および解離速度（k_{off}）は、単純一対一ラングミュア結合モデル（ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ ｖｅｒｓｉｏｎ ３．２）を使用して、会合センサーグラムと解離センサーグラムとを同時に当てはめることにより計算される。平衡解離定数（Ｋｄ）は、比k_{off}／k_{on}として計算される。例えば、Ｃｈｅｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２９３：８６５～８８１（１９９９）を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる会合速度が10^{6}Ｍ$^{-1}$秒$^{-1}$を超える場合、会合速度は、流動停止を

備えた分光光度計（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）または撹拌型キュベットを伴う８０００シリーズのＳＬＭ－ＡＭＩＮＣＯ（商標）分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）などの分光計により測定される、漸増濃度の抗原の存在下における、ＰＢＳ、ｐＨ７．２中に２０ｎＭの抗抗原抗体（Ｆａｂ形態）の、２５℃における蛍光放出強度（励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、帯域通過を１６ｎｍとする）の増大または減少を測定する蛍光消光技術を用いることにより決定されうる。

【０４４４】

別の実施形態では、ＳＥＴ（ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｅｑｕｉｌｉｂｒａｔｉｏｎ　ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）アッセイを使用して、Ｋｄを測定する。このアッセイに従い、典型的には、被験抗体を、定常濃度で適用し、被験抗原の段階希釈液と共に混合する。平衡を確立するインキュベーションの後、遊離抗体の一部を、抗原コーティング表面上で捕捉し、一般に、電気化学発光（例えば、Ｈａｅｎｅｌら、Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、３３９（２００５）、１８２～１８４において記載されている）を使用して、標識／タグ付け抗種抗体により検出する。

【０４４５】

例えば、一実施形態では、３８４ウェルストレプトアビジンプレート（Ｎｕｎｃ、Ｍｉｃｒｏｃｏａｔ；型番：１１９７４９９８００１）を、ＰＢＳバッファー中に２０ｎｇ／ｍｌの濃度で、ウェル１つ当たり２５μｌの抗原－ビオチン－異性体ミックスと共に、４℃で、一晩にわたりインキュベートする。抗体試料の、遊離抗原との平衡化のために、０．０１ｎＭ～１ｎＭの抗体を、２５００ｎＭ、５００ｎＭ、または１００ｎＭの濃度で始める、１：３、１：２、または１：１．７の段階希釈において、関与性の抗原により滴定する。試料を、シーリングされたＲＥＭＰ　Ｓｔｏｒａｇｅポリプロピレン製マイクロプレート（Ｂｒｏｏｋｓ）内、４℃で、一晩にわたりインキュベートする。一晩にわたるインキュベーションの後、ストレプトアビジンプレートを、ウェル１つ当たり９０μｌずつのＰＢＳＴで、３回にわたり洗浄する。各試料１５μｌずつを、平衡化プレートから、アッセイプレートに移し、ＲＴで、１５分間にわたりインキュベートするのに続き、ＰＢＳＴバッファー９０μｌずつ３回にわたる洗浄工程にかける。２５μｌのヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体－ＰＯＤコンジュゲート（Ｊａｃｋｓｏｎ、１０９－０３６－０８８、ＯＳＥＰ中に１：４０００）を添加することにより、検出を実行するのに続き、ＰＢＳＴバッファー９０μｌずつ６回にわたる洗浄工程にかける。２５μｌのＴＭＢ基質（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＧｍｂＨ；型番：１１８３５０３３００１）を、各ウェルに添加する。測定は、Ｓａｆｉｒｅ　２リーダー（Ｔｅｃａｎ）上、３７０／４９２ｎｍで行う。

【０４４６】

別の実施形態では、ＫｉｎＥｘＡ（ｋｉｎｅｔｉｃ　ｅｘｃｌｕｓｉｏｎ）アッセイを使用して、Ｋｄを測定する。このアッセイに従い、典型的に、抗原を、一定濃度の抗体結合部位に滴定し、試料を平衡化させ、次いで、フローセルを介して、速やかに取り出し、遊離抗体結合部位を、抗原コーティングビーズ上で捕捉する一方で、抗原飽和抗体複合体を、洗い流す。次いで、ビーズ捕捉抗体を、標識抗種抗体、例えば、蛍光標識により検出する（Ｂｅｅら、ＰｌｏＳ　Ｏｎｅ、２０１２、７（４）：ｅ３６２６１）。例えば、一実施形態では、ＫｉｎＥｘＡ実験は、ＰＢＳ　ｐＨ７．４を、ランニングバッファーとして使用して、室温（ＲＴ）で実施される。試料は、１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを補充したランニングバッファー（「試料バッファー」）中で調製する。０．２５ｍｌ／分の流量を使用する。結合部位濃度を５ｐＭとする、一定量の抗体を、１００ｐＭ（濃度範囲：０．０４９ｐＭ～１００ｐＭ）で始める、２倍の段階希釈を介する抗原により滴定する。抗原を伴わない、１例の抗体試料は、１００％のシグナル（すなわち、阻害を伴わないシグナル）として用いられる。抗原－抗体複合体を、ＲＴで、少なくとも２４時間にわたりインキュベートして、平衡に達することを可能とする。次いで、ＫｉｎＥｘＡシステム内、溶液の平衡状態を撹乱せずに、非結合抗体が、ビーズにより捕捉されることを可能とする、５ｍｌの容量で、抗原カップリングビーズのカラムを介して、平衡化混合物を取り出す。捕捉された抗体は、試料バッファー中に２５０ｎｇ／ｍｌのＤｙｌｉｇｈｔ　６５０（著作権

）コンジュゲート抗ヒトＦｃ断片特異的二次抗体を使用して検出する。各試料は、全ての平衡実験について、二連で測定する。ＫＤは、「標準的解析」法を使用する、ＫｉｎＥｘＡソフトウェア（Ｖｅｒｓｉｏｎ　４．０．１１）内に含有される、１部位均一結合モデルを使用して、データの非線形回帰分析から得られる。

【０４４７】

Ｌ．治療法および治療用組成物

本明細書で記載される抗体のセットは、治療法において使用されうる。一態様では、医薬としての使用のための、本明細書で記載される抗体のセットが提供される。ある特定の態様では、処置法における使用のための抗体のセットが提供される。

【０４４８】

上記で論じられた通り、一部の態様では、本発明に従う抗体のセットは、放射性核種を、対象における標的細胞に送達することが所望される、任意の処置に適する。例えば、例えば、がん処置のためのプレターゲティング放射免疫療法における使用のための、本明細書で記載される抗体のセットが提供される。

【０４４９】

ある特定の態様では、本発明は、個体におけるプレターゲティング放射免疫療法であって、個体に有効量の抗体のセットを投与することを含むプレターゲティング放射免疫療法における使用のための抗体のセットを提供する。上記の態様のうちのいずれかに従う「個体」は、好ましくは、ヒトである。

【０４５０】

上記で言及された通り、処置は、患者の罹患細胞にターゲティングされた細胞傷害活性により処置可能な任意の状態の処置でありうる。処置は、好ましくは、腫瘍またはがんの処置である。しかし、本発明の適用可能性は、腫瘍およびがんに限定されない。例えば、処置はまた、ウイルス感染、または別の病原性生物体、例えば、原核生物の感染の処置でもありうる。任意選択で、ターゲティングはまた、Ｔ細胞駆動性自己免疫疾患またはＴ細胞性血液がんの処置のためのＴ細胞のターゲティングでもありうる。したがって、処置される状態は、ＨＩＶ、狂犬病、ＥＢＶおよびカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスなどのウイルス感染、ならびに多発性硬化症および移植片対宿主病などの自己免疫疾患を含むことができる。

【０４５１】

本明細書で使用される「がん」という用語は、下記のがんのうちのいずれかの難治性型、上記のがんのうちのいずれかの、チェックポイント阻害剤経過形、または下記のがんのうちの１つまたは複数の組合せを含む、リンパ腫、リンパ性白血病、肺がん、非小細胞肺（ＮＳＣＬ）がん、細気管支肺胞上皮細胞肺がん、骨がん、膵管腺癌（ＰＤＡＣ）を含む膵臓がん、皮膚がん、頭部がんまたは頸部がん、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、肛門領域がん、胃（ｓｔｏｍａｃｈ、ｇａｓｔｒｉｃ）がん、結腸がんおよび／または直腸がんでありうる結腸直腸がん、乳がん、子宮がん、ファローピウス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系がん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓がんまたは尿管がん、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞がん、胆管がん、中枢神経系（ＣＮＳ）新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン細胞腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、およびユーイング肉腫など、固形がんおよび血液がんの両方を含む。

【０４５２】

治療のために、放射性同位体を、細胞、組織、または臓器にターゲティングする方法は、

ｉ）対象に、本明細書で記載される、第１の抗体および第２の抗体を投与すること（いずれかの順序で、同時に、または逐次的に）であり、抗体が、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化し；第１の抗体と、第２の抗体との会合が、放射標識化合物に対する機能的結合部位を形成する、本明細書で記載される、第１の抗体および第２

の抗体を投与すること（いずれかの順序で、同時に、または逐次的に）；
ならびに
ｉｉ）続いて、放射標識化合物に対する機能的結合部位に結合する放射標識化合物を投与すること
を含むことができる。

【０４５３】

放射標識化合物は、細胞に対して細胞傷害性である、放射性同位体で標識される。適切な放射性同位体は、上記で論じられた、アルファ放射体およびベータ放射体を含む。

【０４５４】

二重特異性抗体（すなわち、本発明に従う「スプリット」抗体ではない抗体）を使用するプレターゲティング放射免疫療法では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、除去剤またはブロッキング剤を投与することが、一般的慣行である。除去剤は、抗体に結合し、それらの体内からのクリアランスの速度を増強する。除去剤は、抗イディオタイプ抗体を含む。ブロッキング剤とは、典型的に、放射標識化合物に対する抗原結合部位に結合するが、それら自体が放射標識ではない薬剤である。例えば、放射標識化合物が、ある特定の化学元素（例えば、金属）の放射性同位体をロードされたキレート剤を含む場合、ブロッキング剤は、それが、抗原結合部位により、なおも結合しうることを条件として、同じ元素（例えば、金属）の非放射性同位体をロードされた、同じキレート剤を含むことができ、非ロードキレート剤、または異なる非放射性部分（例えば、異なる元素の非放射性同位体）をロードされたキレート剤を含むことができる。一部の場合に、ブロッキング剤は、加えて、分子のサイズおよび／または流体力学半径を増大させる部分を含むことができる。これらは、分子が、循環中の抗体に結合する能力に干渉せずに、分子が、腫瘍に接近する能力を妨げる。例示的部分は、親水性ポリマーを含む。部分は、例えば、デキストラン、デキストリン、ＰＥＧ、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒアルロン酸、ヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）、またはポリ（２－エチル２－オキサゾリン）（ＰＥＯＺ）のポリマーまたはコポリマーでありうる。他の実施形態では、部分は、ＸＴＥＮポリペプチド（非構造化親水性タンパク質ポリマー）、ホモ－アミノ酸ポリマー（ＨＡＰ）、プロリン－アラニン－セリンポリマー（ＰＡＳ）、エラスチン様ペプチド（ＥＬＰ）、またはゼラチン様タンパク質（ＧＬＫ）などの非構造化ペプチドまたは非構造化タンパク質でありうる。さらなる例示的部分は、アルブミン、例えば、ウシ血清アルブミンまたはＩｇＧなどのタンパク質を含む。部分／ポリマーに適する分子量は、例えば、少なくとも５０ｋＤａ、例えば、５０ｋＤａ～２０００ｋＤａの間の範囲でありうる。例えば、分子量は、２００～８００ｋＤａ、任意選択で、３００、３５０、４００、または４５０ｋＤａを超え、任意選択で、７００、６５０、６００、または５５０ｋＤａ未満、任意選択で、約５００ｋＤａでありうる。

【０４５５】

本発明のある特定の態様に従い、除去剤またはブロッキング剤を、対象に投与する工程は存在しない。ある特定の態様では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、第１の抗体または第２の抗体に結合する、任意の薬剤を投与する工程は存在しない。ある特定の態様では、任意選択で、化学療法剤、免疫療法剤、および放射性増感剤から選択される化合物を除き、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、任意の薬剤を投与する工程は存在しない。一部の実施形態では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間で、薬剤が投与されない。一部の実施形態では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、他の任意の薬剤の、対象への注射または点滴は存在しない場合がある。

【０４５６】

一部の実施形態では、方法は、ｉ）抗体のセットを投与する工程（この場合、第１の抗体および第２の抗体は、同時に投与される場合もあり、いずれかの順序で、逐次的に投与される場合もある）と、ｉｉ）続いて、放射標識化合物を投与する工程とからなるか、またはこれらから本質的になる、２工程プレターゲティング放射免疫療法でありうる。処置は、このような治療の複数のサイクル、すなわち、これらの２つの工程の複数のサイクル

を伴いうる。例示的処置サイクルの持続期間は、抗体のセットが、サイクルの１日目に投与され、放射標識化合物が、任意選択で、サイクルの１、２、３、４、５、６、７、または８日目に、例えば、７日目に投与される、２８日間である。治療サイクルの数は、変動しうる。一実施形態では、４、５、または６つの処置サイクルが施されうる。

【０４５７】

驚くべきことに、本発明者らは、本発明に従う抗体を使用して、正常組織中の過剰な放射能の蓄積を回避しながら、治療的に有効な放射標識化合物の、腫瘍への取込みを得ることが可能であることを決定した。実際、実施例において、非標的組織中の放射能の蓄積レベルは、二重特異性抗体および除去工程を使用し、また、より簡単な手順の使用ももたらす、３工程ＰＲＩＴ法の場合よりも低いことが見出された。

【０４５８】

一部の実施形態では、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体が、標的細胞に局在化するのに適する時間を与えられたら、対象に投与されうる。例えば、一部の実施形態では、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体の直後に、対象に投与される場合もあり、第１の抗体および第２の抗体の、少なくとも４時間、８時間、１日間、または２日間後に、対象に投与される場合もある。任意選択で、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体の後、３日間、５日間、または７日間を超えずに投与されうる。１つの特定の実施形態では、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体の２～７日後に、対象に投与されうる。

【０４５９】

一部の実施形態では、本明細書で記載される抗体は、併用療法の一部として投与されうる。例えば、本明細書で記載される抗体は、１つまたは複数の化学療法剤と組み合わせて投与される場合がある：化学療法剤と、抗体とは、いずれかの順序で、同時に、または逐次的に投与されうる。加えて、または代替的に、本明細書で記載される抗体は、１つまたは複数の免疫療法剤と組み合わせて投与される場合がある：免疫療法剤と、抗体とは、いずれかの順序で、同時に、または逐次的に投与されうる。

【０４６０】

一部の実施形態では、加えて、または代替的に、本明細書で記載される抗体は、放射性増感剤と組み合わせて投与されうる。放射性増感剤と、抗体とは、いずれかの順序で、同時に、または逐次的に投与されうる。

【０４６１】

本発明の抗体（および任意のさらなる治療剤、例えば、放射標識化合物）は、非経口投与、肺内投与、および鼻腔内投与を含む、任意の適切な手段により投与される場合があり、局所処置に所望される場合、病巣内投与により投与されうる。非経口注入は、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、または皮下投与を含む。投与は、任意の適切な経路による投与、例えば、静脈内または皮下注射など、注射による投与でありうる。

【０４６２】

一部の実施形態では、上記で記載された、１つまたは複数の処置サイクルの前に、１つまたは複数の線量測定サイクルが使用されうる。線量測定サイクルは、ｉ）抗体のセットを投与する工程（この場合、第１の抗体および第２の抗体は、同時に投与される場合もあり、いずれかの順序で、逐次的に投与される場合もある）と、ｉｉ）続いて、ガンマ放射体による放射標識のイメージングに適する化合物を投与する工程（この場合、前記放射標識化合物は、放射標識化合物に対する機能的結合部位に結合する）とを含むことができる。化合物は、それが、アルファ放射体またはベータ放射体ではなく、ガンマ放射体で標識されることを除き、その後の処置サイクルで使用される化合物と同じでありうる。例えば、一実施形態では、線量測定サイクルで使用される放射標識化合物は、^{203}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭであることが可能であり、処置サイクルで使用される放射標識化合物は、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭでありうる。患者は、化合物の、腫瘍への取込みを決定し、かつ／または化合物の吸収線量を推定するように、イメージングにかけられうる。この情報は、その後の処置工程において予測される照射曝露量を推定し、処置工程で使用される放射標識化合

物の用量を、安全なレベルに補正するのに使用されうる。

【０４６３】

Ｍ．薬学的製剤

本明細書で記載される第１の抗体および第２の抗体は、単一の薬学的組成物中に製剤化される場合もあり、個別の薬学的組成物中に製剤化される場合もある。したがって、さらなる態様では、本発明は、例えば、本明細書で記載される治療法または診断法のうちのいずれかにおける使用のための、本発明の第１の抗体および第２の抗体、または本発明の第１の抗体を含む、第１の薬学的製剤と、本発明の第２の抗体を含む、第２の薬学的組成物とを含む薬学的組成物を提供する。一実施形態では、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。別の実施形態では、薬学的組成物は、例えば、下記で記載される、少なくとも１つのさらなる治療剤をさらに含む。

【０４６４】

本明細書で記載される抗体の薬学的製剤は、所望の純度を有する、このような抗体を、１つまたは複数の任意選択の、薬学的に許容される担体（「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」、１６版、Ｏｓｏｌ，Ａ．編（１９８０））と、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で混合することにより調製されうる。

【０４６５】

薬学的に許容される担体は、一般に、援用される投与量および濃度において、レシピエントに対して非毒性であり、ヒスチジン、ホスフェート、シトレート、アセテート、および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチルアルコール、もしくはベンジルアルコール；メチルパラベンもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾールなど）；低分子量（約１０残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；ならびに／またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）などの非イオン性界面活性剤を含むがこれらに限定されない。本明細書において例示的な、薬学的に許容される担体は、可溶型中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（ｓＨＡＳＥＧＰ）、例えば、ｒＨｕＰＨ２０（ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）、Ｈａｌｏｚｙｍｅ，Ｉｎｃ．）などのヒト可溶型ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ糖タンパク質などの間質内薬物分散剤をさらに含む。ｒＨｕＰＨ２０を含む、ある特定の例示的ｓＨＡＳＥＧＰおよびこれらの使用法については、米国特許公開第２００５／０２６０１８６号および同第２００６／０１０４９６８号において記載されている。一態様では、ｓＨＡＳＥＧＰとは、コンドロイチナーゼなど、１つまたは複数のさらなるグリコサミノグリカナーゼと組み合わされる。

【０４６６】

例示的な凍結乾燥抗体組成物については、米国特許第６，２６７，９５８号において記載されている。水性抗体組成物は、米国特許第６，１７１，５８６号およびＷＯ２００６／０４４９０８において記載されている水性抗体組成物を含み、後者の組成物は、ヒスチジン－アセテートバッファーを含む。

【０４６７】

本明細書における製剤はまた、処置される特定の適応に必要な、１つを超える有効成分、好ましくは、互いに有害な影響を及ぼさない、相補的活性を伴う有効成分も含有しうる。例えば、上記で論じられた、化学療法剤、免疫療法剤、および／または放射性増感剤をさらにもたらすことが所望でありうる。このような有効成分は、意図される目的に有効な

量で組み合わされて存在することが適切である。
【０４６８】
有効成分は、例えば、コアセルベーション法または界面重合により調製されたマイクロカプセル中に、例えば、それぞれ、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）中、またはマクロエマルジョン中にある、ヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセル中、またはゼラチンマイクロカプセル中およびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に封入されうる。このような技法は、「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」、１６版、Ｏｓｏｌ，Ａ．編（１９８０）において開示されている。
【０４６９】
徐放性調製物も調製されうる。徐放性調製物の適切な例は、抗体を含有する、固形疎水性ポリマーの半透性マトリックスであって、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態にあるマトリックスを含む。
【０４７０】
ｉｎ ｖｉｖｏにおける投与のために使用される製剤は、一般に、滅菌である。無菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を介する濾過により、たやすく達せられうる。
【０４７１】
Ｎ．診断および検出のための方法および組成物
本明細書で記載される抗体のセットはまた、診断法またはイメージング法、好ましくは、プレターゲティング型ラジオイムノイメージング法、またはこれを含む方法においても使用されうる。したがって、本発明は、診断法およびイメージング法を提供する。本発明は、本明細書で記載されるイメージング法における、抗体のセットの使用、および対象において、例えば、ヒトまたは動物の体内において実行される診断法における使用のための、本明細書で記載される抗体のセット（すなわち、本明細書で記載される、第１の抗体および第２の抗体）をさらに提供する。
【０４７２】
イメージング法は、体内における、標的抗原存在および／または分布のイメージングに適する。例えば、方法は、上記で論じられた疾患状態のうちのいずれかなどの疾患と関連する抗原を発現する細胞をイメージングする方法でありうる。任意選択で、方法は、腫瘍またはがんをイメージングするための方法である。方法は、がんなどの増殖性疾患または感染性疾患を有することが疑われる対象を診断するための方法でありうる。
【０４７３】
一部の実施形態では、対象は、ヒトであることが好ましい場合がある。
【０４７４】
イメージングまたは診断のために、放射性同位体を、組織または臓器にターゲティングする方法は、
ｉ）対象に、本明細書で記載される第１の抗体および第２の抗体を投与すること（いずれかの順序で、同時に、または逐次的に）であり、抗体が、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化し；第１の抗体と第２の抗体との会合が、放射標識化合物に対する機能的結合部位を形成する、本明細書で記載される第１の抗体および第２の抗体を投与すること（いずれかの順序で、同時に、または逐次的に）；
ならびに
ｉｉ）続いて、放射標識化合物に対する機能的結合部位に結合する放射標識化合物を投与すること
を含むことができる。
【０４７５】
任意選択で、方法は、
ｉｉｉ）組織または臓器をイメージングすることであって、放射標識化合物が、局在化しているか、または局在化していることが予測される、組織または臓器をイメージングす

ること
をさらに含むことができる。
【０４７６】
任意選択で、方法は、診断を形成し、診断を対象に配信し、かつ／または診断に基づき、適切な処置を決定および／もしくは投与する、１つまたは複数の工程をさらに含むことができる。
【０４７７】
別の実施形態では、本発明の方法は、既に、
ｉ）抗体が、標的抗原に結合し、標的抗原を発現する細胞の表面に局在化し；第１の抗体と、第２の抗体との会合が、放射標識化合物に対する機能的結合部位を形成する、本明細書で記載される、第１の抗体および第２の抗体（いずれかの順序で、同時に、または逐次的に）；ならびに
ｉｉ）第１の抗体と第２の抗体との会合により形成される、前記放射標識化合物に対する抗原結合部位に結合する放射標識化合物
を投与されている対象の組織または臓器をイメージングすること
を含むことができる。
【０４７８】
本明細書で記載される、イメージング法および／または診断法では、放射標識化合物は、イメージングに適する放射性同位体で標識される。適切な放射性同位体は、上記で論じられたガンマ放射体を含む。
【０４７９】
従来のプレターゲティング放射線イメージング法では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、除去剤またはブロッキング剤、例えば、上記で記載された除去剤またはブロッキング剤を投与することが、一般的慣行である。
【０４８０】
本発明のある特定の実施形態では、除去剤またはブロッキング剤を投与する工程は存在しない。ある特定の態様では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、第１の抗体または第２の抗体に結合する、任意の薬剤を投与する工程は存在しない。ある特定の態様では、任意選択で、化学療法剤、免疫療法剤、および放射性増感剤から選択される化合物を除き、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、任意の薬剤を投与する工程は存在しない。一部の実施形態では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間で、薬剤が投与されない。一部の実施形態では、抗体の投与と、放射標識化合物の投与との間に、他の任意の薬剤の、対象への注射または点滴は存在しない場合がある。
【０４８１】
一部の実施形態では、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体が、標的細胞に局在化するのに適する時間を与えられたら、対象に投与されうる。例えば、一部の実施形態では、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体の直後に、または第１の抗体および第２の抗体の、少なくとも４時間後、８時間後、１日後、もしくは２日後に、対象に投与されうる。任意選択で、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体の後、３日間、５日間、または７日間を超えずに投与されうる。１つの特定の実施形態では、放射標識化合物は、第１の抗体および第２の抗体の２～７日後に、対象に投与されうる。
【０４８２】
一部の実施形態では、イメージング法は、ｉ）抗体のセットを投与する工程（この場合、第１の抗体および第２の抗体は、同時に投与される場合もあり、いずれかの順序で、逐次的に投与される場合もある）、ｉｉ）続いて、放射標識化合物を投与する工程、およびｉｉｉ）目的の組織または臓器をイメージングする工程からなるか、またはこれらから本質的になる、プレターゲティング型放射線イメージング法でありうる。診断法は、前記工程に続く、診断を形成する工程からなるか、またはこれらから本質的になることができ、次いで、この診断は、患者に送達され、治療レジメンの選択および／または治療レジメンの投与のための基礎として使用されうる。

【０４８３】
標的抗原は、本明細書で論じられる、任意の標的抗原でありうる。一部の実施形態では、標的抗原は、上記で論じられた腫瘍特異的抗原であることが可能であり、イメージングは、１つまたは複数の腫瘍のイメージング法でありうる。個体は、腫瘍を有することが公知であるか、またはこれが疑われる個体でありうる。
【０４８４】
例えば、方法は、下記のがんのうちのいずれかの難治性型、またはこれらのがんのうちのいずれかの、チェックポイント阻害剤経過形、または下記のがんのうちの１つまたは複数の組合せを含む、肺がん、非小細胞肺（ＮＳＣＬ）がん、細気管支肺胞上皮細胞肺がん、骨がん、ＰＤＡＣを含む膵臓がん、皮膚がん、頭部がんまたは頸部がん、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がんおよび／または結腸がんでありうる結腸直腸がん、肛門領域がん、胃（ｓｔｏｍａｃｈ、ｇａｓｔｒｉｃ）がん、乳がん、子宮がん、ファローピウス管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系がん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓がんまたは尿管がん、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞がん、胆管がん、中枢神経系（ＣＮＳ）新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン細胞腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、およびユーイング肉腫を有するか、またはこれらを有することが疑われる個体における、腫瘍のイメージング法でありうる。
【０４８５】

ＩＩＩ．配列

配列番号	記載	配列
1	重鎖 CDR1、<Pb-Dotam>	gfslstysms
2	重鎖 CDR2 <Pb-Dotam>	figsrgdtyyaswakg
3	重鎖 CDR3 <Pb-Dotam>	erdpygggaypphl
4	軽鎖 CDR1、<Pb-Dotam>	qsshsvysdndla
5	軽鎖 CDR2 <Pb-Dotam>	qasklas
6	軽鎖 CDR3 <Pb-Dotam>	lggyddesdtyg
7	重鎖可変ドメイン<Pb-Dotam> PRIT-0213	vtlkesgpvl vkptetltlt ctvsgfslst ysmswirqpp gkalewlgfi gsrgdtyyas wakgrltisk dtsksqvvlt mtnmdpvdta tyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
8	軽鎖可変ドメイン<Pb-Dotam>	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq

	PRIT-0213	pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
9	重鎖可変ドメイン 〈Pb-Dotam〉 PRIT-0214	vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsrgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
10	軽鎖可変ドメイン 〈Pb-Dotam〉 PRIT-0214	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
11	重鎖 CDR1 〈CEA〉T84.66	GFNIKDTYMH
12	重鎖 CDR2 〈CEA〉T84.66	RIDPANGNSKYVPKFQG
13	重鎖 CDR3 〈CEA〉T84.66	FGYYVSDYAMAY
14	軽鎖 CDR1 〈CEA〉T84.66	RAGESVDIFGVGFLH
15	軽鎖 CDR2 〈CEA〉T84.66	RASNRAT
16	軽鎖 CDR3 〈CEA〉T84.66	QQTNEDPYT
17	重鎖可変ドメイン	qvqlvqsgaevkkpgssvkvsckasgfnikdtymhwvrqapgqglewmgridpangnskyvpkfqgrvtitadtststaymelsslrsedtavyycapfgyyvsd

	〈CEA〉 T84.66	yamaywgqgtlvtvss
18	軽鎖可変ドメイン 〈CEA〉T84.66	eivltqspatlslspgeratlscragesvdifgvgflhwyqqkpgqaprlliyrasnratgiparfsgsgsgtdftltisslepedfavyycqqtnedpytfgqgtkleik
19	重鎖 CDR1 〈CEA〉CH1A1A	GYTFTEFGMN
20	重鎖 CDR2 〈CEA〉CH1A1A	WINTKTGEATYVEEFKG
21	重鎖 CDR3 〈CEA〉CH1A1A	WDFAYYVEAMDY
22	軽鎖 CDR1 〈CEA〉CH1A1A	KASAAVGTYVA
23	軽鎖 CDR2 〈CEA〉CH1A1A	SASYRKR
24	軽鎖 CDR3 〈CEA〉CH1A1A	HQYYTYPLFT
25	重鎖可変ドメイン 〈CEA〉 CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSS
26	軽鎖可変ドメイン 〈CEA〉	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK

10

20

30

40

50

	CH1A1A	
27	リンカーおよび<DOTAM-VH>を伴わない、重鎖<CEA>P1AD874 9→リンカーおよび<DOTAM>を欠く、配列番号 32と同じプラスミド	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
28	P1AD8749 重鎖ホール<CEA>CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	リンカーおよび<DOTAM-VL>を伴わない、重鎖<CEA>P1AD859 2→リンカーおよび	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK

10

20

30

40

50

	び<DOTAM>を欠く、配列番号 33 と同じプラスミド	PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	P1AD8592 重鎖ノブ<CEA>CH1A1A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	リンカー	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
32	P1AD8749 重鎖ノブ<CEA>CH1A1A<Dotam-VH>	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**GGGGSGGGGSGGGGS** **GGGGS**VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSK SQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSS
33	P1AD8592 重鎖ホール	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF

10

20

30

40

50

	<CEA>CH1A1A Dotam-VL>	PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**GGGGSGGGGSGGGGS** **GGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK**
34	P1AD8749 および P1AD8592 軽鎖 <CEA>CH1A1A	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
35	重鎖 CDR1、<C825>	DYGVH
36	重鎖 CDR2、<C825>	VIWSGGGTAYNTALIS
37	重鎖 CDR3、<C825>	RGSYPYNYFDA
38	軽鎖 CDR1、<C825>	GSSTGAVTASNYAN
39	軽鎖 CDR2、<C825>	GHNNRPP

40	軽鎖 CDR3、 〈C825〉	ALWYSDHWV
41	重鎖可変ドメイン 〈C825〉	HVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQV FLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGQGTTVTVSS
42	軽鎖可変ドメイン、〈C825〉	QAVVIQESALTTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDHLFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTIAG TQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTKLTVL
43	重鎖 CDR1 〈CEA〉 A5B7	DYYMN
44	重鎖 CDR2 〈CEA〉A5B7	FIGNKANAYTTEYSASVKG
45	重鎖 CDR3 〈CEA〉A5B7	DRGLRFYFDY
46	軽鎖 CDR1 〈CEA〉A5B7	RASSSVTYIH
47	軽鎖 CDR2 〈CEA〉A5B7	ATSNLAS
48	軽鎖 CDR3 〈CEA〉A5B7	QHWSSKPPT
49	重鎖可変ドメイン 〈CEA〉A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSS

10

20

30

40

50

50	軽鎖可変ドメイン <CEA>A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIK
51	P1AE4956 重鎖 ホール <CEA>A5B7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
52	P1AE4956 重鎖 ノブ<CEA> A5B7 <Dotam-VH>	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP**GGGGSGGGGSGGGGSGG** **GGS**VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQ VVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSS
53	リンカーおよび DOTAM-VH>を 伴わない重鎖 <CEA>P1AE4956	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV

10

20

30

40

50

	→リンカーおよび〈DOTAM〉を欠く、配列番号 52 と同じプラスミド	LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
54	P1AE4956 軽鎖〈CEA〉A5B7 に対する	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	P1AE4957 重鎖ノブ〈CEA〉A5B7 に対する	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
56	P1AE4957 重鎖ホール〈CEA〉A5B7〈Dotam-VL〉	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP**GGGGSGGGGSGGGGSGG** **GGS**IQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK

57	リンカーおよび DOTAM-VL>を 伴わない、重鎖 〈CEA>P1AE4957 →リンカーおよび 〈DOTAM>を欠 く、配列番号 56 と同じプラスミド	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYYMNWVRQAPGKGLEWLGFIGNKANAYTTEYSASVKGRFTISRDKSK NTLYLQMNSLRAEDTATYYCTRDRGLRFYFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
58	P1AE4957 軽鎖 〈CEA〉 A5B7	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVTYIHWYQQKPGQAPRSWIYATSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQHWSSKPPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
59	重鎖 CDR1 〈CEA〉 28A9	GGTFSYYAIS
60	重鎖 CDR2 〈CEA〉 28A9	GILPAFGAANYAQKFQG
61	重鎖 CDR3 〈CEA〉 28A9	LPPLPGAGLDY
62	軽鎖 CDR1 〈CEA〉 28A9	RASQSISSWLA
63	軽鎖 CDR2 〈CEA〉 28A9	DASSLES

64	軽鎖 CDR3 〈CEA〉28A9	QQNTQYPMT
65	重鎖可変ドメイン 〈CEA〉 28A9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSS
66	軽鎖可変ドメイン 〈CEA〉 28A9	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPDDFATYYCQQNTQYPMTFGQGTKVEIK
67	重鎖 CDR1 〈GPRC5D〉	GFTFSKYAMA
68	重鎖 CDR2 〈GPRC5D〉	SISTGGVNTYYADSVKG
69	重鎖 CDR3 〈GPRC5D〉	HTGDYFDY
70	軽鎖 CDR1 〈GPRC5D〉	RASQSVSISGINLMN
71	軽鎖 CDR2 〈GPRC5D〉	HASILAS
72	軽鎖 CDR3 〈GPRC5D〉	QQTRESPLT
73	重鎖可変ドメイン	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNSKNT

	〈GPRC5D〉	LYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSS
74	軽鎖可変ドメイン 〈GPRC5D〉	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQQKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIK
75	重鎖 CDR1 〈FAP〉4B9	GFTFSSYAMS
76	重鎖 CDR2 〈FAP〉4B9	AIIGSGASTYYADSVKG
77	重鎖 CDR3 〈FAP〉4B9	GWFGGFNY
78	軽鎖 CDR1 〈FAP〉4B9	RASQSVTSSYLA
79	軽鎖 CDR2 〈FAP〉4B9	VGSRRAT
80	軽鎖 CDR3 〈FAP〉4B9	QQGIMLPPT
81	重鎖可変ドメイン 〈FAP〉4B9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
82	軽鎖可変ドメイン 〈FAP〉4B9	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
83	P1AF0709	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTS

	HC ノブ〈CEA〉 T84.66 (D1AE4688)	TAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
84	P1AF0709 HC ホール 〈CEA〉T84.66 Dotam-VL (D1AA4920)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
85	リンカーおよび DOTAM を伴わ ない、P1AF0709 HC ホール 〈CEA〉T84.66	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
86	P1AF0298 HC ホール	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP

	<CEA> T84.66 (D1AE4687)	EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
87	P1AF0298 HC ノブ<CEA> T84.66 Dotam-VH-AST (D1AE3668)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSAST
88	リンカーおよび DOTAM を伴わない、P1AF0298 HC ノブ <CEA>T84.66	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
89	P1AF0709 および P1AF0298 軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

	(D1AA4120)	
90	P1AF0710 HC ノブ <CEA>28A9 (D1AE4690)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
91	P1AF0710 HC ホール <CEA> 28A9 Dotam-VL (D1AC3172)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
92	リンカーまたは DOTAM を伴わ ない、P1AF0710 HC ホール <CEA>28A9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

93	P1AF0711 HC ホール 〈CEA〉28A9 (D1AE4689)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
94	P1AF0711 HC ノブ〈CEA〉 28A9 Dotam− VH−AST (D1AE3671)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGGG GSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQV VLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSAST
95	リンカーおよび DOTAM を伴わ ない、P1AF0711 HC ノブ 〈CEA〉28A9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWMGGILPAFGAANYAQKFQGRVTITADKSTST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLPPLPGAGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
96	P1AF0710 およ	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP

10

20

30

40

50

	び P1AF0711 軽鎖 (D1AA2299)	DDFATYYCQQNTQYPMTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
97	P1AF0712 HC ノブ〈CEA〉 CH1A1A (D1AC4023)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
98	P1AF0712 HC ホール 〈CEA〉 CH1A1A DOTA-VL (D1AE4684)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSQAVVIQESALTTPPGETVTLTCGSSTGAVTASNYANWVQEKPDHLFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKA ALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTKLTVL
99	リンカーまたは DOTA を伴わない、P1AF0712 HC ホール	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL

	〈CEA〉	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
		QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
100	P1AF0713	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS
	HC ホール	TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
	〈CEA〉CH1A1A	PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
	(D1AC4022)	CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
		TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
		QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
101	P1AF0713	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS
	HC ノブ〈CEA〉	TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
	CH1A1A DOTA-VH-AST	PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
		CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
	(D1AE3670)	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG
		QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGS
		GGGGSHVKLQESGPGLVQPSQSLSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDN
		SKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWGQGTTVTVSSAST
102	リンカーおよび	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS
	DOTA を伴わな	TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
	い、P1AF0713	PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
	HC ノブ	CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
	〈CEA〉CH1A1A	TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG

10

20

30

40

50

		QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
103	P1AF0712 および P1AF0713 軽鎖 (D1AA3384)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
104	P1AF8284 および P1AF8285 HC ノブ 〈GPRC5D〉 (D1AF6517)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYAMAWVRQAPGKGLEWVASISTGGVNTYYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCATHTGDYFDYWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	P1AF8284 HC ホール Dotam-VL (D1AG3592)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
106	P1AF8285 HC ホール Dotam-VH (D1AG3591)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGR LTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA

107	P1AF8284 およびP1AF8285 軽鎖 (D1AF6469)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSISGINLMNWYQQKPGQQPKLLIYHASILASGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQTRESPLTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
108	P1AF8286 およびP1AF8287 HC ノブ<FAP> 4B9 (D1AF6515)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	P1AF8286 HC ホール Dotam-VL (D1AG3592)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
110	P1AF8287 HC ホール Dotam-VHA (D1AG3591)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGR LTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSA
111	P1AF8286 および	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE

	び P1AF8287 軽鎖 (D1AB9974)	PEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
112	P1AF7782 および P1AF7784 HC ノブ<CEA> CH1A1A (D1AD3419)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	P1AF7782 HC ホール Dotam-VL (D1AG2237)	SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	P1AF7784 HC ホール Dotam-VH (D1AG2236)	GVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVV LTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGDKTHTCPPCPAP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	P1AF7782 および P1AF7784 軽	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG

10

20

30

40

50

	鎖 (D1AD3421)	NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
156	重鎖 CDR1 〈CEA〉 MFE23	DSYMH
157	重鎖 CDR2 〈CEA〉 MFE23	WIDPENGDTEYAPKFQG
158	重鎖 CDR2 〈CEA〉 MFE23- H26	WIDPENGGTNYAQKFQG
159	重鎖 CDR3 〈CEA〉 MFE23	GTPTGPYYFDY
160	軽鎖 CDR1 〈CEA〉 MFE23	SASSSVSYMH
161	軽鎖 CDR1 〈CEA〉 MFE23- L24、L25	RASSSVSYMH
162	軽鎖 CDR1 〈CEA〉 MFE23- L26	RASQSISSYM
163	軽鎖 CDR2	STSNLAS

	〈CEA〉MFE23	
164	軽鎖 CDR2 〈CEA〉MFE23-L26	YTSNLAS
165	軽鎖 CDR2 〈CEA〉MFE23-L29	STSSLQS
166	軽鎖 CDR3 〈CEA〉MFE23	QQRSSYPLT
167	重鎖可変ドメイン 〈CEA〉MFE23	QVKLQQSGAELVRSGTSVKLSCTASGFNIKDSYMHWLRQGPEQGLEWIGWIDPENGDTEYAPKFQGKATFTTDTSSNT AYLQLSSLTSEDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTTVTVSS
168	軽鎖可変ドメイン 〈CEA〉MFE23	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEA EDAATYYCQQRSSYPLTFGAGTKLELK
169	MFE-H24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMTTDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
170	MFE-H25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMTTDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
171	MFE-H26	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGGTNYAQKFQGRVTMTTDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
172	MFE-H27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMTTDTSIS

		TAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
173	MFE−H28	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTMTRDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
174	MFE−H29	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDSYMHWVRQAPGQGLEWMGWIDPENGDTEYAPKFQGRVTITTDESTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCNEGTPTGPYYFDYWGQGTLVTVSS
175	MFE−L24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
176	MFE−L25	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
177	MFE−L26	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
178	MFE−L27	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVPYMHWYQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
179	MFE−L28	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVPYMHWLQQKPGKAPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK
180	MFE−L29	EIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVPYMHWLQQKPGKAPKLLIYSTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQP EDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKLEIK

【実施例】

【０４８６】

ＩＶ．例

以下は、本発明の方法および組成物の例である。上記で提示された一般的な記載を踏まえ、他の多様な実施形態も実施されうることが理解される。

【０４８７】

略号の語釈

ＡＤＡ　抗薬剤抗体

ＡＳＴ　アラニン、セリン、スレオニン

ＢｓＡｂ　二重特異性抗体
ＣＡ　除去剤
ＣＥＡ　がん胎児性抗原
ＤＯＴＡＭ　１，４，７，１０－テトラキス（カルバモイルメチル）－１，４，７，１０－テトラアザシクロドデカン
ＩＤ　注入（注射）用量
ＥＬＩＳＡ　酵素免疫測定アッセイ
ＦＡＰ　線維芽細胞活性化タンパク質
ＧＰＲＣ５Ｄ　Ｇタンパク質共役受容体ファミリーＣ５群メンバーＤ
ＩＶ　静脈内
ＭＷ　分子量
ＰＢＳ　リン酸緩衝食塩水
ｐ．ｉ．　注射後
ＰＫ　薬物動態
ＰＲＩＴ　プレターゲティング放射免疫療法
ＲＩＴ　放射免疫療法
ＲＴ　室温
ＳＣ　皮下
ＳＣＩＤ　重度複合免疫不全
ＳＤ　標準偏差
ＳＯＰＦ　Ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｄ　ｏｐｐｏｒｔｕｎｉｓｔｉｃ　ｐａｔｈｏｇｅｎ－ｆｒｅｅ
ＴＡ　標的抗原
ＴＧＩ　腫瘍増殖阻害
ＴＲ　腫瘍縮小

【０４８８】

実施例１

ＤＯＴＡＭに結合するウサギ抗体の作出

実施例１Ａ

ウサギの免疫化

２つのエナンチオマーＰｂ－ＤＯＴＡＭ－アルキル－ＰＥＧ$_4$－ＫＬＨ画分（ＭＳ２－ＤＯＴＡＭ　ＫＬＨ画分１およびＭＳ２－ＤＯＴＡＭ　ＫＬＨ画分２）の１：１ミックスを、ＷＯ２０００／４６２５１、ＷＯ２００２／１２４３７、ＷＯ２００５／００７６９６、ＷＯ２００６／０４７３６７、ＵＳ２００７／００３３６６１、およびＷＯ２００８／０２７９８６において報告されている、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む、ニュージーランドホワイトウサギまたはトランスジェニックウサギの免疫化のために使用した。０日目に、皮内適用により、各ウサギを、完全フロイントアジュバントによりエマルジョン化された、５００ｕｇの免疫原ミックスにより免疫化し、７、１４、２８、５６日目に、筋肉内適用および皮下適用の交替を介する、５００ｕｇずつの同ミックスにより免疫化した。その後、ウサギに、毎月、５００ｕｇの皮下免疫化を施し、免疫化の７日後に、血清力価の決定のために、少量の血液試料を採取した。大量の血液試料（推定全血液体積の１０％）を、免疫化の３カ月目および９カ月目に（免疫化の５～７日後に）採取し、末梢血単核細胞を分離し、これを、Ｂ細胞クローニング工程における、抗原特異的Ｂ細胞の供給源として使用した。

【０４８９】

血清力価の決定（ＥＬＩＳＡ）

２つのエナンチオマーＰｂ－ＤＯＴＡＭ画分（ＰＪＲＤ０５．１３３Ｆ１またはＰＪＲＤ０５．１３３Ｆ２）の各々を、ウェル１つ当たり１００ｕｌずつのＰＢＳ中に、１ｕｇ／ｍｌで、ＮＵＮＣ　Ｍａｘｉｓｏｒｐ９６ウェルプレート上に固定化するのに続き：ウェル１つ当たり２００ｕｌずつのＰＢＳ中に２％のＣｒｏｔｅｉｎ　Ｃによるプレートの

ブロック；ウェル１つ当たり１００ｕｌずつのＰＢＳ中に０．５％のＣｒｏｔｅｉｎ　Ｃ中で、二連における、抗血清の段階希釈液の適用；ＨＲＰコンジュゲートロバ抗ウサギＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ／Ｄｉａｎｏｖａ；７１１－０３６－１５２；１／１６，０００）、およびストレプトアビジン－ＨＲＰによる検出；ウェル１つ当たり１００ｕｌのＰＢＳ中に０．５％のＣｒｏｔｅｉｎ　Ｃ中における、各々の希釈を行った。全ての工程について、プレートを、３７℃で、１時間にわたりインキュベートした。全ての工程の間で、プレートを、ＰＢＳ中に０．０５％のＴｗｅｅｎ　２０で、３回にわたり洗浄した。ウェル１つ当たり１００ｕｌの、ＢＭ　Ｂｌｕｅ　ＰＯＤ　Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　ｓｏｌｕｂｌｅ（Ｒｏｃｈｅ）の添加により、シグナルを発生させ；１Ｍ　ＨＣｌの、ウェル１つ当たり１００ｕｌの添加により、停止させた。吸光度は、参照としての６９０ｎｍに対して、４５０ｎｍで読み取った。力価は、最大半量のシグナルを結果としてもたらす抗血清の希釈率と規定した。

【０４９０】

実施例１Ｂ

ウサギからのＢ細胞クローニング

ウサギ末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）の分離

血液試料を、免疫化ウサギから採取した。ＥＤＴＡを含有する全血を、製造元の仕様に従い、ｌｙｍｐｈｏｌｙｔｅ　ｍａｍｍａｌ（Ｃｅｄａｒｌａｎｅ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｂｕｒｌｉｎｇｔｏｎ、Ｏｎｔａｒｉｏ、Ｃａｎａｄａ）を使用する、密度遠心分離の前に、１倍濃度のＰＢＳ（ＰＡＡ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）で２倍に希釈した。ＰＢＭＣを、１倍濃度のＰＢＳで、２回にわたり洗浄した。

【０４９１】

ＥＬ－４　Ｂ５培地

１０％ＦＣＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ、Ｌｏｇａｎ、ＵＴ、ＵＳＡ）、２ｍＭのグルタミン、１％ペニシリン／ストレプトマイシン溶液（ＰＡＡ、Ｐａｓｃｈｉｎｇ、Ａｕｓｔｒｉａ）、２ｍＭのピルビン酸ナトリウム、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ＰＡＮ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ａｉｄｅｎｂａｃｈ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、および０．０５ｍＭのｂ－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ、Ｐａｉｓｌｅｙ、Ｓｃｏｔｌａｎｄ）を補充したＲＰＭＩ　１６４０（Ｐａｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ａｉｄｅｎｂａｃｈ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用した。

【０４９２】

プレートのコーティング

滅菌細胞培養６ウェルプレートを、炭酸塩バッファー（０．１Ｍの重炭酸ナトリウム、３４ｍＭの炭酸水素二ナトリウム、ｐＨ９．５５）中に２μｇ／ｍｌのＫＬＨにより、４℃で、一晩にわたりコーティングした。プレートを、使用の前に、滅菌ＰＢＳ中で、３回にわたり洗浄した。滅菌ストレプトアビジンコーティング６ウェルプレート（Ｍｉｃｒｏｃｏａｔ、Ｂｅｒｎｒｉｅｄ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を、ＰＢＳ中にビオチン化ＴＣＭＣ－Ｐｂ－ｄＰＥＣ３－ビオチン異性体Ａ（１μｇ／ｍｌ）およびＢ（１μｇ／ｍｌ）の１＋１エナンチオマー混合物により、室温で、３時間にわたりコーティングした。パニング工程の前に、これらの６ウェルプレートを、滅菌ＰＢＳで、３回にわたり洗浄した。

【０４９３】

マクロファージ／単球の枯渇

非特異的接着を介して、マクロファージおよび単球を枯渇させ、ＫＬＨに結合する細胞を除去するように、ＰＢＭＣを、滅菌ＫＬＨコーティング６ウェルプレート上に播種した。各ウェルを、最大４ｍｌの培地、および免疫化ウサギに由来する6×10^{6}個のＰＢＭＣで満たし、３７℃および５％ＣＯ２で、１時間にわたり結合させた。上清中の細胞（末梢血リンパ球（ＰＢＬ））を、抗原パニング工程のために使用した。

【０４９４】

Ｐｂ含有ＴＣＭＣエナンチオマー上における、Ｂ細胞のエンリッチメント

ＴＣＭＣ－Ｐｂ－ｄＰＥＣ３－ビオチン異性体ＡおよびＢのエナンチオマー混合物でコーティングした６ウェルプレートに、培地４ｍｌ当たり、最大で、6×10^{6}個のＰＢＬ

を播種し、３７℃および５％ＣＯ２で、１時間にわたり結合させた。ウェルを、１倍濃度のＰＢＳで、１～３回にわたり、注意深く洗浄することにより、非接着細胞を除去した。残りの粘着細胞を、トリプシンにより、３７℃および５％ＣＯ２で、１０分間にわたり解離させた。ＥＬ－４　Ｂ５培地により、トリプシン化を停止させた。免疫蛍光染色まで、細胞を、氷上で保持した。

【０４９５】

免疫蛍光染色およびフローサイトメトリー

抗ＩｇＧ　ＦＩＴＣ（ＡｂＤ　Ｓｅｒｏｔｅｃ、Ｄｕｓｓｅｌｄｏｒｆ、Ｇｅｒｍａｎｙ）を、単一細胞分取のために使用した。表面染色のために、枯渇工程およびエンリッチメント工程からの細胞を、ＰＢＳ中の抗ＩｇＧ　ＦＩＴＣ抗体と共にインキュベートし、暗所内、４℃で、４５分間にわたりインキュベートした。染色の後、ＰＢＭＣを、氷冷ＰＢＳで、２回にわたり洗浄した。最後に、ＰＢＭＣを、氷冷ＰＢＳ中に再懸濁させ、速やかに、ＦＡＣＳ解析にかけた。ＦＡＣＳ解析の前に、５μｇ／ｍｌ（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ、ＵＳＡ）の濃度のヨウ化プロピジウムを添加して、死細胞と生細胞とを弁別した。

【０４９６】

コンピュータおよびＦＡＣＳＤｉｖａソフトウェア（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、ＵＳＡ）を装備した、Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　ＦＡＣＳＡｒｉａを、単一細胞分取のために使用した。

【０４９７】

Ｂ細胞の培養

ウサギＢ細胞の培養物は、Ｌｉｇｈｔｗｏｏｄら（Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈｏｄｓ、２００６、３１６：１３３～１４３）により記載されている方法により調製した。略述すると、単一分取ウサギＢ細胞を、インキュベーター内、９６ウェルプレート内、Ｐａｎｓｏｒｂｉｎ　Ｃｅｌｌ（１：１００００）（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ（Ｍｅｒｃｋ）、Ｄａｒｍｓｔａｄｔ、Ｄｅｕｔｓｃｈｌａｎｄ）、５％ウサギ胸腺細胞上清（ＭｉｃｒｏＣｏａｔ、Ｂｅｒｎｒｉｅｄ、Ｇｅｒｍａｎｙ）、およびガンマ照射マウスＥＬ－４　Ｂ５胸腺腫細胞（ウェル１つ当たりの細胞５×10^5個）を含有する、ウェル１つ当たり２００μｌのＥＬ－４　Ｂ５培地と共に、３７℃で、７日間にわたりインキュベートした。スクリーニングのために、Ｂ細胞培養物の上清を除去し、残りの細胞を、速やかに採取し、１００μｌのＲＬＴバッファー（Ｑｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ、Ｇｅｒｍａｎｙ）中、－８０℃で凍結させた。

【０４９８】

実施例１Ｃ

ウサギ抗体の発現

ＶドメインのＰＣＲ増幅

全ＲＮＡは、製造元のプロトコールに従い、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　８／９６　ＲＮＡキット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ＆Ｎａｇｅｌ；７４０７０９．４、７４０６９８）を使用して、Ｂ細胞溶解物（ＲＬＴバッファー；Ｑｉａｇｅｎ；型番：７９２１６中に再懸濁させた）から調製した。ＲＮＡは、６０μｌのＲＮａｓｅ非含有水で溶出させた。製造元の指示書に従い、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ　Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１８０８０－４００）およびオリゴｄＴプライマーを使用する、逆転写酵素反応により、ｃＤＮＡを作出するのに、６μｌのＲＮＡを使用した。全ての工程は、Ｈａｍｉｌｔｏｎ　ＭＬ　Ｓｔａｒ　Ｓｙｓｔｅｍ上で実施した。重鎖のために、プライマーであるｒｂＨＣ．ｕｐおよびｒｂＨＣ．ｄｏを使用し、軽鎖のために、プライマーであるｒｂＬＣ．ｕｐおよびｒｂＬＣ．ｄｏ（下記の表）を使用して、５０μｌの最終容量中で、ＡｃｃｕＰｒｉｍｅ　Ｓｕｐｅｒｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　１２３４４－０４０）により、免疫グロブリンの重鎖可変領域および軽鎖可変領域（ＶＨおよびＶＬ）を増幅するのに、４μｌのｃＤＮＡを使用した。全てのフォワードプライマーが、シグナルペプチド（それぞれ、ＶＨおよびＶＬの）に特異的で

あるのに対し、リバースプライマーは、定常領域（それぞれ、ＶＨおよびＶＬの）に特異的であった。ＲｂＶＨ＋ＲｂＶＬのためのＰＣＲ条件は、以下：９４℃で５分間にわたる、高温における開始；９４℃で２０秒間、７０℃で２０秒間、６８℃で４５秒間、および６８℃で７分間にわたる最終伸長の３５サイクルの通りであった。

【０４９９】

プライマー配列

rbHC.up	AAGCTTGCCACCATGGAGACTGGGCTGCGCTGGCTTC（配列番号 141）
rbHCf.do	CCATTGGTGAGGGTGCCCGAG（配列番号 142）
rbLC.up	AAGCTTGCCACCATGGACAYGAGGGCCCCCACTC（配列番号 143）
rbLC.do	CAGAGTRCTGCTGAGGTTGTAGGTAC（配列番号 144）

【０５００】

５０μｌのＰＣＲ溶液のうちの８μｌを、４８　Ｅ－Ｇｅｌ　２％（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｇ８００８－０２）上にロードした。製造元のプロトコールに従い、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ　Ｅｘｔｒａｃｔ　ＩＩキット（Ｍａｃｈｅｒｅｙ＆Ｎａｇｅｌ；７４０６０９２５０）を使用して、陽性のＰＣＲ反応物をクリーニングし、５０μｌの溶出バッファー中で溶出させた。全てのクリーニング工程は、Ｈａｍｉｌｔｏｎ　ＭＬ　ＳｔａｒｌｅｔＳｙｓｔｅｍ上で実施した。

【０５０１】

ウサギモノクローナル二価抗体の組換え発現

ウサギモノクローナル二価抗体の組換え発現のために、突出末端クローニング法（ＲＳＨａｕｎら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（１９９２）、１３、５１５～５１８；ＭＺＬｉら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｔｈｏｄｓ（２００７）、４、２５１～２５６）により、ＶＨまたはＶＬをコードするＰＣＲ産物を、ｃＤＮＡとして、発現ベクターにクローニングした。発現ベクターは、イントロンＡおよび３’ＢＧＨポリアデニル化配列を含む、５’ＣＭＶプロモーターからなる発現カセットを含有した。発現カセットに加えて、プラスミドは、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）内のプラスミド増幅のために、ｐＵＣ１８由来複製開始点と、アンピシリン耐性を付与するベータ－ラクタマーゼ遺伝子とを含有した。基本プラスミドの３つの変化形：１つのプラスミドが、ＶＨ領域を受容するようにデザインされたウサギＩｇＧ定常領域を含有するのに対し、２つのさらなるプラスミドは、ＶＬ領域を受容するように、ウサギまたはヒトのカッパＬＣ定常領域を含有する変化形を使用した。重複プライマーを使用するＰＣＲにより、カッパ定常領域またはガンマ定常領域およびＶＬ／ＶＨインサートをコードする直鎖化発現プラスミドを増幅した。精製ＰＣＲ産物を、Ｔ４ＤＮＡ－ポリメラーゼと共にインキュベートし、これにより、一本鎖突出末端を作出した。ｄＣＴＰの添加により、反応を停止させた。次の工程では、プラスミドとインサートとを組み合わせ、ｒｅｃＡと共にインキュベートし、これにより、部位特異的組換えを誘導し

た。組換えプラスミドを、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）に形質転換した。翌日、増殖したコロニーを採取し、プラスミドの調製、制限解析、およびＤＮＡシーケンシングにより、適正な組換えプラスミドについて調べた。抗体発現のために、試薬供給元により示唆される手順に従い、２３９－Ｆｒｅｅトランスフェクション試薬（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用することにより、単離ＨＣプラスミドおよび単離ＬＣプラスミドを、２ｍｌ（９６ウェルプレート）のＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　ＨＥＫ２９３－Ｆ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｒ７９０－０７）に、一過性にコトランスフェクトした。１週間後に、上清を採取し、精製に引き渡した。

【０５０２】

実施例１Ｄ

ウサギモノクローナル抗体の選択

ＳＥＴ（ｓｏｌｕｔｉｏｎ　ｅｑｕｉｌｉｂｒａｔｉｏｎ　ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）アッセイは、下記で記載される通りに実行した。

【０５０３】

ＳＥＴアッセイ

材料：

１．ＤＯＴＡＭ－ビオチン異性体ミックス：

濃度＝２０ｎｇ／ｍｌをとする、以下の成分の混合物：

・Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ－Ｂｎ－ビオチン／ＴＣＭＣ－Ｐｂ－ｄＰＥＧ３－ビオチン、異性体Ａ

・Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ－Ｂｎ－ビオチン／ＴＣＭＣ－Ｐｂ－ｄＰＥＧ３－ビオチン、異性体Ｂ

・Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ－アルキル－ビオチン異性体Ａ

・Ｐｂ－Ｄｏｔａｍ－アルキル－ビオチン異性体Ｂ

２．ＰＢＳ：ＤＰＢＳ；ＰＡＮ；Ｐ０４－３６５００

３．ＢＳＡ：Ｒｏｃｈｅ；１０７３５０８６００１

４．Ｔｗｅｅｎ　２０：Ｐｏｌｙｓｏｒｂａｔ　２０（ｕｓｂ；型番：２０６０５、５００ｍｌ）

５．ＰＢＳＴ：１０倍濃度；Ｒｏｃｈｅ；型番：１１６６６７８９００１／０．１％のＴｗｅｅｎ　２０

６．ＯＳＥＰ：ＰＢＳ（１０倍濃度；Ｒｏｃｈｅ；型番：１１６６６７８９００１）／０．５％ＢＳＡ（脂肪酸非含有ウシ血清アルブミン画分Ｖ；Ｒｏｃｈｅ；型番：１０７３５０８６００１）／０．０５％Ｔｗｅｅｎ　２０

【０５０４】

アッセイプレートの調製：３８４ウェルストレプトアビジンプレート（Ｎｕｎｃ、Ｍｉｃｒｏｃｏａｔ；型番：１１９７４９９８００１）を、ＰＢＳバッファー中に２０ｎｇ／ｍｌの濃度の、ＤＯＴＡＭ－ビオチン－異性体ミックス、ウェル１つ当たり２５μｌと共に、４℃で、一晩にわたりインキュベートした。

【０５０５】

抗ＤＯＴＡＭ抗体試料の、遊離ＤＯＴＡＭ－金属キレート（Ｐｂ、Ｂｉ、Ｃａ、Ｃｕ、Ｚｎ、Ｍｇ、Ｆｅ）との平衡化：０．０１ｎＭ～１ｎＭの抗体を、２５００ｎＭ、５００ｎＭ、または１００ｎＭのＤＯＴＡＭ－金属キレートの濃度で始める、１：３、１：２、または１：１．７の段階希釈において、関与性のＤＯＴＡＭ－金属キレートにより滴定した。試料を、シーリングされたＲＥＭＰ　Ｓｔｏｒａｇｅポリプロピレン製マイクロプレート（Ｂｒｏｏｋｓ）内、４℃で、一晩にわたりインキュベートした。

【０５０６】

一晩にわたるインキュベーションの後、ストレプトアビジンプレートを、ウェル１つ当たり９０μｌずつのＰＢＳＴで、３回にわたり洗浄した。各試料１５μｌずつを、平衡化プレートから、アッセイプレートに移し、ＲＴで、１５分間にわたりインキュベートするのに続き、ＰＢＳＴバッファー９０μｌずつ３回にわたる洗浄工程にかけた。２５μｌの

ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体－ＰＯＤコンジュゲート（Ｊａｃｋｓｏｎ、１０９－０３６－０８８、ＯＳＥＰ中に１：４０００）を添加することにより、検出を実行するのに続き、ＰＢＳＴバッファー９０μｌずつ６回にわたる洗浄工程にかけた。２５μｌのＴＭＢ基質（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　ＧｍｂＨ；型番：１１８３５０３３００１）を、各ウェルに添加した。測定は、Ｓａｆｉｒｅ　２リーダー（Ｔｅｃａｎ）上、３７０／４９２ｎｍで行った。

【０５０７】

下記の表は、このアッセイを使用して決定される、多様な二価モノクローナルウサギ抗体の特性を示す。キレート化ＰｂおよびキレートＢｉへの同等の結合、他のキレート化金属への結合の低減、ならびに高親和性（＜１００ｐＭ）を有するので、ＰＲＩＴ－０１２８を、主要候補物質として選択した。

二価モノクローナルウサギ抗体の、キレート化金属への結合

名称	種	KD [SET による滴定]			
		Pb	Bi	Ca	Zn
PRIT-0135	WTRa	0.000	0.000	0.001	0.285
PRIT-0129	WTRa	0.001	0.024	0.013	9.251
PRIT-0128	WTRa	0.002	0.003	0.003	8.152
PRIT-0132	WTRa	0.002	0.046	0.002	0.217
PRIT-0134	WTRa	0.002	0.059	0.003	0.443
PRIT-0136	WTRa	0.004	0.029	0.014	131.926
PRIT-0127	WTRa	0.014	0.092	0.015	222.339
PRIT-0107	TgRa	1.1	51.0	48.0	>1000

WTRa:野生型ウサギ;TgRa:トランスジェニックウサギ

【０５０８】

実施例２

ヒト化

ヒト化

次に、主要候補物質である、ＰＲＩＴ－０１２８を、ヒト化にかけた。

【０５０９】

ＤＯＴＡＭ結合剤であるＰＲＩＴ－０１２８のヒト化時に適する、ヒトアクセプターフレームワークを同定するために、２つの方法の組合せを使用した。一方では、親抗体に対して、高度の配列相同性を伴うアクセプターフレームワークを探索し、その後、ＣＤＲ領域を、このアクセプターフレームワークにグラフティングすることによる、古典的手法を取った。同定されたフレームワークの、親抗体に対する、各アミノ酸の差違を、結合剤の構造的完全性に対する影響について判定し、適切な場合は、いつでも、親配列に対する復帰突然変異を導入した。

【０５１０】

他方では、社内で開発されたコンピュータツールを使用して、ヒト化型のＶＨドメインおよびＶＬドメインの、互いに対する配向性を予測した（ＷＯ２０１６／０６２７３４を参照されたい）。これを、全ての可能なヒト生殖系列の組合せにおける、ＣＤＲの仮想上のグラフトについて実行した。結果を、親結合剤のＶＨ－ＶＬドメインの配向性と比較し

て、形状が出発抗体に近接するフレームワークの組合せを選択した。

【０５１１】

各場合に、親抗体の、以下のＣＤＲ領域（カバットに従う番号付け）：

ＶＨ＿ＣＤＲ１：３１～３５
ＶＨ＿ＣＤＲ２：５０～６５
ＶＨ＿ＣＤＲ３：９５～１０２
ＶＬ＿ＣＤＲ１：２４～３４
ＶＬ＿ＣＤＲ２：５０～５６
ＶＬ＿ＣＤＲ３：８９～９７

を、アクセプターフレームワークにグラフトした。

【０５１２】

Ｄｏｔａｍ結合剤のＶＨドメインのＮ末端に融合させた、重鎖のうちの一方のＣ末端と、ＤＯＴＡＭ結合剤のＶＬドメインのＮ末端に融合させた、他方の重鎖のＣ末端とを伴い、ＣＥＡに対する２つの結合部位と、ＤＯＴＡＭに対する１つ機能的結合部位とを伴う、二重特異性抗体を形成する、ＣＥＡに対する完全長抗体を含むフォーマットで、ヒト化変異体を作製した。したがって、ＤＯＴＡＭ結合剤を、ＶＨ／ＶＬ　Ｆｖ融合体として、腫瘍をターゲティングするＩｇＧのＦｃのＣ末端（それぞれ、ＣＨ１およびＣｋを伴わない）に融合させた。この二重特異性フォーマットにおける、親ＤＯＴＡＭ結合剤であるＰＲＩＴ－０１２８に由来する分子を、ＰＲＩＴ－０１５６と呼ぶ。

【０５１３】

ＶＨ／ＶＬの予測およびフレームワークの安定性の増大の点における適性のために、ハーセプチンフレームワークも組み入れた。全てのＶＨのヒト化変異体のために、ヒトＪエレメントであるｈＪＨ２を使用した。全てのＶＫのヒト化変異体のために、ヒトＪエレメントであるｈＪＫ４を使用した。

【０５１４】

ＨＣ４とは、１つの復帰突然変異である、カバットＡ４９Ｇを伴う、ＰＲＩＴ－１２８の、ヒト生殖系列であるＩＧＨＶ３－３０－０２へのグラフティングである。

【０５１５】

可変重鎖であるＨＣ５を得るために、元のウサギＮ末端を反映するように、復帰突然変異としてのＡ４９Ｇ、および第１のアミノ酸の欠失を伴うＣＤＲを、ヒト生殖系列ｈＶＨ＿２＿２６にグラフトした。

【０５１６】

ハーセプチンＶ領域（ヒト生殖系列であるｈＶＨ３＿６６に由来する）にグラフトされる、変異体ＨＣ７は、アクセプターフレームワーク内の少数の修飾：Ｎ末端におけるＥの欠失、Ａ４９Ｇ、Ａ７１Ｒ、およびＳ９３Ａにより特徴づけられる。

【０５１７】

ＨＣ１０のために、ＰＲＩＴ－１２８のＣＤＲを、ヒト生殖系列であるＩＧＨＶ４＿３４＿０１にグラフトした。

【０５１８】

ここで、Ｑ２で始まる元のウサギ抗体を反映するように、Ｎ末端を修飾し、Ｖ２で始まるようにした。加えて、Ｇ２９ＦおよびＦ３１Ｌのほか、フレームワーク３内のＶ７１ＲおよびＦ７８Ｖを、カバット用語法に従う復帰突然変異と考えた。

【０５１９】

軽鎖ＬＣ１のために、復帰突然変異を伴わないＣＤＲを、ヒト生殖系列である、ＩＧＫＶ１＿３９＿０１にグラフトした。Ａ２で始まる元のウサギＡｂを反映するように、始点を、Ｉ２として選び出した。

【０５２０】

軽鎖変異体であるＬＣ３は、ヒト生殖系列ｈＶＫ１＿５へのＣＤＲのグラフティングにより得た。Ｄ１を欠失させ、Ｉ２Ａ復帰突然変異を、新たなＮ末端と考えた。さらなる復帰突然変異として、Ｋ４２ＱおよびＡ４３Ｐを考慮に入れた。

【０５２１】
ヒト化マトリックスの全ての可能な組合せを作製したが、ＶＨ／ＶＬの予測、および所与の組合せの配列の危険性などの検討に基づき、規定された組合せの選択を選び出した。
【０５２２】
候補物質の選択
ヒト化の目標は、ＤＯＴＡＭに対する親和性の点で、１０倍を超える喪失を示さないヒト化結合剤を得ることであった。これは、ＤＯＴＡＭに対する親和性が、同等であるか、なおまたは良好である、いくつか結合剤により達成した。
【０５２３】
上記で言及された通り、ＰＲＩＴ－０１５６とは、ウサギＤＯＴＡＭ結合剤である、ＰＲＩＴ－０１２８を、ＣＥＡ結合剤である、ＣＨ１Ａ１Ａと組み合わせて含む２：１抗体である。ＰＲＩＴ－０１７８～ＰＲＩＴ－０２０４は、同じＣＥＡ結合剤を伴う、同じフォーマットのヒト化変異体である。ＰＲＩＴ－０２０５～ＰＲＩＴ－０２２１は、ＤＯＴＡＭ結合部分では、ＰＲＩＴ－０１７８～ＰＲＩＴ－０２０４のヒト化変異体に対応するが、ＣＥＡ結合剤を、Ｔ８４．６６に変化させている。
【０５２４】
溶液平衡ベースのｋｄの決定
大量のヒト化候補物質を、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対するそれらの親和性についてスクリーニングするために、ＳＥＴ（ｓｏｌｕｔｉｏｎ ｅｑｕｉｌｉｂｒａｔｉｏｎ ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）を使用した。下記の表は、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに対して選択された、ヒト化ＤＯＴＡＭ結合剤についての、ＳＥＴベースの親和性決定について詳述する。この表における全ての抗体は、ＣＥＡへの二価結合、およびＰｂ－Ｄｏｔａｍへの一価の結合を含む、二重特異性抗体（２：１フォーマット）である。

分子名	ヒト化 HC/LC の組合せ	Pb-DOTAM についての SET(pM)
PRIT-0187-0002	HC10 LC1	0.03
PRIT-0193-0002	HC5 LC3	0.36
PRIT-0195-0004	HC10 LC3	0.40
PRIT-0156-0004	親分子	0.43
PRIT-0182-0002	HC8 LC7	5.54
PRIT-0189-0002	HC7 LC2	5.81
PRIT-0185-0002	HC 2 LC1	5.87
PRIT-0192-0002	HC2 LC3	8.04
PRIT-0183-0004	HC2 LC2	8.11
PRIT-0197-0002	HC7 LC1	8.69
PRIT-0198-0002	HC7 LC3	9.09
PRIT-0182-0004	HC8 LC7	17.14
PRIT-0183-0002	HC2 LC2	22.45
PRIT-0180-0004	HC9 LC6	26.10
PRIT-0190-0002	HC9 LC2	33.83
PRIT-0194-0002	HC8 LC3	34.63
PRIT-0199-0002	HC9 LC1	43.91
PRIT-0180-0002	HC9 LC6	47.70
PRIT-0188-0002	HC4 LC2	54.34
PRIT-0178-0004	HC1 LC6	60.06
PRIT-0179-0004	HC4 LC6	64.92
PRIT-0181-0002	HC4 LC7	65.11
PRIT-0179-0002	HC4 LC6	65.81
PRIT-0178-0002	HC1 LC6	66.68
PRIT-0187-0004	HC10 LC1	78.09
PRIT-0184-0002	HC1 LC1	80.56
PRIT-0200-0002	HC9 LC3	83.24
PRIT-0191-0002	HC1 LC3	111.10

【０５２５】

Ｋｉｎｅｘａベースのｋｄの決定

親和性決定についての、より詳細な解析および直交法のために、Ｋｉｎｅｘａを使用した。

【０５２６】

測定器および材料

オートサンプラーを伴う、Ｓａｐｉｄｙｎｅ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（Ｂｏｉｓｅ、ＩＤ）製のＫｉｎＥｘＡ　３２００測定器を使用した。ポリメチルメタクリレート（ＰＭＭＡ）ビーズは、Ｓａｐｉｄｙｎｅから購入したが、ＰＢＳ（リン酸緩衝生理食塩水）、

ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン画分Ｖ）、および抗ＤＯＴＡＭ抗体は、社内（Ｒｏｃｈｅ）で調製した。Ｄｙｌｉｇｈｔ６５０（登録商標）コンジュゲート親和性精製ヤギ抗ヒトＩｇＧ－Ｆｃ断片交差吸着抗体は、Ｂｅｔｈｙｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙ、ＴＸ）から購入した。ビオチン化Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ抗原（Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－アルキル－ビオチン異性体ＡおよびＢ、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－Ｂｎ－ビオチン／ＴＣＭＣ－Ｐｂ－ｄＰＥＧ３－ビオチン、異性体ＡおよびＢ）、および非ビオチン化Ｐｂ－ＤＯＴＡＭは、ＡＲＥＶＡ　Ｍｅｄ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）から得た。

【０５２７】

抗原コーティングビーズの調製

「ＫｉｎＥｘＡ　Ｈａｎｄｂｏｏｋ　ｐｒｏｔｏｃｏｌ　ｆｏｒ　ｂｉｏｔｉｎｙｌａｔｅｄ　ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ」（Ｓａｐｉｄｙｎｅ）に従い、ＰＭＭＡビーズをコーティングした。略述すると、第１に、吸着コーティングのためのビーズバイアル（２００ｍｇ）１本当たり、１ｍｌのＰＢＳ（ｐＨ７．４）中に、１０μｇのビオチン－ＢＳＡ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を添加した。室温で、２時間にわたり回転させた後で、上清を除去し、ビーズを、１ｍｌのＰＢＳで、５回にわたり洗浄した。第２に、１０ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを含有するＰＢＳ中に１００μｇのＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎビオチン結合タンパク質（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）１ｍｌを、ビーズに添加し、室温で、さらに２時間にわたりインキュベートして、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎを、ビーズにカップリングさせ、その後におけるビオチン化タンパク質の結合のための、さらなるビオチン結合部位をもたらした。次いで、ＮｅｕｔｒＡｖｉｄｉｎコーティングビーズを、１ｍｌのＰＢＳで、５回にわたりすすいだ。最後に、ビーズを、ＰＢＳ中に２００ｎｇ／ｍｌのビオチン化Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－異性体ミックス（各異性体について５０ｎｇずつ）でコーティングし、室温で、さらに２時間にわたりインキュベートした。次いで、ビーズを、３０ｍｌのＰＢＳ中に再懸濁させ、速やかに使用した。

【０５２８】

ＫｉｎＥｘＡ平衡アッセイ

全てのＫｉｎＥｘＡ実験は、ＰＢＳ　ｐＨ７．４を、ランニングバッファーとして使用して、室温（ＲＴ）で実施した。試料は、１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡを補充したランニングバッファー（「試料バッファー」）中で調製した。０．２５ｍｌ／分の流量を使用した。結合部位濃度を５ｐＭとする、一定量の抗ＤＯＴＡＭ抗体を、１００ｐＭ（濃度範囲：０．０４９ｐＭ～１００ｐＭ）で始める、２倍の段階希釈を介するＰｂ－ＤＯＴＡＭ抗原により滴定した。抗原を伴わない、１例の抗体試料は、１００％のシグナル（すなわち、阻害を伴わないシグナル）として用いられた。抗原－抗体複合体を、ＲＴで、少なくとも２４時間にわたりインキュベートして、平衡に達することを可能とした。次いで、ＫｉｎＥｘＡシステム内、溶液の平衡状態を撹乱せずに、非結合抗体が、ビーズにより捕捉されることを可能とする、５ｍｌの容量で、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭカップリングビーズのカラムを介して、平衡化混合物を取り出した。捕捉された抗体は、試料バッファー中に２５０ｎｇ／ｍｌのＤｙｌｉｇｈｔ　６５０（著作権）コンジュゲート抗ヒトＦｃ断片特異的二次抗体を使用して検出した。各試料は、全ての平衡実験について、二連で測定した。

【０５２９】

ＫＤは、「標準的解析」法を使用する、ＫｉｎＥｘＡソフトウェア（Ｖｅｒｓｉｏｎ　４．０．１１）内に含有される、１部位均一結合モデルを使用して、データの非線形回帰分析から得られた。ソフトウェアは、ＫＤを計算し、データ点を、理論によるＫＤ曲線に当てはめることにより、９５％信頼区間を決定する。９５％信頼区間（ＳａｐｉｄｙｎｅＴｅｃｈＮｏｔｅ　ＴＮ２０７Ｒ０）は、低値ＫＤおよび高値ＫＤとして与えられる。

【０５３０】

ヒト化ＰＲＩＴ分子についての熱安定性の測定

方法およびデータ解析

最終的なフォーマット（２０ｍＭのヒスチジン、１４０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ６．０）におけるヒト化ＰＲＩＴ分子の異なる変異体を、同じバッファー中で、１ｍｇ／ｍｌに希

釈した。各試料３０μｌずつを、３８４ウェルプレートフィルターデバイスに移した（参照としての抗ＨＥＲ３抗体と共に）。１，０００ｇで、１分間にわたる遠心分離の後、ウェルを、１０μｌのパラフィン油で覆った。プレートを、再度遠心分離し（１，０００ｇで、１分間にわたる）、ＤＬＳプレートリーダー（Ｄｙｎａ　Ｐｒｏ　ＰｌａｔｅＲｅａｄｅｒ－ＩＩ、Ｗｙａｔｔ）に移した。２５℃で始め、温度を、０．０５℃／分の速度で、７９．９℃に上昇させた。散乱光は、Ｄｙｎａｍｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｖ７．０）を使用して記録した。

【０５３１】

データを、Ｅｘｃｅｌ（Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ）に変換し、試料および温度によりソートし、ソフトウェアのアドインを使用して、溶融曲線を作成した。ベースラインからの明らかな逸脱が生じる温度を、「凝集の開始」温度と規定し、溶融曲線の屈折点を、「溶融温度」と規定した。

【０５３２】

結果

試料	凝集の開始(℃単位)	溶融温度(℃単位)
Her 3	63 ±1	67.5 ±1
PRIT-0156 (ウサギ DOTAM 結合剤を伴う親分子)	45 ±1	51 ±1
PRIT 205	51 ±1	51.5 ±1
PRIT 206	51 ±1	58.1 ±1
PRIT 207	49 ±1	58.1 ±1
PRIT 208	54 ±1	57.7 ±1
PRIT 209	54 ±1	57.7 ±1
PRIT-0213	54 ±1	57.7 ±1

【０５３３】

候補物質の特性

下記の表は、多様なＰＲＩＴ分子の識別についてまとめ、それらの特性を比較する。好ましい化合物は、ＰＲＩＴ－０２１３およびＰＲＩＴ－０２１４であった。

候補物質の概要

抗体	CEA 結合剤	Dotam 結合剤	フォーマット
PRIT 0218	なし	野生型	ウサギ抗体
PRIT0156	CH1A1A	PRIT-0218	抗体と、dotam 結合剤である PRIT 0128 とを 2:1 とする
PRIT 0186	CH1A1A	HC5/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット
PRIT-0213	T84.86	HC5/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット
PRIT-0214	T84.86	HC10/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット
PRIT-0206	T84.86	HC5/LC3 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット
PRIT-0216	T84.86	HC5/LC3 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット
PRIT-0217	T84.86	HC5/LC3 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット
PRIT-0208	T84.86	HC7/LC1 (ヒト化 PRIT-0218)	2:1 フォーマット

特性の比較

	CEA BiCEAnder	DOTAM 結合剤	SET PbDOTAM [pM]	Kinexa PbDOTAM [pM]	収量 [mg/l]	T Agg 266nm	ヒト性		生体内分布
PRIT-0156	CH1A1A	野生型ウサギ	0.01	0.25	25	45	---	---	合格
PRIT-0186	CH1A1A	HC5 / LC1	0.4	0.92	38	50	HC 58%	LC 57%	合格
PRIT-0213	T84.66	HC5/LC1	0.4	0.84	4.0	54	HC 58%	LC 57%	合格
PRIT-0187	CH1A1A	HC10/ LC1	0.03	0.99	17.8	57	HC 40%	LC 57%	合格
PRIT-0214	T84.66	HC10/LC1	0.03	0.84	6.0	55	HC 40%	LC 57%	合格
PRIT-0206	T84.66	HC5/LC3	0.36	1.0	1.32	50	HC 58%	LC 55%	合格
PRIT-0216	T84.66	HC5/LC3	---	51	7.0	50	HC 58%	LC 55%	合格
PRIT-0217	T84.66	HC5/LC3	---	3	10.0	54	HC 58%	LC 55%	合格
PRIT-0208	T84.66	HC7/LC1	8.7	8.3	7.6	59	HC 51%	LC 57%	合格

【０５３４】

ＰＲＩＴ－０２１３について、Ｋｉｎｅｘａにより決定される親和性値についてのさらにデータを、下記に提示する（ＰＲＩＴ－０２１３は、別のＣＥＡ結合性ＶＨ／ＶＬを除き、ＰＲＩＴ－０１８６と同じ分子である）。

ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂの、金属－ＤＯＴＡＭキレートに対する親和性

抗原	KD [pM]	95% CI[pM]
Pb-DOTAM	0.84	0.44-1.4
Ca-DOTAM	0.95	0.43-1.7
Bi-DOTAM	5.7	4.6-6.2
Cu-DOTAM	122000	60000 - 206000

【０５３５】
さらなる値を下記に示す：

名称	抗原	KD [pM]	95%信頼区間[pM]
PRIT-0213	Ca-DOTAM	0.95	0.43 - 1.7*
PRIT-0214	Ca-DOTAM	0.52	0.34 - 0.74
PRIT-0213	Bi-DOTAM	5.7	4.6 - 6.2*
PRIT-0214	Bi-DOTAM	6.0	5.5 - 6.4
PRIT-0213	Cu-DOTAM	122000	60000 - 206000*°
PRIT-0214	CU-DOTAM	38000	19000 - 63000*°

*信頼区間の広がりは、測定が不正確な K_D を指し示す
° nM(親和性)についての最適化が不完全なアッセイ

【０５３６】
配列
本実施例のための配列を下記に提示する。ＰＲＩＴ－０２１３およびＰＲＩＴ－０２１４は、いずれも、下記の配列番号１１６～１２１のＣＤＲを含む、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ結合部位を有する。ＰＲＩＴ－０２１３のＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合部位の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の配列を、配列番号１２２～１２３に示し、ＰＲＩＴ－０２１４のＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合部位の重鎖可変領域および軽鎖可変領域の配列を、配列番号１２４～１２５に示す。
【０５３７】
ＰＲＩＴ－０２１４は、
ｉ）配列番号１２６のアミノ酸配列を有する、第１の重鎖；
ｉｉ）配列番号１２７のアミノ酸配列を有する、第２の重鎖；および
ｉｉｉ）配列番号１２８のアミノ酸配列を有する、２つの抗体軽鎖
から構成される。
【０５３８】
ＰＲＩＴ－０２１３は、
ｉ）配列番号１２９のアミノ酸配列を有する、第１の重鎖；
ｉｉ）配列番号１３０のアミノ酸配列を有する、第２の重鎖；および
ｉｉｉ）配列番号１２８のアミノ酸配列を有する、２つの抗体軽鎖
から構成される。

配列番号	記載	配列
116	重鎖 CDR1 <Pb-Dotam> PRIT-0213	gfslstysms
117	重鎖 CDR2 <Pb-Dotam> PRIT-0213	figsrgdtyyaswakg
118	重鎖 CDR3 <Pb-Dotam> PRIT-0213	erdpygggaypphl
119	軽鎖 CDR1 <Pb-Dotam> PRIT-0213	qsshsvysdndla
120	軽鎖 CDR2 <Pb-Dotam> PRIT-0213	qasklas
121	軽鎖 CDR3 <Pb-Dotam> PRIT-0213	lggyddesdtyg
122	重鎖可変ドメイン 1<Pb-Dotam> PRIT-0213	vtlkesgpvl vkptetltlt ctvsgfslst ysmswirqpp gkalewlgfi gsrgdtyyas wakgrltisk dtsksqvvlt mtnmdpvdta tyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
123	軽鎖可変ドメイン<Pb-Dotam> PRIT-0213	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
124	重鎖可変ドメイン<Pb-Dotam> PRIT-0214	vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsrgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
125	軽鎖可変ドメイン<Pb-Dotam> PRIT-0214	iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
126	重鎖 1、二重特異性、三価<CEA/Pb-Dotam> PRIT-0214 VH_84.66	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg

配列番号	記載	配列
		101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvytlppcrd eltknqvslw clvkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 ggggsggggs ggggsggggs vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst 501 ysmswirqpp gkglewigfi gsrgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk 551 lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
127	重鎖 2、二重特異性、三価<CEA/Pb-Dotam> PRIT-0214 VL_84.66	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn

配列番号	記載	配列
		aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvctlppsrd eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 ggggsggggs ggggsggggs iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
128	軽鎖 CEA> 84.66	1 eivltqspat lslspgerat lscragesvd ifgvgflhwy qqkpgqaprl 51 liyrasnrat giparfsgsg sgtdftltis slepedfavy ycqqtnedpy 101 tfgqgtklei krtvaapsvf ifppsdeqlk sgtasvvcll nnfypreakv 151 qwkvdnalqs gnsqesvteq dskdstysls stltlskady ekhkvyacev 201 thqglsspvt ksfnrgec
129	重鎖 1、二重特異性、三価<CEA/Pb-Dotam>PRIT-0213 VH_84.66→ノブ	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag

配列番号	記載	配列
		gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvytlppcrd eltknqvslw clvkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl yskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 ggggsggggs ggggsggggs vtlkesgpvl vkptetltlt ctvsgfslst 501 ysmswirqpp gkalewlgfi gsrgdtyyas wakgrltisk dtsksqvvlt 551 mtnmdpvdta tyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
130	重鎖 2、二重特異性、三価<CEA/Pb-Dotam>PRIT-0213 VL_84.66→ホール	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvctlppsrd eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp

配列番号	記載	配列
		401 vldsdgsffl vskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 ggggsggggs ggggsggggs iqmtqspssl sasvgdrvti tcqsshsvys 501 dndlawyqqk pgkapklliy qasklasgvp srfsgsgsgt dftltisslq 551 pedfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
131	重鎖 1、二重特異性<CEA/Pb-Dotam>Rabbit Dotam_84.66	1 qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr 51 idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg 101 yyvsdyamay wgqgtlvtvs sastkgpsvf plapssksts ggtaalgclv 151 kdyfpepvtv swnsgaltsg vhtfpavlqs sglyslssvv tvpssslgtq 201 tyicnvnhkp sntkvdkkve pkscdkthtc ppcpapeaag gpsvflfppk 251 pkdtlmisrt pevtcvvvdv shedpevkfn wyvdgvevhn aktkpreeqy 301 nstyrvvsvl tvlhqdwlng keykckvsnk algapiekti skakgqprep 351 qvctlppsrd eltknqvsls cavkgfypsd iavewesngq pennykttpp 401 vldsdgsffl vskltvdksr wqqgnvfscs vmhealhnhy tqkslslspg 451 ggggsggggs ggggsggggs avltqtpspv spavggtvti scqsshsvys 501 dndlawyqqk lgqppklliy qasklasgvs srfsgsgsgt qftltisgvq 551 sddaatyycl ggyddesdty gfgggtevvv k

配列番号	記載	配列
132	HC5	VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQ PPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKS QVVLTMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLW GRGTLVTVSS
133	LC1	SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAW YQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK
134	LC3	aqmtqspstl sasvgdrvti tcqsshsvys dndlawyqqk pgqppklliy qasklasgvp srfsgsgsgt eftltisslq pddfatyycl ggyddesdty gfgggtkvei k
135	HC7	vqlvesgggl vqpggslrls caasgfslst ysmswvrqap gkglewvgfi gsrgdtyyas wakgrftisr dtskntaylq mnslraedta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
136	HC10	vqlqqwgagl lkpsetlslt cavygfslst ysmswirqpp gkglewigfi gsrgdtyyas wakgrvtisr dtsknqvslk lssvtaadta vyycarerdp ygggaypphl wgrgtlvtvs s
137	T84.66 VH 1	qvqlvqsgae vkkpgssvkv sckasgfnik dtymhwvrqa pgqglewmgr idpangnsky vpkfqgrvti tadtststay melsslrsed tavyycapfg yyvsdyamay wgqgtlvtvs s
138	T84.66 VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLH WYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIK
139	CH1A1A VH	qvqlvqsgae vkkpgasvkv sckasgytft efgmnwvrqa pgqglewmgw intktgeaty veefkgrvtf ttdtststay melrslrsdd

配列番号	記載	配列
		tavyycarwd fayyveamdy wgqgttvtvs s
140	CH1A1A VL	diqmtqspss lsasvgdrvt itckasaavg tyvawyqqkp gkapklliys asyrkrgvps rfsgsgsgtd ftltisslqp edfatyychq yytyplftfg qgtkleik

【０５３９】
実施例３
Ｆａｂ　Ｐ１ＡＡ１２２７　Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ複合体の結晶化、データ回収、および構造決定
複合体を形成するために、２６ｍｇ／ｍｌの、Ｐ１ＡＡ１２２７と呼ばれる、ＰＲＩＴ－０２１３内のヒト化ＶＨ／ＶＬに由来するＦａｂを、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ粉末と、１：４．２のモル比で混合した。４℃で、２時間にわたるインキュベーションの後、初期結晶化試験は、ＪＣＳＧ＋　ｓｃｒｅｅｎ（Ｑｉａｇｅｎ、Ｈｉｌｄｅｎ）を使用して、２１℃のシッティングドロップ蒸気拡散設定で実施した。結晶は、０．２Ｍの（ＮＨ４）２ＳＯ４、０．１Ｍのビス－トリスｐＨ５．５、２５％ｗ／ｖのＰＥＧ３３５０から、５日間以内に現れた。結晶を、任意のさらなる最適化工程を伴わずに、スクリーニングプレートから直接採取した。
【０５４０】
データ回収および構造決定：データ回収のために、結晶を、１０％のエチレングリコールを含有する沈殿剤溶液中、１００Ｋで、瞬時凍結させた。回折データは、ＰＩＬＡＴＵＳ　６Ｍ検出器を、Ｓｗｉｓｓ　Ｌｉｇｈｔ　Ｓｏｕｒｃｅ（Ｖｉｌｌｉｇｅｎ、Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）のビームラインＸ１０ＳＡで使用して、１．０００００Åの波長で回収した。データは、ＸＤＳ（Ｋａｂｓｃｈ，Ｗ．、Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔ．、Ｄ６６、１３３～１４４（２０１０））で加工し、ＳＡＤＡＢＳ（ＢＲＵＫＥＲ）でスケーリングした。複合体の結晶は、セル軸を、ａ＝１３５．６３Å、ｂ＝５６．４２Å、ｃ＝６４．５２Åとし、β＝１０８．３６°とする空間群Ｃ２に属し、１．４０Åの分解能で回折される。構造は、自社製のＦａｂ構造についての座標を、探索モデルとして使用する、ＰＨＡＳＥＲ（ＭｃＣｏｙ，Ａ．Ｊ、Ｇｒｏｓｓｅ－Ｋｕｎｓｔｌｅｖｅ，Ｒ．Ｗ．、Ａｄａｍｓ，Ｐ．Ｄ．、Ｓｔｏｒｏｎｉ，Ｌ．Ｃ．、およびＲｅａｄ，Ｒ．Ｊ．、Ｊ．Ａｐｐｌ．Ｃｒｙｓｔ．、４０、６５８～６７４（２００７））を伴う分子置換法により決定した。電子密度差を使用して、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを配置し、実空間精緻化による配列差に従い、アミノ酸を変化させた。構造は、ＣＣＰ４パッケージソフト（「Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ　Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ　Ｐｒｏｊｅｃｔ」、その４、Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔ．、Ｄ５０、７６０～７６３（１９９４））、およびＢＵＳＴＥＲ（Ｂｒｉｃｏｇｎｅ，Ｇ．、Ｂｌａｎｃ，Ｅ．、Ｂｒａｎｄｌ，Ｍ．、Ｆｌｅｎｓｂｕｒｇ，Ｃ．、Ｋｅｌｌｅｒ，Ｐ．、Ｐａｃｉｏｒｅｋ，Ｗ．、Ｒｏｖｅｒｓｉ，Ｐ．、Ｓｈａｒｆｆ，Ａ．、Ｓｍａｒｔ，Ｏ．Ｓ．、Ｖｏｎｒｈｅｉｎ，Ｃ．、Ｗｏｍａｃｋ，Ｔ．Ｏ．（２０１１）、Ｂｕｓｔｅｒ　ｖｅｒｓｉｏｎ　２．９．５、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ：Ｇｌｏｂａｌ　Ｐｈａｓｉｎｇ　Ｌｔｄ．）に由来するプログラムにより精緻化した。マニュアルの再構築は、ＣＯＯＴにより行った（Ｅｍｓｌｅｙ，Ｐ．、Ｌｏｈｋａ

ｍｐ，Ｂ．、Ｓｃｏｔｔ，Ｗ．Ｇ．、およびＣｏｗｔａｎ，Ｋ．、Ａｃｔａ　Ｃｒｙｓｔ、Ｄ６６、４８６～５０１（２０１０））。

【０５４１】

データ回収および精緻化統計学を、下記にまとめる。

【０５４２】

全てのグラフ表示は、ＰＹＭＯＬ（Ｐｙｍｏｌ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｇｒａｐｈｉｃｓ　Ｓｙｓｔｅｍ、Ｖｅｒｓｉｏｎ　１．７．４．、Ｓｃｈｒｏｅｄｉｎｇｅｒ，ＬＬＣ．）により作成した。

Ｆａｂ　Ｐ１ＡＡ１２２７－Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ複合体についてのデータ回収および精緻化統計学

	P1AA1227–Pb–DOTAM
データ回収	
空間群	C2
セルの寸法	
a, *b*, *c*（Å）	135.63, 56.42, 64.52
α，β，γ（°）	90, 108.36, 90
分解能(Å)	1.40
R_{sym} または R_{merge}	0.041
$I/\delta I$	10.3 (0.94)
完全性(%)	94.4 (86.1)
冗長性	3.37 (3.33)
精緻化	
分解能(Å)	48.9 – 1.40
反射数	81631
R_{work} / R_{free}	19.21/22.38
原子数	
タンパク質	3342
水	523
Pb–DOTAM	29
*B*因子	
タンパク質	14.81
水	37.46
Pb–DOTAM	21.09
実効値による偏差	
結合長(Å)	0.011
結合角(°)	1.57

*括弧内の値は、最外殻分解能についての値である。

【０５４３】
Ｐｂ－ＤＯＴＡＭと複合させたＦａｂ　Ｐ１ＡＡ１２２７の構造
　Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、Ｆａｂ　Ｐ１ＡＡ１２２７との相互作用の詳細を特徴付けるために、本発明者らは、複合体の結晶構造を、１．４０Åの分解能で決定した。構造は、軽鎖のＣＤＲ１およびＣＤＲ３、ならびに重鎖のＣＤＲ２およびＣＤＲ３による主要な寄与により、Ｆａｂ　Ｐ１ＡＡ１２２７が、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭに結合することを明らかにする。
【０５４４】
　プログラムであるＰＩＳＡによる、結合接触面についての解析は、３つの水素結合、極性相互作用、およびファンデルワールス力による接触を介する、Ｆａｂ　Ｐ１ＡＡ１２２７の、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭとの相互作用パターンを明らかにする。Ｐｂ－ＤＯＴＡＭは、重鎖および軽鎖により形成されるポケット内で結合している。このポケットは、１つの面において開く箱の形状を有する。ポケットの側壁面が、無極性相互作用に寄与するのに対し、壁面の縁辺部では、極性相互作用が中心をなす。重鎖のＣＤＲ３残基であるＧｌｕ９５およびＡｓｐ９７の、ＤＯＴＡＭのカルバモイルの窒素原子であるＮ７およびＮ８との間では、側鎖間の水素結合が形成される。さらなる水素結合は、主鎖Ａｒｇ９６のカルボニル炭素原子およびＤＯＴＡＭの原子Ｎ７を介して確立される。複合体は、アザシクロドデカン環に対してエッジ－フェイス配向をなす、重鎖ＣＤＲ２のＰｈｅ５０およびＴｙｒ５８の側鎖の無極性相互作用を介して、さらに安定化される。軽鎖は、主に、ＣＤＲ３の残基Ｇｌｙ９１～Ｔｙｒ９６と共に、ポケットの「ボトム」を与え、テトラシクロドデカン環に対する、無極性の接触面をもたらす。Ａｓｐ３２は、ＤＯＴＡＭのカルバモイルの窒素原子Ｎ６に対する水素結合を受け入れる（カバットに従う番号付け）。
【０５４５】
　下記の表は、ＰＩＳＡプログラムによる解析に基づく、重鎖パラトープ残基を示す。

重鎖残基(カバットによる番号)	相互作用の種類	Pb-DOTAM
Phe50	無極性	アザシクロドデカン環に対するエッジ-フェイス配向
Asp56	極性	N8
Tyr58	無極性	アザシクロドデカン環に対するエッジ-フェイス配向
Glu95	H 結合	N7
Arg96	H 結合(mc カルボニル)	N7
Asp97	H 結合	N8
Pro98	エッジ-フェイス配向	Pb-Dotam の上方(ただし、距離:4Å)
Tyr99	極性(ただし、距離:6Å)	N5
Ala100C	無極性	C12
Tyr100D	極性(mc 原子)	N7

【０５４６】
下記の表は、ＰＩＳＡプログラムによる解析に基づく、軽鎖パラトープ残基を示す。

軽鎖残基(カバットによる番号)	相互作用の種類	Pb-DOTAM
Tyr28	無極性	アザシクロドデカン環に対するエッジ-フェイス配向
Asp32	極性、H 結合	N6
Gly91	無極性	アザシクロドデカン環の下方
Tyr92	無極性	アザシクロドデカン環の下方
Asp93	無極性	アザシクロドデカン環の下方
Thr95C	無極性	アザシクロドデカン環の下方
Tyr96	無極性	アザシクロドデカン環に対するエッジ-フェイス配向

【０５４７】

下記の配列でもまた、パラトープ残基に下線を付す：

＞Ｐ１ＡＡ１２２７＿ＨＣ

VTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVL
TMTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV
TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC（配列番号１４５）

＞Ｐ１ＡＡ１２２７＿ＬＣ

SIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYSDNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号１４６）

【０５４８】

実施例４

ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ　ＶＨ／ＶＬ抗体の作出

標的抗原に対する結合部位と、放射標識化合物に対する結合部位とを有する二重特異性抗体を使用するＰＲＩＴ法（プレターゲティング放射免疫療法）は、一般に、有効なターゲティング、および高腫瘍に吸収された用量対正常組織に吸収された用量の比を確認するように、抗体の投与と、放射性リガンドの投与と間に、除去剤（ＣＡ）を使用する（図３を参照されたい）。このような一方法の例では、注入されたＢｓＡｂは、一般に、４～１０日間である、腫瘍への浸透に十分な時間を与えられ、この後、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００　ＣＡを使用して、循環ＢｓＡｂが中和される。ＣＡは、^{212}Ｐｂ－

ＤＯＴＡＭの、腫瘍への浸透を伴わない、非標的ＢｓＡｂへの結合をブロックし、これにより、プレターゲティング部位をブロックする。このプレターゲティングレジメンは、続いて投与される放射標識キレートである、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、効率的な腫瘍蓄積を可能とする。

【０５４９】

しかし、除去剤を伴う方法では、ＣＡの使用は、非効率的な方法に、さらなる工程を導入する。さらに、複合因子である、ＣＡ投与のタイミングおよび投与量は、注意深く選び出すことが重要である。

【０５５０】

除去剤の使用と関連する問題に取り組むために、本発明者らは、それらが、個別の抗体上で見出されるように、ＤＯＴＡＭ　ＶＬドメインと、ＤＯＴＡＭ　ＶＨドメインとを分配する戦略を提起した。

【０５５１】

例示的なスプリットＤＯＴＡＭ　ＶＨ／ＶＬ抗体の作出については、下記でさらに論じられる。

【０５５２】

抗体の重鎖または軽鎖の組換え発現のためのプラスミドの作出

所望のタンパク質は、ヒト胎児性腎細胞（ＨＥＫ　２９３）の一過性トランスフェクションにより発現させた。さらなるドメイン（例えば、そのＣ末端における、免疫グロブリンの重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメイン）を含有する、所望の遺伝子／タンパク質（例えば、完全長抗体重鎖、完全長抗体軽鎖、または完全長抗体重鎖の発現のために、以下の機能的エレメント：

・イントロンＡを含む、ヒトサイトメガロウイルス（Ｐ－ＣＭＶ）に由来する、即初期エンハンサーおよび即初期プロモーター、

・ヒト重鎖免疫グロブリン５’側非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、

・マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列（ＳＳ）、

・発現される遺伝子／タンパク質、および

・ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（ＢＧＨｐＡ）

を含む転写単位を使用した。

【０５５３】

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

このプラスミドの、大腸菌内の複製を可能とするベクターである、ｐＵＣ１８に由来する複製開始点、および

大腸菌内でアンピシリン耐性を付与する、ベータ－ラクタマーゼ遺伝子を含有した。

【０５５４】

ａ）抗体重鎖のための発現プラスミド

完全でかつ機能的な抗体重鎖に続き、さらなる抗体の重鎖Ｖドメインまたは軽鎖Ｖドメインを含む、Ｃ末端融合遺伝子を含む遺伝子をコードする抗体重鎖を、各々が、Ｇ４Ｓ×４リンカーにより分離された、それぞれの配列エレメント（重鎖Ｖエレメントまたは軽鎖Ｖエレメント）をコードするＤＮＡ断片を、ヒトＩｇＧ分子（ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＨまたはＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＬ）のＣＨ３ドメインのＣ末端に融合させることによりアセンブルした。２つのＣＨ３ドメインそれぞれのＣ末端に、１つのＶＨと、１つのＶＬドメインとを保有する組換え抗体分子は、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用して発現させた。

【０５５５】

ＨＥＫ２９３細胞内の、Ｃ末端にＶＨドメインまたはＶＬドメインを伴う抗体重鎖の一過性発現のための発現プラスミドは、Ｃ末端にＶＨドメインまたはＶＬドメインを伴う抗体重鎖断片の発現カセットに加えて、このプラスミドの、大腸菌内の複製を可能とするベクターである、ｐＵＣ１８に由来する複製開始点、および大腸菌内でアンピシリン耐性を

付与する、ベーターラクタマーゼ遺伝子を含んだ。Ｃ末端にＶＨドメインまたはＶＬドメインの融合遺伝子を伴う抗体重鎖断片の転写単位は、以下の機能的エレメント：

・イントロンＡを含む、ヒトサイトメガロウイルス（Ｐ－ＣＭＶ）に由来する、即初期エンハンサーおよび即初期プロモーター、

・ヒト重鎖免疫グロブリン５’側非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、

・マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、

・抗体重鎖（ＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＨ、またはＶＨ－ＣＨ１－ヒンジ－ＣＨ２－ＣＨ３－リンカー－ＶＬ）をコードする核酸、および

・ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（ＢＧＨｐＡ）

を含む。

【０５５６】

Ｃ末端において、ＶＨドメインまたはＶＬドメインの融合タンパク質を伴う、成熟抗体重鎖断片のアミノ酸配列を、下記に示す：

ＤＯＴＡＭ－ＶＨを伴うＰＲＩＴスプリット抗体（Ｐ１ＡＤ８７４９）

＞Ｄ１ＡＣ４０２２

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW
INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号２８）（配列番号９９）（配列番号１００）

＞Ｄ１ＡＡ４５０７

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW
INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLST
YSMSWIRQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLT
MTNMDPVDTATYYCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSS（配列番号３２）

ＤＯＴＡＭ－ＶＬを伴うＰＲＩＴスプリット抗体（Ｐ１ＡＤ８５９２）

＞Ｄ１ＡＡ４５０６

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW
INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQSSHSVYS

DNDLAWYQQKPGKAPKLLIYQASKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCLGGYDDESDTYGFGGGTKVEIK（配列番号３３）
＞Ｄ１ＡＣ４０２３
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGW
INTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWD
FAYYVEAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号３０、９７）
【０５５７】
ｂ）抗体軽鎖のための発現プラスミド
　完全でかつ機能的な抗体軽鎖を含む遺伝子をコードする抗体軽鎖を、それぞれの配列エレメントをコードするＤＮＡ断片を融合させることによりアセンブルした。
【０５５８】
　抗体軽鎖の一過性発現のための発現プラスミドは、抗体軽鎖断片に加えて、このプラスミドの、大腸菌内の複製を可能とするベクターである、ｐＵＣ１８に由来する複製開始点、および大腸菌内でアンピシリン耐性を付与する、ベーターラクタマーゼ遺伝子を含んだ。抗体軽鎖断片の転写単位は、以下の機能的エレメント：
　　・イントロンＡを含む、ヒトサイトメガロウイルス（Ｐ－ＣＭＶ）に由来する、即初期エンハンサーおよび即初期プロモーター、
　・ヒト重鎖免疫グロブリン５’側非翻訳領域（５’ＵＴＲ）、
　・マウス免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
　・抗体軽鎖（ＶＬ－ＣＬ）をコードする核酸、および
　・ウシ成長ホルモンポリアデニル化配列（ＢＧＨｐＡ）
を含む。
【０５５９】
　成熟抗体軽鎖断片のアミノ酸配列は、Ｐ１ＡＤ８５９２およびＰ１ＡＤ８７４９の両方について、同じである。
＞Ｄ１ＡＡ３３８４
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKPGKAPKLLIYS
ASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYYTYPLFTFG
QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC（配列番号３４）、（配列番号１０３）、（配列番号１１５）
【０５６０】
一過性抗体分子の発現
　抗体分子を、Ｆ１７培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．）中で培養された、一過性トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞（ヒト胎児性腎細胞株２９３由来）内で作出した。トランスフェクションのために、「２９３－Ｆｒｅｅ」トランスフェクション試薬（Ｎｏｖａｇｅｎ）を使用した。上記で記載された、それぞれの抗体重鎖分子および抗体軽鎖分子は、個々の発現プラスミドから発現させた。トランスフェクションは、製造元の指示書に指定されている通りに実施した。免疫グロブリン含有細胞培養上清を、トランスフェクションの３～７日後に採取した。上清を、精製まで、低温（例えば、－８０℃）で保管した。
【０５６１】
　例えば、ＨＥＫ２９３細胞内における、ヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般

的情報は、Ｍｅｉｓｓｎｅｒ，Ｐ．ら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．、７５（２００１）、１９７～２０３において与えられている。

【０５６２】

ＰＲＩＴヘミボディー（スプリット抗体）は、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅ（親和性クロマトグラフィー）、およびこれに続く、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００（サイズ排除クロマトグラフィー）により精製した。ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／Ｐ１ＡＤ８５９２を伴うＰＲＩＴスプリット抗体のために、解析用ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づき、濃度を１．３７２ｍｇ／ｍＬとし、純度＞９６％とする５ｍｇを作製した。ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／Ｐ１ＡＤ８７４９を伴うＰＲＩＴスプリット抗体のために、解析用ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づき、濃度を２．０３ｍｇ／ｍＬとし、純度＞９１％とする１４ｍｇを作製した。

【０５６３】

また、抗体である、Ｐ１ＡＥ４９５６およびＰ１ＡＥ４９５７も作出したが、本明細書では、これらの配列を提示する（Ｐ１ＡＥ４９５６は、配列番号５１および５２の重鎖、ならびに配列番号５４の軽鎖を有し；Ｐ１ＡＥ４９５７は、配列番号５５および５６の重鎖、ならびに配列番号５８の軽鎖を有する）。ＤＯＴＡＭ－ＶＬ／Ｐ１ＡＥ４９５７を伴うＰＲＩＴスプリット抗体のために、解析用ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づき、濃度を２．６ｍｇ／ｍＬとし、純度＞８１．６％とする１９ｍｇを作製した。ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／Ｐ１ＡＥ４９５６を伴うＰＲＩＴスプリット抗体のために、解析用ＳＥＣおよびＣＥ－ＳＤＳに基づき、濃度を１．５ｍｇ／ｍＬとし、純度＞９０％とする６．９ｍｇを作製した。ＥＳＩ－ＭＳを使用して、ＰＲＩＴヘミボディーの同一性を確認した。

【０５６４】

実施例５

スプリット抗体の機能性についのＦＡＣＳ解析

スプリット抗体またはヘミボディーの機能性について評価するために、３７℃で、１０分間にわたりアキュターゼを使用して、ＭＫＮ－４５細胞を、培養物容器から解離させた。その後、細胞を、ＰＢＳ中で、２回にわたり洗浄し、９６ウェルｖ字底プレートに、ウェル１つ当たりの細胞４×10^6個の最終密度まで播種した。

【０５６５】

ヘミボディーＰ１ＡＤ８７４９およびＰ１ＡＤ８５９２、ならびにヒトＩＳＯコントロールを、１：１で混合し、図５に表示の濃度で、細胞に添加した。その後、細胞を、氷上で、１時間にわたりインキュベートし、ＰＢＳ中で、２回にわたり洗浄した。細胞ペレットを再懸濁させ、ウェル１つ当たり４０μｌの検出試薬である、ＰＢＳ／５％ＦＣＳ中の、＜ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）＞ＦＩＴＣ（１０μｇ／ｍｌ）、またはＰｂ＿Ｄｏｔａｍ＿ＦＩＴＣ１：１００（１０μｇ／ｍｌ）を添加した。氷上で６０分間にわたるインキュベーションの後、細胞を、ＰＢＳ中で、２回にわたり洗浄し、ＦＡＣＳ　ｃａｎｔｏを使用する、ＦＩＴＣ蛍光の測定のために、ＰＢＳ／５％ＦＣＳ　２００μｌ中に再懸濁させた。

【０５６６】

ヘミボディーの、ＭＫＮ－４５細胞上のＣＥＡへの結合能について評価するために、ヒトＩｇＧに特異的な二次抗体を使用して、ヘミボディーを、検出した（図５）。予測される通り、これらの細胞上では、ヒトＩＳＯコントロールの著明な結合は観察されない。同じＩｇＧ濃度に補正すると、いずれのヘミボディーも、両方のヘミボディーの組合せも、ＭＫＮ－４５細胞への用量依存的結合を示し、予測される通り、極高濃度では、顕著なフック効果を伴う。この実験は、ヘミボディーでは、ＣＥＡへの結合が機能的であることを裏付ける。

【０５６７】

ヘミボディーの、ＤＯＴＡＭへの結合能について評価するために、これらを、１：１比のヒトＩＳＯコントロールまたはそれらのそれぞれのスプリット抗体パートナーの存在下で、細胞に結合させた。それらのＭＫＮ－４５細胞への結合の後、細胞を洗浄して、非結合抗体を除去した。その後、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＦＩＴＣ（蛍光標識Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）を添加して、ＤＯＴＡＭの、コンピテント細胞に結合した抗体への結合を検出した（図６

）。予測される通り、スプリット抗体のパートナーのうちの一方が、ヒトＩＳＯコントロールと組み合わされている場合は、これらの細胞上で、著明なＦＩＴＣは観察されない。両方のヘミボディーの、１：１の比における組合せだけが、用量依存的ＦＩＴＣシグナルを示す。この実験は、両方のヘミボディーが、１つの細胞上で一体となった場合に、ＤＯＴＡＭ結合部位は、機能的となることを示す。

【０５６８】

実施例６

ｉｎ　ｖｉｖｏ研究

実施例６ａ

材料および方法：全般

全ての実験プロトコールは、地域の規制機関（Ｃｏｍｉｔｅ　Ｒｅｇｉｏｎａｌ　ｄ’Ｅｔｈｉｑｕｅ　ｄｅ　ｌ’Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｔｉｏｎ　Ａｎｉｍａｌｅ　ｄｕ　Ｌｉｍｏｕｓｉｎ［ＣＲＥＥＡＬ］、Ｌａｂｏｒａｔｏｉｒｅ　Ｄｅｐａｒｔｅｍｅｎｔａｌ　ｄ’Ａｎａｌｙｓｅｓ　ｅｔ　ｄｅ　Ｒｅｃｈｅｒｃｈｅｓ　ｄｅ　ｌａ　Ｈａｕｔｅ－Ｖｉｅｎｎｅ）により審査および承認された。雌重度複合免疫不全（ＳＣＩＤ）マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）を、倫理的ガイドラインと共に、毎日の明暗周期（１２時間／１２時間）を伴う、ＳＯＰＦ（ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｄ　ｏｐｐｏｒｔｕｎｉｓｔｉｃ　ｐａｔｈｏｇｅｎ　ｆｒｅｅ）条件下で維持した。動物を、新たな環境に馴らすように、到着後、最初の５日間は、操作を実施しなかった。臨床症状および有害事象の検出のために、動物を毎日制御下に置いた。

【０５６９】

固形異種移植片は、Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）マトリゲル（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低減型；型番：３５４２３０）と、１：１で混合された細胞培養物中のＣＥＡ発現腫瘍細胞の皮下（ＳＣ）注射により確立した。腫瘍体積は、毎週３回、手作業のノギスによる計測を介して推定し、式：体積＝０．５×長さ×幅^{2}に従い計算した。腫瘍増殖速度に応じて必要とされる場合は、さらなる腫瘍測定を行った。

【０５７０】

腫瘍負荷、注射の副作用、または他の原因による、不適切な苦痛または疼痛の徴候を示した場合は、マウスを、予定の終点の前に安楽死させた。疼痛、苦痛、または不快感の徴候は、急性体重（ＢＷ）減少、毛並みの乱れ、下痢、猫背の姿勢、および嗜眠を含むがこれらに限定されない。処置動物の体重は、毎週３回測定し、健康状態により、必要に応じてさらに測定した。放射性物質注射の翌日から始めて、７日間にわたり、または全ての個体が、任意の急性体重減少から十分に回復するまで、全てのマウスに含水食餌を与えた。体重減少が、それらの初期体重の２０％を超えるか、または腫瘍容量が、３０００ｍｍ^{3}に達したマウスは、速やかに安楽死させた。倫理的理由による安楽死のために考慮される他の因子は、腫瘍状態（例えば、壊死領域、血液／体液の漏出、自傷の徴候）、および動物の一般的な外見（例えば、毛並み、姿勢、動き）であった。

【０５７１】

放射性尿／糞便の再摂取を最小化するため、全ての有効性研究用マウスを、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの投与後、４時間にわたり、床面を格子状としたケージに入れてから、標準的な寝藁を備えた、新たなケージに移した。次いで、注射の２４時間後（ｐ．ｉ．）に、全てのケージを交換した。この手順は、放射性物質注射後２４時間以内における、生体内分布を目的として　殺されたマウスには実施しなかった。

【０５７２】

プロトコールにより指示される通りに、安楽死時に、頸椎脱臼を介する終結の前に、麻酔下マウスにおける眼窩後採血を使用して、静脈洞から血液を回収するのに続き、放射能の測定および／または組織学的解析のために、さらなる組織採取を行った。予測外の状態または異常な状態は記録した。ホルマリン固定のために回収された組織は、速やかに、１０％の中性緩衝ホルマリン（４℃）中に入れ、次いで、５日後に、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ；４℃）に移した。生体内分布目的で回収された臓器および組織を秤量し、２４７０

ＷＩＺＡＲＤ^{2}自動式ガンマカウンター（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して放射能について測定し、その後、減衰およびバックグラウンドについての補正を含む、組織１グラム当たりの注入用量パーセント（１ｇ当たりのＩＤ％）を計算した。

【０５７３】

統計学的解析は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ７（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．）およびＪＭＰ １２（ＳＡＳ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｉｎｃ．）を使用して実施した。腫瘍増殖阻害（ＴＧＩ）についての曲線解析は、式：

$$TGI = 100 - \frac{\overline{v_{treatment,d} - v_{treatment,0}}}{\overline{v_{ref,d} - v_{ref,0}}} \times 100$$

［式中、ｄは、研究日を指し示し、０は、ベースライン値を指し示す］

を使用する、平均値腫瘍体積に基づき実施した。ビヒクルを、参照群として選択した。腫瘍縮小（ＴＲ）は、

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

［式中、正の値は、腫瘍縮小を指し示し、－１を下回る値は、ベースライン値の２倍を上回る増殖を指し示す］

に従い計算した。

【０５７４】

被験化合物

記載される研究で利用された化合物を、それぞれ、二重特異性抗体、除去剤、および放射性標識キレートについて、下記の表に提示する。

【０５７５】

ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７１９８４２７、ＰＲＩＴ－０２１３）が、ＣＥＡのＴ８４．６６エピトープをターゲティングする完全ヒト化ＢｓＡｂであるのに対し、ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０４０１２）は、ネガティブコントロールとして使用される、非ＣＥＡ結合ＢｓＡｂである。Ｐ１ＡＤ８７４９、Ｐ１ＡＤ８５９２、Ｐ１ＡＥ４９５６、およびＰ１ＡＥ４９５７は、ＣＨ１Ａ１ＡまたはＣＥＡのＡ５Ｂ７エピトープをターゲティングするＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体である。全ての抗体コンストラクトを、注射日まで、－８０℃で保管し、そこで、これらを融解させ、標準的ビヒクルバッファー（２０ｍＭのヒスチジン、１４０ｍＭのＮａＣｌ；ｐＨ６．０）または０．９％ＮａＣｌ中で、静脈内（ＩＶ）投与または腹腔内（ＩＰ）投与のための、それらそれぞれの最終濃度に希釈した。

【０５７６】

Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００ ＣＡ（ＲＯ７２０１８６９）を、注射日まで、－２０℃で保管し、そこで、これらを融解させ、ＩＶ投与またはＩＰ投与のために、ＰＢＳ中で希釈した。

【０５７７】

放射性標識のためのＤＯＴＡＭキレートは、Ｍａｃｒｏｃｙｃｌｉｃｓにより提供され、Ｏｒａｎｏ Ｍｅｄ（Ｒａｚｅｓ、Ｆｒａｎｃｅ）により実施される放射性標識の前に、－２０℃で維持された。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０５８３４）は、ＤＯＴＡＭによる、トリウム発生物質からの溶出を介して作出し、続いて、標識付けの後、Ｃａによりクエンチングした。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ溶液は、０．９％ＮａＣｌで希釈して、ＩＶ注射に所望の^{212}Ｐｂ活性濃度を得た。

【０５７８】

ビヒクル対照群内のマウスには、ＢｓＡｂ、ＣＡ、および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの代わりに、ビヒクルバッファーの複数回の注射を施した。

二重特異性抗体

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

除去剤

化合物	プロトコール
Ca-DOTAM-デキストラン-500 (RO7201869)	144, 158, 160

放射標識キレート

化合物	クエンチング	プロトコール
^{212}Pb-DOTAM (RO7205834)	Ca	144, 158, 160, 175, 185, 189
^{212}Pb-DOTAM-CEA-DOTAM	Ca	160

【０５７９】

腫瘍モデル

使用される腫瘍細胞株、およびマウスにおける接種のための注入量については、下記の表において記載される。ＢｘＰＣ３とは、天然でＣＥＡを発現させる、ヒト初代膵腺癌細胞株である。細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｈｙｃｌｏｎｅ ＳＨ３００８８．０３）で濃縮された、ＲＰＭＩ １６４０培地、ＧｌｕｔａＭＡＸ

（商標）サプリメント、ＨＥＰＥＳ（Ｇｉｂｃｏ；型番：７２４００－０２１）中で培養した。固形異種移植片は、研究０日目に、Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標）マトリゲル（登録商標）基底膜マトリックス（増殖因子低減型；型番：３５４２３０）と、１：１で混合されたＲＰＭＩ培地中の細胞の、右脇腹への皮下注射により、各ＳＣＩＤマウスにおいて確立した。

腫瘍細胞株

細胞株	マウス１匹当たりの細胞数	注入容量	プロトコール	供給元
BxPC3	5×10^{6}	100μL	144, 158, 160, 175, 185, 189	ECACC*

*European Collection of Authenticated Cell Cultures (Salisbury, UK)

【０５８０】

実施例６ｂ

プロトコール１４４

プロトコール１４４の目的は、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂを使用する２工程ＰＲＩＴ後の、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、プレターゲティング^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭについてのＰＫデータおよびｉｎ　ｖｉｖｏ分布データを提示することであった。

【０５８１】

２工程ＰＲＩＴは、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨおよびＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ（Ｐ１ＡＤ８７４９およびＰ１ＡＤ８５９２）の、個別の注入、または併せた注入の７日後における、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射により実施した。マウスを、放射性物質注射の６時間後に　殺し、放射能の測定のために、血液および臓器を採取した。２工程スキームを、標準的なＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ二重特異性抗体の７日後における、Ｃａ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００　ＣＡ、およびＣＡの２４時間後における^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを使用する、３工程ＰＲＩＴと比較した。

【０５８２】

ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬのクリアランスについてのＰＫデータは、抗体注射の１時間～７日間後における採血の反復により回収し、その後、ＥＬＩＳＡにより解析した。

【０５８３】

研究の概観を、図７に示す。図７ａは、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおける、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＰＫのための採血を含む、２工程ＰＲＩＴレジメンについての概観を示す。図７ｂは、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するＳＣＩＤマウスにおいて実施された、３工程ＰＲＩＴレジメンについての概観（ｈ＝時間、ｄ＝日）を示す。

【０５８４】

研究デザイン

プロトコール１４４の時間経過およびデザインを、下記の表に示す。

プロトコール１４４の時間経過

研究日	日付	実験手順
0	2018 年 5 月 2 日	BxPC3 細胞の調製、およびシリンジの充填
0	2018 年 5 月 2 日	BxPC3 細胞の SC 注入
14	2018 年 5 月 16 日	CEA-DOTAM BsAb の IV 注射(群 D)
15	2018 年 5 月 17 日	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL BsAb の IV 注射(群 Aa、Ab、Ba、Bb、Ca、Cb)
15	2018 年 5 月 17 日	眼窩後採血(注入の 1 および 4 時間後;それぞれ、群 Aa、Ba、Ca、andAb、Bb、Cb)
16	2018 年 5 月 18 日	眼窩後採血(注入の 24 時間後;群 Aa、Ba、Ca)
18	2018 年 5 月 20 日	眼窩後採血(注入の 72 時間後;群 Ab、Bb、Cb)
21	2018 年 5 月 23 日	CA の IV 注射(群 D)
21	2018 年 5 月 23 日	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
22	2018 年 5 月 24 日	^{212}Pb-DOTAM の IV 注射(群 Aa、Ba、Ca、D)
22	2018 年 5 月 24 日	眼窩後採血(注入の 168 時間後)、および安楽死(群 Ab、Bb、Cb)
22	2018 年 5 月 24 日	安楽死、および眼窩後採血を含む組織採取(注入の 6 時間後)+ガンマカウンティング(群 Aa、Ba、Ca、D)

プロトコール１４４における研究群

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

【０５８５】

固形異種移植片は、研究０日目に、ＲＰＭＩ／マトリゲル中の細胞５×１０^{6}個（第２６継代）の、右脇腹へのＳＣ注入により、各ＳＣＩＤマウスにおいて確立した。腫瘍細胞

注入の１４日後に、マウスを、平均腫瘍体積を１１６ｍｍ^{3}とする実験群に分けた。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、接種後２２日目に注入した；平均腫瘍体積は、２１日目において、１４０ｍｍ^{3}であった。

【０５８６】

群Ａａ、Ｂａ、およびＣａにおけるマウスからの血液は、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬの注射の１時間（右眼）、２４時間（左眼）、および１６８時間（右眼、終結時）後の麻酔下において、眼窩後採血を介して回収した。同様に、試料を、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬの注射の４時間（右眼）、７２時間（左眼）、および１６８時間（右眼、終結時）後に、群Ａｂ、Ｂｂ、およびＣｂにおけるマウスから採取した。

【０５８７】

群Ａａ、Ｂａ、Ｃａ、およびＤ内のマウスを　　殺し、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に剖検し、放射性物質の含有量の測定のために、以下の臓器および組織：血液、皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、脳、尾、耳、および腫瘍を採取した。

【０５８８】

結果

注射の６時間後における全ての回収組織中の平均^{212}Ｐｂ蓄積およびクリアランスを、図８に提示する。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨまたはＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ単独によるプレターゲティングは、腫瘍内の放射能の蓄積を結果としてもたらさなかった。２つの相補的抗体の組合せは、標準的な３工程ＰＲＩＴレジメンのための１ｇ当たり８７±１５％のＩＤと比較される、１ｇ当たり６５±１２％のＩＤによる２工程ＰＲＩＴの後に、腫瘍への取込みを結果としてもたらした。チューキーの多重比較検定による二元分散分析（ＡＮＯＶＡ）は、２つのＰＲＩＴ処置の間の、腫瘍への取込みの差違は、膀胱における差違と同様に有意であること（２工程ＰＲＩＴおよび３工程ＰＲＩＴについて、それぞれ、１ｇ当たり１±２％のＩＤおよび１ｇ当たり３８±１７％のＩＤ）を示したが；この検定（ｐ＝０．０５）を使用する、他の組織蓄積の差違は、統計学的に有意ではなかった。

【０５８９】

酵素免疫測定アッセイ（ＥＬＩＳＡ）により解析される、ＩＶ注入ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトのクリアランスを、図９に示す。

【０５９０】

有害事象および毒性

本研究と関連する有害事象または毒性は見られなかった。

【０５９１】

結論

研究結果は、相補的ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用する、ＣＡ非依存型２工程プレターゲティングの概念実証を裏付けた。２工程ＰＲＩＴおよび標準的３工程ＰＲＩＴを使用して、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、腫瘍への、高度かつ特異的な取込みを達成したところ、相補的ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用した場合の正常組織中の放射能の蓄積は、ごくわずかしか見られなかった。

【０５９２】

実施例６ｃ

プロトコール１５８

プロトコール１５８の目的は、除去剤非依存型２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴのための、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の二重パラトープ（ＣＨ１Ａ１ＡおよびＡ５Ｂ７）対によりプレターゲティングされたマウスにおける、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、皮下ＢｘＰＣ３腫瘍との会合について評価することであった。腫瘍への取込みを、標準的な３工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴの場合と比較した。

【０５９３】

皮下ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するマウスに、
・ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の７日後における、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２工程ＰＲＩＴ）、または
・ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂの７日後における、ＣＡ、および、最後の２４時間後における、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（３工程ＰＲＩＴ）
を注入した。

【０５９４】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける分布を、放射性物質注射の６時間後に評価した。研究の概観を、図１０に示す。

【０５９５】

研究デザイン

プロトコール１５８の時間経過および設計を、下記の表に示す。

プロトコール１５８の時間経過

研究日	日付	実験手順
0	2018 年 11 月 26 日	BxPC3 細胞の調製、およびシリンジの充填
0	2018 年 11 月 26 日	BxPC3 細胞の SC 注入
15	2018 年 12 月 11 日	CEA-DOTAM BsAb の IV 注射(群 C)
16	2018 年 12 月 12 日	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL BsAb の IV 注射(群 A、B)
22	2018 年 12 月 18 日	CA の IV 注射(群 C)
22	2018 年 12 月 18 日	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
23	2018 年 12 月 19 日	^{212}Pb-DOTAM の IV 注射(全ての)
23	2018 年 12 月 19 日	安楽死、および眼窩後採血を含む組織採取(注入の 6 時間後)+ガンマカウンティング(全群)

プロトコール１５８における研究群

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

＊P1AD8749 の用量は、35%のホール/ホール不純物について補償するように、154μｇへと調整した; ** P1AD8592 の用量は、40%のホール/ホール不純物について補償するように、167μｇへと調整した。

【０５９６】

固形異種移植片は、研究０日目に、ＲＰＭＩ／マトリゲル中の細胞５×１０^{6}個（第２

７継代）の、右脇腹へのＳＣ注入により、各ＳＣＩＤマウスにおいて確立した。腫瘍細胞注入の１４日後に、マウスを、平均腫瘍体積を１７７ｍｍ^{3}とする実験群に分けた。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、接種後２０日目に注入した；平均腫瘍体積は、２１日目において、２４３ｍｍ^{3}であった。

【０５９７】

全ての群内のマウスを　　殺し、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に剖検し、放射性物質の含有量の測定のために、以下の臓器および組織：血液、皮膚、膀胱、胃、小腸、結腸、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺、心臓、大腿骨、筋肉、脳、尾、および腫瘍を採取した。

【０５９８】

結果

注射の６時間後における全ての回収組織内の平均^{212}Ｐｂ分布を、図１１に示す。チューキーの多重比較検定による二元ＡＮＯＶＡは、いずれの二重パラトープ型ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対も、標準的３工程ＰＲＩＴより低量の蓄積をもたらした膀胱を除き、３つの処置の間で、正常組織内の^{212}Ｐｂの取込みに有意差は見られないことを示した。腎臓への取込みは、３つの処置全てについて、１ｇ当たり３～４％のＩＤであった。二重パラトープの組合せは、３工程ＰＲＩＴについての１ｇ当たりのＩＤを６７％と比較して、１ｇ当たりのＩＤを約５６％とする腫瘍蓄積を結果としてもたらし；２工程ＰＲＩＴと、３工程ＰＲＩＴとの差違は、統計学的に有意であった（ｐ＜０．０００１）。

【０５９９】

有害事象および毒性

本研究と関連する有害事象または毒性は見られなかった。

【０６００】

結論

本研究は、ＣＡ非依存型２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴのための、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の二重パラトープ対によりプレターゲティングされたマウスにおける、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍との会合を、標準的な３工程ＰＲＩＴと比較して評価した。注入の６時間後における^{212}Ｐｂの分布は、２工程ＰＲＩＴと３工程ＰＲＩＴとで同等であり、腫瘍内の蓄積は高度であり、健常組織内の放射能は、極微量であった。これは、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用する、２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴのための、ＣＥＡ発現腫瘍の、二重パラトープによるプレターゲティングの概念実証を裏付けた。

【０６０１】

実施例６ｄ

プロトコール１６０

プロトコール１６０の目的は、ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するマウスの、相補的なＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を使用する、３サイクルにわたる、ＣＡ非依存型２工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴの後における治療有効性を、標準的な３工程ＣＥＡ－ＰＲＩＴの場合と比較することであった。比較はまた、注入の前に、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭと共にプレインキュベートされた、ＢｓＡｂを使用する、１工程ＣＥＡ－ＲＩＴによっても行った。

【０６０２】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するマウスに、

・ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂの７日後における、ＣＡ、および、最後の２４時間後における、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（３工程ＰＲＩＴ）、

・ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の７日後における、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（２工程ＰＲＩＴ）、または

・^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ（プレインキュベートあり；１工程ＲＩＴ）

を注入した。

【０６０３】

治療は、非ＣＥＡ結合対照抗体（ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ）、および非処置（ビヒクル）との比較もまた含む、２０μＣｉの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭによる、３回にわたる反復サイクルで投与した。各処置サイクルにおける、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭのターゲティングおよびクリアランスを確認するように、特化マウスを、生体内分布を目的として　　殺した。処置の有効性を、ＴＧＩおよびＴＲについて評価し、処置の忍容性について評価するように、マウスを、研究の持続期間にわたり、注意深くモニタリングした。研究の概観を、図１２に示す。

【０６０４】

プロトコール１６０の時間経過およびデザインを、下記の表に示す。

プロトコール１６０の時間経過

研究日	日付	実験手順
0	2019 年 1 月 29 日	BxPC3 細胞の調製、およびシリンジの充填
0	2019 年 1 月 29 日	BxPC3 細胞の SC 注入
15	2019 年 2 月 13 日	BsAb またはヒスチジンバッファーの IP 注射(群 A、B、C、F、G、H、I)
16	2019 年 2 月 14 日	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL またはヒスチジンバッファーの IP 注射(群 D、J、K、L)
22	2019 年 2 月 20 日	CA または PBS の IP 注射(群 A、B、C、F、G、H、I)
23	2019 年 2 月 21 日	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
23	2019 年 2 月 21 日	^{212}Pb-DOTAM-CEA-DOTAM またはヒスチジンバッファーの IV 注射(群 E、M)
23	2019 年 2 月 21 日	^{212}Pb-DOTAM または 0.9%NaCl の IV 注射(群 B、C、D、F、G、H、I、J、K、L)
24	2019 年 2 月 22 日	安楽死、および組織採取(注入の 24 時間後)+ガンマカウンティング(群 F、G、J、M)
29	2019 年 2 月 27 日	PRIT BsAb または PBS の IP 注射(群 A、B、C、H、I)
30	2019 年 2 月 28 日	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL またはヒスチジンバッファーの IP 注射(群 D、K、L)
36	2019 年 3 月 6 日	CA または PBS の IP 注射(群 A、B、C、H、I)
37	2019 年 3 月 7 日	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
37	2019 年 3 月 7 日	^{212}Pb-DOTAM または 0.9%NaCl の IV 注射(群 B、C、D、H、I、K、L)
38	2019 年 3 月 8 日	安楽死、および組織採取(注入の 24 時間後)+ガンマカウンティング(群 H、K)
43	2019 年 3 月 13	PRIT BsAb または PBS の IP 注射(群 A、B、C、I)
44	2019 年 3 月 14 日	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL またはヒスチジンバッファーの IP 注射(群 D、L)
50	2019 年 3 月 20 日	CA または PBS の IP 注射(群 A、B、C、I)
51	2019 年 3 月 21	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
51	2019 年 3 月 21 日	^{212}Pb-DOTAM または 0.9%NaCl の IV 注射(群 B、C、D、I、L)
52	2019 年 3 月 22 日	安楽死、および組織採取(注入の 24 時間後)+ガンマカウンティング(群 I、L)

プロトコール１６０における研究群

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

*P1AD8749:原液中35%のホール/ホール不純物について補償するように、用量を154μgへと調整した; **P1AD8592; ***第1の処置サイクルにおける急性照射誘導性毒性のために、3サイクルから1サイクルへと調整した。

【０６０５】

固形異種移植片は、研究０日目に、ＲＰＭＩ／マトリゲル中の細胞５×１０^{6}個（第２４継代）の、右脇腹へのＳＣ注入により、各ＳＣＩＤマウスにおいて確立した。腫瘍細胞注入の１５日後に、マウスを、平均腫瘍体積を１２２ｍｍ^{3}とする実験群に分けた。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、接種後２３日目に注入した；平均腫瘍体積は、２２日目において、１５５ｍｍ^{3}であった。

【０６０６】

ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ、およびＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ抗体を、上記の表に従うＩＰ投与（プロトコール１６０における研究群）のために、ビヒクルバッファー中で、２００μＬ当たり１００μｇの最終濃度に希釈した。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体を、２００μＬ当たり１００μｇの各コンストラクトを含有する、ＩＰ投与のための、単一の注射溶液に、併せて混合した。Ｐ１ＡＤ８７４９のために、用量は、原液中に３５％のホール／ホール不純物について補償するように、１５４μｇに調整した（ＶＨ／ＶＬを保有しない側の分子）。Ｃａ－ＤＯＴＡＭ－デキストラン－５００　ＣＡを、ＢｓＡｂ注射の７日後にＩＰ（ＰＢＳ　２００μＬ当たり２５μｇ）の２４時間後に、図１２における実験スケジュールに従い、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７２０５８３４）を投与した。ＰＲＩＴ処置マウス（２工程および３工程）に、１００μＬのＣａクエンチング^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ溶液（０．９％ＮａＣｌ　１００μＬ中に２０μＣｉ）をＩＶ注射した。

【０６０７】
１工程ＲＩＴで処置されるマウスには、１回の注射：あらかじめ結合している^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ＩＶ注射のための０．９％ＮａＣｌ　１００μＬ中に２０μＣｉ／２０μｇのＢｓＡｂ）だけを施した。直接標識化抗体は、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂと共に、３７℃で、１０分間にわたりインキュベートすることにより調製した。
【０６０８】
安楽死時に、群Ａ～Ｅのマウスから、以下の臓器および組織：血清、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、および腫瘍を採取した。安楽死の前に、眼窩後採血による血液回収のために、生存マウスに麻酔をかけた。回収された血液試料を、１００００ｒｃｆで、５分間にわたり遠心分離し、結果として得られる血清画分を分離し、凍結させ、－２０℃で保管した。切り出された組織は、速やかに、１０％中性緩衝ホルマリン（４℃）中に入れ、次いで、２４時間後に、１倍濃度のＰＢＳ（４℃）に移した。さらなる加工および解析のために、ホルマリン固定試料を、Ｒｏｃｈｅ　Ｐｈａｒｍａ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ａｎｄ　Ｅａｒｌｙ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ、Ｒｏｃｈｅ　Ｉｎｎｏｖａｔｉｏｎ　Ｃｅｎｔｅｒ　Ｂａｓｅｌに送付した。
【０６０９】
群Ｆ、Ｇ、Ｊ、およびＭ内のマウスを　　殺し、それらの１回目のみで唯一の^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭまたは^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＢｓＡｂの注射の２４時間後に剖検し；群ＨおよびＫ内のマウスを　　殺し、それらの２回目のみの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後に剖検し；群ＩおよびＬ内のマウスを　　殺し、それらの３回目のみの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後に剖検した。血液は、安楽死時に、頸椎脱臼を介する終結の前に、麻酔下マウスにおける眼窩後採血を使用して、静脈洞から回収した。生体内分布を目的として、以下の臓器および組織：膀胱、脾臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、尾、皮膚、および腫瘍もまた採取した。
【０６１０】
結果
注射の２４時間後における全ての回収組織中の平均^{212}Ｐｂ蓄積およびクリアランスを、各治療および処置サイクルについて、図１３に示す。ネガティブコントロールは、腫瘍内の取込みを結果としてもたらさなかった（１ｇ当たり０．４％のＩＤ）。チューキーの多重比較検定による二元分散分析（ＡＮＯＶＡ）は、２工程ＰＲＩＴおよび３工程ＰＲＩＴについて、いかなるサイクルにおいても、分布は、有意に異ならないが；ネガティブコントロールおよび１工程ＲＩＴと比較した差違は、全てのサイクルにおいて、統計学的に有意（ｐ＜０．０５）であることを示した。腫瘍への取込みは、３工程ＰＲＩＴについて、１ｇ当たり２５～４５％のＩＤであり、２工程ＰＲＩＴについて、１ｇ当たり２５～３０％のＩＤであり、いずれの処置またはサイクルの間でも、統計学的有意差を伴わなかった。１工程ＲＩＴについて、腫瘍への取込みは、唯一の処置サイクルにおいて、９９％であった。正常組織内の取込みは、いずれのＰＲＩＴレジメンについても、極めて低度であったが、１工程ＲＩＴの後では、プレインキュベート抗体の循環時間が、低分子放射性標識ＤＯＴＡＭキレートと比較して、はるかに長いために、全ての臓器内および組織内で、有意に高度であった。
【０６１１】
平均腫瘍発症数および個別の腫瘍増殖曲線を、それぞれ、図１４および図１５に示す。非処置ビヒクル群およびＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ群における腫瘍は、後者では、３回目の処置の後に、倍加速度がわずかに低下したが、着実に増殖した。これに対し、ＰＲＩＴ群およびＲＩＴ群における腫瘍は、第１の処置サイクルの後で、サイズが減少し、腫瘍のサイズが増大し始める、接種の約１０週間後まで、腫瘍コントロールを維持した。２工程ＰＲＩＴ処置および３工程ＰＲＩＴ処置は、ほぼ同一な腫瘍コントロールを結果としてもたらした。腫瘍の完全な退縮は、見られなかった。
【０６１２】

全ての処置群を、平均値に基づき解析しうる最後の日である、研究８３日目に、ＴＧＩは、それぞれ、ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（３工程）およびＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ（２工程）を使用するＰＲＩＴについて、ビヒクル対照と比較して、９１．７％および８８．４％であった。１工程ＲＩＴについて対応する数が、７２．６％であったのに対し、非特異的ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ対照についてのＴＧＩは、－５９．７％であった。同じ日に、平均値に基づくＴＲは、３工程ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＰＲＩＴについての－３９．３、－２．９ｆｏｒ２工程ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＰＲＩＴ、１工程ＲＩＴについての－４．７、ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ　ＰＲＩＴについての－２８．８、およびビヒクル対照についての－３９．３であった。

【０６１３】

下記に記載される有害事象のために、生存解析は、統計学的に関与性であると考えられなかった。

【０６１４】

有害事象および毒性

全ての治療群における体重の推移を、図１６に示す。複数のサイクルにわたる、２０μＣｉの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを伴う、２工程ＰＲＩＴおよび３工程ＰＲＩＴは、良好な耐容性を示したが、１工程ＲＩＴを施されるマウスでは、急性の体重減少が生じ、群Ｅのマウス１０匹中８匹を、第１のＲＩＴサイクルの後（^{212}Ｐｂ照射の６～１１日後）に、２０％またはこれを超える体重の降下のために安楽死させた。残りの２匹のＲＩＴマウスには、さらなる^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭの注射を施さず、腫瘍増殖の評価のために、継続的に追跡した。

【０６１５】

加えて、多数のマウスを、腫瘍状態の増悪、すなわち、腫瘍の開口または漏出に起因する倫理的理由で　殺した。ＤＩＧ－ＤＯＴＡＭ群では、この理由で、１０匹中９匹のマウスを、３０００ｍｍ^{3}の腫瘍容量に達する前に安楽死させた；非処置ビヒクル対照について、対応する数は、１０匹中５匹であった。ＰＲＩＴ群およびＲＩＴ群では、問題は、それほど顕著ではなく、３工程ＰＲＩＴ群、２工程ＰＲＩＴ群、および１工程ＲＩＴ群では、それぞれ、１０匹中１匹、１０匹中２匹、および１０匹中２匹のマウスを、たこの理由で安楽死させた。これは、図１５の個別の腫瘍増殖曲に反映されている。

【０６１６】

最後に、群Ｃ内の１匹のマウスを、肛門下方の創傷の増悪のために安楽死させた。

【０６１７】

全ての有害事象を、下記の表に列挙する。

プロトコール１６０における有害事象

群	屠殺マウス数（群１つ当たりの例数）	研究日	打切りの理由
A: ビヒクル	5(10)	53, 71, 71, 73, 75	腫瘍状態の悪化
B: DIG–DOTAM	9(10)	55, 55, 55, 55, 61, 73, 73, 73, 74	腫瘍状態の悪化
C: CEA –DOTAM	1(10)	83	肛門下方の創傷
C: CEA –DOTAM	1(10)	85	腫瘍状態の悪化
D: CEA–スプリット–DOTAM	2(10)	83, 83	腫瘍状態の悪化
E: ^{212}Pb–DOTAM–CEA–DOTAM	8(10)	29, 29, 30, 31, 31, 32, 32, 34	体重減少≧20%
E: ^{212}Pb–DOTAM–CEA–DOTAM	2(10)	83, 83	腫瘍状態の悪化

^{212}Pb 照射は、研究の 23(サイクル 1)、37(サイクル 2)、および 51(サイクル 3)日目に実施した。

【０６１８】

結論

３工程スキーム（ＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ　ＢｓＡｂ、ＣＡ、および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）を使用するＣＥＡ－ＰＲＩＴと、２工程スキーム（ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体および^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ）を使用するＣＥＡ－ＰＲＩＴとの間に、差違は見られなかった；ＴＧＩは、２つの処置について、著明かつ同一であり、いずれの場合にも、３サイクルにわたる２０μＣｉは、安全に投与された。対照的に、注射の前にＣＥＡ－ＤＯＴＡＭにあらかじめ結合している、２０μＣｉの^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ（１工程ＲＩＴ）は、処置されたマウスの大部分により忍容されなかった。

【０６１９】

こうして、研究は、開発されたＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトを使用する、ＣＡ非依存型２工程ＰＲＩＴの忍容性および治療有効性を裏付けた。

【０６２０】

実施例７

プロトコール１７５

プロトコール１７５の目的は、注入されるプレターゲティング抗体量の増大の、その後における、腫瘍組織内および健常組織内の^{212}Ｐｂの蓄積に対する影響について評価することであった。ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の２つの異なる用量：標準量（１００μｇ）と、２．５倍の高用量（２５０μｇ）とを比較した。さらに、そのＶＨを伸長させて、抗薬剤抗体（ＡＤＡ）の形成を回避するように、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨコンストラクトに修飾を施した（これを、既に調べられたＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬコンストラクトと併せて使用した）。抗体のＣＨ１ドメインに由来する、最初の３つのアミノ酸：アラニン、セリン、およびスレオニン（ＡＳＴ）を含むようにＶＨを伸長させ、本明細書の以下では、コンストラクトを、抗体のＣＨ１ドメインに由来する、最初の３つのアミノ酸：アラニン、セリン、およびスレオニン（ＡＳＴ）と称する。

【０６２１】

抗体Ｐ１ＡＤ８５９２については、上記の実施例４で既に記載した。Ｐ１ＡＦ０１７１は、融合ＨＣが、残基ＡＳＴにより伸長される点を除き、Ｐ１ＡＤ８７４９と同じである。（したがって、抗体Ｐ１ＡＤ０１７１は、上記で記載された軽鎖である、Ｄ１ＡＡ３３

８４（配列番号３４）、上記で記載された第１の重鎖である、Ｄ１ＡＣ４０２２（配列番号２８）、および下記に示される第２の重鎖である、Ｄ１ＡＥ３６６９：
Ｄ１ＡＥ３６６９（ＨＣｋｎｏｂ＜ＣＥＡ＞ＣＨ１Ａ１Ａ　Ｄｏｔａｍ－ＶＨ－ＡＳＴ）
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTKT
GEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
GGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSTYSMSWI
RQPPGKALEWLGFIGSRGDTYYASWAKGRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDTATY
YCARERDPYGGGAYPPHLWGRGTLVTVSSAST（配列番号１４７）
からなる）。

【０６２２】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するマウスに、

・標準用量の１倍容量のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂの７日後における、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ、または

・標準用量の２．５倍容量のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂの７日後における、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ

を注入した。

【０６２３】

^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける分布を、放射性物質注射の２４時間後に評価した。研究の概観を、図１７に示す。

【０６２４】

研究デザイン

プロトコール１７５の時間経過およびデザインを、下記に示す。

プロトコール１７５の時間経過

研究日	実験手順
0	BxPC3 細胞の調製、およびシリンジの充填
0	BxPC3 細胞の SC 注入
22	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL BsAb の IP*注射
29	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
29	^{212}Pb-DOTAM の IV 注射
30	安楽死、および組織採取(注入の 24 時間後)+ガンマカウンティング

*低化合物濃度のために要求される IP 注射量
(コンストラクト 1 つ当たり 200μL=合計 400μL)

プロトコール１７５における研究群

群	P1AF0171 (VH-AST) （μg）	P1AD8592 (VL) （μg）	^{212}Pb （μCi）	BD （注入後時間）	例数 （マウス匹）
A	143*	100	10	24	4
B	357*	250	10	24	4

*P1AF0171 の用量は、約 30%のホール/ホール不純物について補償するように、143～357μｇへと調整した。

【０６２５】

固形異種移植片は、研究０日目に、ＲＰＭＩ／マトリゲル中の細胞５×１０^{6}個（第２４継代）の、右脇腹へのＳＣ注入により、各ＳＣＩＤマウスにおいて確立した。腫瘍細胞注入の２１日後に、マウスを、平均腫瘍体積を３１０ｍｍ^{3}とする実験群に分けた。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、接種後２９日目に注入した；平均腫瘍体積は、３０日目において、４６２ｍｍ^{3}であった。

【０６２６】

全てのマウスを　　殺し、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の２４時間後に剖検し、放射性物質の含有量の測定のために、以下の臓器および組織：血液、皮膚、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、筋肉、尾、および腫瘍を採取した。

【０６２７】

結果

注射の２４時間後における全ての回収組織内の平均^{212}Ｐｂ分布を、図１８に示す。２つの用量レベルの間で、腫瘍組織または正常組織内の^{212}Ｐｂの取込みに有意差は見られなかった。腫瘍蓄積は、いずれの処置群については、１ｇ当たり３０～３１％のＩＤであり、腎臓への取込みは、この時点において、１ｇ当たり＜２％のＩＤであった。１匹のマウスは、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射問題のために、尾内に、１ｇ当たり約１％のＩＤを有したが、他の回収健常組織は、相当量の^{212}Ｐｂ蓄積を示さなかった。

【０６２８】

有害事象および毒性

本研究と関連する有害事象または毒性は見られなかった。

【０６２９】

結論

このｉｎ　ｖｉｖｏモデルでは、プレターゲティングＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体の用量の、２．５倍の増大は、続いて投与された^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの腫瘍への蓄積を改善しなかった。しかし、プレターゲティングＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体はまた、正常組織中の放射能の蓄積も増大させなかったことから、この２工程プレターゲティングレジメンを使用して達成される、強力な特異性を強調した。最後に、結果は、伸長型ＶＨＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ－ＡＳＴコンストラクトの機能について検証した。

【０６３０】

実施例８

プロトコール１８５

プロトコール１８５の目的は、Ｔ８４．６６エピトープをターゲティングする、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬについて評価することであった。本明細書では、Ｐ１ＡＦ０７０９およびＰ１ＡＦ０２９８の配列が提示される。Ｐ１ＡＦ０７０９は、Ｄ１ＡＥ４６８８（配列番号８３）の第１の重鎖と、Ｄ１ＡＡ４９２０（配列番号８４）の第２の重鎖とを有する。Ｐ１ＡＦ０２９８は、Ｄ１ＡＥ４６８７（配列番号８６）の第１の重鎖と、Ｄ１ＡＥ３６６８（配列番号８７）の第２の重鎖とを有する。いずれも、Ｄ１

ＡＡ４１２０（配列番号８９）の軽鎖を有する。

【０６３１】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するマウスに、標準用量のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂ（抗体１つ当たり１００μｇ）を注入した６日後に、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける分布を、放射性物質注射の６時間後に評価した。研究の概観を、図１９に示す。

【０６３２】

研究デザイン

プロトコール１８５の時間経過およびデザインを、下記に示す。

プロトコール１８５の時間経過

研究日	日付	実験手順
0	2020 年 3 月 4 日	BxPC3 細胞の調製、およびシリンジの充填
0	2020 年 3 月 4 日	BxPC3 細胞の SC 注入
22	2020 年 3 月 26 日	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL BsAb の IV 注射
27	2020 年 3 月 31 日	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
28	2020 年 4 月 1 日	^{212}Pb-DOTAM の IV 注射
28	2020 年 4 月 1 日	安楽死、および組織採取(注入の 6 時間後)+ガンマカウンティング

プロトコール１８５における研究群

群	P1AF0298 T84.66 (VH-AST) (μg)	P1AF0709 T84.66 (VL) (μg)	P1AF0171 CH1A1A (VH-AST) (μg)	P1AD8592 CH1A1A (VL) (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (注入後時間)	例数 (マウス匹)
A	100	100	0	0	10	6	5
B	0	0	143*	100	10	6	5

＊P1AF0171 の用量は、約 30%のホール/ホール不純物について補償するように、143μg へと調整した。

【０６３３】

固形異種移植片は、研究０日目に、ＲＰＭＩ／マトリゲル中の細胞５×１０^{6}個（第２７継代）の、右脇腹へのＳＣ注入により、各ＳＣＩＤマウスにおいて確立した。腫瘍細胞注入の２２日後に、マウスを、平均腫瘍体積を２２４ｍｍ^{3}とする実験群に分けた。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、接種後２８日目に注入した；この時点で、平均腫瘍体積は、３８５ｍｍ^{3}に達していた。

【０６３４】

全てのマウスを　　殺し、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に剖検し、放射性物質の含有量の測定のために、以下の臓器および組織：血液、皮膚、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、筋肉、尾、および腫瘍を採取した。回収された腫瘍を、２つの小片の分けた：一方を、放射性物質の含有量について測定し、他方を、Ｔｉｓｓｕｅ－Ｔｅｋ（登録商標）最適切断温度（ＯＣＴ）用包埋培地を含有するクリオモルド中に入れ、急速凍結のために、ドライアイス上に置いた。ＯＣＴ中で凍結させた試料を、凍結切片化、免疫蛍光染色、およびＺｅｉｓｓ　Ａｘｉｏ　Ｓｃｏｐｅ．Ａ１型モジュラー顕微鏡を使用する解析の前に、－８０℃で維持した。

【０６３５】

結果

注射の６時間後における全ての回収組織内の平均^{212}Ｐｂ分布を、図２０に示す。腫瘍蓄積は、１ｇ当たり４０％のＩＤ（ＣＨ１Ａ１Ａ）、または１ｇ当たり４４％のＩＤ（Ｔ８４．６６）であった。他の相当量の放射能蓄積は、腎臓内だけで見出された：２つの群について、注射の６時間後において、１ｇ当たり３～５％のＩＤであった。

【０６３６】

Ｔ８４．６６（群Ａ）またはＣＨ１Ａ１Ａ（群Ｂ）をターゲティングする、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対の腫瘍内分布の例を、図２１に示す。パネルＡおよびＣは、ＣＥＡの発現が、ＢｘＰＣ３腫瘍内で、高度かつ均一であることを示し、パネルＢおよびＤは、注入の７日後における抗体分布が同様であることを裏付ける。しかし、群Ａからの試料は、群Ｂからの腫瘍試料と比較して、全体として強いシグナルを提示し、Ｔ８４．６６が、ＣＨ１Ａ１Ａより強い結合剤であることの証拠を提示する。

【０６３７】

有害事象および毒性

本研究と関連する有害事象または毒性は見られなかった。

【０６３８】

結論

結果は、ＣＥＡのＴ８４．６６エピトープをターゲティングする、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトの機能について検証した。結果として得られる、プレターゲティングされたＣＥＡ発現腫瘍内の^{212}Ｐｂの蓄積は、高度かつ特異的であり、ＣＨ１Ａ１Ａエピトープまたは Ｔ８４．６６エピトープをターゲティングする、ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対は、ＣＥＡ発現腫瘍の内部において、均一に分布した。

【０６３９】

実施例９

プロトコール１８９

プロトコール１８９の目的は、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ／ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬおよびＴ８４．６６　ＶＬ／ＣＨ１Ａ１　ＶＨ－ＡＳＴをターゲティングする、二重パラトープＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ抗体対について、ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＨ－ＡＳＴ／ＶＬをターゲティングするポジティブコントロール対と比較して評価することであった。この二重パラトープの組合せは、２つのエピトープのうちの１つ（例えば、Ｔ８４．６６エピトープ）だけを発現させる、可溶型ＣＥＡ上における、完全なＰｂ－ＤＯＴＡＭ結合剤の形成を排除し、これにより、循環放射能の増大、および関連する照射誘導性毒性、ならびに腫瘍オフ標的との競合に由来する有効性の減少など、その潜在的有害作用を緩和する。

【０６４０】

ＳＣ　ＢｘＰＣ３腫瘍を保有するマウスに、標準用量のＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ　ＢｓＡｂ（抗体１つ当たり１００μｇ）を注入した７日後に、放射性標識^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを注射した。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける分布を、放射性物質注射の６時間後に評価した。研究の概観を、図２２に示す。

【０６４１】

研究デザイン

プロトコール１８９の時間経過およびデザインを、下記に示す。

プロトコール１８９の時間経過

研究日	実験手順
0	BxPC3 細胞の調製、およびシリンジの充填
0	BxPC3 細胞の SC 注入
15	CEA-スプリット-DOTAM-VH/VL BsAb の IV 注射
21	^{212}Pb-DOTAM の溶出、およびシリンジの充填
22	^{212}Pb-DOTAM の IV 注射
22	安楽死、および組織採取(注入の 6 時間後)+ガンマカウンティング

プロトコール１８９における研究群

群	P1AF0298 T84.66 (VH-AST) (μg)	P1AF0709 T84.66 (VL) (μg)	P1AF0171 CH1A1A (VH-AST) (μg)	P1AD8592 CH1A1A (VL) (μg)	^{212}Pb (μCi)	BD (注入後時間)	例数 (マウス匹)
A	100	0	0	100	10	6	5
B	0	100	143*	0	10	6	5
C	0	0	143*	100	10	6	3

＊P1AF0171 の用量は、約 30%のホール/ホール不純物について補償するように、143μg へと調整した。

【０６４２】

固形異種移植片は、研究０日目に、ＲＰＭＩ／マトリゲル中の細胞５×１０^{6}個（第３１継代）の、右脇腹へのＳＣ注入により、各ＳＣＩＤマウスにおいて確立した。腫瘍細胞注入の１４日後に、マウスを、平均腫瘍体積を３４３ｍｍ^{3}とする実験群に分けた。^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭを、接種後２２日目に注入した；平均腫瘍体積は、２１日目において、５５７ｍｍ^{3}に達していた。

【０６４３】

全てのマウスを　　殺し、^{212}Ｐｂ－ＤＯＴＡＭの注射の６時間後に剖検し、放射性物質の含有量の測定のために、以下の臓器および組織：血液、皮膚、脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、筋肉、尾、および腫瘍を採取した。

【０６４４】

結果

注射の６時間後における全ての回収組織内の平均^{212}Ｐｂ分布を、図２３に示す。二重パラトープの腫瘍への蓄積の変動は、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬおよびＴ８４．６６　ＶＬ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＨ－ＡＳＴのそれぞれについて、１ｇ当たり７１％のＩＤ～１ｇ当たり４６％のＩＤであった。ポジティブコントロールである、ＣＨ１Ａ１Ａは、１ｇ当たり３７％のＩＤを結果としてもたらした。チューキーの多重比較検定による二元ＡＮＯＶＡは、３つの群全ては、腫瘍への取込みの点で、互いと著明に異なること（他の２つの群と対比した、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬについてのｐ＜０．０００１；ＣＨ１Ａ１Ａだけと対比した、Ｔ８４．６６　ＶＬ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＨ－ＡＳＴについてのｐ＝０．００２０）を示した。他の臓器は、群間の統計学的有意差を示さなかったが、他の２つの群：１ｇ当たり＜１％のＩＤと比較した、

１ｇ当たり２％のＩＤと比較した、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬの組合せについて、血液中の、わずかに高度の保持が指し示された。腎臓への取込みは、統計学的に有意にではないが、同様に、わずかに高度であった：他の２つの群についての、１ｇ当たり３％のＩＤと比較された、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａについて１ｇ当たり４．５％のＩＤであった。

【０６４５】

有害事象および毒性

本研究と関連する有害事象または毒性は見られなかった。しかし、本研究におけるＢｘＰＣ３腫瘍の増殖は、標準的な増殖速度と比較して、有意に速く、ばらつきの増大を伴った。剖検時に、大型の腫瘍（大部分）は、放射能の測定の前に、腫瘍を半分に切断するとなくなる液体で充たされていることが結論づけられた；この液体は、増殖速度の加速化により引き起こされた可能性が高いが、腫瘍は、開口させた後で秤量し、測定したので、１ｇ当たりのＩＡ％に、大きな程度で影響を及ぼすことはなかった。

【０６４６】

結論

結果は、被験ＣＥＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬコンストラクトを使用して、ＣＥＡのＴ８４．６６エピトープおよびＣＨ１Ａ１Ａエピトープをターゲティングする二重パラトープの機能について検証し、驚くべきことに、この組合せについて、ポジティブコントロールである、ＣＨ１Ａ１Ａと比較した、高度の有効性を裏付けた。結果として得られる、プレターゲティングされたＣＥＡ発現腫瘍内の^{212}Ｐｂの蓄積は、高度かつ特異的であり、Ｔ８４．６６　ＶＨ－ＡＳＴ＋ＣＨ１Ａ１Ａ　ＶＬ対について、特定の利点を指し示した。

【０６４７】

実施例１０

これらの例は、本明細書で記載されるスプリット抗体による、Ｐｂ－ＤＯＴＡの、細胞への動員について探索する。

【０６４８】

Ｐ１ＡＦ０７１２は、配列番号９７の第１の重鎖、配列番号９８の第２の重鎖、および配列番号１０３の軽鎖を有する。Ｐ１ＡＦ０７１３は、配列番号１００の第１の重鎖、配列番号１０１の第２の重鎖、および配列番号１０３の軽鎖を有する。

【０６４９】

トリプシンを使用して、ＭＫＮ－４５細胞を、培養ボトルから解離させ、Ｃａｓｙ細胞カウンターを使用してカウントした。４℃、３００ｇにおけるペレット化の後、細胞を、ＦＡＣＳバッファー（ＰＢＳ中に２．５％のＦＣＳ）中に再懸濁させ、９６ウェルＰＰ製Ｖ字底プレート（ウェル１つ当たり２５μＬ＝ウェル１つ当たりの細胞５．０×１０^{4}個）に分注される、１ｍＬ当たりの細胞２．０×１０^{6}個に調整した。

【０６５０】

ＤＯＴＡ－ＦＩＴＣを使用するＦＡＣＳ染色

ＣＥＡ特異的スプリット抗体（それぞれ、Ｐ１ＡＦ０７１２またはＰ１ＡＦ０７１３）を、ＦＡＣＳバッファー中に４０μｇ／ｍＬに調整する結果として、１０μｇ／ｍＬの最終濃度をもたらした。両方の抗体を、組み合わせて、または個別に、細胞に添加するのに続き、バッファーを添加し、４℃で、１時間にわたりインキュベートした。その後、Ｐｂ－ＤＯＴＡ標識ＦＩＴＣを、抗体に対する等モル比で、細胞に添加し、４℃で、１時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を、ＦＡＣＳバッファー中で、２回にわたり洗浄し、ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ（ＢＤ、Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を使用する測定のために、ウェル１つ当たり７０μｌのＦＡＣＳバッファー中に再懸濁させた。スプリットの片割れのいずれも、蛍光シグナルをもたらさなかったことが示された（図２４）ことは、Ｐｂ－ＤＯＴＡへの結合能の欠如を指し示す。スプリットの片割れ両方の組合せだけが、Ｐｂ－ＤＯＴＡＭ－ＦＩＴＣを、標的細胞に動員することが可能であった（図２４）。

【０６５１】

＜ｈｕＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）Ａ４８８＞を使用するＦＡＣＳ染色

ＣＥＡ特異的スプリット抗体（それぞれ、Ｐ１ＡＦ０７１２またはＰ１ＡＦ０７１３）を、ＦＡＣＳバッファー中に４０μｇ／ｍＬに調整する結果として、１０μｇ／ｍＬの最終濃度をもたらした。両方の抗体を、細胞に、個別に添加するのに続き、バッファーを添加するか、または組み合わせて添加し、４℃で、１時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を、ＦＡＣＳバッファー中で、２回にわたり洗浄した。洗浄した後で、細胞を、二次抗体（＜ｈｕＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）＞－Ａｌｅｘａ４８８、濃度＝１０μｇ／ｍＬ）を含有する、５０μＬのＦＡＣＳバッファー中に再懸濁させ、４℃で、１時間にわたりインキュベートした。次いで、細胞を、ＦＡＣＳバッファー中で、２回にわたり洗浄し、ＦＡＣＳ Ｃａｎｔｏ（ＢＤ、Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を使用する測定のために、ウェル１つ当たり７０μｌのＦＡＣＳバッファー中に再懸濁させた。両方のスプリット抗体についてのＥＣ５０が同等であったことは、両方のスプリット抗体の、ＣＥＡ特異的細胞への結合を指し示す。これらの状況下では、下記の表において示される通り、混合物中に高量の抗体のために、低値のＥＣ５０が得られた。

スプリット抗体のＥＣ５０の決定

		絶対量による EC50 (μg/ml)
<hu>A488	P1AF0712+ PBS	2.7
	P1AF0713+ PBS	2.3
	P1AF0712+ P1AF0713	0.9
	hu ISO + PBS	
DOTA-FITC	P1AF0712+ PBS	該当なし
	P1AF0713+ PBS	該当なし
	P1AF0712+ P1AF0713	2.4
	hu ISO + PBS	

二次抗体ベースの検出(<hu>488;上パネル)またはPb-DOTA-FITC(DOTA-FITC;下パネル)を使用して、スプリット抗体について、EC50を決定した。

【０６５２】

実施例１１

Ｂｉａｃｏｒｅ結合実験

本実施例は、ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ、およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬの、ＤＯＴＡＭへの結合について、参照抗体であるＣＥＡ－ＤＯＴＡＭ（ＲＯ７１９８４２７、ＰＲＩＴ－０２１３）と比較して、個別に調べる。本実施例は、ＤＯＴＡＭの、ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対への結合についても、参照抗体と比較してさらに調べる。

【０６５３】
これらの例において使用されるコード化と、本出願の別の箇所で使用されるタンパク質番号との対応を、下記に示す。配列もまた、提示される。本実施例では、参照抗体は、「ＰＲＩＴ＿ＲＳ」とコード化される。

標的結合剤	SPRコード(プロドラッグ A+B)	SPRコード	DOTAM	タンパク質	LC（配列番号）	HC（配列番号）	融合HC（配列番号）
<CEA> CH1A1A	P1_AB	P1_A	VL	P1AD8592	34	30	33
		P1_B	VH	P1AD8749	34	28	32
<CEA> CH1A1A	P2_AB	P2_A	VL	P1AD8592	34	30	33
		P2_B	VH	P1AF0171	34	28	147
<CEA> T84.66	P3_AB	P3_A	VL	P1AF0709	89	83	84
		P3_B	VH	P1AF0298	89	86	89
<CEA> 28A9	P4_AB	P4_A	VL	P1AF0710	96	90	91
		P4_B	VH	P1AF0711	96	93	94
<CEA> A5H1EL1(G54A)	P5_AB	P5_A	VL	P1AE4957	58	55	56
		P5_B	VH	P1AE4956	54	51	52
<CEA> CH1A1A	P6_AB	P6_A	VL	P1AF0712	103	97	98
		P6_B	VH	P1AF0713	103	100	101
<GPRC5D>	P7_AB	P7_A	VL	P1AF8284	107	104	105
		P7_B	VH	P1AF8285	107	104	106

【０６５４】
これらの実験のために、ＰＲＩＴスプリット抗体を、ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅ（親和性クロマトグラフィー）による第１の工程、およびイオン交換クロマトグラフィー（例えば、ＰＯＲＯＳ　ＸＳ）による第２の工程により精製し、次いで、Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００（サイズ排除クロマトグラフィー）により精製した。
【０６５５】
実験は、測定温度を２５℃として、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００により．全てのＢｉａｃｏｒｅ　Ｔ２００実験は、ｐＨ７．４のＨＢＳ－Ｐ＋（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｂｒ－１００８－２７）ランニングバッファー中で実施した。２つの実験は、異なるＤＯＴＡＭ画分を使用して、被験抗体／抗体対について実施した。
【０６５６】
１．第１の実験では、個別のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体、およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体のチップ上に捕捉されたビオチン化ＤＯＴＡＭへの結

合を、参照抗体と比べて評価した。

【０６５７】

ＤＯＴＡＭ（ＨＢＳ－Ｐ＋中の１２０ｎＭ溶液）を、ＣＡＰ　Ｃｈｉｐ表面上の高密度で捕捉した（１０μｌ／分、６０秒間）。次いで、プロドラッグ＿Ａまたはプロドラッグ＿Ｂの、ＨＢＳ－Ｐ＋中の６００ｎＭ溶液を、ＤＯＴＡＭ表面上に注入した（１０μｌ／分、９０秒間）。解離を、１０μｌ／分の流量で、２４０秒間にわたりモニタリングした。相対最大応答決定は、Ｔ２００査定ソフトウェアを使用して査定した。

【０６５８】

結果を、図２６に示す。個別の抗体のうちのいずれも、捕捉されたＤＯＴＡＭへの結合を示さなかった。

【０６５９】

２．第２の実験では、固定化抗ｈＦａｂを使用して、まず、個別のＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ抗体、およびＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＬ抗体を、チップ内に捕捉し、次いで、ＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体（ＲＴで１時間にわたる、１：１のモル比による、６００ｎＭのＤＯＴＡＭ＋モノストレプトアビジンカップリング）の結合を評価した。

【０６６０】

プロドラッグ＿Ａまたはプロドラッグ＿Ｂの、ＨＢＳ－Ｐ＋中の６００ｎＭ溶液を、抗ｈＦａｂ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＢＲ－１００８－２７）ＣＭ５　Ｃｈｉｐ表面上に注入した（１０μｌ／分、１２０秒間）。プロドラッグ＿Ａ溶液またはプロドラッグ＿Ｂ溶液の、高密度捕捉の後、ＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体を注入した（２０μｌ／分、９０秒間）。解離を、２０μｌ／分の流量で、１８０秒間にわたりモニタリングした。新たなサイクルのために、Ｇｌｙｃｉｎ　２．１および１０μｌ／分で、７５秒間の再生時間を使用することにより、表面を再生した。相対最大応答決定は、Ｔ２００査定ソフトウェアを使用して査定した。

【０６６１】

結果を、図２７に示す。低百分率の最大応答（図中に、＊でマークした）は、ＤＯＴＡＭ－ＳＡとの、「微量」相互作用または非特異的相互作用であると考えられ、アッセイを最適化する必要を反映する。

【０６６２】

３．第３の実験では、ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対のＤＯＴＡＭへの結合を、参照抗体と比較して評価する。固定化抗ｈＦａｂを使用して、まず、抗体を、チップ内に捕捉し、次いで、ＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体（ＲＴで１時間にわたる、１：１のモル比による、６００ｎＭのＤＯＴＡＭ＋モノストレプトアビジンカップリング）の結合を評価した。

【０６６３】

プロドラッグ＿Ａおよびプロドラッグ＿Ｂの、ＨＢＳ－Ｐ＋中の３００ｎＭ溶液を、抗ｈＦａｂ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、ＢＲ－１００８－２７）ＣＭ５　Ｃｈｉｐ表面上に注入した（１０μｌ／分、１２０秒間）。プロドラッグ＿Ａ溶液およびプロドラッグ＿Ｂ溶液の、高密度捕捉の後、ＤＯＴＡＭ－モノストレプトアビジン複合体を注入した（２０μｌ／分、９０秒間）。解離を、２０μｌ／分の流量で、１８０秒間にわたりモニタリングした。新たなサイクルのために、Ｇｌｙｃｉｎ　２．１および１０μｌ／分で、７５秒間の再生時間を使用することにより、表面を再生した。相対最大応答決定は、Ｔ２００査定ソフトウェアを使用して査定した。

【０６６４】

結果を、図２８に示す。全てのＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対は、ＤＯＴＡ結合剤である、Ｐ６＿ＡＢ（Ｐ１ＡＦ０７１２／Ｐ１ＡＦ０７１３）対を除き、ＤＯＴＡＭに対する、著明量の結合を示した。

【０６６５】

ＦＡＰ結合剤である、Ｐ１ＡＦ８２８６およびＰ１ＡＦ８２８７についてもまた、著明

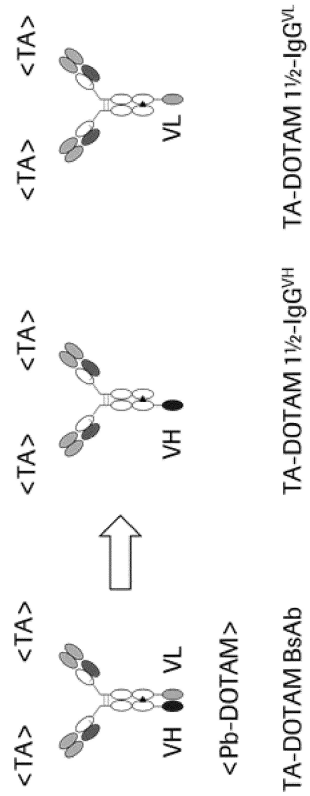
量のＤＯＴＡＭの、ＴＡ－スプリット－ＤＯＴＡＭ－ＶＨ／ＶＬ対に対する結合を示すが、対の個々のメンバーに対する著明量の結合は示さない、同様の結果が得られた。Ｐ１ＡＦ８２８６は、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１０９の第２の重鎖、および配列番号１１１の軽鎖から構成され、Ｐ１ＡＦ８２８７は、配列番号１０８の第１の重鎖、配列番号１１０の第２の重鎖、および配列番号１１１の軽鎖から構成される。しかし、このアッセイは、最適化されることをさらに必要とする。

【０６６６】

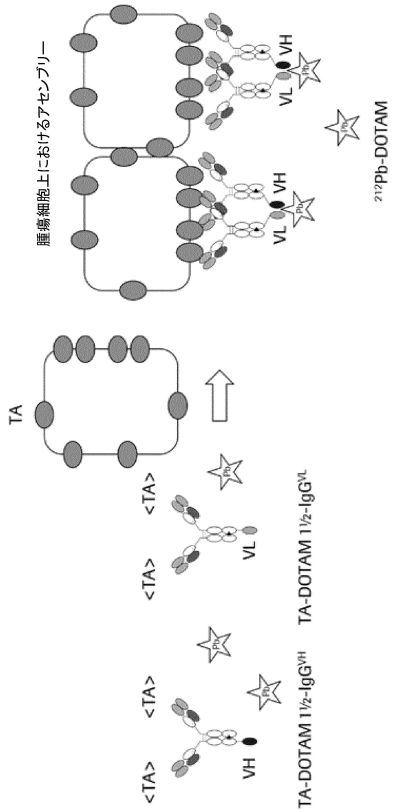
理解の明確さを目的とする、例示および例のために、前出の発明について、ある程度詳しく記載されたが、記載および例は、本発明の範囲を限定するものとして考えられるべきではない。本明細書で引用される、全ての特許および学術文献の開示は、参照によりそれらの全体において明示的に組み込まれる。

【図面】

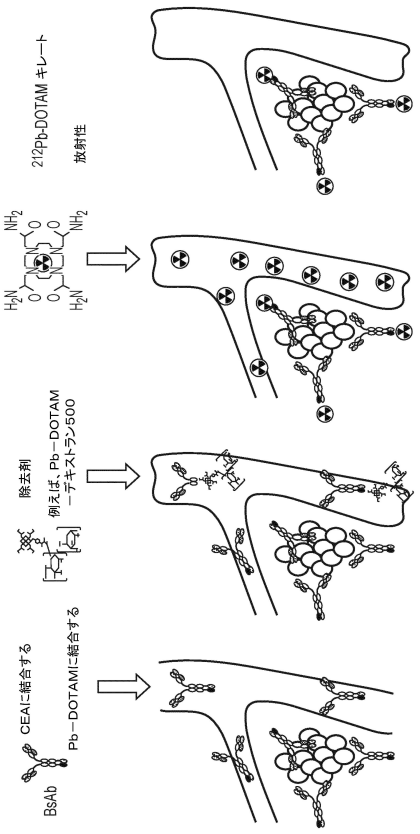
【図１】



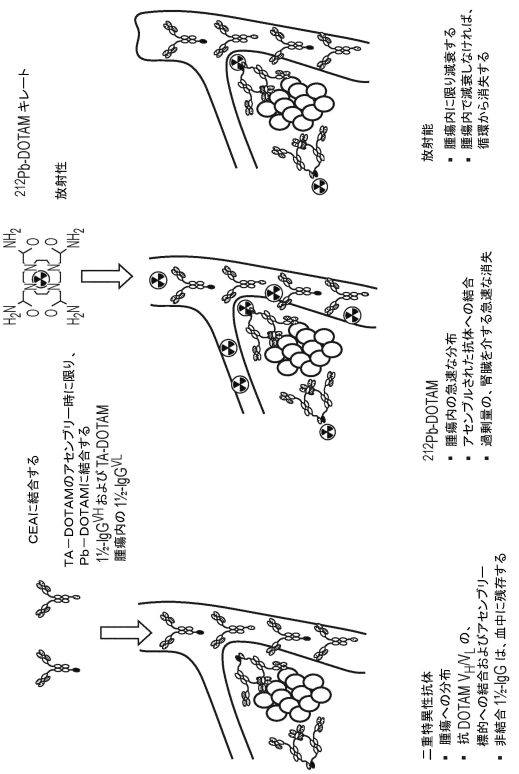
【図２】



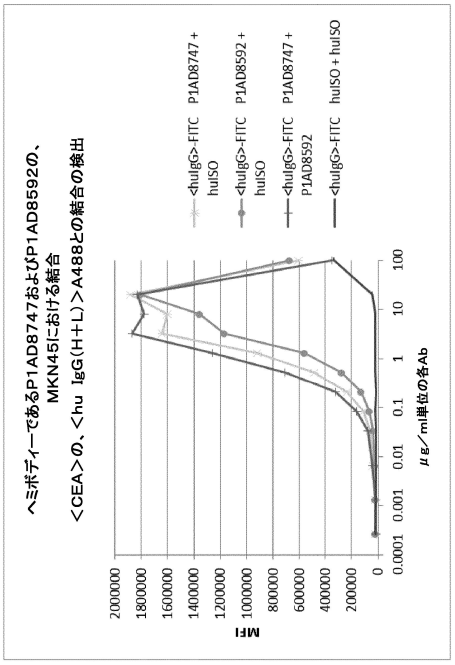
【図３】


BsAb
CEAに結合する
Pb−DOTAMに結合する
除去剤
例えば、Pb−DOTAM
−デキストラン500
^{212}Pb-DOTAM キレート
放射性

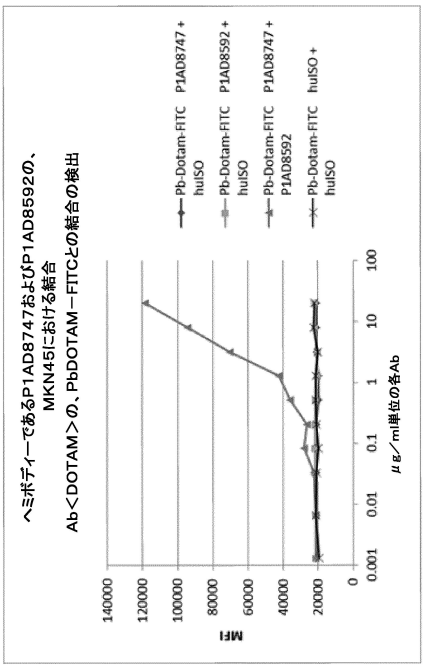
【図４】


CEAに結合する
TA−DOTAMのアセンブリー時に限り、
Pb−DOTAMに結合する
1½-IgG^{VH}およびTA-DOTAM
腫瘍内の 1½-IgG^{VL}
^{212}Pb-DOTAM キレート
放射性
^{212}Pb-DOTAM
• 腫瘍内の急速な分布
• アセンブルされた抗体への結合
• 過剰量の、腎臓を介する急速な消失
放射能
• 腫瘍内に限り滅表する
• 腫瘍内で滅衰しなければ、
循環から消失する
二重特異性抗体
• 腫瘍への分布
• 抗 DOTAM V_H/V_L の、
標的への結合およびアセンブリー
• 非結合 1½-IgG は、血中に残存する

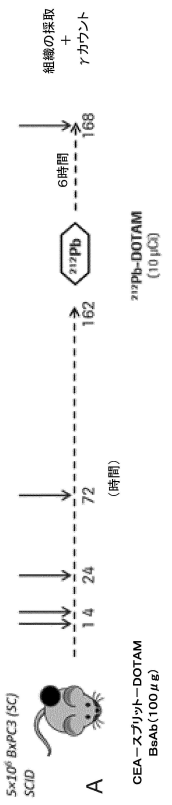
【図５】


ヘミボディーであるP1AD8747およびP1AD8592の、
MKN45における結合
<CEA>の、<hu IgG(H+L)>A488との結合の検出
<huIgG>-FITC huISO
<huIgG>-FITC huISO
<huIgG>-FITC P1AD8592
<huIgG>-FITC huISO + huISO
P1AD8747 +
P1AD8592 +
P1AD8747 +
MFI
μg/ml単位の各Ab

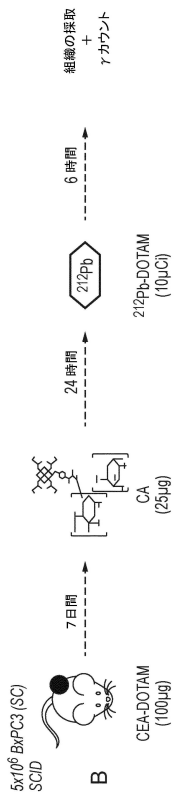
【図６】


ヘミボディーであるP1AD8747およびP1AD8592の、
MKN45における結合
Ab<DOTAM>の、PbDOTAM−FITCとの結合の検出
Pb-Dotam-FITC huISO
Pb-Dotam-FITC huISO
Pb-Dotam-FITC P1AD8592
Pb-Dotam-FITC huISO
P1AD8747 +
P1AD8592 +
P1AD8747 +
huISO +
MFI
μg/ml単位の各Ab

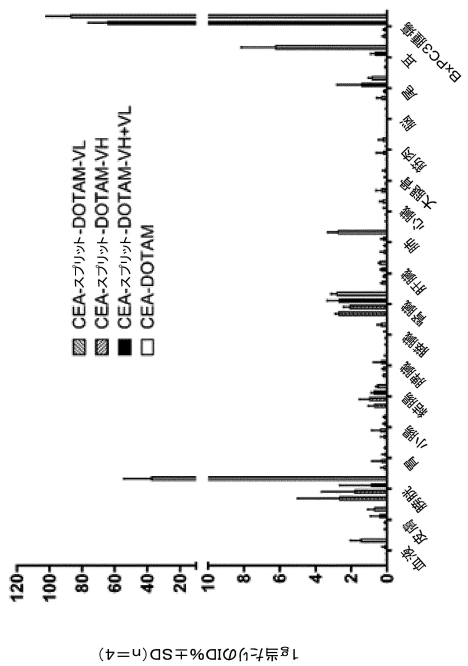
【図７Ａ】


5×10⁶ BxPC3 (SC)
SCID
A
CEA－スプリット－DOTAM
BsAb(100μg)
1 4
24
72
(時間)
眼窩後採血(血清)→ELISA
162
²¹²Pb
6時間
168
²¹²Pb-DOTAM
(10μCi)
組織の採取
＋
γカウント

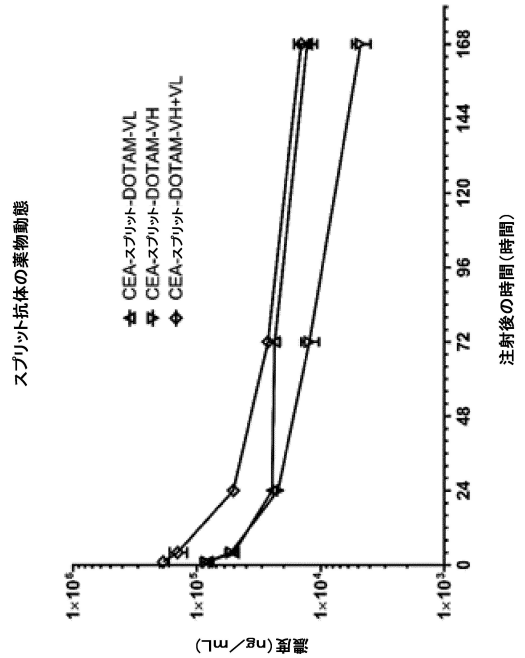
【図７Ｂ】


5×10⁶ BxPC3 (SC)
SCID
B
CEA-DOTAM
(100μg)
7日間
CA
(25μg)
24時間
²¹²Pb
²¹²Pb-DOTAM
(10μCi)
6時間
組織の採取
＋
γカウント

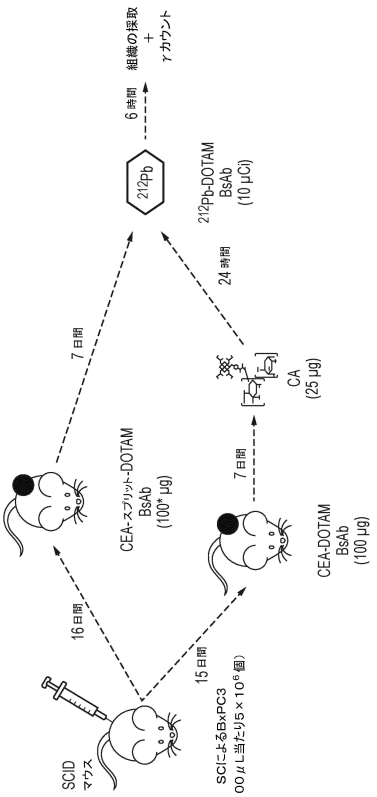
【図８】


CEA-スプリット-DOTAM-VL
CEA-スプリット-DOTAM-VH
CEA-スプリット-DOTAM-VH+VL
CEA-DOTAM
1g当たりのID%±SD(n=4)
血液
皮膚
腎臓
肺
小腸
結腸
膵臓
脾臓
肝臓
胃
心臓
大腸
膀胱
脳
腎
耳
BxPC3腫瘍

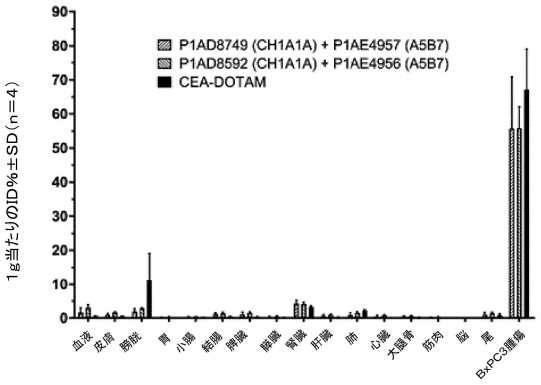
【図９】


スプリット抗体の薬物動態
CEA-スプリット-DOTAM-VL
CEA-スプリット-DOTAM-VH
CEA-スプリット-DOTAM-VH+VL
濃度(ng／mL)
注射後の時間(時間)

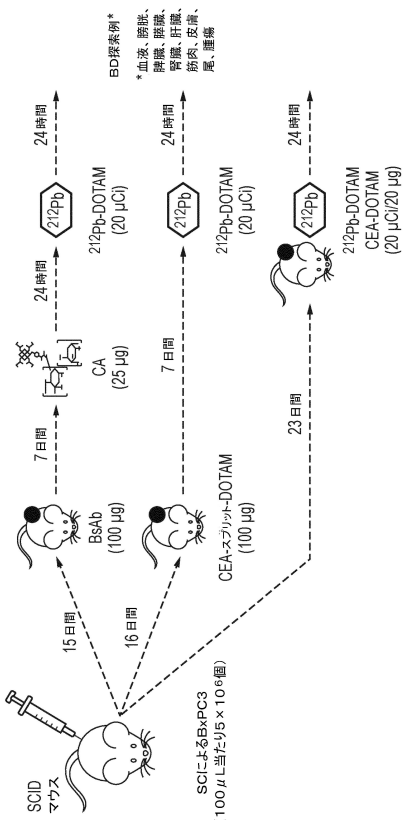
【図１０】



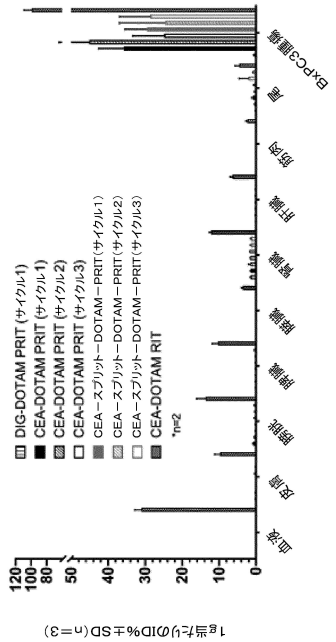
【図１１】



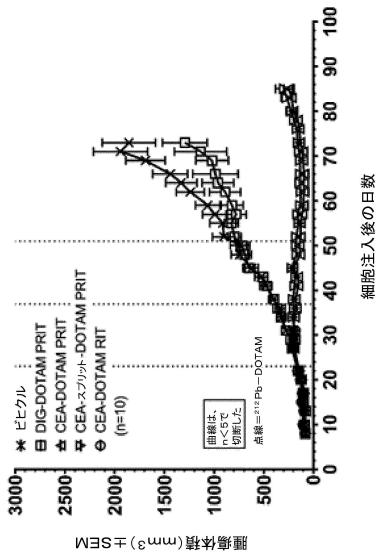
【図１２】



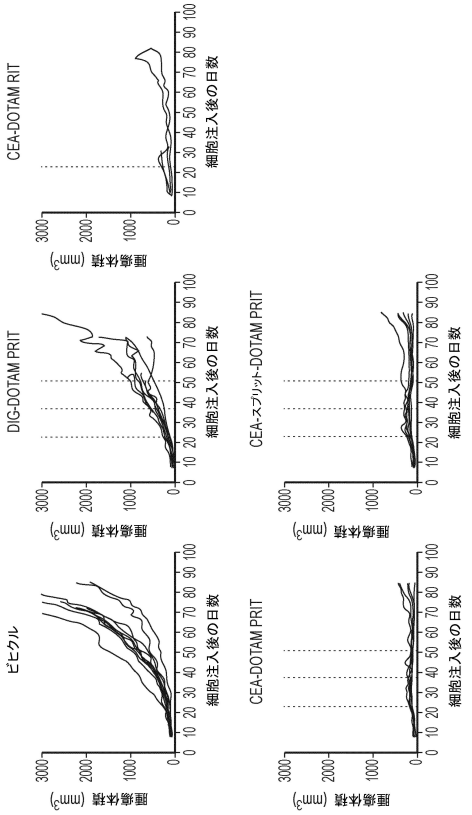
【図１３】



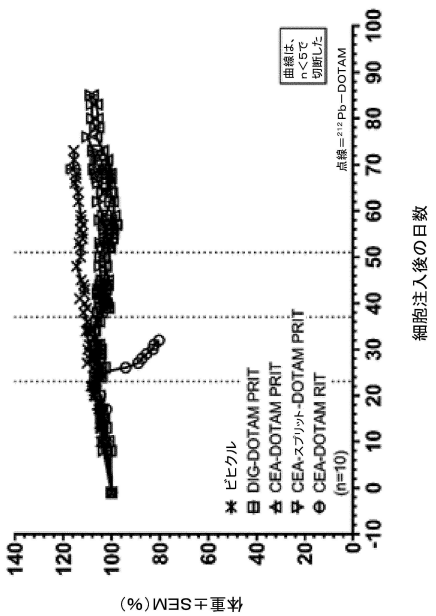
【図１４】



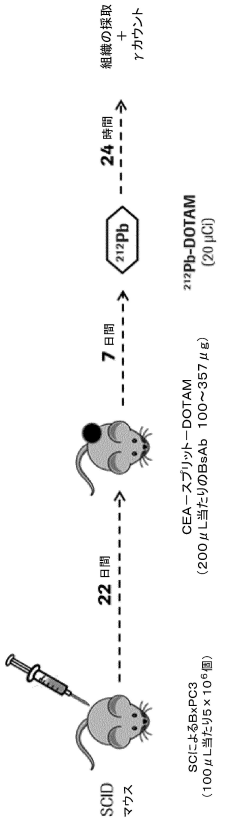
【図１５】



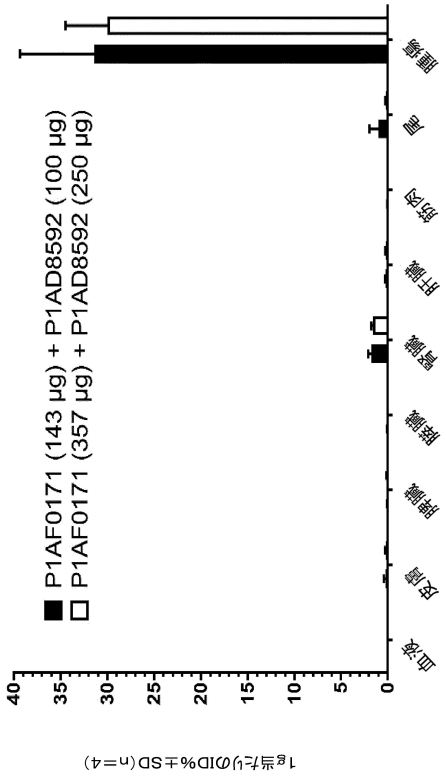
【図１６】



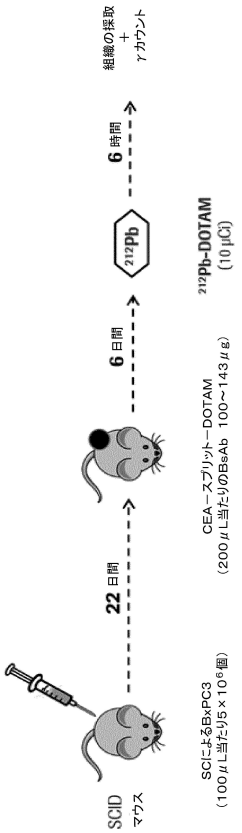
【図１７】



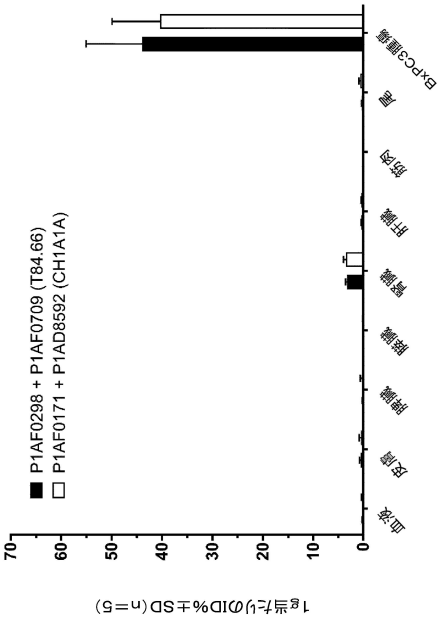
【図１８】



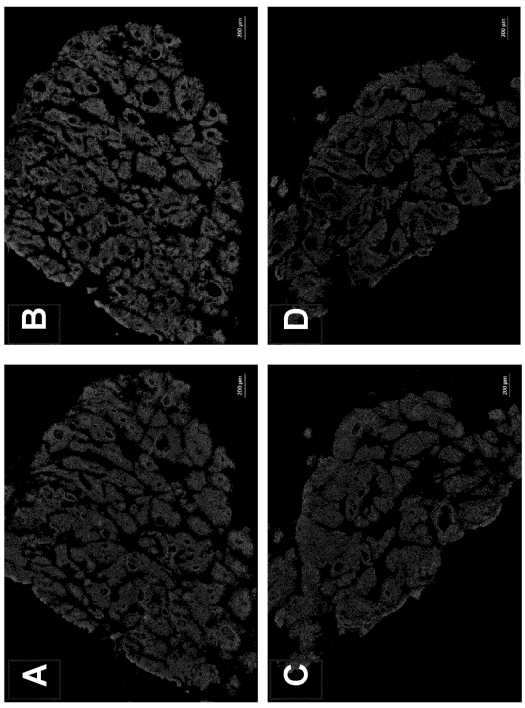
【図１９】



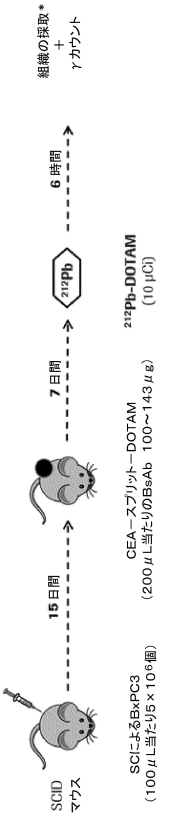
【図２０】



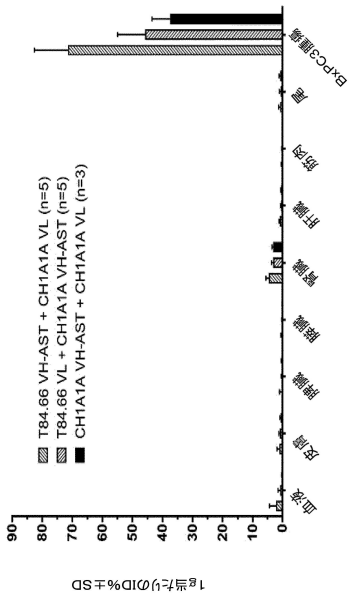
【図２１】



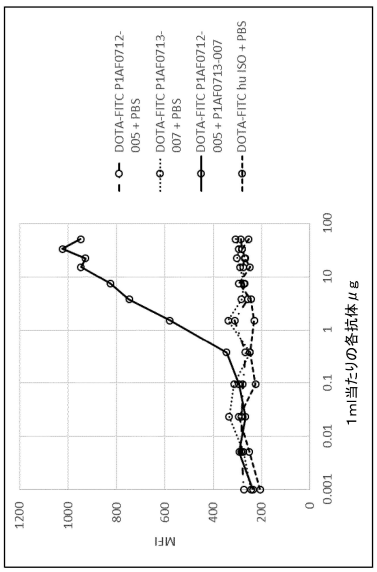
【図２２】



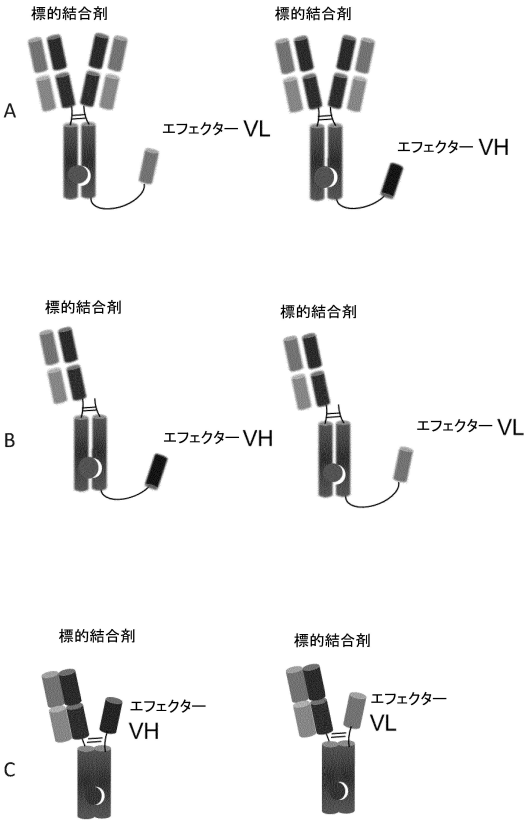
【図２３】



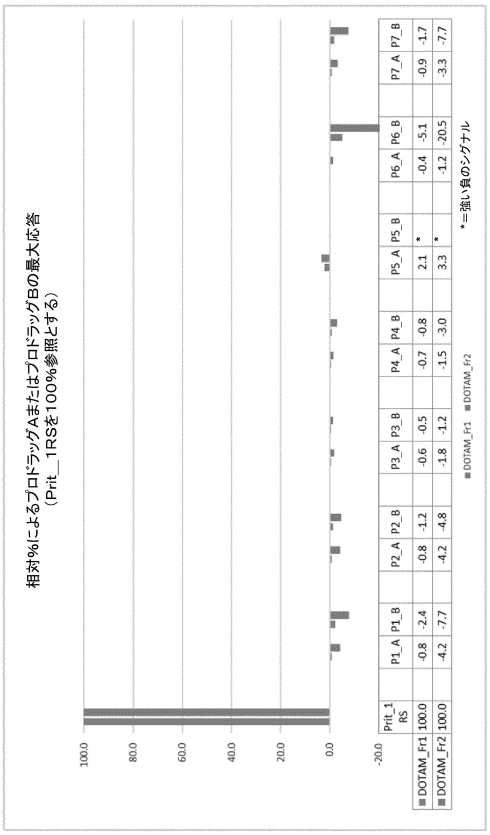
【図２４】



【図２５Ａ－Ｃ】

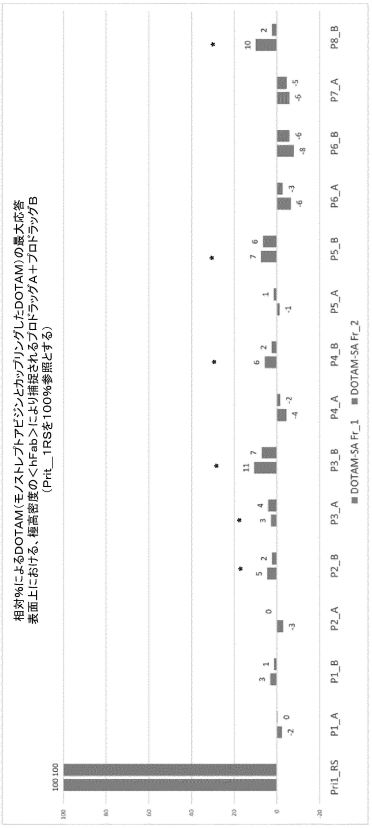


【図２６】



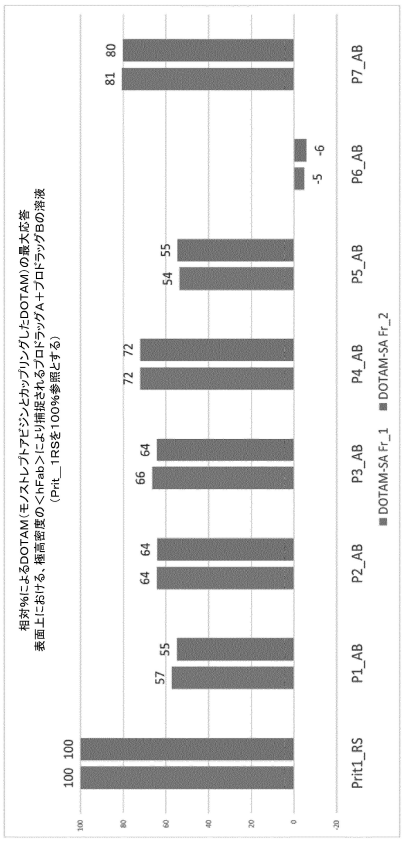
Prit_1 RS	P1_A	P1_B	P2_A	P2_B	P3_A	P3_B	P4_A	P4_B	P5_A	P5_B	P6_A	P6_B	P7_A	P7_B
DOTAM_Fr1 100.0	-0.8	-2.4	-0.8	-1.2	-0.6	-0.5	-0.7	-0.8	2.1	*	-0.4	-5.1	-0.9	-1.7
DOTAM_Fr2 100.0	-4.2	-7.7	-4.2	-4.8	-1.8	-1.2	-1.5	-3.0	3.3	*	-1.2	-20.5	-3.3	-7.7

【図２７】



Prit1_RS	P1_A	P1_B	P2_A	P2_B	P3_A	P3_B	P4_A	P4_B	P5_A	P5_B	P6_A	P6_B	P7_A	P8_B

【図２８】



Prit1_RS	P1_AB	P2_AB	P3_AB	P4_AB	P5_AB	P6_AB	P7_AB

【配列表】
20225406100000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/069561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/30 C07K16/44 A61K51/04
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/122350 A1 (STUHLER GERNOT [DE]) 27 June 2019 (2019-06-27) figure 1 page 1, paragraph 2 - last paragraph -----	1-103
X	WO 2013/104804 A2 (UNIV WUERZBURG J MAXIMILIANS [DE]) 18 July 2013 (2013-07-18) page 1, paragraph 1 page 4, paragraph 4 page 6, paragraph 2 example 2 ----- -/--	1-103

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 September 2020	05/10/2020

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Covone-van Hees, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/069561

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/087789 A1 (REVITOPE LTD [GB]; COBBOLD MARK [US]) 26 May 2017 (2017-05-26) figures 3,4,5b paragraphs [0005], [0006], [0016], [0098], [0099], [0113], [0114], [0126], [0129]	1-103
A	ROSEBROUGH S F: "Two step immunological approaches for imaging and therapy", THE QUARTERLY JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING, EDIZIONI MINERVA MEDICA, IT, vol. 40, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 234-251, XP002086486, ISSN: 1125-0135 the whole document	1-103
A	YAZAKI PAUL J ET AL: "A series of anti-CEA/anti-DOTA bispecific antibody formats evaluated for pre-targeting: comparison of tumor uptake and blood clearance", REDUCED ELIMINATION OF IGG ANTIBODIES BY ENGINEERING THE VARIABLE REGION,, vol. 26, no. 3, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 187-193, XP002792685, ISSN: 1741-0134, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZS096 the whole document	1-103

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2020/069561

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019122350 A1	27-06-2019	NONE	
WO 2013104804 A2	18-07-2013	AU 2013208895 A1	28-08-2014
		BR 112014017182 A2	13-06-2017
		CA 2861003 A1	18-07-2013
		CN 104159923 A	19-11-2014
		CN 108034006 A	15-05-2018
		CY 1119928 T1	12-12-2018
		DK 2802607 T3	08-01-2018
		EA 201400811 A1	30-12-2014
		EP 2802607 A2	19-11-2014
		EP 3333190 A1	13-06-2018
		ES 2653287 T3	06-02-2018
		HK 1200175 A1	31-07-2015
		HR P20171912 T1	09-02-2018
		HU E035207 T2	02-05-2018
		IL 233566 A	31-07-2018
		JP 6408915 B2	17-10-2018
		JP 2015505319 A	19-02-2015
		KR 20140130679 A	11-11-2014
		KR 20200040893 A	20-04-2020
		LT 2802607 T	12-02-2018
		MX 359411 B	27-09-2018
		NO 2802607 T3	03-03-2018
		PL 2802607 T3	30-03-2018
		PT 2802607 T	03-01-2018
		SG 11201403997S A	28-08-2014
		SI 2802607 T1	31-01-2018
		US 2015079093 A1	19-03-2015
		US 2019284296 A1	19-09-2019
		WO 2013104804 A2	18-07-2013
		ZA 201405658 B	25-05-2016
WO 2017087789 A1	26-05-2017	AU 2016358296 A1	17-05-2018
		AU 2020220048 A1	03-09-2020
		CA 3003482 A1	26-05-2017
		CN 108289952 A	17-07-2018
		EP 3377103 A1	26-09-2018
		JP 2018538262 A	27-12-2018
		US 2017152316 A1	01-06-2017
		US 2018346568 A1	06-12-2018
		WO 2017087789 A1	26-05-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FＩ			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ａ６１Ｋ	*51/10 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	51/10	１００	
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	51/10	２００	
		Ａ６１Ｐ	35/00		

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

(72)発明者　ハース， アレクサンダー
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
(72)発明者　クライン， クリスティアン
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １０， シー／オー ロッシュ グリクアート アーゲー
(72)発明者　フロスト， ソフィア
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １０， シー／オー ロッシュ グリクアート アーゲー
(72)発明者　ボルマン， フェリックス
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
(72)発明者　ジョルジュ， ギー
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
(72)発明者　フェン， セバスチャン
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
(72)発明者　リップスマイヤー， フロリアン
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
(72)発明者　マチェコ， ダニエラ
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
(72)発明者　メレケン， イェルク
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー
(72)発明者　ヴァイザー， バルバラ
ドイツ国 ８２３７７ ペンツベルク， ノンネンヴァルト ２， シー／オー ロッシュ ディアグノスティクス ゲーエムベーハー

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44 CA46
4C084　AA12 MA05 NA13 ZB26
4C085　HH03 KA04 LL18
4H045　AA11 AA20 BA10 BA41 BA71 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74