

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-513721
(P2025-513721A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 6
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全173頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-556497(P2024-556497)	(71)出願人	510214045		
(86)(22)出願日	令和5年3月24日(2023.3.24)		ザイムワークス ビーシー インコーポレ		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月14日(2024.11.14)		イテッド		
(86)国際出願番号	PCT/CA2023/050405		カナダ ブイ5ティール 1ジー4 プリテ		
(87)国際公開番号	WO2023/178451		イッシュ コロンビア州 バンクーバー		
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)		イースト フォース アベニュー 1 1 4		
(31)優先権主張番号	63/323,957		スイート 8 0 0		
(32)優先日	令和4年3月25日(2022.3.25)	(74)代理人	100102978		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 清水 初志		
(31)優先権主張番号	63/417,293	(74)代理人	100205707		
(32)優先日	令和4年10月18日(2022.10.18)		弁理士 小寺 秀紀		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100160923		
(31)優先権主張番号	63/450,602		弁理士 山口 裕孝		
		(74)代理人	100119507		
			弁理士 刑部 俊		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗葉酸受容体アルファ抗体及び使用方法

(57)【要約】

ヒト葉酸受容体アルファ（F R αまたはF O L R 1）に結合する抗体構築物、及び細胞毒素または免疫調節物質などの薬物にコンジュゲートされた抗F R α抗体構築物を含む抗体ー薬物コンジュゲート（A D C）、ならびに、例えば、がんの治療または診断における、治療薬または診断薬としてのそれらの使用。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、抗体構築物であって、

配列番号 15 のアミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含む、hFR α 内のエピトープ

に特異的に結合する参照抗体と hFR α への結合を競合する、前記抗体構築物。

【請求項 2】

前記エピトープが、不連続エピトープである、請求項 1 に記載の抗体構築物。

【請求項 3】

前記参照抗体が、配列番号 20、23、26、28、または 31 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、27、29、または 32 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、または 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR3 アミノ酸配列、配列番号 40、43、または 45 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、または 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 42 または 47 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR3 アミノ酸配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体構築物。

【請求項 4】

配列番号 15 のアミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含む、ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）内のエピトープに特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、抗体構築物。

【請求項 5】

前記エピトープが、不連続エピトープである、請求項 4 に記載の抗体構築物。

【請求項 6】

ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、抗体構築物であって、前記抗原結合ドメインが、配列番号 3、4、及び 5 に記載の配列を含む重鎖 CDR アミノ酸配列（HCDR1、HCDR2、及び HCDR3）、ならびに配列番号 6、7、及び 8 に記載の配列を含む軽鎖 CDR アミノ酸配列（LCDR1、LCDR2、及び LCDR3）を含む、前記抗体構築物。

【請求項 7】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 19、50、54、57、61、76、79、82、85、88、91、99、106、113、116、133、または 136 のいずれか 1 つに記載の配列を有する VH ドメインの、CDR 配列を含む、請求項 4 または 6 に記載の抗体構築物。

【請求項 8】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 39、64、119、124、または 130 のいずれか 1 つに記載の配列を有する VL ドメインの、CDR 配列を含む、請求項 4、6、及び 7 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物。

【請求項 9】

前記抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号 20、23、26、28、31、92、93、94、95、または 96 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、27、29、32、51、58、100、101、102、103、109、137、138、または 139 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 22、25、30、107、108、または 110 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR3 アミノ酸配列、ならびに

(ii) 配列番号 40、43、45、65、125、126、または 127 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR1 アミノ酸配列、配列番号 41、44

10

20

30

40

50

【請求項 10】

(a) 配列番号 20、23、26、28、もしくは 31 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、27、29、もしくは 32 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、もしくは 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR3 アミノ酸配列、配列番号 40、43、もしくは 45 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、もしくは 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 42 もしくは 47 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR3 アミノ酸配列、または

(b) 配列番号 20、23、26、28、もしくは31のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは51のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、配列番号40、45、もしくは65のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR1アミノ酸配列、配列番号41、44、もしくは46のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号42もしくは47のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR3アミノ酸配列、または

(c) 配列番号 20、23、26、28、もしくは31のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは58のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、配列番号40、45、もしくは65のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR1アミノ酸配列、配列番号41、44、もしくは46のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号42もしくは47のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR3アミノ酸配列、または

(d) 配列番号 92、93、94、95、もしくは96のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは51のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、配列番号125、126、もしくは127のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR1アミノ酸配列、配列番号41、44、もしくは46のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号42もしくは47のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR3アミノ酸配列、または

(e) 配列番号 92、93、94、95、もしくは96のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号24、100、101、102、もしくは103のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、配列番号125、126、もしくは127のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR1アミノ酸配列、配列番号41、44、もしくは46のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号120もしくは121のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択

50

10

20

30

40

50

50

(k) 配列番号 20、23、26、28、もしくは 31 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、29、32、もしくは 109 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、配列番号 107、108、もしくは 110 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選

択される H C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 1 2 5、1 2 6、もしくは 1 2 7 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 1、4 4、もしくは 4 6 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 1 2 0 もしくは 1 2 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列、または

(l) 配列番号 2 0、2 3、2 6、2 8、もしくは 3 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 1、2 4、2 9、3 2、もしくは 1 0 9 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 2 2、2 5、もしくは 3 0 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 1 2 5、1 2 6、もしくは 1 2 7 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 1、4 4、もしくは 4 6 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 1 2 0 もしくは 1 2 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列、または

(m) 配列番号 9 2、9 3、9 4、9 5、もしくは 9 6 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 1、2 4、1 3 7、1 3 8、もしくは 1 3 9 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 2 2、2 5、もしくは 3 0 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 1 2 5、1 2 6、もしくは 1 2 7 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 1、4 4、もしくは 4 6 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 1 2 0 もしくは 1 2 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列

を含む、請求項 4 または 6 に記載の抗体構築物。

【請求項 1 1】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 1 9、5 0、5 4、5 7、6 1、7 6、7 9、8 2、8 5、8 8、9 1、9 9、1 0 6、1 1 3、1 1 6、1 3 3、または 1 3 6 のいずれか 1 つに記載の V H アミノ酸配列から選択される V H アミノ酸配列を含む、請求項 4 または 6 に記載の抗体構築物。

【請求項 1 2】

前記抗原結合ドメインが、配列番号 3 9、6 4、1 1 9、1 2 4、または 1 3 0 のいずれか 1 つに記載の V L アミノ酸配列から選択される V L アミノ酸配列を含む、請求項 4、6、及び 1 1 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 3】

前記抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号 1 9 に記載の V H アミノ酸、及び配列番号 3 9 に記載の V L アミノ酸配列、または

(i i) 配列番号 5 0 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 5 4 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(i v) 配列番号 5 7 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v) 配列番号 6 1 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v i) 配列番号 7 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v i i) 配列番号 7 9 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v i i i) 配列番号 8 2 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L

10

20

30

40

50

アミノ酸配列、または

(i x) 配列番号 8 5 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x) 配列番号 8 8 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i) 配列番号 9 1 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 2 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i i) 配列番号 9 9 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i i i) 配列番号 1 0 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i v) 配列番号 1 0 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 1 9 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v) 配列番号 1 0 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v i) 配列番号 1 1 3 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v i i) 配列番号 1 1 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 1 9 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v i i i) 配列番号 1 1 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i x) 配列番号 1 3 3 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x x) 配列番号 1 3 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列

を含む、請求項 4 または 6 に記載の抗体構築物。

【請求項 1 4】

足場をさらに含み、前記抗原結合ドメインが、前記足場に機能的に連結されている、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 5】

前記足場が、I g G F c 領域を含む、請求項 1 4 に記載の抗体構築物。

【請求項 1 6】

前記抗体構築物が、第 2 の抗原結合ドメインをさらに含む、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物。

【請求項 1 7】

前記第 2 の抗原結合ドメインが、h F R α に特異的に結合する、請求項 1 6 に記載の抗体構築物。

【請求項 1 8】

前記第 2 の抗原結合ドメインが、h F R α 以外の抗原に結合する、請求項 1 6 に記載の抗体構築物。

【請求項 1 9】

1 つ以上の追加の抗原結合ドメインをさらに含む、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物。

【請求項 2 0】

足場をさらに含み、少なくとも 1 つの抗原結合ドメインが、前記足場に機能的に連結されている、請求項 1 6 ～ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物。

【請求項 2 1】

前記足場が、I g G F c 領域を含む、請求項 2 0 に記載の抗体構築物。

【請求項 2 2】

I g G F c 領域に機能的に連結された 2 つの抗原結合ドメインを含む、抗体構築物で

10

20

30

40

50

あって、前記抗原結合ドメインのそれぞれが、ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）に特異的に結合し、

（a）配列番号 39 に記載の V L アミノ酸配列、及び配列番号 19 に記載の V H アミノ酸配列、または

（b）配列番号 124 に記載の V L アミノ酸配列、及び配列番号 91 に記載の V H アミノ酸配列、または

（c）配列番号 64 に記載の V L アミノ酸配列、及び

（i）配列番号 50 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i i）配列番号 54 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i i i）配列番号 57 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i v）配列番号 61 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（v）配列番号 76 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（v i）配列番号 79 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（v i i）配列番号 82 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（v i i i）配列番号 85 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i x）配列番号 88 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（x）配列番号 106 に記載の V H アミノ酸配列、または

（d）配列番号 130 に記載の V L アミノ酸配列、及び

（i）配列番号 99 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i i）配列番号 106 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i i i）配列番号 113 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i v）配列番号 116 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（v）配列番号 133 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（v i）配列番号 136 に記載の V H アミノ酸配列、または

（e）配列番号 119 に記載の V L アミノ酸配列、及び

（i）配列番号 106 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは

（i i）配列番号 116 に記載の V H アミノ酸配列

を含む、前記抗体構築物。

【請求項 23】

請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物をコードする、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット。

【請求項 24】

請求項 23 に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含む、発現ベクターまたは発現ベクターのセット。

【請求項 25】

請求項 24 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。

【請求項 26】

1 つ以上の薬物部分にコンジュゲートされた、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物

を含む、抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 27】

前記抗体コンジュゲートが、1～約 8 個の薬物部分にコンジュゲートされている、請求項 26 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 28】

一般式 I：

$$A - (L - (D)_m)_n \quad (I)$$

を有する抗体－薬物コンジュゲートであって、式中、

A が、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の抗体構築物であり、

L が、リンカーであり、

D が、薬物部分であり、

10

20

30

40

50

mが、1～約8であり、

nが、1及び約12である、

前記抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項29】

mが、1または2である、請求項28に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項30】

nが、約2～約8である、請求項28または29に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項31】

前記薬物部分が、メイタンシノイド、メイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、ピロロベンゾジアゼピン、デュオカルマイシン、カリケアミシン、カリケアミシン類似体、アウリスタチン、アウリスタチン類似体、ヘミアステリン、ヘミアステリン類似体、チューブリシン、チューブリシン類似体、アマトキシシン、アマトキシシン類似体、カンプトテシン、カンプトテシン類似体、エリブリン、TLRアゴニスト、またはSTINGアゴニストである、請求項26～30のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

10

【請求項32】

前記薬物部分が、アウリスタチン、アウリスタチン類似体、ヘミアステリン、ヘミアステリン類似体、カンプトテシン、カンプトテシン類似体、またはエリブリンである、請求項26～30のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項33】

請求項1～22のいずれか1項に記載の抗体構築物と、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む、医薬組成物。

20

【請求項34】

請求項26～32のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲートと、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む、医薬組成物。

【請求項35】

療法における使用のための、請求項1～22のいずれか1項に記載の抗体構築物。

【請求項36】

前記療法が、がんの治療を含む、請求項35に記載の使用のための抗体構築物。

【請求項37】

療法における使用のための、請求項26～32のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

30

【請求項38】

前記療法が、がんの治療を含む、請求項37に記載の使用のための抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項39】

がんの治療のための薬剤の製造における、請求項1～22のいずれか1項に記載の抗体構築物の使用。

【請求項40】

がんの治療のための薬剤の製造における、請求項26～32のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲートの使用。

40

【請求項41】

FR α 陽性腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、前記細胞を、請求項1～22のいずれか1項に記載の抗体構築物と接触させることを含む、前記方法。

【請求項42】

FR α 陽性腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞を、請求項26～32のいずれか1項に記載の抗体－薬物コンジュゲートと接触させることを含む、前記方法。

【請求項43】

がんを有する対象を治療する方法であって、前記対象に、有効量の請求項1～22のいずれか1項に記載の抗体構築物を投与することを含む、前記方法。

【請求項44】

50

がんを有する対象を治療する方法であって、前記対象に、有効量の請求項 26～32 のいずれか 1 項に記載の抗体－薬物コンジュゲートを投与することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、抗体療法剤の分野に関し、特に、ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）を標的とする抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

葉酸受容体アルファ（FR α ）は、FOLR1によってコードされるグリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカー細胞表面タンパク質であり、FR β （FOLR2）、FR γ （FOLR3）、及びFR δ （FOLR4）も含む高親和性FRのファミリーの1つである。FR α は、卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）、子宮内膜癌、中皮腫、及び肺癌を含む様々ながんにおいて過剰発現され、非悪性組織における発現が最小限であるため、関連性の高いがん療法標的として同定されている。

10

【0003】

抗FR α 抗体、ファーレッズマブ、及びFR α 標的化抗体－薬物コンジュゲート（ADC）、ミルベツキシマブソラブタンシン（ImmunoGen, Inc.）、MORAb-202（Eisai Inc.）、及びSTRO-002（Sutro Biopharma, Inc.）を含む、がんの治療におけるFR α 標的化剤を含むいくつかの臨床研究が現在進行中である。

20

【0004】

この背景情報は、本開示に関連する可能性があると思われる本出願人が考える情報を周知する目的で提供されるものである。前述の情報がいずれも、特許請求する本発明に対する先行技術を構成することを認めるように必ずしも意図するものではなく、そのように解釈すべきでもない。

【発明の概要】

【0005】

抗FR α 抗体及び使用方法を本明細書に記載する。本開示の一態様は、ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む抗体構築物に関し、抗体構築物は、配列番号15のアミノ酸残基E120、D121、R123、T124、S125、及びY126を含むhFR α 内のエピトープと特異的に結合する参照抗体と、hFR α への結合を競合する。

30

【0006】

本開示の別の態様は、配列番号15のアミノ酸残基E120、D121、R123、T124、S125、及びY126を含むヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）内のエピトープに特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、抗体構築物に関する。

【0007】

本開示の別の態様は、ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、抗体構築物であって、抗原結合ドメインが、配列番号3、4、及び5に記載の配列を含む重鎖CDRアミノ酸配列（HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）、ならびに配列番号6、7、及び8に記載の配列を含む軽鎖CDRアミノ酸配列（LCDR1、LCDR2、及びLCDR3）を含む、抗体構築物に関する。

40

【0008】

本開示の別の態様は、IgG Fc領域に機能的に連結された2つの抗原結合ドメインを含む抗体構築物に関し、抗原結合ドメインのそれぞれは、ヒト葉酸受容体アルファ（hFR α ）に特異的に結合し、

（a）配列番号39に記載のVLアミノ酸配列、及び配列番号19に記載のVHアミノ酸配列、または

（b）配列番号124に記載のVLアミノ酸配列、及び配列番号91に記載のVHアミ

50

ノ酸配列、または

- (c) 配列番号 64 に記載の V L アミノ酸配列、及び
 - (i) 配列番号 50 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i i) 配列番号 54 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i i i) 配列番号 57 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i v) 配列番号 61 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (v) 配列番号 76 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (v i) 配列番号 79 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (v i i) 配列番号 82 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (v i i i) 配列番号 85 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i x) 配列番号 88 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (x) 配列番号 106 に記載の V H アミノ酸配列、または
- (d) 配列番号 130 に記載の V L アミノ酸配列、及び
 - (i) 配列番号 99 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i i) 配列番号 106 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i i i) 配列番号 113 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i v) 配列番号 116 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (v) 配列番号 133 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (v i) 配列番号 136 に記載の V H アミノ酸配列、または
- (e) 配列番号 119 に記載の V L アミノ酸配列、及び
 - (i) 配列番号 106 に記載の V H アミノ酸配列、もしくは
 - (i i) 配列番号 116 に記載の V H アミノ酸配列

を含む。

【0009】

本開示の別の態様は、本明細書に記載される抗 F R α 抗体構築物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。

【0010】

本開示の別の態様は、本明細書に記載される抗 F R α 抗体構築物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を含む発現ベクターまたは発現ベクターのセットに関する。本開示の別の態様は、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に関する。

【0011】

本開示の別の態様は、1つ以上の薬物部分にコンジュゲートされる、本明細書に記載される抗 F R α 抗体構築物を含む抗体-薬物コンジュゲートに関する。

【0012】

本開示の別の態様は、一般式 I :



を有する抗体-薬物コンジュゲートに関し、式中、

A は、本明細書に記載の抗 F R α 抗体構築物であり、

L は、リンカーであり、

D は、薬物部分であり、

m は、1 ~ 約 8 であり、

n は、1 及び約 12 である。

【0013】

本開示の別の態様は、本明細書に記載の抗 F R α 抗体構築物、または本明細書に記載の抗体-薬物コンジュゲートと、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む、医薬組成物に関する。

【0014】

本開示の別の態様は、療法、例えば、がんの治療における使用のための、本明細書に記載される抗 F R α 抗体構築物または本明細書に記載される抗体-薬物コンジュゲートに関

10

20

30

40

50

する。

【0015】

本開示の別の態様は、がんの治療のための薬剤の製造における、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物または本明細書に記載される抗体-薬物コンジュゲートの使用に関する。

【0016】

本開示の別の態様は、FR α 陽性腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、細胞を、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物または本明細書に記載される抗体-薬物コンジュゲートと接触させることを含む、方法に関する。

【0017】

本開示の別の態様は、がんを有する対象を治療する方法であって、有効量の本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物または本明細書に記載される抗体-薬物コンジュゲートを対象に投与することを含む、方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】図1Aは、ヒトVHフレームワーク（IGHV3-23*01）に移植されたキメラ抗体v23924のウサギ重鎖可変ドメインCDRの配列（配列番号155）を示し、図1Bは、ヒトVLフレームワーク（IGKV1-39*01）に移植されたキメラ抗体v23924のウサギ軽鎖可変ドメインCDRの配列（配列番号156）を示す。CDRを、AbM定義で割り当て、太字のイタリック体でマークした。

【図1B】図1Aの説明を参照のこと。

【図2A】図2A～Dは、電気泳動及びUPLC-SECによって分析した、精製された親キメラバリエントv23924及び精製された代表的なヒト化バリエントv30384のプロファイルを示す。図2A及びCは、親キメラバリエントv23924（2A）及び精製された代表的なヒト化バリエントv30384（2C）の分取SEC精製後（分取SEC後）またはプロテインA精製後（pA後）の非還元（NR）及び還元（R）条件下での電気泳動からのプロファイルを示し、図2B及びDは、分取SEC精製後の親キメラバリエントv23924（2B）及びプロテインA精製後の精製された代表的なヒト化バリエントv30384（2D）のUPLC-SECプロファイルを示す。

【図2B】図2Aの説明を参照のこと。

【図2C】図2Aの説明を参照のこと。

【図2D】図2Aの説明を参照のこと。

【図3】図3A及びBは、親キメラバリエントv23924（3A）及び精製された代表的なヒト化バリエントv30384（3B）のバイオレイヤー干渉法（BLI）センサグラムを示す。

【図4A】図4A～Dは、代表的なヒト化バリエントv30384（4A、付随して、4Bに主ピークの拡大図）及びv31422（4C、付随して、4Dに主ピークの拡大図）のインタクトなLC/MSプロファイルを示す。

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D】図4Aの説明を参照のこと。

【図5】図5A及びBは、6時間のインキュベーション（5A）及び24時間のインキュベーション（5B）後のフローサイトメトリーによって決定される、キメラ抗体v23924、代表的なヒト化バリエントであるv30384、ならびにFR α 発現細胞株IGROV-1における様々な濃度のFR α 標的化抗体ミルベツキシマブ及びファレツズマブの受容体媒介内在化能力を示す。抗RSV抗体であるパリビズマブを陰性対照として含めた。

【図6】図6A及びBは、6時間のインキュベーション（6A）及び24時間のインキュベーション（6B）後のフローサイトメトリーによって決定される、キメラ抗体v23924、代表的なヒト化バリエントであるv30384、ならびにFR α 発現細胞株OVC

10

20

30

40

50

A R-3における様々な濃度のFR α 標的化抗体ミルベツキシマブ及びファーレッズマブの受容体媒介内在化能力を示す。抗RSV抗体であるパリビズマブを陰性対照として含めた。

【図7】hFR α のペプシン消化によって生成されたペプチドによるhFR α 配列（配列番号15）のカバレッジを示す。配列の下各バーは、ペプチドを表す。

【図8】図8A及びBは、hFR α :hFOLR1(hFR α)対hFOLR1-v23924複合体のペプシン消化によって生成されるペプチドの水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)キネティクスの要約プロット(8A)及び差分プロット(8B)を示す。

【図9】図9A~Cは、1時間の水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)後のペプチド119-126(WEDCRTSY)(配列番号152)のアミド重水素化レベル:hFOLR1(9A)対hFOLR1-v23924複合体(9B)、及び差分プロット(9C)を示す。

【図10】図10A及びBは、5時間及び24時間のインキュベーション期間後のフローサイトメトリーによって決定された、FR α 発現細胞株IGROV-1(10A)及びJEG-3(10B)における、親ヒト化バリエーション、v30384、及び代表的な親和性成熟バリエーション、v35356の受容体媒介性内在化能力を示す。パリビズマブを非標準的対照として含めた。

【図11-1】図11A~Dは、質量分析によって評価される、細胞株JEG-3(11A)、Caov-3(11B)、H2110(11C)、及びHEC-1-A(11D)における代表的なADCの細胞内ペイロード送達能力を示す。ADCは、薬物リンカーDL1にそれぞれコンジュゲートされたヒト化抗体バリエーションv30384及び親和性成熟バリエーションv35356であった。

【図11-2】図11-1の説明を参照のこと。

【図12A】図12A~Hは、異種移植片モデルで評価された薬物リンカーDL1またはDL7にコンジュゲートされたキメラ抗FR α 抗体v23924のインビボ抗腫瘍活性を示す:CTG-0848 PDX(12A)、OV90 CDX(12B)、OVCA3 CDX(12C)、LXFA737 PDX(12D)、JEG3 CDX(12E)、HCC1954 CDX(12F)、SKOV3 CDX(12G)、及びKB CDX(12H)。対照ADCは、薬物リンカーDL1またはDL6にコンジュゲートされたv17717(HetFcを有するミルベツキシマブFab)であった。

【図12B】図12Aの説明を参照のこと。

【図12C】図12Aの説明を参照のこと。

【図12D】図12Aの説明を参照のこと。

【図12E】図12Aの説明を参照のこと。

【図12F】図12Aの説明を参照のこと。

【図12G】図12Aの説明を参照のこと。

【図12H】図12Aの説明を参照のこと。

【図13】中/高レベルFR α 発現OVCA3卵巣癌モデルにおいて、4mg/kgまたは9mg/kgで投与される、薬物リンカーDL1にそれぞれコンジュゲートされたキメラ抗体v23924またはヒト化バリエーションv30384またはv30399を含むADCのインビボ抗腫瘍活性を示す。

【図14A】図14A~Eは、異種移植片モデルで評価される、示される用量で投与される薬物リンカーDL1またはDL8にコンジュゲートされたヒト化バリエーションv30384を含むADCの、インビボ抗腫瘍活性を示す:H2110 CDX(14A)、SKOV3 CDX(14B及び14C)、IGROV-1 CDX(14D)、ならびにLXFA737 PDX(14E)。対照ADCは、薬物リンカーDL6にコンジュゲートされたv17717(HetFcを有するミルベツキシマブFab)、薬物リンカーDL6にコンジュゲートされたv17716(HomoFcを有するミルベツキシマブFab)、及び、H2110 CDXについては、薬物リンカーDL4にコンジュゲートされたv31629(ファーレッズマブ)であった。

【図 1 4 B】図 1 4 A の説明を参照のこと。

【図 1 4 C】図 1 4 A の説明を参照のこと。

【図 1 4 D】図 1 4 A の説明を参照のこと。

【図 1 4 E】図 1 4 A の説明を参照のこと。

【図 1 5 A】図 1 5 A ～ D は、示される投与量で異種移植片モデルにおいて投与される薬物リンカー-DL5 にコンジュゲートされた、ヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 を含む ADC のインビボ抗腫瘍活性を示す：OV90 (1 5 A)、H 2 1 1 0 (1 5 B)、ならびに OV CAR-3 (1 5 C 及び 1 5 D)。

【図 1 5 B】図 1 5 A の説明を参照のこと。

【図 1 5 C】図 1 5 A の説明を参照のこと。

【図 1 5 D】図 1 5 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 A】図 1 6 A ～ H は、様々な抗 FR α 抗体；OV90 モデル (1 6 A)、OV CAR-3 モデル (1 6 B)、L X F A 7 3 7 モデル (1 6 C)、J E G 3 モデル (1 6 D)、または SKOV-3 モデル (1 6 E) で薬物リンカー-DL1 にコンジュゲートしたキメラ抗 FR α 抗体 v 2 3 9 2 4；H 2 1 1 0 モデル (1 6 F) で薬物リンカー-DL1 にコンジュゲートしたヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4、及び OV90 モデル (1 6 G) または H 2 1 0 0 モデル (1 6 H) で薬物リンカー-DL5 にコンジュゲートしたヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 を含む、ADC で処置した動物から採取した血清中の経時的な血清中の Ig G または ADC の濃度を示す薬物動態学的分析の結果を示す。

【図 1 6 B】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 C】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 D】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 E】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 F】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 G】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 6 H】図 1 6 A の説明を参照のこと。

【図 1 7-1】IMGT、Chothia、Kabatt、Contact 及び AbM の定義によって定義される代表的な抗 FR α 抗体の CDR 配列を示す表を提示する。

【図 1 7-2】図 1 7-1 の説明を参照のこと。

【図 1 7-3】図 1 7-1 の説明を参照のこと。

【図 1 7-4】図 1 7-1 の説明を参照のこと。

【図 1 7-5】図 1 7-1 の説明を参照のこと。

【図 1 7-6】図 1 7-1 の説明を参照のこと。

【図 1 7-7】図 1 7-1 の説明を参照のこと。

【図 1 8-1】代表的な抗 FR α 抗体の VH 及び VL 配列を示す表を示す。

【図 1 8-2】図 1 8-1 の説明を参照のこと。

【図 1 8-3】図 1 8-1 の説明を参照のこと。

【図 1 9-1】薬物リンカー-DL1 にコンジュゲートされたヒト化抗体 v 3 0 3 8 4 を含む ADC、及び細胞株中の薬物リンカー-DL1 にコンジュゲートされた親和性成熟バリエーション v 3 5 3 5 6 を含む ADC の細胞増殖阻害（細胞傷害性）能力を示す：KB-HeLa (1 9 A)、IGROV-1 (1 9 B)、JEG-3 (1 9 C)、SKOV-3 (1 9 D) 及び MDA-MB-468 (1 9 E)。

【図 1 9-2】図 1 9-1 の説明を参照のこと。

【図 1 9-3】図 1 9-1 の説明を参照のこと。

【図 2 0】図 2 0 A ～ D は、4 時間 (2 0 A)、24 時間 (2 0 B)、48 時間 (2 0 C)、及び 96 時間 (2 0 D) における、ミルベツキシマブ及び陰性対照であるパリビズマブと比較した、抗 FR α ヒト化抗体バリエーション v 3 6 6 7 5 の JEG-3 細胞スフェロイドへの浸透を示す。

【図 2 1 A】図 2 1 A 及び B は、20 μ g/mL の抗 FR α ヒト化抗体バリエーション v 3 6 6 7 5 (2 1 A) 及び 1 μ g/mL の対照抗体（リツキシマブバイオシミラー）(2 1 B

10

20

30

40

50

）についての、Retrogenix Cell Microarray Technologyを使用した特異的なオフターゲット結合相互作用のためのスクリーニングからの固定細胞確認スクリーニング画像を示す。

【図21B】図21Aの説明を参照のこと。

【図22】H2110細胞において評価された、キメラ抗FR α 抗体v23294と、抗FR α 抗体ミルベツキシマブ及びファーレツズマブと、の間の競合結合を示す。

【図23】5時間のインキュベーション期間後にフローサイトメトリーによって決定される、FR α 発現細胞株IGROV-1における、バイパラトピック抗FR α 抗体B5327A（v36264）及び抗FR α 抗体ミルベツキシマブ（v17716）と比較した、ヒト化バリエーションv30384の受容体媒介内在化能力を示す。

【図24】96時間でのバイパラトピック抗FR α 抗体B5327A（v36264）及び抗FR α 抗体ミルベツキシマブ（v17716）と比較した、JEG-3細胞スフェロイドにおける抗FR α ヒト化抗体バリエーションv36675の浸透を示す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

詳細な説明

本開示は、ヒト葉酸受容体アルファ（FR α ；本明細書でFOLR1とも称される）に結合するが、葉酸受容体ベータ（FOLR2）、ガンマ（FOLR3）、またはデルタ（FOLR4）への有意な結合を示さない抗体構築物に関する。特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、カニクイザルFR α に結合することができる。

【0020】

本開示はまた、細胞毒素または免疫調節物質などの薬物にコンジュゲートされた、本明細書に記載の抗FR α 抗体構築物を含む抗体-薬物コンジュゲート（ADC）に関する。本開示の抗FR α 抗体構築物及びADCは、例えば、治療薬または診断薬として使用され得る。本開示の特定の態様は、例えば、がんの治療における、抗FR α 抗体構築物及びADCの治療方法及び使用に関する。いくつかの態様は、例えば、がんの診断または分析における、抗FR α 抗体構築物及びADCの診断方法及び使用に関する。

【0021】

定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0022】

本明細書で使用する場合、「約」という用語は、所与の値からおよそ $\pm 10\%$ 変動することを指す。そのような変動は常に、それが具体的に言及されているか否かにかかわらず、本明細書で提供される任意の所与の値に含まれることを理解されたい。

【0023】

「a」または「an」という語の使用は、「含む」という用語と併せて本明細書で 사용되는場合、「1つ」を意味し得るが、「1つ以上」、「少なくとも1つ」及び「1つまたは1を超える」の意味とも一致する。

【0024】

本明細書で使用する場合、「含む（comprising）」、「有する」、「含む（including）」及び「含有する」という用語、ならびにこれらの文法的変形表現は、包括的、すなわちオープンエンドであり、列挙されていない追加の要素及び／または方法のステップを排除するものではない。「～から本質的になる」という用語は、本明細書において、組成物、使用または方法に関連して使用する場合、追加の要素及び／または方法のステップが存在することがあるが、これらの追加が、列挙されている組成物、方法または使用が機能する様式に実質的に影響を及ぼさないことを示す。「～からなる」という用語は、本明細書において、組成物、使用または方法に関連して使用する場合、追加の要素及び／または方法のステップの存在が除外される。ある特定の要素及び／またはステップを含むものとして本明細書に記載される組成物、使用または方法はまた、ある特定の

実施形態では、それらの要素及び／またはステップから本質的になる場合もあり、他の実施形態では、それらの要素及び／またはステップからなる場合もあり、これらの実施形態が特に参照されるか否かを問わない。

【0025】

「相補性決定領域」または「CDR」は、抗原結合特異性及び親和性に寄与するアミノ酸配列である。「フレームワーク」領域（FR）は、CDRの適切なコンフォメーションを維持して、抗原結合領域と抗原との間の結合を促進するのに役立ち得る。N末端からC末端まで、抗体の軽鎖可変領域（VL）及び重鎖可変領域（VH）の両方は、典型的には、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4を含む。3つの重鎖CDRは、本明細書においてHC DR1、HC DR2、及びHC DR3と称され、3つの軽鎖CDRは、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3と称される。CDRは、抗体を抗原またはエピトープに結合させるための接触残基の大部分を提供する。多くの場合、3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRが、抗原と結合するために必要である。しかしながら、いくつかの場合では、単一の可変ドメインであっても、抗原に結合特異性を付与し得る。さらに、当該技術分野において既知のように、いくつかの場合には、抗原結合は、VH及び／またはVLドメインから選択される最低でも1つ以上のCDR、例えば、HC DR3の組み合わせによっても生じる場合がある。

10

【0026】

CDR配列のいくつかの異なる定義は、Kabat et al. (1983, Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH Publication No. 369-847, Bethesda, MD)、Chothia et al. (1987, J Mol Biol, 196: 901-917)、ならびにIMGT、AbM (University of Bath) 及びContact (MacCallum, et al., 1996, J Mol Biol, 262 (5): 732-745) の定義によって説明されるものを含めて、一般的に使用されている。例として、Kabat、Chothia、IMGT、AbM及びContactに従うCDRの定義が以下の表1に記載される。したがって、当業者には容易に明らかとなるように、CDRの正確な番号付け及び配置は、用いられる番号付けシステムに基づいて異なる場合がある。しかしながら、本明細書でのVHの開示が、既知の番号付けシステムのいずれかによって定義される、関連する（固有の）重鎖CDR（HC DR）の開示を含むと理解されるべきである。同様に、VLの本明細書における開示は、既知の番号付けシステムのいずれかによって定義される、関連する（固有の）軽鎖CDR（LC DR）の開示を含む。

20

30

【0027】

40

50

【表 1】

一般的なCDRの定義¹

定義	重鎖			軽鎖		
	CDR1 ²	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	H31-H35B	H50-H65	H95-H102	L24-L34	L50-L56	L89-L97
Chothia	H26-H32、 H33 または H34	H52-H56	H95-H102	L24-L34	L50-L56	L89-L97
IMGT	H26-H33、 H34、H35、 H35A また は H35B	H51-H57	H93-H102	L27-L32	L50-L52	L89-L97
AbM	H26-H35B	H50-H58	H95-H102	L24-L34	L50-L56	L89-L97
Contact	H30-H35B	H47-H58	H93-H101	L30-L36	L46-L55	L89-L96

¹K a b a t または C h o t h i a 番号付けシステムのうちのいずれかが、H C D R 2、H C D R 3 及び軽鎖CDRについてC o n t a c t を除く全ての定義で使用される場合があり、C o n t a c t はC h o t h i a 番号付けを使用する

²K a b a t 番号付けを使用する。C h o t h i a 及びI M G T C D R - H 1 ループの末端を区切るK a b a t 番号付けスキームの位置は、ループの長さに応じて変動し、これはK a b a t がこれらのCDR定義外の位置35A及び35Bに挿入を配置するからである。しかしながら、I M G T 及びC h o t h i a C D R - H 1 ループは、C h o t h i a 番号付けを使用して明確に定義され得る。C h o t h i a 番号付けを使用したCDR-H1定義：K a b a t H 3 1 - H 3 5、C h o t h i a H 2 6 - H 3 2、A b M H 2 6 - H 3 5、I M G T H 2 6 - H 3 3、C o n t a c t H 3 0 - H 3 5。

【0028】

2つ以上のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の文脈における「同一」という用語は、同じである2つ以上の配列または部分配列を指す。配列は、当業者に既知の一般的に使用される配列比較アルゴリズムのうちの1つを使用して、または手動によるアラインメント及び目視検査によって測定されるように、比較ウィンドウにわたって、または指定領域にわたって最大の一致となるように比較及び整列させたときに、同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドのパーセンテージ（例えば、指定領域にわたって約80%、約85%、約90%、約95%、または約98%の同一性）を有する場合、「実質的に同一」である。配列比較については、典型的には、指定された参照配列と試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要であれば部分配列座標を指定して、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータが使用され得るか、または代替パラメータが指定され得る。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメータに基づき、参照配列と比較して試験配列のパーセント配列同一性を算出する。

【0029】

「比較ウィンドウ」は、例えば、約10～600の連続するアミノ酸またはヌクレオチド位置、または約10～約200、または約10～約150の連続するアミノ酸またはヌクレオチド位置であり得る、連続するアミノ酸またはヌクレオチド位置を含む配列のセグメントを指し、試験配列は、2つの配列が最適に整列された後に、同じ数の連続する位置の参照配列と比較され得る。比較のための配列のアラインメント方法は、当業者に既知である。比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、S m i t h & W a t e r m a n, 1970, Adv. Appl. Math., 2:482cの局所相同性アルゴリズムによって、N e e d l e m a n & W u n s c h, 1970, J. Mol. Biol., 4

8 : 4 4 3 の 相 同 性 ア ラ イ ン メ ン ト アル ゴ リ ズ ム に よ っ て 、 P e a r s o n & L i p m a n , 1 9 8 8 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 5 : 2 4 4 4 の 類 似 性 の 検 索 方 法 に よ っ て 、 ま た は こ れ ら の アル ゴ リ ズ ム (例 え ば 、 W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , M a d i s o n , W I の 、 G A P 、 B E S T F I T 、 F A S T A ま た は T F A S T A) の コ ン ピ ュ ー タ に よ る 実 装 に よ っ て 、 ま た は 手 動 ア ラ イ ン メ ン ト 及 び 目 視 検 査 (例 え ば 、 A u s u b e l e t a l . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , (1 9 9 5 s u p p l e m e n t) , C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s を 参 照 さ れ た い) に よ っ て 実 施 す る こ と が で き る 。 パ ー セ ン ト 配 列 同 一 性 を 決 定 す る の に 好 適 な 利 用 可 能 な アル ゴ リ ズ ム の 例 は 、 B L A S T 及 び B L A S T 2 . 0 アル ゴ リ ズ ム で あり 、 こ れ ら は A l t s c h u l e t a l . , 1 9 9 7 , N u c . A c i d s R e s . , 2 5 : 3 3 8 9 - 3 4 0 2 、 及 び A l t s c h u l e t a l . , 1 9 9 0 , J . M o l . B i o l . , 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 に そ れ ぞ れ 記 載 さ れ て い る 。 B L A S T 分 析 を 実 施 す る た め の ソ フ ト ウ ェ ア は 、 米 国 国 立 生 物 工 学 情 報 セ ン タ ー (N C B I) の ウ ェ ブ サ イ ト か ら 公 的 に 入 手 可 能 で あ る 。

10

【0030】

「対象」という用語は、本明細書中で使用される場合、処置、観察または実験の対象である動物、いくつかの実施形態では哺乳動物を指す。動物は、ヒト、非ヒト霊長類、愛玩動物（例えば、イヌ、ネコなど）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）、または実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、非ヒト霊長類など）であってもよい。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

20

【0031】

本明細書で論じられるいずれの実施形態も、本明細書に開示されるいずれの方法、使用または組成物に関して実施できることが想定され、その逆も同様である。

【0032】

本明細書に開示される実施形態と組み合わせて記載される特定の特徴、構造及び／または特性は、本明細書に開示される別の実施形態と組み合わせて記載される特徴、構造及び／または特性と任意の好適な様式で組み合わせられて1つ以上のさらなる実施形態を提供することができる。

30

【0033】

一実施形態における特徴の積極的な列挙が、代替的な実施形態において特徴を除外するための基礎として機能することも理解されたい。例えば、所与の実施形態または特許請求の範囲について選択肢の一覧が提示される場合、1つ以上の選択肢が一覧から削除される場合があり、短縮された一覧が、代替的な実施形態を形成する場合があると理解されるべきであり、そのような代替的な実施形態が特に参照されるか否かを問わない。

【0034】

抗FR α 抗体構築物

本開示は、ヒトFR α (hFR α) に特異的に結合する抗体構築物に関する。この文脈では、「抗体構築物」という用語は、1つ以上の抗原結合ドメインを含むポリペプチドまたはポリペプチドのセットを指し、1つ以上の抗原結合ドメインのそれぞれは、エピトープまたは抗原に特異的に結合する。抗体構築物が2つ以上の抗原結合ドメインを含む場合、抗原結合ドメインの各々は、同じエピトープまたは抗原に結合し得（すなわち、抗体構築物は、単一特異性である）、またはそれらは、異なるエピトープまたは抗原に結合し得（すなわち、抗体構築物は、二重特異性または多重特異性である）。抗体構築物は、足場をさらに含み得、1つ以上の抗原結合ドメインは、本明細書中に記載されるように、任意に、リンカーを介して、足場に融合または共有結合することができる。

40

【0035】

本開示によれば、抗FR α 抗体構築物は、hFR α に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。hFR α に「特異的に結合する」とは、抗体構築物がhFR

50

α に結合するが、ヒト葉酸受容体ベータ（FOLR2）、ガンマ（FOLR3）またはデルタ（FOLR4）のいずれにも有意な結合を示さないことを意味する。特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、1つ以上の非ヒト種由来のFR α に結合することができる。特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、カニクイザルFR α に結合することができる。

【0036】

ヒトFR α は、「ヒト葉酸受容体1」または「FOLR1」としても知られる。様々な供給源からのhFR α のタンパク質配列は、当該技術分野において既知であり、GenBankまたはUniProtKBなどの公的にアクセス可能なデータベースから容易に入手可能である。hFR α 配列の例として、例えば、NCBI参照番号P15328、AA
X29268.1、AA
X37119.1、NP__057937.1及びNP__057936.1で提供される配列が挙げられる。例示的なhFR α タンパク質配列は、配列番号1（NCBI参照配列：NP__057936.1）として表2に提供される。例示的なカニクイザルFR α タンパク質配列もまた、表2（配列番号2；NCBI参照配列：XP__005579002.2）に提供される。

【0037】

【表2】

ヒト及びカニクイザルFR α タンパク質配列

生物	配列	配列番号
ヒト	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKH HKEKPGPEDKLHEQCRPWKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNW NHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERV NVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVG AACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPA QGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPFLSLALMLLWLLS	1
カニクイザル	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRTTRARTELLNVCMNAKHH KEKPGPEDKLHEQCRPWKKNACCSTNTSQAHKDVSYLRFNWN HCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWQQVDQSWRKERV VPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCPVGA ACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTYSYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQ GNPNEEVARFYAAAMSGAGPWAAWPLLLSLALTLLWLLS	2

【0038】

抗原結合ドメインの標的抗原またはエピトープへの特異的結合は、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、表面プラズモン共鳴（SPR）技術（例えば、BIAcore機器を用いる）（Liljebladet al., 2000, Glyco J, 17:323-329）、フローサイトメトリー、または従来 of 結合アッセイ（Heeley, 2002, Endocr Res, 28:217-229）によって測定され得る。特定の実施形態では、特異的結合は、例えば、ELISAまたはフローサイトメトリーにより測定した場合、非標的タンパク質（FOLR2、FOLR3またはFOLR4など）への結合が、hFR α への結合の約10%未満程度であるとして定義し得る。特定の実施形態では、FR α に対する抗体構築物の特異的結合は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、例えば、 $\leq 500 \text{ nM}$ 、 $\leq 250 \text{ nM}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 50 \text{ nM}$ 、または $\leq 10 \text{ nM}$ の解離定数（ K_D ）によって定義され得る。特定の実施形態では、特定の抗原またはエピトープに対する抗体構築物の特異的結合は、 10^{-6} M 以下、例えば、 10^{-7} M 以下、または 10^{-8} M 以下の解離定数（ K_D ）によって定義され得る。いくつかの実施形態では、特定の抗原またはエピトープに対する抗体構築物の特異的結合は、 $10^{-6} \text{ M} \sim 10^{-9} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-7} \text{ M} \sim 10^{-9} \text{ M}$ の解離定数（ K_D ）によって定義され得る。

【0039】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、参照抗体であるミルベツキシマブ（huMov19またはhuFR107）及びファーレッツズマブ（MORAb-003）よりも高いFR α 発現細胞への内在化を示す。

【0040】

抗体内在化は、当該技術分野で既知の方法を使用して、例えば、Schmidt, M. et al., 2008, Cancer Immunol. Immunother., 57:1879-1890に詳述されているプロトコルに従う直接内在化法、またはpHAb染料（Promega Corporation, Madison, WI）、pHrodo iFL及びDeep Red Dye（ThermoFisher Scientific Corporation, Waltham, MA）及びIncucyte（登録商標）Fabfluor-pH抗体標識試薬（Sartorius AG, Göttingen, Germany）などの市販の蛍光染料、ならびに顕微鏡、FACS、高含量イメージングまたは他のプレートベースのアッセイなどの分析技術を使用して測定することができる。

【0041】

特定の実施形態では、FR α 発現細胞内に内在化される抗FR α 抗体構築物の量が、同じ試験条件下で同じFR α 発現細胞内に内在化される参照抗体の量よりも少なくとも1.2倍多い場合、抗FR α 抗体構築物は、対応する参照抗体（ミルベツキシマブまたはファーレッツズマブ）よりもFR α 発現細胞内へのより高い内在化を示すと考えられる。特定の実施形態では、適切な蛍光染料及び高コンテンツイメージングを使用して、内在化された抗体の量を決定する。いくつかの実施形態では、FR α を高レベルで発現する細胞において、内在化された抗体の量が決定される。いくつかの実施形態では、内在化された抗体の量は、IGROV-1細胞またはIGROV-1細胞と同様のレベルでFR α を発現する細胞で決定される。いくつかの実施形態では、内在化された抗体の量は、6時間のインキュベーション期間後に決定される。いくつかの実施形態では、内在化抗体の量は、24時間のインキュベーション期間の後に決定される。

【0042】

特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、FR α 発現細胞に内在化される抗FR α 抗体構築物の量が、同じ試験条件下で同じFR α 発現細胞に内在化される参照抗体の量よりも少なくとも1.3倍大きい、少なくとも1.4倍大きい、少なくとも1.5倍大きい、1.6倍大きい、1.7倍大きい、1.8倍大きい、1.9倍大きい、または2.0倍大きい場合に、対応する参照抗体（ミルベツキシマブまたはファーレッツズマブ）よりもFR α 発現細胞へのより高い内在化を示すとみなされる。特定の実施形態では、適切な蛍光染料及び高コンテンツイメージングを使用して、内在化された抗体の量を決定する。いくつかの実施形態では、FR α を高レベルで発現する細胞において、内在化された抗体の量が決定される。いくつかの実施形態では、内在化された抗体の量は、IGROV-1細胞またはIGROV-1細胞と同様のレベルでFR α を発現する細胞で決定される。いくつかの実施形態では、内在化された抗体の量は、6時間のインキュベーション期間後に決定される。いくつかの実施形態では、内在化抗体の量は、24時間のインキュベーション期間の後に決定される。

【0043】

抗原結合ドメイン

本開示の抗FR α 抗体構築物は、hFR α に結合することができる少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。hFR α に結合することができる少なくとも1つの抗原結合ドメインは、典型的には、抗原結合抗体断片などの免疫グロブリンベースの結合ドメインである。抗原結合抗体断片の例として、限定されないが、Fab断片、Fab'断片、一本鎖Fab（scFab）、一本鎖Fv（scFv）、及び単一ドメイン抗体（sdAb）が挙げられる。

【0044】

「Fab断片」は、軽鎖の定常ドメイン（CL）及び重鎖の第1の定常ドメイン（CH

10

20

30

40

50

1) を、軽鎖及び重鎖の可変ドメイン（それぞれ V L 及び V H）とともに含む。F a b ' 断片は、抗体ヒンジ領域からの 1 つ以上のシステインを含む、重鎖 C H 1 ドメインの C 末端に若干のアミノ酸残基が付加されていることによって F a b 断片とは異なる。F a b 断片はまた、一本鎖 F a b 分子、すなわち、F a b 軽鎖及び F a b 重鎖がペプチドリンカーによって接続されて単一のペプチド鎖を形成する F a b 分子であってもよい。例えば、F a b 軽鎖の C 末端は、一本鎖 F a b 分子内の F a b 重鎖の N 末端に接続され得る。

【0045】

「s c F v」は、単一のポリペプチド鎖内に抗体の重鎖可変ドメイン（V H）及び軽鎖可変ドメイン（V L）を含む。s c F v は、任意で、V H ドメインと V L ドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含んでもよく、これにより、s c F v が抗原結合のための所望の構造を形成することが可能になる。例えば、s c F v は、ポリペプチドリンカーによってその C 末端から V H の N 末端に接続された V L を含み得る。あるいは、s c F v は、ポリペプチドリンカーによってその C 末端を介して V L の N 末端に接続された V H を含み得る（Pluckthun の総説である The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)）を参照されたい）。

10

【0046】

「s d A b」フォーマットは、単一の免疫グロブリンドメインを指す。s d A b は、例えば、ラクダ科起源のものであってよい。ラクダ科抗体は軽鎖を欠いていて、それらの抗原結合部位は、「V H H」と称される単一ドメインからなる。s d A b は、抗原結合部位を形成する 3 つの C D R / 超可変ループを含む：C D R 1、C D R 2 及び C D R 3。s d A b は、例えば、抗体の F c 鎖との融合物として、かなり安定して発現しやすい（例えば、Harmsen & De Haard, 2007, Appl. Microbiol Biotechnol., 77 (1) : 13-22 を参照されたい）。

20

【0047】

抗 F R α 抗体構築物が 2 つ以上の抗原結合ドメインを含むそれらの実施形態では、各追加の抗原結合ドメインは、独立して、免疫グロブリンベースドメイン、例えば、抗原結合抗体断片、または非免疫グロブリンベースドメイン、例えば、非免疫グロブリンベースの抗体模倣物、またはその標的に特異的に結合することができる他のポリペプチドもしくは小分子、例えば、天然または操作されたリガンドであり得る。非免疫グロブリンベースの抗体模倣フォーマットには、例えば、アンチカリン、フィノマー、アフィマー、アルファボディ、D A R P i n、及びアビマーが含まれる。

30

【0048】

本開示は、本明細書において、h F R α（バリエーション v 2 3 9 2 4）に特異的に結合する抗体、ならびにこの抗体の代表的なヒト化バージョン（バリエーション v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5 及び v 3 1 4 2 6）ならびにこの抗体の代表的な親和性成熟バージョン（バリエーション v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8 及び v 3 6 6 7 5）の同定を説明する（実施例及び配列表を参照されたい）。図 7 に示される h F R α 配列（配列番号 1 5）を使用したエピトープマッピングは、バリエーション v 2 3 9 2 4 によって結合された h F R α タンパク質内のエピトープが、配列番号 1 5 のアミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含むことを決定した（実施例 1 3 を参照されたい）。

40

【0049】

特定の実施形態では、本開示の抗 F R α 抗体構築物に含まれる h F R α に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインは、配列番号 1 5 のアミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含む h F R α タンパク質内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物によって結合される h F R α エ

50

ピトープは、配列番号 15 のアミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含む非直線（または不連続）エピトープである。特定の実施形態では、本開示の抗 F R α 抗体構築物は、h F R α への結合を、アミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含む h F R α タンパク質内のエピトープに結合する抗体と競合する抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態では、本開示の抗 F R α 抗体構築物は、h F R α への結合を、本明細書に記載される抗体 v 2 3 9 2 4 と競合する抗原結合ドメインを含む。

【0050】

当該技術分野で既知の競合アッセイを使用して、抗体構築物が、アミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含む h F R α タンパク質内のエピトープに結合する抗体、または抗体 v 2 3 9 2 4 と、h F R α への結合のために競合するかどうかを決定することができる。例えば、アミノ酸残基 E 1 2 0、D 1 2 1、R 1 2 3、T 1 2 4、S 1 2 5、及び Y 1 2 6 を含む h F R α タンパク質内のエピトープに結合する抗体または抗体 v 2 3 9 2 4（参照抗体）を、まず、飽和条件下で h F R α に結合させ、次に、試験抗体構築物が h F R α に結合する能力を測定する。試験抗体構築物が、参照抗体と同時に h F R α に結合することができる場合、試験抗体構築物は、参照抗体とは異なるエピトープに結合すると考えられる。逆に、試験抗体構築物が、参照抗体と同時に h F R α に結合することができない場合、試験抗体構築物は、同じエピトープ、重複するエピトープ、または参照抗体によって結合されるエピトープに近接するエピトープに結合すると考えられる。競合アッセイはまた、参照抗体及び試験抗体の結合順序を逆転する、すなわち、試験抗体がまず飽和条件下で h F R α に結合することを可能にし、次いで、参照抗体構築物が h F R α に結合する能力を測定するように実施してもよい。

【0051】

そのような競合アッセイは、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴（S P R）、バイオレイヤー干渉法、フローサイトメトリーなどの技術を使用して行うことができる。参照抗体「と競合する抗体」とは、競合アッセイでそのエピトープへの参照抗体の結合を 50% 以上ブロックする抗体を指す。

【0052】

特定の実施形態では、本開示の抗 F R α 抗体構築物は、h F R α に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインは、本明細書に記載される抗体バリエーション v 2 3 9 2 4 の C D R に基づく C D R のセットを含む。この抗体の抗体 v 2 3 9 2 4 及び代表的なヒト化または親和性成熟バージョンの C D R 配列を、図 17 に示す。親及び親和性成熟抗 F R α 抗体からの C D R 配列の分析は、I M G T、C h o t h i a、K a b a t、C o n t a c t、または A b M 番号付けテムのうちのいずれか 1 つによって定義されるように、各 C D R に存在する最小のアミノ酸配列を同定した。これらのアミノ酸配列は、表 3 に提供される最小コンセンサス C D R 配列によって表される。A b M 番号付けシステムによって定義される、C D R 配列に基づくこれらの C D R コンセンサス配列の拡張バージョンを表 4 に示す。

【0053】

10

20

30

40

50

【表 3】

抗F R α 抗体の最小CDR コンセンサス配列

CDR	配列	変数(X)	配列番号
重鎖			
HCDR1	X ¹ YGVS	X ¹ は、SまたはLである	3
HCDR2	NSGGS		4
HCDR3	SGSGYPMDYX ² X ³ I	X ² は、LまたはHである X ³ は、AまたはPである	5
軽鎖			
LCDR1	QSIX ⁴ X ⁵ W	X ⁴ は、GまたはWである X ⁵ は、DまたはYである	6
LCDR2	EAS		7
LCDR3	QQGYGRX ⁶ X ⁷ X ⁸ X ⁹ N	X ⁶ は、SまたはWである X ⁷ は、NまたはHである X ⁸ は、VまたはIである X ⁹ は、DまたはLである	8

【 0 0 5 4 】

【表 4】

A b M番号付けシステムに基づく抗F R α抗体のCDRコンセンサス配列

CDR	配列	変数	配列番号
重鎖			
HCDR1	GFSLSX ¹⁰ YGVS	X ¹⁰ は、SまたはLである	9
HCDR2	X ¹¹ X ¹² NSGGSAY	X ¹¹ は、SまたはAである X ¹² は、VまたはLである	10
HCDR3	SGSGYPMDYX ¹³ X ¹⁴ I	X ¹³ は、LまたはHである X ¹⁴ は、AまたはPである	11
軽鎖			
LCDR1	X ¹⁵ ASQSIX ¹⁶ X ¹⁷ WLA	X ¹⁵ は、RまたはQである X ¹⁶ は、GまたはWである X ¹⁷ は、DまたはYである	12
LCDR2	EASTLAS		13
LCDR3	QQGYGRX ¹⁸ X ¹⁹ X ²⁰ X ²¹ NI	X ¹⁸ は、SまたはWである X ¹⁹ は、NまたはHである X ²⁰ は、VまたはIである X ²¹ は、DまたはLである	14

【0055】

特定の実施形態では、本開示の抗F R α抗体構築物は、配列番号3、4、及び5に記載の配列を含む重鎖CDRアミノ酸配列（HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）、ならびに配列番号6、7、及び8に記載の配列を含む軽鎖CDRアミノ酸配列（LCDR1、LCDR2、及びLCDR3）を有する抗原結合ドメインを含む。

【0056】

特定の実施形態では、本開示の抗F R α抗体構築物は、以下の抗原結合ドメインを含む：

（i）配列番号3に記載のHCDR1アミノ酸配列、配列番号4に記載のHCDR2アミノ酸配列、及び配列番号5に記載のHCDR3アミノ酸配列（X²はLであり、X³はAである、またはX²はHであり、X³はPである）、ならびに

（ii）配列番号6に記載のLCDR1アミノ酸配列（X⁴はGであり、X⁵はDである、またはX⁴はWであり、X⁵はYである）、配列番号7に記載のLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号8に記載のLCDR3アミノ酸配列（X⁶はSであり、X⁷はNであり、X⁸はVであり、X⁹はDである、またはX⁶はWであり、X⁷はHであり、X⁸は

Iであり、 X^9 はLである）。

【0057】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、配列番号9、10、及び11に記載の配列を含む重鎖CDRアミノ酸配列（HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）、ならびに配列番号12、13、及び14に記載の配列を含む軽鎖CDRアミノ酸配列（LCDR1、LCDR2、及びLCDR3）を有する抗原結合ドメインを含む。

【0058】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、以下の抗原結合ドメインを含む：

（i）配列番号9に記載のHCDR1アミノ酸配列、配列番号10に記載のHCDR2アミノ酸配列（ X^{11} はSまたはAであり、 X^{12} はVである、または X^{11} はSであり、 X^{12} はLである）、及び配列番号11に記載のHCDR3アミノ酸配列（ X^{13} はLであり、 X^{14} はAである、または X^{13} はHであり、 X^{14} はPである）、及び

（ii）配列番号12に記載のLCDR1アミノ酸配列（ X^{15} はRまたはQであり、 X^{16} はGであり、 X^{17} はDである、または X^{15} はRであり、 X^{16} はWであり、 X^{17} はYである）、配列番号13に記載のLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号14に記載のLCDR3アミノ酸配列（ X^{18} はSであり、 X^{19} はNであり、 X^{20} はVであり、 X^{21} はDである、または X^{18} はWであり、 X^{19} はHであり、 X^{20} はIであり、 X^{21} はLである）。

【0059】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、以下の抗原結合ドメインを含む：

（i）バリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、v31426、v35305、v35342、v35347、v35348、v35350、v35354、v35356、v35358、v36167、v36168、またはv36675のうちのいずれか1つのHCDR1アミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、バリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、v31426、v35305、v35342、v35347、v35348、v35350、v35354、v35356、v35358、v36167、v36168、またはv36675のうちのいずれか1つのHCDR2アミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、及びバリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、v31426、v35305、v35342、v35347、v35348、v35350、v35354、v35356、v35358、v36167、v36168、またはv36675のうちのいずれか1つのHCDR3アミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、及び

（ii）バリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、v31426、v35305、v35342、v35347、v35348、v35350、v35354、v35356、v35358、v36167、v36168、またはv36675のうちのいずれか1つのLCDR1アミノ酸配列から選択されるLCDR1アミノ酸配列、バリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、v31426、v35305、v35342、v35347、v35348、v35350、v35354、v35356、v35358、v36167、v36168、またはv36675のうちのいずれか1つのLCDR2アミノ酸配列から選択されるLCDR2アミノ酸配列、及びバリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v

3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのLCDR3アミノ酸配列から選択されるLCDR3アミノ酸配列、を含み、
CDRアミノ酸配列は、IMGT、Chothia、Kabata、ContactまたはAbM番号付けシステムのいずれか1つによって定義されるとおりである（図17を参照されたい）。

【0060】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、IMGT、Chothia、Kabata、Contact、またはAbM番号付けシステムのうちのいずれか1つによって定義される、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つの重鎖CDRアミノ酸配列（HC DR 1、HC DR 2及びHC DR 3）から選択される重鎖CDRアミノ酸配列（HC DR 1、HC DR 2及びHC DR 3）、及びIMGT、Chothia、Kabata、Contact、またはAbM番号付けシステムのうちのいずれか1つによって定義される、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つの軽鎖CDRアミノ酸配列（LC DR 1、LC DR 2及びLC DR 3）から選択される軽鎖CDRアミノ酸配列（LC DR 1、LC DR 2及びLC DR 3）を有する抗原結合ドメインを含む。

【0061】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、IMGT、Chothia、Kabata、Contact、またはAbM番号付けシステムのうちのいずれか1つによって定義される、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つの重鎖CDRアミノ酸配列（HC DR 1、HC DR 2、HC DR 3）及び軽鎖CDRアミノ酸配列（LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3）を含む抗原結合ドメインを含む。

【0062】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのVHドメインのCDR配列を含む抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのVLドメインのCDR配列を含む抗原結合ドメインを含む。v 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0

、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、及びv 3 6 6 7 5のV H及びV L配列を、図18に提供する。

【0063】

特定の実施形態では、本開示の抗F R α抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのV Hアミノ酸配列から選択されるV Hアミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態では、本開示の抗F R α抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのV Lアミノ酸配列から選択されるV Lアミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。

10

【0064】

ある特定の実施形態において、本開示の抗F R α抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのV Hアミノ酸配列及びV Lアミノ酸配列から選択されるV Hアミノ酸配列及びV Lアミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。

20

【0065】

当業者は、抗体がその標的に結合する能力を失うことなく、限定された数のアミノ酸置換を、既知の抗体のC D R配列またはV HもしくはV L配列に導入できることを理解するであろう。候補のアミノ酸置換は、コンピュータモデリングによって、またはアラニンスキャンなどの当該技術分野で既知の技術によって同定することができ、得られたバリエーションは、標準的な技術によって結合活性について試験される。したがって、特定の実施形態では、本開示の抗F R α抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのC D Rのセットに対して、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上、または100%の配列同一性を有するC D Rのセット（すなわち、重鎖H C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3、ならびに軽鎖L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3）を含む抗原結合ドメインを含み、ここで、%配列同一性は、6つのC D R全てにわたって計算され、抗原結合ドメインは、h F R αに結合する能力を保持する。

30

【0066】

特定の実施形態では、本開示の抗F R α抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのC D R配列のセットのバリエーションを含む抗原結合ドメインを含み、バリエーションは、C D Rのセットにわたって1～10個のアミノ酸置換を含み（すなわち、C D Rは、6つのC D Rの任意の組み合わせを修飾することで、最大10個のアミノ酸置換によって修飾され得る）、抗原結合ドメインは、h F R αに結合する能力を保持する。いくつかの実施形態では、本開示の抗F R α抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4

40

50

、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのCDR配列のセットのバリエーションを含む抗原結合ドメインを含み、バリエーションは、CDRのセットにわたって、1～7個のアミノ酸置換、1～5個のアミノ酸置換、1～4個のアミノ酸置換、1～3個のアミノ酸置換、1～2個のアミノ酸置換、または1個のアミノ酸置換を含み、抗原結合ドメインは、hFR α に結合する能力を保持する。

【0067】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのVH配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVH配列を含む抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインは、hFR α に結合する能力を保持する。特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、バリエーションv 2 3 9 2 4、v 3 0 6 1 8、v 3 0 3 8 4、v 3 0 3 8 9、v 3 0 3 9 4、v 3 0 3 9 9、v 3 1 4 2 2、v 3 1 4 2 3、v 3 1 4 2 4、v 3 1 4 2 5、v 3 1 4 2 6、v 3 5 3 0 5、v 3 5 3 4 2、v 3 5 3 4 7、v 3 5 3 4 8、v 3 5 3 5 0、v 3 5 3 5 4、v 3 5 3 5 6、v 3 5 3 5 8、v 3 6 1 6 7、v 3 6 1 6 8、またはv 3 6 6 7 5のうちのいずれか1つのVL配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一であるVL配列を含む抗原結合ドメインを含み、抗原結合ドメインは、hFR α に結合する能力を保持する。

【0068】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、以下の抗原結合ドメインを含む：

(i) 配列番号20、23、26、28、31、92、93、94、95、または96のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHC DR1アミノ酸配列、配列番号21、24、27、29、32、51、58、100、101、102、103、109、137、138、または139のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHC DR2アミノ酸配列、及び配列番号22、25、30、107、108、または110のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHC DR3アミノ酸配列、ならびに
(ii) 配列番号40、43、45、65、125、126、または127のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLC DR1アミノ酸配列、配列番号41、44、または46のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLC DR2アミノ酸配列、及び配列番号42、47、120、または121のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLC DR3アミノ酸配列。

【0069】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、配列番号19、50、54、57、61、76、79、82、85、88、91、99、106、113、116、133、または136のいずれか1つに記載される配列を有するVHドメインの、CDR配列を含む抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、配列番号39、64、119、124、または130のいずれか1つに記載される配列を有するVLドメインの、CDR配列を含む抗原結合ドメインを含む。

【0070】

特定の実施形態では、本開示の抗 F R α 抗体構築物は、以下の抗原結合ドメインを含む：

(a) 配列番号 40、43、または 45 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、または 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 42 または 47 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 20、23、26、28、または 31 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、27、29、または 32 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、または 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、

10

(b) 配列番号 125、126、または 127 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、または 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 42 または 47 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 92、93、94、95、または 96 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、29、32、または 51 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、または 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、

20

(c) 配列番号 40、45、または 65 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、または 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 42 または 47 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列、ならびに

(i) 配列番号 20、23、26、28、もしくは 31 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、29、32、もしくは 51 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、もしくは 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、または

(i i) 配列番号 20、23、26、28、もしくは 31 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、29、32、もしくは 58 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、もしくは 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、または

30

(i i i) 配列番号 92、93、94、95、もしくは 96 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 24、100、101、102、もしくは 103 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、もしくは 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、または

(d) 配列番号 125、126、または 127 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、または 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 120 または 121 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列、及び

40

(i) 配列番号 92、93、94、95、もしくは 96 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 24、100、101、102、もしくは 103 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、もしくは 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、または

(i i) 配列番号 92、93、94、95、もしくは 96 のいずれか 1 つに記載され

50

るアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは109のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号107、108、もしくは110のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、または

(iii) 配列番号92、93、94、95、もしくは96のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは109のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、または

(iv) 配列番号20、23、26、28、もしくは31のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは109のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号107、108、もしくは110のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、または

(v) 配列番号20、23、26、28、もしくは31のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは109のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、または

(vi) 配列番号92、93、94、95、もしくは96のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、137、138、もしくは139のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、または

(e) 配列番号40、45、もしくは65のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR1アミノ酸配列、配列番号41、44、もしくは46のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号120もしくは121のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR3アミノ酸配列、及び

(i) 配列番号92、93、94、95、もしくは96のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは109のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号107、108、もしくは110のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、または

(ii) 配列番号20、23、26、28、もしくは31のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、29、32、もしくは109のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号107、108、もしくは110のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列。

【0071】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、以下の抗原結合ドメインを含む：

(a) 配列番号20、23、26、28、もしくは31のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR1アミノ酸配列、配列番号21、24、27、29、もしくは32のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR2アミノ酸配列、配列番号22、25、もしくは30のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるHCDR3アミノ酸配列、配列番号40、43、もしくは45のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR1アミノ酸配列、配列番号41、44、もしくは46のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR2アミノ酸配列、及び配列番号42もしくは47のいずれか1つに記載のアミノ酸配列から選択されるLCDR3ア

10

20

30

40

50

50

(g) 配列番号 92、93、94、95、もしくは 96 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、29、32、もしくは 109 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、配列番号 107、108、もしくは 110 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選

(h) 配列番号 92、93、94、95、もしくは 96 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、29、32、もしくは 109 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、配列番号 107、108、もしくは 110 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR3 アミノ酸配列、配列番号 125、126、もしくは 127 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、もしくは 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 120 もしくは 121 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR3 アミノ酸配列、または

(j) 配列番号 20、23、26、28、もしくは 31 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、29、32、もしくは 109 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、配列番号 107、108、もしくは 110 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR3 アミノ酸配列、配列番号 40、45、もしくは 65 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、もしくは 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 120 もしくは 121 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR3 アミノ酸配列、または

(l) 配列番号 2 0、2 3、2 6、2 8、もしくは 3 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 1、2 4、2 9、3 2、もしくは 1 0 9 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 2 アミノ酸配列、配列番号 2 2、2 5、もしくは 3 0 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される H C D R 3 アミノ酸配列、配列番号 1 2 5、1 2 6、もしくは 1 2 7 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 4 1、4 4、もしくは 4 6 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 2 アミノ酸配列、及び配列番号 1 2 0 もしくは 1 2 1 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される L C D R 3 アミノ酸配列、または

(m) 配列番号 92、93、94、95、もしくは 96 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR1 アミノ酸配列、配列番号 21、24、137、138、もしくは 139 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR2 アミノ酸配列、配列番号 22、25、もしくは 30 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される HCDR3 アミノ酸配列、配列番号 125、126、もしくは 127 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR1 アミノ酸配列、配列番号 41、44、もしくは 46 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR2 アミノ酸配列、及び配列番号 120 もしくは 121 のいずれか 1 つに記載のアミノ酸配列から選択される LCDR3 アミノ酸配列。

【0072】

特定の実施形態では、本開示の抗 FR α 抗体構築物は、配列番号 19、50、54、57、61、76、79、82、85、88、91、99、106、113、116、133、または 136 のいずれか 1 つに記載の VH アミノ酸配列から選択される VH アミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態では、本開示の抗 FR α 抗体構築物は、配列番号 39、64、119、124、または 130 のいずれか 1 つに記載の VL アミノ酸配列から選択される VL アミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。

【0073】

特定の実施形態では、本開示の抗 FR α 抗体構築物は、配列番号 19、50、54、57、61、76、79、82、85、88、91、99、106、113、116、133、または 136 のいずれか 1 つに記載の VH アミノ酸配列から選択される VH アミノ酸配列、及び配列番号 39、64、119、124、または 130 のいずれか 1 つに記載の VL アミノ酸配列から選択される VL アミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。

【0074】

特定の実施形態では、本開示の抗 FR α 抗体構築物は、以下を含む抗原結合ドメインを含む：

(a) 配列番号 39 に記載の VL アミノ酸配列、及び配列番号 19 に記載の VH アミノ酸配列、または

(b) 配列番号 124 に記載の VL アミノ酸配列、及び配列番号 91 に記載の VH アミノ酸配列、または

(c) 配列番号 64 に記載の VL アミノ酸配列、及び

(i) 配列番号 50 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i i) 配列番号 54 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i i i) 配列番号 57 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i v) 配列番号 61 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(v) 配列番号 76 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(v i) 配列番号 79 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(v i i) 配列番号 82 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(v i i i) 配列番号 85 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i x) 配列番号 88 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(x) 配列番号 106 に記載の VH アミノ酸配列、または

(d) 配列番号 130 に記載の VL アミノ酸配列、及び

(i) 配列番号 99 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i i) 配列番号 106 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i i i) 配列番号 113 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i v) 配列番号 116 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(v) 配列番号 133 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(v i) 配列番号 136 に記載の VH アミノ酸配列、または

(e) 配列番号 119 に記載の VL アミノ酸配列、及び

(i) 配列番号 106 に記載の VH アミノ酸配列、もしくは

(i i) 配列番号 116 に記載の VH アミノ酸配列。

【 0 0 7 5 】

特定の実施形態では、本開示の抗 F R α 抗体構築物は、以下を含む抗原結合ドメインを含む：

(i) 配列番号 1 9 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 3 9 に記載の V L アミノ酸配列、または

(i i) 配列番号 5 0 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(i i i) 配列番号 5 4 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(i v) 配列番号 5 7 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v) 配列番号 6 1 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v i) 配列番号 7 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v i i) 配列番号 7 9 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(v i i i) 配列番号 8 2 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(i x) 配列番号 8 5 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x) 配列番号 8 8 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i) 配列番号 9 1 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 2 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i i) 配列番号 9 9 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i i i) 配列番号 1 0 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 6 4 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i v) 配列番号 1 0 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 1 9 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v) 配列番号 1 0 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v i) 配列番号 1 1 3 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v i i) 配列番号 1 1 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 1 9 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x v i i i) 配列番号 1 1 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x i x) 配列番号 1 3 3 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列、または

(x x) 配列番号 1 3 6 に記載の V H アミノ酸配列、及び配列番号 1 3 0 に記載の V L アミノ酸配列。

【 0 0 7 6 】

フォーマット

本開示の抗 F R α 抗体構築物は、様々なフォーマットを有し得る。抗 F R α 抗体構築物の最小構成要素は、h F R α に結合する抗原結合ドメインである。抗 F R α 抗体構築物は、1 つ以上の追加の抗原結合ドメイン及び／または足場をさらに任意に含み得る。抗 F R α 抗体構築物が 2 つ以上の抗原結合ドメインを含むそれらの実施形態では、各追加の抗原結合ドメインは、h F R α 内の同じエピトープに結合してもよく、h F R α 内の異なるエ

10

20

30

40

50

ピトープに結合してもよく、または異なる抗原に結合してもよい。したがって、抗 F R α 抗体構築物は、例えば、単一特異性、バイパラトピック、二重特異性、または多重特異性であり得る。

【0077】

特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、h F R α に結合する少なくとも1つの抗原結合ドメイン及び足場を含み、抗原結合ドメインは、足場に機能的に連結されている。

「機能的に連結された」という用語は、本明細書中で使用される場合、記載される構成要素が、それらがその意図される方法で機能することを可能にする関係にあることを意味する。好適な足場の例を以下に記載する。

【0078】

特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、任意で足場に機能的に連結された2つの抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、3つまたは4つの抗原結合ドメイン及び任意に足場を含み得る。これらのフォーマットでは、足場を含む場合、少なくとも第1の抗原結合ドメインは、足場に機能的に連結され、残りの抗原結合ドメイン（複数可）は、それぞれ独立して、足場または第1の抗原結合ドメインに機能的に連結されてもよく、または2つを超える抗原結合ドメインが存在する場合、別の抗原結合ドメインに連結されてもよい。

【0079】

足場を欠く抗 F R α 抗体構築物は、s d A b などの適切なフォーマットで単一の抗原結合ドメインを含んでもよく、またはそれらは、1つ以上のリンカーによって任意に機能的に連結された2つ以上の抗原結合ドメインを含んでもよい。そのような抗 F R α 抗体構築物において、抗原結合ドメインは、s c F v、F a b、s d A b、またはそれらの組み合わせの形態であり得る。例えば、抗原結合ドメインとして s c F v を使用すると、タンデム s c F v ((s c F v)₂ または t a F v) などのフォーマットが構築され得、s c F v は、フレキシブルなリンカーによって一緒に接続される。s c F v は、短いリンカー（通常、長さが約5アミノ酸）によって接続された2つの s c F v を含むダイアボディフォーマットを構築するために使用され得る。リンカーの制限された長さは、頭から尾の様式で s c F v の二量体化をもたらす。先行するフォーマットのいずれかにおいて、s c F v は、ドメイン間ジスルフィド結合を含めることによってさらに安定化され得る。例えば、V L と V H との間に、各鎖に追加のシステイン残基を導入することによって（例えば、V H の44位及びV L の100位に）ジスルフィド結合を導入してもよく（例えば、F i t z g e r a l d e t a l . , 1997, P r o t e i n E n g i n e e r i n g , 10:1221-1225を参照されたい）、または2つのV H との間にジスルフィド結合を導入して、D A R T フォーマットを有する構築物を提供してもよい（例えば、J o h n s o n e t a l . , 2010, J M o l . B i o l . , 399:436-449を参照されたい）。

【0080】

同様に、いくつかの実施形態では、好適なリンカーを介して一緒に接続された、V H またはV H H などの2つの s d A b を含むフォーマットを用いてもよい。足場を欠く抗 F R α 抗体構築物フォーマットの他の例としては、F a b 断片、例えば、F a b₂ 及び F (a b ')₂ フォーマットに基づくものが挙げられ、F a b 断片は、リンカーまたはI g G ヒンジ領域を介して接続される。

【0081】

異なる形態の抗原結合ドメインの組み合わせを用いて、代替の足場のないフォーマットを作製することもできる。例えば、s c F v または s d A b は、F a b 断片の軽鎖及び重鎖のいずれかまたは両方のC末端に融合され得、二価 (F a b - s c F v / s d A b) 構築物をもたらす。

【0082】

特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、免疫グロブリン (I g) に基づく抗体フォーマットであり得る。特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、I g G クラス免疫

10

20

30

40

50

グロブリン、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4免疫グロブリンに基づき得る。いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、IgG1免疫グロブリンに基づき得る。本開示の文脈では、抗FR α 抗体構築物が特定の免疫グロブリンアイソタイプに基づく場合、抗FR α 抗体構築物が、特定の免疫グロブリンアイソタイプの定常領域の全部または一部を含むことを意味する。例えば、所与のIgアイソタイプに基づく抗FR α 抗体構築物は、Ig足場に機能的に連結された少なくとも1つの抗原結合ドメインを含み得、足場は、所与のアイソタイプからのFc領域及び任意に同じまたは異なるアイソタイプからのIgヒンジ領域を含む。いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物はまた、アイソタイプ及び／またはサブクラスのハイブリッドを含み得ることも理解されたい。また、Fc領域及び／またはヒンジ領域は、任意で、当該技術分野で既知であるような1つ以上の所望の機能的特性を付与するように修飾され得ることも理解されたい。

10

【0083】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、異なる種に由来する2つ以上の免疫グロブリンに由来してもよく、例えば、抗FR α 抗体構築物は、キメラ抗体またはヒト化抗体であり得る。「キメラ抗体」及び「ヒト化抗体」という用語は、両方とも、概して、2つ以上の種由来の免疫グロブリン領域またはドメインを組み合わせる抗体を指す。

【0084】

「キメラ抗体」は、典型的には、ウサギまたはげっ歯類（例えば、マウス）抗体などの非ヒト抗体からの少なくとも1つの可変ドメイン、及びヒト抗体からの少なくとも1つの定常ドメインを含む。キメラ抗体のヒト定常ドメインは、置き換えられる非ヒト定常ドメインと同じアイソタイプである必要はない。キメラ抗体は、例えば、Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-55、及び米国特許第4,816,567号にて議論されている。

20

【0085】

「ヒト化抗体」は、非ヒト抗体に由来する配列を最小限で含有するキメラ抗体の一種である。一般に、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域(CDR)由来の残基が、標的抗原に対して所望の特異性及び親和性を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域(CDR)由来の残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。このヒト化抗体を作製するための技術は、多くの場合、「CDRグラフト化」と呼ばれる。

30

【0086】

場合によっては、抗体の性能をさらに改良するために、ヒト化抗体に追加の修飾がなされる。例えば、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基を、対応する非ヒト残基で置き換えるか、またはレシピエント抗体もしくはドナー抗体のいずれにも見られない残基をヒト化抗体に含めてもよい。一般に、ヒト化抗体の可変ドメインは、非ヒト免疫グロブリンに由来する超可変領域の全てまたは実質的に全てと、ヒト免疫グロブリン配列に由来するFRの全てまたは実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、例えば、Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525、Riechman et al., 1988, Nature, 332:323-329、及びPresta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596により詳細に記述されている。

40

【0087】

非ヒトCDRをグラフトするのに最適なヒトフレームワークを選択するための数多くのアプローチが当該技術分野において知られている。初期のアプローチは、CDRを提供する非ヒト抗体との配列同一性に関係なく、十分に特徴付けられたヒト抗体の限られたサブセットを使用していた(「固定フレームワーク」アプローチ)。より最近のアプローチは、CDRを提供する非ヒト抗体の可変領域と高いアミノ酸配列同一性を有する可変領域が採用されている(「相同性マッチング」または「ベストフィット」アプローチ)。別のアプローチは、いくつかの異なるヒト抗体に由来する軽鎖または重鎖可変領域内のフレームワーク配列の断片を選択することである。CDRグラフト化により、場合によっては、グ

50

ラフトされた分子のその標的抗原に対する親和性が部分的または完全に失われ得る。そのような場合、親和性は、ヒト由来の残基の一部を対応する非ヒト由来の残基に復帰変異させることによって、回復することができる。これらのアプローチによってヒト化抗体を調製するための方法は、当該技術分野においてよく知られている（例えば、Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA)、Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525、Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-329、Presta et al., 1997, Cancer Res, 57(20):4593-4599を参照されたい）。

10

【0088】

このような従来のアプローチに代えてまたは加えて、CDRグラフト化ヒト化抗体の免疫原性をさらに減少させるために、より最近の技術を採用し得る。例えば、体細胞変異（複数可）を有するヒトフレームワークではなく、ヒト生殖細胞系列配列またはコンセンサス配列に基づくフレームワークをアクセプターヒトフレームワークとして採用し得る。非ヒトCDRの潜在的な免疫原性を減少させることを目的とした別の技術は、特異性決定残基（SDR）のみをグラフトすることである。このアプローチでは、抗原結合活性に必要な最小限のCDR残基（「SDR」）のみを、ヒト生殖細胞系列のフレームワークにグラフトする。この方法は、ヒト化抗体の「ヒト性」（すなわち、ヒト生殖細胞系配列との類似性）を改善し、したがって、可変領域の免疫原性のリスクを低減させるのに役立ち得る。これらの技術は、様々な刊行物に記載されている（例えば、Almagro & Fransson, 2008, Front Biosci, 13:1619-1633、Tan, et al., 2002, J Immunol, 169:1119-1125、Hwang, et al., 2005, Methods, 36:35-42、Pelat, et al., 2008, J Mol Biol, 384:1400-1407、Tamura, et al., 2000, J Immunol, 164:1432-1441、Gonzales, et al., 2004, Mol Immunol, 1:863-872、及びKashmiri, et al., 2005, Methods, 36:25-34を参照されたい）。

20

30

【0089】

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、ヒト化抗体配列、例えば、1つ以上のヒト化可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、ヒト化抗体であり得る。抗FR α 抗体v23924に基づくヒト化抗体の非限定的な例は、本明細書に記載される（v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、及びv31426；実施例及び配列表を参照のこと）。

【0090】

足場

特定の実施形態では、本開示の抗FR α 抗体構築物は、足場に機能的に連結された1つ以上の抗原結合ドメインを含む。抗原結合ドメイン（複数可）は、上記の形態（例えば、scFv、Fab、及び／またはsdAb）の1つまたは組み合わせであり得る。好適な足場の例は、以下により詳細に記載され、限定されないが、免疫グロブリンFc領域、アルブミン、アルブミン類似体及び誘導體、ヘテロ二量体化ペプチド（例えば、ロイシンジッパー、Jun及びFos由来のヘテロ二量体形成「ジッパー」ペプチド、IgG CH1及びCLドメインまたはバーナーゼバースター毒素）、サイトカイン、ケモカインまたは成長因子を含む。他の例としては、IBC Pharmaceuticals, Inc. 及び Immunomedics, Inc.（例えば、Chang, et al., 2007, Clin. Cancer Res., 13:5586s-5591sを参照されたい）によって開発されたDOCK-AND-LOCK（商標）（DNL（商標））技術に

40

50

基づく抗体が含まれる。

【0091】

足場は、ペプチド、ポリペプチド、ポリマー、ナノ粒子または他の化学物質であり得る。足場がポリペプチドである場合、抗F R α抗体構築物の各抗原結合ドメインは、ポリペプチド足場のN末端またはC末端のいずれかに連結され得る。抗原結合ドメインのうちの1つ以上が、N末端またはC末端以外の領域に、例えば、リンカーを伴う、または伴わないアミノ酸の側鎖を介して連結されるポリペプチド足場を含む抗F R α抗体構築物も、特定の実施形態では企図される。

【0092】

抗F R α抗体構築物がペプチドまたはポリペプチドである足場を含む実施形態では、抗原結合ドメイン（複数可）は、遺伝的融合または化学的コンジュゲーションによって足場に連結され得る。典型的には、足場がペプチドまたはポリペプチドである場合、抗原結合ドメイン（複数可）は、遺伝的融合によって足場に結合される。足場がポリマーまたはナノ粒子であるいくつかの実施形態では、抗原結合ドメイン（複数可）は、化学的コンジュゲーションによって足場に結合され得る。

【0093】

2つの異なるポリペプチドの選択的対を含むいくつかのタンパク質ドメインが当該技術分野で既知であり、足場を形成するために使用され得る。一例は、一緒に選択的に対合するFos及びJunなどのロイシンジッパードメインである（Kostelny, et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)、Wranik, et al., J. Biol. Chem., 287:43331-43339 (2012)）。他の選択的対合分子対としては、例えば、バーナーゼバースター対（Deyev, et al. Nat Biotechnol, 21:1486-1492 (2003)）、DNA鎖対（Chaudri, et al., FEBS Letters, 450(1-2):23-26 (1999)）、及びスプリット蛍光タンパク質対（国際特許出願公開第WO2011/135040号）が挙げられる。

【0094】

タンパク質足場の他の例としては、免疫グロブリンFc領域、アルブミン、アルブミン類似体及び誘導体、毒素、サイトカイン、ケモカイン、及び成長因子が挙げられる。抗原結合部分と組み合わせたタンパク質足場の使用が記載されている（例えば、Muller et al., 2007, J. Biol. Chem., 282:12650-12660、McDonagh et al., 2012, Mol. Cancer Ther., 11:582-593、Vallera et al., 2005, Clin. Cancer Res., 11:3879-3888、Song et al., 2006, Biotech. Appl. Biochem., 45:147-154、及び米国特許出願公開第2009/0285816号を参照されたい。

【0095】

例えば、scFv、ダイアボディまたは一本鎖ダイアボディなどの抗原結合部分をアルブミンに融合させることは、抗原結合部分の血清半減期を改善することが示されている（Muller et al., 同書）。抗原結合部分は、任意で、リンカーを介して、アルブミンのN末端及び／またはC末端で融合され得る。

【0096】

トランスポーターポリペプチドが自己組織化して準天然アルブミンを形成するように、アルブミンタンパク質のセグメンテーションによって得られる2つのトランスポーターポリペプチドを含む、ヘテロ多量体の形態のアルブミンの誘導体が記載されている（国際特許出願公開第WO2012/116453号及び同第WO2014/012082号を参照されたい）。アルブミンのセグメンテーションの結果として、ヘテロ多量体は、4つの末端を含み、したがって、任意でリンカーを介して、最大4つの異なる抗原結合部分に融合することができる。

【0097】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、タンパク質足場を含んでもよい。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、免疫グロブリン F c 領域、アルブミン、またはアルブミン類似体もしくは誘導体に基づくタンパク質足場を含んでもよい。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、免疫グロブリン F c 領域、例えば、I g G F c 領域に基づくタンパク質足場を含んでもよい。

【0098】

F c 領域

「F c 領域」、「F c」または「F c ドメイン」という用語は、本明細書中で使用される場合、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を指す。その用語には、天然配列 F c 領域及びバリエーション F c 領域が含まれる。本明細書において別段明記されない限り、F c 領域または定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に記載される、E U インデックスとも呼ばれる E U 番号付けシステムに従う。

【0099】

特定の実施形態では、本開示の抗 F R α 抗体構築物は、免疫グロブリン F c 領域に基づく足場を含んでもよい。F c 領域は、二量体であり、2つの F c ポリペプチドから構成され得るか、または代替的に、F c 領域は、単一のポリペプチドから構成され得る。

【0100】

二量体 F c の文脈における「F c ポリペプチド」は、二量体 F c ドメインを形成する2つのポリペプチドのうちの1つ、すなわち、安定な自己会合が可能な免疫グロブリン重鎖の1つ以上の C 末端定常領域を含むポリペプチドを指す。二量体 F c 領域を形成するポリペプチドを指す場合、用語「第1の F c ポリペプチド」及び「第2の F c ポリペプチド」は、F c 領域が1つの第1の F c ポリペプチド及び1つの第2の F c ポリペプチドを含むことを条件として、互換的に使用されてもよい。

【0101】

F c 領域は、C H 3 ドメインを含んでもよく、または C H 3 及び C H 2 ドメインの両方を含んでもよい。例えば、特定の実施形態では、二量体 I g G F c 領域の F c ポリペプチドは、I g G C H 2 ドメイン配列及び I g G C H 3 ドメイン配列を含み得る。そのような実施形態では、C H 3 ドメインは、二量体 F c 領域の2つの F c ポリペプチドのそれぞれから1つで、2つの C H 3 配列を含み、C H 2 ドメインは、二量体 F c 領域の2つの F c ポリペプチドのそれぞれから1つで、2つの C H 2 配列を含む。

【0102】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、I g G F c 領域に基づく足場を含んでもよい。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、ヒト I g G F c 領域に基づく足場を含んでもよい。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、I g G 1 F c 領域に基づく足場を含み得る。いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、ヒト I g G 1 F c 領域に基づく足場を含んでもよい。

【0103】

特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、第1の F c ポリペプチド及び第2の F c ポリペプチドを含む、ホモ二量体 F c 領域である I g G F c 領域に基づく足場を含んでもよく、第1の F c ポリペプチド及び第2の F c ポリペプチドは、それぞれ、C H 3 配列、及び任意に、C H 2 配列を含み、第1及び第2の F c ポリペプチドのアミノ酸配列は、同一である。

【0104】

特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、第1の F c ポリペプチド及び第2の F c ポリペプチドを含む、ヘテロ二量体 F c 領域である I g G F c 領域に基づく足場を含んでもよく、第1の F c ポリペプチド及び第2の F c ポリペプチドは、それぞれ、C H 3 配

列、及び任意に、CH₂配列を含み、第1及び第2のFcポリペプチドのアミノ酸配列は、異なる。いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、2つのCH₃配列を含むFc領域に基づく足場を含み得、そのうちの少なくとも1つは、1つ以上のアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、2つのCH₃配列及び2つのCH₂配列を含むFc領域に基づく足場を含み得、CH₂配列のうちの少なくとも1つは、1つ以上のアミノ酸修飾を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、修飾されたCH₃ドメインを含むヘテロ二量体Fc領域を含み得、修飾されたCH₃ドメインは、1つ以上の非対称アミノ酸修飾を含む非対称修飾されたCH₃ドメインである。本明細書中で使用される場合、「非対称アミノ酸修飾」は、第1のCH₃またはCH₂配列上の特定の位置にあるアミノ酸が、同じ位置にある第2のCH₃またはCH₂配列上のアミノ酸とは異なる、置換または挿入などの修飾を指す。これらの非対称アミノ酸修飾は、各配列上の同じそれぞれのアミノ酸位置にある2つのアミノ酸のうちの一方のみの修飾、または第1及び第2のCH₃またはCH₂配列の各々の上の同じそれぞれの位置にある両方のアミノ酸の異なる修飾の結果であり得る。ヘテロ二量体Fcの第1及び第2のCH₃またはCH₂配列のそれぞれは、1つまたは2つ以上の非対称アミノ酸修飾を含み得る。

【0106】

いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、修飾されたCH₃ドメインを含むヘテロ二量体Fcを含み得、修飾されたCH₃ドメインは、ホモ二量体Fcの形成にわたってヘテロ二量体Fcの形成を促進する1つ以上のアミノ酸修飾を含む。いくつかの実施形態では、アミノ酸修飾のうちの1つ以上は、非対称アミノ酸修飾である。

【0107】

ヘテロ二量体Fcの形成を促進するために、FcのCH₃ドメインに対して行ってよいアミノ酸改変は、当該技術分野において知られており、例えば、国際公開第WO96/027011号に記載されているもの（「knobs into holes」）、Gunasekaran et al., 2010, J Biol Chem, 285, 19637-46に記載されているもの（「静電ステアリング」）、Davis et al., 2010, Prot Eng Des Sel, 23(4):195-202に記載されているもの（strand exchange engineered domain (SEED) 技術）、及びLabrijn et al., 2013, Proc Natl Acad Sci USA, 110(13):5145-50に記載されているもの（Fabアーム交換）が挙げられる。他の例としては、国際公開第WO2012/058768号及び同第WO2013/063702号に記載される、非対称に修飾された安定なFc領域をもたらす正及び負の設計戦略を組み合わせたアプローチが挙げられる。特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、国際公開第WO2012/058768号または同第WO2013/063702号に記載されているような修飾Fc領域に基づく足場を含み得る。

【0108】

表5は、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231～447に対応する、ヒトIgG1Fc配列（配列番号16）のアミノ酸配列を提供する。CH₃配列は、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸341～447を含む。表5には、国際特許出願公開第WO2012/058768号及び同第WO2013/063702号に記載されるように、ヘテロ二量体Fcの形成を促進するCH₃ドメインアミノ酸修飾も示される。

【0109】

特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、表5に示されるように、バリエーション1、バリエーション2、バリエーション3、バリエーション4またはバリエーション5のいずれか1つの修飾を含む修飾されたCH₃ドメインを有するヘテロ二量体Fc足場を含んでもよい。

【0110】

10

20

30

40

50

【表 5】

ヒト I g G 1 F c 配列¹及び C H 3 ドメインアミノ酸修飾は、ヘテロ二量体形成を促進する。

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号 16)		
バリエント番号	鎖	変異
1	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

10

¹ 2 3 1 ~ 4 4 7 位 (E U 番号付け) からの配列

20

【0 1 1 1】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、2つの C H 3 配列及び2つの C H 2 配列を含む F c 領域に基づく足場を含み得、C H 2 配列のうちの少なくとも1つは、1つ以上のアミノ酸修飾を含む。C H 2 ドメインの修飾は、F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I サブクラスの受容体などの、F c への F c 受容体 (F c R) の結合に影響を与えることができる。

【0 1 1 2】

いくつかの実施形態では、抗 F R α 抗体構築物は、修飾された C H 2 ドメインを有する I g G F c に基づく足場を含み、C H 2 ドメインの修飾は、F c γ R I、F c γ R I I 及び F c γ R I I I 受容体のうちの1つ以上への結合の変化をもたらす。

30

【0 1 1 3】

異なる F c γ 受容体に対する F c の親和性を選択的に変化させる C H 2 ドメインに対するいくつかのアミノ酸修飾は、当該技術分野で既知である。結合の増加をもたらすアミノ酸修飾及び結合の減少をもたらすアミノ酸修飾はそれぞれ、特定の適応において有用であり得る。例えば、F c γ R I I I a (活性化受容体) に対する F c の結合親和性の増加は、増加した抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C) をもたらし得、これは次に、増加した標的細胞の溶解をもたらす。同様に、F c γ R I I I b (抑制性受容体) への結合の減少は、いくつかの状況においては有益であることがある。特定の適応症では、A D C C 及び補体媒介性細胞傷害性 (C D C) の低減または消失が望ましいこともある。このような場合には、F c γ R I I I b への結合を増大させるアミノ酸修飾を含む修飾された C H 2 ドメイン、または全ての F c γ 受容体への F c 領域の結合を低減もしくは消失させるアミノ酸修飾 (「ノックアウト」バリエント) が有用であり得る。

40

【0 1 1 4】

F c γ 受容体による F c の結合を変化させる C H 2 ドメインへのアミノ酸修飾の例としては、限定されないが、以下が挙げられる：S 2 9 8 A / E 3 3 3 A / K 3 3 4 A 及び S 2 9 8 A / E 3 3 3 A / K 3 3 4 A / K 3 2 6 A (F c γ R I I I I a に対する親和性が増加) (L u , e t a l . , 2 0 1 1 , J I m m u n o l M e t h o d s , 3 6 5 (1 - 2) : 1 3 2 - 4 1)、F 2 4 3 L / R 2 9 2 P / Y 3 0 0 L / V 3 0 5 I / P 3 9 6 L (F c γ R I I I I a に対する親和性が増加) (S t a v e n h a g e n , e t a l

50

., 2007, Cancer Res, 67 (18) : 8882-90)、F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (FcγRIIIaに対する親和性が増加) (Nordstrom JL, et al., 2011, Breast Cancer Res, 13 (6) : R123)、F243L (FcγRIIIaに対する親和性が増加) (Stewart, et al., 2011, Protein Eng Des Sel., 24 (9) : 671-8)、S298A/E333A/K334A (FcγRIIIaに対する親和性が増加) (Shields, et al., 2001, J Biol Chem, 276 (9) : 6591-604)、S239D/I332E/A330L及びS239D/I332E (FcγRIIIaに対する親和性が増加) (Lazar, et al., 2006, Proc Natl Acad Sci USA, 103 (11) : 4005-10)、ならびにS239D/S267E及びS267E/L328F (FcγRIIbに対する親和性が増加) (Chu, et al., 2008, Mol Immunol, 45 (15) : 3926-33)。FcγRIIbによるFcの結合を変化させる、CH2ドメインへの様々なアミノ酸修飾は、国際公開第WO2021/232162号に記載されている。Fc受容体へのFcの結合に影響を及ぼす追加の修飾は、Therapeutic Antibody Engineering (Strohl & Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012, page 283)に記載されている。

10

20

【0115】

特定の実施形態では、抗FRα抗体構築物は、修飾されたCH2ドメインを有するIgG Fcに基づく足場を含み、修飾されたCH2ドメインは、全てのFc領域のFcγ受容体への結合の減少または排除をもたらす1つ以上のアミノ酸修飾を含む（すなわち、「ノックアウト」バリエーション）。

【0116】

様々な刊行物が「ノックアウト」バリエーションを生成するために抗体を操作するために使用された戦略を記載している（例えば、Strohl, 2009, Curr Opin Biotech 20:685-691, 及びStrohl & Strohl, “Antibody Fc engineering for optimal antibody performance” In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge:Woodhead Publishing, 2012, pp225-249を参照されたい）。これらの戦略には、グリコシル化の修飾、IgG2/IgG4足場の使用、またはFcのヒンジもしくはCH2ドメインにおける変異の導入によるエフェクター機能の低下が含まれる（米国特許公開第2011/0212087号、国際公開第WO2006/105338号、米国特許公開第2012/0225058号、米国特許公開第2012/0251531号、及びStrop et al., 2012, J. Mol. Biol., 420:204-219も参照されたい）。

30

【0117】

「ノックアウト」バリエーションを生成するためにヒンジまたはCH2ドメインに導入される変異の例としては、アミノ酸修飾L234A/L235A、及びL234A/L235A/D265Sが挙げられる。

40

【0118】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗FRα抗体構築物は、天然グリコシル化が修飾されたIgG Fcに基づく足場を含んでもよい。当該技術分野において知られているように、Fcのグリコシル化を改変して、エフェクター機能を増減させてよい。例えば、297位の保存されたアスパラギン残基のアラニン、グルタミン、リジンまたはヒスチジンへの変異（すなわち、N297A、Q、KまたはH）は、全てのエフェクター機能を欠く非グリコシル化Fcをもたらす（Bolt et al., 1993, Eur. J. Immunol., 23:403-411; Tao & Morrison, 1989, J

50

. Immunol., 143:2595-2601)。

【0119】

反対に、重鎖N297結合オリゴ糖からのフコースの除去は、FcγRIIIaへの改善された結合に基づいて、ADCCを増強することが示されている（例えば、Shields et al., 2002, J Biol Chem., 277:26733-26740、及びNiwa et al., 2005, J. Immunol. Methods, 306:151-160を参照されたい）。そのような低フコース抗体は、例えば、フコシルトランスフェラーゼ（FUT8）を欠くノックアウトチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（Yamane-Ohnuki et al., 2004, Biotechnol. Bioeng., 87:614-622）、N297結合炭水化物にフコースを結合させる能力が低下したバリエーションCHO細胞株Lec13（国際公開第WO03/035835号）、または非フコシル化抗体を生成する他の細胞（例えば、Li et al., 2006, Nat Biotechnol, 24:210-215; Shields et al., 2002, ibid、及びShinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem., 278:3466-3473を参照されたい）において産生され得る。加えて、国際公開第WO2009/135181号は、抗体上の炭水化物へのフコースの組み込みを阻害するために、抗体産生中に培養培地にフコース類似体を添加することを記載している。

【0120】

Fcグリコシル化部位（N297）上にフコースがほとんどまたは全くない抗体を産生する他の方法は、当該技術分野で周知である。例えば、GlymaX（登録商標）技術（ProBioGen AG）（von Horsten et al., 2010, Glycobiology, 20(12):1607-1618及び米国特許第8,409,572号を参照されたい）。

【0121】

他のグリコシル化バリエーションには、二分されたオリゴ糖を含むもの、例えば、抗体のFc領域に結合している二分岐型オリゴ糖がN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）によって二分されているバリエーションが含まれる。かかるグリコシル化バリエーションは、低減されたフコシル化及び／または改善されたADCC機能を有し得る（例えば、国際公開第WO2003/011878号、米国特許第6,602,684号、及び米国特許出願公開第US2005/0123546号を参照されたい）。有用なグリコシル化バリエーションとしては、Fc領域に結合したオリゴ糖に、少なくとも1つのガラクトース残基を有するバリエーションであって、CDC機能が向上していることがあるバリエーションも挙げられる（例えば、国際公開第WO1997/030087号、同第WO1998/58964号及び同第WO1999/22764号を参照されたい）。

【0122】

特定の実施形態では、抗FRα抗体構築物は、フルサイズ抗体（FSA）のフォーマットを有する。いくつかの実施形態では、抗FRα抗体構築物は、IgG FSA、例えば、IgG1 FSAのフォーマットを有する。いくつかの実施形態では、抗FRα抗体構築物は、第1の重鎖配列（H1）、第2の重鎖配列（H2）、第1の軽鎖配列（L1）及び第2の軽鎖配列（L2）を含むFSAである。いくつかの実施形態では、抗FRα抗体構築物は、ホモ二量体Fcを有する単一特異性FSAであり、H1、H2、L1及びL2配列を含み、H1及びH2は同じアミノ酸配列を有し、L1及びL2は同じアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、抗FRα抗体構築物は、ヘテロ二量体Fcを有する単一特異性FSAであり、H1、H2、L1及びL2配列を含み、H1及びH2は異なるアミノ酸配列を有し、L1及びL2は同じアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、抗FRα抗体構築物は、ヘテロ二量体Fcを有する二重特異性またはバイパラトピックFSAであり、H1、H2、L1及びL2配列を含み、H1及びH2は異なるアミノ酸配列を有し、L1及びL2は異なるアミノ酸配列を有する。

【0123】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、バリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、v31426、v35305、v35342、v35347、v35348、v35350、v35354、v35356、v35358、v36167、v36168、またはv36675のうちのいずれか1つについて表A及びBに示されるH1、H2、L1、及びL2アミノ酸配列を含む、H1、H2、L1、及びL2配列のセットを有するFSAである。当該技術分野で既知であるように、特定の細胞株または特定の発現ベクターからの抗体重鎖配列の発現は、重鎖の一方または両方にC末端リジン残基を含むことをもたらし得る。したがって、本開示の特定の実施形態は、バリエントv23924、v30618、v30384、v30389、v30394、v30399、v31422、v31423、v31424、v31425、v31426、v35305、v35342、v35347、v35348、v35350、v35354、v35356、v35358、v36167、v36168、またはv36675のうちのいずれか1つについての表A及びBに記載されるH1、H2、L1、及びL2アミノ酸配列を含むH1、H2、L1、及びL2配列のセットを有するFSAである抗FR α 抗体構築物に関し、H1及びH2配列の一方または両方は、C末端リジンを含む（例えば、配列番号157を参照されたい）。

10

【0124】

抗FR α 抗体構築物の調製

本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物は、当該技術分野で既知の標準的な組換え方法を使用して産生され得る（例えば、米国特許第4,816,567号及び“Antibodies: A Laboratory Manual,” 2nd Edition, Ed. Greenfield, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2014を参照されたい）。

20

【0125】

典型的には、抗体構築物の組換え産生のために、抗FR α 抗体構築物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を生成し、宿主細胞におけるさらなるクローニング及び／または発現のために1つ以上のベクターに挿入する。抗FR α 抗体構築物をコードするポリヌクレオチド（複数可）は、当該技術分野で既知の標準的な方法によって産生され得る（例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1994 & update、及び“Antibodies: A Laboratory Manual,” 2nd Edition, Ed. Greenfield, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2014を参照されたい）。当業者によって理解されるように、抗FR α 抗体構築物の発現に必要なポリヌクレオチドの数は、抗体構築物が足場を含むかどうかを含む、構築物のフォーマットに依存するであろう。例えば、抗FR α 抗体構築物がホモ二量体Fcを有するmAbフォーマットである場合、1つのポリペプチド鎖をそれぞれコードする2つのポリヌクレオチドが必要となるが、抗FR α 抗体構築物がヘテロ二量体Fcを有するmAbフォーマットである場合、1つのポリペプチド鎖をそれぞれコードする3つのポリヌクレオチドが必要となる。複数のポリヌクレオチドが必要な場合、それらは、1つのベクター中に、または2つ以上のベクター中に組み込まれ得る。

30

40

【0126】

一般に、発現のために、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットは、ポリヌクレオチドの効率的な転写に必要な1つ以上の調節エレメント、例えば、転写エレメントとともに、発現ベクター（複数可）に組み込まれる。そのような調節エレメントの例としては、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、及びポリアデニル化シグナルが挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、調節エレメントの選択が、抗体構築物の発現のために選択された宿主細胞に依存し、そのような調節エレメントが、細菌、真菌、ウイルス、哺乳動物または昆虫遺伝子を含む様々な供給源に由来し得ることを理解するで

50

あろう。その発現ベクターは任意に、発現、または発現したタンパク質の精製を促進する異種の核酸配列をさらに含んでよい。例としては、シグナルペプチド、ならびに金属親和性タグ、ヒスチジンタグ、アビジン／ストレプトアビジンコード配列、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) コード配列及びビオチンコード配列のような親和性タグが挙げられるが、これらに限らない。その発現ベクターは、染色体外ベクターまたは組み込みベクターであってよい。

【0127】

抗FR α 抗体構築物のクローニングまたは発現に好適な宿主細胞は、当該技術分野で既知であるように、様々な原核細胞または真核細胞を含む。真核宿主細胞としては、例えば、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び酵母細胞（例えば、*Saccharomyces*、または*Pichia*細胞など）が挙げられる。原核生物宿主細胞には、例えば、*E. coli*細胞、*A. salmonicida*細胞または*B. subtilis*細胞が含まれる。

【0128】

特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、及び同第5,840,523号、ならびにCharlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, pp. 245-254, B. K. C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, N. J., 2003に記載のように、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要でないときに、細菌中で生成され得る。

【0129】

糸状菌または酵母などの真核微生物は、特定の実施形態では、好適な発現宿主細胞であり得、特に、グリコシル化経路が「ヒト化」され、部分的または完全にヒトグリコシル化パターンを有する抗体構築物の産生をもたらす真菌及び酵母株であり得る（例えば、Gerngross, 2004, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414、及びLi et al., 2006, *Nat. Biotech.* 24:210-215を参照されたい）。

【0130】

グリコシル化された抗FR α 抗体構築物の発現に好適な宿主細胞は、通常、真核細胞である。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号には、トランスジェニック植物において抗原結合構築物を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術が記載されている。懸濁液中で成長するように適合された哺乳動物細胞株は、抗体構築物の発現に特に有用であり得る。例としては、SV40 (COS-7) によって形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚性腎臓 (HEK) 株293または293細胞（例えば、Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36:59を参照されたい）、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスSertoli TM4細胞（例えば、Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251を参照されたい）、サル腎臓細胞 (CV1)、アフリカミドリサル腎臓細胞 (VERO-76)、ヒト子宮頸癌 (HeLa) 細胞、イヌ腎臓細胞 (MDCK)、buffalo系ラット肝細胞 (BRL3A)、ヒト肺細胞 (W138)、ヒト肝臓細胞 (Hep G2)、マウス乳房腫瘍 (MMT060562)、TRI細胞（例えば、Mather et al., 1982, *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 383:44-68を参照されたい）、MRC5細胞、FS4細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (DHFR-CHO細胞を含む、Urlaub et al., 1980, *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:4216を参照されたい)、ならびに骨髓腫細胞株 (Y0、NS0、及びSp2/0など) を含むが、これらに限定されない。抗体構築物の産生に好適な例示的な哺乳動物宿主細胞株は、Yazaki & Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, pp. 255-268 (B. K. C. Lo, ed. Humana Press, Totowa, N. J.

10

20

30

40

50

、2003)に概説されている。

【0131】

特定の実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞株などの一過性または安定した高等真核生物細胞株であってもよい。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物HEK293T、CHO、HeLa、NS0もしくはCOS細胞株、またはこれらの細胞株のうちのいずれか1つに由来する細胞株であり得る。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、抗体構築物の成熟グリコシル化を可能にする安定した細胞株であり得る。

【0132】

抗FR α 抗体構築物をコードする発現ベクター（複数可）を含む宿主細胞は、抗FR α 抗体構築物を産生するための通常の方法を使用して培養され得る。あるいは、いくつかの実施形態では、抗FR α 抗体構築物をコードする発現ベクター（複数可）を含む宿主細胞を治療的または予防的に使用して、抗FR α 抗体構築物を対象に送達してもよく、またはポリヌクレオチドまたは発現ベクターを対象からの細胞にエクスピボで投与してもよく、その後、細胞を対象の体に戻してもよい。

【0133】

典型的には、抗FR α 抗体構築物は、発現後に精製される。タンパク質は、当業者に知られている様々な方法で単離または精製してよい（例えば、Protein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994を参照されたい）。標準的な精製方法としては、FPLC及びHPLCのようなシステムを用いて、大気圧または高圧で行うクロマトグラフィー技法（イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、サイジングクロマトグラフィーまたはゲルろ過クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィーを含む）が挙げられる。さらなる精製方法としては、電気泳動、免疫学的、沈殿、透析及びクロマトフォーカシング技術も挙げられる。タンパク質濃度と組み合わせた限外ろ過及びダイアフィルトレーション技術も有用である。当該技術分野で周知であるように、様々な天然タンパク質がFc及び抗体に結合し、これらのタンパク質は、特定の抗体構築物の精製に使用され得る。例えば、細菌タンパク質のA及びGはFc領域に結合する。同様に、細菌タンパク質のLは一部の抗体のFab領域に結合する。精製は、特定の融合パートナーによっても可能にされ得る。例えば、抗体は、GST融合物を用いる場合はグルタチオン樹脂、Hisタグを用いる場合はNi²⁺親和性クロマトグラフィー、またはフラグタグを用いる場合は固定化抗フラグ抗体を用いて精製してもよい。必要な精製の程度は、抗FR α 抗体構築物の使用に応じて変動する。いくつかの場合では、精製は必要ない場合がある。

【0134】

特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物は、実質的に純粋である。「実質的に純粋」（または「実質的に精製された」）という用語は、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物に関して使用される場合、抗体構築物が、その天然に存在する環境中、例えば、天然細胞、または組換え的に生成される構築物の場合には宿主細胞において見られるようなタンパク質に通常付随するまたはタンパク質と相互作用する成分を実質的にまたは本質的に含まないことを意味する。特定の実施形態では、実質的に純粋である抗FR α 抗体構築物は、（乾燥重量で）約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、または約5%未満の汚染タンパク質を有するタンパク質調製物である。

【0135】

本開示の特定の実施形態は、抗FR α 抗体構築物の発現に好適な条件下で、抗FR α 抗体構築物をコードする1つ以上のポリヌクレオチド、または抗FR α 抗体構築物をコードする1つ以上の発現ベクターが導入されている宿主細胞を培養することと、任意で、抗FR α 抗体構築物を宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から回収することと、を含む、抗FR α 抗体構築物の作製方法に関する。

【0136】

翻訳後修飾

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物は、1つ以上の翻訳後修飾を含み得る。そのような翻訳後修飾は、インビボで生じ得るか、またはそれらは、宿主細胞からの抗FR α 抗体構築物の単離後にインビトロで実施され得る。

【0137】

翻訳後修飾は、当該技術分野で知られている様々な修飾が挙げられる（例えば、Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993、Post-Translational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12, 1983、Seifter et al., 1990, Meth. Enzymol., 182: 626-646、及びRattan et al., 1992, Ann. N. Y. Acad. Sci., 663: 48-62を参照されたい）。抗FR α 抗体構築物が1つ以上の翻訳後修飾を含む実施形態では、構築物は、1または複数の部位に同じ種類の修飾を含み得るか、または異なる部位に異なる修飾を含み得る。

【0138】

翻訳後修飾の例としては、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基／ブロック基による誘導体化、ホルミル化、酸化、還元、タンパク質分解的切断または特定の化学的切断（臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼまたはNaBH₄による）が挙げられる。

【0139】

翻訳後修飾の他の例としては、例えば、N結合型またはO結合型糖鎖の付加または除去、N結合型またはO結合型糖鎖の化学修飾、N末端またはC末端の処理、アミノ酸骨格への化学部分の結合、及び原核生物宿主細胞の発現から生じるN末端メチオニン残基の付加または欠失が挙げられる。翻訳後修飾には、タンパク質の検出及び単離を可能にするための、酵素標識、蛍光標識、発光標識、同位体標識、または親和性標識などの検出可能な標識による修飾も含まれ得る。好適な酵素標識の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが挙げられるが、これらに限定されない。好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチンが挙げられるが、これらに限定されない。好適な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド及びフィコエリトリンが挙げられるが、これらに限定されない。発光材料の例としては、ルミノール、及びルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びアエコリンなどの生体発光材料が挙げられる。好適な放射性物質の例として、ヨウ素、炭素、硫黄、トリチウム、インジウム、テクネチウム、タリウム、ガリウム、パラジウム、モリブデン、キセノン、及びフッ素が挙げられる。

【0140】

翻訳後修飾の追加の例としては、アシル化、ADPリボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部位の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、システインの形成、ピログルタミン酸の形成、ガンマーカルボキシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、ペグ化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などのタンパク質への転移RNA媒介アミノ酸付加、及びユビキチン化が挙げられる。

【0141】

ポリヌクレオチド、ベクター及び宿主細胞

本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物をコードする単離された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。この文脈における

ポリヌクレオチドは、抗 F R α 抗体構築物の全部または一部をコードし得る。

【0142】

用語「核酸」、「核酸分子」及び「ポリヌクレオチド」は、本明細書において互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドのいずれか、またはそれらの類似体である任意の長さのヌクレオチドの高分子形態を指す。ポリヌクレオチドの非限定的な例としては、遺伝子、遺伝子断片、メッセンジャー RNA (mRNA)、cDNA、組換えポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離された DNA、任意の配列の単離された RNA、核酸プローブ、及びプライマーが挙げられる。

【0143】

所与のポリペプチドを「コードする」ポリヌクレオチドは、適切な調節配列の制御下に置かれるときに、インビボで (DNA の場合) 転写され、(mRNA の場合) ポリペプチドに翻訳されるポリヌクレオチドである。コード配列の境界は、5' (アミノ) 末端の開始コドン及び 3' (カルボキシ) 末端の翻訳停止コドンによって決定される。転写終結配列は、コード配列の 3' に位置し得る。

【0144】

本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載の抗 F R α 抗体構築物をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドを含むベクター (発現ベクターなど) に関する。ポリヌクレオチド (複数可) は、単一のベクターによって、または 1 つを超えるベクターによって構成され得る。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、マルチシストロン性ベクターによって構成され得る。

【0145】

本開示のある特定の実施形態は、本明細書に記載の抗 F R α 抗体構築物またはポリヌクレオチド (複数可) を含む 1 つ以上のベクターをコードするポリヌクレオチド (複数可) を含む宿主細胞に関する。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、真核生物、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ヒト胚性腎臓 (HEK) 細胞またはリンパ系細胞 (例えば、Y0、NS0、Sp20 細胞) である。

【0146】

抗体-薬物コンジュゲート

本開示の特定の実施形態は、細胞毒素または免疫調節物質などの 1 つ以上の薬物部分にコンジュゲートされた、本明細書に記載の抗 F R α 抗体構築物を含む抗体-薬物コンジュゲート (ADC) に関する。

【0147】

典型的には、ADC では、抗 F R α 抗体構築物は、切断可能または切断不可能なリンカーであり得るリンカーを介して薬物部分にコンジュゲートされる。抗 F R α 抗体構築物は、単一の薬物分子にコンジュゲートされてもよい、または複数の薬物分子にコンジュゲートされてもよい。単一の抗 F R α 抗体構築物にコンジュゲートされた薬物分子の数は、薬物-抗体比 (DAR) によって定義される。特定の実施形態では、本開示の ADC において、DAR は、約 1 ~ 約 12、または約 2 ~ 約 12、または約 2 ~ 約 8 の範囲内である。

【0148】

特定の実施形態では、抗 F R α 抗体構築物を含む ADC は、一般式 I、

$$A - (L - (D)_m)_n \quad (I)$$

を有し、

式中、A は、本明細書に記載される抗 F R α 抗体構築物であり、L は、リンカーであり、D は、薬物部分であり、m は、1 ~ 約 8 であり、n は、1 ~ 約 12 である。

【0149】

式 I の特定の実施形態では、m は、1 ~ 6 である。いくつかの実施形態では、m は 1 または 2 である。いくつかの実施形態では、n は、約 1 ~ 約 8、例えば、約 2 ~ 約 8 である。

【0150】

細胞傷害性または免疫調節性ADCペイロードとして有用であることが知られている様々な化合物は、抗FR α 抗体構築物を含むADCにおける薬物部分として用いられ得る。例としては、限定されないが、マイタンシノイド及びマイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン及びピロロベンゾジアゼピン、CC-1065などのデュオカルマイシン及びその類似体、カリケアミシン及びカリケアミシン類似体、アウリスタチン及びアウリスタチン類似体、ヘミアステリン及びヘミアステリン類似体、チューブリシン及びチューブリシン類似体、アマトキシシン及びアマトキシシン類似体、カンプトテシン及びカンプトテシン類似体、エリブリン、TLRアゴニスト（TLR7及び／またはTLR8のアゴニストなど）、ならびにSTINGアゴニストが挙げられる。

【0151】

特定の実施形態では、本開示のADCによって構成される薬物部分は、アウリスタチンまたはアウリスタチン類似体、ヘミアステリンまたはヘミアステリン類似体、カンプトテシンまたはカンプトテシン類似体、またはエリブリンである。

【0152】

典型的には、本開示のADCにおいて、薬物部分は、リンカーによって抗FR α 抗体構築物に結合される。リンカーは、1つ以上の薬物分子を抗体構築物に結合することができる二官能性または多官能性部分である。いくつかの実施形態では、リンカーは、単一の薬物分子を抗体構築物上の単一の部位に結合させるように、二官能性（または一価）であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、2つ以上の薬物分子を抗体構築物上の単一の部位に結合させるように、多官能性（または多価）であり得る。いくつかの実施形態では、多機能性リンカーを使用して、1つの薬物分子を抗体構築物上の2つ以上の部位に結合させてもよい。

【0153】

リンカーの抗FR α 抗体構築物への結合は、表面リジンを介して、酸化された炭水化物への還元的カップリング、または鎖間ジスルフィド結合を還元することによって遊離されたシステイン残基を介してなどの様々な方法で達成することができる。あるいは、抗FR α 抗体構築物へのリンカーの結合は、付加的なシステイン残基を含むための抗体構築物の改変（例えば、米国特許第7,521,541号、同第8,455,622号及び同第9,000,130号を参照）、または反応性のハンドルをもたらす非天然アミノ酸、例えば、セレノメチオニン、p-アセチルフェニルアラニン、ホルミルグリシンもしくはp-アジドメチル-L-フェニルアラニンによって達成されて、部位特異的なコンジュゲーションを可能にすることができる（例えば、Hofer et al., 2009, Biochemistry, 48:12047-12057、Axup et al., 2012, PNAS, 109:16101-16106、Wu et al., 2009, PNAS, 106:3000-3005、Zimmerman et al., 2014, Bioconj. Chem., 25:351-361を参照）。さらなる選択肢は、GlycoConnect（商標）技術（Synaffix BV、Nijmegen, Netherlands）の使用であり、これは、金属を含まないクリック化学によるリンカーの付着を可能にするための抗体グリカンの酵素的リモデリングを伴う（例えば、欧州特許第EP2911699号を参照されたい）。

【0154】

リンカーは、典型的には、抗原結合構築物上の標的基（複数可）と反応可能な官能基、及び薬物部分上の標的基と反応可能な1つ以上の官能基を含む。好適な官能基は当該技術分野で既知であり、例えば、Bioconjugate Techniques（G. T. Hermanson, 2013, Academic Press）に記載されているものを含む。遊離システインまたはチオールと反応するための官能基の非限定的な例としては、マレイミド、ハロアセトアミド、ハロアセチル、活性化エステル、例えば、スクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネートならびにイソチオシアネートが挙げられる。この状況では、Lyon et al., 201

10

20

30

40

50

4, Nat. Biotechnol., 32:1059-1062に記載されているものなどの「自己安定化」マレイミドも有用である。表面リジン及びアミンと反応するための官能基の非限定的な例としては、活性化エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンアミド（NHS）エステル、スルホ-NHSエステル）、イミドエステル（例えば、Traut試薬）、イソチオシアネート、アルデヒド及び酸無水物（例えば、ジエチレントリアミンペンタ無水酢酸（DTPA））が挙げられる。他の例として、スクシンイミド-1, 1, 3, 3-テトラ-メチルウロニウムテトラフルオロホウホウ酸（TSTU）またはベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（PyBOP）を使用して、カルボン酸を活性化エステルに変換し、次いで、活性化エステルをアミンと反応させてよい。（アルデヒドまたはケトンカルボニル基などの）抗体構築物または薬物部分上の求電子基と反応することができる官能基の非限定的な例としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジドが挙げられる。

10

【0155】

特定の実施形態では、抗体結合構築物上の2つの鎖間システインの架橋を可能にする官能基を含むリンカー、例えば、ThioBridge（商標）リンカー（Badescu et al., 2014, Bioconjug. Chem., 25:1124-1136）、ジチオマレイミド（DTM）リンカー（Behrens et al., 2015, Mol. Pharm., 12:3986-3998）、ジチオアリール（TCEP）ピリダジンジオン系リンカー（Lee et al., 2016, Chem. Sci., 7:799-802）またはジブロモピリダジンジオン系リンカー（Maruani et al., 2015, Nat. Commun., 6:6645）が使用され得る。

20

【0156】

ヒドラゾン、ジスルフィド及びペプチド系のリンカーを含む、薬物を抗体に連結するための様々なリンカーが当該技術分野で既知である。リンカーは、切断可能であっても切断不可能であってもよい。切断可能なリンカーは、典型的には、例えば、リソソームプロセスを介して、細胞内条件下で切断されやすい。例としては、プロテアーゼ感受性、酸感受性または還元感受性のリンカーが挙げられる。対照的に、切断不可能なリンカーは、一般にアミノ酸-リンカー-薬物部分の放出をもたらす細胞における抗体の分解に依存する。

30

【0157】

特定の実施形態で有用であり得る切断可能なリンカーの例は、細胞内プロテアーゼ、例えば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼによって切断可能なペプチド含有リンカーである。例として、ジペプチド含有リンカー、例えば、ジペプチド Val-Cit、Phe-Lys、Val-Lys、Ala-Lys、Phe-Lys、Val-Cit、Phe-Cit、Leu-Cit、Ile-Cit、Trp-Cit、Phe-Arg、Ala-Phe、Val-Ala、Met-Lys、Asn-Lys、Ile-Pro、Ile-Val、Asp-Val、His-Val、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Val-(D)Asp、NorVal-(D)Asp、Ala-(D)Asp、Me₃Lys-Pro、フェニルGly-(D)Lys、Met-(D)Lys、Asn-(D)Lys、Pro-(D)Lys、またはMet-(D)Lysを含むリンカー、トリペプチド含有リンカー、例えば、トリペプチド Met-Cit-Val、Gly-Cit-Val、(D)Phe-Phe-Lys、または(D)Ala-Phe-Lysを含むリンカー、及びテトラペプチド含有リンカー、例えば、テトラペプチド Gly-Phe-Leu-Gly、Gly-Gly-Phe-Gly、またはAla-Leu-Ala-Leuを含むリンカーが挙げられる。

40

【0158】

追加的な有用な切断可能なリンカーとしては、ジスルフィド含有リンカー、及びヒドラゾンリンカーなどの、特定のpHまたはpH範囲内で加水分解可能なリンカーが挙げられる。ジスルフィド含有リンカーの例として、限定されないが、N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)ブタン酸（SPDB）及びN-スクシンイミジル-4-(2-

50

ピリジルジチオ) - 2 - スルホブタン酸 (スルホ - S P D B) が挙げられる。ジスルフィド含有リンカーは、任意にリンカーの細胞外安定性を向上させるために、例えば、ジェミナルジメチル基を含めるなど、ジスルフィド結合に隣接する立体障害をもたらす追加の基を含んでもよい。これらの官能基の組み合わせを含むリンカーも有用な場合があり、例えば、ヒドラゾン及びジスルフィドの両方を含むリンカーが当該技術分野において知られている。

【0159】

切断可能なリンカーのさらなる例は、リソソーム及び腫瘍間質に存在する酵素である β - グルクロニダーゼによって切断可能な β - グルクロニドを含むリンカーである (例えば、De Graaf et al., 2002, Curr. Pharm. Des., 8: 1391 - 1403)。

10

【0160】

切断可能なリンカーは、任意に、自壊性基 / 自己離脱基、ストレッチャーまたは親水性部分などの1つ以上の追加の官能基をさらにも含む。

【0161】

リンカーとして用途を見出す自壊性及び自己離脱基としては、例えば、p - アミノベンジル (PAB) 及び p - アミノベンジルオキシカルボニル (PABC) 基、メチル化エチレンジアミン (MED) 及びヘミアミナル基が挙げられる。自壊性基の他の例としては、複素環式誘導体、例えば、米国特許第7, 375, 078号に記載されている2 - アミノイミダゾール - 5 - メタノール誘導体などの、PABCまたはPABE基と電子的に類似した芳香族化合物が挙げられるが、これらに限定されない。他の例としては、置換及び非置換4 - アミノ酪酸アミド (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology, 2: 223 - 227) 及び2 - アミノフェニルプロピオン酸アミド (Amsberry, et al., 1990, J. Org. Chem., 55: 5867 - 5877) などのアミド結合の加水分解時に環化する基が含まれる。自壊性 / 自己離脱基は、単独で、または組み合わせで、ペプチドベースのリンカーに含まれることが多いが、他のタイプのリンカーに含まれてもよい。いくつかの実施形態では、リンカーは、1つ以上の自壊性 / 自己離脱基、例えば、PABC基、PABE基、またはPABCもしくはPABE基とMEDとの組み合わせを含み得る。

20

【0162】

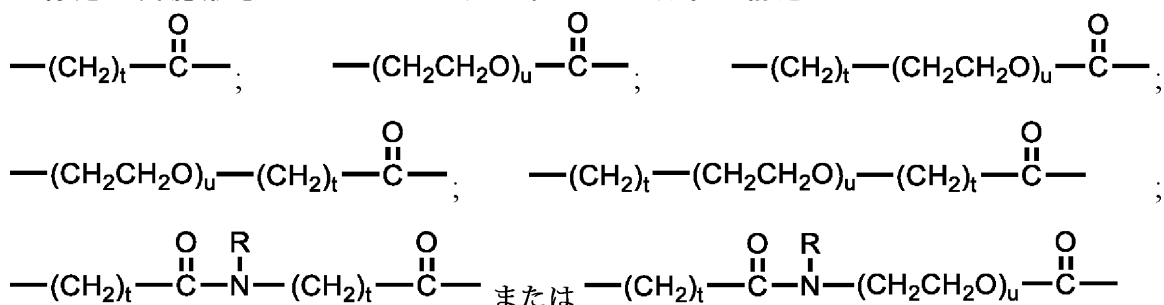
ADCのためのリンカーに使用されるストレッチャーとしては、例えば、アルキレン基ならびに脂肪酸、二塩基酸、アミンまたはジアミンベースのストレッチャー、例えば、ジグリコレート、マロネート、カプロネート及びカプロアミドが挙げられる。その他のストレッチャーとしては、例えば、グリシンベースのストレッチャー及びポリエチレングリコール (PEG) またはモノメトキシポリエチレングリコール (mPEG) ストレッチャーが挙げられる。PEG及びmPEGストレッチャーは、親水性部分としても機能し、疎水性薬物とともに特に有用であり得るが、他の薬物とのリンカーにおけるそれらの使用は、いくつかの実施形態においても企図される。

30

【0163】

特定の実施形態では、ストレッチャーは、以下の構造：

40



のうちの1つを有し得、式中、

50

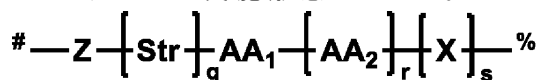
R は、H または C₁ ~ C₆ アルキルであり、

t は、2 ~ 10 の整数であり、

u は、1 ~ 10 の整数である。

【0164】

いくつかの実施形態では、式 I の ADC において、リンカー L は、式 II :



(II)

10

を有する切断可能なリンカーであり、式中、

Z は、リンカーを、抗 FR α 抗体構築物 A 上の標的基に結合するリンカーを結合する連結基であり、

Str は、ストレッチャーであり、

AA₁ 及び AA₂ は、それぞれ独立してアミノ酸であり、AA₁-[AA₂]_r が、プロテアーゼ切断部位を形成し、

X は、自壊性基であり、

q は、0 もしくは 1 であり、

r は、1、2、もしくは 3 であり、

s は、1、もしくは 2 であり、

20

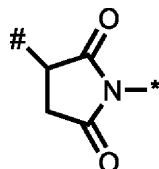
は、抗 FR α 抗体構築物 A への結合点であり、

% は、薬物部分 D との結合点である。

【0165】

いくつかの実施形態では、式 (II) のリンカーにおいて、

Z は

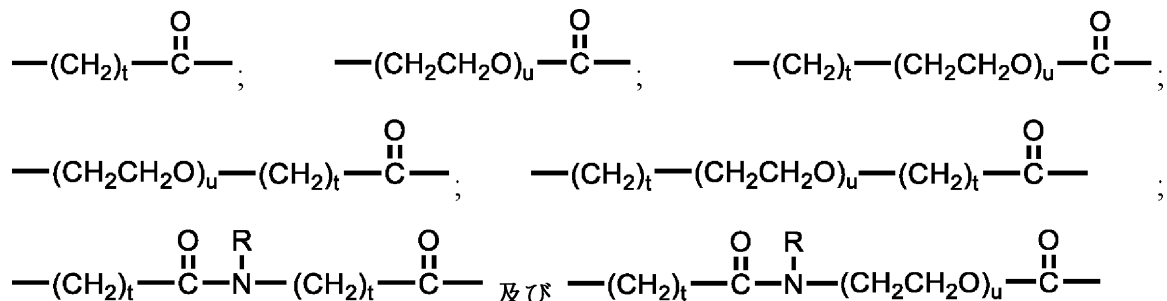


30

であり、# は、A との結合点であり、* は、リンカーの残部との結合点である。

【0166】

いくつかの実施形態では、式 (II) のリンカーにおいて、Str は、



40

から選択され、式中、

R は、H または C₁ ~ C₆ アルキルであり、

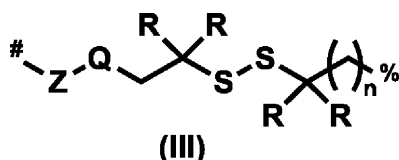
t は、2 ~ 10 の整数であり、

u は、1 ~ 10 の整数である。

【0167】

いくつかの実施形態では、式 I の ADC は、ジスルフィド含有リンカーを含んでもよい。いくつかの実施形態では、式 I の ADC において、リンカー L は、式 III :

50



を有する切断可能なリンカーであり、式中、

Zは、リンカーを、抗FR α 抗体構築物A上の標的基にリンカーを結合する連結基であり、

Qは、 $-(CH_2)_p-$ または $-(CH_2CH_2O)_q-$ であり、p及びqは、それぞれ独立して1～10の整数であり、

各Rは独立して、HまたはC₁～C₆アルキルであり、

nは、1、2または3であり、

#は、抗FR α 抗体構築物Aへの結合点であり、

%は、薬物部分Dとの結合点である。

【0168】

いくつかの実施形態では、式IのADCは、 β -グルクロニド含有リンカーを含んでもよい。

【0169】

薬物を抗体と連結するための様々な切断不可能なリンカーが当該技術分野において知られており、特定の実施形態では、本開示のADCに有用な場合もある。切断不可能なリンカーの例としては、抗体との反応のためのN-スクシンイミジルエステルもしくはN-スルホスクシンイミジルエステル部分を有する、もしくは薬物との反応のためのマレイミドもしくはハロアセチルベースの部分を有するリンカー、その逆のリンカーが挙げられる。そのような切断不可能なリンカーの例は、スルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシラート（スルホ-SMCC）ベースのものである。スルホ-SMCCコンジュゲーションは、典型的には、スルフヒドリル（チオール、-SH）と反応するマレイミド基を介して生じ、一方、スルホ-NHSエステルは、一級アミンに対して反応性である。そのようなリンカーの他の非限定的な例としては、N-スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサンカルボキシラート（SMCC）、N-スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシ（6-アミドカプロエート）（「長鎖」SMCCまたはLC-SMCC）、 κ -マレイミドウンデカン酸N-スクシンイミジルエステル（KMUA）、 γ -マレイミド酪酸N-スクシンイミジルエステル（GMBs）、 ϵ -マレイミドカプロン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（EMCS）、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（MBS）、N-(α -マレイミドアセトキシ)-スクシンイミドエステル（AMAS）、スクシンイミド-6-(β -マレイミドプロピオンアミド)ヘキサノエート（SMPH）、N-スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)-ブチレート（SMPB）、及びN-(p-マレイミドフェニル)イソシアネート（PMPi）に基づくリンカーが挙げられる。その他の例としては、N-スクシンイミジル-4-(ヨードアセチル)-アミノベンゾアート（SIAB）、N-スクシンイミジルヨードアセタート（SIA）、N-スクシンイミジルプロモアセタート（SBA）及びN-スクシンイミジル3-(プロモアセトアミド)プロピオナート（SBAP）などのハロアセチルベースの官能基を含むものが挙げられる。

【0170】

本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物を含むADCは、標準的な有機化学反応、条件、及び試薬を用いて、当該技術分野で既知のいくつかの経路のうちの1つによって調製され得る（例えば、Bioconjugate Techniques (G. T. Hermanson, 2013, Academic Press)を参照されたい）。例えば、コンジュゲーションは、(1)抗体構築物の官能基を二価リンカー試薬と反応させて、共有結合を介して抗体-リンカー中間体A-Lを形成し、続いて、活性化された薬物部分D

と反応させること、または（２）薬物部分の官能基をリンカー試薬と反応させて、共有結合を介して薬物－リンカー中間体D－Lを形成し、続いて、抗体構築物の官能基と反応させること、によって達成することができる。コンジュゲーション方法（１）及び（２）は、本明細書に記載されるADCを調製するために、様々な抗体構築物、薬物部分、及びリンカーとともに用いられ得る。

【0171】

様々な調製されたリンカー、リンカー構成成分、及び薬物は、市販されているか、または標準的な合成有機化学技術を使用して調製することができ（例えば、March's Advanced Organic Chemistry (Smith & March, 2006, Sixth Ed., Wiley); Toki et al., 2002, J. Org. 67:1866-1872; Frisch et al., 1997, Bioconj. 7:180-186; Bioconjugate Techniques (G. T. Hermanson, 2013, Academic Press)、及び抗体－薬物コンジュゲート：Methods in Molecular Biology (Ducry (Ed.), 2013, Springer)を参照されたい）。加えて、選択された抗体構築物との反応に好適ないくつかの事前に形成された薬物リンカーも市販されており、例えば、DM1、DM4、MMAE、MMAF、またはデュオカルマイシンSAを含む薬物リンカーは、Creative BioLabs (Shirley, NY)から入手可能である。加えて、様々な抗体－薬物コンジュゲーションサービスは、Lonza Inc. (Allendale, NJ)、Abzena PLC (Cambridge, UK)、ADC Biotechnology (St. Asaph, UK)、Baxter BioPharma Solutions (Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL)及びPiramal Pharma Solutions (Grangemouth, UK)などの企業から商業的に利用可能である。

10

20

【0172】

ADCは、一度調製されると、クロマトグラフィー（例えば、HPLC、サイズ排除、吸着、イオン交換及び／または親和性捕捉）、透析及び／またはタンジェンシャルフロー過などの標準的な技術によって精製され得る。

【0173】

使用の方法

本開示の特定の態様は、抗FR α 抗体構築物及びADCの治療的または診断的使用に関する。FR α は、多種多様ながんにおいて過剰発現され、したがって、本開示の特定の実施形態は、FR α 陽性がんの治療または診断における抗FR α 抗体構築物及びADCの使用方法に関する。

30

【0174】

特定の実施形態は、FR α 陽性腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、細胞を、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物またはADCと接触させることを含む方法に関する。細胞は、インビトロであってもインビボであってもよい。特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物及びADCは、対象のFR α 陽性がんまたは腫瘍を治療する方法で使用され得る。

40

【0175】

FR α を過剰発現するがんは、典型的には固形腫瘍である。例としては、限定されないが、卵巣癌、子宮内膜癌、肺癌（非小細胞肺癌（NSCLC）など）、中皮腫、乳癌（トリプルネガティブ乳癌（TNBC）を含む）、結腸直腸癌、胆道癌、膵癌及び食道癌が挙げられる。本開示の特定の実施形態は、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物またはADCでFR α 陽性がんを治療する方法に関し、がんは、卵巣癌、子宮内膜癌、肺癌（非小細胞肺癌（NSCLC）など）、中皮腫、乳癌、結腸直腸癌、胆道癌、膵癌または食道癌である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物またはADCは、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）の治療に有用であり得る。

50

【0176】

FR α 陽性がんの治療は、症状の緩和、腫瘍のサイズの縮小、腫瘍の成長の阻害、疾患の1つ以上の直接的または間接的な病理学的帰結の軽減、転移の予防、疾患の進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、生存の向上、無増悪生存、寛解、及び／または予後の向上、のうちの1つ以上をもたらし得る。

【0177】

特定の実施形態では、がんの治療に使用される場合、抗FR α 抗体構築物またはADCは、例えば、ボラス注射または対象の血流への連続注入によって、治療される対象に全身的に投与され得る。特定の実施形態では、がんの治療に使用される場合、抗FR α 抗体構築物またはADCは、治療される部位で対象に局所的に投与され得る。

10

【0178】

抗FR α 抗体構築物またはADCは、単独で、またはがんの治療に典型的に使用される1つ以上の既知の化学療法剤または免疫療法剤と組み合わせて使用され得ることが企図される。抗FR α 抗体構築物またはADCと標準的な化学療法剤または免疫療法剤との組み合わせは、化学療法剤または免疫療法剤の有効性を改善するために作用し得、したがって、標準的ながん療法を改善し得る。本出願は、標準的な治療に応答しない薬剤耐性がんの治療において重要であり得る。1つ以上の既知の化学療法剤または免疫療法剤と併せて使用される場合、抗FR α 抗体構築物またはADCは、化学療法剤または免疫療法剤の投与の前または後に投与され得るか、またはそれらは同時に投与され得る。

【0179】

投与される抗FR α 抗体構築物またはADCの投与量は、定義された制限に従うものではないが、治療上有効な量となるであろう。「治療上有効な量」とは、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物またはADCの量であって、対象に投与された場合、特定の適応症の治療を達成するのに十分な量を指す。がん治療に関する治療上有効な量の抗FR α 抗体構築物またはADCは、例えば、以下の効果の1つ以上を有し得る：がん細胞の数を減少させること、腫瘍サイズを減少させること、末梢器官へのがん細胞の浸潤を阻害すること、腫瘍転移を阻害すること、腫瘍増殖を阻害すること、生存時間を増加させること、及び／またはがんに関連する症状のうちの1つ以上をある程度軽減すること。がん治療について、有効性は、代替的に、例えば、疾患進行までの時間(TTP)を評価すること及び／または奏効率(RR)を決定することによって測定し得る。

20

30

【0180】

特定の実施形態は、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物を使用して、細胞または組織を含む試料などの生体試料中のFR α の存在を検出する方法に関する。いくつかの実施形態では、生体試料は、患者、例えば、がんを有することが知られているまたは疑われる患者から採取され得る。いくつかの実施形態は、試料を、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物と接触させることを含む、生体試料中のFR α の存在の検出方法に関する。

【0181】

特定の実施形態は、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物を使用して、がんなどのFR α の発現の増加に関連する障害を診断する方法に関する。診断方法は、抗FR α 抗体構築物が対象に投与されるインビボ方法であってもよい、または対象から採取された試料が抗FR α 抗体構築物と接触されるインビトロ方法であってもよい。インビボ方法について、投与は、全身または局所であり得る。

40

【0182】

FR α の存在を検出するか、またはFR α の発現の増加に関連する障害を診断する方法では、抗FR α 抗体構築物は、当該技術分野で既知の蛍光、発光、発色、化学発光、放射性、または酵素標識などの検出可能な標識で標識され得る。

【0183】

医薬組成物

治療的使用のために、抗FR α 抗体構築物及びADCは、抗FR α 抗体構築物またはADCと、薬学的に許容される担体または希釈剤とを含む、医薬組成物の形態で提供され得

50

る。組成物は、周知で容易に入手可能な成分を使用した既知の手順によって調製することができる。

【0184】

医薬組成物は、例えば、非経口、経口（例えば、頬側もしくは舌下）、局所、直腸または経膈経路、あるいは吸入または噴霧によって対象に投与するために製剤化されてもよい。「非経口」投与は、皮下注射、または皮内、関節内、静脈内、筋肉内、血管内、胸骨内、くも膜下腔内注射または注入であり得る。医薬組成物は、一般に、例えば、シロップ剤、エリキシル剤、錠剤、トローチ剤、ロゼンジ剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、丸剤、坐剤、油性懸濁剤、水性懸濁剤、分散性散剤、分散性顆粒剤、乳剤、注射剤または溶液剤として、対象に投与するのに適した様式に製剤化されることになる。医薬組成物は、単位剤形製剤として提供されてもよい。

10

【0185】

特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物またはADCを含む医薬組成物は、例えば、凍結乾燥製剤または水溶液として、注入による非経口投与のために、または単位用量の注射可能な形態で製剤化され得る。

【0186】

薬学的に許容される担体は、一般に、採用される投与量及び濃度でレシipientに対して非毒性である。そのような担体の例としては、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンなどの抗酸化剤；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リド、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルアルコール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチルまたはプロピルパラベンなど）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール及びm-クレゾールなどの保存剤；低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド；血清アルブミンまたはゼラチ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、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンなどの単糖、二糖、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；Zn-タンパク質複合体などの金属複合体、ならびに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が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0187】

ある特定の実施形態において、抗FR α 抗体構築物またはADCを含む医薬組成物は、滅菌注射剤用の水性または油性の溶液または懸濁液の形態であり得る。かかる懸濁液は、当該技術分野において既知の好適な分散剤もしくは湿潤剤及び／または懸濁剤を使用して製剤化され得る。滅菌注射用溶液または懸濁液は、非毒性の非経口的に許容される希釈剤または溶媒中に抗FR α 抗体構築物またはADCを含み得る。採用され得る許容される希釈剤及び溶媒には、例えば、1,3-ブタンジオール、水、リンゲル液または等張塩化ナトリウム溶液が含まれる。加えて、溶媒または懸濁媒体として、無菌不揮発性油が採用されてもよい。この目的では、合成のモノグリセリドまたはジグリセリドを含め、様々な無刺激固定油を用いてもよい。加えて、オレイン酸のような脂肪酸も、注射剤の調製に用いられる。局所麻酔薬、保存料及び／または緩衝剤などのアジュバントも、注入可能な溶液または懸濁液に含めてもよい。

40

【0188】

特定の実施形態では、抗FR α 抗体構築物またはADCを含む医薬組成物は、対象、例えば、ヒトへの静脈内投与のために製剤化され得る。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性バッファー中の溶液である。必要な場合には、その組成物は、可溶化剤、及び／または注射部位の痛みを和らげるためのリグノカインのような局所麻酔剤も含んでよい。一般に、成分は別個か、または単位剤形中で互いに混合させるかのいずれかで、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェなどの密閉容器中の凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。組成物が注入によって投与される場合、組成物は医薬

50

グレードの滅菌水または生理食塩水を含有する注入ボトルを用いて調剤され得る。組成物が注射によって投与される場合、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが、投与前に成分を混合できるように提供され得る。

【0189】

他の医薬組成物及び医薬組成物を調製する方法は、当該技術分野において知られており、例えば、“Remington: The Science and Practice of Pharmacy”（かつての“Remingtons Pharmaceutical Sciences”）、Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000)に記載されている。

10

【0190】

医薬キット

特定の実施形態は、本明細書に記載される抗FR α 抗体構築物またはADCを含む医薬キットに関する。

【0191】

キットは、典型的には、抗FR α 抗体構築物またはADCを保持する容器と、容器上または容器に関連付けられたラベル及び／または添付文書とを含むであろう。ラベルまたは添付文書には、治療用製品の市販パッケージに慣習的に含まれている説明が含まれ、当該治療用製品の使用に関する適応症、使用、投与量、投与、禁忌及び／または警告についての情報もしくは指示が記載されている。ラベルまたは添付文書は、医薬品または生物学的製剤の製造、使用、または販売を管轄する政府機関により規定された書式の説明書をさらに含んでもよく、この説明書には、ヒトまたは動物投与に関する製造、使用、または販売の政府機関による承認が織り込まれている。いくつかの実施形態では、容器は、滅菌アクセスポートを有し得る。例えば、容器は、皮下注射針によって貫通され得るストッパーを有する静注溶液バッグまたはバイアルであり得る。

20

【0192】

抗FR α 抗体構築物またはADCを保持する容器に加えて、キットは、任意に、キットの他の構成要素を含む1つ以上の追加の容器を含み得る。例えば、薬学的に許容されるバッファー（注射用滅菌水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液またはデキストロース溶液など）、他のバッファーまたは希釈液。

30

【0193】

好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、静脈内輸液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。適切であれば、キットの1つ以上の構成成分はまた、凍結乾燥されてもよく、または粉末もしくは顆粒などの乾燥形態で提供されてもよく、キットは凍結乾燥または乾燥された構成成分（複数可）の再構成に適した溶媒をさらに含んでもよい。

【0194】

キットは、フィルタ、針、及び注射器など、商業的な立場または使用者の立場から望ましい他の材料を含む場合もある。

【0195】

以下の実施例は、例示のために提供され、本発明の範囲をいかなる形でも限定する意図はない。

【実施例】

【0196】

一般条項

生物学的アッセイ：細胞株及びCDXモデルにおけるFR α の発現レベルを、試験レベルのIHCアッセイを使用して社内で評価し、相対発現レベル（高／中／低または強／中／弱）を割り当てた。PDXモデルを、アーカイブ腫瘍試料を使用して同様に評価した。

【0197】

実施例1：抗葉酸受容体アルファ抗体の調製

40

50

葉酸受容体アルファ (FR α) に特異的に結合する抗体を、ウサギをヒト FR α 抗原で免疫化することによって生成し、以下に記載するように単離し配列決定した。

【0198】

1. 1 免疫化

FR α に対する抗体を、可溶性 HIS タグ付きヒト葉酸受容体 1 抗原 (FR α -HIS) (ACROBiosystems, Newark, DE; Cat#FO1-H82E2) で免疫化したウサギにおいて成長させた。簡潔に述べると、2匹のニュージーランドホワイトウサギに、ウサギの背部体に沿って3部位 (0.333mL/部位) で皮下投与された Alum (5mg/注射) / CpG (10 μ g/注射) と混合した 200 μ g の FR α -HIS 抗原からなる一次ブーストを免疫化した。これらに続いて、100 μ g の FR α -HIS 抗原と Alum (5mg/注射) / CpG (10 μ g/注射) を混合した4回の免疫化を行った。それぞれの免疫化を14日間離した。動物を、血清学的検査のための第4の免疫化の前に採血した。

10

【0199】

1. 2 採取する動物の選択

抗ヒト FR α 抗体の価は、ヒト FR α を発現する CHO 細胞を用いたフローサイトメトリーによって決定された。簡潔に述べると、CHO 細胞を、Lipofectamine (商標) 2000 (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA) の製造業者の説明書に従って、ヒト FR α をコードする pTT5 ベースの発現プラスミド (National Research Council of Canada) で一過性にトランスフェクトした。1:400 から開始し、1:2 で11点にわたって連続希釈した免疫化されたウサギ血清の希釈物を、ヒト FR α を一過性に発現する 50,000 個の CHO 細胞で30分間インキュベートした。次いで、試料を洗浄し、抗体結合を、フローサイトメトリーによって、Alexa Fluor-647 (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA) にコンジュゲートされたヤギ抗ウサギ二次抗体で検出した。力価は、バックグラウンドを上回る少なくとも2倍の蛍光シグナルを示した最高希釈試料を同定することによって決定された。

20

【0200】

1. 3 B細胞の回収及び抗ヒト FR α 抗体の発見

100,000 を超える所望の力価を有する免疫化されたウサギを犠牲にし、脾臓を採取した。リンパ球を FACS バッファー (PBS、2% v/v FBS) 中で粉碎することによって解離し、細胞を組織から放出した。細胞をペレット化し、次いで 5mL の Pharm Lyse (商標) (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ) 中に1分間懸濁して赤血球を溶解させた。等体積の FACS バッファーを添加して、Pharm Lyse (商標) を中和し、得られたリンパ球試料をペレット化し、FACS バッファー中に再懸濁した。

30

【0201】

次いで、リンパ球懸濁液をヤギ抗ウサギ IgG Alexa Fluor-647 (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA) で染色して、IgG+B細胞を同定した。染色の30分後、IgG+B細胞を FACS Aria (商標) (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ) 上で選別し、カウントした。Selected Lymphocyte Antibody Method (SLAM) (Babcock et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93(15):7843-7848) を使用して、B細胞を、384ウェルプレート中の単一細胞から最大50個の細胞までの範囲の異なる密度で播種し、7日間培養により増大させ、抗ヒト FR α 抗体の検出のために上清を採取した。384ウェルプレートを-80℃で保存した。

40

【0202】

上清を、ELISAによってヒト FR α 特異的モノクローナル抗体についてスクリーニ

50

ングした。384ウェルELISAプレートを、PBS中の25 μ L／ウェルのヒトFR α -HIS (2 μ g／mL)でコーティングし、次いで、4℃で一晩インキュベートした。インキュベート後、プレートを水で2回洗浄し、90 μ L／ウェルのブロッキングバッファー (2%脱脂乳、PBS)を添加し、プレートを室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを、12.5 μ L／ウェルの抗体含有上清+12.5 μ Lブロッキングバッファーで洗浄し、陽性対照及び陰性対照を添加し、プレートを室温で2時間インキュベートした。

【0203】

インキュベーション後、プレートを洗浄し、25 μ Lの0.4 μ g／mLヤギ抗ウサギIgG Fc-HRP検出抗体 (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA)を各ウェルに添加し、プレートを室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを洗浄し、25 μ Lのテトラメチルベンジジン (TMB)を添加し、プレートを約10分間展開させた (陰性対照ウェルがシグナルを示し始めるまで)。次いで、25 μ Lの停止溶液 (1NのHCL)を各ウェルに添加し、プレートをSynergy (商標) H1マイクロプレート (BioTek Instruments, Winooski, VT)上で波長450nmで読み取った。

【0204】

1.4 抗ヒトFR α 抗体の配列決定

全RNAを、RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany)を使用して、製造者のプロトコルに従って、所望の特徴を有する抗体を含有するウェルから抽出した。得られた総RNAを、mRNAからcDNAを転写するために、SuperScript (商標) III (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA)及びoligo-dT20 (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA)とともに鋳型として使用した。cDNAは、続いてRNaseH (New England Biolabs, Ipswich, MA)で処理した。重鎖及び軽鎖抗体コード配列の最初のPCRを、核酸鋳型としてのcDNAとともに、Babcock et al., 1996, Proc Natl Acad Sci USA, 93 (15): 7843-7848及びvon Boehmer et al., 2016, Nat Protoc., 11 (10): 1908から改変したプライマー及び方法を使用して実施した。PCR生成物を、Zero Blunt (商標) TOPO (商標) PCRクローニングキット (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA)を使用してpCRTOPO4中にクローニングし、E. coli (登録商標)細胞 (Lucigen Corporation, Middleton, WI)へと形質変換した。抗生物質耐性クローンをサンガー配列決定し、独自の抗体コード配列について分析した。

【0205】

次いで、Vセグメントファミリー及びJセグメントファミリー特異的プライマーを使用して、これらの独自の配列に対して後続のPCR反応を行った。得られたアンプリコンを、pTT5ベースの発現プラスミド (National Research Council of Canada)にクローニングした。単一ウェル試料から出現する固有の重鎖配列及び軽鎖配列を、HEK293-6E細胞 (National Research Council of Canada)中において全ての可能な組み合わせで共発現させ、正確な重鎖及び軽鎖の対合を決定した。産生された抗体を、HEK293細胞上で一過的に発現した抗原への結合についてアッセイした。

【0206】

1.5 キメラ抗体の生成

抗体可変領域のコード配列を、huIgG1発現及びhuCK発現ベクター (pTT5ベクターに基づく)にフレーム内でクローニングした。huIgG1定常領域は、アラニンKabatt-118で始まり、huCK定常領域は、アルギニンKabatt-108で始まる。得られた組換えキメラ抗体の活性は、特異性結合アッセイで確認され、親抗体と

10

20

30

40

50

同等であることが見出された。

【0207】

実施例2：抗FR α 抗体のヒト化

実施例1に記載されるように生成されたキメラ抗ヒトFR α （抗hFR α ）バリエーションv23924の1つをヒト化のために選択した。v23924のCDR配列を表2.1に提供し、VH及びVL配列を表2.2に提供する。ヒト化を以下に記載するように行った。

【0208】

【表2.1】

抗hFR α 抗体v23924のCDR配列

10

番号付けシステム	配列					
	重鎖 CDR1	配列番号	重鎖 CDR2	配列番号	重鎖 CDR3	配列番号
IMGT	GFSLSSYG	20	VNSGGS	21	ARSGSGYPMDYLAI	22
Kabat	SYGVS	26	AVNSGGSAYANWAKS	27	SGSGYPMDYLAI	25
Chothia	GFSLSSY	23	NSGGS	24	SGSGYPMDYLAI	25
AbM	GFSLSSYGVS	31	AVNSGGSAY	32	SGSGYPMDYLAI	25
Contact	SSYGVS	28	WIGAVNSGGSAY	29	ARSGSGYPMDYLA	30
	軽鎖 CDR1	配列番号	軽鎖 CDR2	配列番号	軽鎖 CDR3	配列番号
IMGT	QSIGDW	40	EAS	41	QQGYGRSNVDNI	42
Kabat	QASQSIGDWLA	43	EASTLAS	44	QQGYGRSNVDNI	42
Chothia	QASQSIGDWLA	43	EASTLAS	44	QQGYGRSNVDNI	42
AbM	QASQSIGDWLA	43	EASTLAS	44	QQGYGRSNVDNI	42
Contact	GDWLAWY	45	LLIYEASTLA	46	QQGYGRSNVDN	47

20

30

【0209】

【表2.2】

抗hFR α 抗体v23924のVH及びVL配列

40

	配列	配列番号
VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYGVSWSVRQAPGNGLIEWIGAVNSGGSAYANWAKSRSTITRNTNLFVTCLKMTSLAVADTATYFCARSGSGYPMDYLAIWGPGLTVTVSS	19
VL	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSIGDWLAWYQQKPGQPPRLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVECADEAATYYCQQGYGRSNVDNIFGGGTEVVVK	39

【0210】

2.1 ヒト化

v23924のウサギVH及びVL配列の、それぞれのヒト生殖細胞系配列への配列ア

50

ラインメントは、IGHV3-23*01及びIGKV1-39*01を、最も近く最も頻繁なヒト生殖細胞系配列として同定した。図1に示されるように、AbM定義によるCDR配列(表2.1を参照)を、これらの選択されたヒト生殖細胞系配列のフレームワーク上に移植した。抗原への結合親和性の保持に重要である可能性が高いと判断される位置での得られた配列におけるウサギ残基への逆変異(hFRα)は、ほとんどの部分が以前の配列上に構築された生成された配列であり、第1のヒト化配列が最小数の逆変異を含有する、いくつかのヒト化配列を作製することを含んだ。いずれのバリエーションも、AbM方法によって定義されるように、親抗体のCDRを修飾しなかった。

【0211】

このプロセスを2つのサイクルで実施し、第1のサイクル(「サイクル1」)は、6つの可変重鎖ヒト化配列及び5つの可変軽鎖ヒト化配列をもたらした。第2のサイクル(「サイクル2」)は、ヒト化抗体のhFRαに対するより近い親様親和性を追求して、追加の5つの可変重鎖ヒト化配列に拡大した。ヒト化重鎖可変ドメイン(VH)及びhIgG1重鎖定常ドメイン(CH1、ヒンジ、CH2、CH3)を含有する完全重鎖配列、ならびにヒト化軽鎖可変ドメイン(VL)及びヒトカッパ軽鎖定常ドメイン(カッパCL)を含有する完全軽鎖配列をアセンブルした。次いで、モノクローナル抗体(mAb)バリエーションを、サイクル1において、ヒト化重鎖の各々をヒト化軽鎖の各々とペアリングして、30個のヒト化バリエーションを提供し、サイクル2において、追加のヒト化重鎖を選択されたヒト化軽鎖とペアリングして、追加の15個のヒト化バリエーションを提供し、合計45個のヒト化バリエーションを実験的に評価するようにアセンブルした。

【0212】

2.2 ヒト化抗体の産生

45個のヒト化mAb構築物のそれぞれ、及び親v23924mAb構築物を、2つの同一の全長重鎖(親v23924及び15個のヒト化バリエーション)のいずれかを含有するフルサイズ抗体(FSA)フォーマットで産生し、ホモ二量体Fc領域(HomoFc)をもたらし、またはCH3領域内の相補的変異を含むヘテロ二量体全長重鎖をもたらして、排他的な重鎖対合(30個のヒト化バリエーション)を駆動し、ヘテロ二量体Fc領域(HetFc)をもたらした。HomoFcの代わりにHetFcを含有するv23924のバージョンもまた作製した(バリエーションv30618)。全ての構築物は、2つの同一のカッパ軽鎖を含む。

【0213】

HomoFc領域によって構成される2つの同一の全長重鎖は、IGHG1*01のヒトCH1-ヒンジ-CH2-CH3ドメイン配列を含んだ(配列番号146、表2.3を参照)。HetFc領域(HetFc-A及びHetFc-B)によって構成されるヘテロ二量体完全長重鎖は、Fc領域において以下の変異を有するIGHG1*01のヒトCH1-ヒンジ-CH2-CH3ドメイン配列を含有した：

HetFc-A：T350V__L351Y__F405A__Y407V

HetFc-B：T350V__T366L__K392L__T394W

【0214】

HetFc-A(配列番号148)及びHetFc-B(配列番号149)の配列を表2.3に示す。IGKC*01のヒトカッパCL配列(配列番号147、表2.3を参照)を全ての構築物に使用した。

【0215】

10

20

30

40

50

【表 2 . 3】
H o m o F c 及び H e t F c 配列

	配列	配列 番号
CH1-ヒンジ-CH2-CH3(IGHG1*01)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	146
CL(カップ)(IGKC*01)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNREGC	147
CH1-ヒンジ-CH2-CH3(HetFc-A)(IGHG1*01)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	148
CH1-ヒンジ-CH2-CH3(HetFc-B)(IGHG1*01)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYVLPSPRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYLTWPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG	149

10

20

30

【0216】

サイクル1からのヒト化VHドメイン配列のそれぞれを、IGHG1*01のヒトCH1-ヒンジ-CH2-CH3(HetFc-A及びHetFc-B)ドメイン配列に付加して、12個のヒト化完全重鎖配列(6個のヒト化VH×2)を得た。ウサギVH及びサイクル2からの追加の5つのヒト化VHドメイン配列のそれぞれを、IGHG1*01のヒトCH1-ヒンジ-CH2-CH3ドメイン配列に付加して、親ウサギーヒトキメラ完全重鎖配列及び5つの追加のヒト化完全重鎖配列を提供した。VLドメイン配列のそれぞれをIGKC*01のヒトカップCL配列に付加して、5つのヒト化軽鎖配列を提供した。全ての配列をDNAに逆翻訳し、哺乳動物発現のためにコドン最適化し、遺伝子を合成した。

40

【0217】

シグナルペプチドを含む重鎖ベクターインサート(人工的に設計された配列:MRPTWAWWLFLVLLLLALWAPARG(配列番号150)(Barash et al., 2002, Biochem and Biophys Res. Comm., 294:835-842))及びCH3ドメインの残基G446(EU番号付け)で終わる重鎖クローンをpTT5ベクターにライゲーションして、重鎖発現ベクターを作製した。同じシグナルペプチドを含む軽鎖ベクターインサートをpTT5ベクターにライゲートし、

50

軽鎖発現ベクターを作製した。得られた重鎖及び軽鎖発現ベクターをシーケンシングし、コードDNAの正確なリーディングフレーム及び配列を確認した。

【0218】

ヒト化抗体バリエーションの各々の重鎖及び軽鎖を、CHO-3E7細胞の200mL培養物中で発現させた。簡潔に述べると、 $1.7 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mLの密度、生存率>95%のCHO-3E7細胞を、4mMのグルタミン（GE Life Sciences, Marlborough, MA）及び0.1%のPluronic（登録商標）F-68（Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）を補充したFreeStyle（商標）F17培地（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA）中で37℃で培養した。総量200mLのCHO-3E7細胞+1×抗生物質/抗真菌剤（GE Life Science, Marlborough, MA）に、PEI-MAX（登録商標）（Polyscience, Inc., Philadelphia, PA）を使用して、DNA:PEI比1:4（w/w）で合計200ugのDNA（抗体DNA 100ug及びGFP/AKT/スタッファ- DNA 100ug）をトランスフェクトした。DNA-PEI混合物の添加の24時間後、0.5mMのバルプロ酸（最終濃度）+1%w/vのトリプトン（最終濃度）を細胞に添加し、次いでそれを32℃に移し、収穫前にさらに6日間インキュベートした。

【0219】

タンパク質A精製を、バッチモードで、または1mLのHiTrap（商標）MabSelect（商標）SuRe（商標）カラム（Cytiva, Marlborough, MA）を使用して行った。バッチモードでは、清澄化した上清試料を、NaOHで定置洗浄した（CIP'd）mAb Select SuRe（商標）樹脂（GE Healthcare, Chicago, IL）とともにバッチでインキュベートし、ダルベッコのPBS（DPBS）中で平衡化した。樹脂をCIP'dカラムに注ぎ、カラムをDPBSで洗浄した。両方の精製モードで、タンパク質を、100mMのクエン酸ナトリウムバッファ- pH 3.0で溶出した。溶出画分を、10%（v/v）1MのHEPES（ pH 約10.6~10.7）を添加することによって pH を調整し、最終 pH を6~7にした。試料をDPBSにバッファ交換した。タンパク質を、280nm（A280nm）での吸光度に基づいて定量した。親ウサギ-ヒト抗体キメラバリエーション（v23924及びv30618）を、プロテインA精製後、DPBS移動相中のSuperdex 200 Increase 10/30カラム（GE Healthcare, Chicago, IL）上の分取SECクロマトグラフィーによってさらに精製した。

【0220】

精製後、試料の純度を、High Throughput Protein Expressアッセイ及びCaliper LabChip（登録商標）GXIIまたはGXII Touch HT（Perkin Elmer, Waltham, MA）を使用して、非還元及び還元条件下で電気泳動によって評価した。手順は、HT Protein Express LabChip（登録商標）ユーザーガイドバージョン2に従って、以下の変更を加えて実施した。2 μL または5 μL （濃度範囲5~2000ng/ μL ）のいずれかの抗体試料を、7 μL のHT Protein Express Sample Buffer（Perkin Elmer, カタログ番号760328）とともに、96ウェルプレート（BioRad, Hercules, CA）中の別個のウェルに添加した。次いで、抗体試料を70℃で15分間変性させた。HT Protein Express Chip（Perkin Elmer, Waltham, MA）及びAb-200アッセイの設定を用いて、LabChip（登録商標）の装置を操作した。

【0221】

45個のヒト化抗体バリエーション及び親キメラ抗体v23924全体の収率（タンパク質-A精製後）は、約9~17mg（または45~85mg/L）の範囲であった。図2A及び2Cは、親キメラ抗体v23924及び代表的なヒト化バリエーションv30384のC

a l i p e r 電気泳動結果を示す。図 2 から分かるように、代表的なヒト化抗体試料について、非還元 (NR) 及び還元 (R) C a l i p e r は、フルサイズ抗体及びインタクトな重鎖及び軽鎖に対応する単一の種を反映した。これは、他のヒト化バリエーションについても同様であった。

【0222】

2.3 ヒト化抗体の品質評価

ヒト化抗体バリエーションの種の均一性を、プロテインA精製後及び親キメラ抗体である v 2 3 9 2 4 の分取 S E C 精製後の U P L C - S E C によって評価した。

【0223】

U P L C - S E C は、30℃に設定された W a t e r s A c q u i t y B E H 2 0 0 S E C カラム (2.5 mL、4.6 × 150 mm、ステンレス鋼、1.7 μm 粒子) (W a t e r s L T D, M i s s i s s a u g a, O N) を使用して実施し、フォトダイオードアレイ (P D A) 検出器を備えた W a t e r s A c q u i t y U P L C (商標) H クラスバイオシステムに取り付けた。移動相は、pH 7.4 の 0.02% T w e e n 2 0 を有するダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (D P B S) であり、流量は 0.4 mL / 分であった。各注入の合計実行時間は 7 分であり、総移動相容積は 2.8 mL であった。210 ~ 500 nm の範囲の UV 吸光度により溶出を監視し、280 nm でクロマトグラムを抽出した。ピーク統合は、A p e x T r a c k (商標) を採用し、ショルダーの特徴を検出する W a t e r s E m p o w e r (登録商標) 3 ソフトウェアを使用して行われた。

10

20

【0224】

図 2 B 及び 2 D は、それぞれ、親キメラ抗体 v 2 3 9 2 4 (S E C 精製後) 及び代表的なヒト化抗体 v 3 0 3 8 4 (プロテインA精製後) の U P L C - S E C プロファイルを示す。代表的なヒト化抗体試料の U P L C - S E C プロファイルは、親キメラ抗体試料に匹敵する高い種均質性を反映した。残りのヒト化抗体バリエーションからの試料は、代表的なヒト化抗体試料について示されるものと同様のプロファイルを有した。

【0225】

実施例 3: h F R α に対するヒト化抗体の結合

3.1 h F R α に対するヒト化抗体の親和性評価

ヒト化プロセスがそれらの標的に対するヒト化バリエーションの親和性に影響を与えたかどうかを決定するために、h F R α 抗原に結合する 45 個の精製ヒト化抗体バリエーションの能力を、以下のようにバイオレイヤー干渉法 (B L I) によって評価した。

30

【0226】

h F R α 抗原結合を、O c t e t (登録商標) R E D 9 6 システム (F o r t e B i o, F r e m o n t, C A) を使用して、以下のステップを循環させることによって評価した: 200 秒にわたる抗ヒト I g G F c キャプチャ (A H C) バイオセンサへの抗体 (0.9 μg / mL) のローディング; 60 秒間のベースラインの安定化; 400 ~ 500 秒間の予想される K_D にスパンする複数の関連する濃度の組換え H i s タグ付きヒト F R α (A C R O B i o s y s t e m s, N e w a r k, D E) への会合; 500 ~ 1000 秒間の解離の記録; ならびに次の抗体に進む前に、10 mM のグリシン pH 1.5 (15 秒) 及びアッセイバッファー (1 秒) の間に 3 回循環させることによって行われる再生。使用したアッセイバッファーは、K B バッファー (P B S pH 7.4、0.1% B S A、0.02% T w e e n 2 0、0.05% アジ化ナトリウムからなるキネティクスバッファー) に 0.06% T w e e n 2 0 を補充し、いくつかの例では 1% B S A も補充した。実験は、30℃で、1000 rpm の振盪速度で実施した。

40

【0227】

データ解析は、D a t a A n a l y s i s S o f t w a r e 9.0 F o r t e B i o, F r e m o n t C A) を使用して行った。参照を減算された結合曲線を 1:1 の相互作用モデルに全体的に適合させて、結合動態パラメータ k_{on}、k_{off}、及び解離定数 K_D を生成した。

50

【 0 2 2 8 】

45個のヒト化抗体バリエーションのうち9個が、約63 nM～210 nMの範囲の K_D 値でhFR α に結合することが見出された（表3.1を参照されたい）。親キメラ抗体（v23924）の K_D は、27 nMであることが判定された。hFR α への結合を示したヒト化抗体バリエーションは、親キメラ抗体のそれと比較して、約2倍～約8倍低減した親和性によって特徴付けられた。表3.1から分かるように、全ての成功したヒト化バリエーションは、同じ可変軽鎖（4L）を共有したが、可変重鎖組成が異なる。成功したヒト化バリエーションの軽鎖及び重鎖の配列を表3.2に提供する。図3は、親キメラ抗体v23924、及び代表的なヒト化抗体v30384のBLIセンサグラムを示す。

【 0 2 2 9 】

【表 3. 1】

Octet（登録商標）によるヒト化バリエーションの抗原結合評価

バリエーション	組成(VH+VL)	Fc領域 ¹	平均 K_D (M) ²	標準偏差 K_D (M)
v23924(親)	--	HomoFc	2.7E-08	8.4E-09
サイクル1バリエーション				
v30384	3H4L	HetFc	1.1E-07	4.2E-09
v30389	3bH4L	HetFc	1.0E-07	1.4E-09
v30394	4H4L	HetFc	6.3E-08	7.1E-11
v30399	4bH4L	HetFc	6.9E-08	2.5E-09
サイクル2バリエーション				
v31422	3cH4L	HomoFc	1.8E-07	2.8E-08
v31423	3dH4L	HomoFc	1.1E-07	1.2E-08
v31424	3eH4L	HomoFc	1.1E-07	1.9E-08
v31425	3fH4L	HomoFc	1.6E-07	4.2E-10
v31426	3gH4L	HomoFc	2.1E-07	3.5E-10

¹ HetFc = ヘテロ二量体Fc領域；HomoFc = ホモ二量体Fc領域（実施例2を参照）

² n = 2

【 0 2 3 0 】

10

20

30

40

50

【表 3 . 2】

ヒト化VH及びVL鎖のアミノ酸配列

名称	アミノ酸配列	配列 番号
3H_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	50
3bH_VH	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	54
3cH_VH	EVQLLESGGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	76
3dH_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDT SKNTVY LQMNSLRAEDTAV YYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	79
3eH_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDT SKFTVY LQMNSLRAEDTAV YYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	82
3fH_VH	EVQLLESGGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDT SKFTVY LQMNSLRAEDTAV YYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	85
3gH_VH	QQLLESGGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLEW IGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDT SKFTVY LQMNSLRAEDTAVY YCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	88
4H_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	57
4bH_VH	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKGLE WIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTA VYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	61
4L_VL	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQSIGDWLAWYQQKPGKAPKL LIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDAATYYCQQGYGR SNVDNIFGGGTKVEVK	64

10

20

30

【0231】

3.2 hFR α に対するヒト化抗体の結合活性評価

FSAフォーマットにおける親バリエント及び選択されたヒト化バリエントに対する抗原結合の結合活性を、以下に記載するように表面プラズモン共鳴（SPR）によって評価した。

40

【0232】

親キメラ抗体（v23924）及びヒト化バリエントのhFR α 親和性、ならびに結合活性を決定するためのSPRアッセイを、Biacore（商標）T200SPRシステム上で、25℃の温度で、PBS-T（PBS+0.05%（v/v）Tween20）ランニングバッファー（3.4mMの最終濃度に0.5MのEDTAストック溶液を添加したもの）を用いて実施した。CM5シリーズSセンサチップ、Biacore（商標）アミンカップリングキット（NHS、EDC及び1Mエタノールアミン）、及び10mM酢酸ナトリウムバッファーを、GE Healthcare Life Science（Mississauga, ON, Canada）から購入した。0.05% Tween

50

20 (PBST) を有するPBSランニングバッファーを、Teknova Inc. (Hollister, CA) から購入した。組換えヒトFR α をACROBiosystems (Newark, DE) から購入した。

【0233】

hFR α 抗原への結合のためのバリエーションのスクリーニングを、2つのステップで実施した：表面へのhFR α の捕捉、続いて3～5つの濃度のバリエーションの注入。hFR α 表面を、製造業者 (GE Healthcare Life Science, Mississauga, ON, Canada) によって説明される標準的なアミンカップリング方法によってCM5シリーズSセンサチップ上で調製した。hFR α の固定化は、5～20 RUの範囲の共鳴単位 (RU) を目指すアミンカップリング方法を用いて、Biacore (商標) T200固定化ウィザードを使用して行った。多サイクル速度論を使用して、ブランクバッファー対照を用いて300 nMで開始する2倍希釈シリーズの試料の3～5つの濃度を、50 μ L / 分で180秒間、600秒の解離段階を用いて注入し、バッファーブランク基準を有するセンサグラムのセットを得た。hFR α 表面を再生し、30 μ L / 分で30秒間、10 mMグリシン / HCl pH 1.5の1つのパルスによって次の注射サイクルを準備した。ブランク減算センサグラムを、Biacore (商標) T200 Evaluation Software v3.0を使用して分析した。次いで、ブランク減算されたセンサグラムを1：1のLangmuir結合モデルに適合させた。

【0234】

結果を表3.3に示す。通常の二価抗体フォーマット (FSA) における親抗体 (v23924) 及び2つのヒト化バリエーション (v30384及びv30399) の両方が、hFR α 抗原への結合における結合活性を示した。すなわち、親の場合には約17倍低いK_D値、及びヒト化試料の場合には約27～39倍低いK_D値が、高抗原密度でそれぞれ約108倍及び約116～181倍にさらに低下した中低抗原密度での1アーム抗体 (OAA) フォーマットと比較して、FSAで得られた。

【0235】

【表3.3】

SPRによる選択されたヒト化バリエーションの結合活性評価

バリエーション	フォーマット ¹	平均 K _D (M) ²		
		高抗原密度	中抗原密度	中低抗原密度
v23924	FSA	2.78E-10	1.37E-09	2.29E-09
v32596	OAA v23924 等価物	3E-08	3.03E-08	3.79E-08
v30384	FSA	7.9E-10	2.58E-09	3.76E-09
v32597	OAA v30384 等価物	1.43E-07	1.39E-07	1.46E-07
v30399	FSA	7.09E-10	2.67E-09	3.71E-09
v32598	OAA v30399 等価物	8.2E-08	8.08E-08	9.15E-08

¹ OAA = 1アーム抗体、FSA = フルサイズ抗体；OAA抗体試料は、それぞれのFSA試料の等価物であり、実施例2に記載されるFSA試料と同様の方法で産生された。

² n = 2

【0236】

実施例4：ヒト化抗FR α 抗体の純度

実施例3からのヒト化抗体バリエーションの見かけの純度を、プロテインA精製 (実施例2

）及び非変性脱グリコシル化後の質量分析を使用して評価した。

【0237】

抗体バリエーション試料はFc N結合グリカンのみを含有したため、試料はN-グリコシダーゼF (PNGase-F) のみで処理した。精製された試料を、以下のようにPNGase-Fで脱グリコシル化した。50mMのTris-HCl pH7.0中の0.1U PNGase-F/μgの抗体、37℃での一晚のインキュベーション、0.48mg/mLの最終タンパク質濃度。脱グリコシル化後、LC-MS分析前に試料を4℃で保存した。

【0238】

脱グリコシル化したタンパク質試料を、Ion Maxエレクトロスプレー源によるLTQ-Orbitrap (商標) XL質量分析計 (ThermoFisher, Waltham, MA) (より大きなタンパク質 (50kDa超) の最適検出のために調整した) に連結したAgilent 1100 HPLCシステムを使用して、インタクトLC-MSによって分析した。試料を2.1×30mmのPoros R2逆相カラム (Applied Biosystems Corp., Waltham, MA) に注入し、0.1%のギ酸水溶液/アセトニトリル (脱気)、アセトニトリルの濃度 (20~90%) の増加からなる線形勾配を使用して分解した。カラムを82.5℃に加熱し、溶媒をプレカラムで80℃に加熱して、タンパク質のピーク形状を改善した。コーン電圧 (ソースフラグメンテーション設定) はおよそ40Vであり、FT分解能設定は7,500であり、スキャン範囲はm/z 400~4,000であった。LC-MSシステムを、脱グリコシル化IgG標準 (Waters IgG標準) 及び脱グリコシル化mAb標準混合物 (25:75の半分:フルサイズ抗体) を使用して、IgG試料分析について評価した。各LC-MS分析について、抗体ピーク (典型的には3.6~4.1分) にわたって取得された質量スペクトルを合計し、MassLynx (商標) データ分析ソフトウェア (Waters, Milford, MA) のMaxEnt1モジュールを使用して、多価イオンエンベロープ (m/z 1,200~4,000) 全体を分子量プロファイルにデコンボリューションした。各試料における各抗体種の見かけの量を、得られた分子量プロファイルのピーク高さから決定した。

【0239】

結果を表4.1に示す。ほとんど全てのヒト化バリエーションは、約89~100%の所望の種の範囲で高純度であり、v30389のみがより低い純度 (82.6%) を示した。残りのバリエーションのそれと比較して、4つのバリエーション、v30384、v30389、v30394及びv30399のわずかに低い純度は、いくつかの半抗体の存在をもたらすヘテロ二量体CH3領域 (実施例2を参照) を含むこれらのバリエーションに起因する。図4は、2つの代表的なヒト化バリエーション、v30384及びv31422についてのLC/MSプロファイルを示す。全ての試料のLC/MSプロファイルでは、約+266Daのサイドピークが観察され、これはおそらく分析のアーチファクトである。

【0240】

10

20

30

40

50

【表 4. 1】

LC/MSによって決定されるヒト化バリエーションの純度

バリエーション	望ましい種の%
v30384	93.2
v30389	82.6
v30394	89.1
v30399	91.8
v31422	100
v31423	100
v31424	100
v31425	100
v31426	100

10

【0241】

実施例 5：ヒト化抗 FR α 抗体の熱安定性

ヒト化抗体バリエーションの熱安定性を、以下に記載するように、示差走査熱量測定（DSC）によって評価した。

【0242】

PBS中で主に0.4 mg/mLの濃度の400 μ Lの精製試料を、VP-Capillary DSC（GE Healthcare, Chicago, IL）を用いたDSC分析に使用した。各DSC実行の開始時に、5回のバッファブランク注入を実施してベースラインを安定させ、バッファ注入を参照のために各試料注入前に設置した。各試料を、低フィードバック、8秒フィルタ、3分のプレスキャンサーモスタット、及び70 psiの窒素圧を用いて、60°C/時間の速度で20°C~100°Cで走査した。得られたサーモグラムを参照し、Origin 7ソフトウェア（OriginLab Corporation, Northampton, MA）を使用して分析し、熱安定性の指標として融解温度（T_m）を決定した。

20

【0243】

ヒト化バリエーションについて決定されたFab T_m値を表5.1に示す。全てのヒト化バリエーションは、親抗体v23924（約72°CのFab T_m）と比較して、増加した熱安定性を示し、Fab T_m値は、約81~84°Cの範囲であった。ヒト化バリエーションのうち、v30394は、最高の熱安定性を示した。

30

【0244】

【表 5. 1】

ヒト化バリエーションの熱安定性

バリエーション	Fab T _m (°C)
v23924(親)	72.1
v30384	81.7
v30389	80.7
v30394	84.4
v30399	83.4
v31422	82.6
v31423	83.0
v31424	81.3
v31425	82.4
v31426	81.9

40

【0245】

50

実施例 6：ヒト化抗 F R α 抗体の等電点の決定

ヒト化抗体バリエーションの等電点を以下に記載するように、キャピラリー等電点泳動（c I E F）によって決定した。

【0246】

c I E Fを、C E - U V A g i l e n t 7 1 0 0 キャピラリー電気泳動（C E）システムを使用して行った。5 μ g（または最大 2.5 μ L）の試料をキャピラリーに適用した（両性電解質の範囲は 3.0 ~ 10.0）。p I マーカーミックス、システム適合性試験のために 4.1、4.22、5.5、7.0 及び 10.0、ならびに試料分析のために 4.1 及び 10.0 を使用した。6 $^{\circ}$ C に設定された外部水槽、検出器フィルタアセンブリ（280 nm）、及び 9 バールの外部圧力を備えた A g i l e n t 7 1 0 0 C E システムは、全ての C E 実行に使用された。中性コーティングされたキャピラリー（フルオロカーボン）を、緑色のアラインメントインターフェースを装備し、A g i l e n t キャピラリーカセットに取り付けられた、検出ウィンドウからそれぞれ 8.5 cm 及び 24.5 cm の距離で両端で切断した。1 日 1 回、キャピラリーを以下のようにコンディショニングした：3.5 バールで 350 mM の酢酸で 5 分間、水で 2 分間、及び c I E F ゲルで 5 分間、高圧フラッシュした。各実行の前に、キャピラリーを以下のようにコンディショニングした：4.3 M の尿素溶液で 3 分間、水で 2 分間、3.5 bar で高圧フラッシュ。2 バールの高圧を 100 秒間適用することによって、試料を注入し、続いて、入口電極及び出口電極の両方の水浸漬を行った。25 kV で、200 mM のリン酸を陽極液として、300 mM の NaOH を陰極液として、10 分間フォーカスを行った。化学的動員を使用して、出口バイアルを 350 mM の酢酸と交換し、30 kV を 30 分間適用した。各実行後、2 分間、水で 3.5 バールで高圧フラッシュを行った。A g i l e n t O p e n L A B I n t e l l i g e n t R e p o r t i n g A . 0 1 . 0 6 . 1 1 1 ソフトウェアを使用して、ピーク R T 及び電気泳動図の手動統合を得た。生データ（シグナル対保持時間）を C V S ファイルにエクスポートし、質量中心での主アイソフォーム p I、p I 範囲及び p I を（内部 p I マーカーに基づいて）M i c r o s o f t E x c e l で計算した。

【0247】

結果を表 6.1 に示す。ヒト化バリエーションの大部分について主アイソフォームについて決定された p I 値は、7.78 ~ 7.97 の範囲であり、1 つのバリエーションは、8.25（v31426）の p I を有し、これらは全て、治療用抗体の典型的な範囲内にあり、親キメラ抗体 v23924（p I は 7.65）のそれと比較的に同等である。

【0248】

【表 6.1】

ヒト化バリエーションのための等電点

バリエーション	pI(主アイソフォーム)
v23924(親)	7.65
v30384	7.79
v30389	7.78
v30394	7.89
v30399	7.89
v31422	7.93
v31423	7.94
v31424	7.97
v31425	7.93
v31426	8.25

【0249】

実施例 7：抗 F R α 抗体のクロマトグラフィー分析

親及びヒト化バリエーションを、以下に示されるとおり、疎水性相互作用クロマトグラフィー

ー（H I C）及びサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）によって分析した。

【0250】

7.1 H I C解析

抗体の疎水性／親水性を、Antibody Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology, 2013, vol. 1045, pp. 275-284. L. Ducry, Ed. に記載されているとおりにH I Cによって評価した。実験を、室温の5カラム体積のバッファーA（1.5 Mの（NH₄）₂SO₄、25 mMのNaH₂PO₄、pH=6.95）で予め平衡化したT S K g e l（登録商標）Butyl-NPRカラム（2.5 μm、4.6×35 mm、T O S O H B i o s c i e n c e G m b H、G r i e s h e i m、G e r m a n y）を使用したA g i l e n t I n f i n i t y I I 1290 H P L Cにおいて行った。典型的には、2～3 mg/mLの濃度の試料20～30 μgを、95%のバッファーA及び5%のバッファーB（75% 25 mM PO₄³⁻プラス25%イソプロパノール、pH6.95）とともにカラムにロードし、表7.1に示されるグラジエントを使用して0.5 mL/分で15分間実行した。完全なベースラインからベースラインへの統合を提供する適切なパラメータを使用して、H I Cクロマトグラムを統合した。

10

【0251】

【表7.1】

H I C溶媒勾配

時間(分)	バッファーA%	バッファーB%
0	95	5
0.1	95	5
5	80	20
9.5	65	35
11.5	50	50
12.5	5	95
13.5	5	95
12.6	95	5
15	95	5

20

30

【0252】

7.2 S E C分析

室温で、5カラム体積の移動相A（150 mM Na₂PO₄、pH6.95）で平衡化したA d v a n c e B i o S E Cカラム（300 Å、2.7 μm、7.8×150 mm）を備えたA g i l e n t I n f i n i t y I I 1260 H P L Cを使用して分析S E Cを行った。典型的には、2～3 mg/mLの濃度の試料20～30 μgを、A 280で吸光度を監視しながら1 mL/分で7分間、等方圧的に溶出した。クロマトグラムを積分して、各ピークの完全なベースライン間の積分を得、部分的に分離したピーク間に適度な分離があった。I g Gの主成分と対応するピーク（概算保持時間3.3分）を、対照であるトラスツズマブのS E Cプロフィールに基づいて単量体として報告した。3.3分より前に生じるあらゆるピークを高分子量種（H M W S）と指定し、溶媒ピーク（5.2分を超える）を除いて、3.3分以降に生じるあらゆるピークを低分子量種（L M W S）と指定した。

40

【0253】

7.3 結果

親及びヒト化バリエーションのH I C保持時間（H I C-R T）及び% S E C単量体の要約を表7.2に提供する。全体として、H I C及びS E Cは、全てのヒト化バリエーションの好ましい生物物理学的挙動を示した。親キメラ抗体v 23924は、H I Cグラジエントで6.5分で溶出したが、全てのヒト化バリエーションは、6.0～6.7分の間に溶出した。

50

SECプロファイルは、全てのヒト化バリエーションについて>90%の単量体を示し、バリエーションv30389は、最低の単量体%(94%)を有する。これらのバリエーションは全て、<5%のHMWS及び5<%のLMWSを有した。

【0254】

【表7.2】

親及びヒト化抗FR α 抗体のHIC及びSEC分析

バリエーション	抗体	HIC-RT(最小)	SEC		
			単量体%	HMWS %	LMWS %
v23924	キメラ(親)	6.5	100	0	0
v30618	キメラ (HetFc)	6.7	94	6	0
v30384	ヒト化サ イクル 1*	6.2	97	3	0
v30389		6.2	94	3	4
v30394		6.0	95	4	2
v30399		6.1	96	4	0
v31422	ヒト化サ イクル 2	6.0	100	0	0
v31423		6.0	100	0	0
v31424		6.1	100	0	0
v31425		6.2	100	0	0
v31426		6.5	100	0	0

*以前のPrep-SECはない

【0255】

実施例8：追加の安定性試験

ヒト化抗体バリエーションの安定性をさらに調査するために、実施例2に記載されるように、Caliper及びUPLC-SECによって、及び実施例6及び3にそれぞれ記載されるように、さらにcIEF及びオクテット抗原結合による40℃安定性試験の場合において、試料を特定の時点で特徴付けた40℃安定性及び酸安定性試験を実施した。これらの試験において対照としてトラスツズマブを使用した。

【0256】

選択されたヒト化バリエーション(v30389、v30394、v30399、v31423、及びv31424)を、PBS pH7.4バッファー中で、約1mg/mlの試料濃度で14日間、40℃安定性試験を行った。試料を、0、5、7、11及び14日時点で特徴付けた。酸安定性試験を、試料をpH3.6の酢酸バッファーに、様々な試料濃度で、25℃で1時間の間、バッファー交換する際に実施し、0、15、30及び60分時点で特徴付けた。さらに、1サイクル当たり30分の3サイクルを構成する凍結融解(-80℃から室温まで)を、PBS pH7.4中の試料濃度約1mg/mlで行った。

【0257】

その結果を表8.1に示す。ヒト化バリエーションの安定性に関する有意な問題は、試験で特定されなかった。凍結融解及び酸安定性試験は、Caliper及びUPLC-SECによって決定されるように、試験の経過にわたって試料組成の変化を明らかにしなかった。40℃安定性試験は、試験が進行するにつれて、Caliper及びUPLC-SECプロファイルのわずかな変化(具体的には、約10~17%の範囲のいくつかの量の低分子量種の出現)を示した。抗原結合親和性の変化は観察されなかった。cIEFは、主アイソフォームと比較して、より酸性の種の予想されるわずかな増加を明らかにした。

【0258】

10

20

30

40

50

【表 8. 1】

40℃におけるヒト化バリエーションの安定性評価、酸安定性及び凍結融解試験

バリエーション	%単量体(UPLC-SECによる)		
	40℃試験 0/7/14 日目	酸安定性試験 0/30/60 分	凍結融解試験
v6738 ¹	99.93/99.71/99.43	Err ² /100/100	ND
v30389	92.75/87.64/82.02	Err/94.91/93.83	ND
v30394	95.49/89.01/83.51	95.12/95.53/95.49	ND
v30399	96.13/89.25/81.68	Err/100/100	ND
v31423	100/90.92/82.58	Err/100/100	99.22
v31424	100/90.96	100/100/100	99.36

¹トラスツズマブ対照²エラー=誤ったベースライン

【0259】

実施例 9：抗 FR α 抗体の機能的特徴付け - FR α 特異性

親キメラ抗体 v23924 の FR α (FOLR1)、FOLR2、FOLR3 及び FOLR4 への結合交差反応性を、フローサイトメトリー及び ELISA によって評価した。FR α 、FOLR2 及び FOLR4 の結合を、HEK293 トランスフェクト細胞を使用してフローサイトメトリーによって評価した。FOLR3 は可溶性タンパク質であるため、ELISA によって FOLR3 結合を評価した。対照抗 FOLR2 (マウス抗ヒト FOLR2; Nordic BioSite AB, Taby, Sweden; カタログ番号 AFC-4544-2)、抗 FOLR3 (マウス抗ヒト FOLR3; LS Bio, Seattle, WA; カタログ番号 LS-C125621) 及び抗 FOLR4 (マウス抗ヒト FOLR4; His DyLight (商標) 650; Novus Biologicals, Littleton, CO; カタログ番号 NBP2-31055C) 抗体をこれらの実験に含めた。

【0260】

FR α 、FOLR2 及び FOLR4 結合：簡潔に述べると、HEK293-6e 細胞を約 24 時間トランスフェクトして、ヒト FR α (カタログ番号 13420)、FOLR2 (カタログ番号 13481) 及び FOLR4 (カタログ番号 13483) (全て GenScript Biotech, Piscataway, NJ 由来) を一過性に発現する (100 万個の細胞当たり 1 μ g の DNA)。トランスフェクション後、50,000 個の細胞を V 底 96 ウェルプレートに播種し、標準培養条件下で 50 nM の一次抗体で 45 分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、抗ヒト IgG Fc AF647 コンジュゲート (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA; カタログ番号 109-605-098) を室温で 45 分間染色した。インキュベーション及び洗浄後、蛍光を、BD LSRFortessa (商標) Cell Analyzer (BD Biosciences, Franklin Lake, NJ) 上でフローサイトメトリーによって検出し、ウェル当たり最小 1,000 のイベントを収集した。

【0261】

FOLR3 結合：ELISA 96 ウェルプレートを、市販の精製 FOLR3 タンパク質 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN; カタログ番号 5319-FR) で 1 時間、37℃ でコートした。プレートを、室温で 1 時間、PBS、pH 7.4 中の 1% 乳でブロックした。ブロック後、一次抗体を室温で 7 nM で 1 時間添加した。HRP 結合二次抗体 (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA; カタログ番号 109-035-098) を次いで、0.4 μ g/ml で、室温で 1 時間添加した。プレートをテトラメチルベンジジン (TM

B) を使用して展開し、H C l を使用して反応を停止した。吸光度は、S y n e r g y (商 標) H 1 マイクロプレートリーダー (B i o T e k I n s t r u m e n t s , W i n o o s k i , V T) を使用して 4 5 0 n m で読み取られた。

【 0 2 6 2 】

結果

結果を表 9 . 1 及び 9 . 2 に示す。

【 0 2 6 3 】

抗 F R α 、抗 F O L R 2、抗 F O L R 3 及び抗 F O L R 4 対照抗体は、フローサイトメトリーまたは E L I S A によってそれぞれの標的タンパク質への予想される結合を示した。フローサイトメトリーによって、F l o w J o (商 標) v 8 ソフトウェア (B D B i o s c i e n c e s , F r a n k l i n L a k e , N J) を使用して、生きたシングレット細胞集団をゲーティングし、各抗体についてこの集団において A F 6 4 7 G e o M e a n 及び % 陽性結合を決定した。E L I S A については、陰性対照吸光度シグナルと比較して、未処理の吸光度値を使用して、抗 F O L R 3 及び v 2 3 9 2 4 抗体の % 陽性結合を決定した。v 2 3 9 2 4 は、ヒト F R α への予想される結合を示し、F R α 特異性を示す F O L R 2、F O L R 3 または F O L R 4 への結合交差反応性を示さなかった。

【 0 2 6 4 】

【表 9 . 1】

フローサイトメトリーによって評価される F R α 、F O L R 2 及び F O L R 4 への結合

抗体	AF647/DyLight650 GeoMean シングレット集団			%陽性結合シングレット集団		
	FR α	FOLR2	FOLR4	FR α	FOLR2	FOLR4
v23924	7663	7	27	71	0	0
抗 F R α 対照	17971	227	188	86	1	0
抗 F O L R 2 対照	17	4267	15	1	87	0
抗 F O L R 4 対照	32	32	164	1	1	48
ヒト IgG	59	20	23	0	0	0

【 0 2 6 5 】

【表 9 . 2】

E L I S A によって評価される F O L R 3 への結合

抗体	吸光度 450nm	結合(%)
v23924	0.29	8.9
抗 F R α 対照	0.24	7.4
抗 F O L R 3 対照	3.27	100.0
ヒト IgG	0.15	4.5

【 0 2 6 6 】

実施例 1 0 : 抗 F R α 抗体の機能的特徴付け—カニクイザル F R α への結合

ヒト及びカニクイザル F R α に対する親キメラ抗体 v 2 3 9 2 4 の交差反応性を、以下に記載するように、トランスフェクトした C H O - S 細胞を使用するフローサイトメトリーによって評価した。陰性対照としてパリビズマブ (抗 R S V) (v 2 2 2 7 7) を使用した。

【 0 2 6 7 】

簡潔に述べると、C H O - S 細胞を約 2 4 時間トランスフェクトして、ヒトまたはカニクイザル F R α 、1 0 0 万個の細胞当たり 1 μ g の D N A を一過性に発現させた。トランスフェクション後、細胞を V 底 9 6 ウェルプレート中に 5 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで播種し、内在化を防止するために抗体で 4 $^{\circ}$ C で 2 4 時間処理した。インキュベーション後、細

胞を洗浄し、抗ヒトIgG Fc AF647コンジュゲート（Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA, カタログ番号109-605-098）を4℃で30分間染色した。インキュベーション及び洗浄後、BD LSRFortessa（商標）Cell Analyzer（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）上でフローサイトメトリーによって蛍光を検出した。

【0268】

結果を表10.1に示す。v23924は、CHO-Sトランスフェクト細胞上でヒト及びカニクイザルFR α への同等の結合を示し、ヒトFR α 及びカニクイザルFR α トランスフェクト細胞上での見かけのKd値はそれぞれ、83.89 pM及び121.60 pMであった。予想通り、対照v22277による結合は観察されなかった。

10

【0269】

【表10.1】

カニクイザルFR α への結合

抗体	細胞	Bmax	見かけのKd(nM)
v23924	CHO-S ヒト FR α	398.90	0.08
v22277		6.94	>50
v23924	CHO-S カニクイザル FR α	7626	0.12
v22277		79.62	>50

20

【0270】

実施例11：抗FR α 抗体の機能的特徴付け－細胞結合

親キメラ抗体v23924及び代表的なヒト化バリエーションv30384の細胞上結合能力を、以下に記載するように、JEG-3及びHEC-1-A内因性FR α 発現細胞株上でフローサイトメトリーによって評価した。

【0271】

簡潔に述べると、細胞をV底96ウェルプレート中に50,000細胞／ウェルで播種し、内在化を防止するために4℃で抗体を24時間処理した。インキュベーション後、細胞を洗浄し、抗ヒトIgG Fc AF647コンジュゲート（Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA; カタログ番号109-605-098）を4℃で30分間染色した。インキュベーション及び洗浄後、蛍光を、BD LSRFortessa（商標）Cell Analyzer（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）上でフローサイトメトリーによって検出し、ウェル当たり1,000の最小イベントを収集した。生きた細胞集団におけるAF647/APC-A GeoMean（蛍光シグナル幾何平均、抗ヒトAF647結合に比例）を、GraphPad Prism Version 9（GraphPad Software, San Diego, CA）を使用してプロットした。

30

【0272】

結果を表11.1に示す。キメラ（v23924）抗体及びヒト化（v30384）抗体の両方が、JEG-3及びHEC-1-A細胞株（それぞれ、高及び中等度の内因性FR α 発現）の両方において同等の見かけのKd及びBmax値をもたらした。

40

【0273】

50

【表 1 1 . 1】
細胞結合

抗体	JEG-3			HEC-1-A		
	Bmax	カーブヒル スロープ (h)	Kd(nM)	Bmax	カーブヒ ルスロー プ(h)	Kd(nM)
v23924	20337	1.18	0.32	2490	1.38	0.05
v30384	18299	1.73	0.31	2125	1.31	0.07
ヒト IgG	NA	NA	NA	NA	NA	NA

【 0 2 7 4 】
実施例 1 2：抗 F R α 抗体の機能的特徴付け－内在化

F R α 発現細胞株（I G R O V－1 及び O V C A R－3）における親キメラ抗体 v 2 3 9 2 4 及び代表的なヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 の受容体媒介性内在化能力を、以下に記載するように高含量イメージングによって決定した。F R α 標的化抗体のミルベツキシマブ及びファーレッツズマブを陽性対照として使用し、パリーブズマブ（抗 R S V）（v 2 2 2 7 7）を陰性対照として使用した。

【 0 2 7 5 】
簡潔に述べると、抗体は、抗ヒト I g G F c F a b 断片 p H A b 染料コンジュゲート（P r o m e g a C o r p o r a t i o n , M a d i s o n , W I ; カタログ番号 G 9 8 4 1）（F a b 断片当たり約 3 個の染料分子）に、4℃で 2 4 時間、5：1 のモル過剰でカップリングすることにより蛍光的に標識された。細胞を播種し、一晚、3 7℃で 9 6 ウェルプレート中 5 % C O 2 でインキュベートした。カップリング抗体を翌日細胞に添加し、内在化を可能にするために、3 7℃で 6 ～ 2 4 時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を D y e C y c l e V i o l e t（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c C o r p o r a t i o n , W a l t h a m , M A ; カタログ番号 V 3 5 0 0 3）で生細胞における生細胞同定及び内在化蛍光のために染色し、C e l l I n s i g h t（商標）C X 5 H i g h C o n t e n t S c r e e n i n g（H C S）P l a t f o r m（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c C o r p o r a t i o n , W a l t h a m , M A）を使用して高コンテンツイメージングによって分析した。キメラ抗体 v 2 3 9 2 4 の折り畳み蛍光を、G r a p h P a d P r i s m , V e r s i o n 9（G r a p h P a d S o f t w a r e , S a n D i e g o , C A）を使用してプロットした。

【 0 2 7 6 】
結果

結果を、図 5 A 及び 5 B（I G R O V－1 細胞）及び図 6 A 及び 6 B（O V C A R－3 細胞）に示す。キメラ抗体 v 2 3 9 2 4 及びヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 は、I G R O V－1 細胞（高 F R α）及び O V C A R－3 細胞（中等度 F R α）の両方において、同等のレベルの内在化を示した。I G R O V－1 及び O V C A R 細胞の両方において、キメラ抗体 v 2 3 9 2 4 及びヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 は、全ての試験濃度（2 5 ～ 1 n M）及び時点（6 及び 2 4 時間）にわたって、ミルベツキシマブ及びファーレッツズマブ陽性対照と比較して、増加した内在化を示した。例えば、I G R O V－1 細胞での 6 時間のインキュベーション後、ヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 は、2 5 n M では、ミルベツキシマブ及びファーレッツズマブと比較してそれぞれ 3 . 3 倍及び 6 . 1 倍の内在化蛍光の増加を示し、5 n M では、ミルベツキシマブ及びファーレッツズマブと比較してそれぞれ 2 . 6 倍及び 1 9 . 1 倍の内在化蛍光の増加を示した（図 5 A）。同様に、I G R O V－1 細胞での 2 4 時間のインキュベーション後、ヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 は、2 5 n M では、それぞれ、ミルベツキシマブ及びファーレッツズマブと比較して内在化蛍光が 2 . 1 倍及び 3 . 9 倍増加し、5 n M では、それぞれ、ミルベツキシマブ及びファーレッツズマブと比較

して、内在化蛍光が1.9倍及び4.7倍増加した(図5B)。

【0277】

実施例13：エピトープマッピング

ヒトFR α 抗原(hFR α)上の親キメラ抗体v23924の高分解能エピトープマッピングは、以下に記載のように、NovoAb Bioanalytics Inc. (Victoria, BC, Canada)において水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)によって行われた。

【0278】

13.1 HDX-MSの試料調製

凍結乾燥したhFR α をACROBiosystems (Newark, DE; カタログ番号: FO1-H5229)から購入し、2.5mg/mlの濃度に溶解した。hFR α を親キメラ抗体v23924とモル比2:1で混合することによって、抗原-抗体複合体を調製した。全ての試料は、pHが7.4であり、透明であった(沈殿物は観察されなかった)。ペプチド同定のために、10 μ Mの濃度のhFR α を、pH2.4の2Mグアニジンの存在下で、100mMのトリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)で還元し、次いで、1:1の酵素-タンパク質モル比でペプシンで消化した。HDXは、タンパク質試料を、2:8(v/v)の比でD₂Oバッファーと混合することによって開始した。得られた溶液を26°Cでインキュベートし、20秒、7分、1時間及び4時間でアリコートを取り、4Mのグアニジンを含む200mMのTCEP溶液を添加することによって即座にクエンチした。これらの試料を液体窒素中でフラッシュ凍結し、-80°Cで保存した。LC-MS実験中に、タンパク質アリコートを速やかに解凍し、氷上で保持して、還元を2分間進め、次いで、ペプシンで0°Cで2分間消化した。

【0279】

13.2 LC-MS及びLC-MS/MS

LC-MS実験では、各試料の20 μ LのアリコートをC18分析カラムに即座に注入し、Dionex UHPLCシステム(Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)を使用して、100 μ L/分の流量で逆相液体クロマトグラフィーによって分離した。UHPLCシステムを、加熱エレクトロスプレーイオン化(HESI)II源を装備したThermo Scientific Orbitrap Fusion(商標)質量分析計に結合した。H/D逆交換を最小限に抑えるために、カラム、付属品、インジェクタ及び溶媒送達ラインをアイスバケットに埋め込んだ。注射に使用したシリンジを氷上で冷却した。移動相は、0.1%ギ酸(A)及び100%アセトニトリル/0.1%ギ酸(B)であり、ペプチドを13分間のグラジエントで分離した。MSサーベイスキャンを、120,000FWHMの質量分解能で、m/z 300~1600の範囲で行った。Orbitrap検出器を、Calibration Mix(Calmix; Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA)を使用して<3ppmの誤差に校正した。電子移動解離(ETD)実験では、フルオランテンラジカルアニオンを50ミリ秒以上にわたってイオントラップに導入した。衝突誘発解離(CID)及びETD断片イオンを、150~2000m/zのスキャン範囲を使用してOrbitrapで検出した。

【0280】

データ分析のために、生のボトムアップLC-MS/MSデータを、Proteome Discoverer(商標)ソフトウェアスイート(Thermo Fisher Scientific)を使用して処理した。生成されたピークリストを社内のMasco t2.2サーバーに提出し、hFR α の配列に対して検索した。このようにして同定されたペプチドをHDXデータ分析に使用した。ETDデータは、Xcalibur(商標)ソフトウェア(Thermo Fisher Scientific Corporation, Waltham, MA)を使用して処理し、生成されたETDピークリストは、Protein Prospector(the University of California, San Franciscoのウェブサイト; <http://prosp>

ector.ucsf.eduからオンラインで利用可能)を使用してhFR α の配列に対して検索した。マッチしたイオンもチェックし、手動検査で確認した。ペプチドの質量移動及び個々のアミドの重水素化状態は、H/D交換の前後のそれらの重心m/z値に基づいて決定された。全てのHDXデータを100% D₂O含有量(全ての時点でバッファー中80%D交換)に正規化した。得られた重水素の数を各ペプチドに含まれるアミド水素の総数と比較することによって、重水素取り込み値のパーセントを得た。アミドレベルの重水素化情報は、ETD断片の重水素取り込みに基づいて計算した。

【0281】

13.3 結果

タンパク質配列カバレッジ及びペプチド同定

タンパク質ジスルフィド結合の存在は、ペプチドベースのHDX-MS分析におけるペプシン消化パターン及び効率に有意な影響を有する。hFR α 及び抗体v23924の両方が複数のジスルフィド架橋を含有するため、迅速なタンパク質ジスルフィド還元及びペプシン消化のための最適化プロトコルが最初に開発された。還元時間及び消化時間をそれぞれ2分に最適化し、これらの条件は、hFR α 及びhFR α -v23924複合体の両方に適用可能であった。このようにして同定されたペプチドは、抗原配列の100%をカバーした(図7を参照されたい)。

【0282】

ペプチドレベルHDX比較

hFR α 及びv23924複合体由来のペプチドの重水素取り込みレベルを、HDX時間(20秒、7分、1時間、及び4時間)に対してプロットした。結果を要約し、図8に示す。ほとんどのペプチドは、抗体結合の前後で同じ重水素取り込み挙動を有する(図8A)。これは、v23924抗体の結合部位(エピトープ)が非常に局在していることを示唆している。図8Bに示される差分プロットでは、3つのペプチド(番号14、15及び16)が、v23924結合後の重水素取り込みの有意な低下を示し、それらがエピトープ領域にあることを示した。これらのペプチドの配列は、それぞれ、WWEDCRTSY(118~126)(配列番号151)、WEDCRTSY(119~126)(配列番号152)、及びWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTS GF(119~142)(配列番号153)である。

【0283】

アミノ酸レベルでのエピトープ決定

3つのエピトープペプチドは配列が異なるが、それらのHDXの違いは同じであり(図8)、それらは全て、配列WEDCRTSY(119~126)(配列番号152)を含有する。これは、全てのエピトープ残基が最短ペプチド119~126に含まれることを示す。同じ領域内の複数の差異ペプチドの観察は、タンパク質のこの領域がv23924抗体の結合部位であるというさらなる確認を提供する。HDXの差異をさらに特定し、エピトープを個々のアミノ酸まで特定するために、MSMSを、ETDを使用してペプチド119~126上で実施した。これが最大の差異をもたらしたため、1時間のHDX時点を選択した。ETD断片は、単一残基分解能を提供した。各アミノ酸の重水素化レベルを計算し、hFR α とv23924複合体との間で比較した(図9)。差分プロットの結果に基づいて、エピトープ残基は、配列番号15のE120、D121、R123、T124、S125、及びY126であることが判定された(すなわち、エピトープ配列は、EDRTSY;配列番号154)。

【0284】

実施例14:抗FR α 抗体の親和性成熟

ヒト化抗体v30384(実施例3を参照されたい)を、HuTarg(商標)システム(Innovative Targeting Solutions, Vancouver, BC, Canada)を使用して親和性成熟させた。遺伝子組換えをヒト化バリアントv30384の可変領域に適用し、高親和性変異体を、次世代配列決定(NGS)を使用して同定した。

【0285】

14.1 ライブラリプラスミドプールの設計

ヒト化バリエーションv30384可変ドメインのCDRループに、RAG1／2組換えシグナル配列(RSS)を散在させた。これらの可変ドメインをIntegrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, IA)で合成し、プラスミドE951 (Innovative Targeting Solutions, Vancouver, BC, Canada)にクローニングした。

【0286】

14.2 HuTarg (商標) ライブラリ生成

以下のステップを、Innovative Targeting Systemのプロトコルに従って実施した。E951ベースのプラスミドプールをHuTarg (商標) 細胞に組み込み、RAG1／2発現を48時間誘導した。次に、PEコンジュゲートされたヤギ抗ヒトカッパ軽鎖抗体 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; カタログ番号206009) で染色した後に示される、組換え抗体を首尾よく示したHuTarg (商標) 細胞を、次に、さらなる調査のために選択した。

【0287】

14.3 親和性変異体のFACSベースの選択

HuTarg (商標) 細胞を、BD FACSAria (商標) フローサイトメーター (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 上でFACSに基づく複数ラウンドの選別に供し、各ラウンドには、減少した量のビオチン化された可溶性HISタグFR α 抗原 (FR α -HIS; ACROBiosystems Newark, DE; カタログ番号FO1-H82E2) を用いて、AlexaFluor-647にコンジュゲートしたストレプトアビジンで検出した (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA; カタログ番号S11223)。ビオチン化FR α -HISへの結合の増加を示したHuTarg (商標) 細胞を、次世代配列決定の準備として、RNAzol RT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI; カタログ番号R4533) に直接選別した。

【0288】

14.4 親和性変異体の次世代配列決定

RNAzol中で溶解された細胞からの総RNAを、製造業者の指示に従って単離した。RNAをezDNase (商標) (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA; カタログ番号11766051) で消化し、Superscript (商標) IV (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA; カタログ番号18090010) 及び遺伝子特異的プライマーを用いてcDNAを転写した。VH及びVKドメインをPCR増幅のために標的化し、NEBNext (登録商標) Ultra (商標) DNAライブラリ調製キット (New England Biolabs, Ipswich, MA; カタログ番号E7370L) で分子バーコード化した。試料をプールし、v2ケミストリー (Illumina, San Diego, CA; カタログ番号MS-102-2003) を使用して、500サイクルキットを用いて、Illumina MiSeq (商標) シーケンサー上で実行した。配列解析を行い、親和性の増加を付与する可能性が高いことを示したVH及びVK配列内の変異を同定した。

【0289】

14.5 親和性変異体の組換え発現

変異したVH及びVKドメインをコードするDNA配列を「MiniGenes」 (Integrated Technologies, Inc., Coralville, IA) として合成し、発現ベクターにクローニングして、それぞれ、完全ヒトIgG1重鎖及びヒトカッパ軽鎖をコードする発現プラスミドを提供した。発現プラスミドを互いにマトリックスして、全ての重鎖プラスミドを全ての軽鎖プラスミドとペアリングした。このマトリックスは、製造業者の指示に従って、Expi293 (商標) 細胞 (Thermo

10

20

30

40

50

Fisher Scientific Corp., Waltham, MA; カタログ番号 A14635) において組換え的に発現させ、64 個の試料を作成した。

【0290】

14.6 親和性変異体の評価

プロテイン G 粒子 (Spherotech Inc., Lake Forest, IL) を、正規化濃度でヒト化バリエーション v30384 または親和性成熟抗体でコーティングした。可溶性ヒト FR α を限界抗原濃度に希釈し、抗体コーティングビーズでインキュベートした。FR α 抗原結合及び抗体捕捉は、それぞれ Alexa Fluor-647 コンジュゲートストレプトアビジン及び Alexa Fluor-488 コンジュゲートヤギ抗ヒト IgG Fc γ (両方とも Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME から) を使用して検出された。試料を BD LSRFortessa (商標) Cell Analyzer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 上でフローサイトメトリーによって分析した。FR α 結合及び抗体捕捉の幾何学的平均を各試料について分析した。抗体捕捉を、親和性成熟抗体に対する親和性ランクヒト化バリエーション v30384 への FR α 結合に正規化した。

10

【0291】

単一点親和性ランキングは、抗体によって捕捉された抗原の量に対するビーズ上で捕捉された抗体の比率を測定することによって実施した。バリエーション v30384 の結合は、1.9 nM のヒト FR α 濃度を使用して最小限 (バックグラウンドより 3 倍) であったが、成熟バリエーションの大部分は、より高い結合比を示した。64 個の変異したバリエーションのうち、3 個のバリエーションは、結合比の 4 倍の増加を示し、10 個は、同等の結合比を示した。

20

【0292】

実施例 15: FR α に対する親和性成熟抗体の親和性の評価

実施例 14 に記載の親和性成熟バリエーションのうち 10 個は、CHO-K1 細胞における一過性トランスフェクション及び (必要に応じて) 主に分取 SEC または CEX クロマトグラフィーを含む後続の研磨ステップを有する親和性捕捉精製を介して、Wuxi Biologics (Hong Kong) Limited, China において、フルサイズ抗体 (FSA) フォーマットで産生され、HPLC-SEC による 97% を超える試料純度を得た。FSA フォーマットは、これらのバリエーションが HetFc ではなく HomoFc を含むことを除いて、親ヒト化バリエーション v30384 のフォーマットと類似していた。10 個の親和性成熟バリエーションを、実施例 3 に記載されるように、Octet (登録商標) RED96 系を使用して hFR α への結合について特徴付けた。

30

【0293】

結果

結果を表 15.1 に示す。親和性成熟は、約 12 ~ 58 倍の改善の範囲で、親ヒト化抗体 v30384 (K_D , 1.27 E-07 M) よりも実質的に高い hFR α に対する親和性を有するヒト化バリエーションを得ることに成功した。2.2 E-09 M の最低 K_D は、バリエーション v35348 について観察された。親和性の向上は、主に解離定数の低下によって達成されることが決定された。

40

【0294】

【表 15. 1】

親和性成熟バリエーションの親和性評価

バリエーション	平均 $K_D(M)^*$	標準偏差 $K_D(M)$
v30384 (親ヒト化)	1.27E-07	2.49E-08
v35305	1.08E-08	9.12E-10
v35342	4.1E-09	1.3E-10
v35347	8.65E-09	9.18E-10
v35348	2.2E-09	1.8E-10
v35350	3.55E-09	2.89E-10
v35354	3.13E-09	7.64E-11
v35356	4.98E-09	1.8E-10
v35358	7.22E-09	4.21E-10
v36167	7.29E-09	1E-10
v36168	4.97E-09	2.64E-10

* n = 2

10

【0295】

実施例 16：親和性成熟抗体のクロマトグラフィー分析

20

実施例 15 からの 10 個の親和性成熟バリエーションを、実施例 7 に記載されるように、疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) 及びサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によって分析した。結果を表 16. 1 に示す。抗体の親和性成熟は、可変 HIC-RT によって実証されるように、疎水性／親水性に変化をもたらした。抗体単量体含有量は、全ての場合において 97 % を超えており、HIC-RT と関連しなかった。

【0296】

【表 16. 1】

親和性成熟抗 F R α 抗体の HIC 及び SEC 分析

バリエーション	HIC-RT(分)	SEC		
		単量体%	HMWS %	LMWS %
v30384 (親ヒト化)	6.2	97	3	0
v36167	8.4	98.8	1.2	0
v36168	10.0	99.4	0.6	0
v35305	9.2	100.0	0.0	0
v35342	10.1	100.0	0.0	0
v35347	4.9	97.3	2.7	0
v35348	5.6	98.4	1.6	0
v35350	9.9	100.0	0.0	0
v35354	9.6	100.0	0.0	0
v35356	5.0	98.7	1.3	0
v35358	8.7	98.7	1.3	0

30

40

【0297】

実施例 17：親和性成熟抗体の機能的特徴付け－細胞結合

代表的な親和性成熟バリエーション v35356 の細胞上の結合能力を、実施例 11 に記載されるフローサイトメトリーによって、IGROV-1 及び JEG-3 内在性 F R α 発現細胞株上で評価した。

【0298】

50

結果

結果を表 17. 1 に示す。親ヒト化バリエーション v30384 及び親和性成熟バリエーション v35356 は、IGROV-1 及び JEG-3 細胞株の両方において同等の見かけの K_d 及び B_{max} 値（それぞれ、高及び中等度の内因性 $FR\alpha$ 発現）をもたらした。

【0299】

【表 17. 1】

細胞結合

抗体	IGROV-1			JEG-3		
	B_{max}	カーブヒルス ロープ(h)	$K_d(nM)$	B_{max}	カーブ ヒルス ロープ (h)	$K_d(nM)$
v30384(親ヒト化)	42,611	1.442	1.38	35,942	1.598	0.50
v35356(親和性成熟)	43,842	1.537	1.31	40,110	2.119	0.44
ヒト IgG	208	NA	NA	144	NA	NA

10

【0300】

実施例 18：親和性成熟抗体の機能的特徴付け－内在化

$FR\alpha$ 発現細胞株（IGROV-1 及び JEG-3）における親ヒト化バリエーションである v30384、及び代表的な親和性成熟バリエーションである v35356 の受容体媒介性内在化能力を、以下に記載するようにフローサイトメトリーによって決定した。陰性対照としてパリビズマブ（抗 RSV ）（v22277）を使用した。

20

【0301】

簡潔に述べると、抗体は、Fab-AF488 抗ヒト IgG Fc 標識試薬（Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA；カタログ番号 109-547-008）に、1：1 のモル比で 24 時間、4℃ でカップリングすることにより蛍光的に標識された。細胞を播種し、48 ウェルプレート中で 5% CO_2 中の 37℃ で一晩インキュベートした。カップリング抗体を翌日細胞に添加し、37℃ で 24 時間インキュベートして、内在化を可能にした。インキュベーション後、細胞を解離し、洗浄し、表面 AF488 蛍光を、4℃ で 45 分間インキュベートした 100 nM の抗 488 抗体を使用してクエンチした。クエンチされた AF488 蛍光（内在化蛍光）を、BD LSRFortessa（商標）Cell Analyzer（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）上の全ての試料についてフローサイトメトリーによって分析し、ウェル当たり最小 1,000 のイベントを収集した。生細胞集団における AF488/FITC-A GeoMean を、GraphPad Prism Version 9（GraphPad Software, San Diego, CA）を使用してプロットした。

30

【0302】

結果

結果を図 10 に示す。親ヒト化バリエーション v30384 及び親和性成熟バリエーション v35356 は、20 nM で、5 時間及び 24 時間の曝露の両方で投与された場合、IGROV-1（図 10（A））及び JEG-3（図 10（B））細胞において同等の内在化を示した。

40

【0303】

実施例 19：抗体－薬物コンジュゲート－システインコンジュゲーションの調製

マレイミド含有薬物リンカーにコンジュゲートされたキメラ親抗体 v23924、ヒト化抗体バリエーションまたは親和性成熟抗体バリエーションを含む抗体－薬物コンジュゲート（ADC）を、様々な薬物－抗体比（DAR）で調製した。例示的なプロトコルを以下に提供する。用いられる薬物リンカーを、表 19. 1 に列挙する。調製された ADC 及び用いら

50

れるコンジュゲーション条件を、表 19. 2 に要約する。

【0304】

19. 1 鎖間ジスルフィド結合の部分的還元による v 23924 のコンジュゲーション (DAR4)

キメラ抗体 v 23924 (25 mg) の溶液 (5.14 mL) を、PBS (pH 7.4) 中の DTPA (ジエチレントリアミン五酢酸) の 5 mM 溶液で 3.57 mg/mL に希釈し、この溶液に 10 mM のトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP) (1.78 当量、31 µL) を添加した。37℃の水浴中で2時間インキュベーションした後、20 mM の DMSO ストックとしての薬物-リンカー DL1 (10 当量、87 µL) を添加した。コンジュゲーション反応物をピペティングによって完全に混合し、反応を氷上で最大1時間進行させ、続いて過剰な薬物リンカーを20 mM の N-アセチルシステイン水性ストック (9 当量、78 µL) で30分間クエンチした後、小分子から ADC を精製した。v 23924 も、同じコンジュゲーション手順を使用して DAR4 で薬物リンカー DL2 及び DL3 にコンジュゲーションした。

10

【0305】

19. 2 鎖間ジスルフィド結合の完全還元後の v 23924 のコンジュゲーション (DAR10)

キメラ抗体 v 23924 (15 mg) の溶液 (3.1 mL) を、PBS 中の DTPA の 5 mM 溶液 (pH 7.4) で 3.57 mg/mL に希釈した。10 mM の TCEP (18 当量、188 µL) を添加し、反応混合物を 37℃の水浴中で3時間インキュベートした後、PBS、pH 7.4 で予め平衡化した 10 mL 40 kD の Zeba (商標) Spin Desalting Column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して過剰な TCEP を除去した。完全に還元された抗体を、氷上の 20 mM の DMSO ストックの薬物リンカー DL1 (18 当量、94 µL) に最大1時間コンジュゲートした後、20 mM の水性ストックの N-アセチルシステイン (12 当量、63 µL) で過剰な薬物リンカーを30分間クエンチした後、小分子からの ADC を精製した。

20

【0306】

19. 3 鎖間ジスルフィド結合の部分的還元による v 30384 のコンジュゲーション (DAR4)

ヒト化抗体バリエーション v 30384 (10 mg) の溶液 (2.1 mL) を、PBS 中の DTPA の 5 mM 溶液 (pH 7.4) で 3.52 mg/mL に希釈した。1 mM の TCEP (2.37 当量、164.5 µL) を添加し、反応混合物を 37℃の水浴中で2時間インキュベートした後、氷上で20 mM の DMSO ストックの薬物リンカー DL1 (10 当量、34.7 µL) に最大1時間コンジュゲートし、その後20 mM の水性ストックの N-アセチルシステイン (9 当量、31.2 µL) を用いて過剰な薬物リンカーを30分間クエンチした後、小分子からの ADC を精製した。

30

【0307】

19. 4 鎖間ジスルフィド結合の完全還元後の v 30384 のコンジュゲーション (DAR8)

ヒト化抗体バリエーション v 30384 (20 mg) の溶液 (958.3 µL) を、PBS 中の 5 mM の DTPA 溶液 (pH 7.4) で 5 mg/mL に希釈した。10 mM の TCEP (12 当量、167 µL) を添加し、反応混合物を 37℃の水浴中で3時間インキュベートした後、10 mM の Na-アセテート、pH 5.5 で予め平衡化した 10 mL 40 kD の Zeba (商標) Spin Desalting Column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して過剰な TCEP を除去した。完全に還元された抗体を、10% DMSO (体積/体積) の存在下で最大2時間、暗所、室温で連続して攪拌しながら薬物リンカー DL5 の 10 mM の DMSO ストック (15 当量、208 µL) にコンジュゲートし、続いて、小分子からの ADC の精製前に、N-アセチルシステインの 10 mM の水性ストック (20 当量、274 µL) で

40

50

過剰な薬物リンカーを30分間クエンチした。

【0308】

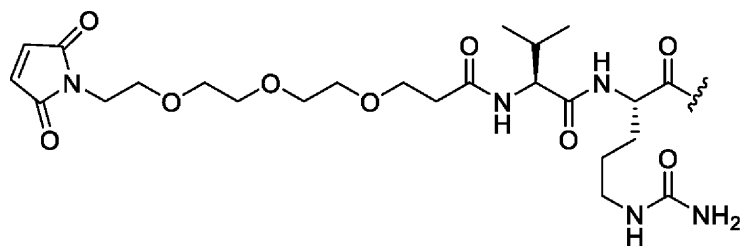
【表19.1】

システインコンジュゲートADCの調製に使用される薬物リンカー

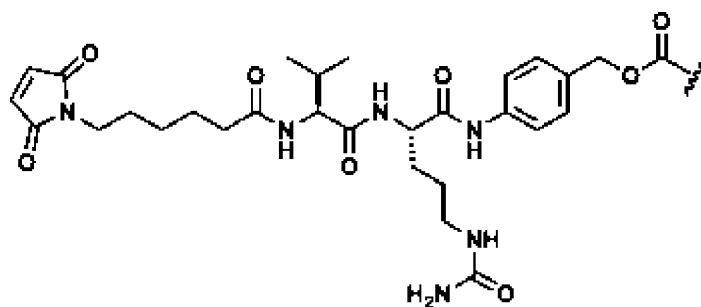
薬物-リンカー	リンカー ¹	ペイロード
DL1	MTvc	化合物 1 ¹
DL2	MTvc	化合物 2 ¹
DL3	MCvc-PABC	MMAE
DL4	MCvc-PABC	エリブリン
DL5	MC-GGFG	Dxd
DL7	MTvk	化合物 2 ¹

¹構造を以下に示す。

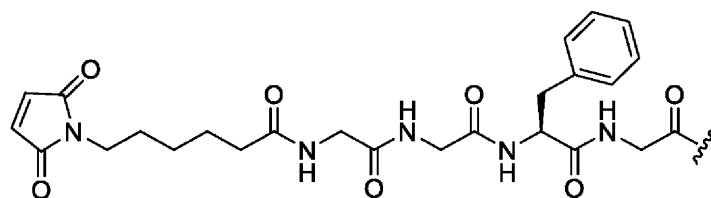
MTvc :



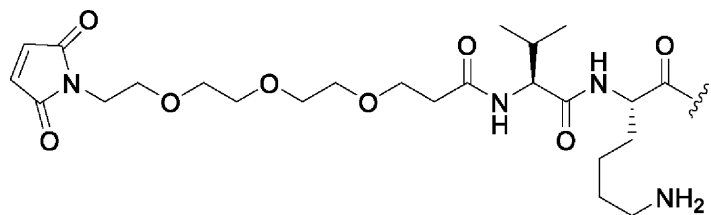
MCvcPABC :



MC-GGFG :



MTvk :



化合物 1 :

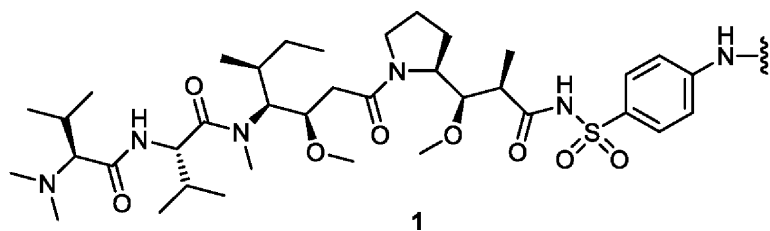
10

20

30

40

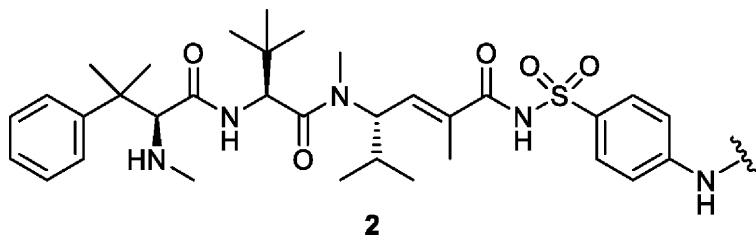
50



1

(国際特許出願公開第W O 2 0 1 6 / 0 4 1 0 8 2号を参照されたい)

化合物 2 :



2

(国際特許出願公開第W O 2 0 1 4 / 1 4 4 8 7 1号を参照されたい)

【 0 3 0 9 】

10

20

30

40

50

【表 19. 2】

システインコンジュゲートADCの調製の要約

バリエーション	抗体の種類	Fc 型 ¹	薬物-リンカー	標的DAR	スケール (mg)	TCEPモル過剰 (当量)	抗体濃度反応中 (mg/mL)	コンジュゲーションバッファー
v23924	キメラ	HomoFc	DL1	2	0.5	0.9	3.6	PBS、pH7.4
v23924	キメラ	HomoFc	DL1	4	25.0	1.8	3.6	PBS、pH7.4
v23924	キメラ	HomoFc	DL1	10	15.0	18.0	3.6	PBS、pH7.4
v30384	ヒト化	HetFc	DL1	4	0.3	2.3	3.1	PBS、pH7.4
v30389	ヒト化	HetFc	DL1	4	0.3	2.3	3.1	PBS、pH7.4
v30394	ヒト化	HetFc	DL1	4	0.3	2.3	3.1	PBS、pH7.4
v30399	ヒト化	HetFc	DL1	4	0.3	2.3	2.5	PBS、pH7.4
v30618	Cysを有するキメラ	HetFc	DL1	4	0.3	1.8	3.1	PBS、pH7.4
v31422	ヒト化	HomoFc	DL1	4	0.3	2.3	3.5	PBS、pH7.4
v31423	ヒト化	HomoFc	DL1	4	0.3	2.3	3.5	PBS、pH7.4
v31424	ヒト化	HomoFc	DL1	4	0.3	2.3	3.5	PBS、pH7.4
v31425	ヒト化	HomoFc	DL1	4	0.3	2.3	3.5	PBS、pH7.4
v31426	ヒト化	HomoFc	DL1	4	0.3	2.3	3.5	PBS、pH7.4
v30384	ヒト化	HomoFc	DL1	4	10.0	2.4	3.5	PBS、pH7.4
v30399	ヒト化	HomoFc	DL1	4	10.0	2.4	3.5	PBS、pH7.4
v31423	ヒト化	HomoFc	DL1	4	10.0	2.3	3.3	PBS、pH7.4
v31424	ヒト化	HomoFc	DL1	4	9.1	2.3	3.3	PBS、pH7.4
v36167	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.15	2.3	2.0	PBS、pH7.4
v36168	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.15	2.5	2.0	PBS、pH7.4
v35305	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4

10

20

30

40

50

バリエーション	抗体の種類	Fc 型 1	薬物-リンカー	標的 DAR	スケール(mg)	TCEP モル 過剰 (当量)	抗体濃度 反応中 (mg/mL)	コンジュゲーションバッファー
v35342	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4
v35347	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4
v35348	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4
v35350	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4
v35354	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4
v35356	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4
v35358	親和性が成熟した	HomoFc	DL1	4	0.22	2.1	2.2	PBS、pH7.4
v23924	キメラ	HomoFc	DL2	10	0.7	12.0	3.5	PBS、pH7.4
v23924	キメラ	HomoFc	DL3	4	0.5	12.0	3.3	PBS、pH7.4
v30384	ヒト化	HetFc	DL3	4	1.0	2.8	3.0	PBS、pH7.4
v30384	ヒト化	HetFc	DL4	4	1.0	2.4	3.2	50%のプロピレングリコール(v/v)を有する PBS、pH7.4
v30384	ヒト化	HetFc	DL5	8	20.0	12.0	4.1	10mM の Na-アセテート、10%DMSO(v/v)、pH5.5
v36167	親和性が成熟した	HomoFc	DL5	8	1.8	10	2.5	10mM の Na-アセテート、10%DMSO(v/v)、pH5.5

10

20

30

40

50

バリエーション	抗体の種類	Fc 型 ¹	薬物-リンカー	標的 DAR	スケール (mg)	TCEP モル 過剰 (当量)	抗体濃度 反応中 (mg/mL)	コンジュゲーションバッファー
v36168	親和性が成熟した	HomoFc	DL5	8	1.8	10	2.5	10mM の Na-アセテート、10%DMSO(v/v)、pH5.5
v35347	親和性が成熟した	HomoFc	DL5	8	1.8	10	3.0	10mM の Na-アセテート、10%DMSO(v/v)、pH5.5
v35348	親和性が成熟した	HomoFc	DL5	8	1.8	10	3.0	10mM の Na-アセテート、10%DMSO(v/v)、pH5.5
v35356	親和性が成熟した	HomoFc	DL5	8	1.8	10	3.0	10mM の Na-アセテート、10%DMSO(v/v)、pH5.5
v35358	親和性が成熟した	HomoFc	DL5	8	1.8	10	3.0	10mM の Na-アセテート、10%DMSO(v/v)、pH5.5
v36675 ²	ヒト化	HomoFc	DL5	8	1500	12	5	10mM の Na-アセテート、7%DMSO(v/v)、pH5.5
v23924	キメラ	HomoFc	DL7	10	0.7	12.0	3.5	PBS、pH7.4
v23924	キメラ	HomoFc	DL7	4	20.0	1.8	3.6	PBS、pH7.4

¹実施例 2 を参照されたい。

²バリエーション v 3 6 6 7 5 は、v 3 0 3 8 4 と同じであるが、H e t F c ではなく H o m o F c を含む。

【 0 3 1 0 】

実施例 2 0 : 抗体－薬物コンジュゲート－リジンコンジュゲーションの調製

それぞれ 3 . 3 または 4 の標的 DAR で薬物リンカー DL 6 または DL 8 にコンジュゲートされたヒト化抗体バリエーション v 3 0 3 8 4 (表 2 0 . 1 を参照) を含む抗体－薬物コンジュゲート (ADC) を以下に記載するように調製し、表 2 0 . 2 に要約した。

【0311】

DL6：ヒト化抗体 v30384（1mg）の溶液（207 μ L）を、PBS、pH 7.4 中の薬物リンカー DL6（14 当量、9.7 μ L）の 10mM の DMSO ストックと反応させた。ピペッティングによってコンジュゲーション反応物を完全に混合し、反応を室温で最大 17 時間進行させた。

【0312】

DL8：ヒト化抗体 v30384（30mg）の溶液（5.9 mL）を、PBS、pH 7.4 中の薬物リンカー DL8（9.5 当量、99 μ L）の 20mM の DMSO ストックと反応させた。ピペッティングによってコンジュゲーション反応物を完全に混合し、反応を室温で最大 18 時間進行させた。

【0313】

【表 20.2】

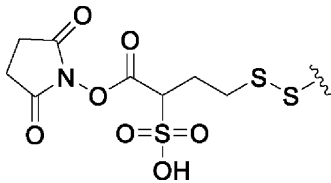
リジンコンジュゲート ADC の調製に使用される薬物リンカー

薬物-リンカー	リンカー ¹	ペイロード
DL6	sSPDB	DM4
DL8	NHS-ADvc	化合物 1 ²

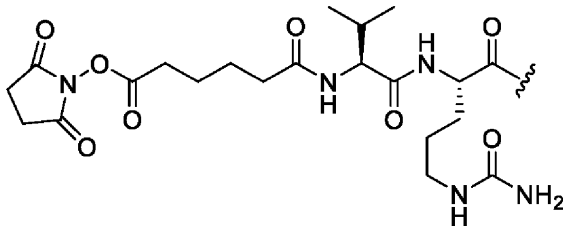
¹構造を以下に示す。

²表 19.1 の脚注を参照されたい

sSPDB：



NHS-ADvc：



【0314】

【表 20.2】

リジンコンジュゲート ADC の調製の要約

バリエーション	抗体の種類	Fc 型*	薬物-リンカー	標的 DAR	スケール (mg)	TCEP モル 過剰 (当量)	抗体濃度 反応中 (mg/mL)	コンジュゲーションバッファー
v30384	ヒト化	HetFc	DL6	3.3	1.0	14.0	4.8	PBS、pH7.4
v30384	ヒト化	HetFc	DL8	4	30	9.5	5.1	PBS、pH7.4

*実施例 2 を参照されたい

【0315】

実施例 21：ADC の精製及び特性評価

実施例 19 及び 20 に記載のように調製した ADC を、PBS、pH 7.4、または 1

10

20

30

40

50

0 mMのNa-アセテート、pH 5.5で予め平衡化した適切なサイズの40 kD Zeba (商標) Spin Desalting Column (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用して精製した。>1 mgスケールで生成されたADCを滅菌ろ過した(0.22 μm)。

【0316】

精製されたADCを4℃で保存し、280 nmの吸光度を使用して、またはトラスツブマブ1 mg/mLから生成された標準曲線を参照したビシンコニン酸(BCA)アッセイを使用して、総タンパク質含有量について分析した。ADCをまた、以下に記載するように、HPLC-HIC、SEC、CE-SDS及びRP-HPLC-MSによって特徴付けた。ADCの平均DAR及びDAR分布は、HIC及びLC-MSデータから得られた。エンドトキシンレベルは、Toxin Sensor (商標) Single Test Kit (Genescript BioTech, Piscataway, NJ; カタログ番号L00450) を使用して、0.5 EU/mgに設定された閾値で評価した。残存遊離薬物及び薬物-リンカーレベル(%FD)をRP-HPLC-MSによって評価し、閾値を1 mol%のDARに設定して以下の方程式に基づいて算出した。

$$\%FD = \frac{[\text{遊離薬物}] + [\text{遊離薬物-リンカー}] + [\text{薬物-リンカーTCEP付加体}]}{[ADC] \times DAR}$$

【0317】

ADCについて決定された生物物理学的特性を表21.4に要約する。

【0318】

21.1 システインコンジュゲートADCのHICによるDAR測定

HICによる平均DARを、Antibody Drug Conjugates, Methods in Molecular Biology, 2013, vol. 1045, pp. 275-284. L. Ducry, Ed. に記載されているとおりに評価した。実験を、室温の5カラム体積のバッファーA (1.5 M (NH₄)₂SO₄、25 mM NaH₂PO₄、pH=6.95) で予め平衡化したTSK gel (登録商標) Butyl-NPRカラム (2.5 μm、4.6×35 mm、TOSOH Bioscience GmbH, Griesheim, Germany) を使用したAgilent Infinity II 1290 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) において行った。典型的には、2~3 mg/mLの濃度の試料20~30 μgを、95%のバッファーA及び5%のバッファーB (75% 25 mM NaH₂PO₄ プラス25% イソプロパノール、pH 6.95) とともにカラムにロードし、表21.1に示されるグラジエントを使用して0.5 mL/分で15分間実行した。HICクロマトグラムを、各ピークの完全なベースライン間の積分をもたらす適切なパラメータを使用して積分し、続いて各ピークの積分を行い、妥当な分離を示した。基準として、非コンジュゲートのネイキッド抗体を同じグラジエントで実行して、DAR=0種のHIC保持時間を得た。

【0319】

【表 21. 1】

H I C グラジエント

時間(分)	バッファーA%	バッファーB%
0	95	5
0.1	95	5
5	80	20
9.5	65	35
11.5	50	50
12.5	5	95
13.5	5	95
12.6	95	5
15	95	5

10

【0320】

21.2 リジンコンジュゲートADCのRP-HPLC-MSによるDAR測定

ADC試料を、EndoSを用いて室温で1時間脱グリコシル化し、Agilent 6545 四重極飛行時間(Q-TOF)質量分析計(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)と結合したAgilent 1290 Infinity II LCに注入した。タンパク質種を、表21.2に示されるグラジエントを使用して、0.3mL/分の流量で、PLRP-Sカラム(1000 Å、8 μm、50×2.1mm)を使用して分離した。バッファーA：水中の0.1%ギ酸(FA)、0.025%トリフルオロ酢酸(TFA)、及び10%イソプロピルアルコール(IPA)。バッファーB：アセトニトリル(ACN)中0.1%FA及び10%IPA。

20

【0321】

【表 21. 2】

RP-HPLC-MS グラジエント

時間(分)	バッファーA%	バッファーB%
0	80	20
20	60	40
22	10	90
22.5	1	99
24	1	99

30

【0322】

MSソース条件を表21.3に示し、取得パラメータは次のとおりであった。

【0323】

モード：MS；質量範囲：500～7000 m/z、取得速度：1スペクトル/秒、及び1000ミリ秒/スペクトル、3354トランジェント/スペクトル。

【0324】

40

【表 21. 3】

MSソース条件

ガス温度:300°C	VCap:5000V
乾燥ガス:13l/分	ノズル電圧:2000V
ネブライザー:45 psig	フラグメンター:170V
シースガス温度:400°C	スキマー:65V
シースガスフロー:12l/分	Oct RF Vpp:750V

【0325】

50

MassHunterソフトウェア (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用した定量的分析は、デコンボリューション及びデータ分析のために使用した。デコンボリューションパラメータは以下のとおりであった。

【0326】

デコンボリューションアルゴリズム：最大エントロピー；質量範囲：70000～160000；質量ステップ：1.0；使用された制限 m/z 範囲：1000～7000；ベースラインを差し引く：7.0；付加物：プロトン；同位体幅：自動；高さフィルタ：ピーク信号対ノイズ ≥ 30.0 。最大ピーク数：高さ100に制限されている。

【0327】

平均DARは、以下の式を使用して、デコンボリューションしたスペクトルから計算されたものであった。

$$\text{平均 DAR} = \sum_{i=0}^n \frac{\text{薬物負荷}_i \cdot \text{ピーク強度}_i}{\text{総ピーク強度}}$$

10

【0328】

21.3 ADCのSEC-HPLC分析

室温で5カラム体積のバッファー (150 mM Na_2PO_4 、pH 6.95) で平衡化したAdvance Bio SECカラム (300 Å、2.7 μm 、7.8 $\times$ 150 mm) を備えたAgilent Infinity II 1260 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を使用して分析SECを行った。典型的には、2～3 mg/mLの濃度の試料20～30 μg を、1 mL/分で7分間、等方圧的に溶出し、A280で吸光度を監視した。クロマトグラムを積分して、各ピークの完全なベースライン間の積分を得、部分的に分離したピーク間に適度な分離があった。IgGの主成分と対応するピーク (概算保持時間3.3分) を無改変のキメラ抗体v23924のSECプロファイルに基づいて単量体として報告した。3.3分より前に生じるあらゆるピークを高分子量種 (HMWS) と指定し、溶媒ピーク (5.2分を超える) を除いて、3.3分以降に生じるあらゆるピークを低分子量種 (LMWS) と指定した。

20

【0329】

21.4 ADCのCE-SDS分析

まず、全ての試料を1 mg/mLに希釈した後、製造業者の手順に従って96ウェルPCRプレート (Protein Express Assay LabChip (商標) ; PerkinElmer, Inc., Waltham, MA) において試料を調製した。簡潔に述べると、2 μg のADCを、400 mMのジチオスレイトール (DTT) の存在 (還元) または非存在 (非還元) 下において7 μL のProtein Express バッファーと混合し、続いて95 $^{\circ}\text{C}$ で5分間熱変性させた。次いで、試料をデータ取得前にdH₂O中で1:2の比で希釈した。各CE-SDS実行後に、LabChip (商標) Reviewer (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA) を使用してゲル及び対応する電気泳動図を分析した。

30

【0330】

40

【表 2 1 . 4】

ADCの生物物理学的特性

ADC ¹	標的 DAR	報告された DAR		単量体% (HPLC-SEC)	%FD(mol%/ DAR)	エンドトキシン (EU/mg)
		HPLC-HIC	LC-MS			
v23924-DL1	2	2.1	1.9	100	ND ²	ND
v23924-DL1	4	4.0	4.0	99	0.4	<0.15
v23924-DL1	10	9.4	9.7	99	0.4	<0.23
v30384-DL1 ³	4	3.8	4.0	98	ND	ND
v30384-DL1 ⁴	4	3.8	4.1	97	<0.1	<0.23
v30389-DL1	4	3.8	3.9	93	ND	ND
v30394-DL1	4	3.9	3.7	96	ND	ND
v30399-DL1 ³	4	3.9	4.1	97	ND	ND
v30399-DL1 ⁴	4	3.8	4.1	98	<0.1	<0.21
v30618-DL1	4	4.2	4.2	97	ND	ND
v31422-DL1	4	3.9	4.2	99	ND	ND
v31423-DL1 ³	4	4.1	4.6	99	ND	ND
v31423-DL1 ⁴	4	3.9	4.3	99	<0.1	<0.42
v31424-DL1 ³	4	4.0	4.3	100	ND	ND
v31424-DL1 ⁴	4	3.8	4.4	100	<0.1	<0.5
v31425-DL1	4	3.9	4.3	100	ND	ND
v31426-DL1	4	3.9	4.4	99	ND	ND
v36167-DL1	4	4.0	ND	100	ND	ND
v36168-DL1	4	4.0	ND	100	ND	ND
v35305-DL1	4	4.0	ND	100	ND	ND
v35342-DL1	4	4.2	ND	100	ND	ND
v35347-DL1	4	3.5	ND	98	ND	ND
v35348-DL1	4	3.3	ND	99	ND	ND
v35350-DL1	4	3.3	ND	100	ND	ND
v35354-DL1	4	4.2	ND	100	ND	ND
v35356-DL1	4	3.7	ND	100	ND	ND
v35358-DL1	4	3.8	ND	99	ND	ND
v23924-DL2	10	9.5	9.7	98	ND	ND
v23924-DL3	4	3.5	2.9	100	ND	ND
v30384-DL3	4	4.0	ND	91	ND	ND
v30384-DL4	4	3.8	ND	93	ND	ND
v30384-DL5	8	ND	8	96	<1.0	<0.25
v36167-DL5	8	8.0	ND	100	ND	ND
v36168-DL5	8	8.0	ND	100	ND	ND
v35347-DL5	8	8.0	ND	100	ND	ND
v35348-DL5	8	8.0	ND	100	ND	ND
v35356-DL5	8	8.0	ND	100	ND	ND
v35358-DL5	8	8.0	ND	100	ND	ND
v36675-DL5	8	8.0	8.0	99	0.8	<0.02

10

20

30

40

50

ADC ¹	標的 DAR	報告された DAR		単量体% (HPLC-SEC)	%FD(mol %/DAR)	エンドトキ シン (EU/mg)
		HPLC-HIC	LC-MS			
v30384-DL6	3.3	ND	3.3	100	ND	ND
v23924-DL7	10	9.5	9.8	100	ND	ND
v23924-DL7	4	4.0	3.6	100	<0.1	<0.19
v30384-DL8	4.0	ND	3.9	97	0.4	<0.25

¹薬物リンカー（DL）の詳細については、実施例 19 及び 20 を参照されたい。

²ND＝未検出

³小規模な調製、%FD 及びエンドトキシン未測定

⁴大規模な調製

10

【0331】

実施例 22：ADC のインビトロ細胞傷害性

薬物リンカー DL1 にそれぞれコンジュゲートしたヒト化バリエーション v30384 または親和性成熟バリエーション v35356（実施例 19 を参照）を含む ADC の細胞増殖阻害（細胞傷害性）能力を、以下に記載するように FR α 発現細胞株のパネルにおいて決定した。

20

【0332】

簡潔に述べると、細胞を 384 ウェルプレートに 1000 細胞／ウェルで播種し、完全細胞増殖培地中で生成した試験物を滴定で処理した。処理された細胞を、標準的な培養条件下で 4 日間インキュベートした（37℃／5% CO₂）。インキュベーション後、CellTiter-Glo（登録商標）試薬（Promega Corporation, Madison, WI；カタログ番号 G7570）を全てのウェルにスパイクし、Synergy（商標）H1 プレートリーダー（BioTek Instruments, Winooski, VT）を使用して、各ウェルに存在する ATP に対応する発光を測定した。（試験物を添加していない、培地のみ）のブランクウェルに基づいて ATP 測定 RLU 値を使用して %細胞傷害値を算出し（相対光単位）、GraphPad Prism 9 ソフトウェア（GraphPad Software, San Diego, CA）を使用して試験物濃度に対してプロットした。

30

【0333】

結果

結果を表 22.1 及び 19 に示す。ヒト化バリエーション v30384 を含む ADC 及び親和性成熟バリエーション v35356 を含む ADC の両方が、FR α 発現細胞 KB-HeLa、IGROV-1、JEG-3 及び SKOV-3 において同等のインビトロ細胞傷害性を示した。いずれの ADC も、FR α 陰性 MDA-MB-468 細胞株において非特異的な細胞傷害性を示さなかった。

40

【0334】

【表 22.1】

インビトロ細胞傷害性

ADC	DAR	EC50(nM)DAR 補正済み				
		KB-HeLa	IGROV-1	JEG-3	SKOV-3	MDA-MB-468
v30384-DL1	3.9	0.0528	0.169	0.102	0.1767	>15
v35356-DL1	3.7	0.0307	0.0395	0.0409	0.0545	>15

【0335】

実施例 23：細胞内ペイロードの放出及び定量

細胞株 JEG-3（高 FR α ）、Caov-3（中等度 FR α ）、HEC-1-A（中

50

等度FR α)、及びH2110(中等度/低FR α)における代表的なADCの細胞内ペイロード送達能力を以下に記載するように質量分析を使用して評価した。試験したADCは、薬物リンカーDL1にそれぞれコンジュゲートされたヒト化バリエーションv30384または親和性成熟バリエーションv35356を含む(実施例19を参照されたい)。

【0336】

簡潔に述べると、細胞を80,000細胞/ウェルで12ウェルプレートに播種し、標準培養条件下で24時間、様々な濃度のADCで処理した。インキュベーション後、PBS pH7.4を使用して細胞を洗浄し、収集し、カウントし、-80℃で凍結した。解凍後、細胞を純粋なアセトニトリルを使用して溶解した。細胞溶解物上清を、Agilent 6470 3連四重極(QQQ)質量分析計(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)と結合したAgilent 1290 Infinity II LCに注入し、細胞溶解物試料中の遊離ペイロード(化合物1)を、既知の濃度の遊離ペイロード標準を使用して定量した。

【0337】

結果

結果を図11に示す。高FR α 発現細胞株JEG-3において、両方のADCは、同等の細胞内ペイロード(化合物1)送達を示した。より低いFR α 発現細胞株Caov-3、H2110及びHEC-1-Aにおいて、親和性成熟バリエーションv35356を含むADCは、親ヒト化バリエーションv30384を含むADCと比較して、24時間でより高いペイロード送達を示した。

【0338】

実施例24：インビボ有効性試験ーキメラ抗FR α 抗体ADC

薬物リンカーDL1またはDL7にコンジュゲートされた親キメラ抗体v23924のインビボ抗腫瘍活性を、以下に記載するように、様々なレベルのFR α を発現するいくつかの異種移植片モデルにおいて評価した。既知のFR α 標的化抗体であるミルベツキシマブを含む対照ADCの活性を、比較のために評価した。対照ADCは、薬物リンカーDL1にコンジュゲートされたv17717(HetFcを有するミルベツキシマブFab)、及び薬物リンカーDL6にコンジュゲートされたv17717であった。統計分析のために、線形混合効果モデルを対数変換された腫瘍体積に適合させ、次に、平均成長率が等しいという帰無仮説のF検定及び事後対比較を行った。

【0339】

各異種移植試験において利用されたADC、異種移植モデル、投与量及び試験期間の概要を表24.1に示す。各異種移植試験において、動物の腫瘍体積及び体重を週に2回測定した。

【0340】

10

20

30

40

50

【表 2 4 . 1】
試験パラメータ

異種移植モデル	がんの種類	FR α 発現	ADC	用量レベル(複数可)mg/kg	試験期間
CTG0848	非小細胞肺	中/高	v23924-DL1	5、10	28 日
OV90	卵巣	中	v23924-DL1	9、18	60 日
			v17717-DL6	9	
OVCAR3	卵巣	中/高	v23924-DL1	9	60 日
			v17717-DL6	9	
LXFA737	肺	中	v23924-DL1	5	45 日
			v17717-DL6	5	
			v17717-DL1	5	
JEG3	絨毛癌	未検出	v23924-DL1	3	25 日
			v17717-DL6	3	
			v17717-DL1	3	
HCC1954	胸	低	v23924-DL1	10	49 日
			v17717-DL6	10	
			v17717-DL1	10	
SKOV3	卵巣	低	v23924-DL1	10	40 日
			v17716-DL6	10	
			v17717-DL1	10	
KB	子宮頸管内	中	v23924 DL1	5、10	28 日
			v23924-DL7	5、10	
			v17717-DL6	5、10	

10

20

30

40

50

【0 3 4 1】

CTG-0848 PDXモデルの場合、腫瘍断片を雌のヌードマウスに皮下移植した。平均腫瘍体積が約100～250mm³に達したとき、動物を腫瘍サイズによってマッチさせ、処置群に割り当て（群当たりn=5）、表24.1に示されるように、0日目に単回のIV用量のADCで処置した。

【0 3 4 2】

OV90モデルに関して、腫瘍細胞懸濁液（0.1mlの50%Matrigel（登録商標）中の 1×10^7 細胞）を雌のCB.17 SCIDマウスの皮下に移植した。平均腫瘍体積が100～150mm³に達したとき、動物を群に割り当て（群当たりn=9）、試験1日目に単回IV用量の表24.1に示されるADCで処置した。

【0 3 4 3】

OVCAR3モデルの場合、腫瘍断片（約1mm³）を雌のCB.17 SCIDマウスに皮下に移植した。平均腫瘍体積が約100～150mm³に達したとき、動物を群に割り当て（群当たりn=8）、試験1日目に単回IV用量の表24.1に示されるADCで処置した。

【0 3 4 4】

LXFA737 PDXモデルについて、腫瘍断片（3～4mmのエッジ長）を雌のヌードマウスに皮下移植した。平均腫瘍体積が約80～200mm³に達したとき、動物を群に割り当て（群当たりn=6）、試験0日目に単回IV用量の表24.1に示されるADCで処置した。

【0 3 4 5】

JEG3 CDXモデルに関して、腫瘍細胞懸濁液（0.1mlの50%Matrigel（登録商標）中の 1×10^7 細胞）をNOD/SCIDマウスの皮下に移植した。平

均腫瘍体積が約 100 mm^3 に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n = 5$ ）、試験 0 日目に単回 IV 用量の表 24.1 に示される ADC で処置した。

【0346】

HCC1954 CDX モデルに関して、腫瘍細胞懸濁液（0.1 ml の 50% Matrigel（登録商標）中の 5×10^6 細胞）をヌードマウスの皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 150 mm^3 に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n = 5$ ）、試験 0 日目に単回 IV 用量の表 24.1 に示される ADC で処置した。

【0347】

SKOV3 CDX モデルに関して、腫瘍細胞懸濁液（0.1 ml の 50% Matrigel（登録商標）中の 1×10^7 細胞）をヌードマウスの皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 170 mm^3 に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n = 5$ ）、試験 0 日目に単回 IV 用量の表 24.1 に示される ADC で処置した。

【0348】

KB CDX モデルの場合、腫瘍細胞懸濁液（0.1 ml の PBS 中の 3×10^6 細胞）をヌードマウスに皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 $100 \sim 150\text{ mm}^3$ に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n = 5$ ）、試験 1 日目に単回 IV 用量の表 24.1 に示される ADC で処置した。

【0349】

HCC1954 及び KB CDX モデルを除く全てのモデルについて、実施例 28 に記載されるように、薬物動態分析のためにいくつかの時点で血清を収集した。

【0350】

結果

結果を図 12 に示す。

【0351】

CTG-0848 PDX モデルでは、5 及び 10 mg/kg での投与時に、v23924-DL1 は、腫瘍増殖の持続的な退縮をもたらした（図 12A）。OV90 モデルでは、9 及び 18 mg/kg で投与された場合、v23924-DL1 は、腫瘍増殖速度の中程度の阻害をもたらした（図 12B）が、これは、ビヒクル対照（混合効果モデル）と統計的に有意差はなかった。OVCA3 モデルでは、 9 mg/kg で投与した場合、v23924-DL1 及び v17717-DL6 の両方が、腫瘍増殖率の統計的に有意な阻害をもたらした（ $p < 0.001$ 混合効果モデル）。v23924-DL1 は、持続的な腫瘍退縮をもたらし、v17717-DL6 よりも腫瘍増殖率の有意に大きい阻害をもたらした（ $p < 0.001$ ）（図 12C）。

【0352】

LXF737 PDX モデルでは、 5 mg/kg 、v23924-DL1、v17717-DL6、及び v17717-DL1 で投与した場合、それぞれ 198%、144%、及び 165% の腫瘍増殖率阻害をもたらした（各腫瘍増殖率は、対照と有意に異なる、 $p < 0.001$ ）（図 12D）。JEG3 CDX モデルでは、 3 mg/kg で投与した場合、v23924-DL1、v17717-DL6、及び v17717-DL1 は、それぞれ 132%、148%、及び 139% の腫瘍増殖率阻害を伴う一過性の腫瘍退縮をもたらした（各腫瘍増殖率は対照と有意に異なる、 $p < 0.001$ ）（図 12E）。HCC1954 CDX モデルでは、 10 mg/kg で投与した場合、v23924-DL1、v17717-DL6、及び v17717-DL1 は、それぞれ 287%、278%、及び 242% の腫瘍増殖率阻害を有する一過性の腫瘍退縮をもたらした（各腫瘍増殖率は、対照とは有意に異なる、 $p < 0.01$ ）（図 12F）。

【0353】

SKOV3 CDX モデルでは、 10 mg/kg で投与した場合、v23924-DL1、v17716-DL6、及び v17717-DL1 は、それぞれ 287%、243%、及び 278% の腫瘍増殖率阻害を有する一過性の腫瘍退縮をもたらした（各腫瘍増殖率は、対照とは有意に異なる、 $p < 0.01$ ）（図 12G）。KB CDX モデルにおいて

、5 mg / kg で投与された場合、v 2 3 9 2 4 - D L 1、v 2 3 9 2 4 - D L 7、及び v 1 7 7 1 7 - D L 6 は、それぞれ 2 8 9 %、1 7 1 %、及び - 1 % の腫瘍増殖率阻害をもたらし、両方の v 2 3 9 2 4 A D C は、ビヒクル対照及び v 1 7 7 1 7 - D L 6 よりも有意に優れていた ($p < 0.01$)。10 mg / kg で投与した場合、全ての A D C は、このモデルで持続的な腫瘍退縮をもたらした (図 1 2 H)。

【0354】

実施例 25：インビボ有効性試験－キメラ及びヒト化抗 F R α 抗体 A D C

キメラ抗体 v 2 3 9 2 4 及び薬物リンカー D L 1 (実施例 19 を参照) にコンジュゲートしたヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 及び v 3 0 3 9 9 (実施例 3 を参照) のインビボ抗腫瘍活性を、以下に記載するように、中 / 高レベル F R α 発現 O V C A R 3 卵巣癌モデルにおいて評価した。統計分析のために、線形混合効果モデルを対数変換された腫瘍体積に適合させ、次に、平均成長率が等しいという帰無仮説の F 検定及び事後対比較を行った。

【0355】

腫瘍断片 (約 1 mm³) を、雌の C B . 1 7 S C I D マウスに皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 1 0 0 ~ 1 5 0 mm³ に達したとき、動物を群 (群当たり n = 8) に割り当て、試験 1 日目に 4 mg / kg または 9 mg / kg の A D C のいずれかの単回 I V 用量で処置した。腫瘍体積及び体重を 6 0 日間の試験期間で週に 2 回測定した。

【0356】

結果

結果を図 1 3 に示す。4 mg / kg で投与した場合、v 2 3 9 2 4 - D L 1 及びヒト化 v 3 0 3 8 4 - D L 1 及び v 3 0 3 9 9 - D L 1 は、同様の腫瘍退縮、それに続く再成長をもたらした。9 mg / kg で投与した場合、全ての A D C は、持続的な腫瘍退縮をもたらした。

【0357】

実施例 26：インビボ有効性試験－ヒト化抗 F R α 抗体 A D C # 1

薬物リンカー D L 1 または D L 8 にコンジュゲートされた (実施例 19 及び 20 を参照されたい) ヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 (実施例 3 を参照されたい) のインビボ抗腫瘍活性を、以下に記載するように、様々なレベルの F R α を発現するいくつかの異種移植片モデルにおいて評価した。既知の F R α 標的化抗体であるミルベツキシマブを含む対照 A D C の活性を、比較のために選択されたモデルにおいて評価した。対照 A D C は、薬物リンカー D L 6 (v 1 7 7 1 7 - D L 6) にコンジュゲートされた v 1 7 7 1 7 (H e t F c を有するミルベツキシマブ F a b)、及び薬物リンカー D L 6 (v 1 7 7 1 6 - D L 6) にコンジュゲートされた v 1 7 7 1 6 (H o m o F c を有するミルベツキシマブ F a b) であった。H 2 1 1 0 C D X モデルにおいて、薬物リンカー D L 4 (v 3 1 6 2 9 - D L 4) にコンジュゲートされた v 3 1 6 2 9 (ファーレツズマブ) も対照として含まれた。統計分析のために、線形混合効果モデルを対数変換された腫瘍体積に適合させ、次に、平均成長率が等しいという帰無仮説の F 検定及び事後対比較を行った。

【0358】

各異種移植試験において利用された A D C、異種移植モデル、投与量及び試験期間の概要を表 2 6 . 1 に示す。各異種移植試験において、動物の腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した。

【0359】

10

20

30

40

50

【表 26. 1】
試験パラメータ

異種移植 モデル	がんの種 類	FR α 発現	ADC	用量レベル(複数 可)mg/kg	試験期間
H2110	肺	中/低	v30384-DL1	1.25、2.5、5	28 日
			v17716-DL6	1.24、2.5、5	
			v31629-DL4	2.5	
SKOV3	卵巣	低	v30384-DL1	8	42 日
				4 及び 8、q10d $\times$ 4	
			v17717-DL6	8 4 及び 8、q15d $\times$ 3	
IGROV-1	卵巣	高い	v30384-DL1	4 及び 8、q10d $\times$ 4	60 日
			v17716-DL6	4 及び 8、q15d $\times$ 3	
LXFA737	肺	中	v30384-DL1	4、8	45 日
			v17717-DL6	4、8	

10

【0360】

H2110 CDXモデルでは、腫瘍細胞懸濁液（0.1mlの50%Matrigel（登録商標）中の 1×10^7 細胞）をCB.17 SCIDマウスの皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 155 mm^3 に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n=8$ ）、試験0日目に単回IV用量の表26.1に示されるADCで処置した。血清を、実施例28に記載されるように、薬物動態分析のためにいくつかの時点で収集した。

20

【0361】

SKOV3 CDXモデルでは、腫瘍細胞懸濁液（0.1mlの50%Matrigel（登録商標）中の 1×10^7 細胞）をヌードマウスの皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 175 mm^3 に達したとき、動物を群に割り当て（反復用量群については群当たり $n=9$ 、単回用量群については $n=7$ ）、表26.1に示されるように、用量レベル及びスケジュールに従って、試験0日目にADCで処置した。血清を、実施例28に記載されるように、薬物動態分析のためにいくつかの時点で収集した。

30

【0362】

IGROV-1モデルについて、腫瘍細胞懸濁液（0.1mlの50%Matrigel（登録商標）中の 1×10^7 個の細胞）を雌のヌードマウスに皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ に達したとき、動物を群（群当たり $n=12$ ）に割り当て、表26.1に示されるように、用量レベル及びスケジュールに従ってADCで処置した。

【0363】

LXFA737 CDXモデルについて、腫瘍断片（3～4mmのエッジ長）をヌードマウスに皮下移植した。平均腫瘍体積が約 100 mm^3 に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n=10$ ）、試験0日目に単回IV用量の表26.1に示されるADCで処置した。

40

【0364】

結果

結果を図14に示す。

【0365】

H2110 CDXモデルでは、1.25、2.5及び 5 mg/kg で投与した場合、v30384-DL1及びv17716-DL6の両方が、浅い用量応答にわたって軽度から中等度の腫瘍増殖阻害をもたらしたが、これらは統計的に有意ではなかった（図14A）。v31629-DL4を 2.5 mg/kg で投与した場合、v17716-DL6

50

及び v 3 0 3 8 4 - D L 1 に匹敵する腫瘍増殖速度の軽度な阻害をもたらした。

【0366】

S K O V 3 C D X モデルにおいて、8 m g / k g の v 3 0 3 8 4 - D L 1、v 3 0 3 8 4 - D L 8、及び v 1 7 7 1 6 - D L 6 の単回投与は、それぞれ 2 0 3 %、1 7 8 %、及び 2 3 2 % ($p < 0.01$) の腫瘍増殖率の有意な阻害をもたらした、v 1 7 7 1 6 - D L 6 ($p < 0.01$) による腫瘍増殖率阻害は中等度であるが統計的に有意に大きい (図 1 4 B)。反復投与 (v 3 0 3 8 4 - D L 1 を 1 0 日ごとに合計 4 回、v 1 7 7 1 6 - D L 6 を 1 5 日ごとに合計 3 回) は、単回用量投与と比較して腫瘍増殖にわずかな影響を与えた (図 1 4 C)。

【0367】

I G R O V - 1 モデルでは、8 m g / k g で投与された場合、v 3 0 3 8 4 - D L 1 (合計 4 回投与の場合は 1 0 日ごと) 及び v 1 7 7 1 6 - D L 6 (合計 3 回投与の場合は 1 5 日ごと) の両方が、対照と比較して腫瘍増殖の有意な阻害をもたらした ($p < 0.001$)。4 m g / k g で投与した場合、v 3 0 3 8 4 - D L 1 のみ (合計 4 回の投与で 1 0 日ごと) が、対照と比較して腫瘍増殖の有意な阻害をもたらした ($p < 0.001$)。v 3 0 3 8 4 - D L 1 は、4 及び 8 m g / k g の用量レベルの両方で、v 1 7 7 1 6 - D L 6 よりも有意に大きな腫瘍増殖率阻害をもたらした (それぞれ、 $p < 0.001$ 及び $p = 0.014$) (図 1 4 D)。

【0368】

L X F A 7 3 7 C D X モデルでは、8 m g / k g で投与された場合、v 3 0 3 8 4 - D L 8 及び v 1 7 7 1 6 - D L 6 は、それぞれ 1 5 4 % 及び 3 1 3 % の腫瘍増殖率の有意な阻害をもたらした ($p < 0.01$)。v 1 7 7 1 6 - D L 6 は、4 m g / k g (1 3 2 % 及び 2 1 %) 及び 8 m g / k g (3 1 3 % 及び 1 5 4 %) の用量レベル ($p < 0.01$) の両方で v 3 0 3 8 4 - D L 8 と比較して、有意に大きな腫瘍増殖率阻害をもたらした (図 1 4 E)。

【0369】

実施例 27: インビボ有効性試験ーヒト化抗 F R α 抗体 A D C # 2

薬物リンカー D L 5 (実施例 19 を参照されたい) にコンジュゲートされたヒト化バリアント v 3 0 3 8 4 (実施例 3 を参照されたい) のインビボ抗腫瘍活性を、以下に記載するように、様々なレベルの F R α を発現するいくつかの異種移植片モデルにおいて評価した。統計分析のために、線形混合効果モデルを対数変換された腫瘍体積に適合させ、次に、平均成長率が等しいという帰無仮説の F 検定及び事後対比較を行った。

【0370】

各異種移植試験において利用された A D C、異種移植モデル、投与量及び試験期間の概要を表 27.1 に示す。各異種移植試験において、動物の腫瘍体積及び体重を週に 2 回測定した。

【0371】

【表 27.1】

試験パラメータ

異種移植モデル	がんの種類	FR α 発現	用量レベル(複数可)mg/kg	試験期間
OV90	卵巣	中	1、3、10	61 日
H2110	肺	中/低	0.3、1、3、10	28 日
OVCAR3	卵巣	中/高	0.25、0.75、1.5、3	61 日
OVCAR3	卵巣	中/高	6	61 日

【0372】

O V 9 0 C D X モデルでは、腫瘍細胞懸濁液 (0.1 m l の 5 0 % M a t r i g e l (登録商標) 中の 1×10^7 細胞) を C B . 1 7 S C I D マウスの皮下に移植した。平

均腫瘍体積が約 $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n = 6$ ）、試験1日目に単回IV用量の表27.1に示されるADCで処置した。

【0373】

H2110 CDXモデルでは、腫瘍細胞懸濁液（0.1 mlの50% Matrigel（登録商標）中の 1×10^7 細胞）をCB.17 SCIDマウスの皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 150 mm^3 に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n = 5$ ）、単回IV用量の表27.1に示されるADCで処置した。

【0374】

OVCA3 CDXモデルでは、腫瘍断片（約 1 mm^3 ）をCB.17 SCIDマウスに皮下に移植した。平均腫瘍体積が約 $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ に達したとき、動物を群に割り当て（群当たり $n = 5$ ）、試験1日目に単回IV用量の表27.1に示されるADCで処置した。

【0375】

各モデルについて、実施例28に記載されるように、薬物動態分析のためにいくつかの時点で血清を収集した。

【0376】

結果

結果を図15に示す。3つのモデル全てにおいて、v30384-DL5は、試験された投与量にわたって用量応答をもたらした。

【0377】

OV90 CDXモデルにおいて、v30384-DL5は、1、3、及び 10 mg/kg にわたって用量応答をもたらした（それぞれ、腫瘍増殖率の25%、47%、及び185%阻害、3及び 10 mg/kg 用量レベルで有意（ $p < 0.01$ ））（図15A）。H2110 CDXモデルにおいて、v30384-DL5は、0.3、1、3、及び 10 mg/kg の用量レベルにわたって用量応答をもたらした（図15B）。OVCA3 CDXモデルにおいて、v30384-DL5は、0.25、0.75、1.5及び 3 mg/kg 用量レベルにわたる用量応答をもたらし、より高い用量群は、投与後約5週間での再成長を伴う持続的な退縮をもたらした（図15C）。OVCA3 CDXモデルにおけるさらなる試験において、v30384-DL5を 6 mg/kg で投与し、持続的な退縮をもたらした（図15D）。

【0378】

実施例28：薬物動態試験

実施例24、26、及び27に記載の異種移植試験のサブセットから記述のとおり血清を採取し、以下に記載の評価の下、ADCの薬物動態（PK）に関して分析した。全体として、免疫不全腫瘍保有マウスにおけるこれらの試験は、v30384に基づくADCが好ましいPK特性を有することを実証する。

【0379】

試験物（総抗体及び／またはインタクトADC）濃度を、384ウェルプレートELISAによってマウス血清から測定した。キメラv23924、ヒト化v30384、及びコンパレーターv17717及びv17716ベースのADCを投与されたマウス由来の血清中の総IgGの検出のために、ELISAプレートをヤギ抗ヒトIgG Fc捕捉抗体（Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA）でコートした。DL1インタクトADCのELISAについて、ウサギ抗化合物1捕捉抗体を使用した。DL6インタクトADCのELISAについて、マウス抗DM1／4キャプチャ抗体を使用した（Levena Biopharma, San Diego, CA）。血清試料は、ブロック後に適用され、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）（Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA）にコンジュゲートされた検出抗体：ヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂が適用された。3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）及びHCLクエンチングの適用後に、450 nmでの吸光度を測定し

10

20

30

40

50

た。濃度を、標準を参照して測定した (GraphPad Prismソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA))。

【0380】

結果を図16に示す。複数の試験にわたる分析は、典型的な抗体様長期曝露で、v23924-DL1及びv17717-DL1の各々の総IgG及びADC PKが同等であることを実証した (図16A～Fを参照されたい)。v17717-DL6及びv17716-DL6 ADC PKは、それぞれの総IgG PKと比較して一貫して低い曝露及びより高いクリアランスを実証した。

【0381】

v30384-DL5は、OV90モデルにおいて、1、3及び10mg/kgの用量にわたって比例したPKを示した (図16G)。H2110モデルでは、v30384-DL5は、10mg/kgでの長期曝露、及び低用量でのより大きなクリアランスを示した (図16H)。

【0382】

実施例29：多細胞腫瘍スフェロイドにおける抗FR α 抗体の浸透

抗FR α 抗体がFR α 発現細胞株スフェロイドを浸透する能力を、以下に記載の方法に従って評価した。スフェロイドは、異なる細胞集団の層と、外側の領域から内側の領域にかけて異なる勾配を形成する、3次元の細胞組織を提供する。細胞シグナル伝達は、二次元細胞培養よりもスフェロイドの方が複雑である。これらの特徴の結果として、スフェロイドは薬物耐性と代謝適応を再現する可能性がある。

【0383】

ヒト化バリエーションv36675のスフェロイド浸透能力を、ミルベツキシマブ (v17716) 及び非FR α 標的化対照パリビズマブ (抗RSV) (v22277) と比較した。バリエーションv36675は、バリエーションv30384と同じであるが、HetFcではなくHomoFcを含む。使用した細胞株は、高FR α 発現JEG-3 (胎盤性絨毛癌) であった。

【0384】

抗体は、抗ヒトIgG Fcを標的とするFab断片AF488コンジュゲート (Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA; カタログ番号109-547-008) に、1:1のモル比でPBS pH7.4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; カタログ番号10010-023) 中で、4℃で24時間カップリングすることにより、蛍光的に標識された。

【0385】

JEG-3細胞をTrypLE (商標) Express Enzyme (1X) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で培養容器から分離し、Cellaca (登録商標) MXハイスループット自動細胞計数器 (Nexcelom Bioscience LLC, Lawrence, MA) を用いてカウントした。細胞を完全成長培地 (10%ウシ胎児血清を補充した最小必須培地 (両方ともThermo Fisher Scientific, Waltham, MA製)) で希釈し、3,000細胞/ウェルで96ウェルのCellCarrier Spheroid ultra-lowアタッチメントプレート (Perkin Elmer, Waltham, MA) に播種し、遠心分離し、標準培養条件下で3日間インキュベートして、スフェロイドの形成及び成長を可能にした。

【0386】

スフェロイド形成後、Fab-AF488カップリング抗体を25nMの最終濃度でスフェロイドに添加し、標準培養条件下で4～96時間インキュベートした。インキュベーション後、100 μ Lの完全増殖培地を添加し、ウェルから100 μ Lの培地を除去し、合計3回の洗浄を行うことによって、過剰な抗体を除去した。スフェロイドを、1 μ MのHoechst33342 (Thermo Fisher Scientific, Wa

10

20

30

40

50

l t h a m, M A) 及び 1 0 0 n M の抗 A l e x a F l u o r 4 8 8 抗体 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, W a l t h a m, M A; カタログ番号 A - 1 1 0 9 4) の溶液で処理し、3 7 ° C / 5 % C O ₂ で 2 時間インキュベートした。

【 0 3 8 7 】

共焦点取得及び 1 0 倍倍率空気対物レンズを用いて、O p e r e t t a C L S (商標) 高含量分析システム (P e r k i n E l m e r, W a l t h a m, M A) を使用してイメージングを行った。1 5 μ m で区切られた 1 5 平面の Z スタックを取得し、スフェロイドの中心スライスを表す最大直径のスライスを 2 D 分析のために選択した。画像解析は、H a r m o n y (登録商標) 4 . 5 ソフトウェア (P e r k i n E l m e r, W a l t h a m, M A) を使用して画像分析を行った。簡潔に述べると、スフェロイド同定は、H o e c h s t 3 3 3 4 2 陽性物体の周りにマスクを、ウェル当たり 1 つのスフェロイドに適用することによって行われた。スフェロイド領域は、各々がスフェロイド領域の 1 0 % の面積を表す、同心円バンドのサブ領域に分割された。各サブ領域バンド内の平均 A F 4 8 8 蛍光を定量し、内側の 1 0 % 平均 A F 4 8 8 蛍光を減算することによって補正し、G r a p h P a d P r i s m V e r s i o n 9 (G r a p h P a d S o f t w a r e, S a n D i e g o, C A) を使用してプロットした。

10

【 0 3 8 8 】

結果

結果を表 2 9 . 1 及び図 2 0 に要約する。ヒト化抗体バリエーション v 3 6 6 7 5 は、評価された全ての時点で A F 4 8 8 蛍光が検出可能であったスフェロイドエッジからの距離によって、各サブ領域バンドでの A F 4 8 8 強度によって、J E G - 3 スフェロイドへのミルベツキシマブよりも高い程度の浸透を示した。非結合対照パリビズマブは、評価された全ての時点で、両方の抗 F R α 抗体と比較して、スフェロイド全体でより少ない A F 4 8 8 シグナルを示した。

20

【 0 3 8 9 】

30

40

50

【表 2 9 . 1】

平均補正 AF488 平均強度											
時間 (時間)	試料	バンド 1	バンド 2	バンド 3	バンド 4	バンド 5	バンド 6	バンド 7	バンド 8	バンド 9	スフェロイ ド中心
4	v36675	-11.2	97.5	129.6	107.1	56.1	33.0	23.9	14.6	7.8	0.0
	ミルベツキシマブ	9.8	100.1	57.1	17.0	0.1	-13.5	-15.9	-13.7	-7.1	0.0
	バリ ビズマブ	-16.0	5.1	31.7	31.2	21.6	25.4	23.5	14.8	7.5	0.0
24	v36675	-133.1	576.7	643.2	370.2	199.2	95.3	25.7	6.4	-1.7	0.0
	ミルベツキシマブ	-134.5	129.0	427.8	374.6	187.3	71.3	17.9	10.1	0.3	0.0
	バリ ビズマブ	-18.2	18.0	50.9	62.1	53.5	37.4	21.5	7.3	1.8	0.0
48	v36675	303.6	1017.6	648.1	418.6	324.6	214.1	106.6	47.2	17.5	0.0
	ミルベツキシマブ	153.2	542.7	332.1	206.6	146.2	112.5	71.7	28.9	4.2	0.0
	バリ ビズマブ	17.8	136.1	133.9	148.9	141.8	125.0	69.6	12.8	4.0	0.0
96	v36675	-60.5	1519.5	1213.0	815.5	507.5	305.5	196.5	121.5	48.5	0.0
	ミルベツキシマブ	-24.8	698.9	495.9	261.9	134.9	44.7	5.8	-12.1	-11.6	0.0
	バリ ビズマブ	-147.8	-25.7	-0.1	-20.1	-28.2	-18.8	-13.6	-9.9	-5.3	0.0

J E G - 3 スフェロイドにおける抗 F R α 抗体の浸透

【 0 3 9 0 】

実施例 3 0 : 抗 F R α 抗体の特異性評価

R e t r o g e n i x C e l l M i c r o a r r a y T e c h n o l o g y (C h a r l e s R i v e r L a b o r a t o r i e s , W i l m i n g t o n , M A) を使用して、以下の抗 F R α 抗体：ヒト化バリエーション v 3 6 6 7 5 及び親和性成熟バリエーション v 3 5 3 5 6 の任意の特定のオフターゲット結合相互作用をスクリーニングした。

【 0 3 9 1 】

R e t r o g e n i x C e l l M i c r o a r r a y T e c h n o l o g y は、6 , 3 0 0 を超えるヒトタンパク質を表す c D N A クローンのライブラリに対する結合に

10

20

30

40

50

ついて試験リガンドをスクリーニングすることによって、細胞表面受容体及び分泌タンパク質の両方との相互作用を同定する。これらのタンパク質には、形質膜単量体、ヘテロ二量体（別個のサブユニットの共発現によって形成される）、及び分泌タンパク質（不活性細胞膜テザーで発現される）が含まれる。各cDNAは、特化したスライド上に重複してスポットされ、HEK293細胞でオーバーレイされる。これらの細胞は逆トランスフェクトされ、それぞれが異なる個々のタンパク質（またはヘテロ二量体複合体）を過剰発現する細胞のクラスターをもたらす。

【0392】

この研究は、Charles River Laboratoriesで実施され、事前スクリーニング、ライブラリスクリーニング、及び確認スクリーニングの3つの段階で構成されていた。事前スクリーニングを最初に行い、ライブラリスクリーニングのための試験抗体の適切な濃度（すなわち、固定されたトランスフェクトされていないHEK293細胞への低レベルのバックグラウンド結合及びFR α を過剰発現する細胞への強い結合が観察された濃度）を決定した。ライブラリスクリーニング段階では、試験抗体を、約6,300個のヒトタンパク質を個別に発現する固定HEK293細胞に対するプールとしてスクリーニングした。確認スクリーニング段階では、各ライブラリヒットを再発現させ、固定及び生HEK293細胞の両方を使用して各試験抗体を個別に再試験した。

【0393】

3つの段階全てにおいて、スライドを、ZsGreen1（トランスフェクション効率を評価するための）、及び（1）事前スクリーニング段階で：ヒトFR α または対照受容体（EGFR及びCD20）、（2）ライブラリスクリーニング段階で：複数のマイクロアレイスライド（「スライドセット」）にわたって、個別に重複して配列させた上記のタンパク質ライブラリを、2つの複製スライドをそれぞれのスライドセットに対してスクリーニングしたもの、または（3）確認スクリーニング段階で：ライブラリスクリーニングで同定されたタンパク質ヒットまたは重複して配列させた対照受容体（EGFR及びCD20）、の両方をコードする発現ベクターで個別にスポットした。

【0394】

プレスクリーニング段階では、2、5または20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の選択された抗体、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の対照抗体（CD20に結合するリツキシマブバイオシミラー）、またはPBSのそれぞれを、細胞固定後にスライドに添加した。ライブラリスクリーニング段階では、細胞固定後、2つの抗体（20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバリエーションv36675及び5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバリエーションv35356）のプールを各スライドに添加した。確認スクリーニング段階では、スライドを、個々の抗体で処理した：20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバリエーションv36675、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のバリエーションv35356、または1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の対照抗体（リツキシマブバイオシミラー）、または固定の不在下での試験物なし（生細胞；1処置当たりn=1スライド）、及び細胞固定後（1処置当たりn=2スライド）。

【0395】

結合を、AlexaFluor（登録商標）647標識抗ヒトIgG H+L（AF647抗hIgG H+L）を使用して検出し、続いて蛍光撮像した。蛍光画像を、ImageQuant（商標）ソフトウェア（バージョン8.2；GE Healthcare, Chicago, IL）を使用して分析し、（トランスフェクションのために）定量した。タンパク質ヒットは、バックグラウンドレベルと比較して増加したシグナルを示す重複スポットとして定義され、ImageQuant（商標）ソフトウェア上に格子状に配置された画像を使用して目視検査によって同定された。重複スポットの強度に基づいて、2人の経験豊富な科学者による目視検査によって、ヒットを強、中、弱、または非常に弱いに分類した。

【0396】

結果

ライブラリスクリーニングで同定された最初のヒットの大部分は、スポット強度が非常に弱いから強いまでの範囲であり、バリエーションv36675とバリエーションv35356の

両方の確認スクリーニングでヒットであることが確認された。しかしながら、FR α との予想される強い相互作用を反映したヒットは別として、これらのヒットが1)Fc γ R受容体(Fcドメイン媒介相互作用によるシグナル)を含むため、対照抗体(リツキシマブバイオシミラー)についても観察されたか、または2)検出抗体によって認識された様々な免疫グロブリンを含むかのいずれかであったため、他のヒットは非特異的であるとみなされた。

【0397】

ヒト化バリエーションv36675については、他の相互作用は同定されず(図21を参照)、その主な標的であるFR α に対するバリエーションv36675の高い特異性を示した。ヘテロ二量体FCGR3A+CD247とのこのバリエーションについて観察された弱い相互作用は、対照において観察されなかった(図21A及びBを比較されたい)が、ヒットするのに十分に強いとは考えられなかった。

10

【0398】

親和性成熟バリエーションv35356について、ライブラリスクリーニングにおいて、タンパク質COL6A2アイソフォーム2C2Aについて弱い強度のシグナルを検出した。この「ヒット」は、固定細胞スクリーンで確認されたが、生細胞スクリーンでは確認されておらず、観察された不一致が固定アーチファクトに起因する可能性が高いことを示している。

【0399】

実施例31:競合アッセイ

20

親キメラ抗体v23924と抗FR α 抗体ミルベツキシマブ(v17716)及びファーレッツマブ(v31629)との間のFR α 標的への競合結合を、中等度のFR α 発現腫瘍細胞株H2110において、以下のようにフローサイトメトリーによって評価した。

【0400】

簡潔に述べると、抗体を、細胞処理前に、Alexa Fluor 647(AF647; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA; カタログ番号A20006)で、製造元の仕様に従って標識した。腫瘍細胞をVボトム96ウェルプレート中に50,000細胞/ウェルで播種し、内在化を防止するために4°Cで標識されていない抗体で1時間処理した。インキュベーション後、細胞を洗浄し、蛍光標識抗体を4°Cで1時間添加した。インキュベーション及び洗浄後、蛍光を、BD LSRT Fortessa(商標)Cell Analyzer(BD Biosciences, Franklin Lake, NJ)上でフローサイトメトリーによって検出し、ウェル当たり1,000の最小イベントを収集した。生細胞集団におけるAF647/APC-A GeoMean(蛍光シグナル幾何平均、抗ヒトAF647結合に比例)を使用して、未処置の対照と比較して、競合結合%を計算し、データを、GraphPad Prism Version 9(GraphPad Software, San Diego, CA)を使用して、プロットした。

30

【0401】

結果

結果を図22及び表31.1に示す。キメラ抗体v23924は、H2110細胞株におけるFR α 結合についてファーレッツマブと競合することが見出され、両方の結合配向(一次抗体ファーレッツマブ及び二次蛍光標識抗体バリエーションv23924、ならびに一次抗体バリエーションv23924及び二次蛍光標識抗体ファーレッツマブ)においてほぼ100%の競合結合をもたらす。キメラ抗体v23924は、H2110細胞株において、ミルベツキシマブとのFR α 結合について競合しないことが見出された。これらの抗体は、両方の結合配向において低レベルの%競合を示した。対照的に、ファーレッツマブは、ミルベツキシマブとの競合結合を示した。したがって、キメラ抗体v23924は、ミルベツキシマブ及びファーレッツマブの両方とは異なる結合プロファイルを示す。

40

【0402】

50

【表 3 1 . 1】

H 2 1 1 0 細胞におけるファーレッズマブ及びミルベツキシマブとの競合結合

	競合結合%							
	v23924		ミルベツキシマブ		ファーレッズマブ		未処置	
v23924	98	99	11	21	99	98	0	0
ミルベツキシマブ	13	7	100	98	99	100	0	0
ファーレッズマブ	99	72	91	75	98	100	0	0
未処置	1	1	0	0	0	0	0	0

10

【0 4 0 3】

実施例 3 2：抗 F R α 抗体の追加的な機能的特徴付け

ヒト化抗体バリエーション v 3 0 3 8 4 (H e t F c) または v 3 6 6 7 5 (H o m o F c) の機能活性を、F R α 発現腫瘍細胞株を使用して、細胞結合、抗原媒介抗体内在化、腫瘍細胞スフェロイドへの抗体浸透、及びスフェロイドの 3 D 細胞増殖阻害によって、バイパロットピック抗 F R α 抗体 B 5 3 2 7 A (I M G N 1 5 1 ; v 3 6 2 6 4) 及び抗 F R α 抗体ミルベツキシマブ (v 1 7 7 1 6) と比較して評価した。

20

【0 4 0 4】

3 2 . 1 細胞結合

ヒト化抗体バリエーション v 3 0 3 8 4 (H e t F c)、v 3 6 2 6 4 (B 5 3 2 7 A) 及び v 1 7 7 1 6 (ミルベツキシマブ) が F R α 発現腫瘍細胞株に結合する能力を、実施例 1 1 に記載されるのと同じ一般的な手順に従って、フローサイトメトリーによって、内因性 F R α 発現腫瘍細胞株 I G R O V - 1 (卵巣腺癌；F R α - 高) 上で評価した。

【0 4 0 5】

結果を表 3 2 . 1 に示す。ヒト化バリエーション v 3 0 3 8 4 及びミルベツキシマブ (v 1 7 7 1 6) は、同等の B m a x 値 (それぞれ 1 6 , 5 9 9 及び 1 9 , 5 0 5 の強度幾何平均) 及び見かけの K d 値 (それぞれ 0 . 4 3 及び 0 . 6 9 n M) で、同様の細胞上結合能力を示した。バイパロットピック抗体 B 5 3 2 7 A (v 3 6 2 6 4) は、バイパロットピック抗体の予想通り、他の 2 つの抗体 (2 6 , 2 6 7 強度幾何平均) と比較して、B m a x の増加を示した。

30

【0 4 0 6】

【表 3 2 . 1】

I G R O V - 1 細胞株における抗 F R α 抗体の細胞結合

試料	Bmax	Kd(nM)	ヒルスロープ (h)
v30384	16,599	0.43	1.2
v36264(B5327A)	26,267	0.70	1.4
v17716(ミルベツキシマブ)	19,505	0.69	1.4

40

【0 4 0 7】

3 2 . 2 内在化

ヒト化抗体バリエーション v 3 0 3 8 4 (H e t F c)、v 3 6 2 6 4 (B 5 3 2 7 A) 及び v 1 7 7 1 6 (ミルベツキシマブ) の受容体媒介性内在化能力を、以下のようにフローサイトメトリーによって内因性 F R α 発現腫瘍細胞株 I G R O V - 1 (卵巣腺癌) への取り込みによって評価した。

【0 4 0 8】

50

抗体は、抗ヒトIgG Fc Fab断片AF488コンジュゲート（Jackson Immuno Research Labs, West Grove, PA；カタログ番号109-547-008）に、1：1のモル比で、PBS pH7.4（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA；カタログNo. 10010-023）中で24時間、4℃でカップリングすることにより蛍光的に標識された。細胞を50,000細胞／ウェルで48ウェルプレートに播種し、標準的な培養条件（37℃／5%CO₂）下で一晩インキュベートして、結合を可能にした。カップリング抗体を、翌日、25nMで細胞に添加し、標準培養条件下で5時間インキュベートして、内在化を可能にした。インキュベーション後、細胞を解離し、洗浄し、表面のAF488の蛍光を、100nMの抗AF488抗体（Life Technologies, Carlsbad, CA；カタログ番号A-11094）を使用して、4℃で30分間クエンチした。クエンチしたAF488の蛍光（内在化蛍光）を、BD LSRFortessa（商標）Cell Analyzer（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）上でフローサイトメトリーによって検出し、ウェル当たり1,000の最小イベントを収集した。AF488／FITC-A GeoMean（蛍光シグナル幾何平均、抗ヒトFabAF488標識に比例）を、FlowJo（商標）バージョン10.8.1（BD Biosciences, Franklin Lake, NJ）を使用して、生体単一細胞集団について計算し、GraphPad Prismバージョン9（GraphPad Software, San Diego, CA）を使用してプロットした。

10

20

【0409】

結果を図23に示す。25nMの試験抗体とともにIGROV-1細胞を5時間インキュベートした後、ヒト化抗体バリエーションv30384は、バイパトリック抗体v36264と同等の内在化蛍光を示した（v30384に対して1.1倍）が、ミルベツキシマブ（v17716）は、内在化蛍光の程度が著しく低かった（v30384に対して0.5倍）。

【0410】

32.3 3Dスフェロイドへの抗体浸透

ヒト化抗体バリエーションv36675（HomoFc）、v36264（B5327A）及びv17716（ミルベツキシマブ）がFR α 発現細胞株スフェロイドを浸透する能力を、実施例29に記載されるのと同じ一般的な手順に従って、蛍光標識抗体を用いて高FR α 発現細胞株JEG-3（胎盤絨毛癌）から形成されるスフェロイドを処置することによって評価した。

30

【0411】

結果を図24に示す。25nMの蛍光標識抗体とのJEG-3スフェロイドの96時間のインキュベーションの後、ヒト化抗体バリエーションv36675は、第2の層から内側に向かって、バイパトリック抗体B5327A（v36264）またはミルベツキシマブ（v17716）よりも大きな蛍光強度を示し、全ての層でのv36675の細胞取り込みの程度が高く、全体的に、スフェロイドにより大きな距離へと浸透したことを示した。対照的に、バイパトリック抗体B5327A（v36264）は、最外層でv36675またはv17716よりも大きな蛍光強度を示し、スフェロイド表面上の抗体の蓄積を示した。

40

【0412】

32.4 3Dスフェロイド成長阻害

薬物リンカーDL1にそれぞれコンジュゲートされたヒト化抗体バリエーションv30384（HetFc）、v36264（B5327A）、及びv17716（ミルベツキシマブ）の3D細胞傷害性能力を、FR α 発現IGROV-1（卵巣腺癌）及びJEG-3（胎盤絨毛癌）細胞株スフェロイドにおいて以下のように評価した。

【0413】

簡潔に述べると、細胞を超低接着384ウェルプレート（Corning, New Y

50

ork, NY) に 3,000 細胞／ウェルで播種し、遠心分離し、標準的な培養条件下で 3 日間インキュベートして、スフェロイドの形成及び成長を可能にした。次いで、細胞増殖培地中に生成されたスフェロイドを、試験物の滴定で処理した。スフェロイドを標準的な培養条件下で 6 日間インキュベートした。インキュベーション後、CellTiter-Glo (登録商標) 3D 試薬 (Promega Corporation, Madison, WI) を全てのウェルに添加した。プレートを暗所において室温で 1 時間インキュベートし、発光を BioTek Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) を使用して定量した。(試験物を添加していない) ブランクウェルに基づいて細胞傷害値パーセントを算出し、GraphPad Prism9 ソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA) を使用して試験物濃度に対してプロットした。EC₅₀ 値は、GraphPad Prism9 によって、非線形回帰 log (アゴニスト) 対応答、可変勾配 (4 つのパラメータ) に基づいて計算した。

10

【0414】

結果を表 32.2 に示す。IGROV-1 スフェロイドに対して、3 つの抗体-薬物コンジュゲート (ADC) 全てが、同等の細胞増殖阻害能力を示した。JEG-3 スフェロイドに対して、v30384-DL1 は、v17716-DL1 (それぞれ、EC₅₀ 0.18 及び 0.17 nM) に類似した力価であったが、バイパラトピック ADC である、v36264-DL1 は、わずかに低い力価 (0.35 nM) を示した。

20

【0415】

【表 32.4】

3D インビトロ細胞増殖阻害

ADC	DAR	EC ₅₀ (nM)	
		IGROV-1 スフェロイド	JEG-3 スフェロイド
v30384-DL1	3.9	0.22	0.18
v36264-DL1	3.8	0.34	0.35
v17716-DL1	3.9	0.23	0.17

30

【0416】

本明細書で言及されている全ての特許、特許出願、刊行物及びデータベースエントリーの開示内容は、そのような個々の特許、特許出願、刊行物及びデータベースエントリーがそれぞれ、参照により援用されることが具体的かつ個々に示されている場合と同程度に、参照により、その全体が本明細書に具体的に援用される。

【0417】

当業者には明らかであろう、本明細書に記載される特定の実施形態の改変は、以下の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【0418】

配列の表

40

50

【表 A】
バリエーションのクローン番号

バリエーション	クローン番号			
	H1	H2	L1	L2
23924	18894	18894	18915	18915
30618	18908	18901	18915	18915
30384	22046	22057	22054	22054
30389	22047	22058	22054	22054
30394	22048	22059	22054	22054
30399	22049	22060	22054	22054
31422	22874	22874	22054	22054
31423	22875	22875	22054	22054
31424	22876	22876	22054	22054
31425	22877	22877	22054	22054
31426	22878	22878	22054	22054
35305	26434	26434	26449	26449
35342	26443	26443	26450	26450
35347	26445	26445	27276	27276
35348	26445	26445	26448	26448
35350	26445	26445	26450	26450
35354	26446	26446	26450	26450
35356	26447	26447	26448	26448
35358	26447	26447	26450	26450
36167	27272	27272	27274	27274
36168	27273	27273	27274	27274
36675	27275	27275	22054	22054

10

20

30

40

50

【表 B】
クローン配列

クローン ID	領域	配列	配列 番号
18894	全長	QSVKESEGGFLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYGVSWSVRQAPGN GLEWIGAVNSGGSAYYANWAKSRSTITRNTNLFVTTLKMTS LAVADTATYFCARSGSGYPMDYLAIWGPGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	17
	全長	CAGAGCGTGAAGGAGTCCGAGGGCGGCCTGTTCAAGCCCA CCGACACACTGACCCTGACATGCACCGTGTCTGGCTTTAGC CTGAGCTCCTACGGCGTGTCTTGGGTGCGGCAGGCCCGG GAAACGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACAGCGGCG GCTCTGCCTACTATGCCAACTGGGCCAAGTCCCGGTCTACA ATCACCAGAAACACAAATCTGTTCACAGTGACCCTGAAGA TGACCTCCCTGGCCGTGGCAGACACAGCAACCTATTTTTGT GCAAGGAGCGGCTCCGGATACCCAATGGATTATCTGGCCA TCTGGGGCCCTGGCACACTGGTGACCGTGTCTAGCGCTAG CACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTA AATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGGT GAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGGAAC TCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGT GCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTCA CCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTG CAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAG AAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACCTGCC CACCTTGTCCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGT GTTCTGTCTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCTGATGATTT CCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGTGGACGTGTCT CACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATG GCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGGAGG AACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGAC AGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAG TGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCCAATCGAAA AAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAACCACA GGTGTAACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAG AACCAGGTCAGTCTGACCTGTCTGGTGAAAGGATTCTATC CCAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCC TGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCT GATGGCAGTTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGTCGATAA ATCACGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTCAGCTGTTTCAGTG ATGCACGAAGCCCTGCACAACCAATTACACCCAGAAGAGCC TGAGCCTGTCTCCCGGC	18

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYGVSWSVRQAPGN GLEWIGAVNSGGSAYYANWAKSRSTITRNTNLFTVTLKMTS LAVADTATYFCARSGSGYPMDYLAIWGPGLTVTVSS	19
	IMGT CDR1	GFSLSSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSSY	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYANWAKS	27
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
18901	全長	QSVKESEGGLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYGVSWSVRQAPGN GLEWIGAVNSGGSAYYANWAKSRSTITRNTNLFTVTLKMTS LAVADTATYFCARSGSGYPMDYLAIWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	33

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	CAGAGCGTGAAGGAGTCCGAGGGCGGCCTGTTCAAGCCCA CCGACACACTGACCCTGACATGCACCGTGTCTGGCTTTAGC CTGAGCTCCTACGGCGTGTCTTGGGTGCGGCAGGCCCCCG GAAACGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACAGCGGCG GCTCTGCCTACTATGCCAACTGGGCCAAGTCCCGGTCTACA ATCACCAGAAACACAAATCTGTTACAGTGACCCTGAAGA TGACCTCCCTGGCCGTGGCAGACACAGCAACCTATTTTGT GCAAGGAGCGGCTCCGGATACCCAATGGATTATCTGGCCA TCTGGGGCCCTGGCACACTGGTGACCGTGTCTAGCGCTAG CACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTA AATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGGT GAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGGAAC TCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGT GCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTCA CCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTG CAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAG AAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACCTGCC CACCTTGTCCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGT GTTCTGTTCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGATTT CCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGGACGTGTCT CACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATG GCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACC AAACCCCGGGAGG AACAGTACA ACTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGAC AGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAG TGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAATCGAAA AAACAATCTCTAAAGCAAAGGACAGCCTCGCGAACCACA GGTCTACGTCTACCCCCATCAAGAGATGAACTGACAAAA AATCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTCTACCC TTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGCCC GAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTCTGGACTCTG ATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCAAAGCTGACCGTCGATAA AAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGCTCCGTC ATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAAGAAGTCCC TGAGCCTGAGCCCTGGC	34
	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGN GLEWIGAVNSGGSAYYANWAKSRSTITRNTNLTFTVTLKMTS LAVADTATYFCARSGSGYPMDYLAIWGPGLVTVSS	19
	IMGT CDR1	GFSLSSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSSY	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYANWAKS	27

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
18908	全長	QSVKESEGGFLFKPTDTLTLTCTVSGFSLSSYGVSWSVRQAPGN GLEWIGAVNSGGSAYYANWAKSRSTITRNTNLTFTVTLKMTS LAVADTATYFCARSGSGYPMDYLAIWGPGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	35
	全長	CAGAGCGTGAAGGAGTCCGAGGGCGGCCTGTTCAAGCCCA CCGACACACTGACCCTGACATGCACCGTGTCTGGCTTTAGC CTGAGCTCCTACGGCGTGTCTTGGGTGCGGCAGGCCCCCG GAAACGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACAGCGGCG GCTCTGCCTACTATGCCAACTGGGCCAAGTCCCGGTCTACA ATCACCAGAAACACAAATCTGTTCACAGTGACCCTGAAGA TGACCTCCCTGGCCGTGGCAGACACAGCAACCTATTTTTGT GCAAGGAGCGGCTCCGGATACCCAATGGATTATCTGGCCA TCTGGGGCCCTGGCACACTGGTGACCGTGTCTAGCGCTAG CACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTA AATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGGT GAAGGATTACTTCCCTGAACAGTCACAGTGAGTTGGAAC TCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGT GCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTGGTCA CCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTG CAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAG AAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACCTGCC CACCTTGTCCGGCGCCAGAAGTGTGGGAGGACCAAGCGT GTTCTGTCTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGATTT CCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGGACGTGTCT CACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATG GCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAACCCCGGGAGG AACAGTACAACCTTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGAC AGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAG TGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAATCGAAA AAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAACCACA GGTCTACGTGCTGCCCCCTAGCCGCGACGAAGTACTAAA AATCAGGTCTCTGTGTGTCTGGTCAAAGGATTCTACCC	36

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGCCC GAGAACAAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCTG ATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTCGATAAA AGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTCAGCTGCTCCGTCA TGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTCAGAAGTCCCT GTCCCTGTCACCTGGC	
	VH	QSVKESEGGLFKPTDTLTLCTVSGFSLSSYGVSWVRQAPGN GLEWIGAVNSGGSAYYANWAKSRSTITRNTNLTFTVTLKMTS LAVADTATYFCARSGSGYPMDYLAIWGPGLTVTVSS	19
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYANWAKS	27
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
18915	全長	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSIGDWLAWYQQKP GQPPRLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVECADAA TYYCQQGYGRSNVDNIFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC	37
	全長	GCCTACGACATGACCCAGACACCCGCCTCCGTGGAGGTGG CAGTGGGAGGAACCGTGACAATCAAGTGCCAGGCCAGCC AGTCCATCGGCGATTGGCTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCC TGGACAGCCACCTCGGCTGCTGATCTATGAGGCCTCTACCC TGGCCAGCGGAGTGCCATCCAGATTCTCTGGCAGCGGCTC CGGCACACAGTTTACCCTGACAATCTCTGGAGTGGAGTGC GCAGACGCAGCAACCTACTATTGTCAGCAGGGCTATGGCA GGAGCAACGTGGATAATATCTTTGGAGGAGGAACCGAGGT GGTGGTGAAGAGGACAGTGGCGGCGCCAGTGTCTTCATT TTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGGACAGCCA GTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGAGGCT AAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGGAA	38

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		ATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAG CACCTATTCCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCC GACTACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTACCC ACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAG AGGGGAGTGC	
	VL	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSIGDWLAWYQQKP GQPPRLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVECADAA TYYCQQGYGRSNVDNIFGGGTEVVVK	39
	IMGT CDR1	QSIGDW	40
	IMGT CDR2	EAS	41
	IMGT CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Chothia CDR1	QASQSIGDWLA	43
	Chothia CDR2	EASTLAS	44
	Chothia CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Kabat CDR1	QASQSIGDWLA	43
	Kabat CDR2	EASTLAS	44
	Kabat CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Contact CDR1	GDWLAWY	45
	Contact CDR2	LLIYEASTLA	46
	Contact CDR3	QQGYGRSNVDN	47
	AbM CDR1	QASQSIGDWLA	43
	AbM CDR2	EASTLAS	44
	AbM CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
22046	全長	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVY LQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFALVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	48

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCT TTCCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACTCTG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGACTAAGGGGCCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGCGGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGTTGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGT CTGACAGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTCTACGTCTACCCCCCATCAAGAGATGAACTG ACAAAAATCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGAT TCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGG CCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTCTCTG GACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCAAAGCTGACCGT CGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGC TCCGTCATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGA AGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC	49
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLLTVSS	50
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22047	全長	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWSVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	52
	全長	GAGGTGCAGGTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCT TTTCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACCTG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGCTC CACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGC ACTAAGGGGCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGGCGGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTC CTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTCTACGTCTACCCCCCATCAAGAGATGAACTG ACAAAAAATCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGAT	53

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TCTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGG CCAGCCCAGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTCCTG GACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCAAAGCTGACCGT CGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGC TCCGTCATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGA AGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC	
	VH	EVQVLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSS	54
	IMGT CDR1	GFSLSSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS A	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSSY	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22048	全長	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDN SKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	55

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGC CAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCTT TTCCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTTGGGTGAGACAGGCC CCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACTCTGG AGGCAGCGCCTACTATGCAGACTGGGCAAAGGGCCGGTCC ACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTGC AGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTA TTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTGG CCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGC TAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCAGTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCAAGTGAGTTGG AACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTCCCG CAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGA CAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACC TGCCACCTTGTCGGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAA GCGTGTTCTGTTCACCCAAAGCCTAAAGACACCCTGATG ATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGG AGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCT GACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTAT AAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCCCCCAATCG AAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAAC CACAGGTCTACGTCTACCCCCCATCAAGAGATGAACTGAC AAAAAATCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGATTCT TACCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGCC AGCCCGAGAACAATTACAGACCACACCCCTGTCCTGGA CTCTGATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCAAAGCTGACCGTCG ATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGCTC CGTCATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAG TCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC	56
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	57
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADWAKG	58

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22049	全長	EVQVLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDN SKNTVY LQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	59
	全長	GAGGTGCAGGTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCT TTTCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTTGGGTGAGACAGGCC CCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACCTG GAGGCAGCGCCTACTATGCAGACTGGGCAAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTACCTGCGTGGTCGTGGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTC CTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTCTACGTCTACCCCCCATCAAGAGATGAACTG ACAAAAAATCAGGTCTCTCTGACATGCCTGGTCAAAGGAT	60

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TCTACCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGG CCAGCCCGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTCCTG GACTCTGATGGGAGTTTCGCTCTGGTGTCAAAGCTGACCGT CGATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTTAGCTGC TCCGTCATGCACGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGA AGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC	
	VH	EVQVLES GGGLVQPGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDN SKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVTVSS	61
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS A	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADWAKG	58
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22054	全長	DYQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSIGDWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDAAT YYCQQGYGRSNVDNIFGGGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	62
	全長	GACTACCAGATGACCCAGTCTCCAAGCTCCGTGTCCGCCTC TGTGGGCGACAGGGTGACCATCACATGCAGAGCCAGCCAG TCCATCGGCGATTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCAAGGCCCTAAGCTGCTGATCTATGAGGCCTCTACCCT GGCCAGCGGCGTGCCTTCCCGTTCTCTGGCAGCGGCTCC GGCACAGACTTTACCCTGACAATCTCTAGCGTGCAGCCAG AGGATGCCGCCACCTACTATTGTCAGCAGGGCTATGGCAG GTCCAACGTGGATAATATCTTTGGAGGAGGCACCAAGGTG GAGGTGAAGAGGACAGTGGCGGCGCCAGTGTCTTCATTT TTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGGACAGCCAG TGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGAGGCTA AAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGAAA	63

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGC ACCTATTCCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCCG ACTACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCA CCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAGA GGGGAGTGC	
	VL	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQSIGDWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRSNVDNIFGGGGTKVEVK	64
	IMGT CDR1	QSIGDW	40
	IMGT CDR2	EAS	41
	IMGT CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Chothia CDR1	RASQSIGDWLA	65
	Chothia CDR2	EASTLAS	44
	Chothia CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Kabat CDR1	RASQSIGDWLA	65
	Kabat CDR2	EASTLAS	44
	Kabat CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Contact CDR1	GDWLAWY	45
	Contact CDR2	LLIYEASTLA	46
	Contact CDR3	QQGYGRSNVDN	47
	AbM CDR1	RASQSIGDWLA	65
	AbM CDR2	EASTLAS	44
	AbM CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
22057	全長	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSLCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	66

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCT TTCCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACTCTG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGACTAAGGGGCCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGTTGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGT CTGACAGTGTGTCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTCTACGTGCTGCCCCCTAGCCGCGACGAACTG ACTAAAAATCAGGTCTCTCTGCTGTGTCTGGTCAAAGGATT CTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGC CAGCCCGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGG ACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTC GATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTACAGCTGCT CCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTCAGAA GTCCCTGTCCCTGTACCTGGC	67
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	50
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22058	全長	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWSVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYVLPISRDELTKNQVSL LCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	68
	全長	GAGGTGCAGGTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCT TTTCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAAC TCTG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGC ACTAAGGGGCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTACCTGCGTGGTCGTGGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTC CTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTCTACGTGCTGCCCCCTAGCCGCGACGAAGT ACTAAAAATCAGGTCTCTCTGCTGTGCTGGTCAAAGGATT	69

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		CTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGC CAGCCCGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGG ACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTC GATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTCAGCTGCT CCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTCAGAA GTCCCTGTCCCTGTACCTGGC	
	VH	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWSVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDNNSKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSS	54
	IMGT CDR1	GFSLSSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSSY	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22059	全長	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWSVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDNNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSGDSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	70

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAGC CAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCCTGCGCCGTGAGCGGCTT TTCCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTTGGGTGAGACAGGCC CCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACTCTGG AGGCAGCGCCTACTATGCAGACTGGGCAAAGGGCCGTCC ACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTGC AGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTA TTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTGG CCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGC TAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCAGTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACTGAGTGTGG AACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTCCCG CAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTC AAGCCTGGGCACCCAGACATATA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGA CAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACC TGCCACCTTGTCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAA GCGTGTTCTGTTCACCCAAAGCCTAAAGACACCTGATG ATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCACTGGTACGTG GATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGG AGGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCT GACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTAT AAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCCCCCAATCG AAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAAC CACAGGTCTACGTGCTGCCCCCTAGCCGCGACGAACCTGAC TAAAAATCAGGTCTCTCTGTGTGTCTGGTCAAAGGATTCT ACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGCCA GCCCCGAGAACAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGAC TCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTCGA TAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTCACTGCTCC GTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTCAGAAGT CCCTGTCCCTGTCACCTGGC	71
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	57
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADWAKG	58

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22060	全長	EVQVLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDN SKNTVY LQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPETVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYVLPSSRDELTKNQVSLCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	72
	全長	GAGGTGCAGGTGCTGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCT TTTCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTTGGGTGAGACAGGCC CCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACCTG GAGGCAGCGCCTACTATGCAGACTGGGCAAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTACCTGCGTGGTCGTGGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTC CTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTCTACGTGCTGCCCCCTAGCCGCGACGAAGT ACTAAAAATCAGGTCTCTCTGCTGTGTCTGGTCAAAGGATT	73

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		CTACCCTTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAAAGTAACGGC CAGCCCGAGAACAAATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGG ACTCTGATGGGAGTTTCTTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTC GATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTCAGCTGCT CCGTCATGCACGAAGCACTGCACAACCATTACACTCAGAA GTCCCTGTCCCTGTACCTGGC	
	VH	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADWAKGRSTISRDN SKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	61
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADWAKG	58
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22874	全長	EVQLLES GGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	74

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGTTCCAGC CAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCCTGCGCCGTGAGCGGCTT TTCCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACTCTG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATAACTCTAAGAATACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGACTAAGGGGCCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGCGGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTC CTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTG ACTAAGAACCAGGTCAGTCTGACCTGTCTGGTGAAAGGAT TCTATCCAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGG CCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTG GACTCTGATGGCAGTTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGT CGATAAATCACGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTACAGCTGT TCAGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGA AGAGCCTGAGCCTGTCTCCCGGC	75
	VH	EVQLLESGGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	76
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22875	全長	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWSVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKNTVYLMQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	77
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCTGCGCCGTGAGCGGCT TTTCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACCTG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATACCTCTAAGAACACAGTGTATCTG CAGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACT ATTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTG GCCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCG CTAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCA AGCGTGTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGAT GATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGAC GTGTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAAACCCCG GGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTC CTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAAT CGAAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGA ACCACAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTG ACTAAGAACCAGGTCAGTCTGACCTGTCTGGTGAAAGGAT	78

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TCTATCCCAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGG CCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTG GACTCTGATGGCAGTTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGT CGATAAATCACGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTCAGCTGT TCAGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGA AGAGCCTGAGCCTGTCTCCCGGC	
	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSS	79
	IMGT CDR1	GFSLSSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS A	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSSY	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22876	全長	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKFTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	80

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG CCAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCCTGCGCCGTGAGCGGCT TTCCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACTCTG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATACCTCTAAGTTCACAGTGTATCTGC AGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTA TTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTGG CCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGC TAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCAGTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACTGAGTGTGG AACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCG CAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTC AAGCCTGGGCACCCAGACATATA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGA CAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACC TGCCACCTTGTCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAA GCGTGTTCTGTTCACCC AAGCCTAAAGACACCCTGATG ATTTCCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTC AACTGGTACGTG GATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGG AGGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCT GACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTAT AAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCCCCCAATCG AAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAAC CACAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGAC TAAGAACCAGGTCAGTCTGACCTGTCTGGTGAAAGGATTCT TATCCCAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGCC AGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGA CTCTGATGGCAGTTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGTCG ATAAATCACGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTCAGCTGTTC AGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCTCCCGGC	81
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKFTVYQLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	82
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22877	全長	EVQLLESGGGLFQPGGSLRLSCA VSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKFTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	83
	全長	GAGGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGTTCCAGC CAGGAGGCAGCCTGCGGCTGTCCTGCGCCGTGAGCGGCTT TTCCCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGACAGGCC CCCGCAAGGGACTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAACCTCG GCGGCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTC CACCATCTCTAGAGATACCTCTAAGTTTACAGTGTATCTGC AGATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTA TTGTGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTGG CCATCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGC TAGCACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGC ACTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACAGTGAGTTGG AACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCG CAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGA CAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATACC TGCCCACCTTGTCGGCGGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAA GCGTGTTCCCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATG ATTTCCCGGACTCCTGAGGTACCTGCGTGGTCTGTGGACGT GTCTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GATGGCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCGGG AGGAACAGTACAACCTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCT GACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTAT AAGTGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCGCCCCAATCG AAAAAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAAC CACAGGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGAC TAAGAACCAGGTCACTGTGACCTGTCTGGTGAAAGGATTCT	84

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TATCCCAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGCC AGCCTGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGA CTCTGATGGCAGTTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGTCG ATAAATCACGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTCAGCTGTTT AGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGTCTCCCGGC	
	VH	EVQLLES GGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKFTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	85
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
22878	全長	QQLES GGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPGK GLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKFTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	86

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	CAGCAGCTGCTGGAGAGCGGCGGCGGCTGTTCCAGCCTG GAGGCAGCCTGAGACTGTCCTGCGCCGTGAGCGGCTTTTC CCTGAGCTCCTACGGCGTGTCTGGGTGAGGCAGGCCCCC GGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGAGCCGTGAAGTCTGGCG GCAGCGCCTACTATGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTCCAC CATCTCTAGAGATACTCTAAGTTTACAGTGTATCTGCAGA TGAATAGCCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTACTATTG TGCACGCTCCGGCTCTGGCTACCCCATGGATTATCTGGCCA TCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTGTCTAGCGCTAG CACTAAGGGGCCTTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAGTA AATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGGT GAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACAGTGAGTTGGAAC TCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGCAGT GCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTCA CCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATATCTG CAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGACAAG AAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACCTGCC CACCTTGTCCGGCGCCAGAACTGCTGGGAGGACCAAGCGT GTTCTGTTTCCACCCAAGCCTAAAGACACCCTGATGATTT CCCGGACTCCTGAGGTCACCTGCGTGGTCTGGACGTGTCT CACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATG GCGTCGAAGTGCATAATGCCAAGACC AAACCCCGGGAGG AACAGTACA ACTCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGAC AGTGTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGTATAAG TGTAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCCCGCCCAATCGAAA AAACAATCTCTAAAGCAAAAGGACAGCCTCGCGAACCACA GGTGTACACTCTGCCTCCATCTCGGGACGAGCTGACTAAG AACCAGGTCAGTCTGACCTGTCTGGTGAAAGGATTCTATC CCAGCGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAGCC TGAGAACAATTACAAGACCACACCCCTGTGCTGGACTCT GATGGCAGTTTCTTTCTGTATAGTAAGCTGACCGTCGATAA ATCACGATGGCAGCAGGGGAACGTGTTTCAGCTGTTTCAGTG ATGCACGAAGCCCTGCACAACCATTACACCCAGAAGAGCC TGAGCCTGTCTCCCGGC	87
	VH	QQLLESGGGLFQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGK GLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDTSKFTVYLMNSL RAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	88
	IMGT CDR1	GFSLSSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSSY	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
26434	全長	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSLYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	89
	全長	GAGGTCCAGTTGCTGGAATCAGGAGGTGGACTCGTGCAGC CTGGGGGTTCCCTGCGCTTGCTTGCGCTGTCAGCGGTTTT AGCTTATCTTTATACGGTGTAAAGTTGGGTTTCGGCAGGCTCC TGGCAAAGGTCTGGAATGGATCGGGGCTGTAAACAGCGGG GGGTCCGCCTACTATGCTGATTCTGTAAAGGGGAGGTCCA CCATTAGCAGAGATAATTCCAAGAACACCGTTTATCTCCA GATGAATCCTTGAGGGCGGAGGACACTGCTGTCTATTAT TGTGCGCGGTCAGGCAGCGGATACCCGATGGACTATCTGG CGATCTGGGGCCAGGGAACCCCTTGACAGTCTCTTCCGCT AGCACCAAGGGACCTAGCGTATTTCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGC ACTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGG AACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCG CAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGTG GTCACCGTGCTAGTTC AAGCCTGGGCACCCAGACATATA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATAACAAAAGTCGA CAAGAAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATACC TGCCCACCTTGTCGGCTCCAGAGCTGCTCGGCGGACCATC CGTGTTCCCTGTTTCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGA TTAGCCGCACTCCCGAAGTCACCTGTGTGGTCTGTGGACGT GTCCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGA GAGGAACAGTACAATTC AACCTATAGGGTCGTGAGCGTCC TGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA TAAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCCGCTCCTATC GAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGGGAA CCCCAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGA CCAAAAACCAGGTGTCCCTGACTTGCTGGTGAAGGGCTT	90

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGG CAGCCAGAAAACAATTACAAAACAACCTCCACCCGTGCTGG ACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCCAACTGACTGTG GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGCTTTCAGCTGTT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAA GTCTCTGAGTCTGTCACCCGGC	
	VH	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAVSGFSLSLYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSS	91
	IMGT CDR1	GFSLSLYG	92
	IMGT CDR2	VNSGGS A	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSLY	93
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	LYGVS	94
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SLYGVS	95
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSLYGVS	96
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
26443	全長	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAVSGFSLSLYGVS WVRQAPG KGLEWIGSLNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	97

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTTTCAGTTGCTTGAGTCTGGAGGTGGGTTGGTACAAC CAGGTGGATCTCTCCGCCTTTCTTGTGCAGTCTCAGGCTTC TCTCTCAGCCTGTACGGCGTGTCAATGGGTTAGACAAGCTCC GGGTAAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGTCTTAATAGTGGG GGAAGCGCCTACTATGCAGATAGCGTAAAAGGAAGATCA ACTATATCCAGAGACAATTCTAAGAATACCGTCTACTTGC AGATGAACCTCTCTGCGGGCAGAGGATACTGCGGTTTACTA TTGTGCGCGAAGCGGTAGTGGATACCCTATGGATTATCTTG CTATTTGGGGTCAAGGTACCCTCGTAACGGTCTCTAGTGTCT AGCACCAAGGGACCTAGCGTATTTCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCCTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACTGAGTGGTGG AACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCG CAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTC AAGCCTGGGCACCCAGACATATA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGA CAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACC TGCCACCTTGTCGGCTCCAGAGCTGCTCGGCGGACCATC CGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGA TTAGCCGCACTCCC GAAGTCACTGTGTGGTCTGGACGT GTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGA GAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTCTGTGAGCGTCC TGACAGTGTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA TAAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCCTCCTATC GAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGGGAA CCCCAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGA CCAAAACCAGGTGTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGCTT TTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGG CAGCCAGAAAACAATTACAAAACAACCTCCACCCGTGCTGG ACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCCAACTGACTGTG GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTCAGCTGTT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACCCAGAA GTCTCTGAGTCTGTACCCGGC	98
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSLYGVS WVRQAPG KGLEWIGSLNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVY LQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	99
	IMGT CDR1	GFSLSLYG	92
	IMGT CDR2	LNSGGS	100
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSLY	93
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	LYGVS	94
	Kabat CDR2	SLNSGGSAYYADSVKG	101

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SLYGVS	95
	Contact CDR2	WIGSLNSGGSAY	102
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSLYGVS	96
	AbM CDR2	SLNSGGSAY	103
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
26445	全長	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSLYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYHPIWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	104
	全長	GAGGTCCAGCTCTTGGAGTCAGGAGGCGGCCTGGTTCAGC CGGGGGGTTCACCTCAGACTTAGTTGTGCGGTAAGCGGGTT CAGCCTTAGTCTGTATGGCGTATCATGGGTCCGGCAAGCG CCTGGTAAGGGCCTGGAGTGGATAGGTGCTGTCAATAGCG GTGGCTCCGCATACTACGCGGACTCTTTTAAGGGCAGATC CACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACTGTATATCTT CAGATGAACTCACTCAGGGCGGAGGATACTGCGGTATACT ACTGTGCACGAAGTGGTAGTGGTTACCCAATGGATTACCA TCCCATTGTTGGGGCAAGGGACACTCGTTACAGTGAGTAGT GCTAGCACCAAGGGACCTAGCGTATTTCCACTGGCTCCCTC TAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGT CTGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTT GGAAGTCAAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCC CGCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCCTCTG TGGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATA TATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTC GACAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCAT ACCTGCCCACCTTGTCGGCTCCAGAGCTGCTCGGCGGAC CATCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAAGATACACTG ATGATTAGCCGCACTCCCAGAGTCACCTGTGTGGTCGTGG ACGTGTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCA AGAGAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTCGTGAGCG TCCTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGA GTATAAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCCGCTCCT ATCGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGG GAACCCAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGC TGACCAAAAACCAGGTGTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGG	105

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		CTTTTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATG GGCAGCCAGAAAAACAATTACAAAACAACTCCACCCGTGCT GGACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCCAAACTGACTG TGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTCAGCTG TTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAG AAGTCTCTGAGTCTGTACCCGGC	
	VH	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAVSGFSLSLYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYHPIWGQGLVTVSS	106
	IMGT CDR1	GFSLSLYG	92
	IMGT CDR2	VNSGGS A	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYHPI	107
	Chothia CDR1	GFSLSLY	93
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYHPI	108
	Kabat CDR1	LYGVS	94
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYHPI	108
	Contact CDR1	SLYGVS	95
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYHP	110
	AbM CDR1	GFSLSLYGVS	96
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYHPI	108
26446	全長	EVQLLES GGGLVQPGSLRLSCAVSGFSLSLYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	111

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAGGTACAGCTTCTGGAAAGTGGTGGCGGTCTTGTCCAGC CTGGAGGAAGTCTCAGGTTGTCATGTGCAGTCTCTGGTTTT TCCCTCTCATTGTACGGCGTGAGTTGGGTTAGACAAGCGCC AGGTAAGGGGTTGGAGTGGATCGGGGCGGTCAATTCCGGC GGTTCTGCCTATTACGCCGACTCATTCAAAGGCCGCTCCAC GATTAGTCGAGATAATTCCAAAAATACTGTGTATCTCCAA ATGAATAGTCTCCGCGCGGAGGACACAGCTGTTTATTATT GTGCCCCGTCCGGAAGTGGCTATCCAATGGACTATCTCGC CATCTGGGGTCAGGGCACGTTGGTAACGGTGTCTCCGCT AGCACCAAGGGACCTAGCGTATTTCCACTGGCTCCCTCTA GTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCCTGGGATGTCT GGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCAAGTGAGTTGG AACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTCCCG CAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTG GTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATA TCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGA CAAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACC TGCCACCTTGTCGGGCTCCAGAGCTGCTCGGCGGACCATC CGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGA TTAGCCGCACTCCCGAAGTCACCTGTGTGGTCTGTGGACGT GTCCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGA GAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTCTGTGAGCGTCC TGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA TAAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCCTCCTATC GAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGGGAA CCCCAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGA CCAAAACCAGGTGTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGCTT TTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGG CAGCCAGAAAACAATTACAAAACAACCTCCACCCGTGCTGG ACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCCAACTGACTGTG GACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTCAGCTGTT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACCCAGAA GTCTCTGAGTCTGTCACCCGGC	112
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSLYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDNKNTVYLMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	113
	IMGT CDR1	GFSLSLYG	92
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSLY	93
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	LYGVS	94
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SLYGVS	95
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSLYGVS	96
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
26447	全長	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWSVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYHPIWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	114
	全長	GAGGTGCAACTGTTGGAATCCGGAGGTGGTTTGGTGCAGC CTGGCGGTAGTCTGCGGCTTAGTTGCGCTGTTTCAGGCTTT TCTCTCTCATCATACGGGGTATCATGGGTGAGACAGGCAC CAGGAAAGGGTCTTGAATGGATTGGGGCCGTAAATTCCGG AGGTAGTGCATACTATGCTGACTCATTCAAGGGCAGGTCC ACCATTAGTCGAGATAACTCAAAGAACACGGTTTATCTGC AGATGAATAGCCTTAGAGCGGAGGACACGGCAGTATATTA TTGCGCGAGAAGCGGGTCTGGATATCCGATGGACTACCAT CCAATCTGGGGCCAGGGAACACTCGTAACGGTGAGCAGCG CTAGCACCAAGGGACCTAGCGTATTTCCACTGGCTCCCTCT AGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTC TGGTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAAGTCACAGTGAGTTG GAACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCC GCAGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCCTCTGT GGTCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATAT ATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCG ACAAGAAAGTGGAGCCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATAC CTGCCCACCTTGTCGGCTCCAGAGCTGCTCGGCGGACCAT CCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATG ATTAGCCGCACTCCCGAAGTCACCTGTGTGGTCTGTGGACG TGTCACGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAG AGAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTCGTGAGCGTC CTGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGT ATAAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCGCTCCTAT CGAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGGGA ACCCAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTG ACCAAAAACCAGGTGTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGCT	115

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TTTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGG GCAGCCAGAAAACAATTACAAAACAACCTCCACCCGTGCTG GACAGCGATGGGTCCTTCTTTCTGTATTCCAAACTGACTGT GGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAACGTCTTCAGCTGT TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGA AGTCTCTGAGTCTGTACCCGGC	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSQVVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDNSTNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYHPIWGQGTLVTVSS	116
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYHPI	107
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYHPI	108
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYHPI	108
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYHP	110
	AbM CDR1	GFSLSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYHPI	108
26448	全長	DYQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSIGDWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRWHILNIFGGGKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	117
	全長	GACTATCAAATGACGCAGTCCCCGTCCTCCGTTTCCGCCTC AGTTGGTGACCGGGTTACAATCACTTGCAGAGCATCTCAG TCTATTGGTGATTGGCTGGCGTGGTATCAACAGAAGCCCG GCAAAGCCCCTAACTCCTGATATACGAAGCATCAACGCT TGCTTCTGGAGTACCCTCCCGGTTTTCTGGGTCAGGAAGCG GCACGGATTTTACCCTGACTATCTTCTGTTTCAGCCTGAG GATGCCGCAACCTATTATTGCCAACAGGGGTATGGCAGAT GGCATATCCTAAATATTTTCGGTGGCGGGACCAAAGTTGA GGTTAAACGTACGGTAGCAGCTCCCAGCGTATTTATTTTC CCCCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGGACAGCCAGTGT GGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGAGGCTAAA GTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGGAAATT	118

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		CTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCAC CTATTCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCCGAC TACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCACC AGGGGCTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAGAGG GGAGTGC	
	VL	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQSIGDWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRWHILNIFGGGKVEVK	119
	IMGT CDR1	QSIGDW	40
	IMGT CDR2	EAS	41
	IMGT CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Chothia CDR1	RASQSIGDWLA	65
	Chothia CDR2	EASTLAS	44
	Chothia CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Kabat CDR1	RASQSIGDWLA	65
	Kabat CDR2	EASTLAS	44
	Kabat CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Contact CDR1	GDWLAWY	45
	Contact CDR2	LLIYEASTLA	46
	Contact CDR3	QQGYGRWHILN	121
	AbM CDR1	RASQSIGDWLA	65
	AbM CDR2	EASTLAS	44
	AbM CDR3	QQGYGRWHILNI	120
26449	全長	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQSIWYWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRSNVDNIFGGGKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	122
	全長	GACTATCAAATGACGCAGTCCCCGTCCTCCGTTTCCGCCTC AGTTGGTGACCGGGTTACAATCACTTGCAGAGCATCTCAG TCTATTTGGTATTGGCTGGCGTGGTATCAACAGAAGCCCG GCAAAGCCCCTAACTCCTGATATACGAAGCATCAACGCT TGCTTCTGGAGTACCCTCCCGGTTTCTGGGTCAGGAAGCG GCACGGATTTTACCCTGACTATCTTCTGTTCAGCCTGAG GATGCCGCAACCTATTATTGCCAACAGGGGTATGGCAGAT CAAACGTGGATAATATTTTCGGTGGCGGGACCAAAGTTGA GGTTAAACGTACGGTAGCAGCTCCCAGCGTATTTATTTTC CCCCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGGACAGCCAGTGT GGTCTGTCTGCTGAACAACTTCTACCCTAGAGAGGCTAAA GTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGGAAT	123

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		CTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAGCAC CTATTCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCCGAC TACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCACC AGGGGCTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAGAGG GGAGTGC	
	VL	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQSIWYWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRSNVDNIFGGGTKVEVK	124
	IMGT CDR1	QSIWYW	125
	IMGT CDR2	EAS	41
	IMGT CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Chothia CDR1	RASQSIWYWLA	126
	Chothia CDR2	EASTLAS	44
	Chothia CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Kabat CDR1	RASQSIWYWLA	126
	Kabat CDR2	EASTLAS	44
	Kabat CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Contact CDR1	WYWLAWY	127
	Contact CDR2	LLIYEASTLA	46
	Contact CDR3	QQGYGRSNVDN	47
	AbM CDR1	RASQSIWYWLA	126
	AbM CDR2	EASTLAS	44
	AbM CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
26450	全長	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQSIWYWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRWHILNIFGGGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	128
	全長	GATTATCAGATGACACAGAGTCCTTCCTCAGTCAGCGCAT CTGTGGGAGATCGGGTTACAATTACCTGCCGAGCATCTCA ATCAATCTGGTATTGGCTGGCCTGGTACCAGCAAAAACCA GGAAAAGCACCTAAACTGTTGATTTATGAGGCCAGCACTC TTGCTAGTGGGGTCCCAAGTAGGTTCAGCGGCAGCGGTTTC AGGGACGGATTTTACCTTGACCATAAGTTCCGTTCAGCCA GAAGACGCGGCGACCTATTATTGCCAACAAGGGTACGGTA GATGGCACATTTTGAACATATTCGGTGGAGGTACTAAGGT CGAGGTGAAGCGTACGGTAGCAGCTCCCAGCGTATTTATT TTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGGACAGCCA GTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGAGGCT AAAGTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGGAA	129

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		ATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATAG CACCTATTCCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCC GACTACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCC ACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAG AGGGGAGTGC	
	VL	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQSIWYWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRWHILNIFGGGKVEVK	130
	IMGT CDR1	QSIWYW	125
	IMGT CDR2	EAS	41
	IMGT CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Chothia CDR1	RASQSIWYWLA	126
	Chothia CDR2	EASTLAS	44
	Chothia CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Kabat CDR1	RASQSIWYWLA	126
	Kabat CDR2	EASTLAS	44
	Kabat CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Contact CDR1	WYWLAWY	127
	Contact CDR2	LLIYEASTLA	46
	Contact CDR3	QQGYGRWHILN	121
	AbM CDR1	RASQSIWYWLA	126
	AbM CDR2	EASTLAS	44
	AbM CDR3	QQGYGRWHILNI	120
27272	全長	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	131

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	全長	GAAGTGCAGCTCCTGGAGAGTGGAGGCGGCCTAGTCCAAC CCGGTGGATCTCTGAGGCTCTCCTGTGCTGTTAGTGGTTTT TCACTCTCTTCCTATGGAGTCAGCTGGGTTAGACAGGCACC CGGCAAGGGCTTGGAGTGGATCGGCGCTGTTAATTCCGGC GGTTCCGCCTACTATGCTGACTCTTTCAAAGGAAGAAGTA CTATTTCCCGCGACAACCTCTAAGAACACAGTGTATCTCCAA ATGAACTCCCTGCGTGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACT GCGCCCGGAGCGGCTCTGGCTATCCAATGGATTACCTGGC CATCTGGGGCCAAGGTACCCTGGTGACAGTCTCAAGCGCT AGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTC CAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGA ACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGC CGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACACAT GCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCC AAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGACGAGCTGA CCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT CCGTGATGCATGAGGCTCTGCAACAACCTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA	132
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSFKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVT VSS	133
	IMGT CDR1	GFSLSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSYG	23
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
27273	全長	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSLYGVSWVRQAPG KGLEWIGSVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLLTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	134
	全長	GAGGTTTCAGCTTCTCGAGTCTGGCGGTGGCCTGGTTCAACC TGGTGGTAGTCTCCGACTGAGCTGTGCTGTTTCGGGCTTCA GCCTGAGCCTTTACGGCGTGTCTGGGTCAGGCAGGCTCC AGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTCCGTGAACAGCGGT GGAAGTGCTACTATGCTGATTCTGTGAAGGGCCGAAGCA CGATTTCTCGCGATAACAGCAAGAATACTGTGTATTTGCA AATGAACCTCTGCGTGCCGAGGATACCGCTGTGTACTACT GCGCTCGATCGGGGTCCGGTTACCCTATGGATTACCTGGCC ATCTGGGGTCAGGGTACCCTTGTTACTGTATCCTCTGCTAG CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCCG TCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA AGAAGGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATG CCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGACGAGCTGAC CAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC	135

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		TATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGCAA	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSLYGVSWVRQAPG KGLEWIGSVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LVTVSS	136
	IMGT CDR1	GFSLSLYG	92
	IMGT CDR2	VNSGGS	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSLY	93
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	LYGVS	94
	Kabat CDR2	SVNSGGSAYYADSVKG	137
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SLYGV	95
	Contact CDR2	WIGSVNSGGSAY	138
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSLYGV	96
	AbM CDR2	SVNSGGSAY	139
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
27274	全長	DYQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSIWYWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRWHILNIFGGGKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	140
	全長	GACTACCAGATGACCCAGAGCCCAAGTTCAGTATCGGCCT CCGTTGGTGACAGAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAGCCA ATCCATCTGGTACTGGCTGGCCTGGTATCAACAAAAGCCG GGCAAAGCACCCAAGCTCCTCATCTACGAGGCTAGCACAC TGGCCTCCGGCGTTCCTTCGCGATTCA GTGGTTCCGGGTCT GGAACAGACTTCACTTTGACCATTTCTTCTGTGCAACCCGA GGATGCTGCAACATATTACTGCCAACAAGGCTATGGCCGG TGGCACATTCTGAACATCTTTGGCGCGGGA ACTAAGGTTG AAGTCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGT TGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAA GTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACT	141

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		CCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCA CCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG GAGAGTGT	
	VL	DYQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQSIWYWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISVQPEDAAT YYCQQGYGRWHILNIFGGGTKVEVK	130
	IMGT CDR1	QSIWYW	125
	IMGT CDR2	EAS	41
	IMGT CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Chothia CDR1	RASQSIWYWLA	126
	Chothia CDR2	EASTLAS	44
	Chothia CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Kabat CDR1	RASQSIWYWLA	126
	Kabat CDR2	EASTLAS	44
	Kabat CDR3	QQGYGRWHILNI	120
	Contact CDR1	WYWLAWY	127
	Contact CDR2	LLIYEASTLA	46
	Contact CDR3	QQGYGRWHILN	121
	AbM CDR1	RASQSIWYWLA	126
	AbM CDR2	EASTLAS	44
	AbM CDR3	QQGYGRWHILNI	120
27275	全長	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	142
	全長 + C 末端 Lys	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGT LTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK	157

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
		PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
	全長	GAGGTCCAGTTGCTGGAATCAGGAGGTGGACTCGTGCAGC CTGGGGGTTCCCTGCGCTTGTCTTGCCTGTCAGCGGTTTT AGCTTATCTTCATACGGGTGTAAGTTGGGTTTCGGCAGGCTCC TGGCAAAGGTCTGGAATGGATCGGGGCTGTAAACAGCGGG GGGTCCGCCTACTATGCTGATTCTGTAAAGGGGAGGTCCA CCATTAGCAGAGATAATTCCAAGAACACCGTTTATCTCCA GATGAACCTCTTGAGGGCGGAGGACACTGCTGTCTATTAT TGTGCGCGGTCAGGCAGCGGATACCCGATGGACTATCTGG CGATCTGGGGCCAGGGAACCCCTGTGACAGTCTCTTCCGCT AGCACTAAGGGGCCCTCCGTGTTTCCACTGGCTCCCTCTAG TAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCAGTGGGATGTCTG GTGAAGGATTACTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGGA ACTCAGGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTTTCCCGC AGTGCTGCAGTCAAGCGGACTGTACTCCCTGTCTCTGTGG TCACCGTGCCTAGTTCAAGCCTGGGCACCCAGACATATAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAAGTCGAC AAGAAAGTGGAGCCCAAGAGCTGTGATAAACTCATACCT GCCACCTTGTCCGGCTCCAGAGCTGCTCGGCGGACCATC CGTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAAGATACACTGATGA TTAGCCGCACTCCCGAAGTCACCTGTGTGGTCTGTGGACGT GTCCACAGAGGACCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTCGAGGTGCATAATGCCAAGACTAAACCAAGA GAGGAACAGTACAATTCAACCTATAGGGTCTGTGAGCGTCC TGACAGTGCTGCATCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTA TAAGTGCAAAGTGTCTAACAAGGCCCTGCCCCGCTCCTATC GAGAAGACTATTAGCAAGGCAAAAGGGCAGCCACGGGAA CCCCAGGTCTACACTCTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGA CCAAAAACCAGGTGTCCCTGACTTGTCTGGTGAAGGGCTT TTATCCTAGTGATATCGCTGTGGAGTGGGAATCAAATGGG CAGCCAGAAAACAATTACAAAACAACCTCCACCCGTGCTGG ACAGCGATGGGTCTTCTTTCTGTATTCCAAACTGACTGTG GACAAAGTCCAGATGGCAGCAGGGAAACGTCTTCAGCTGTT CCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCATTACACCCAGAA GTCTCTGAGTCTGTACCCCGGC	143
	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVS WVRQAPG KGLEWIGAVNSGGSAYYADSVKGRSTISRDN SKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGQGTLVTVSS	50
	IMGT CDR1	GFSLSSYG	20
	IMGT CDR2	VNSGGS A	21
	IMGT CDR3	ARSGSGYPMDYLAI	22
	Chothia CDR1	GFSLSSY	23

10

20

30

40

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Chothia CDR2	NSGGS	24
	Chothia CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Kabat CDR1	SYGVS	26
	Kabat CDR2	AVNSGGSAYYADSVKG	51
	Kabat CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
	Contact CDR1	SSYGVS	28
	Contact CDR2	WIGAVNSGGSAY	29
	Contact CDR3	ARSGSGYPMDYLA	30
	AbM CDR1	GFSLSYGVS	31
	AbM CDR2	AVNSGGSAY	32
	AbM CDR3	SGSGYPMDYLAI	25
27276	全長	DYQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSIGDWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDAAT YYCQQGYGRSNVDNIFGGGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	144
	全長	GACTATCAAATGACGCAGTCCCCGTCCTCCGTTTCCGCCTC AGTTGGTGACCGGGTTACAATCACTTGCAGAGCATCTCAG TCTATTGGTGATTGGCTGGCGTGGTATCAACAGAAGCCCG GCAAAGCCCCCTAAACTCCTGATATACGAAGCATCAACGCT TGCTTCTGGAGTACCCTCCCGGTTTTCTGGGTCAGGAAGCG GCACGGATTTTACCCTGACTATCTCTTCTGTTCAGCCTGAG GATGCCGCAACCTATTATTGCCAACAGGGGTATGGCAGAT CAAACGTGGATAATATTTTCGGTGGCGGGACCAAAGTTGA GGTTAAACGTACGGTGGCGGCGCCAGTGTCTTCATTTTTTC CCCCTAGCGACGAACAGCTGAAGTCTGGGACAGCCAGTGT GGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGAGGCTAAA GTGCAGTGGAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGGAATTT CTCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAGATAGCAC CTATCCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCCGAC TACGAGAAGCATAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCACC AGGGGCTGAGTTCACCAGTCACAAAATCATTCAACAGAGG GGAGTGC	145
	VL	DYQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQSIGDWLAWYQQKPG KAPKLLIYEASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSVQPEDAAT YYCQQGYGRSNVDNIFGGGTKVEVK	64
	IMGT CDR1	QSIGDW	40
	IMGT CDR2	EAS	41
	IMGT CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Chothia CDR1	RASQSIGDWLA	65
	Chothia CDR2	EASTLAS	44
	Chothia CDR3	QQGYGRSNVDNI	42

10

20

30

40

50

クローン ID	領域	配列	配列 番号
	Kabat CDR1	RASQSIGDWLA	65
	Kabat CDR2	EASTLAS	44
	Kabat CDR3	QQGYGRSNVDNI	42
	Contact CDR1	GDWLAWY	45
	Contact CDR2	LLIYEASTLA	46
	Contact CDR3	QQGYGRSNVDN	47
	AbM CDR1	RASQSIGDWLA	65
	AbM CDR2	EASTLAS	44
	AbM CDR3	QQGYGRSNVDNI	42

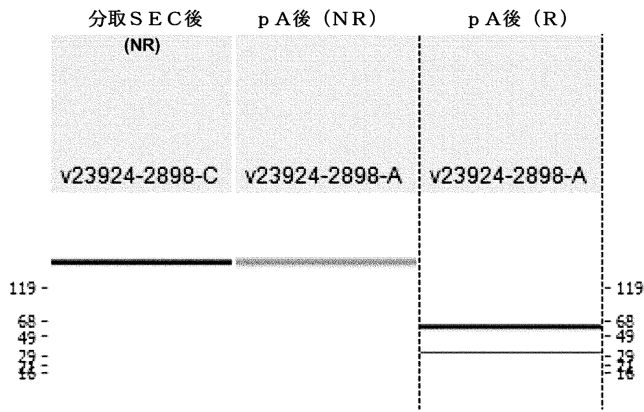
【図面】

【図 1 A】

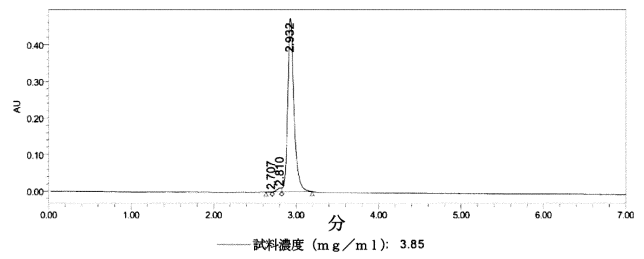
【図 1 B】

1 A 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSLSSYGV S WVRQAPGKGLEWVS AVNSGGSAY YADSVKGRFTISRDNKNTLLYLQMNSLRRAEDTAVYYCAK SGSGYPMDYLA I WGQGTLTIVTSS	10
1 B 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQSIGDWLA WYQQKPGKAPKLLIY EASTLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPQPEDFATYYC QQGYGRSNVDNI FGGGTKVEIK	20
		30
		40
		50

【図 2 A】

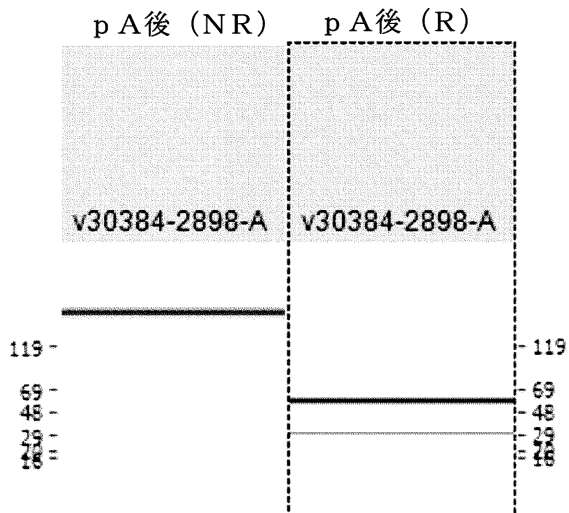


【図 2 B】

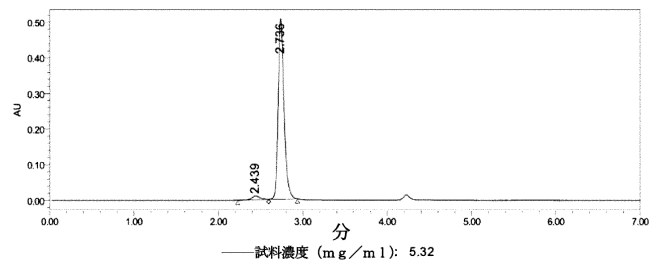


10

【図 2 C】



【図 2 D】



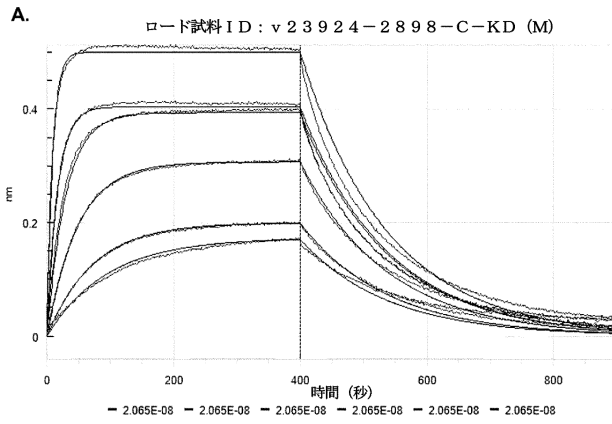
20

30

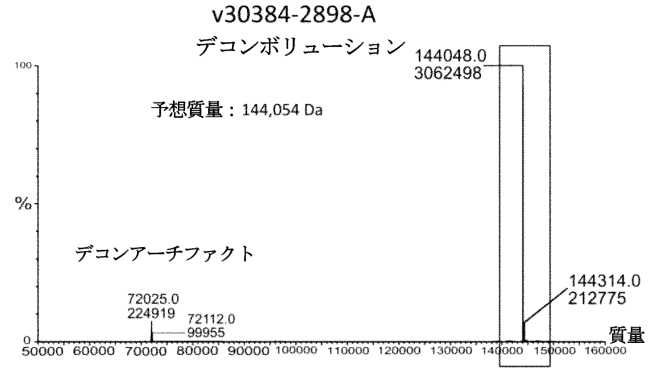
40

50

【図 3】



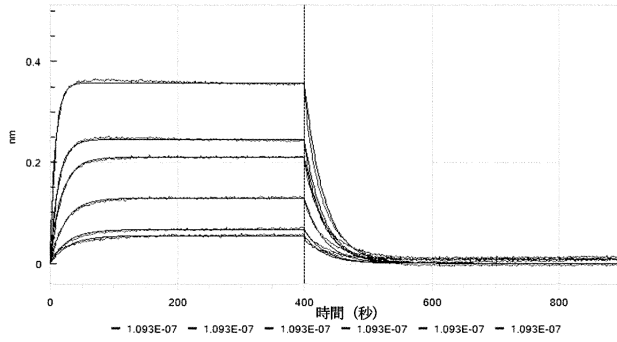
【図 4 A】



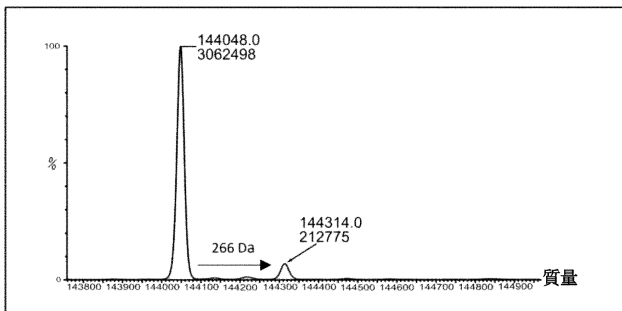
10

20

B. ロード試料 ID : v 3 0 3 8 4 - 3 0 1 2 - C - K D (M)



【図 4 B】



【図 4 C】

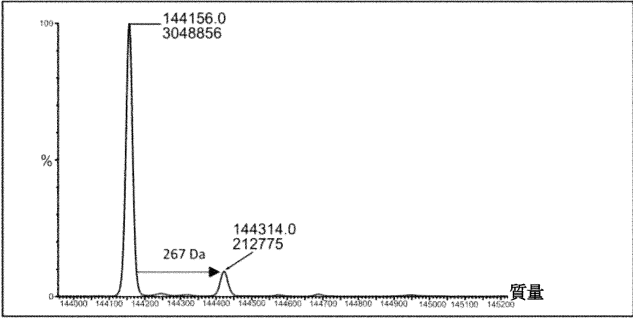


30

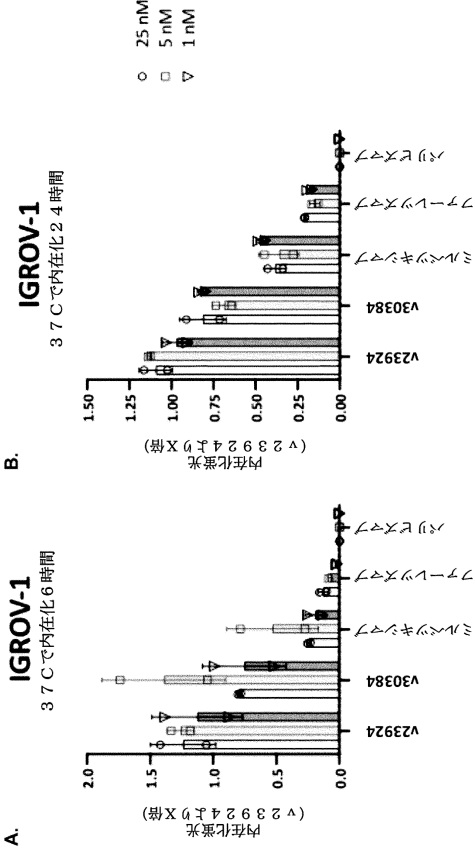
40

50

【図 4 D】



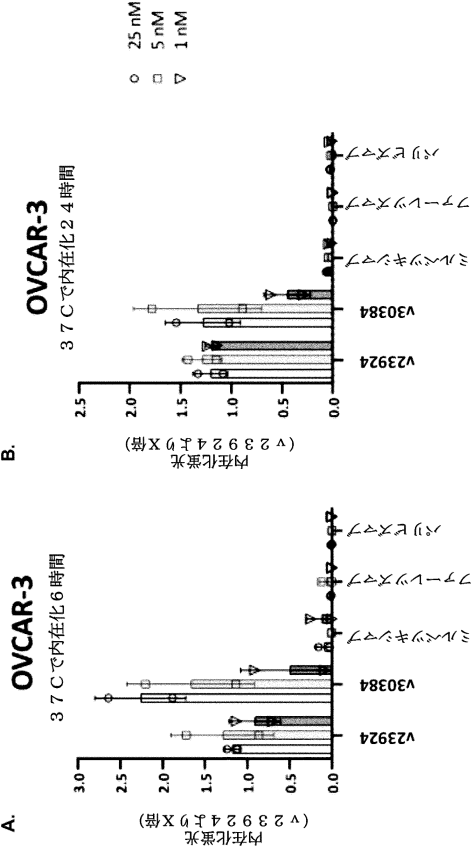
【図 5】



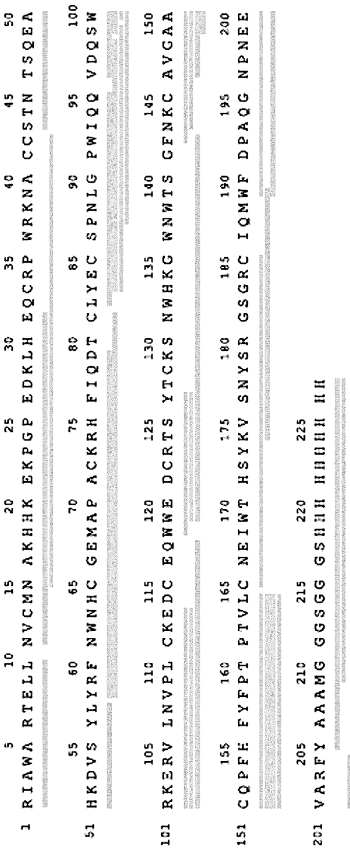
10

20

【図 6】



【図 7】

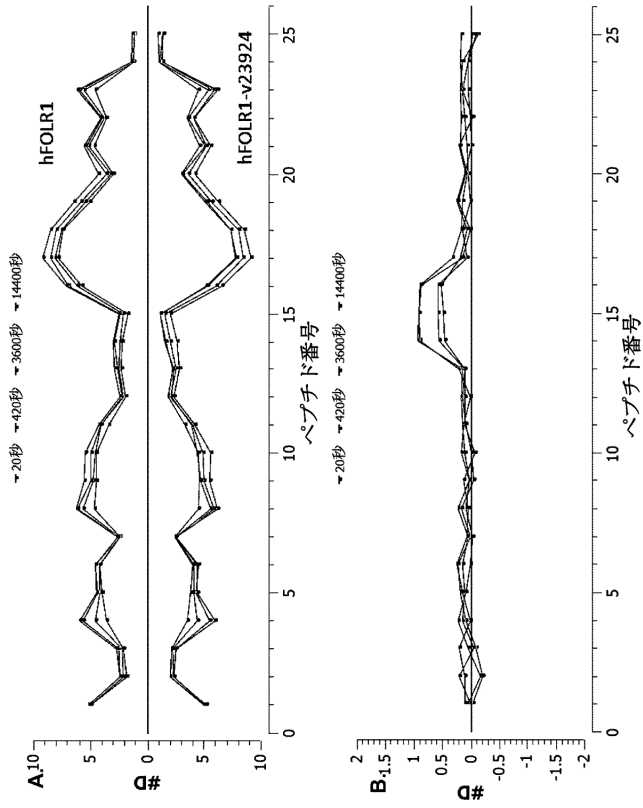


30

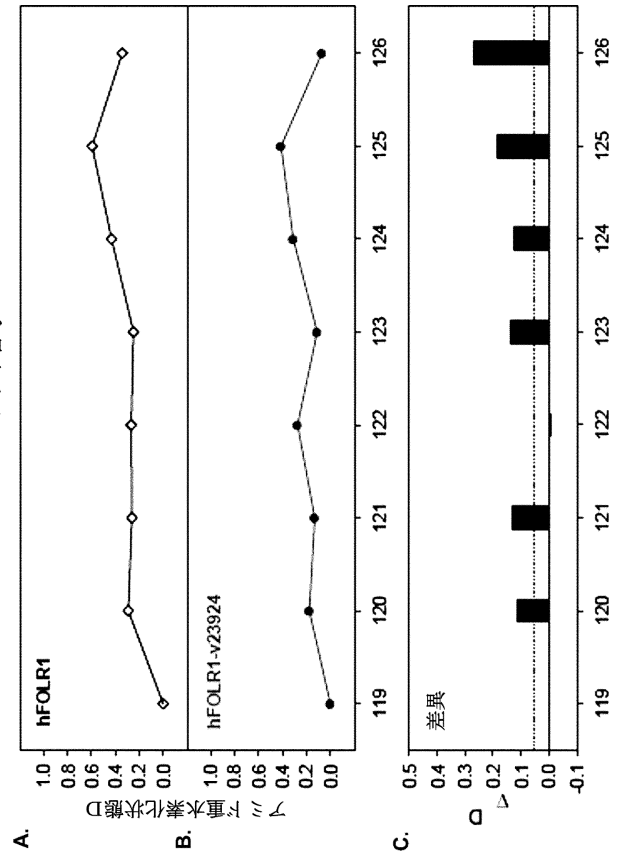
40

50

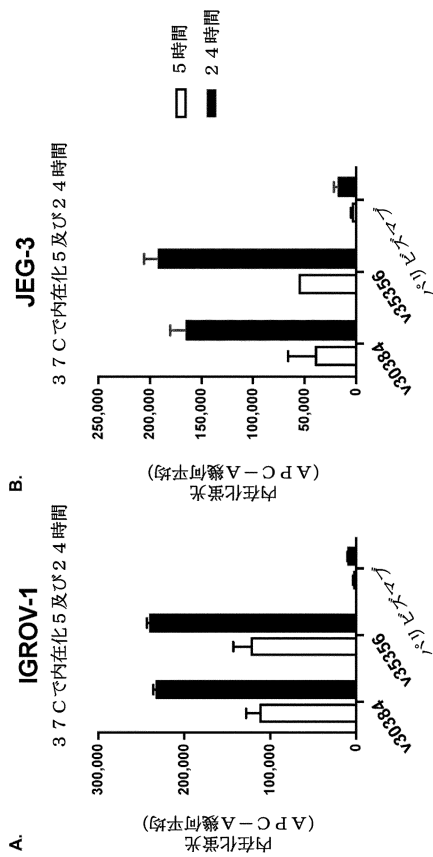
【図 8】



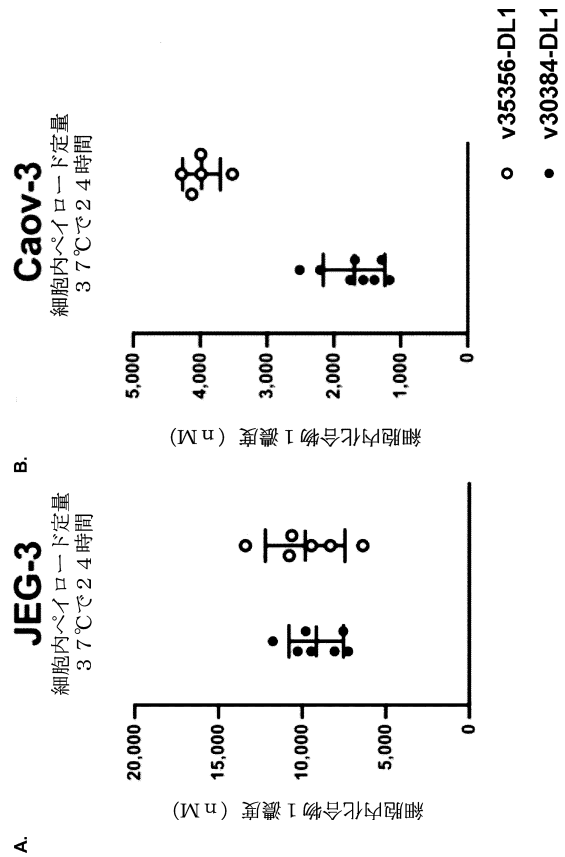
【図 9】



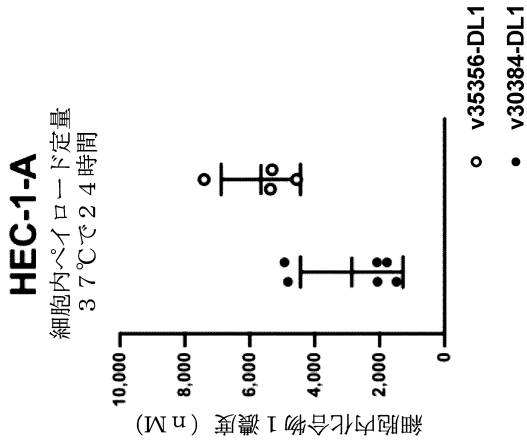
【図 10】



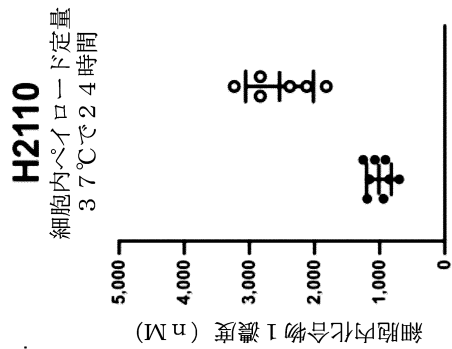
【図 11-1】



【図 1 1 - 2】

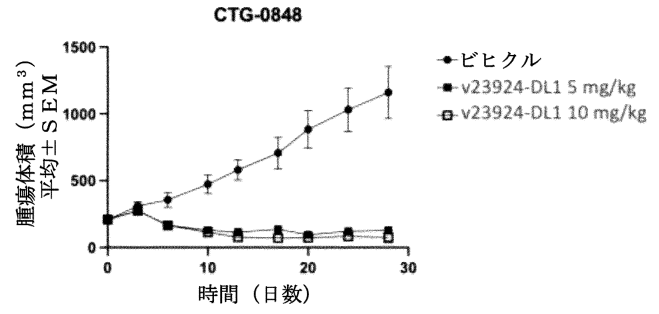


D.



C.

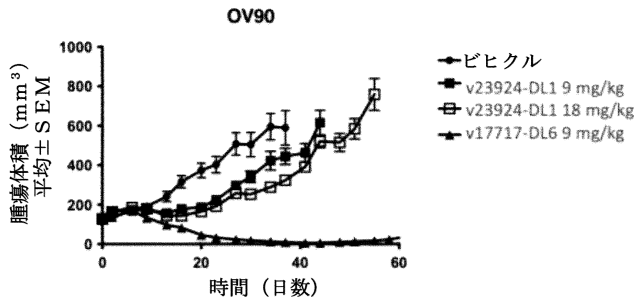
【図 1 2 A】



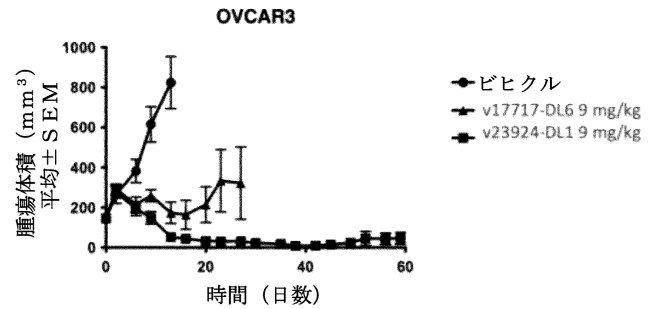
10

20

【図 1 2 B】



【図 1 2 C】

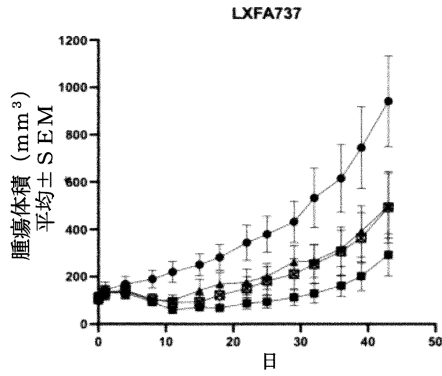


30

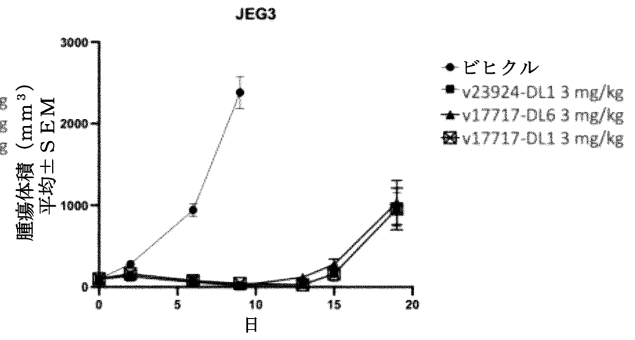
40

50

【図 1 2 D】

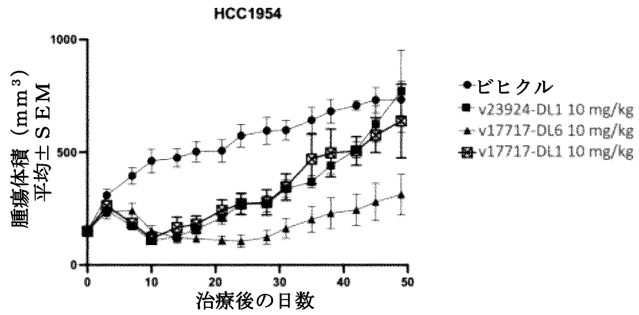


【図 1 2 E】

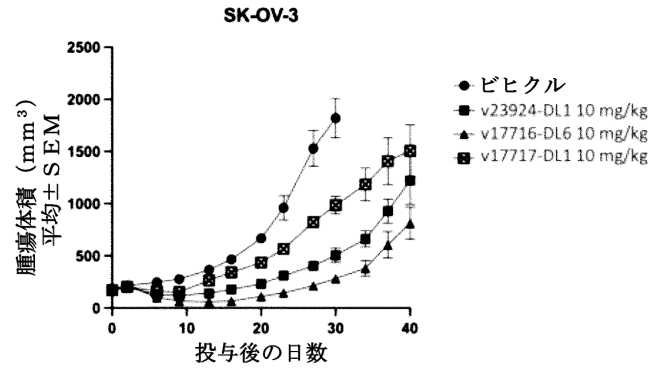


10

【図 1 2 F】



【図 1 2 G】



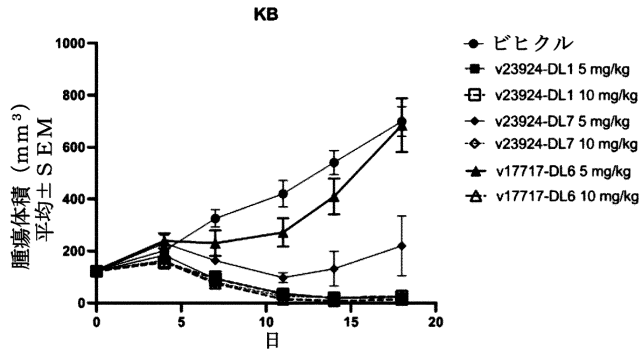
20

30

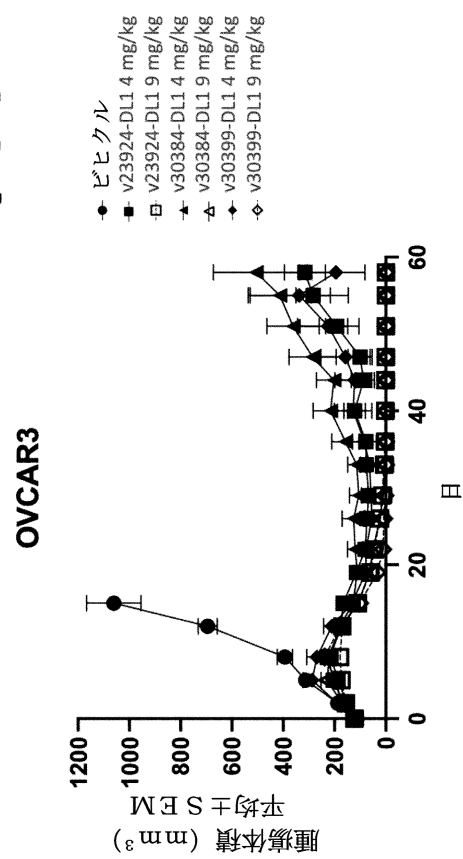
40

50

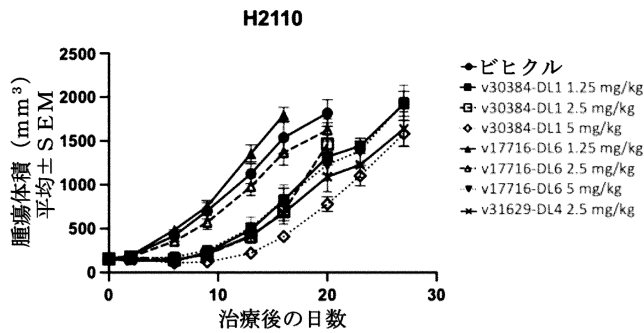
【図 1 2 H】



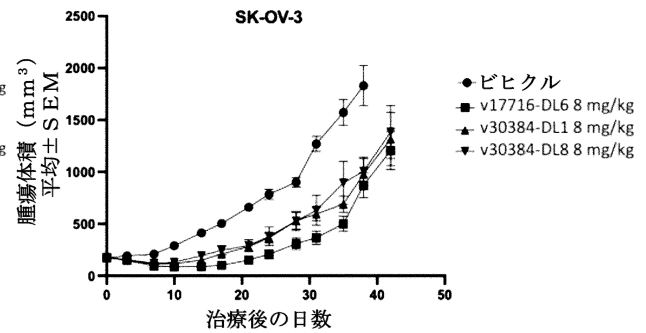
【図 1 3】



【図 1 4 A】



【図 1 4 B】



10

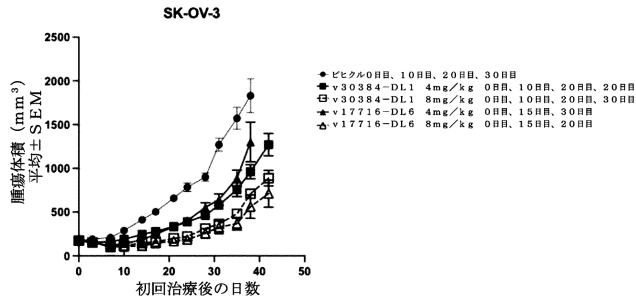
20

30

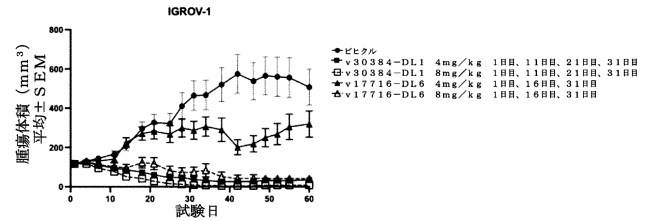
40

50

【図 1 4 C】

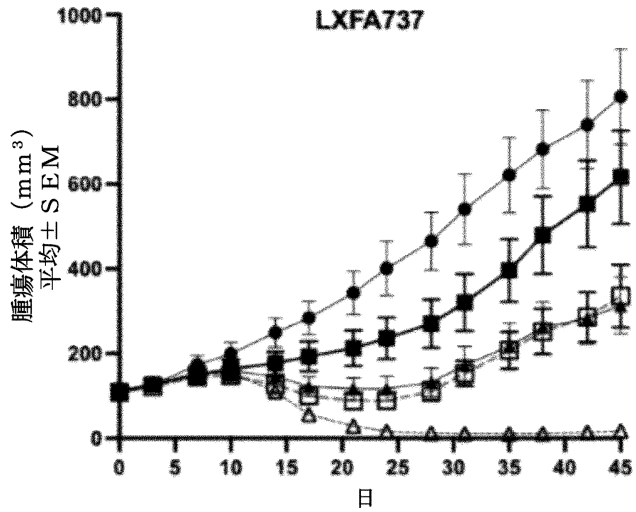


【図 1 4 D】

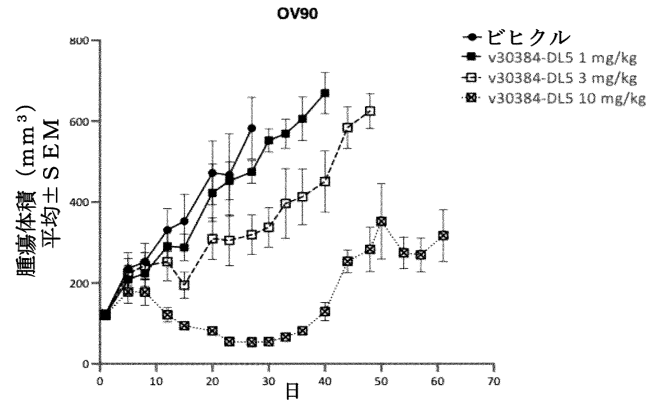


10

【図 1 4 E】



【図 1 5 A】



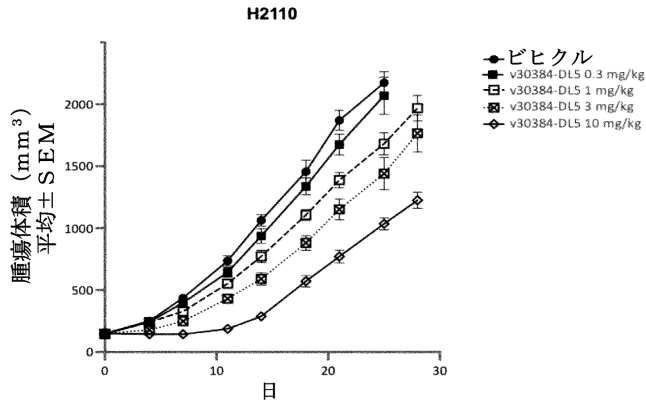
20

30

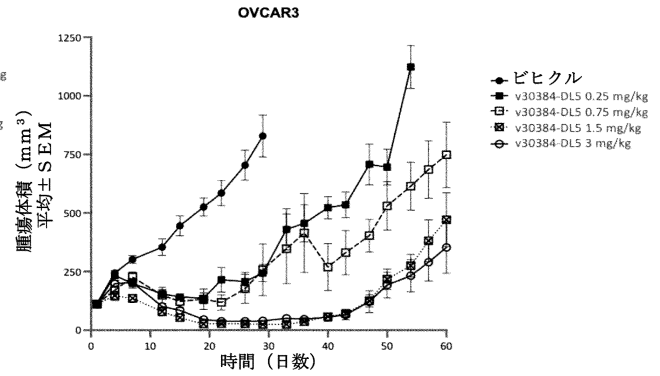
40

50

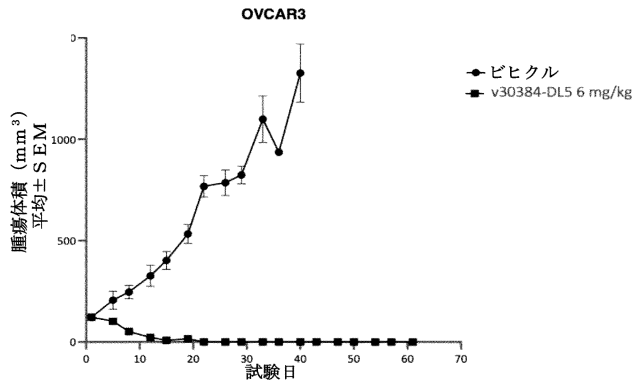
【図 15 B】



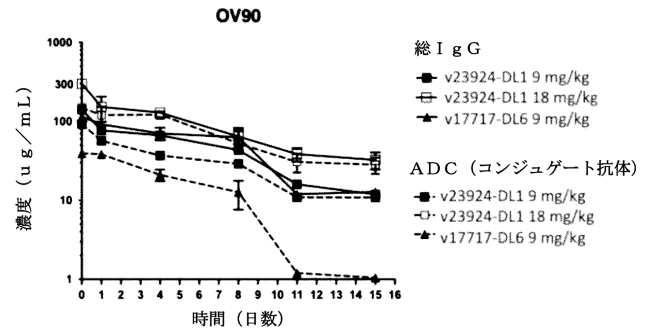
【図 15 C】



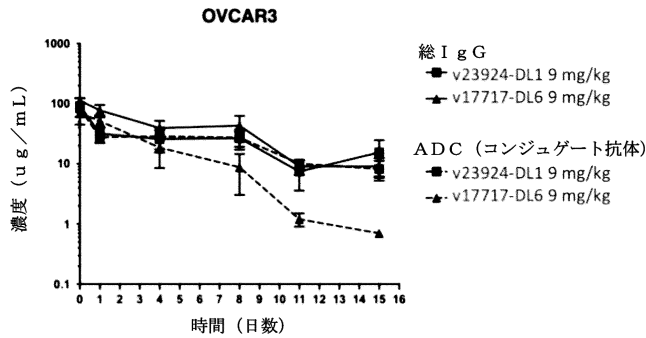
【図 15 D】



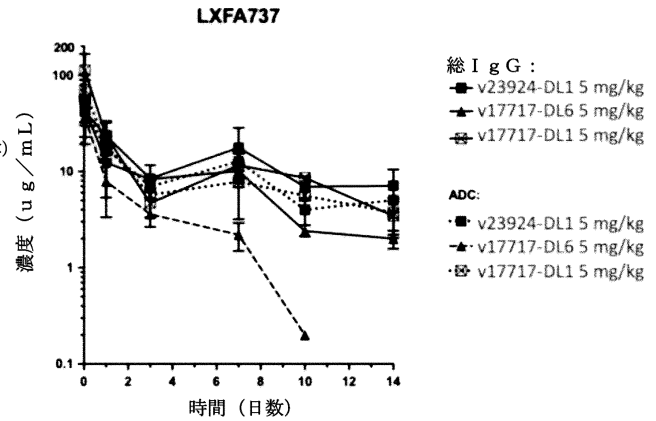
【図 16 A】



【図 16 B】



【図 16 C】



10

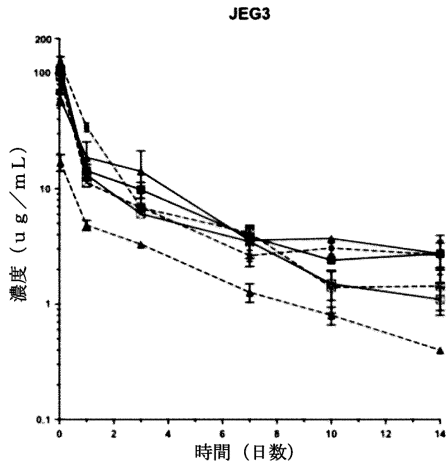
20

30

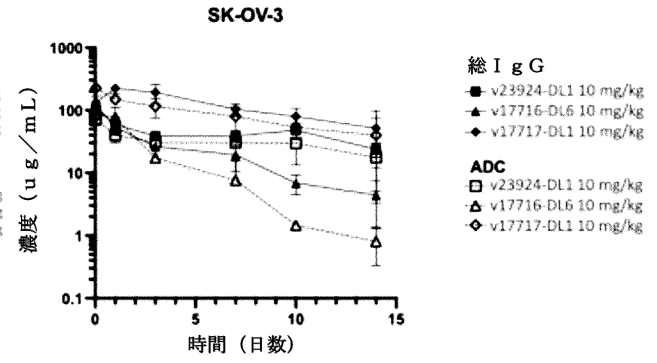
40

50

【図 1 6 D】

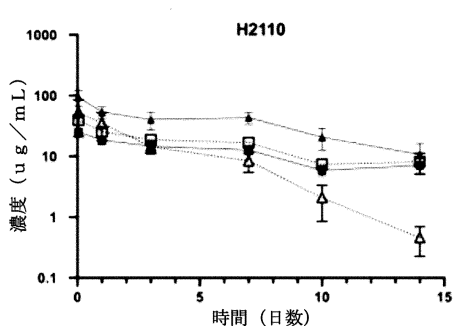


【図 1 6 E】

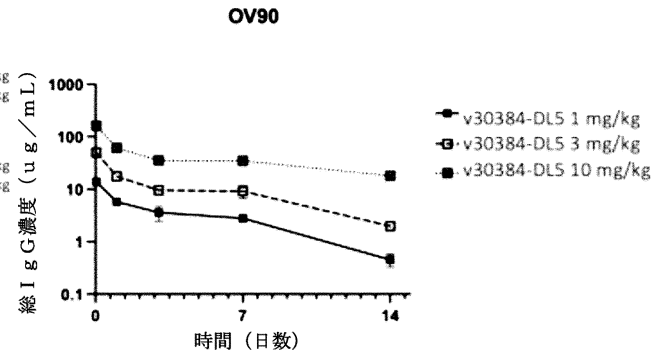


10

【図 1 6 F】



【図 1 6 G】



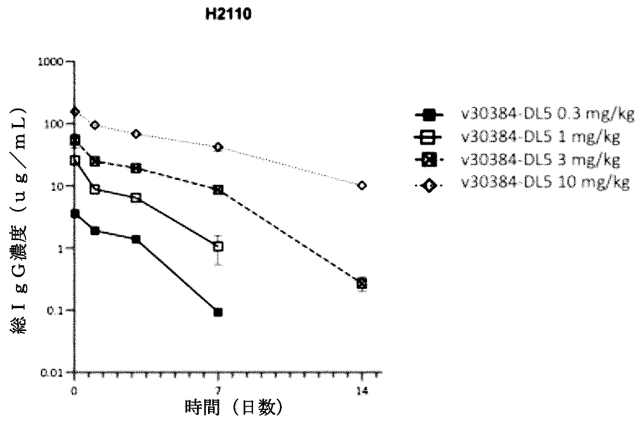
20

30

40

50

【図 16 H】



【図 17 - 1】

配列番号	重鎖 CDR	軽鎖 CDR	変異番号	変異番号	変異番号
20	HCDR1	LCDR1	20	LCDR1	20
21	HCDR2	LCDR2	21	LCDR2	21
22	HCDR3	LCDR3	22	LCDR3	22
23	HCDR1	LCDR1	23	LCDR1	23
24	HCDR2	LCDR2	24	LCDR2	24
25	HCDR3	LCDR3	25	LCDR3	25
26	HCDR1	LCDR1	26	LCDR1	26
27	HCDR2	LCDR2	27	LCDR2	27
28	HCDR3	LCDR3	28	LCDR3	28
29	HCDR1	LCDR1	29	LCDR1	29
30	HCDR2	LCDR2	30	LCDR2	30
31	HCDR3	LCDR3	31	LCDR3	31
32	HCDR1	LCDR1	32	LCDR1	32
33	HCDR2	LCDR2	33	LCDR2	33
34	HCDR3	LCDR3	34	LCDR3	34
35	HCDR1	LCDR1	35	LCDR1	35
36	HCDR2	LCDR2	36	LCDR2	36
37	HCDR3	LCDR3	37	LCDR3	37
38	HCDR1	LCDR1	38	LCDR1	38
39	HCDR2	LCDR2	39	LCDR2	39
40	HCDR3	LCDR3	40	LCDR3	40
41	HCDR1	LCDR1	41	LCDR1	41
42	HCDR2	LCDR2	42	LCDR2	42
43	HCDR3	LCDR3	43	LCDR3	43
44	HCDR1	LCDR1	44	LCDR1	44
45	HCDR2	LCDR2	45	LCDR2	45
46	HCDR3	LCDR3	46	LCDR3	46
47	HCDR1	LCDR1	47	LCDR1	47
48	HCDR2	LCDR2	48	LCDR2	48
49	HCDR3	LCDR3	49	LCDR3	49
50	HCDR1	LCDR1	50	LCDR1	50
51	HCDR2	LCDR2	51	LCDR2	51
52	HCDR3	LCDR3	52	LCDR3	52
53	HCDR1	LCDR1	53	LCDR1	53
54	HCDR2	LCDR2	54	LCDR2	54
55	HCDR3	LCDR3	55	LCDR3	55
56	HCDR1	LCDR1	56	LCDR1	56
57	HCDR2	LCDR2	57	LCDR2	57
58	HCDR3	LCDR3	58	LCDR3	58
59	HCDR1	LCDR1	59	LCDR1	59
60	HCDR2	LCDR2	60	LCDR2	60
61	HCDR3	LCDR3	61	LCDR3	61
62	HCDR1	LCDR1	62	LCDR1	62
63	HCDR2	LCDR2	63	LCDR2	63
64	HCDR3	LCDR3	64	LCDR3	64
65	HCDR1	LCDR1	65	LCDR1	65
66	HCDR2	LCDR2	66	LCDR2	66
67	HCDR3	LCDR3	67	LCDR3	67
68	HCDR1	LCDR1	68	LCDR1	68
69	HCDR2	LCDR2	69	LCDR2	69
70	HCDR3	LCDR3	70	LCDR3	70
71	HCDR1	LCDR1	71	LCDR1	71
72	HCDR2	LCDR2	72	LCDR2	72
73	HCDR3	LCDR3	73	LCDR3	73
74	HCDR1	LCDR1	74	LCDR1	74
75	HCDR2	LCDR2	75	LCDR2	75
76	HCDR3	LCDR3	76	LCDR3	76
77	HCDR1	LCDR1	77	LCDR1	77
78	HCDR2	LCDR2	78	LCDR2	78
79	HCDR3	LCDR3	79	LCDR3	79
80	HCDR1	LCDR1	80	LCDR1	80
81	HCDR2	LCDR2	81	LCDR2	81
82	HCDR3	LCDR3	82	LCDR3	82
83	HCDR1	LCDR1	83	LCDR1	83
84	HCDR2	LCDR2	84	LCDR2	84
85	HCDR3	LCDR3	85	LCDR3	85
86	HCDR1	LCDR1	86	LCDR1	86
87	HCDR2	LCDR2	87	LCDR2	87
88	HCDR3	LCDR3	88	LCDR3	88
89	HCDR1	LCDR1	89	LCDR1	89
90	HCDR2	LCDR2	90	LCDR2	90
91	HCDR3	LCDR3	91	LCDR3	91
92	HCDR1	LCDR1	92	LCDR1	92
93	HCDR2	LCDR2	93	LCDR2	93
94	HCDR3	LCDR3	94	LCDR3	94
95	HCDR1	LCDR1	95	LCDR1	95
96	HCDR2	LCDR2	96	LCDR2	96
97	HCDR3	LCDR3	97	LCDR3	97
98	HCDR1	LCDR1	98	LCDR1	98
99	HCDR2	LCDR2	99	LCDR2	99
100	HCDR3	LCDR3	100	LCDR3	100
101	HCDR1	LCDR1	101	LCDR1	101
102	HCDR2	LCDR2	102	LCDR2	102
103	HCDR3	LCDR3	103	LCDR3	103
104	HCDR1	LCDR1	104	LCDR1	104
105	HCDR2	LCDR2	105	LCDR2	105
106	HCDR3	LCDR3	106	LCDR3	106
107	HCDR1	LCDR1	107	LCDR1	107
108	HCDR2	LCDR2	108	LCDR2	108
109	HCDR3	LCDR3	109	LCDR3	109
110	HCDR1	LCDR1	110	LCDR1	110
111	HCDR2	LCDR2	111	LCDR2	111
112	HCDR3	LCDR3	112	LCDR3	112
113	HCDR1	LCDR1	113	LCDR1	113
114	HCDR2	LCDR2	114	LCDR2	114
115	HCDR3	LCDR3	115	LCDR3	115
116	HCDR1	LCDR1	116	LCDR1	116
117	HCDR2	LCDR2	117	LCDR2	117
118	HCDR3	LCDR3	118	LCDR3	118
119	HCDR1	LCDR1	119	LCDR1	119
120	HCDR2	LCDR2	120	LCDR2	120
121	HCDR3	LCDR3	121	LCDR3	121
122	HCDR1	LCDR1	122	LCDR1	122
123	HCDR2	LCDR2	123	LCDR2	123
124	HCDR3	LCDR3	124	LCDR3	124
125	HCDR1	LCDR1	125	LCDR1	125
126	HCDR2	LCDR2	126	LCDR2	126
127	HCDR3	LCDR3	127	LCDR3	127
128	HCDR1	LCDR1	128	LCDR1	128
129	HCDR2	LCDR2	129	LCDR2	129
130	HCDR3	LCDR3	130	LCDR3	130
131	HCDR1	LCDR1	131	LCDR1	131
132	HCDR2	LCDR2	132	LCDR2	132
133	HCDR3	LCDR3	133	LCDR3	133
134	HCDR1	LCDR1	134	LCDR1	134
135	HCDR2	LCDR2	135	LCDR2	135
136	HCDR3	LCDR3	136	LCDR3	136
137	HCDR1	LCDR1	137	LCDR1	137
138	HCDR2	LCDR2	138	LCDR2	138
139	HCDR3	LCDR3	139	LCDR3	139
140	HCDR1	LCDR1	140	LCDR1	140
141	HCDR2	LCDR2	141	LCDR2	141
142	HCDR3	LCDR3	142	LCDR3	142
143	HCDR1	LCDR1	143	LCDR1	143
144	HCDR2	LCDR2	144	LCDR2	144
145	HCDR3	LCDR3	145	LCDR3	145
146	HCDR1	LCDR1	146	LCDR1	146
147	HCDR2	LCDR2	147	LCDR2	147
148	HCDR3	LCDR3	148	LCDR3	148
149	HCDR1	LCDR1	149	LCDR1	149
150	HCDR2	LCDR2	150	LCDR2	150
151	HCDR3	LCDR3	151	LCDR3	151
152	HCDR1	LCDR1	152	LCDR1	152
153	HCDR2	LCDR2	153	LCDR2	153
154	HCDR3	LCDR3	154	LCDR3	154
155	HCDR1	LCDR1	155	LCDR1	155
156	HCDR2	LCDR2	156	LCDR2	156
157	HCDR3	LCDR3	157	LCDR3	157
158	HCDR1	LCDR1	158	LCDR1	158
159	HCDR2	LCDR2	159	LCDR2	159
160	HCDR3	LCDR3	160	LCDR3	160
161	HCDR1	LCDR1	161	LCDR1	161
162	HCDR2	LCDR2	162	LCDR2	162
163	HCDR3	LCDR3	163	LCDR3	163
164	HCDR1	LCDR1	164	LCDR1	164
165	HCDR2	LCDR2	165	LCDR2	165
166	HCDR3	LCDR3	166	LCDR3	166
167	HCDR1	LCDR1	167	LCDR1	167
168	HCDR2	LCDR2	168	LCDR2	168
169	HCDR3	LCDR3	169	LCDR3	169
170	HCDR1	LCDR1	170	LCDR1	170
171	HCDR2	LCDR2	171	LCDR2	171
172	HCDR3	LCDR3	172	LCDR3	172
173	HCDR1	LCDR1	173	LCDR1	173
174	HCDR2	LCDR2	174	LCDR2	174
175	HCDR3	LCDR3	175	LCDR3	175
176	HCDR1	LCDR1	176	LCDR1	176
177	HCDR2	LCDR2	177	LCDR2	177
178	HCDR3	LCDR3	178	LCDR3	178
179	HCDR1	LCDR1	179	LCDR1	179
180	HCDR2	LCDR2	180	LCDR2	180
181	HCDR3	LCDR3	181	LCDR3	181
182	HCDR1	LCDR1	182	LCDR1	182
183	HCDR2	LCDR2	183	LCDR2	183
184	HCDR3	LCDR3	184	LCDR3	184
185	HCDR1	LCDR1	185	LCDR1	185
186	HCDR2	LCDR2	186	LCDR2	186
187	HCDR3	LCDR3	187	LCDR3	187
188	HCDR1	LCDR1	188	LCDR1	188
189	HCDR2	LCDR2	189	LCDR2	189
190	HCDR3	LCDR3	190	LCDR3	190
191	HCDR1	LCDR1	191	LCDR1	191
192	HCDR2	LCDR2	192	LCDR2	192
193	HCDR3	LCDR3	193	LCDR3	193
194	HCDR1	LCDR1	194	LCDR1	194
195	HCDR2	LCDR2	195	LCDR2	195
196	HCDR3	LCDR3	196	LCDR3	196
197	HCDR1	LCDR1	197	LCDR1	197
198	HCDR2	LCDR2	198	LCDR2	198
199	HCDR3	LCDR3	199	LCDR3	199
200	HCDR1	LCDR1	200	LCDR1	200
201	HCDR2	LCDR2	201	LCDR2	201
202	HCDR3	LCDR3	202	LCDR3	202
203	HCDR1	LCDR1	203	LCDR1	203
204	HCDR2	LCDR2	204	LCDR2	204
205	HCDR3	LCDR3	205	LCDR3	205
206	HCDR1	LCDR1	206	LCDR1	206
207	HCDR2	LCDR2	207	LCDR2	207
208	HCDR3	LCDR3	208	LCDR3	208
209	HCDR1	LCDR1	209	LCDR1	209
210	HCDR2	LCDR2	210	LCDR2	210
211	HCDR3	LCDR3	211	LCDR3	211
212	HCDR1	LCDR1	212	LCDR1	212
213	HCDR2	LCDR2	213	LCDR2	213
214	HCDR3	LCDR3	214	LCDR3	214
215	HCDR1	LCDR1	215	LCDR1	215
216	HCDR2	LCDR2	216	LCDR2	216
217	HCDR3	LCDR3	217	LCDR3	217
218	HCDR1	LCDR1	218	LCDR1	218
219	HCDR2	LCDR2	219	LCDR2	219
220	HCDR3	LCDR3	220	LCDR3	220
221	HCDR1	LCDR1	221	LCDR1	221
222	HCDR2	LCDR2	222	LCDR2	222
223	HCDR3	LCDR3	223	LCDR3	223
224	HCDR1	LCDR1	224	LCDR1	224
225	HCDR2	LCDR2	225	LCDR2	225
226	HCDR3	LCDR3	226	LCDR3	226
227	HCDR1	LCDR1	227	LCDR1	227
228	HCDR2	LCDR2	228	LCDR2	228
229	HCDR3	LCDR3	229	LCDR3	229
230	HCDR1	LCDR1	230	LCDR1	230
231	HCDR2	LCDR2	231	LCDR2	231
232	HCDR3	LCDR3	232	LCDR3	232
233	HCDR1	LCDR1	233	LCDR1	233
234	HCDR2	LCDR2	234	LCDR2	234
235	HCDR3	LCDR3	235	LCDR3	235
236	HCDR1	LCDR1	236	LCDR1	236
237	HCDR2	LCDR2	237	LCDR2	237
238	HCDR3	LCDR3	238	LCDR3	238
239	HCDR1	LCDR1	239	LCDR1	239
240	HCDR2	LCDR2	240	LCDR2	240
241	HCDR3	LCDR3	241	LCDR3	241
242	HCDR1	LCDR1	242	LCDR1	242</

【図 17 - 4】

バリアント	番号付けシステム	重鎖CDR	配列	配列番号	軽鎖CDR	配列	配列番号
v35348	AbM	HCDR1	ARSGSGYPMDYHP	110	LCDR3	QQGYGRWHILNI	47
		HCDR2	GFSLSLYGV	96	LCDR1	RASQSGDWLA	65
		HCDR3	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR1	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	40
		HCDR2	GFSLSLYGV	92	LCDR1	QSIGDW	42
		HCDR3	VNSGSA	21	LCDR2	EAS	41
		HCDR1	ARSGSGYPMDYHP	107	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR2	GFSLSLY	93	LCDR1	RASQSGDWLA	65
		HCDR3	NSGGS	24	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR1	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
v35350	AbM	HCDR1	LYGV	94	LCDR1	RASQSGDWLA	65
		HCDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	SLYGV	95	LCDR1	GDWLAWY	45
		HCDR2	WIGAVNSGGSAY	29	LCDR2	LLIYEASTLA	46
		HCDR3	ARSGSGYPMDYHP	110	LCDR3	QQGYGRWHILNI	121
		HCDR1	GFSLSLYGV	96	LCDR1	RASQSGDWLA	65
		HCDR2	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSLYGV	92	LCDR1	QSIWYW	125
v35355	Contact	HCDR1	VNSGSA	21	LCDR2	EAS	41
		HCDR2	ARSGSGYPMDYHP	107	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR3	GFSLSLY	93	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR1	NSGGS	24	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR2	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	LYGV	94	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSLYGV	92	LCDR1	QSIWYW	125
		HCDR2	VNSGSA	21	LCDR2	EAS	41

【図 17 - 5】

バリアント	番号付けシステム	重鎖CDR	配列	配列番号	軽鎖CDR	配列	配列番号
v35354	AbM	HCDR1	WIGAVNSGGSAY	29	LCDR2	LLIYEASTLA	46
		HCDR2	ARSGSGYPMDYHP	110	LCDR3	QQGYGRWHILNI	121
		HCDR3	GFSLSLYGV	96	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR1	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR2	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSLYGV	92	LCDR1	QSIWYW	125
		HCDR2	VNSGSA	21	LCDR2	EAS	41
		HCDR3	ARSGSGYPMDYLA	22	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSLY	93	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	NSGGS	24	LCDR2	EASTLAS	44
v35356	Contact	HCDR1	LYGV	94	LCDR1	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109	LCDR2	RASQSIWYLA	126
		HCDR3	SGSGYPMDYLA	25	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	SLYGV	95	LCDR1	WYWLAWY	127
		HCDR2	WIGAVNSGGSAY	29	LCDR2	LLIYEASTLA	46
		HCDR3	ARSGSGYPMDYLA	30	LCDR3	QQGYGRWHILNI	121
		HCDR1	GFSLSLYGV	96	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYLA	25	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSLYGV	20	LCDR1	QSIGDW	40

10

20

【図 17 - 6】

バリアント	番号付けシステム	重鎖CDR	配列	配列番号	軽鎖CDR	配列	配列番号
v35358	Contact	HCDR1	SSYGV	28	LCDR1	GDWLAWY	45
		HCDR2	WIGAVNSGGSAY	29	LCDR2	LLIYEASTLA	46
		HCDR3	ARSGSGYPMDYHP	110	LCDR3	QQGYGRWHILNI	121
		HCDR1	GFSLSSYGV	31	LCDR1	RASQSGDWLA	65
		HCDR2	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSSYG	20	LCDR1	QSIWYW	125
		HCDR2	VNSGSA	21	LCDR2	EAS	41
		HCDR3	ARSGSGYPMDYHP	107	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSSY	23	LCDR1	RASQSIWYLA	126
v36167	AbM	HCDR2	NSGGS	24	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	SYGV	26	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	AVNSGGSAYYADSFKG	109	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	SSYGV	28	LCDR1	WYWLAWY	127
		HCDR2	WIGAVNSGGSAY	29	LCDR2	LLIYEASTLA	46
		HCDR3	ARSGSGYPMDYHP	110	LCDR3	QQGYGRWHILNI	121
		HCDR1	GFSLSSYGV	31	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44
v36168	Contact	HCDR3	SGSGYPMDYHP	108	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSSYG	20	LCDR1	QSIWYW	125
		HCDR2	VNSGSA	21	LCDR2	EAS	41
		HCDR3	ARSGSGYPMDYLA	22	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	GFSLSSY	23	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	NSGGS	24	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYLA	25	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR1	SYGV	26	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44
		HCDR3	SGSGYPMDYLA	109	LCDR3	QQGYGRWHILNI	120

【図 17 - 7】

バリアント	番号付けシステム	重鎖CDR	配列	配列番号	軽鎖CDR	配列	配列番号
v36168	Contact	HCDR1	SSYGV	28	LCDR1	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR2	WIGAVNSGGSAY	29	LCDR2	WYWLAWY	127
		HCDR3	ARSGSGYPMDYLA	30	LCDR3	LLIYEASTLA	46
		HCDR1	GFSLSSYGV	31	LCDR1	QQGYGRWHILNI	121
		HCDR2	AVNSGGSAY	32	LCDR2	RASQSIWYLA	126
		HCDR3	SGSGYPMDYLA	25	LCDR3	EASTLAS	44
		HCDR1	GFSLSLYGV	92	LCDR1	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR2	VNSGSA	21	LCDR2	QSIWYW	125
		HCDR3	ARSGSGYPMDYLA	22	LCDR3	EAS	41
		HCDR1	GFSLSLY	93	LCDR1	QQGYGRWHILNI	120
v36169	Chothia	HCDR2	NSGGS	24	LCDR2	RASQSIWYLA	126
		HCDR3	SGSGYPMDYLA	25	LCDR3	EASTLAS	44
		HCDR1	LYGV	94	LCDR1	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR2	SVNSGGSAYYADSVKG	137	LCDR2	RASQSIWYLA	126
		HCDR3	SGSGYPMDYLA	25	LCDR3	EASTLAS	44
		HCDR1	SLYGV	95	LCDR1	QQGYGRWHILNI	120
		HCDR2	WIGAVNSGGSAY	29	LCDR2	LLIYEASTLA	46
		HCDR3	ARSGSGYPMDYLA	30	LCDR3	QQGYGRWHILNI	121
		HCDR1	GFSLSLYGV	96	LCDR1	RASQSIWYLA	126
		HCDR2	AVNSGGSAY	32	LCDR2	EASTLAS	44

30

40

50

【圖 18-1】

配列番号	配列	領域	バリエーション
19	QSYKESGGGLFKPDTILRTYSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY ANWAKRSITIRTNLFTVLTKMISLAVADTAYTCARSGSGYPMDYLAIWGGTILV	VH	v32924 v30618
50	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v30384 v36675
54	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v30389
57	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADWAKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v30394
61	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADWAKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v30399
76	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v31422
79	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v31423
82	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v31424
85	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v31425
88	QQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v31426
91	EVQLLESGGGI VQPQGGSLRLSCAVSGFSLSSYGVSWVRQAPGKLEWIGAVNSGGSAY YADSVKGRSTISRDNKNTVYLQMSLRAEDTAVYYCARSGSGYPMDYLAIWGGTILVTSVS	VH	v35305

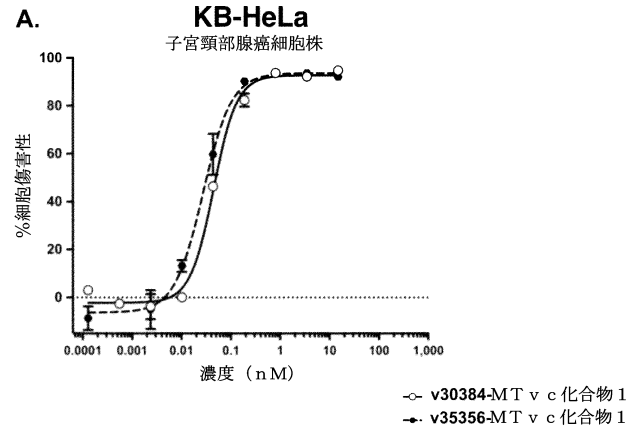
【圖 18-2】

配列	配列番号
VH	99
VH	106
VH	113
VH	116
VH	133
VH	136
VL	39
VL	64
VL	119

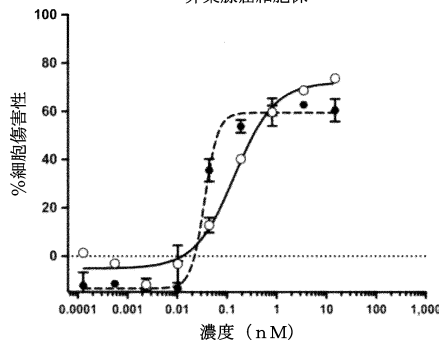
【図 18-3】

領域	配列	配列番号
ペリアント	VL	124
v35305	DYQMTQSPSSVSASVGRDVTITCRASQSIWYWLAWYQOQKPGKAPKLIIYEASTLASGV	
v35342	PSRFGSGGDTFTLTSSVQPEDAATYYCOQYGRSNVDFNFGGKTKVEVK	
v35350	DYQMTQSPSSVSASVGRDVTITCRASQSIWYWLAWYQOQKPGKAPKLIIYEASTLASGV	130
v35554	PSRFGSGGDTFTLTSSVQPEDAATYYCOQYGRWHLNFNGGKTKVEVK	
v35358		
v36167		
v36168		

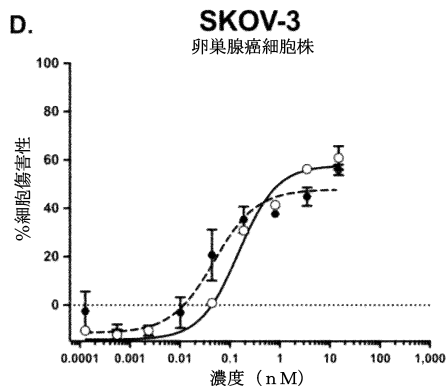
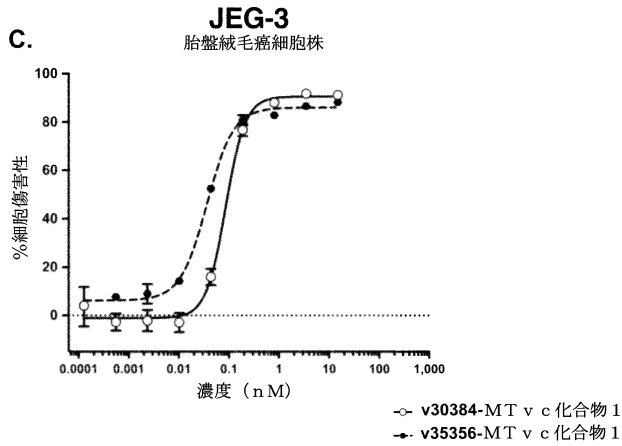
【図 19 - 1】



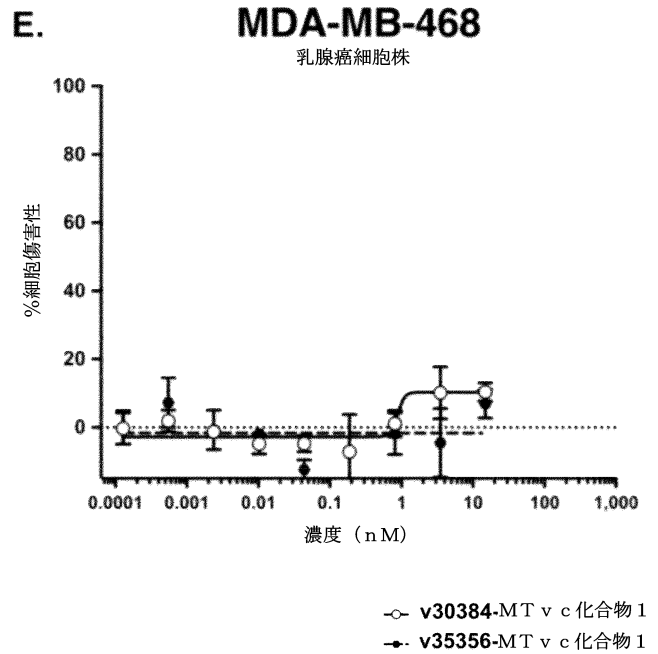
B. IGROV-1
卵巢腺癌細胞株



【図 19-2】



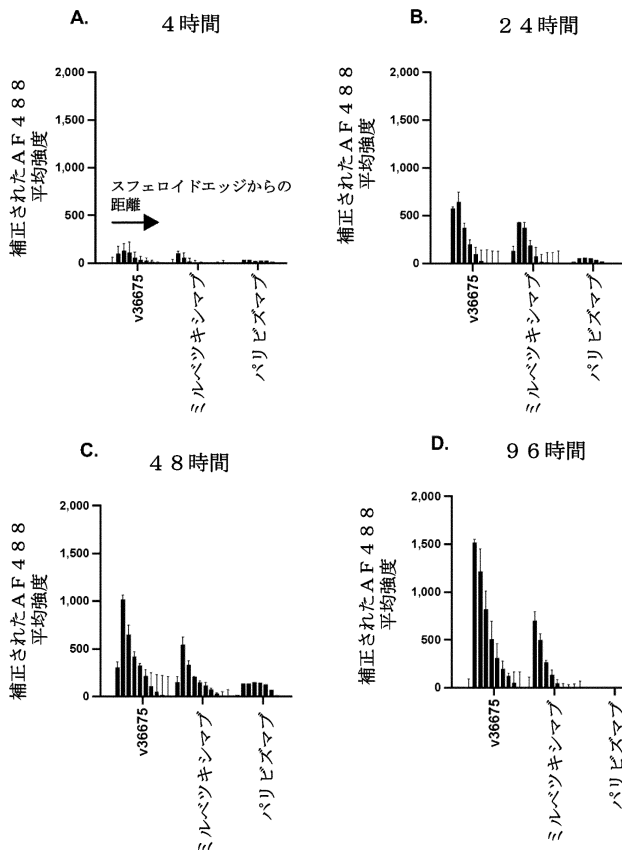
【図 19-3】



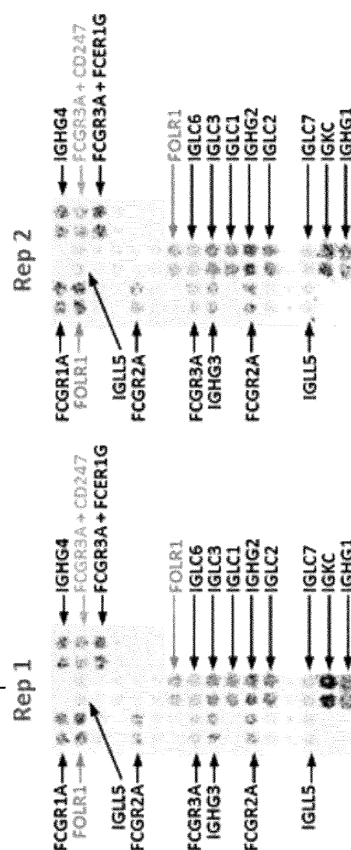
10

20

【図 20】



【図 21 A】

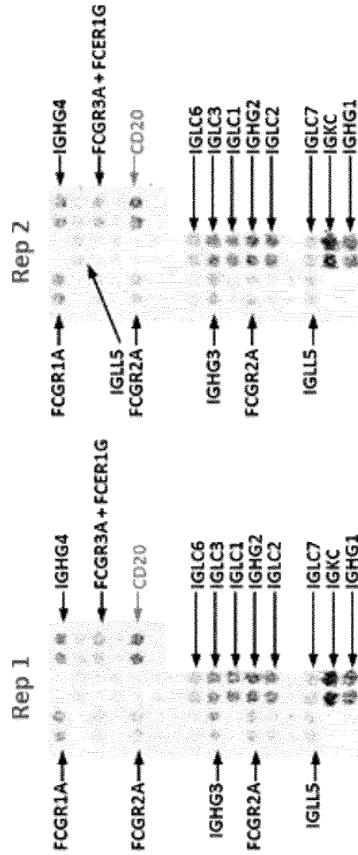


30

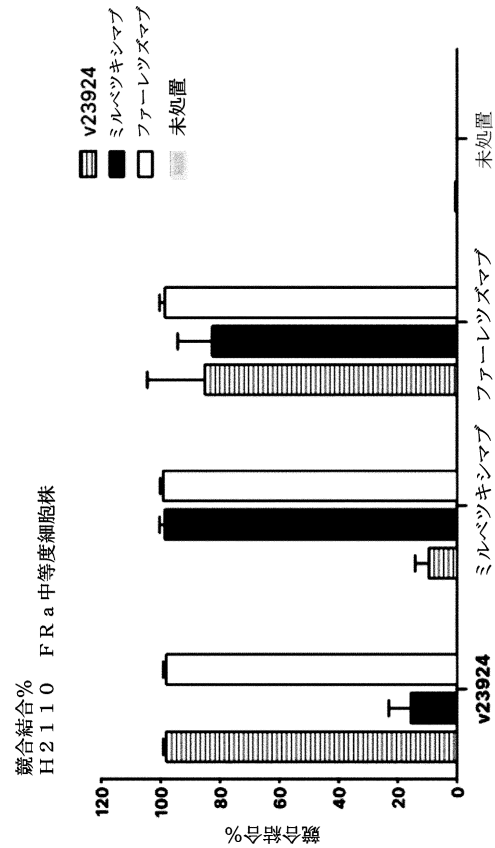
40

50

【図 2 1 B】



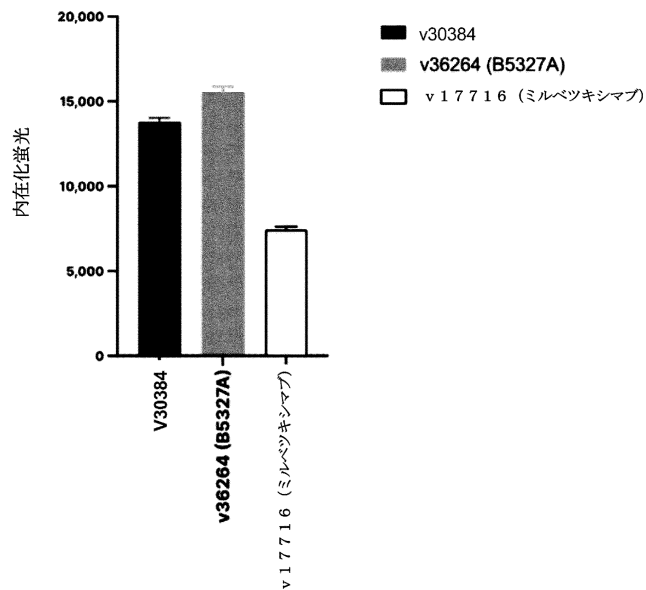
【図 2 2】



【図 2 3】

IGROV-1

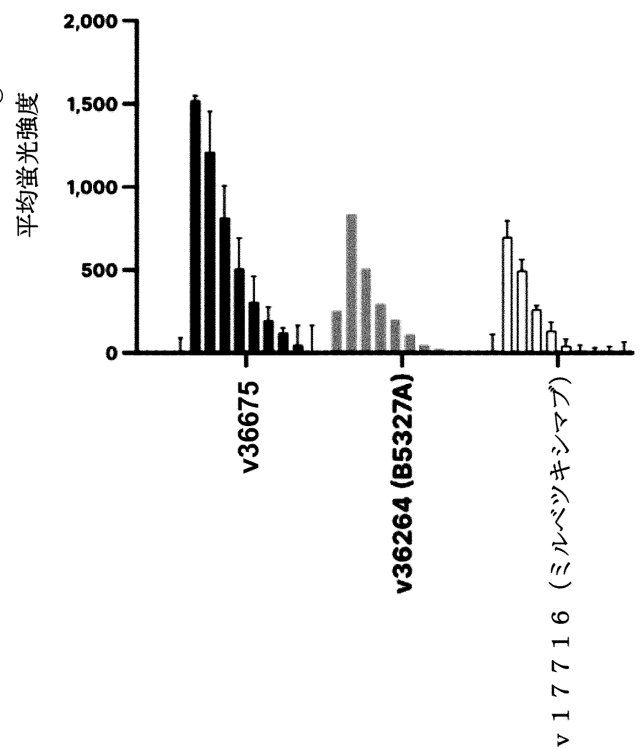
25 nM、37°Cで5時間



【図 2 4】

JEG-3スフェロイド

25 nM FRa mAb : Fab488 (1:1)、96時間



10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和6年12月10日(2024.12.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2025513721000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2023/050405
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 16/28</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61K 47/68</i> (2017.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>C12N 15/13</i> (2006.01) CPC: , <i>A61K 39/3955</i> (2020.01), <i>A61K 47/6849</i> (2020.01), <i>A61K 47/6851</i> (2020.01), <i>A61P 35/00</i> (2020.01), <i>C07K 16/28</i> (2020.01), <i>C12N 15/11</i> (2020.01), <i>C07K 2317/35</i> (2020.01), <i>C07K 2317/50</i> (2020.01) 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) Keywords used across the whole IPC and CPC		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Questel Orbit, Scopus, GenomeQuest Keywords: anti-FRA, anti-FRalpha, anti-FRα, anti-FOLR1, anti-folate receptor, folate, epitope*, ADC, antibody-drug conjugate, cancer, Search of SEQ ID NOs: 3-8, 39, 64, 119, 124 and 130, and the epitope defined in claims 1 and 4 (EDXRTSY).		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FURUUCHI, K. et al. Antibody-drug conjugate MORAb-202 exhibits long-lasting antitumor efficacy in TNBC PDx models. Cancer Science. June 2021, Vol. 112, No. 6, pages 2467-2480. *see whole document*	1-3, 14-21 and 23-44
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* "A" "D" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "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 29 June 2023 (29-06-2023)		Date of mailing of the international search report 29 June 2023 (29-06-2023)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 819-953-2476		Authorized officer Alexandre Martel (819) 230-4870

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2023/050405**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☐ forming part of the international application as filed.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13~~ter~~.1(a)),
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

It is noted that the sequence listing furnished by the Applicant does not have a proper sequence associated with SEQ ID NO : 7. Consequently, for searching purposes, the sequence of "EAS" was used for SEQ ID NO: 7, as is defined in Table 3 of the description (pages 18-19).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 38/07 (2006.01)
 A 6 1 K 38/06 (2006.01)
 A 6 1 K 31/4745 (2006.01)
 A 6 1 K 31/357 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 38/07
 A 6 1 K 38/06
 A 6 1 K 31/4745
 A 6 1 K 31/357
 A 6 1 P 35/00

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

(32)優先日 令和5年3月7日(2023.3.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,CV,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,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741

弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926

弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 リッチ ジェームズ アール.

カナダ ブイ5ティール 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
 アベニュー 114 スイート 800

(72)発明者 デイビース ルパート エイチ.

アメリカ合衆国 98161 ワシントン州 シアトル フォース アベニュー 1215 スイート

2100

- (72)発明者 バーンシャー スチュアート ダニエル
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 ユロセフ ドウニャ
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 カン スクビル シン
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 チャン ピーター ウィン イウ
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 ダス サミール
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 エルナンデス ロハス アンドレア
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 ジーン ロバート ウィリアム
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 ヤング エイダ ジー. エイチ.
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 ローン サミュエル オリバー
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 チュイ ダニー
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 ブロウマン ダンカン
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800
- (72)発明者 クラヴェット ブランドン
カナダ ブイ5ティー 1ジー4 ブリティッシュ コロンビア州 バンクーバー イースト フォース
アベニュー 114 スイート 800

F ターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C076 AA12 AA29 AA95 BB11 BB17 CC27 CC41 EE41 EE59 GG47
4C084 AA02 BA01 BA10 BA14 BA41 DA27 MA17 MA44 MA66 NA13
ZB26
4C085 AA13 AA14 AA26 BB31 BB36 BB42 CC22 CC23 EE01 GG01
GG02
4C086 AA01 AA02 CA02 CB22 MA01 MA04 MA17 MA44 MA66 NA13
ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74
GA21 GA26