(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2014-514314
(P2014-514314A)
(43)公表日　平成26年6月19日(2014.6.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	4B024
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4B064
C07K 1/02	(2006.01)	C07K	1/02		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C085
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 169 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-505655 (P2014-505655)
(86)(22)出願日　平成24年4月20日 (2012.4.20)
(85)翻訳文提出日　平成25年12月12日 (2013.12.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP2012/057307
(87)国際公開番号　WO2012/143524
(87)国際公開日　平成24年10月26日 (2012.10.26)
(31)優先権主張番号　PCT/EP2011/056388
(32)優先日　平成23年4月20日 (2011.4.20)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)
(31)優先権主張番号　PA201100312
(32)優先日　平成23年4月20日 (2011.4.20)
(33)優先権主張国　デンマーク (DK)
(31)優先権主張番号　PCT/EP2011/058772
(32)優先日　平成23年5月27日 (2011.5.27)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　507316398
ゲンマブ　エー／エス
デンマーク　コペンハーゲン　ケー　ブレドゲード　３４イー
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＥＲ２およびＣＤ３に対する二重特異性抗体

(57)【要約】
ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）のエピトープと結合する1つの抗原結合領域およびヒトCD3と結合する1つの抗原結合領域を含む二重特異性抗体、ならびに関連する抗体ベースの組成物および分子が開示される。これらの抗体を含む薬学的組成物ならびにこれらの抗体の作製方法および使用方法も開示される。

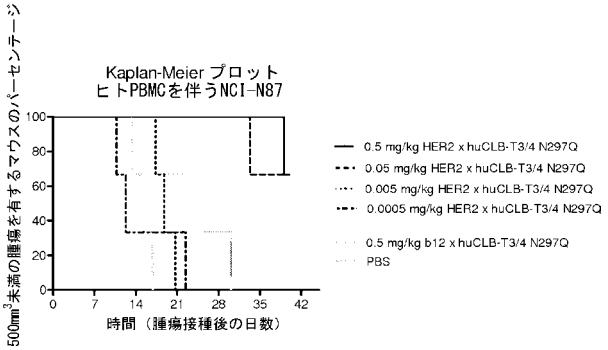
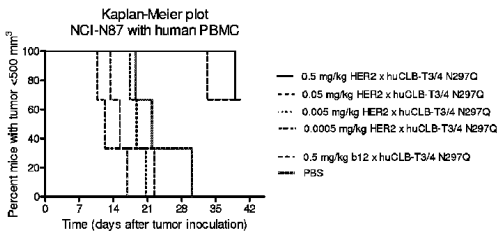


Figure 33B



【特許請求の範囲】
【請求項１】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2（HER2）上のエピトープと結合し、かつ
（a）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域を含む抗体（153）、ならびに
（b）SEQ ID NO：1の配列を含む重鎖可変（VH）領域およびSEQ ID NO：5の配列を含む軽鎖可変（VL）領域を含む抗体（169）、ならびに
（c）SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域を含む抗体（005）、ならびに
（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む抗体（025）
からなる群より選択される参照抗体の、HER2に対する結合、任意で可溶性HER2に対する結合をブロックする、二重特異性抗体。
【請求項２】
第1の抗原結合領域が（a）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項３】
第1の抗原結合領域が（b）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項４】
第1の抗原結合領域が（c）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項５】
第1の抗原結合領域が（d）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項６】
第1の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：2、3および4（169）；
（b）それぞれSEQ ID NO：9、10および11（050）；
（c）それぞれSEQ ID NO：16、17および18（084）；
（d）それぞれSEQ ID NO：23、24および25（025）；
（e）それぞれSEQ ID NO：30、163および31（091）；
（f）それぞれSEQ ID NO：36、37および38（129）：
（g）それぞれSEQ ID NO：43、44および45（127）；
（h）それぞれSEQ ID NO：50、51および52（159）；
（i）それぞれSEQ ID NO：57、58および59（098）；
（j）それぞれSEQ ID NO：64、65および66（153）；
（k）それぞれSEQ ID NO：71、72および73（132）；
（l）それぞれSEQ ID NO：166、167および168（005）；
（m）それぞれSEQ ID NO：173、174および175（006）；
（n）それぞれSEQ ID NO：180、181および182（059）；
（o）それぞれSEQ ID NO：187、188および189（060）；
（p）それぞれSEQ ID NO：194、195および196（106）；ならびに
（q）それぞれSEQ ID NO：201、202および203（111）、
からなる群より選択されるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項７】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗

原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2上のエピトープと結合し、第1の抗原結合領域が、

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

（q）それぞれSEQ ID NO：201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：205、GASおよびSEQ ID NO：206であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（111）、
からなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、二重特異性抗体。
【請求項８】
第1の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；
（b）それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）；
（c）それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（153）、ならびに
（d）それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）、
からなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、請求項7記載の二重特異性抗体。
【請求項９】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（169）、ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）を含む、二重特異性抗体。
【請求項１０】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（153）、二重特異性抗体。
【請求項１１】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（005）、二重特異性抗体。
【請求項１２】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（025）、二重特異性抗体。
【請求項１３】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：5を含むVL領域を含む（169）、二重特異性抗体。
【請求項１４】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗

原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：67を含むVL領域を含む（153）、二重特異性抗体。

【請求項１５】

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域を含む（005）、二重特異性抗体。

【請求項１６】

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がCD3と結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：22を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む（025）、二重特異性抗体。

【請求項１７】

第2の抗原結合領域が、

（a）SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む抗体（huCLB-T3/4）；

（b）SEQ ID NO：234の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：235の配列を含むVL領域を含む抗体（YTH12.5）；

（c）SEQ ID NO：238の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：239の配列を含むVL領域を含む抗体（huOKT3-C114S-gLC）；ならびに

（d）SEQ ID NO：236の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：237の配列を含むVL領域を含む抗体（HUM291）、

からなる群より選択される参照抗体のCD3に対する結合をブロックする、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項１８】

第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む参照抗体（huCLB-T3/4）のCD3に対する結合をブロックする、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項１９】

第2の抗原結合領域が、

（a）それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）；

（b）SEQ ID NO：234のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（YTH12.5）；

（c）SEQ ID NO：238のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huOKT3-C114S-gLC）；ならびに

（d）SEQ ID NO：236のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（HUM291）

からなる群より選択されるVH領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項２０】

第2の抗原結合領域が、それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項２１】

SEQ ID NO：244のVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（huCLB-T3/4）およびSEQ ID NO：4のVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（169）を含む、二重特異性抗体。

【請求項２２】

第2の抗原結合領域がSEQ ID NO：246のVL CDR3配列（huCLB-T3/4）を含み、第2の抗原結合領域がSEQ ID NO：7のVL CDR3配列（169）を含む、請求項21記載の二重特異性抗体。

【請求項２３】

第2の抗原結合領域が、それぞれSEQ ID NO：242、243および244のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列；ならびに任意で、それぞれ245、DTSおよび246のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む（huCLB-T3/4）、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項２４】

第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む（huCLB-T3/4）、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項２５】

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

【請求項２６】

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

【請求項２７】

第2の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第1の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、請求項1～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項２８】

第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から独立に選択される、請求項23および24のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項２９】

第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1およびIgG4から独立に選択される、請求項28記載の二重特異性抗体。

【請求項３０】

第1および第2のFc領域の一方がIgG1アイソタイプのものであり、一方がIgG4アイソタイプのものである、請求項29記載の二重特異性抗体。

【請求項３１】

第1および第2のFc領域のアイソタイプがIgG1である、請求項29記載の二重特異性抗体。

【請求項３２】

エフェクター機能が欠損している、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項３３】

第1のFc領域が、409、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ該第1のFc領域および該第2のFc領域が同じ位置では置換されていない、請求項26～32のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項３４】

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項３５】

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項３６】

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項３７】

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項３８】

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項３９】

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４０】

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４１】

第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４２】

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４３】

第1のFc領域が位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４４】

第1のFc領域が、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４５】

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４６】

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４７】

第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４８】

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項４９】

第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～332のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項５０】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５１】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５２】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５３】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５４】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、
（i）位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAsp、Cys、Pro、GluおよびGln以外のアミノ酸、または
（iv）位置366にLys、Arg、Ser、ThrおよびTrp以外のアミノ酸
を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５５】
第1のFc領域が、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のホモ二量体タンパク質が、
（i）位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetもしくはTyr
を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５６】
第1のFc領域が位置409にArgを有し、第2のFc領域が、
（i）位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln
を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５７】
第1および第2のCH3領域が、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：256の配列（IgG1m(a)）を含む、請求項26～56のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５８】
第1のFc領域も第2のFc領域もヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない、請求項26～57のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５９】
第1および第2のFc領域の両方がヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む、請求項26～57のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項６０】
第1および第2のFc領域がヒト抗体のFc領域である、請求項26～58のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６１】
第1および第2のFc領域が、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：247、248、249、250、251、252、253、254および255からなる群より独立して選択される配列を含む、請求項26～60のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６２】
第1および第2の抗原結合領域が、ヒト抗体のVH配列、および任意でヒト抗体のVL配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６３】
第1および第2の抗原結合領域が重鎖抗体由来である、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６４】
第1および第2の抗原結合領域が第1および第2の軽鎖を含む、請求項1～63のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６５】
第1および第2の軽鎖が異なる、請求項64記載の二重特異性抗体。
【請求項６６】
第1および／または第2のFc領域が、Asn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含む、請求項26～65のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６７】
薬物、放射性同位体、サイトカインもしくは細胞傷害性部分などの1つもしくは複数の他の部分と結合体化されているか、またはそれに対する1つもしくは複数のアクセプター基を含有する、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６８】
IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFNα、IFNβ、IFNγ、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチムおよびTNFαからなる群より選択されるサイトカインと結合体化されている、請求項67記載の二重特異性抗体。
【請求項６９】
二重特異性抗体を作製するためのインビトロ方法であって、
（a）HER2上のエピトープと結合しかつ第1のFc領域を含む第1の抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第1のCH3領域を含む段階、
（b）ヒトCD3上のエピトープと結合しかつ第2のFc領域を含む第2の抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第2のCH3領域を含む段階、
（c）該第1の抗体を該第2の抗体とともに還元条件下でインキュベートする段階、および
（d）該二重特異性抗体を入手する段階
を含み、該第1および第2のCH3領域の配列が異なり、かつ該第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が、該第1および第2のCH3領域の各ホモ二量体相互作用よりも強い、方法。
【請求項７０】
第1の抗体が、
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）、
（b）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）、
（c）SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域（005）、ならびに

（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）
を含む抗体の可溶性ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）に対する結合をブロックする、請求項69記載の方法。
【請求項７１】
第1および第2のFc領域が、請求項33～56のいずれか一項記載のアミノ酸置換を含む、請求項69および70のいずれか一項記載の方法。
【請求項７２】
請求項69～71のいずれか一項記載の方法によって入手しうる二重特異性抗体。
【請求項７３】
請求項1～68のいずれか一項に定義された二重特異性抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞。
【請求項７４】
請求項1～68のいずれか一項に定義された二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。
【請求項７５】
医薬として用いるための、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項７６】
癌の治療に用いるための、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項７７】
癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群より選択される、請求項76記載の使用のための二重特異性抗体。
【請求項７８】
化学療法剤などの1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて癌の治療に用いるためのものである、請求項76～77のいずれか一項記載の使用のための二重特異性抗体。
【請求項７９】
請求項77および／または78のさらなる特徴を任意で含む、癌の治療用の医薬を製造するための、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体の使用。
【請求項８０】
HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害する方法であって、それを必要とする個体に請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体を投与する段階を含む、方法。
【請求項８１】
（a）HER2を共発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、および
（b）請求項1～72のいずれか一項記載の二重特異性抗体を該対象に投与する段階
を含む、癌を治療する方法。
【請求項８２】
癌が、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌／子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、精巣癌、滑膜肉腫などの軟部組織腫瘍、および膀胱癌からなる群より選択される、請求項81記載の方法。
【請求項８３】
（a）請求項73記載の宿主細胞を培養する段階、および
（b）二重特異性抗体を培地から精製する段階
を含む、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体を作製する方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、ヒト上皮細胞成長因子受容体2（HER2）およびcluster determinant 3（CD3

）に対する二重特異性抗体およびこのような抗体の使用、特に、癌の治療におけるこのような抗体の使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

発明の背景

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

【０００３】

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

【０００４】

トラスツズマブ（ハーセプチン（Herceptin）（登録商標））はHER2タンパク質ドメインIVに対する組換えヒト化モノクローナル抗体であり、それによって、HER2が大幅に過剰発現している細胞においてリガンド非依存性HER2ホモ二量体化を阻止し、さらに低い程度でHER2と他のファミリーメンバーとのヘテロ二量体化を阻止する（Cho et al., Nature 2003；421：756-760（非特許文献14）およびWehrman et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006；103：19063-19068（非特許文献15））。HER2発現レベルが中程度の細胞においては、トラスツズマブはHER2/EGFRヘテロ二量体の形成を阻害することが見出された（Wehrman et al.,（2006）、前記；Schmitz et al., Exp Cell Res 2009；315：659-670（非特許文献16））。トラスツズマブは抗体依存性細胞傷害（ADCC）を媒介し、外部ドメインシェディングを阻止する。外部ドメインシェディングが阻止されなければ、HER2過剰発現細胞において切断型常時活性型タンパク質が形成されるだろう。トラスツズマブについては、高レベルのHER2を発現する腫瘍細胞のインビトロ増殖およびインビボ増殖の阻害も報告されている（Nahta and Esteva, Oncogene 2007；26：3637-3643（非特許文献17）において概説されている）。ハーセプチン（登録商標）は、化学療法と併用した、または1種類もしくは複数種の化学療法後の単一薬剤として、HER2過剰発現転移乳癌のファーストライン療法および補助療法に認可されている。トラスツズマブはHER2過剰発現乳腺腫瘍患者の20～50％にしか有効でないことが見出されており、初期応答者の多くは数ヶ月後に再発する（Dinh et al., Clin Adv Hematol Oncol 2007；5：707-717（非特許文献18））。

【０００５】
ペルツズマブ（オムニターグ（Omnitarg）（商標））は別のヒト化モノクローナル抗体である。当該抗体は、HER2タンパク質ドメインIIに対して作られ、リガンド誘導性ヘテロ二量体化（すなわち、リガンドが結合している別のErbBファミリーメンバーとのHER2二量体化）；高いHER2発現レベルを厳格に必要としないと報告されている機構を阻害する（Franklin et al., Cancer Cell 2004；5：317-328（非特許文献19））。ペルツズマブもADCCを媒介するが、ペルツズマブの主な作用機構はその二量体化の阻止に依存している（Hughes et al., Mol Cancer Ther 2009；8：1885-1892（非特許文献20））。さらに、ペルツズマブは、EGFR/HER2ヘテロ二量体の形成を阻害することによってEGFRの内部移行およびダウンレギュレーションを増強することが見出された。EGFR/HER2ヘテロ二量体の形成が阻害されなければ、EGFRは原形質膜に繋ぎ止められる（Hughes et al., 2009、前記）。これは、EGFRホモ二量体がEGFR/HER2二量体より有効に内部移行するという観察と相関する（Pedersen et al., Mol Cancer Res 2009；7：275-284（非特許文献21））。先に行われたトラスツズマブによる治療の間に進行した患者に、ペルツズマブおよびトラスツズマブを併用すると、それらの補完的な作用機序により、抗腫瘍効果および有効性の強化をもたらすことが報告されており（Baselga et al., J Clin Oncol 2010;28:1138-1144（非特許文献22））、治療歴のないHER2陽性転移性乳癌の患者において、この抗体の組み合わせとドセタキセルの併用を評価するための第III相試験が進行中である。
【０００６】
標的抗体療法を改良するための代替的なアプローチの1つは、抗原を発現する癌細胞に対して、細胞傷害性の細胞または薬物を特異的に送達することによる。腫瘍細胞の効率的な死滅のためにT細胞を用いるというこの考え方は、1985年に既に記載されている（Stearz at al. Nature 1985, 314:628-631（非特許文献23））。例えば、いわゆる三機能性抗体は、一方のアームで腫瘍細胞上の抗原を標的とし、もう一方のアームで例えばT細胞上のCD3を標的とし、Fc領域によってFc受容体との結合をもたらす二重特異性抗体である。結合が起こると、T細胞と、腫瘍細胞と、抗体Fcドメインと結合するエフェクター細胞との複合体が形成され、腫瘍細胞の死滅が誘導される（Muller and Kontermann, BioDrugs 2010;24:89-98（非特許文献24））。エルツマキソマブ（ertumaxomab）は、HER2およびCD3に対するそのような三機能性抗体の1つであり、HER2発現が少ない細胞株において細胞傷害を誘導し、転移性乳癌における第II相臨床開発が進行中である（Jones et al., Lancet Oncol 2009;10: 1179-1187（非特許文献25）およびKiewe et al., Clin Cancer Res 2006；12:3085-3091（非特許文献26））。
【０００７】
または、T細胞と腫瘍細胞との複合体を形成させて、二重標的指向性抗体断片（例えば、二重標的指向性単鎖抗体）によって腫瘍細胞の死滅を導く（Muller and Kontermann, BioDrugs 2010;24:89-98（非特許文献24）, Baeuerle and Reinhardt 2009, Cancer Research 96: 4941（非特許文献27））。ブリナツモマブ（blinatumomab）（Bargou et al, Science 2008, 321:974-976（非特許文献28））は、CD19およびCD3を標的とすることによって細胞傷害を誘導する、BiTEと名付けられた単鎖抗体構築物である。抗体断片を基にしたT細胞係合性の他の二重特異性薬（bispecifics）も記載されている（Moore et al. 2011, Blood 117:4542-4551（非特許文献29）, Baeuerle et al., Current opinion in Molecular Therapeutics 2009, 11:22-30（非特許文献30））。
【０００８】
HER2の機能を調節している複雑な機構は、この癌原遺伝子に対する最適化された新たな治療戦略に関するさらなる研究に値する。したがって、癌などのHER2関連疾患を治療するための有効かつ安全な製品に対しては未だに需要がある。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００９】
【特許文献１】WO 2005/117973号

【非特許文献】
【００１０】
【非特許文献１】Graus-Porta et al., Embo J 1997；16：1647-1655
【非特許文献２】Tao et al., J Cell Sci 2008；121：3207-3217
【非特許文献３】Riese and Stern、Bioessays 1998；20：41-48
【非特許文献４】Huang et al., Expert Opin Biol Ther 2009；9：97-110
【非特許文献５】Reese et al., Stem Cells 1997；15：1-8
【非特許文献６】Andrechek et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2000；97：3444-3449
【非特許文献７】Slamon et al., Science 1987；235：177-182
【非特許文献８】Garcia de Palazzo et al., Int J Biol Markers 1993；8：233-239
【非特許文献９】Ross et al., Oncologist 2003；8：307-325
【非特許文献１０】Osman et al., J Urol 2005；174：2174-2177
【非特許文献１１】Kapitanovic et al., Gastroenterology 1997；112：1103-1113
【非特許文献１２】Turken et al., Neoplasma 2003；50：257-261
【非特許文献１３】Oshima et al., Int J Biol Markers 2001；16：250-254
【非特許文献１４】Cho et al., Nature 2003；421：756-760
【非特許文献１５】Wehrman et al., Proc Natl Acad Sci U S A 2006；103：19063-19068
【非特許文献１６】Schmitz et al., Exp Cell Res 2009；315：659-670
【非特許文献１７】Nahta and Esteva, Oncogene 2007；26：3637-3643
【非特許文献１８】Dinh et al., Clin Adv Hematol Oncol 2007；5：707-717
【非特許文献１９】Franklin et al., Cancer Cell 2004；5：317-328
【非特許文献２０】Hughes et al., Mol Cancer Ther 2009；8：1885-1892
【非特許文献２１】Pedersen et al., Mol Cancer Res 2009；7：275-284
【非特許文献２２】Baselga et al., J Clin Oncol 2010;28:1138-1144
【非特許文献２３】Stearz at al. Nature 1985, 314:628-631
【非特許文献２４】Muller and Kontermann, BioDrugs 2010;24:89-98
【非特許文献２５】Jones et al., Lancet Oncol 2009;10: 1179-1187
【非特許文献２６】Kiewe et al., Clin Cancer Res 2006；12:3085-3091
【非特許文献２７】Baeuerle and Reinhardt 2009, Cancer Research 96: 4941
【非特許文献２８】Bargou et al, Science 2008, 321:974-976
【非特許文献２９】Moore et al. 2011, Blood 117:4542-4551
【非特許文献３０】Baeuerle et al., Current opinion in Molecular Therapeutics 2009, 11:22-30
【発明の概要】
【００１１】
本発明の1つの目的は、HER2抗体に由来する第1の抗原結合領域およびCD3に対する結合特異性を有する第2の領域を含む、医療用の、新規の有効な二重特異性抗体を提供することである。典型的には、第2の領域は、CD3抗体（任意で公知のCD3抗体）に由来する抗原結合領域を含む。
【００１２】
本明細書に示されているように、新規の二重特異性HER2×CD3抗体は、インビトロ細胞傷害性アッセイにおいてHER2を発現する細胞を用量依存的に死滅させることができ、インビボでの腫瘍成長を有効に阻止し、かつ／または単一特異性のHER2抗体もしくはCD3抗体を上回る他の利点を有する。1つの局面において、HER2結合領域の由来元である単一特異性HER2抗体は、当技術分野で記載されているHER2抗体とは異なるHER2結合特性または可変領域配列を呈する。
【００１３】
好ましい態様において、本発明のHER2×CD3二重特異性抗体は、完全ヒト型であるかもしくはヒト化されたHER2抗体から調製され、新規エピトープと結合し、かつ／または、ヒ

ト患者における治療用途にとって有利な特性を有する。二重特異性抗体の各FabアームはFc領域をさらに含んでもよく、任意で、二重特異性抗体の形成を促進する修飾、Fc媒介性エフェクター機能に影響を及ぼす修飾、および／または本明細書に記載された他の特徴を含む。

【００１４】

本発明のこれらの局面および他の局面について、以下にさらに詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【００１５】

【図１】HER2 HuMab重鎖可変領域（VH）配列と生殖系列（参照）配列（A～O）とのアラインメント。それぞれのVH配列の中で、特定の位置において生殖系列（参照）のアミノ酸と異なるアミノ酸を強調した。コンセンサスVH配列を示した。「X」は、代替のアミノ酸（各位置においてアラインメントされたアミノ酸より選択される）が可能な位置を示す。それぞれのVH配列において、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列に下線を引いた。コンセンサスCDR配列を表4においてさらに詳しく定義した。

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

【図３】実施例12に記載のように確かめられた時の、HER2抗体と、（A、B、E）高（AU565）HER2発現細胞株および（C、D、F）低（A431）HER2発現細胞株との結合曲線。示したデータは、それぞれの細胞株を対象にした1回の代表的な実験の平均蛍光強度（MFI）である。EC_{50}値はみかけの親和性を示す。

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

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

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

【図７】ヘレグリン-β1のみで刺激した細胞と対比した、ヘレグリン-β1で刺激して表記のHER2抗体で処理した生存MCF7細胞のパーセンテージ。対照として、非刺激細胞（なし）の増殖率を示している。データは3回の独立した実験から入手し、±標準偏差とした。*ヘレグリン-β1で誘導される増殖の有意な阻害（$P<0.05$）。詳細については実施例17参照。

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

【図９】ジャーカット細胞に対する二重特異性HER2×CD3抗体の結合。作製された二重特異性抗体はすべて、ジャーカットに対する結合を示すが、単一特異性親抗体よりも見かけの親和性は低い（名称＝CD3クローン×HER2クローン）。

【図１０】（A）標識したAU565細胞（CFSE‐Y軸）およびジャーカット細胞（PKH26‐X軸）に対するHER2×CD3抗体（HER2-169 × huCLB-T3/4）の用量依存的な同時結合と、それによりFACSドットプロット（Q2）中に生じた二重陽性細胞によって示される、相互に連結された細胞のダブレット。（B）二重特異性HER2×CD抗体を介して同時に結合した細胞を表す、Q2（点線）における二重陽性イベントを示しているFACS実験の代表例。

【図１１】二重特異性HER2×CD3抗体によるAU565細胞の用量依存的死滅。4種類の異なるCD3抗体と、2種類の異なるHER2抗体（169および153）または対照抗体IgG1 b12とを組み合わせて、二重特異性抗体を作製した。（A）huOKT3、（B）HUM291、（C）YTH12.5および（D）huCLB-T3/4。詳細については実施例21参照。

【図１２】抗体はHER2のダウンモジュレーションを誘導した。10μg／mL抗体との3日間のインキュベーション後にAU565細胞溶解液において発現されたHER2の相対的パーセンテージ。HER2の量をHER2特異的捕捉ELISAを用いて定量し、非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとしてプロットした。示したデータは、3回の実験の平均±標準偏差である。

【図１３】HER2抗体（FITC）とリソソームマーカーLAMP1（Cy5）との共局在分析。さまざまな単一特異性HER2抗体に関して、FITCピクセル強度がCy5と重複している。各抗体に関して、3つの異なる画像のLAMP1／Cy5陽性ピクセルにおけるFITCピクセル強度をプロットしている。群3抗体である098および153は、群2の抗体025およびペルツズマブ、ならびに群1の抗体169およびハーセプチン（登録商標）と比較して、LAMP1／Cy5陽性区画において、より高いFITCピクセル強度を示している。

【図１４】フローサイトメトリーを用いて分析した、異なるHER2 ECD構築物をトランスフェクトしたCHO-S細胞に対するHER2抗体の結合。Hu-HER2＝完全ヒトHER2、Hu-HER2-ch（I）CR1＝ニワトリドメインIを有するhu-HER2、Hu-HER2-ch（II）＝ニワトリドメインIIを有するhu-HER2、hu-HER2-ch（III）＝ニワトリドメインIIIを有するhu-HER2、およびHu-HER2-ch（IV）＝ニワトリドメインIVを有するhu-HER2。示したデータは、1つの代表的な抗体であるTH1014-153の平均蛍光強度（MFI）である。詳細については実施例24参照。

【図１５】雌性CB.17重症複合型免疫不全症（SCID）マウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植モデルに対するHER2-HuMabのインビボ効果。示したデータは、各群当たりの平均腫瘍サイズ±S.E.M.（n＝各群当たりマウス10匹）（A、C）および生存（B、D）である。詳細については実施例25参照。

【図１６】Balb／CヌードマウスにおけるBT-474乳腺腫瘍異種移植片に対するHER2 HuMabのインビボ効果。示されているデータは、各群当たりの平均腫瘍サイズ±S.E.M.（n＝各群当たりマウス8匹）（A）および生存率（B）である。詳細については実施例26参照。

【図１７】PBMCを用いる細胞傷害性アッセイにおける非特異的なFc媒介性死滅は、改変Fc領域（LFLEDANQPS）を有する抗体を用いてさらに減少させることができるが、一方、N297Qのみを介した非グリコシル化だけではこの活性は完全には除去されない。これらの変異は二重特異性HER2×CD3抗体の特異的死滅活性を損なわない。詳細については実施例27参照。

【図１８】T細胞（A）またはPBMC（B）のいずれかをエフェクター細胞として用いる細胞傷害性アッセイで3種のmAbを同一の抗CD3抗体（huCLB-T3/4）と組み合わせた比較試験によって示されるように、HER2エピトープの場所はHER2×CD3抗体の有効性に強い影響を及ぼす。

【図１９】さまざまなHER2発現レベルの標的細胞株を用いたT細胞細胞傷害性アッセイ。HER2×CD3二重特異性抗体の存在下におけるT細胞との3日間のインキュベーション後の生細胞のパーセンテージを示している。最も高発現の細胞が最も低い抗体濃度で死滅させられているように、有効性は発現レベルと正に相関した。

【図２０】二重特異性HER2×CD3抗体および単一特異性対照の存在下でAU565腫瘍細胞と共培養したT細胞のCD69発現。

【図２１】腫瘍細胞の非存在下で、DuoBody HER2 169 × huCLBT3/4の種々のFc変異体で処理したPBMCプールにおけるT細胞のCD69発現。

【図２２】PBMCまたはT細胞と、DuoBody huCLB T3/4-Q × HER2-169-Q（CD3-Q/169Q）抗

体およびHER2陽性腫瘍細胞とのインキュベーションによって生じたサイトカインプロファイル。
【図２３】二重特異性HER2×CD3抗体によるT細胞活性化の尺度としてのGM-CSF産生、および非特異的なFc媒介性活性化の寄与。
【図２４】HER2を発現する腫瘍細胞株およびヒトPBMCを有する皮下異種移植モデルにおけるHER2×CD3二重特異性mAbのインビボ有効性の評価。（A）には、二重特異性HER2×CD3抗体で処理したNCI-N87 S.C.異種移植片およびS.C.ヒトPBMCを有するマウスにおける腫瘍形成（平均およびSEM）を示している。3つの投薬スケジュールを比較したところ、最低用量が最も有効であるように思われた。（B）には、生存マウス（腫瘍サイズが500mm^3未満）のパーセンテージを、Kaplan-Meierプロットの形で示している。
【図２５】ヒトIgG4-7D8とのFabアーム交換による二重特異性抗体の作製における、三重変異型（ITL）、二重変異型（IT、IL、TL）および単一変異型（L）のヒトIgG1-2F8間の比較。ヒトIgG1-2F8三重および二重変異体と、CPSCヒンジを有する野生型IgG4-7D8との間（A）、もしくは安定化されたヒンジを有する変異型IgG4-7D8-CPPCとの間（B）、または野生型CPSCもしくは安定化されたCPPCヒンジを有する単一変異型IgG1-2F8-F405LとIgG4-7D8との間（C）での、2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。二重および単一変異体を含む実験に関して、それぞれ0～20μg／mLまたは0～10μg／mLの濃度系列（全抗体）をELISAで分析した。二重変異型IgG1-2F8-ILと-TLとの組み合わせでは、三重変異型IgG1-ITLに類似した二重特異性EGFR／CD20結合が生じる。IgG1-2F8-ITとの組み合わせでは、二重特異性産物が生じない。単一変異型IgG1-2F8-F405Lとの組み合わせでは、二重特異性EGFR／CD20結合が生じる。
【図２６】IgG1-2F8-ITL変異体とIgG1-7D8-K409X変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-ITL変異体と表記のIgG1-7D8-K409X変異体との間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。（A）0～20μg／mLの濃度系列（全抗体）を分析した。陽性対照は、IgG1-2F8-ITL × IgG4-7D8-CPPCに由来する二重特異性抗体の精製バッチである。（B）交換は、陽性対照（黒のバー）と対比した、20μg／mLでの二重特異性結合として提示されている。ダークグレーのバーは、IgG4対照（IgG4-7D8 × IgG4-2F8）の間、陰性対照（IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R）の間、およびIgG1-2F8-ITLとIgG4-7D8-CPPCとの間の二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-7D8-K409X変異体とIgG1-2F8-ITLとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。
【図２７】IgG1-2F8-F405X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。表記のIgG1-2F8-F405X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEAで誘導されるインビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。（A）0～20μg／mLの濃度系列（全抗体）をELISAで分析した。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409Rに由来する二重特異性抗体の精製バッチである。（B）交換は、陽性対照（黒のバー）と対比した、抗体濃度20μg／mLでの二重特異性結合として提示されている。ダークグレーのバーは、IgG4対照（IgG4-7D8 × IgG4-2F8）の間および陰性対照（IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R）の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-F405X変異体とIgG1-7D8-K409Rまたは対照との間でのFabアーム交換反応による結果を表している。
【図２８】IgG1-2F8-Y407X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。表記のIgG1-2F8-Y407X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、ELISAによって判定した。（A）0～20μg／mLの濃度系列（全抗体）をELISAで分析した。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409Rに由来する、二重特異性抗体の精製バッチである。（B）交換は、陽性対照（黒のバー）と対比した、20μg／mL抗体濃度での二重特異性結合として提示されている。ダークグレーのバーは、IgG4対照（IgG4-7D8 × IgG4-2F8）の間および陰性対照（IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R）の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-Y407X変異体とIgG1-7D8-K409Rまたは対照との間でのFabアーム交換

反応による結果を表している。
【図２９】表記のIgG1-2F8-L368X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0～20μg／mLの濃度系列（全抗体）を用いてELISAによって判定した（A）。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409Rに由来する二重特異性抗体の精製バッチである。（B）陽性対照（黒のバー）と対比した、20μg／mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照（IgG4-7D8 × IgG4-2F8）の間および陰性対照（IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R）の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-L368X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。
【図３０】表記のIgG1-2F8-K370X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0～20μg／mLの濃度系列（全抗体）を用いてELISAによって判定した（A）。陽性対照は、IgG1-2F8-F405L × IgG1-7D8-K409Rに由来する、二重特異性抗体の精製バッチである。（B）陽性対照（黒のバー）と対比した、20μg／mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照（IgG4-7D8 × IgG4-2F8）の間および陰性対照（IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R）の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-D370X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。
【図３１】表記のIgG1-2F8-D399X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0～20μg／mLの濃度系列（全抗体）を用いてELISAによって判定した（A）。（B）陽性対照（黒のバー）と対比した、抗体濃度20μg／mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照（IgG4-7D8 × IgG4-2F8）の間および陰性対照（IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R）の間の二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-D399X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。
【図３２】表記のIgG1-2F8-T366X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間の2-MEA誘導性インビトロFabアーム交換による二重特異性抗体の作製に関して、0～20μg／mLの濃度系列（全抗体）を用いてELISAによって判定した（A）。（B）陽性対照（黒のバー）と対比した、抗体濃度20μg／mLでの二重特異性結合。ダークグレーのバーは、IgG4対照（IgG4-7D8 × IgG4-2F8）の間および陰性対照（IgG1-2F8 × IgG1-7D8-K409R）の間での二重特異性結合を表している。ライトグレーのバーは、同時に行った表記のIgG1-2F8-T366X変異体とIgG1-7D8-K409Rとの間でのFabアーム交換反応による結果を表している。
【図３３】HER2を発現する腫瘍細胞株およびヒトPBMCを有する皮下異種移植モデルにおけるHER2×CD3二重特異性mAbのインビボ有効性の評価。（A）には、二重特異性HER2×CD3抗体で処理したNCI-N87 S.C.異種移植片およびS.C.ヒトPBMCを有するマウスにおける腫瘍成長（平均およびSEM）を示している。異なる投薬スケジュールを比較したところ、0.05mg／kgおよび0.5mg／kgが有効であるように思われた。（B）には、腫瘍サイズが500mm^{3}未満であるマウスのパーセンテージマウスを、Kaplan-Meierプロットの形で示している。
【発明を実施するための形態】
【００１６】
発明の詳細な説明
定義
「HER2」（ErbB-2、NEU、HER-2、およびCD340とも知られる）という用語は、本明細書において用いられる時には、ヒト上皮細胞成長因子受容体2（SwissProt P04626）を指し、腫瘍細胞を含む細胞によって天然に発現されたHER2、またはHER2遺伝子もしくはDNAでトランスフェクトされた細胞上に発現されたHER2の任意の変種、アイソフォーム、および種ホモログを含む。種ホモログには、アカゲザルHER2（アカゲザル（macaca mulatta）；GenBankアクセッション番号GI：109114897）が含まれる。
【００１７】
「CD3」という用語は、6つの別個の鎖（1つのCD3γ鎖（SwissProt P09693）、1つのCD3δ鎖（SwissProt P04234）、2つのCD3ε鎖（SwissProt P07766）、および1つのCD3ζ鎖ホ

モ二量体（SwissProt P20963）（εγ：εδ：ζζ））で構成され、T細胞受容体α鎖およびβ鎖と会合している、ヒトCD3タンパク質複合体を指す。この用語は、T細胞を含む細胞によって天然に発現されるか、または、前述の鎖をコードする遺伝子もしくはcDNAがトランスフェクトされた細胞で発現される、あらゆるCD3変異体、アイソフォームおよび種ホモログを含む。

【００１８】

「免疫グロブリン」という用語は、一対が低分子量の軽鎖（L）、一対が重鎖（H）の二対のポリペプチド鎖からなり、4本全てがジスルフィド結合で相互接続されている構造的に関連する糖タンパク質のクラスをいう。免疫グロブリンの構造は詳細に特徴づけられている。例えば、Fundamental Immunology Ch.7（Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.（1989））を参照されたい。簡単に述べると、それぞれの重鎖は、典型的には、重鎖可変領域（本明細書ではV_HまたはVHと省略する）および重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、C_H1、C_H2、およびC_H3からなる。それぞれの軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域（本明細書ではV_LまたはVLと省略する）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメインC_Lからなる。V_H領域およびV_L領域は、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる超可変性領域（または配列が著しく変化し得る、および/もしくは構造が規定されたループの形をとり得る超可変領域）にさらに細分することができ、超可変性領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる保存領域と共に散在している。それぞれのV_HおよびV_Lは、典型的には、3つのCDRおよび4つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって、以下の順序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で並べられている（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917（1987）も参照されたい）。特に定めのない限り、または文脈によって明らかに否定されない限り、本明細書のCDR 配列はIMGT規則に従って特定される（Brochet X., Nucl Acids Res.2008；36：W503-508 およびLefranc MP., Nucleic Acids Research 1999； 27：209-212；インターネットhttpアドレス imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option = humanIgも参照されたい）。しかしながら、抗体配列におけるアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.（1991）に記載の方法によって行うこともできる（本明細書における「Kabatと同様の可変ドメイン残基ナンバリング」、「Kabat位置」、または「Kabatによる」などの句は、このナンバリングシステムをいう）。特に、定常領域におけるアミノ酸のナンバリングの場合、EUインデックスナンバリングシステム（Kabatら、前記）を使用することができる。Kabat残基ナンバリングは、ある特定の抗体について、Kabatら、前記において記載されている。

【００１９】

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

【００２０】

本発明の文脈において「抗体」（Ab）という用語は、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそのいずれかの誘導体を指し、これらは、代表的な生理学的条件下で、相当な長さの半減期、例えば少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間以上、約48時間以上、約3日、4日、5日、6日、7日以上など、あるいは他の任意の関連する、機能によって規定された期間（例えば、抗体と抗原との結合に関連する生理学的応答を誘導する、促進する、増強する、および／もしくは調節するのに十分な時間、ならびに／または抗体がエフェクター活性を高めるのに十分な時間）で抗原に特異的に結合する能力を有する。免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体（Ab）の定常領域は、免疫グロブリンと、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および補体系成分、例えば補体活性化の古典経路の第1の成分であるC1qを含む、宿主組織または宿主因子との結合を媒介することができ

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

【００２１】

「二重特異性抗体」という用語は、本発明の文脈において、異なる抗体配列によって定められる2種類の異なる抗原結合領域を有する抗体と解釈されることとする。これは、異なる標的との結合と解釈しうるが、1つの標的における異なるエピトープとの結合も含む。

【００２２】

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

【００２３】

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

【００２４】

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

【００２５】

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

いう。

【００２６】

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

【００２７】

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

【００２８】

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

【００２９】

「HER2×CD3抗体」または「抗HER2×CD3抗体」とは、2種類の抗原結合領域を含み、そのうち一方が抗原HER2と特異的に結合し、一方がCD3と特異的に結合する、多重特異性抗体、任意で二重特異性抗体のことである。

【００３０】

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

【００３１】

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

【００３２】

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

【００３３】

好ましい態様において、本発明の抗体は単離されている。本明細書で使用する「単離された抗体」は、抗原特異性の異なる他の抗体を実質的に含まない抗体をいうことが意図される（例えば、HER2に特異的に結合する単離された抗体は、HER2以外の抗原に特異的に結

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

【００３４】

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

【００３５】

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

【００３６】

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

【００３７】

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

【００３８】
本明細書で使用する「k_d」（sec^{-1}）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数をいう。この値は、k_{off}値とも呼ばれる。
【００３９】
本明細書で使用する「k_a」（$M^{-1}xsec^{-1}$）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数をいう。
【００４０】
本明細書で使用する「K_D」（M）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数をいう。
【００４１】
本明細書で使用する「K_A」（M^{-1}）という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数をいい、k_aをk_dで割ることによって得られる。
【００４２】
本明細書で用いる場合、「第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用」という用語は、第1のCH3／第2のCH3ヘテロ二量体タンパク質における第1のCH3領域と第2のCH3領域との間の相互作用のことを指す。
【００４３】
本明細書で用いる場合、「第1および第2のCH3領域間のホモ二量体相互作用」とは、第1のCH3／第1のCH3ホモ二量体タンパク質における第1のCH3領域ともう1つの第1のCH3領域との間の相互作用、および、第2のCH3／第2のCH3ホモ二量体タンパク質における第2のCH3領域ともう1つの第2のCH3領域との間の相互作用のことを指す。
【００４４】
「還元条件」または「還元環境」という用語は、基質、本明細書においては抗体のヒンジ領域内のシステイン残基が、酸化されるよりも還元される可能性の方が高い条件または環境のことを指す。
【００４５】
本明細書で使用する「増殖を阻害する」（例えば、腫瘍細胞などの細胞を指している場合）という用語は、例えば、実施例（例えば実施例16）におけるアッセイによって確かめられた時に、細胞とHER2抗体が接触した時に、HER2抗体と接触していない同じ細胞の増殖と比較して任意の実質的な細胞増殖減少、例えば、細胞培養増殖の少なくとも約10％、少なくとも約20％、もしくは少なくとも約30％、またはトラスツズマブなどの参照抗体と少なくとも同程度の阻害を含むことが意図される。
【００４６】
本明細書で使用する「増殖を促進する」（例えば、腫瘍細胞などの細胞を指している場合）という用語は、例えば、実施例におけるアッセイによって確かめられた時に、細胞とHER2抗体が接触した時に、HER2抗体と接触していない同じ細胞の増殖と比較して任意の実質的な細胞増殖増加、例えば、細胞培養増殖の少なくとも約10％、少なくとも約20％、もしくは少なくとも約30％、またはF5などの参照抗体と少なくとも同程度の促進を含むことが意図される。
【００４７】
本明細書で使用する「内部移行」という用語は、HER2抗体に関して用いられた時に、抗体が細胞表面および/または周囲媒体から、例えば、エンドサイトーシスを介してHER2発現細胞に内部移行される任意の機構を含む。抗体の内部移行は、内部移行された抗体の量を測定する直接アッセイ（例えば、実施例19に記載のfab-CypHer5Eアッセイ）、または内部移行された抗体-毒素結合体の作用が測定される間接アッセイ（例えば、実施例18の抗-κ-ETA'アッセイ）を用いて評価することができる。
【００４８】
本発明はまた、実施例の抗体のVL領域、VH領域、または1つもしくは複数のCDRの機能的変種を含む抗体を提供する。HER2抗体に関して用いられるVL、VH、またはCDRの機能的変種は依然として、親抗体の親和性／アビディティおよび／または特異性／選択性の少なく

とも相当な部分（少なくとも約50％、60％、70％、80％、90％、95％以上）を抗体が保持することを可能にする。場合によっては、このようなHER2抗体は、親抗体より高い親和性、選択性、および／または特異性に関連することがある。

【００４９】

このような機能的変種は、典型的には、親抗体と大きな配列同一性を保持している。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適アラインメントのために導入される必要のある、ギャップの数およびそれぞれのギャップの長さを考慮に入れた、これらの配列が共有する同一の位置の数の関数（すなわち、％相同性＝同一の位置の数／位置の総数x100）である。2つのヌクレオチド配列間またはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン2.0）の中に組み込まれている、E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17（1988）のアルゴリズムを使用し、PAM120ウエイト残基表、12のギャップレングスペナルティ、および4のギャップペナルティを用いて決定することができる。さらに、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453（1970）アルゴリズムを用いて決定することができる。

【００５０】

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

【００５１】

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

【００５２】

保存的置換のためのアミノ酸残基クラス

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

【００５３】

本発明の文脈においては、別に指定のある場合を除き、変異を記述するのに、以下の表記法を用いる；i）所定の位置におけるアミノ酸の置換は例えばK405Rなどと記述され、これは位置405におけるリジンのアルギニンによる置換を意味する；およびii）特定の変異体に関しては、任意のアミノ酸残基を指し示すために、コードXaaおよびXを含む特定の3文字コードまたは1文字コードが用いられる。すなわち、位置405におけるリジンのアルギニンによる置換はK405Rと表記され、または位置405におけるリジンの任意のアミノ酸残基による置換はK405Xと表記される。位置405におけるリジンの欠失の場合には、それはK405*によって指し示される。

【００５４】

本明細書で使用する「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）という用語は、発現ベクター、例えば本発明の抗体をコードする発現ベクターが導入されている細胞をいうことが意図される。組換え宿主細胞には、例えばトランスフェクトーマ（transfectoma）、例えばCHO細胞、HEK293細胞、NS／0細胞、およびリンパ球細胞が含まれる。

【００５５】

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

【００５６】

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

【００５７】

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

【００５８】

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

【００５９】

本発明のさらなる局面および態様

上記のように、本発明は、一方がHER2に対する結合特異性を有し、もう一方がCD3に対する結合特異性を有する、2種類の異なる抗原結合領域を含む二重特異性抗体に関する。

【００６０】

1つの局面において、本発明は、本明細書に記載のHER2抗体由来の第1の抗原結合領域および本明細書に記載のCD3抗体由来の第2の抗原結合領域を含む二重特異性分子に関する。

【００６１】

1つの態様において、HER2抗原結合領域は、本明細書に記載された、クロスブロック群1由来の参照抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合するHER2抗体由来である。1つの具体的な態様において、二重特異性抗体は、本明細書に記載されたような、クロスブロック群1の抗体由来の抗原結合領域を含む。

【００６２】

1つの態様において、HER2抗原結合領域は、本明細書に記載された、クロスブロック群2

由来の参照抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合するHER2抗体由来である。1つの具体的な態様において、二重特異性抗体は、本明細書に記載されたような、クロスブロック群2の抗体由来の抗原結合領域を含む。

【００６３】

1つの態様において、HER2抗原結合領域は、本明細書に記載された、クロスブロック群3由来の参照抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合するHER2抗体由来である。1つの具体的な態様において、二重特異性抗体は、本明細書に記載されたような、クロスブロック群3の抗体由来の抗原結合領域を含む。

【００６４】

1つの態様において、HER2抗原結合領域は、本明細書に記載された、クロスブロック群4由来の参照抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合するHER2抗体由来である。1つの具体的な態様において、二重特異性抗体は、本明細書に記載されたような、クロスブロック群4の抗体由来の抗原結合領域を含む。

【００６５】

1つの特定の態様において、前記の態様の任意の1つの二重特異性抗体は、いずれも当技術分野において公知であるCD3抗体YTH12.5、HUM291（ビジリズマブとしても知られる）、huOKT3-C114S-gLC（テプリズマブと関連）のVH領域およびVL領域を含む参照CD3抗体、またはCLB-T3/4のヒト化変異体であるCD3抗体huCLB-T3/4のVH領域およびVL領域を含む参照CD3抗体と同じエピトープをクロスブロックするかまたはそれと結合する抗原結合領域を含む。これらのCD3抗体に関するそれ以上の詳細は実施例21に提示されている。別の特定の態様において、前記の態様の任意の1つの二重特異性抗体は、YTH12.5、HUM291 huOKT3-C114S-gLCおよびhuCLB-T3/4から選択される抗体由来の抗原結合領域を含む。

【００６６】

したがって、本発明の二重特異性抗体は、第1の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2（HER2）上のエピトープと結合して、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合する、第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含みうる。

【００６７】

抗体および抗原結合領域

本発明の二重特異性抗体は、それぞれHER2およびCD3と結合する2種類の異なる抗原結合領域を含む。その上、以下に述べるように、本発明の二重特異性抗体を生成させる1つの方法は、第1のHER2抗体および第2のCD3抗体を還元条件下でインキュベートすることに基づく。

【００６８】

本発明のHER2抗体と結合する抗原結合領域は、クロスブロック群1、2、3および4のいずれかに属しうる。以下には、クロスブロック群1、2、3および4に属するHER2と結合するそのような抗原結合領域の例が提示されており、この文脈における「抗原結合領域」への言及は、本発明の二重特異性抗体の1つの抗原結合領域（例えば第1の抗原結合領域）と、第1のHER2抗体との両方を含むものとする。

【００６９】

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

【００７０】

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

【００７１】

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

【００７２】
したがって、本発明の二重特異性抗体は、第1および第2の抗原結合領域が異なるエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2（HER2）上のエピトープと結合する、第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含みうる。
【００７３】
本発明の二重特異性抗体の第1の抗原結合領域は、クロスブロック群1、2、3および4のいずれかに由来する抗原結合領域であってもよい。
【００７４】
クロスブロック群1
1つの局面において、本発明の二重特異性抗体は、本明細書に記載のクロスブロック群1のヒト抗体のうち1つまたは複数の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する結合）をブロックするか、またはそれらと同じHER2上のエピトープと結合する、1つの抗原結合領域を含む。
【００７５】
1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載したように判定した場合に、トラスツズマブの可溶性HER2に対する結合をクロスブロックする。
【００７６】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域を含む参照抗体（169）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。
【００７７】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：12の配列を含むVL領域を含む参照抗体（050）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。
【００７８】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域を含む参照抗体（084）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。
【００７９】
1つの態様において、抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む参照抗体の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：77の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：78の配列を含むVL領域（049）；
（b）SEQ ID NO：79の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：80の配列を含むVL領域（051）；
（c）SEQ ID NO：81の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：82の配列を含むVL領域（055）；
（d）SEQ ID NO：83の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：84の配列を含むVL領域（123）；
（e）SEQ ID NO：85の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：86の配列を含むVL領域（161）；ならびに
（f）SEQ ID NO：87の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：88の配列を含むVL領域（124）。
【００８０】
本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、1つの抗原結合領域はHER2と結合し、かつ、本明細書に記載の抗体におけるそのような配列と類似または同一のVH CDR3、VH領域および／またはVL領域配列を含む。
【００８１】
1つの態様において、抗原結合領域は、以下からなる群より選択される配列を有するVH

CDR3領域を含む：
SEQ ID NO：11（050、049、051、055）、ここで任意でVH領域はIgHV3-21-1生殖細胞系列配列に由来する；
SEQ ID NO：130、例えばSEQ ID NO：18の配列（084）、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-04生殖細胞系列配列に由来する；
SEQ ID NO：133（169、123、161、124）、例えばSEQ ID NO：4の配列（169）、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列配列に由来する。

【００８２】
1つの態様において、抗原結合領域は、図1に示されているように、抗体123、161または124のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列に由来する。

【００８３】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVH領域を含む：
（a）SEQ ID NO：9、127および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（050）を含むVH領域；ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する；
（b）それぞれSEQ ID NO：128、129および130であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（084）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-04生殖細胞系列に由来する；ならびに
（c）それぞれSEQ ID NO：131、132および133であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（169）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列に由来する。

【００８４】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域、前記の態様（a）または（b）から選択されるVH領域、ならびに、それぞれSEQ ID NO：13、XAS（ここでXはAまたはVである）およびSEQ ID NO：155であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えば、SEQ ID NO：13または20から選択されるCDR1配列、AASまたはVASであるCDR2、ならびにSEQ ID NO：14および21から選択されるCDR3配列を含むVL領域（050、084）を含み；ここで任意でVL領域はIgKV1-12-01生殖細胞系列に由来する。

【００８５】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、前記の態様（c）であるVH領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DXS（ここでX＝AまたはT）およびSEQ ID NO：156であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）を含み、ここで任意でVL領域はIgKV3-11-01に由来する。

【００８６】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み；かつそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）を任意で含む。

【００８７】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み；かつそれぞれSEQ ID NO：13、AASおよびSEQ ID NO：14であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（050）を含む。

【００８８】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み；かつそれぞれSEQ ID NO：20、VASおよびSEQ ID NO：21であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（084）を含む。

【００８９】
別の態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、以下のものを含む：
（ａ）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域および任意で、SEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）；
（ｂ）SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：12の配列を含むVL領域（050）；
（ｃ）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：19の配列を含むVL領域（084）；
（ｄ）SEQ ID NO：77の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：78の配列を含むVL領域（049）；
（ｅ）SEQ ID NO：79の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：80の配列を含むVL領域（051）；
（ｆ）SEQ ID NO：81の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：82の配列を含むVL領域（055）；
（ｇ）SEQ ID NO：83の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：84の配列を含むVL領域（123）；
（ｈ）SEQ ID NO：85の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：86の配列を含むVL領域（161）；
（ｉ）SEQ ID NO：87の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：88の配列を含むVL領域（124）；ならびに／または
（ｊ）前記の抗体のいずれかの変異体であって、好ましくは最大で1つ、2つもしくは3つのアミノ酸修飾、より好ましくはアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換、および、新たなアミノ酸が、図1もしくは2におけるアラインメントを行った配列において同じ位置のアミノ酸、特に対応するコンセンサス配列において「X」と示された位置のアミノ酸であるような置換）を有する、前記変異体。
【００９０】
クロスブロック群2
本発明の抗体の1つの局面において、二重特異性抗体は、HER2に対する（例えば、可溶性HER2）に対する結合をブロックするか、または本明細書に記載のクロスブロック群2のヒト抗体のうちの1つもしくは複数と同じ、HER2上のエピトープと結合する、1つの抗原結合領域を含む。
【００９１】
1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載したように判定した場合に、ペルツズマブの可溶性HER2に対する結合をクロスブロックする。
【００９２】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む参照抗体（025）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。
【００９３】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域を含む参照抗体（091）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。
【００９４】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：39の配列を含むVL領域を含む参照抗体（129）の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する。
【００９５】
1つの態様において、抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む参照抗体の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する：

（a）SEQ ID NO：89の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：90の配列を含むVL領域（001）；
（b）SEQ ID NO：91の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：92の配列を含むVL領域（143）；
（c）SEQ ID NO：93の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：94の配列を含むVL領域（019）；
（d）SEQ ID NO：95の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：96の配列を含むVL領域（021）；
（e）SEQ ID NO：97の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：98の配列を含むVL領域（027）；
（f）SEQ ID NO：99の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：100の配列を含むVL領域（032）
（g）SEQ ID NO：101の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：102の配列を含むVL領域（035）；
（h）SEQ ID NO：103の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：104の配列を含むVL領域（036）；
（i）SEQ ID NO：105の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：106の配列を含むVL領域（054）；ならびに
（j）SEQ ID NO：107の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：108の配列を含むVL領域（094）。

【００９６】
本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、本明細書に記載の新規抗体の配列と類似または同一のVH CDR3、VH領域および／またはVL領域配列を含む。

【００９７】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、以下からなる群より選択される配列を有するVH CDR3領域を含む：
SEQ ID NO：136、例えばSEQ ID NO：25の配列（025）、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-1生殖細胞系列配列に由来する；
SEQ ID NO：139、例えばSEQ ID NO：31の配列（091）、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-01生殖細胞系列配列に由来する；および
SEQ ID NO：142、例えばSEQ ID NO：38の配列（129）、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-01生殖細胞系列配列に由来する。

【００９８】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、図1に示されているような抗体001、143、019、021、027、032、035、036、054または094のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-1生殖細胞系列に由来する。

【００９９】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVH領域を含む：
（a）SEQ ID NO：134、135および136であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（025）を含むVH領域；ここで任意でVH領域はIgHV4-34-1生殖細胞系列に由来する；
（b）それぞれSEQ ID NO：137、138および139であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（091）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-01生殖細胞系列に由来する；ならびに
（c）それぞれSEQ ID NO：140、141および142であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（129）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-01生殖細胞系列に由来する。

【０１００】

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

【０１０１】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、前記の態様（b）から選択されるVH領域、ならびに、それぞれSEQ ID NO：33、AX_1X_2（ここでX_1はAまたはT、好ましくはAであり；X_2はSまたはF、好ましくはSである）およびSEQ ID NO：158であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばそれぞれSEQ ID NO：33、AASおよびSEQ ID NO：34であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含み（091）；ここで任意でVL領域はIgKV1D-16-01生殖細胞系列に由来する。

【０１０２】

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

【０１０３】

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

【０１０４】

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

【０１０５】

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

【０１０６】

別の態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、以下のものを含む：

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

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

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

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

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

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

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

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

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

むVL領域（032）；
（j）SEQ ID NO：101の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：102の配列を含むVL領域（035）；
（k）SEQ ID NO：103の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：104の配列を含むVL領域（036）；
（l）SEQ ID NO：105の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：106の配列を含むVL領域（054）；
（m）SEQ ID NO：106の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：108の配列を含むVL領域（094）；ならびに／または
（n）前記の抗体もしくは抗原結合領域のいずれかの変異体であって、好ましくは最大で1つ、2つもしくは3つのアミノ酸修飾、より好ましくはアミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換、および、新たなアミノ酸が、図1もしくは2の中のアラインメントを行った配列において同じ位置のアミノ酸、特に対応するコンセンサス配列において「X」と示された位置のアミノ酸であるような置換）を有する、前記変異体。

【０１０７】

クロスブロック群3

本発明の二重特異性抗体の1つの局面において、二重特異性抗体は、HER2に対する（例えば、可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、または本明細書に記載のクロスブロック群3のヒト抗体のうちの1つもしくは複数と同じ、HER2上のエピトープと結合する、抗原結合領域を含む。

【０１０８】

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

【０１０９】

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

【０１１０】

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

【０１１１】

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

【０１１２】

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

【０１１３】

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

【０１１４】

1つの態様において、抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む参照抗体の、HER2に対する（例えば可溶性HER2に対する）結合をブロックするか、またはそれと同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：109の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：110の配列を含むVL領域（105）；
（b）SEQ ID NO：111の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：112の配列を含むVL領域（1

00）；
（c）SEQ ID NO：113の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：114の配列を含むVL領域（125）；
（d）SEQ ID NO：115の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：116の配列を含むVL領域（162）；
（e）SEQ ID NO：117の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：118の配列を含むVL領域（033）；
（f）SEQ ID NO：119の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：120の配列を含むVL領域（160）
（g）SEQ ID NO：121の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：122の配列を含むVL領域（166）；
（h）SEQ ID NO：123の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：124の配列を含むVL領域（152）；ならびに
（i）SEQ ID NO：125の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：126の配列を含むVL領域（167）。

【０１１５】
本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、本明細書に記載の新規抗体の配列と類似または同一のVH CDR3、VH領域および／またはVL領域配列を含む。

【０１１６】
1つの態様において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、以下からなる群より選択される配列を有するVH CDR3領域を含む：
SEQ ID NO：148、例えばSEQ ID NO：48の配列（127）、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列配列に由来する；
SEQ ID NO：52（159）、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列配列に由来する；
SEQ ID NO：145、例えばSEQ ID NO：59の配列（098）、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-01生殖系列配列に由来する；
SEQ ID NO：154、例えばSEQ ID NO：66の配列（153）、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-03-01生殖細胞系列配列に由来する；ならびに
SEQ ID NO：151、例えばSEQ ID NO：73の配列（132）、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-01生殖細胞系列配列に由来する。

【０１１７】
1つの態様において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、図1に示されているような抗体105、100、125または162のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する。

【０１１８】
1つの態様において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、図1に示されているような抗体033、160、166、152または167のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-3-01生殖細胞系列に由来する。

【０１１９】
1つの態様において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVH領域を含む：
（a）SEQ ID NO：146、147および148であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（127）を含むVH領域；ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する；
（b）それぞれSEQ ID NO：149、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（159）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する；
（c）それぞれSEQ ID NO：143、144および145であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むV

H領域、例えばSEQ ID NO：57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（098）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-01生殖細胞系列に由来する；
（d）それぞれSEQ ID NO：152、153および154であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（153）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-03-01生殖細胞系列に由来する；ならびに
（e）それぞれSEQ ID NO：71、150および151であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（132）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-01生殖細胞系列に由来する。

【０１２０】

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

【０１２１】

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

【０１２２】

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

【０１２３】

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

【０１２４】

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

【０１２５】

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

【０１２６】

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

【０１２７】

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

【０１２８】
1つの態様において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み；かつそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を任意で含む（153）。
【０１２９】
1つの態様において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み；かつそれぞれSEQ ID NO：75、DASおよびSEQ ID NO：76であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（132）。
【０１３０】
別の態様において、二重特異性抗体または第１の抗原結合領域は、以下のものを含む：
（a）SEQ ID NO：46の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：49の配列を含むVL領域（127）；
（b）SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：53の配列を含むVL領域（159）；
（c）SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）；
（d）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域および任意で、SEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）；
（e）SEQ ID NO：70の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：74の配列を含むVL領域（132）；
（f）SEQ ID NO：109の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：110の配列を含むVL領域（105）；
（g）SEQ ID NO：111の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：112の配列を含むVL領域（100）；
（h）SEQ ID NO：113の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：114の配列を含むVL領域（125）；
（i）SEQ ID NO：115の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：116の配列を含むVL領域（162）；
（j）SEQ ID NO：117の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：118の配列を含むVL領域（033）；
（k）SEQ ID NO：119の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：120の配列を含むVL領域（160）
（l）SEQ ID NO：121の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：122の配列を含むVL領域（166）；
（m）SEQ ID NO：123の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：124の配列を含むVL領域（152）；
（o）SEQ ID NO：125の配列を含むVH領域および好ましくは、SEQ ID NO：126の配列を含むVL領域（167）；ならびに／または
（p）前記の抗体のいずれかの変異体、ここで前記変異体は好ましくは多くとも1個、2個もしくは3個のアミノ酸修飾を有し、より好ましくはアミノ酸置換（例えば保存的アミノ酸置換、および、新たなアミノ酸が、図1もしくは2におけるアラインメントを行った配列において同じ位置のアミノ酸、特に対応するコンセンサス配列において「X」と示された位置のアミノ酸であるような置換）を有する。
【０１３１】
クロスブロック群4
本発明の二重特異性抗体の1つの局面において、二重特異性抗体は、実施例14に記載したように判定した場合に、HER2と結合するが、トラスツズマブ、ペルツズマブ、F5およびC1のいずれかのVHおよびVL配列を含む任意で固定化形態にある第2の抗体の可溶性HER2に

対する結合はブロックしない、抗原結合領域を含む。

【０１３２】

本発明の抗体の追加的または代替的な局面において、抗原結合領域は、クロスブロック群4のヒト抗体の1つまたは複数のHER2に対する結合をブロックするかまたはクロスブロックする。

【０１３３】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体のHER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO：165の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域とを含み（005）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【０１３４】

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

【０１３５】

1つの態様において、抗原結合領域は、実施例14に記載した通りに判定した場合に、任意で固定化されている参照抗体のHER2に対する結合をブロックし、ここで参照抗体はSEQ ID NO：179の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：183の配列を含むVL領域とを含み（059）、好ましくは、本抗体は完全にブロックする抗体である。

【０１３６】

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

【０１３７】

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

【０１３８】

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

【０１３９】

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

【０１４０】

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

【０１４１】

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

【０１４２】

1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域を含みかつSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域を任意で含む抗体（005）と、同じエピトープに結合す

る。
【０１４３】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：172の配列を含むVH領域を含みかつSEQ ID NO：176の配列を含むVL領域を含む抗体（006）と、同じエピトープに結合する。
【０１４４】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：179の配列を含むVH領域を含みかつSEQ ID NO：183の配列を含むVL領域を含む抗体（059）と、同じエピトープに結合する。
【０１４５】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：186の配列を含むVH領域を含みかつSEQ ID NO：190の配列を含むVL領域を含む抗体（060）と、同じエピトープに結合する。
【０１４６】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：193の配列を含むVH領域を含みかつSEQ ID NO：197の配列を含むVL領域を含む抗体（106）と、同じエピトープに結合する。
【０１４７】
1つの態様において、抗原結合領域は、SEQ ID NO：200の配列を含むVH領域を含みかつSEQ ID NO：204の配列を含むVL領域を含む抗体（111）と、同じエピトープに結合する。
【０１４８】
1つの態様において、抗原結合領域は、以下からなる群より選択される少なくとも1つの抗体と、同じエピトープに結合する：
（a）SEQ ID NO：207の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：208の配列を含むVL領域とを含む抗体（041）
（b）SEQ ID NO：209の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：210の配列を含むVL領域とを含む抗体（150）、ならびに
（c）SEQ ID NO：211の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：212の配列を含むVL領域とを含む抗体（067）；
（d）SEQ ID NO：213の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：214の配列を含むVL領域とを含む抗体（072）；
（e）SEQ ID NO：215の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：216の配列を含むVL領域とを含む抗体（163）；
（f）SEQ ID NO：217の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：218の配列を含むVL領域とを含む抗体（093）；
（g）SEQ ID NO：219の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：220の配列を含むVL領域とを含む抗体（044）。
【０１４９】
本発明の二重特異性抗体の別の追加的または代替的な局面において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、本明細書に記載のHER2抗体と類似するかまたは同一である配列を含むVH CDR3、VH領域および／またはVL領域の配列を含む。
【０１５０】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するVH CDR3領域を含む：
SEQ ID NO：223、例えばSEQ ID NO：168、189、196の配列（005、060、106）、ここで任意でVH領域がIgHV5-51-1生殖系列に由来する；
SEQ ID NO：226、例えばSEQ ID NO：175の配列（006）、ここで任意でVH領域がIgHV3-23-1生殖系列配列に由来する；
SEQ ID NO：229、例えばSEQ ID NO：182の配列（059）、ここで任意でVH領域がIgHV1-18-1生殖系列配列に由来する；または
SEQ ID NO：231、例えばSEQ ID NO：203の配列（111）、ここで任意でVH領域がIgHV1-69-4生殖系列配列に由来する。
【０１５１】
1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：223のア

ミノ酸配列を含むVH CDR3領域を含み、式中、X1＝Q、HまたはL；X2＝R、A、TまたはK；X3＝G；X4＝D；X5＝Rまたは無し；X6＝Gまたは無し；X7＝YまたはF；X8＝YまたはD；X9＝Y、FまたはH；X10＝Y、D、S、FまたはN；X11＝MまたはL；およびX12＝VまたはIであり；好ましくは、式中、X1＝Q、X2＝RまたはA；X5＝X6＝無し；X7＝YまたはF；X8＝Y；X9＝F；X10＝Y；およびX12＝Vである。

【０１５２】

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

【０１５３】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、図1に示すように、抗体041、150、067、072、163または093のうちの1つのVH CDR3領域を含み、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖系列に由来する。

【０１５４】

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

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

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

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

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

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

ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖系列に由来する；

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

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

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

【０１５５】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、前記の態様（a）、（c）または（d）から選択されるVH領域を含み、かつそれぞれSEQ ID NO：232、GASおよ

びSEQ ID NO：233であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：170、184、191、198および205から選択されるCDR1配列、GASであるCDR2、ならびに171、85、192、199および206から選択されるCDR3配列を含むVL領域を含み（005、059、060、106、111）、ここで任意でVL領域はIgKV3-20-01生殖系列に由来する。

【０１５６】

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

【０１５７】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み、かつそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を任意で含む（005）。

【０１５８】

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

【０１５９】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO：184、GASおよびSEQ ID NO：185であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（059）。

【０１６０】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO：191、GASおよびSEQ ID NO：192であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（060）。

【０１６１】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO：198、GASおよびSEQ ID NO：199であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（106）。

【０１６２】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域と、それぞれSEQ ID NO：205、GASおよびSEQ ID NO：206であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域とを含む（111）。

【０１６３】

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

【０１６４】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：221のCDR1配列（式中、X1＝S、X2＝TおよびX3＝S）；SEQ ID NO：222のCDR2配列（式中、X1＝Yお

およびX2＝H）；ならびにSEQ ID NO：223のCDR3配列（式中、X1＝Q、X2＝A、X3＝G、X4＝D、X5＝X6＝無し、X7＝X8＝Y、X9＝Y、X10＝N、X11＝M、およびX12＝V）を含むVH領域と、SEQ ID NO：232のCDR1配列（式中、X1＝X2＝S）；CDR2配列GAS；ならびにSEQ ID NO：233のCDR3配列（式中、X1＝Q、X2＝S、X3＝X4＝無しおよびX5＝L）を含むVL領域とを含む（150）。

【０１６５】

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

【０１６６】

1つの態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：221のCDR1配列（式中、X1＝S、X2＝TおよびX3＝S）；SEQ ID NO：222のCDR2配列（式中、X1＝YおよびX2＝D）；ならびにSEQ ID NO：223のCDR3配列（式中、X1＝Q、X2＝K、X3＝G、X4＝D、X5＝X6＝無し、X7＝Y、X8＝Y、X9＝F、X10＝N、X11＝L、およびX12＝V）を含むVH領域と、SEQ ID NO：232のCDR1配列（式中、X1＝X2＝S）；CDR2配列GAS；ならびにSEQ ID NO：233のCDR3配列（式中、X1＝Q、X2＝S、X3＝P、X4＝RおよびX5＝L）を含むVL領域とを含む（072）。

【０１６７】

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

【０１６８】

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

【０１６９】

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

【０１７０】

別の態様において、二重特異性抗体または第1の抗原結合領域は、以下のものを含む：

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

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

含むVL領域（006）、
（c）SEQ ID NO：179の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：183の配列を含むVL領域（059）、
（d）SEQ ID NO：186の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：190の配列を含むVL領域（060）、
（e）SEQ ID NO：193の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：197の配列を含むVL領域（106）、
（f）SEQ ID NO：200の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：204の配列を含むVL領域（111）、
（g）SEQ ID NO：297の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：208の配列を含むVL領域（041）、
（h）SEQ ID NO：209の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：210の配列を含むVL領域（150）、
（i）SEQ ID NO：211の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：212の配列を含むVL領域（067）、
（j）SEQ ID NO：213の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：214の配列を含むVL領域（072）、
（k）SEQ ID NO：215の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：216の配列を含むVL領域（163）、
（l）SEQ ID NO：217の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：218の配列を含むVL領域（093）、
（m）SEQ ID NO：219の配列を含むVH領域、および好ましくはSEQ ID NO：220の配列を含むVL領域（044）、ならびに/または
（n）好ましくは多くとも1個、2個もしくは3個のアミノ酸修飾を有し、より好ましくはアミノ酸置換、例えば保存的アミノ酸置換、および新たなアミノ酸が図1もしくは2におけるアラインメントされた配列中で同じ位置に、特に対応するコンセンサス配列中で「X」によって示された位置にある置換などを有する、前記のいずれかの抗体の変種。

【０１７１】

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

本発明の抗体の別の局面において、二重特異性抗体は、好ましくは実施例14に記載したように判定した場合に、本明細書に記載の新規群1、2、3または4の抗体の1つまたは複数と同じHER2エピトープと結合するHER2抗体由来の抗原結合領域を含み；かつ、実施例12、13、15、16、17、18および19に記載したように判定される1つまたは複数の特性によってさらに特徴づけられる。

【０１７２】

したがって、本発明の二重特異性抗体の第1の抗原結合領域は、以下のHER2抗体のいずれか1つと同じであってもよい。本発明の第1のHER2抗体は、以下の特性の1つまたは複数を有しうる。

【０１７３】

1つの態様において、HER2抗体は、実施例12に記載した通りに判定した場合に、A431細胞に対する結合に関してトラスツズマブよりも低いEC_{50}値（半数効果濃度）、好ましくは0.80μg／ml、0.50μg／mlまたは0.30μg／mlよりも低いEC_{50}値を有し、かつ、好ましくは、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）；
（b）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域（084）；
（c）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）；

（d）SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域（091）；
（e）SEQ ID NO：46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：49の配列を含むVL領域（127）；
（f）SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：53の配列を含むVL領域（159）；
（g）SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）；
（h）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）；
（i）SEQ ID NO：70の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：74の配列を含むVL領域（132）；
（j）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（005）；
（k）SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：11の配列を含むVL領域（006）；ならびに
（l）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域（059）。

【０１７４】

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

【０１７５】

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

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

【０１７６】

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

（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）；
（b）SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：12の配列を含むVL領域（050）；
（c）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域（084）；
（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）；
（e）SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域（091）；
（f）SEQ ID NO：35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：39の配列を含むVL領域（129）；
（g）SEQ ID NO：46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：49の配列を含むVL領域（127）；
（h）SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：53の配列を含むVL領域（159）；
（i）SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）；
（j）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）；
（k）SEQ ID NO：70の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：74の配列を含むVL領域（132）、
（l）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（005）；ならびに
（m）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（060）。

【０１７７】

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体または第1の抗原結合領域は、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合して、細胞のリガンド非依存的増殖を阻害し、実施例16に記載した通りに判定した場合に、好ましくは増殖を少なくとも20％、より好ましくは少なくとも25％阻害し、かつ好ましくは、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）；ならびに
（b）SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：12の配列を含むVL領域（050）。

【０１７８】

追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、HER2を発現するAU565細胞と特異的に結合するが、リガンドで誘導される細胞の増殖に対して著しい影響を及ぼすこともそれを促進することもなく、実施例17に記載した通りに判定した場合に、好ましくは増殖を25％以下、より好ましくは15％以下阻害し、かつ、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）；
（b）SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：12の配列を含むVL領域（050）；
（c）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域（084）；ならびに
（d）SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）。

【０１７９】
追加的または代替的な態様において、抗HER2抗体は、HER2を発現するMCF-7細胞と特異的に結合して、リガンドで誘導される増殖を阻害し、例えば、実施例17に記載した通りに判定した場合に、それはリガンドで誘導される作用を完全に阻害するか、または細胞の全増殖を50％、例えば、60％もしくは70％もしくは80％阻害することができ、かつ、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む少なくとも1つの参照抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）；
（b）SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域（091）；
（c）SEQ ID NO：35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：39の配列を含むVL領域（129）；ならびに
（d）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域、好ましくは、SEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）。
【０１８０】
追加的または代替的な態様において、第1の抗HER2抗体は、好ましくは実施例18に従って判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞、例えばAU565細胞などによる内部移行を、トラスツズマブおよびペルツズマブよりも高度に、好ましくは内部移行を受けるトラスツズマブの量の2倍または3倍を上回って受け、かつ、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：49の配列を含むVL領域（127）；
（b）SEQ ID NO：49の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：53の配列を含むVL領域（159）；
（c）SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）；
（d）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）；ならびに
（e）SEQ ID NO：70の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：74の配列を含むVL領域（132）。
【０１８１】
好ましくは、抗体は、
（a）SEQ ID NO：46の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：49の配列を含むVL領域（127）ならびに
（b）SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）、
から選択されるVHおよびVL領域と同じエピトープと結合する。
【０１８２】
さらなる態様において、抗体はHER2のドメインIIまたはIVと結合し、ここで好ましくは抗体はHER2発現細胞の増殖を著しく促進することはなく、好ましくは実施例に、例えばそれぞれ実施例16および19に記載した通りに判定した場合に、HER2を発現する腫瘍細胞内に、トラスツズマブまたはペルツズマブよりも有効に内部移行を受けるか、またはより高度に内部移行を受ける。
【０１８３】
さらなる態様において、抗体は、実施例22に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブよりもHER2ダウンモジュレーションを増強し、例えば、抗体はHER2ダウンモジュレーションを30％超、例えば40％超または50％超というように増強したが、ここで好ましくは抗体は本発明のクロスブロック群3の抗体と同じエピトープと結合し、例えば、抗体は、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する

：
（a）SEQ ID NO：56の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：60の配列を含むVL領域（098）；
（b）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）。

【０１８４】
別の、または代替的な態様において、抗体は、実施例25に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブよりもインビボでの腫瘍成長を低下させて生存性を改善したが、ここで好ましくは抗体は、本発明のクロスブロック群1またはクロスブロック群2の抗体と同じエピトープと結合し、例えば、抗体は、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）；
（b）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域（084）；ならびに
（c）SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域（091）。

【０１８５】
別の、または代替的な態様において、抗体は、実施例26に記載した通りに判定した場合に、トラスツズマブよりもインビボでの腫瘍成長を低下させて生存性を改善したが、ここで好ましくは抗体は、本発明のクロスブロック群2またはクロスブロック群3の抗体と同じエピトープと結合し、例えば、抗体は、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）；
（b）SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域（091）；
（c）SEQ ID NO：35の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：39の配列を含むVL領域（129）；ならびに
（d）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）。

【０１８６】
より詳細には、ここで抗体は、以下からなる群より選択されるVHおよびVL領域を含む抗体と同じエピトープと結合する：
（a）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）；ならびに
（b）SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：32の配列を含むVL領域（091）。

【０１８７】
1つの態様において、結合体化された抗体は、実施例18に記載した通りに判定した場合に、AU565細胞またはA431細胞の少なくとも60％、好ましくは少なくとも70％を死滅させ、以下から選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）、
（b）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域とを含む抗体（060）、
（c）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域とを含む抗体（059）、ならびに
（d）SEQ ID NO：36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：40の配列を含むVL領域とを含む抗体（111）。

【０１８８】
別の具体的な態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、060、059、111またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくは、それらと同じエピトープと結合する。
【０１８９】
1つの態様において、前記の態様の抗体は、実施例18に記載した通りに判定した場合に、A431細胞の少なくとも80％を死滅させ、かつ、以下から選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）、ならびに
（b）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域とを含む抗体（060）。
【０１９０】
別の具体的な態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、060またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。
【０１９１】
追加的または代替的な態様において、抗体は、好ましくは実施例19に従って判定した場合に、トラスツズマブよりも、HER2を発現する腫瘍細胞、例えばAU565細胞などによる内部移行を受け、好ましくは、内部移行を受けるトラスツズマブの量の2倍または3倍を上回る内部移行を受け、かつ、以下からなる群より選択される少なくとも1つの抗体をクロスブロックする：
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域とを含む抗体（005）
（b）SEQ ID NO：8の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：11の配列を含むVL領域とを含む抗体（006）
（c）SEQ ID NO：15の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：19の配列を含むVL領域とを含む抗体（059）
（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域とを含む抗体（060）
（e）SEQ ID NO：29の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：33の配列を含むVL領域とを含む抗体（106）
（f）SEQ ID NO：36の配列を含むVH領域とSEQ ID NO：40の配列を含むVL領域とを含む抗体（111）。
【０１９２】
別の具体的な態様において、前記の態様の抗体は、抗体005、006、059、060、106、111またはそれらの組み合わせを完全にクロスブロックし、好ましくはそれらと同じエピトープと結合する。
【０１９３】
二重特異性抗体
1つの態様において、抗体は、（i）本明細書で定義したようなHER2抗体（例えば、クロスブロック群1、2、3または4の抗体）の第1の抗原結合領域と、（ii）CD3に結合する抗体の抗原結合領域を含む第2の抗体とを含む、二重特異性抗体である。
【０１９４】
第1の抗原結合領域
1つの態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR3配列（例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005））を含むVH領域を含む。1つの特定の態様において、第1の抗原結合領域は、SEQ ID NO：4であるCDR3配列（169）を含むVH領域を含む。
【０１９５】
1つの態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したクロスブロック群1、2

、3または4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み、例えば、SEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（169）、またはSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（025）、またはSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（153）、またはSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2 CDR3配列（005）を含むVH領域を含む。1つの特定の態様において、第1の抗原結合領域は、CDR1、CDR2およびCDR3配列SEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（169）を含むVH領域を含む。

【０１９６】

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

【０１９７】

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

【０１９８】

1つの態様において、第1の抗原結合領域は、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含み、かつ本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4の抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む。

【０１９９】

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

【０２００】

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

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

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

を含むVL領域（025）；
（c）SEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（153）；ならびに
（d）SEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）。

【０２０１】

1つの特定の態様において、それぞれ、VH領域は、SEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含み、VL領域は、SEQ ID：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含む（169）。

【０２０２】

さらなる、または代替的な態様において、第1の抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む：
（a）SEQ ID NO：9、127および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（050）を含むVH領域；ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する；
（b）それぞれSEQ ID NO：128、129および130であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（084）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-69-04生殖細胞系列に由来する；ならびに
（c）それぞれSEQ ID NO：137、138および139であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（091）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV4-34-01生殖細胞系列に由来する；ならびに
（d）それぞれSEQ ID NO：140、141および142であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（129）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-30-01生殖細胞系列に由来する、
（e）SEQ ID NO：146、147および148であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（127）を含むVH領域；ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する；
（f）それぞれSEQ ID NO：149、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（159）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-01生殖細胞系列に由来する；
（g）それぞれSEQ ID NO：143、144および145であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（098）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-01生殖細胞系列に由来する；
（h）それぞれSEQ ID NO：71、150および151であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（132）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-01生殖細胞系列に由来する；
（i）それぞれSEQ ID NO：221、222および223であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（060）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖細胞系列に由来する；
（j）それぞれSEQ ID NO：194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（106）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV5-51-1生殖細胞系列に由来する；
（k）それぞれSEQ ID NO：224、225および226であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（006）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV3-23-1生殖細胞系列に由来する；
（l）それぞれSEQ ID NO：227、228および229であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例えばSEQ ID NO：180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列（059）を含むVH領域、ここで任意でVH領域はIgHV1-18-1生殖細胞系列に由来する；ならびに
（m）それぞれSEQ ID NO：230、202および231であるCDR1、CDR2およびCDR3配列、例え

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

【０２０３】

第2の抗原結合領域

前記の態様の任意の1つにおいて、第2の抗原結合領域はCD3抗体に由来しうる。

【０２０４】

1つの態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：244のVH CDR3配列を含むCD3抗体に由来する（huCLB-T3/4）。

【０２０５】

1つのさらなる態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：246のVL CDR3配列を含むCD3抗体に由来する（huCLB-T3/4）。

【０２０６】

さらなる態様において、第2の抗原結合領域は、以下からなる群より選択されるVH領域を含む抗体であるCD3抗体に由来する：

（a）それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）；

（b）SEQ ID NO：234のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（YTH12.5）；

（c）SEQ ID NO：238のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huOKT3-C114S-gLC）；ならびに

（d）SEQ ID NO：236のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（HUM291）。

【０２０７】

1つのさらなる態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：234のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、ならびにSEQ ID NO：235のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含むCD3抗体に由来する（YTH12.5）。

【０２０８】

1つの具体的な態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：234の配列を含むVH領域（YTH12.5）およびSEQ ID NO：235の配列を含むVL領域（YTH12.5）を含むCD3抗体に由来する。

【０２０９】

1つの態様において、第2の抗原結合領域は、それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、ならびに任意でそれぞれSEQ ID NO：245、DTSおよび246であるVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含むCD3抗体に由来する（huCLB-T3/4）。

【０２１０】

1つの具体的な態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）および任意でSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域（huCLB-T3/4）を含むCD3抗体に由来する。

【０２１１】

1つの態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：238のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、ならびにSEQ ID NO：239のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含むCD3抗体に由来する（huOKT3-C114S-gLC）。

【０２１２】

1つの具体的な態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：238の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：239の配列を含むVL領域を含むCD3抗体に由来する（huOKT3-C114S-gLC）。

【０２１３】

1つの態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：236のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、ならびにSEQ ID NO：237のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含むCD3抗体に由来する（HUM291）。

【０２１４】

1つの具体的な態様において、第2の抗原結合領域は、SEQ ID NO：236の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：237の配列を含むVL領域を含むCD3抗体に由来する（HUM291）。

【０２１５】

二重特異性抗体の具体的な組み合わせ

本発明の1つの態様は、SEQ ID NO：244（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005）を含むVH領域を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２１６】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：244（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO：246（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005）を含むVH領域、および本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：7、28、69または171（169、025、153または005）を含むVL領域を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２１７】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：242、243および244（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：2、3および4（169）、SEQ ID NO：23、24および25（025）、SEQ ID NO：64、65および66（153）、またはSEQ ID NO：166、167および168（005）を含むVH領域を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２１８】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：242、243および244（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、ならびにSEQ ID NO：245、DTSおよび246（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびに本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えば、SEQ ID NO：2、3、4、6、DASおよび7（169）、SEQ ID NO：23、24、25、27、AASおよび28（025）、SEQ ID NO：64、65、66、68、DASおよび69（153）またはSEQ ID NO：166、167、168、170、GASおよび171（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２１９】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：240（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のVH領域を含む第2の抗原結合領域、および本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域、例えばSEQ ID NO：1、22、63または165（169、025、153または005）を含む第1の抗原結合領域を有する二重特異性抗体に関する。

【０２２０】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：240および241（huCLB-T3/4）に記載のCD3抗体のVH領域およびVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域およびVL領域、例えばSEQ ID NO：1および5（169）、22および26（025）、63および67（153）または165および169（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２１】

本発明の1つの態様は、SEQ ID NO：234（YTH12.5）に記載のCD3抗体のVH CDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または0

05）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２２】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：234（YTH12.5）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO：235（YTH12.5）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005）、および本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：7、28、69または171（169、025、153または005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２３】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：234（YTH12.5）に記載のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体の第1の抗原結合領域、例えばSEQ ID NO：2、3および4（169）、SEQ ID NO：23、24および25（025）、SEQ ID NO：64、65および66（153）またはSEQ ID NO：166、167および168（005）とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２４】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：234（YTH12.5）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域、ならびにSEQ ID NO：235（YTH12.5）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびに本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：2、3、4、6、DASおよび7（169）、SEQ ID NO：23、24、25、27、AASおよび28（025）、SEQ ID NO：64、65、66、68、DASおよび69（153）またはSEQ ID NO：166、167、168、170、GASおよび171（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２５】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：234（YTH12.5）に記載のCD3抗体のVH領域を含む第2の抗原結合領域と、クロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体の第1の抗原結合領域、例えばSEQ ID NO：1、22、63または165（169、025、153または005）とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２６】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：234および235（YTH12.5）に記載のCD3抗体のVH領域およびVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域およびVL領域、例えばSEQ ID NO：1および5（169）、22および26（025）、63および67（153）または165および169（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２７】

本発明の1つの態様は、SEQ ID NO：236（HUM291）に記載のCD3抗体のVH CDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２８】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：236（HUM291）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVH領域、およびSEQ ID NO：237（HUM291）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005）、および本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：7、28、69または171（169、025、153または005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２２９】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：236（HUM291）に記載のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体の第1の抗原結合領域、例えばSEQ ID NO：2、3および4（169）、SEQ ID NO：23、24および25（025）、SEQ ID NO：64、65および66（153）またはSEQ ID NO：166、167および168（005）とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３０】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：236（HUM291）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびにSEQ ID NO：237（HUM2915）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびにCDR1、CDR2および本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：2、3、4、6、DASおよび7（169）、SEQ ID NO：23、24、25、27、AASおよび28（025）、SEQ ID NO：64、65、66、68、DASおよび69（153）またはSEQ ID NO：166、167、168、170、GASおよび171（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３１】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：236（HUM291）に記載のCD3抗体のVH領域を含む第2の抗原結合領域と、クロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体の第1の抗原結合領域、例えばSEQ ID NO：1、22、63または165（169、025、153または005）とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３２】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：236および237（HUM291）に記載のCD3抗体のVH領域およびVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域およびVL領域、例えばSEQ ID NO：1および5（169）、22および26（025）、63および67（153）または165および169（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３３】

本発明の1つの態様は、SEQ ID NO：238（huOKT3-C114S-gLC）に記載のCD3抗体のVH CDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３４】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：238（huOKT3-C114S-gLC）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：239（huOKT3-C114S-gLC）に記載のCD3抗体のCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVH領域、例えばSEQ ID NO：4、25、66または168（169、025、153または005）、および本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：7、28、69または171（169、025、153または005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３５】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：238（huOKT3-C114S-gLC）に記載のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体の第1の抗原結合領域、例えばSEQ ID NO：2、3および4（169）、SEQ ID NO：23、24および25（025）、SEQ ID NO：64、65および66（153）またはSEQ ID NO：166、167および168（005）とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３６】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：238（huOKT3-C114S-gLC）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域ならびにSEQ ID NO：239（huOKT3-C114S-gLC）に記載のCD3抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含

むVH領域ならびに本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域、例えばSEQ ID NO：2、3、4、6、DASおよび7（169）、SEQ ID NO：23、24、25、27、AASおよび28（025）、SEQ ID NO：64、65、66、68、DASおよび69（153）またはSEQ ID NO：166、167、168、170、GASおよび171（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３７】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：238（huOKT3-C114S-gLC）に記載のCD3抗体のVH領域を含む第2の抗原結合領域と、クロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体の第1の抗原結合領域、例えばSEQ ID NO：1、22、63または165（169、025、153または005）とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３８】

本発明の別の態様は、SEQ ID NO：238および239（huOKT3-C114S-gLC）に記載のCD3抗体のVH領域およびVL領域を含む第2の抗原結合領域と、本明細書に定義したクロスブロック群1、2、3または4のHER2抗体のVH領域およびVL領域、例えばSEQ ID NO：1および5（169）、22および26（025）、63および67（153）または165および169（005）を含む第1の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体に関する。

【０２３９】

1つの追加的または代替的な態様において、二重特異性抗体は、実施例21に記載するようにAU565のT細胞媒介性細胞傷害を誘導し、かつ、実施例21に記載されたhuCLB-T3/4 × HER2-169、huCLB-T3/4 × HER2 153およびhuCLB-T3/4xHER2 005からなる群より選択される二重特異性抗体の少なくとも1つと同じエピトープと結合する、HER2×CD3二重特異性抗体である。

【０２４０】

1つのさらなる態様において、本発明の二重特異性抗体の第1および第2の抗原結合領域は、ヒト抗体VH配列、および任意でヒト抗体VL配列を含む。

【０２４１】

1つのさらなる態様において、本発明の二重特異性抗体の第1および第2の抗原結合領域は、重鎖抗体由来である。

【０２４２】

1つのさらなる態様において、本発明の二重特異性抗体の第1および第2の抗原結合領域は、第1および第2の軽鎖を含む。

【０２４３】

1つのさらなる態様において、本発明の二重特異性抗体の第1および第2の抗原結合領域は、前記第1および第2の軽鎖が異なる。

【０２４４】

Fc領域

本発明の1つの局面において、本発明の二重特異性HER2×CD3抗体は第1のFc領域および第2のFc領域をさらに含み、これらのFc領域は第1および第2のFabアームの中に含まれてもよく、これらのFabアームはそれぞれ上記の第1および第2の抗原結合領域（またはその逆のもの）をさらに含む。

【０２４５】

本発明の別の局面において、二重特異性HER2×CD3抗体は、第1および第2の抗原結合領域をそれぞれ含む第1および第2のFabアームを含む。典型的には、第1および第2の抗原結合領域は、それぞれHER2結合ドメインおよびCD3結合ドメインである。二重特異性HER2×CD3抗体は第1および第2のFc領域をさらに含み、典型的にはそれぞれ第1および第2の重鎖ポリペプチドを含む。

【０２４６】

本発明の1つの局面において、二重特異性HER2×CD3抗体は、第1の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第2の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む。

【０２４７】
本発明の別の局面において、二重特異性HER2×CD3抗体は、第2の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第2のFabアーム、ならびに第1の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第1のFabアームを含む。
【０２４８】
第1および第2のFc領域はそれぞれ、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を非限定的に含む任意のアイソタイプのものであってもよく、1つまたは複数の変異または修飾を含んでもよい。1つの態様において、第1および第2のFc領域のそれぞれはIgG4アイソタイプのものであるか、またはそれに由来し、任意で1つまたは複数の変異または修飾を伴う。1つの態様において、第1および第2のFc領域のそれぞれはIgG1アイソタイプのものであるか、またはそれに由来し、任意で1つまたは複数の変異または修飾を伴う。別の態様において、Fc領域の一方はIgG1アイソタイプのものであり、かつもう一方はIgG4アイソタイプであるか、またはそのような各々のアイソタイプに由来し、任意で1つまたは複数の変異または修飾を伴う。
【０２４９】
1つの態様において、一方または両方のFc領域はエフェクター機能欠損性である。例えば、Fc領域はIgG4アイソタイプのものであってもよく、または、ADCCなどのエフェクター機能を媒介する能力が低下するかもしくはさらには消失するように変異させた非IgG4型、例えばIgG1、IgG2もしくはIgG3のものであってもよい。そのような変異は、例えば、Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006)およびHezareh M, J Virol.;75 (24):12161-12168 (2001)に記載されている。その他の例示的な修飾は、実施例の項、例えば実施例27などに記載されている。
【０２５０】
1つの態様において、一方または両方のFc領域はIgG1野生型配列（SEQ ID NO：247、実施例21参照）を含む。
【０２５１】
1つの態様において、Fc領域の一方または両方は、Asn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含むか、またはグリコシル化特性が変化するように他の様式で操作される。例えば、IgG1 Fc領域では、N297Q変異を利用してAsn結合型グリコシル化部位を除去することができる。したがって、1つの具体的な態様において、一方または両方のFc領域は、N297Q変異を有するIgG1野生型配列（SEQ ID NO：250、実施例21参照）を含む。
【０２５２】
さらなる態様において、Fc領域の一方または両方は、例えば、US2009317869号に記載されたように、もしくはvan Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350に記載されたように抗体産生中に培地に化合物を添加することによって、または例えばYamane-Ohnuki et al (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614に記載されたようにFUT8ノックアウト細胞を用いることによって、フコースを減少させ、そのためADCCを増強するような糖質操作を受けている（glyco-engineered）。または、ADCCを、Umana et al. (1999) Nature Biotech 17:176によって記載された方法を用いて最適化することもできる。さらなる態様において、Fc領域の一方または両方は、例えば、Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411に記載されたように、補体活性化を強化するように操作されている。
【０２５３】
本発明の1つの態様において、第1または第2の抗原結合領域またはその一部、例えば1つまたは複数のCDRは、ラクダ科の種のもの（WO 2010001251号参照）であるか、または軟骨魚類の種（例えばテンジクザメ）のものである。1つの態様において、第1および第2の抗原結合領域または重鎖は、重鎖抗体由来である。
【０２５４】
1つの態様において、第1および／または第2のFc領域は、薬物、プロドラッグもしくは毒素と結合体化されているか、またはそれに対するアクセプター基を含む。そのようなアクセプター基は、例えば、非天然アミノ酸であってよい。

【０２５５】
1つの局面において、本発明の二重特異性抗体は、第1のCH3領域を含む第1のFc領域、および第2のCH3領域を含む第2のFc領域を含み、ここで第1および第2のCH3領域の配列は異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強い。これらの相互作用、およびそれらをいかにして達成しうるかに関するこれ以上の詳細は、WO 2011131746号（Genmab）として公開されたPCT/EP2011/056388号に提示されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。
【０２５６】
本明細書および実施例で説明しているように、CH3領域内に少数の極めて保存的な非対称変異のみを含む、1種のホモ二量体の出発HER2抗体と1種のホモ二量体の出発CD3抗体とに基づく特定の方法を用いて、安定した二重特異性HER2×CD3分子を高収率で入手することができる。非対称変異とは、前記第1および第2のCH3領域の配列がアミノ酸置換を同一でない位置に含むことを意味する。
【０２５７】
1つの態様において、第1のFc領域は、366、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ、第1および第2のFc領域は同じ位置では置換されていない。
【０２５８】
1つの態様において、第1のFc領域は位置366にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。1つの態様において、位置366のアミノ酸は、Ala、Asp、Glu、His、Asn、ValまたはGlnから選択される。
【０２５９】
1つの態様において、第1のFc領域は位置368にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。
【０２６０】
1つの態様において、第1のFc領域は位置370にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。
【０２６１】
1つの態様において、第1のFc領域は位置399にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。
【０２６２】
1つの態様において、第1のFc領域は位置405にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。
【０２６３】
1つの態様において、第1のFc領域は位置407にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、405および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。
【０２６４】
1つの態様において、第1のFc領域は位置409にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域は、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。
【０２６５】
したがって、1つの態様において、前記第1および第2のCH3領域の配列は、非対称変異、

すなわち、例えば、CH3領域の一方における位置405の変異およびもう一方のCH3領域内の位置409の変異といった、2つのCH3領域内の異なる位置にある変異を含む。

【０２６６】

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

【０２６７】

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

【０２６８】

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

【０２６９】

1つのさらなる態様において、前記第1のFc領域は、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。1つのさらなる態様において、前記第1のFc領域は、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０２７０】

1つのさらなる別の態様において、前記第1のFc領域は、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０２７１】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ

酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを含み、前記第2のFc領域は、位置409にLysを含み、かつ（a）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、または（b）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０２７２】

別の態様において、前記第1のFc領域は位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は、位置409にLysを含み、かつ（a）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、または（b）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０２７３】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のHER2抗体は、位置409にLysを含み、かつ（a）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、または（b）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０２７４】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2のFc領域は、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

【０２７５】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407に、Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸、例えば、Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、TrpまたはCysを有する。別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する。

【０２７６】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する。

【０２７７】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407に、Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸、例えば、Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、TrpまたはCysを有し、位置409にLysを有する。

【０２７８】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【０２７９】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを有し、前記第2のFc領域は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【０２８０】

別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のFc領域は、位置407に、Tyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸、例えば、Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、His、Asn、Pro、TrpまたはCysを有

し、位置409にLysを有する。
【０２８１】
別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のFc領域は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。
【０２８２】
別の態様において、前記第1のFc領域は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2のFc領域は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。
【０２８３】
1つの態様において、第1のFc領域は、位置409に、Lys、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Phe、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrまたはCysを有し、第2のFc領域は、
（i）位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、例えば、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asp、Asn、Glu、Gln、Pro、Trp、TyrもしくはCysを有するか、または
（ii）位置370にTrpを有するか、または
（iii）位置399にAsp、Cys、Pro、GluおよびGln以外のアミノ酸、例えば、Phe、Leu、Met、Gly、Ala、Val、Ile、Ser、Thr、Lys、Arg、His、Asn、Trp、TyrもしくはCysを有するか、または
（iv）位置366にLys、Arg、Ser、ThrおよびTrp以外のアミノ酸、例えば、Phe、Leu、Met、Ala、Val、Gly、Ile、Asn、His、Asp、Glu、Gln、Pro、TyrもしくはCysを有する。
【０２８４】
1つの態様において、第1のFc領域は位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のホモ二量体タンパク質は、
（i）位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrpを有するか、または
（ii）位置370にTrpを有するか、または
（iii）位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyrを有するか、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetまたはTyrを有する。
【０２８５】
1つの態様において、第1のFc領域は位置409にArgを有し、第2のホモ二量体タンパク質は、
（i）位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrpを有するか、または
（ii）位置370にTrpを有するか、または
（iii）位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyrを有するか、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Glnを有する。
【０２８６】
上記に特定されたアミノ酸置換に加えて、前記第1および第2のホモ二量体タンパク質が、野生型Fc配列に比してさらなるアミノ酸置換、欠失または挿入を含んでもよい。
【０２８７】
1つのさらなる態様において、第1および第2のFc領域を含む前記第1および第2のFabアーム（または重鎖定常ドメイン）は、明記した変異を除き、以下から独立に選択される配列を含む：

(IgG1m(a)):
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:256)
(IgG1m(f)):
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:257), および
(IgG1m(ax)):
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:258)

。

【０２８８】

1つの態様において、前記第1のFc領域も前記第2のFc領域も、（コア）ヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない。

【０２８９】

1つのさらなる態様において、前記第1および前記第2のFc領域は両方とも、（コア）ヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む。

【０２９０】

別の具体的な態様において、一方または両方のFabアームは、SEQ ID NO：247、248、249、250、251、252、253、254および255から独立に選択される重鎖定常領域配列を含む（実施例21参照）。

【０２９１】

1つの具体的な例において、CD3抗体は、SEQ ID NO：234の配列（VH YTH12.5）を含むVH領域およびSEQ ID NO：235の配列（VL YTH12.5）を含むVL領域を有する抗体である。別の例は、SEQ ID NO：240の配列（VH huCLB-T3/4）を含むVH領域およびSEQ ID NO：241の配列（VL huCLB-T3/4）を含むVL領域を有するCD3抗体である。

【０２９２】

1つの態様において、二重特異性抗体は、（i）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を含む第1のFabアームを含み、ここでVH領域はSEQ ID NO：63のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：67のアミノ酸配列を含み（153）、ここで任意で第1のFabアームは、位置409にArgを有するか、または位置297にGlnを有するか、または位置409にArgを有しかつ位置297にGlnを有する、IgG1,κFc領域を含む；かつ（ii）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアームを含み、ここでVH領域はSEQ ID NO：171のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：172のアミノ酸配列を含み（YTH12.5）、ここで任意で第2のFabアームは、位置297にGlnを有するか、または位置405にLeuを有するか、または位置297にGlnを有しかつ位置405にLeuを有する、IgG1,κFc領域を含む。

【０２９３】

1つの態様において、二重特異性抗体は、（i）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアームを含み、ここでVH領域はSEQ ID NO：1のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：5のアミノ酸配列を含み（169）、ここで任意で第1のFabアームは、位置409にArgを有するIgG1,κFc領域を含む；かつ（ii）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアームを含み、ここでVH領域はSEQ ID NO：171のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：172のアミノ酸配列を含み（YTH12.5）、ここで任意で第2のFabアームは、位置297にGlnを有するか、または位置405にLeuを有するか、または位置297にGlnを有しかつ位置405にLeuを有する、IgG1,κFc領域を含む。

【０２９４】

1つの態様において、二重特異性抗体は、（i）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアームを含み、ここでVH領域はSEQ ID NO：63のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：67のアミノ酸配列を含み（153）、ここで任意で第1のFabアームは、位置409に

Argを有するか、または位置297にGlnを有するか、または位置409にArgを有しかつ位置297にGlnを有する、IgG1,κFc領域を含む；かつ（ii）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアームを有し、ここでVH領域はSEQ ID NO：173のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：174のアミノ酸配列を含み（huCLB-T3/4）、ここで任意で第2のFabアームは、位置297にGlnを有するか、または位置405にLeuを有するか、または位置297にGlnを有しかつ位置405にLeuを有する、IgG1,κFc領域を含む。

【０２９５】

1つの態様において、二重特異性抗体は、（i）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第1のFabアームを含み、ここでVH領域はSEQ ID NO：1のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：5のアミノ酸配列を含み（169）、ここで任意で第1のFabアームは、位置409にArgを有するIgG1,κFc領域を含む；かつ（ii）Fc領域ならびにVHおよびVL配列を有する第2のFabアームを含み、ここでVH領域はSEQ ID NO：173のアミノ酸配列を含み、VL領域はSEQ ID NO：174のアミノ酸配列を含み（huCLB-T3/4）、ここで任意で第2のFabアームは、位置297にGlnを有するか、または位置405にLeuを有するか、または位置297にGlnを有しかつ位置405にLeuを有する、IgG1,κFc領域を含む。

【０２９６】

上記の態様の任意のものにおいて、第1および／または第2のFabアームは、CH1配列および／またはCL配列をさらに含んでもよい。

【０２９７】

1つの態様において、二重特異性抗体は、

IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-YTH12.5-F405L, IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L, IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L, IgG1-HER2-153-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-YTH12.5-F405L, IgG1-HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L, IgG1- HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L, IgG1- HER2-153-N297Q-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L, IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-hu-CLB-T3/4-N297Q-F405L, IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-YTH12.5-F405L および IgG1-HER2-169-K409R x IgG1-YTH12.5-N297Q-F405L

からなる群より選択され、ここでITLは、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを有するIgG1,κを意味し、K409Rは、位置409にArgを有するIgG1,κを意味し、F405Lは、位置405にLeuを有するIgG1,κを意味し、N297Qは、位置297にあるGlnを意味し、太字の数字は、表1および実施例21に記載された配列を含むVHおよびVL領域を有する本明細書に記載の抗体を指す。

【０２９８】

1つのさらなる態様において、二重特異性抗体は、実施例29に記載した通りに判定した場合にAU565、NIH-3T3、A431およびA549細胞の用量依存的な死滅を誘導し、かつ、二重特異性抗体IgG1-HER2-169 × IgG1-CLBT3/4と同じエピトープと結合する。

【０２９９】

二重特異性抗体のフォーマット

本発明は、HER2を発現する腫瘍細胞のT細胞媒介性死滅を有効に促進する二重特異性HER2×CD3抗体を提供する。個々の用途に望まれる機能的特性に応じて、特定の抗原結合領域を、本発明によって提供される抗体もしくは抗原結合領域のセットから、または、例えば、本発明によって提供される抗体もしくは抗原結合領域とエピトープもしくはクロスブロック領域が共通している抗体もしくは抗原結合領域から選択することができる。二重特異性抗体のフォーマットおよび用途は数多くのさまざまなものが当技術分野において公知であり、最近、Chames and Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12: 276によって概説されている。

【０３００】

本発明の例示的な二重特異性抗体分子には、以下のものが含まれる：（i）一方がHER2エピトープに対する特異性を有し、一方がCD3に対する特異性を有する、複数の異なる抗原結合領域を含む2つのアームを有する単一の抗体、（ii）HER2エピトープに対して特異的な1つの抗原結合領域またはアーム、およびCD3エピトープに対して特異的な第2の抗原結合領域またはアームを有する単一の抗体、（iii）例えば追加のペプチドリンカーによって縦列に連結された2つのscFvを介して、HER2エピトープに対する第1の特異性およびCD3エピトープに対する第2の特異性を有する単鎖抗体；（iv）各軽鎖および重鎖が短いペプチドによる結合を通じて縦列になった2つの可変ドメインを含有する二重可変ドメイン（dual-variable-domain）抗体（DVD-Ig）（Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable DomainImmunoglobulin (DVD-Ig（商標）)Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)）；（v）化学的に結合した二重特異性$(Fab')_2$断片；（vi）2つの単鎖ダイアボディの融合の結果、標的抗原のそれぞれに対して2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体が生じるTandab；（vii）scFvとダイアボディの組み合わせの結果、多価分子が生じるフレキシボディ（flexibody）；（viii）プロテインキナーゼAの中の「二量体化・ドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「dock and lock」分子、これはFabに適用されると、2つの同一なFab断片が1つの異なるFab断片と連結したものからなる三価の二重特異性結合タンパク質を生じうる；（ix）例えば、2つのscFvがヒトFabアームの両端と融合したものを含む、いわゆるスコルピオン（Scorpion）分子；ならびに（x）ダイアボディ。

【０３０１】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、ダイアボディ、クロスボディ（cross-body）、または本発明に記載したもののような制御下でのFabアーム交換を介して入手しうる二重特異性抗体である。

【０３０２】

さまざまなクラスの二重特異性抗体の例には、以下のものが非限定的に含まれる：

・ヘテロ二量体化を強制的に行わせる相補的CH3ドメインを有するIgG様分子

・分子の両側がそれぞれ、少なくとも2種類の異なる抗体のFab断片またはFab断片の一部を含む、組換えIgG様二重標的指向性分子；

・完全長IgG抗体が追加のFab断片またはFab断片の一部と融合されたIgG融合分子；

・単鎖Fv分子または安定化されたダイアボディが重鎖定常ドメイン、Fc領域またはそれらの一部と融合されたFc融合分子；

・複数の異なるFab断片が融合して1つになったFab融合分子；

・複数の異なる単鎖Fv分子または異なるダイアボディまたは異なる重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）が互いに、または別のタンパク質もしくは担体分子と融合された、ScFvおよびダイアボディを基にした抗体ならびに重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）。

【０３０３】

相補的CH3ドメイン分子を有するIgG様分子の例には、Triomab／Quadroma（Trion Pharma／Fresenius Biotech）、Knobs-into-Holes（Genentech）、CrossMAb（Roche）およびelectrostatically-matched（Amgen）、LUZ-Y（Genentech）、Strand Exchange Engineered Domain body（SEEDbody）（EMD Serono）、Biclonic（Merus）ならびにDuoBody（GenmabA／S）が非限定的に含まれる。

【０３０４】

組換えIgG様二重標的指向性分子の例には、Dual Targeting（DT）-Ig（GSK／Domantis）、Two-in-one抗体（Genentech）、Cross-linked Mab（Karmanos Cancer Center）、mAb^2（F-Star）およびCovX-body（CovX／Pfizer）が非限定的に含まれる。

【０３０５】

IgG融合分子の例には、Dual Variable Domain（DVD）-Ig（Abbott）、IgG-like Bispecific（ImClone／Eli Lilly）、Ts2Ab（Medlmmune／AZ）およびBsAb（Zymogenetics）、HERCULES（Biogen Idec）ならびにTvAb（Roche）が非限定的に含まれる。

【０３０６】
Fc融合分子の例には、ScFv／Fc融合体（Academic Institution）、SCORPION（Emergent BioSolutions／Trubion、Zymogenetics／BMS）、Dual Affinity Retargeting Technology（Fc-DART）（MacroGenics）およびDual(ScFv)$_2$-Fab（National Research Center for Antibody Medicine-China）が非限定的に含まれる。
【０３０７】
Fab融合二重特異性抗体の例には、F(ab)$_2$（Medarex／AMGEN）、Dual-ActionまたはBis-Fab（Genentech）、Dock-and-Lock（DNL）（ImmunoMedics）、二価二重特異性（Bivalent Bispecific）（Biotecnol）およびFab-Fv（UCB-Celltech）が非限定的に含まれる。
【０３０８】
ScFvに基づく抗体、ダイアボディに基づく抗体およびドメイン抗体の例には、Bispecific T Cell Engager（BiTE）（Micromet、Tandem Diabody（Tandab）（Affimed）、Dual Affinity Retargeting Technology（DART）（MacroGenics）、単鎖ダイアボディ（Single-chain Diabody）（Academic）、TCR様抗体（TCR-like Antibodies）（AIT, ReceptorLogics）、ヒト血清アルブミンscFv融合体（Human Serum Albumin ScFv Fusion）（Merrimack）およびCOMBODY（Epigen Biotech）、二重標的ナノボディ（dual targeting nanobody）（Ablynx）、二重標的性の重鎖のみのドメイン抗体（dual targeting heavy chain only domain antibody）が非限定的に含まれる。
【０３０９】
二重特異性抗体の調製方法
本発明の二重特異性抗体を調製する方法には、WO 2008119353号（Genmab）、WO 2011131746号（Genmab）に記載されたもの、およびvan der Neut-Kolfschoten et al.（Science. 2007 Sep 14;317(5844):1554-7）によって報告されたものが含まれる。二重特異性抗体を調製するために有用な他のプラットフォームの例には、BiTE（Micromet）、DART（MacroGenics）、FcabおよびMab^2（F-star）、Fc-engineered IgG1（Xencor）またはDuoBody（Fabアーム交換に基づく、Genmab、本出願では以下および例えば実施例20に記載）が非限定的に含まれる。
【０３１０】
ハイブリッドハイブリドーマ法および化学的結合法などの従来の方法（Marvin and Zhu（2005）Acta Pharmacol Sin 26: 649）を用いることもできる。異なる重鎖および軽鎖からなる2つの抗体を宿主細胞に共発現させることにより、所望の二重特異性抗体に加えて、可能な抗体産物の混合物が生じ、それらを続いて、例えばアフィニティークロマトグラフィーまたは類似の方法によって単離することができる。
【０３１１】
複数の異なる抗体構築物の共発現による機能的な二重特異性産物の形成にとって有利な戦略、例えば、Lindhofer et al.（1995 J Immunol 155:219）によって記載された方法を用いることもできる。複数の異なる抗体を産生するラットおよびマウスのハイブリドーマの融合では、種に拘束された選好的な重鎖／軽鎖対合が理由で、限られた数のヘテロ二量体タンパク質しか得られない。ホモ二量体を上回るヘテロ二量体の形成を促進するための別の戦略は、第1の重鎖ポリペプチドに出っ張り（protuberance）を、対応するくぼみ（cavity）を第2の重鎖ポリペプチドに導入し、それにより、これらの2つの重鎖の境界部にあるくぼみの中に出っ張りが位置し、ヘテロ二量体形成を促進してホモ二量体形成を妨げるようにする「knob-into-hole」戦略である。「出っ張り」は、第1のポリペプチドの境界部にある小さなアミノ酸側鎖を、それよりも大きい側鎖で置き換えることによって構築される。埋め合わせとなる、出っ張りと同一または類似のサイズの「くぼみ」は、第2のポリペプチドの境界部で大きなアミノ酸側鎖をそれよりも小さいもので置き換えることによって作り出される（米国特許第5,731,168号）。EP1870459号（Chugai）およびWO 2009089004号（Amgen）は、宿主細胞における複数の異なる抗体ドメインの共発現によるヘテロ二量体形成のために有利な他の戦略を記載している。これらの方法では、両方のCH3ドメインにおいてCH3-CH3境界部を構成する1つまたは複数の残基を荷電アミノ酸で置き換えて

、ホモ二量体形成が静電的に不利でヘテロ二量体化が静電的に有利になるようにする。WO 2007110205（Merck）は、IgAとIgGのCH3ドメインの違いを利用してヘテロ二量体化を助長する、もう1つの別の戦略を記載している。

【０３１２】

二重特異性抗体を生産するための別のインビトロ方法は、WO 2008119353号（Genmab）に記載されており、この場合には、還元条件下でのインキュベーションによる2つの単一特異性IgG4抗体またはIgG4様抗体の間の「Fabアーム」または「半分子（half-molecule）」の交換（1つの重鎖および付属する軽鎖の交換）によって二重特異性抗体が形成される。結果的に生じる産物は、異なる配列を含む可能性のある2つのFabアームを有する二重特異性抗体である。

【０３１３】

本発明の二重特異性HER2×CD3抗体を調製するための1つの好ましい方法には、WO 2011131746（Genmab）に記載された方法が含まれ、それは以下の段階を含む：

（a）Fc領域を含む第1の抗体を用意する段階であって、前記Fc領域が第1のCH3領域を含む、段階；

（b）第2のFc領域を含む第2の抗体を用意する段階であって、前記Fc領域が第2のCH3領域を含み、前記第1の抗体がHER2抗体でありかつ前記第2の抗体がCD3抗体であるか、またはその逆であり、前記第1および第2のCH3領域の配列は異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は、前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強い、段階；

（c）前記第1の抗体を前記第2の抗体とともに還元条件下でインキュベートする段階；ならびに

（d）前記二重特異性HER2×CD3抗体を入手する段階。

【０３１４】

理論に限定されるわけではないが、段階c）において、親抗体のヒンジ領域内の重鎖ジスルフィド結合は還元され、その結果生じるシステインは、別の親抗体分子（元から異なる特異性を有するもの）のシステイン残基と重鎖間ジスルフィド結合を形成することができる。この方法の1つの態様において、段階c）における還元条件は、還元剤、例えば、2-メルカプトエチルアミン（2-MEA）、ジチオトレイトール（DTT）、ジチオエリトリトール（DTE）、グルタチオン、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン（TCEP）、L-システインおよびβ-メルカプトエタノールからなる群より選択される還元剤の添加を含み、好ましくは、2-メルカプトエチルアミン、ジチオトレイトールおよびトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンからなる群より選択される還元剤の添加を含む。さらなる態様において、段階c）は、例えば脱塩などによる還元剤の除去によって、条件を非還元性またはより低い還元性に戻すことを含む。

【０３１５】

典型的には、この方法において、第1および第2の抗体は、それぞれHER2およびCD3のエピトープと結合する、かつ／またはそれぞれHER2およびCD3の異なる抗原結合配列を含む、HER2抗体およびCD3抗体である。

【０３１６】

この方法に関しては、上記のHER2抗体およびCD3抗体のいずれを用いてもよく、例えばそれぞれ、第1および／または第2のFc領域を含む第1および第2のHER2およびCD3抗体を含む。そのような第1および第2のFc領域の組み合わせを含む、そのような第1および第2のFc領域の例には、上記のものの任意のものが含まれうる。1つの特定の態様において、第1および第2のHER2抗体およびCD3抗体をそれぞれ選択して、本明細書に記載したような二重特異性抗体を入手することができる。

【０３１７】

この方法の1つの態様において、前記第1および／または第2の抗体は完全長抗体である。

【０３１８】

第1および第2の抗体のFc領域は、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を非限定的に含む任意のアイソタイプのものであってもよい。この方法の1つの態様において、前記第1および前記第2の抗体のFc領域は両方とも、IgG1アイソタイプのものである。別の態様において、前記抗体のFc領域の一方はIgG1アイソタイプのものであり、もう一方はIgG4アイソタイプのものである。後者の態様において、その結果得られる二重特異性抗体はIgG1のFc領域およびIgG4のFc領域を含み、そのため、エフェクター機能の活性化に関連して興味深い中間的特性を有する。前記第1および／または前記第2の抗体がAsn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含むか、またはグリコシル化特性が変化するように他の様式で操作されている場合に、類似の産物を入手することができる。

【０３１９】

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

【０３２０】

この方法のさらなる態様において、抗体の一方または両方は、ヘテロ二量体タンパク質の血清中半減期を操作する目的で、新生児Fc受容体（FcRn）に対する結合性を低下させるかまたは増大させるように操作されている。さらなる態様において、出発抗体タンパク質の一方は、プロテインAと結合せず、それ故に、産物をプロテインAカラムに通過させることによってヘテロ二量体タンパク質を前記のホモ二量体の出発タンパク質と分離することが可能なように操作されている。

【０３２１】

この方法の特定の態様において、抗体またはその一部、例えば1つまたは複数のCDRは、ラクダ科の種（WO 2010001251号参照）もしくは軟骨魚類の種（例えばテンジクザメ）のものであるか、または重鎖抗体もしくはドメイン抗体である。

【０３２２】

1つの態様において、第1および／または第2のHER2抗体は、薬物、プロドラッグもしくは毒素と結合体化されているか、またはそれに対するアクセプター基を含む。そのようなアクセプター基は、例えば、非天然アミノ酸であってよい。

【０３２３】

上記のように、ホモ二量体の出発抗体の第1および第2のCH3領域の配列は異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強い。これらの相互作用、およびそれらをいかにして達成しうるかに関するこれ以上の詳細は、WO 2011131746（Genmab）として公開されたPCT／EP2011/056388号に記載されており、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０３２４】

特に、本明細書および実施例で説明しているように、それぞれHER2およびCD3に結合しかつCH3領域内に少数の極めて保存的な非対称変異のみを含む2つのホモ二量体の出発抗体に基づく特定の方法を用いて、安定した二重特異性HER2×CD3分子を高収率で入手することができる。非対称変異とは、前記第1および第2のCH3領域の配列がアミノ酸置換を同一でない位置に含むことを意味する。

【０３２５】

本方法の1つの態様において、第1の抗体は、366、368、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2の抗体は、366、368、370、39

9、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ第1および第2の抗体は同じ位置では置換されていない。

【０３２６】

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

【０３２７】

本方法の1つの態様において、第1の抗体タンパク質は位置368にアミノ酸置換を有し、前記第2の抗体は、366、370、399、405、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。

【０３２８】

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

【０３２９】

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

【０３３０】

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

【０３３１】

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

【０３３２】

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

【０３３３】

したがって、この方法の1つの態様において、前記第1および第2のCH3領域の配列は、非対称変異、すなわち、例えば、CH3領域の一方では位置405の変異、もう一方のCH3領域内では位置409の変異というような、2つのCH3領域内の異なる位置にある変異を含む。

【０３３４】

この方法の1つの態様において、第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する。1つのそのような態様において、前記第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は位置405にPhe以外のアミノ酸を有する。このさらなる態様において、前記第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を有する。

【０３３５】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、前記第2の抗体は、位置405にPhe以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1の抗体は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、前記第2の抗体は、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む。

【０３３６】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、前記第2の抗体は、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。このさらなる態様において、前記第1の抗体は、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2の抗体は、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む。別の態様において、前記第1の抗体は、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2の抗体は位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

【０３３７】

この方法のさらなる態様において、前記第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、前記第2のホモ二量体タンパク質は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。さらなる態様において、前記第1のホモ二量体タンパク質は位置409にArgを含み、前記第2のホモ二量体タンパク質は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０３３８】

この方法のなおさらなる態様において、前記第1の抗体は、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2の抗体は、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０３３９】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、前記第2の抗体は、位置409にLysを含み、かつ、（ａ）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、または（ｂ）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０３４０】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は位置409にArgを含み、前記第2の抗体は、位置409にLysを含み、かつ、（ａ）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、または（ｂ）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０３４１】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2の抗体は、位置409にLysを含み、かつ、（ａ）位置350にIleを、位置405にLeuを含むか、または（ｂ）位置370にThrを、位置405にLeuを含む。

【０３４２】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置350にThrを、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、前記第2の抗体は、位置350にIleを、位置370にThrを、位置405にLeuを、位置409にLysを含む。

【０３４３】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を有する。別の態様において、前記第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する。

【０３４４】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する。

【０３４５】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する。

【０３４６】

この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。

【０３４７】
この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2の抗体は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。
【０３４８】
この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2の抗体は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する。
【０３４９】
この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2の抗体は、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する。
【０３５０】
この方法の別の態様において、前記第1の抗体は、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、前記第2の抗体は、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する。
【０３５１】
この方法の1つの態様において、第1の抗体は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2の抗体は、
（i）位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAsp、Cys、Pro、GluおよびGln以外のアミノ酸、または
（iv）位置366にLys、Arg、Ser、ThrおよびTrp以外のアミノ酸
を有する。
【０３５２】
この方法の1つの態様において、第1のホモ二量体タンパク質は、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のホモ二量体タンパク質は、
（i）位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetもしくはTyr
を有する。
【０３５３】
この方法の1つの態様において、第1のホモ二量体タンパク質は、位置409にArgを有し、第2のホモ二量体タンパク質は、
（i）位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln
を有する。
【０３５４】
上記に特定されたアミノ酸置換に加えて、前記第1および第2のホモ二量体タンパク質が、野生型Fc配列に比してさらなるアミノ酸置換、欠失または挿入を含んでもよい。
【０３５５】
さらなる態様において、前記第1および第2のCH3領域は、明記した変異を除いて、IgG1m（a）（SEQ ID NO：256）、IgG1m（f）（SEQ ID NO：257）またはIgG1m（ax）（SEQ ID NO：258）の配列を含む。

【０３５６】
したがって、1つの態様において、前記第1の抗体も前記第2の抗体も、（コア）ヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない。
【０３５７】
さらなる態様において、前記第1および前記第2の抗体は両方とも、（コア）ヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む。
【０３５８】
また、本発明の二重特異性抗体を、第1および第2のポリペプチドをコードする構築物の、単一細胞における共発現によって入手することもできる。したがって、1つのさらなる局面において、本発明は、二重特異性抗体を生産するための方法であって、以下の段階を含む方法に関する：
（a）第1の抗体重鎖の第1のFc領域および第1の抗原結合領域を含む第1のポリペプチドをコードする第1の核酸構築物を用意する段階であって、前記第1のFc領域が第1のCH3領域を含む段階、
（b）第2の抗体重鎖の第2のFc領域および第2の抗原結合領域を含む第2のポリペプチドをコードする第2の核酸構築物を用意する段階であって、前記第2のFc領域が第1のCH3領域を含み、
前記第1および第2のCH3領域の配列が異なり、前記第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が前記第1および第2のCH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強く、
前記第1のホモ二量体タンパク質が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のホモ二量体タンパク質が、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、
任意で前記第1および第2の核酸構築物が前記第1および第2の抗体の軽鎖配列をコードしている、段階、
（c）前記第1および第2の核酸構築物を宿主細胞内で共発現させる段階、ならびに
（d）前記ヘテロ二量体タンパク質を細胞培養物から入手する段階。
【０３５９】
したがって、本発明はまた、本発明の二重特異性抗体を産生する組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞にも関する。本発明の1つの態様において、二重特異性抗体は本発明の方法の任意のものによって得られる。
【０３６０】
プロモーター、エンハンサーなどを含む適した発現ベクター、および抗体の産生のために適した適した宿主細胞は、当技術分野において周知である。宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞および哺乳動物細胞（例えばCHO細胞またはHEK細胞）が含まれる。
【０３６１】
この方法の1つの態様において、前記第1のCH3領域は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のCH3領域は、位置405にPhe以外のアミノ酸を有する。
【０３６２】
この方法の別の態様において、前記第1のCH3領域は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のCH3領域は、位置405にPhe以外、例えば位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を有するか；または前記第1のCH3領域は、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、前記第2のCH3領域は、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を有する。
【０３６３】
いくつかの態様において、前記第1および第2のポリペプチドは、異なるエピトープと結合する2つの抗体の完全長重鎖であり（すなわち、前記第1および第2の核酸構築物は、異なるエピトープと結合する2つの抗体の完全長重鎖をコードし）、それ故にヘテロ二量体タンパク質は二重特異性抗体である。この二重特異性抗体は重鎖抗体であってもよく、または前記宿主細胞が、軽鎖をコードする1つまたは複数の核酸構築物をさらに発現しても

よい。1種のみの軽鎖構築物を重鎖構築物と共発現させる場合には、機能的な二重特異性抗体は、軽鎖配列が重鎖のそれぞれと機能的抗原結合ドメインを形成しうる場合にのみ形成される。2種またはそれ以上の異なる軽鎖構築物を重鎖と共発現させる場合には、複数の産物が形成されると考えられる。

【０３６４】

さらなる態様において、本発明の共発現方法は、上記のインビトロ方法の項に記載された任意のさらなる特徴を含む。さらなる局面において、本発明は、上記に指定された第1および第2の核酸構築物を含む発現ベクターに関する。さらなる態様において、発現ベクターは、抗体（例えばヒト抗体）の軽鎖、重鎖、または軽鎖および重鎖の両方の定常領域をコードするヌクレオチド配列をさらに含む。

【０３６５】

本発明の文脈において発現ベクターは、染色体核酸ベクター、非染色体核酸ベクター、および合成核酸ベクター（適切な一組の発現制御エレメントを含む核酸配列）を含む任意の適切なベクターでよい。このようなベクターの例には、SV40、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドおよびファージDNAの組み合わせに由来するベクター、ならびにウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターの誘導体が含まれる。1つの態様において、HER2抗体をコードする核酸は、例えば直鎖発現エレメントを含む、裸のDNAベクターもしくはRNAベクター（例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59（1997）に記載）、圧縮された核酸ベクター（例えば、US6,077,835および／もしくはWO00/70087に記載）、プラスミドベクター、例えばpBR322、pUC19/18、もしくはpUC118/119、「midge」最小サイズ核酸ベクター（例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800（2001）に記載）、または沈殿された核酸ベクター構築物、例えばCaPO4によって沈殿された構築物（例えば、WO00/46147、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55（1986）、Wigler et al., Cell 14, 725（1978）、およびCoraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603（1981）に記載）の中に含まれる。このような核酸ベクターおよびその利用は当技術分野において周知である（例えば、US5,589,466およびUS5,973,972を参照されたい）。

【０３６６】

本発明の抗体のための例示的な発現ベクターは、実施例2および3にも記載する。

【０３６７】

1つの態様において、ベクターは、細菌細胞におけるHER2抗体の発現に適している。このようなベクターの例には、発現ベクター、例えばBlueScript（Stratagene）、pINベクター（Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509（1989）、pETベクター（Novagen, Madison WI）など）が含まれる。

【０３６８】

同様にまたは代替として、発現ベクターは、酵母系における発現に適したベクターでもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを使用することができる。適切なベクターには、例えば構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えばα因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHを含むベクターが含まれる（F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York（1987）、およびGrant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544（1987）に概説）。

【０３６９】

同様にまたは代替として、発現ベクターは、哺乳動物細胞における発現に適したベクター、例えば選択マーカーとしてグルタミン合成酵素を含むベクター、例えばBebbington（1992）Biotechnology（NY）10：169-175に記載のベクターでもよい。

【０３７０】

核酸および／またはベクターはまた、分泌配列／局在化配列をコードする核酸配列を含んでもよい。分泌配列／局在化配列は、ポリペプチド、例えば新生ポリペプチド鎖を細胞周辺腔にまたは細胞培地中に標的化することができる。このような配列は当技術分野にお

いて公知であり、分泌リーダーまたはシグナルペプチドを含む。

【０３７１】

発現ベクターには、HER2抗体をコードする核酸は、任意の適切なプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進エレメントを含んでもよく、これらと結合してもよい。このようなエレメントの例には、強発現プロモーター（例えば、ヒトCMV IEプロモーター／エンハンサーならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター）、有効なポリ（A）終結配列、大腸菌におけるプラスミド産物用の複製起点、選択マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、ならびに／または便利なクローニングサイト（例えば、ポリリンカー）が含まれる。核酸はまた、構成的プロモーターと相対する誘導性プロモーター、例えばCMV IEを含んでもよい。

【０３７２】

1つの態様において、HER2抗体をコードする発現ベクターを、ウイルスベクターを介して、宿主細胞または宿主動物の中に配置すること、および／または送達することができる。

【０３７３】

1つのさらなる別の局面において、本発明は、上記に指定された第1および第2の核酸構築物を含む宿主細胞に関する。

【０３７４】

したがって、本発明はまた、本発明の二重特異性抗体を産生する組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞（例えばトランスフェクトーマ）にも関する。

【０３７５】

第1のHER2抗体は、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞、例えばトランスフェクトーマなどにおいて発現させることができる。

【０３７６】

宿主細胞の例には、酵母細胞、細菌細胞および哺乳動物細胞（例えばCHO細胞またはHEK細胞）が含まれる。例えば、1つの態様において、宿主細胞は、細胞ゲノム中に安定的に組み込まれた第1および第2の核酸構築物を含みうる。別の態様において、本発明は、上記に指定したような第1および第2の核酸構築物を含む、プラスミド、コスミド、ファージミドまたは線状発現エレメントなどの非組込み型の核酸を含む細胞を提供する。

【０３７７】

1つのさらなる別の局面において、本発明は、ヒト重鎖およびヒト軽鎖の1つまたは2つのセットをコードする核酸を含むトランスジェニック非ヒト動物または植物であって、本発明の二重特異性抗体を産生する動物または植物に関する。

【０３７８】

1つのさらなる局面において、本発明は、本明細書で定義したような本発明の抗体を産生するハイブリドーマに関する。1つのさらなる別の局面において、本発明は、ヒト重鎖およびヒト軽鎖のセットを1種または2種コードする核酸を含むトランスジェニック非ヒト動物または植物であって、本発明の二重特異性抗体を産生する動物または植物に関する。

【０３７９】

1つのさらなる局面において、本発明は、本発明のHER2×CD3抗体を生産するための方法であって、

（a）本明細書で上述したような本発明の宿主細胞を培養する段階、および

（b）本発明の抗体を培地から精製する段階

を含む方法に関する。

【０３８０】

HER2およびCD3抗体の調製

本発明の二重特異性抗体の調製方法に応じて、二価単一特異性抗体を最初に調製することが関係し得る。これは例えば、二重特異性抗体が、2種の二価単一特異性抗体を還元条件下で混合することをベースとする上記の方法で調製されるか否かに関係し得る。

【０３８１】

例えばクロスブロック群1、2、3または4の抗体と共通のエピトープ領域またはクロスブロック領域を有する抗原結合領域を提供するといった目的で、本発明に用いるためのHER2抗体などのモノクローナル抗体は、例えば、Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって生産することができ、または組換えDNA方法によって生産することもできる。モノクローナル抗体はまた、例えばClackson et al., Nature 352, 624-628（1991）およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597（1991）に記載の技法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離されてもよい。モノクローナル抗体は任意の適切な供給源から得ることができる。従って、例えばモノクローナル抗体は、関心対象の抗原、例えば表面上に抗原を発現する細胞、または関心対象の抗原をコードする核酸の形をした抗原で免疫したマウスから得られたマウス脾臓B細胞から調製されたハイブリドーマから得られてもよい。モノクローナル抗体はまた、免疫したヒトまたは非ヒト哺乳動物、例えばラット、イヌ、霊長類などの抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得られてもよい。

【０３８２】

1つの態様において、本発明の抗体はヒト抗体である。HER2またはCD3に対するヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックマウスまたはトランスクロモソームマウスを用いて作製することができる。このようなトランスジェニックマウスおよびトランスクロモソームマウスは、本明細書において、それぞれ、HuMAb（登録商標）マウスおよびKMマウスと呼ばれるマウスを含み、本明細書において総称して「トランスジェニックマウス」と呼ばれる。

【０３８３】

HuMAb（登録商標）マウスは、再編成されていないヒト重鎖（μおよびγ）免疫グロブリン配列ならびにκ軽鎖免疫グロブリン配列と、内因性μ鎖およびκ鎖遺伝子座を不活化する標的変異をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ遺伝子座を含有する（Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859（1994））。従って、このマウスはマウスIgMまたはκの低発現を示し、免疫に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランスジーンはクラススイッチおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgG,κモノクローナル抗体を産生する（Lonberg, N. et al.（1994）, 前出；Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101（1994）、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol.13 65-93（1995）、およびHarding, F. and Lonberg, N. Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546（1995）に概説）。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295（1992）、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656（1993）、Tuaillon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920（1994）、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591（1994）、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851（1996）に詳述されている。US5,545,806、US5,569,825、US5,625,126、US5,633,425、US5,789,650、US5,877,397、US5,661,016、US5,814,318、US5,874,299、US5,770,429、US5,545,807、WO98/24884、WO94/25585、WO93/1227、WO92/22645、WO92/03918、およびWO01/09187も参照されたい。

【０３８４】

HCo7、HCo12、HCo17、およびHCo20マウスは、内因性軽鎖（κ）遺伝子におけるJKD破壊（Chen et al., EMBO J. 12, 821-830（1993）に記載）、内因性重鎖遺伝子におけるCMD破壊（WO01/14424の実施例1に記載）、およびKCo5ヒトκ軽鎖トランスジーン（Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851（1996）に記載）を有する。さらに、Hco7マウスはHCo7ヒト重鎖トランスジーン（US5,770,429に記載）を有し、HCo12マウスはHCo12ヒト重鎖トランスジーン（WO01/14424の実施例2に記載）を有し、HCo17マウスはHCo17ヒト重鎖トランスジーン（WO01/09187の実施例2に記載）を有し、HCo20マウスはHCo20ヒト重鎖トランスジーンを有する。結果として生じたマウスは、内因性マウス重鎖遺伝子座およびκ軽鎖遺伝子座がホモで破壊されたバックグラウンドでヒト免疫グロブリン重鎖トランスジーンおよびκ軽鎖トランスジーンを発現する。

【０３８５】

KMマウス系統では、内因性マウスκ軽鎖遺伝子は、Chen et al., EMBO J. 12, 811-820（1993）に記載のようにホモで破壊されており、内因性マウス重鎖遺伝子は、WO01/09187の実施例1に記載のようにホモで破壊されている。このマウス系統は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851（1996）に記載のように、ヒトκ軽鎖トランスジーンであるKCo5を有する。このマウス系統はまた、WO02/43478に記載のように、第14番染色体断片hCF（SC20）からなるヒト重鎖トランスクロモソームも有する。HCo12-Balb/Cマウスは、WO/2009/097006に記載のように、HCo12をKCo5[J/K]（Balb）と交雑することによって作製することができる。

【０３８６】

これらのトランスジェニックマウスに由来する脾細胞を用いると、周知の技法に従って、ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製することができる。

【０３８７】

さらに、HER2抗原結合領域は、ヒト抗体または他の種に由来する抗体から得ることができ、当技術分野において周知の技法を用いた、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、および他の技法を含むが、それに限定されるわけではないディスプレイ型技術によって特定することができ、得られた分子は、このような技法が当技術分野において周知のように親和性成熟などのさらなる成熟に供することができる（例えば、Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381（1991）（ファージディスプレイ）、Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309（1996）（ファージディスプレイ）、Hanes and Plucthau, PNAS USA 94, 4937-4942（1997）（リボソームディスプレイ）、Parmley and Smith, Gene 73, 305-318（1988）（ファージディスプレイ）、Scott TIBS 17, 241-245（1992）、Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382（1990）、Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085（1993）、Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68（1992）、Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84（1992）、およびUS5,733,743を参照されたい）。非ヒト抗体を作製するためにディスプレイ技術が用いられるのであれば、このような抗体をヒト化することができる。

【０３８８】

本発明の二重特異性抗体はいかなるアイソタイプでもよい。アイソタイプの選択は、典型的には、ADCC誘導などの望ましいエフェクター機能によって導かれる。例示的なアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4である。ヒト軽鎖定常領域であるκまたはλのどちらか一方を使用することができる。本発明の抗体のエフェクター機能は、様々な治療用途に合わせて、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体へのアイソタイプスイッチによって変えることができる。1つの態様において、本発明の抗体の両Fc領域は、IgG1アイソタイプ、例えば、IgG1,κである。1つの態様において、二重特異性抗体の2つのFc領域は、それぞれIgG1およびIgG4アイソタイプである。任意で、Fc領域は、本明細書の他の箇所で述べたように、ヒンジ領域および/またはCH3領域において改変されていてもよい。

【０３８９】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、完全長抗体であり、好ましくは、IgG1抗体、特に、IgG1,κ抗体またはそれらの変種である。別の態様において、本発明の二重特異性抗体は抗体断片または単鎖抗体を含む。抗体断片は、例えば、従来の技法を用いた断片化によって得ることができ、この断片は、抗体全体について本明細書で説明されたものと同じやり方で有用性についてスクリーニングすることができる。例えば、$F(ab')_2$断片は、抗体をペプシンで処理することによって作製することができる。ジスルフィド架橋が少なくなるように、得られた$F(ab')_2$断片をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して、Fab'断片を作製することができる。Fab断片は抗体をパパインで処理することによって得ることができる。$F(ab')_2$断片はまた、チオエーテル結合またはジスルフィド結合を介してFab' 断片を結合させることによって作製することもできる。抗体断片はまた、組換え細胞において、このような断片をコードする核酸を発現させることによって作製することもできる（例えば、Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38（1995）

を参照されたい）。このような切断型抗体断片分子を生じるために、F（ab'）$_2$断片の一部をコードするキメラ遺伝子は、H鎖のC_H1ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列の後に翻訳停止コドンを含んでもよい。

【０３９０】

本発明のHER2×CD3二重特異性抗体は、単鎖抗体から調製され得る。単鎖抗体は、重鎖Fv領域および軽鎖Fv領域が接続されているペプチドである。1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、1本のペプチド鎖において、本発明のHER2抗体のFvの重鎖および軽鎖が可動性ペプチドリンカー（典型的には、約10個、12個、15個以上のアミノ酸残基からなる）とつながっている単鎖Fv（scFv）を含む。このような抗体を作製する方法は、例えばUS4,946,778、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315（1994）、Bird et al., Science 242, 423-426（1988）、Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883（1988）、およびMcCafferty et al., Nature 348, 552-554（1990）に記載されている。さらに、二重特異性抗体は、単鎖HER2抗体および単鎖CD3抗体に由来する2つのV_H鎖およびV_L鎖から形成され得、または3種類以上のV_H鎖およびV_L鎖から形成された多価抗体であり得る。

【０３９１】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体を調製するためのHER2 mAbおよびCD3 mAbのFc領域の一方または両方はエフェクター機能が欠損している。1つの態様において、エフェクター機能欠損性の抗体は、Fabアーム交換を阻止するように修飾されている、安定化されたヒトIgG4抗体である（van der Neut Kolfschoten et al.（2007）Science 317（5844）：1554-7）。適切な安定化されたヒトIgG4抗体の例は、Kabat et al.,のようにEUインデックスで記載されたヒトIgG4の重鎖定常領域の位置409にあるアルギニンが、リジン、スレオニン、メチオニン、もしくはロイシン、好ましくはリジンで置換されている抗体（WO2006033386（Kirin）に記載）、および／またはヒンジ領域がCys-Pro-Pro-Cys配列を含むように修飾されている抗体である。

【０３９２】

1つの態様において、安定化されたIgG4抗体は、重鎖および軽鎖を含むIgG4抗体であり、前記重鎖は、409に対応する位置に、Lys、Ala、Thr、Met、およびLeuからなる群より選択される残基、ならびに／または405に対応する位置に、Ala、Val、Gly、Ile、およびLeuからなる群より選択される残基を有するヒトIgG4定常領域を含み、前記抗体は、任意で1つまたは複数のさらなる置換、欠失、および／または挿入を含むが、ヒンジ領域にCys-Pro-Pro-Cys配列を含まない。好ましくは、前記抗体は、409に対応する位置にLysもしくはAla残基を含むか、または抗体のCH3領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、もしくはヒトIgG3のCH3領域で置換されている。WO2008145142（Genmab）およびWO2011131746（Genmab）も参照されたい。

【０３９３】

なおさらなる態様において、安定化されたIgG4抗体は、重鎖および軽鎖を含むIgG4抗体であり、前記重鎖は、409に対応する位置に、Lys、Ala、Thr、Met、およびLeuからなる群より選択される残基、ならびに／または405に対応する位置に、Ala、Val、Gly、Ile、およびLeuからなる群より選択される残基を有するヒトIgG4定常領域を含み、前記抗体は、任意で1つまたは複数のさらなる置換、欠失、および／または挿入を含み、ヒンジ領域にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む。好ましくは、前記抗体は、409に対応する位置にLysもしくはAla残基を含むか、または抗体のCH3領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、もしくはヒトIgG3のCH3領域で置換されている。

【０３９４】

さらなる態様において、エフェクター機能欠損性の抗体は、ADCCなどのエフェクター機能を媒介する能力が低下するように、さらにはエフェクター機能が無くなるように変異されている、非IgG4型、例えばIgG1、IgG2、またはIgG3の抗体である。このような変異は、例えばDall'Acqua WF et al., J Immunol.177（2）：1129-1138（2006）およびHezareh M, J Virol.；75（24）：12161-12168（2001）に記載されている。

【０３９５】
結合体
さらなる局面において、本発明は、1つまたは複数の治療部分（例えば細胞毒、化学療法薬、サイトカイン、免疫抑制剤、および/または放射性同位体）と結合または結合体化されたHER2×CD3二重特異性抗体を提供する。このような結合体は本明細書において「免疫結合体」または「薬物結合体」と呼ばれる。1種類または複数種の細胞毒を含む免疫結合体は「免疫毒素」と呼ばれる。
【０３９６】
組成物
さらなる主な局面において、本発明は、
- 本明細書において定義されたHER2×CD3二重特異性抗体、および
- 薬学的に許容される担体
を含む、薬学的組成物に関する。
【０３９７】
本発明の薬学的組成物は、本発明の1種類の二重特異性抗体または本発明の異なる二重特異性抗体の組み合わせを含有してもよい。
【０３９８】
薬学的組成物は、従来の技法、例えばRemington： The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示される技法に従って処方することができる。本発明の薬学的組成物は、例えば希釈剤、増量剤、塩、緩衝液、界面活性剤（例えば、非イオン性界面活性剤、例えばTween-20もしくはTween-80）、安定剤（例えば、糖もしくはタンパク質を含まないアミノ酸）、防腐剤、組織固定液、可溶化剤、および／または薬学的組成物に含めるのに適した他の材料を含んでもよい。
【０３９９】
薬学的に許容される担体には、本発明の二重特異性抗体と生理学的に適合する、任意のおよび全ての適切な溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが含まれる。本発明の薬学的組成物において使用することができる適切な水性および非水性の担体の例には、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、および適切なその混合物、植物油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチル、ならびに／または様々な緩衝液が含まれる。薬学的に許容される担体には、滅菌した水溶液または分散液、および滅菌した注射液または分散液を即時調製するための滅菌した散剤が含まれる。適切な流動性は、例えばコーティング材料、例えばレシチンを使用することによって、分散液の場合、必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を使用することによって維持することができる。
【０４００】
本発明の薬学的二重特異性抗体はまた、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば、（1）水溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど；（2）油溶性の酸化防止剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチルヒドロキシアニソール、ブチルヒドロキシトルエン、レシチン、没食子酸プロピル、α-トコフェロールなど；および（3）金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸などを含んでもよい。
【０４０１】
本発明の薬学的二重特異性抗体はまた、組成物中に、等張剤、例えば糖、多価アルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロール、または塩化ナトリウムを含んでもよい。
【０４０２】

本発明の薬学的二重特異性抗体はまた、薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を増強することができる、選択された投与経路に適した1種類または複数種の佐剤、例えば防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、防腐剤、または緩衝液を含んでもよい。本発明の二重特異性抗体は、急速に放出されないように二重特異性抗体を保護する担体、例えば移植片、経皮パッチ、およびマイクロカプセルに閉じ込めた送達系を含む徐放製剤を用いて調製されてもよい。このような担体は、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリン、生分解性生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のみもしくはポリ乳酸とろう、または当技術分野において周知の他の材料を含んでもよい。このような製剤を調製するための方法は一般的に当業者に公知である。

【０４０３】

滅菌注射液は、必要とされる量の活性化合物を、必要に応じて、例えば前記で列挙された成分の1つまたは組み合わせと共に適切な溶媒中に組み込んだ後に、滅菌精密濾過を行うことによって調製することができる。一般的に、分散液は、活性化合物を、基本分散媒、および必要とされる他の成分、例えば前記で列挙されたものを含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって調製される。滅菌注射液を調製するための滅菌散剤の場合、調製方法の例は、活性成分+任意のさらなる望ましい成分の散剤をそれらの予め濾過滅菌した溶液から生じさせる真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）である。

【０４０４】

薬学的組成物における活性成分の実際の投与量レベルは、患者への毒性無く、特定の患者、組成物、および投与方法について望ましい治療応答を実現するのに有効な活性成分量を得るように変えることができる。選択される投与量レベルは、使用される本発明の特定の組成物またはそのアミドの活性、投与経路、投与時間、使用されている特定の化合物の排出速度、治療期間、使用される特定の組成物と併用される他の薬物、化合物、および／または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、身体全体の健康、および前病歴、ならびに医学分野において周知の同様の要因を含む様々な薬物動態要因に依存する。

【０４０５】

薬学的組成物は、任意の適切な経路および方法によって投与することができる。1つの態様において、本発明の薬学的組成物は非経口投与される。本明細書で使用する「非経口投与される」とは、経腸投与および局所投与以外の投与方法、通常、注射による投与方法を意味し、表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外、および胸骨内への注射および注入を含む。

【０４０６】

1つの態様において、薬学的組成物は、静脈内または皮下への注射または注入によって投与される。

【０４０７】

使用

さらなる主な局面において、本発明は、医薬として使用するための本発明のHER2×CD3二重特異性抗体に関する。

【０４０８】

本発明の二重特異性抗体は多くの目的に使用することができる。特に、本発明の抗体は、転移性癌および難治性癌を含む様々な形態の癌の治療に使用することができる。

【０４０９】

1つの態様において、本発明の二重特異性抗体は、原発性乳癌、転移性乳癌、および難治性乳癌を含む乳癌の治療に用いられる。

【０４１０】

1つの態様において、本発明の二重特異性2抗体は、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵臓癌、精巣癌、

悪性黒色腫、および軟部組織癌（例えば、滑膜肉腫）からなる群より選択される癌の一形態の治療に用いられる。

【０４１１】

同様に本発明は、それを必要とする個体に、有効量の本発明の抗体、例えば抗体薬物結合体（ADC）を投与する段階を含む、HER2発現腫瘍細胞を死滅させるための方法に関する。

【０４１２】

本発明はまた、HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害するための方法であって、それを必要とする個体に対する本発明の二重特異性抗体を投与する段階を含む方法に関する。

【０４１３】

本発明はまた、癌を治療するための方法であって、

（a）HER2を共発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、ならびに

（b）本発明の二重特異性抗体または本発明の薬学的組成物を該対象に投与する段階

を含む方法に関する。

【０４１４】

1つの態様において、前記腫瘍細胞は、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌および頭頚部の扁平上皮癌、子宮頚癌、膵臓癌、精巣癌、悪性黒色腫、ならびに軟部組織癌（例えば、滑膜肉腫）からなる群より選択される癌の一形態に関与する。

【０４１５】

1つの態様において、腫瘍細胞は、HER2を共発現する腫瘍細胞であり、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頚癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍（例えば、滑膜肉腫）、または膀胱癌に関与する腫瘍細胞である。

【０４１６】

1つの局面において、本発明は、HER2を発現する腫瘍細胞を含む癌に罹患している対象を選択する段階、ならびに本発明の二重特異性抗体を対象に投与する段階を含む、対象において癌を治療するための方法に関する。1つの態様において、対象は、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌/子宮頚癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、精巣癌、軟部組織腫瘍（例えば、滑膜肉腫）、または膀胱癌からなる群より選択される癌に罹患している。

【０４１７】

また、本発明は、癌、例えば、前述された特定の癌適応症の1つを治療するための医用薬剤を調製するための、ヒトHER2およびヒトCD3に結合する二重特異性抗体の使用に関する。

【０４１８】

さらに、本発明は、癌、例えば、前述された特定の癌適応症の1つの治療において使用するための二重特異性抗体に関する。

【０４１９】

本発明の治療方法のさらなる態様において、治療の効力は、療法中に、例えば所定の時点で、関連腫瘍細胞における腫瘍量またはHER2発現レベルを確かめることによってモニタリングされる。

【０４２０】

前記の治療方法および使用における投与計画は、最適な望ましい応答（例えば、治療応答）をもたらすように調節される。例えば、単一ボーラスを投与してもよく、いくつかの分割量を、ある期間にわたって投与してもよく、その用量は、治療状況の難局により示されるように比例して減少または増加してもよい。投与の容易さおよび投薬の均一性のために単位剤形で非経口組成物が処方されてもよい。

【０４２１】

二重特異性抗体にとっての有効な用量および投与計画は、治療しようとする疾患または

病状に応じて決まり、それは当業者によって決定されうる。本発明の化合物の治療的有効量に関する例示的で非限定的な範囲は、約0.001～10mg／kg、例えば約0.001～5mg／kg、例えば約0.001～2mg／kg、例えば約0.001～1mg／kg、例えば約0.001、約0.01、約0.1、約1または約10mg／kgである。

【０４２２】

当技術分野において通常の知識を有する医師または獣医師は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定して処方することができる。例えば、医師または獣医師は、薬学的組成物に使用される二重特異性抗体の用量を、所望の治療効果を達成する目的に必要とされる用量よりも低いレベルで開始して、所望の効果が達成されるまで投与量を徐々に増やすことができる。一般に、本発明の二重特異性抗体の適した一日量は、治療効果を生じるのに有効な最低用量である化合物の量である。投与は、例えば、非経口投与、例えば静脈内投与、筋肉内投与、または皮下投与であってもよい。1つの態様において、二重特異性抗体を、mg／m^2単位で計算した毎週投与量での注入によって投与してもよい。そのような投与量は、以下に従った、上に提示したmg／kg投与量に基づきうる：用量（mg／kg）×70：1.8。そのような投与を、例えば1～8回、例えば3～5回にわたって繰り返してもよい。投与を、2～24時間、例えば2～12時間といった期間にわたる連続注入によって行ってもよい。1つの態様において、毒性副作用を減少させる目的で、二重特異性抗体を、例えば24時間を上回るような長期間にわたる緩徐な連続注入によって投与してもよい。

【０４２３】

1つの態様において、二重特異性抗体は、週1回与える場合、固定用量として計算した毎週投与量で最大8回まで、例えば4～6回にわたって投与することができる。そのようなレジメンを、例えば6カ月後または12カ月後に、必要に応じて1回または複数回繰り返してもよい。そのような固定投与量は、例えば、体重推定値を70kgとする、上に提示したmg／kg投与量に基づくことができる。例えば、生物試料を採取して、本発明の二重特異性抗体のHER2抗原結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を用いることにより、投与時の血液中の本発明の二重特異性抗体の量を測定することによって、投与量を決定または調節することができる。

【０４２４】

1つの態様において、二重特異性抗体は、維持療法によって、例えば、6ヶ月以上にわたって1週間に1回、投与することができる。

【０４２５】

二重特異性抗体はまた、癌を発症するリスクを下げるために、癌進行における事象の発生の開始を遅延するために、および／または癌が軽快している時の再発のリスクを下げるために予防的に投与することもできる。

【０４２６】

本発明の二重特異性抗体はまた併用療法で投与することができる、すなわち、治療しようとする疾患または状態に関連する他の治療剤と組み合わせて投与することができる。従って、1つの態様において、抗体を含有する医薬は、1種類または複数種のさらなる治療剤、例えば細胞傷害剤、化学療法剤、または抗血管新生剤と併用するためのものである。

【０４２７】

このような併用投与は同時に行われてもよく、別々に行われてもよく、連続して行われてもよい。同時投与の場合、薬剤は、適宜、1つの組成物として投与されてもよく、別々の組成物として投与されてもよい。従って、本発明はまた、前記のHER2を発現する細胞に関与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、下記の1種類または複数種のさらなる治療剤と組み合わせて本発明の二重特異性抗体を投与する段階を含む。

【０４２８】

1つの態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に関与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体、および任意で少なくとも1種類のさらなる化学療法剤、または当該抗体とは異なるHER2エピトープに結合する抗体を、障害の治療を必要とする対象に投与する段階を含む。

【０４２９】
1つの態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体および少なくとも1種類のさらなる化学療法剤を、癌の治療または予防を必要とする対象に投与する段階を含む。
【０４３０】
1つの態様において、このようなさらなる治療剤は、代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン（decarbazine）、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、またはクラドリビンにより選択されてもよい。
【０４３１】
別の態様において、このようなさらなる治療剤は、アルキル化剤、例えばメクロレタミン、チオエパ（thioepa）、クロランブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、ロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン（DTIC）、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチンおよび他の白金誘導体、例えばカルボプラチンにより選択されてもよい。
【０４３２】
別の態様において、このようなさらなる治療剤は、有糸分裂阻害剤、例えばタキサン、例えばドセタキセルおよびパクリタキセル、ならびにビンカアルカロイド、例えばビンデシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、およびビノレルビンにより選択されてもよい。
【０４３３】
別の態様において、このようなさらなる治療剤は、トポイソメラーゼ阻害剤、例えばトポテカンもしくはイリノテカン、または細胞分裂停止薬、例えばエトポシドおよびテニポシドにより選択されてもよい。
【０４３４】
別の態様において、このようなさらなる治療剤は、成長因子阻害剤、例えばErbB1（EGFR）阻害剤（例えば、EGFR抗体、例えばザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブもしくはニモツズマブ（nimotuzumab）、または他のEGFR阻害剤、例えばゲフィチニブもしくはエルロチニブ）、ErbB2（HER2／neu）の別の阻害剤（例えば、HER2抗体、例えばトラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1、またはペルツズマブ）、あるいはEGFRおよびHER2両方の阻害剤、例えばラパチニブにより選択されてもよい。
【０４３５】
別の態様において、このようなさらなる治療剤は、チロシンキナーゼ阻害剤、例えばイマチニブ（Glivec、Gleevec STI571）またはラパチニブ、PTK787／ZK222584により選択されてもよい。
【０４３６】
別の態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に関与する障害を治療するための方法を提供し、本方法は、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体、ならびに血管形成、新血管新生、および／または他の血管新生の少なくとも1種類の阻害剤を、障害の治療を必要とする対象に投与する段階を含む。
【０４３７】
このような血管形成阻害剤の例は、ウロキナーゼ阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤（例えば、マリマスタット、ネオバスタット（neovastat）、BAY12-9566、AG3340、BMS-275291、および類似の薬剤）、内皮細胞の遊走および増殖の阻害剤（例えば、TNP-470、スクアラミン、2-メトキシエストラジオール、コンブレタスタチン、エンドスタチン、アンギオスタチン、ペニシラミン、SCH66336（Schering-Plough Corp, Madison, NJ）、R115777（Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ）、および類似の薬剤）、血管新生成長因子のアンタゴニスト（例えば、ZD6474、SU6668、血管新生剤および／またはその受容体（例えば、VEGF（例えば、ベバシズマブ）、bFGF、およびアンジオポエチン-1）に対する抗体、サリドマイド、サリドマイド類似体（例えば、CC-5013）、Sugen5416、SU5402、抗血管新生リボザイム（例えば、アンギオザイム（angiozyme））、インター

フェロンα（例えば、インターフェロンα2a）、スラミン、および類似の薬剤）、VEGF-Rキナーゼ阻害剤および他の抗血管新生性のチロシンキナーゼ阻害剤（例えば、SUO11248）、内皮特異的インテグリン／生存シグナル伝達の阻害剤（例えば、ビタキシン（vitaxin）および類似の薬剤）、銅アンタゴニスト／キレート剤（例えば、テトラチオモリブデート（tetrathiomolybdate）、カプトプリル、および類似の薬剤）、カルボキシアミド-トリアゾール（CAI）、ABT-627、CM101、インターロイキン-12（IL-12）、IM862、PNU145156E、ならびに血管形成を阻害するヌクレオチド分子（例えば、アンチセンス-VEGF-cDNA、アンギオスタチンをコードするcDNA、p53をコードするcDNA、および欠損VEGF受容体-2をコードするcDNA）である。

【０４３８】

血管形成、新血管新生、および／または他の血管新生のこのような阻害剤の他の例は、抗血管新生性のヘパリン誘導体（例えば、ヘペリナーゼ（heperinase）III）、テモゾロミド、NK4、マクロファージ遊走阻害因子、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、低酸素誘導性因子1の阻害剤、抗血管新生性のダイズイソフラボン、オルチプラズ、フマギリンおよびその類似体、ソマトスタチン類似体、多流酸ペントサン、テコガランナトリウム、ダルテパリン、タムスタチン、トロンボスポンジン、NM-3、コンブレスタチン（combrestatin）、カンスタチン（canstatin）、アバスタチン（avastatin）、他の標的に対する抗体、例えば抗α-v／β-3インテグリンおよび抗キニノスタチン抗体である。

【０４３９】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗癌免疫原、例えば癌抗原／腫瘍関連抗原（例えば、上皮細胞接着分子（EpCAM／TACSTD1）、ムチン1（MUC1）、癌胎児抗原（CEA）、腫瘍関連糖タンパク質72（タグ-72）、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7、癌関連ウイルスワクチン（例えば、ヒトパピローマウイルスワクチン）、または腫瘍由来熱ショックタンパク質でもよい。

【０４４０】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗癌性サイトカイン、ケモカイン、またはその組み合わせでもよい。適切なサイトカインおよび成長因子の例には、IFNγ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFNα（例えば、INFα2b）、IFNβ、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム、およびTNFαが含まれる。適切なケモカインは、Glu-Leu-Arg（ELR）ネガティブケモカイン、例えばヒトCXCおよびC-Cケモカインファミリーからの IP-10、MCP-3、MIG、およびSDF-1αを含んでもよい。適切なサイトカインには、サイトカイン誘導体、サイトカイン変種、サイトカイン断片、およびサイトカイン融合タンパク質が含まれる。

【０４４１】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、細胞周期制御／アポトーシス制御因子（または「制御剤」）でもよい。細胞周期制御／アポトーシス制御因子は、細胞周期制御／アポトーシス制御因子を標的とし、調節する分子、例えば、（i）cdc-25（例えば、NSC663284）、（ii）細胞周期を過度に刺激するサイクリン依存性キナーゼ（例えば、フラボピリドール（L868275、HMR1275）、7-ヒドロキシスタウロスポリン（UCN-01、KW-2401）、およびロスコビチン（R-ロスコビチン、CYC202））、ならびに（iii）テロメラーゼモジュレーター（例えば、BIBR1532、SOT-095、GRN163、ならびに例えば、US6,440,735およびUS6,713,055に記載の組成物）を含んでもよい。アポトーシス経路に干渉する分子の非限定的な例には、TNF関連アポトーシス誘発リガンド（TRAIL）／アポトーシス-2リガンド（Apo-2L）、TRAIL受容体を活性化する抗体、IFN、およびアンチセンスBcl-2が含まれる。

【０４４２】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、ホルモン制御剤、例えば抗アンドロゲン療法および抗エストロゲン療法に有用な薬剤でもよい。このようなホルモン制御剤の例は、タモキシフェン、イドキシフェン、フ

ルベストラント、ドロロキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ジエチルスチルベストロール、エチニルエストラジオール／エスチニル（estinyl）、抗アンドロゲン（例えば、フルタミンド（flutaminde）／エルレキシン（eulexin））、プロゲスチン（例えば、カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシ-プロゲステロン／プロベラ、酢酸メゲストロール／メゲース）、副腎皮質ステロイド（例えば、ヒドロコルチゾン、プレドニゾン）、黄体形成ホルモン放出ホルモン（およびその類似体、ならびに他のLHRHアゴニスト、例えばブセレリンおよびゴセレリン）、アロマターゼ阻害剤（例えば、アナストラゾール（anastrazole）／アリミデックス、アミノグルテチミド／シトラデン（cytraden）、エキセメスタン）、またはホルモン阻害剤（例えば、オクトレオチド／サンドスタチン）である。

【０４４３】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗アネルギー剤、例えばCTLA-4の活性をブロックする分子、例えばイピリムマブでもよい。

【０４４４】

1つの態様において、前記の障害を治療するために二重特異性抗体と併用するための治療剤は、抗癌性核酸または抗癌性抑制性RNA分子でもよい。

【０４４５】

前記の障害を治療するために本発明の二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、分化誘導剤、レチノイン酸類似体（例えば、オールトランスレチノイン酸、13-cisレチノイン酸、および類似の薬剤）、ビタミンD類似体（例えば、セオカルシトール（seocalcitol）および類似の薬剤）、ErbB3、ErbB4、IGF-IR、インシュリン受容体、PDGFRa、PDGFRβ、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、RON（例えば、抗RON抗体）、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7の阻害剤、および類似の薬剤である。

【０４４６】

前記の障害を治療するために本発明の二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、エストラムスチンおよびエピルビシンである。

【０４４７】

前記の障害を治療するために本発明の二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、HSP90阻害剤、例えば17-アリルアミノゲルダナマイシン、腫瘍抗原、例えばPSA、CA125、KSAなどに対する抗体、インテグリン、例えばインテグリンβ1、またはVCAM阻害剤である。前記の障害を治療するためにの二重特異性抗体と併用するための治療剤として関連し得る他の抗癌剤の例は、カルシニューリン阻害剤（例えば、バルスポダール（valspodar）、PSC833および他のMDR-1またはp-糖タンパク質阻害剤）、TOR阻害剤（例えば、シロリムス、エベロリムス、およびラパマイシン）、ならびに「リンパ球ホーミング」機構の阻害剤（例えば、FTY720）、ならびに細胞シグナル伝達に作用する薬剤、例えば接着分子阻害剤（例えば、抗LFAなど）である。

【０４４８】

1つの態様において、本発明のの二重特異性抗体は、1種類または複数種の他の治療用抗体、例えば、オファツムマブ、ザノリムマブ（zanolimumab）、ダラツムマブ（daratumumab）、ラニビズマブ、ニモツズマブ、パニツムマブ、hu806、ダクリズマブ（ゼナパックス）、バシリキシマブ（シムレクト）、インフリキシマブ（レミケード）、アダリムマブ（ヒュミラ）、ナタリズマブ（タイサブリ）、オマリズマブ（ゾレア）、エファリズマブ（ラプティバ）、および/またはリツキシマブと併用するためのものである。

【０４４９】

別の態様において、本明細書に記載の2つ以上の異なる本発明の抗体は、疾患の治療のために併用される。特に興味深い組み合わせには2種類以上の非ブロッキング抗体が含まれる。このような併用療法によって、細胞1個あたり多数の抗体分子が結合することがあり、それによって、効力が増大する、例えば、補体媒介性溶解の活性化を介して効力が増

大することがある。

【０４５０】

前記に加えて、本発明の併用療法の他の態様は、以下を含む：

乳癌の治療の場合、二重特異性抗体またはその治療用結合体と、メトトレキセート、パクリタキセル、ドキソルビシン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ダウノルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、イクサベピロン、ムタマイシン（mutamycin）、ミトキサントロン、ビノレルビン、ドセタキセル、チオテパ、ビンクリスチン、カペシタビン、EGFR抗体（例えば、ザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、もしくはニモツズマブ（nimotuzumab））、または他のEGFR阻害剤（例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ）、別のHER2抗体もしくはHER2結合体（例えば、トラスツズマブ、例えば、トラスツズマブ-DM1もしくはペルツズマブ）、EGFRおよびHER2両方の阻害剤（例えば、ラパチニブ）との併用、ならびに/あるいはHER3阻害剤との併用；

非小細胞肺癌の治療の場合、本発明の二重特異性抗体と、EGFR阻害剤、例えば、EGFR抗体、例えば、ザルツムマブ、セツキシマブ、パニツムマブ、もしくはニモツズマブ、または他のEGFR阻害剤（例えば、ゲフィチニブもしくはエルロチニブ）との組み合わせ、あるいは別のHER2薬剤（例えば、HER2抗体、例えば、トラスツズマブ、トラスツズマブ-DM1もしくはペルツズマブ）との組み合わせ、あるいはEGFRおよびHER2両方の阻害剤、例えば、ラパチニブとの併用、あるいはHER3阻害剤との併用；

結腸直腸癌の治療の場合、本発明の二重特異性抗体と、ゲムシタビン、ベバシズマブ、FOLFOX、FOLFIRI、XELOX、IFL、オキサリプラチン、イリノテカン、5-FU／LV、カペシタビン、UFT、EGFR標的剤、例えばセツキシマブ、パニツムマブ、ザルツムマブ；VEGF阻害剤、またはチロシンキナーゼ阻害剤、例えばスニチニブより選択される1種類または複数種の化合物との併用；

前立腺癌の治療の場合、本発明の二重特異性抗体と、ホルモン／抗ホルモン療法；例えば、抗アンドロゲン、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト、および化学療法剤、例えばタキサン、ミトキサントロン、エストラムスチン、5FU、ビンブラスチン、およびイクサベピロンより選択される1種類または複数種の化合物との併用。

【０４５１】

放射線療法-外科手術

1つの態様において、本発明は、対象において、HER2を発現する細胞に関与する障害を治療するための方法を提供するものであり、この方法は、それを必要とする対象への、治療的有効量の二重特異性抗体、例えば本発明のHER2×CD3抗体および放射線療法の投与を含む。

【０４５２】

1つの態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供するものであり、この方法は、それを必要とする対象への、治療的有効量の二重特異性抗体、例えば本発明のHER2×CD3抗体および放射線療法の投与を含む。

【０４５３】

1つの態様において、本発明は、放射線療法と組み合わせて投与される癌を治療するための薬学的組成物を調製するための、本発明の二重特異性抗体の使用を提供する。

【０４５４】

放射線療法は放射線を含む場合があり、または患者への放射性医薬品の関連する投与が提供される。放射線源は、治療を受けている患者の外部にあってもよく、内部にあってもよい（放射線治療は、例えば外部ビーム放射線療法（EBRT）または近接照射療法（BT）の形をとってもよい）。このような方法の実施において使用することができる放射性元素には、例えばラジウム、セシウム-137、イリジウム-192、アメリシウム-241、金-198、コバルト-57、銅-67、テクネチウム-99、ヨウ素-123、ヨウ素-131、およびインジウム-111が含まれる。

【０４５５】

さらなる態様において、本発明は、癌を治療または予防するための方法を提供し、本方

法は、癌の治療または予防を必要とする対象に、治療的有効量の本発明の二重特異性抗体を外科手術と組み合わせて投与する段階を含む。

【０４５６】

診断用途

本発明の二重特異性抗体は診断目的でも使用することができる。従って、さらなる局面において、本発明は、本明細書において定義されたHER2×CD3二重特異性抗体を含む診断用組成物およびその使用に関する。1つの態様において、本発明は、HER2×CD3二重特異性抗体、および抗体とHER2との結合を検出するための1種類または複数種の試薬を含む容器を含む、癌を診断するためのキットを提供する。試薬は、例えば蛍光タグ、酵素タグ、または他の検出可能なタグを含んでもよい。試薬はまた、二次もしくは三次の抗体または酵素反応用試薬を含んでもよく、酵素反応によって、視覚化可能な産物が産生される。

【０４５７】

本発明は以下の実施例によってさらに例示される。実施例は、本発明の範囲を限定するものであると解釈してはならない。

【実施例】

【０４５８】

実施例1-HER2およびHER2変種のための発現構築物

完全長HER2（1255aa、Swissprot P04626）、HER2細胞外ドメイン（ECD）（Her2-ECDHis、C末端His6タグを有するaa1～653）、天然HER2スプライスバリアント（Her2-delex16、エキソン16欠失から生じ、aa633～648を欠く）、および切断型HER2受容体（Her2-stumpy、aa648～1256）を発現させるために、完全にコドン最適化された構築物を作製した。これらの構築物は、クローニングに適した制限部位および最適Kozak配列（Kozak, M., Gene 1999；234（2）：187-208）を含んだ。これらの構築物を、哺乳動物発現ベクターpEE13.4（Lonza Biologics； Bebbington, C.R., et al., Biotechnology（NY）1992；10（2）：169-75）にクローニングし、構築物が正しいことを確認するために全配列決定した。

【０４５９】

実施例2-ペルツズマブ、C1、およびF5のための発現構築物

HEK細胞においてIgG1抗体ペルツズマブ、C1、およびF5の重鎖（HC）および軽鎖（LC）を発現させるために、完全にコドン最適化された構築物を作製した。これらの構築物によってコードされる可変領域は、ペルツズマブ重鎖および軽鎖については米国特許第6,949,245号ならびにC1およびF5重鎖および軽鎖については米国特許第7,244,826号と同一である。C1およびF5については、ヒトIgG1重鎖（アロタイプf）の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターp33G1f、ヒトκ軽鎖またはヒトλ軽鎖の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターp33KまたはP33L（pcDNA3.3（Invitrogen））を使用した。ペルツズマブについては、ヒトIgG1重鎖（アロタイプf）の完全にコドン最適化された定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターpG1f（pEE12.4（Lonza Biologics）、およびヒトκ軽鎖の完全にコドン最適化された定常領域を含有するpKappa（pEE6.4（Lonza Biologics）を使用した。

【０４６０】

トラスツズマブ（ハーセプチン（Herceptin）（登録商標））は、例えば、米国特許第7,632,924号に記載の重鎖配列および軽鎖配列を用いて同じやり方で生成することができる。

【０４６１】

米国特許第6,949,245号、7,244,826号および7,632,924号に開示の配列は、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０４６２】

実施例3-HEK-293細胞またはCHO細胞における一過性発現

Freestyle（商標）293-F（懸濁増殖および既知組成のFreestyle培地に順応させたHEK-293サブクローン、（HEK-293F））細胞をInvitrogenから入手し、適切なプラスミドDNAと293fectin（Invitrogen）を用いて製造業者の説明書に従ってトランスフェクトした。抗体

発現の場合、適切な重鎖発現ベクターおよび軽鎖発現ベクターを共発現させた。

【０４６３】

pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16、およびpEE13.4Her2-stumpyを、Freestyle（商標）CHO-S（Invitrogen）細胞株においてFreestyle MAXトランスフェクション試薬（Invitrogen）を用いて一過性にトランスフェクトした。HER2およびHer2-delex16の発現を、下記のようにFACS分析によって試験した。

【０４６４】

実施例4-NSOにおける安定ポリクローナルプール発現

pEE13.4 Her2、pEE13.4 Her2-delex16、およびpEE13.4 Her2-stumpyを、ヌクレオフェクション（nucleofection）（Amaxa）によってNSO細胞に安定的にトランスフェクトした。組み込まれたグルタミン合成酵素選択マーカー（Barnes, L.M ., et al., Cytotechnology 2000；32（2）：109-123）に基づくグルタミン依存性増殖による選択後に、安定的にトランスフェクトされた細胞のプールを樹立した。

【０４６５】

実施例5-Hisタグ化HER2の精製

Her2ECDHisをHEK-293F細胞において発現させた。Her2ECDHisの中にあるHisタグは、固定化金属アフィニティクロマトグラフィーを用いた精製を可能にした。なぜなら、Hisタグ化タンパク質は樹脂ビーズに強く結合するが、培養上清中に存在する他のタンパク質は強く結合しないからである。

【０４６６】

このプロセスでは、クロマトグラフィー樹脂上に固定化されたキレート剤にCo^{2+}カチオンが充填されている。バッチモードで（すなわち、溶液中で）、Her2ECDHisを含有する上清を樹脂とインキュベートした。インキュベーション後、ビーズを上清から取り出し、カラムに詰めた。弱く結合しているタンパク質を除去するためにカラムを洗浄した。次いで、強く結合しているHer2ECDHisタンパク質を、HisとCo^{2+}との結合において競合するイミダゾールを含有する緩衝液で溶出した。脱塩カラムにおける緩衝液交換によって溶出剤をタンパク質から除去した。

【０４６７】

実施例6‐トランスジェニックマウスの免疫処置手順

抗体001、019、021、025、027、032、033、035、036、049、050、051、054、055、084、091、094、098、100、105、123および124は、以下の免疫処置によって得た：3匹の雌性HCo12マウス、1匹の雄性および2匹の雌性HCo12-Balb／Cマウス、1匹の雄性HCo17マウスならびに1匹の雄性HCo20マウス（Medarex, San Jose, CA, USA）に対して、Her2ECDを安定的にトランスフェクトした5×10^6個のNSO細胞の腹腔内（IP）免疫処置と、ハプテンであるキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と連結させた20μgのHer2ECDHisタンパク質の尾基部への皮下（SC）免疫処置とを、交互に14日毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中にて行った。他の免疫処置についてはすべて、細胞はPBS中にてIP注射し、KLHと連結させたHer2ECDHisは不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いてSC注射した。

【０４６８】

抗体125、127、129、132、152、153および159は、以下の免疫処置によって得た：1匹の雄性および2匹の雌性HCo12-Balb／Cマウス、1匹の雌性HCo20マウス、ならびに1匹の雌性HCo12マウス（Medarex）に対して、Her2delex16を安定的にトランスフェクトした5×10^6個のNSO細胞のIP免疫処置と、ハプテンであるキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と連結させた20μgのHer2ECDHisタンパク質の尾基部へのSC免疫処置とを、交互に14日毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中にて行った。他の免疫処置についてはすべて、細胞はPBS

中にてIP注射し、KLHと連結させたHer2ECDは不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いてSC注射した。

【０４６９】

抗体143、160、161、162、166および169は、以下の免疫処置によって得た：1匹の雄性および1匹の雌性HCo12マウス、1匹のHCo12-Balb／Cマウス、1匹の雄性HCo17マウス、ならびに1匹の雄性HCo20マウス（Medarex）に対して、ハプテンであるキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と連結させた20μgのHer2ECDHisタンパク質のIP免疫処置と尾基部へのSC免疫処置とを、交互に14日毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中にて行った。他の免疫処置はすべて、不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いて注射した。

【０４７０】

抗体005、006、041、044、059、060、067、072、093、106および111を、以下の免疫処置手順によって得た：2匹の雌性HCo12マウス、1匹の雌性および1匹の雄性HCo12-Balb／Cマウス、1匹の雌性および1匹の雄性HCo17マウス、ならびに2匹の雄性HCo20マウス（Medarex, San Jose, CA, USA）に対して、Her2ECDHisを安定的にトランスフェクトした5×10^6個のNS0細胞の腹腔内（IP）免疫処置、およびハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と結合させた20μgのHer2ECDHisタンパク質を一過性にトランスフェクトした5×10^6個のNS0細胞の尾基部への皮下（SC）免疫処置を、交互に2週間毎に行った。マウス1匹当たり最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中で行った。他の免疫処置についてはすべて、細胞をPBS中にてIP注射し、KLHを結合させたHer2ECDを、不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いてSC注射した。

【０４７１】

抗体150は、1匹の雌性HCo17マウス（Medarex）に対する、Her2delex16を安定的にトランスフェクトした5×10^6個のNS0細胞のIP免疫処置、およびハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と結合させた20μgのHer2ECDHisタンパク質を一過性にトランスフェクトした5×10^6個のNS0細胞の尾基部へのSC免疫処置を、14日の間隔をおいて交互に行うことによって得た。最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。細胞による初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中で行った。他の免疫処置についてはすべて、PBS中にある細胞をIP注射し、KLHと結合させたHer2ECDは不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いてSC注射した。

【０４７２】

抗体163は、1匹の雄性HCo20マウス（Medarex）に対する、ハプテンのキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）と結合させた20μgのHer2ECDHisタンパク質による、14日間隔でのIPおよび尾基部へのSCの交互の免疫処置によって得た。最大で8回の免疫処置を行った（4回のIP免疫処置および4回のSC免疫処置）。初回免疫処置は完全フロイントアジュバント（CFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）中でIPで行った。他の免疫処置は、不完全フロイントアジュバント（IFA；Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）を用いて注射した。

【０４７３】

抗原特異的FMATスクリーニングアッセイ（実施例7に記載）においてTC1014-Her2、TC1014- Her2delex16、またはTC1014-HER2stumpyに対する力価が少なくとも2回連続して認められたマウスを陽性とみなし、融合した。

【０４７４】

実施例7：ホモジニアス抗原特異的スクリーニングアッセイ

免疫マウスの血清中またはHuMab（ヒトモノクローナル抗体）ハイブリドーマもしくは

トランスフェクトーマの培養上清中にあるHER2抗体の存在を、ホモジニアス抗原特異的スクリーニングアッセイ（4クワドラント（four quadrant））によってFluorometric Micro volume Assay Technology（FMAT； Applied Biosystems, Foster City, CA, USA）を用いて確かめた。このために、4種類の細胞ベースのアッセイの組み合わせを使用した。TC1014-Her2（HER2受容体を一過性に発現するCHO-S細胞；前記のように作製された）、TC1014-Her2delex16（Her2-delexの細胞外ドメインを一過性に発現するCHO-S細胞（HER2受容体の16アミノ酸欠失変異体；前記のように作製された）、およびTC1014-Her2stumpy（HER2受容体の細胞外stumpyドメインを一過性に発現するHEK-293F細胞；前記のように作製された）、ならびにCHO-S野生型細胞（HER2を発現しない負の対照細胞）との結合を確かめた。HER2と結合させるために、試料を細胞に添加した。その後に、蛍光結合体（ヤギ抗ヒトIgG-Cy5； Jackson ImmunoResearch）を用いて、HuMabの結合を検出した。TH1014-ペルツズマブ（HEK-293F細胞において作製された）を正の対照として使用し、HuMab（登録商標）-マウスプール血清およびHuMab-KLHを負の対照として使用した。試料を、Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System（8200 CDS）を用いてスキャンし、「カウントx蛍光」を読み取り値として使用した。カウントが50を超えた時に試料は陽性と示され、カウントx蛍光は、負の対照の少なくとも3倍であった。

【０４７５】

実施例8：HuMabハイブリドーマの作製

十分な抗原特異的力価（前記で定義した）が発生したHuMabマウスを屠殺し、脾臓ならびに腹大動脈および大静脈に隣接するリンパ節を収集した。脾細胞およびリンパ節細胞とマウスミエローマ細胞株を、CEEF 50 Electrofusion System（Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA）を用いて、本質的に製造業者の説明書に従って融合した。次に、一次ウェルを、ClonePixシステム（Genetix, Hampshire, UK）を用いてサブクローニングした。この目的のために、特異的な一次ウェルハイブリドーマを、40％CloneMedia（Genetix, Hampshire, UK）および60％HyQ 2x完全培地（Hyclone, Waltham, USA）から作られた半固体培地に播種した。実施例 7に記載のように抗原特異的結合アッセイにおいてサブクローンを再試験した。さらに増殖させるために、Octet（Fortebio, Menlo Park, USA）を用いてIgGレベルを測定して、一次ウェル1個につき最も特異的でかつ最も産生しているクローンを選択した。結果として生じたHuMabハイブリドーマのさらなる増殖および培養は、標準的なプロトコール（例えば、Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006に記載のプロトコール）に基づいて行った。このプロセスによって得られたクローンをPC1014と名付けた。

【０４７６】

実施例9-精製抗体の質量分析

6ウェルまたはHyperflask段階からの抗体含有上清の小さな0.8mlアリコートを、Sciclone ALH 3000ワークステーション（Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA）においてプロテインG樹脂（PhyNexus Inc., San Jose, USA）を含有するPhyTipカラムを用いて精製した。PhyTipカラムを製造業者の説明書に従って使用したが、緩衝液を、Binding Buffer PBS（B.Braun, Medical B.V., Oss, Netherlands）およびElution Buffer 0.1Mグリシン-HCl pH2.7（Fluka Riedel-de Haen, Buchs, Germany）と交換した。精製後、試料を2M Tris-HCl pH9.0（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands）によって中和した。または、場合によっては、さらに多量の培養上清を、MabSelect SuReカラム（GE Health Care）を用いて精製した。

【０４７７】

精製後、試料を384ウェルプレート（Waters, 100ul角型ウェルプレート,部品番号186002631）に入れた。N-グリコシダーゼF（Rocheカタログ番号11365177001）を用いて、試料を37℃で一晩、脱グリコシルした。DTT（15mg/mL）を添加し（1μl/ウェル）、37℃で1時間インキュベートした。試料（5μlまたは6μl）を、Acquity UPLC（商標）（Waters, Milford, USA）においてBEH300 C18、1.7μm、2.1x50mmカラムを用いて60℃で脱塩した。0.

1％ギ酸（Fluka，カタログ番号56302，Buchs，Germany）を含むMQ水および0.1％ギ酸（Fluka，カタログ番号56302，Buchs，Germany）を含むLC-MS等級のアセトニトリル（Biosolve,カタログ番号01204101，Valkenswaard，The Netherlands）を、それぞれ、溶出剤（Eluens）AおよびBとして使用した。飛行時間型エレクトロスプレーイオン化質量スペクトルを、陽イオンモードで動いているmicrOTOF（商標）質量分析計（Bruker，Bremen，Germany）においてオンラインで記録した。分析の前に、900～3000m/zスケールを、ESチューニングミックス（tuning mix）（Agilent Technologies，Santa Clara，USA）を用いて較正した。DataAnalysis（商標）ソフトウェアv.3.4（Bruker）と5～80kDaの分子量を探すMaximal Entropyアルゴリズムを用いて、質量スペクトルをデコンボリューションした。

【０４７８】

デコンボリューション後、重複する抗体を見つけるために、全ての試料について、得られた重鎖および軽鎖の質量を比較した。これは時として余分な軽鎖の存在によるものであったが、重鎖の比較では、C末端リジン変種が存在する可能性があることも考慮に入れた。これにより、重複しない抗体、すなわち、ある特定の重鎖および軽鎖の重複しない組み合わせのリストが得られた。重複する抗体が見つかった場合には、他の試験からの結果に基づいて、1つの重複しない抗体が選択された。

【０４７９】

実施例10-HER2抗体可変ドメインの配列分析および発現ベクターへのクローニング

HER2 HuMabの全RNAを$5x10^6$個のハイブリドーマ細胞から調製し、SMART RACE cDNA Amplificationキット（Clontech）を用いて製造業者の説明書に従って、100ngの全RNAから5'-RACE-Complementary DNA（cDNA）を調製した。VHコード領域およびVLコード領域をPCR増幅し、連結非依存クローニング（ligation independent cloning）（Aslanidis，C. and P.J．de Jong，Nucleic Acids Res 1990；18（20）：6069-74）によって、pG1f発現ベクターおよびpKappa発現ベクターにインフレームで直接クローニングした。適切な重鎖ベクターがおよび軽鎖ベクターが、293fectinを用いてFreestyle（商標）293-F細胞に一過性に共発現された。このプロセスによって得られたクローンをTH1014（THは一過性HEK細胞（transient HEK cells）を意味する)と名付けた。それぞれの抗体について、16個のVLクローンおよび8個のVHクローンを配列決定した。さらなる研究および発現のために、重鎖質量および軽鎖質量の推定値が（質量分析によって求められた）同じ抗体のハイブリドーマ由来材料の質量と一致するクローンを選択した。

【０４８０】

結果として生じた配列を図1および図2ならびに配列表に示した。選択された配列を下記においてもさらに詳細に説明する。CDR配列を、IMGT（Lefranc MP. et al.，Nucleic Acids Research，27，209-212，1999およびBrochet X. Nucl. Acids Res. 36，W503-508（2008））に従って定義した。表1、表2、および表3は抗体配列情報または生殖系列配列の概要を示す。表4はコンセンサス配列を示す。

【０４８１】

（表１Ａおよび１Ｂ）HuMabs 169、050、084、025、091、129、127、159、098、153、および132（表1A）、ならびにHuMab 005、006、059、060、106、および111（表1B）の重鎖可変領域（VH）、軽鎖可変領域（VL）、およびCDR配列

1A:

SEQ ID No:1	VH 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISW VRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMT TDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:2	VH 169, CDR1	GYTFTNYG
SEQ ID No:3	VH 169, CDR2	LSAYSGNT
SEQ ID No:4	VH 169, CDR3	ARDRIVVRPDYFDY
SEQ ID No:5	VL 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:6	VL 169, CDR1	QSVSSY
	VL 169, CDR2	DAS
SEQ ID No:7	VL 169, CDR3	QQRSNWPRT
SEQ ID No:8	VH 050	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNW VRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKARANWDYFDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID No:9	VH 050, CDR1	GFTFSSYA
SEQ ID No:10	VH 050, CDR2	ISGRGGTT
SEQ ID No:11	VH 050, CDR3	AKARANWDYFDY
SEQ ID No:12	VL 050	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No:13	VL 050, CDR1	QGISSW
	VL 050, CDR2	AAS
SEQ ID No:14	VL 050, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID No:15	VH 084	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFRTYAINW VRQAPGQGLEWMGRINTVLGIVNHAQKFQGRVTITA DKSTNTAYMELNSLRSEDTAVYYCAREKGVDYYYGIE VWGQGTTVTVSS
SEQ ID No:16	VH 084, CDR1	GGTFRTYA
SEQ ID No:17	VH 084, CDR2	INTVLGIV
SEQ ID No:18	VH 084, CDR3	AREKGVDYYYGIEV

SEQ ID No:19	VL 084	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QHKPGKAPKLLIYVASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No:20	VL 084, CDR1	QGISSW
	VL 084, CDR2	VAS
SEQ ID No:21	VL 084, CDR3	QQANSFPLT
SEQ ID No:22	VH 025	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWN WIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYYFDY WAQGTLVTVSS
SEQ ID No:23	VH 025, CDR1	GGSFSDYY
SEQ ID No:24	VH 025, CDR2	IHHSGST
SEQ ID No:25	VH 025, CDR3	ARGYYDSGVYYFDY
SEQ ID No:26	VL 025	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No:27	VL 025, CDR1	QGISRW
	VL 025, CDR2	AAS
SEQ ID No:28	VL 025, CDR3	QQYNSYPIT
SEQ ID No:29	VH 091	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWT WIRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYNPSLKSRVTISVD TSKNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDY WGQGTLVTVSS
SEQ ID No:30	VH 091, CDR1	GGSFSGYY
SEQ ID No:163	VH 091, CDR2	IYHSGDT
SEQ ID No:31	VH 091, CDR3	ARLYFGSGIYYLDY
SEQ ID No:32	VL 091	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLVWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:33	VL 091, CDR1	QGISSW
	VL 091, CDR2	AAS
SEQ ID No:34	VL 091, CDR3	QQYNSFPPT
SEQ ID No:35	VH 129	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTFAIHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGGHKFYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARGLGVWGAFD YWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:36	VH 129, CDR1	GFTFSTFA
SEQ ID No:37	VH 129, CDR2	ISYDGGHK
SEQ ID No:38	VH 129, CDR3	ARGLGVWGAFDY
SEQ ID No:39	VL 129	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:40	VL 129, CDR1	QSVSSY

	VL 129, CDR2	DAS
SEQ ID No:41	VL 129, CDR3	QQRSNWWT
SEQ ID No:42	VH 127	EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKGSGYSFSIYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIFPGDSDIRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSPRH WYFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID No:43	VH 127, CDR1	GYSFSIYW
SEQ ID No:44	VH 127, CDR2	IFPGDSDI
SEQ ID No:45	VH 127, CDR3	ARQPGDWSPRHWYFDL
SEQ ID No:46	VL 127	VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGISSYLAWY QQKPGKAPELLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISYLQSEDFATYYCQQYYSFPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No:47	VL 127, CDR1	QGISSY
	VL 127, CDR2	AAS
SEQ ID No:48	VL 127, CDR3	QQYYSFPLT
SEQ ID No:49	VH 159	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILTG YFNWFDPWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:50	VH 159, CDR1	GYNFTSYW
SEQ ID No:51	VH 159, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No:52	VH 159, CDR3	ARWGTYYDILTGYFN
SEQ ID No:53	VL 159	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYYIYPWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No:54	VL 159, CDR1	QGISSW
	VL 159, CDR2	AAS
SEQ ID No:55	VL 159, CDR3	QQYYIYPWT
SEQ ID No:56	VH 098	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSW VRQAPGKGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISR DNSKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYY TLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:57	VH 098, CDR1	GFTFSNYG
SEQ ID No:58	VH 098, CDR2	ISGSAYST
SEQ ID No:59	VH 098, CDR3	AKAHYHGSGSYYTLFDY
SEQ ID No:60	VL 098	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No:61	VL 098, CDR1	QGISSW
	VL 098, CDR2	AAS
SEQ ID No:62	VL 098, CDR3	QQYNSYPYT

SEQ ID No:63	VH 153	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVIHW VRQAPGKGLEWVTVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLSAEDTAMYYCARGGITGTTGVF DYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No:64	VH 153, CDR1	GFTFSDYV
SEQ ID No:65	VH 153, CDR2	ISYDGSNK
SEQ ID No:66	VH 153, CDR3	ARGGITGTTGVFDY
SEQ ID No:67	VL 153	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWY QQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGYGTDFSL TISSLQPEDFAIYYCQQYKSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No:68	VL 153, CDR1	QGISSW
	VL 153, CDR2	DAS
SEQ ID No:69	VL 153, CDR3	QQYKSYPIT
SEQ ID No:70	VH 132	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGNSNYVQKFQGRVTM TTDTTTSTAYMELRSLTSDDTAVYYCAREYSYDSGTY FYYGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No:71	VH 132, CDR1	GYTFTSYG
SEQ ID No:72	VH 132, CDR2	ISAYNGNS
SEQ ID No:73	VH 132, CDR3	AREYSYDSGTYFYYGMDV
SEQ ID No:74	VL 132	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPMYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No:75	VL 132, CDR1	QSVSSY
	VL 132, CDR2	DAS
SEQ ID No:76	VL 132, CDR3	QQRSNWPMYT

1B)

SEQ ID No: 165	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDSDTRYRPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWTSLKASDTAIYYCARQRGDYYYFYGM DVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 166	VH 005, CDR1	GYSFHFYW
SEQ ID No: 167	VH 005, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No: 168	VH 005, CDR3	ARQRGDYYYFYGMDV
SEQ ID No: 169	VL 005	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQVPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 170	VL 005, CDR1	QSVSSSY
	VL 005, CDR2	GAS
SEQ ID No: 171	VL 005, CDR3	QQYGSSLT

SEQ ID No: 172	VH 006	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYALIWV RQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPLFDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 173	VH 006, CDR1	GFTFSNYA
SEQ ID No: 174	VH 006, CDR2	IRGGAGST
SEQ ID No: 175	VH 006, CDR3	AKARIWGPLFDY
SEQ ID No: 176	VL 006	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 177	VL 006, CDR1	QSVSSY
	VL 006, CDR2	DAS
SEQ ID No: 178	VL 006, CDR3	QQRSNWPPLT
SEQ ID No: 179	VH 059	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTRYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELY FDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 180	VH 059, CDR1	GYTFTRYG
SEQ ID No: 181	VH 059, CDR2	ISAYNGKT
SEQ ID No: 182	VH 059, CDR3	ARSPLLWFEELYFDY
SEQ ID No: 183	VL 059	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGTSLFTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 184	VL 059, CDR1	QSVSSTY
	VL 059, CDR2	GAS
SEQ ID No: 185	VL 059, CDR3	QQYGTSLFT
SEQ ID No: 186	VH 060	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSPSFQGQVTISA DKSIATAYLQWNSLKASDTAMYYCARHAGDFYYFDG LDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 187	VH 060, CDR1	GYRFTTSYW
SEQ ID No: 188	VH 060, CDR2	IYPGDSYT
SEQ ID No: 189	VH 060, CDR3	ARHAGDFYYFDGLDV
SEQ ID No: 190	VL 060	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 191	VL 060, CDR1	QSVSSSY
	VL 060, CDR2	GAS
SEQ ID No: 192	VL 060, CDR3	QQYGSSPPIT
SEQ ID No: 193	VH 106	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYY SGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 194	VH 106, CDR1	GYSFTRYW

SEQ ID No: 195	VH 106, CDR2	IYPGDSDT
SEQ ID No: 196	VH 106, CDR3	ARLTGDRGFDYYSGMDV
SEQ ID No: 197	VL 106	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-FTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 198	VL 106, CDR1	QSVSSSY
	VL 106, CDR2	GAS
SEQ ID No: 199	VL 106, CDR3	QQYGSSFT
SEQ ID No: 200	VH 111	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISW VRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITAD KSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSNWYYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 201	VH 111, CDR1	GGTFSSYG
SEQ ID No: 202	VH 111, CDR2	IIPILGIA
SEQ ID No: 203	VH 111, CDR3	ARDQEYSSNWYY
SEQ ID No: 204	VL 111	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQLYGSSPTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 205	VL 111, CDR1	QSVRSSY
	VL 111, CDR2	GAS
SEQ ID No: 206	VL 111, CDR3	QLYGSSPT

【０４８２】

（表２）選択されたHuMabのマウス起源ならびに重鎖配列相同性および軽鎖配列相同性

HuMab:	マウス：	種：	生殖系列VH：	生殖系列VL：
169	361494	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
050	350633	HCo12	IgHV3-23-01	IgKV1-12-01
084	350615	HCo12-BalbC	IgHV1-69-04	IgKV1-12-01
025	350631	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
091	350630	HCo12	IgHV4-34-01	IgKV1D-16-01
129	359783	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV3-11-01
127	359783	HCo12-BalbC	IgHV5-51-01	IgKV1D-8-01
159	363503	HCo12	IgHV5-51-01	IgKV1D-16-01
098	350659	HCo17	IgHV3-23-01	IgKV1D-16-01
153	359785	HCo12-BalbC	IgHV3-30-3-01	IgKV1D-16-01
132	361487	HCo20	IgHV1-18-01	IgKV3-11-01
005	350611	HCo12-BalbC	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
006	350611	HCo12-BalbC	IgHV3-23-1	IgKV3-11-01
059	350654	HCo17	IgHV1-18-1	IgKV3-20-01
060	350654	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
106	350660	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
111	350660	HCo17	IgHV1-69-4	IgKV3-20-01

【０４８３】

（表３Ａおよび３Ｂ）HuMabs 049、051、055、123、161、124、001、143、019、021、027、032、035、036、054、094、ならびにHuMab 041、150、067、072、163、093、および044（3B）の重鎖可変領域（VH）配列、軽鎖可変領域（VL）配列。それぞれのCDRは、図1において下線が引かれたVH配列のCDRおよび図2において下線が引かれたVL配列のCDRに対応

する。

3A:

SEQ ID No: 77	VH 049	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 78	VL 049	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 79	VH 051	EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 80	VL 051	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 81	VH 055	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPG KGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKGRFTISRDNSKSTLCLQMNS LRAEDTAVYYCAKARANWDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 82	VL 055	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGK APKLLIYAASILQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLRPEDFATYY CQQANSFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 83	VH 123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPG QALEWMGWITTYSSNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRVVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 84	VL 123	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDTSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSHWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 85	VH 161	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELR SLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 86	VL 161	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 87	VH 124	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAAGYTFTNYGISWVRQAPG QGLEWMGWIITYNGNTIYAQRFQDRVTMTTDTSTSTAYMELRS LRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 88	VL 124	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPRTFGQGTKVEIK

SEQ ID No: 89	VH 001	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGNYGSGYYYFDLWGRGTQVTVSS
SEQ ID No: 90	VL 001	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIFAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYISFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 91	VH 143	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSGSANYNPSLMSRVTISVDTSKNQFSLQLSSV TAADTAVYYCARGYYGSGYYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 92	VL 143	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 93	VH 019	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHVGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKSQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYYDSGVYYFDYWAQGTLVTVSS
SEQ ID No: 94	VL 019	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 95	VH 021	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARGYYASGVYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 96	VL 021	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 97	VH 027	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWNWIRQPPG KGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLNLSSVT AADTAVYYCARGLIGSGYYYFDYWDQGTLVTVSS
SEQ ID No: 98	VL 027	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 99	VH 032	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 100	VL 032	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 101	VH 035	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 102	VL 035	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 103	VH 036	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWSWIRQPPG KGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLYYGSGTYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 104	VL 036	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLTWYQQKPEKA PKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 105	VH 054	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPG KGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLWYGSGSYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 106	VL 054	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID No: 107	VH 094	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQPPG KGLEWIGEIYHSGDTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLYSVT AADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 108	VL 094	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLVWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 109	VH 105	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSAYSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLWLQMNS LRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 110	VL 105	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 111	VH 100	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMNWVRQAPG KGLEWVSAISGTGYSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKAHYFGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 112	VL 100	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 113	VH 125	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMNWVRQAPG KGLEWVSTISGSGYATYYADSVKGRFTISRDNSKTTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKGHTLGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 114	VL 125	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
SEQ ID No: 115	VH 162	EVQLWESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAP GKGLEWVSGISGSGYSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGYYHGSGSYYTSFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 116	VL 162	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 117	VH 033	QVQLVESGGGVVQTGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGDYISSSGVFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 118	VL 033	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 119	VH 160	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSHAMHWVRQAPG KGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTMYLQMN SLRAEDTAMCYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 120	VL 160	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPEK APKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 121	VH 166	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNEYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGSIIGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 122	VL 166	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 123	VH 152	QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSYKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 124	VL 152	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPENFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK

SEQ ID No: 125	VH 167	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 126	VL 167	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEK APKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQYNSYPITFGQGTRLEIK

3B:

SEQ ID No: 207	VH 041	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQKGDFYYFFGLDVWGQGTAITVSS
SEQ ID No: 208	VL 041	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 209	VH 150	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQAGDYYYYNGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 210	VL 150	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 211	VH 067	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQKGDYYYHYGLDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 212	VL 067	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 213	VH 072	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQKGDYYYFNGLDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 214	VL 072	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 215	VH 163	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGSGYRFISYWIGWVRQMPG KGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISVDKSISTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQRGDYYYFNGLDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 216	VL 163	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 217	VH 093	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPG KGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSS LRASDTAMYYCARQRGDYYYFFGLDIWGQGTTVTVSL
SEQ ID No: 218	VL 093	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 219	VH 044	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWVRQMPG KGLEWMGSIFPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSITTAYLQWSS LKASDTAMYYCARQAGDYYYYNGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 220	VL 044	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSLTFGGGTKVEIK

【０４８４】

（表４）図1および2に示された配列アラインメントに基づくコンセンサスCDR

SEQ ID No: 9 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSSYA	
SEQ ID No: 127 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR2	ISGX1GGX2T	式中、X1=RまたはS, および X2=TまたはS; 好ましくは、式中、X1=Rおよび X2=T
SEQ ID No: 11 050-049-051-055	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKARANWDYFDY	
SEQ ID No: 128 084	IgHV1-69-04	VH CDR1	GGTFX1X2YA	式中、X1=RまたはS, および X2=TまたはS; 好ましくは、式中、X1=Rおよび X2=T
SEQ ID No: 129 084	IgHV1-69-04	VH CDR2	IX1X2X3LGIX4	式中、X1=NまたはI, X2=TまたはP, X3=Vまたは I,および X4=VまたはA, 好ましくは、式中、X1=N,X2=T, X3=V,およびX4=V
SEQ ID No: 130 084	IgHV1-69-04	VH CDR3	AREKGVDYYYG X1X2	式中、X1=IまたはM, X2=EまたはD; 好ましくは、式中、X1=I, X2=E
SEQ ID No: 131 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	式中、X=NまたはS, 好ましくはN
SEQ ID No: 132 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR2	IX1X2YX3GNT	式中、X1=S, T,またはI; X2=AまたはT; X3=SまたはN; 好ましくは、式中、X1=S, X2=A, およびX3=S
SEQ ID No: 133 169-123-161-124	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARDRX1X2VRP DYFDY	式中、X1=I またはV, X2=V またはI;好ましくは、式中、X1=I および X2=V
SEQ ID No: 134 025-001-143-019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGSFSX1YX2	式中、X1=Dまたは G および X2=YまたはF; 好ましくは、式中、X1=D および X2=Y

SEQ ID No: 135 025-001-143-019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HX2GSX3	式中X1=HまたはN, X2=SまたはV,およびX3=TまたはA;好ましくは、式中X1=H, X2=S, および X3=T
SEQ ID No:136 025-001-143-019-021-027	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARGX1X2X3SGX4YYFDX5	式中X1=Y, NまたはL; X2=YまたはI, X3=D, GまたはA; X4=VまたはY;およびX5=YまたはL; 好ましくは、式中X1=Y, X2=Y, X3=D, X4=V, およびX5=Y
SEQ ID No:137 091-032-035-036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR1	GGSFSX1YY	式中X1=GまたはD, 好ましくは G
SEQ ID No:138 091-032-035-036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR2	IX1HSGX2T	式中X1=Y, NまたはH; および X2=DまたはS; 好ましくは、式中X1=YおよびX2=D
SEQ ID No:139 091-032-035-036-054-094	IgHV4-34-01	VH CDR3	ARLX1X2GSGX3YYX4DY	式中X1=Y, FまたはW; X2=FまたはY; X3=I, TまたはS;および X4=LまたはF; 好ましくは、式中X1=Y, X2=F, X3=I, およびX4=L
SEQ ID No:140 129	IgHV3-30-01	VH CDR1	GFTFSX1X2A	式中X1=TまたはF, X2=FまたはY; 好ましくは、式中X1=T およびX2=F
SEQ ID No:141 129	IgHV3-30-01	VH CDR2	ISYDGX1X2K	式中X1=GまたはS, X2=HまたはN; 好ましくは、式中X1=G およびX2=H
SEQ ID No:142 129	IgHV3-30-01	VH CDR3	ARGLGVWGX1FDY	式中X1=AまたはY, 好ましくはA
SEQ ID No:143 098-105-100-125-162	IgHV3-23-01	VH CDR1	GFTFX1X2YX3	式中X1=S, NまたはT; X2=N, DまたはS;およびX3=GまたはA; 好ましくは、式中X1=S, X2=N およびX3=G
SEQ ID No:144 098-105-100-125-162	IgHV3-23-01	VH CDR2	ISGX1X2X3X4T	式中X1=SまたはT, X2=AまたはG, X3=YまたはG, X4=SまたはA; 好ましくは、式中X1=S, X2=A, X3=Y, X4=S

SEQ ID No:145 098-105-100- 125-162	IgHV3-23-01	VH CDR3	AKX1X2X3X4G SGSYYTX5FDY	式中X1=AまたはG; X2=Hまたは Y; X3=Y またはT; X4=H, F またはL; X5=LまたはS; 好ましくは、式中X1=A; X2=H; X3=Y; X4=H; X5=L
SEQ ID No:146 127	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYSFX1X2YW	式中X1=Sまたは T, X2=I または S; 好ましくは、式中 X1=S, X2=I
SEQ ID No:147 127	IgHV5-51-01	VH CDR2	IX1PGDSDX2	式中 X1=FまたはY, X2=I または T; 好ましくは、式中X1=F, X2=I
SEQ ID No:148 127	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARQPGDWSPR HWYFDL	
SEQ ID No:149 159	IgHV5-51-01	VH CDR1	GYXFTSYW	式中X=NまたはS, 好ましくはN
SEQ ID No:51 159	IgHV5-51-01	VH CDR2	IYPGDSDT	
SEQ ID No:52 159	IgHV5-51-01	VH CDR3	ARWGTYYDILT GYFN	
SEQ ID No:71 132	IgHV1-18-01	VH CDR1	GYTFTSYG	
SEQ ID No:150 132	IgHV1-18-01	VH CDR2	ISAYNGNX	式中X=Sまたは T, 好ましくはS
SEQ ID No:151 132	IgHV1-18-01	VH CDR3	AREYSYDSGTY FYYGMDV	
SEQ ID No:152 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR1	GFTFSX1X2X3	式中 X1=DまたはS, X2=Y または H, X3=V またはA; 好ましくは、 式中 X1=D, X2=Y, X3=V
SEQ ID No:153 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR2	ISYDGSX1X2	式中X1=N またはY, X2=K または E, 好ましくは、式中X1=N およびX2=K

SEQ ID No:154 153-033-160- 166-152-167	IgHV3-30- 03-01	VH CDR3	ARGX1X2X3X4 X5X6GX7FDY	式中 X1=G, D または S; X2=I または Y; X3=T または I; X4=G または S; X5=T または S; X6=T または S; X7=Y または V; 好ましく は、式中 X1=G; X2=I; X3=T; X4 =G; X5=T; X6=T; および X7=V
SEQ ID No:13 050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR1	QGISSW	
050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR2	XAS	式中 X=A または V
SEQ ID No:155 050-084-049- 051-055	IgKV1-12-01	VL CDR3	QQANSFPXT	式中 X=I または L
SEQ ID No:6 169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY	
169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR2	DXS	式中 X=A または T, 好ましくは A
SEQ ID No:156 169-124-161- 123	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRSXWPRT	式中 X=N または H, 好ましくは N
SEQ ID No:157 025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR1	QGISXW	式中 X=R または S, 好ましくは R
025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID No:164 025-001-019- 143-021-027	IgKV1D-16- 01	VL CDR3	QQYNSXPIT	式中 X=Y または F, 好ましくは Y
SEQ ID No:33 091-032-035- 036-054-094	IgKV1D-16- 01	VL CDR1	QGISSW	
091-032-035- 036-054-094	IgKV1D-16- 01	VL CDR2	AX1X2	式中 X1=A または T, および X2=S または F; 好ましくは、 式中 X1=A および X2=S

SEQ ID No:158 091-032-035-036-054-094	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSFPPT	
SEQ ID No:159 098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIXSW	式中 X=S または N, 好ましくは S
098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR2	AAS	
SEQ ID No:160 098-100-105-125-162	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYNSYPXT	式中 X=Y または L, 好ましくはY
SEQ ID No:161 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR1	QGIX1X2W	式中 X1=S または N; X2=S または N; 好ましくは、式中 X1=X2=S
153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR2	XAS	式中 X=D または A, 好ましくは D
SEQ ID No:162 153-152-166-167-160-033	IgKV1D-16-01	VL CDR3	QQYXSYPIT	式中 X=K または N, 好ましくは K
SEQ ID No: 221 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR1	GYX1FX2X3YW	式中 X1=S または R; X2=S, T, H, または I; および X3=S, R, または F; 好ましくは、式中 X2=H または T
SEQ ID No: 222 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR2	IX1PGDSX2T	式中 X1=Y または F; X2=D, Y, または H 好ましくは、式中 X2=D または Y

SEQ ID No: 223 005-060-106-041-150-067-072-163-093-044	IgHV5-51-1	VH CDR3	ARX1X2X3X4X5X6X7X8YX9X10GX11DX12	式中X1=Q, H, またはL; X2=R, A, T, またはK; X3=G; X4=D; X5=Rまたは無し; X6=Gまたは無し; X7=YまたはF; X8=YまたはD; X9=Y, F, またはH; X10=Y, D, S, F, またはN; X11=Mまたは L; および X12=Vまたは I; 好ましくは、式中 X1=Q, X2= Rまたは A; X5=X6=無し; X7=Yまたは F; X8=Y; X9=F; X10=Y; および X12=V
SEQ ID No: 224 006	IgHV3-23-1	VH CDR1	GFTFSXYA	式中X=NまたはS, 好ましくはN
SEQ ID No: 225 006	IgHV3-23-1	VH CDR2	IX1GX2X3GST	式中X1=Rまたは S; X2=Gまたは S; および X3=Aまたは G, 好ましくは、式中 X1=R; X2=G; および X3=A
SEQ ID No: 226 006	IgHV3-23-1	VH CDR3	AKRIWGPXFDY	式中X=Lまたは Y, 好ましくはL
SEQ ID No: 227 059	IgHV1-18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	式中X=Rまたは S, 好ましくはR
SEQ ID No: 228 059	IgHV1-18-1	VH CDR2	ISAYNGXT	式中X=Kまたは N, 好ましくはK
SEQ ID No: 229 059	IgHV1-18-1	VH CDR3	ARSPLLWFEELYFDY	
SEQ ID No:230 111	IgHV1-69-4	VH CDR1	GGTFSSYX	式中X=Gまたは A, 好ましくはG
SEQ ID No: 202 111	IgHV1-69-4	VH CDR2	IIPILGIA	
SEQ ID No: 231 111	IgHV1-69-4	VH CDR3	ARDQEYSSX1X2X3	式中X1=Nまたは Y; X2=Wまたは F; および X3=Yまたは D, 好ましくは、式中 X1=N; X2=W; および X3=Y

SEQ ID No: 232 005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR1	QSVX1SX2Y	式中 X1=S または R および X2=S または T
005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR2	GAS	
SEQ ID No: 233 005-059-060-106-111-041-150-067-072-163-093-044	IgKV3-20-01	VL CDR3	QX1YGX2SX3X4X5T	式中 X1=Q または L; X2=S または T; X3=P または 無し; X4=P, L, R, または 無し; および X5=L, F, I, または 無し; 好ましくは、式中 X4=P, L, または 無し
SEQ ID No: 177 006	IgKV3-11-01	VL CDR1	QSVSSY	
006	IgKV3-11-01	VL CDR2	DAS	
SEQ ID No: 178 006	IgKV3-11-01	VL CDR3	QQRSNWPPLT	

【０４８５】

実施例11-抗体の精製

培養上清を0.2μmデッドエンドフィルターで濾過し、5mLのMabSelect SuReカラム（GE Health Care）にロードし、0.1Mクエン酸ナトリウム-NaOH, pH3を用いて溶出した。すぐに、溶出液を2M Tris-HCl, pH9で中和し、12.6mM NaH2PO4、140mM NaCl, pH7.4（B.Braun）に対して一晩、透析した。または、精製後、溶出液をHiPrep Desaltingカラムにロードし、抗体を12.6mM NaH2PO4、140mM NaCl, pH7.4（B.Braun）緩衝液に交換した。透析後または緩衝液交換後、試料を0.2μmデッドエンドフィルターで滅菌濾過した。純度をSDS-PAGEによって求め、濃度を比濁分析および280nmでの吸光度によって測定した。精製抗体を4℃で保管した。実施例9に記載のように、ハイブリドーマによって発現された抗体重鎖および軽鎖の分子量を特定するために、質量分析を行った。

【０４８６】

実施例12‐FACS分析を利用して測定した、膜結合型HER2を発現する腫瘍細胞に対するHER2クローンの結合

AU565細胞（ATCCで購入、CRL-2351）およびA431細胞（ATCCで購入、CRL-1555）に対するHER2抗体の結合を、フローサイトメトリーを用いて試験した（FACS Canto II, BD Biosciences）。Qifi分析（Dako, Glostrup, Denmark）により、AU565細胞が細胞当たり平均1,000,000コピーのHER2タンパク質を発現し、一方、A431細胞は細胞当たり平均15,000コピーを発現したことが判明した。HER2抗体の結合は、フィコエリトリン（PE）結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson）を用いて検出した。トラスツズマブ（臨床グレードのハーセプチン（登録商標））を陽性対照として用い、アイソタイプ対照抗体を陰性対照抗体として用いた。EC_{50}値は、非線形回帰（傾きが変化するS字形用量反応）を利用して、GraphPad Prism V4.03ソフトウエア（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて決定した。

【０４８７】

被験HER2抗体はすべて、AU565細胞およびA431細胞のいずれで発現されたHER2とも用量依存的な様式で結合した。クロスブロック群1、2および3の抗体の場合、結合に関するEC_{50}値は、AU565細胞については0.336～2.290μg／mL、A431細胞については0.068～1.135μg／mLの幅があった（図3A～D）。クロスブロック群4の抗体の場合、結合に関するEC_{50}値は、AU565細胞については0.304～2.678μg／mL、A431細胞については0.106～1.982μg／mLの幅があった（図3EおよびF）。特にA431細胞に関しては、試験した抗体の間でEC_{50}値の大きな違いが観察された。しかし、抗体098はいずれの種類の細胞においてもEC_{50}値が最も優れていた（すなわち、最も低かった）。また、AU565細胞およびA431細胞のいずれでも、異なる抗体間では最大結合レベルのある程度の違いが観察された。試験したクロスブロック群1～3の抗体の中では、AU565細胞での最大結合レベルは抗体098がやはり最も高かったが、一方、A431細胞での最大結合レベルは抗体025が最も高かった。クロスブロック群4の抗体に関しては、抗体005および006が、他のHER2抗体と比較してA431での最大結合レベルがより高いことが明らかに示された。

【０４８８】

実施例13-FACS分析によって測定された、HER2抗体と、アカゲザル上皮細胞上に発現している膜結合型HER2との結合

アカゲザルHER2との交差反応性を確かめるために、フローサイトメトリー（FACS Canto II, BD Biosciences）を用いて、HER2抗体とHER2陽性アカゲザル上皮細胞（4MBr-5、ATCCで購入）との結合を試験した。フィコエリトリン結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson）を二次結合体として使用した。アイソタイプ対照抗体を負の対照抗体として使用した。

【０４８９】

試験した全てのHER2抗体がアカゲザルHER2と交差反応した（図4AおよびB）。どちらの試験濃度（1μg/mLおよび10μg/mL）でもHER2抗体はアカゲザルHER2に特異的に結合することができた。抗体127は、1μg/mL濃度では弱い結合を示したが、10μg/mL濃度では良好な結合を示した。抗体098は、両方の抗体濃度で結合レベルが最大であった。アイソタイプ対照抗体を用いた場合、結合は観察されなかった。

【０４９０】

実施例14-サンドイッチELISAにおいて測定された、可溶性Her2ECDHisとの結合におけるHER2抗体の競合

最適な試験HER2抗体コーティング濃度および最適なHer2ECDHis濃度を以下のように求めた。ELISAウェルを、PBSで連続希釈したHER2 HuMab（2倍希釈で0.125～8μg/mL）で4℃で一晩コーティングした。次に、ELISAウェルをPBST（0.05%Tween-20[Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands]を添加したPBS）で洗浄し、PBSTC（2%[v/v]ニワトリ血清[Gibco, Paisley, Scotland]を添加したPBST）で室温（RT）で1時間ブロックした。次いで、ELISAウェルをPBSTで洗浄し、PBSTCで連続希釈したHer2ECDHis（2倍希釈で0.25～2μg/mL）とRTで1時間インキュベートした。結合しなかったHer2ECDHisをPBSTで洗い流し、結合したHer2ECDHisを、0.25μg/mLビオチン化ウサギ抗6xhis-biot（Abcam, Cambridge, UK）とRTで1時間インキュベートした。その後に、プレートをPBSTで洗浄し、PBSTで希釈した0.1μg/mLストレプトアビジン-ポリ-HRP（Sanquin, Amsterdam, The Netherlands）と1時間インキュベートした。洗浄後、光から保護しながら、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)（ABTS：1個のABTS錠剤を50mL ABTS緩衝液（Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands）で希釈した）とRTで15分間インキュベートすることによって、反応を視覚化した。等量のシュウ酸（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）を添加することによって発色を止めた。405nmでの蛍光をマイクロタイタープレートリーダー（Biotek Instruments, Winooski, USA）によって測定した。それぞれの抗体の最適以下の結合をもたらした抗体濃度を求め、以下のクロスブロック実験に使用した。

【０４９１】

各HER2抗体を、上記の通りに決定した準最適用量でELISAウェルにコーティングした。ELISAウェルのブロッキングの後に、ウェルを、過剰な第2の（競合用）HER2抗体の存在下または非存在下で、1μg／mLという所定濃度のビオチン化Her2ECDHisとともにインキュベ

ートした。続いてELISAを、上記の通りに行った。コーティングされた抗体に対するHer2ECDHisの残留結合を、競合用抗体の非存在下で観察された結合に対する相対的なパーセンテージとして表した。続いて、競合率を、100から阻害率を差し引いたものとして求めた。75％の競合は完全なクロスブロックと見なし、一方、25～74％の競合は部分的ブロックと見なし、0～24％の競合はブロックなしと見なした。

【０４９２】

クロスブロック群1、2および3：

表5Aに示されているように、これらの群のHER2抗体はすべて、Her2ECDHisに対する結合に関して、少なくとも部分的には競合することが見いだされた。抗体を3つの主なクロスブロック群に分けた後に、すべての抗体を、各群の少なくとも1つの代表的な抗体との競合に関して試験した。

【０４９３】

第1の群はトラスツズマブならびに抗体169、050および084で構成され、これらはHer2ECDHisに対する結合をめぐって互いにブロックしたが、他の群の抗体はクロスブロックしなかった。

【０４９４】

第2の群はペルツズマブならびに抗体025、091および129で構成され、これらはHer2ECDHisに対する結合をめぐって互いにブロックしたが、ただし抗体129および091は、いずれもペルツズマブおよび025をクロスブロックしたものの、互いに対してはそうでなかった。第2群の抗体はいずれも、他の群の抗体をブロックしなかった。

【０４９５】

第3の群は抗体C1、F5、127、098、132、153および159で構成され、これらは他の群のいかなる抗体もクロスブロックしなかった。この第3群の中では、ある程度の差異が観察された。抗体127は、Her2ECDHisに対する結合をめぐって、この群の中の他のすべての抗体をクロスブロックすることができた唯一の抗体であった；抗体159は、132を除き、この群の中の他のすべての抗体をクロスブロックした；クローン098は、132および153を除き、第3群のすべての抗体をクロスブロックした；抗体153は、Her2ECDHisに対する結合をめぐって127、132および159をクロスブロックしたが、098、C1またはF5はクロスブロックしなかった；クローン132は127、132および153をクロスブロックした。競合用抗体として加えた場合に、互いにクロスブロックを明らかに示したのはF5およびC1のみであった。しかし、逆の反応により、抗体127、098および159との競合も明らかになったが、153および132についてはそうでなかった。おそらく、これらの違いはHer2ECDHisに対する抗体C1およびF5の親和性がより低いことに起因すると考えられる。

【０４９６】

100％よりも高い値は、アビディティー効果、および2つの非競合性抗体を含む抗体-Her2ECDHis複合体の形成によって説明することができる。

【０４９７】

クロスブロック群4：

表5に示すように、本群のHER2抗体はすべて、Her2ECDHisに対する結合に関して、それら自体と少なくとも部分的には競合した。トラスツズマブ（臨床グレードのハーセプチン（登録商標））およびペルツズマブ（TH1014-pert、HEK-293細胞において一過性に産生）は、それら自体と競合することのみが可能であり、クロスブロック群4の列記した他のHER2抗体のいずれとも競合することができなかった。C1およびF5（どちらもHEK-293細胞において一過性に産生）は、Her2ECDHisに対する結合に関して互いに競合したが、クロスブロック群4の他のHER2抗体とは競合しなかった。

【０４９８】

抗体005、006、059、060、106および111はすべて、Her2ECDHisに対する結合に関して互いに競合したが、トラスツズマブ、ペルツズマブ、C1またはF5のいずれともクロスブロックは行わなかった。クローン005、059、060および106は、006が競合用抗体である場合にのみ006をブロックした。006を固定化した逆反応では、005、059、060または106によるブ

ロックは全く見られなかった。これは、クローン006の見かけの親和性が、図3Aおよび3Bに示したように、005、059、060、106および111と比較して、より高い結果である可能性がある。100％よりも高い値は、結合活性効果、および2つの非ブロッキング抗体を含む抗体-Her2ECDHis複合体の形成によって説明することができる。

【０４９９】

（表５）Her2ECDHisに対する結合に関するHER2抗体の競合およびクロスブロック

5A:

固定化された mAb ↓	競合mAb →														
	トラスツズマブ	**169**	**050**	**084**	**pert**	**025**	**091**	**129**	**C1**	**F5**	**127**	**159**	**098**	**153**	**132**
トラスツズマブ	6	15	6	51	100	107	100	85	103	99	115	90	101	101	101
TH1014-169	19	45	21	73	101	98	105	106	ND	ND	ND	ND	105	102	ND
TH1014-050	13	30	12	74	95	104	98	110	ND	ND	ND	ND	102	104	ND
TH1014-084	74	73	76	20	101	106	104	104	ND	ND	ND	ND	109	98	ND
TH1014-pert	104	100	94	95	9	20	19	39	106	125	116	81	103	100	109
TH1014-025	98	98	100	104	8	18	21	15	ND	ND	ND	ND	102	99	ND
TH1014-091	99	99	95	100	5	13	15	78	ND	ND	ND	ND	98	98	ND
TH1014-129	93	99	97	92	22	55	76	12	ND	ND	ND	ND	106	98	ND
TH1014-C1	89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	65	58	73	53	58	77	90
TH1014-F5	197	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	70	21	62	15	16	80	125
TH1014-127	102	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	112	88	11	8	58	21	44
TH1014-159	111	ND	ND	ND	112	ND	ND	ND	96	86	15	6	11	40	79
TH1014-098	107	102	100	103	104	108	104	107	125	96	21	9	17	110	142
TH1014-153	134	111	103	107	121	97	102	106	257	96	27	23	115	28	33
TH1014-132	353	ND	ND	ND	288	ND	ND	ND	422	379	30	131	309	41	32
クロスブロック群	**1**	**1**	**1**	**1**	**2**	**2**	**2**	**2b**	**3a**	**3a**	**3a**	**3a**	**3a**	**3b**	**3b**

5B:

	競合 mAb: →									
固定化されたmAb ↓	トラスツズマブ	**Pert**	**C1**	**F5**	**106**	**111**	**005**	**006**	**059**	**060**
トラスツズマブ	6	100	103	99	114	166	137	110	120	119
TH1014-pert	104	9	106	125	115	145	151	125	132	118
TH1014-C1	89	85	65	58	84	86	98	99	89	93
TH1014-F5	197	178	70	21	129	183	178	192	165	185
PC1014-106	323	275	471	495	26	21	25	25	25	23
PC1014-111	110	102	122	119	75	14	51	10	65	36
PC1014-005	126	115	157	227	54	32	18	15	22	12
PC1014-006	163	136	136	153	127	47	148	20	129	125
PC1014-059	117	107	78	128	23	12	13	11	12	11
PC1014-060	106	99	108	126	37	35	30	6	14	19
クロスブロック群	**1**	**2**	**3**	**3**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**

75 – >100% 競合

25 – 74% 競合

0 – 24% 競合

【０５００】
示した値は、2回の独立した実験の、競合用抗体の非存在下で観察された結合に対する相対的な結合の平均割合である。HEKにより産生されたTH1014-C1およびTH1014-F5を用いる競合実験は1回行った。トラスツズマブ（臨床グレードのハーセプチン（登録商標））およびHEKにより産生されたペルツズマブ（TH1014-pert）についても試験した。
【０５０１】
実施例15-抗体依存性細胞傷害（ADCC）
SK-BR-3細胞（ATCCで購入、HTB-30）を収集し（5x10^6個の細胞）、洗浄し（PBSで1500rpm、5分間、2回）、10％コスミック（cosmic）仔ウシ血清（CCS）（HyClone, Logan, UT, USA）を添加したRPMI1640培地1mLに収集した。これに、200μCi^{51}Cr（クロム-51； Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands）を添加した。振盪している水浴中で、混合物を37℃で1.5時間インキュベートした。細胞を（PBSで1500rpm、5分間、2回）洗浄した後に、10％CCSを添加したRPMI1640培地に再懸濁し、トリパンブルー排除によって計数し、1x10^5細胞/mLの濃度まで希釈した。
【０５０２】
その間、末梢血単核球（PBMC）を、標準的なFicoll密度遠心分離を用いて製造業者の説明書（リンパ球分離培地； Lonza, Verviers, France）に従って、新鮮なバフィーコート（Sanquin, Amsterdam, The Netherlands）から単離した。細胞を、10％CCSを添加したRPMI1640培地に再懸濁した後に、トリパンブルー排除によって計数し、1x10^7細胞/mLまで濃縮した。
【０５０３】
トラスツズマブはCHO細胞で産生され、その結果、12.4％という（高い）非コアフコシル化グレードをもたらしたが、一方、他のHER2抗体はHEK細胞で産生され、その結果、平均4％という非コアフコシル化をもたらした。
【０５０４】
ADCC実験のために、96ウェルマイクロタイタープレートの中で、50μLの^{51}Cr標識SK-BR-3細胞（5,000個の細胞）を、総体積100μLの10％CCS添加RPMI培地に溶解した15μg/mL HER2抗体（IgG1,κ）とプレインキュベートした。RTで15分後に、50μLのPBMC（500,000個の細胞）を添加して、100：1のエフェクター：標的比にした。細胞溶解の最大量は、50μLの^{51}Cr標識SK-BR-3細胞（5,000個の細胞）を100μLの5％Triton-X100とインキュベートすることによって確かめられた。自然溶解量は、抗体またはエフェクター細胞を含まない150μLの培地中で5,000個の^{51}Cr標識SK-BR-3細胞をインキュベートすることによって確かめられた。抗体非依存性細胞溶解のレベルは、抗体を使用せずに5000個のSK-BR-3細胞を500,000個のPBMCとインキュベートすることによって確かめられた。その後に細胞を、37℃、5％CO_2で4時間インキュベートした。細胞溶解量を確かめるために、細胞を遠心分離（1200rpm、3分）し、75μLの上清をミクロニックチューブ（micronic tube）に移し、この後に、放出された^{51}Crを、ガンマカウンターを用いてカウントした。測定されたカウント毎分（cpm）を用いて、以下のように抗体性溶解のパーセントを計算した：
（cpm試料-cpm Ab非依存性溶解）/（cpm最大溶解-cpm自然溶解）x100％。
【０５０５】
クロスブロック群1および2のHER2抗体は、ADCCを介したSK-BR-3細胞の有効な溶解を誘導した（図5A）。第3群では、有効なADCCを誘導したのは抗体153が唯一の抗体であり、抗体132は約10％のADCCを誘導し、クローン098、159および127はADCCを誘導しなかった。図5を参照のこと。クロスブロック群4のHER2抗体はすべて、ADCCを介したSK-BR-3細胞の有効な溶解を誘導した（図5B）。クロスブロック群4の種々の抗体による平均溶解率には15％～28％の幅があり、平均41％の溶解を示したトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））とは対照的であった。理論に拘束されるものではないが、トラスツズマブによるより高い溶解率は、HEKにより産生された他のHER2抗体上のほぼ4％の非コア（non-core）フコシル化と比較して、そのCHO産生に起因する非コアフコシル化グレードの増大（12.4％）が原因で、またはHER2受容体-抗体複合体の、より少ない内部移行を誘導するエピトープ

を認識することによって、起こった可能性がある。

【０５０６】

実施例16- AU565細胞のリガンド非依存性増殖の阻害

HER2抗体がインビトロでAU565細胞の増殖を阻害する能力を試験した。AU565細胞上でのHER2発現レベルが高いために（実施例12に記載のように細胞1個あたり約1,000,000コピー）、これらの細胞においてHER2は常時活性型であり、従って、リガンド誘導性ヘテロ二量体化に依存しない。

【０５０７】

96ウェル組織培養プレート（Greiner bio-one, Frickenhausen, Germany）の中に、1ウェルにつき9000個のAU565細胞を、無血清細胞培地に溶解した10μg/mL HER2抗体の存在下で播種した。対照として、細胞を、抗体を含まない無血清培地に播種した。3日後に、Alamarblue（BioSource International, San Francisco, US）を用いて製造業者の説明書に従って、生細胞量を定量した。EnVision 2101 Multilabelリーダー（PerkinElmer, Turku, Finland）と標準的なAlamarblue設定を用いて、蛍光をモニタリングした。抗体処理細胞のAlamarblueシグナルを未処理細胞に対するパーセントでプロットした。統計解析にはダネット検定を適用した。

【０５０８】

HER2抗体処理後のAU565細胞の増殖率を、100％に設定した非処理細胞と比較した。HER2抗体処理後のAU565細胞の増殖率を、100％に設定した非処理細胞と比較した。試験した第1群の抗体のうち、トラスツズマブ、050および169はAU565細胞の増殖の有意な阻害を明らかに示したが（P＜0.05）、一方、084は全く効果を有さなかった。第2群の被験抗体（ペルツズマブ、025、092および129）はいずれも、AU565細胞の増殖を阻害することができなかった。第3群の被験抗体（098および153）は、AU565の増殖を阻害しなかった。対照的に、どちらの抗体もAU565細胞の増殖を非処理細胞と比較して強化した（098の方が153を上回る）。図6参照。トラスツズマブおよびペルツズマブに関しては、これはJuntilla et al.（Cancer Cell 2009;15(5):353-355）によって記載された結果に一致していた。

【０５０９】

クロスブロック群4では、TH1014-F5がAU565細胞の増殖を有意に強化し、このことはこれがアゴニスト抗体であることを指し示しており、一方、試験したクロスブロック群4の他の抗体（005、060およびペルツズマブ）はいずれも、AU565増殖に対して実質的な効果を及ぼさなかった（データは提示せず）。増殖を強化することは、例えば、薬物の細胞傷害作用が細胞増殖に依拠しているか、またはそれによって強化される場合というような、ADC結合体のある種の治療応用においては利点となる可能性がある。

【０５１０】

実施例17 - リガンドで誘導されるMCF-7細胞の増殖の阻害

HER2はオーファン受容体であるため、そのシグナル伝達は主として、EGFRおよびHer3といった、ErbBファミリーの他のメンバーの活性化に依存する。リガンド結合が起こると、これらの2つの受容体はHER2受容体と結合してそれを活性化し、その結果、例えば増殖を引き起こすことができる。さまざまな刊行物が、ヘレグリン-β1で誘導される増殖をペルツズマブが有効に阻害することを記載している（Franklin MC. Cancer Cell 2004 / Landgraf R. BCR 2007）。トラスツズマブに関しては、ヘレグリン-β1で誘導されるHER2／HER3ヘテロ二量体化および増殖に対してそれがほとんど影響を及ぼさないことが記載されている（Larsen SS., et al., Breast Cancer Res Treat 2000;58:41-56；Agus DB., et al., Cancer Cell 2002;2:127-137；Wehrman et al. (2006)、前記）。

【０５１１】

本ヒトHER2抗体が、ヘレグリン-β1で誘導されるHER2／HER3ヘテロ二量体と干渉する能力を調べるために、ヘレグリン-β1で誘導される増殖アッセイを行った。このために、細胞1個当たりおよそ20,000個のHER2分子を発現するMCF7細胞（ATCCで購入、HTB-22）を、完全細胞培地中にて、96ウェル組織培養プレート（Greiner bio-one）（細胞2,500個／ウェル）に播種した。4時間後に、細胞培地を、1% Cosmic Calf Serum（CCS）および10μg

／mLのHER2抗体を含む飢餓培地に置き換えた。次に、1% CCSを含む飢餓培地中に希釈したヘレグリン-β1（PeproTech, Princeton Business Park, US）を、ウェルに最終濃度1.5ng／mLで添加した。4日間のインキュベーション後に、生細胞の量を、Alamarblue（BioSource International）を製造元の指示に従って用いて定量した。蛍光は、EnVision 2101 Multilabelリーダー（PerkinElmer）をAlamarblue用の標準的な設定で用いてモニターした。HER2抗体で処理した、リガンドで誘導された細胞のAlamarblueシグナルを、HER2抗体を伴わずにインキュベートした、リガンドで誘導された細胞のシグナルのパーセンテージと比較した。統計分析にはDunnett検定を利用した。

【０５１２】

ヘレグリン-β1で刺激して指定のHER2抗体で処理した生存MCF7細胞のパーセンテージを、HER2抗体の非存在下におけるヘレグリン-β1による刺激後の生細胞に対して相対的に算出した。ヘレグリン-β1および抗体の両方の非存在下ではMCF-7増殖はみられなかった。抗体025、091、129、153およびペルツズマブ（TH1014-pert）は、ヘレグリン-β1で誘導されるMCF-7増殖の有意な阻害（P＜0.05）を明らかに示した。トラスツズマブも、ヘレグリン-β1で誘導されるMCF-7細胞の増殖のある程度の阻害を示したが、試験した他のHER2抗体ほどには有効ではなかった。HER2のドメインIVはEGFR／HER2ヘテロ二量体の安定化に関与することが報告されているが、HER2／HER3ヘテロ二量体に対するその寄与についての詳細は不明である（Wehrman et al.,、前記）。抗体050、084、169および098は、ヘレグリン-β1で誘導されるMCF-7細胞の増殖に対して統計的に有意な効果を及ぼさなかった。図7を参照のこと。理論に限定されるわけではないが、このことは、これらの抗体がリガンドで誘導されるHER2／HER3ヘテロ二量体化を阻害しないことを示唆する。

【０５１３】

実施例18-抗κ-ETA'アッセイ

抗体-薬物結合体アプローチへのHER2抗体の適性を調べるために、κ指向性シュードモナス属エキソトキシンA（抗κ-ETA'）を用いた商標登録で保護されていない（generic）インビトロ細胞ベース殺傷アッセイを開発した。このアッセイでは、切断型シュードモナス属エキソトキシンAと結合体化された高親和性抗κドメイン抗体を使用する。抗κ-ETA'ドメイン抗体は内部移行するとタンパク質分解され、ジスルフィド結合が還元されて、触媒ドメインと結合ドメインは分離される。触媒ドメインはKDEL保留モチーフを介してゴルジ体から小胞体に輸送され、その後にサイトゾルに移動される。サイトゾルにおいて触媒ドメインはタンパク質合成を阻害し、アポトーシスを誘導する（参考、Kreitman RJ. Bio Drugs 2009；23（1）：1-13）。このアッセイにおいて、内部移行および毒素による死滅を可能にするHER2抗体を特定するために、HER2抗体は抗κ-ETA'と先に結合体化された後に、HER2陽性細胞とインキュベートされる。

【０５１４】

最初に、それぞれの細胞株に最適な抗κ-ETA'濃度、すなわち、非特異的細胞死を誘導しない最大投与可能量を求めた。AU565細胞（7500細胞/ウェル）およびA431細胞（2500細胞/ウェル）を正常細胞培地が入っている96ウェル組織培養プレート（Greiner bio-one）に播種し、少なくとも4時間、付着させた。次に、細胞を、正常細胞培地で溶解した100μg/mL、10μg/mL、1μg/mL、0.1μg/mL、0.01μg/mL、0.001μg/mL、および0μg/mLの抗κ-ETA'希釈液とインキュベートした。3日後に、Alamarblue（BioSource International, San Francisco, US）を用いて製造業者の説明書に従って、生細胞量を定量した。EnVision 2101 Multilabelリーダー（PerkinElmer, Turku, Finland）と標準的なAlamarblue設定を用いて、蛍光をモニタリングした。単独で細胞を死滅させなかった抗κ-ETA'最高濃度を以下の実験に使用した（AU565の場合、0.5μg/mL、A431の場合、1μg/mL）。

【０５１５】

次に、異なるHER2抗体について、抗体によって媒介された内部移行および毒素による死滅を試験した。細胞を前記のように播種した。HER2抗体の希釈シリーズを所定の濃度の抗κ-ETA'と30分間プレインキュベートした後に、細胞に添加した。3日間インキュベートした後に、生細胞量を前記のように定量した。抗κ-ETA'結合抗体で処理された細胞のAlama

rblueシグナルを、抗体のみで処理された細胞と比較してプロットした。細胞死滅については正の対照として23.4μg/mLのスタウロスポリンを使用した。負の対照としてアイソタイプ対照抗体を使用した。

【０５１６】

クロスブロック群1、2および3：

図8A、Bおよび表6Aに示されているように、抗κ-ETA'結合HER2抗体はすべて、AU565細胞を用量依存的な様式で死滅させることができた。試験した抗κ-ETA'結合HER2抗体はすべて、抗κ-ETA'結合トラスツズマブ（31.9％）および抗κ-ETA'結合ペルツズマブ（TH1014-pert）（47.51％）のいずれと比較してもAU565細胞のより優れた死滅（70.3～49.9％）を明らかに示し、EC_{50}値が向上した（12.12～46.49ng／mL、これに対して抗κ-ETA'結合トラスツズマブでは78.49ng／mL、抗κ-ETA'結合ペルツズマブでは117.8ng／mL）。抗体159は細胞死滅率が最も高く、098はEC_{50}が最も低かった。

【０５１７】

図8C、Dおよび表7Aに示されているように、抗体025、091、098、129および153は、A431細胞の効果的な死滅（75％以上）を誘導することができた。最も高い細胞死滅率および最も低いEC_{50}は抗体098によって示された。抗κ-ETA'と結合体化された場合に、トラスツズマブおよびアイソタイプ対照抗体はA431細胞の死滅を誘導しなかった。抗体169、084およびペルツズマブは約50％以下のパーセンテージで細胞死滅を誘導した。非結合体化HER2抗体では細胞死滅は観察されなかった。

【０５１８】

クロスブロック群4：

表6Bに示されているように、クロスブロック群4の抗κ-ETA'結合HER2抗体はすべて、AU565細胞を用量依存的な様式で死滅させることができた（50～72％の細胞死滅）。抗体005および111は、トラスツズマブ（78.49ng／mL）と比較して、EC_{50}値（それぞれ15.13ng／mLおよび24.20ng／mL）を3倍を超えて向上させることが明らかに示された。クロスブロック群4の非結合体化HER2抗体は、試験した濃度ではAU565細胞の死滅を誘導しなかった。

【０５１９】

表7Bに示されているように、抗体005および060は、抗κ-ETA'と結合体化させた場合にA431細胞の効果的な死滅（85％以上）を誘導することができた。抗体005および111は、低い抗体濃度（10ng／mL）で既にA431細胞を死滅させることが明らかに示され、EC_{50}値はおよそ10ng／mLであった。クロスブロック4の非結合体化HER2抗体では細胞死滅は観察されなかった。

【０５２０】

（表６）示されているデータは、1つの代表的な実験で測定した、抗κ-ETA'結合HER2抗体で処理したAU565細胞のEC_{50}値および最大細胞死滅率である（A、クロスブロック群1、2および3；B、クロスブロック群4）。スタウロスポリンによって誘導された細胞死滅を100％に設定し、非処理細胞のMFIを0％に設定した。Ndet＝検出されず。

A:

抗体	細胞死滅率（%）	EC50 ng/mL
PC1014-159	70.3	34.93
PC1014-127	69.0	34.46
PC1014-132	61.6	39.35
PC1014-129	60.8	30.85
PC1014-153	60.3	32.26
PC1014-025	60.0	16.71
PC1014-098	58.7	12.12
PC1014-084	58.1	26.97
PC1014-050	52.4	12.71
PC1014-091	50.6	46.49
PC1014-169	49.9	35.62
TH1014-pert	47.5	117.8
トラスツズマブ	31.9	78.49
アイソタイプ対照	Ndet	Ndet

B:

抗体	細胞死滅率（%）	EC50 ng/mL
PC1014-111	72.0	24.2
PC1014-005	69.7	15.13
PC1014-059	67.0	67.65
PC1014-060	64.3	79.38
PC1014-106	59.1	107.9
PC1014-006	50.4	45.14
トラスツズマブ	31.9	78.49
アイソタイプ対照	Ndet	Ndet

【０５２１】

（表７）示されているデータは、1つの代表的な実験で測定した、抗κ-ETA'結合HER2抗体で処理したA431細胞のEC_{50}値および最大細胞死滅率である（A、クロスブロック群1、2および3；B、クロスブロック群4）。スタウロスポリンによって誘導された細胞死滅を100％に設定し、非処理細胞のMFIを0％に設定した。「Ndet」は、検出されなかったことを意味する。

A:

抗体	細胞死滅率（%）	EC50 ng/mL
PC1014-025	86.7	~9.77
PC1014-084	50.5	ND
PC1014-091	83.3	~9.86
PC1014-098	87.2	1.65
PC1014-129	75.9	~10.60
PC1014-153	82.4	~10.11
PC1014-169	34.0	ND
TH1014-pert	37.0	61.58
トラスツズマブ	Ndet	Ndet
アイソタイプ対照	NDet	NDet

B:

抗体	細胞死滅率（%）	EC50 ng/mL
PC1014-005	88.5	~ 10.07
PC1014-060	85.0	~ 10.03
トラスツズマブ	NDet	NDet
アイソタイプ対照	NDet	NDet

【０５２２】

実施例19‐FMATに基づくfab-CypHer5Eアッセイを用いて測定したHER2抗体の内部移行

前の実施例で記載したκ-毒素-ETA'アッセイにおける、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））およびペルツズマブと比較したHER2抗体によるAU565細胞の死滅の強化が、HER2抗体の内部移行の強化と相関するか否かを調べるために、fab-CypHer5Eに基づく内部移行アッセイを行った。CypHer5Eは、塩基性pH（細胞外：培地）では非蛍光性であって酸性pH（細胞内：リソソーム）では蛍光性であるpH感受性色素であり、酸解離定数（pKa）は7.3である。

【０５２３】

AU565細胞を、240ng／mLのfab-CypHer5E（ヤギfab-抗ヒトIgG［Jackson］とCypHer5E［GE Healthcare, Eindhoven, The Netherlands］との結合体化を製造元の指示に従って行った）を加えた通常の細胞培地中にて、384ウェル組織培養プレート（Greiner bio-one）に細胞3,000個／ウェルの密度で播種した。次に、HER2抗体を通常の細胞培地中に系列希釈した上で細胞に添加し、室温で9時間そのまま置いた。細胞内CypHer5Eの平均蛍光強度（MFI）を8200 FMAT（Applied Biosystems, Nieuwerkerk A/D IJssel, The Netherlands）を用いて測定し、「カウント数×蛍光」を読み取り値として用いた。アイソタイプ対照抗体を陰性対照抗体として用いた。EC_{50}値および最大MFIは、非線形回帰（傾きを変化させたS字状用量反応）を利用して、GraphPad Prism V4.03ソフトウェア（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて決定した。

【０５２４】

クロスブロック群1、2および3：

結果は表8Aに示されており、これは、AU565細胞を用いたCypHer5E内部移行アッセイにおいて試験したクロスブロック群1、2および3のHER2抗体すべてに関するEC_{50}値および最大MFI値を示している。最大MFI値は、抗体結合が起こるとどの程度の数のHER2受容体が内部移行を受けるかを指し示している。HER2抗体はすべて、トラスツズマブ（35,000）およびペルツズマブ（TH1014-pert）（32,366）と比較してより高い最大MFI値（137,904～38,801）を示し、このことは試験したHER2抗体が受容体内部移行の強化を誘導したことを指し示している。注目されることに、HER2結合をめぐってトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））またはTH1014-pertと競合しなかった抗体は、トラスツズマブおよびTH1014-pertと競合した抗体と比較して、受容体内部移行をより誘導し、最も高いMFIは抗体098および127によって達成された。理論に限定されるわけではないが、このことは、HER2ヘテロ二量体化を阻害する能力がないことに固有なものである可能性がある。

【０５２５】

クロスブロック群4：

結果は表8Bに示されており、これはAU565細胞を用いたCypHer5E内部移行アッセイにおける試験したクロスブロック群4のHER2抗体すべてに関するEC_{50}値および最大MFIを示している。最大MFI値は、結合に際してどの程度の数のHER2抗体が内部移行を受けたかを反映している。試験したクロスブロック群4のヒトHER2抗体はすべて、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））（35,000）およびTH1014-pert（35,323）よりも高い最大MFI値（130,529～57,428）を示し、このことはこれらの抗体が強化された受容体内部移行を誘導したことを示している。TH1014-F5の強化された内部移行は、そのアゴニスト活性およびHER2-HER2二量体化の誘導の結果である可能性がある（実施例16参照）。

【０５２６】

（表８）HER2抗体のCypher-5に基づく内部移行アッセイ。示したデータは、fab-CypHer5E標識HER2抗体で処理したAU565細胞を用いた2回の実験のうちの1つの代表的な実験のMFIおよびEC_{50}値である。いくつかのEC_{50}値は計算できなかった（ND）

A:

Cypher 5		
抗体	**EC_{50} ng/mL**	**最大MFI**
PC1014-025	30.05	63428
PC1014-091	32.99	50711
PC1014-129	7.15	60302
TH1014-pert	530	32366
PC1014-169	ND	38801
PC1014-084	30.51	71059
トラスツズマブ	21.70	35000
PC1014-098	13.77	134575
PC1014-127	~9.68	137904
PC1014-159	ND	92427
TH1014-F5	22.65	113116
PC1014-132	11.42	112270
PC1014-153	~14.91	87531

ハーセプチンと競合するmAb

TH1014-pertと競合するmAb

TH1014-F5と競合するmAb

非競合性mAb

B:

Cypher 5		
抗体	**EC_{50} ng/mL**	**最大MFI**
PC1014-006	23.08	130829
PC1014-005	21.37	95117
PC1014-111	35.22	81680
PC1014-059	14.77	77123
PC1014-060	36.16	68184
PC1014-106	68.60	57428
TH1014-F5	22.65	113116
TH1014-pert	~1041	35323
トラスツズマブ	21.70	35000

【０５２７】

実施例20：2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性抗体の作製

二重特異性抗体を生成させるためのインビトロ方法は、WO 2008119353号（Genmab）に記載され、van der Neut-Kolfschotenら（Science. 2007 Sep 14;317(5844):1554-7）によって報告されている。本明細書では、穏やかな還元条件下でのインキュベーションによる2つの単一特異性IgG4抗体またはIgG4様抗体の間の「Fabアーム」または「半分子」交換（1つの重鎖および付属する軽鎖の交換）によって、二重特異性抗体を形成させた。理論に限定されるわけではないが、このFabアーム交換反応は、単一特異性抗体のヒンジ領域内の重鎖間ジスルフィド結合が還元されて、その結果生じる遊離システインが、異なる特異性を有する別の抗体分子のシステイン残基と新たな重鎖間ジスルフィド結合を形成するというジスルフィド結合異性化反応の結果であった。その結果生じた生成物は、異なる配列を有する2つのFabアームを有する二重特異性抗体であった。

【０５２８】

この自然なIgG4 Fabアーム交換に関する知見を応用して、IgG1を基にした安定な二重特異性抗体を生成させるための方法を作り出した（WO 2011131746号（Genmab））。下記の方法によって作製された二重特異性抗体産物は、IgG4 Fabアーム交換にはもはや関与しない。この方法の基盤は、特定のアッセイ条件下でヘテロ二量体の形成を促進する、相補的（complimentary）CH3ドメインを用いることである。この方法による二重特異性抗体の生成を可能にするために、CH3ドメイン内に、ある特定の変異を有するIgG1分子を作製した：親IgG1抗体の一方にはT350I、K370TおよびF405L変異（または最低限でもF405L）、もう一方の親IgG1抗体にはK409R変異。

【０５２９】

二重特異性抗体を作製するために、これらの2つの親抗体を、各抗体の最終濃度0.5mg／mL（等モル濃度）で、25mM 2-メルカプトエチルアミン-HCl（2-MEA）とともに、合計容積100μLのTE中にて37℃で90分間インキュベートした。還元反応は、スピンカラム（Microcon遠心濾過機、30k、Millipore）を製造元のプロトコールに従って用いることによって還元剤2-MEAが除去されると停止する。

【０５３０】

実施例21‐インビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験したHER2×CD3二重特異性抗体

CD3は、成熟T細胞上で発現されるT細胞受容体α鎖およびβ鎖と会合したタンパク質複合体である。二重特異性抗体におけるCD3特異的抗体のFabアームと腫瘍抗原特異的抗体のFabアームとの組み合わせは、腫瘍細胞に対するT細胞の特異的標的化をもたらして、T細胞媒介性の腫瘍細胞溶解を招くと考えられる。同様に、CD3陽性T細胞を、体内の他の逸脱した（derailed）細胞、感染細胞に対して、または直接的に病原体に対して標的化させることも可能と考えられる。

【０５３１】

種々のHER2抗体配列およびパブリックドメインのCD3抗体配列を組み合わせて、さまざまなHER2×CD3二重特異性抗体を作製した。その上、gp120特異的抗体の1つであるb12（Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23.）を陰性対照として用いた。抗体153のHER2特異的Fabアームの重鎖および軽鎖可変領域配列はそれぞれSEQ ID NO：63および67であり、抗体169のHER2特異的FabアームのVHおよびVL配列はそれぞれSEQ ID NO：1および5であった。CD3特異的Fabアームについては、以下の重鎖および軽鎖可変領域配列を用いた。

【０５３２】

YTH12.5（Routledge et al., Eur J Immunol. 1991, 21(11):2717-25、これは配列開示を含め、その全体が参照により本明細書に組み入れられる）

SEQ ID NO: 234	VH YTH12.5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SFP**MAWVRQAP GKGLEWVSTISTSGGRTYYRDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAK*FRQYSGGFDY*WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 235	VL YTH12.5	DIQLTQPNSVSTSLGSTVKLSCTLS**SGNIE**NNYVHWYQLYE GRSPTTMIYDDDKRPDGVPDRFSGSIDRSSNSAFLTIHNVAI EDEAIYFC*HSYVSSFNV*FGGGTKLTVL

太字によって強調した配列はCDR1ドメインを表し、下線によって強調した配列はCDR2ドメインを表し、イタリック体によって強調した配列はCDR3ドメインを表す。

【０５３３】

HUM291（ヒト化抗体ビジリズマブ、NCBIタンパク質データベースからGenBankアクセッション番号：AAC28464.1として取り出した配列、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる）

SEQ ID NO: 236	VH HUM291	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFI**SYT**MHWVRQA PGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAR*SAYYDYDGFAY*WGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 237	VL HUM291	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS**SSVSY**MNWYQQKPG KAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYC*QQWSSNPPT*FGGGTKVEIK

太字によって強調した配列はCDR1ドメインを表し、下線によって強調した配列はCDR2ドメインを表し、イタリック体によって強調した配列はCDR3ドメインを表す。

【０５３４】

huOKT3-C114S-gLC（テプリズマブに用いられているが、VHにおいて追加のC114S変異を伴う；Adair, J. et al. 1994. Hum Antibodies Hybridomas 5:41-47、これは配列開示を含め、その全体が参照により本明細書に組み入れられる）

SEQ ID NO:238	VH huOKT3-C114S-gLC	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCKASGYTFT**RYT**MHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGYTNYNQKVKDRFTISRDNSKNT AFLQMDSLRPEDTGVYFCAR*YYDDHYSLDY*WGQGTPVTV SS
SEQ ID NO:239	VL huOKT3-C114S-gLC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS**SSVSY**MNWYQQTP GKAPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQP EDIATYYC*QQWSSNPFT*FGQGTKLQIT

太字で強調した配列はCDR1ドメインを表し、下線によって強調した配列CDR2ドメインを表し、イタリック体によって強調した配列はCDR3ドメインを表す。

【０５３５】

huCLB-T3/4は、マウス抗体CLB-T3/4のヒト化型である（Parren et al., Res Immunol. 1991, 142(9): 749-63、これは配列開示を含め、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。手短に述べると、Parrenら（1991）に公開されているCLB-T3/4のマウスVHおよびVL配列のヒトVHおよびVLレパートリーに対するアラインメントを、IMGTのV-QUESTを用いて行った。見いだされた最も近いヒト生殖細胞系列は、VH遺伝子についてはIGHV3-21*01であり、VL遺伝子についてはIGKV3-11*01（+IGKJ4*02）であった。異なっていたマウスVHおよびVL配列中のアミノ酸残基はすべて、CLB-T3/4のCDR領域内のものを除いて、ヒトの同等物に置き換えた。VH配列に関しては関連性のあるJ領域が見いだされなかったため、共通のWGQGTLVTVSS配列を重鎖のFR4領域に用いた。両方の配列を妥当な発現ベクター中にクローニングし、HEK293F細胞へのコトランスフェクションによって発現させた。

SEQ ID NO: 240	VH huCLB-T3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQ APGKGLEWVATISRYSRYIYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARRPLYGSSPDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 241	VL huCLB-T3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPG QAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCFQGSGYPLTFGSGTKLEMR
SEQ ID NO:242	VH CDR1	GFTFSSYG
SEQ ID NO:243	VH CDR2	ISRYSRYI
SEQ ID NO:244	VH CDR3	ARRPLYGSSPDY
SEQ ID NO:245	VL CDR1	SSVTY
	VL CDR2	DTS
SEQ ID NO:246	VL CDR3	FQGSGYPLT

【０５３６】

抗体はすべて、それらのFc領域を以下のように改変したIgG1,κとして発現させた：IgG1-HER2-153-K409R、IgG1-HER2-169-K409R、IgG1-b12-K409R、IgG1-hu-CLB-T3/4-F405L、IgG1-YTH12.5-F405L、IgG1-HUM291-F405LおよびIgG1-huOKT3-F405L。

【０５３７】

また、以後の実験のために、抗体のFcドメインを不活性化する目的で、同じ抗体のN297Q変異体も作製した。不活性なFcドメインは、グリコシル化部位が除かれているため、単球上に存在するFc受容体と抗体が相互作用するのを妨げる；この部位でのグリコシル化はIgG-Fcγ受容体の相互作用にとって決定的に重要である（Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23:403-411）。N297Q変異の代わりに、パブリックドメイン由来の3組の変異を1つの抗体Fcドメイン内で組み合わせることによって、残留Fc活性をさらに除去することも行った。変異L234F、L235E、P331S（Oganesyan, Acta Cryst. (2008). D64, 700-704）、D265A（Shields JBC (2001) 276(9) 6591-6604）およびN297Qを、K409RおよびF405LのIgG1骨格に導入した。LFLEDANQPS（SEQ ID NO：251）と名付けられたこれらの5種の変異の組み合わせも、実施例のいくつかで同様に用いた。種々のFc変異体に対して、以下のFc配列を用いた（下線を施した文字によって変異が強調されている：

IgG1重鎖定常領域-WT（SEQ ID NO：247）

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-F405L（SEQ ID NO：248）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-K409R（SEQ ID NO：249）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-N297Q（SEQ ID NO：250）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-LFLEDANQPS mut（SEQ ID NO：251）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-F405L N297Q（SEQ ID NO：252）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-K409R N297Q（SEQ ID NO：253）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-F405L LFLEDANQPS（SEQ ID NO：254）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1重鎖定常領域-K409R LFLEDANQPS（SEQ ID NO：255）

>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【０５３８】

以下の重鎖および軽鎖可変領域配列を、b12、HIV gp120特異的Fabアームに対して用いた（Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23.によって記載されている配列）。

VH b12 (SEQ ID NO:256)

>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPGQRFEWMGWINPYNGNKEFSAKFQ
DRVTFTADTSANTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWGKGTTVIVSS

VL b12 (SEQ ID NO:257)

>EIVLTQSPGTLSLSPGERATFSCRSSHSIRSRRVAWYQHKPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGS
GTDFTLTITRVEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERK

【０５３９】

これらのHER2特異的抗体およびCD3特異的抗体由来の二重特異性抗体を、実施例20に記載した通りに作製した。

【０５４０】

ヒトCD3に対する特異性は、フローサイトメトリーを用いたジャーカット細胞（CD3を発現するT細胞株）に対する二重特異性HER2×CD3抗体の結合によって検証した。親IgG1抗CD3抗体の二価結合を、単一特異性親抗体による結合と比較した。作製した二重特異性バッチはすべて、いずれのジャーカット細胞に対しても良好な結合を示したが、単一特異性二価CD3抗体よりも親和性が低かった（図9A～D）。

【０５４１】
異なる蛍光色素で標識した2種類の細胞集団を二重特異性抗体または対照抗体の存在下でコインキュベートすることによって、二重特異性抗体huCLB-T3/4-N297Q-F405L × HER2-169-N297Q-K409Rの同時結合が示された。製造元の指示に従い、HER2陽性AU565細胞をCFSE（FITC／FL-1）で標識し、CD3を発現するジャーカット細胞をPKH26（PE／FL-2）で標識した。続いて、二重特異性HER2×CD3抗体の存在下で、両方の細胞種を4℃で30分間コインキュベートした。試料はFACS CantoIIでのフローサイトメトリーによって分析した。CSFE／PKH26二重陽性細胞を検出するために四象限分析（quadrant analysis）を行った。
【０５４２】
二重特異性抗体の存在下でのみ、二重陽性細胞（ダブレット）の集団が観察され、このことはこれらの抗体が2つの細胞種に同時に結合しうることを指し示している。データは図10Aにまとめており、二重特異性HER2×CD3（169 × CLB-T3/4）および単一特異性対照抗体で処理した細胞の代表例を図10Bに示している。
【０５４３】
続いて、HER2×CD3抗体を、エフェクター細胞としての単離したT細胞のみまたはPBMCのいずれかと共にAU565細胞を用いるインビトロ細胞傷害性アッセイにて試験した。AU565細胞をほぼ集密化するまで培養した。細胞をPBSで2回洗浄し、37℃で5分間トリプシン処理した。培地12mLを加えてトリプシンを不活性化し、細胞を800rpmで5分間遠心沈殿させた。細胞を培地10mL中に再懸濁させ、細胞濾過器（cellstrainer）に細胞を通すことによって単細胞懸濁液を作った。細胞5×10^5個／mLの懸濁液100μLを96ウェル培養プレートの各ウェルに添加し、37℃、5% CO_2で少なくとも3時間インキュベートして、細胞をプレートに接着させた。
【０５４４】
末梢血単核細胞（PBMC）は、Leucosep 30mL試験管を製造元のプロトコール（Greiner Bio-one）に従って用いて、健常志願者の血液から単離した。PBMC調製物から、Untouched Human T-cells Dynabeadキット（Dynal）を用いる陰性選択によってT細胞を単離した。単離した細胞を細胞培地中に再懸濁させて、最終濃度を7×10^6個／mLにした。
【０５４５】
接着したAU565細胞から培地を除去し、50μL／ウェルの2倍濃縮抗体希釈液および50μL／ウェルのT細胞7×10^6個／mLと置き換えた（エフェクター：標的の比＝7：1）。プレートを37℃、5% CO_2で3日間インキュベートした。上清を除去し、プレートをPBSで2回洗浄した。各ウェルに培地150μLおよびAlamar Blue溶液15μLを添加した。プレートを37℃、5% CO_2で4時間インキュベートし、吸光度を測定した（Envision, Perkin Elmer）。
【０５４６】
図11は、すべての二重特異性HER2×CD3抗体が、単離したT細胞を用いたインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて、AU565細胞の用量依存的死滅を誘導したことを示している。死滅は、腫瘍を標的とするFabアーム（クローン169および153の両者）の存在に決定的に依存しており、一方、対照抗体（CD3単一特異性IgG1-YTH12.5、IgG1-huCLB-T3/4、IgG1-Hum291およびIgG1-OKT3、ならびに無関係な抗原特異的IgG1-b12、およびCD3×b12）はT細胞の細胞傷害作用を誘導しなかった。HER2-169を含有する二重特異性抗体は、HER2-153を含有するものよりも効力が強かった。
【０５４７】
実施例27の図17に示されているように、N297Q変異、およびそれによるHER2×CD3二重特異性抗体huCLB-T3/4×HER2-169のFcグリコシル化の欠如は、PBMCによるAU565細胞の用量依存的細胞傷害作用を誘導する能力に影響を及ぼさなかった。
【０５４８】
実施例22‐HER2のダウンモジュレーション
第3群抗体098および153ならびに第4群抗体005によって誘導されたHER2内部移行の強化が、受容体ダウンモジュレーションももたらすか否かを調べるために、AU565細胞をHER2抗体とともに3日間インキュベートして、HER2の存在に関して分析した。AU565細胞を通常

の細胞培地中にて24ウェル組織培養プレート（細胞100,000個／ウェル）に播種し、10μg／mLのHER2抗体の存在下で37℃にて3日間培養した。PBSで洗浄した後に、細胞を、25μLのSurefire溶解緩衝液（Perkin Elmer, Turku, Finland）とともに室温で30分間インキュベートすることによって溶解させた。全タンパク質レベルは、ビシンコニン酸（BCA）タンパク質アッセイ試薬（Pierce）を製造元のプロトコールに従って用いて定量した。溶出液中のHER2タンパク質レベルは、HER2特異的サンドイッチELISAを用いて分析した。HER2の捕捉にはウサギ-抗ヒトHER2細胞内ドメイン抗体（Cell Signaling）を用い、ビオチン化ヤギ抗ヒトHER2ポリクローナル抗体（R&D）、続いてストレプトアビジン-ポリ-HRPを用いて、結合したHER2を検出した。反応を2,2'-アジノ-ビス3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸（ABTS：ABTS錠1錠を50mLのABTS緩衝液［Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands］中に希釈）によって可視化させ、シュウ酸（Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, The Netherlands）で停止させた。405nmでの蛍光をマイクロタイタープレートリーダー（Biotek Instruments, Winooski, USA）で測定し、HER2の量を非処理細胞に対する相対的なパーセンテージとして表した。

【０５４９】

図12および表10に示された結果は、試験した第3群抗体（098および153）が両方とも、50%を上回るHER2ダウンモジュレーションを誘導したことを明らかに示している。対照的に、抗体025、169およびトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））はダウンモジュレーションをほとんど誘導せず（非処理細胞のおよそ20%）、一方、抗体005は中程度のダウンモジュレーション（非処理細胞のおよそ30%）を誘導した。これは、抗体098、153および005によって観察された内部移行の強化と一致する。

【０５５０】

（表１０）非処理細胞と比較したHER2のパーセンテージとして示した、抗体で誘導されたHER2のダウンモジュレーション

抗体	非処理細胞と比較したHER2のパーセンテージ
ハーセプチン	80
IgG1-1014-169	82
IgG1-1014-025	85
IgG1-1014-098	44
IgG1-1014-153	50
IgG1-1014-005	70
アイソタイプ対照	108

【０５５１】

実施例23 - 共焦点顕微鏡検査によって分析した、HER2抗体とリソソームマーカーLAMP1との共局在

実施例21に記載したHER2のダウンモジュレーションアッセイおよび実施例19に記載したCypHer-5Eに基づく内部移行アッセイにより、第3群および第4群のHER2抗体は、第1群および第2群の抗体と比較して、より有効に内部移行してリソソームに標的化されることが示された。第3群および第4群の抗体のリソソーム輸送の強化を確かめるために、AU565細胞をカバーガラス上で培養し、指定の抗体によって18時間処理した。細胞を固定し、透過処理を行った上で、抗体を可視化するためにFITC結合ヤギ抗ヒトIgG1で染色し、さらにリソソームを同定するためにマウス抗ヒトCD107a（LAMP1）および続いてヤギ抗マウスIgG-Cy5で染色した。

【０５５２】

しかし、これらの実験では、単一特異性抗体と二重特異性抗体とを識別するのは可能であるが異なる単一特異性抗体同士の識別は可能でない設定で共焦点画像解析を行っており、事実、これらの設定では単一特異性抗体はほとんど検出できなかった。異なる単一特異性抗体を比較することが可能になるように、蛍光強度を高めるためにゲイン設定を大きくして、共焦点スライドを再び測定した。手順の他のすべての段階は、実施例23に記載したものと同じとした。

【０５５３】
その結果は図13および表11に示されており、これらはさまざまな単一特異性HER2抗体に関してCy5と重複するFITCのピクセル強度を示している。各スライドから、およそ1個、3個または5個を上回る細胞を含む3つの異なる画像を分析した。各スライド内の異なる画像間で有意な差異が観察された。やはり、抗体005、098および153は、025、ペルツズマブ、169およびトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））と比較して、より有効にリソソーム区画に標的化されることが明白であった。このことは、これらの抗体によって誘導される内部移行および受容体分解の強化とよく相関した。
【０５５４】
（表１１）任意単位として示した、Cy5と重複するFITCの平均ピクセル強度

抗体	リソソーム中のFITCピクセル強度［任意単位］
TH1014-005	0.619
TH1014-098	0.522
TH1014-153	0.409
TH1014-025	0.248
TH1014-pert	0.214
TH1014-169	0.255
ハーセプチン	0.236

【０５５５】
実施例24-ヒトとニワトリとのHER2細胞外ドメインシャッフル
実施例14で記載した4つの異なるクロス競合群の抗体によって認識されるHER2結合領域をさらに規定するために、HER2細胞外ドメインシャッフル実験を行った。この目的のために、ヒトHER2細胞外ドメインのドメインI、II、III、またはIVの配列を、ニワトリHER2（ニワトリ（Gallus gallus）アイソフォームB NCBI：NP_001038126.1）の対応する配列と交換した5つの構築物を用いて小さな遺伝子合成ライブラリーを作製した：1）完全ヒトHER2（Uniprot P04626）、以下hu-HER2と呼ぶ、2）ニワトリドメインIを有するhu-HER2（ヒトHER2のアミノ酸（aa）1～203を対応するニワトリHER2領域と交換した）、以下hu-HER2-ch（I）と呼ぶ、3）ニワトリドメインIIを有するhu-HER2（ヒトHER2のアミノ酸（aa）204～330を対応するニワトリHER2領域と交換した）、以下hu-HER2-ch（II）と呼ぶ、4）ニワトリドメインIIIを有するhu-HER2（ヒトHER2のaa331～507を対応するニワトリHER2領域と交換した）、以下hu-HER2-ch（III）と呼ぶ、および5）ニワトリドメインIVを有するhu-HER2（ヒトHER2のaa508～651を対応するニワトリHER2領域と交換した）、以下hu-HER2-ch（IV）と呼ぶ。ヒトHER2オルソログおよびニワトリHER2オルソログは細胞外ドメインでは67％の相同性、ドメインIでは62％の相同性、ドメインIIでは72％の相同性、ドメインIIIでは63％の相同性、ドメインIVでは68％の相同性を示す。これらの構築物を、Freestyle（商標）CHO-S（Invitrogen）細胞株において、Freestyle MAXトランスフェクション試薬（Invitrogen）を用いて製造業者の説明書に従って一過性にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を20時間、培養した。トランスフェクトされた細胞に対するHER2抗体の結合をフローサイトメトリーによって分析した。トランスフェクトされたCHO-S細胞を収集し、FACS緩衝液で洗浄し、10μg/mL HER2抗体と（氷上で30分間）インキュベートした。HER2抗体の結合を、フィコエリトリン（PE）結合ヤギ抗ヒトIgG抗体（Jackson）を用いて検出した。異なるバッチ間で発現が同一であるかどうか調べるために、細胞を固定し、Cytofix/Cytoperm溶液（BD）を用いて製造業者の説明書に従って透過処理し、ウサギ抗ヒト細胞内HER2抗体（DAKO）と二次PE結合ヤギ抗ウサギ抗体（Jackson）の組み合わせを用いて染色した。アイソタイプ対照抗体を負の対照として使用した。蛍光をFACSCanto-II（BD）によって測定し、GraphPad Prism V4.03ソフトウェア（GraphPad Software, San Diego, CA, USA）を用いて、結合曲線を非線形回帰によって作成した（傾きが変わるS字形用量反応）。異なる抗体によって、どのHER2ドメインが認識されるのかを特定するために、結合の消失を読み取り値として使用した。
【０５５６】

抗体153に関する例示的な結合曲線を図14に示している。結合結果はすべて表12に示されている。第1群HER2抗体050、084、169およびトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））は、Hu-HER2-ch（IV）に対する結合のみの喪失を示したが、シャッフリングを受けた残りのドメインの1つを有するタンパク質に対してはそうでなく、このことは第1群mAbのエピトープがHER2ドメインIV内にあることを指し示している。第2群抗体025、091、129およびペルツズマブは、Hu-HER2-ch（II）に対する結合のみの喪失を示し、このことはエピトープがHER2ドメインII内にあることを指し示している。抗体098および153はいずれもクロス競合アッセイ（提示せず）では第3群に定められたが、シャッフル実験ではある程度の差異を示した。抗体098は、Hu-HER2-ch（I）に対する結合の喪失およびHu-HER2-ch（II）に対する結合の軽度の低下を明らかに示したが、一方、153はHu-HER2-ch（II）に対する結合の喪失のみを示した。これらのデータは、第3群mAbの098および153は少なくとも部分的にはHER2ドメインIIとも結合することができ、エピトープがおそらく、098の場合がそうであるように、HER2ドメインI内に伸びていることを示唆する。抗体005、006、060および111はHER2ドメインIIIの置換後に結合の喪失を示したが、このことはエピトープがHER2ドメインIII内にあることを明らかに示している。興味深いことに、抗体059および106は、hu-HER2-ch（III）およびhu-HER2-ch（I）の両方に対する結合の喪失を明らかに示したが、このことは抗体059および106がこれらの2つのドメイン内の立体構造エピトープを認識することを意味する。

【０５５７】

（表１２）種々のHER2ECD受容体構築物に対するHER2抗体の結合の概要。FL；hu-HER2、I；hu-HER2-ch（I）、II；hu-HER2-ch（II）、III；hu-HER2-ch（III）、IV；hu-HER2-ch（IV）。+++は正常な結合を指し示し、++はhu-HER2に対して観察された結合と比較してEC_{50}は低下しているが最大結合は同程度であることを指し示し、+はhu-HER2に対して観察された結合と比較してEC_{50}の低下および結合の低下を指し示し、-は全く結合がないことを指し示す

		シャッフリングしたHER2ドメイン				
抗体	群	FL	I	II	III	IV
ハーセプチン（登録商標）	1	+++	+++	+++	+++	-
050	1	+++	+++	+++	+++	-
084	1	+++	+++	+++	+++	-
169	1	+++	+++	+++	+++	+
ペルツズマブ	2	+++	+++	+	+++	+++
025	2	+++	+++	-	+++	+++
091	2	+++	+++	-	+++	+++
129	2	+++	+++	-	+++	+++
153	3	+++	+++	-	+++	+++
098	3	+++	-	++	+++	+++
005	4	+++	+++	+++	-	+++
006	4	+++	+++	+++	-	+++
059	4	+++	-	+++	-	+++
060	4	+++	+++	+++	-	+++
106	4	+++	-	+++	-	+++
111	4	+++	+++	+++	-	+++

【０５５８】

実施例25‐SCIDマウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植片に対するHER2 HuMab 005、091、084および169のインビボ有効性

雌性CB.17重症複合免疫不全症（SCID）マウスにおけるNCI-N87ヒト胃癌異種移植モデルの腫瘍成長および生存に対するHER2-HuMab 091（クロス競合群2）、084および169（いずれもクロス競合群1）ならびに005（クロスブロック群4）のインビボ効果を判定した。50％マトリゲル中の10×10^6個のNCI-N87腫瘍細胞を、雌性SCIDマウスに、各群当たりマウス10匹ずつ皮下注射した。腫瘍接種から8日後に、HER2-HuMab 005、091、084および169または対照抗体HuMab-HepCの静脈内投与を開始した。図15（A）および（C）中で、これは第1日、治療開始日として指し示されている。初回用量は40mg／kgとし、その後、治療開始後の第4日、8日、11日、15日、18日、22日および25日には10mg／kgとした。腫瘍体積を毎週少なくとも2回測定した。体積（mm^3）は、キャリパー（PLEXX）測定値から（幅$^2\times$長さ）／2として算出した。

【０５５９】

結果は図15A、15B、15Cおよび15Dに示されており、これらは、HuMab 005、084、169および091を投与されたマウスが、陰性対照抗体HuMab-HepCを投与されたマウスよりも、より緩徐な腫瘍成長（A）およびより優れた生存（B）を明らかに示したことを示している。処置はすべて忍容性が良好であった。

【０５６０】

実施例26－Balb／CヌードマウスにおけるBT-474乳腫瘍異種移植片の治療的処置

Balb／Cヌードマウスにおけるヒト皮下BT-474乳腫瘍異種移植片に対する5種類のHER2 HuMabによる治療的処置の効果について判定した。γ線源（1.8Gy，Co60、BioMep，France）を全身照射して24～72時間後に、BT-474腫瘍細胞を注射した。マトリゲルを含むRPMI 1640（50：50，v：v；BD Biosciences）200μl中の2×10^7個のBT-474細胞を、雌性Balb／CヌードマウスのＲ側腹部に皮下注射した。マウスの体重および腫瘍体積を週2回記録した。腫瘍体積（mm^3）は、キャリパー（PLEXX）測定値から（幅$^2\times$長さ）／2として算出した。

【０５６１】

腫瘍の平均体積が100～200mm^3に達した時に、HER2 HuMabを用いる処置を開始した。腫瘍を有するマウスを、8匹のマウスからなる群に無作為割り付けした。1つの群には、対照mAb HuMab-HepCを週2回、静脈内（i.v.）注射した。他の4つの群には、HER2 HuMab 025、129、153および091を初回用量20mg/kgおよびその後に9回、5mg/kgの用量で週2回i.v.注射した。

【０５６２】

その結果は図16Aおよび図16Bに示されており、これらはBT-474腫瘍成長がHuMab 129およびHuMab 153処置によって部分的に阻害されたことを示している（HuMab-HepC対照処置と比較して約30％および50％の阻害）。HuMab-025およびHuMab-091はBT-474腫瘍成長を強く阻害し、これらの抗体によって、腫瘍体積800mm^3に到達する時間が極めて遅くなった。HER2 HuMAbが投与されたマウスでは生存性も向上した。

【０５６３】

実施例27－Fc変異によるFc媒介性T細胞活性化の除去

PBMCに存在する単球はFc受容体を発現し、IgG単一特異性抗体および二重特異性抗体におけるFcドメインと相互作用することができる。単一特異性CD3抗体を用いる場合には、そのような活性FcドメインがT細胞の活性化を引き起こしうることが知られている。重要なことに、精製T細胞をエフェクター細胞として用いる場合、単球が存在しないため、このFc媒介性効果も存在しない。

【０５６４】

この活性を除去するために、そのようなFc媒介性活性を持たない抗体を作り出す戦略を策定した。N-グリカナーゼによる翻訳後の抗体の脱グリコシル化、またはN297Q変異による遺伝的な抗体の脱グリコシル化のいずれかにより、不活性な抗体フォーマットがもたらされることが記載されている（Tao M H et al.，Immunol 1989，143;2595-2601）。T細胞のFc媒介性活性化の寄与を明らかにするために、これらのFc改変抗体を作製した。FcドメインにN297Q変異を有するか、または化学的に脱グリコシル化されたかのいずれかである

一群の（二重特異性）抗体を、PBMCを用いる細胞傷害性アッセイ（E：T比は5：1）において、WT Fc領域を有する抗体と比較した。細胞傷害性アッセイは実施例21に記載した通りに行ったものの、精製T細胞の代わりにヒトPBMCを用いた。細胞傷害性アッセイにおいて、HER2×CD3二重特異性抗体の活性は脱グリコシル化より損なわれなかったが、単一特異性huCLB-T3/4のFc媒介性活性は、試験条件下において、脱グリコシル化により完全ではないものの強力に除去された（図17）。

【０５６５】

残留Fc活性を完全に除去するために、パブリックドメイン由来の3組の変異を組み合わせて1つの変異体とした。変異L234F、L235E、P331S（Oganesyan, Acta Cryst. (2008). D64, 700-704）、D265A（Shields JBC (2001) 276(9) 6591-6604）およびN297Qを、K409RおよびF405LのIgG1骨格に導入した。LFLEDANQPSと名付けられたこの変異体は、PBMCを用いた細胞傷害性アッセイ（上記と同じプロトコール）において、T細胞の残留性Fc媒介性活性化を全く示さなかった（図17）。

【０５６６】

実施例28‐HER2×CD3の有効性に対するHER2エピトープの影響

異なるHER2エピトープを認識する3種の二重特異性抗体を、二重特異性フォーマットで有効であることが実証されたCD3抗体（実施例21および27）と組み合わせて作製することにより、腫瘍標的上の結合部位（エピトープ）の影響について判定した。HER2クローン005、153および169は、実施例24に示されているように、HER2の空間的に隔てられた部分を認識する3種のクロスブロックしない抗体である。これらの3種のHER2クローンを、二重特異性分子としてヒトCD3を認識するCD3抗体クローンhuCLB-T3/4と組み合わせて、ヒトPBMCまたは精製ヒトT細胞のいずれかを用いる細胞傷害性アッセイにて試験した。アッセイは実施例21に記載した通りに行った。T細胞アッセイにはE：T比として1：1を用い、PBMCアッセイには2：1の比を用いた。

【０５６７】

図18に示されているように、3種の二重特異性抗体はすべて、AU565標的細胞の死滅を誘導することができるものの、有効性は異なる。これらのデータは、HER2×CD3二重特異性抗体の細胞傷害能力に対する、標的エピトープの場所の重要な影響を示している。

【０５６８】

実施例29‐T細胞媒介性死滅の有効性はHER2発現レベルに依存する

HER2発現レベルが異なる細胞株を用いて、二重特異性HER2×CD3抗体の有効性に対する標的密度の影響について検討した。二重特異性抗体169×huCLB-T3/4-N297Qを、A549細胞、A431細胞、3T3細胞およびAU565細胞を用いる細胞傷害性アッセイにおいて試験した。HER2発現は、QIFIKIT（登録商標）分析を用い、マウス抗ヒトHER2（R&D Systems、Cat. MAB1129、Lot IBD0207061）およびアイソタイプ対照抗体（BD、Cat. 555740 Lot 3280）を濃度10μg／mLで用いて決定した。発現レベルは表13にまとめている。

【０５６９】

細胞傷害性アッセイでは、実施例21に記載したプロトコールを用いて、種々のHER2発現細胞株と新たに単離したヒトT細胞を、E：T比10：1で共培養した。

【０５７０】

169×CLB-T3/4の細胞傷害作用の有効性は、標的細胞株のHER2発現と相関していた（図19）。AU565細胞は非常に低い抗体濃度で早くも死滅させられ、一方、最も低発現であった細胞（A549）は、この実験構成ではほとんど死滅させることができなかった。

【０５７１】

（表１３）細胞傷害性アッセイに用いた細胞株のHER2発現レベル

細胞株	HER2発現（細胞1個当たりの分子数）
AU565	4x10e5
NIH-3T3	7x10e4
A431	1.4x10e4
A549	1x10e4

【０５７２】
実施例30：HER2×CD3二重特異性抗体で誘導されるT細胞活性化の特性決定
前の実施例で示したように、二重特異性HER2×CD3抗体を用いることによって、HER2を発現するさまざまな腫瘍細胞株の効果的な死滅が達成された。細胞傷害作用T細胞の明確に特徴づけられた活性化マーカーであるCD69の発現を、二重特異性HER2×CD3抗体の存在下にて37℃で16時間、AU565腫瘍細胞と共培養したT細胞においてモニターした。CD69発現による評価でT細胞の用量依存的活性化が観察されたが（図20）、それは実施例21で示された細胞傷害作用の観察データと相関している。
【０５７３】
実施例27で示された細胞傷害作用データと一致して、T細胞応答のインビトロ特性決定により、腫瘍細胞の非存在下であっても、PBMCをエフェクター細胞として用いた場合にはFc媒介性のT細胞活性化を観察しうることが明らかになった（図21）。この効果は、DuoBody HER2 169 × huCLBT3/4の非改変Fcを有する変異体を用いた場合に最も顕著であり、N297Q変異の導入によって低下させることができた。単一特異性CD3抗体によるFc媒介性活性化は、LFLEDANQPS Fc変異体を用いることによってさらに低下させることができた（図21）。
【０５７４】
インビトロ細胞傷害性アッセイは実施例21に記載した通りに行った。種々のウェルの培地中でのTh1／Th2サイトカインの検出は、サイトカイン放出を測定するために細胞傷害性アッセイの上清試料を収集することによって行った。非希釈試料を、ヒトTh1／Th2サイトカイン検出キット（BD Biosciences、カタログ番号551809）を製造元の指示に従って用いて、FACSで分析した。試料中のIL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IFN-γおよびTNF-αのサイトカイン濃度を、これらのサイトカインの標準曲線に基づいて算出した。データはGraphpad Prism 5.0およびExcel 2003ソフトウェアを用いて分析した。3群のサイトカインを分析した：（1）炎症誘発性サイトカインTNF-α、INF-γおよびIL-2、（2）炎症誘発性かつ抗炎症性のサイトカインであるIL6、ならびに（3）抗炎症性サイトカインIL4およびIL10。DuoBody huCLB-T3/4 × HER2-169 N297Qおよび適切なすべての対照を用いたインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて、T細胞またはPBMCによって作成された第3日のサイトカインプロファイルを、表14にまとめている。
【０５７５】
腫瘍細胞およびT細胞をDuoBody huCLB-T3/4 × HER2-169 N297Qとともにインキュベートした場合には、対照抗体および対照処理（培地およびT細胞のみ）とは対照的に、サイトカインがアップレギュレートされている。
【０５７６】
腫瘍細胞およびPBMCとDuoBody huCLB-T3/4 × HER2-169 N297Qとのインキュベーションは、対照抗体IgG1-1014-169 N297QおよびIgG1-ハーセプチン（登録商標）ならびに対照状況（培地およびT細胞のみ）と比較した場合にも、測定したサイトカインのアップレギュレーションをもたらした。しかし、標的細胞およびPBMCと、対照抗体DuoBody huCLB-T3/4-N297Q × b12-N297Qおよび単一特異性huCLB-T3/4-N297Qとのインキュベーションも、対照状況（培地およびT細胞のみ）と比較して、大半のサイトカインのアップレギュレーションをもたらした。
【０５７７】

サイトカイン発現の経時的な追跡も行った。DuoBody（商標）huCLB-T3/4-N297Q × HER2-169-N297Qを用いたインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて、T細胞またはPBMCによって作成された第1日、2日および3日のサイトカインプロファイルを図22に示している。概ね、より低い抗体濃度を用いた実験（3ng／mL）では、炎症誘発性サイトカイン、TNF-α、INF-γおよびIL-2は顕著に存在した。抗体濃度を300倍に高めた実験では、大部分の炎症誘発性サイトカインはより低い濃度で存在した。炎症誘発活性および抗炎症活性を有するサイトカインであるIL-6は、腫瘍細胞およびDuoBody huCLB-T3/4 × HER2-169 N297Qとのインキュベーション時に、T細胞によってはほとんど分泌されないが、PBMCによっては高度に分泌される。第1日および／または第2日により高いレベルで分泌され、第3日には減少するサイトカインもあれば、第1日により低いレベルで分泌され、第2日および／または第3日に発現増大を示すものもある。

【０５７８】

さらに、T細胞活性化の尺度としてGM-CSFの放出も測定した。このサイトカインはT細胞の活性化中には消費されず、このため、長期的実験におけるサイトカインレベルの測定のためにはより好適である。上記のような対照試料で観察されるサイトカイン放出について調べるために、Fc変異体をWT抗体と比較した。ここでは、二重特異性抗体の存在下におけるPBMCとAU565腫瘍細胞との共培養物からのT細胞試料を、GM-CSF ELISAで分析した。

【０５７９】

以下のプロトコールを用いた。ELISAプレートを、PBS中の2.0μg／mLコーティング抗体（抗GM-CSF 9.1 Sanquin）により100μL／ウェルでコーティングして、室温（RT）で一晩インキュベートした。続いてプレートを、0.05% Tweenを加えたPBS（PBST）により、Elisa-washerを用いて3回洗浄した。試料をPBST／0.2% BSA中に希釈し、標準曲線試料を調製した（標準曲線：最初の点は1000pg／mL、2倍希釈曲線、10段階およびブランク2個（標準物質GM-CSF＝組換えGM-CSF Sandoz））。100μL／ウェルの試料をプレートに添加し、PBST／0.2% BSA中に希釈した10μL／ウェルのモノクローナルビオチン化抗GM-CSF（モノクローナル抗GM-CSF 16.3 Sanquin）（1μg／mL）を添加した上で、室温で2時間インキュベートした。PBS-Tで3回洗浄した後に、PBST／0.2% BSA（0.1μg／mL）中に希釈した100μL／ウェルのStrep-ポリ-HRPを添加して、振盪機にて室温で20分間インキュベートした。検出のためには、1錠のABTS基質を50mlのABTS緩衝液（Roche）に溶解させ、100μL／ウェルのABTS溶液をウェルに添加して、暗所にて室温で15～30分間インキュベートした。反応を100μL／ウェルの2%シュウ酸で停止させ、暗所で10分間インキュベートした。EL808-Elisa-readerを用いて、吸光度を405nmで読み取った。

【０５８０】

DuoBody HER2 169 × huCLB-T3/4（両方のFc変異体、N297QおよびLFLEDANQPS）は、GM-CSF産生によって示されたように、T細胞の用量依存的活性化を誘導した（図23）。単一特異性対照抗体IgG1-HER2-169-N297Qおよび無関係な抗体IgG1-b12 N297Qは、予想通り、T細胞活性化を誘導しなかった。TH1／TH2サイトカインプロファイルアッセイで観察されたように、単一特異性IgG1-huCLB-T3/4 N297QおよびDuoBody huCLB-T3/4 × b12 N297QはT細胞の活性化を誘導しなかった。$(Fab')_2$対照およびIgG1-CLB-T3/4の不活性Fc変異体LFLEDANQPSはT細胞活性化を誘導せず、このことはN297Q変異体によるT細胞のFc媒介性活性化が起こっていることを示唆している。

【０５８１】

（表１４）A．T細胞またはB．PBMCを用いたインビトロ細胞傷害性アッセイ（1000ng／mLの抗体とともにインキュベート）の第3日に測定したサイトカインプロファイル。

A	サイトカイン T細胞（濃度pg／mL）					
	INFγ	TNFα	IL2	IL6	IL4	IL10
DuoBody huCLB-T3/4-Q x HER2-169-Q	4268.0	1005.1	2371.3	45.3	32.6	2010.1
DuoBody huCLB-T3/4-Q x B12-Q	0.5	0.3	9.3	0.1	0.1	1.7
IgG1-hCLB-T3/4-Q	1.6	1.7	20.5	0.2	0.3	2.6
IgG1-HER2-169-Q	4.8	0.7	5.1	0.3	0.2	0.5
T細胞のみ	0.1	0.4	0.2	0.1	0.0	0.3
T細胞の培地	3.8	1.0	7.9	0.2	0.1	0.3
B	サイトカイン PBMC（濃度pg／mL）					
	INFγ	TNFα	IL2	IL6	IL4	IL10
DuoBody huCLB-T3/4-Q x HER2-169-Q *	4082.6	1073.3	585.6	4191.9	13.2	2018.2
DuoBody huCLB-T3/4-Q x B12-Q *	1760.2	115.0	10.1	569.4	1.4	592.4
IgG1-hCLB-T3/4-Q	1474.2	92.7	345.2	116.5	1.7	1295.4
IgG1-HER2-169-Q	1.3	1.0	15.5	2.2	0.2	2.8
T細胞のみ	0.4	0.7	0.3	0.2	0.4	0.4
T細胞の培地	1.5	1.0	8.8	0.2	0.3	2.2

* 抗体濃度＝1000ng／mL

【０５８２】

実施例31‐インビボでの概念実証

二重特異性HER2×CD3抗体のインビボ抗腫瘍有効性を、Brischwein et al.,（Mol. Immunol. 43 (2006), 1129-1143）によって記載されたモデルに類似した、ヒトT細胞を非刺激PBMCの形で腫瘍細胞とともに同時接種する皮下NCI-N87異種移植モデルにおいて評価した。6～11週齢の雌性NOD-SCID（NOD.CB17-Prkdcscid／NcrCrl）マウスを用いた。健常ドナー由来のPBMCを、実施例21に記載した通りにバフィーコートから単離した。第0日に、PBMCおよびNCI-N87細胞をいずれも5×10^6個含有する混合物を、各マウスの右側腹部の皮下に200μL接種した（ドナー特異的なアーチファクトの可能性を排除するために、2人のドナー由来のPBMCを並行して用いた）。注射から1時間以内に、マウスを5群（n＝7）に選別し、各群に（二重特異性）抗体の単回用量を腹腔内（i.p.）注射した。処置群は表15に示されている。抗体試料にはすべて、無関係なmAbIgG1-b12を加えて、試料毎の全抗体濃度が4mg／kgとなるようにした。

【０５８３】

1500mm^3というエンドポイント腫瘍体積になるまで、腫瘍が潰瘍形成を示すまで、または試験終了時（第50日）まで、キャリパー（PLEXX）を用いて腫瘍を週2回測定した。図24Aは、第42日の時点で、二重特異性HER2×CD3抗体によって0.05mg／kgの用量で腫瘍増殖が最も至適に、効果的に阻害されたことを示している。

【０５８４】

図24Bには、生存率（腫瘍サイズが500mm^3よりも小さいもの）がKaplan-Meierプロット

の形で示されている。HER2×CD3抗体（0.05mg／kg）を投与したマウスでは、b12 × CD3対照抗体を投与した対照群と比較して、腫瘍形成が有意に遅延している（p＜0.05、Log Rank（Mantel-Cox））。

【０５８５】

（表１５）処置群および投薬

群	抗体	用量
1	DuoBody HER2 169 x CLB-T3/4-N297Q	1 µg (= 0.05 mg/kg)
2	DuoBody b12 x CLB-T3/4-N297Q	80 µg (= 4 mg/kg)
3	陰性対照mAb IgG1-b12	80 µg (= 4 mg/kg)

【０５８６】

実施例32：ヒトIgG1のFabアーム交換への関わりのためのT350I、K370TおよびF405L置換の必要性の解明

IgG1がFabアーム交換に関わるために必要なIgG1 CH3ドメインにおける決定基をさらに特定するために、三重変異T350I-K370T-F405L（ITL）を含むIgG1を、WO 02/100348号およびWO 04/035607号にそれぞれ記載された抗体2F8および7D8を用いて試験されている二重変異体T350I-K370T（IT）、T350I-F405L（IL）およびK370T-F405L（TL）と比較した。また、単一変異体F405L（L）も試験した。2-MEAを還元剤として用い、インビトロでのFabアーム交換を誘導した（PBS／25 mM 2-MEA 100µL中にて各抗体50µgを37℃で90分間）。単一変異体F405L抗体の場合、一過性トランスフェクションの上清由来の未精製抗体を、Amicon Ultra遠心分離器具（30k, Millipore, カタログ番号UFC803096）を用いて緩衝液をPBSに交換した後に用いた。還元反応を停止させるために、スピンカラムを用いて試料を脱塩することによって還元剤2-MEAを除去した。二重特異性抗体の生成については、ELISAで測定した二重特異性結合によって判定した。

【０５８７】

三重変異（ITL）、二重変異（IT、ILおよびTL）および単一変異（L）をIgG1-2F8に導入した。これらの変異体を、25mM 2-MEAを用いたFabアーム交換のために、CPSCヒンジを含むIgG4-7D8（野生型）、または安定化されたヒンジを含むIgG4-7D8（IgG4-7D8-CPPC）と37℃で90分間組み合わせた。図25A～Bは、IgG1-2F8-IL変異体およびIgG1-2F8-TL変異体が、組み合わされたIgG4-7D8（CPSCまたはCPPCヒンジ）に関係なく、三重変異体ITLと同じレベルまでFabアーム交換を示したことを示している。対照的に、IgG1-2F8-IT変異体との組み合わせでは二重特異性結合が見いだされなかった。図25Cは、同様にIgG1-2F8-F405L変異体が、組み合わされたIgG4-7D8（CPSCまたはCPPCヒンジ）に関係なく、Fabアーム交換を示したことを示している。これらのデータは、上述した条件下では、Fabアーム交換にヒトIgG1を関わらせるにはF405L変異で十分であることを指し示している。

【０５８８】

実施例33：IgG1-ITLとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置409の決定基

2-MEAは、ヒトIgG1-ITLとIgG4-CPPCとの間のFabアーム交換を誘導することができる。ヒトIgG1およびIgG4のCH3境界部残基は位置409でのみ異なる：IgG1ではリジン（K）であり、IgG4ではアルギニン（R）である。このため、位置409のリジンのアルギニンまたは他の任意のアミノ酸による置換（K409X）により、IgG1をIgG1-ITLとの2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わらせうるか否かについて試験した。PBS／25mM 2-MEA 20µl中でヒトIgG1-2F8-ITL 10µgおよびIgG1-7D8-K409X 10µgの組み合わせ（各抗体について最終濃度0.5mg／mL）を、37℃で90分間インキュベートした。一過性トランスフェクションの上清由来の未精製抗体を、Amicon Ultra遠心分離器具（30k, Millipore, カタログ番号UFC803096）を用いて緩衝液をPBSに交換した後に用いた。Fabアーム交換反応の後に、PBS 20µLを各試料に加え、スピン脱塩プレートを用いて試料を脱塩することによって還元剤を除去した。抗体の希釈系列（3倍希釈にて総抗体濃度0～20µg／mL）をELISAで用いて、二重特異性結

合を測定した。

【０５８９】

図26Aは、IgG1-2F8-ITL × IgG1-7D8-K409X間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。図26Bにおいては、交換が、100％に設定した、IgG1-2F8-ITLとIgG4-7D8-CPPCとの間の2-MEA誘導性Fabアーム交換に由来する二重特異性抗体の精製バッチと対比した二重特異性結合として提示されている。また、これらのデータを、表1に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度のFabアーム交換、（+）中程度のFabアーム交換、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-7D8における位置409がK（＝野生型IgG1）、LまたはMであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-7D8における位置409がF、I、NまたはYであった場合には中程度（+）であることが見いだされ、IgG1-7D8における位置409がA、D、E、G、H、Q、R、S、T、VまたはWであった場合には高度（++）であることが見いだされた。

【０５９０】

（表１６）IgG1-2F8-ITL変異体とIgG1-7D8-K409X変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-ITL変異体とIgG1-7D8-K409X変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

	Fab-アーム交換
IgG1-7D8-K409X	x IgG1-2F8-ITL
A	++
D	++
E	++
F	+
G	++
H	++
I	+
K	-
L	-
M	-
N	+
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	+

【０５９１】

実施例34：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置405の決定基

実施例32では、F405L変異が、IgG4-7D8と組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを記載した。ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせにおいて2-MEA誘導性Fabアーム交換における関与に関するIgG1の位置405の決定基をさらに検討するために、考えうるすべてのIgG1-2F8-F405X変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。この手順は、実施例32に記載した通りに精製抗体を用いて行った。

【０５９２】

図27は、IgG1-2F8-F405X × IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表18に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置405がF（＝野生型IgG1）であった場合には、

Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置405がGまたはRであった場合には軽度（+/-）であることが見いだされた。IgG1-2F8における位置405がA、D、E、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V、WまたはYであった場合には、Fabアーム交換は高度（++）であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置405での特定の変異により、IgG1-K409Rと組み合わされた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【０５９３】

（表１７）IgG1-2F8-F405X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-F405X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-F405X	Fab-アーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	+/-
H	++
I	++
K	++
L	++
M	++
N	++
Q	++
R	+/-
S	++
T	++
V	++
W	++
Y	++

【０５９４】

実施例35：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置407の決定基

前の実施例では、位置F405での特定の単一の変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを記載した。CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係する他の決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介しうるか否かについて検討するために、IgG1の位置407での変異誘発を行い、変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせにおける2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-Y407X変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は精製抗体を用いて行った。

【０５９５】

図28は、IgG1-2F8-Y407X × IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表19に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置407がY（＝野生型IgG1）、E、K、QまたはRであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置407がD、F、I、SまたはTであった場合には軽度（+/-）であり、IgG1-2F8における位置407がA、H、NまたはVであった場合には中程度（+）であり、IgG1-2F8における位置407がG、L、MまたはWであった場合には高度（++）であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置407での特定の変異により、IgG1-K409Rと組み合わされた場合

に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【０５９６】

（表１８）IgG1-2F8-Y407X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-Y407X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-Y407X	Fab-アーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+/-
E	-
F	+/-
G	++
H	+
I	+/-
K	-
L	++
M	++
N	+
Q	-
R	-
S	+/-
T	+/-
V	+
W	++
Y	-

【０５９７】

実施例36：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置368の決定基

実施例34および35は、位置F405およびY407での特定の単一の変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置368の変異誘発を行い、変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-L368X変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は精製抗体を用いて行った。

【０５９８】

図29は、IgG1-2F8-L368X × IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表20に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置368がL（＝野生型IgG1）、FまたはMであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置368がYであった場合には軽度（+/-）であることが見いだされた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置368がKであった場合には中程度（+）であり、IgG1-2F8における位置368がA、D、E、G、H、I、N、Q、R、S、T、VまたはWであった場合には高度（++）であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置368での特定の変異により、IgG1-K409Rと組み合わされた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【０５９９】

（表１９）IgG1-2F8-F368X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性Fabアー

ム交換。IgG1-2F8-F368X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

	Fab-アーム交換 Fab-アーム交換
IgG1-2F8-L368X	x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	++
E	++
F	-
G	++
H	++
I	++
K	+
L	-
M	-
N	++
Q	++
R	++
S	++
T	++
V	++
W	++

【０６００】

実施例37：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置370の決定基

上記実施例は、位置F405、Y407またはL368での特定の単一の変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置370の変異誘発を行い、変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-K370X変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は精製抗体を用いて行った。

【０６０１】

図30は、IgG1-2F8-K370X × IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表21に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置370がK（＝野生型IgG1）、A、D、E、F、G、H、I、L、M、N、Q、R、S、T、VまたはYであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。中程度のFabアーム交換（+）をもたらしたのは、K370のWによる置換のみであった。これらのデータは、IgG1の位置370での唯一の変異（K370W）のみが、IgG1-K409Rと組み合わされた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることを可能にすることを指し示している。

【０６０２】

（表２０）IgG1-2F8-K370X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-K370X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

	Fab-アーム交換
IgG1-2F8-K370X	x IgG1-7D8-K409R
A	-
D	-
E	-
F	-
G	-
H	-
I	-
K	-
L	-
M	-
N	-
Q	-
R	-
S	-
T	-
V	-
W	+
Y	-

【０６０３】

実施例38：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置399の決定基

以前の実施例は、位置F405、Y407、L368またはK370での特定の単一の変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置399の変異誘発を行い、変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-D399X変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は、実施例33に記載されたように精製抗体を用いて行った。

【０６０４】

図31は、IgG1-2F8-D399X × IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらの結果を、表10に提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置399がD（＝野生型IgG1）、EおよびQであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置399がVであった場合には軽度（+/-）であり、IgG1-2F8における位置399がG、I、L、M、N、S、TまたはWであった場合には中程度（+）であった。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置399がA、F、H、K、RまたはYであった場合には高度（++）であることが見いだされた。これらのデータは、IgG1の位置399での特定の変異により、IgG1-K409Rと組み合わされた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【０６０５】

（表２１）IgG1-2F8-D399X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-D399X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度のFabアーム交換、（+）中程度のFabアーム交換、（++）高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-D399X	Fab-アーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	++
D	-
E	-
F	++
G	+
H	++
I	+
K	++
L	+
M	+
N	+
Q	-
R	++
S	+
T	+
V	+/-
W	+
Y	++

【０６０６】

実施例39：IgG1-K409Rとの組み合わせで2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わるためのIgG1の位置366の決定基

実施例32～38は、位置F405、Y407、L368、K370またはD399での特定の単一の変異が、IgG1-K409Rと組み合わせた場合にヒトIgG1をFabアーム交換に関与させるために十分であることを示している。この実施例で例証しているように、CH3ドメイン内のFc：Fc境界部位置に関係するさらなる決定基も同じくFabアーム交換機構を媒介する可能性がある。この効果に関して、IgG1の位置366の変異誘発を行い、変異体を、ヒトIgG1-K409Rとの組み合わせでの2-MEA誘導性Fabアーム交換への関わりに関して試験した。考えうるすべてのIgG1-2F8-T366X変異体（CおよびPを除く）を、IgG1-7D8-K409Rと組み合わせた。手順は、実施例33に記載されたように精製抗体を用いて行った。

【０６０７】

図32は、IgG1-2F8-T366X × IgG1-7D8-K409R間の2-MEA誘導性Fabアーム交換による二重特異性結合の結果を示している。これらのデータを、表Xに提示されているように、（-）Fabアーム交換なし、（+/-）軽度、（+）中程度、または（++）高度のFabアーム交換としてもスコア化した。IgG1-2F8における位置366がT（＝野生型IgG1）、K、R、SまたはWであった場合には、Fabアーム交換はない（-）と認められた。Fabアーム交換は、IgG1-2F8における位置366がF、G、I、L、MまたはYであった場合には軽度（+/-）であり、IgG1-2F8における位置366がA、D、E、H、N、VまたはQであった場合には中程度（+）であった。これらのデータは、IgG1の位置366での特定の変異により、IgG1-K409Rと組み合わされた場合に、IgG1が2-MEA誘導性Fabアーム交換に関わることが可能になることを指し示している。

【０６０８】

（表２２）IgG1-2F8-T366X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性Fabアーム交換。IgG1-2F8-T366X変異体とIgG1-7D8-K409R変異体との間の2-MEA誘導性のインビトロでのFabアーム交換後の二重特異性抗体の生成をサンドイッチELISAによって判定した。（-）なし、（+/-）軽度、（+）中程度、（++）高度のFabアーム交換。

IgG1-2F8-T366X	Fab-アーム交換 x IgG1-7D8-K409R
A	+
D	+
E	+
F	+/-
G	+/-
H	+
I	+/-
K	-
L	+/-
M	+/-
N	+
Q	+
R	-
S	-
T	-
V	+
W	-
Y	+/-

【０６０９】

実施例40‐インビボでの概念実証：用量調整

二重特異性HER2×CD3抗体の成長阻害効果についてさらに試験するために、NOD-SCIDマウスでの皮下NCI-N87異種移植モデルを用いて、実施例31に記載した通りの非刺激ヒトPBMC（各群当たりマウス7匹）との皮下（S.C.）同時注射により、種々の抗体用量を試験した。この時は、腫瘍接種から1時間後に抗体の単回用量を静脈内（i.v.）投与した。処置群は表23に示されている。

【０６１０】

対照群は、治療用抗体の非存在下で、2人のドナーのうち1人からのPBMCにより、ドナー特異的な腫瘍成長阻害（アロ反応）を示した（データは提示せず）。このため、その特定のドナーからのPBMCを用いて得られたデータは分析から除外した。

【０６１１】

（表２３）処置群および投薬

群	抗体	用量
1	DuoBody HER2 169 x CLB-T3/4-N297Q	0.01 µg (= 0.0005 mg/kg)
2	DuoBody HER2 169 x CLB-T3/4-N297Q	0.1 µg (= 0.005 mg/kg)
3	DuoBody HER2 169 x CLB-T3/4-N297Q	1 µg (= 0.05 mg/kg)
4	DuoBody HER2 169 x CLB-T3/4-N297Q	10 µg (= 0.5 mg/kg)
5	DuoBody b12 x CLB-T3/4-N297Q	10 µg (= 0.5 mg/kg)
6	PBS	

【０６１２】

図33Aは、0.05mg／kgおよび0.5mg／kgのHER2×CD3 N297Qによって腫瘍成長が阻害されたことを示している。

【０６１３】

図33Bは、500mm^{3}未満の腫瘍を有するマウスのパーセンテージを提示しているKaplan-Meierプロットを示している。0.05mg／kgおよび0.5mg／kgのHER2×CD3-N297Q二重特異性抗体を投与したマウスでは、PBSまたはb12 × CD3対照抗体を投与した対照マウスと比較して、腫瘍形成が遅延している。

【図１Ａ】

IgHV3-23-01 / IGHJ4-02 – VHアラインメント（第1群）

```
IgHV1-23-01 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-050  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
VH1014 049  EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
VH1014-051  EVQLLESGGDLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
VH1014 055  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSAISGRGGTTYYADSVKG
コンセンサス  EVQLLESGGXLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMXWVRQAPGKGLEWVSAISGXGGXTYYADSVKG

IgHV1-23-01 RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-050  RFTIGRDNGKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAKARAHNDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-049  RFTISRDNGKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARAHNDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-051  RFTISRDNGKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARAHNDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-055  RFTIGRDNGKSTLCLQMNSLRAEDTAVYYCAKARAHNDYFDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  RFTISRDNSKXTLXLQMXSLRAEDTAVYYCAKARAHNDYFDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｂ】

IgHV1-69-04 / IGHJ6-02 – VHアラインメント（第1群）

```
IgHV1-69-04 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
TH1014-084  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFRTYAISWVRQAPGQGLEWMGRINTVLGIVNHAQKFQG
コンセンサス  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFXXYAISWVRQAPGQGLEWMGRIXXXLGIXNXAQKFQG

IgHV1-69-04 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR--------GMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-084  RVTITADKSTNTAYMELNGLRSEDTAVYYCARERGVDYYYGIEVWGQGTTVTVSS
コンセンサス  RVTITADKSTXTAYMELXSLRSEDTAVYYCARERGVDYYYGXXVWGQGTTVTVSS
```

【図１Ｃ】

IgHV1-18-01 / IGHJ4-02 – VHアラインメント（第1群）

```
IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-169  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQG
VH1014-123  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQALEWMGNITTYSGNTIYAQKLQG
VH1014-161  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQG
VH1014-124  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGNIITYNGNTIYAQRFQD
コンセンサス  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTXYGISWVRQAPGQXLEWMGNIXXYXGNTXYAQXXQG

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-169  RVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-123  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRVVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-161  RVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIVVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-124  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  RVTMTTDTSTXTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDRXXVRPDYFDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｄ】

IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 – VHアラインメント（第2群、No.1）

```
IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
TH1014-025  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-001  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-143  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSANYNPSLMSR
VH1014-019  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHVGSTNYNPGLKSR
VH1014-021  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-027  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYFWNWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
コンセンサス  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSXYXWXWIRQPPGKGLEWIGEIXHXGSXNYNPSLXSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-025  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYYFDYWAQGTLVTVSS
VH1014-001  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGNYGSGYYYFDLWGRGTQVTVSS
VH1014-143  VTISVDTSKNQFSLQLSSVTAADTAVYYCARGYYGSGYYYFDYWNQGTLVTVSS
VH1014-019  VTISVDTSKSQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYDSGVYYFDYWAQGTLVTVSS
VH1014-021  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARGYYASGVYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-027  VTISVDTSKNQFSLNLSSVTAADTAVYYCARGLIGSGYYYFDYWNDQGTLVTVSS
コンセンサス  VTISVDTSKXQFSLXLSSVTAADTAVYYCARGXXXSGXYYFDXWXXGTXVTVSS
```

【図１Ｅ】

IgHV4-34-01 / IGHJ4-02 – VHアラインメント（第2群、No.2）

```
IgHV4-34-01 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSR
TH1014-091  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWTWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYNPSLKSR
VH1014 C32  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSR
VH1014 C35  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGDTNYNPSLTSR
VH1014-C36  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWSWIRQPPGKGLEWTGEINHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-C54  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSR
VH1014-C94  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVSGGSFSGYYWIWIRQPPGKGLEWIGEIYHSGDTNYNPSLKSR
コンセンサス  QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAXXGGSFSXYYWXWIRQPPGKGLEWIGEIXHSGXTNYNPSLXSR

IgHV4-34-01 VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-091  VTISVDTSKNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYWGQGTLVTVSS
VH1014-C32  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-C35  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLFYGSGIYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-C36  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLYYGSGTYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-C54  VTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLWYGSGSYYFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-C94  VTISVDTSKNQFSLKLYSVTAADTAVYYCARLYFGSGIYYLDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  VTISVDTSKNQFSLKLXSVTAADTAVYYCARLXXGSGXYYXDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｆ】

IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 – VHアラインメント（第2群）

```
IgHV1-3C-... QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGR
TH1014-129  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTFAIHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGGHKFYADSVKGR
コンセンサス  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSXXAXHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGXXKXYADSVKGR

IgHV3-3C-... FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-129  FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARGLGVWGAFDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAXYYCARGLGVWGXFDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｇ】

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 – VHアラインメント（第3a群）

```
IgHV3-23-1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-098  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGAYGTYYADSVKG
VH1014-105  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGAYGTYYADSVKG
VH1014-100  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNYGMNWVRQAPGKGLEWVSTISGGIGYSTYYADSVKG
VH1014-125  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMNWVRQAPGKGLEWVSTISGSGYATYYADSVKG
VH1014-162  EVQLWESGGGSVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGYSTYYADSVKG
コンセンサス  EVQLXESGGGXVQPGGSLRLSCAASGFTFXXYXMXWVRQAPGKGLEWVSXISGXXXXTYYADSVKG

IgHV3-23-1  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK----------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-098  RFTIGRDNGKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-105  RFTIGRDNGKNTLWLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYHGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-100  RFTIGRDNGKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAHYFGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-125  RFTIGRDNGKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGHTLGSGSYYTLFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-162  RFTIGRDNGKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGYYHGSGSYYTSFDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  RFTIGRDNGKXTLXLQMNSLRAEDTAVYYCAKXXXXGSGSYYTXFDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｈ】

IgHV5-51-01 / IGHJ2-01 – VHアラインメント（第3a群、No.1）

```
IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG
TH1014-127  EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKGSGYSFSIYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIFPGDSDIRYSPSFQG
コンセンサス  EVQLVQSGAEVKKPGESLXISCKGSGYSFXXYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIXPGDSDXRYSPSFQG

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR----------YFDLWGRGTLVTVSS
TH1014-127  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSPRHWYFDLWGRGTLVTVSS
コンセンサス  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQPGDWSPRHWYFDLWGRGTLVTVSS
```

【図１Ｉ】

IgHV5-51-01-01 / IGHJ5-02 – VHアラインメント（第3a群、No.2）

```
IgHV5-51-01 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG
TH1014-159  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYNFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG
コンセンサス  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYXFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQG

IgHV5-51-01 QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR------------NWFDPWGQGTLVTVSS
TH1014-159  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILTGYFNWFDPWGQGTLVTVSS
コンセンサス  QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARWGTYYDILTGYFNWFDPWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｊ】

IgHV1-18-01 / IGHJ6-02 – VHアラインメント（第3b群）

```
IgHV1-18-01 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-132  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYHGNSNYVQKFQG
コンセンサス  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYHGNXNYXQKXQG

IgHV1-18-01 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR------------GMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-132  RVTMTTDTTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARESYSYDGSTYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
コンセンサス  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARESYSYDGSTYFYYGMDVWGQGTTVTVSS
```

【図１Ｋ】

IgHV3-30-3-01 / IGHJ4-02 – VHアラインメント（第3b群）

```
IgHV3-30... QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
TH1014-153  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSDYVIHWVRQAPGKGLEWVTVISYDGSIKYYADSVKG
VH1014-033  QVQLVESGGGVVQTGRSLRLSCAASGFTFSGHAMHWVRQAPGKGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKG
VH1014-160  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSGHAMHWVRQAPGKGLEWVAAISYDGSNKYYADSVKG
VH1014-166  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSGYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNEYYADSVKG
VH1014-152  QVQVVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSYKYYADSVKG
VH1014-167  QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAIHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG
コンセンサス  QVQLVESGGGVVQXGRSLRLSCAASGFTFSXXXXHWVRQAPGKGLEWVXXISYDGSXXYYADSVKG

IgHV3-30... RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR--------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-153  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLSAEDTAMYYCARGGITGTFGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-033  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYIGSSGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-160  RFTISRDNSKNTMYLQMNSLRAEDTAMCYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-166  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSIIGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-152  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
VH1014-167  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSITGSTGVFDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  RFTISRDNSKNTXYLQMNSLXAEDTAXYYCARGXXXXXXGXFDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｌ】

IgHV5-51-1 / IGHJ6-02 – VHアラインメント

```
IgHV5-51-1  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
TH1014-005  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSDTRYRPSFQ
TH1014-060  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSPSFQ
TH1014-106  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-041  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQ
VH1014-150  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSHTRYRPSFQ
VH1014-067  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-072  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-163  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCQGSGYRFISYWIGWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-093  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGRIYPGDSDTRYSPSFQ
VH1014-044  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWVRQMPGKGLEWMGSIPPGDSDTRYSPSFQ
コンセンサス  EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCXXGSGYXFXXYWIGWVRQMPGKGLEWMGXIXPGDSXTRXXPSFQ

IgHV5-51-1  GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR----------GMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-005  GQVTISADKSISTAYLQWTSLKASDTAIYYCARQRGD--YYYFYGMDVWGQGTTVTVSS
TH1014-060  GQVTISADKSIATAYLQWNSLKASDTAMYYCARHAGD--FYYFDSLDVWGQGTTVTVSS
TH1014-106  GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYYSGMDVWGQGTTVTVSS
VH1014-041  GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYYFFSLDVWGQGTAITVSS
VH1014-150  GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGD--YYYYNGMDVWGQGTTVTVSS
VH1014-067  GQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYYHYGLDVWGQGTTVTVSS
VH1014-072  GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--YYYFNSLDVWGQGTTVTVSS
VH1014-163  GQVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQRGD--YYYFNSLDVWGQGTTVTVSS
VH1014-093  GQVTISADKSITTAYLQWSSLRASDTAMYYCARQRGD--YYYFFSLDIWGQGTTVTVSL
VH1014-044  GQVTISADKSITTAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGD--YYYYNGMDVWGQGTTVTVSS
コンセンサス  GQVTISXDKSIXTAYLQWXSLXASDTAXYYCARXXXXXXXXXYXXGXDXWGQGTXXTVSX
```

【図１Ｍ】

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 – VHアラインメント

```
IgHV3-23-1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-006  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYALIWVRQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKG
コンセンサス  EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSXYAXWVRQAPGKGLEWVSXIXGXXGSTYYADSVKG

IgHV3-23-1  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK       YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-006  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPLFDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPXFDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｎ】

IgHV1-18-1 / IGHJ4-02 – VHアラインメント

```
IgHV1-18-1  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-059  QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTRYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYYAQKLQG
コンセンサス  QVQLVQSGAEVKKPGASVXVXCKASGYTFTXYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGXTXYAQKLQG

IgHV1-18-1  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR---------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-059  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGPLLWFEELYFDYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGPLLWFEELYFDYWGQGTLVTVSS
```

【図１Ｏ】

IgHV1-69-4 / IGHJ4-02 – VHアラインメント

```
IgHV1-69-4  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
TH1014-111  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
コンセンサス  QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYXISWVRQAPGXGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG

IgHV1-69-4  RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR------YFDYWGQGTLVTVSS
TH1014-111  RVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSNWYYWGQGTLVTVSS
コンセンサス  RVTITADKSTXTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSXXXYWGQGTLVTVSS
```

【図２Ａ】

IgKV1-12-01 / IGKJ5-01 – VLアラインメント（第1群）

```
IgKV1-12-01  DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-050  DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
VL1014-084  DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYVASTLQSGVPSRFSGSG
VL1014 049  DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
VL1014-051  DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
VL1014-055  DIQMIQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQHKPGKAPKLLIYAASILQSGVPSRFSGSG
コンセンサス  DIQMIQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQXKPGKAPKLLIYXASXLQSGVPSRFSGSG

IgKV1-12-01  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-050  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-084  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTKVEIK
VL1014-049  SGTDFTLTISSLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-051  SGTDFTLTISSLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
VL1014-055  SGTDFTLTISSLRPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK
コンセンサス  SGTDFTLTISSLXPEDFATYYCQQANSFPXTFGXGTRXEIK
```

【図２Ｂ】

IgKV3-11-01 / IGKJ1-01 – VLアラインメント（第1群）

```
IgKV3-11-01  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014-169  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014 124  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014-161  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSG
VL1014-123  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDTSNRATGIPARFSGSG
コンセンサス  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDXSNRATGIPARFSGSG

IgKV3-11-01  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPWTFGQGTKVEIK
VL1014-169  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
VL1014-124  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
VL1014-161  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK
VL1014-123  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSHWPRTFGQGTKVEIK
コンセンサス  SGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSXWPRTFGQGTKVEIK
```

【図２Ｃ】

IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01– VLアラインメント（第2群、No.1）

```
IgKV1D-16 …  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-025  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSG
VL1014-001  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIFAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-019  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLRSGVPSRFSGSG
VL1014-143  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSG
VL1014-021  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-027  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISXWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASXLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 …  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-025  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-001  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYIGFPITFGQGTRLEIK
VL1014-019  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-143  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-021  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-027  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
コンセンサス  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSXPITFGQGTRLEIK
```

【図２Ｄ】

IgKV1D-16-01 / IGKJ1-01– VLアラインメント（第2群、No.2）

```
IgKV1D-16 …  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-091  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLVWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-032  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSG
VL1014-035  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYATFRLQSGVPSRFSGSG
VL1014 036  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLTWYQQKPEKAPKSLIYAASRLQSGVPSRFSGSG
VL1014-054  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-094  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLVWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLXWYQQKPEKAPKSLIYAASXLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 …  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPWTFGQGTKVEIK
VL1014-091  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-032  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-035  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-036  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-054  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
VL1014-094  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGQGTKVEIK
コンセンサス  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSFPPTFGXGTKVEIK
```

【図２Ｅ】

IgKV1D-16-01 / IGKJ2-01 – VLアラインメント（第3a群）

```
IgKV1D-16 …  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-098  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-100  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-105  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014 125  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-162  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISXWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 …  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-098  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-100  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014 105  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-125  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQGTKLEIK
VL1014-162  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGQGTKVEIK
コンセンサス  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPXTFGXGTKXEIK
```

【図２Ｆ】

IgKV1D-16-01 / IGKJ5-01 – VHアラインメント（第3b鞘）

```
IgKV1D-16 … DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-153  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-152  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGINSWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-166  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGICHWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014 167  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNWLAWYQQKPEKAPKSLIYDASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-160  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
VL1014-033  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSG
コンセンサス  DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIXXWLAWYQQKPEKAPKSLIYXASSLQSGVPSRFSGSG

IgKV1D-16 … SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-153  YGTDFSLTISSLQPEDFATYYCQQYKSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-152  SGTDFTLTISSLQPENFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-166  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-167  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-160  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
VL1014-033  SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPITFGQGTRLEIK
コンセンサス  XGTDFXLTISSLQPEXFAXYYCQQYXSYPITFGQGTRLEIK
```

【図２Ｇ】

IgKV3-20-01 / IGKJ4-01 – VLアラインメント

```
IgKV3-20-01 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-005  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQVPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-059  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-060  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-106  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-111  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-041  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-150  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-067  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-072  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-163  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-093  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-044  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
コンセンサス  EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVXSSYLAWYQQKPGQXPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS

IgKV3-20-01 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-005  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-059  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTS-LFTFGPGTKVDIK
VL1014-060  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPITFGQGTRLEIK
VL1014-106  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--FTFGPGTKVDIK
VL1014-111  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQLYGSSP--TFGPGTKVDIK
VL1014-041  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-150  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-067  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
VL1014-072  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPRLTFGGGTKVEIK
VL1014-163  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-093  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
VL1014-044  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSS--LTFGGGTKVEIK
コンセンサス  GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQXYGXSXXXTFGXGTXXXIK
```

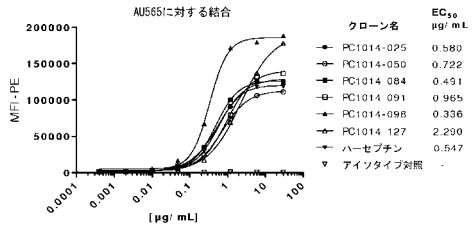
【図２Ｈ】

IgKV3-11-01 / IGKJ4-01 – VLアラインメント

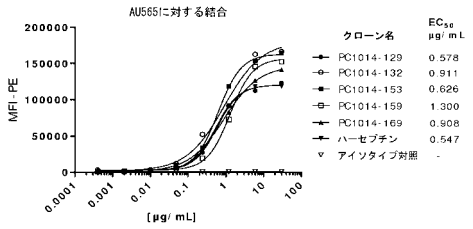
```
IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
VL1014-006  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAGNRATGIPARFSGS
コンセンサス  EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAGNRATGIPARFSGS

IgKV3-11-01 GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
VL1014-006  GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
コンセンサス  GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPLTFGGGTKVEIK
```

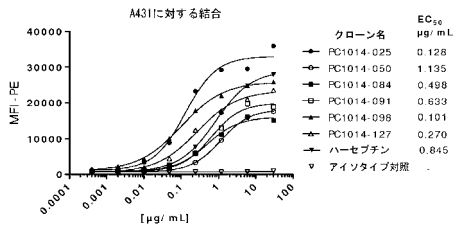
【図３Ａ】



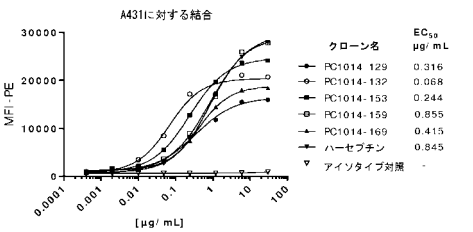
【図３Ｂ】



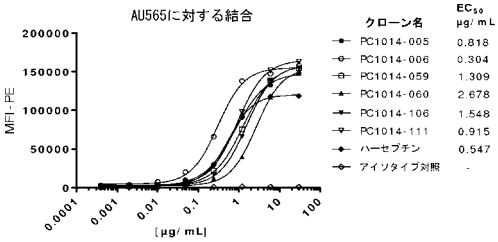
【図３Ｃ】



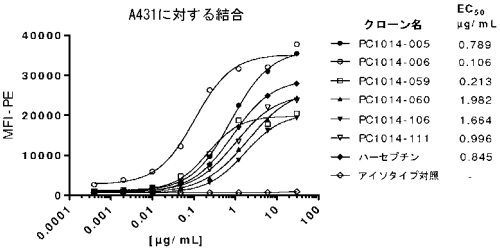
【図３Ｄ】



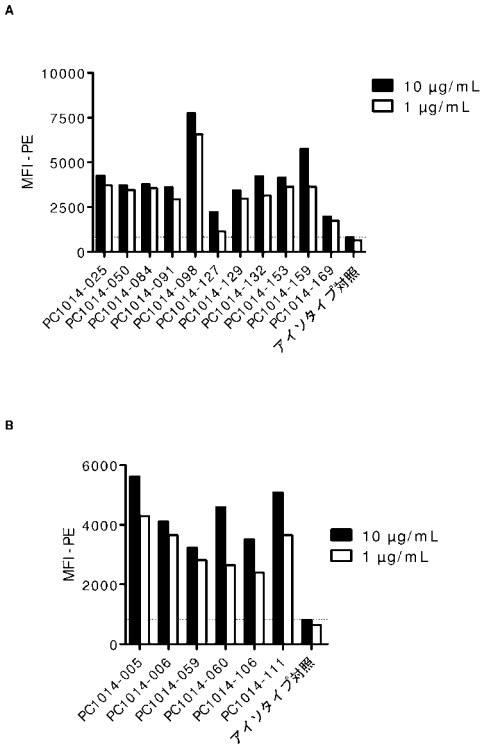
【図３Ｅ】



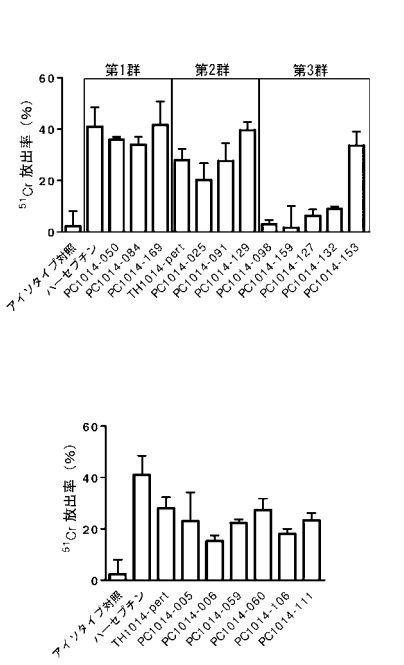
【図３Ｆ】



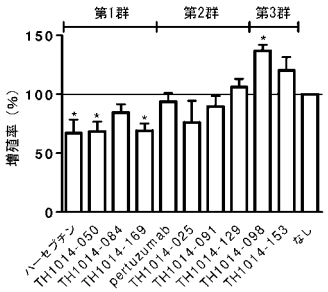
【図４】



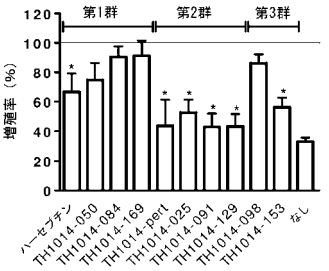
【図５】



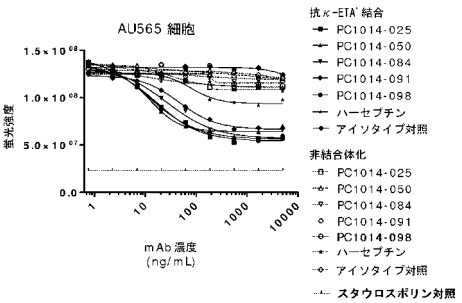
【図６】



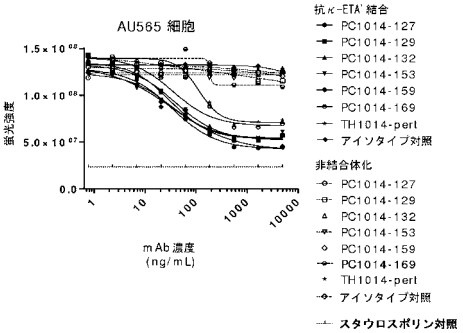
【図７】



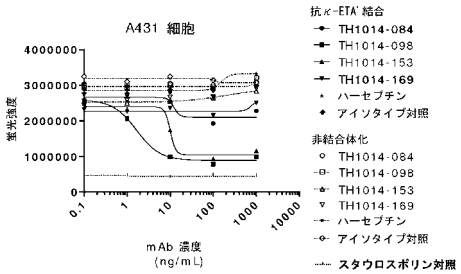
【図８Ａ】



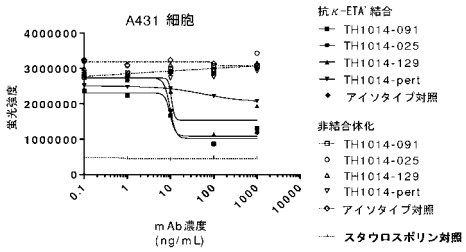
【図８Ｂ】



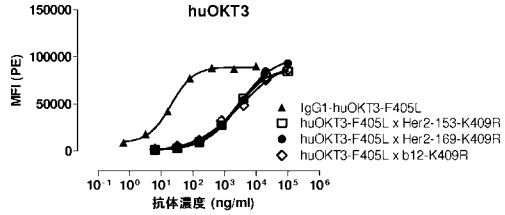
【図８Ｃ】



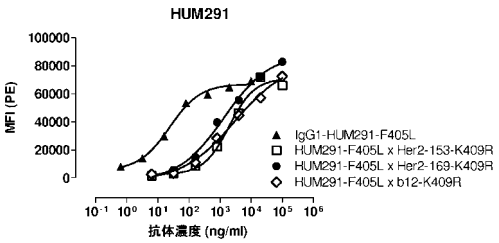
【図８Ｄ】



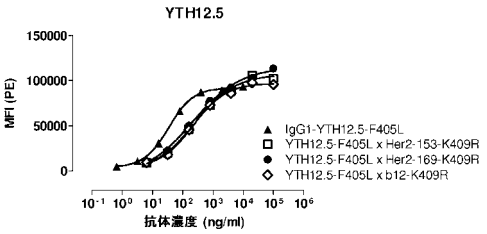
【図９Ａ】



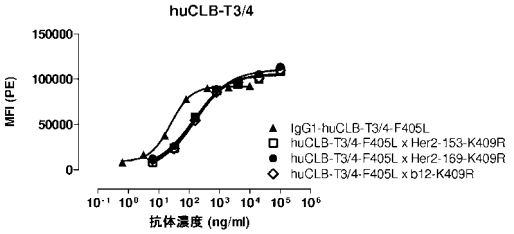
【図９Ｂ】



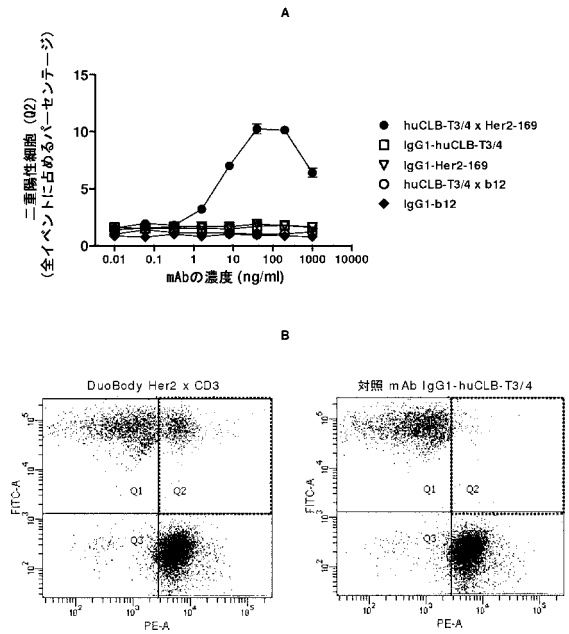
【図９Ｃ】



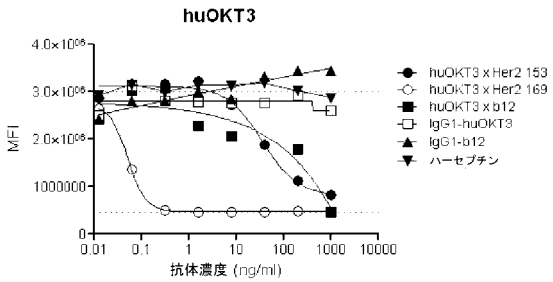
【図９Ｄ】



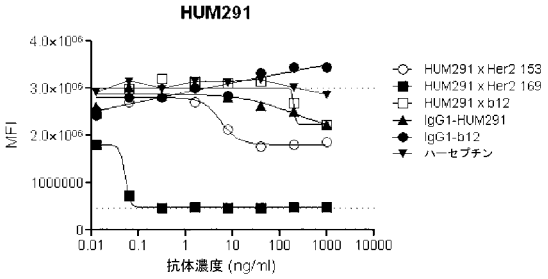
【図１０】



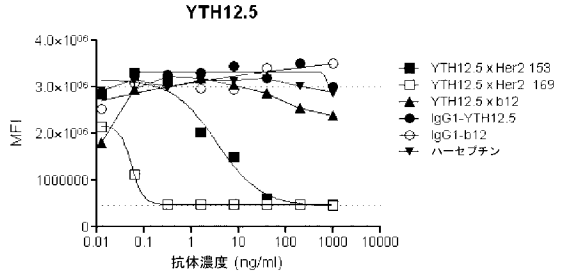
【図１１Ａ】



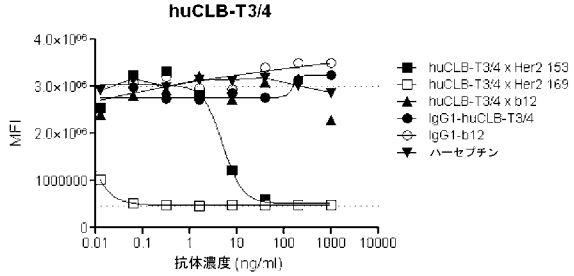
【図１１Ｂ】



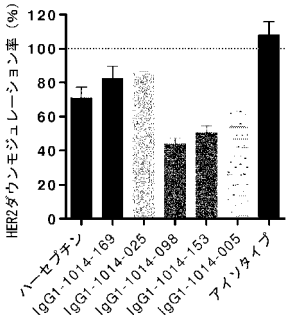
【図１１Ｃ】



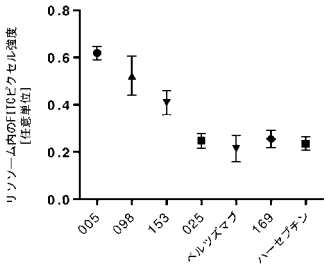
【図１１Ｄ】



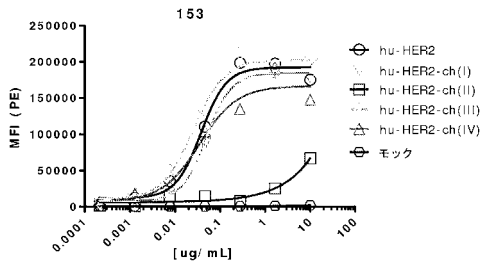
【図１２】



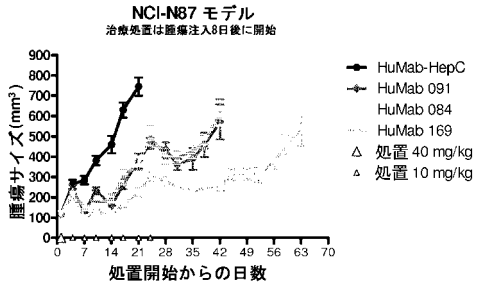
【図１３】



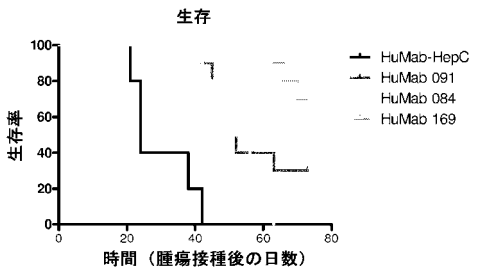
【図１４】



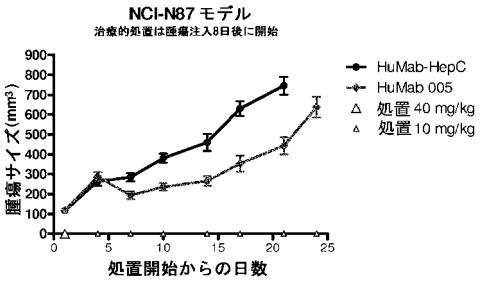
【図１５Ａ】



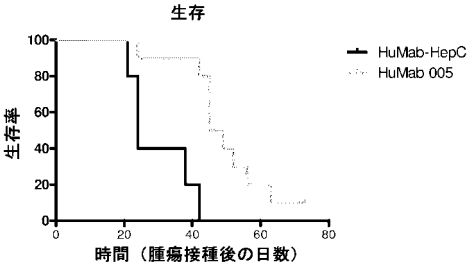
【図１５Ｂ】



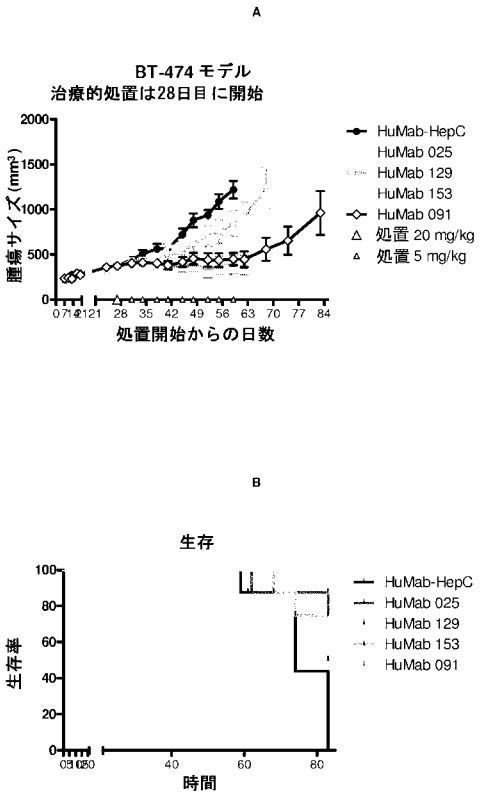
【図１５Ｃ】



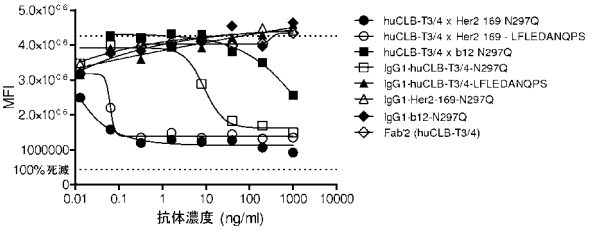
【図１５Ｄ】



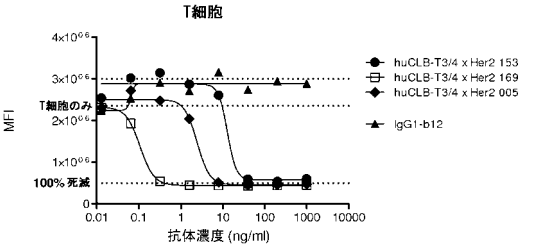
【図１６】



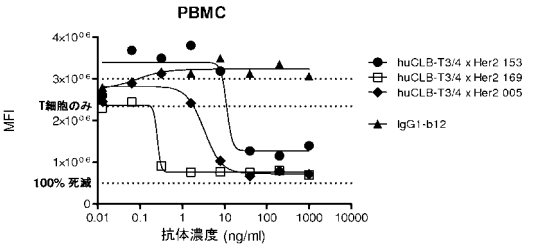
【図１７】



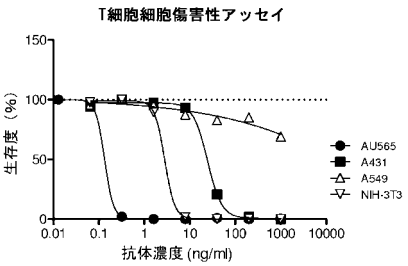
【図１８Ａ】



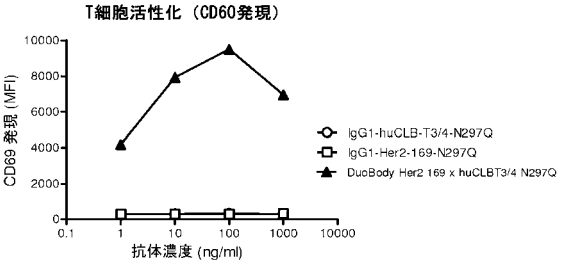
【図１８Ｂ】



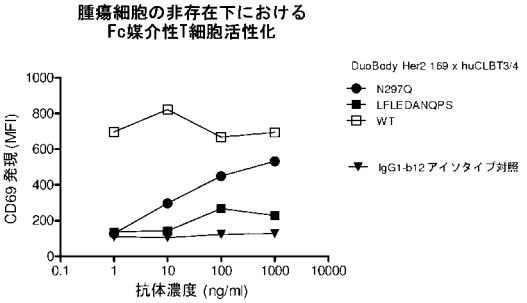
【図１９】



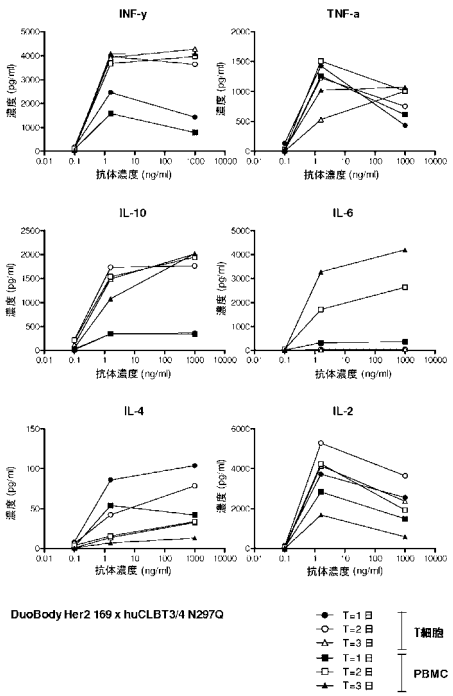
【図２０】



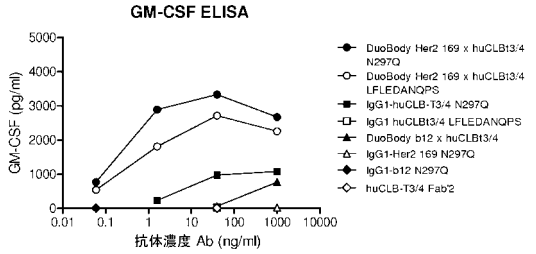
【図２１】



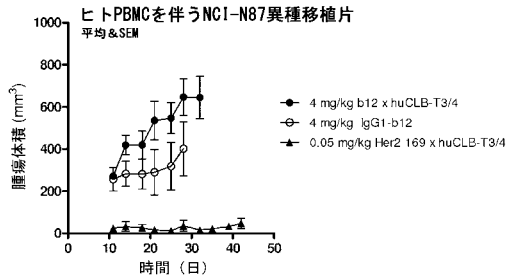
【図２２】



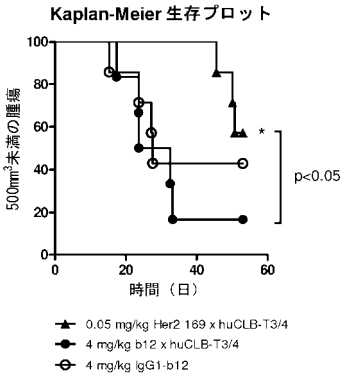
【図２３】



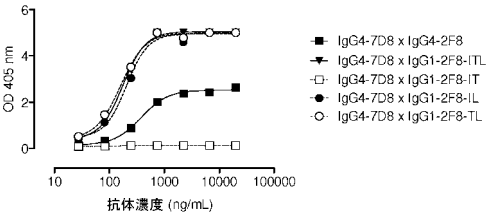
【図２４Ａ】



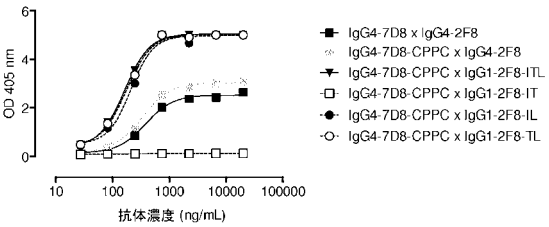
【図２４Ｂ】



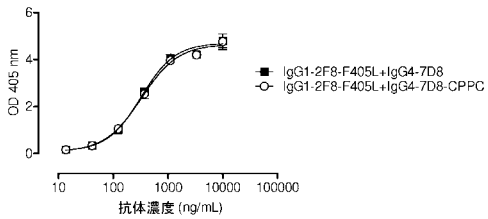
【図２５Ａ】



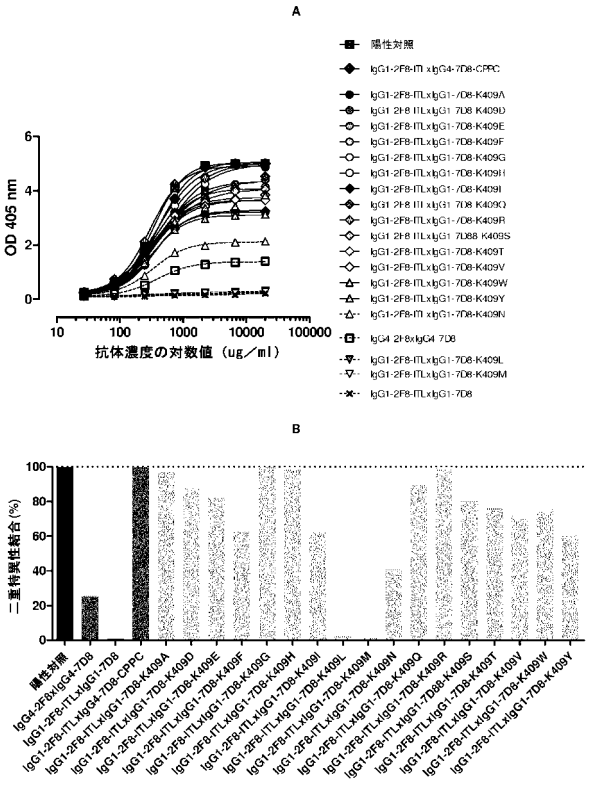
【図２５Ｂ】



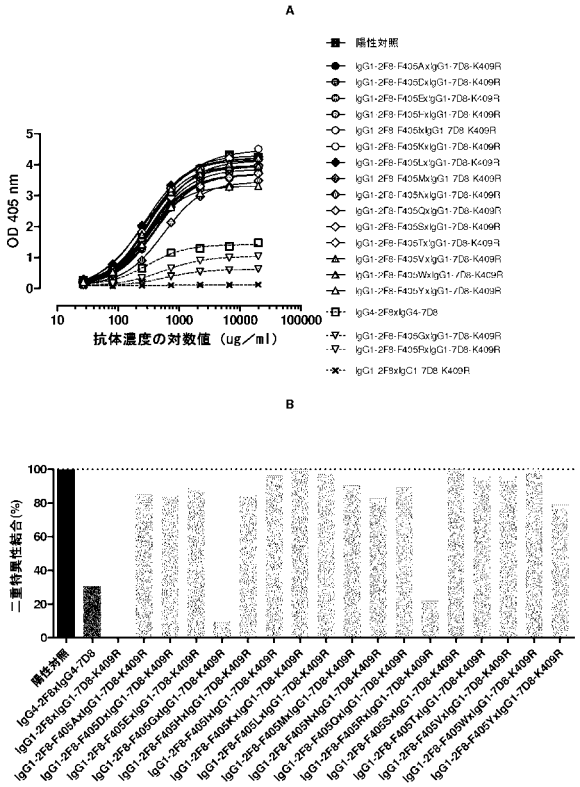
【図２５Ｃ】



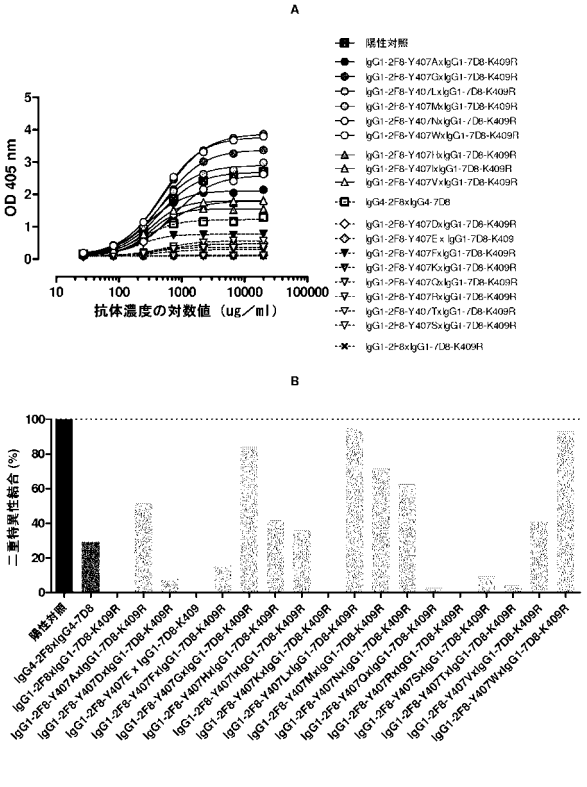
【図２６】



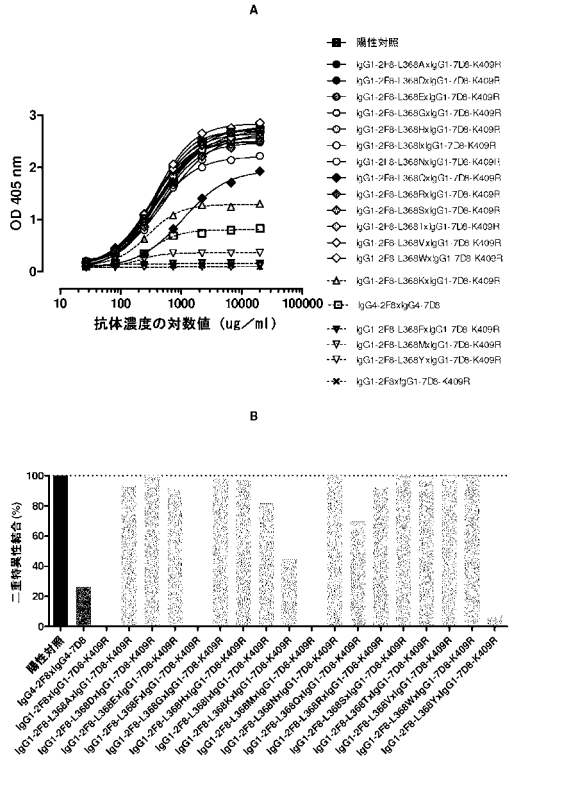
【図２７】



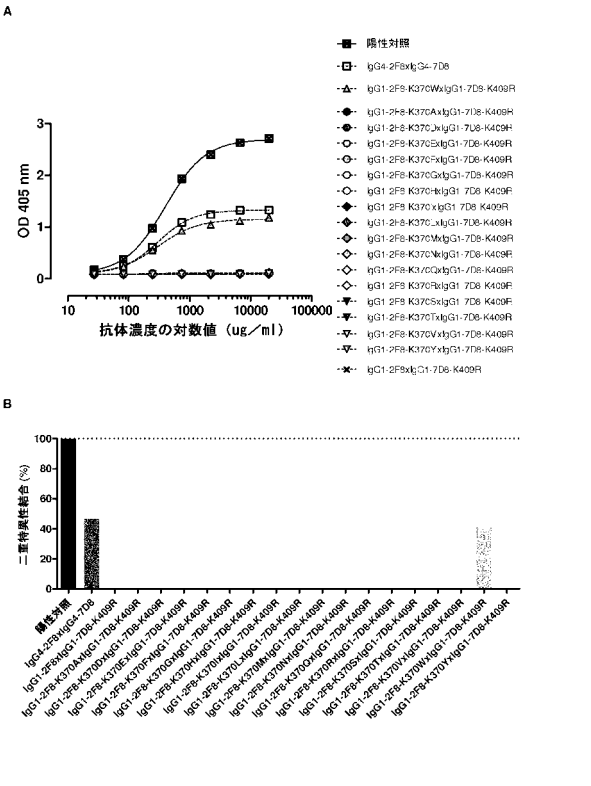
【図２８】



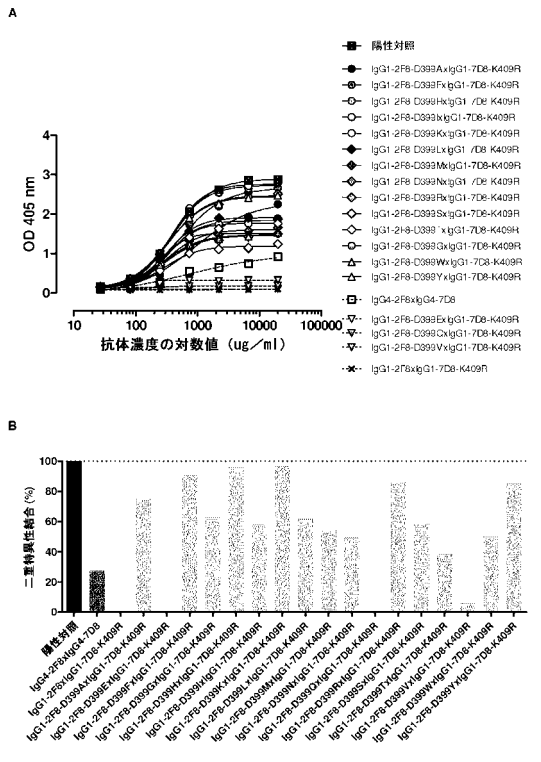
【図２９】



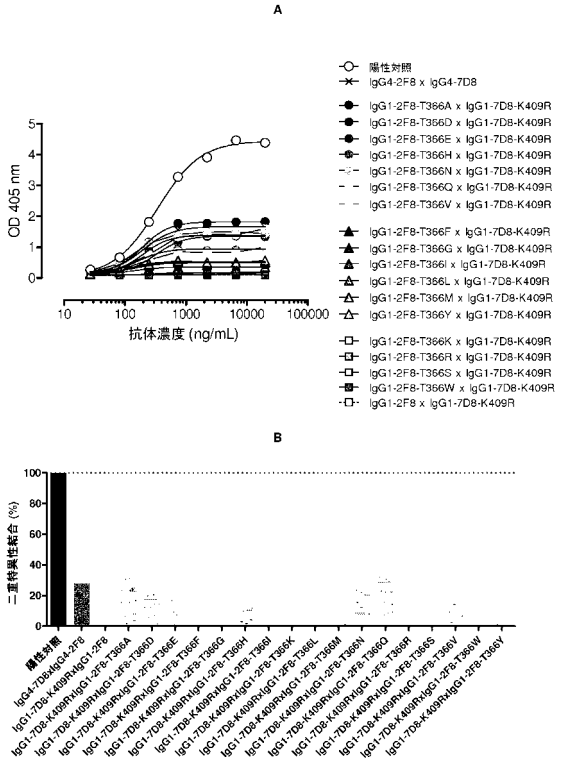
【図３０】



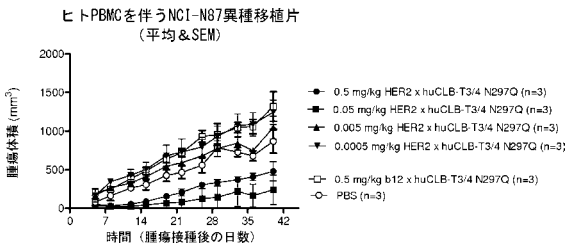
【図３１】



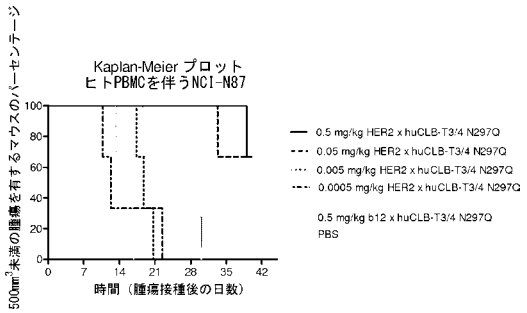
【図３２】



【図３３Ａ】



【図３３Ｂ】



【配列表】
2014514314000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成26年1月28日(2014.1.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００１４
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００１４】
[本発明1001]
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2（HER2）上のエピトープと結合し、かつ
（a）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域を含む抗体（153）、ならびに
（b）SEQ ID NO：1の配列を含む重鎖可変（VH）領域およびSEQ ID NO：5の配列を含む軽鎖可変（VL）領域を含む抗体（169）、ならびに
（c）SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域を含む抗体（005）、ならびに
（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む抗体（025）
からなる群より選択される参照抗体の、HER2に対する結合、任意で可溶性HER2に対する結合をブロックする、二重特異性抗体。
[本発明1002]
第1の抗原結合領域が（a）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、本発明1001の二重特異性抗体。
[本発明1003]
第1の抗原結合領域が（b）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、本発明1001の二重特異性抗体。
[本発明1004]
第1の抗原結合領域が（c）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、本発明1001の二重特異性抗体。
[本発明1005]
第1の抗原結合領域が（d）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、本発明1001の二重特異性抗体。
[本発明1006]
第1の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：2、3および4（169）；
（b）それぞれSEQ ID NO：9、10および11（050）；
（c）それぞれSEQ ID NO：16、17および18（084）；
（d）それぞれSEQ ID NO：23、24および25（025）；
（e）それぞれSEQ ID NO：30、163および31（091）；
（f）それぞれSEQ ID NO：36、37および38（129）：
（g）それぞれSEQ ID NO：43、44および45（127）；
（h）それぞれSEQ ID NO：50、51および52（159）；
（i）それぞれSEQ ID NO：57、58および59（098）；
（j）それぞれSEQ ID NO：64、65および66（153）；
（k）それぞれSEQ ID NO：71、72および73（132）；
（l）それぞれSEQ ID NO：166、167および168（005）；

（ｍ）それぞれSEQ ID NO：173、174および175（006）；
（ｎ）それぞれSEQ ID NO：180、181および182（059）；
（ｏ）それぞれSEQ ID NO：187、188および189（060）；
（ｐ）それぞれSEQ ID NO：194、195および196（106）；ならびに
（ｑ）それぞれSEQ ID NO：201、202および203（111）、
からなる群より選択されるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1007]
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2上のエピトープと結合し、第1の抗原結合領域が、
（ａ）それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；
（ｂ）それぞれSEQ ID NO：9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：13、AASおよびSEQ ID NO：14であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（050）；
（ｃ）それぞれSEQ ID NO：16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：20、VASおよびSEQ ID NO：21であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（084）；
（ｄ）それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）；
（ｅ）それぞれSEQ ID NO：30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：33、AASおよびSEQ ID NO：34であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（091）；
（ｆ）それぞれSEQ ID NO：36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：40、DASおよびSEQ ID NO：41であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（129）；
（ｇ）それぞれSEQ ID NO：43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：47、AASおよびSEQ ID NO：48であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（127）；
（ｈ）それぞれSEQ ID NO：50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：54、AASおよびSEQ ID NO：55であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（159）；
（ｉ）それぞれSEQ ID NO：57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：60、AASおよびSEQ ID NO：61であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（098）；
（ｊ）それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（153）；
（ｋ）それぞれSEQ ID NO：71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：75、DASおよびSEQ ID NO：76であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（132）；
（ｌ）それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）；
（ｍ）それぞれSEQ ID NO：173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：177、DASおよびSEQ ID NO：178であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（006）；

（n）それぞれSEQ ID NO：180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：184、GASおよびSEQ ID NO：185であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（059）；
（o）それぞれSEQ ID NO：187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：191、GASおよびSEQ ID NO：192であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（060）；
（p）それぞれSEQ ID NO：194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：198、GASおよびSEQ ID NO：199であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（106）；
（q）それぞれSEQ ID NO：201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：205、GASおよびSEQ ID NO：206であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（111）、
からなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、二重特異性抗体。
[本発明1008]
第1の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；
（b）それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）；
（c）それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（153）、ならびに
（d）それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）、
からなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、本発明1007の二重特異性抗体。
[本発明1009]
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（169）、ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）を含む、二重特異性抗体。
[本発明1010]
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（153）、二重特異性抗体。
[本発明1011]
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（005）、二重特異性抗体。
[本発明1012]
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を

含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（025）、二重特異性抗体。

[本発明1013]

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：5を含むVL領域を含む（169）、二重特異性抗体。

[本発明1014]

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：67を含むVL領域を含む（153）、二重特異性抗体。

[本発明1015]

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域を含む（005）、二重特異性抗体。

[本発明1016]

第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がCD3と結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：22を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む（025）、二重特異性抗体。

[本発明1017]

第2の抗原結合領域が、

（a）SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む抗体（huCLB-T3/4）；

（b）SEQ ID NO：234の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：235の配列を含むVL領域を含む抗体（YTH12.5）；

（c）SEQ ID NO：238の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：239の配列を含むVL領域を含む抗体（huOKT3-C114S-gLC）；ならびに

（d）SEQ ID NO：236の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：237の配列を含むVL領域を含む抗体（HUM291）、

からなる群より選択される参照抗体のCD3に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1018]

第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む参照抗体（huCLB-T3/4）のCD3に対する結合をブロックする、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1019]

第2の抗原結合領域が、

（a）それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）；

（b）SEQ ID NO：234のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（YTH12.5）；

（c）SEQ ID NO：238のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huOKT3-C114S-gLC）；ならびに

（d）SEQ ID NO：236のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（HUM291）

からなる群より選択されるVH領域を含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1020]

第2の抗原結合領域が、それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）を含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体

。
[本発明1021]
SEQ ID NO：244のVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（huCLB-T3/4）およびSEQ ID NO：4のVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（169）を含む、二重特異性抗体。
[本発明1022]
第2の抗原結合領域がSEQ ID NO：246のVL CDR3配列（huCLB-T3/4）を含み、第2の抗原結合領域がSEQ ID NO：7のVL CDR3配列（169）を含む、本発明1021の二重特異性抗体。
[本発明1023]
第2の抗原結合領域が、それぞれSEQ ID NO：242、243および244のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列；ならびに任意で、それぞれ245、DTSおよび246のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む（huCLB-T3/4）、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1024]
第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む（huCLB-T3/4）、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体
。
[本発明1025]
第1のFc領域および第2のFc領域をさらに含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体
。
[本発明1026]
第1の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第2の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1027]
第2の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第1の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、本発明1001～1024のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1028]
第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から独立に選択される、本発明1023および1024のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1029]
第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1およびIgG4から独立に選択される、本発明1028の二重特異性抗体。
[本発明1030]
第1および第2のFc領域の一方がIgG1アイソタイプのものであり、一方がIgG4アイソタイプのものである、本発明1029の二重特異性抗体。
[本発明1031]
第1および第2のFc領域のアイソタイプがIgG1である、本発明1029の二重特異性抗体。
[本発明1032]
エフェクター機能が欠損している、前記本発明のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1033]
第1のFc領域が、409、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ該第1のFc領域および該第2のFc領域が同じ位置では置換されていない、本発明1026～1032のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1034]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1035]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、

位置405にPhe以外のアミノ酸を有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1036]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1037]
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1038]
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1039]
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1040]
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1041]
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1042]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1043]
第1のFc領域が位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1044]
第1のFc領域が、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1045]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1046]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1047]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1048]
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外の

アミノ酸を、位置409にLysを有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1049]
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1026～1332のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1050]
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1051]
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1052]
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1053]
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1054]
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、
（i）位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAsp、Cys、Pro、GluおよびGln以外のアミノ酸、または
（iv）位置366にLys、Arg、Ser、ThrおよびTrp以外のアミノ酸
を有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1055]
第1のFc領域が、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のホモ二量体タンパク質が、
（i）位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetもしくはTyr
を有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1056]
第1のFc領域が位置409にArgを有し、第2のFc領域が、
（i）位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln
を有する、本発明1026～1033のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1057]
第1および第2のCH3領域が、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：256の配列（IgG1m(a)）を含む、本発明1026～1056のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1058]

第1のFc領域も第2のFc領域もヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない、本発明1026～1057のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1059]

第1および第2のFc領域の両方がヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む、本発明1026～1057のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1060]

第1および第2のFc領域がヒト抗体のFc領域である、本発明1026～1058のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1061]

第1および第2のFc領域が、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：247、248、249、250、251、252、253、254および255からなる群より独立して選択される配列を含む、本発明1026～1060のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1062]

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

[本発明1063]

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

[本発明1064]

第1および第2の抗原結合領域が第1および第2の軽鎖を含む、本発明1001～1063のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1065]

第1および第2の軽鎖が異なる、本発明1064の二重特異性抗体。

[本発明1066]

第1および／または第2のFc領域が、Asn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含む、本発明1026～1065のいずれかの二重特異性抗体。

[本発明1067]

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

[本発明1068]

IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFNα、IFNβ、IFNγ、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチムおよびTNFαからなる群より選択されるサイトカインと結合体化されている、本発明1067の二重特異性抗体。

[本発明1069]

二重特異性抗体を作製するためのインビトロ方法であって、

（a）HER2上のエピトープと結合しかつ第1のFc領域を含む第1の抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第1のCH3領域を含む段階、

（b）ヒトCD3上のエピトープと結合しかつ第2のFc領域を含む第2の抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第2のCH3領域を含む段階、

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

（d）該二重特異性抗体を入手する段階

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

[本発明1070]

第1の抗体が、

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

、
（b）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）、
（c）SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域（005）、ならびに
（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）
を含む抗体の可溶性ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）に対する結合をブロックする、本発明1069の方法。
[本発明1071]
第1および第2のFc領域が、本発明1033～1056のいずれかのアミノ酸置換を含む、本発明1069および1070のいずれかの方法。
[本発明1072]
本発明1069～1071のいずれかの方法によって入手しうる二重特異性抗体。
[本発明1073]
本発明1001～1068のいずれかに定義された二重特異性抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞。
[本発明1074]
本発明1001～1068のいずれかに定義された二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。
[本発明1075]
医薬として用いるための、本発明1001～1068のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1076]
癌の治療に用いるための、本発明1001～1068のいずれかの二重特異性抗体。
[本発明1077]
癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群より選択される、本発明1076の使用のための二重特異性抗体。
[本発明1078]
化学療法剤などの1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて癌の治療に用いるためのものである、本発明1076～1077のいずれかの使用のための二重特異性抗体。
[本発明1079]
本発明1077および／または1078のさらなる特徴を任意で含む、癌の治療用の医薬を製造するための、本発明1001～1068のいずれかの二重特異性抗体の使用。
[本発明1080]
HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害する方法であって、それを必要とする個体に本発明1001～1068のいずれかの二重特異性抗体を投与する段階を含む、方法。
[本発明1081]
（a）HER2を共発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、および
（b）本発明1001～1072のいずれかの二重特異性抗体を該対象に投与する段階
を含む、癌を治療する方法。
[本発明1082]
癌が、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌／子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、精巣癌、滑膜肉腫などの軟部組織腫瘍、および膀胱癌からなる群より選択される、本発明1081の方法。
[本発明1083]
（a）本発明1073の宿主細胞を培養する段階、および
（b）二重特異性抗体を培地から精製する段階
を含む、本発明1001～1068のいずれかの二重特異性抗体を作製する方法。

本発明のこれらの局面および他の局面について、以下にさらに詳細に説明する。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０２８７
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０２８７】
1つのさらなる態様において、第1および第2のFc領域を含む前記第1および第2のFabアーム（または重鎖定常ドメイン）は、明記した変異を除き、以下から独立に選択される配列を含む：
(IgG1m(a)):
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:258)
(IgG1m(f)):
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:259), および
(IgG1m(ax)):
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEGLHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:260)

。
【手続補正３】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３５５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３５５】
さらなる態様において、前記第1および第2のCH3領域は、明記した変異を除いて、IgG1m（a）（SEQ ID NO：258）、IgG1m（f）（SEQ ID NO：259）またはIgG1m（ax）（SEQ ID NO：260）の配列を含む。
【手続補正４】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がヒト上皮成長因子受容体2（HER2）上のエピトープと結合し、かつ
（a）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域を含む抗体（153）、ならびに
（b）SEQ ID NO：1の配列を含む重鎖可変（VH）領域およびSEQ ID NO：5の配列を含む軽鎖可変（VL）領域を含む抗体（169）、ならびに
（c）SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域を含む抗体（005）、ならびに
（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む抗体（025）
からなる群より選択される参照抗体の、HER2に対する結合、任意で可溶性HER2に対する結

合をブロックする、二重特異性抗体。
【請求項２】
第1の抗原結合領域が（a）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項３】
第1の抗原結合領域が（b）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項４】
第1の抗原結合領域が（c）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項５】
第1の抗原結合領域が（d）の抗体の可溶性HER2に対する結合をブロックする、請求項1記載の二重特異性抗体。
【請求項６】
第1の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：2、3および4（169）；
（b）それぞれSEQ ID NO：9、10および11（050）；
（c）それぞれSEQ ID NO：16、17および18（084）；
（d）それぞれSEQ ID NO：23、24および25（025）；
（e）それぞれSEQ ID NO：30、163および31（091）；
（f）それぞれSEQ ID NO：36、37および38（129）：
（g）それぞれSEQ ID NO：43、44および45（127）；
（h）それぞれSEQ ID NO：50、51および52（159）；
（i）それぞれSEQ ID NO：57、58および59（098）；
（j）それぞれSEQ ID NO：64、65および66（153）；
（k）それぞれSEQ ID NO：71、72および73（132）；
（l）それぞれSEQ ID NO：166、167および168（005）；
（m）それぞれSEQ ID NO：173、174および175（006）；
（n）それぞれSEQ ID NO：180、181および182（059）；
（o）それぞれSEQ ID NO：187、188および189（060）；
（p）それぞれSEQ ID NO：194、195および196（106）；ならびに
（q）それぞれSEQ ID NO：201、202および203（111）、
からなる群より選択されるVH CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項７】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2上のエピトープと結合し、第1の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；
（b）それぞれSEQ ID NO：9、10および11であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：13、AASおよびSEQ ID NO：14であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（050）；
（c）それぞれSEQ ID NO：16、17および18であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：20、VASおよびSEQ ID NO：21であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（084）；
（d）それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）；

（e）それぞれSEQ ID NO：30、163および31であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：33、AASおよびSEQ ID NO：34であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（091）；
（f）それぞれSEQ ID NO：36、37および38であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：40、DASおよびSEQ ID NO：41であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（129）；
（g）それぞれSEQ ID NO：43、44および45であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：47、AASおよびSEQ ID NO：48であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（127）；
（h）それぞれSEQ ID NO：50、51および52であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：54、AASおよびSEQ ID NO：55であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（159）；
（i）それぞれSEQ ID NO：57、58および59であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：60、AASおよびSEQ ID NO：61であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（098）；
（j）それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（153）；
（k）それぞれSEQ ID NO：71、72および73であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：75、DASおよびSEQ ID NO：76であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（132）；
（l）それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）；
（m）それぞれSEQ ID NO：173、174および175であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：177、DASおよびSEQ ID NO：178であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（006）；
（n）それぞれSEQ ID NO：180、181および182であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：184、GASおよびSEQ ID NO：185であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（059）；
（o）それぞれSEQ ID NO：187、188および189であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：191、GASおよびSEQ ID NO：192であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（060）；
（p）それぞれSEQ ID NO：194、195および196であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：198、GASおよびSEQ ID NO：199であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（106）；
（q）それぞれSEQ ID NO：201、202および203であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：205、GASおよびSEQ ID NO：206であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（111）、
からなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、二重特異性抗体。
【請求項８】
第1の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）；
（b）それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（025）；
（c）それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびC

DR3配列を含むVL領域（153）、ならびに
（ｄ）それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびにそれぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（005）、
からなる群より選択されるVH領域およびVL領域を含む、請求項7記載の二重特異性抗体。
【請求項９】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：2、3および4であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（169）、ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：6、DASおよびSEQ ID NO：7であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域（169）を含む、二重特異性抗体。
【請求項１０】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：64、65および66であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：68、DASおよびSEQ ID NO：69であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（153）、二重特異性抗体。
【請求項１１】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：166、167および168であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：170、GASおよびSEQ ID NO：171であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（005）、二重特異性抗体。
【請求項１２】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、それぞれSEQ ID NO：23、24および25であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域；ならびに任意で、それぞれSEQ ID NO：27、AASおよびSEQ ID NO：28であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVL領域を含む（025）、二重特異性抗体。
【請求項１３】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：5を含むVL領域を含む（169）、二重特異性抗体。
【請求項１４】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：67を含むVL領域を含む（153）、二重特異性抗体。
【請求項１５】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がヒトCD3上のエピトープと結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域を含む（005）、二重特異性抗体。
【請求項１６】
第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第2の抗原結合領域がCD3と結合し、かつ第1の抗原結合領域がHER2と結合し、かつ該抗体が、SEQ ID NO：22を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域を含む（025）、二重特異性抗体。
【請求項１７】

第2の抗原結合領域が、
（a）SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む抗体（huCLB-T3/4）；
（b）SEQ ID NO：234の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：235の配列を含むVL領域を含む抗体（YTH12.5）；
（c）SEQ ID NO：238の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：239の配列を含むVL領域を含む抗体（huOKT3-C114S-gLC）；ならびに
（d）SEQ ID NO：236の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：237の配列を含むVL領域を含む抗体（HUM291）、
からなる群より選択される参照抗体のCD3に対する結合をブロックする、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項１８】
第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む参照抗体（huCLB-T3/4）のCD3に対する結合をブロックする、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項１９】
第2の抗原結合領域が、
（a）それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）；
（b）SEQ ID NO：234のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（YTH12.5）；
（c）SEQ ID NO：238のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huOKT3-C114S-gLC）；ならびに
（d）SEQ ID NO：236のCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（HUM291）
からなる群より選択されるVH領域を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２０】
第2の抗原結合領域が、それぞれSEQ ID NO：242、243および244であるCDR1、CDR2およびCDR3配列を含むVH領域（huCLB-T3/4）を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２１】
SEQ ID NO：244のVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（huCLB-T3/4）およびSEQ ID NO：4のVH CDR3配列を含む第2の抗原結合領域（169）を含む、二重特異性抗体。
【請求項２２】
第2の抗原結合領域がSEQ ID NO：246のVL CDR3配列（huCLB-T3/4）を含み、第2の抗原結合領域がSEQ ID NO：7のVL CDR3配列（169）を含む、請求項21記載の二重特異性抗体。
【請求項２３】
第2の抗原結合領域が、それぞれSEQ ID NO：242、243および244のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列；ならびに任意で、それぞれ245、DTSおよび246のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む（huCLB-T3/4）、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２４】
第2の抗原結合領域が、SEQ ID NO：240の配列を含むVH領域、および任意でSEQ ID NO：241の配列を含むVL領域を含む（huCLB-T3/4）、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２５】
第1のFc領域および第2のFc領域をさらに含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２６】
第1の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第2の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。

【請求項２７】
第2の抗原結合領域および第1のFc領域を含む第1のFabアーム、ならびに第1の抗原結合領域および第2のFc領域を含む第2のFabアームを含む、請求項1～24のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２８】
第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から独立に選択される、請求項23および24のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項２９】
第1および第2のFc領域のアイソタイプが、IgG1およびIgG4から独立に選択される、請求項28記載の二重特異性抗体。
【請求項３０】
第1および第2のFc領域の一方がIgG1アイソタイプのものであり、一方がIgG4アイソタイプのものである、請求項29記載の二重特異性抗体。
【請求項３１】
第1および第2のFc領域のアイソタイプがIgG1である、請求項29記載の二重特異性抗体。
【請求項３２】
エフェクター機能が欠損している、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３３】
第1のFc領域が、409、366、368、370、399、405および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399、407および409からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有し、かつ該第1のFc領域および該第2のFc領域が同じ位置では置換されていない、請求項26～32のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３４】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、405、366、368、370、399および407からなる群より選択される位置にアミノ酸置換を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３５】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３６】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３７】
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３８】
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項３９】
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４０】
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にPhe、ArgおよびGly以外のアミノ酸を、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記

載の二重特異性抗体。
【請求項４１】
第1のFc領域が、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置405にLeuを、位置409にLysを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４２】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４３】
第1のFc領域が位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４４】
第1のFc領域が、位置370にLysを、位置405にPheを、位置409にArgを含み、第2のFc領域が、位置409にLysを、位置370にThrを、位置405にLeuを含む、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４５】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４６】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４７】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４８】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項４９】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～332のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５０】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、位置407にGly、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５１】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にTyr、Asp、Glu、Phe、Lys、Gln、Arg、SerおよびThr以外のアミノ酸を、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５２】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にAla、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、ValまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５３】
第1のFc領域が、位置407にTyrを、位置409にArgを有し、第2のFc領域が、位置407にGly

、Leu、Met、AsnまたはTrpを、位置409にLysを有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５４】
第1のFc領域が、位置409にLys、LeuおよびMet以外のアミノ酸を有し、第2のFc領域が、
（i）位置368にPhe、LeuおよびMet以外のアミノ酸、
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAsp、Cys、Pro、GluおよびGln以外のアミノ酸、または
（iv）位置366にLys、Arg、Ser、ThrおよびTrp以外のアミノ酸
を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５５】
第1のFc領域が、位置409にArg、Ala、HisまたはGlyを有し、第2のホモ二量体タンパク質が、
（i）位置368にLys、Gln、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、Trp、Phe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln、Phe、Gly、Ile、Leu、MetもしくはTyr
を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５６】
第1のFc領域が位置409にArgを有し、第2のFc領域が、
（i）位置368にAsp、Glu、Gly、Asn、Arg、Ser、Thr、ValもしくはTrp、または
（ii）位置370にTrp、または
（iii）位置399にPhe、His、Lys、ArgもしくはTyr、または
（iv）位置366にAla、Asp、Glu、His、Asn、Val、Gln
を有する、請求項26～33のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５７】
第1および第2のCH3領域が、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：258の配列（IgG1m(a)）を含む、請求項26～56のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５８】
第1のFc領域も第2のFc領域もヒンジ領域内にCys-Pro-Ser-Cys配列を含まない、請求項26～57のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項５９】
第1および第2のFc領域の両方がヒンジ領域内にCys-Pro-Pro-Cys配列を含む、請求項26～57のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６０】
第1および第2のFc領域がヒト抗体のFc領域である、請求項26～58のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６１】
第1および第2のFc領域が、明記した変異を除いて、SEQ ID NO：247、248、249、250、251、252、253、254および255からなる群より独立して選択される配列を含む、請求項26～60のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６２】
第1および第2の抗原結合領域が、ヒト抗体のVH配列、および任意でヒト抗体のVL配列を含む、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６３】
第1および第2の抗原結合領域が重鎖抗体由来である、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６４】

第1および第2の抗原結合領域が第1および第2の軽鎖を含む、請求項1～63のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６５】
第1および第2の軽鎖が異なる、請求項64記載の二重特異性抗体。
【請求項６６】
第1および／または第2のFc領域が、Asn結合型グリコシル化のアクセプター部位を除去する変異を含む、請求項26～65のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６７】
薬物、放射性同位体、サイトカインもしくは細胞傷害性部分などの1つもしくは複数の他の部分と結合体化されているか、またはそれに対する1つもしくは複数のアクセプター基を含有する、前記請求項のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項６８】
IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFNα、IFNβ、IFNγ、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチムおよびTNFαからなる群より選択されるサイトカインと結合体化されている、請求項67記載の二重特異性抗体。
【請求項６９】
二重特異性抗体を作製するためのインビトロ方法であって、
（a）HER2上のエピトープと結合しかつ第1のFc領域を含む第1の抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第1のCH3領域を含む段階、
（b）ヒトCD3上のエピトープと結合しかつ第2のFc領域を含む第2の抗体を用意する段階であって、該Fc領域が第2のCH3領域を含む段階、
（c）該第1の抗体を該第2の抗体とともに還元条件下でインキュベートする段階、および
（d）該二重特異性抗体を入手する段階
を含み、該第1および第2のCH3領域の配列が異なり、かつ該第1および第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が、該第1および第2のCH3領域の各ホモ二量体相互作用よりも強い、方法。
【請求項７０】
第1の抗体が、
（a）SEQ ID NO：1の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：5の配列を含むVL領域（169）、
（b）SEQ ID NO：63の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：67の配列を含むVL領域（153）、
（c）SEQ ID NO：165の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：169の配列を含むVL領域（005）、ならびに
（d）SEQ ID NO：22の配列を含むVH領域およびSEQ ID NO：26の配列を含むVL領域（025）
を含む抗体の可溶性ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）に対する結合をブロックする、請求項69記載の方法。
【請求項７１】
第1および第2のFc領域が、請求項33～56のいずれか一項記載のアミノ酸置換を含む、請求項69および70のいずれか一項記載の方法。
【請求項７２】
請求項69～71のいずれか一項記載の方法によって入手しうる二重特異性抗体。
【請求項７３】
請求項1～68のいずれか一項に定義された二重特異性抗体を産生する、組換え真核宿主細胞または原核宿主細胞。
【請求項７４】
請求項1～68のいずれか一項に定義された二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体

とを含む、薬学的組成物。
【請求項７５】
医薬として用いるための、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項７６】
癌の治療に用いるための、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体。
【請求項７７】
癌が、乳癌、前立腺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸癌、膵癌、精巣癌、悪性黒色腫および軟部組織癌からなる群より選択される、請求項76記載の使用のための二重特異性抗体。
【請求項７８】
化学療法剤などの1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて癌の治療に用いるためのものである、請求項76～77のいずれか一項記載の使用のための二重特異性抗体。
【請求項７９】
請求項77および／または78のさらなる特徴を任意で含む、癌の治療用の医薬を製造するための、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体の使用。
【請求項８０】
HER2を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害する方法であって、それを必要とする個体に請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体を投与する段階を含む、方法。
【請求項８１】
（a）HER2を共発現する腫瘍細胞を含む、癌に罹患した対象を選択する段階、および
（b）請求項1～72のいずれか一項記載の二重特異性抗体を該対象に投与する段階
を含む、癌を治療する方法。
【請求項８２】
癌が、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌／子宮頸癌、肺癌、悪性黒色腫、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、精巣癌、滑膜肉腫などの軟部組織腫瘍、および膀胱癌からなる群より選択される、請求項81記載の方法。
【請求項８３】
（a）請求項73記載の宿主細胞を培養する段階、および
（b）二重特異性抗体を培地から精製する段階
を含む、請求項1～68のいずれか一項記載の二重特異性抗体を作製する方法。
【手続補正５】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】変更
【補正の内容】
【配列表】
2014514314000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/057307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61P35/00 C07K16/32 C07K16/10 C07K16/28
C07K16/46 A61K47/48
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/154651 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; PATON VIRGINIA [US]; BLACK) 23 December 2009 (2009-12-23) e.g. claim 1-5; paragraph 217; page 42, paragraph 2-3; page 43, penultimate paragraph; the whole document ----- -/--	1-8,10, 14, 17-20, 73-83

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 August 2012	12/11/2012

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gruber, Andreas

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/057307

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KIEWE P ET AL: "PHASE I TRIAL OF THE TRIFUNCTIONAL ANTI-HER2 X ANTI-CD3 ANTIBODY ERTUMAXOMAB IN METASTATIC BREAST CANCER", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 12, no. 10, 15 May 2006 (2006-05-15), pages 3085-3091, XP008067039, ISSN: 0732-183X e.g. abstract; the whole document	1-8,10, 14, 17-20, 73-83
A	WO 2008/031531 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; FRIESS THOMAS [DE]; HASMANN MAX [DE]; SCHEUER) 20 March 2008 (2008-03-20) e.g. paragraph bridging page 27 and 28; the whole document	1-8,10, 14, 17-20, 73-83
A	ZHU Z ET AL: "ENGINEERING HIGH AFFINITY HUMANIZED ANTI-P185HER2/ANTI-CD3 BISPECIFIC F(AB')2 FOR EFFICIENT LYSIS OF P185HER2 OVEREXPRESSING TUMOR CELLS", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER,, vol. 62, no. 3, 28 July 1995 (1995-07-28), pages 319-324, XP001022188, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/IJC.2910620315 the whole document	1-8,10, 14, 17-20, 73-83
A	WO 2009/106096 A1 (FRESENIUS BIOTECH GMBH [DE]; LINDEMANN CARSTEN [DE]; KLUGE MICHAEL [DE) 3 September 2009 (2009-09-03) e.g. example 2,3; the whole document	1-8,10, 14, 17-20, 73-83
A	"Oral Presentations", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US, vol. 33, no. 7, 1 July 2005 (2005-07-01), pages 39-72, XP027605363, ISSN: 0301-472X [retrieved on 2005-07-01] abstract 62 on page 53; the whole document	1-8,10, 14, 17-20, 73-83
X,P	WO 2011/147986 A1 (GENMAB AS [DK]; GOEIJ BART DE [NL]; HAIJ SIMONE DE [NL]; RIEDL THILO [) 1 December 2011 (2011-12-01) fig. 10-12;Claim 9; SEQ ID NO 63; SEQ ID NO 67;Claim 26; SEQ ID NO 164; SEQ ID NO 165; the whole document	1-8,10, 14, 17-20, 73-83

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/057307

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

10, 14(completely); 1-8, 17-20, 73-83(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2012/ 057307

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 10, 14(completely); 1-8, 17-20, 73-83(partially)

   bispecific antibody as defined in claim 1,7,10,14,73-76,79-81,83, all comprising antibody labelled 153, i.e. e.g. SEQ ID NO:63,67

   ---

2. claims: 9, 13, 21-68(completely); 1-8, 17-20, 73-83(partially)

   bispecific antibody as defined in claim 1,7,9,13,21-68,73-76,79-81,83, all comprising antibody labelled 169, i.e. e.g. SEQ ID NO:1,5

   ---

3. claims: 11, 15(completely); 1-8, 17-20, 73-83(partially)

   bispecific antibody as defined in claim 1,7,11,15,73-76,79-81,83, all comprising antibody labelled 005, i.e. e.g. SEQ ID NO:165,169

   ---

4. claims: 12, 16(completely); 1-8, 17-20, 73-83(partially)

   bispecific antibody as defined in claim 1,7,12,16,73-76,79-81,83, all comprising antibody labelled 025, i.e. e.g. SEQ ID NO:22,26

   ---

5. claims: 69-72(completely); 81, 82(partially)

   in vitro method for generating a bispecific antibody and method for using these antibodies

   ---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/057307

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009154651 A1	23-12-2009	AU 2008331354 A1	07-01-2010
		BR PI0812682 A2	22-06-2010
		CA 2671223 A1	16-12-2009
		US 2009317387 A1	24-12-2009
		WO 2009154651 A1	23-12-2009
WO 2008031531 A1	20-03-2008	AR 062840 A1	10-12-2008
		PE 06632008 A1	17-05-2008
		TW 200820987 A	16-05-2008
		US 2008102069 A1	01-05-2008
		WO 2008031531 A1	20-03-2008
WO 2009106096 A1	03-09-2009	WO 2009106096 A1	03-09-2009
		WO 2009106321 A1	03-09-2009
WO 2011147986 A1	01-12-2011	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***1/21***	***(2006.01)***	C12N	1/21		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/00	101	
C12P	***21/08***	***(2006.01)***	C12P	21/08		
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	A61K	39/395	D	
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	A61K	39/395	N	
C12N	*15/09*	*(2006.01)*	A61K	39/395	E	
			A61K	39/395	T	
			A61P	35/00		
			C12N	15/00	A	

(31)優先権主張番号 PCT/EP2011/058779
(32)優先日 平成23年5月27日(2011.5.27)
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)
(31)優先権主張番号 PA201100824
(32)優先日 平成23年10月27日(2011.10.27)
(33)優先権主張国 デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号 61/552,286
(32)優先日 平成23年10月27日(2011.10.27)
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
(74)代理人 100130845
弁理士 渡邉 伸一
(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 ネイセン ヨースト ジェイ.
オランダ王国 ユトレヒト イャレラーン ６０ ゲンマブ ビー. ブイ. 内
(72)発明者 メーステルス ヨイセ アイ.
オランダ王国 ユトレヒト イャレラーン ６０ ゲンマブ ビー. ブイ. 内
(72)発明者 デ ゴージ バート

オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　ラブレイン　アラン　フランク
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　パルレン　パウル
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内
(72)発明者　スフールマン　ジャニーヌ
オランダ王国　ユトレヒト　イャレラーン　６０　ゲンマブ　ビー．ブイ．内

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA53 DA02 FA10 GA11
4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC15 CC24 CE12 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90X AA92X AB01 AC14 BA02 CA25
CA44
4C085 AA13 AA14 BB31 BB36 BB41 BB42 CC22 CC23 DD21 EE01
GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 FA20 FA74 GA26