(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2024-522075
(P2024-522075A)
(43)公表日　令和6年6月11日(2024.6.11)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46	4B065
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15	4C076
C12N 1/19	*(2006.01)*	C12N	1/19	4C084
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N	1/21	4C085
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N	5/10	4C086

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全210頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-571801(P2023-571801)
(86)(22)出願日　令和4年5月18日(2022.5.18)
(85)翻訳文提出日　令和5年11月20日(2023.11.20)
(86)国際出願番号　PCT/CN2022/093565
(87)国際公開番号　WO2022/242680
(87)国際公開日　令和4年11月24日(2022.11.24)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2021/095113
(32)優先日　令和3年5月21日(2021.5.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2022/085625
(32)優先日　令和4年4月7日(2022.4.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2022/088172
最終頁に続く

(71)出願人　519371552
ベイジーン スウィッツァーランド ゲーエムベーハー
スイス連邦、４０５１ バーゼル、アエッシェングラーベン ２７
(74)代理人　110002871
弁理士法人坂本国際特許商標事務所
(72)発明者　ク、リャン
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフサイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　チャン、トン
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗ＣＥＡ及び抗ＣＤ１３７多重特異性抗体ならびにそれらの使用方法

(57)【要約】
ヒトＣＥＡ及びＣＤ１３７に結合する多重特異性抗体及びその抗原結合フラグメント、前記抗体を含む医薬組成物、ならびに治療するための多重特異性抗体または組成物の使用。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号８８のアミノ酸５９６～６７４でヒトＣＥＡに特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインとを含む、多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメント。
【請求項２】
前記第１の抗原結合ドメインが他のＣＥＡＣＡＭファミリーメンバーに結合しない、請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項３】
ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、
（ｉ）（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１（重鎖相補性決定領域１）と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１（軽鎖相補性決定領域１）と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域；
（ｉｉ）（ａ）配列番号２４のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号２５のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号２６のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号２７のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号２８のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号２３のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域；または
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号４１のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号４２のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号４３のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号４４のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号４５のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号４０のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む、
請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項４】
（ｉ）配列番号１４と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号１５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｉｉ）配列番号３１と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号３２と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；または
（ｉｉｉ）配列番号４８と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号４９と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）
を含む、請求項３に記載の多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【請求項５】
配列番号１４、１５、３１、３２、４８、または４９内の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸が挿入、削除、または置換されている、請求項４に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項６】
前記第１の抗原結合ドメインが、
（ｉ）配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｉｉ）配列番号３１を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号３２を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；または
（ｉｉｉ）配列番号４８を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号４９を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、
請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項７】
ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、
（ｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１（重鎖相補性決定領域１）と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、；
（ｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号７３のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号６６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；または
（ｉｖ）（ａ）配列番号５５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号５６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号５７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む、
請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項８】
（ｉ）配列番号８４と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉ）配列番号８６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉｉ）配列番号７５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｖ）配列番号７０と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；または
（ｖ）配列番号６０と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、
請求項７に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項９】
配列番号８４、８６、７５、７０、または６０内の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸が挿入、削除、または置換されている、請求項８に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１０】
前記第２の抗原結合ドメインが、
（ｉ）配列番号８４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉ）配列番号８６を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉｉ）配列番号７５を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｖ）配列番号７０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；または
（ｖ）配列番号６０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、
請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項１１】
（ｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含むか、
（ｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号７３のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含むか、

（ｉｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号６６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含むか、または

（ｉｖ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号５５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号５６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号５７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む、

請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項１２】

（ｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号８４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；

（ｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号８６を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；

（ｉｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号７５を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；

（ｉｖ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号７０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；または

（ｖ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号６０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、

請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項１３】

モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト改変抗体、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、またはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントである、請求項１～１２のいずれか一項に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項１４】

前記多重特異性抗体が、二重特異性抗体である、請求項１に記載の多重特異性抗体。

【請求項１５】

前記二重特異性抗体が配列番号３１７から配列番号３５８のリンカーを含む、請求項１４に記載の二重特異性抗体。

【請求項１６】

前記リンカーが、配列番号３２４である、請求項１５に記載の二重特異性抗体。

【請求項１７】

前記リンカーが、配列番号３２９である、請求項１５に記載の二重特異性抗体。
【請求項１８】
前記多重特異性抗体がＢＥ－１４６（配列番号３１３及び配列番号１７９）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項１９】
前記多重特異性抗体がＢＥ－１８９（配列番号２５５及び配列番号１７９）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２０】
前記多重特異性抗体がＢＥ－７１８（配列番号２９５及び配列番号１７９）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２１】
前記多重特異性抗体がＢＥ－７４０（配列番号２９７及び配列番号１７９）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２２】
前記多重特異性抗体がＢＥ－９４２（配列番号２９９、配列番号３０１及び配列番号３０３）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２３】
前記多重特異性抗体がＢＥ－７５５（配列番号２９９、配列番号３０１及び配列番号３０５）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２４】
前記多重特異性抗体がＢＥ－５６２（配列番号３０７及び配列番号１７９）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２５】
前記多重特異性抗体がＢＥ－３７５（配列番号３０９及び配列番号１７９）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２６】
前記多重特異性抗体がＢＥ－２４４（配列番号３１１及び配列番号１７９）である、請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項２７】
前記抗体またはその前記抗原結合フラグメントが抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を有する、請求項１～２６のいずれか一項に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項２８】
前記抗体またはその前記抗原結合フラグメントは、グリコシル化が低下しているか、グリコシル化がないか、または低フコシル化されている、請求項１～２６のいずれか一項に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項２９】
前記抗体またはその前記抗原結合フラグメントが、増加した二分ＧｌｃＮａｃ構造を含む、請求項１～２６のいずれか一項に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項３０】
Ｆｃドメインが、エフェクター機能が低下したＩｇＧ１である、請求項１～２６のいずれか一項に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項３１】
ＦｃドメインがＩｇＧ４である、請求項１～２６のいずれか一項に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメント。
【請求項３２】
請求項１～２６のいずれか一項に記載の多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントを含む医薬組成物であって、薬学的に許容される担体をさらに含む、前記医薬組成物。
【請求項３３】

ヒスチジン／ヒスチジンＨＣｌ、トレハロース二水和物、及びポリソルベート２０をさらに含む、請求項３２に記載の医薬組成物。

【請求項３４】

有効量の請求項１に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメントを、必要とする患者に投与することを含む、がんの治療方法。

【請求項３５】

前記がんが、胃癌、結腸癌、膵臓癌、乳癌、頭頸部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、皮膚癌、中皮腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫及び肉腫である、請求項３４に記載の方法。

【請求項３６】

前記結腸癌が結腸直腸癌である、請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

前記胃癌が血清中の高いＣＥＡレベルに関連している、請求項３５に記載の方法。

【請求項３８】

前記肺癌が血清中の高いＣＥＡレベルに関連している、請求項３５に記載の方法。

【請求項３９】

前記非小細胞肺癌が血清中の高いＣＥＡレベルに関連している、請求項３５に記載の方法。

【請求項４０】

前記多重特異性抗体が５ｍｇ～１２００ｍｇの範囲で投与される、請求項３４に記載の治療方法。

【請求項４１】

前記多重特異性抗体が５ｍｇ～１２００ｍｇの範囲で週に１回投与される、請求項４０に記載の方法。

【請求項４２】

前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメントが、別の治療剤と組み合わせて投与される、請求項３４に記載の方法。

【請求項４３】

前記治療剤が、パクリタキセルもしくはパクリタキセル剤、ドセタキセル、カルボプラチン、トポテカン、シスプラチン、イリノテカン、ドキソルビシン、レナリドマイド、または５－アザシチジンである、請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】

前記治療剤が、パクリタキセル剤、レナリドマイドまたは５－アザシチジンである、請求項４３に記載の方法。

【請求項４５】

前記治療剤が、抗ＰＤ１抗体または抗ＰＤＬ１抗体である、請求項４２に記載の方法。

【請求項４６】

前記抗ＰＤ１抗体がチスレリズマブである、請求項４５に記載の方法。

【請求項４７】

請求項１～２６のいずれか一項に記載の多重特異性抗体または抗原結合フラグメントをコードする、単離された核酸。

【請求項４８】

請求項４７に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項４９】

請求項４７に記載の核酸または請求項４８に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項５０】

請求項４９に記載の宿主細胞を培養し、培養物から抗体または抗原結合フラグメントを回収することを含む、前記多重特異性抗体またはその前記抗原結合フラグメントを産生する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本明細書には、ヒトＣＥＡ及びヒトＣＤ１３７に結合する多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメント、前記抗体を含有する組成物、ならびにがんの治療に使用する方法が開示される。
【背景技術】
【０００２】
がん胎児性抗原（ＣＥＡ、ＣＥＡＣＡＭ５またはＣＤ６６ｅとしても知られる）は、存在するグリコシル化の量に応じて分子量が約７０～１００ｋＤａの糖タンパク質である。ヒト腺癌におけるがん特異抗原として関連するＣＥＡの存在は、Ｇｏｌｄ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１２１，４３９（１９６５）によって最初に報告された。ＣＥＡは、通常、様々な腺上皮組織（胃腸管、呼吸器管、及び泌尿生殖管など）で発現しており、細胞の頂端表面に局在していると考えられる（Ｈａｍｍａｒｓｔｒｏｍ，Ｓ．Ｓｅｍｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ．９，６７－８１（１９９９））。例えば、結腸の円柱上皮及び杯細胞において見出される（Ｆｒａｅｎｇｓｍｙｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｕｍｏｒ Ｂｉｏｌ．２０：２７７－２９２（１９９９））。これらの組織タイプから生成された腫瘍では、ＣＥＡ発現は頂端膜から細胞表面まで増加し、細胞表面から除去されると血流に入る（Ｈａｍｍａｒｓｔｒｏｍ，Ｓ．Ｓｅｍｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｂｉｏｌ．９，６７－８１；（１９９９）；Ｆｒａｅｎｇｓｍｙｒ ｅｔ ａｌ．，Ｔｕｍｏｒ Ｂｉｏｌ．２０：２７７－２９２（１９９９）も参照）。ＣＥＡの過剰発現は、結腸直腸癌、膵臓癌、肺癌、胃癌、肝細胞癌、乳癌、甲状腺癌など、多くの種類のがんで観察された。したがって、ＣＥＡは、がんの予後及び管理においてがん患者の血液中のＣＥＡレベルの上昇を判定するための診断腫瘍マーカーとして有用である（Ｃｈｅｖｉｎｓｋｙ，Ａ．Ｈ．（１９９１）Ｓｅｍｉｎ．Ｓｕｒｇ．Ｏｎｃｏｌ．７，１６２－１６６；Ｓｈｉｖｅｌｙ，Ｊ．Ｅ．ｅｔ ａｌ．，（１９８５）Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｏｎｃｏｌ．Ｈｅｍａｔｏｌ．２，３５５－３９９）。
【０００３】
ＣＥＡは、標的療法に有用な腫瘍関連抗原と考えられている（Ｋｕｒｏｋｉ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２２：４２５５－６４）。１つのアプローチは、抗ＣＥＡ ｓｃＦｖを表示し、ＣＥＡを発現するがん細胞に一酸化窒素シンターゼ（ｉＮＯＳ）遺伝子を送達するレトロウイルス構築物の生成であった。（Ｋｕｒｏｋｉ Ｍ．ｅｔ ａｌ．，（２０００）Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０（６Ａ）：４０６７－７１）。別のアプローチは、放射性同位体を抗ＣＥＡ抗体に結合させ、放射線がＣＥＡ発現腫瘍に特異的に向けられたことを実証することであった（Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，ＰＮＡＳ ＵＳＡ ９８，１０２５６－６０（２００１）、Ｇｏｌｄｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌ．，８６：１３９２－１４０３（１９９１）、Ｏｌａｆｓｅｎ Ｔ．ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｄｅｓｉｇｎ ＆ Ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ，１７，２１－２７，（２００４）、Ｍｅｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１５：４４８４－４４９２（２００９）、Ｓｈａｒｋｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４６：６２０－６３３（２００５））。放射性同位体によるアプローチは、抗ＣＥＡ抗体薬物複合体（ＡＤＣ）にも拡張されている。例えば、Ｓｈｉｎｍｉ ｅｔ ａｌ．は、モノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）に結合した抗ＣＥＡ抗体について報告した（Ｓｈｉｎｍｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｍｅｄ．６（４）：７９８－８０８（２０１７））。
【０００４】
しかし、抗ＣＥＡ抗体の問題の１つは交差反応性である。ＣＥＡは他のＣＥＡＣＡＭファミリーメンバーと高い相同性を示す。例えば、ヒトＣＥＡはＣＥＡＣＡＭ６と８４％の相同性、ＣＥＡＣＡＭ８と７７％の相同性、ＣＥＡＣＡＭ１と７３％の相同性を示す。本開示は、ＣＥＡに特異的な抗ＣＥＡ抗体を提供する。

【０００５】
ＣＤ１３７（ＴＮＦＲＳＦ９／４１ＢＢとしても知られる）は、ＴＮＦＲＳＦファミリーに属する共刺激分子である。ＣＤ１３７は、コンカナバリンＡによって刺激されたマウスヘルパー及び細胞傷害性細胞のＴ細胞因子スクリーニングによって発見され、１９８９年に、抗原刺激を受けたＴ細胞では発現されるが、休止期のＴ細胞では発現されない誘導性遺伝子として同定された（Ｋｗｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．１９８９；８６：１９６３－１９６７）。ＣＤ１３７は、ＴＮＦＲＳＦに属する共刺激分子である。ＣＤ１３７は、コンカナバリンＡによって刺激されたマウスヘルパー及び細胞傷害性細胞のＴ細胞因子スクリーニング中に８０年代後半に発見された。さらに、樹状細胞（ＤＣ）、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）（Ｖｉｎａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒ．２０１２；１１：１０６２－１０７０）、活性化されたＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔリンパ球、好酸球、ナチュラルキラーＴ細胞（ＮＫＴ）、及びマスト細胞（Ｋｗｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８９　ｓｕｐｒａ；Ｖｉｎａｙ　Ｄ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｈｅｍａｔｏｌ．２００６；８３：２３－２８）で発現することが知られている。

【０００６】
ＣＤ１３７のＣＲＤ　Ｉに結合する抗ＣＤ１３７抗体ウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）、ならびにＣＤ１３７のＣＲＤ　ＩＩＩ及びＩＶに結合するウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）は、細胞傷害性Ｔ細胞を活性化し、インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）の産生を増加させる能力により、がん治療薬としての可能性を示している。これらの抗体による腫瘍退縮の根底にあるメカニズムは、がん細胞に対する免疫細胞の応答に対する影響である。抗ＣＤ１３７抗体は、エフェクターＴリンパ球（例えば、ＣＤ８Ｔリンパ球を刺激してＩＮＦγを産生する）、ＮＫＴ、及びＡＰＣ（例えば、マクロファージ）を刺激し、活性化する。

【０００７】
ウレルマブは、前臨床実験及び初期臨床研究において有望な結果を示した（Ｓｚｎｏｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００８；２６（Ｓｕｐｐｌ．１５））。しかし、その後の研究でウレルマブは肝毒性を示し、その結果、抗体の開発は２０１２年２月まで一時停止された（Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１７；２３：１９２９－１９３６）。肝毒性は主に腫瘍細胞と間質細胞によって分泌されるＳ１００Ａ４タンパク質によるものであり、ウレルマブの用量を３週間ごとに患者１人当たり８ｍｇまたは０．１ｍｇ／ｋｇに制限した研究により、この抗体への関心が再び高まった（Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１７；２３：１９２９－１９３６）。

【０００８】
ウレルマブとは対照的に、ウトミルマブはより優れた安全性プロファイルを示し、初期の研究では肝毒性やその他の用量制限因子は示されていない（Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２０１４；３２（Ｓｕｐｐｌ．１５））。単独療法としてのウトムルマブの第Ｉ相試験から報告された結果は、良好な安全性プロファイルを示した（Ｓｅｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１８；２４：１８１６－１８２３）。２つの抗体の違いは、ＣＤ１３７受容体上の結合部位の違いによるものと推測されている。

【０００９】
これら両方の標的の独特の生物学を考慮すると、ＣＥＡ発現がんに免疫細胞を動員する抗ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体はがんの治療に有用であると考えられる。

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本開示は、多重特異性抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体及びその抗原結合フラグメントを対象とする。本開示は、以下の実施形態を包含する。

【００１１】
配列番号８８のアミノ酸５９６～６７４でヒトＣＥＡに特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインとを含む、多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメント。
【００１２】
前記第１の抗原結合ドメインが他のＣＥＡＣＡＭファミリーメンバーに結合しない、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００１３】
ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、
（ｉ）（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１（重鎖相補性決定領域１）と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１（軽鎖相補性決定領域１）と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域；
（ｉｉ）（ａ）配列番号２４のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号２５のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号２６のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号２７のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号２８のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号２３のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域；または
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号４１のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号４２のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号４３のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号４４のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号４５のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号４０のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域
を含む、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００１４】
（ｉ）配列番号１４と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号１５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｉｉ）配列番号３１と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号３２と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；または
（ｉｉｉ）配列番号４８と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号４９と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）
を含む、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００１５】
配列番号１４、１５、３１、３２、４８、または４９内の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸が挿入、削除、または置換されている、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００１６】
前記第１の抗原結合ドメインが、
（ｉ）配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；
（ｉｉ）配列番号３１を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号３２を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）；または
（ｉｉｉ）配列番号４８を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、及び配列番号４９を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００１７】
ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、

（ｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１（重鎖相補性決定領域１）と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、；
（ｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号７３のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号６６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；または
（ｉｖ）（ａ）配列番号５５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号５６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号５７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。

【００１８】

（ｉ）配列番号８４と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉ）配列番号８６と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉｉ）配列番号７５と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｖ）配列番号７０と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；または
（ｖ）配列番号６０と少なくとも９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）
を含む、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。

【００１９】

配列番号８４、８６、７５、７０、または６０内の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のアミノ酸が挿入、削除、または置換されている、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。

【００２０】

前記第２の抗原結合ドメインが、
（ｉ）配列番号８４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉ）配列番号８６を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｉｉ）配列番号７５を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；
（ｉｖ）配列番号７０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）；または
（ｖ）配列番号６０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。

【００２１】

（ｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含むか、
（ｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号７３のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含むか、
（ｉｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ

３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号６６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含むか、または

（ｉｖ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び、（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、（ａ）配列番号５５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号５６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号５７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む、

前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。

【００２２】

（ｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号８４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；

（ｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号８６を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；

（ｉｉｉ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号７５を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；

（ｉｖ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号７０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含むか；または

（ｖ）ヒトＣＥＡに特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ヒトＣＤ１３７に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号６０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、

前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。

【００２３】

モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト改変抗体、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、またはＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントである、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。

【００２４】

二重特異性抗体である、前記多重特異性抗体。

【００２５】

配列番号３１７から配列番号３５８のリンカーを含む、前記二重特異性抗体。

【００２６】

前記リンカーが、配列番号３２４である、前記二重特異性抗体。

【００２７】

前記リンカーが、配列番号３２９である、前記二重特異性抗体。

【００２８】

前記多重特異性抗体がＢＥ－１４６（配列番号３１３及び配列番号１７９）である、前記二重特異性抗体。

【００２９】
前記多重特異性抗体がＢＥ－１８９（配列番号２５５及び配列番号１７９）である、前記二重特異性抗体。
【００３０】
前記多重特異性抗体がＢＥ－７１８（配列番号２９５及び配列番号１７９）である、前記二重特異性抗体。
【００３１】
前記多重特異性抗体がＢＥ－７４０（配列番号２９７及び配列番号１７９）である、前記二重特異性抗体。
【００３２】
前記多重特異性抗体がＢＥ－９４２（配列番号２９９、配列番号３０１及び配列番号３０３）である、前記二重特異性抗体。
【００３３】
前記多重特異性抗体がＢＥ－７５５（配列番号２９９、配列番号３０１及び配列番号３０５）である、前記二重特異性抗体。
【００３４】
前記多重特異性抗体がＢＥ－５６２（配列番号３０７及び配列番号１７９）である、前記二重特異性抗体。
【００３５】
前記多重特異性抗体がＢＥ－３７５（配列番号３０９及び配列番号１７９）である、前記二重特異性抗体。
【００３６】
前記多重特異性抗体がＢＥ－２４４（配列番号３１１及び配列番号１７９）である、前記二重特異性抗体。
【００３７】
前記抗体またはその前記抗原結合フラグメントが抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を有する、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００３８】
前記抗体またはその前記抗原結合フラグメントは、グリコシル化が低下しているか、グリコシル化がないか、または低フコシル化されている、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００３９】
前記抗体またはその前記抗原結合フラグメントが、増加した二分ＧｌｃＮａｃ構造を含む、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００４０】
Ｆｃドメインが、エフェクター機能が低下したＩｇＧ１である、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００４１】
ＦｃドメインがＩｇＧ４である、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００４２】
前記ＩｇＧ４がＳ２２８Ｐ置換（ＥＵ番号付けシステムによる）を有する、前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメント。
【００４３】
前記多重特異性抗体またはその前記抗原結合フラグメントを含む医薬組成物であって、薬学的に許容される担体をさらに含む、前記医薬組成物。
【００４４】
ヒスチジン／ヒスチジンＨＣｌ、トレハロース二水和物、及びポリソルベート２０をさらに含む、前記医薬組成物。

【００４５】
有効量の前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメントを、必要とする患者に投与することを含む、がんの治療方法。
【００４６】
前記がんが、胃癌、結腸癌、膵臓癌、乳癌、頭頸部癌、腎臓癌、肝臓癌、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、皮膚癌、中皮腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫及び肉腫である、前記方法。
【００４７】
前記結腸癌が結腸直腸癌である、前記方法。
【００４８】
前記胃癌が血清中の高いＣＥＡレベルに関連している、前記方法。
【００４９】
前記肺癌が血清中の高いＣＥＡレベルに関連している、前記方法。
【００５０】
前記非小細胞肺癌が血清中の高いＣＥＡレベルに関連している、前記方法。
【００５１】
前記多重特異性抗体が５ｍｇ～１２００ｍｇの範囲で投与される、前記治療方法。
【００５２】
前記多重特異性抗体が５ｍｇ～１２００ｍｇの範囲で週に１回投与される、前記方法。
【００５３】
前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメントが、別の治療剤と組み合わせて投与される、前記方法。
【００５４】
前記治療剤が、パクリタキセルもしくはパクリタキセル剤、ドセタキセル、カルボプラチン、トポテカン、シスプラチン、イリノテカン、ドキソルビシン、レナリドマイド、または５－アザシチジンである、前記方法。
【００５５】
前記治療剤が、パクリタキセル剤、レナリドマイドまたは５－アザシチジンである、前記方法。
【００５６】
前記治療剤が、抗ＰＤ１抗体または抗ＰＤＬ１抗体である、前記方法。
【００５７】
前記抗ＰＤ１抗体がチスレリズマブである、前記方法。
【００５８】
前記多重特異性抗体または前記抗原結合フラグメントをコードする、単離された核酸。
【００５９】
前記核酸を含む、ベクター。
【００６０】
前記核酸または前記ベクターを含む、宿主細胞。
【００６１】
前記宿主細胞を培養し、培養物から抗体または抗原結合フラグメントを回収することを含む、前記多重特異性抗体またはその前記抗原結合フラグメントを産生する方法。
【００６２】
一実施形態では、多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号１０、配列番号１１、配列番号６、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２３、配列番号４１、配列番号４２、配列番号４３、配列番号４４、配列番号４５、配列番号４０、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号６６、配列番号６６、配列番号６７、配列番号７３、配列番号６７、配列番号７４、配列番号６５、配列番号８０または配列番号８１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含

む。

【００６３】

別の実施形態では、多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号７、配列番号８、配列番号９、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号４１、配列番号４２、配列番号４３、配列番号５５、配列番号５６、配列番号５７、配列番号６５、配列番号６６、配列番号６７、配列番号６５、配列番号７３、配列番号６７、配列番号６５、配列番号８０、及び配列番号８１からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む１つ以上の相補性決定領域（ＨＣＤＲ）を含む重鎖可変領域、及び／または（ｂ）配列番号１０、配列番号１１、配列番号６、配列番号２７、配列番号２８、配列番号２３、配列番号４４、配列番号４５、及び配列番号４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む１つ以上の相補性決定領域（ＬＣＤＲ）を含む軽鎖可変領域を含む。

【００６４】

別の実施形態では、多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号７、配列番号２４、配列番号４１、配列番号５５、配列番号６５、配列番号６８、配列番号７２もしくは配列番号７７のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号８、配列番号２５、配列番号４２、配列番号５６、配列番号６６、配列番号７３、もしくは配列番号８０のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号９、配列番号２６、配列番号４３、配列番号５７、配列番号６７もしくは配列番号８１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域（ＨＣＤＲ）を含む重鎖可変領域、及び／または（ｂ）配列番号１０、配列番号２７、もしくは配列番号４４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号１１、配列番号２８、もしくは配列番号４５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号６、配列番号２３、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３との３つの相補性決定領域（ＬＣＤＲ）を含む軽鎖可変領域を含む。

【００６５】

別の実施形態では、多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号８のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号９のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域（ＨＣＤＲ）、もしくは、配列番号２４のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号２５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号２６のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域、もしくは、配列番号４１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号４２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号４３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域、もしくは、配列番号５５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号５６のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号５７のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域、もしくは、配列番号６５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号６６のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域、もしくは、配列番号６５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号７３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号６７のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域、もしくは、配列番号６５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１と、配列番号８０のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２と、配列番号８１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３との３つの相補性決定領域を含む重鎖可変領域、及び／または（ｂ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３との３つの相補性決定領域（ＬＣＤＲ）、もしくは、配列番号２７のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号２８のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号２３のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３との３つの相補性決定領域、もしくは、配列番号４４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１と、配列番号４５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２と、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３との３つの相補性決定領域を含む軽鎖可変領域を含む。

【００６６】

別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを

含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合ドメイン、ならびに、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００６７】

別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号２４のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号２５のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号２６のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号２７のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号２８のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号２３のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合ドメイン、ならびに、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００６８】

さらに別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号４１のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号４２のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号４３のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号４４のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号４５のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号４０のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合ドメイン、ならびに、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００６９】

さらに別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合ドメイン、ならびに、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号７３のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００７０】

別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合ドメイン、ならびに、（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号６６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００７１】

別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号７のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号９のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号１０のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号１１のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号６のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合ドメイン、ならびに、（ａ）配列番号５５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号５６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号５７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００７２】

別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号４１のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号４２のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号４３のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号４４のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号４５のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号４０のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗

原結合ドメイン、ならびに、
（ｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；
（ｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号７３のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号６６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；または
（ｉｖ）（ａ）配列番号５５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号５６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号５７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００７３】
別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号２４のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号２５のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号２６のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域、及び（ｄ）配列番号２７のＬＣＤＲ１と、（ｅ）配列番号２８のＬＣＤＲ２と、（ｆ）配列番号２３のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域を含む第１の抗原結合ドメイン、ならびに、
（ｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号８０のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号８１のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；
（ｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号７３のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号６５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号６６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号６７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域；または
（ｉｖ）（ａ）配列番号５５のＨＣＤＲ１と、（ｂ）配列番号５６のＨＣＤＲ２と、（ｃ）配列番号５７のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域を含む第２の抗原結合ドメインを含む。

【００７４】
一実施形態では、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号１４、配列番号３１、配列番号４８、配列番号６０、配列番号７０、配列番号８４、もしくは配列番号８６のアミノ酸配列、または、配列番号１４、配列番号３１、配列番号４８、配列番号６０、配列番号７０、配列番号８４、もしくは配列番号８６のいずれか１つと少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％同一のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、及び／または（ｂ）配列番号１５、配列番号３２、もしくは配列番号４９のアミノ酸配列、または、配列番号１５、配列番号３２、もしくは配列番号４９のいずれか１つと少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【００７５】
別の実施形態では、本開示の多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメントは、（ａ）配列番号１４、配列番号３１、配列番号４８、配列番号６０、配列番号７０、配列番号８４、もしくは配列番号８６のアミノ酸配列、または、配列番号１４、配列番号３１、配列番号４８、配列番号６０、配列番号７０、配列番号８４、もしくは配列番号８６のアミノ酸配列において１、２もしくは３個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／または（ｂ）配列番号１５、配列番号３２、もしくは配列番号４９のアミノ酸配列、または、配列番号１５、配列番号３２、もしくは配列番号４９のアミノ酸において１、２、３、４もしくは５個のアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の実施形態では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【００７６】
一実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）と、配列番号１５を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）とを含む第１の抗原結合ドメイン、及び
（ｉ）配列番号８４を含むＶＨ；

（ｉｉ）配列番号８６を含むＶＨ；
（ｉｉｉ）配列番号７５を含むＶＨ；
（ｉｖ）配列番号７０を含むＶＨ；または
（ｖ）配列番号６０を含むＶＨを含む第２の抗原結合ドメインを含む。
【００７７】
別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号３１を含むＶＨと、配列番号３２を含むＶＬとを含む第１の抗原結合ドメイン、及び
（ｉ）配列番号８４を有するＶＨ；
（ｉｉ）配列番号８６を含むＶＨ；
（ｉｉｉ）配列番号７５を含むＶＨ；
（ｉｖ）配列番号７０を含むＶＨ；または
（ｖ）配列番号６０を含むＶＨを含む第２の抗原結合ドメインを含む。
【００７８】
別の実施形態では、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号４８を含むＶＨ、及び配列番号４９を含むＶＬ、ならびに
（ｉ）配列番号８４を有するＶＨ；
（ｉｉ）配列番号８６を含むＶＨ；
（ｉｉｉ）配列番号７５を含むＶＨ；
（ｉｖ）配列番号７０を含むＶＨ；または
（ｖ）配列番号６０を含むＶＨを含む第２の抗原結合ドメインを含む。
【００７９】
一実施形態では、本開示の多重特異性抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４アイソタイプのものである。より具体的な実施形態では、本開示の抗体は、野生型ヒトＩｇＧ１（ヒトＩｇＧ１ｗｔまたはｈｕＩｇＧ１とも呼ばれる）またはＩｇＧ２のＦｃドメインを含む。別の実施形態では、本開示の抗体は、Ｓ２２８Ｐ及び／またはＲ４０９Ｋ置換（ＥＵ番号付けシステムによる）を有するヒトＩｇＧ４のＦｃドメインを含む。
【００８０】
一実施形態では、本開示の多重特異性抗体は、1×10^{-6}Ｍ～1×10^{-10}Ｍの結合親和性（K_D）でＣＥＡに結合する。別の実施形態では、本開示の抗体は、約1×10^{-6}Ｍ、約1×10^{-7}Ｍ、約1×10^{-8}Ｍ、約1×10^{-9}Ｍ、または約1×10^{-10}Ｍの結合親和性（K_D）でＣＥＡに結合する。
【００８１】
別の実施形態では、本開示の抗ヒトＣＥＡ多重特異性抗体は、カニクイザルＣＥＡに対して種間結合活性を示す。
【００８２】
一実施形態では、本開示の抗体は、強力なＦｃ媒介エフェクター機能を有する。抗体は、ＣＥＡを発現する標的細胞に対する抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を媒介する。
【００８３】
本開示は、多重特異性抗体または抗原結合フラグメントのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸に関する。一実施形態では、単離された核酸は、配列番号１６、配列番号３３、配列番号５０、配列番号６１、配列番号７１、配列番号７６、配列番号８５、もしくは配列番号８７のＶＨヌクレオチド配列、または配列番号１６、配列番号３３、配列番号５０、配列番号６１、配列番号７１、配列番号７６、配列番号８５、もしくは配列番号８７と少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、本開示の抗体または抗原結合フラグメントのＶＨ領域をコードする。代替的にまたは追加的に、単離された核酸は、配列番号１７、配列番号３４もしくは配列番号５１のＶＬヌクレオチド配列、または配列番号１７、配列番号３４もしくは配列番号５１と少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％もしくは９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、本開示の抗体または抗原結合フラグメント

のＶＬ領域をコードする。
【００８４】
別の態様では、本開示は、ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体またはその抗原結合フラグメント、及び任意選択的に薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物に関する。
【００８５】
さらに別の態様では、本開示は、治療有効量のＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体もしくはその抗原結合フラグメント、またはＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む、対象における疾患を治療する方法に関する。別の実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントによって治療される疾患はがんである。
【００８６】
本開示は、がんなどの疾患を治療するためのＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体もしくはその抗原結合フラグメント、またはＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体医薬組成物の使用に関する。
【図面の簡単な説明】
【００８７】
【図１】脱落したＣＥＡ（ｓＣＥＡ）、キメラＣＥＡ（ＣＨＩＭ）、ＣＥＡＣＡＭ６、及びＣＥＡ変異体（ＣＥＡ－ｖ）の概略図である。ＣＥＡでは、ドメインＮ、Ａ１、Ｂ１、Ａ２、Ｂ２、Ａ３、Ｂ３、及びＧＰＩリンカー（ＧＰＩ）が標識されており、ＣＥＡＣＡＭ６では、ドメインＮ’、Ａ’、及びＢ’が標識されている。
【図２Ａ】抗ＣＥＡドメインＢ３抗体のＶＨ領域の系統樹を示す図である。候補抗ＣＥＡ抗体のＶＨ配列は、ＤＮＡＳＴＡＲのＭｅｇａｌｉｇｎ（商標）ソフトウェアを使用してアラインメントされた。配列相同性は系統樹に表示された。
【図２Ｂ】抗ＣＥＡドメインＢ３抗体のＶＬ領域の系統樹を示す図である。候補抗ＣＥＡ抗体のＶＬ配列は、ＤＮＡＳＴＡＲのＭｅｇａｌｉｇｎ（商標）ソフトウェアを使用してアラインメントされた。配列相同性は系統樹に表示された。
【図３】Ａは、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によるキメラ構築物（ＣＨＩＭ）上の精製マウス抗ＣＥＡ抗体ＢＧＡ１３の親和性測定を示す図である。Ｂは、抗原ＥＬＩＳＡによるＢＧＡ１３の結合プロファイルを示す図である。
【図４Ａ】ＭＫＮ４５細胞に結合するＣＥＡ抗体に対する可溶性ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）の効果を示す図である。可溶性ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）の存在下または非存在下におけるドメインＢ３抗体の結合プロファイルを示す。
【図４Ｂ】ＭＫＮ４５細胞に結合するＣＥＡ抗体に対する可溶性ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）の効果を示す図である。Ａの抗体結合プロファイルをヒストグラムとして示したものである。
【図５】Ａ～Ｂは、ヒト化ＢＧＡ１３抗体の軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ）領域（Ａ）及び重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ）領域（Ｂ）の親和性成熟のための抗体ライブラリーを生成するためのランダム化部位を示す図である。
【図６】４つのラウンドの選択後のＢＧＡ１３軽鎖ＣＤＲ領域のアミノ酸変化を示す図である。
【図７】フローサイトメトリーによる、親和性成熟ヒト化ＢＧＡ１３変異体のＬＯＶＯ細胞への結合を示す図である。
【図８】フローサイトメトリーによる、最適化されたヒト化ＢＧＡ１１３変異体のＭＫＮ４５細胞への結合を示す図である。
【図９】Ａ及びＢは、フローサイトメトリー（Ａ）及び抗原ＥＬＩＳＡ（Ｂ）により、抗体ＢＧＡ１１３Ｋの様々なＣＥＡＣＡＭファミリーメンバーへのオフターゲット結合がないことを実証する図である。
【図１０】様々な濃度の可溶性ＣＥＡの存在下でのＣＥＡ発現細胞ＭＫＮ４５細胞へのＢＧＡ１１３Ｋ結合に対する可溶性ＣＥＡの効果を示す図である。
【図１１】抗体ＢＧＡ１１３がインビトロでＡＤＣＣによって細胞を死滅させることを実証する図である。

【図１２】ＢＧＡ１１３抗体で処置した場合のマウスがんモデルの腫瘍体積の減少を示す図である。
【図１３Ａ】各サブライブラリーから同定されたヒト抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体の概要を示す図である。候補抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体のＶＨ配列は、ＤＮＡＳＴＡＲのＭｅｇａｌｉｇｎ（商標）ソフトウェアを使用してアラインメントされた。
【図１３Ｂ】各サブライブラリーからのヒト抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体の系統樹を示すグラフである。候補抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体のＶＨ配列は、ＤＮＡＳＴＡＲのＭｅｇａｌｉｇｎ（商標）ソフトウェアを使用してアラインメントされた。配列相同性は系統樹に表示された。
【図１４】Ａは、ヒトＦｃ融合ＶＨ抗体フォーマット（ＶＨ－Ｆｃ）の概略図である。ＶＨドメイン抗体を不活性Ｆｃ（ＦｃγＲ結合なし）のＮ末端に、その間にＧＳ４リンカーが介在して融合させた。Ｂは、ＶＨ－Ｆｃタンパク質を含む上清を使用した代表的なスクリーニング結果を示す図であり、Ｃは、クローンのうちの１つであるＢＧＡ－４７１２が用量依存的にＨｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞におけるＩＬ－２産生を刺激できることが実証されたことを示す図である。
【図１５】Ａ～Ｂは、代表的な抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２の結合プロファイルである。Ａは、フローサイトメトリーによるヒト抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２結合の測定を示す図である。Ｂは、ｈｕＣＤ１３７リガンド（ヒトＣＤ１３７リガンド－ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａ融合タンパク質）相互作用によるヒト抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２のブロッキングを示す図である。精製ヒト抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２のＣＤ１３７発現Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞（Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７）への結合をフローサイトメトリーにより測定した。
【図１６】Ａ～Ｄは、ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体フォーマットの概略図である。
【図１７】Ａ～Ｂは、フローサイトメトリーによるＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体の細胞結合の比較を示す図である。Ａは、ＣＥＡ発現細胞ＣＴ２６／ＣＥＡへの結合を示す図である。Ｂは、ＣＤ１３７発現細胞Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７への結合を示す図である。
【図１８】Ａ～Ｂは、Ａ－ＣＤ１３７／ＣＥＡが、ＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞の存在下でＰＢＭＣを刺激してＩＦＮ－γを産生することを実証する図である。Ａは、ＣＥＡ×ＣＤ１３７多重特異性抗体の１つであるＡ－ＣＥＡ／ＣＤ１３７が、ＣＤ１３７発現細胞株Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７を誘導してＩｌ－２を産生することを示す図である。Ｂは、ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体の１つであるＡ－ＣＥＡ／ＣＤ１３７が、ヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を誘導してＩＦＮ－γを用量依存的に産生することを示す図である。
【図１９】４つのラウンドの選択後のＢＧＡ－４７１２－Ｍ３のＣＤＲ領域の配列を示す図である。
【図２０】フローサイトメトリーによる抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメインＡｂ　ＢＧＡ－５６２３の結合アッセイを示す図であり、ＣＤ１３７への結合が親和性成熟後に改善されることを実証している。
【図２１】ＥＬＩＳＡにより、他のＴＮＦ受容体ファミリーメンバーに対するＢＧＡ－５６２３のオフターゲット結合がないことを実証する図である。
【図２２】Ａ～Ｂは、ヒト抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－５６２３のエピトープマッピングを示す図である。Ａは、細胞ベースの結合アッセイにおける代表的なスクリーニング結果である。ｈｕＣＤ１３７変異体の発現は、ウレルマブ類似体によって監視された。Ｂは、精製されたｈｕＣＤ１３７変異体のＢＧＡ－５６２３結合を示す。
【図２３】Ａは、ＥＬＩＳＡによりＣＤ１３７リガンドがヒト抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－５６２３と競合することを実証する図である。Ｂは、ＣＤ１３７×ＣＥＡ多重特異性抗体ＢＧＡ－５６２３が、細胞ベースのリガンド競合アッセイにおいてＣＤ１３７／ＣＤ１３７リガンド相互作用を減少させることができることを実証する図である。

【図２４】ＣＤ１３７についてＣＤ１３７Ｌに対するＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）の部分競合結合を示す図である。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）／ＣＤ１３７の結晶構造を、ＣＤ１３７を介してＣＤ１３７Ｌ／ＣＤ１３７複合体（ＰＤＢ：６ＭＧＰ）と重ね合わせた。ＣＤ１３７、ＣＤ１３７Ｌ、及びＶＨは、それぞれ黒、白、及び灰色で着色されている。

【図２５】ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）のＣＤＲ３が、ＣＤ１３７結合により劇的に立体構造変化を受けることを示す図である。黒色のＣＤ１３７結合ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）を白色のａｐｏＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）と重ね合わせた。

【図２６】ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）／ＣＤ１３７複合体の結合表面上の原子相互作用を示す図である。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）とＣＤ１３７との間の結合界面は、ＢＧＡ－５６２３（パラトープ残基）とＣＤ１３７（エピトープ残基）の特定の重要な残基を同定する。ＣＤ１３７のＣＲＤ１及びＣＲＤ２ドメインは、白い透明な表面で覆われた灰色の画で示されている。パラトープ残基は、黒色に着色されている。

【図２７】インビトロでのＣＤ１３７活性化に影響を与える可能性のあるモジュール比などの他のパラメータを調査するためのＣＥＡ×ＣＤ１３７多重特異性抗体フォーマットの概略図である。

【図２８】モジュール比２：４の二重特異性抗体Ａ－４１Ａ１１－４１Ａ１１が、ＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞が存在する（Ａ）か否か（Ｂ）に関係なく、ＣＤ１３７を活性化できることを実証する図である。

【図２９】インビトロでのＣＤ１３７活性化に影響を与える可能性のあるＦｃ機能及びモジュール配向などの他のパラメータを調査するためのＣＥＡ×ＣＤ１３７多重特異性抗体フォーマットの概略図である。

【図３０】Ａは、研究されたＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体のみが、ＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞の存在下でＰＢＭＣを刺激してＩＦＮ－γを産生することを実証する図である。Ｂは、ＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞の非存在下では、ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体によってＩＦＮ－γが誘導されなかったことを示す図である。

【図３１】リンカーの長さが、ＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞の存在下でインビトロでのＣＤ１３７活性化に最小限の影響しか及ぼさないことを実証する図である。

【図３２】Ａ～Ｄは、ウレルマブ（Ｄ）を比較として、フォーマットＡ－ＢＧＡ－５６２３（ＢＥ－１８９）（Ｂ）がインビボで腫瘍増殖の有意な阻害を誘導するが、Ａ－ＩｇＧ１－ＢＧＡ－５６２３（ＢＥ－７４０）（Ｃ）は誘導しないことを示す図である。

【図３３】設計された腫瘍標的化ＣＥＡ×ＣＤ１３７多重特異性抗体フォーマットの概略図である。

【図３４】Ａ～Ｂは、ｈｕＣＥＡ（Ａ）及びｈｕＣＤ１３７－ｍＩｇＧ２ａ（Ｂ）に対するＢＥ－１４６の抗原結合ＥＬＩＳＡを示す図である。このアッセイでは、ＢＥ－１４６の２つのバッチをテストした。

【図３５】ＦＡＣＳによるＢＥ－１４６のヒトＣＤ１３７への結合を示す図である。

【図３６】ＦＡＣＳによるＢＥ－１４６のヒトＣＥＡへの結合を示す図である。

【図３７】ＢＥ－１４６がＦＡＣＳによるオフターゲット結合を持たないことを示す図である。

【図３８】Ａ～Ｃは、ＣＥＡ×ＣＤ１３７多重特異性抗体ＢＥ－１４６がヒトＰＢＭＣからのＩＬ－２及びＩＦＮ－γ放出を誘導することを実証する図である。Ａは、ＭＫＮ４５細胞の存在下で、ｈｕＰＢＭＣをＢＥ－１４６細胞及びＨＥＫ２９３／ＯＳ８細胞で共刺激することによるＣＤ１３７活性化の概略図である。Ｂ～Ｃは、ＢＥ－１４６がヒトＰＢＭＣからＩＬ－２（Ｂ）及びＩＦＮ－γ（Ｃ）を誘導できることを示す。２名のドナーからのＰＢＭＣを試験した。結果は、重複の平均±ＳＤで示した。

【図３９】Ａ～Ｂは、ＣＥＡ×ＣＤ１３７多重特異性抗体ＢＥ－１４６がヒトＴ細胞からのＩＬ－２及びＩＦＮ－γ放出を誘導することを実証する図である。Ａは、ＢＥ－１４６がヒトＰＢＭＣからＩＬ－２及びＩＦＮ－γ（Ｂ）を誘導できることを示す。２名のドナーからのＰＢＭＣを試験した。結果は、重複の平均±ＳＤで示した。

【図４０】Ａ～Ｂは、ＣＥＡ×ＣＤ１３７誘導反応がＣＥＡ依存性であることを実証する

図である。Ａは、ＢＥ－１４６が、ＣＥＡ過剰発現ＨＥＫ２９３細胞に対してはＰＢＭＣからの有意なＩＬ－２及びＩＦＮ－γ放出（Ｂ）を誘導できたが、ＣＥＡ形質導入のないＨＥＫ２９３細胞に対しては誘導できなかったことを示す。３名のドナーからのＰＢＭＣを試験した。結果は、重複の平均±ＳＤで示した。

【図４１】Ａ～Ｂは、ＣＥＡｘＣＤ１３７誘発応答が組換え可溶性ＣＥＡによって有意にブロックされないことを示す図である。結果は、ＰＢＭＣからのＢＥ－１４６誘導ＩＬ－２（Ａ）及びＩＦＮ－γ（Ｂ）放出が、５０ｎｇ／ｍｌまたは５００ｎｇ／ｍｌの可溶性ＣＥＡによって有意にブロッキングされなかったことを示す。２名のドナーからのＰＢＭＣを試験した。結果は、重複の平均±ＳＤで示した。

【図４２】細胞ベースの生物発光アッセイを使用して、ＢＥ－１４６がＴ細胞活性化を増強することを実証する図である。

【図４３】Ａ～Ｂは、ＢＥ－１４６がＭＫＮ４５に対してＰＢＭＣからのＩＦＮ－γ及びＩＬ－２放出を増強するが（ＣＥＡ^{high}）（Ａ）、ＮＣＩ－Ｎ８７は増強しない（ＣＥＡ^{low}）（Ｂ）ことを示す図である。

【図４４】ＢＥ－１４６がＭＫＮ４５細胞に対してＰＢＭＣの細胞毒性を用量依存的に増強することを実証する図である。

【図４５】ＢＥ－１４６とＢＧＢ－Ａ３１７との組み合わせがＰＢＭＣからのＩＦＮ－γ分泌を促進することを示す図である。

【図４６Ａ】ＢＥ－１４６のＥＬＩＳＡベースのＦｃγＲｓ結合分析を示す図である。

【図４６Ｂ】ＢＥ－１４６のＥＬＩＳＡベースのＣ１ｑ結合活性を示す図である。

【図４７】ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＭＣ３８／ｈＣＥＡ同系モデルにおける腫瘍増殖に対するＢＥ－１４６の効果を示す図である。

【図４８】ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＣＴ２６／ｈＣＥＡ同系モデルにおける腫瘍増殖に対するＢＥ－１４６及びＣｈ１５ｍｔの効果を示す図である。

【図４９】ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＢ１６　Ｆ１０／ｈＣＥＡ同系モデルにおける腫瘍増殖に対するＢＥ－１４６及びＣｈ１５ｍｔの効果を示す図である。

【図５０】ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＢ１６　Ｆ１０／ｈＣＥＡ同系モデルにおける動物生存率に対するＢＥ－１４６及びＣｈ１５ｍｔの効果を示す図である。

【図５１】ＢＥ－１４６がインビボで肝毒性を持たないことを示す図である。高用量のウレルマブ類似体は、アラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）濃度の有意な増加を誘導し、肝臓における炎症細胞浸潤を増加させたが、ＢＥ－１４６では誘導されなかった。

【発明を実施するための形態】

【００８８】

定義

本書類の別の箇所で特に定義されない限り、本明細書で使用される他のすべての技術的及び科学的用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有する。

【００８９】

添付の特許請求の範囲を含めて、本明細書で使用される場合、「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」などの単数形の単語は、文脈が明らかにそうではないと指示しない限り、それらの対応する複数への参照を含む。

【００９０】

「または」という用語は、文脈が明らかにそうではないと指示しない限り、「及び／または」という用語を意味するために使用され、「及び／または」と同義に使用される。

【００９１】

本明細書で使用される「抗がん剤」という用語は、細胞傷害剤、化学療法剤、放射線療法及び放射線療法剤、標的化抗がん剤、ならびに免疫療法剤を含むがこれらに限定されない、がんなどの細胞増殖性障害を治療するために使用することができる任意の薬剤を指す。

【００９２】

「がん胎児性抗原」または「ＣＥＡ」という用語は、約７０～１００ｋＤａの糖タンパク質を指す。ＣＥＡはＣＥＡＣＡＭ５またはＣＤ６６ｅとしても知られている。ヒトＣＥＡのアミノ酸配列（配列番号８８）は、受託番号Ｐ０６７３１またはＮＭ＿００４３６３．２としても見出すことができる。

【００９３】

「ＣＤ１３７」または「ＴＮＦＲＳＦ９」、「ＩＬＡ」または「４１ＢＢ」という用語は、ヒトＣＤ１３７のアミノ酸配列（配列番号１３５）を指し、受託番号Ｑ０７０１１（ＴＮＲ９＿ＨＵＭＡＮ）またはＵ０３３９７でも見出すことができる。ＣＤ１３７の核酸配列を、配列番号１３６に明記する。

【００９４】

本明細書で使用される「投与」、「投与すること」、「治療すること」、及び「治療」という用語は、動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、または生体液に適用される場合、動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官、または生体液への外因性医薬品、治療剤、診断剤、または組成物の接触を意味する。細胞の治療は、試薬の細胞への接触、ならびに試薬の流体への接触を包含し、流体が細胞と接触する。「投与」及び「治療」という用語はまた、例えば細胞の、試薬、診断、結合化合物による、または別の細胞による、インビトロ及びエクスビボ治療を意味する。本明細書における「対象」という用語には、任意の生物、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ）、及び最も好ましくはヒトが含まれる。一態様において、任意の疾患または障害を処置することは、疾患または障害を緩和すること（すなわち、疾患またはその臨床症状のうちの少なくとも１つの発症を遅らせる、または阻止する、または減少させること）を指す。別の態様において、「治療する」、「治療すること」、または「治療」は、患者によって識別できない可能性のあるものを含む少なくとも１つの物理的パラメータを緩和または改善することを指す。さらに別の態様において、「治療する」、「治療すること」、または「治療」は、疾患または障害を、物理的（例えば、識別可能な症状の安定化）、生理学的（例えば、物理的パラメータの安定化）のいずれか、またはその両方で調節することを指す。さらに別の態様において、「治療する」、「治療すること」、または「治療」は、疾患または障害の発症または発達もしくは進行を予防または遅延させることを指す。

【００９５】

本開示の文脈における「対象」という用語は、哺乳動物、例えば、霊長類、好ましくは高等霊長類、例えば、ヒト（例えば、本明細書に記載の障害を有するか、または有するリスクがある患者）である。

【００９６】

本明細書で使用される「親和性」という用語は、抗体と抗原との間の相互作用の強さを指す。抗原内では、抗体の可変領域が非共有結合力を介して多くの部位で抗原と相互作用する。一般に、相互作用が多ければ多いほど、親和性は強くなる。

【００９７】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、対応する抗原に非共有結合的に、可逆的に、かつ特異的に結合することができる免疫グロブリンファミリーのポリペプチドを指す。例えば、天然に存在するＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも２つの重（Ｈ）鎖と２つの軽（Ｌ）鎖を含む四量体である。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書でＶＨと略記される）及び重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、３つのドメインＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書でＶＬまたはＶκと略記される）及び軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣＬからなる。ＶＨ及びＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称されるより保存された領域と共に散在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性の領域に、さらに細分することができる。各ＶＨ及びＶＬは、３つのＣＤＲ及び４つのフレームワーク領域（ＦＲ）から構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へと、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４の順序で配列される。重鎖及び軽鎖の可変領域には、抗原と相互作用する結合ドメインが含まれている。抗体の定常領域は、免疫

系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【００９８】

「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体を含むが、これらに限定されない。抗体は、いずれかのアイソタイプ／クラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ及びＩｇＹ）、またはサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）のものであることが可能である。

【００９９】

いくつかの実施形態では、抗ＣＥＡ抗体は、少なくとも１つの抗原結合部位、少なくとも可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＥＡ抗体は、本明細書に記載のＣＥＡ抗体からの抗原結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＥＡ抗体は、単離されるか、または組み換え体である。

【０１００】

いくつかの実施形態では、抗ＣＤ１３７抗体は、少なくとも１つの抗原結合部位、少なくとも可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ１３７抗体は、本明細書に記載のＣＤ１３７抗体からの抗原結合フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗ＣＤ１３７抗体は、単離されるか、または組み換え体である。

【０１０１】

本明細書における「モノクローナル抗体」または「ｍＡｂ」もしくは「Ｍａｂ」という用語は、実質的に同種の抗体の集団を意味し、すなわち、その集団に含まれる抗体分子は、少量で存在し得る天然に存在する変異の可能性を除いて、アミノ酸配列が同一である。対照的に、従来の（ポリクローナル）抗体調製物は通常、可変ドメイン、特に異なるエピトープに特異的であることが多い相補性決定領域（ＣＤＲ）内に異なるアミノ酸配列を有する多数の異なる抗体を含む。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られるものとして抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。モノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、当業者に知られている方法によって得ることができる。例えば、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ １９７５ ２５６：４９５－４９７；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．４，３７６，１１０；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ １９９２；Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｃｏｌｄ ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ １９８８；及びＣｏｌｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＹ １９９３を参照されたい。本明細書に開示される抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡを含む任意の免疫グロブリンクラス、及びＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４などのその任意のサブクラスのものであり得る。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養することができる。高力価のモノクローナル抗体は、個々のハイブリドーマからの細胞をマウス（初期刺激済みのＢａｌｂ／ｃマウスなど）に腹腔内注射して、所望の抗体を高濃度に含有する腹水を産生するインビボ産生で得ることができる。アイソタイプＩｇＭまたはＩｇＧのモノクローナル抗体は、当業者に周知のカラムクロマトグラフィー法を使用して、そのような腹水または培養上清から精製することができる。

【０１０２】

一般に、基本的な抗体構造単位は、四量体を含む。各四量体は、２つの同一のポリペプチド鎖対を含み、各対は、１つの「軽鎖」（約２５ｋＤａ）及び１つの「重鎖」（約５０～７０ｋＤａ）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する約１００～１１０以上のアミノ酸長の可変領域を含む。重鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を定義することができる。通常、ヒト軽鎖はカッパ軽鎖とラムダ軽鎖に分類される。さらに、ヒト重鎖は通常、α、δ、ε、γ、またはμとして分類

され、抗体のアイソタイプはそれぞれＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭとして定義される。軽鎖及び重鎖内では、可変領域及び定常領域は、約１２個以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって連結されており、重鎖には、約１０個以上のアミノ酸の「Ｄ」領域も含まれている。

【０１０３】

各軽鎖／重鎖（ＶＬ／ＶＨ）対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。したがって、一般に、完全な抗体は２つの結合部位を有する。二機能性抗体または二重特異性抗体を除いて、２つの結合部位は、一般的に、一次配列において同じである。

【０１０４】

通常、重鎖と軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）の間に位置する「相補性決定領域（ＣＤＲ）」とも呼ばれる３つの超可変領域を含む。ＣＤＲは通常、フレームワーク領域によって整列され、特定のエピトープへの結合を可能にする。一般に、Ｎ末端からＣ末端まで、軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインの両方は、ＦＲ－１（またはＦＲ１）、ＣＤＲ－１（またはＣＤＲ１）、ＦＲ－２（ＦＲ２）、ＣＤＲ－２（ＣＤＲ２）、ＦＲ－３（またはＦＲ３）、ＣＤＲ－３（ＣＤＲ３）、及びＦＲ－４（またはＦＲ４）を含む。ＣＤＲ及びフレームワーク領域の位置は、当技術分野で周知の様々な定義、例えば、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＡｂＭ及びＩＭＧＴを使用して決定することができる（例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２９：２０５－２０６（２００１）；Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１－９１７（１９８７）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４２：８７７－８８３（１９８９）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：７９９－８１７（１９９２）；Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２７３：９２７－９４８（１９９７）ＩｍＭｕｎｏＧｅｎＴｉｃｓ（ＩＭＧＴ）ｎｕｍｂｅｒｉｎｇ（Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．，Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｓｔ，７，１３２－１３６（１９９９）；Ｌｅｆｒａｎｃ，Ｍ．－Ｐ．ｅｔ ａｌ．，Ｄｅｖ．Ｃｏｍｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２７，５５－７７（２００３）（「ＩＭＧＴ」番号付け手順）を参照されたい）。抗原結合部位の定義は以下にも記載されている：Ｒｕｉｚ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２８：２１９－２２１（２０００）；及びＬｅｆｒａｎｃ，Ｍ．Ｐ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２９：２０７－２０９（２００１）；ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６２：７３２－７４５（１９９６）；及びＭａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：９２６８－９２７２（１９８９）；Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２０３：１２１－１５３（１９９１）；及びＲｅｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ Ｍ．Ｊ．Ｅ．（ｅｄ．），Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，１４１－１７２（１９９６）。例えば、Ｋａｂａｔでは、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）のＣＤＲアミノ酸残基には３１～３５（ＨＣＤＲ１）、５０～６５（ＨＣＤＲ２）、及び９５～１０２（ＨＣＤＲ３）の番号が付けられており、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）のＣＤＲアミノ酸残基には２４～３４（ＬＣＤＲ１）、５０～５６（ＬＣＤＲ２）、及び８９～９７（ＬＣＤＲ３）の番号が付けられている。Ｃｈｏｔｈｉａでは、ＶＨのＣＤＲアミノ酸には２６～３２（ＨＣＤＲ１）、５２～５６（ＨＣＤＲ２）、及び９５～１０２（ＨＣＤＲ３）の番号が付けられており、ＶＬのアミノ酸残基には２６～３２（ＬＣＤＲ１）、５０～５２（ＬＣＤＲ２）、及び９１～９６（ＬＣＤＲ３）の番号が付けられている。ＫａｂａｔとＣｈｏｔｈｉａの両方のＣＤＲ定義の組み合わせにより、ＣＤＲは、ヒトＶＨのアミノ酸残基２６～３５（ＨＣＤＲ１）、５０～６５（ＨＣＤＲ２）、及び９５～１０２（ＨＣＤＲ３）、ならびにヒトＶＬのアミノ酸残基２４～３４（ＬＣＤＲ１）、５０～５６（ＬＣＤＲ２）、及び８９～９７（ＬＣＤＲ３）からなる。ＩＭＧＴでは、ＶＨのＣＤＲアミノ酸残基にはおよそ２６～３５（ＨＣＤＲ１）、５１～５７（ＨＣＤＲ２）、及び９３～１０２（ＨＣＤＲ３）の番号が付けられており、ＶＬのＣ

ＤＲアミノ酸残基にはおよそ２７～３２（ＬＣＤＲ１）、５０～５２（ＬＣＤＲ２）、及び８９～９７（ＬＣＤＲ３）の番号が付けられている（Ｋａｂａｔによる番号付け）。ＩＭＧＴでは、抗体のＣＤＲ領域を、プログラムＩＭＧＴ／ＤｏｍａｉｎＧａｐ　Ａｌｉｇｎを使用して決定することができる。

【０１０５】

「超可変領域」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、「ＣＤＲ」（例えば、軽鎖可変ドメインのＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３、ならびに重鎖可変ドメインのＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）からのアミノ酸残基を含む。Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（配列によって抗体のＣＤＲ領域を定義している）を参照されたい。また、Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（構造によって抗体のＣＤＲ領域を定義している）をも参照されたい。「フレームワーク」または「ＦＲ」残基という用語は、本明細書においてＣＤＲ残基として定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。

【０１０６】

他に示さない限り、「抗原結合フラグメント」は、抗体の抗原結合フラグメント、すなわち、完全長抗体によって結合される抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体断片、例えば、１つ以上のＣＤＲ領域を保持する断片を意味する。抗原結合フラグメントの例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、及びＦｖ断片；二重特異性抗体；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子、例えば、単鎖Ｆｖ（ＳｃＦｖ）；抗体断片から形成されたナノボディ及び多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０７】

本明細書で使用される場合、抗体が標的タンパク質に「特異的に結合」することは、抗体が他のタンパク質と比較してその標的に対して優先的な結合を示すことを意味するが、この特異性は、絶対的な結合特異性を必要としない。抗体が「特異的に結合する」または「選択的に結合する」ことは、抗原（例えば、タンパク質）と抗体または抗原結合抗体フラグメントとの間の相互作用を説明する文脈で使用され、タンパク質及び他の生物製剤の不均一集団、例えば生物学的サンプル、血液、血清、血漿または組織サンプルにおける抗原の存在を決定する結合反応を指す。したがって、特定の指定されたイムノアッセイ条件下では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、バックグラウンドレベルと比較して少なくとも２倍特定の抗原に特異的に結合し、サンプル中に存在する他の抗原には有意な量で特異的に結合しない。一態様では、指定されたイムノアッセイ条件下では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、結合のバックグラウンドレベルと比較して少なくとも１０倍特定の抗原に特異的に結合し、サンプル中に存在する他の抗原には有意な量で特異的に結合しない。

【０１０８】

本明細書で使用される「抗原結合ドメイン」は、少なくとも３つのＣＤＲを含み、エピトープに特異的に結合する。多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）の「抗原結合ドメイン」は、第１のエピトープに特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、第２のエピトープに特異的に結合する少なくとも３つのＣＤＲからなる第２の抗原結合ドメインとを含む。多重特異性抗体は、それぞれの特異的なエピトープに向けられた抗原結合ドメインを有する、二重特異性、三重特異性、四特異性などであり得る。多重特異性抗体は、複数の抗原結合ドメイン、例えば、第１のエピトープに特異的に結合する２、３、４またはそれ以上の抗原結合ドメインと、第２のエピトープに特異的に結合する２、３、４またはそれ以上の抗原結合ドメインとを含む多価（例えば、二重特異性四価抗体）であり得る。

【０１０９】

本明細書において「ヒト抗体」という用語は、ヒト免疫グロブリンタンパク質配列のみ

を含む抗体を意味する。ヒト抗体は、マウス、マウス細胞、またはマウス細胞由来のハイブリドーマで生成される場合、マウスの糖鎖を含むことができる。同様に、「マウス抗体」または「ラット抗体」は、それぞれマウスまたはラットの免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を意味する。

【０１１０】

「ヒト化」または「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト（例えばマウス）抗体及びヒト抗体由来の配列を含む抗体の形態を意味する。このような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含む。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが、非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、ＦＲ領域のすべてまたは実質的にすべてが、ヒト免疫グロブリン配列のＦＲ領域である。ヒト化抗体は、任意選択的に、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部も含む。ヒト化抗体をげっ歯類の親抗体と区別するために必要な場合、接頭辞「ｈｕｍ」、「ｈｕ」、「Ｈｕ」、または「ｈ」が抗体クローンの名称に追加される。げっ歯類抗体のヒト化形態は、一般に、げっ歯類の親抗体と同じＣＤＲ配列を含むが、親和性を高め、ヒト化抗体の安定性を高め、翻訳後修飾を除去するため、または他の理由のために、特定のアミノ酸置換を含むことができる。

【０１１１】

「対応するヒト生殖系列配列」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン可変領域配列によってコードされる他のすべての既知の可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と決定された最も高いアミノ酸配列同一性を共有するヒト可変領域アミノ酸配列またはサブ配列をコードする核酸配列を指す。対応するヒト生殖系列配列は、他のすべての評価された可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列またはサブ配列と最も高いアミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列またはサブ配列を指すこともできる。対応するヒト生殖系列配列は、フレームワーク領域のみ、相補性決定領域のみ、フレームワーク及び相補性決定領域、可変セグメント（上記で定義したとおり）、または可変領域を含む配列もしくはサブ配列の他の組み合わせであり得る。配列同一性は、本明細書に記載の方法、例えば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ、または当技術分野で公知の別のアラインメントアルゴリズムを使用して２つの配列をアラインメントすることを使用して決定することができる。対応するヒト生殖系列核酸またはアミノ酸配列は、参照可変領域の核酸またはアミノ酸配列と少なくとも約９０％、９１、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有し得る。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域もそのようなヒト配列、例えば、ヒト生殖系列配列、もしくはヒト生殖系列配列の変異バージョン、または、例えば、Ｋｎａｐｐｉｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９６：５７－８６，２０００に記載されているように、ヒトフレームワーク配列分析に由来するコンセンサスフレームワーク配列を含む抗体に由来する。

【０１１２】

「平衡解離定数（K_D、Ｍ）」という用語は、解離速度定数（ｋｄ、時間$^{-1}$）を結合速度定数（ｋａ、時間$^{-1}$、Ｍ$^{-1}$）で割ったものを指す。平衡解離定数は、当技術分野で知られている任意の方法を使用して測定することができる。本開示の抗体は、一般に、約10^{-7}Ｍ未満または10^{-8}Ｍ未満、例えば、約10^{-9}Ｍ未満または10^{-10}Ｍ未満、いくつかの態様では、約10^{-11}Ｍ未満、10^{-12}Ｍ未満、または10^{-13}Ｍ未満の平衡解離定数を有することになる。

【０１１３】

本明細書における「がん」または「腫瘍」という用語は、当該技術分野で理解される最も広い意味を有し、典型的には調節されていない細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指す。本開示の文脈において、がんは、特定の種類または位置に限定されない。

【０１１４】

本開示の文脈において、アミノ酸配列に言及する場合、「保存的置換」という用語は、元のアミノ酸の、抗体またはフラグメントの化学的、物理的及び／または機能的特性、例えば、そのＣＥＡまたはＣＤ１３７への結合親和性を実質的に改変しない新しいアミノ酸による置換を意味する。具体的には、アミノ酸の一般的な保存的変換は当該技術分野で周知である。

【０１１５】

本明細書で使用される「ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ」技術という用語は、１つのポリペプチド内に空間的隆起（ｋｎｏｂ）を導入し、他のポリペプチド内にソケットまたは空洞（ｈｏｌｅ）を導入する（それらが相互作用する界面において）ことによって、インビトロまたはインビボのいずれかで２つのポリペプチドの対合を一緒に指示するアミノ酸を指す。例えば、ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅは、抗体のＦｃ：Ｆｃ結合界面、C_L：C_HＩ界面、またはV_H／V_L界面に導入されている（例えば、ＵＳ２０１１／０２８７００９、ＵＳ２００７／０１７８５５２、ＷＯ９６／０２７０１１、ＷＯ９８／０５０４３１、及びＺｈｕ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ６：７８１－７８８を参照されたい）。いくつかの実施形態において、ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅは、多重特異性抗体の製造中に、２つの異なる重鎖が一緒になる正しい対合を保証する。例えば、それらのＦｃ領域内にｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅアミノ酸を有する多重特異性抗体は、各Ｆｃ領域に連結された単一可変ドメインをさらに含み得るか、または類似のもしくは異なる軽鎖可変ドメインと対合する異なる重鎖可変ドメインをさらに含み得る。Ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ技術をＶＨまたはＶＬ領域で使用して正しい対合を保証することもできる。

【０１１６】

本明細書で使用される「ｋｎｏｂ」という用語は、「ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ」技術の文脈では、ポリペプチドが別のポリペプチドと相互作用する界面において、ポリペプチド内に隆起（ｋｎｏｂ）を導入するアミノ酸の変化を指す。いくつかの実施形態において、他のポリペプチドは、ｈｏｌｅ突然変異を有する。

【０１１７】

本明細書で使用される「ｈｏｌｅ」という用語は、「ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ」の文脈では、ポリペプチドが別のポリペプチドと相互作用する界面において、ポリペプチド内にソケットまたは空洞（ｈｏｌｅ）を導入するアミノ酸の変化を指す。いくつかの実施形態において、他のポリペプチドは、ｋｎｏｂ突然変異を有する。

【０１１８】

パーセント配列同一性及び配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの例は、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２，１９７７；及びＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０，１９９０にそれぞれ記載されているＢＬＡＳＴアルゴリズムである。ＢＬＡＳＴ分析を行うためのソフトウェアは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎを通じて一般に入手可能である。このアルゴリズムは、第１に、データベース配列において同じ長さのワードと整列するときに、一致するかまたは何らかの正値の閾値スコアＴを満たすクエリ配列における長さＷの短いワードを特定することによって、高スコアの配列対（ＨＳＰ）を特定することを含む。Ｔは、近傍ワードスコア閾値と称される。これらの初期の近隣ワードヒットは、それらを含むより長いＨＳＰを見つけるための検索を開始するための値として機能する。ワードヒットは、累積アライメントスコアを増加させることができる限り、各配列に沿って両方向に延びる。累積スコアは、ヌクレオチド配列について、パラメータＭ（マッチする残基の対についての報酬スコア、常に＞０）及びＮ（ミスマッチする残基についてのペナルティスコア、常に＜０）を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコア化マトリックスを使用して累積スコアを算出する。各方向の単語ヒットの拡張は、累積アライメントスコアがその最大達成値から量Ｘだけ減少するか、１つ以上の負のスコア残基アライメントの累積に起因して累積スコアがゼロもしくはゼロ以下になるか、または配列のいずれか

の終わりに達した場合に停止される。ＢＬＡＳＴアルゴリズムパラメータＷ、Ｔ、及びＸは、アライメントの感度及び速度を決定する。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列について）は、デフォルトとして、１１の単語長（Ｗ）、１０の期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝４、及び両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列については、ＢＬＡＳＴプログラムは、３のワード長、及び１０の期待値（Ｅ）、ならびに５０のＢＬＯＳＵＭ６２スコア化マトリックス（Ｈｅｎｉｋｏｆｆ　ａｎｄ　Ｈｅｎｉｋｏｆｆ，（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８９：１０９１５を参照）アライメント（Ｂ）、１０の期待値（Ｅ）、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、及び両方の鎖の比較をデフォルトとして使用する。

【０１１９】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムはまた、２つの配列間の類似性の統計分析を行う（例えば、Ｋａｒｌｉｎ　ａｎｄ　Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：５８７３－５７８７，１９９３を参照）。ＢＬＡＳＴアルゴリズムが提供する類似性の１つの尺度は、最小合計確率（Ｐ（Ｎ））であり、これは、２つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の一致が偶然に起こる確率の指標を提供する。例えば、核酸は、試験核酸と参照核酸とを比較した際の最小合計確率が約０．２未満、より好ましくは約０．０１未満、最も好ましくは約０．００１未満である場合に、参照配列に類似しているとみなされる。

【０１２０】

２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Ｅ．Ｍｅｙｅｒｓ　ａｎｄ　Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．４：１１－１７，（１９８８）のアルゴリズムを使用して決定することもできる。このアルゴリズムは、ＰＡＭ１２０重み剰余テーブル、１２のギャップ長さペナルティ、及び４のギャップペナルティを使用してＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれている。さらに、２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ＢＬＯＳＵＭ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックスのいずれか、ならびに１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップ重み及び１、２、３、４、５または６の長さ重みを使用して、ＧＣＧソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラムに組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３，（１９７０）のアルゴリズムを使用して決定することができる。

【０１２１】

「核酸」という用語は、本明細書で「ポリヌクレオチド」という用語と同義に使用され、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態でのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド及びそのポリマーを指す。この用語は、既知のヌクレオチド類似体または修飾された骨格残基または結合を含有する核酸を包含し、これらは、合成物、天然存在物、及び非天然存在物であり、参照核酸と同様の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと同様の方法で代謝される。かかる類似体の例としては、限定されないが、ホスホロチオエート、ホスホラミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、２－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（ＰＮＡ）が挙げられる。

【０１２２】

「作用可能に連結された」という用語は、核酸の文脈では、２つ以上のポリヌクレオチド（例えば、ＤＮＡ）セグメント間の機能的関係を指す。典型的には、転写調節配列の転写配列に対する機能的関係を指す。例えば、プロモーターまたはエンハンサー配列は、適切な宿主細胞または他の発現系におけるコード配列の転写を刺激または調節する場合、コード配列に作動可能に連結される。一般に、転写配列に作動可能に連結されているプロモーター転写調節配列は、転写配列に物理的に連続しており、すなわち、それらはシス作動性である。しかしながら、エンハンサーなどのいくつかの転写調節配列は、それらが転写を増強するコード配列に物理的に連続しているか、または近接して位置する必要はない。

【０１２３】

いくつかの態様において、本開示は、少なくとも１つの薬学的に許容される賦形剤と共

に製剤化される、本明細書に記載の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体を含む組成物、例えば、薬学的に許容される組成物を提供する。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、生理学的に適合性である任意の及びすべての溶媒、分散媒、等張剤及び吸収遅延剤などを含む。賦形剤は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、直腸、脊髄、または表皮投与（例えば、注射または注入による）に好適であり得る。

【０１２４】

本明細書に開示される組成物は、様々な形態であることができる。これらには、例えば、液体溶液（例えば、注射及び注入溶液）、分散液または懸濁液、リポソーム、及び坐剤などの液体、半固体及び固体剤形が含まれる。好適な形態は、意図される投与様式及び治療的適用に依存する。典型的な好適な組成物は、注射液または注入液の形態である。１つの好適な投与様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。いくつかの実施形態では、抗体は、静脈内注入または注射によって投与される。ある特定の実施形態において、抗体は、筋肉内または皮下注射によって投与される。

【０１２５】

本明細書で使用される「治療有効量」という用語は、疾患、または疾患もしくは障害の臨床症状のうちの少なくとも１つを治療するために対象に投与するときに、疾患、障害、または症状に対してそのような治療を達成するのに十分である抗体の量を指す。「治療有効量」は、抗体、疾患、障害、及び／または疾患もしくは障害の症状、疾患、障害、及び／または疾患もしくは障害の症状の重症度、治療される対象の年齢、及び／または治療される対象の体重と共に変化し得る。任意の所与の事例における適切な量は、当業者には明白であり得るか、または慣例的な実験によって決定することができる。併用療法の場合、「治療有効量」は、疾患、障害、または状態の効果的な治療のための併用対象の総量を指す。

【０１２６】

「併用療法」という用語は、本開示に記載される治療的状態または障害を治療するための２つ以上の治療剤の投与を指す。かかる投与は、実質的に同時の様式でのこれらの治療剤の同時投与を包含する。かかる投与はまた、各活性成分について、複数の容器内または別々の容器内（例えば、カプセル、粉末、及び液体）での同時投与を包含する。粉末及び／または液体は、投与前に所望の用量に再構成または希釈され得る。さらに、このような投与は、ほぼ同じ時間または異なる時間のいずれかで、各種の治療剤を順次使用することも包含する。いずれの場合においても、治療レジメンは、本明細書に記載の状態または障害の治療において薬物併用の有益な効果を提供する。

【０１２７】

本明細書で使用される場合、「と組み合わせて」という語句は、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体が、追加の治療剤の投与と同時に、その直前に、またはその直後に、対象に投与されることを意味する。ある特定の実施形態において、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体は、追加の治療剤との共製剤として投与される。

【０１２８】

発明を実施するための形態

本開示は、抗体、抗原結合フラグメント、及び抗ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体を提供する。さらに、本開示は、所望の薬物動態特性及び他の所望の属性を有し、したがって、がんの可能性を低減するために、またはがんを治療するために使用することができる抗体を提供する。本開示は、がん及び関連する障害の予防及び治療のために、抗体を含む薬学的組成物、ならびにそのような薬学的組成物を作製及び使用する方法をさらに提供する。

【０１２９】

抗ＣＥＡ抗体

本開示は、ＣＥＡに特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。本開示の抗体または抗原結合フラグメントは、以下に記載されるように生成される抗体またはその抗原結合フラグメントを含むが、これらに限定されない。

【０１３０】
本開示は、ＣＥＡに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体または抗体フラグメント（例えば、抗原結合フラグメント）は、配列番号１４、３１または４８のアミノ酸配列を有するＶＨドメインを含む（表１）。本開示はまた、ＣＥＡに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体または抗原結合フラグメントは、表１に列挙されるＨＣＤＲのいずれか１つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲを含む。一態様では、本開示は、ＣＥＡに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体は、表１に列挙されるＨＣＤＲのいずれかのアミノ酸配列を有する１、２、３、またはそれ以上のＨＣＤＲを含む（あるいは代わりに、１、２、３、またはそれ以上のＨＣＤＲからなる）。
【０１３１】
本開示は、ＣＥＡに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号１５、３２または４９のアミノ酸配列を有するＶＬドメインを含む（表１）。本開示はまた、ＣＥＡに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体または抗原結合フラグメントは、表１に列挙されるＬＣＤＲのいずれか１つのアミノ酸配列を有するＬＣＤＲを含む。特に、本開示は、ＣＥＡに特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、前記抗体または抗原結合フラグメントは、表１に列挙されるＬＣＤＲのいずれかのアミノ酸配列を有する１、２、３、またはそれ以上のＬＣＤＲを含む（あるいは代わりに、１、２、３、またはそれ以上のＬＣＤＲからなる）。
【０１３２】
本開示の他の抗体またはその抗原結合フラグメントは、変更されているが、表１に開示されたＣＤＲ領域においてＣＤＲ領域と少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を依然として有するアミノ酸を含む。いくつかの態様では、これは、表１に記載の配列に示されるＣＤＲ領域と比較した場合、ＣＤＲ領域において１、２、３、４または５個以下のアミノ酸が変更されているアミノ酸変化を含む。
【０１３３】
本開示の他の抗体は、アミノ酸、またはアミノ酸をコードする核酸が変更されているが、表１に記載の配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を依然として有するものを含む。いくつかの態様では、これは、表１に記載の配列に示される可変領域と比較した場合、実質的に同じ治療活性を保持しながら、可変領域において１、２、３、４または５個以下のアミノ酸が変更されているアミノ酸配列の変化を含む。
【０１３４】
本開示はまた、ＣＥＡに特異的に結合する抗体のＶＨ、ＶＬ、全長重鎖、及び全長軽鎖をコードする核酸配列を提供する。このような核酸配列は、哺乳類細胞における発現のために最適化することができる。
【０１３５】

【表１－１】

表１：アミノ酸配列及び核酸配列

抗体	配列番号		配列
BGA113K (IMGT)	配列番号 1	HCDR1 (IMGT)	GYIFTSYY
	配列番号 2	HCDR2 (IMGT)	INPQTGKT
	配列番号 3	HCDR3 (IMGT)	AREYGNYNYPLDY
	配列番号 4	LCDR1 (IMGT)	ENQYGY
	配列番号 5	LCDR2 (IMGT)	NY
	配列番号 6	LCDR3 (IMGT)	QHHLGTPYT
BGA113K (Kabat)	配列番号 7	HCDR1 (Kabat)	SYYLH
	配列番号 8	HCDR2 (Kabat)	YINPQTGKTSYAQKFQG
	配列番号 9	HCDR3 (Kabat)	EYGNYNYPLDY
	配列番号 10	LCDR1 (Kabat)	RASENQYGYLA
	配列番号 11	LCDR2 (Kabat)	NYKNLVE
	配列番号 6	LCDR3 (Kabat)	QHHLGTPYT
BGA113K (Chothia)	配列番号 12	HCDR1 (Chothia)	GYIFTSY
	配列番号 13	HCDR2 (Chothia)	NPQTGK
	配列番号 9	HCDR3 (Chothia)	EYGNYNYPLDY
	配列番号 10	LCDR1 (Chothia)	RASENQYGYLA
	配列番号 11	LCDR2 (Chothia)	NYKNLVE
	配列番号 6	LCDR3 (Chothia)	QHHLGTPYT

【０１３６】

【表１－２】

BGA113K	配列番号 14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIF TSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYINPQTGK TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAREYGNYNYPLDYWGQG TLVTVSS
	配列番号 15	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQY GYLAWYQQKPGKVPKLLIYNYKNLVEGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QHHLGTPYTFGQGTKVEIK
	配列番号 16	VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCG GAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTG AAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTAT ATTTTTACCAGCTATTACCTGCATTGGGT GCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGA ATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACC GGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTC AGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATAC CAGCACCAGCACCGTGTATATGGAACTG AGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCA ACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGG CCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
	配列番号 17	VL DNA	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCA GCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGT GACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAAC CAGTATGGCTATCTGGCGTGGTATCAGC AGAAACCGGGCAAAGTGCCGAAACTGC TGATTTATAACTATAAAAACCTGGTGGA AGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGC GGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCA TTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGC GACCTATTATTGCCAGCATCATCTGGGC ACCCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCA AAGTGGAAATTAAA
BGA190 (IMGT)	配列番号 18	HCDR1 (IMGT)	GFTFSSFG
	配列番号 19	HCDR2 (IMGT)	ISIGSDII
	配列番号 20	HCDR3 (IMGT)	TRRSYRSYWYFDV
	配列番号 21	LCDR1 (IMGT)	ENIYSY
	配列番号 22	LCDR2 (IMGT)	NA
	配列番号 23	LCDR3 (IMGT)	QHHFLSPWM

【０１３７】

【表１－３】

BGA190 (Kabat)	配列番号 24	HCDR1 (Kabat)	SFGMH
	配列番号 25	HCDR2 (Kabat)	YISIGSDIIYYADTVKG
	配列番号 26	HCDR3 (Kabat)	RSYRSYWYFDV
	配列番号 27	LCDR1 (Kabat)	RTSENIYSYLA
	配列番号 28	LCDR2 (Kabat)	NAKTLAE
	配列番号 23	LCDR3 (Kabat)	QHHFLSPWM
BGA190 (Chothia)	配列番号 29	HCDR1 (Chothia)	GFTFSSF
	配列番号 30	HCDR2 (Chothia)	SIGSDI
	配列番号 26	HCDR3 (Chothia)	RSYRSYWYFDV
	配列番号 27	LCDR1 (Chothia)	RTSENIYSYLA
	配列番号 28	LCDR2 (Chothia)	NAKTLAE
	配列番号 23	LCDR3 (Chothia)	QHHFLSPWM

【０１３８】

【表１－４】

BGA190	配列番号 31	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSRELSCAASGFTF SSFGMHWVRQAPERGLEWVAYISIGSDIIY YADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRS EDTAVYYCTRRSYRSYWYFDVWGAGTT VTVSS
	配列番号 32	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENIYS YLAWYQQKQGKSPHLLVYNAKTLAEGVP SRFSGSGSGTQFSLKIISLQPEDFGTYYCQH HFLSPWMFGGGTKLEIK
	配列番号 33	VH DNA	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGA GGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGGG AACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAC TTTCAGTAGCTTTGGAATGCACTGGGTT CGTCAGGCTCCAGAGAGGGGGCTGGAG TGGGTCGCATACATTAGTATTGGCAGTG ATATCATCTACTATGCAGACACAGTGAA GGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAAT CCCAAGAACACCCTGTTCCTGCAAATGA CCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGT GTATTACTGTACAAGAAGGTCTTATAGG TCCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCG CAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
	配列番号 34	VL DNA	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCT CCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGT CACCATCACATGTCGAACAAGTGAGAAT ATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGC AGAAACAGGGAAAATCTCCTCATCTCCT GGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAG GGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG GATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGAT CATCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGG ACTTATTACTGTCAGCATCATTTTCTTAG TCCGTGGATGTTCGGTGGAGGCACCAAG CTGGAAATCAAA
BGA288 (IMGT)	配列番号 35	HCDR1 (IMGT)	GYTFTDYN
	配列番号 36	HCDR2 (IMGT)	IGPNYGGT
	配列番号 37	HCDR3 (IMGT)	ARRGSIPRAVDY
	配列番号 38	LCDR1 (IMGT)	QDIHNY
	配列番号 39	LCDR2 (IMGT)	RA
	配列番号 40	LCDR3 (IMGT)	LQYDEFPYT

【０１３９】

【表１－５】

BGA288 (Kabat)	配列番号 41	HCDR1 (Kabat)	DYNID
	配列番号 42	HCDR2 (Kabat)	DIGPNYGGTIYNQKFKG
	配列番号 43	HCDR3 (Kabat)	RGSIPRAVDY
	配列番号 44	LCDR1 (Kabat)	KASQDIHNYLS
	配列番号 45	LCDR2 (Kabat)	RANRLVD
	配列番号 40	LCDR3 (Kabat)	LQYDEFPYT
BGA288 (Chothia)	配列番号 46	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDY
	配列番号 47	HCDR2 (Chothia)	GPNYGG
	配列番号 43	HCDR3 (Chothia)	RGSIPRAVDY
	配列番号 44	LCDR1 (Chothia)	KASQDIHNYLS
	配列番号 45	LCDR2 (Chothia)	RANRLVD
	配列番号 40	LCDR3 (Chothia)	LQYDEFPYT

【０１４０】

【表１－６】

BGA288	配列番号 48	VH	EVLLQQSGPELVKPGASVKIFCKASGYTFT DYNIDWVQQSHGKSLEWIGDIGPNYGGTI YNQKFKGKATLTVAKSSSTAYMELRSLTS EDTAVYYCARRGSIPRAVDYWGQGTSVT VSS
	配列番号 49	VL	DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIH NYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVP SRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCL QYDEFPYTFGGGTKLEIK
	配列番号 50	VH DNA	GAGGTCCTGCTGCAACAGTCTGGACCTG AGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA GATTTTCTGTAAGGCTTCTGGATACACA TTCACTGACTACAACATAGACTGGGTGC AGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGT GGATTGGAGATATTGGTCCTAATTATGG TGGTACTATCTACAACCAGAAGTTCAAG GGCAAGGCCACATTGACTGTAGCCAAGT CCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCG CAGCCTGACATCTGAGGACACTGCAGTC TATTACTGTGCAAGACGCGGTAGCATCC CGAGGGCTGTGGACTACTGGGGTCAAG GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
	配列番号 51	VL DNA	GACATCAAGATGACCCAGTCTCCATCTT CCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGT CACTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGAC ATTCATAACTATTTAAGCTGGTTCCAGC AGAAACCAGGGAAATCTCCTAAGACCCT GATCTATCGTGCAAACAGATTGGTAGAT GGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG GATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCAT CAGCAGCCTGGAGTATGAAGATATGGG AATTTATTATTGTCTACAGTATGATGAG TTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCA AGCTGGAAATAAAA

【０１４１】

本開示は、ヒトＣＥＡのエピトープに結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。特定の態様では、抗体及び抗原結合フラグメントは、ＣＥＡの同じエピトープに結合することができる。

【０１４２】

本開示は、表１に記載の抗ＣＥＡ抗体と同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合フラグメントも提供する。したがって、追加の抗体及びその抗原結合フラグメントは、結合アッセイにおいて他の抗体と交差競合する（例えば、統計的に有意な方法で結合を競合的に阻害する）能力に基づいて同定することができる。本開示の抗体及びその抗原結合フラグメントのＣＥＡへの結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体がＣＥＡへの結合に関してその抗体またはその抗原結合フラグメントと競合できることを実証する。このような抗体は、いずれか１つの理論に束縛されることなく、競合する抗体またはその抗原結合フラグメントと同じまたは関連する（例えば、構造的に類似したまたは空間的に近位の）ＣＥＡ上のエピトープに結合することができる。特定の態様では、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントと同じＣＥＡ上のエピトープに結合する抗体は、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である。このようなヒトまたはヒト化モノクローナル抗体は、本

明細書に記載のように調製及び単離することができる。

【０１４３】

抗ＣＤ１３７抗体

【表２－１】

表２：配列

抗体	配列番号		配列
BGA-7207 (IMGT)	配列番号 52	HCDR1 (IMGT)	GFRLDTTE
	配列番号 53	HCDR2 (IMGT)	IMGISGST
	配列番号 54	HCDR3 (IMGT)	ARVVDSLFDDSAVFDY
BGA-7207 (Kabat)	配列番号 55	HCDR1 (Kabat)	TTEVG
	配列番号 56	HCDR2 (Kabat)	TIMGISGSTYYADSVKG
	配列番号 57	HCDR3 (Kabat)	VVDSLFDDSAVFDY
BGA-7207 (Chothia)	配列番号 58	HCDR1 (Chothia)	GFRLDTT
	配列番号 59	HCDR2 (Chothia)	MGISGS
	配列番号 57	HCDR3 (Chothia)	VVDSLFDDSAVFDY
BGA-7207	配列番号 60	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFR LDTTEVGWVRQAPGKGLEWVSTIMGIS GSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVVDSLFDDSA VFDYWGQGTLVTVSS
	配列番号 61	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGG AGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGC TGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGAT TCAGATTGGACACCACCGAAGTAGGT TGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGG ACTGGAATGGGTCTCCACCATCATGG GTATTAGTGGTTCGACATACTATGCGG ACAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATC TCGCGCGATAACTCAAAAAATACTCTT TACCTTCAAATGAATAGCCTTCGTGCT GAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGC CCGCGTCGTCGATTCCCTCTTTGATGA CAGCGCCGTTTTTGATTACTGGGGACA GGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG
BGA-4712 (IMGT)	配列番号 62	HCDR1 (IMGT)	GFMLSAED
	配列番号 63	HCDR2 (IMGT)	ILDFGGST
	配列番号 64	HCDR3 (IMGT)	ARVVYHAGGGVTFDY
BGA-4712 (Kabat)	配列番号 65	HCDR1 (Kabat)	AEDVG
	配列番号 66	HCDR2 (Kabat)	AILDFGGSTYYADSVKG
	配列番号 67	HCDR3 (Kabat)	VVYHAGGGVTFDY
BGA-4712 (Chothia)	配列番号 68	HCDR1 (Chothia)	GFMLSAE
	配列番号 69	HCDR2 (Chothia)	LDFGGS
	配列番号 67	HCDR3 (Chothia)	VVYHAGGGVTFDY

【０１４４】

【表２－２】

BGA-4712	配列番号 70	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFMLSAEDVGWVRQAPGKGL EWVSAILDFGGSTYYADSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARVVYHAGGGVTFDYWGQ GTLVTVSS
	配列番号 71	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTG GTGGAGGTCTGGTCCAACCAGG AGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCG CCGCGTCTGGATTCATGTTGTCC GCCGAAGACGTGGGTTGGGTGC GTCAAGCGCCGGGGAAAGGACT GGAATGGGTCTCCGCCATCTTGG ATTTTGGTGGTTCGACATACTAT GCGGACAGTGTCAAAGGGCGCT TTACGATCTCGCGCGATAACTCA AAAAATACTCTTTACCTTCAAAT GAATAGCCTTCGTGCTGAGGAC ACTGCGGTGTACTACTGCGCCCG CGTCGTCTACCATGCTGGTGGTG GCGTCACCTTTGATTACTGGGGA CAGGGCACCTTAGTTACAGTCTC ATCG
BGA-4712-M3 (IMGT)	配列番号 72	HCDR1 (IMGT)	GFTLSAED
	配列番号 63	HCDR2 (IMGT)	ILDFGGST
	配列番号 64	HCDR3 (IMGT)	ARVVYHAGGGVTFDY
BGA-4712-M3 (Kabat)	配列番号 65	HCDR1 (Kabat)	AEDVG
	配列番号 73	HCDR2 (Kabat)	AILDFGGSTYYAESVKG
	配列番号 67	HCDR3 (Kabat)	VVYHAGGGVTFDY
BGA-4712-M3 (Chothia)	配列番号 74	HCDR1 (Chothia)	GFTLSAE
	配列番号 69	HCDR2 (Chothia)	LDFGGS
	配列番号 67	HCDR3 (Chothia)	VVYHAGGGVTFDY

【０１４５】

【表２－３】

BGA-4712-M3	配列番号 75	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTFDYWGQ GTLVTVSS
	配列番号 76	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTG GTGGAGGTCTGGTCCAACCAGG AGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCG CCGCGTCTGGATTCACGTTGTCC GCCGAAGACGTGGGTTGGGTGC GTCAAGCGCCGGGGAAAGGACT GGAATGGGTCTCCGCCATCTTG GATTTTGGTGGTTCGACATACTA TGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGC TTTACGATCTCGCGCGATAACGC AAAAAATACTCTTTACCTTCAAA TGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGAC ACTGCGGTGTACTACTGCGCCC GCGTCGTCTACCATGCTGGTGGT GGCGTCACCTTTGATTACTGGGG ACAGGGCACCTTAGTTACAGTC TCATCG
BGA-5623 (IMGT)	配列番号 77	HCDR1 (IMGT)	GFTVSAED
	配列番号 78	HCDR2 (IMGT)	ILDKGGST
	配列番号 79	HCDR3 (IMGT)	ARIVYHAGGGVTFDT
BGA-5623 (Kabat)	配列番号 65	HCDR1 (Kabat)	AEDVG
	配列番号 80	HCDR2 (Kabat)	AILDKGGSTYYAESVKG
	配列番号 81	HCDR3 (Kabat)	IVYHAGGGVTFDT
BGA-5623 (Chothia)	配列番号 82	HCDR1 (Chothia)	GFTVSAE
	配列番号 83	HCDR2 (Chothia)	LDKGGS
	配列番号 81	HCDR3 (Chothia)	IVYHAGGGVTFDT

【０１４６】

【表２－４】

BGA-5623	配列番号84	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAED VGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAR IVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
	配列番号85	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCT GGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCT GCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAA GACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGA AAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGAT AAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGT CAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACG CAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGC CTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTG CGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCG TCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAA GTTACAGTCTCATCG
BGA-7556	配列番号86	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDV GWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKG RFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARV VYHAGGGVTFDYRGQGTQVTVSS
	配列番号87	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCT GGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCT GCGCCGCGTCTGGATTCACGTTGTCCGCCGAA GACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGA AAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGAT TTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGT CAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACG CAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGC CTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTG CGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCG TCACCTTTGATTACCGGGGACAGGGCACCCAA GTTACAGTCTCATCG

【０１４７】

本開示は、ＣＤ１３７に特異的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを提供する。本開示の抗体または抗原結合フラグメントは、以下に記載されるように生成される抗体またはその抗原結合フラグメントを含むが、これらに限定されない。

【０１４８】

本開示は、ＣＤ１３７に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体または抗体フラグメント（例えば、抗原結合フラグメント）は、配列番号６０、配列番号７０、配列番号７５、配列番号８４または配列番号８６のアミノ酸配列を有するＶＨドメインを含む（表２）。本開示はまた、ＣＤ１３７に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体または抗原結合フラグメントは、表２に列挙されるＨＣＤＲのいずれか１つのアミノ酸配列を有するＨＣＤＲを含む。一態様では、本開示は、ＣＤ１３７に特異的に結合する抗体または抗原結合フラグメントを提供し、ここで、前記抗体は、表２に列挙されるＨＣＤＲのいずれかのアミノ酸配列を有する１、２、３、またはそれ以上のＨＣＤＲを含む（あるいは代わりに、１、２、３、またはそれ以上のＨＣＤＲからなる）。

【０１４９】

本開示の他の抗体またはその抗原結合フラグメントは、変更されているが、表２に開示

されたＣＤＲ領域においてＣＤＲ領域と少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を依然として有するアミノ酸を含む。いくつかの態様では、これは、表２に記載の配列に示されるＣＤＲ領域と比較した場合、ＣＤＲ領域において１、２、３、４または５個以下のアミノ酸が変更されているアミノ酸変化を含む。

【０１５０】

本開示の他の抗体は、アミノ酸、またはアミノ酸をコードする核酸が変更されているが、表２に記載の配列と少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９５％または９９％の同一性を依然として有するものを含む。いくつかの態様では、これは、表２に記載の配列に示される可変領域と比較した場合、実質的に同じ治療活性を保持しながら、可変領域において１、２、３、４または５個以下のアミノ酸が変更されているアミノ酸配列の変化を含む。

【０１５１】

本開示はまた、ＣＤ１３７に特異的に結合する抗体のＶＨ、ＶＬ、全長重鎖、及び全長軽鎖をコードする核酸配列を提供する。このような核酸配列は、哺乳類細胞における発現のために最適化することができる。

【０１５２】

本開示は、ヒトＣＤ１３７のエピトープに結合する抗体及びその抗原結合フラグメントを提供する。特定の態様では、抗体及び抗原結合フラグメントは、ＣＤ１３７の同じエピトープに結合することができる。

【０１５３】

本開示は、表２に記載の抗ＣＤ１３７抗体と同じエピトープに結合する抗体及びその抗原結合フラグメントも提供する。したがって、追加の抗体及びその抗原結合フラグメントは、結合アッセイにおいて他の抗体と交差競合する（例えば、統計的に有意な方法で結合を競合的に阻害する）能力に基づいて同定することができる。本開示の抗体及びその抗原結合フラグメントのＣＤ１３７への結合を阻害する試験抗体の能力は、試験抗体がＣＤ１３７への結合に関してその抗体またはその抗原結合フラグメントと競合できることを実証する。このような抗体は、いずれか１つの理論に束縛されることなく、競合する抗体またはその抗原結合フラグメントと同じまたは関連する（例えば、構造的に類似したまたは空間的に近位の）ＣＤ１３７上のエピトープに結合することができる。特定の態様では、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントと同じＣＤ１３７上のエピトープに結合する抗体は、ヒトまたはヒト化モノクローナル抗体である。このようなヒトまたはヒト化モノクローナル抗体は、本明細書に記載のように調製及び単離することができる。

【０１５４】

抗ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体

一実施形態では、本明細書に開示される抗ＣＥＡ抗体及び抗ＣＤ１３７抗体は、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体に組み込むことができる。抗体分子は多重特異性抗体分子であり、例えば、多数の抗原結合ドメインを含み、少なくとも１つの抗原結合ドメイン配列が第１のエピトープとしてＣＥＡに特異的に結合し、第２の抗原結合ドメイン配列が第２のエピトープとしてＣＤ１３７に特異的に結合する。一実施形態では、多重特異性抗体は、第３、第４、または第５の抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、多重特異性抗体は二重特異性抗体、三重特異性抗体、または四重特異性抗体である。各例において、多重特異性抗体は、少なくとも１つの抗ＣＥＡ抗原結合ドメイン及び少なくとも１つの抗ＣＤ１３７抗原結合ドメインを含む。

【０１５５】

一実施形態では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。本明細書で使用される場合、二重特異性抗体は２つの抗原のみに特異的に結合する。二重特異性抗体は、ＣＥＡに特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、ＣＤ１３７に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインとを含む。これには、第１のエピトープとしてＣＥＡに特異的に結合する重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインと、第２のエピトープとしてＣＤ１３７に特異的に結合する重鎖可変ドメインとを含む二重特異性抗体が含まれる。別の実施形態では、二重

特異性抗体は、ＣＥＡに特異的に結合する抗体の抗原結合フラグメントと、ＣＤ１３７に特異的に結合する抗原結合フラグメントとを含む。抗原結合フラグメントを含む二重特異性抗体において、抗原結合フラグメントは、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、または単鎖Ｆｖ（ＳｃＦｖ）またはｓｃＦｖであり得る。

【０１５６】

以前の実験（Ｃｏｌｏｍａ ａｎｄ Ｍｏｒｒｉｓｏｎ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１５：１５９－１６３（１９９７））では、ＩｇＧ３抗ダンシル抗体のＣ末端（ＣＨ３－ｓｃＦｖ）の後またはヒンジ（ヒンジ－ｓｃＦｖ）の後に一本鎖抗ダンシル抗体Ｆｖ（ｓｃＦｖ）をコードするＤＮＡを融合することによって操作される四価の二重特異性抗体が記載されていた。本開示は、少なくとも２つの抗原結合ドメインを有する多価抗体（例えば、四価抗体）を提供し、これは、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現によって容易に産生され得る。本明細書における多価抗体は、少なくとも２つの抗原に特異的に結合する、３～８個、好ましくは４個の抗原結合ドメインを含む。

【０１５７】

リンカー

四価の二重特異性抗体のポリペプチド鎖のドメイン及び／または領域は、様々な長さのリンカー領域によって分離することができることもまた理解される。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインは、リンカー領域によって互いに、ＣＬ、ＣＨ１、ヒンジ、ＣＨ２、ＣＨ３、またはＦｃ領域全体から分離されている。例えば、ＶＬ１－ＣＬ－（リンカー）ＶＨ２－ＣＨ１のようなリンカー領域は、ランダムなアミノ酸の類別、または限定されたアミノ酸のセットを含み得る。このようなリンカー領域は、柔軟であっても剛直であってもよい（ＵＳ２００９／０１５５２７５を参照）。

【０１５８】

多重特異性抗体は、柔軟なリンカーの使用の有無にかかわらず、ロイシンジッパー（Ｋｏｓｔｅｌｎｙ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９２１４８：１５４７－５３；ｄｅ Ｋｒｕｉｆｅｔａｌ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９６ ２７１：７６３０－４）及びＩｇ Ｃ／ＣＨ１ドメイン（Ｍｕｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．４２２：２５９－６４）などの二量体化装置を介して；二特異性抗体（Ｈｏｌｌｉｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．１９９８ ９０：６４４４－８；Ｚｈｕ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＮＹ）１９９６ １４：１９２－６）；Ｆａｂ－ｓｃＦｖ融合（Ｓｃｈｏｏｎｊａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００ １６５：７０５０－７）；及びミニ抗体フォーマット（Ｐａｃｋｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １９９２．３１：１５７９－８４；Ｐａｃｋｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １９９３ １１：１２７１－７）によって、２つの単鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）またはＦａｂフラグメントを遺伝的に融合することによって構築されている（Ｍａｌｌｅｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９４ ２６９：１９９－２０６；Ｍａｃｋｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．１９９５ ９２：７０２１－５；Ｚａｐａｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．１９９５ ８．１０５７－６２）。

【０１５９】

本明細書に開示される四価の二重特異性抗体は、その抗原結合ドメイン、ＣＬドメイン、ＣＨ１ドメイン、ヒンジ領域、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、またはＦｃ領域のうちの１つ以上の間に少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、またはそれ以上のアミノ酸残基のリンカー領域を含む。いくつかの実施形態において、アミノ酸グリシン及びセリンは、リンカー領域内のアミノ酸を構成する。別の実施形態では、リンカーは、ＧＳ（配列番号３１７）、ＧＧＳ（配列番号３１８）、ＧＳＧ（配列番号３１９）、ＳＧＧ（配列番号３２０）、ＧＧＧ（配列番号３２１）、ＧＧＧＳ（配列番号３２２）、ＳＧＧＧ（配列番号３２３）、ＧＧＧＧＳ（配列番号３２４）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番号３２５）、ＧＧＧＧＳＧＳ（配列番

号３２６）、ＧＧＧＧＳＧＧＳ（配列番号３２７）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３２８）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３２９）、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲ（配列番号３３０）、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号３３１）、ＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３３２）、ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３３３）、ＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号３３４）、ＳＡＫＴＴＰ（配列番号３３５）、ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３３６）、ＲＡＤＡＡＰ（配列番号３３７）、ＲＡＤＡＡＰＴＶＳ（配列番号３３８）、ＲＡＤＡＡＡＡＧＧＰＧＳ（配列番号３３９）、ＲＡＤＡＡＡＡ（G_4S）$_4$（配列番号３４０）、ＳＡＫＴＴＰ（配列番号３４１）、ＳＡＫＴＴＰＫＬＧＧ（配列番号３４２）、ＳＡＫＴＴＰＫＬＥＥＧＥＦＳＥＡＲＶ（配列番号３４３）、ＡＤＡＡＰ（配列番号３４４）、ＡＤＡＡＰＴＶＳＩＦＰＰ（配列番号３４５）、ＴＶＡＡＰ（配列番号３４６）、ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ（配列番号３４７）、ＱＰＫＡＡＰ（配列番号３４８）、ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰ（配列番号３４９）、ＡＫＴＴＰＰ（配列番号３５０）、ＡＫＴＴＰＰＳＶＴＰＬＡＰ（配列番号３５１）、ＡＫＴＴＡＰ（配列番号３５２）、ＡＫＴＴＡＰＳＶＹＰＬＡＰ（配列番号３５３）、ＡＳＴＫＧＰ（配列番号３５４）、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰ（配列番号３５５）、ＧＥＮＫＶＥＹＡＰＡＬＭＡＬＳ（配列番号３５６）、ＧＰＡＫＥＬＴＰＬＫＥＡＫＶＳ（配列番号３５７）、及びＧＨＥＡＡＡＶＭＱＶＱＹＰＡＳ（配列番号３５８）、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい（ＷＯ２００７／０２４７１５を参照）。

【０１６０】

二量体化特異的アミノ酸

一実施形態では、多重特異性抗体は少なくとも１つの二量体化特異的アミノ酸変化を含む。二量体化特異的アミノ酸変化により、「ｋｎｏｂｓ　ｉｎｔｏ　ｈｏｌｅｓ」の相互作用が生じ、正しい多重特異性抗体の集合が増加する。二量体化特異的アミノ酸は、ＣＨ１ドメインもしくはＣＬドメインまたはそれらの組み合わせ内にあり得る。二量体化特異的アミノ酸は、ＣＨ１ドメインと他のＣＨ１ドメイン（ＣＨ１－ＣＨ１）、及びＣＬドメインと他のＣＬドメイン（ＣＬ－ＣＬ）を対にするために使用され、少なくともＷＯ２０１４０８２１７９、ＷＯ２０１５１８１８０５ファミリー及びＷＯ２０１７０５９５５１の開示で見出すことができる。二量体化特異的アミノ酸は、Ｆｃドメイン内にあってもよく、ＣＨ１またはＣＬドメイン内の二量体化特異的アミノ酸と組み合わされてもよい。一実施形態において、本開示は、少なくとも１つの二量体化特異的アミノ酸対を含む二重特異性抗体を提供する。

【０１６１】

Ｆｃ領域のフレームワークのさらなる改変

さらに他の態様において、少なくとも１つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えて抗体のエフェクター機能を改変することにより、Ｆｃ領域が改変される。例えば、１つ以上のアミノ酸は、抗体がエフェクターリガンドに対する改変された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。親和性が改変されるエフェクターリガンドは、例えば、Ｆｃ受容体または補体のＣ１成分であり得る。このアプローチは、例えば、Ｗｉｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．による米国特許第５，６２４，８２１号及び同第５，６４８，２６０号に記載されている。

【０１６２】

別の態様において、抗体が改変されたＣ１ｑ結合及び／または低減もしくは消失された補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を有するように、１つ以上のアミノ酸残基が、１つ以上の異なるアミノ酸残基に置き換えられ得る。このアプローチについては、例えば、Ｉｄｕｓｏｇｉｅ　ｅｔ　ａｌ．による米国特許第６，１９４，５５１号に記載されている。

【０１６３】

さらに別の態様において、１つ以上のアミノ酸残基が変更され、それにより、補体を固定する抗体の能力が改変される。このアプローチは、例えば、Ｂｏｄｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．による公開第ＷＯ９４／２９３５１号に記載される。特定の態様において、本開示の抗体またはその抗原結合フラグメントの１つ以上のアミノ酸は、ＩｇＧ１サブクラス及びカ

ッパアイソタイプについての１つ以上のアロタイプのアミノ酸残基によって置き換えられる。アロタイプのアミノ酸残基には、限定されないが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ３サブクラスの重鎖の定常領域、ならびにＪｅｆｆｅｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＭＡｂ．１：３３２－３３８（２００９）によって記述されるカッパアイソタイプの軽鎖の定常領域も含まれる。

【０１６４】

別の態様では、Ｆｃ領域は、１つ以上のアミノ酸を修飾することによって、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を媒介する抗体の能力を増加させるため、及び／またはＦｃγ受容体に対する抗体の親和性を増加させるために修飾される。このアプローチは、例えば、Ｐｒｅｓｔａによる公開ＷＯ００／４２０７２に記載されている。さらに、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、ＦｃγＲＩＩＩ及びＦｃＲｎについてのヒトＩｇＧ１上の結合部位がマッピングされ、結合が改善された変異体が記載されている（Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：６５９１－６６０４，２００１を参照）。

【０１６５】

さらに別の態様では、多重特異性抗体のグリコシル化が修飾される。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる（すなわち、抗体はグリコシル化が欠如しているか、グリコシル化が低下している）。グリコシル化を変更して、例えば「抗原」に対する抗体の親和性を高めることができる。このような炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内のグリコシル化の１つ以上の部位を変更することによって達成することができる。例えば、１つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位の除去をもたらす１つ以上のアミノ酸置換を行うことができ、それによってその部位でのグリコシル化が除去される。このような非グリコシル化により、抗原に対する抗体の親和性を高めることができる。このようなアプローチは、例えば、Ｃｏ　ｅｔ　ａｌ．による米国特許第５，７１４，３５０号及び同第６，３５０，８６１号に記載されている。

【０１６６】

さらに、または代わりに、フコシル残基の量が減少した低フコシル化抗体または増加した二分ＧｌｃＮａｃ構造を有する抗体など、改変されたタイプのグリコシル化を有する抗体を作製することができる。このような改変されたグリコシル化パターンは、抗体のＡＤＣＣ能力を増加させることが実証されている。このような炭水化物修飾は、例えば、グリコシル化経路が改変された宿主細胞内で抗体を発現させることによって達成することができる。グリコシル化経路が改変された細胞は当該技術分野で記載されており、組換え抗体を発現させてグリコシル化が改変された抗体を産生する宿主細胞として使用することができる。例えば、Ｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．によるＥＰ１，１７６，１９５には、そのような細胞株で発現される抗体が低フコシル化を示すように、フコシルトランスフェラーゼをコードする機能的に破壊されたＦＵＴ８遺伝子を有する細胞株が記載されている。Ｐｒｅｓｔａによる公開ＷＯ０３／０３５８３５には、Ａｓｎ（２９７）結合炭水化物にフコースを結合する能力が低下した変異型ＣＨＯ細胞株、Ｌｅｃｌ３細胞が記載されており、これはその宿主細胞内で発現される抗体の低フコシル化ももたらす（Ｓｈｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３－２６７４０をも参照）。Ｕｍａｎａ　ｅｔ　ａｌ．によるＷＯ９９／５４３４２は、操作された細胞株で発現される抗体が二分ＧｌｃＮａｃ構造の増加を示すように、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（１，４）－ＮアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように操作された細胞株を記載しており、その結果、抗体のＡＤＣＣ活性が増加する（Ｕｍａｎａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：１７６－１８０，１９９９をも参照）。

【０１６７】

別の態様において、ＡＤＣＣの低減が所望される場合、ヒト抗体サブクラスＩｇＧ４は、多くの以前の報告において、適度なＡＤＣＣのみを有し、ＣＤＣエフェクター機能をほとんど有しないことが示された（Ｍｏｏｒｅ　ＧＬ，ｅｔ　ａｌ．，２０１０　ＭＡｂｓ，２：１８１－１８９）。しかしながら、天然のＩｇＧ４は、酸性緩衝液中または昇温中

などのストレス条件において安定性が低いことが見出された（Ａｎｇａｌ，Ｓ．１９９３ Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，３０：１０５－１０８；Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ，Ｗ．ｅｔ ａｌ．，１９９８ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３７：９２６６－９２７３；Ａａｌｂｅｒｓｅ ｅｔ ａｌ．，２００２ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１０５：９－１９）。低減されたＡＤＣＣは、抗体を、ＦｃγＲ結合またはＣ１ｑ結合活性を低減する改変の組み合わせによって操作されたＩｇＧ４ Ｆｃに動作可能に結合し、それによってＡＤＣＣ及びＣＤＣエフェクター機能を低減または排除することによって達成することができる。生物学的薬としての抗体の物理化学的特性を考慮すると、ＩｇＧ４のより望ましくない内在的特性の１つは、溶液中におけるその２つの重鎖を動的に分離して半分の抗体を形成することであり、これにより、「Ｆａｂアーム交換」と呼ばれるプロセスを介してインビボで二重特異性抗体が生成される（Ｖａｎ ｄｅｒ Ｎｅｕｔ Ｋｏｌｆｓｃｈｏｔｅｎ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，２００７ Ｓｃｉｅｎｃｅ，３１７：１５５４－１５７）。２２８位（ＥＵ番号付けシステム）におけるセリンのプロリンへの突然変異は、ＩｇＧ４重鎖分離に対して阻害されるように見えた（Ａｎｇａｌ，Ｓ．１９９３ Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，３０：１０５－１０８；Ａａｌｂｅｒｓｅ ｅｔ ａｌ．，２００２ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１０５：９－１９）。ヒンジ及びγＦｃ領域のアミノ酸残基のいくつかは、Ｆｃγ受容体との抗体相互作用に影響を与えることが報告されている（Ｃｈａｐｐｅｌ Ｓ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，１９９１ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：９０３６－９０４０；Ｍｕｋｈｅｒｊｅｅ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，１９９５ ＦＡＳＥＢ Ｊ，９：１１５－１１９；Ａｒｍｏｕｒ，Ｋ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．，１９９９ Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２９：２６１３－２６２４；Ｃｌｙｎｅｓ，Ｒ．Ａ．ｅｔ ａｌ，２０００ Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，６：４４３－４４６；Ａｒｎｏｌｄ Ｊ．Ｎ．，２００７ Ａｎｎｕ Ｒｅｖ ｉｍｍｕｎｏｌ，２５：２１－５０）。さらに、ヒト集団において稀に生じるいくつかのＩｇＧ４アイソフォームはまた、異なる物理化学的特性を誘発することができる（Ｂｒｕｓｃｏ，Ａ． ｅｔ ａｌ．，１９９８ Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ，２５：３４９－５５；Ａａｌｂｅｒｓｅ ｅｔ ａｌ．，２００２ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１０５：９－１９）。低いＡＤＣＣ及びＣＤＣを有するが良好な安定性を有する多重特異性抗体を生成するために、ヒトＩｇＧ４のヒンジ及びＦｃ領域を修飾し、いくつかの改変を導入することが可能である。これらの修飾ＩｇＧ４ Ｆｃ分子は、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．による米国特許第８，７３５，５５３号の配列番号８３～８８に見出すことができる。

【０１６８】

抗体産生

抗体及びその抗原結合フラグメントは、抗体四量体の組換え発現、化学合成、及び酵素消化を含むがこれらに限定されない、当技術分野で知られている任意の手段によって産生することができ、一方、完全長モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマまたは組換え生産によって得ることができる。組換え発現は、当該技術分野で既知の任意の適切な宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞などに由来し得る。

【０１６９】

本開示はさらに、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載の相補性決定領域を含む重鎖または軽鎖可変領域またはセグメントをコードするポリヌクレオチドを提供する。いくつかの態様では、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１６、配列番号３３、配列番号５０、配列番号６１、配列番号７１、配列番号７６、配列番号８５、及び配列番号８７からなる群から選択されるポリヌクレオチドと少なくとも８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の核酸配列同一性を有する。いくつかの態様では、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１７、配列番号３４、または配列番号５１からなる群から選択されるポリヌクレオチドと少なくとも８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％の核酸配列同一性を有する。

【０１７０】
本開示のポリヌクレオチドは、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体の可変領域配列をコードすることができる。本開示のポリヌクレオチドは、抗体の可変領域と定常領域の両方をコードすることもできる。ポリヌクレオチド配列のいくつかは、例示された抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体の重鎖及び軽鎖の両方の可変領域を含むポリペプチドをコードする。
【０１７１】
本開示において、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体を生成するための発現ベクター及び宿主細胞も提供される。発現ベクターの選択は、ベクターが発現される意図された宿主細胞に依存する。典型的には、発現ベクターは、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体鎖または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されるプロモーター及び他の調節配列（例えば、エンハンサー）を含有する。いくつかの態様において、誘導性プロモーターは、誘導条件の制御下にある場合以外に挿入された配列の発現を防止するために使用される。誘導性プロモーターとしては、例えば、アラビノース、ｌａｃＺ、メタロチオネインプロモーター、または熱ショックプロモーターが挙げられる。形質転換された生物の培養物は、発現産物が宿主細胞によってより良好に許容されるコード配列のために集団を偏らせることなく、非誘導条件下で増やすことができる。プロモーターに加えて、他の調節エレメントも、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体または抗原結合フラグメントの効率的な発現のために必要とされ、または所望され得る。これらのエレメントは、典型的には、ＡＴＧ開始コドン及び隣接リボソーム結合部位または他の配列を含む。加えて、発現の効率は、使用中の細胞系に適切なエンハンサーを含めることによって高めることができる（例えば、Ｓｃｈａｒｆ ｅｔ ａｌ．，Ｒｅｓｕｌｔｓ Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒ．２０：１２５，１９９４；及びＢｉｔｔｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５３：５１６，１９８７を参照）。例えば、ＳＶ４０エンハンサーまたはＣＭＶエンハンサーを使用して、哺乳類宿主細胞における発現を増加させることができる。
【０１７２】
抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体鎖を保有及び発現するための宿主細胞は、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。Ｅ．ｃｏｌｉは、本開示のポリヌクレオチドのクローニング及び発現に有用な１つの原核宿主である。使用に適した他の微生物宿主としては、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓなどの桿菌、及びＳａｌｍｏｎｅｌｌａ、Ｓｅｒｒａｔｉａ、及び種々のＰｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ種などの他の腸内細菌科が挙げられる。これらの原核宿主において、発現ベクターを作製することもでき、これは典型的には、宿主細胞（例えば、複製起点）に適合する発現制御配列を含有する。加えて、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター系、ベータラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダ由来のプロモーター系など、任意の数の様々な既知のプロモーターが存在するであろう。プロモーターは、典型的には、任意選択的にオペレーター配列によって発現を制御し、転写及び翻訳を開始及び完了するための、リボソーム結合部位配列などを有する。酵母などの他の微生物も、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体を発現するために使用することができる。バキュロウイルスベクターと組み合わせた昆虫細胞も使用することができる。他の態様において、哺乳動物宿主細胞を使用して、本開示の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体を発現及び産生する。例えば、それらは、内因性免疫グロブリン遺伝子を発現するハイブリドーマ細胞株、または外因性発現ベクターを有する哺乳動物細胞株であり得る。これらには、任意の正常な致死または正常もしくは異常な不死の動物またはヒト細胞が含まれる。例えば、ＣＨＯ細胞株、様々なＣＯＳ細胞株、ＨＥＫ２９３細胞、骨髄腫細胞株、形質転換Ｂ細胞、及びハイブリドーマを含む、インタクトな免疫グロブリンを分泌することができるいくつかの好適な宿主細胞株が開発されている。ポリペプチドを発現するための哺乳類組織細胞培養物の使用は、概して、例えば、Ｗｉｎｎａｃｋｅｒ，Ｆｒｏｍ Ｇｅｎｅｓ ｔｏ Ｃｌｏｎｅｓ，ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．，１９８７において議論される。哺乳類宿主細胞の発現ベクターは、複製起点、プロモーター、及びエンハンサーなどの発現制御配列（例えば、Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．８９：４９－６８，１９８６を参照されたい）、ならびにリボソーム結

合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列などの必要なプロセシング情報部位を含むことができる。これらの発現ベクターは、通常、哺乳動物遺伝子または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含有する。好適なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、ステージ特異的、及び／または調節可能（ｍｏｄｕｌａｔａｂｌｅ）もしくは調節可能（ｒｅｇｕｌａｔａｂｌｅ）であり得る。有用なプロモーターとしては、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性ＭＭＴＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＭＲＰｐｏｌＩＩＩプロモーター、構成的ＭＰＳＶプロモーター、テトラサイクリン誘導性ＣＭＶプロモーター（ヒト最初期ＣＭＶプロモーターなど）、構成的ＣＭＶプロモーター、及び当該技術分野において知られているプロモーター－エンハンサーの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７３】

二重特異性抗体の産生

操作されたヘテロ二量体抗体Ｆｃドメインの現在の標準は、コアＣＨ３ドメイン界面に突然変異を導入したｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ（ＫｉＨ）設計である。得られたヘテロダイマーは、低下したＣＨ３溶融温度（６９℃以下）を有する。対照的に、ＺＷヘテロ二量体Ｆｃ設計は８１．５℃の熱安定性を有し、これは野生型ＣＨ３ドメインに匹敵する。

【０１７４】

検出及び診断方法

本開示の抗体または抗原結合フラグメントは、ＣＥＡの検出方法を含むがこれらに限定されない様々な用途において有用である。一態様では、抗体または抗原結合フラグメントは、生体試料中のＣＥＡの存在の検出に有用である。本明細書で使用される「検出すること」という用語は、定量または定性検出を含む。ある特定の態様では、生物学的試料は、細胞または組織を含む。他の態様では、かかる組織は、他の組織と比較して高レベルでＣＥＡを発現する正常な組織及び／またはがん性組織を含む。

【０１７５】

一態様において、本開示は、生体試料中のＣＥＡの存在を検出する方法を提供する。ある特定の態様において、この方法は、生体試料と、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体とを、抗原に抗体が結合することを許容する条件下で接触させることと、複合体が抗体と抗原との間で形成されるかどうかを検出することと、を含む。生体試料は、尿、組織、痰、または血液サンプルを含み得るが、これらに限定されない。

【０１７６】

また、ＣＥＡの発現に関連する障害を診断する方法も含まれる。特定の態様では、この方法は、試験細胞を抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体と接触させることと、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体のＣＥＡポリペプチドへの結合を検出することによって、試験細胞によって発現されるＣＥＡの発現レベル（定量的または定性的のいずれか）を決定することと、試験細胞による発現レベルを、対照細胞（例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞または非ＣＥＡ発現細胞）におけるＣＥＡ発現レベルと比較することとを含み、ここで、対照細胞と比較して試験細胞におけるＣＥＡ発現の高いレベルは、ＣＥＡの発現に関連する障害の存在を示す。

【０１７７】

治療方法

本開示の抗体または抗原結合フラグメントは、ＣＥＡ関連障害または疾患の治療方法を含むがこれらに限定されない様々な用途において有用である。一態様では、ＣＥＡ関連障害または疾患はがんである。

【０１７８】

一態様において、本開示は、がんの治療方法を提供する。ある特定の態様において、方法は、有効量の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体または抗原結合フラグメントを必要とする患者に投与することを含む。がんとしては、胃癌、結腸癌、膵臓癌、乳癌、頭頸部癌、腎臓癌

、肝臓癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、皮膚癌、中皮腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫及び肉腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７９】

本明細書に開示される抗体または抗原結合フラグメントは、非経口、肺内、及び鼻腔内を含む任意の好適な手段によって投与することができ、所望の場合、局所治療、病変内投与を含む。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、投与が短期であるか、または長期であるかに部分的に依存して、任意の適した経路、例えば、静脈内または皮下注射などの注入によることができる。限定されないが、様々な時点での単回または複数回投与、ボーラス投与、及びパルス注入を含む様々な投薬スケジュールが本明細書において企図される。

【０１８０】

本開示の抗体または抗原結合フラグメントは、グッドメディカルプラクティス（ｇｏｏｄ　ｍｅｄｉｃａｌ　ｐｒａｃｔｉｃｅ）と一致した様式で製剤化、投薬、及び投与することができる。この文脈における考慮の要因には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、及び医療従事者に既知の他の要因が含まれる。抗体は、必ずしもそうである必要はないが、任意選択的に、問題の障害を予防または治療するために現在使用されている１つ以上の薬剤と共に製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または治療の種類、及び上で考察される他の要因に左右される。これらは、一般に、本明細書に記載されるのと同じ投薬量、投与経路により、または本明細書に記載される投薬量の約１～９９％、または適切であると経験的／臨床的に決定される任意の投薬量で、任意の経路によって、使用される。

【０１８１】

疾患の予防または治療のため、本開示の抗体または抗原結合フラグメントの適切な投与量は、治療される疾患の種類、抗体の種類、その疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、これまでの治療法、患者の臨床歴及び抗体への反応、ならびに主治医の判断に応じて異なる。抗体は好適に、１回で、または一連の治療にわたって患者に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、１回以上の別個の投与によるものであれ、連続注入によるものであれ、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの抗体が、患者への投与のための初期候補投薬量であり得る。１つの典型的な１日投薬量は、上述の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲であり得る。病態に依存する、数日間またはより長い日数にわたる反復投与について、治療は、一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続されるであろう。かかる用量は、間欠的に、例えば、毎週または３週間に１回（例えば、患者が約２～約２０回、または例えば約６回用量の抗体を受けるように）投与され得る。最初により高い負荷用量、続いて１つ以上のより低い用量を投与することができる。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であり得る。この治療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

【０１８２】

併用療法

一態様において、本開示の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体は、他の治療剤と併用することができる。本開示の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体と共に使用することができる他の治療剤としては、化学療法剤（例えば、パクリタキセルまたはパクリタキセル剤（例えば、Ａｂｒａｘａｎｅ（登録商標））、ドセタキセル、カルボプラチン、トポテカン、シスプラチン、イリノテカン、ドキソルビシン、レナリドミド、５－アザシチジン、イホスファミド、オキサリプラチン、ペメトレキセド二ナトリウム、シクロホスファミド、エトポシド、デシタビン、フルダラビン、ビンクリスチン、ベンダムスチン、クロラムブシル、ブスルファン、ゲムシタビン、メルファラン、ペントスタチン、ミトキサントロン、ペメトレキセド二ナトリウム）、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、ＥＧＦＲ阻害剤（例えば、エルロチニブ）、マルチキナーゼ阻害剤（例えば、ＭＧＣＤ２６５、ＲＧＢ－２８６６３８）、ＣＤ－２０標的化剤（例えば、リツキシマブ、オファツムマブ、ＲＯ５０７２７５９、ＬＦ

Ｂ－Ｒ６０３）、ＣＤ５２標的化剤（例えば、アレムツズマブ）、プレドニソロン、ダルベポエチンアルファ、レナリドミン、Ｂｃｌ－２阻害剤（例えば、オブリメルセンナトリウム）、オーロラキナーゼ阻害剤（例えば、ＭＬＮ８２３７、ＴＡＫ－９０１）、プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ）、ＣＤ－１９標的化剤（例えば、ＭＥＤＩ－５５１、ＭＯＲ２０８）、ＭＥＫ阻害剤（例えば、ＡＢＴ－３４８）、ＪＡＫ－２阻害剤（例えば、ＩＮＣＢ０１８４２４）、ｍＴＯＲ阻害剤（例えば、テムシロリムス、エベロリムス）、ＢＣＲ／ＡＢＬ阻害剤（例えば、イマチニブ）、ＥＴ－Ａ受容体アンタゴニスト（例えば、ＺＤ４０５４）、ＴＲＡＩＬ受容体２（ＴＲ－２）アゴニスト（例えば、ＣＳ－１００８）、ＥＧＥＮ－００１、Ｐｏｌｏ様キナーゼ１阻害剤（例えば、ＢＩ　６７２）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１８３】

本開示の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体は、他の治療薬、例えば免疫チェックポイント抗体と併用することができる。このような免疫チェックポイント抗体には、抗ＰＤ１抗体が含まれ得る。抗ＰＤ１抗体としては、限定されないが、チスレリズマブ、ペンブロリズマブまたはニボルマブを挙げることができる。チスレリズマブは、ＵＳ８，７３５，５５３に開示されている。ペムブロリズマブ（旧名ＭＫ－３４７５）は、ＵＳ８，３５４，５０９及びＵＳ８，９００，５８７において開示されており、ＰＤ１受容体を標的とし、ＰＤ１受容体リガンドＰＤ－Ｌ１及びＰＤ－Ｌ２の結合を阻害するヒト化ＩｇＧ４－Ｋ免疫グロブリンである。ペムブロリズマブは、転移性黒色腫及び転移性非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の適応症について承認されており、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）及び難治性ホジキンリンパ腫（ｃＨＬ）の治療について臨床研究されている。ニボルマブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｅｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂによって開示）は、完全ヒトＩｇＧ４－Ｋモノクローナル抗体である。ニボルマブ（クローン５Ｃ４）は、米国特許第ＵＳ８，００８，４４９号及びＷＯ２００６／１２１１６８に開示されている。ニボルマブは、黒色腫、肺癌、腎臓癌、及びホジキンリンパ腫の治療に承認されている。

【０１８４】

抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体と組み合わせる他の免疫チェックポイント抗体には、抗ＴＩＧＩＴ抗体が含まれ得る。このような抗ＴＩＧＩＴ抗体は、限定されないが、ＷＯ２０１９／１２９２６１に開示されている抗ＴＩＧＩＴ抗体を含むことができる。

【０１８５】

薬学的組成物及び製剤

また、抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体もしくは抗原結合フラグメントをコードする配列を含むポリヌクレオチドを含む、薬学的製剤を含む組成物も提供される。特定の実施形態では、組成物は、１つ以上の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体もしくは抗原結合フラグメント、または１つ以上の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体もしくは抗原結合フラグメントをコードする配列を含む１つ以上のポリヌクレオチドを含む。これらの組成物は、当該技術分野で周知である、緩衝液を含む薬学的に許容される賦形剤などの好適な担体をさらに含むことができる。

【０１８６】

本明細書に記載される抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体または抗原結合フラグメントの薬学的製剤は、所望される程度の純度を有するそのような抗体または抗原結合フラグメントと、１つ以上の任意選択の薬学的に許容される担体とを混合すること（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　１６ｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０））によって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、使用される投薬量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、以下を含むが、これらに限定されない：リン酸、クエン酸、及び他の有機酸等の緩衝剤、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤、保存剤（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、ベンザルコニウムクロリド、ベンゼトニウムクロリド、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール、メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シ

クロヘキサノール、３－ペンタノール、及びｍ－クレゾール）、低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド、タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン、ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー、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、またはリジン等のアミノ酸、単糖類、二糖類、及びグルコース、マンコース、またはデキストリンを含む他の炭化水素、ＥＤＴＡ等のキレート剤、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等の糖、ナトリウム等の塩形成カウンターイオン、金属複合体（例えば、Ｚｎ－タンパク質複合体）、及び／またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体として、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（ｓＨＡＳＥＧＰ）、例えば、ヒト可溶性ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、ｒＨｕＰＨ２０（ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）、Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．）などの間質性薬物分散剤がさらに含まれる。ｒＨｕＰＨ２０を含む、ある特定の例示的なｓＨＡＳＥＧＰ及び使用方法は、米国特許第ＵＳ７，８７１，６０７号及び同第２００６／０１０４９６８号に記載されている。一態様において、ｓＨＡＳＥＧＰは、コンドロイチナーゼなどの１つ以上のさらなるグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【０１８７】

一実施形態では、製剤は、Ｌ－ヒスチジン／Ｌ－ヒスチジン塩酸塩一水和物、トレハロース、及びポリソルベート２０から構成される。別の実施形態において、注射用滅菌水で構成した後の抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体医薬品の濃度は、１０ｍｇ／ｍＬの抗ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体、２０ｍＭのヒスチジン／ヒスチジンＨＣｌ、２４０ｍＭのトレハロース二水和物、及び０．０２％ポリソルベート２０、ｐＨ約５．５からなる等張溶液である。

【０１８８】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第６，２６７，９５８号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第６，１７１，５８６号及びＷＯ２００６／０４４９０８に記載されるものを含み、後者の製剤は、ヒスチジン－アセテート緩衝液を含む。

【０１８９】

持続放出製剤を調製することができる。徐放性調製物の好適な例としては、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、これらのマトリックスは、成形物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。

【０１９０】

インビボ投与のために使用される製剤は、一般に滅菌されている。滅菌性は、例えば、滅菌濾過膜を介した濾過によって容易に達成され得る。

【実施例】

【０１９１】

実施例１：抗ＣＥＡモノクローナル抗体の生成

免疫化及び結合アッセイ用のＣＥＡ組換えタンパク質

ドメインＢ３（配列番号８８のアミノ酸５９６～６７４、Ｂｅａｕｃｈｅｍｉｎ ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏ．，１９８７，７（９）：３３２１－３３３０）を参照）を含む膜周辺領域においてヒト及びＭａｃａｃａ ｍｕｌａｔｔａ ＣＥＡの両方と交差反応するが他のヒトＣＥＡＣＡＭメンバーとのオフターゲット結合を起こさない、ＣＥＡに対する新規抗体を発見するために、抗体スクリーニング用にいくつかの組換えタンパク質が設計され、発現された（表３を参照）。

【０１９２】

全長ヒトＣＥＡ（配列番号８８）、Ｍａｃａｃａ ＣＥＡ（配列番号８９）、及び全長ヒトＣＥＡＣＡＭ６（配列番号９０）のｃＤＮＡコード領域は、ＧｅｎＢａｎｋ配列に基づいて配列された。ヒトＣＥＡ（受託番号：ＮＭ＿００４３６３．２）の場合、遺伝子はＳｉｎｏｂｉｏ（カタログ番号ＨＧ１１０７７－ＵＴ）から入手できる。Ｍａｃａｃａ ＣＥＡ（受託番号：ＮＭ＿００１０４７１２５）の場合、遺伝子はＧｅｎｓｃｒｉｐｔ（カタログ番号ＯＭｂ２３８６５Ｄ）から入手できる。ヒトＣＥＡＣＡＭ６（受託番号：Ｎ

Ｍ＿００２４８３．４）の場合、遺伝子はＳｉｎｏｂｉｏ（カタログ番号ＨＧ１０８２３－ＵＴ）から入手できる。ＣＥＡ融合タンパク質の概略図を図１に示す。ヒトＣＥＡのスプライス変異体が腫瘍上で完全長ＣＥＡと同時に発現することが報告されており（Ｐｅｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，ＰｌｏＳ　ｏｎｅ，７，ｅ３６４１２－ｅ３６４１２（２０１２））、変異体（ＣＥＡ－ｖ）はそれに応じて調製された。この構築物を生成するために、ｈｕＣＥＡのアミノ酸（ＡＡ）１～６８７（配列番号９１）からなる細胞外ドメイン（ＥＣＤ）のコード領域、サルＣＥＡのアミノ酸（ＡＡ）１～６９０（配列番号９２）の領域、及びＣＥＡＣＡＭ６のアミノ酸（ＡＡ）１～３２０（配列番号９３）の領域をＰＣＲ増幅した。ＣＥＡのアミノ酸（ＡＡ）１～７８（配列番号９４）及びＣＥＡのアミノ酸３９８～６８７（配列番号９５）の領域をＰＣＲ増幅し、次いでオーバーラップＰＣＲによって結合させてＣＥＡ変異体（ＣＥＡ－ｖ）（配列番号９６）を作製した。あるいは、ＣＥＡＣＡＭ６アミノ酸（ＡＡ）１～２７３（配列番号９７）の領域、及びＣＥＡアミノ酸（ＡＡ）５９６～６８７（配列番号９８）のドメインＢ３を含む膜周辺領域は、ＰＣＲ増幅し、次いでオーバーラップＰＣＲによって結合させてキメラ構築物（ＣＨＩＭ）（配列番号９９）を作製した。次に、すべての構築物を、６ｘＨｉｓタグと融合したＣ末端を持つｐｃＤＮＡ３．１ベースの発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）に個別にクローニングし、ＣＥＡ、サルＣＥＡ、ＣＥＡＣＡＭ６、ＣＥＡ－ｖ、及びＣＨＩＭの５つの組換え融合タンパク質発現プラスミドが得られた。組換え融合タンパク質の生産では、ＣＥＡ、サルＣＥＡ、ＣＥＡＣＡＭ６、ＣＥＡ－ｖ、及びＣＨＩＭプラスミドをＨＥＫ２９３ベースの哺乳類細胞発現システム（インハウスで生成）に一時的にトランスフェクションし、回転シェーカーを備えたCO_2インキュベーターで５～７日間培養した。組換えタンパク質を含む上清を収集し、遠心分離によって除去した。組換えタンパク質は、Ｎｉ－ＮＴＡアガロース（カタログ番号Ｒ９０１１５、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して精製した。すべての組換えタンパク質はリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）に対して透析し、少量ずつアリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０１９３】

細胞株での安定した発現

全長ヒトＣＥＡ（受託番号：ＮＭ＿００４３６３．２）を発現する安定した細胞株を確立するために、ＣＥＡを発現するｃＤＮＡをレトロウイルスベクターｐＦＢ－Ｎｅｏ（カタログ番号２１７５６１、Ａｇｉｌｅｎｔ，ＵＳＡ）にクローニングした。デュアルトロピックレトロウイルスベクターは、以前のプロトコールに従って生成した（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｌｏｏｄ．２００５　１０６（５）：１５４４－５１）。ヒトＣＥＡ発現細胞株を生成するために、ヒトＣＥＡを含むウイルスベクターをＬ９２９（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡ）及びＣＴ２６細胞（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡ）に形質導入した。高発現細胞株は、Ｇ４１８を含む１０％ＦＢＳを含有する完全ＲＰＭＩ１６４０培地で培養することによって選択され、次いでＦＡＣＳ結合アッセイによって検証した。

【０１９４】

免疫化、ハイブリドーマ融合及びクローニング

８～１２週齢のＢａｌｂ／ｃマウス（ＨＦＫ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ　ＣＯ．，ＬＴＤ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）を、水溶性アジュバント（カタログ番号ＫＸ０２１００４１、ＫａｎｇＢｉＱｕａｎ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）の有無にかかわらず、５００μｌの1×10^7個のＬ９２９／ｈｕＣＥＡ細胞で腹腔内（ｉ．ｐ．）免疫した。抗体産生を促進するために、この手順を２週間後に繰り返した。３回目の免疫化の２週間後、マウス血清をＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳによって可溶性ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）結合について評価した。脾細胞を単離し、標準技術（Ｃｏｌｌｉｇａｎ　ＪＥ，ｅｔ　ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ　ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ　ＩＮ　ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＹ，１９９３）を用いてマウス骨髄腫細胞株ＳＰ２／０細胞（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ，ＵＳＡ）に融合した。

【０１９５】

ＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳによる抗体のＣＥＡ結合活性の評価

ヒトＣＥＡには結合するがＣＥＡＣＡＭ６またはｓＣＥＡには結合しない抗体をスクリーニングするために、ＣＨＩＭには結合するがｓＣＥＡ、ＣＥＡＣＡＭ６及びＣＥＡ－ｖには結合しない抗体、ならびにＣＨＩＭ、ｓＣＥＡ及びＣＥＡ－ｖには結合するがＣＥＡＣＡＭ６には結合しない抗体をスクリーニング及びカウンタースクリーニングした。ハイブリドーマクローンの上清を、（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（２００７）３７８：３３－５２）に記載されているようにＥＬＩＳＡによって最初にスクリーニングし、いくつかの変更を加えた。簡単に説明すると、ｓＣＥＡ、ＣＨＩＭ、ＣＥＡＣＡＭ６、またはＣＥＡ－ｖを３μｇ／ｍｌの低濃度で９６ウェルプレートに個別にコーティングした。ＨＲＰ結合抗マウスＩｇＧ抗体（カタログ番号７０７６Ｓ、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ＵＳＡ）及び基質（カタログ番号００－４２０１－５６、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＵＳＡ）を開発に使用し、波長４５０ｎｍの吸光度シグナルを、プレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｐａｒａｄｉｇｍ（商標），Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，ＵＳＡ）を使用して測定した。ＥＬＩＳＡ陽性クローンは、Ｌ９２９／ｈｕＣＥＡ及び／またはＭＫＮ４５細胞（ＡＴＣＣ）を使用してＦＡＣＳによってさらに検証された。ＭＫＮ４５細胞はヒト胃癌由来である。ＣＥＡ発現細胞（10^5細胞／ウェル）をＥＬＩＳＡ陽性ハイブリドーマ上清と共にインキュベートし、続いてＡｌｅｘａ Ｆｌｕｒｏ－６４７標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（カタログ番号Ａ０４７３、Ｂｅｙｏｔｉｍｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｃｈｉｎａ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。

【０１９６】

ＦＡＣＳスクリーニングにおいて陽性シグナルを示し、ＣＥＡＣＡＭ６及びｓＣＥＡには結合しないがＣＨＩＭには結合するハイブリドーマからの馴化培地を機能アッセイに供して、ＣＥＡ発現細胞へのＣＥＡ抗体の結合におけるｓＣＥＡの存在を評価した（以下の実施例を参照）。所望の結合特異性及び機能活性を備えた抗体をさらにサブクローニングし、特性付けた。

【０１９７】

ハイブリドーマのサブクローニング及び無血清培地または低血清培地への適応

主にＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、及び機能アッセイによるスクリーニングの後、陽性ハイブリドーマクローンを限界希釈法によってサブクローニングした。機能アッセイを通じて検証された上位の抗体サブクローンは、３％ＦＢＳを含むＣＤＭ４ＭＡｂ培地（カタログ番号ＳＨ３０８０１．０２、Ｈｙｃｌｏｎｅ，ＵＳＡ）での増殖に適応された。

【０１９８】

モノクローナル抗体の発現及び精製

ハイブリドーマ細胞をＣＤＭ４ＭＡｂ培地（カタログ番号ＳＨ３０８０１．０２、Ｈｙｃｌｏｎｅ）で培養し、CO_2インキュベーター内で３７℃で５～７日間インキュベートした。精製前に、遠心分離及び０．２２μｍの膜を通過させる濾過によって馴化培地を収集した。マウス抗体を含む上清を適用し、製造元ガイドのプロトコールに従ってプロテインＡカラム（カタログ番号１７１２７９０１、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に結合させた。この手順により、通常、９０％を超える純度の抗体が得られた。プロテインＡアフィニティー精製抗体をＰＢＳに対して透析するか、ＨｉＬｏａｄ（商標）１６／６０Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）２００カラム（カタログ番号１７５３１８０１、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用してさらに精製して凝集体を除去した。タンパク質濃度は、２８０ｎｍでの吸光度を測定することによって決定した。最終的な抗体調製物は、アリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０１９９】

【表３－１】

表３：アミノ酸配列及び核酸配列

配列番号	構築物	配列
配列番号88	全長ヒトCEA	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREI IYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSN NSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTL TLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRS GENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQA HNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNT TYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNELSV DHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLI DGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPK PSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSN GNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPP DSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGT YACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI
配列番号89	Macaca CEA	MGSPSAPLHRWCIPWQTLLLTASLLTFWNPPTTAQLTIESRPFNVAEGKE VLLLAHNVSQNLFGYIWYKGERVDASRRIGSCVIRTQQITPGPAHSGRETI DFNASLLIHNVTQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFRVYPELPKPYISSN NSNPVEDKDAVALTCEPETQDTTYLWWVNNQSLPVSPRLELSSDNRTLT VFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRRSDPVTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRA GENLNLTCHAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQ AHNSATGLNRTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQD TTYLWWVNNQSLSVSSRLELSNDNRTLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSV RRSDPVTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPAAQYSWF VNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYVEL PKPYISSNNSNPIEDKDAVTLTCEPVAENTTYLWWVNNQSLSVSPRLQLS NGNRILTLLSVTRNDTGPYECGIQNSESAKRSDPVTLNVTYGPDTPIISPPD LSYRSGANLNLSCHSDSNPSPQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNSGAY ACFVSNLATGRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSARATVGIIIGMLVGVAL M
配列番号90	全長ヒトCEACAM6	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLAHNLPQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRE TIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSIS SNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNM TLTLLSVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTLNVLYGPDVPTISPSKAN YRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYM CQAHNSATGLNRTTVTMITVSGSAPVLSAVATVGITIGVLARVALI

【０２００】

【表３－２】

配列番号91	huCEAの1～687	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREI IYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSN NSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTL TLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRS GENLNLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQA HNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNT TYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNELSV DHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLI DGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPK PSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSN GNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPIISPP DSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGT YACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGAHHHHHH
配列番号92	サルCEAの1～690	MGSPSAPLHRWCIPWQTLLLTASLLTFWNPPTTAQLTIESRPFNVAEGKE VLLLAHNVSQNLFGYIWYKGERVDASRRIGSCVIRTQQITPGPAHSGRETI DFNASLLIHNVTQSDTGSYTIQVIKEDLVNEEATGQFRVYPELPKPYISSN NSNPVEDKDAVALTCEPETQDTTYLWWVNNQSLPVSPRLELSSDNRTLT VFNIPRNDTTSYKCETQNPVSVRRSDPVTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRA GENLNLTCHAASNPTAQYFWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQ AHNSATGLNRTTVTAITVYAELPKPYITSNNSNPIEDKDAVTLTCEPETQD TTYLWWVNNQSLSVSSRLELSNDNRTLTVFNIPRNDTTFYECETQNPVSV RRSDPVTLNVLYGPDAPTISPLNTPYRAGENLNLSCHAASNPAAQYSWF VNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYMCQAHNSATGLNRTTVTAITVYVEL PKPYISSNNSNPIEDKDAVTLTCEPVAENTTYLWWVNNQSLSVSPRLQLS NGNRILTLLSVTRNDTGPYECGIQNSESAKRSDPVTLNVTYGPDTPIISPPD LSYRSGANLNLSCHSDSNPSPQYSWLINGTLRQHTQVLFISKITSNNSGAY ACFVSNLATGRNNSIVKNISVSSGDSAPGSSGLSARAHHHHHH
配列番号93	CEACAM6の1～320	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLAHNLPQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRE TIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSIS SNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNM TLTLLSVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTLNVLYGPDVPTISPSKAN YRPGENLNLSCHAASNPPAQYSWFINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYM CQAHNSATGLNRTTVTMITVSGHHHHHH
配列番号94	huCEAの1～78	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREI IYPNASLLIQNIIQN
配列番号95	huCEAの398～687	ELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYS WLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAE LPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQ LSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGPDTPII SPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNN NGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGA

【０２０１】

【表３－３】

配列番号96	CEA-v	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREI IYPNASLLIQNIIQNELSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLS LSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSAS GHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLW WVNGQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSD PVTLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQ HTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAG AHHHHHH
配列番号97	CEACAM6の1～273	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLAHNLPQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRE TIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSIS SNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNM TLTLLSVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTLNVLYGPDVPTIS
配列番号98	huCEAの596～687	PIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPN NNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGA
配列番号99	CHIM	MGPPSAPPCRLHVPWKEVLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKE VLLLAHNLPQNRIGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGPAYSGRE TIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPSIS SNNSNPVEDKDAVAFTCEPEVQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNM TLTLLSVKRNDAGSYECEIQNPASANRSDPVTLNVLYGPDVPTISPIISPPD SSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTY ACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGAHHHHHH
配列番号100	CEACAM1	MGHLSAPLHRVRVPWQGLLLTASLLTFWNPPTTAQLTTESMPFNVAEGK EVLLLVHNLPQQLFGYSWYKGERVDGNRQIVGYAIGTQQATPGPANSG RETIYPNASLLIQNVTQNDTGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYPELPKPS ISSNNSNPVEDKDAVAFTCEPETQDTTYLWWINNQSLPVSPRLQLSNGNR TLTLLSVTRNDTGPYECEIQNPVSANRSDPVTLNVTYGPDTPTISPSDTYY RPGANLSLSCYAASNPPAQYSWLINGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCH ANNSVTGCNRTTVKTIIVTELSPVVAKPQIKASKTTVTGDKDSVNLTCST NDTGISIRWFFKNQSLPSSERMKLSQGNTTLSINPVKREDAGTYWCEVFN PISKNQSDPIMLNVNYNALPQENGLSPGAIAGIVIGVVALVALIAVALACF LHFGKTGSSGPLQ
配列番号101	CEACAM3	MGPPSASPHRECIPWQGLLLTASLLNFWNPPTTAKLTIESMPLSVAEGKE VLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNSLIVGYVIGTQQATPGAAYSGRE TIYTNASLLIQNVTQNDIGFYTLQVIKSDLVNEEATGQFHVYQENAPGLP VGAVAGIVTGVLVGVALVAALVCFLLLAKTGRTSIQRDLKEQQPQALAP GRGPSHSSAFSMSPLSTAQAPLPNPRTAASIYEELLKHDTNIYCRMDHKA EVAS

【０２０２】

【表３－４】

配列番号102	CEACAM7	MGSPSACPYRVCIPWQGLLLTASLLTFWNLPNSAQTNIDVVPFNVAEGK EVLLVVHNESQNLYGYNWYKGERVHANYRIIGYVKNISQENAPGPAHN GRETIYPNGTLLIQNVTHNDAGIYTLHVIKENLVNEEVTRQFYVFSEPPKP SITSNNFNPVENKDIVVLTCQPETQNTTYLWWVNNQSLLVSPRLLLSTDN RTLVLLSATKNDIGPYECEIQNPVGASRSDPVTLNVRYESVQASSPDLSA GTAVSIMIGVLAGMALI
配列番号103	CEACAM8	MGPISAPSCRWRIPWQGLLLTASLFTFWNPPTTAQLTIEAVPSNAAEGKE VLLLVHNLPQDPRGYNWYKGETVDANRRIIGYVISNQQITPGPAYSNRET IYPNASLLMRNVTRNDTGSYTLQVIKLNLMSEEVTGQFSVHPETPKPSISS NNSNPVEDKDAVAFTCEPETQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNGNRT LTLLSVTRNDVGPYECEIQNPASANFSDPVTLNVLYGPDAPTISPSDTYYH AGVNLNLSCHAASNPPSQYSWSVNGTFQQYTQKLFIPNITTKNSGSYAC HTTNSATGRNRTTVRMITVSDALVQGSSPGLSARATVSIMIGVLARVALI

【０２０３】

【表３－５】

配列番号104	全長ヒトCEA DNA	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAG AGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGG CTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTA TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CATCATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAGT CAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACG CAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTC ACAAGAAATGACACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAG TGAGTGCCAGGCGCAGTGATTCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCC CGGATGCCCCCACCATTTCCCCTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGG AAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGT ACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCCACCCAAGAGCTCT TTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGTGGATCCTATACGTGCCAAG CCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGACGATC ACAGTCTATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCATCACCAGCAACAACTC CAACCCCGTGGAGGATGAGGATGCTGTAGCCTTAACCTGTGAACCTG AGATTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATAATCAGAGCCTC CCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGACCCTCAC TCTACTCAGTGTCACAAGGAATGATGTAGGACCCTATGAGTGTGGAA TCCAGAACGAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAAT GTCCTCTATGGCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATACACCTAT TACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAAC CCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACA CACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGAC TCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACT ACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCAT CTCCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCT TCACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTA AATGGTCAGAGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGG CAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCAAGAG CCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCGCAGTGAC CCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCATTTCC CCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGC CACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGG ATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCC AAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGG CCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAA CTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCACTGTCGGCATCATGATTGGAG TGCTGGTTGGGGTTGCTCTGATATAG

【０２０４】

【表３－６】

配列番号105	サルCEA DNA	ATGGGGTCTCCCTCAGCCCCTCTTCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAG ACGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACC ACTGCCCAGCTCACTATTGAATCCAGGCCGTTCAATGTTGCAGAGGG GAAGGAGGTTCTTCTACTTGCCCACAATGTGTCCCAGAATCTTTTTGG CTACATTTGGTACAAGGGAGAAAGAGTGGATGCCAGCCGTCGAATTG GATCATGTGTAATAAGAACTCAACAAATTACCCCAGGGCCCGCACAC AGCGGTCGAGAGACAATAGACTTCAATGCATCCCTGCTGATCCACAA TGTCACCCAGAGTGACACAGGATCCTACACCATACAAGTCATAAAGG AAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTACATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTAACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACA CAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGGAGCTGTCCAGTGACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATAT TCCAAGAAATGACACAACATCCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAG TGAGTGTCAGACGCAGCGACCCAGTCACCCTGAACGTCCTCTATGGC CCGGATGCGCCCACCATTTCCCCTCTAAACACACCTTACAGAGCAGG GGAAAATCTGAACCTCACCTGCCACGCAGCCTCTAACCCAACTGCAC AGTACTTTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCCAGCAATCCACACAAGAGC TCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATAGCGGATCCTATATGTGCC AAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGGCG ATCACAGTCTACGCGGAGCTGCCCAAGCCCTACATCACCAGCAACAA CTCCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTGACCTTAACCTGTGAAC CTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGC CTCTCGGTCAGTTCCAGGCTGGAGCTGTCCAATGACAACAGGACCCT CACTGTATTCAATATTCCAAGAAACGACACAACGTTCTACGAATGTG AGACCCAGAACCCAGTGAGTGTCAGACGCAGCGACCCAGTCACCCTG AATGTCCTCTATGGCCCGGATGCGCCCACCATTTCCCCTCTAAACACA CCTTACAGAGCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTC TAACCCAGCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCCAGCA ATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATAGCG GATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGG ACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTATGTGGAGCTGCCCAAGCCCTA CATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTGA CCTTAACCTGTGAACCTGTGGCTGAGAACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAACAATCAGAGCCTCTCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTCTCCAA TGGCAACAGGATCCTCACTCTACTCAGTGTCACACGGAATGACACAG GACCCTATGAATGTGGAATCCAGAACTCAGAGAGTGCAAAACGCAGT GACCCAGTCACCCTGAATGTCACCTATGGCCCAGACACCCCCATCAT ATCCCCCCCAGACTTGTCTTACCGTTCGGGAGCAAACCTCAACCTCTC CTGCCACTCGGACTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCTTATCAA TGGGACACTGCGGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCTCCAAAATCAC ATCAAACAATAGCGGGGCCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTAC CGGTCGCAATAACTCCATAGTCAAGAACATCTCAGTCTCCTCTGGCGA TTCAGCACCTGGAAGTTCTGGTCTCTCAGCTAGGGCTACTGTCGGCAT CATAATTGGAATGCTGGTTGGGGTTGCTCTGATGTAG

【０２０５】

【表３－７】

配列番号106	全長ヒトCEACAM6DNA	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAG GAGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGG TTACAGCTGGTACAAAGGCGAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTG TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CGTCACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCCTACAAGTCATAAAGT CAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTCAGAACA CAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTC AAAAGGAACGATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAG CGAGTGCCAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGC CCAGATGTCCCCACCATTTCCCCCTCAAAGGCCAATTACCGTCCAGGG GAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCACCTGCACA GTACTCTTGGTTTATCAATGGGACGTTCCAGCAATCCACACAAGAGCT CTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGCGGATCCTATATGTGCCA AGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGATGA TCACAGTCTCTGGAAGTGCTCCTGTCCTCTCAGCTGTGGCCACCGTCG GCATCACGATTGGAGTGCTGGCCAGGGTGGCTCTGATATAG

【０２０６】

【表３－８】

配列番号107	huCEA DNAの1～687	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAG AGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGG CTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTA TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CATCATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAGT CAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACG CAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTC ACAAGAAATGACACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAG TGAGTGCCAGGCGCAGTGATTCAGTCATCCTGAATGTCCTCTATGGCC CGGATGCCCCCACCATTTCCCCTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGG AAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGT ACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCCACCCAAGAGCTCT TTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGTGGATCCTATACGTGCCAAG CCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGACGATC ACAGTCTATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCATCACCAGCAACAACTC CAACCCCGTGGAGGATGAGGATGCTGTAGCCTTAACCTGTGAACCTG AGATTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATAATCAGAGCCTC CCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGACAACAGGACCCTCAC TCTACTCAGTGTCACAAGGAATGATGTAGGACCCTATGAGTGTGGAA TCCAGAACGAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAAT GTCCTCTATGGCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATACACCTAT TACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAAC CCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACA CACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGAC TCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACT ACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCAT CTCCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCT TCACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTA AATGGTCAGAGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGG CAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCAAGAG CCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCGCAGTGAC CCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCATTTCC CCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGC CACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGG ATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCC AAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGG CCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAA CTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCCATCACCATCACCATCAC

【０２０７】

【表３－９】

配列番号108	サルCEA DNAの1～690	ATGGGGTCTCCCTCAGCCCCTCTTCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAG ACGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACC ACTGCCCAGCTCACTATTGAATCCAGGCCGTTCAATGTTGCAGAGGG GAAGGAGGTTCTTCTACTTGCCCACAATGTGTCCCAGAATCTTTTTGG CTACATTTGGTACAAGGGAGAAAGAGTGGATGCCAGCCGTCGAATTG GATCATGTGTAATAAGAACTCAACAAATTACCCCAGGGCCCGCACAC AGCGGTCGAGAGACAATAGACTTCAATGCATCCCTGCTGATCCACAA TGTCACCCAGAGTGACACAGGATCCTACACCATACAAGTCATAAAGG AAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTACATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTAACCTGTGAACCTGAGACTCAGGACA CAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGGAGCTGTCCAGTGACAACAGGACCCTCACTGTATTCAATAT TCCAAGAAATGACACAACATCCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAG TGAGTGTCAGACGCAGCGACCCAGTCACCCTGAACGTCCTCTATGGC CCGGATGCGCCCACCATTTCCCCTCTAAACACACCTTACAGAGCAGG GGAAAATCTGAACCTCACCTGCCACGCAGCCTCTAACCCAACTGCAC AGTACTTTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCCAGCAATCCACACAAGAGC TCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATAGCGGATCCTATATGTGCC AAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGGCG ATCACAGTCTACGCGGAGCTGCCCAAGCCCTACATCACCAGCAACAA CTCCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTGACCTTAACCTGTGAAC CTGAGACTCAGGACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGC CTCTCGGTCAGTTCCAGGCTGGAGCTGTCCAATGACAACAGGACCCT CACTGTATTCAATATTCCAAGAAACGACACAACGTTCTACGAATGTG AGACCCAGAACCCAGTGAGTGTCAGACGCAGCGACCCAGTCACCCTG AATGTCCTCTATGGCCCGGATGCGCCCACCATTTCCCCTCTAAACACA CCTTACAGAGCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTC TAACCCAGCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACGTTCCAGCA ATCCACACAAGAGCTCTTTATACCCAACATCACCGTGAATAATAGCG GATCCTATATGTGCCAAGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGG ACCACAGTCACGGCGATCACAGTCTATGTGGAGCTGCCCAAGCCCTA CATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCATAGAGGACAAGGATGCTGTGA CCTTAACCTGTGAACCTGTGGCTGAGAACACAACCTACCTGTGGTGG GTAAACAATCAGAGCCTCTCGGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTCTCCAA TGGCAACAGGATCCTCACTCTACTCAGTGTCACACGGAATGACACAG GACCCTATGAATGTGGAATCCAGAACTCAGAGAGTGCAAAACGCAGT GACCCAGTCACCCTGAATGTCACCTATGGCCCAGACACCCCCATCAT ATCCCCCCCAGACTTGTCTTACCGTTCGGGAGCAAACCTCAACCTCTC CTGCCACTCGGACTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCTTATCAA TGGGACACTGCGGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCTCCAAAATCAC ATCAAACAATAGCGGGGCCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTAC CGGTCGCAATAACTCCATAGTCAAGAACATCTCAGTCTCCTCTGGCGA TTCAGCACCTGGAAGTTCTGGTCTCTCAGCTAGGGCTCATCACCATCA CCATCAC

【０２０８】

【表３－１０】

配列番号109	CEACAM6 DNAの1～320	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAG GAGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGG TTACAGCTGGTACAAAGGCGAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTG TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CGTCACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCCTACAAGTCATAAAGT CAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTCAGAACA CAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTC AAAAGGAACGATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAG CGAGTGCCAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGC CCAGATGTCCCCACCATTTCCCCCTCAAAGGCCAATTACCGTCCAGGG GAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAGCCTCTAACCCACCTGCACA GTACTCTTGGTTTATCAATGGGACGTTCCAGCAATCCACACAAGAGCT CTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGCGGATCCTATATGTGCCA AGCCCATAACTCAGCCACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGATGA TCACAGTCTCTGGACATCACCATCACCATCAC
配列番号110	huCEA DNAの1～78	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAG AGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGG CTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTA TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CATCATCCAGAAT

【０２０９】

【表３－１１】

配列番号111	huCEA DNAの398～687	GAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCCTCTAT GGCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATACACCTATTACCGTCCA GGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCA CAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGA GCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTG CCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAGGACTACAGTCAAGA CAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAAC AACTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGA ACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGA GCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACC CTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGT GGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCGCAGTGACCCAGTCACCCT GGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCATTTCCCCCCCAGACTC GTCTTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTC TAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCA ACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACG GGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATAATT CCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACTTCTCCTGGTC TCTCAGCTGGGGCC
配列番号112	CEA-v DNA	ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAG AGGCTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCACAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGG CTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATGGCAACCGTCAAATTA TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CATCATCCAGAATGAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCC TGAATGTCCTCTATGGCCCAGACGACCCCACCATTTCCCCCTCATACA CCTATTACCGTCCAGGGGTGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCT CTAACCCACCTGCACAGTATTCTTGGCTGATTGATGGGAACATCCAGC AACACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACTGAGAAGAACAGC GGACTCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACAGCAG GACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCCAAGCCCT CCATCTCCAGCAACAACTCCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTG GCCTTCACCTGTGAACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTG GGTAAATGGTCAGAGCCTCCCAGTCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCA ATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCACAAGAAATGACGCA AGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAACCGCAG TGACCCAGTCACCCTGGATGTCCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCAT TTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTC CTGCCACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAA TGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCA CGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTA CTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTG GAACTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCCATCACCATCACCATCAC

【０２１０】

【表３－１２】

配列番号113	NCA DNAの1-273	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAG GAGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGG TTACAGCTGGTACAAAGGCGAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTG TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CGTCACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCCTACAAGTCATAAAGT CAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTCAGAACA CAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTC AAAAGGAACGATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAG CGAGTGCCAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGC CCAGATGTCCCCACCATTTCC
配列番号114	huC EA DNAの596～687	CCCATCATTTCCCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCGGGAGCGAACCTC AACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGG CGTATCAATGGGATACCGCAGCAACACACACAAGTTCTCTTTATCGCC AAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTGTTTTGTCTCTAAC TTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGTCTCT GCATCTGGAACTTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCC
配列番号115	CHI M DNA	ATGGGACCCCCCTCAGCCCCTCCCTGCAGATTGCATGTCCCCTGGAAG GAGGTCCTGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCACCCACC ACTGCCAAGCTCACTATTGAATCCACGCCGTTCAATGTCGCAGAGGG GAAGGAGGTTCTTCTACTCGCCCACAACCTGCCCCAGAATCGTATTGG TTACAGCTGGTACAAAGGCGAAAGAGTGGATGGCAACAGTCTAATTG TAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCCGCATAC AGTGGTCGAGAGACAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAA CGTCACCCAGAATGACACAGGATTCTATACCCTACAAGTCATAAAGT CAGATCTTGTGAATGAAGAAGCAACCGGACAGTTCCATGTATACCCG GAGCTGCCCAAGCCCTCCATCTCCAGCAACAACTCCAACCCCGTGGA GGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAACCTGAGGTTCAGAACA CAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCGGTCAGTCCC AGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACATGACCCTCACTCTACTCAGCGTC AAAAGGAACGATGCAGGATCCTATGAATGTGAAATACAGAACCCAG CGAGTGCCAACCGCAGTGACCCAGTCACCCTGAATGTCCTCTATGGC CCAGATGTCCCCACCATTTCCCCCATCATTTCCCCCCCAGACTCGTCTT ACCTTTCGGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCGGCCTCTAACC CATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACAC ACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGAC CTATGCCTGTTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCAT AGTCAAGAGCATCACAGTCTCTGCATCTGGAACTTCTCCTGGTCTCTC AGCTGGGGCCCATCACCATCACCATCAC

【０２１１】

実施例２．ＣＥＡ抗体のクローニング及び配列分析

製造元のプロトコールに基づいて、Ｕｌｔｒａｐｕｒｅ　ＲＮＡキット（カタログ番号７４１０４、ＱＩＡＧＥＮ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して、マウスのハイブリドーマ細胞を回収して全ＲＮＡを調製した。第１鎖ｃＤＮＡは、ＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎのｃＤＮＡ合成キット（カタログ番号１８０８０－０５１）を使用して合成し、マウスモノクローナル抗体のＶＨ及びＶＬ遺伝子のＰＣＲ増幅を、ＰＣＲキット（カタログ番号ＣＷ０６８６、ＣＷＢｉｏ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）を使用して行った。重鎖可変領域（ＶＨ）及びカッパ軽鎖可変領域（ＶＬ）の抗体ｃＤＮＡクローニングに使用されるオリゴプライマ

ーは、以前に報告された配列に基づいて合成した（Ｂｒｏｃｋｓ　ｅｔ　ａｌ．，ＭｏｌＭｅｄ．２００１　７（７）：４６１－９．）。次に、ＰＣＲ産物をｐＥＡＳＹ－Ｂｌｕｎｔクローニングベクター（カタログ番号ＣＢ１０１－０２、ＴｒａｎｓＧｅｎ，Ｃｈｉｎａ）にサブクローニングし、配列を決定した。ＶＨ及びＶＬ領域のアミノ酸配列は、ＤＮＡ配列決定の結果から決定された。

【０２１２】

モノクローナル抗体は、配列相同性を比較することによって分析され、配列類似性に基づいてグループ化された（図２）。相補的決定領域（ＣＤＲ）は、配列アノテーションによるＩＭＧＴ（Ｌｅｆｒａｎｃ　ｅｔ　ａｌ．，１９９９　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２７：２０９－２１２）システムに基づいて定義された。代表的なクローンＢＧＡ１３のアミノ酸配列を表４に示す。

【０２１３】

【表４】

表４：アミノ酸配列

BGA13 (IMGT)	配列番号 116	HCDR1 (IMGT)	GYIFTSYW
	配列番号 117	HCDR2 (IMGT)	INPNTGYT
	配列番号 3	HCDR3 (IMGT)	AREYGNYNYPLDY
	配列番号 118	LCDR1 (IMGT)	ENIYGY
	配列番号 119	LCDR2 (IMGT)	NA
	配列番号 120	LCDR3 (IMGT)	QHHYGTPYT
BGA13	配列番号 121	VH	QVQLQQSGAELAKSGASVKMSCKASGYIFT SYWLHWVKQRPGQGLEWIGYINPNTGYTNY SQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDS AVYYCAREYGNYNYPLDYWGQGTSVTVSS
	配列番号 122	VL	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYGY LAWYQQKQGKSPQLLVFNAKNLVEGVPSRF SGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYCQHHYG TPYTFGGGTKLEIK

【０２１４】

実施例３．精製マウス抗ＣＥＡ抗体の結合プロファイルの決定

ＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳによって示されるＣＥＡに対する特異的結合を有するＣＥＡ抗体、ならびに可溶性ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）干渉のないＣＥＡ抗体は、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ－２００（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用するＳＰＲアッセイによってそれらの結合動態について特徴付けられた（図３Ａ）。簡単に説明すると、抗マウスＩｇＧ抗体を活性化されたＣＭ５バイオセンサーチップ（カタログ番号ＢＲ１００５３０、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）上に固定化した。精製マウス抗体をチップ表面に流し、抗マウスＩｇＧ抗体によって捕捉した。次に、精製ＣＨＩＭ、ＣＥＡ－ｖ、ＣＥＡ、またはサルＣＥＡ組換えタンパク質の段階希釈（６．０ｎＭ～２１５０ｎＭ）をチップ表面に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化を分析して、１対１のラングミュア結合モデル（ＢＩＡ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して会合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を算出した。平衡解離定

数（K_D）を、比率k_{off}／k_{on}として計算した。ＢＧＡ１３の結合親和性プロファイルを以下の表５に示す。

【０２１５】

ＢＧＡ１３の結合プロファイルを抗原ＥＬＩＳＡでチェックし、精製ＢＧＡ１３のｈｕＣＥＡ及びサルＣＥＡへの結合を観察した。これらは、ＢＧＡ１３が可溶性ｈｕＣＥＡ及びサルＣＥＡに対して弱い結合剤であるか、または可溶性ＣＥＡが固定化されたときに異なる立体構造を有することを示した（図３Ｂ）。この実験では、ｓＣＥＡ、ＣＨＩＭ、サルＣＥＡ、ＣＥＡ－ｖ、及びＢＳＡを９６ウェルプレートに１０μｇ／ｍｌの高濃度で４℃で一晩コーティングした。ＢＧＡ１３または対照の抗体ａｂ４４５１（カタログ番号ａｂ４４５１、ａｂｃａｍ，ＵＳＡ）を２μｇ／ｍｌの濃度で１時間インキュベートした。ＨＲＰ結合抗マウスＩｇＧ抗体（カタログ番号７０７６Ｓ、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，ＵＳＡ）及び基質（カタログ番号００－４２０１－５６、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＵＳＡ）を開発に使用し、波長４５０ｎｍの吸光度シグナルを、プレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｐａｒａｄｉｇｍ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ，ＵＳＡ）を使用して測定した。

【０２１６】

【表５】

表５：ＳＰＲによるＢＧＡ１３結合親和性の比較

抗原	KD (M)
sCEA	不検出
sCEA-v	1.50E-07
CHIM	1.20E-07
サル CEA	不検出（結合が弱いため検出不可）

【０２１７】

実施例４．ＣＥＡ発現細胞へのＢＧＡ１３の結合に対する組換え可溶性ＣＥＡの影響

ＣＥＡ発現細胞に対する様々なＣＥＡ抗体の特異的結合における可溶性ＣＥＡの存在を、フローサイトメトリーによって評価した。簡単に説明すると、ヒトＣＥＡ発現細胞（10^5細胞／ウェル）を、２０μｇ／ｍｌの超組換え可溶性ＣＥＡタンパク質の存在下で２μｇ／ｍｌの精製ＣＥＡマウスモノクローナル抗体とインキュベートし、その後Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｒｏ－６４７－標識ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（カタログ番号Ａ０４７３、Ｂｅｙｏｔｉｍｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｃｈｉｎａ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。図４Ａ及び図４Ｂに示すように、ＣＥＡ発現細胞へのＢＧＡ１３の結合は、可溶性ＣＥＡの存在によって影響されなかった。

【０２１８】

実施例５．マウス抗ヒトＣＥＡ抗体のヒト化

ｍＡｂのヒト化及び操作

ＢＧＡ１３のヒト化については、ＩＭＧＴ及びＮＣＢＩのヒト免疫グロブリン遺伝子データベースにおける配列比較により、ＢＧＡ１３可変領域のｃＤＮＡ配列と高い相同性を共有する配列をヒト生殖系列ＩｇＧ遺伝子で検索した。ヒト抗体レパートリーに高頻度で存在し（Ｇｌａｎｖｉｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２００９ ＰＮＡＳ １０６：２０２１６

－２０２２１）、ＢＧＡ１３との相同性が高いヒトＩＧＶＨ及びＩＧＶＬ遺伝子を、ヒト化のテンプレートとして選択した。ヒト化前に、ＢＧＡ１３重鎖及び軽鎖可変ドメインを、それぞれ、ヒトＩｇＧ１ｗｔ（配列番号１２３）として指定される野生型ヒトＩｇＧ１定常領域及びヒトカッパ定常（ＣＬ）領域（配列番号１２４）に融合した。

【０２１９】

【表６】

表６：アミノ酸配列

配列番号123	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1 wt
配列番号124	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	CL

【０２２０】

ヒト化は、ＣＤＲグラフティング（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ ２４８：Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ）によって実施され、ＢＧＡ１３抗体はヒトＩｇＧ１フォーマットで操作された。ヒト化の最初のラウンドでは、フレームワーク領域におけるマウスからヒトアミノ酸残基への変異は、シミュレートされた３Ｄ構造によって誘導され、ＣＤＲの標準構造を維持するために構造的に重要なマウスのフレームワーク残基は、ヒト化抗体ＢＧＡ１３、ＢＧＡ１３１（重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を配列番号１２５及び１２６に示す）の最初のバージョンで保持された。

【０２２１】

【表７】

表７：アミノ酸配列

配列番号125	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGYINPNTGYTNYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	BGA131 重鎖
配列番号126	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYGYLAWYQQKPGKVPKLLIYNAKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHYGTPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	BGA131 軽鎖

【０２２２】

具体的には、ＢＧＡ１３　ＶＬのＣＤＲを、２つのマウスフレームワーク残基（Ｎ６６及びＶ６８）を保持した状態でヒト生殖系列可変遺伝子ＩＧＶＫ１－２７のフレームワークに移植した（軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は配列番号１２８に示す）。ＢＧＡ１３ＶＨのＣＤＲは、５つのマウスフレームワーク（Ｌ３９、Ｉ５３、Ｙ５５、Ｎ６６、Ｓ６８）残基を保持した状態で、ヒト生殖系列可変遺伝子ＩＧＶＨ１－４６のフレームワークに移植した（重鎖可変ドメインのアミノ酸配列は配列番号１２７に示す）。

【０２２３】

【表８】

表８：アミノ酸配列

配列番号127	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGYINPNTGYTNYSQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSS	BGA131 VH
配列番号128	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYGYLAWYQQKPGKVPKLLIYNAKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHYGTPYTFGQGTKVEIK	BGA131 VL

【０２２４】

ＢＧＡ１３－１は、容易に適応できるサブクローニング部位を備えた野生型ヒトＩｇＧ１の定常領域を含むインハウス開発の発現ベクターを使用して、ヒト完全長抗体フォーマットとして構築した。ＢＧＡ１３－１抗体の発現及び調製は、上記２つの構築物の２９３Ｇ細胞への同時トランスフェクションと、プロテインＡカラム（カタログ番号１７５４３８０２、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用した精製とによって達成された。精製した抗体をＰＢＳ中で０．５～５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、アリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０２２５】

ＢＧＡ１３１を使用して、追加の単一または複数のアミノ酸変更を行い、ＶＨ及びＶＬのフレームワーク領域のヒト残基を、それぞれＶＨではＶ６８Ａ、Ｒ７２Ａ、及びＶ７９Ａ、ＶＬではＶ４３Ｓを含む、対応するマウス生殖系列残基に変換した。その結果、ＢＧＡ１３２（ＶＨ中のＶ６８Ａ、Ｒ７２Ａ）、ＢＧＡ１３３（ＶＨ中のＶ７９Ａ）、ＢＧＡ１３４（ＶＨ中のＶ６８Ａ、Ｒ７２Ａ、Ｖ７９Ａ）、ＢＧＡ１３５（ＶＬ中のＶ４３Ｓ）、ＢＧＡ１３６（ＶＨ中のＶ６８Ａ、Ｒ７２Ａ、及びＶＬ中のＶ４３Ｓ）、ＢＧＡ１３７（ＶＨ中のＶ７９Ａ、ＶＬ中のＶ４３Ｓ）、及びＢＧＡ１３８（ＶＨ中のＶ６８Ａ、Ｒ７２Ａ、Ｖ７９Ａ、ＶＬ中のＶ４３Ｓ）が得られた。修飾を含むすべての抗体はＢＧＡ１３１に対して同様の結合活性を有し、いずれの変化も結合を破壊しなかった。

【０２２６】

翻訳後修飾（ＰＴＭ）部位を除去するために、ＢＧＡ１３１配列に基づいてＣＤＲ及びフレームワーク領域に変異を導入することでさらなる操作が行われた。これには、ＶＨ領域におけるＮ５２Ｔ、Ｎ５４Ｑ、Ｎ５９Ｓ、Ｎ１０２Ｇ、Ｎ１０４Ｑ、及びＳ６１Ａアミノ酸の変化が含まれた。その結果、ＢＧＡ１３１Ａ（Ｎ５２Ｔ（ＶＨ））、ＢＧＡ１３１Ｂ（Ｎ５４Ｑ（ＶＨ））、ＢＧＡ１３１Ｃ（Ｎ５９Ｓ（ＶＨ））、ＢＧＡ１３１Ｄ（Ｎ１０２Ｇ（ＶＨ））、ＢＧＡ１３１Ｅ（Ｎ１０４Ｑ（ＶＨ））、及びＢＧＡ１３１Ｆ（Ｎ５４Ｑ、Ｎ５９Ｓ、Ｓ６１Ａ（ＶＨ））が得られ、すべての抗体はＢＧＡ１３１に対して同様の結合特異性を有し、いずれの変化も結合を破壊しなかった。特異性を維持しながら、アミノ酸組成及び発現レベルも考慮された。すべてのヒト化変異は、特定の位置に変異を含むプライマー及び部位特異的変異誘発キット（カタログ番号ＦＭ１１１－０２、ＴｒａｎｓＧｅｎ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）を使用して作成された。望ましい変異は配列分析によって確認された。ＢＧＡ１３－１と比較して、ＢＧＡ１３－１Ｆはグリコシル化部位がなく結合親和性が有意に低下していたが、発現レベルが高かった（表９）。

【０２２７】
【表９】

表９：アミノ酸配列

配列番号129	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYGYLAWYQQKPGKVPKLLIYNAKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHYGTPYTFGQGTKVEIK	BGA13-1 VL
配列番号130	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGYINPQTGYTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSS	BGA13-1F VH

【０２２８】
実施例６．親和性成熟ライブラリーの生成
ファージミドベクターｐＣＡＮＴＡＢ　５Ｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を標準的な分子生物学技術によって使用して、ＢＧＡ１３－１Ｆ　Ｆａｂフラグメントを遺伝子３の微量のコートタンパク質のフラグメントのＮ末端との融合体としてＭ１３バクテリオファージの表面に表示するように設計されたファージミドを構築した。ファージミドクローンから直接Ｆａｂフラグメントを発現できるように、ｇ３配列の前にアンバー終止コドンがあった。ファージミドをテンプレートとして使用して、10^8個のユニークなメンバーを含むファージディスプレイライブラリーを構築した。
【０２２９】
２つのライブラリー（Ｈ－ＡＭ、Ｌ－ＡＭ）は、それぞれ重鎖及び軽鎖のＣＤＲ位置をランダム化して構築した。３つのＣＤＲはすべて各ライブラリーでランダム化されたが、各ＣＤＲには、２つの同時変異を有し得るＨＣＤＲ３を除き、各クローンに最大１つの変異があった。各位置は、任意のアミノ酸またはアンバー終止コドンをコードするＮＮＫコドン（ＩＵＰＡＣコード）でランダム化された。組み合わされた重鎖及び軽鎖のライブラリー設計には、終止コドンやシステインコドンを持たない5.0×10^6個のユニークな完全長クローンの潜在的な多様性があり、それぞれ０、１、２、及び３個の変異を有するクローンの予想分布は約０．０２％、１．１％、１７％、及び８２％であった。重鎖クローンの少数の部分には、ＨＣＤＲ３領域のプライマー設計のため４つの変異があることが予想された。最初のステップとして、テンプレートとしてｐＣＡＮＴＡＢ　５Ｅ、及びランダム化されたＣＤＲ３位置を含むプライマーを使用してＤＮＡフラグメントを増幅した（図５のＡ及びＢを参照）。次に、ＰＣＲ産物をゲル精製し、ランダム化されたＣＤＲ２位置を含むプライマーを使用して組み立てた。この手順を、ランダムなＣＤＲ１位置に向けられたプライマーを使用して繰り返した。次に、得られた重鎖または軽鎖のＰＣＲ産物を、オーバーラップＰＣＲによって対応するＣＨフラグメントまたはＣＬフラグメントと組み立てた。フラグメントは、オーバーラップＰＣＲによって、変異のない軽鎖または重鎖とさらに組み立てた。次いで、得られたフラグメントをゲル精製し、ＮｃｏＩ／ＮｏｔＩ消化後にｐＣＡＮＴＡＢ　５Ｅとライゲーションした。精製されたライゲーションは、エレクトロポレーションによってＴＧ１細菌に形質転換された。各ライブラリーからの４８クローンの配列決定により、各位置のランダム化が確認された（データは示されていない）。ただし、サンプリング深度が限られているため、すべての位置ですべてのアミノ酸変異が観察されたわけではない。軽鎖及び重鎖ライブラリーの約５２％及び５５％は完全長のランダム化クローンを有しており、オリゴヌクレオチド合成及びライブラリー構築において中程度の取り込みバイアスがあっても生成された10^8個の独立したクローンで設計の潜在的な多様性をすべてカバーするのに十分であった。
【０２３０】
実施例７．親和性成熟ヒト化ＢＧＡ１３変異体の生成
ライブラリーの選択及びスクリーニング

親和性成熟ヒト化ＢＧＡ１３　Ｆａｂの生成は、標準プロトコールを用いたファージディスプレイによって実施した（Ｓｉｌａｃｃｉ　ｅｔ　ａｌ．，（２００５）Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ，５，２３４０－５０；Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１４）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，９，ｅ１１１３３９）。第１と第２のラウンドの選択では、免疫チューブ（カタログ番号４７０３１９、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中の固定化ＣＨＩＭに対して競合選択を行った。簡単に説明すると、免疫チューブを１ｍｌのＣＨＩＭ（ＰＢＳ中５μｇ／ｍｌ）で一晩４℃でコーティングした。すべての親和性成熟ライブラリーを、様々な濃度のＢＧＡ１３－１Ｆ　ＩｇＧ（ラウンド１、１μｇ／ｍｌ；ラウンド２、５μｇ／ｍｌ）の存在下で、コーティングされた免疫チューブと共に１時間インキュベートした。第３と第４のラウンドの選択では、Ｌ９２９／ｈｕＣＥＡ細胞（ラウンド３）またはＬＯＶＯ細胞（ＡＴＣＣ　ＣＣＬ－２２９）（ラウンド４）を使用し、枯渇細胞としてＨＥＫ２９３細胞を使用して細胞パニングを行った。４つのラウンドの選択後、個々のクローンを選択し、標準プロトコールを使用してファージを含む上清を調製した。ＥＬＩＳＡ陽性クローンの配列を決定し、変異部位を分析した。

【０２３１】

ＣＤＲの変異頻度の解析

４つのラウンドの選択後の各ＣＤＲにおける変異の頻度は比較的高く、ＨＣＤＲ３の１７％からＬＣＤＲ２の９５％の範囲であった。重鎖に関しては、Ｈ－ＡＭライブラリーで同定されたクローンの約半数が親クローンと同一であった。他のクローンには、ＨＣＤＲ２中のＱ５４Ｎに１つの逆突然変異が含まれていた。

【０２３２】

軽鎖を分析すると、変異はさらに多様であった。２つの部位では、それぞれＬＣＤＲ１のほぼすべてのクローンに変異が発生していた。軽鎖残基２９及び３１は、それぞれクローンの４７．０９％及び３５．２９％でＩｌｅからＧｌｎに、及びＧｌｙからＧｌｎに変異した。２９位はＧｌｎ変異の頻度が高いだけではなく、チロシンへの変異を持つクローンのサブセットも有していた。位置３１はＧｌｎ変異の頻度が高いだけではなく、Ｌｅｕに変異する可能性が約１２．５％であった。ライブラリー設計の制約により、２９位と３１位の変異は、互いに組み合わせて見られなかった。しかしながら、これら２つの部位のそれぞれの変異は、他のＣＤＲの変異と組み合わせられることがよくあった。ＬＣＤＲ２に関しては、Ａ５１のみに少なくとも６４．７１％のクローンにおいて変異が発生していたが、明らかなパターンはなく、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ、Ｔｈｒ、Ａｓｎなどの大きな疎水性極性残基が含まれていた。ＬＣＤＲ３に関しては、２つの部位で少なくとも５０％のクローンに変異が発生していた。軽鎖残基９０及び９２は、それぞれクローンの１１．７６％及び４７．０６％でＨｉｓからＬｅｕに、及びＴｙｒからＬｅｕに変異していた。図６は、４つのラウンドの選択後の軽鎖のＣＤＲ領域の配列分散を示す。

【０２３３】

選択されたヒト化ＢＧＡ１３変異体の発現

突然変異の組み合わせが行われた。選択したファージクローンからの軽鎖可変領域を、ヒトカッパ軽鎖発現哺乳類発現ベクターにサブクローニングした。軽鎖発現ベクターを、ＢＧＡ１３－１Ｆ重鎖を発現する哺乳類発現ベクターと共に１：１の比率で２９３Ｇ細胞に同時トランスフェクトした。ＣＥＡ抗体のバージョンは、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（カタログ番号１７５４３８０２、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）によって培養上清から精製された。精製した抗体をＰＢＳ中で０．５～５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、アリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０２３４】

親和性成熟ヒト化ＢＧＡ１３変異体の特徴付け

ＢＧＡ１３－１Ｆ及び他の親和性成熟クローンの親和性比較は、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ－２００（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）及びフローサイトメトリー（図７）を使用するＳＰＲアッセイ（表１０）によって行われた。この実験では、抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を活性化されたＣＭ５バイオセンサーチップ（カタログ番号ＢＲ１００８３９

、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に固定化した。抗ＣＥＡ抗体をチップ表面に流し、抗ヒトＦａｂ抗体によって捕捉した。次に、ＣＨＩＭの段階希釈（１．３７ｎＭ～３３３ｎＭ）をチップ表面に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化を分析して、１対１のラングミュア結合モデル（ＢＩＡ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して会合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を算出した。フローサイトメトリーでは、ＣＥＡ発現細胞（10^5細胞／ウェル）を様々な濃度の精製された親和性成熟抗体とインキュベートし、次いでＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｒｏ－６４７標識抗ｈｕＩｇＧ　Ｆｃ抗体（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，ＵＳＡ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ　ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。平衡解離定数（K_D）を、比率k_{off}／k_{on}として計算した。ＢＧＡ１３１Ｆ－ｐｈ－Ｌ（配列番号１３１）及びＢＧＡ１３１Ｆ－ｐｈ－Ｍ（配列番号１３２）は、ｈｕＣＥＡ表面タンパク質に対して改善された親和性を有することが示された（表１１）。

【０２３５】

【表１０】

表１０：ＳＰＲによる結合親和性の比較

試料 ID	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)
1F-ph-E	3.4E+3	3.5E-3	1.0E-6	284
1F-ph-F	1.0E+2	1.2E-2	1.2E-4	4162
1F-ph-G	6.4E+1	2.6E-3	4.1E-5	3487
1F-ph-H	1.1E+2	2.8E-3	2.5E-5	1983
1F-ph-I	2.0E+2	2.2E-3	1.1E-5	2248
1F-ph-L	6.7E+3	3.0E-4	4.6E-8	184
1F-ph-M	2.5E+3	2.5E-4	9.9E-8	224
1F-ph-N	1.1E+3	1.0E-2	9.2E-6	1267
BGA13-1F	1.9E+3	1.5E-3	7.9E-7	367

【０２３６】

【表１１】

表１１：アミノ酸配列

配列番号131	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLLIYNFKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTPYTFGQGTKVEIK	BGA13-1F-ph-L VL
配列番号132	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLLIYNTKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTPYTFGQGTKVEIK	BGA13-1F-ph-M VL

【０２３７】

実施例８．親和性成熟ヒト化ＢＧＡ１３変異体のさらなる操作

ＢＧＡ１３１Ｆ－ｐｈ－Ｍテンプレートに基づいてＣＤＲに変異を導入することにより、さらなる操作が行われた。これには、ＶＨのＷ３３Ｙ、Ｑ５４Ｎ、及びＳ５９Ｎ、ならびにＶＬのＴ５１Ｙが含まれていた。その結果、ＢＧＡ１１３２Ａ（Ｗ３３Ｙ（ＶＨ））、ＢＧＡ１１３２Ｂ（Ｑ５４Ｎ（ＶＨ））、ＢＧＡ１１３２Ｃ（Ｓ５９Ｎ（ＶＨ））、ＢＧＡ１１３１Ａ（Ｔ５１Ｙ（ＶＬ））が得られ、これらはすべてＢＧＡ－１１３１Ｆに対する結合活性が改善された。最も改善された抗体は、最終的に、（Ｗ３３Ｙ（ＶＨ）、Ｔ５１Ｙ（ＶＬ））変化を有するＢＧＡ１１３抗体（表１２）をもたらし、配列は表１３に示されている。

【０２３８】

【表１２】

表１２：ＳＰＲによるＣＨＩＭへの結合親和性の比較

試料ID	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)
BGA1311F-ph-M	1.97E+04	2.48E-04	1.26E-08	97.2
1132A	1.99E+04	2.82E-04	1.42E-08	129.1
1132B	1.98E+04	3.80E-04	1.92E-08	71.1
1132C	1.84E+04	3.94E-04	2.15E-08	59.4
1131A	3.21E+04	4.63E-04	1.44E-08	92.9
113	3.15E+04	4.75E-04	1.51E-08	112.4

【０２３９】

【表１３】

表１３：ＢＧＡ－１１３のアミノ酸配列及び核酸配列

BGA113	配列番号 133	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIF TSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYINPQTGY TSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSL RSEDTAVYYCAREYGNYNYPLDYWGQG TLVTVSS
	配列番号 15	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQY GYLAWYQQKPGKVPKLLIYNYKNLVEGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QHHLGTPYTFGQGTKVEIK
	配列番号 134	VH DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCG GAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTG AAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTAT ATTTTTACCAGCTATTACCTGCATTGGGT GCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGA ATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACC GGCTATACCAGCTATGCCCAGAAATTTC AGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATAC CAGCACCAGCACCGTGTATATGGAACTG AGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCG GTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCA ACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGG CCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGC
	配列番号 17	VL DNA	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCA GCCTGAGCGCGAGCGTGGGCGATCGCGT GACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAAC CAGTATGGCTATCTGGCGTGGTATCAGC AGAAACCGGGCAAAGTGCCGAAACTGC TGATTTATAACTATAAAAACCTGGTGGA AGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGC GGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCA TTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGC GACCTATTATTGCCAGCATCATCTGGGC ACCCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCA AAGTGGAAATTAAA

【０２４０】

実施例９．ＢＧＡ１１３の最適化

生化学的／生物物理学的特性をさらに改善するために、ＣＤＲ及びフレームワーク領域に置換を導入することによってＢＧＡ１１３の最適化を行った（表１４）。ヒトＶＨ生殖系列間で観察された差に基づいて選択されるＫ１３及びＱ５３を除き、大きな疎水性残基を選択し、極性残基に変更した。機能的活性を維持しながら、アミノ酸組成、熱安定性（Ｔｍ）、表面疎水性、及び等電子点（ｐＩ）を考慮する。実施例６に記載したように、ベクターｐＣＡＮＴＡＢ－５Ｅにクローニングすることによって変異体をＦａｂ形式で発現させた。次いで、Ｆａｂ含有上清をＥＬＩＳＡ及びＳＰＲ分析によってＣＥＡ結合に関してスクリーニングした。有意な親和性低下のない変異体を選択し、置換を許容できる残基を同定した。軽鎖のＬ９２Ｅ、重鎖のＫ１３Ｅ、Ｑ５４Ｅ、Ｙ５７Ｄ／Ｅ、及びＹ５７Ｋは、親和性に最小限の影響を与えることが示された。したがって、単一の同定された変異または組み合わせを有するＩｇＧフォーマットのＢＧＡ１１３変異体を実施例８に記載のように発現及び精製した。ＳＰＲ研究及びＦＡＣＳ分析を実施し、表１４にまとめた。導

入されたアミノ酸置換によって特異性及びエピトープに変化が生じないことが確認された（データは示されていない）。まとめると、これらの結果は、これらの単一または複合変異（重鎖のＫ１３Ｅ、Ｑ５４Ｅ、Ｙ５７Ｄ及びＹ５７Ｋ、軽鎖のＬ９２Ｅ）が、ＣＥＡへの結合親和性をわずかに低下させるＬ９２Ｅを除いて、親和性に対する影響が最小限であることを示した。要約すると、Ｙ５７Ｋの変化により、ＢＧＡ１１３抗体の発現、ＣＥＡ結合及び親和性が最適化され、その結果ＢＧＡ１１３Ｋが得られた（表１）。

【０２４１】

【表１４】

表１４：置換対象の残基のまとめ

残基	アミノ酸置換
H: K13	E
H: Y32	H, N, Q, D, E, K
H: Y33	H, N, Q, D, E, K
H: Q53	A, D, G, N, S, T, Y, R, H,
H: Y57	H, N, Q, D, E, K
H: Y100	H, N, Q, D, E, K
H: Y105	H, N, Q, D, E, K
L: V15	T, P, L
L: Y30	H, N, Q, D, E, K
L: Y32	H, N, Q, D, E, K
L: Y49	H, N, Q, D, E, K
L: P80	S, T, A
L: L92	H, N, Q, D, E, K

【０２４２】

【表１５】

表１５：ＳＰＲによるＢＧＡ１１３変異体の親和性測定の概要

BGA113 変異体	動態(huCEA)			親和性(MKN45 細胞)	
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	トップ	EC50 (ug/ml)
L92E, Y57K	3.34E+04	1.77E-04	5.29E-09	969.9	1.09
L92E	4.17E+04	1.88E-04	4.50E-09	945.4	1.19
Q54E, Y57K	1.10E+05	2.60E-04	2.36E-09	901.9	0.58
Y57K	1.02E+05	1.81E-04	1.77E-09	934.6	0.52
K13E, Y57K	1.28E+05	1.72E-04	1.34E-09	959.9	0.48
Q54E, Y57E	1.17E+05	2.50E-04	2.14E-09	926.9	0.65
Y57D	1.07E+05	1.95E-04	1.82E-09	949.3	0.56
BGA113	1.13E+05	1.69E-04	1.49E-09	919.3	0.49

【０２４３】

実施例１０．抗ＣＥＡ抗体ＢＧＡ１１３Ｋの結合プロファイル

ＢＧＡ１１３Ｋ及びＵＳ２０１２／０２５１５２９で抗体２Ｆ１と称される以前に開示されたＣＥＡ抗体は、ヒトＩｇＧ１フォーマットで生成し、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ－２００（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用するＳＰＲアッセイによって結合動態について特徴付けられた。

【０２４４】

このデータを得るために、抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を活性化されたＣＭ５バイオセンサーチップ（カタログ番号ＢＲ１００８３９、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に固定化した。ＢＧＡ１１３Ｋ抗体をチップ表面に流し、抗ヒトＦａｂ抗体によって捕捉した。次に、可溶性ｈｕＣＥＡまたはｃｙｎｏＣＥＡ（カタログ番号：ＣＥ５－Ｃ５２Ｈ５、Ａｃｒｏｂｉｏｓｙｓｔｅｍ）の段階希釈（１．３７ｎＭ～２１５０ｎＭ）をチップ表面に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化を分析して、１対１のラングミュア結合モデル（ＢＩＡ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して会合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を算出した。平衡解離定数（K_D）を、比率k_{off}／k_{on}として計算した。ＢＧＡ１１３Ｋ及び２Ｆ１対照抗体は異なる結合親和性を示した。以下の表１６に示すように、ＢＧＡ１１３Ｋは、ヒトＣＥＡに対して非常に高い親和性を有し、カニクイザルＣＥＡに対しても同等の親和性を有する。

【０２４５】

フローサイトメトリーでは、ＣＥＡ発現ＭＫＮ４５細胞（10^5細胞／ウェル）を様々な濃度の精製された親和性成熟抗体とインキュベートし、次いでＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｒｏ－６４７標識抗ｈＩｇＧ　Ｆｃ抗体（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，ＵＳＡ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ　ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。図８に示すように、ＢＧＡ－１１３Ｋは、２．９２ｕｇ／ｍｌのＥＣ５０で用量反応的に生細胞上の天然ＣＥＡに特異的に結合することを示した。

【０２４６】

【表１６】

表１６：ＳＰＲによる抗ＣＥＡ抗体の結合親和性の比較

	BGA113K			2F1 抗体		
	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
huCEA	1.02E+05	1.81E-04	1.77E-09	4.50E+4	3.00E-3	6.50E-8
カニクイザル CEA	2.67E+04	5.34E-04	1.99E-08	不検出	不検出	不検出

【０２４７】

実施例１１．オフターゲット特異性の評価

ＢＧＡ１１３Ｋのオフターゲット特異性は、ＥＬＩＳＡ及びフローサイトメトリーによって評価した。フローサイトメトリーでは、ＣＥＡＣＡＭ３（配列番号１０１）、ＣＥＡＣＡＭ７（配列番号１０２）、またはＣＥＡＣＡＭ８（配列番号１０３）をＨＥＫ２９３細胞（10^5細胞／ウェル）に一時的にトランスフェクトし、次いで２μｇ／ｍｌの精製ＢＧＡ１１３Ｋでインキュベートし、続いてＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ－６４７－標識抗ｈｕＩｇＧ　Ｆｃ抗体（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，ＵＳＡ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ　ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。抗原ＥＬＩＳＡの場合、ＣＥＡＣＡＭ１（配列番号：１００）（カタログ番号１０８２２－Ｈ０８Ｈ、Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ，Ｃｈｉｎａ）、ＣＨＩＭ（配列番号：９９）、ＣＥＡ（配列番号：９１）、またはＣＥＡＣＡＭ６（配列番号：９３）を９６ウェルプレートに１０μｇ／ｍｌの濃度で４℃で一晩コーティングした。ＨＲＰ結合抗ヒトＦｃ（Ｆｃ特異的）ＩｇＧ抗体（カタログ番号Ａ０１７０、Ｓｉｇｍａ，ＵＳＡ）及び基質（カタログ番号００－４２０１－５６、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＵＳＡ）を開発に使用し、波長４５０ｎｍの吸光度シグナルを、プレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｐａｒａｄｉｇｍ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ，ＵＳＡ）を使用して測定した。図９のＡ～Ｂに示すように、他のＣＥＡＣＡＭファミリーメンバーに対する交差反応性は観察されず、したがって、ＢＧＡ１１３ＫはＣＥＡ（図９のＡ～ＢのＣＥＡＣＡＭ５）に対してのみ特異性を示した。

【０２４８】

実施例１２．ＣＥＡ発現細胞へのＢＧＡ１１３Ｋの結合に対する可溶性ｈｕＣＥＡの影響

可溶性ＣＥＡ（ｓＣＥＡ）がＢＧＡ１１３Ｋの特異的結合に何らかの影響を与えるかどうかを確認するために、様々な濃度（０、０．５、１、２μｇ／ｍｌ）の組換え可溶性ＣＥＡを（０．０１～１００μｇ／ｍｌ）ＢＧＡ１１３Ｋと事前混合し、５分間インキュベートした。次いで、これらの混合物を、ＭＫＮ４５細胞などの2×10^5ＣＥＡ発現細胞と共に４℃で３０分間インキュベートした。細胞を二次抗体抗ｈｕＦｃ－ＡＰＣ（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，ＵＳＡ）で染色し、フローサイトメトリーで分析した。２μｇ／ｍｌの組換えｓＣＥＡの存在下では、ＣＥＡ発現細胞へのＢＧＡ１１３Ｋの結合は影響を受けなかった。この結果はＭＫＮ４５細胞について示されており（図１０）、膜結合型ＣＥＡに対するＢＧＡ１１３Ｋの特異性を示している。

【０２４９】

実施例１３．ＢＧＡ１１３は、CEA^+腫瘍細胞に対して強力なＡＤＣＣ効果を誘導する

野生型ＩｇＧ１フォーマットのＢＧＡ１１３が抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を誘導できるかどうかを確認するために、ＣＤ１６（Ｖ１５８）発現ＮＫ９２ＭＩ細胞（ＮＫ９

２ＭＩ／ＣＤ１６Ｖ）をエフェクター細胞として使用し、ＣＥＡを発現するマウス結腸癌細胞（ＣＴ２６－ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２６３８）と共培養した。共培養は、示された濃度（０．００００５～５μｇ／ｍｌ）のＢＧＡ１１３の存在下、Ｅ：Ｔ比１：１で５時間実施し、細胞毒性を乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）放出によって決定した。上清中のＬＤＨの量は、ＣｙｔｏＴｏｘ（商標）９６　Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　Ａｓｓａｙ　ｋｉｔ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を使用して測定し、特異的溶解量を製造業者の指示に従って計算した。図１１に示すように、ＢＧＡ１１３は、約６．７ｎｇ／ｍｌのＥＣ$_{50}$でインビトロでＡＤＣＣを誘導することができた。

【０２５０】

実施例１４．ＢＧＡ１１３のインビボ抗腫瘍効果

ＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞に対するＢＧＡ１１３のインビボ効果を測定するために、ＮＫ９２ＭＩ／ＣＤ１６Ｖ細胞（５ｘ１０^{6}）をＣＴ２６／ＣＥＡ細胞（１０^{6}）と混合し、ＮＣＧマウスに皮下注射した。ＢＧＡ１１３（０．１２、０．６２または３．１ｍｇ／ｋｇ）またはビヒクル対照を、腫瘍注射の日から始めて週に２回与えた（１群あたり７匹のマウス）。ビヒクルと比較して、用量３．１ｍｇ／ｋｇのＢＧＡ１１３は、ビヒクル対照との差は統計的に有意ではなかった（Ｐ＞０．０５）が、低量の腫瘍阻害を示した（図１２）。

【０２５１】

実施例１５．組換えタンパク質及び安定な細胞株の生成

ファージキャンペーン及び結合アッセイ用のＣＤ１３７組換えタンパク質

ヒト及びＭａｃａｃａ　ｍｕｌａｔｔａ　ＣＤ１３７の交差結合を有するが、他のヒトＴＮＦ受容体メンバーとのオフターゲット結合を有さない、ＣＤ１３７に対するＶＨドメイン抗体を発見するために、ファージパニング及びスクリーニング用にいくつかの組換えタンパク質が設計され、発現された（表１７を参照）。全長ヒトＣＤ１３７（配列番号１３５）のｃＤＮＡコード領域は、ＣＤ１３７　ＧｅｎＢａｎｋ配列（受託番号：ＮＭ＿００１５６１．４、遺伝子はＳｉｎｏｂｉｏ、カタログ番号ＨＧ１００４１－Ｍから入手可能）に基づいて注文した。ヒトＣＤ１３７リガンド（ＴＮＦＳＦ９）（配列番号１４５）は、（受託番号：ＮＭ＿００３８１１．３、遺伝子はＳｉｎｏｂｉｏ、カタログ番号ＨＧ１５６９３－Ｇから入手可能）に基づいて注文した。サル（Ｍａｃａｃａ　ｍｕｌａｔｔａ）ＣＤ１３７（配列番号１５１）は（受託番号：ＮＭ＿００１２６６１２８．１、遺伝子はＧｅｎｓｃｒｉｐｔ、カタログ番号ＯＭｂ００２７０から入手可能）に基づいて注文した。全長ヒトＣＤ４０（配列番号１５７）は、（受託番号：ＮＭ＿００１２５０．４、遺伝子はＳｉｎｏｂｉｏ、カタログ番号ＨＧ１０７７４－Ｍから入手可能）に基づいて注文した。ＯＸ４０（配列番号：１６３）は、（受託番号：ＮＭ＿００３３２７．２、遺伝子はＳｉｎｏｂｉｏ、カタログ番号ＨＧ１０４８１－ＵＴから入手可能）に基づいて注文した。簡単に言うと、ｈｕＣＤ１３７（配列番号１３７）のアミノ酸（ＡＡ）２４～１８３からなる細胞外ドメイン（ＥＣＤ）のコード領域、ヒトＣＤ１３７リガンド（配列番号１４７）のＡＡ７１～２５４からなるＥＣＤのコード領域、ｃｙｎｏＣＤ１３７（配列番号１５３）のＡＡ２４～１８６からなるＥＣＤのコード領域、及びヒトＣＤ４０（配列番号１５９）のＡＡ１～１９４からなるＥＣＤのコード領域を、それぞれＰＣＲ増幅した。ｍＩｇＧ２ａ　Ｆｃ（配列番号１４３）のコード領域をＰＣＲ増幅し、次いでオーバーラップＰＣＲによってヒトＣＤ１３７、ヒトＣＤ１３７リガンド、サルＣＤ１３７またはヒトＣＤ４０のＥＣＤと結合させて、ｍＩｇＧ２ａ　Ｆｃ融合タンパク質を作製した。次に、ＰＣＲ産物をｐｃＤＮＡ３．１ベースの発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）にクローニングし、５つの組換えｍＩｇＧ２ａ　Ｆｃ融合タンパク質発現プラスミド、ヒトＣＤ１３７　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａ、ヒトＣＤ１３７リガンド－ｍＩｇＧ２ａ、ｃｙｎｏ　ＣＤ１３７　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａ及びヒトＣＤ４０　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａが得られた。あるいは、ｈｕＣＤ１３７（配列番号１３５）のＡＡ２４～１８３（配列番号１３７）からなるＥＣＤのコード領域、及びヒトＯＸ４０（配列番号１６５）のＡＡ１～２１６からなるＥＣＤのコード領域は、Ｃ末端に６ｘＨｉｓタグ

を融合させたｐｃＤＮＡ３．１ベースの発現ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ，ＵＳＡ）にもクローニングされ、それぞれヒトＣＤ１３７－ｈｉｓ及びヒトＯＸ４０－ｈｉｓが得られた。組換え融合タンパク質の生産では、プラスミドをＨＥＫ２９３ベースの哺乳類細胞発現システム（インハウスで開発）に一時的にトランスフェクションし、回転シェーカーを備えたCO_2インキュベーターで５～７日間培養した。組換えタンパク質を含む上清を収集し、遠心分離によって除去した。組換えタンパク質は、プロテインＡカラム（カタログ番号１７１２７９０１、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）またはＮｉ－ＮＴＡアガロース（カタログ番号Ｒ９０１１５、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用して精製した。すべての組換えタンパク質はリン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）に対して透析し、少量ずつアリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０２５２】

細胞株での安定した発現

全長ヒトＣＤ１３７（ｈｕＣＤ１３７）を発現する安定した細胞株を確立するために、ｈｕＣＤ１３７配列をレトロウイルスベクターｐＦＢ－Ｎｅｏ（カタログ番号２１７５６１、Ａｇｉｌｅｎｔ，ＵＳＡ）にクローニングした。デュアルトロピックレトロウイルスベクターは、以前のプロトコールに従って生成した（Ｚｈａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｂｌｏｏｄ，１０６，１５４４－１５５１）。ｈｕＣＤ１３７を含むベクターをＨｕｔ７８細胞（ＡＴＣＣ、ＴＩＢ－１６１）またはＮＫ９２－ｍｉ細胞（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－２４０８）に形質導入して、ｈｕＣＤ１３７発現細胞株、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７またはＮＫ９２－ｍｉ／ｈｕＣＤ１３７を生成した。ｈｕＣＤ１３７発現細胞株を、Ｇ４１８を含む１０％ＦＢＳを含有する培地中で培養することによって選択し、次いでＦＡＣＳによって検証した。

【０２５３】

【表１７－１】

表１７：組換えＣＤ１３７タンパク質の配列

構築物	配列番号	配列
ヒトCD137 FL AA	配列番号135	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSP CPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCL GAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCS LDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQII SFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQE EDGCSCRFPEEEEGGCEL
ヒトCD137 FL DNA	配列番号136	ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTGTTGCTGGTC CTCAACTTTGAGAGGACAAGATCATTGCAGGATCCTTGTAGTAAC TGCCCAGCTGGTACATTCTGTGATAATAACAGGAATCAGATTTGC AGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGG ACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAAGGTGTTTTCAGGACCAGG AAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACTGCACTCCA GGGTTTCACTGCCTGGGGGCAGGATGCAGCATGTGTGAACAGGAT TGTAAACAAGGTCAAGAACTGACAAAAAAAGGTTGTAAAGACTG TTGCTTTGGGACATTTAACGATCAGAAACGTGGCATCTGTCGACC CTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTTGTGAATGG GACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGTGGACCATCTCCAGCCGACC TCTCTCCGGGAGCATCCTCTGTGACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAG AGCCAGGACACTCTCCGCAGATCATCTCCTTCTTTCTTGCGCTGAC GTCGACTGCGTTGCTCTTCCTGCTGTTCTTCCTCACGCTCCGTTTCT CTGTTGTTAAACGGGGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAAC AACCATTTATGAGACCAGTACAAACTACTCAAGAGGAAGATGGCT GTAGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTG
ヒトCD137 AA 24-183	配列番号137	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGV FRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC KDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPA DLSPGASSVTPPAPAREPGH
ヒトCD137 24-183 DNA	配列番号138	CTGCAGGATCCTTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTCTGTGAT AATAACAGGAATCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTC TCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTG TAAAGGTGTTTTCAGGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAA TGCAGAGTGTGACTGCACTCCAGGGTTTCACTGCCTGGGGGCAGG ATGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAACTGA CAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAACGATC AGAAACGTGGCATCTGTCGACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATG GAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTC TGTGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCGGGAGCATCCTCTGTG ACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACAC

【０２５４】

【表１７－２】

ヒトCD137-his	配列番号139	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE
ヒトCD137-his DNA	配列番号140	CTGCAGGATCCTTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTCTGTGATAATAACAGGAATCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAAGGTGTTTTCAGGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACTGCACTCCAGGGTTTCACTGCCTGGGGGCAGGATGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAACTGACAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAACGATCAGAAACGTGGCATCTGTCGACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGTGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCGGGAGCATCCTCTGTGACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACCATCACCATCACCATCACGGAGGCGGTCTGAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAA
ヒトCD137 ECD-mIgG2a AA	配列番号141	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

【０２５５】

【表１７－３】

ヒトCD137ECD-mIgG2a DNA	配列番号142	CTGCAGGATCCTTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTCTGTGAT AATAACAGGAATCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTC TCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTG TAAAGGTGTTTTCAGGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAA TGCAGAGTGTGACTGCACTCCAGGGTTTCACTGCCTGGGGGCAGG ATGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAACTGA CAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAACGATC AGAAACGTGGCATCTGTCGACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATG GAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTC TGTGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCGGGAGCATCCTCTGTG ACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACGAGCCCAGAGG GCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAA CCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAG GATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTG GTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTT GTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAG AGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCAT CCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGG TCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAA AACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTC CACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGC ATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACC AACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGT CCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGT GGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCAG TGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCT CCCGGACTCCGGGTAAA
mIgG2a AA	配列番号143	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

【０２５６】

【表１７－４】

mIg G2a DNA	配列番号144	GAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGC CCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTC CAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCA CATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGA TCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACAC AAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTG CCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCA AATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGA ACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATAT GTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACT CTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTG GAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACAC TGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAA GCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACT CCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTA AGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA
ヒトCD137リガンドAA	配列番号145	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACA VFLACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAG VYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDL PPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
ヒトCD137リガンドcDNA	配列番号146	ATGGAATACGCCTCTGACGCTTCACTGGACCCCGAAGCCCCGTGG CCTCCCGCGCCCCGCGCTCGCGCCTGCCGCGTACTGCCTTGGGCC CTGGTCGCGGGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTCGCTGCCGCCTGC GCCGTCTTCCTCGCCTGCCCCTGGGCCGTGTCCGGGGCTCGCGCCT CGCCCGGCTCCGCGGCCAGCCCGAGACTCCGCGAGGGTCCCGAGC TTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACCTGCGGCAGGGCA TGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGCTGATCGATGGGC CCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAGGCGTGTCCCTGA CGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAGGAGCTGGTGGTG GCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAACTAGAGCTGCGG CGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTTTCACTTGCGCTG CACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCCGCCGCCCTGGCT TTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAGGCTCGGAACTCG GCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAG CGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCC TGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTG ACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCGAGGTCGGAATAA

【０２５７】

【表１７－５】

ヒトCD137リガンド71-254 AA	配列番号147	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
ヒトCD137リガンド71-254 DNA	配列番号148	CGCGAGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTG GACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTT CTGCTGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTG GCAGGCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACAC GAAGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTT TCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTC CGTTTCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGG GCCGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCC GAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCAC CTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCC AGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTG GGACTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCA CCGAGGTCGGAA
ヒトCD137リガンド-mIgG2a AA	配列番号149	EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVV DVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEE MTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDG SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKG GGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SE

【０２５８】

【表１７－６】

ヒトCD137リガンド-mIgG2a DNA	配列番号150	GAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGC CCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTC CAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCA CATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGA TCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACAC AAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTG CCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCA AATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGA ACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATAT GTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACT CTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTG GAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACAC TGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAA GCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACT CCTGTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTA AGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCACGCG AGGGTCCCGAGCTTTCGCCCGACGATCCCGCCGGCCTCTTGGACC TGCGGCAGGGCATGTTTGCGCAGCTGGTGGCCCAAAATGTTCTGC TGATCGATGGGCCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAG GCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGAAG GAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTTTCAA CTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGGCTCCGTT TCACTTGCGCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGGGCC GCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGCCTCCTCCGAG GCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGCTTGCTGCACCTG AGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTCACACTGAGGCCAGG GCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGGGCGCCACAGTCTTGGGA CTCTTCCGGGTGACCCCCGAAATCCCAGCCGGACTCCCTTCACCG AGGTCGGAA
cyno CD137 FL AA	配列番号151	MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPC PPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNAECDCISGYHCLG AECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLD GKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFFL ALTSTVVLFLLFFLVLRFSVVKRSRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDG CSCRFPEEEEGGCEL

【０２５９】

【表１７－７】

cyno CD137 FL DNA	配列番号152	ATGGGAAACAGCTGTTACAACATAGTAGCCACTCTGTTGCTGGTC CTGAACTTTGAGAGGACAAGATCCTTGCAGGATCTGTGTAGTAAC TGCCCAGCTGGTACATTCTGTGATAATAACAGGAGTCAGATTTGC AGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGG ACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAAGGTGTTTTCAAGACCAGG AAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACTGCATTTCA GGATATCACTGCCTGGGGGCAGAATGCAGCATGTGTGAACAGGA TTGTAAACAAGGTCAAGAATTGACAAAAAAAGGTTGTAAAGACT GTTGCTTTGGGACATTTAATGACCAGAAACGTGGCATCTGTCGAC CCTGGACAAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTGCTTGTGAATG GGACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGCGGACCATCTCCAGCCGAC CTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCGACCCCGCCTGCCCCTGCGAGA GAGCCAGGACACTCTCCGCAGATCATCTTCTTTCTTGCGCTGACTT CGACTGTGGTACTCTTCCTGCTGTTCTTCCTCGTGCTCCGTTTCTCT GTTGTTAAACGGAGCAGAAAGAAACTCCTGTATATATTCAAACAA CCATTTATGAGACCGGTACAAACCACTCAAGAGGAAGATGGATGT AGCTGCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGTG A
cyno CD137 ECD 24-186 AA	配列番号153	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGV FKTRKECSSTSNAECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGC KDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPA DLSPGASSATPPAPAREPGHSPQ
cyno CD137 ECD 24-186 DNA	配列番号154	CTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTCTGTGAT AATAACAGGAGTCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTC TCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTG TAAAGGTGTTTTCAAGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAA TGCAGAGTGTGACTGCATTTCAGGATATCACTGCCTGGGGGCAGA ATGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAATTGA CAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAATGACC AGAAACGTGGCATCTGTCGACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATG GAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTC TGCGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCG ACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCGCAG
cyno CD137 ECD -mIgG2a AA	配列番号155	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGV FKTRKECSSTSNAECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGC KDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPA DLSPGASSATPPAPAREPGHSPQEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSV FIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER TISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

【０２６０】

【表１７－８】

cyno CD137 ECD-mIg G2a DNA	配列番号156	CTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTCTGTGAT AATAACAGGAGTCAGATTTGCAGTCCCTGTCCTCCAAATAGTTTC TCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATATGCAGGCAGTG TAAAGGTGTTTTCAAGACCAGGAAGGAGTGTTCCTCCACCAGCAA TGCAGAGTGTGACTGCATTTCAGGATATCACTGCCTGGGGGCAGA ATGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAACAAGGTCAAGAATTGA CAAAAAAAGGTTGTAAAGACTGTTGCTTTGGGACATTTAATGACC AGAAACGTGGCATCTGTCGACCCTGGACAAACTGTTCTTTGGATG GAAAGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTC TGCGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCG ACCCCGCCTGCCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCGCAGGAG CCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCA GCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAA AGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACAT GTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCA GCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAA ACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCC CTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAA TGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAAC CATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGT CTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCT GACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGA GTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTG AACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCT GAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCT GTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGA GCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA
ヒトCD40 AA	配列番号157	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQ KGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDT ICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGP QDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINF PDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

【０２６１】

【表１７－９】

ヒトCD40 DNA	配列番号158	ATGGTTCGTCTGCCTCTGCAGTGCGTCCTCTGGGGCTGCTTGCTGA CCGCTGTCCATCCAGAACCACCCACTGCATGCAGAGAAAAACAGT ACCTAATAAACAGTCAGTGCTGTTCTTTGTGCCAGCCAGGACAGA AACTGGTGAGTGACTGCACAGAGTTCACTGAAACGGAATGCCTTC CTTGCGGTGAAAGCGAATTCCTAGACACCTGGAACAGAGAGACA CACTGCCACCAGCACAAATACTGCGACCCCAACCTAGGGCTTCGG GTCCAGCAGAAGGGCACCTCAGAAACAGACACCATCTGCACCTGT GAAGAAGGCTGGCACTGTACGAGTGAGGCCTGTGAGAGCTGTGT CCTGCACCGCTCATGCTCGCCCGGCTTTGGGGTCAAGCAGATTGC TACAGGGGTTTCTGATACCATCTGCGAGCCCTGCCCAGTCGGCTT CTTCTCCAATGTGTCATCTGCTTTCGAAAAATGTCACCCTTGGACA AGCTGTGAGACCAAAGACCTGGTTGTGCAACAGGCAGGCACAAA CAAGACTGATGTTGTCTGTGGTCCCCAGGATCGGCTGAGAGCCCT GGTGGTGATCCCCATCATCTTCGGGATCCTGTTTGCCATCCTCTTG GTGCTGGTCTTTATCAAAAAGGTGGCCAAGAAGCCAACCAATAAG GCCCCCCACCCCAAGCAGGAACCCCAGGAGATCAATTTTCCCGAC GATCTTCCTGGCTCCAACACTGCTGCTCCAGTGCAGGAGACTTTA CATGGATGCCAACCGGTCACCCAGGAGGATGGCAAAGAGAGTCG CATCTCAGTGCAGGAGAGACAGTGA
huCD40 ECD AA(1-194)	配列番号159	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKL VSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQ KGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDT ICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGP QDRLRA
huCD40 ECD DNA(1-194)	配列番号160	ATGGTTCGTCTGCCTCTGCAGTGCGTCCTCTGGGGCTGCTTGCTGA CCGCTGTCCATCCAGAACCACCCACTGCATGCAGAGAAAAACAGT ACCTAATAAACAGTCAGTGCTGTTCTTTGTGCCAGCCAGGACAGA AACTGGTGAGTGACTGCACAGAGTTCACTGAAACGGAATGCCTTC CTTGCGGTGAAAGCGAATTCCTAGACACCTGGAACAGAGAGACA CACTGCCACCAGCACAAATACTGCGACCCCAACCTAGGGCTTCGG GTCCAGCAGAAGGGCACCTCAGAAACAGACACCATCTGCACCTGT GAAGAAGGCTGGCACTGTACGAGTGAGGCCTGTGAGAGCTGTGT CCTGCACCGCTCATGCTCGCCCGGCTTTGGGGTCAAGCAGATTGC TACAGGGGTTTCTGATACCATCTGCGAGCCCTGCCCAGTCGGCTT CTTCTCCAATGTGTCATCTGCTTTCGAAAAATGTCACCCTTGGACA AGCTGTGAGACCAAAGACCTGGTTGTGCAACAGGCAGGCACAAA CAAGACTGATGTTGTCTGTGGTCCCCAGGATCGGCTGAGAGCC

【０２６２】

【表１７－１０】

ヒトCD40ECD-mIgG2aAA	配列番号161	MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPCGESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCGPQDRLRASEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
ヒトCD40ECD-mIgG2aDNA	配列番号162	ATGGTTCGTCTGCCTCTGCAGTGCGTCCTCTGGGGCTGCTTGCTGACCGCTGTCCATCCAGAACCACCCACTGCATGCAGAGAAAAACAGTACCTAATAAACAGTCAGTGCTGTTCTTTGTGCCAGCCAGGACAGAAACTGGTGAGTGACTGCACAGAGTTCACTGAAACGGAATGCCTTCCTTGCGGTGAAAGCGAGTTCCTAGACACCTGGAACAGAGAGACACACTGCCACCAGCACAAATACTGCGACCCCAACCTAGGGCTTCGGGTCCAGCAGAAGGGCACCTCAGAAACAGACACCATCTGCACCTGTGAAGAAGGCTGGCACTGTACGAGTGAGGCCTGTGAGAGCTGTGTCCTGCACCGCTCATGCTCGCCCGGCTTTGGGGTCAAGCAGATTGCTACAGGGGTTTCTGATACCATCTGCGAGCCCTGCCCAGTCGGCTTCTTCTCCAATGTGTCATCTGCTTTCGAAAAATGTCACCCTTGGACAAGCTGTGAGACCAAAGACCTGGTTGTGCAACAGGCAGGCACAAACAAGACTGATGTTGTCTGTGGTCCCCAGGATCGGCTGAGAGCTAGCGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGCCCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA
ヒトOX40AA	配列番号163	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

【０２６３】

【表１７－１１】

ヒトOX40 DNA	配列番号164	ATGTGCGTGGGGGCTCGGCGGCTGGGCCGCGGGCCGTGTGCGGCT CTGCTCCTCCTGGGCCTGGGGCTGAGCACCGTGACGGGGCTCCAC TGTGTCGGGGACACCTACCCCAGCAACGACCGGTGCTGCCACGAG TGCAGGCCAGGCAACGGGATGGTGAGCCGCTGCAGCCGCTCCCA GAACACGGTGTGCCGTCCGTGCGGGCCGGGCTTCTACAACGACGT GGTCAGCTCCAAGCCGTGCAAGCCCTGCACGTGGTGTAACCTCAG AAGTGGGAGTGAGCGGAAGCAGCTGTGCACGGCCACACAGGACA CAGTCTGCCGCTGCCGGGCGGGCACCCAGCCCCTGGACAGCTACA AGCCTGGAGTTGACTGTGCCCCCTGCCCTCCAGGGCACTTCTCCCC AGGCGACAACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACCAACTGCACCTTGGC TGGGAAGCACACCCTGCAGCCGGCCAGCAATAGCTCGGACGCAA TCTGTGAGGACAGGGACCCCCCAGCCACGCAGCCCCAGGAGACC CAGGGCCCCCCCGGCCAGGCCCATCACTGTCCAGCCCACTGAAGCC TGGCCCAGAACCTCACAGGGACCCTCCACCCGGCCCGTGGAGGTC CCCGGGGGCCGTGCGGTTGCCGCCATCCTGGGCCTGGGCCTGGTG CTGGGGCTGCTGGGCCCCCTGGCCATCCTGCTGGCCCTGTACCTG CTCCGGAGGGACCAGAGGCTGCCCCCCGATGCCCACAAGCCCCCT GGGGGAGGCAGTTTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGA CGCCCACTCCACCCTGGCCAAGATCTGA
ヒトOX40 ECD (1-216) AA	配列番号165	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHEC RPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSG SERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDN QACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPAR PITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVA
ヒトOX40 ECD (1-216) DNA	配列番号166	ATGTGCGTGGGGGCTCGGCGGCTGGGCCGCGGGCCGTGTGCGGCT CTGCTCCTCCTGGGCCTGGGGCTGAGCACCGTGACGGGGCTCCAC TGTGTCGGGGACACCTACCCCAGCAACGACCGGTGCTGCCACGAG TGCAGGCCAGGCAACGGGATGGTGAGCCGCTGCAGCCGCTCCCA GAACACGGTGTGCCGTCCGTGCGGGCCGGGCTTCTACAACGACGT GGTCAGCTCCAAGCCGTGCAAGCCCTGCACGTGGTGTAACCTCAG AAGTGGGAGTGAGCGGAAGCAGCTGTGCACGGCCACACAGGACA CAGTCTGCCGCTGCCGGGCGGGCACCCAGCCCCTGGACAGCTACA AGCCTGGAGTTGACTGTGCCCCCTGCCCTCCAGGGCACTTCTCCCC AGGCGACAACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACCAACTGCACCTTGGC TGGGAAGCACACCCTGCAGCCGGCCAGCAATAGCTCGGACGCAA TCTGTGAGGACAGGGACCCCCCAGCCACGCAGCCCCAGGAGACC CAGGGCCCCCCCGGCCAGGCCCATCACTGTCCAGCCCACTGAAGCC TGGCCCAGAACCTCACAGGGACCCTCCACCCGGCCCGTGGAGGTC CCCGGGGGCCGTGCGGTTGCC

【０２６４】

【表１７－１２】

ヒトOX40 ECD-His AA	配列番号167	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHEC RPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTWCNLRSG SERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDN QACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPAR PITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAHHHHHH
ヒトOX40 ECD-His DNA	配列番号168	ATGTGCGTGGGGGCTCGGCGGCTGGGCCGCGGGCCGTGTGCGGCT CTGCTCCTCCTGGGCCTGGGGCTGAGCACCGTGACGGGGCTCCAC TGTGTCGGGGACACCTACCCCAGCAACGACCGGTGCTGCCACGAG TGCAGGCCAGGCAACGGGATGGTGAGCCGCTGCAGCCGCTCCCA GAACACGGTGTGCCGTCCGTGCGGGCCGGGCTTCTACAACGACGT GGTCAGCTCCAAGCCGTGCAAGCCCTGCACGTGGTGTAACCTCAG AAGTGGGAGTGAGCGGAAGCAGCTGTGCACGGCCACACAGGACA CAGTCTGCCGCTGCCGGGCGGGCACCCAGCCCCTGGACAGCTACA AGCCTGGAGTTGACTGTGCCCCCTGCCCTCCAGGGCACTTCTCCCC AGGCGACAACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACCAACTGCACCTTGGC TGGGAAGCACACCCTGCAGCCGGCCAGCAATAGCTCGGACGCAA TCTGTGAGGACAGGGACCCCCCAGCCACGCAGCCCCAGGAGACC CAGGGCCCCCCGGCCAGGCCCATCACTGTCCAGCCCACTGAAGCC TGGCCCAGAACCTCACAGGGACCCTCCACCCGGCCCGTGGAGGTC CCCGGGGGCCGTGCGGTTGCCCATCACCATCACCATCAC

【０２６５】

実施例１６．抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体の生成

合成ヒトＶＨ抗体レパートリーの構築

合成ライブラリーは、本質的に生殖系列３－２３（配列番号１６９及び１７０）を使用して構築された。重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ）のランダム化は、縮重オリゴヌクレオチドを使用したコンビナトリアル突然変異誘発によって実行した。ＨＣＤＲ１及びＨＣＤＲ２領域のランダム化は、Ｍｅｅｔｅｉによって記載されているように、ポリメラーゼ連鎖反応による複数の部位特異的突然変異を介して実行した（Ｍｅｅｔｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ，２６４，２８８－９１；Ｍｅｅｔｅｉ　ｅｔ　ａｌ．，（２００２）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ，１８２，９５－１０２）。ＣＤＲ３領域については、８～１４（Ｋａｂａｔ定義）の異なる長さの縮重オリゴヌクレオチドを合成し（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、スプライスオーバーラップエクステンションＰＣＲによって多様性を導入した。突然変異誘発ステップ後のＰＣＲ産物をＮｃｏＩ／ＮｏｔＩで二重消化し、ファージミドベクターｐＣＡＮＴＡＢ－５Ｅに連結した。次に、レパートリーをＥｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ　ＴＧ１細菌に形質転換し、ランダムクローン（解析された９６クローン超）のＤＮＡサンガー配列決定によって検証した。ファージは、ＫＭ１３ヘルパーファージを使用したレスキューステップの後、培養上清から直接ＰＥＧ／ＮａＣｌを用いた２回の沈殿によって精製した。Ｅ．ｃｏｌｉ細菌への形質転換後、合計サイズ１．３８×１０^{11}のライブラリーが得られた。

【０２６６】

【表１８】

表１８：ライブラリー構築に使用された生殖細胞系

3-23 生殖系列 AA	配列番号 169	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAISWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAR
3-23 生殖系列 DNA	配列番号 170	GAAGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGCG GCCTGGTGCAGCCGGGCGGCAGCCTGCG CCTGAGCTGCGCGGCGAGCGGCTTTACCT TTAGCAGCTATGCGATTAGCTGGGTGCGC CAGGCGCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGG TGAGCGCGATTAGCGGCAGCGGCGGTAG CACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGGCC GCTTTACCATTAGCCGCGATAACAGCAAA AACACCCTGTATCTGCAGATGAACAGCCT GCGCGCGGAAGATACCGCCGTGTATTATT GCGCGCGT

【０２６７】

ファージディスプレイのパニング及びスクリーニング

ファージディスプレイの選択は、標準プロトコールを用いたファージディスプレイによって実施した（Ｓｉａｃｃｉ ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ，５，２３４０－５０；Ｚｈａｏ ｅｔ ａｌ．，（２０１４）ＰＬｏＳ Ｏｎｅ，９，ｅ１１１３３９）。簡単に説明すると、ラウンド１とラウンド２では、免疫チューブ（カタログ番号４７０３１９、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）中の１０μｇ／ｍｌの固定化ヒトＣＤ１３７ ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａを使用した。ラウンド３とラウンド４では、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞を選択に使用した。免疫チューブを、１％Ｔｗｅｅｎ２０（ＭＰＢＳＴ）を補充したＰＢＳ中の５％粉乳（ｗ／ｖ）で１時間ブロッキングした。ＰＢＳＴ（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を補充したＰＢＳ緩衝液）で洗浄した後、各サブライブラリーからの５×１０^{12}（ラウンド１）または５×１０^{11}（ラウンド２）のファージを、ＭＰＢＳＴ中のヒトＣＤ４０ ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａによって１時間枯渇させ、次いで抗原と共に１時間インキュベートした。第３と第４のラウンドの選択では、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞（ラウンド３）を使用し、枯渇細胞としてＨＥＫ２９３（ＡＴＣＣ、ＣＲＬ－１５７３）細胞を使用して細胞パニングを行った。ＰＢＳＴで洗浄した後、結合したファージを１００ｍＭのトリエチルアミン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）で溶出した。溶出されたファージを使用して対数増殖期中期のＥ．ｃｏｌｉ ＴＧ１細菌を感染させ、２％グルコース及び１００μｇ／ｍｌアンピシリンを補充したＴＹＥ寒天プレート上にプレーティングした。４つのラウンドの選択後、個々のクローンを選択し、標準プロトコールを使用してファージを含む上清を調製した。ファージＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳを使用して、抗ｈｕＣＤ１３７ ＶＨドメイン抗体をスクリーニングした。

【０２６８】

ファージＥＬＩＳＡでは、Ｍａｘｉｓｏｒｐ（商標）免疫プレートを抗原でコーティングし、ＰＢＳ緩衝液中の５％粉乳（ｗ／ｖ）でブロッキングした。ファージ上清をＭＰＢＳＴで３０分間ブロッキングし、ＥＬＩＳＡプレートのウェルに１時間加えた。ＰＢＳＴで洗浄した後、ＨＲＰ結合抗Ｍ１３抗体（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）及び３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質（カタログ番号００－４２０１－５６、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ＵＳＡ）を使用して、結合したファージを検出した。ＥＬＩＳＡ陽性ク

ローンは、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞を使用したフローサイトメトリーによってさらに検証した。ＣＤ１３７発現細胞（10^5細胞／ウェル）をＥＬＩＳＡ陽性ファージ上清と共にインキュベートし、続いてＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｒｏ－６４７標識抗Ｍ１３抗体（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ　ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。

【０２６９】

ＦＡＣＳスクリーニングにおいて陽性シグナルを示し、ｈｕＣＤ１３７とｃｙｎｏＣＤ１３７の両方に結合するが、ｈｕＯＸ４０及びｈｕＣＤ４０には結合しないクローンを選択し、配列決定した。９３個の陽性クローンから約７６個の固有の配列が同定された（図１３Ａ～１３Ｂ）。

【０２７０】

Ｆｃ融合ＶＨ抗体の発現及び精製

ＶＨ配列は、配列相同性を比較することによって分析され、配列類似性に基づいてグループ化された。相補性決定領域（ＣＤＲ）は、Ｋａｂａｔ（Ｗｕ　ａｎｄ　Ｋａｂａｔ（１９７０）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１３２：２１１－２５０）及びＩＭＧＴ（Ｌｅｆｒａｎｃ（１９９９）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　２７：２０９－２１２）システムに基づいて、配列アノテーション及びインターネットベースの配列解析によって定義された。２つの代表的な上位クローンＢＧＡ－７２０７及びＢＧＡ－４７１２のアミノ酸配列及びＤＮＡ配列を以下の表１９に示す。ＳＰＲによる配列確認及び結合曲線の分析後、インハウスで開発した発現ベクターを使用して、抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体をヒトＦｃ融合ＶＨ抗体フォーマット（ＶＨ－Ｆｃ）として構築した。図１４Ａに示すように、ＶＨドメイン抗体は、間にＧ４Ｓ（配列番号３２４）リンカーを介してヒトＦｃのＮ末端に融合された。ヒトＩｇＧ１（配列番号１７５）のＦｃヌルバージョン（ＦｃγＲ結合のない不活性Ｆｃ）を使用した。Ｆｃ融合ＶＨ抗体の発現及び調製は、２９３Ｇ細胞へのトランスフェクションと、プロテインＡカラム（カタログ番号１７５４３８０２、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用した精製とによって達成された。精製した抗体をＰＢＳ中で０．５～５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、アリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０２７１】

【表１９－１】

表１９：選択した２つの抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体のアミノ酸配列及びＤＮＡ配列

抗体	配列番号		配列
BGA-7207	配列番号60	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRLDTTEVGWVRQAPGKGLEW VSTIMGISGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARVVDSLFDDSAVFDYWGQGTLVTVSS
	配列番号61	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAG GTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCAGATTGGACACC ACCGAAGTAGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAA TGGGTCTCCACCATCATGGGTATTAGTGGTTCGACATACTATGCGGA CAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACTCAAAAAAT ACTCTTTACCTTCAAATGAATAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGT GTACTACTGCGCCCGCGTCGTCGATTCCCTCTTTGATGACAGCGCCG TTTTTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG
	配列番号171	VH-Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFRLDTTEVGWVRQAPGKGLEW VSTIMGISGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARVVDSLFDDSAVFDYWGQGTLVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPA AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	配列番号172	VH-Fc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAG GTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCAGATTGGACACC ACCGAAGTAGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAA TGGGTCTCCACCATCATGGGTATTAGTGGTTCGACATACTATGCGGA CAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACTCAAAAAAT ACTCTTTACCTTCAAATGAATAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGT GTACTACTGCGCCCGCGTCGTCGATTCCCTCTTTGATGACAGCGCCG TTTTTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCGGGC GGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCTC CACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAA GGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTG GTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATG TGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGG AGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCT GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTC CAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCC AAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCC GGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAA GGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGC CAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCG ACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTC TGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAA

【０２７２】

【表１９－２】

BGA-4712	配列番号70	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMLSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDFGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSS
	配列番号71	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAG GTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCATGTTGTCCGCC GAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAA TGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGA CAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACTCAAAAAAT ACTCTTTACCTTCAAATGAATAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGT GTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCT TTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG
	配列番号173	VH -Fc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMLSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDFGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPA AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	配列番号174	VH -Fc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAG GTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCATGTTGTCCGCC GAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAA TGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGA CAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACTCAAAAAAT ACTCTTTACCTTCAAATGAATAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGT GTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCT TTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCGGGCGG CGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCTCCA CCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGG ATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGT GGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTG GACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAG CAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCA ATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAA GGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGG GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGG GCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCA GCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGAC GGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTG CATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAA

【０２７３】

【表１９－３】

不活性Fc	配列番号175	Fcヌルバージョン IgG1	DKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	配列番号176	Fcヌルバージョン IgG1 DNA	GACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCA GGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTG ATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTG AGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGC GTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTA CAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCA GGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAA GGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGG CCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGA AGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGG CTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCA GCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGA CGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCT CTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTA AA

【０２７４】

実施例１７．抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体の機能スクリーニング

ＶＨ－Ｆｃタンパク質を含む上清を使用して、強いアゴニズムを有する選択された抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体に機能的スクリーニングを適用した。簡単に説明すると、９６ウェルの白色／透明底プレート（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ）を３ｕｇ／ｍｌ抗ｈｕＣＤ３（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号１６－００３７－８５）と共に５０μｌ／ウェルで５分間プレインキュベートし、次いで、ＰＢＳ緩衝液で洗い流した。次に、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞を５×１０^{5}細胞／ｍｌで再懸濁し、プレコートプレートに５０μｌ／ウェル（ウェル当たり２５，０００ウェル）で直接プレーティングした。様々なＶＨ－Ｆｃタンパク質を含む上清を細胞と混合した。あるいは、Ｆｃ融合を有する精製ＶＨドメイン抗体については、精製ＶＨ－Ｆｃタンパク質調製物の用量滴定を、２５、５、１、０．２、０．０４、０．００８または０．００１６μｇ／ｍｌで５０μｌ／ウェルで二重に加えた。架橋剤として、ヤギ抗ｈｕＩｇＧ（Ｈ＆Ｌ）ポリスチレン粒子（６．４６μｍ）（カタログ番号ＨＵＰ－６０－５、Ｓｐｈｅｒｏｔｅｃｈ）を添加した。アッセイプレートを３７℃で一晩インキュベートし、２４時間後にＩＬ－２の濃度を測定した。データは、培地のみを含むウェル内の濃度と比較したＩＬ－２の増加倍数としてプロットされた。図１４Ｂは、ＶＨ－Ｆｃタンパク質を含む上清を使用した代表的なスクリーニング結果を示す図であり、クローンの１つであるＢＧＡ－４７１２が用量依存的にＨｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞におけるＩＬ－２産生を刺激できることが示されている（図１４Ｃ）。

【０２７５】

実施例１８．精製された抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体の特徴付け

ＥＬＳＩＡによる精製抗体の特徴付け

抗原ＥＬＩＳＡでは、Ｍａｘｉｓｏｒｐ（商標）免疫プレートを抗原でコーティングし、ＰＢＳ緩衝液（ブロッキング緩衝液）中の３％ＢＳＡ（ｗ／ｖ）でブロッキングした。モノクローナルＶＨドメイン抗体をブロッキング緩衝液で３０分間ブロッキングし、ＥＬ

ＩＳＡプレートのウェルに１時間添加した。ＰＢＳＴで洗浄した後、ＨＲＰ結合抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｓｉｇｍａ、Ａ０１７０）及び３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質（カタログ番号００－４２０１－５６、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ＵＳＡ）を使用して結合抗体を検出した。選択されたすべてのクローンは、ｃｙｎｏＣＤ１３７と交差反応し、ヒトＯＸ４０　ＥＣＤ及びヒトＣＤ４０　ＥＣＤには結合しないことが示された。

【０２７６】

ＳＰＲ分析による精製抗体の特徴付け

抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体の特徴付けは、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ－２００（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用するＳＰＲアッセイによって行われた。簡単に説明すると、抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を活性化されたＣＭ５バイオセンサーチップ（カタログ番号ＢＲ１００８３９、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に固定化した。抗ｈｕＣＤ１３７ドメイン抗体をチップ表面に流し、抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体によって捕捉した。次に、ヒトＣＤ１３７　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａの段階希釈（６．０ｎＭ～２１５０ｎＭ）をチップ表面に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化を分析して、１対１のラングミュア結合モデル（ＢＩＡ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して会合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を算出した。平衡解離定数（K_D）を、比率k_{off}／k_{on}として計算した。

【０２７７】

フローサイトメトリーによる精製抗体の特徴付け

フローサイトメトリーでは、ヒトＣＤ１３７$^{+}$発現細胞（10^5細胞／ウェル）を様々な濃度の精製されたＶＨドメイン抗体とインキュベートし、次いでＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｒｏ－６４７標識抗ｈｕＩｇＧ　Ｆｃ抗体（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，ＵＳＡ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ　ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。リガンド競合は、フローサイトメトリーに基づくアッセイにも適用された。簡単に説明すると、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７を、段階希釈したヒトＣＤ１３７リガンド－ｍＩｇＧ２ａの存在下でＦｃ融合ＶＨドメイン抗体（ＶＨ－Ｆｃ）とインキュベートし、続いてＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｒｏ－６４７標識抗ｈｕＩｇＧ　Ｆｃ抗体（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、ＵＳＡ）で検出した。

【０２７８】

次に、選択したＶＨドメイン抗体を、親和性、細胞結合、及びリガンド競合について特徴付けた。１つの代表的なトップクローンＢＧＡ－４７１２のＳＰＲ研究、ＦＡＣＳ分析及びリガンド競合結果を図１５Ａ～１５Ｂに示す。

【０２７９】

実施例１９．抗ＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２及び抗ＣＥＡ抗体を用いたＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体の構築

単一抗体治療よりも潜在的に効果的なＣＤ１３７ベースの作用機序（ＭＯＡ）を探るため、抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体を利用した多数の多重特異性フォーマットが構築され、テストされている。ここでは、ＣＤ１３７ベースのＴ細胞エンゲージャー（ＴＣＥ）を作成するために複数のフォーマットが採用されており、第１の抗原結合ドメインは腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）を標的とし、第２の抗原結合ドメインはＣＤ１３７活性化受容体を標的とする。例えば、抗ＣＥＡ抗体ＢＧＡ－１１３（配列番号１７９及び１８１）の第１の抗原結合ドメインを使用して、以下に示すように具体的に定義されたフォーマット（表２０）の抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２（配列番号７０）の第２の抗原結合ドメインとペアリングした。この構築物には、不活性Ｆｃを使用した（配列番号１７５）。これらの多重特異性抗体の発現及び調製は、２９３Ｇ細胞へのトランスフェクションと、プロテインＡカラム（カタログ番号１７５４３８０２、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用した精製とによって達成された。精製した抗体をＰＢＳ中で０．５～５ｍｇ／ｍＬに濃縮し、アリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０２８０】

フォーマットＡ（Ａ－ＣＤ１３７／ＣＥＡ）
　フォーマットＡは、Ｆａｂ×ＶＨ構成を備えた対称ＩｇＧ様多重特異性分子を提供する。図１６Ａに示すように、抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２を、抗ＣＥＡ抗体のＦｃ（ＣＨ３ドメイン）のＣ末端に、その間に１つのＧ４Ｓリンカー（配列番号３２４）が介在して融合した（配列番号１７９及び１７７）。
【０２８１】
フォーマットＢ（Ｂ－ＣＤ１３７／ＣＥＡ）
　フォーマットＢも、Ｆａｂ×ＶＨ構成を備えた対称ＩｇＧ様多重特異性分子を提供する。図１６Ｂに示すように、抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２を、抗ＣＥＡ抗体の軽鎖（Ｃκ）のｃ末端に、その間に１つのＧ４Ｓリンカー（配列番号３２４）が介在して融合した（配列番号１８１及び１８３）。
【０２８２】
フォーマットＣ（Ｃ－ＣＤ１３７／ＣＥＡ）
　フォーマットＣは、Ｆａｂ×ＶＨ構成を備えた対称ＶＨ抗体様多重特異性分子を提供する。図１６Ｃに示すように、抗ＣＥＡ抗体のＦａｂ領域を、抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２のＶＨのＮ末端に、その間に１つのＧ４Ｓリンカー（配列番号３２４）が介在して融合した（配列番号１７９及び１８５）。
【０２８３】
フォーマットＤ（Ｄ－ＣＤ１３７／ＣＥＡ）
　フォーマットＤも、Ｆａｂ×ＶＨ構成を備えた対称ＩｇＧ様多重特異性分子を提供する。図１６Ｄに示すように、抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－４７１２を、抗ＣＥＡ抗体の重鎖（Ｖｈ）のＮ末端に、その間に１つのＧ４Ｓリンカー（配列番号３２４）が介在して融合した（配列番号１７９及び１８７）。
【０２８４】
　様々なＣＤ１３７／ＣＥＡ多重特異性抗体の収率及び生化学的特性を表２１にまとめた。２つの分子Ａ－ＣＤ１３７／ＣＥＡ及びＤ－ＣＤ１３７／ＣＥＡでは、ＳＥＣ－ＨＰＬＣプロファイルに基づくと、モノマーは両方とも９５％を超えている（表２１）。フローサイトメトリーベースのアッセイにより、フォーマットＡでは抗ＣＥＡアームの親和性の低下が非常に少ないのに対し、フォーマットＤでは抗ＣＥＡアームの親和性が有意に低下することが実証された（図１７Ａ）。また、フォーマットＡではＣＤ１３７アームの親和性低下があったが、フォーマットＤでは親和性にほとんどまたは全く影響がないことも実証された（図１７Ｄ）。
【０２８５】

【表２０－１】

表２０：様々なフォーマットのＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体のアミノ酸配列及びＤＮＡ配列

構築物	鎖	配列番号	配列
A-CD137/CEA	A-BGA-4712/CEA 重鎖 AA	配列番号 177	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGL EWIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQ LLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMLSAEDVGWVRQAPGKGLEWV SAILDFGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSS

【０２８６】

【表２０－２】

	A-BGA-4712/CEA 重鎖 DNA	配列番号178	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGG CGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTAC CAGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCT GGAATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTA TGCCCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAG CACCAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAG ATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACT ATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCA GCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACA AGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGAC CAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGA TCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCC ACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAA CTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGA TTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGG CCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCC AGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCT TCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGC CTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACG GCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCT GCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAA AGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAG GTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTC TGGATTCATGTTGTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGC GCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGG TGGTTCGACATACTATGCGGACAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGAT CTCGCGCGATAACTCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGAATAG CCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGT CTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATTACTGGGGACAGGG CACCTTAGTTACAGTCTCATCG
	抗CEA Ab 軽鎖 AA	配列番号179	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLL IYNYKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０２８７】

【表２０－３】

	抗CEA Ab軽鎖DNA	配列番号180	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGT GGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAACCAGTA TGGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGTGCCGAA ACTGCTGATTTATAACTATAAAAACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAG CCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT TAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGCGACCTATTATTGCCAGCA TCATCTGGGCACCCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGA AATTAAACGAACAGTGGCAGCCCCTTCCGTCTTCATTTTTCCCCCT TCTGACGAACAGCTGAAATCAGGAACTGCTAGCGTGGTCTGTCTG CTGAACAATTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTC GATAACGCTCTGCAGTCCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACCGAA CAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGTACTCTGACC CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGA AGTCACACACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAGAGTTTCAA CAGAGGGGAATGC
B-CD137/CEA	抗CEA Ab重鎖AA	配列番号181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２８８】

【表２０－４】

	抗CEA Ab重鎖DNA	配列番号182	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGG CGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTAC CAGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCT GGAATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTA TGCCCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAG CACCAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAG ATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACT ATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCA GCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACA AGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGAC CAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGA TCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCC ACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTG GAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAA CTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGA TTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGG CCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCC AGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAG AGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCT TCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGC CTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACG GCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCT GCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAA A
	B-BGA-4712/CEA軽鎖AA	配列番号183	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLL IYNYKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSEVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFMLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVT FDYWGQGTLVTVSS

【０２８９】

【表２０－５】

	B-BGA-4712/CEA軽鎖DNA	配列番号184	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGT GGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAACCAGTA TGGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGTGCCGAA ACTGCTGATTTATAACTATAAAAACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAG CCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT TAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGCGACCTATTATTGCCAGCA TCATCTGGGCACCCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGA AATTAAACGAACAGTGGCAGCCCCTTCCGTCTTCATTTTTCCCCCT TCTGACGAACAGCTGAAATCAGGAACTGCTAGCGTGGTCTGTCTG CTGAACAATTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTC GATAACGCTCTGCAGTCCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACCGAA CAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGTACTCTGACC CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGA AGTCACACACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAGAGTTTCAA CAGAGGGGAATGCGGGGGAGGCGGGTCCGAGGTCCAGTTACTTG AGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTAT CCTGCGCCGCGTCTGGATTCATGTTGTCCGCCGAAGACGTGGGTT GGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCC ATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGACAGTGTCAAA GGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACTCAAAAAATACTCTTTAC CTTCAAATGAATAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTAC TGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATT ACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG
C-CD137/CEA	C-BGA-4712/CEA重鎖AA	配列番号185	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAI LDFGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA RVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSSSGGGGSEPKSCDKTHTCPPCP APPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２９０】

【表２０－６】

	C-BGA-4712/CEA 重鎖 DNA	配列番号186	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGG CGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTAC CAGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCT GGAATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTA TGCCCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAG CACCAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAG ATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACT ATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCA GCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCG CCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACG GGGGAGGCGGGTCcGAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTC TGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTG GATTCATGTTGTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGC CGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTG GTTCGACATACTATGCGGACAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCT CGCGCGATAACTCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGAATAGCC TTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCT ACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATTACTGGGGACAGGGCA CCTTAGTTACAGTCTCATCGTCTGGTGGAGGCGGTTCAGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTC CTGCTGCCGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCGCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTACACCCTGCCCCC ATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGAT GCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
	抗CEA Ab 軽鎖 AA	配列番号179	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLL IYNYKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０２９１】

【表２０－７】

	抗CEA Ab軽鎖DNA	配列番号180	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGT GGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAACCAGTA TGGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGTGCCGAA ACTGCTGATTTATAACTATAAAAACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAG CCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT TAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGCGACCTATTATTGCCAGCA TCATCTGGGCACCCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGA AATTAAACGAACAGTGGCAGCCCCTTCCGTCTTCATTTTTCCCCCT TCTGACGAACAGCTGAAATCAGGAACTGCTAGCGTGGTCTGTCTG CTGAACAATTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTC GATAACGCTCTGCAGTCCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACCGAA CAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGTACTCTGACC CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGA AGTCACACACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAGAGTTTCAA CAGAGGGGAATGC
D-CD137/CEA	D-BGA-4712/CEA重鎖AA	配列番号187	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMLSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDFGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSSSGGGGSQVQLVQSGAE VKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYINPQTG KTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYGN YNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０２９２】

【表２０－８】

	D-BGA-4712/CEA 重鎖 DNA	配列番号188	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCATGTTGTCCG CCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTG GAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATG CGGACAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACTCAA AAAATACTCTTTACCTTCAAATGAATAGCCTTCGTGCTGAGGACA CTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTG GCGTCACCTTTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCT CATCGTCCGGTGGAGGCGGTTCACAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCG GCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGC AAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATTACCTGCATTGGGTG CGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCTATATTAAC CCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAGGGCCGC GTGACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGGAA CTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCG CGCGAATATGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAG GGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCG GTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGTACTTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACC TTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGT CCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCA AGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACAT GCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTC AACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAA GCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGT GCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATA AGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGA CCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACA CACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTC TGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACAC CCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCT GACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTG TTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATC CCTGTCACTGTCACCTGGTAAA
	抗CEA Ab 軽鎖 AA	配列番号179	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLL IYNYKNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０２９３】

【表２０－９】

	抗CEA Ab軽鎖DNA	配列番号180	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGT GGGCGATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAACCAGTA TGGCTATCTGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGTGCCGAA ACTGCTGATTTATAACTATAAAAACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAG CCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCAT TAGCAGCCTGCAGCCGGAAGATGTGGCGACCTATTATTGCCAGCA TCATCTGGGCACCCCGTATACCTTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGA AATTAAACGAACAGTGGCAGCCCCTTCCGTCTTCATTTTTCCCCCT TCTGACGAACAGCTGAAATCAGGAACTGCTAGCGTGGTCTGTCTG CTGAACAATTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTC GATAACGCTCTGCAGTCCGGCAATTCTCAGGAGAGTGTGACCGAA CAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGTACTCTGACC CTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGA AGTCACACACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAGAGTTTCAA CAGAGGGGAATGC

【０２９４】
【表２１】

表２１：収率及び生化学的特性の概要

抗体フォーマット	収率(mg/L)	HMW(%)	モノマー(%)	LMW(%)	ヒトCD137 ECD-mIgG2a SPR KD (M)	CT26/CEA EC50 (ug/ml)	Hut78/huCD137 EC50 (ug/ml)
A-CEAxCD137	30.00	1.28	96.34	2.39	3.60E-07	0.75	0.57
D-CEAxCD137	11.00	1.80	98.19%	0.0	7.80E-08	3.78	2.28

【０２９５】
実施例２０．ＣＤ１３７ベースの多特異性抗体Ａ－ＣＥＡｘＣＤ１３７は、ＣＥＡ依存的にＣＤ１３７を活性化する
ＣＤ１３７ベースの多重特異性抗体は、ＣＤ１３７発現細胞においてＣＤ１３７活性化を誘導する
ＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞による刺激に対するＣＤ１３７$^{+}$細胞の応答を誘導するためのＣＤ１３７ベースの多重特異性抗体の能力をテストするために、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７を使用して、ＣＤ１３７活性化をテストした。ＣＥＡ発現ＣＴ２６（ＣＴ２６／ＣＥＡ）細胞を、前述のプロトコール（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００５上記）に従って、ＣＴ２６（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－２６３８）中へのレトロウイルス形質導入によって生成した。ＯＫＴ３プレコートされた９６ウェルプレートにおいて、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞をＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性構築物の存在下でＣＴ２６／ＣＥＡまたはＣＴ２６（ＣＥＡ陰性）細胞と一晩共培養し、Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞におけるＣＤ１３７活性化の指標としてインターロイキン２（ＩＬ－２）を測定した。図１８Ａに示すように、Ａ－ＣＥＡｘＣＤ１３７は、ＣＥＡ$^{+}$ＣＴ２６／ＣＥＡ細胞の存在下で、用量依存的に

Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７細胞を誘導してＩＬ－２を分泌した。ＩＬ－２の誘導は、ＣＥＡ$^{+}$ＣＴ２６／ＣＥＡ細胞がない場合には見られなかった。

【０２９６】

ＣＤ１３７ベースの多重特異性抗体は、ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）においてＣＤ１３７活性化を誘導する

ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、Ｆｉｃｏｌｌ（Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７，Ｓｉｇｍａ－Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）分離によって健康なドナーの全血から単離した。ＯＳ８発現ＨＥＫ２９３（ＨＥＫ２９３／ＯＳ８）細胞は、前述のプロトコール（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００５上記）に従って、ＨＥＫ２９３（ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５７３）へのレトロウイルス形質導入によって生成した。ＣＤ１３７／ＣＥＡ多重特異性抗体がＣＥＡ$^{+}$腫瘍細胞の存在下でＴ細胞を活性化できるかどうかを調べるために、ＰＢＭＣ（２×１０^{5}／ウェル）をＣＤ１３７／ＣＥＡ多重特異性抗体の存在下でＨＥＫ２９３／ＯＳ８及びＣＴ２６／ＣＥＡ細胞と４８時間共培養した。ＣＤ１３７／ＣＥＡ多重特異性抗体によるＣＤ１３７の活性化は、ＰＢＭＣ内のＩＦＮ－γを測定することによって決定した。結果は、Ａ－ＣＤ１３７／ＣＥＡがＣＥＡ発現細胞の存在下でＰＢＭＣにおいて有意なＣＤ１３７活性化を誘導できることを示した（図１８Ｂ）。

【０２９７】

実施例２１．操作及び親和性成熟

操作

選択されたクローンＢＧＡ－４７１２について操作を実施して、生化学的及び生物物理学的特性を改善した。機能的活性を維持しながら、アミノ酸組成、熱安定性（Ｔｍ）、表面疎水性、翻訳後修飾（ＰＴＭ）部位の除去、及び等電子点（ｐＩ）を考慮する。置換は、ＢＧＡ－４７１２配列に基づいて主にＨＣＤＲ及びフレームワーク領域で行われた。置換は、アミノ酸変化Ｆ２８Ｒ、Ｍ２９Ｔ、Ｖ３５Ｍ、Ｖ３７ＦまたはＹ、Ｇ４４Ｅ、Ｌ４５ＲまたはＧまたはＹ、及びＷ４７ＧまたはＳまたはＦまたはＬまたはＲまたはＹ、Ｄ６２Ｅ、Ｓ７５Ａ、Ｎ８４Ｓ、Ｗ１０３Ｒ（Ｋａｂａｔ定義）を含んでいた。変異体は、前述のようにＦｃ融合ＶＨ及びＡ－ＣＤ１３７／ＣＥＡ多重特異性抗体フォーマットの両方で発現した。有意な親和性低下のない置換を同定した（表２２）。突然変異の組み合わせが行われた。ＢＧＡ－４７１２－Ｍ３及びＢＧＡ－７５５６の配列は、表２３及び２４に示されている。

【０２９８】

親和性成熟

潜在的に有効なＣＤ１３７ベースの作用機序（ＭＯＡ）をさらに探索するために、ファージディスプレイによって薬物開発可能性が向上した親和性成熟ＢＧＡ－４７１２－Ｍ３変異体を生成することを目的とした。ライブラリーの構築は前述のように説明した。簡単に説明すると、ファージミドベクターｐＣＡＮＴＡＢ　５Ｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を標準的な分子生物学技術によって使用して、ＣＨ３－Ｇ４Ｓ（リンカー）－ＢＧＡ－４７１２－Ｍ３（表２５）を遺伝子３の微量のコートタンパク質のフラグメントのＮ末端との融合体としてＭ１３バクテリオファージの表面に表示するように設計されたファージミドを構築した。親和性成熟ＢＧＡ－４７１２変異体の生成は、標準プロトコールを用いたファージディスプレイによって実施した（Ｓｉｌａｃｃｉ　ｅｔ　ａｌ．，（２００５）Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ，５，２３４０－５０；Ｚｈａｏ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１４）ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ，９，ｅ１１１３３９）。ファージミドをテンプレートとして使用して、２．０×１０^{8}個のユニークなメンバーを含むファージディスプレイライブラリーを構築した。３つのＣＤＲはすべてランダム化されたが、各ＣＤＲには、２つの同時変異を有し得るＨＣＤＲ３を除き、各クローンに最大１つの変異があった。各位置は、任意のアミノ酸またはアンバー終止コドンをコードするＮＮＫコドン（ＩＵＰＡＣコード）でランダム化された。

【０２９９】

４つのラウンドの選択後の各ＨＣＤＲにおける変異の頻度は比較的高かった。図１９は

、４つのラウンドの選択後のＨＣＤＲ領域の配列を示す。ＢＧＡ－３３８６を除き、すべての突然変異をＢＧＡ－７５５６（配列番号８６）に導入して親和性成熟変異体を作製した。ＢＧＡ－３３８６のうち、突然変異はＢＧＡ－４７１２－Ｍ３（配列番号７５）に導入した。すべての変異体は、モノクローナル抗体（ＶＨ－Ｆｃ）及びそれらの対応する多重特異性抗体の両方としてフォーマットＡ（Ａ－ＣＥＡｘＣＤ１３７）で発現させた。精製した抗体をＰＢＳ中で０．５～１０ｍｇ／ｍＬに濃縮し、アリコートに分けて－８０℃の冷凍庫に保存した。

【０３００】

ＣＤ１３７親和性成熟変異体の親和性比較は、記載されているように、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ－２００（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）及びフローサイトメトリーを使用するＳＰＲアッセイによって行われた。配列情報を表２８に示し、抗ｈｕＣＤ１３７抗体のＳＰＲ決定結合プロファイルの結果を、表２６及び２７にまとめた。

【０３０１】

【表２２】

表２２：ＣＤ１３７結合親和性の比較

抗体	フォーマット	SEC-HPLC (%)	KD (M)	Hut78/huCD137 細胞の EC50(ug/ml)
BGA-4712-M3	Fc 融合 VH	97.98	1.69E-07	2.37
BGA-4712-M3	フォーマット A-CEAxCD137	97.06	2.55E-07	0.52
BGA-7556	Fc 融合 VH	98.36	2.00E-07	5.71
BGA-7556	フォーマット A-CEAxCD137	92.30	6.69E-07	3.23

【０３０２】

【表２３－１】

表２３：ＢＧＡ－４７１２－Ｍ３の配列情報

抗体	配列番号		配列
BGA-4712-M3	配列番号75	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSS
	配列番号76	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGTTGTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG
BGA-4712-M3-mutFc	配列番号189	AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	配列番号190	DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGTTGTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCGGGCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAA

【０３０３】

【表２３－２】

A-CEA xCD 137-M3	配列番号191	AA	GSATMDMRVPAQLLGLLLLWFPGSRSQVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYINPQTGKTSYAQKFQGR VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYGNYNYPLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG KGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAP GKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAE DTAVYYCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLVTVSS

【０３０４】

【表２３－３】

	配列番号192	DNA	GGATCCGCCACCATGGATATGAGAGTTCCTGCTCAATTGCTGGGG TTGCTCTTGCTCTGGTTTCCTGGCTCGAGAAGCCAGGTGCAGCTGG TGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAA GTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATTACCTG CATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGC TATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTT CAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTG TATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTAT TATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTAT TGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAA GGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGTACTTCT GGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACATGC CCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGT TTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAG AGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAG GTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCT AAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAA GGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTAT CGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTC AGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACC AGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACA AGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTA TAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATAC TCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTC AGAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGG AGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGTTGTCC GCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACT GGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTAT GCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCA AAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACA CTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTG GCGTCACCTTTGATTACTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCT CATCGTGAAAGCTTCGTCAG

【０３０５】

【表２４－１】

表２４：Ｆｃ融合ＶＨ及びＡ－ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体フォーマットにおけるＢＧＡ－７５５６の配列情報

抗体	配列番号		配列
BGA-7556	配列番号86	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDYRGQGTQVTVSS
	配列番号87	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGTTGTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATTACCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
BGA-7556-mutFc	配列番号193	AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDYRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３０６】

【表２４－２】

	配列番号194	DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGG AGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGTTGTC CGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGA CTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATAC TATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAA CGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGA GGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTG GTGGTGGCGTCACCTTTGATTACCGGGGACAGGGCACCCAAGTT ACAGTCTCATCGGGCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATG CCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCT GTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCC CAGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCC CGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA ATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTAT AGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAA CGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCC GCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAG AGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTAT CCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGA GAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCT CTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTG CATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAA A
フォーマットA-BGA-7556	配列番号195	AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGL EWIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDT AVYYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSE VQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTA VYYCARVVYHAGGGVTFDYRGQGTQVTVSS

【０３０７】

【表２４－３】

	配列番号196	DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGG GCGCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTT ACCAGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGG CCTGGAATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCA GCTATGCCCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGAT ACCAGCACCAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAG CGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACT ATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACC GTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGG AACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCT CCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCC CAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCG TGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAAC TGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCC CAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGC TGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAA GTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGA CCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTAC ACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTC TCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTC AGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCA GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGG AGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGTTGTC CGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGA CTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATAC TATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAA CGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGA GGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTG GTGGTGGCGTCACCTTTGATTACCGGGGACAGGGCACCCAAGTT ACAGTCTCATCG

【０３０８】

【表２５】

表２５：配列情報

構築物	配列番号		配列
CH3	配列番号197	AA	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
	配列番号198	DNA	GGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGG GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAG GGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGC CAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCC GACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAG CTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGG TAAA
CH3-BGA-4712-M3	配列番号199	AA	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT LSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDN AKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDYWGQGTLV TVSS
	配列番号200	DNA	GGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGG GAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAG GGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGC CAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCC GACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAG CTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGG TAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGG AGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGC GTCTGGATTCACGTTGTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCA AGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTT TGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTAC GATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTC TAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGT CGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATTACTGGGGACA GGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG

【０３０９】

【表２６】

表２６：Ｆｃ融合抗体としての親和性成熟ＢＧＡ－４７１２変異体の親和性比較

クローン#	フォーマット	SEC-HPLC(%)	KD (M)
BGA-5623	Fc 融合 VH	97.62	5.03E-08
BGA-2690		97.82	6.75E-05
BGA-3849		98.75	7.63E-08
BGA-7916		97.57	8.77E-08
BGA-4988		97.71	1.03E-06
BGA-5164		99.07	1.38E-05
BGA-3953		97.29	4.83E-08
BGA-5385		97.86	1.00E-07
BGA-9468		97.56	1.90E-07
BGA-3285		97.83	1.86E-07
BGA-9442		98.6	1.51E-07
BGA-7746		97.68	1.93E-07
BGA-8425		98.2	9.34E-08
BGA-6468		92.00	1.12E-08
BGA-4712-M3		97.98	1.69E-07
BGA-7556		98.36	2.00E-07

【０３１０】
【表２７】

表２７：親和性成熟ＢＧＡ－４７１２変異体の親和性比較

クローン#	フォーマット	SEC-HPLC(%)	KD (M)
フォーマット A -BGA-5623	A-CEAxCD137	94.55	9.48E-08
フォーマット A - BGA-2690		-	-
フォーマット A - BGA-3849		-	-
フォーマット A-BGA-7916		98.38	2.03E-07
フォーマット A-BGA-4988		98.43	-
フォーマット A - BGA-5164		98.36	-
フォーマット A - BGA-3953		96.19	1.15E-07
フォーマット A - BGA-5385		97.18	1.54E-07
フォーマット A - BGA-9468		98.55	8.73E-07
フォーマット A - BGA-3285		97.32	7.98E-07
フォーマット A - BGA-9442		98.67	1.64E-07
フォーマット A - BGA-7746		97.66	2.45E-07
フォーマット A - BGA-8425		95.69	1.89E-07
フォーマット A - BGA-3386		87.00	2.14E-08
フォーマット A - BGA-4712-M3		97.06	2.89E-07
フォーマット A - BGA-7556		92.3	6.49E-07

【０３１１】

【表２８－１】

表２８：親和性成熟ＢＧＡ－４７１２変異体の配列情報

配列番号84	BGA-5623 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
配列番号85	BGA-5623 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号201	BGA-2690 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSREDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDFGSSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSS
配列番号202	BGA-2690 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCAG AGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTCGGTTCTTCGACATACTATGCGG AAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAA ATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCG GTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCA CCTATGATTATCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号203	BGA-3849 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSHEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARYVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
配列番号204	BGA-3849 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCCA TGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCCGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCTATGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号205	BGA-7916 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSS

【０３１２】

【表２８－２】

配列番号206	BGA-7916 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号207	BGA-4988 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDRGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSS
配列番号208	BGA-4988 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATCGGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号209	BGA-5164 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDHGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVY YCARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSS
配列番号210	BGA-5164 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATCATGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATTATCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号211	BGA-3953 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
配列番号212	BGA-3953 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATtcGGGTGGTTCGACATACTATGCGG AAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAA ATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCG GTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCA CCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG

【０３１３】

【表２８－３】

配列番号213	BGA-5385 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDHGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVIYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
配列番号214	BGA-5385 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATCATGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTTATCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号215	BGA-9468 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHSGGGVTFDLRGQGTQVTVSS
配列番号216	BGA-9468 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATtcGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATTCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATCTTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号217	BGA-3285 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
配列番号218	BGA-3285 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGATTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号219	BGA-9442 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARYVYHAGGGVTFDLRGQGTQVTVSS

【０３１４】

【表２８－４】

配列番号220	BGA-9442 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGATTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCTGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCTATGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATCTTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号221	BGA-7746 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
配列番号222	BGA-7746 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCA GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACGCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号223	BGA-8425 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSS
配列番号224	BGA-8425 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTGTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATTACCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号225	BGA-3386 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARIVYHAGGGVTFDTWGQGTLVTVSS
配列番号226	BGA-3386 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACTTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG

【０３１５】

【表２８－５】

配列番号227	BGA-5623-mutFc-AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号228	BGA-5623-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号229	BGA-2690-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSREDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDFGSSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPA AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３１６】

【表２８－６】

配列番号230	BGA-2690 mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCAG AGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTCGGTTCTTCGACATACTATGCGG AAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAA ATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCG GTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCA CCTATGATTATCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGGG CGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCT CCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCA AGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGT GGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTA TGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGA GGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTG CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTG TCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGG CCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATC CCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGT CAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATT CCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTC CCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAA GCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTG GTAAA
配列番号231	BGA-3849-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSHEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARYVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPAA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３１７】

【表２８－７】

配列番号232	BGA-3849 mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCCA TGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCCGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCTATGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号233	BGA-7916-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTYDTRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAP PAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３１８】

【表２８－８】

配列番号234	BGA-7916-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号235	BGA-4988-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDRGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTYDTRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAP PAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３１９】

【表２８－９】

配列番号236	BGA-4988-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATCGGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号237	BGA-5164-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDHGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVY YCARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２０】

【表２８－１０】

配列番号238	BGA-5164-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATCATGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATTATCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号239	BGA-3953-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２１】

【表２８－１１】

配列番号240	BGA-3953-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATtcGGGTGGTTCGACATACTATGCGG AAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAA ATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCG GTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCA CCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGGG CGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGCT CCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCA AGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGT GGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTA TGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGA GGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTG CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTG TCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGG CCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATC CCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGT CAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATT CCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTC CCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAA GCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTG GTAAA
配列番号241	BGA-5385-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDHGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVY YCARVIYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPA AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２２】

【表２８－１２】

配列番号242	BGA-5385-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGcTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATCATGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTATCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATTATCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号243	BGA-9468-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHSGGGVTFDLRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２３】

【表２８－１３】

配列番号244	BGA-9468-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATTCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATCTTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号245	BGA-3285-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISAEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARVVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPAA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２４】

【表２８－１４】

配列番号246	BGA-3285-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGATTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号247	BGA-9442-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISAEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARYVYHAGGGVTFDLRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPAA GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２５】

【表２８－１５】

配列番号248	BGA-9442-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGATTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCTGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCTATGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATCTTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号249	BGA-7746-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDFGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARVVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２６】

【表２８－１６】

配列番号250	BGA-7746-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCA GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACGCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号251	BGA-8425-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEW VSAILDSGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYY CARVVYHAGGGVTYDYRGQGTQVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPPA AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALA APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２７】

【表２８－１７】

配列番号252	BGA-8425-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTGTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTATGATTACCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号253	BGA-3386-mutFc AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAV YYCARIVYHAGGGVTFDTWGQGTLVTVSSGGGGSDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３２８】

【表２８－１８】

配列番号254	BGA-3386-mutFc DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGA GGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGA ATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAA AATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGC GGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTC ACCTTTGATACTTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCGG GCGGCGGAGGGTCTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCC AAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGG TGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGT ATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGG AGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGT GCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGT GTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAG GCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCA TCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTG GTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAA GTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCAC GAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCAC CTGGTAAA
配列番号255	フォーマットA BGA-5623AA(BE-189)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGSTYYAESV KGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVTFDT RGQGTQVTVSS

【０３２９】

【表２８－１９】

配列番号256	フォーマットABGA-5623DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTG ATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号257	フォーマットABGA-2690AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTLSREDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGSSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTYDY RGQGTQVTVSS

【０３３０】

【表２８－２０】

配列番号258	フォーマットABGA-2690DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCAGAGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTTCGGTTCTTCGACATACTATGCGGAAAGTGT CAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTT TACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACT ACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTATGA TTATCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号259	フォーマットABGA-3849AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTLSHEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARYVYHAGGGVTFDTR GQGTQVTVSS

【０３３１】

【表２８－２１】

配列番号260	フォーマットABGA-3849DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCCATGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTCCGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCTATGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTG ATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号261	フォーマットABGA-7916AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTYDY RGQGTQVTVSS

【０３３２】

【表２８－２２】

配列番号262	フォーマットABGA-7916DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTATG ATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号263	フォーマットABGA-4988AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDRGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTYDY RGQGTQVTVSS

【０３３３】

【表２８－２３】

配列番号264	フォーマットA BGA-4988 DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATCGGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTATG ATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号265	フォーマットA BGA-5164 AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDHGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTYDY RGQGTQVTVSS

【０３３４】

【表２８－２４】

配列番号266	フォーマットABGA-5164DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATCATGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTATG ATTATCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号267	フォーマットABGA-3953AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVTFDTR GQGTQVTVSS

【０３３５】

【表２８－２５】

配列番号268	フォーマットABGA-3953DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATtcGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGT CAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTT TACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACT ACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGA TACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号269	フォーマットABGA-5385AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDHGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVIYHAGGGVTFDTR GQGTQVTVSS

【０３３６】

【表２８－２６】

配列番号270	フォーマットABGA-5385DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATCATGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTTATCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTG ATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号271	フォーマットABGA-9468AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHSGGGVTFDLR GQGTQVTVSS

【０３３７】

【表２８－２７】

配列番号272	フォーマットABGA-9468DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATTCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGA TCTTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号273	フォーマットABGA-3285AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDTR GQGTQVTVSS

【０３３８】

【表２８－２８】

配列番号274	フォーマットA BGA-3285 DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGATTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTG ATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号275	フォーマットA BGA-9442 AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTISAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARYVYHAGGGVTFDLR GQGTQVTVSS

【０３３９】

【表２８－２９】

配列番号276	フォーマットABGA-9442DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGATTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTCTGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCTATGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTG ATCTTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号277	フォーマットABGA-7746AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDFGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTFDTR GQGTQVTVSS

【０３４０】

【表２８－３０】

配列番号278	フォーマットABGA-7746DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTTTGGTGGTTCGACATACTATGCAGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTG ATACGCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号279	フォーマットABGA-8425AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTLSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDSGGSTYYAESVK GRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARVVYHAGGGVTYDY RGQGTQVTVSS

【０３４１】

【表２８－３１】

配列番号280	フォーマットABGA-8425DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGCTGTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATTCGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCGTCGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTATG ATTACCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
配列番号281	フォーマットABGA-3386AA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLE WIGYINPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAV YYCAREYGNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGSTYYAESV KGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVTFDT WGQGTLVTVSS

【０３４２】

【表２８－３２】

配列番号282	フォーマットA BGA-3386 DNA	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGC GCGAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACC AGCTATTACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGG AATGGATTGGCTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGC CCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCAC CAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATAC CGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAACTATAACTATCCG CTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGAGCAGCGCTA GCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAG TACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCA GCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTA CTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCC AGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGA GGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGC TAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGT GGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCG AGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGG TGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGG TGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAA GCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAG CTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAA TCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCC AGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCT GCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTC TCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTG TCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCT TTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTG ATACTTGGGGACAGGGCACCTTAGTTACAGTCTCATCG

【０３４３】

実施例２２．抗ＣＤ１３７抗体ＢＧＡ－５６２３の結合プロファイル

ＢＧＡ－５６２３は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ融合体を用いて生成され、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ－２００（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用したＳＰＲアッセイによってその結合動態について特徴付けられた。簡単に説明すると、抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を活性化されたＣＭ５バイオセンサーチップ（カタログ番号ＢＲ１００８３９、ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に固定化した。抗ｈｕＣＤ１３７ドメイン抗体をチップ表面に流し、抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体によって捕捉した。次に、ヒトＣＤ１３７　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａまたはｃｙｎｏ　ＣＤ１３７　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａの段階希釈（６．０ｎＭ～２１５０ｎＭ）をチップ表面に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化を分析して、１対１のラングミュア結合モデル（ＢＩＡ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して会合速度（k_{on}）及び解離速度（

ｋｏｆｆ）を算出した。平衡解離定数（ＫＤ）を、比率ｋｏｆｆ／ｋｏｎとして計算した。この結果は、以下の表２９に示すように、ＢＧＡ－５６２３がｈｕＣＤ１３７よりもｃｙｎｏＣＤ１３７に対してより高い親和性を有することを実証した。生細胞上の天然ｈｕＣＤ１３７に対する抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体の結合活性を評価するために、Ｈｕｔ７８細胞をトランスフェクトしてヒトＣＤ１３７を過剰発現させた。生Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７発現生細胞を９６ウェルプレートに播種し、段階希釈した抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン抗体と共にインキュベートした。ヤギ抗ヒトＩｇＧを二次抗体として使用し、細胞表面に結合する抗体を検出した。ヒト天然ＣＤ１３７への用量依存的結合のＥＣ５０値は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（商標）を用いて用量反応データを４パラメータロジスティックモデルに適合させることによって決定した。図２０に示すように、ＢＧＡ－５６２３は、２．９２μｇ／ｍｌのＥＣ５０で用量反応的に生細胞上の天然ＣＤ１３７に特異的に結合することを実証した。

【０３４４】

ＢＧＡ－５６２３のオフターゲット特異性は、ＥＬＩＳＡによって評価した。ＴＮＦ受容体ファミリーメンバー、例えば、ＴＮＦＲＳＦ１Ａ（ＣＤ１２０ａ）（カタログ番号１０８７２－Ｈ０８Ｈ、Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ，Ｃｈｉｎａ）、ＴＮＦＲＳＦ１Ｂ（ＣＤ１２０ｂ）（カタログ番号１０４１７－Ｈ０８Ｈ１、Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ，Ｃｈｉｎａ）、ＴＮＦＲＳＦ４（ＯＸ４０）（配列番号１６７）、ＴＮＦＲＳＦ５（ＣＤ４０）（配列番号１６１）、ＴＮＦＲＳＦ７（ＣＤ２７）（カタログ番号１００３９－Ｈ０８Ｂ１、Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ，Ｃｈｉｎａ）、ＴＮＦＲＳＦ９（ＣＤ１３７）（配列番号１３５）及びＴＮＦＲＳＦ１８（ＧＩＴＲ）（カタログ番号１３６４３－Ｈ０８Ｈ、Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ，Ｃｈｉｎａ）を９６ウェルプレート内で１０μｇ／ｍｌの濃度で４℃で一晩コーティングした。野生型ＩｇＧ１Ｆｃ（配列番号１９５）と融合したＢＧＡ－５６２３を添加した。図２１に示すように、他のＴＮＦ受容体ファミリーメンバーへの結合は観察されなかった。

【０３４５】

【表２９】

表２９：ＳＰＲによる親和性

サンプル	種	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
BGA-5623	huCD137	2.12E+05	5.03E-03	2.38E-08
	cynoCD137	1.30E+05	2.54E-03	1.96E-08

【０３４６】

【表３０－１】

表３０：アミノ酸配列及びＤＮＡ配列

抗体	配列番号		配列
BGA-5623	配列番号84	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS
	配列番号85	VH DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG
	配列番号283	IgG1 AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	配列番号284	IgG1 DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

【０３４７】

【表３０－２】

	配列番号285	IgG4AA	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGL EWVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDT AVYYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRWSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	配列番号286	IgG4DNA	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGG AGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTC CGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGA CTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATA CTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATA ACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTG AGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCT GGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGT TACAGTCTCATCGGAATCCAAGTATGGTCCGCCATGTCCACCGT GCCCGGCACCCGAGTTTTTGGGAGGGCCTAGTGTGTTTTTGTTTC CTCCTAAGCCAAAGGACACGCTTATGATTAGTCGCACACCCGAG GTTACCTGTGTAGTGGTGGACGTATCACAAGAGGATCCGGAAGT CCAATTTAATTGGTACGTCGACGGAGTGGAAGTCCACAATGCAA AGACCAAGCCTAGGGAAGAACAGTTCAATTCTACCTATCGCTGG TCTGTACTCACTGTACTCCACCAGGATTGGCTCAATGGAAAGGA ATACAAATGCAAGGTTTCCAACAAAGGGCTCCCCTCTTCCATTG AGAAAACTATTAGCAAGGCTAAAGGCCAACCCAGAGAACCACA GGTTTATACCCTTCCACCTTCCCAGGAGGAGATGACGAAGAATC AGGTTAGTCTTACGTGCCTCGTTAAAGGATTCTACCCTTCAGATA TCGCAGTTGAATGGGAGTCTAACGGGCAACCCGAGAACAACTAC AAGACCACCCCGCCGGTGCTGGACTCAGATGGTAGTTTCTTTCTT TACAGTCGGCTTACCGTCGACAAGTCACGCTGGCAGGAGGGAAA TGTATTCTCCTGCAGCGTAATGCACGAAGCTCTGCACAATCACT ATACCCAGAAGTCACTGAGCCTTTCTCTGGGTAAG

【０３４８】

実施例２３．アラニンスキャニングによるＢＧＡ－５６２３のエピトープマッピング

ＢＧＡ－５６２３の結合エピトープを特徴付けるために、ヒトＣＤ１３７の１７種のアミノ酸残基を個別にアラニンに変異させ、以前に報告されたＣＤ１３７の結晶構造からの情報に基づいて１７種の単一変異ｈｕＣＤ１３７変異体を生成した（Ｂｉｔｒａ ｅｔ ａｌ．，（２０１８）Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ，２９３，９９５８－９９６９；Ｃｈｉｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１８）Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ，９，４６７９）。

【０３４９】

ＣＤ１３７突然変異体は野生型ＣＤ１３７と共にＨＥＫ２９３細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１５７３）で一時的に発現された。ＢＧＡ－５６２３によるそれらの認識及び結合を、フローサイトメトリーによって分析した。ウレルマブの公的に入手可能な配列を使用することによってインハウスで生成されたウレルマブ類似体（配列番号２８７～２９０）を、同じアッセイで使用して、ＣＤ１３７突然変異体の発現を監視した。このアッセイでは、ヒトＣＤ１３７またはヒトＣＤ１３７突然変異体発現細胞（10^5細胞／ウェル）を、２μｇ／ｍｌの精製されたＢＧＡ－５６２３－ｍｕｔＦｃ（Ｆｃ融合ＶＨ Ａｂ）またはウレルマブ類似体と共にインキュベートし、次いでＡｌｅｘａ Ｆｌｕｒｏ－６４７標識抗ｈｕＩｇＧ Ｆｃ抗体（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，ＵＳＡ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅ

ｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。すべての結果を、標準として野生型ＣＤ１３７結合シグナルの蛍光読取りの平均値を使用して正規化した。データ分析を簡略化するために、特定の変異体ＣＤ１３７に対する抗体のＦＡＣＳ結合シグナルが２５％以下に低下した場合、その部位におけるアミノ酸がエピトープにとって重要であると考えた。図２２Ａに示すように、ＢＧＡ－５６２３のエピトープは、ＣＤ１３７のアミノ酸Ｆ３６、Ｉ４４、Ｐ４７、Ｐ４９及びＳ５２に結合するための重要な残基を有する。

【０３５０】

ＢＧＡ－５６２３エピトープをさらに探索するために、単一ＡＡ置換を有するヒトＣＤ１３７　ＥＣＤ突然変異体を発現及び精製してＥＬＩＳＡのために調製した。さらに、ウトミルマブ類似体抗体（配列番号２９１～２９４）は、公的に入手可能なウトミルマブの配列を使用してインハウスで作製した。ＣＤ１３７突然変異体と野生型ＣＤ１３７とを、ＢＧＡ－５６２３による結合について直接ＥＬＩＳＡによって分析した。簡単に説明すると、野生型または変異型ＣＤ１３７をそれぞれ５０ｎｇずつＥＬＩＳＡプレートにコーティングした。ブロッキング後、２μｇ／ｍｌの濃度のＢＧＡ－５６２３－ｍｕｔＦｃ、ウレルマブ類似体またはウトミルマブ類似体抗体１００μｌをプレートに添加し、各抗体の結合シグナルをＨＲＰ結合二次抗体によって検出した。野生型または変異型ｈｕＣＤ１３７を用いたＥＬＩＳＡ結合アッセイでは、アミノ酸Ｆ３６Ａ、Ｐ４７Ａ及びＰ４９Ａは、ＣＤ１３７とＢＧＡ－５６２３の結合を有意に障害した（図２２Ａ～図２２Ｂ）。アミノ酸Ｆ３６Ａでの変化は、ウレルマブまたはウトミルマブ類似体の結合をわずかに減少させただけであり、これは、Ｆ３６ＡがＣＤ１３７の立体構造の完全性において重要な役割を果たすことを示している。対照的に、アミノ酸Ｐ４７ＡまたはＰ４９Ａにおける変化はいずれも、ウレルマブまたはウトミルマブ類似体のＣＤ１３７への結合を破壊せず、ＢＧＡ－５６２３、ウレルマブ類似体またはウトミルマブが異なるエピトープを有することを示している。このデータは、アミノ酸Ｆ３６Ａ、Ｐ４７Ａ及びＰ４９Ａが抗体ＢＧＡ－５６２３のエピトープにおける重要な残基であることを示した。

【０３５１】

【表３１－１】

表３１：アミノ酸配列及びＤＮＡ配列

抗体	配列番号		配列
ウレルマブ類似体	配列番号287	重鎖AA	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEK GLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARDYGPGNYDWYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRWSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGK
	配列番号288	重鎖DNA	CAAGTTCAACTTCAGCAGTGGGGAGCGGGTCTCTTGAAGCCTA GTGAGACGCTGAGCCTGACCTGTGCAGTCTACGGGGGTTCATT TTCTGGGTACTACTGGTCCTGGATACGCCAAAGCCCAGAGAA AGGCCTGGAATGGATTGGGGAGATAAATCACGGGGGTTATGT GACATATAATCCTTCTCTTGAGAGCCGGGTCACGATATCTGTT GACACAAGTAAAAATCAGTTCTCCCTCAAACTGAGCTCCGTTA CCGCAGCAGACACTGCCGTTTACTACTGTGCGCGGGACTATGG GCCAGGTAATTACGATTGGTACTTCGACCTGTGGGGTAGAGG AACGCTGGTCACTGTAAGCAGTGCATCTACAAAGGGCCCCAG CGTGTTTCCCCTTGCACCATGTTCACGGAGCACTAGTGAAAGC ACTGCCGCGCTCGGGTGTCTCGTTAAGGATTATTTTCCGGAGC CTGTCACTGTCTCTTGGAACTCTGGTGCACTGACATCAGGCGT TCACACGTTCCCTGCAGTACTCCAGAGCTCAGGATTGTACAGC CTGTCCAGTGTAGTTACAGTGCCTTCCTCCTCCCTTGGAACAA AGACCTACACCTGCAACGTGGACCATAAGCCCAGCAATACGA AAGTAGACAAACGAGTCGAATCCAAGTATGGTCCGCCATGTC CACCGTGCCCGGCACCCGAGTTTTTGGGAGGGCCTAGTGTGTT TTTGTTTCCTCCTAAGCCAAAGGACACGCTTATGATTAGTCGC ACACCCGAGGTTACCTGTGTAGTGGTGGACGTATCACAAGAG GATCCGGAAGTCCAATTTAATTGGTACGTCGACGGAGTGGAA GTCCACAATGCAAAGACCAAGCCTAGGGAAGAACAGTTCAAT TCTACCTATCGCTGGTCTGTACTCACTGTACTCCACCAGGATT GGCTCAATGGAAAGGAATACAAATGCAAGGTTTCCAACAAAG GGCTCCCCTCTTCCATTGAGAAAACTATTAGCAAGGCTAAAGG CCAACCCAGAGAACCACAGGTTTATACCCTTCCACCTTCCCAG GAGGAGATGACGAAGAATCAGGTTAGTCTTACGTGCCTCGTT AAAGGATTCTACCCTTCAGATATCGCAGTTGAATGGGAGTCTA ACGGGCAACCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCGCCGGTGC TGGACTCAGATGGTAGTTTCTTTCTTTACAGTCGGCTTACCGTC GACAAGTCACGCTGGCAGGAGGGAAATGTATTCTCCTGCAGC GTAATGCACGAAGCTCTGCACAATCACTATACCCAGAAGTCA CTGAGCCTTTCTCTGGGTAAG

【０３５２】

【表３１－２】

	配列番号289	軽鎖AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQR SNWPPALTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	配列番号290	軽鎖DNA	GAAATCGTGCTGACCCAATCACCTGCGACCCTCTCCCTTAGCC CTGGAGAACGAGCAACTCTCAGTTGCAGAGCAAGCCAGAGCG TCAGCTCATATCTCGCATGGTATCAACAAAAACCAGGCCAAG CTCCTAGACTGTTGATTTATGATGCCTCTAACCGGGCGACTGG CATACCAGCCCGCTTTAGCGGGTCTGGGAGTGGCACTGATTTT ACGCTCACGATTTCATCTTTGGAGCCAGAAGATTTCGCTGTAT ACTACTGTCAACAAAGGTCAAACTGGCCGCCTGCACTTACGTT CGGCGGGGGTACCAAGGTGGAGATTAAGAGGACAGTTGCGGC GCCATCAGTTTTTATATTCCCACCCTCCGATGAGCAGTTGAAA AGTGGCACGGCATCAGTTGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTATC CACGGGAGGCGAAAGTCCAATGGAAAGTGGACAATGCGCTTC AGAGCGGGAACTCTCAGGAGAGTGTCACTGAACAGGATTCAA AGGACTCCACGTACTCACTCTCATCCACTCTCACCCTTTCAAA GGCGGATTACGAAAAGCATAAGGTCTACGCTTGTGAGGTAAC ACATCAGGGGCTTTCCAGTCCTGTAACCAAGAGCTTCAATCGC GGCGAATGC
ウトミルマブ類似体	配列番号291	重鎖AA	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKG LEWMGKIYPGDSYTNYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCARGYGIFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVEC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３５３】

【表３１－３】

	配列番号292	重鎖DNA	GAAGTTCAACTGGTACAGTCCGGTGCTGAAGTTAAAAAACCC GGAGAGAGTCTGAGAATCTCTTGCAAGGGGTCTGGGTACTCTT TTAGTACATATTGGATATCTTGGGTGAGACAAATGCCGGGGA AAGGCCTCGAATGGATGGGCAAGATTTATCCCGGAGACAGCT ATACAAATTACTCACCTAGTTTTCAAGGTCAGGTAACTATCAG CGCGGACAAATCCATAAGTACGGCCTATCTGCAATGGTCTTCC TTGAAGGCATCCGACACGGCGATGTATTACTGCGCAAGAGGG TATGGTATATTCGATTACTGGGGGCAGGGCACTCTCGTTACCG TGAGCAGCGCTTCAACAAAAGGCCCATCTGTCTTCCCTCTCGC GCCTTGCTCCCGCTCTACTTCAGAGTCAACAGCTGCTCTGGGG TGCTTGGTGAAGGATTACTTTCCTGAACCGGTTACTGTCAGCT GGAATTCTGGGGCTTTGACGAGCGGAGTTCACACTTTCCCAGC TGTACTGCAAAGTTCTGGACTTTACAGCTTGAGCTCCGTGGTG ACAGTGCCGAGCTCAAACTTCGGTACGCAGACATATACATGC AATGTGGATCATAAACCCAGCAATACGAAAGTAGATAAGACA GTCGAAAGGAAGTGTTGTGTAGAGTGCCCACCGTGCCCCGCC CCTCCGGTTGCAGGCCCATCAGTGTTTCTCTTCCCGCCCAAAC CTAAGGACACGCTGATGATTTCACGAACGCCCGAGGTCACCT GTGTCGTAGTCGATGTGTCCCATGAGGACCCAGAAGTTCAGTT CAATTGGTATGTAGACGGCGTGGAGGTACACAATGCAAAAAC GAAACCACGCGAGGAACAGTTCAATAGTACGTTCCGGGTCGT GAGTGTGCTCACGGTGGTTCACCAAGACTGGCTGAACGGGAA AGAATATAAGTGCAAAGTATCCAATAAAGGCCTGCCCGCACC CATCGAAAAAACTATAAGTAAAACTAAAGGGCAACCGCGAGA GCCTCAGGTCTATACTTTGCCACCGTCACGCGAAGAGATGACC AAGAACCAAGTAAGTCTTACTTGCTTGGTCAAGGGGTTCTACC CCTCAGATATAGCGGTGGAGTGGGAATCCAATGGCCAACCCG AGAACAATTACAAGACAACACCACCAATGCTGGACTCTGACG GGAGTTTCTTTCTGTATAGTAAACTTACCGTCGATAAATCACG CTGGCAGCAAGGCAACGTATTCTCATGCTCAGTAATGCATGAA GCCTTGCATAATCACTACACTCAGAAAAGCCTGTCCCTCTCTC CAGGTAAG
	配列番号293	軽鎖AA	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVL VIYQDKNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCATY TGFGSLAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLV CLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【０３５４】

【表３１－４】

	配列番号294	軽鎖DNA	AGCTACGAGTTGACTCAGCCACCATCCGTCAGTGTTAGCCCCG GACAGACGGCGTCAATTACTTGTAGTGGAGACAACATTGGCG ATCAGTACGCCCATTGGTATCAGCAAAAACCGGGTCAATCAC CAGTTCTGGTGATATATCAGGATAAGAATCGACCATCAGGGA TTCCAGAGAGGTTCTCAGGTAGTAACTCAGGTAACACAGCTAC TCTGACCATAAGTGGTACCCAGGCTATGGACGAAGCAGACTA CTACTGCGCCACCTACACAGGCTTCGGATCACTTGCGGTTTTC GGGGGCGGAACCAAACTAACCGTTCTTGGGCAACCTAAGGCT GCCCCGTCCGTGACTCTTTTTCCTCCGTCTTCCGAAGAGCTTCA AGCCAATAAAGCAACCTTGGTATGTTTGATTTCCGATTTTTAC CCTGGAGCGGTGACGGTGGCATGGAAAGCTGATTCAAGCCCT GTGAAAGCTGGGGTGGAAACTACTACGCCGTCCAAACAGAGC AATAATAAGTACGCGGCCTCCAGCTATTTGTCACTTACCCCGG AGCAATGGAAGTCACACCGAAGTTACAGTTGTCAAGTTACTC ACGAAGGCAGCACTGTTGAAAAGACCGTAGCACCCACCGAAT GCTCA

【０３５５】

実施例２４．リガンド競合

ヒトＣＤ１３７は、その主要リガンドであるヒトＣＤ１３７リガンド（ＣＤ１３７Ｌ）に、３桁のＭの近似的Ｋｄで弱い親和性で結合する（Ｃｈｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１８）Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ，９，４６７９）。上記実施例２３のエピトープマッピングの結果は、ＣＤ１３７のアミノ酸残基Ｆ３６Ａ、Ｐ４７Ａ及びＰ４９Ａが、ＢＧＡ－５６２３抗体のエピトープの一部を構成する重要なアミノ酸残基であることを示している。さらに、リガンドは受容体ＣＲＤ－２の全長及びＣＲＤ－３のＡ２モチーフに沿ってＣＤ１３７に結合し、受容体とリガンドとの間の界面は主に水素結合及びファンデルワールス相互作用によって媒介される（Ｂｉｔｒａ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１８）Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ，２９３，９９５８－９９６９）。このデータに基づき、ＢＧＡ－５６２３抗体はＣＤ１３７／ＣＤ１３７リガンド相互作用をブロッキングできると仮定した。ＢＧＡ－５６２３は、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ融合体を使用して生成された。ＣＤ１３７リガンド競合ＥＬＩＳＡでは、Ｍａｘｉｓｏｒｐ免疫プレートをヒトＣＤ１３７　ＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａでコーティングし、ＰＢＳ緩衝液（ブロッキング緩衝液）中の３％ＢＳＡ（ｗ／ｖ）でブロッキングした。ＶＨドメイン抗体ＢＧＡ－５６２３を、ブロッキング緩衝液で３０分間ブロッキングし、段階希釈したヒトＣＤ１３７リガンドＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａの存在下で、ＥＬＩＳＡプレートのウェルに１時間添加した。ＰＢＳＴで洗浄した後、ＨＲＰ結合抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｓｉｇｍａ、Ａ０１７０）及び３，３’，５，５’－テトラメチルベンジジン基質（カタログ番号００－４２０１－５６、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ＵＳＡ）を使用して結合抗体を検出した（図２３Ａ）。フローサイトメトリーによるＣＤ１３７リガンド競合のアッセイでは、ＣＤ１３７を安定に形質導入した細胞株Ｈｕｔ７８／ｈｕＣＤ１３７を、段階希釈したＢＧＡ－５６２３の存在下でヒトＣＤ１３７リガンドＥＣＤ－ｍＩｇＧ２ａと一緒にインキュベートし、続いてヤギ抗マウスＩｇＧ－ＡＰＣにより検出した（図２３Ｂ）。図２３Ａ～Ｂに示すように、ＢＧＡ－５６２３は、ＣＤ１３７リガンドと競合し、ＣＤ１３７／ＣＤ１３７リガンド相互作用を低下させる。

【０３５６】

実施例２５．構造的及び機能的ＣＤ１３７エピトープマッピング

抗ＣＤ１３７単一ドメイン抗体アームがどのようにしてＣＤ１３７に対して高い親和性を有し、ＣＤ１３７／ＣＤ１３７Ｌ相互作用のロバストなアゴニストを実現できるのかをより良く理解するために、ＣＤ１３７と複合体を形成したＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）の結晶構造を決定した。

【０３５７】
Ａ．ＣＤ１３７及びＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）の発現、精製、及び結晶化
Ｃ１２１Ｓ、Ｎ１３８Ｄ及びＮ１４９Ｑ突然変異を有する４つのＣＲＤ（１～４；アミノ酸２４～１６２）を含むヒトＣＤ１３７エクトドメインがＨＥＫ２９３Ｇ細胞で発現された。ＣＤ１３７をコードするｃＤＮＡを、Ｎ末端分泌配列及びＣ末端ＴＥＶ切断部位、その後にＦｃタグを有するインハウス発現ベクターにクローン化した。分泌されたＣＤ１３７－Ｆｃ融合タンパク質を含む培養上清を、Ｍａｂ Ｓｅｌｅｃｔ Ｓｕｒｅ（商標）樹脂（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）と４℃で３時間混合した。タンパク質を２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．０、１５０ｍＭ ＮａＣｌを含む緩衝液で洗浄し、次いで５０ｍＭの酢酸で溶出し（５Ｍ ＮａＯＨでｐＨ値を３．５に調整）、最後に１／１０ＣＶ １．０Ｍ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ ｐＨ８．０で中和した。溶出したタンパク質をＴＥＶプロテアーゼ（１０：１のモル比）と混合し、緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、１００ｍＭ ＮａＣｌ）に対して４℃で一晩透析した。混合物をＮｉ－ＮＴＡカラム（Ｑｉａｇｅｎ）及びＭａｂ Ｓｅｌｅｃｔ Ｓｕｒｅ（商標）樹脂にロードしてＴＥＶプロテアーゼ及びＦｃタグを除去し、次いでＨｉＬｏａｄ １６／６００ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５ｐｇカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０、１００ｍ ＮａＣｌ）中のサイズ排除クロマトグラフィーでフロースルーをさらに精製した。
【０３５８】
ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）をコードするＤＮＡ配列を、Ｎ末端ＨＩＳ－ＭＢＰタグとそれに続くＴＥＶプロテアーゼ部位を持つＰＥＴ２１ａベクターにクローニングした。Ｓｈｕｆｆｌｅ Ｔ７におけるタンパク質発現は、１ｍＭ ＩＰＴＧを使用して１８℃、１６時間、ＯＤ６００ ０．６～１．０で誘導した。細胞を７，０００ｇ、１０分間の遠心分離によって回収した。細胞ペレットを溶解緩衝液（５０ｍＭのNa_3PO_4 ｐＨ７．０、３００ｍＭのＮａＣｌ）に再懸濁させ、氷上で超音波処理下で溶解した。次いで、溶解物を４８，０００ｇ、４℃で３０分間遠心分離した。上清をＴａｌｏｎ樹脂と混合し、４℃で３時間バッチ処理した。樹脂を５ｍＭのイミダゾールを含有する溶解緩衝液で洗浄し、タンパク質をさらに１００ｍＭのイミダゾールを含有する溶解緩衝液中で溶出した。溶出液をＴＥＶプロテアーゼと混合し（モル比１０：１）、緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、１００ｍＭ ＮａＣｌ）に対して４℃で一晩透析した。混合物をＴａｌｏｎカラムにロードしてＴＥＶプロテアーゼ及びＨＩＳ－ＭＢＰタグを除去し、次いでＨｉＬｏａｄ １６／６００ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５ｐｇカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０、１００ｍ ＮａＣｌ）中のサイズ排除クロマトグラフィーでフロースルーをさらに精製した。
【０３５９】
精製されたＣＤ１３７を、過剰の精製されたＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）と混合して（モル比１：１．５）、ＣＤ１３７／ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）複合体を生成した。次いで、複合体を、ＨｉＬｏａｄ １６／６００ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ（商標）７５ｐｇカラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ ｐＨ８．０、１００ｍＭ ＮａＣｌ）中でのゲル濾過によってさらに精製した。ＣＤ１３７／ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）複合体（１０ｍｇ／ｍｌ）を、０．６ＭのLi_2SO_4、０．０１Ｍの$NiCl_2$、０．１Ｍのｔｒｉｓ ｐＨ９．０中で結晶化した。５％Ｄ－（＋）－スクロースを段階的に加えて最終濃度２０％まで凍結保護した結晶を液体窒素中で瞬間冷凍した。さらに、ａｐｏＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）を１．２Ｍ$(NH_4)_2SO_4$、０．１Ｍクエン酸ｐＨ５．０で結晶化させた。結晶を７％のグリセロールで凍結保護し、液体窒素中で瞬間凍結した。Ｘ線回折データは、Ｓｐｒｉｎｇ－８シンクロトロン放射光施設（Ｈｙｏｇｏ，Ｊａｐａｎ）のビームラインＢＬ４５ＸＵで収集された。

【０３６０】
Ｂ．データ収集及び構造の解決
Ｘ線回折データは、Ｓｐｒｉｎｇ－８シンクロトロン放射光施設（Ｈｙｏｇｏ，Ｊａｐａｎ）のＺＯＯ（Ｈｉｒａｔａ，Ｋ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ，２０１９．７５（Ｐｔ２）：１３８－１５０）自動データ収集システムを備えたビームラインＢＬ４５ＸＵで１００ケルビンの低温冷却条件下で収集した。回折画像は、ＸＤＳ（Ｋａｂｓｃｈ Ｗ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ，２０１０．６６（Ｐｔ２）：１２５～３２）を用いた統合データ処理ソフトウェアＫＡＭＯ（Ｙａｍａｓｈｉｔａ，ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｓｔｒｕｃｔ Ｂｉｏｌ，２０１８．７４（Ｐｔ５）：４４１－４４９）で処理した。ヒトＣＤ１３７（ＰＤＢ：６ＭＧＰ）及びＶＨＨモデル（ＰＤＢ：４Ｕ３Ｘ）の構造を検索モデルとして用いた。最初の解決策は、分子置換プログラムＰＨＡＳＥＲ（ＭｃＣｏｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｓｅｒ ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒａｐｈｉｃ ｓｏｆｔｗａｒｅ．Ｊ Ａｐｐｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ，２００７．４０（Ｐｔ４）：６５８－６７４）を用いて見つけた。次に、このモデルは、プログラムＣＯＯＴ（Ｅｍｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ，２００４．６０（Ｐｔ１２ Ｐｔ１）：２１２６－３２）を使用して手動で反復的に構築し、ＰＨＥＮＩＸ（Ａｄａｍｓ ｅｔ ａｌ．，Ａｃｔａ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ Ｄ Ｂｉｏｌ Ｃｒｙｓｔａｌｌｏｇｒ，２０１０．６６（Ｐｔ２）：２１３－２１）を使用して精密化した。最終的なモデルを、許容できるＲ及びＲ自由値ならびにラマチャンドラン統計（Ｍｏｌｐｒｏｂｉｔｙにより計算）に精密化した。データ処理及び精密化の統計は、表３２に見ることができる。
【０３６１】
Ｃ．ヒトＣＤ１３７に結合したＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）の構造
ＣＤ１３７と複合体を形成したＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）は、Ｉ４１空間群で結晶化し、非対称単位内に１つの複合体があり、２．５８Åに回折した。ヒトＣＤ１３７に結合したＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）の構造は、ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）が部分的にＣＤ１３７Ｌ結合と立体的に界面接続することを示している（図２４）。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）とＣＤ１３７との間の埋め込み表面積は、約５７１Å２である。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）相互作用は、ＣＤ１３７ ＣＲＤ２ドメインの周りにクラスター化されている。これらの相互作用は主にＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）ＣＤＲ２及びＣＤＲ３によって媒介され、ＣＤ１３７とより広範に接触する。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）ＣＤＲ１はＣＤ１３７と直接接触しないが、ＣＤＲ３はＣＤ１３７結合時に非構造ループからβシートへの劇的な立体構造変化を受ける（図２５）。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）ＣＤＲ２ Ｌｅｕ５２、Ｔｙｒ５８はＣＤ１３７残基Ｐｒｏ５０、Ａｓｎ５１と接触する。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）ＣＤＲ３残基Ｇｌｙ１００Ａ、Ｇｌｙ１００Ｂ、Ｖａｌ１００Ｃ、Ｔｈｒ１００Ｄ、Ｐｈｅ１００ＥはＣＤ１３７残基Ｐｈｅ３６、Ｐｒｏ４７、Ｐｒｏ４９、Ａｒｇ６０、Ｃｙｓ６２、Ｉｌｅ６４と接触する。さらに、ＦＲ２Ｌｅｕ４５及びＴｒｐ４７は、ＣＤ１３７結合に有意に寄与するＣＤ１３７残基Ｐｒｏ４７、Ｃｙｓ４８、Ｐｒｏ４９、Ｐｒｏ５０と接触する。ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）は、水素結合と疎水性相互作用の組み合わせを使用してＣＤ１３７と相互作用する。例えば、ＦＲ２Ｔｒｐ４７は、ＣＤ１３７残基Ｐｒｏ４７、Ｃｙｓ４８、Ｐｒｏ４９及びＰｒｏ５０と強い疎水性接触を形成する。ＣＤＲ３残基Ｐｈｅ１００Ｅは、ＣＤ１３７残基Ｐｈｅ３６及びＰｒｏ４７と疎水性相互作用を形成する。ＦＲ２残基Ｔｒｐ４７及びＣＤＲ３残基Ｇｌｙ１００Ａは、それぞれＣＤ１３７残基Ｐｒｏ４７及びＩｌｅ６４と１つの水素結合を形成する。ＣＤＲ３残基Ｖａｌ１００Ｃは、ＣＤ１３７残基Ｃｙｓ６２と２つの水素結合を形成する（図２６）。
【０３６２】
ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）／ＣＤ１３７複合体の結晶構造に基づいて、ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）が接触するＣＤ１３７の残基（すなわち、ＶＨが結合するＣＤ１３７のエピトープ残基）及びＣＤ１３７が接触するＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）の残基（すなわち、ＣＤ

１３７が接触するＶＨのパラアトピー性残基）を測定した。以下の表３３は、ファンデルワールス（非極性）相互作用力が最高となる点である３．７Åの接触距離ストリンジェンシーを使用して評価した、ＣＤ１３７及びそれらが接触するＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）の残基を示す。この結晶構造分析は、先のアラニンスキャン分析と一致し、ＢＧＡ－５６２３結合に最も影響を与えたＣＤ１３７残基の多くが構造内でＢＧＡ－５６２３と相互作用することが分かった。

【０３６３】

【表３２－１】

表３２：データ収集及び精密化の統計

結晶	apoVH (BGA-5623)	VH (BGA-5623)/CD137 複合体
データ収集		
X 線源	BL45XU	BL45XU
波長(Å)	1.0	1.0
空間群	P41212	I41
細胞寸法		
a (Å)	68.342	123.943
b (Å)	68.342	123.943
c (Å)	102.952	57.877
α (°)	90	90
β (°)	90	90
γ (°)	90	90
分解能（Å）	56.94-1.70 (1.80-1.70)a	87.64-2.58 (2.73-2.58)
Rsym (%)	18.0 (145.8)	21.4 (209.3)
<I/σ>	14.3 (1.6)	12.3 (1.2)
CC1/2	99.8 (56.1)	99.7 (44.4)
冗長性	11.6 (5.9)	6.8 (6.6)
完全性（%）	97.3 (84.3)	99.9 (99.4)
精密化		
分解能（Å）	48.33-1.70	43.82-2.58
反射数	26791	14038
Rwork/Rfree b(%)	19.84/23.46	22.8/28.9
ｒ.m.ｓ.ｄ.c 結合／角度	0.006/0.892	0.010/1.314
原子の数		
タンパク質	1787	1959
水	204	5
Ｂ因子		

【０３６４】

【表３２－２】

タンパク質	27.37	83.97
水	36.42	66.79
ラマチャンドラン		
好ましい(%)	98.71	94.21
許容(%)	1.29	3.47
外れ値(%)	0	2.32

[a]括弧内の値は、最高分解能シェルのものである。
[b]精密化中に確保された反射の約５％から計算
[c] ｒ.m.ｓ.ｄ.、二乗平均平方根偏差

【０３６５】
【表３３】

表３３：ＣＤ１３７のエピトープ残基及びそれらの対応するＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）のパラトープ残基

CD137		VH (BGA-5623)	
Phe	36	Thr	100D
		Phe	100E
Pro	47	Leu	45
		Trp	47
		Phe	100E
Cys	48	Trp	47
Pro	49	Trp	47
		Val	100C
		Thr	100D
Pro	50	Trp	47
		Tyr	58
Asn	51	Leu	52
Arg	60	Thr	100D
Cys	62	Gly	100B
		Val	100C
Ile	64	Gly	100A

ＶＨ（ＢＧＡ－５６２３）残基は、Ｋａｂａｔ命名法で番号が付けられている。

【０３６６】
実施例２７．インビトロＣＤ１３７活性化に影響を及ぼし得るパラメータ
ＣＤ１３７における親和性、受容体密度及びエピトープ位置ならびに分子フォーマットに加えて、モジュール比、モジュール配向、リンカー長及びＦｃ機能など、サイトカイン放出（Ｉｌ－２及びＩＦＮ－γ）に有意に影響を及ぼし得る他の重要なパラメータもあることが実証されている。したがって、ＣＤ１３７ベースの多重特異性抗体の合理的な設計を情報提供するために、これらのパラメータがＣＤ１３７アゴニズムにどのように影響するかを調査する体系的なアプローチを採用した。これらの多重特異性抗体の発現及び調製は、記載の通りに行った。

【０３６７】
まず、２：４、１：１及び１：２などの異なるモジュール比を持つＣＥＡ／ＣＤ１３７多重特異性抗体変異体、すなわちＢＥ－７１８（Ａ－ＢＧＡ－５６２３－ＢＧＡ－５６２３）（配列番号２９５及び１７９）、１＋１構成のＢＧＡ－５６２３であるＢＥ－９４２（ＺＷ１＋１）（配列番号２９９、３０１、及び３０３）、及び１＋２構成のＢＧＡ－５６２３であるＢＥ－７５５（ＺＷ１＋２）（配列番号２９９、３０１及び３０５）を構築した（図２７）。「ＺＷ」という呼称を有する抗体構築物の場合、これらの多重特異性抗体に不活性Ｆｃを使用し、ＺｙｍｅｗｏｒｋｓのＡｚｙｍｅｔｒｉｃ（商標）プラットフォームを利用してＦａｂ×ＶＨ構成を組み立てた。この構成において、ＺＷ１変異（鎖Ａ：Ｔ３５０Ｖ／Ｌ３５１Ｙ／Ｆ４０５Ａ／Ｙ４０７Ｖ；鎖Ｂ：Ｔ３５０Ｖ／Ｔ３６６Ｌ／Ｋ３９２Ｌ／Ｔ３９４Ｗ）を重鎖のＣＨ３ドメインに導入して、効率的なヘテロダイマー形成を可能にした（Ｖｏｎ　Ｋｒｅｕｄｅｎｓｔｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２０１３）Ｍａｂｓ　５（５）：６４６－５４）。モジュール比２：２の多重特異性抗体を表すＢＥ－１８９（Ａ－ＢＧＡ－５６２３）（配列番号２５５及び１７９）について、モジュール比がサイトカイン放出にどのように影響するかを調査することができた。上記の実施例２０に記載したように、高ＣＥＡ発現細胞株ＣＴ２６／ＣＥＡを、Ｔ細胞活性化のための第１のシグナルを引き起こし得るＰＢＭＣ（２×１０^{5}／ウェル）及びＨＥＫ２９３／ＯＳ８細胞と共に、インビトロＣＤ１３７活性化アッセイに使用した。表３４及び図２８に示すように、モジュール比２：２の多重特異性抗体は、ＣＤ１３７固有活性化のない強力なＣＤ１３７アゴニストであることが実証され、これは、ＢＥ－１８９（フォーマットＡ－ＢＧＡ－５６２３）がＣＥＡに依存してＣＤ１３７を活性化することを示唆している。対照的に、モジュール比２：４の多重特異性抗体ＢＥ－７１８（Ａ－ＢＧＡ－５６２３－ＢＧＡ－５６２３）は、ＣＥＡ発現細胞の非存在下でもＣＤ１３７を活性化することが示された。

【０３６８】
次に、モジュールの配向及びＦｃ機能がＣＤ１３７の活性化にどのように影響を与えるかを調べた。この実験では、ＢＥ－７４０（Ａ－ＩｇＧ１－ＢＧＡ－５６２３）（配列番号２９７及び１７９）を構築し、これは、不活性Ｆｃを置換するために野生型ＩｇＧ１　Ｆｃを使用した以外にフォーマットがＡ－ＢＧＡ－５６２３（ＢＥ－１８９）と全く同じであった。また、ＢＥ－５６２（Ｅ－ｍｕＦｃ－ＢＧＡ－５６２３）（配列番号３０７及び１７９）及びＢＥ－３７５（Ｅ－ＩｇＧ１－ＢＧＡ－５６２３）（配列番号３０９及び１７９）もそれぞれ構築した。図２９に示されるように、これらの２つの多重特異性抗体は、Ａ－ＢＧＡ－５６２３及びＡ－ＩｇＧ１－ＢＧＡ－５６２３と同じ抗ＣＥＡ抗体及び抗ｈｕＣＤ１３７　ＶＨドメイン（ＣＥＡ及びＢＧＡ－５６２３）の対を共有しているが、反対方向である。実施例２０に記載されているように、ＰＢＭＣベースのサイトカイン放出アッセイを使用して、ＣＤ１３７活性化の効力を定量化した。インビトロ結果に基づき、Ａ－ＢＧＡ－５６２３及びＡ－ＩｇＧ１－ＢＧＡ－５６２３は、Ｅ－ｍｕＦｃ－ＢＧＡ－５６２３及びＥ－ＩｇＧ１－ＢＧＡ－５６２３よりもＣＤ１３７活性化において強力であることが実証された。さらに、この実験に基づくと、Ｆｃ機能は、ＣＤ１３７の活性化に対して最小限の影響しか有さないようである（図３０）。

【０３６９】
次に、ＦｃとＶＨドメイン抗体とを連結するリンカーを、ＣＤ１３７活性化に及ぼす影響について評価した。Ａ－（Ｇ４Ｓ）３－ＢＧＡ－５６２３（ＢＥ－２４４）（配列番号３１１及び１７９）を、Ｇ４Ｓを（Ｇ４Ｓ）$_{3}$（配列番号３２９）の１５ＡＡリンカーで置換して作製した。再度、ＰＢＭＣベースのサイトカイン放出アッセイを使用して、効力を比較した。図３１及び表３４に示すように、リンカー長は、ＣＤ１３７活性化に最小限の影響を与える。

【０３７０】
最後に、様々な親和性を持つ２つのＢＧＡ－４７１２変異体（ＢＧＡ－６４６８及びＢＧＡ－９４４２）を効力比較のために選択した。ＳＰＲ研究及びＦＡＣＳ分析を表３５に

示した。フローサイトメトリーでは、ヒトＣＤ１３７$^{+}$またはヒトＣＥＡ$^{+}$発現細胞（１０^{5}細胞／ウェル）を様々な濃度の精製されたＶＨドメイン抗体とインキュベートし、次いでＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｒｏ－６４７標識抗ｈｕＩｇＧ　Ｆｃ抗体（カタログ番号４０９３２０、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ，ＵＳＡ）と結合させた。フローサイトメーター（Ｇｕａｖａ　ｅａｓｙＣｙｔｅ（商標）８ＨＴ、Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を使用して細胞の蛍光を定量した。試験した２つの多重特異性抗体間でＣＥＡ結合に有意差はなかったが、予想通り、ヒトＣＤ１３７に対する異なる結合親和性がフローサイトメトリーによって観察された。次に、実施例２０で上述したＰＢＭＣベースのサイトカイン放出アッセイを適用して、多重特異性抗体フォーマットＡ－ＣＤ１３７／ＣＥＡにおける異なる親和性を有するこれらのＢＧＡ－４７１２変異体の効力を評価した。表３５に示すように、これらの変異体によって誘発されたＣＤ１３７活性化は、ＣＤ１３７アームの親和性の増加に比例する。

【０３７１】

【表３４】

表３４：インビトロＣＤ１３７活性化のための重要なパラメータ

コード	代替名	ｍＡｂｓ対	モジュール比	Fc	プロテインＡ精製後の SEC-HPLC(%)	機能アッセイ EC50(ug/ml)
BE-189	A-BGA-5623	BGA-5623/CEA	2+2	不活性Fc	94.55	0.31
BE-718	A-BGA-5623-BGA-5623		2+4	不活性Fc	89.47	0.01
BE-740	A-IgG1- BGA-5623		2+2	wt-IgG1	98.71	0.17
BE-942	ZW1+1		1+1	LALADS	92.65	25.06
BE-755	ZW1+2		1+2	LALADS	83.19	1.16
BE-562	E-muFc- BGA-5623		2+2	不活性Fc	98.17	4.69
BE-375	E-IgG1- BGA-5623		2+2	wt-IgG1	97.76	1.76
BE-244	A-(G4S)3- BGA-5623		2+2	不活性Fc	98.84	0.18

【０３７２】

【表３５】

表３５：異なる親和性を有する多重特異性抗体フォーマットＡ－ＣＤ１３７ｘＣＥＡにおけるＢＧＡ－４７１２変異体の比較

フォーマット/クローン	フォーマット	細胞結合 EC50(ug/ml)	機能	
		Hut78/huCD137	EC50(ug/ml)	トップ
フォーマットA -BGA-5623	A-CD137xCEA	0.38	0.3412	2512
フォーマットA BGA-3386		0.21	0.07681	1953

【０３７３】
【表３６－１】

表３６：ＣＤ１３７ｘＣＥＡ多重特異性抗体のアミノ酸及びＤＮＡ配列

構築物	配列番号	配列
BE-718 A-BGA-5623-BGA-5623 重鎖 AA	配列番号 295	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYI NPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG NYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGG STYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGV TFDTRGQGTQVTVSSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSA EDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYL QMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS

【０３７４】

【表３６－２】

BE-718 A-BGA-5623-BGA-5623 重鎖 DNA	配列番号 296	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCG AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATT ACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGG CTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAG GGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGG AACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCG CGAATATGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACATGCC CCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCA CCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACAT GCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTG GTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAG GAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAA GGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAG CCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCT GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACA AGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCT GTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTG TCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCCAGTTACTTG AGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGC GCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCA AGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGT GGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGC GCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCT GAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGG TGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCAT CGGGCGGCGGAGGATCGGAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCT GGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCA CGGTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGG ACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATG CGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAA TACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGT ACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGAT ACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG

【０３７５】

【表３６－３】

BE-740 AA	配列番号 297	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYI NPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG NYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGS TYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVT FDTRGQGTQVTVSS

【０３７６】

【表３６－４】

BE-740 DNA	配列番号298	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCG AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATT ACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGG CTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAG GGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGG AACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCG CGAATATGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCC CACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGAGGTCCAGTTA CTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATC CTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGC GTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAA GGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATC TCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCG TGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTG GTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGT CTCATCG
BE-942 (ZW1+1)抗-CEA重鎖AA	配列番号299	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYI NPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG NYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAWLGCEVTDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLESSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVLPPSR DELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０３７７】

【表３６－５】

BE-942 (ZW1+1)抗-CEA 重鎖 DNA	配列番号 300	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCG AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATT ACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGG CTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAG GGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGG AACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCG CGAATATGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGACCAAGCGTGTTCCCAC TGGCACCCAGCTCCAAGAGCACCTCCGGAGGAACAGCATGGCTGGGATG CGAGGTGACCGACTACTTCCCCGAGCCTGTGACAGTGTCTTGGAACAGC GGCGCCCTGACCAGCGGAGTGCACACATTTCCTGCCGTGCTGGAGTCTA GCGGCCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACCGTGCCTAGCTCCTCTCTG GGCACCCAGACATATATCTGTAACGTGAATCACAAGCCATCTAATACAA AGGTGGATAAGAAGGTGGAGCCAAAGTCCTGCGACAAGACCCACACAT GCCCACCTTGTCCAGCACCAGAGGCAGCAGGAGGACCATCCGTGTTCCT GTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCCGAGG TGACATGCGTGGTGGTGAGCGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCC CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAG TGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTC TAATAAGGCCCTGCCTGCCCCAATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCAAAG GGACAGCCCAGGGAGCCTCAGGTGTACGTGCTGCCTCCAAGCCGCGACG AGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGCTGTGCCTGGTGAAGGGCTTCTA TCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCAGAGAAC AATTACCTGACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTCTTTCTTTCTG TATTCTAAGCTGACAGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGT TTTCTTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAA GTCCCTGTCTCTGAGCCCTGGCAAG
BE-942 (ZW1+1)抗-CEA 軽鎖 AA	配列番号 301	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLLIYNY KNLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTPYTFGQGTK VEIKRTVAAPSVAIFPPSDERLKSGTASVVCVLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSRLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

【０３７８】

【表３６－６】

BE-942 (ZW1+1)抗-CEA 軽鎖 DNA	配列番号 302	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGCG ATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAACCAGTATGGCTATCT GGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGTGCCGAAACTGCTGATTTAT AACTATAAAAACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCG GCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGAAGA TGTGGCGACCTATTATTGCCAGCATCATCTGGGCACCCCGTATACCTTTG GCCAGGGCACCAAAGTGGAAATTAAAAGGACAGTGGCAGCACCAAGCG TGGCAATCTTCCCACCTTCCGACGAGAGACTGAAGTCCGGCACCGCTAG CGTGGTGTGCGTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG TGGAAGGTGGATAACGCCCTGCAGTCCGGCAATTCTCAGGAGAGCGTGA CCGAGCAGGACTCCAAGGATTCTACATATAGCCTGAGCTCCAGGCTGAC CCTGTCTAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCCTGCGAGGTG ACACACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACCGCGGCG AGTGT
BE-942 (ZW1+1)抗-CD137 重鎖 AA	配列番号 303	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAI LDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYH AGGGVTFDTRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
BE-942 (ZW1+1)抗-CD137 重鎖 DNA	配列番号 304	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTT CGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCG CCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGG GCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAA TGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATT GTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCAC CCAAGTTACAGTCTCATCGGAGCCAAAGTCCTCCGACAAGACCCACACA TGCCCACCTTGTCCAGCACCAGAGGCAGCAGGAGGACCATCCGTGTTCC TGTTTCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCCGAG GTGACATGCGTGGTGGTGAGCGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGT TCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCC CCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACA GTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGT CTAATAAGGCCCTGCCTGCCCCAATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCAAA GGGACAGCCCAGGGAGCCTCAGGTGTACGTGTATCCTCCAAGCCGCGAC GAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTTT ACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCAGAGAA CAATTATAAGACCACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTCTTTCGCCC TGGTGTCTAAGCTGACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTTTCTTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGA AGTCCCTGTCTCTGAGCCCTGGCAAG

【０３７９】

【表３６－７】

BE-755 (ZW1 +2)抗-CD137 重鎖 AA	配列番号 305	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAI LDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYH AGGGVTFDTRGQGTQVTVSSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAK NTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSSEPKSS DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVSVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
BE-755 (ZW1 +2)抗-CD137 重鎖 DNA	配列番号 306	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTT CGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCG CCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGG GCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAA TGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATT GTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCAC CCAAGTTACAGTCTCATCGGGCGGCGGAGGGAGCGAGGTGCAGCTGCTT GAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCT GCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGT CAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGG GTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTC GCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTG CTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGT GGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCACCCAAGTGACCGTGT CCAGCGAGCCAAAGTCCTCCGACAAGACCCACACATGCCCACCTTGTCC AGCACCAGAGGCAGCAGGAGGACCATCCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAG CCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCCGAGGTGACATGCGTGG TGGTGAGCGTGTCCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGATGGCGTGGAGGTGCACAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACCTATAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCTAATAAGGCCC TGCCTGCCCCAATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCAAAGGGACAGCCCAG GGAGCCTCAGGTGTACGTGTATCCTCCAAGCCGCGACGAGCTGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTTTACCCTTCCGATAT CGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCAGAGAACAATTATAAGACC ACACCCCCTGTGCTGGACTCCGATGGCTCTTTCGCCCTGGTGTCTAAGCT GACCGTGGATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCTTGCAGC GTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCCTGTCTCT GAGCCCTGGCAAG
BE-562 (E-mutFc) 重鎖 AA	配列番号 307	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAI LDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYH AGGGVTFDTRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYI NPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG NYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCD

【０３８０】

【表３６－８】

BE-562 (E-mutFc) 重鎖 DNA	配列番号 308	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTT CGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCG CCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGG GCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAA TGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATT GTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCAC CCAAGTTACAGTCTCATCGGAGCCAAAGTCCTCTGACAAGACCCACACA TGCCCCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTT TCCACCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTG ACATGCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCA ACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAG GGAGGAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTG CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCA ATAAGGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGG CCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAG ATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCC CTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAAT TACAAGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTA TAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATC CCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCACAGGTGCAGCTG GTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAAAGTG AGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATTACCTGCATTGGGT GCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCTATATTAACCCG CAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAGGGCCGCGTGACCA TGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCAGCCT GCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGGCAAC TATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGA GCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCC AAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
BE-375 (E-wtIgG1 Fc) 重鎖 AA	配列番号 309	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSAI LDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVYH AGGGVTFDTRGQGTQVTVSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYI NPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG NYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCD

【０３８１】

【表３６－９】

BE-375 (E-wtIgG1 Fc) 重鎖 DNA	配列番号 310	GAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACCAGGAGGTT CGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGCCGAAGAC GTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGGGTCTCCG CCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTCAAAGG GCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTTCAAA TGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGCATT GTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGCAC CCAAGTTACAGTCTCATCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCACACAT GCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT CTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCACAGGTGCA GCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGAGCGTGAA AGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATTACCTGCATT GGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCTATATTAA CCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAGGGCCGCGTG ACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGGAACTGAGCA GCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATATGG CAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACC GTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTC CTCCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC
BE-244 (A-(G4S)3)重鎖 AA	配列番号 311	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGYI NPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREYG NYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSG GGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLE WVSAILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCA RIVYHAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS

【０３８２】

【表３６－１０】

BE-244 (A-(G4S)3)重鎖DNA	配列番号312	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCG AGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATT ACCTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGG CTATATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAG GGCCGCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGG AACTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCG CGAATATGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACC CTGGTGACCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACATGCC CCCCTTGTCCTGCTCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCA CCCAAGCCCAAGGATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACAT GCGTGGTGGTGGATGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTG GTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAG GAGCAGTACAACTCCACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGC ACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAA GGCCCTGGCCGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAG CCCAGAGAGCCTCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCTCTGACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCT GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACA AGACCACACCCCCTGTGCTGGATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGC AAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCT GTTCCGTGATGCACGAAGCTCTGCATAATCACTATACTCAGAAATCCCTG TCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGCGGAGGATCTG GTGGCGGTGGGTCCGAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGT CCAACCAGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGG TTTCCGCCGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACT GGAATGGGTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCG GAAAGTGTCAAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATA CTCTTTACCTTCAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTAC TACTGCGCCCGCATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATAC TCGGGGACAGGGCACCCAAGTTACAGTCTCATCG

【０３８３】

実施例２８．単剤ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体のインビボでの有効性

ＣＥＡ＋腫瘍細胞に対するＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体ＢＥ－１８９及びＢＥ－７４０のインビボでの有効性を測定するために、ＣＴ２６／ＣＥＡ細胞（１×１０^{6}）を、ＢＡＬＢ／ｃバックグラウンドのヒト化ＣＤ１３７マウスに皮下注射した。ＢＥ－１８９（３ｍｇ／ｋｇ）、ＢＥ－７４０（３ｍｇ／ｋｇ）、抗ＣＥＡ　Ａｂ（配列番号１８１及び１７９）（３ｍｇ／ｋｇ）、ウレルマブ類似体（３ｍｇ／ｋｇ）またはビヒクル対照を、腫瘍注射の日に開始して、週に２回投与した（１群あたり６匹のマウス）。ビヒクル対照と比較して、ＢＥ－１８９（Ａ－ＢＧＡ－５６２３）及びウレルマブ類似体は、図３２に示すように、腫瘍増殖の有意な阻害（Ｐ＜０．００１）を誘導した。

【０３８４】

実施例２９．ＣＥＡｘＣＤ１３７アゴニスト

アゴニスト性抗ｈｕＣＤ１３７抗体は、臨床現場において毒性を実証しており、これは、全身性のＦｃγＲ架橋がＣＤ１３７活性化に理想的でないことを示し得る。その目的は

、広範囲のがんに対して全身性ＣＤ１３７活性化なしで、腫瘍部位に特異的に強力なＣＤ１３７刺激を達成することであった。ＦｃγＲ架橋の依存性を克服するために、図３３に示す以下の特徴を有するＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体を生成した。この特異的構築物は、モジュール比２：２のＩｇＧ融合様多重特異性抗体フォーマット、ＣＥＡに結合する２価のＦ（ａｂ’）２フラグメント、ｈｕＣＤ１３７に結合するＣＨ３のＣ末端に融合を有するＶＨドメインフラグメント、及びＦｃγＲ結合を持たないがＦｃＲｎ結合を保持するｈｕＩｇＧ１のＦｃヌルバージョンを含んでいた。配列情報を表３７に示す。

【０３８５】

【表３７－１】

表３７：ＣＥＡｘＣＤ１３７のアミノ酸及びＤＮＡ配列

構築物	配列番号	配列
BE-146 重鎖 AA	配列番号 313	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYYLHWVRQAPGQGLEWIGY INPQTGKTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAREY GNYNYPLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSAEDVGWVRQAPGKGLEWVSA ILDKGGSTYYAESVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARIVY HAGGGVTFDTRGQGTQVTVSS

【０３８６】

【表３７－２】

BE-146 重鎖 DNA	配列番号 314	CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAACCGGGCGCGA GCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCTATATTTTTACCAGCTATTAC CTGCATTGGGTGCGCCAGGCGCCGGGCCAGGGCCTGGAATGGATTGGCTA TATTAACCCGCAGACCGGCAAGACCAGCTATGCCCAGAAATTTCAGGGCC GCGTGACCATGACCCGCGATACCAGCACCAGCACCGTGTATATGGAACTG AGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTGTATTATTGCGCGCGCGAATA TGGCAACTATAACTATCCGCTGGATTATTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGA CCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCACCCT CCTCCAAGAGTACTTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCT ACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA AGTTGAGCCAAAGTCCTGTGACAAGACCCACACATGCCCCCCTTGTCCTGC TCCACCAGCTGCAGGACCAAGCGTGTTCCTGTTTCCACCCAAGCCCAAGG ATACCCTGATGATCTCTCGGACCCCAGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGAT GTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTATGTGGACGGCGT GGAGGTGCACAATGCTAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACTCC ACCTATAGAGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAA CGGCAAGGAGTATAAGTGCAAGGTGTCCAATAAGGCCCTGGCCGCTCCTA TCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAGGGCCAGCCCAGAGAGCCTCAGGTG TACACACTGCCTCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTCT GACATGTCTGGTCAAGGGCTTCTATCCCTCTGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAAGACCACACCCCCTGTGCTGG ATTCCGACGGCTCTTTCTTTCTGTATAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCC GGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGTTCCGTGATGCACGAAGCTCTG CATAATCACTATACTCAGAAATCCCTGTCACTGTCACCTGGTAAAGGTGGA GGCGGTTCAGAGGTCCAGTTACTTGAGAGTGGTGGAGGTCTGGTCCAACC AGGAGGTTCGCTGCGTTTATCCTGCGCCGCGTCTGGATTCACGGTTTCCGC CGAAGACGTGGGTTGGGTGCGTCAAGCGCCGGGGAAAGGACTGGAATGG GTCTCCGCCATCTTGGATAAGGGTGGTTCGACATACTATGCGGAAAGTGTC AAAGGGCGCTTTACGATCTCGCGCGATAACGCAAAAAATACTCTTTACCTT CAAATGTCTAGCCTTCGTGCTGAGGACACTGCGGTGTACTACTGCGCCCGC ATTGTCTACCATGCTGGTGGTGGCGTCACCTTTGATACTCGGGGACAGGGC ACCCAAGTTACAGTCTCATCG
BE-146 軽鎖 AA	配列番号 179	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENQYGYLAWYQQKPGKVPKLLIYNYK NLVEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQHHLGTPYTFGQGTKVEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

【０３８７】

【表３７－３】

BE-146軽鎖DNA	配列番号180	GATATTCAGATGACCCAGAGCCCGAGCAGCCTGAGCGCGAGCGTGGGC GATCGCGTGACCATTACCTGCCGCGCGAGCGAAAACCAGTATGGCTATC TGGCGTGGTATCAGCAGAAACCGGGCAAAGTGCCGAAACTGCTGATTT ATAACTATAAAAACCTGGTGGAAGGCGTGCCGAGCCGCTTTAGCGGCA GCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGACCATTAGCAGCCTGCAGCCGGA AGATGTGGCGACCTATTATTGCCAGCATCATCTGGGCACCCCGTATACC TTTGGCCAGGGCACCAAAGTGGAAATTAAACGAACAGTGGCAGCCCCT TCCGTCTTCATTTTTCCCCCTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGAACTGC TAGCGTGGTCTGTCTGCTGAACAATTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGGTG CAGTGGAAAGTCGATAACGCTCTGCAGTCCGGCAATTCTCAGGAGAGTG TGACCGAACAGGACTCAAAGGATAGCACATATTCCCTGTCTAGTACTCT GACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAGCACAAAGTGTATGCCTGTGA AGTCACACACCAGGGGCTGAGTTCACCAGTCACCAAGAGTTTCAACAG AGGGGAATGC

【０３８８】

実施例３０．ＣＥＡｘＣＤ１３７の標的結合活性

組換えＣＤ１３７及びＣＥＡへの結合

ＥＬＩＳＡの結果は、ＢＥ－１４６が一貫した結合活性で抗原ＣＥＡ（ＣＥＡ／Ｈｉｓ）及びＣＤ１３７（ｈｕＣＤ１３７－ｍＩｇＧ２ａ）に結合する一方、２つの陰性対照であるヒトＩｇＧ及びＤＳ（原薬）緩衝液は、ＣＥＡ及びＣＤ１３７に検出可能な結合を有しなかったことを示した（図３４）。

【０３８９】

ＢＥ１４６の結合動力学は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）を用いて測定した。ＳＰＲを用いてＣＤ１３７及びＣＥＡの組み換えタンパク質に対する抗体のオンレート定数（ｋａ）とオフレート定数（ｋｄ）を測定し、次いで親和定数（ＫＤ）を求めた。その結果は、ＢＥ－１４６がヒトＣＤ１３７及びヒトＣＥＡに対して同等の結合親和性を有することを示した。

【０３９０】

ヒトＣＤ１３７タンパク質は、マウスＣＤ１３７と低い配列相同性を有し、配列同一性は６１．０％しかない。対照的に、ＣＤ１３７は、カニクイザルＣＤ１３７と非常に相同性が高く、９５％の配列同一性を有する。ＢＥ－１４６結合機能の種特異性を試験するために、ヒト、カニクイザル、及びマウスＣＤ１３７を結合タンパク質として用いてＳＰＲ結合研究を行った。ＢＥ－１４６は、ヒトＣＤ１３７に対して約３６．２ｎＭのK_Dという高い結合親和性を示した。比較すると、カニクイザルＣＤ１３７に対するＢＥ－１４６の結合親和性は、約１５．９ｎＭの同様のK_Dであった。表３８に示すように、ＢＥ－１４６は、ＳＰＲアッセイにおいてマウスＣＤ１３７に対する検出可能な結合シグナル伝達を有さなかった。

【０３９１】

ヒトとカニクイザル種との間のＣＥＡの結合親和性試験では、ＢＥ－１４６がヒトＣＥＡ（K_D：約３．００ｎＭ）及びサルＣＥＡ（カタログ番号：ＣＥ５－Ｃ５２Ｈ５、Ａｃｒｏｂｉｏｓｙｓｔｅｍ）（K_D：約１１．４ｎＭ）に類似した結合親和性を示したことが示された。このデータを以下の表３９に示す。ヒトとサルのＣＥＡの配列アラインメントは、２つの種の間に７９．２％の相同性があることを示している。

【０３９２】

天然ＣＤ１３７及びＣＥＡへの結合

ＦＡＣＳの結果により、ＨｕＴ７８／ＣＤ１３７細胞表面に発現したＣＤ１３７に対するＢＥ－１４６の結合活性がさらに確認された。ＢＥ－１４６は、２．２５７μｇ／ｍＬ

（１２．９０ｎＭ）のＥＣ５０で用量反応的にＣＤ１３７に対して強い結合活性を示す一方、陰性対照ヒト抗体（ｈＩｇＧ）は、予想されたようにＨｕＴ７８／ＣＤ１３７及びＣＴ２６　ＯＳ８－ＣＥＡに結合しなかった（図３５及び３７）。同様に、ＢＥ－１４６は、１．５３２μｇ／ｍＬ（８．７５ｎＭ）のＥＣ５０で用量反応的にＣＥＡに対して強い結合活性を示す一方、陰性対照ヒト抗体（ｈＩｇＧ）は、予想されたようにＨｕＴ７８／ＣＤ１３７及びＣＴ２６－ＯＳ８－ＣＥＡに結合しなかった（図３５及び３６）。

【０３９３】

【表３８】

表３８：異なる種のＣＤ１３７の、ＳＰＲで決定された動力学パラメータの比較分析

抗原	抗体	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)[a,b]
ヒト CD137	BE-146	1.30E+05	4.69E-03	3.62E-08
サルＣＤ１３７		1.67E+05	2.66E-03	1.59E-08
マウス CD137		ND[c]	ND	ND

略語：K_D、親和性定数；K_{off}、解離の速度定数；K_{on}、結合速度定数；ＮＤ、測定不能；ＳＰＲ、表面プラズモン共鳴。
K_D値は、動力学定数の比から$K_D = K_{off} / K_{on}$として計算される。
K_D値は、リガンドの半分が平衡状態で占める分析対象物の濃度によって決定される。
ＮＤ：親和性が弱すぎて測定できない。

【０３９４】

【表３９】

表３９：異なる種のＣＥＡの、ＳＰＲで決定された動力学パラメータの比較分析

抗原	抗体	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)[a,b]
ヒト CEA	BE-146	9.85E+04	2.95E-04	3.00E-09
サル CEA		6.30E+04	7.17E-04	1.14E-08

略語：ＣＥＡ、がん胎児性抗原；K_D、親和性定数；K_{off}、解離の速度定数；K_{on}、結合速度定数；ＮＤ、測定不能；ＳＰＲ、表面プラズモン共鳴。
K_D値は、動力学定数の比から$K_D = K_{off} / K_{on}$として計算される。
K_D値は、リガンドの半分が平衡状態で占める分析対象物の濃度によって決定される。

【０３９５】

実施例３１．ＣＥＡｘＣＤ１３７は、ＣＥＡに依存してＴ細胞活性化を誘導する

ＣＥＡｘＣＤ１３７多重特異性抗体ＢＥ－１４６の機能性を様々なインビトロ実験で評価した。まず、健康なドナーからのヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を使用して、シグナルを提供するＣＥＡｘＣＤ１３７及びＨＥＫ２９３／ＯＳ８でヒトＴ細胞を活性化した。ＰＢＭＣを、Ｆｉｃｏｌｌ（Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７，Ｓｉｇｍａ－Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）分離によって健康なドナーの全血から単離した。ＣＥＡｘＣＤ１３７がＣＥＡ$^+$腫瘍細胞の存在下でヒトＰＢＭＣからのサイトカイン放出を誘導できるかどうかを調べるために、ＰＢＭＣ（１×１０^5／ウェル）をＣＥＡ$^+$ＭＫＮ４５細胞（２×１０^5／ウェル）及びＨＥＫ２９３／ＯＳ８（１×１０^5／ウェル）細胞と共に９６ウェルＶ底

プレートで２日間（図３８Ａ）共培養した。ＰＢＭＣからのＩＬ－２及びＩＦＮ－γの放出をＥＬＩＳＡによって測定した。結果は、ＣＥＡｘＣＤ１３７が有意なサイトカイン放出を誘導できることを示した（図３８Ｂ～３８Ｃ）。２名のドナーからのＰＢＭＣを試験した。結果は、重複の平均±ＳＤで示した。

【０３９６】

次に、ＣＥＡｘＣＤ１３７が抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞機能を増強できるかどうかを調べた。ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、Ｆｉｃｏｌｌ（Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７，Ｓｉｇｍａ－Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）分離によって健康なドナーの全血から単離した。ヒトＰａｎ　Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、カタログ番号１３０－０９６－５３５）を用いてＴ細胞を単離した。ＢＥ－１４６がＣＥＡ＋腫瘍細胞の存在下でヒトＴ細胞からのサイトカイン放出を誘導できるかどうかを調べるために、Ｔ細胞（１×１０^{5}／ウェル）をＣＥＡ＋ＭＫＮ４５細胞（２×１０^{5}／ウェル）及びＨＥＫ２９３／ＯＳ８（１×１０^{5}／ウェル）細胞と共に９６ウェルＶ底プレートで２日間共培養した。Ｔ細胞からのＩＬ－２及びＩＦＮ－γの放出をＥＬＩＳＡによって測定した。結果は、多重特異性抗体ＢＥ－１４６が有意なＩＬ－２（図３９Ａ）及びＩＦＮ－γ（図３９Ｂ）放出を誘導できることを示した。

【０３９７】

次に、ＣＥＡｘＣＤ１３７がＣＥＡに依存する応答を引き起こすことができるかどうかを調べた。ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、Ｆｉｃｏｌｌ（Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７，Ｓｉｇｍａ－Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）分離によって健康なドナーの全血から単離した。ヒトＰＢＭＣからのＣＥＡｘＣＤ１３７誘導サイトカイン放出がＣＥＡ依存的であったかどうかを調べるために、ＰＢＭＣ（１ｘ１０^{5}／ウェル）を、標的細胞としてＨＥＫ２９３またはＣＥＡ過剰発現ＨＥＫ２９３細胞（ＨＥＫ２９３／ＣＥＡ）（１ｘ１０^{5}／ウェル）、及びＨＥＫ２９３／ＯＳ８（１ｘ１０^{5}／ウェル）細胞と共に９６ウェルＶ底プレートで２日間共培養した。ＰＢＭＣからのＩＬ－２及びＩＦＮ－γの放出をＥＬＩＳＡによって測定した。結果は、多重特異抗体ＢＥ－１４６が、ＣＥＡ過剰発現ＨＥＫ２９３細胞に対してはＰＢＭＣからの有意なＩＬ－２及びＩＦＮ－γ放出を誘導できたが、ＣＥＡ形質導入のないＨＥＫ２９３細胞に対しては誘導できなかったことを示した（図４０Ａ～Ｂ）。

【０３９８】

さらに、ＣＥＡｘＣＤ１３７構築物から誘導された応答が可溶性ＣＥＡによってブロッキングされ得るかどうかを調べるために、一連の実験を実施した。ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、Ｆｉｃｏｌｌ（Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ－１０７７，Ｓｉｇｍａ－Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ　ＭＯ）分離によって健康なドナーの全血から単離した。ヒトＰＢＭＣからのＢＥ－１４６誘導サイトカイン放出が可溶性ＣＥＡによってブロッキングされ得るかどうかを調べるために、様々な濃度の組み換え可溶性ＣＥＡの存在下で、ＰＢＭＣ（１ｘ１０^{5}／ウェル）をＭＫＮ４５（１ｘ１０^{5}／ウェル）及びＨＥＫ２９３／ＯＳ８（１ｘ１０^{5}／ウェル）細胞と共に９６ウェルＶ底プレートで２日間共培養した。ＰＢＭＣからのＩＬ－２及びＩＦＮ－γの放出をＥＬＩＳＡによって測定した。結果は、多重特異抗体ＢＥ－１４６がＰＢＭＣからのＩＬ－２（図４１Ａ）及びＩＦＮ－γ（図４１Ｂ）放出を誘導し、この放出が５０ｎｇ／ｍｌまたは５００ｎｇ／ｍｌの可溶性ＣＥＡによって有意にブロッキングされなかったことを示した。非常に高濃度のＣＥＡ（５０００ｎｇ／ｍｌ）のみが減少につながった。

【０３９９】

これらのデータは、（ＣＤ３εまたはＴ細胞受容体刺激）の存在下でのＣＥＡｘＣＤ１３７が、強力なＣＥＡ依存性Ｔ細胞活性化を誘導することを示している。

【０４００】

実施例３２．ＢＥ－１４６はＴ細胞の活性化を増強する

細胞ベースの生物発光アッセイを開発し、これを用いて、誘導性共刺激受容体ＣＤ１３７を標的として刺激し、Ｔ細胞の活性化を増強するＢＥ－１４６の活性を測定した。

【０４０１】
このアッセイでは、２つの遺伝子修飾された細胞株、ＪＫ－ＮＦＫＢ－ＣＤ１３７及びＣＴ２６－ＯＳ８－ＣＥＡをそれぞれエフェクター細胞及び標的細胞として使用した。ＪＫ－ＮＦＫＢ－ＣＤ１３７は、ヒトＣＤ１３７遺伝子ベクターとルシフェラーゼ構築物を、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）活性化とＣＤ１３７共刺激との両方に応答できるＮＦ－ｋＢ応答要素で安定にトランスフェクションすることにより、Ｊｕｒｋａｔ細胞株、クローンＥ６－１（ＡＴＣＣ、ＴＩＢ－１５２）から開発した。ＣＴ２６－ＯＳ８－ＣＥＡ細胞株は、ヒトＣＥＡ及びＴ細胞エンゲージャーＯＳ８（抗ＣＤ３抗体の膜結合型）を異所的に発現させることによってＣＴ２６ＷＴ細胞から生成した。２つの細胞株が共培養される場合、二重特異性抗体ＢＥ－１４６の添加は、エフェクター細胞上で発現するＣＤ１３７と標的細胞上で発現するＣＥＡとの両方と相互作用し、ＣＥＡ依存性のＣＤ１３７共刺激と、ルシフェラーゼ遺伝子プロモーターの活性化とを用量依存的に開始する。ＪＫ－ＮＦＫＢ－ＣＤ１３７（５×１０^{4}細胞／ウェル）及びＣＴ２６－ＯＳ８－ＣＥＡ（１×１０^{4}細胞／ウェル）を、段階希釈したＢＥ－１４６の存在下に５～６時間共培養した。陰性対照として、ヒトＩｇＧ（ｈＩｇＧ）と、抗体を含まない緩衝液とを使用した。

【０４０２】
ＢＥ－１４６は、用量反応的にアゴニスト機能活性を示した。この実験を二重に行ったところ、図４２に示すように、ＢＥ－１４６のＥＣ５０は、０．５１μｇ／ｍＬ（２．９１ｎＭ）及び０．５６μｇ／ｍＬ（３．２０ｎＭ）であった。緩衝液及びヒトＩｇＧ対照には活性がなかった。

【０４０３】
実施例３３．ＢＥ－１４６は、ＣＥＡ依存的にヒトＰＢＭＣからのＩＦＮ－γ及びＩＬ－２産生を増強する
Ｈｅｋ２９３／ＯＳ８^{ｌｏｗ}細胞株は、初期Ｔ細胞活性化に抗ＣＤ３刺激を提供するために、Ｔ細胞エンゲージャーＯＳ８（抗ＣＤ３抗体の膜結合型）によるレトロウイルス形質導入によって生成した。健康なドナーからのＰＢＭＣ及びＨｅｋ２９３／ＯＳ８^{ｌｏｗ}を、ＣＥＡ高発現を有する標的細胞ＭＫＮ４５、または少量のＣＥＡのみを発現するＮＣＩ－Ｎ８７と、参照抗体としてのＢＥ－１４６もしくはウレルマブ、または陰性対照としてのヒトＩｇＧ１の存在下で共培養した。ＰＢＭＣ（３×１０^{4}細胞／ウェル）を、段階希釈したＢＥ－１４６、ウレルマブまたはｈｕＩｇＧ１の存在下でＨｅｋ２９３／ＯＳ８^{ｌｏｗ}（１×１０^{4}細胞／ウェル）及びＭＫＮ４５（２×１０^{4}細胞／ウェル）と共に４８時間共培養した。ＰＢＭＣ（３×１０^{4}細胞／ウェル）を、段階希釈したＢＥ－１４６、ウレルマブまたはｈｕＩｇＧ１の存在下でＨｅｋ２９３／ＯＳ８^{ｌｏｗ}（１×１０^{4}細胞／ウェル）及びＮＣＩ－Ｎ８７（２×１０^{4}細胞／ウェル）と共に４８時間共培養した。ＩＦＮ－γ及びＩＬ－２の放出をＥＬＩＳＡによって測定した。

【０４０４】
ＢＥ－１４６は、標的細胞がＭＫＮ４５（ＣＥＡ高）であった場合、両方のドナーからのＰＢＭＣを促進して、用量依存的にＩＦＮ－γ及びＩＬ－２を分泌させた（図４３Ａ）。しかしながら、ＮＣＩ－Ｎ８７（ＣＥＡ低）細胞を標的細胞として使用した場合、ＢＥ－１４６はサイトカイン放出を誘発しなかった（図４３Ｂ）。

【０４０５】
実施例３４．ＢＥ－１４６は、ＭＫＮ４５細胞に対してヒトＰＢＭＣの細胞毒性を増強する
健康なドナーからのＰＢＭＣを、ＢＥ－１４６の存在下で標的細胞としてＭＫＮ４５と共培養した。ウレルマブを参照抗体として使用し、ヒトＩｇＧ１を陰性対照として使用した。ＥｐＣａｍ／ＣＤ３二重特異性Ｔ細胞設計（ＢｉＴＥ）構築物であるソリトマブ（Ｆｅｒｒａｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｅｘｐ Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ ２０１５；３４：１２３）を１０ｐｇ／ｍＬ濃度で共培養系に添加し、初期Ｔ細胞活性化のために抗ＣＤ３刺激を提供した。ＭＫＮ４５（１×１０^{4}細胞／ウェル）細胞を２４時間予備培養して細胞をプレートに付着させ、次いで、ＢＥ－１４６またはウレルマブの存在下でＰＢ

ＭＣ（１×１０^{5}細胞／ウェル）と共培養した。この共培養系に、ソリトマブ（１０ｐｇ／ｍＬ）を加えて初期刺激を与えた。

【０４０６】

ＭＫＮ４５細胞に対する死滅を、リアルタイム細胞分析（ＲＴＣＡ）システム（Ｈａｍｉｄｉ，Ｌｉｌｊａ ａｎｄ Ｉｖａｓｋａ Ｂｉｏ Ｐｒｏｔｏｃ ２０１７；７（２４）：ｅ２６４６）を用いて、下にある細胞外マトリックスへのＭＫＮ４５接着の変化を監視することによって測定した。ＢＥ－１４６は、ＭＫＮ４５腫瘍細胞に対して用量依存的な死滅を誘導した。２名のドナーからのＢＥ－１４６の平均ＥＣ５０は０．５４５２ｎＭであり、ウレルマブと同等のレベルである（ＥＣ５０＝０．２５８ｎＭ）（図４４）。

【０４０７】

実施例３５．ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体と抗ＰＤ－１抗体チスレリズマブとの併用により、免疫細胞の活性化がさらに促進される

共刺激受容体ＣＤ１３７はＴ細胞活性化細胞内シグナルを誘導することができるが、シグナルは、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１などの免疫チェックポイントライゲーションによって抑制される可能性がある。したがって、ＰＤ－１抗体チスレリズマブ（ＢＧＢ－Ａ３１７）とＢＥ－１４６との併用により、有効性を高めることができる。ＢＥ－１４６と抗ＰＤ－１抗体チスレリズマブとの併用が単独療法と比較して免疫細胞の活性化を増強できるかどうかを確認するために、ヒトＰＢＭＣをＣＥＡ及びＰＤ－Ｌ１発現標的細胞と共培養し、ＩＦＮ－γ放出を機能的読み取り値として測定した。ＰＢＭＣをエフェクター細胞として使用した。ＰＤ－Ｌ１及びＴ細胞エンゲージャーＯＳ８を発現するように操作されたＨｅｋ２９３／ＯＳ８－ＰＤＬ１細胞を、標的細胞としてＭＫＮ４５（ＣＥＡ高）と混合した。ＩＦＮ－γ分泌は、Ｔ細胞の活性化のマーカーとして測定された。

【０４０８】

ＰＢＭＣを、４０ｎｇ／ｍＬ ＯＫＴ３で２日間予備刺激した。刺激されたＰＢＭＣ（３×１０^{4}細胞／ウェル）を、段階希釈したＢＥ－１４６及びチスレリズマブ（１０００ｎｇ／ｍＬ）の存在下でＨｅｋ２９３／ＯＳ８－ＰＤＬ１（１×１０^{4}細胞／ウェル）及びＭＫＮ４５（２×１０^{4}細胞／ウェル）と共に４８時間共培養した。ＩＦＮ－γ放出を、ＥＬＩＳＡにより読み取り値として測定した。

【０４０９】

ＰＢＭＣをＨｅｋ２９３／ＯＳ８－ＰＤ－Ｌ１細胞及びＭＫＮ４５（ＣＥＡ高）細胞と共培養した場合、ＢＥ－１４６とチスレリズマブとの併用投与は、ヒトＴ細胞活性化に対して累積的な効果を示した。ＢＥ－１４６とチスレリズマブとの組み合わせは、図４５に示すように、ＢＥ－１４６またはチスレリズマブ単独に比べて、ＩＦＮ－γ産生を有意に増強した。

【０４１０】

チスレリズマブ（ＢＧＢ－Ａ３１７）は、米国特許第８，７３５，５５３号に開示されており、ＶＨ／ＶＬ配列は、以下の表４０に示されている。

【０４１１】

【表４０】

表４０：チスレリズマブ配列表

チスレリズマブ VH	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYGVHWIRQPPGKGLEWIGVIYADGSTNYNPSLKSRVTISKDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARAYGNYWYIDVWGQGTTVTVSS (配列番号 315)
チスレリズマブ VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSESVSNDVAWYQQKPGQPPKLLINYAFHRFTGVPDRFSGSGYGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCHQAYSSPYTFGQGTKLEIK (配列番号 316)

【０４１２】

実施例３６．エフェクター受容体結合及びエフェクター機能

ＢＥ－１４６は、エフェクター機能受容体への結合活性が低下した、操作されたヒトＩｇＧ１　Ｆｃ部分を使用する。ＥＬＩＳＡアッセイにより、ＢＥ－１４６をヒトＩｇＧ（ｈｕＩｇＧ）と比較した場合、ＢＥ－１４６はＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡＨ１３１、ＦｃγＲＩＩＡＲ１３１、ＦｃγＲＩＩＢ、ＦｃγＲＩＩＩＡＶ１５８、ＦｃγＲＩＩＩＡＦ１５８、ＦｃγＲＩＩＩＢ及びＣ１ｑに対する結合活性が低下していることが実証された。ＦｃγＲｓ及びＣ１ｑは、免疫複合体により誘導されるエフェクター機能を媒介する重要な受容体であるため、ＢＥ－１４６は、抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）及び補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）などの検出できないエフェクター機能を有する。

【０４１３】

ＦｃγＲ結合活性をＥＬＩＳＡにより評価した。ＢＥ－１４６は、陰性対照と同等の、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡＨ１３１、ＦｃγＲＩＩＡＲ１３１、ＦｃγＲＩＩＢ、ＦｃγＲＩＩＩＡＶ１５８、ＦｃγＲＩＩＩＡＦ１５８、ＦｃγＲＩＩＩＢに対する有意な結合活性を示さなかった。対照的に、陽性対照ヒトＩｇＧは、アッセイでＦｃγＲｓのいずれかに強い結合シグナルを生成した（図４６Ａ～Ｂ）。

【０４１４】

実施例３７．ＣＥＡｘＣＤ１３７抗体はインビボで腫瘍を軽減する

ＢＥ－１４６のインビボ有効性は、ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＭＣ３８／ｈＣＥＡマウス結腸腺癌モデルで調べた。ＭＣ３８／ｈＣＥＡ細胞を、メスのヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスに移植した。細胞接種後５日目に、マウスを腫瘍体積に従ってランダムに４つの群に分けた。ＢＥ－１４６の腹腔内投与（０．１、０．５及び３．０ｍｇ／ｋｇ、週に１回）は、腫瘍の増殖を効果的に阻害し、１７日目のＴＧＩ率はそれぞれ７０％、６１％及び９２％であった（図４７）。さらに、０．１、０．５及び３．０ｍｇ／ｋｇ群における腫瘍のない割合は、試験エンドポイント（２１日目）においてそれぞれ２０％、３０％及び９０％であった。腫瘍のない動物の割合は、０．１ｍｇ／ｋｇから３．０ｍｇ／ｋｇまでの用量にわたって増加した。最初の投与後に、３つの用量レベル（０．１、０．５、及び３．０ｍｇ／ｋｇ）でのＢＥ－１４６の薬物動態（ＰＫ）プロファイルを特徴付けた。ＢＥ－１４６の薬物曝露（AUC_{0-168h}及びC_{max}）を比例して増加させた（表４１）。試験全体を通して、どの処置群でも動物の体重に有意な影響はなかった。

【０４１５】

【表４１】

表４１：ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＭＣ３８／ｈＣＥＡ同系腫瘍モデルにおけるＢＥ－１４６の有効性及びＰＫパラメータ

抗体	n	用量 (mg/kg)	TGI (%)（17 日目）	平均腫瘍体積 (mm^3± SEM)（17 日目）	p 値対ビヒクル (17 日目)	ＰＫパラメータ（単回投与）	
						C_{max}(μg/mL) (平均±SEM)	AUC_{0-168h} (h・μg/mL) (平均±SEM)
ビヒクル	10	NA	NA	2187.0 (± 161.4)	NA	NA	NA
BE-146	10	0.1, QW	70	741.7 (± 316.7)	0.0143	0.60 (± 0.04)	42.34 (± 1.92)
BE-146	10	0.5, QW	61	930.9 (± 309.3)	0.0077	3.04 (± 0.35)	304.66 (± 29.75)
BE-146	10	3.0, QW	92	286.3 (± 284.7)	0.0014	26.11 (± 1.39)	2278.75 (± 334.34)

略語：$AUC_{0\sim168h}$、０～１６８時間までの血清濃度－時間曲線下の面積；C_{max}、最大濃度；ｈＣＥＡ、がん胎児性抗原；ｎ、動物数；ＮＡ、該当せず；ＰＫ、薬物動態；ＱＷ、週に１回；ＳＥＭ、平均の標準誤差；ＴＧＩ、腫瘍増殖阻害。
注：ＴＧＩ率は次の式に従って計算した：％ＴＧＩ＝［１－（処置されたＴｔ－処置されたＴ０）／（ビヒクルＴｔ－ビヒクルＴ０）］ｘ１００％。この表は、１７日目のＴＧＩを示している。処置されたＴｔ＝ｔ日目の投与群の平均腫瘍体積；処置されたＴ０＝０日目の投与群の平均腫瘍体積；ビヒクルＴｔ＝ｔ日目のビヒクル群の平均腫瘍体積；及びビヒクルＴ０＝０日目のビヒクル群の平均腫瘍体積。

【０４１６】

実施例３８．抗ＰＤ－１抗体とＣＥＡｘＣＤ１３７との併用治療は、腫瘍退縮を増加させる

ＢＥ－１４６と抗マウスＰＤ－１抗体との組み合わせの抗腫瘍活性を、ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＣＴ２６／ｈＣＥＡ同系モデルにおいて調べた。ＣＴ２６／ｈＣＥＡ細胞を、メスのヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスに移植した。細胞接種後７日目に、マウスを腫瘍体積に従ってランダムに４つの群に分けた。ＢＥ－１４６（１．０ｍｇ／ｋｇ、週に１回）と抗マウスＰＤ－１抗体Ｃｈ１５ｍｔ（０．３ｍｇ／ｋｇ、週に１回）との併用治療を受けたマウスは、相乗的な腫瘍増殖阻害を示した。１４日目の腫瘍増殖阻害率は７０％であり、ＢＥ－１４６（－２４％）またはＣｈ１５ｍｔ（４１％）単独で治療した群よりも有意に高かった。ビヒクル対照または単剤治療と比較して、ＢＥ－１４６と抗ＰＤ－１との組み合わせは、抗腫瘍効果の有意な増加を誘発し、これを表４２にまとめると共に、図４８に示す。

【０４１７】

【表４２】

表４２：ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＣＴ２６／ｈＣＥＡ同系モデルにおけるＢＥ－１４６及びＣｈ１５ｍｔの抗腫瘍効果

治療	n	用量(mg/kg)	TGI (%) (14 日目)	平均腫瘍 体積(mm^3± SEM) (14 日目)	P 値対 BE-146+Ch15mt 群 (14 日目)
ビヒクル	10	NA	NA	1856.8 ± 273.6	NA
BE-146	10	1.0 QW	-24	2264.5 ± 213.4	0.0000
Ch15mt	10	0.3 QW	41	1173.0 ± 238.3	0.0648
BE-146 + Ch15mt	10	1.0 + 0.3 QW	70	692.1 ± 180.5	NA

略語：ｈＣＥＡ、ヒトがん胎児性抗原；ｎ、動物数；ＮＡ、該当せず；ＱＷ、週単位；ＳＥＭ、平均の標準誤差；ＴＧＩ、腫瘍増殖阻害。

【０４１８】

実施例３９．ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＢ１６－Ｆ１０／ｈＣＥＡモデルにおけるＢＥ－１４６と抗ＰＤ－１抗体との組合せの有効性

ＢＥ－１４６と抗マウスＰＤ－１抗体との組み合わせの抗腫瘍活性を、ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＢ１６－Ｆ１０／ｈＣＥＡ同系モデルにおいて調べた。Ｂ１６－Ｆ１０は、マウス黒色腫細胞株である。ＢＥ－１４６（３．０ｍｇ／ｋｇ、週に１回）と抗マウスＰＤ－１抗体Ｃｈ１５ｍｔ（３．０ｍｇ／ｋｇ、週に１回）との併用治療を受けたマウスは、有意な腫瘍増殖阻害（ＴＧＩ）を有した。図４９及び表４３に示すように、組み合わせ抗体治療の１２日目には、ＴＧＩは７８％であった。さらに、ＢＥ－１４６とＣｈ１５ｍｔとの併用治療は、動物の生存率を有意に改善した。試験エンドポイントでの生存率は７５％であり、ＢＥ－１４６（２５％）またはＣｈ１５ｍｔ単独（２５％）の単剤療法群よりも高かった（図５０及び表４３）。試験全体を通して、どの処置群でも動物の体重に有意な影響はなかった。

【０４１９】

【表４３】

表４３：ヒト化ＣＤ１３７ノックインマウスのＢ１６－Ｆ１０／ｈＣＥＡ同系モデルにおけるＢＥ－１４６及びＣｈ１５ｍｔの抗腫瘍効果

治療	n	用量 (mg/kg)	TGI (%) (12 日目)	平均腫瘍体積 (mm^3± SEM) (12 日目)	P 値対組み合わせ群 (12 日目)	生存率 (%) (22 日目)	P 値対組み合わせ群 生存率(22 日目)
ビヒクル	12	NA	NA	1126.9 ± 161.3	NA	0	NA
BE-146	12	3.0, QW	62	495.4 ± 92.7	0.1302	25	0.02
Ch15mt	12	3.0, QW	32	795.2 ± 205.6	0.0181	25	0.02
BE-146 + Ch15mt	12	3.0 + 3.0 QW	78	328.6 ± 71.3	NA	75	NA

略語：ｎ、動物数；ＮＡ、該当せず；ＱＷ、週に１回；ＳＥＭ、平均の標準誤差；ＴＧＩ、腫瘍増殖阻害。
注：ＴＧＩ率は次の式に従って計算した：％ＴＧＩ＝［１－（処置されたＴｔ－処置されたＴ０）／（ビヒクルＴｔ－ビヒクルＴ０）］ｘ１００％。この表は、１２日目のＴＧＩを示している。処置されたＴｔ＝ｔ日目の投与群の平均腫瘍体積；処置されたＴ０＝０日目の投与群の平均腫瘍体積；ビヒクルＴｔ＝ｔ日目のビヒクル群の平均腫瘍体積；及びビヒクルＴ０＝０日目のビヒクル群の平均腫瘍体積。

【０４２０】

実施例４０．ＢＥ－１４６投与量

２１日間の各サイクルの１日目、８日目及び１５日目に、ＢＥ－１４６単独またはチスレリズマブ（ＢＧＢ－Ａ３１７）との組み合わせの一定用量を静脈内注射によって投与する。単剤療法として試験されるＢＥ－１４６の計画用量レベルは、５ｍｇ、１５ｍｇ、５０ｍｇ、１５０ｍｇ、３００ｍｇ、６００ｍｇ及び１２００ｍｇである。チスレリズマブ２００ｍｇと組み合わせて試験されるＢＥ－１４６の用量レベルは、表４４に示すように、５０ｍｇ、１５０ｍｇ、３００ｍｇ、６００ｍｇ及び１２００ｍｇである。チスレリズマブの用量レベル及びスケジュール（すなわち、２１日間の各サイクルの１日目に２００ｍｇを静脈内注入によって投与）は、固定されたままとなる。組み合わせて投与する場合、チスレリズマブを最初に投与し、続いてＢＥ－１４６を投与する。しかしながら、単剤療法コホート及び／またはＢＥ－１４６とチスレリズマブとの併用投与を受けるコホートにおけるＢＥ－１４６の低用量レベル、中間用量レベル、及び／または高用量レベル及び／または代替投与間隔は、医師が決定することができる。

【０４２１】

【表４４】

表４４：ＢＥ－１４６の投与量

BE-146 単剤療法	BE-146+チスレリズマブ
5 mg (QW)	NA
15 mg (QW)	NA
50 mg (QW)	50 mg (QW) + 200 mg チスレリズマブ(Q3W)
150 mg (QW)	150 mg (QW) + 200 mg チスレリズマブ(Q3W)
300 mg (QW)	300 mg (QW) + 200 mg チスレリズマブ(Q3W)
600 mg (QW)	600 mg (QW) + 200 mg チスレリズマブ(Q3W)
1200 mg (QW)	1200 mg (QW) + 200 mg チスレリズマブ(Q3W)
略語： ＮＡ、該当せず；ＱＷ、週単位；Ｑ３Ｗ、３週間に１回。	

【０４２２】

実施例４４．ＢＥ－１４６適応症

ＣＥＡの過剰発現は、結腸直腸癌（ＣＲＣ）、胃癌（ＧＣ）、肺癌、膵臓癌、肝細胞癌、乳癌、甲状腺癌など、多くの種類のがんで観察された（Ｃｈｅｖｉｎｓｋｙ ＡＨ．，Ｓｅｍｉｎ Ｓｕｒｇ Ｏｎｃｏｌ．１９９１；７（３）：１６２－６；Ｓｈｉｖｅｌｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｏｎｃｏｌ Ｈｅｍａｔｏｌ．１９８５；２（４）：３５５－９９）。高血清ＣＥＡは、ＧＣ及び肺癌患者の予後不良と関連している（Ｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ Ｃｏｌｏｐｒｏｃｔｏｌ．２０１９；３５（６）：２９４－３０５；Ｍｏｒｉｙａｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｓｕｒｇ Ｔｏｄａｙ．２０２１ Ｏｃｔ；５１（１０）：１６３８－４８；Ｇｒｕｎｎｅｔ ｅｔ ａｌ．，Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ．２０１２ Ｍａｙ；７６（２）：１３８－４３）。腫瘍の５年生存率は、転移性進行疾患を有する患者では依然として低く、ＣＲＣでは１４．７％、ＧＣでは５．５％、肺癌では６．３％である。

【０４２３】

ＣＥＡの過剰発現は、免疫機能不全に寄与する。ＣＥＡは様々な種類の免疫細胞の応答を調節することが報告されている。例えば、ＣＥＡは、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞媒介細胞毒性を減少させる共阻害分子として作用するＣＥＡＣＡＭ１と相互作用することができる（Ｓｔｅｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏ．２００５；１７４（１１）：６６９２－７０１）。Ｋｕｐｆｆｅｒ細胞は、ＣＥＡ活性化に際して、ＩＬ－１０、ＩＬ－６及びＴＮＦ－αなどのサイトカインを誘導することができる（Ｇａｎｇｏｐａｄｈｙａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｌｅｔｔｅｒｓ １９９７；１１８（１）：１－６）。また、ヒトＰＢＭＣ由来のＴ細胞の活性化がＣＥＡによって阻害され得ることも報告された（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ２０１５；１３６（１１）：２５７９－８７）。

【０４２４】

ＣＥＡ過剰発現に基づいて、ＢＥ－１４６による治療は、組織学的または細胞学的に確認された進行性、転移性、切除不能なＣＲＣ、ＧＣまたはＮＳＣＬＣを有する患者に投与されることになる。ＢＥ－１４６単独療法の約７つの漸増用量レベルのコホートと、２００ｍｇのチスレリズマブと組み合わせたＢＥ－１４６の５つの漸増用量レベルのコホートを順次評価して、単独療法としてのＢＥ－１４６及びチスレリズマブとの組み合わせの安全性、忍容性、ＰＫ、及び薬力学を評価し、進行性結腸直腸癌（ＣＲＣ）、胃癌（ＧＣ）、または非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の患者におけるＢＥ－１４６の有効性を決定する。

【０４２５】
実施例３５．インビボでのＣＥＡｘＣＤ１３７毒性
ＢＥ－１４６またはウレルマブ類似抗体（３０ｍｇ／ｋｇ）を、Ｃ５７ＢＬ／６バックグラウンドのヒト化ＣＤ１３７マウスに、週に１回、３回注射した。血液を２２日目に収集し、血液生化学試験により分析した。ビヒクル対照と比較して、高用量のウレルマブ類似体は、肝臓毒性を示すアラニントランスアミナーゼ（ＡＬＴ）及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（ＡＳＴ）濃度の有意な増加を誘導したが、ＢＥ－１４６では誘導されなかった。さらに、ウレルマブ類似体治療群の肝臓組織では炎症細胞の増加の顕微鏡的変化は観察されたが、ＢＥ－１４６治療群では有意な顕微鏡的変化は観察されなかった（図５１）。したがって、ＢＥ－１４６は、チェックポイント阻害剤やＴ細胞エンゲージャーなど、肝毒性のないがん免疫療法の有望な併用パートナーである。
【０４２６】
ＢＥ－１４６の安全性プロファイルは、正常なヒト組織を用いた組織交差反応性アッセイ及び新鮮なヒトＰＢＭＣを用いたサイトカイン放出アッセイを使用するカニクイザルにおける４週間反復投与毒性試験で特徴付けられた。試験は、優良試験所基準の規制／原則に従って行った。
【０４２７】
ＢＥ－１４６を５、２０、または１００ｍｇ／ｋｇの用量で週に１回、４週間（合計５回）静脈内注入して治療したカニクイザルの反復投与試験では、死亡率や有害作用は認められなかった。全身曝露は、初回投与後に用量に比例して増加した。明らかな性差または薬剤蓄積は認められなかった。無毒性量（ＮＯＡＥＬ）は１００ｍｇ／ｋｇであった。ＮＯＡＥＬは、１００ｍｇ／ｋｇであると考えられ、定常状態のＣｍａｘ及びＡＵＣ０－１６８ｈは、男性ではそれぞれ２２２０μｇ／ｍＬ及び５８，６００ｈ・μｇ／ｍＬであり、女性ではそれぞれ２１１０μｇ／ｍＬ及び６６，８００ｈ・μｇ／ｍＬであった。さらに、ＰＢＭＣベースのサイトカイン放出アッセイでは、ヒトＩｇＧと比較して、固定化ＢＥ－１４６は、試験したドナーサンプルのいずれにおいてもサイトカイン／ケモカインの有意な放出を誘発せず、サイトカイン放出症候群を誘発するリスクが最小限であることを示した。
【０４２８】
参考文献
Ａｂｄｕｌ－Ｗａｈｉｄ，Ａ．，Ｍ．Ｃｙｄｚｉｋ，Ｎ．Ｗ．Ｆｉｓｃｈｅｒ，Ａ．Ｐｒｏｄｅｕｓ，Ｊ．Ｅ．Ｓｈｉｖｅｌｙ，Ａ．Ｍａｒｔｅｌ，Ｓ．Ａｌｍｉｎａｗｉ，Ｚ．Ｇｈｏｒａｂ，Ｎ．Ｌ．Ｂｅｒｉｎｓｔｅｉｎ ＆ Ｊ．Ｇａｒｉｅｐｙ（２０１８）Ｓｅｒｕｍ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｃａｒｃｉｎｏｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ（ＣＥＡ）ａｃｔｉｖａｔｅｓ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ ｔｏ ｉｎｄｕｃｅ ａ ｌｏｃａｌ ｒｅ－ｍｏｄｅｌｉｎｇ ｏｆ ｔｈｅ ｅｘｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｍａｔｒｉｘ ｔｈａｔ ｆａｖｏｒｓ ｔｈｅ ｅｎｇｒａｆｔｍｅｎｔ ｏｆ ＣＥＡ－ｅｘｐｒｅｓｓｉｎｇ ｔｕｍｏｒ ｃｅｌｌｓ．Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ，１４３，１９６３－１９７７．
Ａｂｄｕｌ－Ｗａｈｉｄ，Ａ．，Ｅ．Ｈ．Ｂ．Ｈｕａｎｇ，Ｍ．Ｃｙｄｚｉｋ，Ｅ．Ｂｏｌｅｗｓｋａ－Ｐｅｄｙｃｚａｋ ＆ Ｊ．Ｇａｒｉｅｐｙ（２０１４）Ｔｈｅ ｃａｒｃｉｎｏｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ａｎｔｉｇｅｎ ＩｇＶ－ｌｉｋｅ Ｎ ｄｏｍａｉｎ ｐｌａｙｓ ａ ｃｒｉｔｉｃａｌ ｒｏｌｅ ｉｎ ｔｈｅ ｉｍｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｅｔａｓｔａｔｉｃ ｔｕｍｏｒ ｃｅｌｌｓ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，８，３３７－３５０．
Ａｒｎｏｎ，Ｔ．Ｉ．，Ｈ．Ａｃｈｄｏｕｔ，Ｏ．Ｌｅｖｉ，Ｇ．Ｍａｒｋｅｌ，Ｎ．Ｓａｌｅｈ，Ｇ．Ｋａｔｚ，Ｒ．Ｇａｚｉｔ，Ｔ．Ｇｏｎｅｎ－Ｇｒｏｓｓ，Ｊ．Ｈａｎｎａ，Ｅ．Ｎａｈａｒｉ，Ａ．Ｐｏｒｇａｄｏｒ，Ａ．Ｈｏｎｉｇｍａｎ，Ｂ．Ｐｌａｃｈｔｅｒ，Ｄ．Ｍｅｖｏｒａｃｈ，Ｄ．Ｇ．Ｗｏｌｆ ＆ Ｏ．Ｍａｎｄｅｌｂｏｉｍ（２００５）Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ＣＤ１３７ ａｃｔｉｖａｔｉｎｇ ｒ

eceptor by pp65 of human cytomegalovirus. Nat Immunol, 6, 515-23.
Augugliaro, R., S. Parolini, R. Castriconi, E. Marcenaro, C. Cantoni, M. Nanni, L. Moretta, A. Moretta & C. Bottino (2003) Selective cross-talk among natural cytotoxicity receptors in human natural killer cells. Eur J Immunol, 33, 1235-41.
Bacac, M., C. Klein & P. Umana (2016) CEA TCB: A novel head-to-tail 2:1 T cell bispecific antibody for treatment of CEA-positive solid tumors. Oncoimmunology, 5, e1203498.
Barrow, A. D., C. J. Martin & M. Colonna (2019) The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. Front Immunol, 10, 909.
Beauchemin, N. 2017. CEA Gene Family. In Encyclopedia of Cancer, ed. M. Schwab, 870-874. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
Beck, A., T. Wurch, C. Bailly & N. Corvaia (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. Nat Rev Immunol, 10, 345-52.
Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens & T. P. Salazar-Mather (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. Annu Rev Immunol, 17, 189-220.
Bozzano, F., A. Picciotto, P. Costa, F. Marras, V. Fazio, I. Hirsch, D. Olive, L. Moretta & A. De Maria (2011) Activating NK cell receptor expression/function (CD137, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. Eur J Immunol, 41, 2905-14.
Brinkmann, U. & R. E. Kontermann (2017) The making of bispecific antibodies. MAbs, 9, 182-212.
Brocks, B., P. Garin-Chesa, E. Behrle, J. E. Park, W. J. Rettig, K. Pfizenmaier & D. Moosmayer (2001) Species-crossreactive scFv against the tumor stroma marker "fibroblast activation protein" selected by phage display from an immunized FAP-/- knock-out mouse. Molecular medicine (Cambridge, Mass.), 7, 461-469.
Castriconi, R., C. Cantoni, M. Della Chiesa, M. Vitale, E. Marcenaro, R. Conte, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta & A. Moretta (2003) Transforming growth factor beta 1 inhibits e

xpression of CD137 and NKG2D receptors：consequences for the NK−mediated killing of dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 4120−5.
Chau, I., M. J. Allen, D. Cunningham, A. R. Norman, G. Brown, H. E. Ford, N. Tebbutt, D. Tait, M. Hill, P. J. Ross & J. Oates (2004) The value of routine serum carcino−embryonic antigen measurement and computed tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. J Clin Oncol, 22, 1420−9.
Correia, M. P., A. Stojanovic, K. Bauer, D. Juraeva, L. O. Tykocinski, H. M. Lorenz, B. Brors & A. Cerwenka (2018) Distinct human circulating CD137 (+) FcepsilonRIgamma (+) CD8 (+) T cell population exhibiting high natural killer−like antitumor potential. Proc Natl Acad Sci USA, 115, E5980−E5989.
Dahlen, E., N. Veitonmaki & P. Norlen (2018) Bispecific antibodies in cancer immunotherapy. Ther Adv Vaccines Immunother, 6, 3−17.
Delahaye, N. F., S. Rusakiewicz, I. Martins, C. Menard, S. Roux, L. Lyonnet, P. Paul, M. Sarabi, N. Chaput, M. Semeraro, V. Minard−Colin, V. Poirier−Colame, K. Chaba, C. Flament, V. Baud, H. Authier, S. Kerdine−Romer, M. Pallardy, I. Cremer, L. Peaudecerf, B. Rocha, D. Valteau−Couanet, J. C. Gutierrez, J. A. Nunes, F. Commo, S. Bonvalot, N. Ibrahim, P. Terrier, P. Opolon, C. Bottino, A. Moretta, J. Tavernier, P. Rihet, J. M. Coindre, J. Y. Blay, N. Isambert, J. F. Emile, E. Vivier, A. Lecesne, G. Kroemer & L. Zitvogel (2011) Alternatively spliced CD137 isoforms affect the prognosis of gastrointestinal stromal tumors. Nat Med, 17, 700−7.
Dotan, E., A. Starodub, J. Berlin, C. H. Lieu, M. J. Guarino, J. Marshall, J. R. Hecht, S. J. Cohen, W. A. Messersmith, P. P. Maliakal, W. A. Wegener, R. M. Sharkey & D. M. Goldenberg (2015) A new anti−CEA−SN−38 antibody−drug conjugate (ADC), IMMU−130, is active in controlling metastatic colorectal cancer (mCRC) in patients (pts) refractory or relapsing after irinotecan−containing chemotherapies：Initial results of a phase I／II study. Journal of Clinical Oncology, 33, 2505−2505.
Durbin, H., S. Young, L. M. Stewart, F. Wrba, A. J. Rowan, D. Snary & W. F. Bodmer (1994) An epitope on carcinoembryonic antigen defined

by the clinically relevant antibody PR1A 3. Proc Natl Acad Sci USA, 91, 4313-7.
Engler, F. A., J. R. Polli, T. Li, B. An, M. Ottender, J. Qu & J. P. Balthasar (2018) "Catch-and-Release" Anti-Carcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody Leads to Greater Plasma and Tumor Exposure in a Mouse Model of Colorectal Cancer. J Pharmacol Exp Ther, 366, 205-219.
Fischer, E., K. Chaitanya, T. Wuest, A. Wadle, A. M. Scott, M. van den Broek, R. Schibli, S. Bauer & C. Renner (2012) Radioimmunotherapy of fibroblast activation protein positive tumors by rapidly internalizing antibodies. Clin Cancer Res, 18, 6208-18.
Flamini, E., L. Mercatali, O. Nanni, D. Calistri, R. Nunziatini, W. Zoli, P. Rosetti, N. Gardini, A. Lattuneddu, G. M. Verdecchia & D. Amadori (2006) Free DNA and carcinoembryonic antigen serum levels: an important combination for diagnosis of colorectal cancer. Clin Cancer Res, 12, 6985-8.
Gangopadhyay, A., D. A. Lazure & P. Thomas (1997) Carcinoembryonic antigen induces signal transduction in Kupffer cells. Cancer Letters, 118, 1-6.
Gauthier, L., A. Morel, N. Anceriz, B. Rossi, A. Blanchard-Alvarez, G. Grondin, S. Trichard, C. Cesari, M. Sapet, F. Bosco, H. Rispaud-Blanc, F. Guillot, S. Cornen, A. Roussel, B. Amigues, G. Habif, F. Caraguel, S. Arrufat, R. Remark, F. Romagne, Y. Morel, E. Narni-Mancinelli & E. Vivier (2019) Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity. Cell, 177, 1701-1713 e16.
Gold, P. & S. O. Freedman (1965) Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. J Exp Med, 121, 439-62.
Goldenberg, D. M. (1992) Cancer imaging with CEA antibodies: historical and current perspectives. Int J Biol Markers, 7, 183-8.
Hammarstrom, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. Seminars in Cancer Biology, 9, 67-81.
Hezareh, M., A. J. Hessell, R. C. Jensen, J. G. va

n de Winkel & P.W.Parren(2001)Effector function activities of a panel of mutants of a broadly neutralizing antibody against human immunodeficiency virus type 1.J Virol,75,12161-8.
Hohenberger,P.,P.M.Schlag,T.Gerneth & C.Herfarth(1994)Pre- and postoperative carcinoembryonic antigen determinations in hepatic resection for colorectal metastases.Predictive value and implications for adjuvant treatment based on multivariate analysis.Ann Surg,219,135-43.
Hollyoake,M.,R.D.Campbell & B.Aguado(2005)CD137(NCR3)is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains,but an expressed gene in Mus caroli.Mol Biol Evol,22,1661-72.
Hsieh,C.L.,K.Nagasaki,O.M.Martinez & S.M.Krams(2006)CD137 is a functional activation receptor on a subset of rat natural killer cells.Eur J Immunol,36,2170-80.
Hudspeth,K.,M.Fogli,D.V.Correia,J.Mikulak,A.Roberto,S.Della Bella,B.Silva-Santos & D.Mavilio(2012)Engagement of CD137 on Vdelta1 T cells induces the production of CCL3,CCL4,and CCL5 and suppresses HIV-1 replication.Blood,119,4013-6.
Hudspeth,K.,B.Silva-Santos & D.Mavilio(2013)Natural cytotoxicity receptors:broader expression patterns and functions in innate and adaptive immune cells.Front Immunol,4,69.
Hurwitz,E.,I.Stancovski,M.Sela & Y.Yarden(1995)Suppression and promotion of tumor growth by monoclonal antibodies to ErbB-2 differentially correlate with cellular uptake.Proc Natl Acad Sci USA,92,3353-7.
Igawa,T.,H.Tsunoda,Y.Kikuchi,M.Yoshida,M.Tanaka,A.Koga,Y.Sekimori,T.Orita,Y.Aso,K.Hattori & M.Tsuchiya(2010)VH/VL interface engineering to promote selective expression and inhibit conformational isomerization of thrombopoietin receptor agonist single-chain diabody.Protein Eng Des Sel,23,667-77.
Joyce,M.G.,P.Tran,M.A.Zhuravleva,J.Jaw,M.Colonna & P.D.Sun(2011)Crystal structure of human natural cytotoxicity receptor CD137 and identification of its ligand binding site.Proc Natl Acad Sci USA,108,6

223-8.
Koch, J., A. Steinle, C. Watzl & O. Mandelboim (2013) Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. Trends Immunol, 34, 182-91.
Kuespert, K., S. Pils & C. R. Hauck (2006) CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. Current Opinion in Cell Biology, 18, 565-571.
Kruse, P. H., J. Matta, S. Ugolini & E. Vivier (2014) Natural cytotoxicity receptors and their ligands. Immunol Cell Biol, 92, 221-9.
Lanier, L. L. (2015) NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. Cancer Immunol Res, 3, 575-82.
Lee, J. H. & S.-W. Lee (2017) The Roles of Carcinoembryonic Antigen in Liver Metastasis and Therapeutic Approaches. Gastroenterology Research and Practice, 2017, 11.
Lee, K.-A., E.-A. Bae, Y. C. Song, E.-K. Kim, Y.-S. Lee, T.-G. Kim & C.-Y. Kang (2015) A multimeric carcinoembryonic antigen signal inhibits the activation of human T cells by a SHP-independent mechanism: A potential mechanism for tumor-mediated suppression of T-cell immunity. International Journal of Cancer, 136, 2579-2587.
Lefranc, M. P., V. Giudicelli, C. Ginestoux, J. Bodmer, W. Muller, R. Bontrop, M. Lemaitre, A. Malik, V. Barbie & D. Chaume (1999) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res, 27, 209-12.
Liersch, T., J. Meller, M. Bittrich, B. Kulle, H. Becker & D. M. Goldenberg (2007) Update of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with (131) I-labetuzumab after salvage resection of colorectal liver metastases: comparison of outcome to a contemporaneous control group. Ann Surg Oncol, 14, 2577-90.
Li, Y., Q. Wang & R. A. Mariuzza (2011) Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor CD137 bound to its tumor cell ligand B7-H6. J Exp Med, 208, 703-14.
Liu, L., W. Zeng, M. A. Wortinger, S. B. Yan, P. Cornwell, V. L. Peek, J. R. Stephens, J. W. Tetreault, J. Xia, J. R. Manro, K. M. Credille, D. W. Ballard, P. Brown-Augsburger, V. Wacheck, C. K. Chow, L. Huang, Y. Wang, I. Denning, J. Davies, Y. Tang, P. Vaillancourt & J. Lu (2014) LY2875358,

a neutralizing and internalizing anti-MET bivalent antibody, inhibits HGF-dependent and HGF-independent MET activation and tumor growth. Clin Cancer Res, 20, 6059-70.
Matsuoka, Y., Y. Matsuo, K. Sugano, H. Ohkura, M. Kuroki & M. Kuroki (1990) Characterization of Carcinoembryonic Antigen-related Antigens in Normal Adult Feces. Japanese Journal of Cancer Research, 81, 514-519.
Mechetner, E. (2007) Development and characterization of mouse hybridomas. Methods Mol Biol, 378, 1-13.
Moertel, C. G., T. R. Fleming, J. S. Macdonald, D. G. Haller, J. A. Laurie & C. Tangen (1993) An evaluation of the carcinoembryonic antigen (CEA) test for monitoring patients with resected colon cancer. Jama, 270, 943-7.
Muller, D. & R. E. Kontermann (2010) Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. BioDrugs, 24, 89-98.
Nap, M., M. L. Hammarstrom, O. Bormer, S. Hammarstrom, C. Wagener, S. Handt, M. Schreyer, J. P. Mach, F. Buchegger, S. von Kleist & et al., (1992) Specificity and affinity of monoclonal antibodies against carcinoembryonic antigen. Cancer Res, 52, 2329-39.
Nap, M., K. Mollgard, P. Burtin & G. J. Fleuren (1988) Immunohistochemistry of carcino-embryonic antigen in the embryo, fetus and adult. Tumour Biol, 9, 145-53.
Oberst, M. D., S. Fuhrmann, K. Mulgrew, M. Amann, L. Cheng, P. Lutterbuese, L. Richman, S. Coats, P. A. Baeuerle & S. A. Hammond (2014) CEA/CD3 bispecific antibody MEDI-565/AMG 211 activation of T cells and subsequent killing of human tumors is independent of mutations commonly found in colorectal adenocarcinomas. MAbs, 6, 1571-84.
Pegram, H. J., D. M. Andrews, M. J. Smyth, P. K. Darcy & M. H. Kershaw (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. Immunol Cell Biol, 89, 216-24.
Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta & A. Moretta (1999) Identification and molecular characterization of CD137, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. J Exp Med, 190, 1505-16.

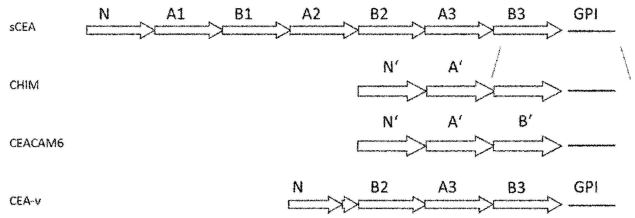
Peng, L., M. D. Oberst, J. Huang, P. Brohawn, C. Morehouse, K. Lekstrom, P. A. Baeuerle, H. Wu, Y. Yao, S. R. Coats, W. Dall'Acqua, M. Damschroder & S. A. Hammond (2012) The CEA/CD3-bispecific antibody MEDI-565 (MT111) binds a nonlinear epitope in the full-length but not a short splice variant of CEA. PloS one, 7, e36412-e36412.
Pesce, S., G. Tabellini, C. Cantoni, O. Patrizi, D. Coltrini, F. Rampinelli, J. Matta, E. Vivier, A. Moretta, S. Parolini & E. Marcenaro (2015) B7-H6-mediated downregulation of CD137 in NK cells contributes to ovarian carcinoma immune escape. Oncoimmunology, 4, e1001224.
Pogge von Strandmann, E., V. R. Simhadri, B. von Tresckow, S. Sasse, K. S. Reiners, H. P. Hansen, A. Rothe, B. Boll, V. L. Simhadri, P. Borchmann, P. J. McKinnon, M. Hallek & A. Engert (2007) Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the CD137 receptor on natural killer cells. Immunity, 27, 965-74.
Poul, M. A., B. Becerril, U. B. Nielsen, P. Morisson & J. D. Marks (2000) Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. J Mol Biol, 301, 1149-61.
Primrose, J. N., R. Perera, A. Gray, P. Rose, A. Fuller, A. Corkhill, S. George & D. Mant (2014) Effect of 3 to 5 years of scheduled CEA and CT follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: the FACS randomized clinical trial. Jama, 311, 263-70.
Richman, P. I. & W. F. Bodmer (1987) Monoclonal antibodies to human colorectal epitheliu m: markers for differentiation and tumour characterization. Int J Cancer, 39, 317-28.
Ridgway, J. B., L. G. Presta & P. Carter (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng, 9, 617-21.
Saito, G., S. Sadahiro, K. Okada, A. Tanaka, T. Suzuki & A. Kamijo (2016) Relation between Carcinoembryonic Antigen Levels in Colon Cancer Tissue and Serum Carcinoembryonic Antigen Levels at Initial Surgery and Recurrence. Oncology, 91, 85-9.
Sakurai, Y., S. Hirohashi, T. Ohishi, Y. Shimosato, S. Kodaira & O. Abe (1989) Conformationa

l epitopes specific to carcinoembryonic antigen defined by monoclonal antibodies raised against colon cancer xenografts. J Surg Oncol, 42, 39-46.
Sheahan, K., M. J. O'Brien, B. Burke, P. A. Dervan, J. C. O'Keane, L. S. Gottlieb & N. Zamcheck (1990) Differential reactivities of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related monoclonal and polyclonal antibodies in common epithelial malignancies. Am J Clin Pathol, 94, 157-64.
Shinmi, D., R. Nakano, K. Mitamura, M. Suzuki-Imaizumi, J. Iwano, Y. Isoda, J. Enokizono, Y. Shiraishi, E. Arakawa, K. Tomizuka & K. Masuda (2017) Novel anticarcinoembryonic antigen antibody-drug conjugate has antitumor activity in the existence of soluble antigen. Cancer Med, 6, 798-808.
Silacci, M., S. Brack, G. Schirru, J. Marlind, A. Ettorre, A. Merlo, F. Viti & D. Neri (2005) Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library. Proteomics, 5, 2340-50.
Stern, N., G. Markel, T. I. Arnon, R. Gruda, H. Wong, S. D. Gray-Owen & O. Mandelboim (2005) Carcinoembryonic Antigen (CEA) Inhibits NK Killing via Interaction with CEA-Related Cell Adhesion Molecule 1. The Journal of Immunology, 174, 6692-6701.
Stewart, L. M., S. Young, G. Watson, S. J. Mather, P. A. Bates, H. A. Band, R. W. Wilkinson, E. L. Ross & D. Snary (1999) Humanisation and characterisation of PR1A3, a monoclonal antibody specific for cell-bound carcinoembryonic antigen. Cancer Immunol Immunother, 47, 299-306.
Takahashi, T., S. Minami, Y. Tsuchiya, K. Tajima, N. Sakai, K. Suga, S. I. Hisanaga, N. Ohbayashi, M. Fukuda & H. Kawahara (2019) Cytoplasmic control of Rab family small GTPases through BAG6. EMBO Rep, 20.
Thompson, J. A., F. Grunert & W. Zimmermann (1991) Carcinoembryonic antigen gene family: Molecular biology and clinical perspectives. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 5, 344-366.
Von Kreudenstein, T. S., E. Escobar-Carbrera, P. I. Lario, I. D'Angelo, K. Brault, J. Kelly, Y. Durocher, J. Baardsnes, R. J. Woods, M. H. Xie, P. A. Girod, M. D. Suits, M. J. Boulanger, D. K. Po

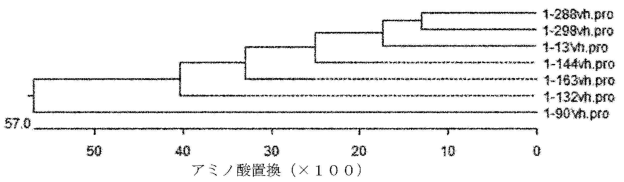
on, G. Y. Ng & S. B. Dixit (2013) Improving biophysical properties of a bispecific antibody scaffold to aid developability: quality by molecular design. MAbs, 5, 646-54.
Wong, J. Y., D. Z. Chu, L. E. Williams, D. M. Yamauchi, D. N. Ikle, C. S. Kwok, A. Liu, S. Wilczynski, D. Colcher, P. J. Yazaki, J. E. Shively, A. M. Wu & A. A. Raubitschek (2004) Pilot trial evaluating an 123I-labeled 80-kilodalton engineered anticarcinoembryonic antigen antibody fragment (cT84.66 minibody) in patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res, 10, 5014-21.
Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier & J. H. Phillips (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. Science, 285, 730-2.
Wu, T. T. & E. A. Kabat (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J Exp Med, 132, 211-50.
Zhang, T., B. A. Lemoi & C. L. Sentman (2005) Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. Blood, 106, 1544-1551.
Zhang, T., X. Song, L. Xu, J. Ma, Y. Zhang, W. Gong, Y. Zhang, X. Zhou, Z. Wang, Y. Wang, Y. Shi, H. Bai, N. Liu, X. Yang, X. Cui, Y. Cao, Q. Liu, J. Song, Y. Li, Z. Tang, M. Guo, L. Wang & K. Li (2018) The binding of an anti-PD-1 antibody to FcgammaRIota has a profound impact on its biological functions. Cancer Immunol Immunother, 67, 1079-1090.
Zhang, T., M. R. Wu & C. L. Sentman (2012) An CD137-based chimeric antigen receptor promotes T cell effector functions and antitumor efficacy in vivo. J Immunol, 189, 2290-9.
Zhao, L., L. Qu, J. Zhou, Z. Sun, H. Zou, Y. Y. Chen, J. D. Marks & Y. Zhou (2014) High throughput identification of monoclonal antibodies to membrane bound and secreted proteins using yeast and phage display. PLoS One, 9, e111339.

【図面】

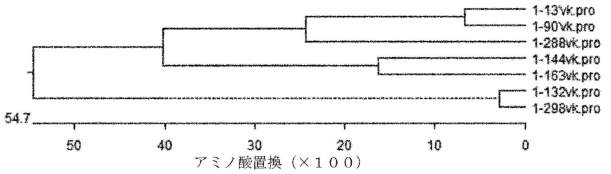
【図１】



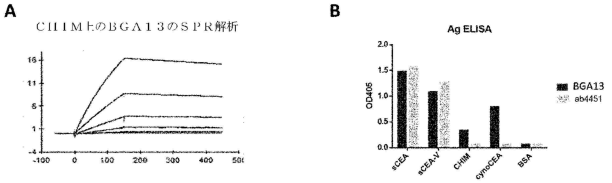
【図２Ａ】



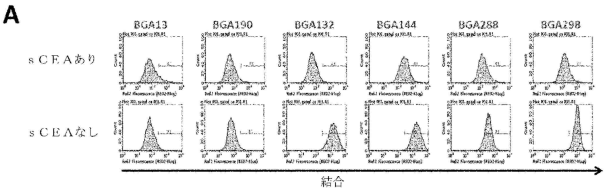
【図２Ｂ】



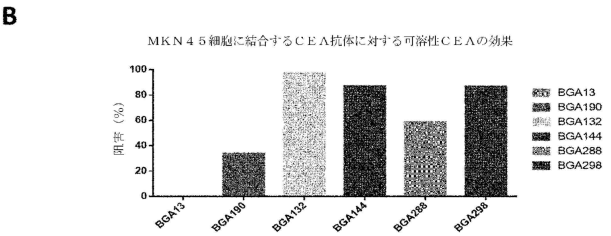
【図３】



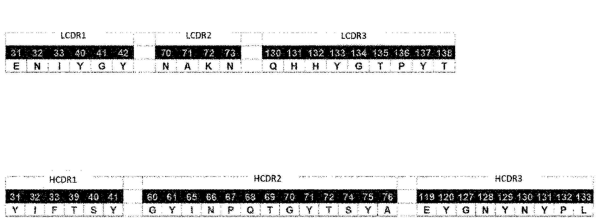
【図４Ａ】



【図４Ｂ】



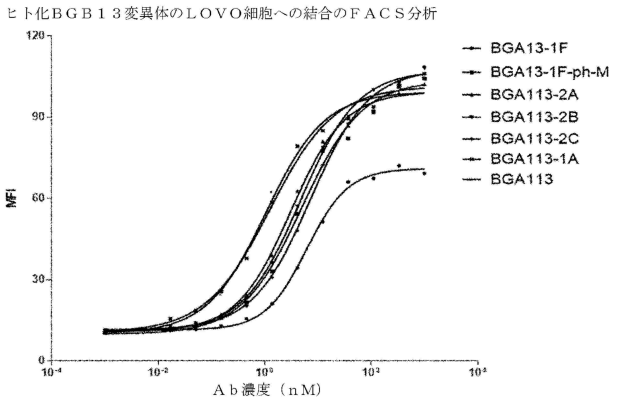
【図５】



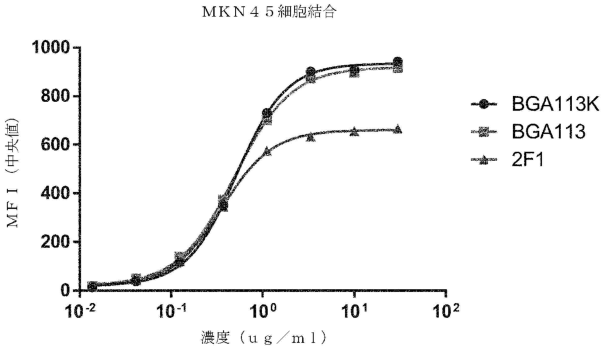
【図６】



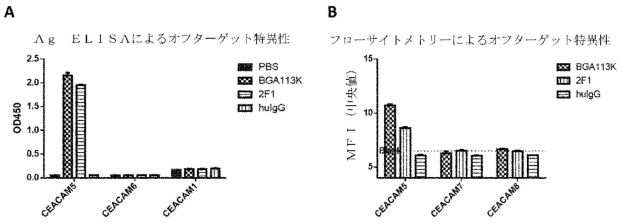
【図７】



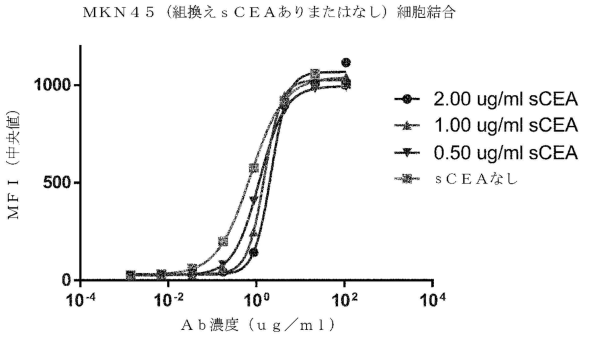
【図８】



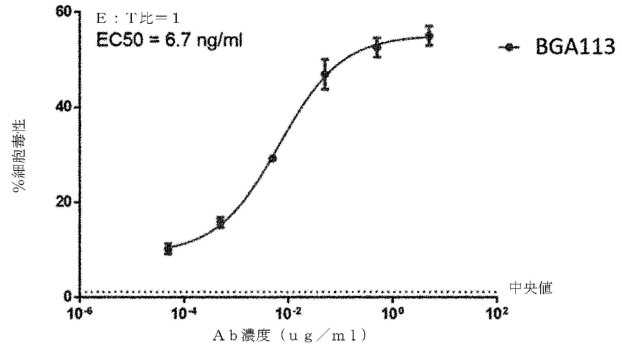
【図９】



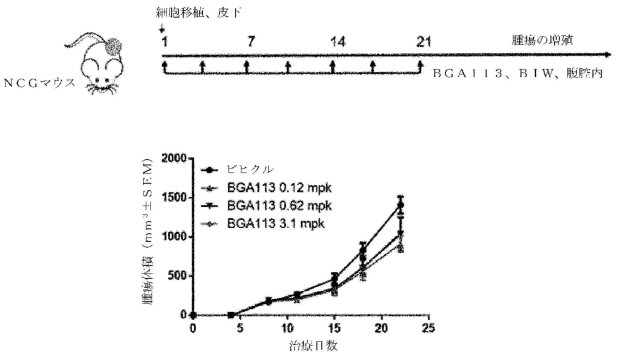
【図１０】



【図１１】



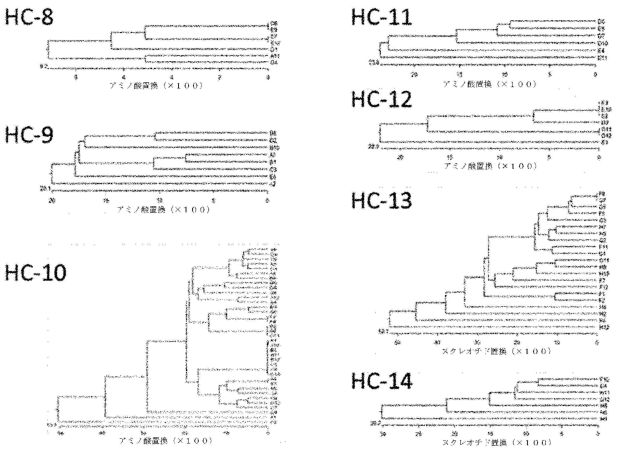
【図１２】



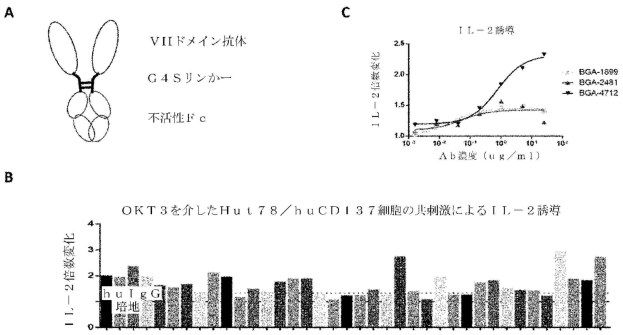
【図１３Ａ】

ライブラリー	陽性クローン
HC-8	7
HC-9	8
HC-10	37
HC-11	6
HC-12	7
HC-13	21
HC-14	7
合計	93

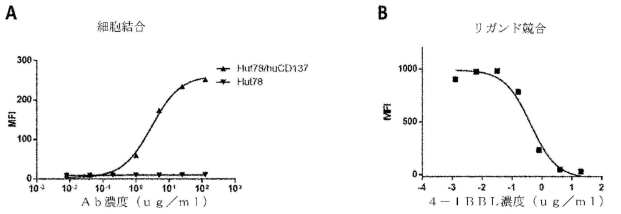
【図１３Ｂ】



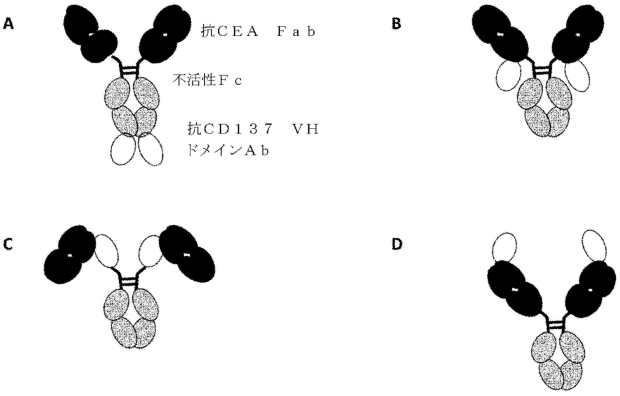
【図１４】



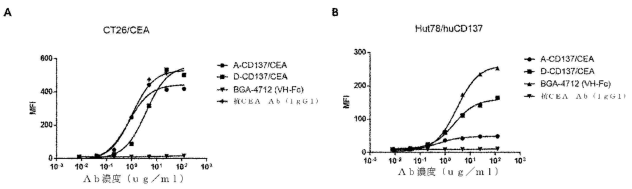
【図１５】



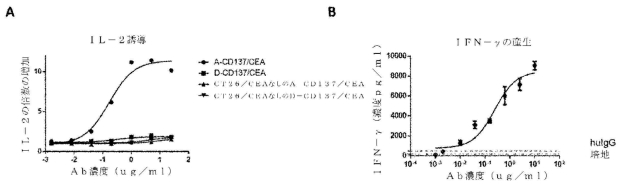
【図１６】



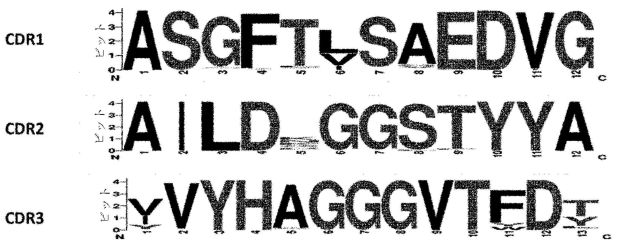
【図１７】



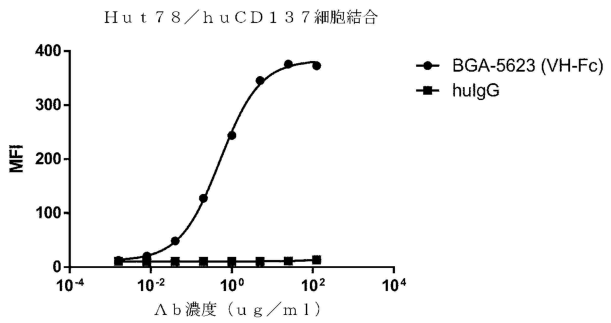
【図１８】



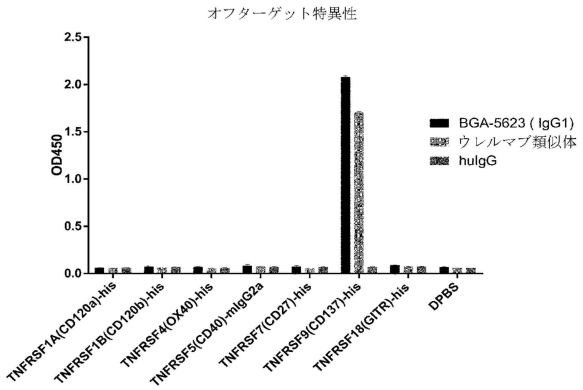
【図１９】



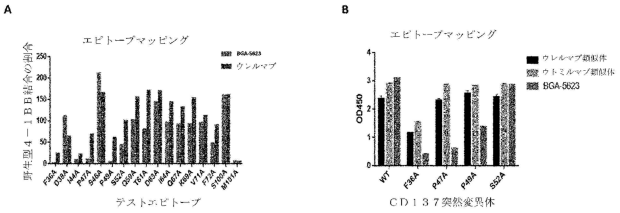
【図２０】



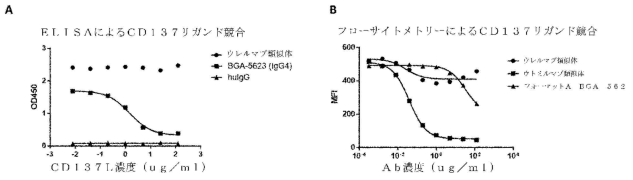
【図２１】



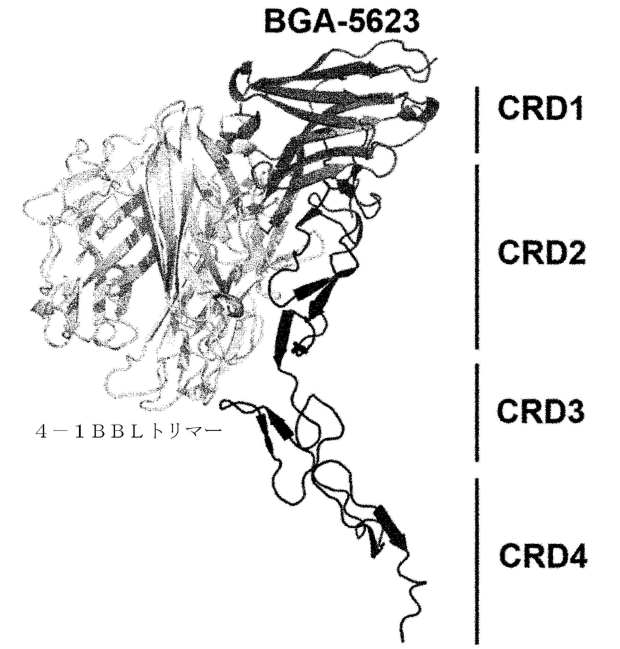
【図２２】



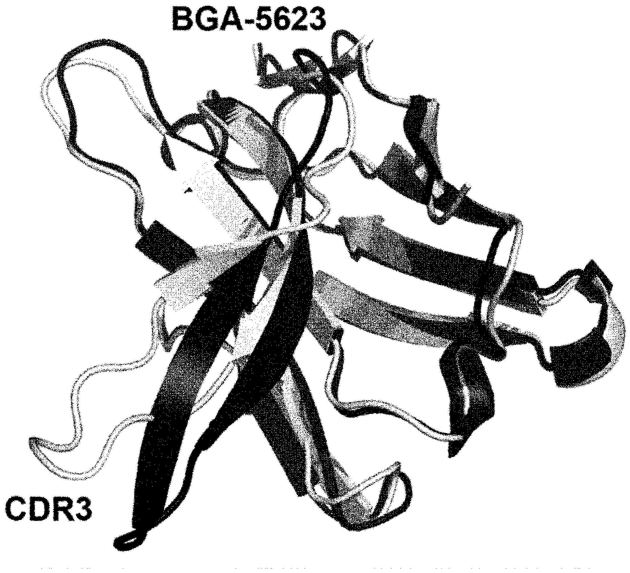
【図２３】



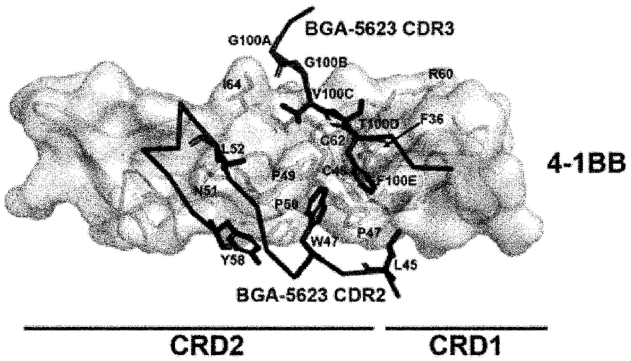
【図２４】



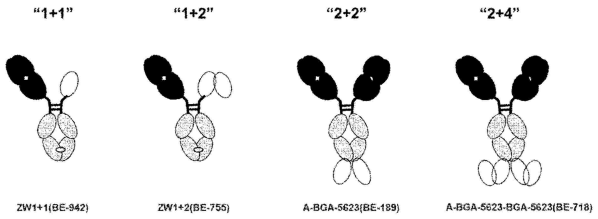
【図２５】



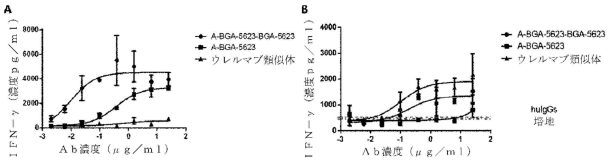
【図２６】



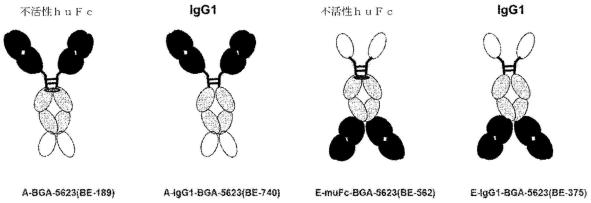
【図２７】



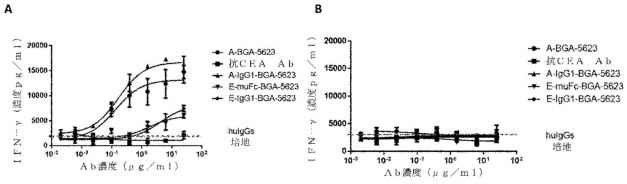
【図２８】



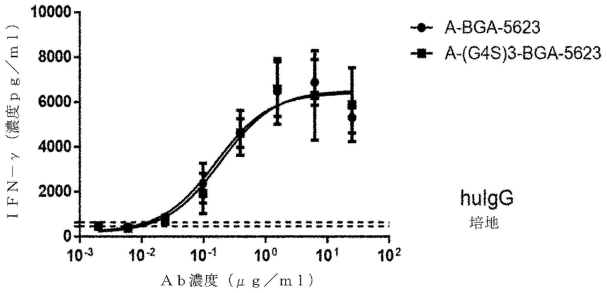
【図２９】



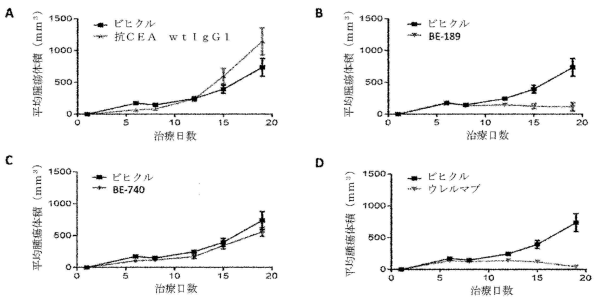
【図３０】



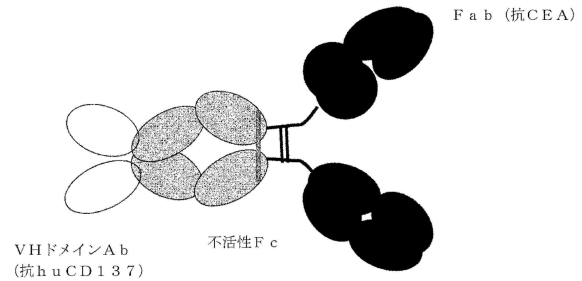
【図３１】



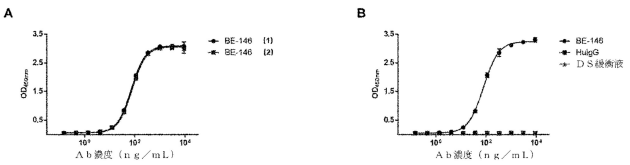
【図３２】



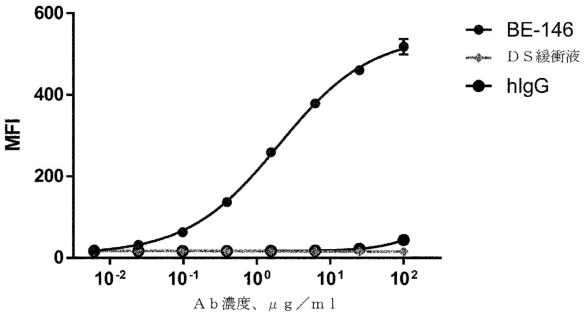
【図３３】



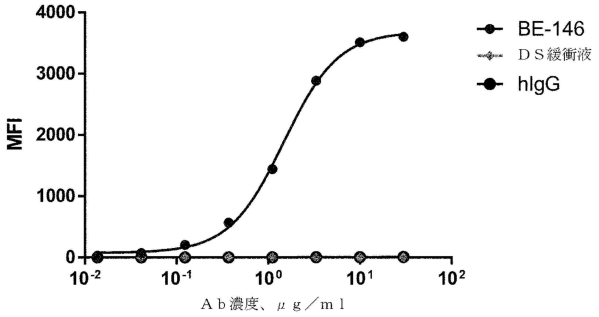
【図３４】



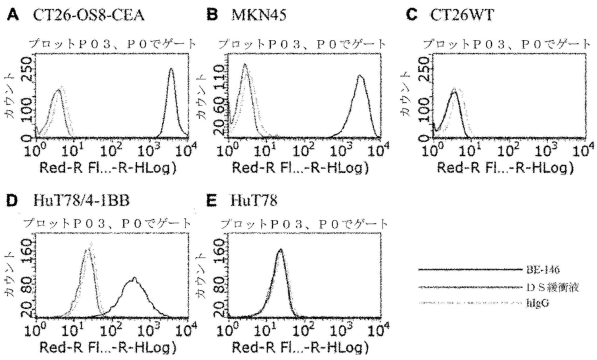
【図３５】



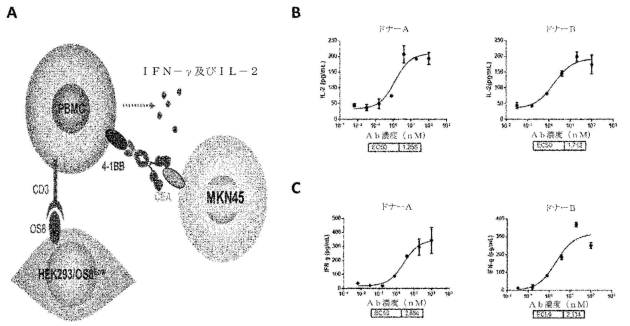
【図３６】



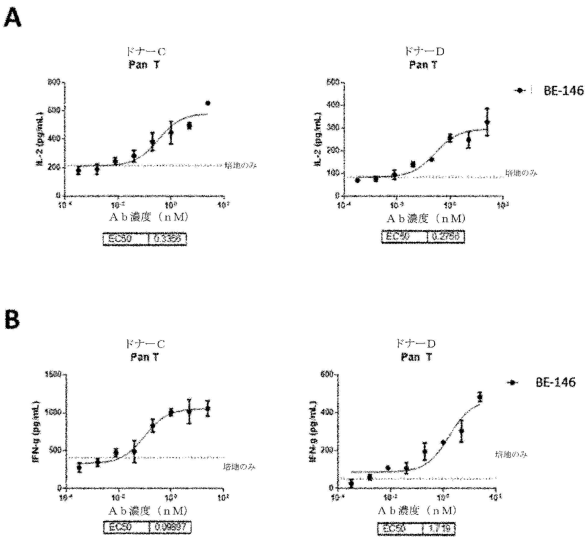
【図３７】



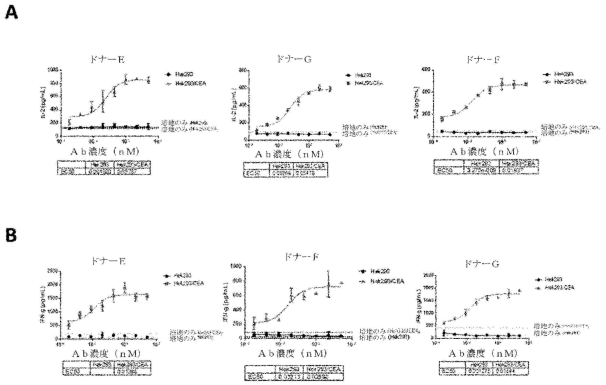
【図３８】



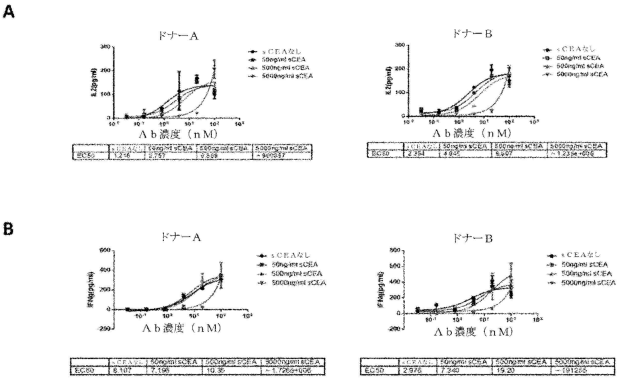
【図３９】



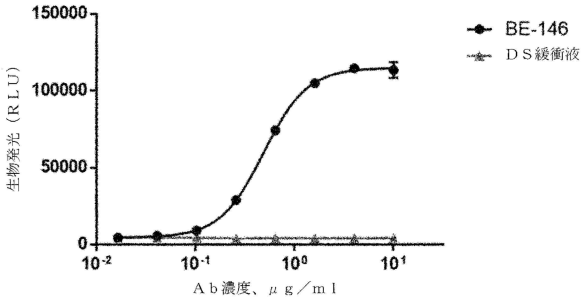
【図４０】



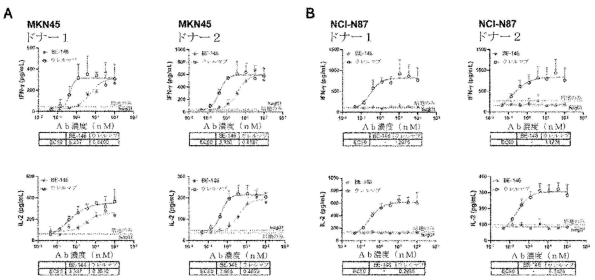
【図４１】



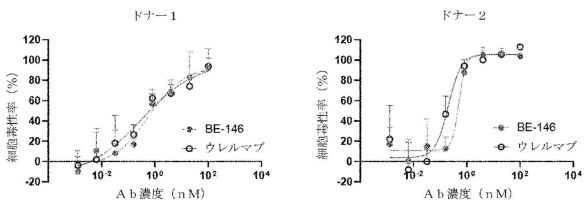
【図４２】



【図４３】



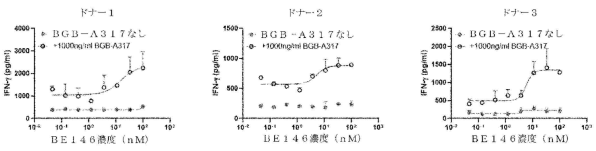
【図４４】



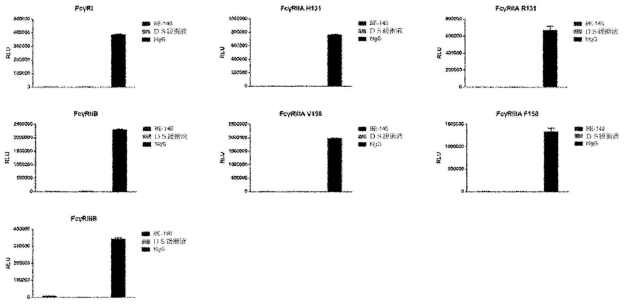
	BE-146	ウレルマブ
EC50	0.5812	0.3145

	BE-146	ウレルマブ
EC50	0.5092	0.2016

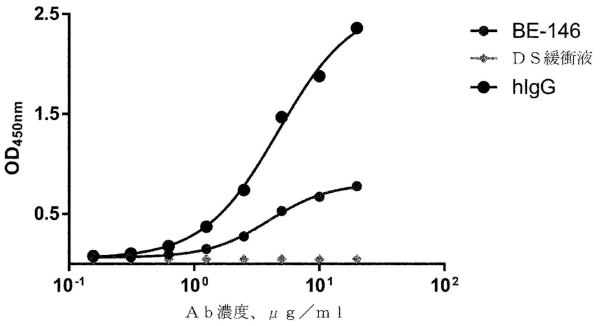
【図４５】



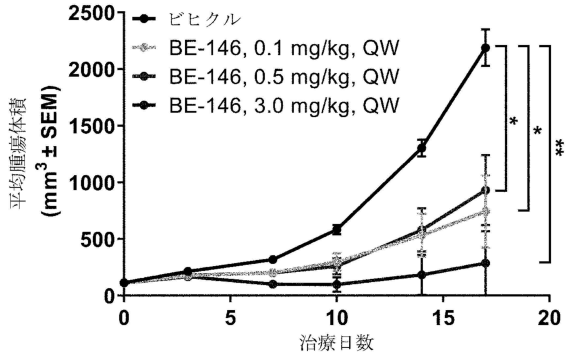
【図４６Ａ】



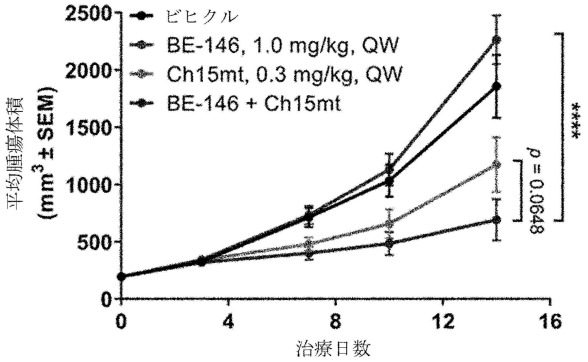
【図４６Ｂ】



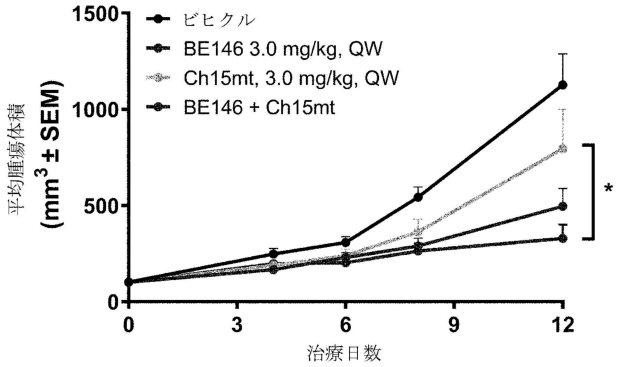
【図４７】



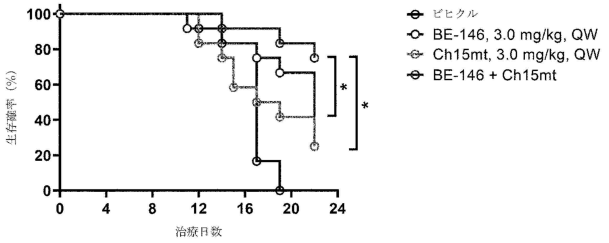
【図４８】



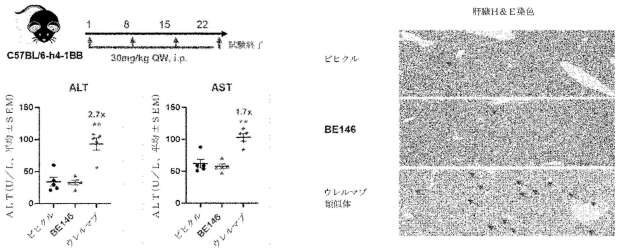
【図４９】



【図５０】



【図５１】



【配列表】

<u>20245220750000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/093565

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 8/67(2006.01)i; A61K 31/203(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 8/49(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C07K 14/525(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61P; C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN,TWTXT,USTXT,WOTXT,STN,SpringerLink, Elsevier Science Direct, Wiley InterScience,BIO-SEQUENCE Database of Chinese Patent,Embase, NCBI,EBI, Unipro, PUBMED,CNKI, antibody,antibodies,cea or ceacam, carcinoembryonic antigen-related cell,anti-CD137,anti-cea,4-1bb,agonist+,epitope#,596 to 674, SEQ ID NO:6-86, 179,255,295-299,307-313, bispecific.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HASHIMOTO, K. "CD137 as an Attractive T Cell Co-Stimulatory Target in the TNFRSF for Immuno-Oncology Drug Development" *CANCERS,* 11 May 2021 (2021-05-11), page9 paragrphs 4-6, table 2	1-2、27-50
Y	CN 105753978 A (UNIV. SECOND MILITARY MEDICAL) 13 July 2016 (2016-07-13) table 2, description paragraphs 5-8, 47	1-2、27-50
Y	WO 2020260329 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 30 December 2020 (2020-12-30) Claim 1	1-2、27-50
Y	WO 2016144976 A1 (KINGS COLLEGE LONDON) 15 September 2016 (2016-09-15) abstract, description paragraph 52	1-2、27-50
A	WO 2020260329 A1 (F.HOFFMANN-LA ROCHE AG) 30 December 2020 (2020-12-30) the whole document	1-50
A	THIEMANN, M. et al. "Novel bispecific molecules combining HERA-CD40L with anti-CEA or with anti-PD-L1 for targeting" *AACR Annual Meeting 2020,* 24 June 2020 (2020-06-24), Poster Number:4460	1-50

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 August 2022	**16 August 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **National Intellectual Property Administration, PRC** **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing** **100088, China**	Authorized officer **ZHANG,Liwei**
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No. **86-(10)-53962036**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/093565

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, P.F. et al. "Prediction of the B cell epitopes for carcinoembryonic antigen of tumor-associated antigen" *BME & Clin. Med.*, Vol. 11, No. 5, 30 September 2007 (2007-09-30), pages 402-405	1-50

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/093565

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **34-46**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter of claims 34-46 relates to methods of treatment for cancers, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out and based on the manufacturing of a medicament.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/093565

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105753978	A	13 July 2016	None			
WO	2020260329	A1	30 December 2020	TW	202115124	A	16 April 2021
				AU	2020304813	A1	06 January 2022
				KR	20220025848	A	03 March 2022
				EP	3990477	A1	04 May 2022
				IL	288597	A	01 February 2022
				CA	3141378	A1	30 December 2020
				AR	119295	A1	09 December 2021
				CN	114127123	A	01 March 2022
				BR	112021026293	A2	03 March 2022
WO	2016144976	A1	15 September 2016	US	2016317654	A1	03 November 2016
				JP	2018512396	A	17 May 2018
				EP	3267969	A1	17 January 2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		４Ｃ２０６
Ｃ１２Ｎ	*15/62 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/62	Ｚ	４Ｈ０４５
Ｃ１２Ｎ	*15/63 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ０７Ｋ	*16/28 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28		
Ｃ０７Ｋ	*16/18 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/18		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*47/22 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/22		
Ａ６１Ｋ	*47/26 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/26		
Ａ６１Ｐ	*43/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｅ	
Ａ６１Ｋ	*31/337 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｔ	
Ａ６１Ｋ	*31/282 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/337		
Ａ６１Ｋ	*31/4745 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/282		
Ａ６１Ｋ	*33/243 (2019.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4745		
Ａ６１Ｋ	*31/706 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	33/243		
Ａ６１Ｋ	*31/454 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/706		
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/454		
		Ａ６１Ｐ	35/02		
		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	

(32)優先日　令和4年4月21日(2022.4.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　リ、ズオ
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　チェン、シン
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　ズー、リン
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　ワン、ペンハオ
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　ジョウ、シャオスイ
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０

(72)発明者　シィエ、ユァンユァン
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　リ、ジエ
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　ソン、ジアン
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　ソン、ジン
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　リ、シュエフイ
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０

Ｆターム（参考）　4B065　AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA25
4C076　CC27 DD09 DD60 DD67 EE23
4C084　AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC751
4C085　AA13 AA14 AA16 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43 CC21 CC23
DD23 DD31 DD62 EE01 EE03 EE05
4C086　AA01 AA02 BA02 BC21 BC22 CB22 EA10 EA16 GA07 HA12
HA24 HA26 HA28 MA01 MA02 MA05 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75
4C206　AA01 AA02 JB16 KA01 MA01 MA02 MA04 MA05 NA05 ZB26
ZB27 ZC75
4H045　AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA28 FA74 GA26