(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7308560号
(P7308560)

(45)発行日　令和5年7月14日(2023.7.14)

(24)登録日　令和5年7月6日(2023.7.6)

(51)国際特許分類		FI		
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z ZNA
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	T
A61K 47/65 (2017.01)		A61K	39/395	U
A61K 47/68 (2017.01)		A61K	47/65	
A61P 35/00 (2006.01)		A61K	47/68	

請求項の数　60　（全124頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-523492(P2021-523492)
(86)(22)出願日　令和1年10月31日(2019.10.31)
(65)公表番号　特表2022-512865(P2022-512865A)
(43)公表日　令和4年2月7日(2022.2.7)
(86)国際出願番号　PCT/CN2019/114818
(87)国際公開番号　WO2020/088608
(87)国際公開日　令和2年5月7日(2020.5.7)
審査請求日　令和3年6月11日(2021.6.11)
(31)優先権主張番号　201811294887.4
(32)優先日　平成30年11月1日(2018.11.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)

(73)特許権者　519366190
安源医薬科技（上海）有限公司
AMPSOURCE BIOPHARMA SHANGHAI INC.
中華人民共和国２０１３１８上海市浦東新区紫萍路９０８弄３号
NO. 3, LANE 908, ZIP ING ROAD, PUDONG NEW AREA, SHANGHAI 201318, PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA
(74)代理人　110001173
弁理士法人川口國際特許事務所
(72)発明者　李 強
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　相同二量体型二重特異性抗体およびその調製方法と使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

２本の同じポリペプチド鎖により共有結合で４価の相同二量体を形成し、各本のポリペプチド鎖は、Ｎ端からＣ端まで、腫瘍関連抗原に特異的に結合する第１の一本鎖Ｆｖ、エフェクター細胞抗原ＣＤ３に特異的に結合する第２の一本鎖Ｆｖ、およびＦｃ断片を順に含む二重特異性抗体であって、

第１の一本鎖Ｆｖと第２の一本鎖Ｆｖとはリンカーペプチドを介して連結され、第２の一本鎖ＦｖとＦｃ断片とは直接連結されるか、またはリンカーペプチドを介して連結され、且つ、前記Ｆｃ断片はＣＤＣ、ＡＤＣＣおよびＡＤＣＰのエフェクター機能を有さず、

第１の一本鎖Ｆｖと第２の一本鎖Ｆｖとを連結するリンカーペプチドは、フレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、前記フレキシブルペプチドは、G_2（ＧＧＧＧＳ）$_3$、（ＧＧＧＧＳ）$_3$、ＧＳ（ＧＧＧＧＳ）$_2$または（ＧＧＧＧＳ）$_1$であり、前記リジッドペプチドは、ＳＳＳＫＡＰＰＰＳ、ＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱ、ＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲ、またはＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱである、二重特異性抗体。

【請求項２】

前記第１の一本鎖Ｆｖに含まれるＶＨドメインとＶＬドメインとはリンカーペプチドを介して連結され、且つ、前記リンカーペプチドのアミノ酸配列は（ＧＧＧＧＸ）$_n$であり、ＸはＳｅｒまたはＡｌａを含み、ｎは１～５の自然数である、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。

【請求項３】
前記腫瘍関連抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ３９、ＣＤ４０、ＣＤ４７、ＣＤ５２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤ１２３、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＢＣＭＡ、ＣＡ１２５、ＣＥＡ、ＣＳ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＥＧＦＲ、ＥｐＣＡＭ、ＦＬＴ３、ｇｐＡ３３、ＧＰＣ－３、Ｈｅｒ２、ＭＥＧＥ－Ａ３、ＮＹＥＳＯ１、ＰＳＭＡ、ＴＡＧ－７２、ＣＩＸ、葉酸塩結合タンパク質、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ２、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、カドヘリン（Ｃａｄｈｅｒｉｎ）、インテグリン（Ｉｎｔｅｇｒｉｎ）、メソテリン（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ）、Ｃｌａｕｄｉｎ１８、αＶβ３、α５β１、ＥＲＢＢ３、ｃ－ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＥＰＨＡ３、ＴＲＡＩＬＲ１、ＴＲＡＩＬＲ２、ＲＡＮＫＬ、Ｂ７タンパク質ファミリー、ムチンファミリー（Ｍｕｃｉｎ）、ＦＡＰまたはテネイシン（Ｔｅｎａｓｃｉｎ）を含む、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項４】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ１９に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：９、１０および１１に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１２、１３および１４に示すとおりであるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：１７、１８および１９に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２０、２１および２２に示すとおりであるグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５、２６および２７に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２８、２９および３０に示すとおりであるグループ、
（ｉｖ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３３、３４および３５に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：３６、３７および３８に示すとおりであるグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項５】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２０に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４１、４２および４３に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４４、４５および４６に示すとおりであるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：４９、５０および５１に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５２、５３および５４に示すとおりであるグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：５７、５８および５９に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６０、６１および６２に示すとおりであるグループ、
（ｉｖ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６５、６６および６７に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：６８、６９および７０に示すとおりであるグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。

【請求項６】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２２に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７３、７４および７５に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７６、７７および７８に示すとおりであるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８１、８２および８３に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８４、８５および８６に示すとおりであるグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項７】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３０に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９、９０および９１に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９２、９３および９４に示すとおりであるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９７、９８および９９に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１００、１０１および１０２に示すとおりであるグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項８】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥｐＣＡＭに特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５、１０６および１０７に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８、１０９および１１０に示すとおりであるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１３、１１４および１１５に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１６、１１７および１１８に示すとおりであるグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項９】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＥＡに特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２１、１２２および１２３に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２４、１２５および１２６に示すとおりであるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２９、１３０および１３１に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３２、１３３および１３４に示すとおりであるグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３７、１３８および１３９に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４０、１４１および１４２に示すとおりであるグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項１０】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｈｅｒ２に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４５、１４６および１４７に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４８、１４９および１５０に示すとおりであるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５３、１５４および１５５に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５６、１５７および１５８に示すとおりであるグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６１、１６２および１６３に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６４、１６５および１６６に示すとおりであるグループ、

から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。

【請求項１１】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥＧＦＲに特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６９、１７０および１７１に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７２、１７３および１７４に示すとおりであるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７７、１７８および１７９に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８０、１８１および１８２に示すとおりであるグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８５、１８６および１８７に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８８、１８９および１９０に示すとおりであるグループ、

から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。

【請求項１２】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＧＰＣ－３に特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９３、１９４および１９５に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９６、１９７および１９８に示すとおりである、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。

【請求項１３】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎに特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０１、２０２および２０３に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０４、２０５および２０６に示すとおりである、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。

【請求項１４】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｕｃｉｎ１に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０９、２１０および２１１に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１２、２１３および２１４に示すとおりであるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１７、２１８および２１９に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２０、２２１および２２２に示すとおりであるグループ、

から選ばれる、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項１５】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＡ１２５に特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２５、２２６および２２７に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２８、２２９および２３０に示すとおりである、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項１６】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ１９に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｖ）そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項４に記載の二重特異性抗体。
【請求項１７】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２０に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５５に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５６に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６４に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｖ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７２に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項５に記載の二重特異性抗体。
【請求項１８】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２２に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７９に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８０に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列

を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８７に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８８に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項６に記載の二重特異性抗体。
【請求項１９】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３０に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９５に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９６に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０３に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインがＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０４に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項７に記載の二重特異性抗体。
【請求項２０】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥｐＣＡＭに特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１９に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２０に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項８に記載の二重特異性抗体。
【請求項２１】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＥＡに特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２７に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２８に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３５に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３６に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４３に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４４に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
から選ばれる、ことを特徴とする請求項９に記載の二重特異性抗体。
【請求項２２】
前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｈｅｒ２に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５１に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５２に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５９に示すアミノ酸配列、または上記

配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６０に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６７に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６８に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、

から選ばれる、ことを特徴とする請求項１０に記載の二重特異性抗体。

【請求項２３】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥＧＦＲに特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７５に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７６に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８３に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８４に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９１に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９２に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、

ことを特徴とする請求項１１に記載の二重特異性抗体。

【請求項２４】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＧＰＣ－３に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９９に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２００に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む、ことを特徴とする請求項１２に記載の二重特異性抗体。

【請求項２５】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎに特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０７に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０８に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む、ことを特徴とする請求項１３に記載の二重特異性抗体。

【請求項２６】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｕｃｉｎ１に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１５に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１６に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２３に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２４に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含むグループ、

から選ばれる、ことを特徴とする請求項１４に記載の二重特異性抗体。

【請求項２７】

前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＡ１２５に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３１に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３２に示すアミノ酸配列

、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む、ことを特徴とする請求項１５に記載の二重特異性抗体。
【請求項２８】
前記第２の一本鎖Ｆｖに含まれるＶＨドメインとＶＬドメインとはリンカーペプチドを介して連結され、且つ、前記リンカーペプチドのアミノ酸配列は（ＧＧＧＧＸ）$_n$であり、ＸはＳｅｒまたはＡｌａを含み、ｎは１～５の自然数である、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項２９】
前記第２の一本鎖Ｆｖは、体外結合親和性分析において、５０ｎＭよりも大きい、または１００ｎＭよりも大きい、または３００ｎＭよりも大きい、または５００ｎＭよりも大きいＥＣ$_{50}$値でエフェクター細胞に結合する、ことを特徴とする請求項１または２８に記載の二重特異性抗体。
【請求項３０】
前記第２の一本鎖ＦｖのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４１、２４２および２４３に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４４、２４５および２４６に示すとおりである、ことを特徴とする請求項２９に記載の二重特異性抗体。
【請求項３１】
前記第２の一本鎖ＦｖのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４９、２５０および２５１に示すとおりであり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５２、２５３および２５４に示すとおりである、ことを特徴とする請求項２９に記載の二重特異性抗体。
【請求項３２】
前記第２の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４７に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４８に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む、ことを特徴とする請求項３０に記載の二重特異性抗体。
【請求項３３】
前記第２の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５５に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５６に示すアミノ酸配列、または上記配列と少なくとも９０％の同一性を有する配列を含む、ことを特徴とする請求項３１に記載の二重特異性抗体。
【請求項３４】
前記リジッドペプチドはＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳである、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項３５】
前記リンカーペプチドは、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５８に示すアミノ酸配列を含む、ことを特徴とする請求項３４に記載の二重特異性抗体。
【請求項３６】
前記Ｆｃ断片と第２の一本鎖Ｆｖとを連結するリンカーペプチドは、（ＧＧＧＧＳ）ｎのみからなり、ｎ＝１、２、３、または４である、ことを特徴とする請求項１に記載の二重特異性抗体。
【請求項３７】
前記Ｆｃ断片は、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、およびＩｇＥの重鎖定常領域から選ばれ、且つ、前記Ｆｃ断片は、由来する天然配列と比べて１つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加を有する、

ことを特徴とする請求項１または３６に記載の二重特異性抗体。
【請求項３８】
前記Ｆｃ断片は、ＥＵ番号システムに基づいて確定されたＬ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｐ３３１Ｓのアミノ酸置換を含む、ことを特徴とする請求項３７に記載の二重特異性抗体。
【請求項３９】
前記Ｆｃ断片は、
（ｉ）新生児受容体（ＦｃＲｎ）との結合親和性が増強されるという性質と、
（ｉｉ）低減または除去されたグリコシル化という性質と、
（ｉｉｉ）低減または除去された荷電不均一性という性質と、
の１種または複数種の性質を有するアミノ酸の置換、欠失、または付加を更に含む、ことを特徴とする請求項３８に記載の二重特異性抗体。
【請求項４０】
前記Ｆｃ断片は、
（ｉ）ＥＵ番号システムに基づいて確定されたＭ４２８Ｌ、Ｔ２５０Ｑ／Ｍ４２８Ｌ、Ｍ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓ、またはＭ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６Ｅのアミノ酸置換と、
（ｉｉ）ＥＵ番号システムに基づいて確定されたＮ２９７Ａのアミノ酸置換と、
（ｉｉｉ）ＥＵ番号システムに基づいて確定されたＫ４４７のアミノ酸欠失と、
の１つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加を更に含む、ことを特徴とする請求項３９に記載の二重特異性抗体。
【請求項４１】
前記Ｆｃ断片のアミノ酸配列は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６３に示すように、由来する天然配列と比べ、Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｎ２９７Ａ／Ｐ３３１Ｓ／Ｔ２５０Ｑ／Ｍ４２８ＬというＥＵ番号システムに基づいて確定された６つのアミノ酸の置換または代替を有し、且つ、ＥＵ番号システムに基づいて確定されたＫ４４７が欠失または削除される、ことを特徴とする請求項３９に記載の二重特異性抗体。
【請求項４２】
前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ１９およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６４に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６４に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６４に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項４に記載の二重特異性抗体。
【請求項４３】
前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ１９およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８３に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８３に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８３に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項４に記載の二重特異性抗体。
【請求項４４】
前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ２０およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６６に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６６に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６６に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有

する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項５に記載の二重特異性抗体。
【請求項４５】
前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ２２およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６８に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６８に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６８に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項６に記載の二重特異性抗体。
【請求項４６】
前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ３０およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７０に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７０に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７０に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項７に記載の二重特異性抗体。
【請求項４７】
前記二重特異性抗体は、ヒトＥｐＣＡＭおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７２に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７２に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７２に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項８に記載の二重特異性抗体。
【請求項４８】
前記二重特異性抗体は、ヒトＣＥＡおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７４に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７４に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７４に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項９に記載の二重特異性抗体。
【請求項４９】
前記二重特異性抗体は、ヒトＨｅｒ２およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項１０に記載の二重特異性抗体。
【請求項５０】
前記二重特異性抗体は、ヒトＥＧＦＲおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７７に示す配列、

（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７７に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７７に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項１１に記載の二重特異性抗体。
【請求項５１】
前記二重特異性抗体は、ヒトＧＰＣ－３およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７９に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７９に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７９に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項１２に記載の二重特異性抗体。
【請求項５２】
前記二重特異性抗体は、ヒトＭｅｓｏｔｈｅｌｉｎおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８１に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８１に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８１に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項１３に記載の二重特異性抗体。
【請求項５３】
前記二重特異性抗体は、ヒトＭｕｃｉｎ１およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８５に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８５に示す配列と比べて１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８５に示す配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する配列、
のとおりである、ことを特徴とする請求項１４に記載の二重特異性抗体。
【請求項５４】
請求項１～５３のいずれか１項に記載の二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子。
【請求項５５】
ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６５、２６７、２６９、２７１、２７３、２７５、２７６、２７８、２８０、２８２、２８４、または２８６に示すヌクレオチド配列を有する、請求項５４に記載のＤＮＡ分子。
【請求項５６】
請求項５４または５５に記載のＤＮＡ分子を含むベクター。
【請求項５７】
請求項５６に記載のベクターを含む宿主細胞であって、前記宿主細胞は、原核細胞、酵母、または哺乳動物細胞を含む、宿主細胞。
【請求項５８】
請求項１～５３のいずれか１項に記載の二重特異性抗体および医薬的に許容される賦形剤、ベクター、または希釈剤を含む、医薬組成物。
【請求項５９】
（ａ）二重特異性抗体の融合遺伝子を取得し、二重特異性抗体の発現ベクターを構築す

ることと、（ｂ）遺伝子工学的手法により上記発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクションすることと、（ｃ）前記二重特異性抗体の産生が許容された条件で上記宿主細胞を培養することと、（ｄ）産生された前記抗体を分離、精製することとを含む請求項１～５３のいずれか１項に記載の二重特異性抗体を調製する方法であって、
ステップ（ａ）に記載の発現ベクターは、プラスミドおよびウイルスから選ばれる１種または複数種であり、
ステップ（ｂ）は、遺伝子工学的手法により構築したベクターを宿主細胞にトランスフェクションし、前記宿主細胞は、原核細胞、酵母、または哺乳動物細胞を含み、
ステップ（ｄ）は、タンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換、疎水性クロマトグラフィー、またはモレキュラーシーブ方法を含む通常の免疫グロブリン精製方法により、前記二重特異性抗体を分離、精製する、方法。
【請求項６０】
請求項１～５３のいずれか１項に記載の二重特異性抗体の、癌／腫瘍を治療、予防、または緩和する薬剤の調製における使用であって、
前記癌は、中皮腫、扁平上皮腫、骨髄腫、骨肉腫、膠芽腫、神経膠腫、悪性上皮性腫瘍、腺癌、メラノーマ、肉腫、急性白血病、慢性白血病、リンパ腫、髄膜腫、ホジキン病、セザリー症候群、多発性骨髄腫、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、喉頭癌、乳癌、頭頸部癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸癌、膣癌、胃癌、腎細胞癌、腎癌、膵臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、肝臓胆管癌、骨癌、皮膚癌、血液癌、鼻腔癌、副鼻腔癌、鼻咽頭癌、口腔癌、中咽頭癌、喉頭癌、喉下部癌、唾液腺癌、縦隔膜癌、胃癌、小腸癌、結腸癌、直腸および肛門領域の癌、尿管癌、尿道癌、陰茎癌、精巣癌、外陰癌、内分泌系癌、中枢神経系癌または形質細胞腫を含む、使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
［関連出願の相互参照］　本発明は、２０１８年１１月１日に提出されたＣＮ２０１８１１２９４８８７．４という中国特許出願に対して優先権を主張するものである。上記引用された優先権の出願の全ての内容を引用により本出願に援用する。
【０００２】
本発明は、免疫学の分野に関し、より具体的には、Ｔ細胞を媒介して殺傷する抗ＣＤ３二重特異性抗体、およびこのような抗体の使用、特に、癌の治療における使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
１９８５年、Ｔ細胞を利用して腫瘍細胞を殺傷する概念は既に提案（Ｓｔｅａｒｚ ＵＤら、Ｎａｔｕｒｅ、３１４：６２８～６３１、１９８５）されている。通常、Ｔ細胞を効果的に活性化には、二重信号が必要となると考えられ、第１の信号は、抗原提示細胞におけるＭＨＣ－抗原複合体とＴ細胞受容体ＴＣＲ－ＣＤ３との結合に由来し、第２の信号は、Ｔ細胞と抗原提示細胞が発現する共刺激分子とが相互作用して生じた非抗原特異性共刺激信号に由来する。多数の腫瘍細胞表面のＭＨＣの発現が低下して更に欠失するため、腫瘍細胞が免疫殺傷から逃げる。
【０００４】
二重特異性抗体は、作用メカニズムで二重信号遮断型および媒介細胞機能型に分けることができる。通常、媒介細胞機能型の二重特異性抗体とは、Ｔ細胞を媒介して殺傷する抗ＣＤ３二重特異性抗体を指す。ＣＤ３分子は、全ての成熟Ｔ細胞の表面に発現し、ＴＣＲと非共有結合を呈し、完全なＴＣＲ－ＣＤ３複合体を形成し、抗原刺激に対する免疫応答に共に参与し、現在の二重特異性抗体で最も多く適用されて最も成功した免疫エフェクター細胞の表面のトリガ分子である。ＣＤ３を標的とする二重特異性抗体は、Ｔ細胞の表面のＣＤ３および腫瘍細胞の表面の抗原にそれぞれ結合することができ、細胞毒性Ｔ細胞（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ Ｔ ｃｅｌｌ、ＴｃまたはＣＴＬ）と腫瘍細胞との距離を近接させ、且つ、Ｔ細胞を直接活性化し、従来のＴ細胞の二重活性化信号に依存せずに癌細胞を直接

殺傷するようにＴ細胞を誘導する。しかし、Ｔ細胞抗原ＣＤ３を標的とするアゴニスト抗体、例えば、第１世代の臨床に応用されるヒトＣＤ３を標的とするマウスモノクローナル抗体ＯＫＴ３（Ｋｕｎｇ　Ｐら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２０６：３４７～３４９、１９７９）は、Ｔ細胞が過剰に活性化されてインターロイキン－２（ＩＬ－２）、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－γ、およびインターロイキン－６（ＩＬ－６）のような炎症因子を大量に放出するため、臨床的に深刻な「サイトカインストーム症候群」（Ｈｉｒｓｃｈ　Ｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４２：７３７～７４３、１９８９）を引き起こし、発熱、身震い、頭痛、吐き気、嘔吐、下痢、呼吸急迫、無菌性髄膜炎、および血圧低下を特徴とする「インフルエンザ様」症候群を引き起こす。そのため、ＣＤ３を標的とする二重機能抗体を開発するには、過剰なサイトカインストームをどのように弱めるまたは回避することは第１の考慮すべき問題となる。

【０００５】

近年、２つの異なるハーフ抗体を正確に組み立てるという問題を解決するために、科学者らは様々な構造の二重特異性抗体を設計して開発した。全体的にまとめて二種類があり、１種類の二重特異性抗体はＦｃ領域を含まない。このような構造の二重抗体の利点は、分子量が小さく、原核細胞に発現でき、正確に組み立てるという問題を考慮する必要がないことであり、欠点は、抗体Ｆｃ断片がないため、分子量が低く、その半減期が短く、且つ、このような形式の二重抗体が重合しやすく、安定性が悪く、発現量が低いため、臨床応用がある程度限られている。現在、このような二重特異性抗体がＢｉＴＥ、ＤＡＲＴ、ＴｒａｎｄＡｂｓ、ｂｉ－Ｎａｎｏｂｏｄｙ等を含むという報告がある。

【０００６】

別の種類の二重特異性抗体はＦｃドメインを保留する。このような二重抗体がＩｇＧ様構造を形成し、分子構造が大きく、且つ、ＦｃＲｎにより媒介される細胞のエンドサイトーシスおよび再循環過程により、より長い半減期を有する。それと共に、Ｆｃにより媒介される部分または全てのエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性（ＡＤＣＣ）、補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ）、および抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）が保留される。現在既に報告されたこのような二重特異性抗体は、Ｔｒｉｏｍａｂｓ、ｋｉｈ　ＩｇＧ、Ｃｒｏｓｓ－ｍａｂ、ｏｒｔｈｏＦａｂ　ＩｇＧ、ＤＶＤ　ＩｇＧ、ＩｇＧ　ｓｃＦｖ、ｓｃＦｖ２－Ｆｃ等を含む。抗ＣＤ３二重特異性抗体は、現在、ＴａｎｄＡｂおよびｓｃＦｖ－Ｆｖ－ｓｃＦｖ構成の他、他の抗ＣＤ３二重特異性抗体の設計は１価の抗ＣＤ３形式を広く採用し、主な原因は、２価の抗ＣＤ３二重特異性抗体が過剰に活性化しやすくてＴ細胞のアポトーシスおよび大量のサイトカインの瞬時放出を誘発し（Ｋｕｈｎ　Ｃら、Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ、８：８８９～９０６、２０１６）、更に、より深刻な場合、Ｔ細胞を非抗原依存的に活性化して免疫バランスを破る可能性があるためである。そのため、従来技術における抗ＣＤ３二重特異性抗体は、２価の抗ＣＤ３抗体の導入を回避することが多く、例えば、ｔｒｉＦａｂ－Ｆｃ、ＤＡＲＴ－ＦｃおよびＢｉＴＥ－Ｆｃ構成の二重特異性抗体は、いずれも非対称性設計を採用する（即ち、ヘテロ二量体型二重抗体）（Ｚ　Ｗｕら、Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、１８２：１６１～１７５、２０１８）が、その下流の生産に多くの挑戦をもたらし、例えば、望ましくない相同二量体またはミスフィットされた不純物分子が生成され、二重抗体の発現および精製の困難度を増加する。「ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ」技術の運用がある程度でヘテロ二量体型二重抗体分子の重鎖間のミスフィットの問題を解決したが、「軽鎖／重鎖のミスフィット」は、更に別の挑戦をもたらす。重鎖－軽鎖のミスフィットを防止する１つの策略は、二重特異性抗体の一方のＦａｂの軽鎖および重鎖の一部のドメインを相互交換し、Ｃｒｏｓｓｍａｂ（ハイブリッド抗体）を形成することであり、該方法は、軽鎖／重鎖間の選択的なペアリングを許容することができる。しかし、これらの方法の欠点は、ミスフィット生成物の生成を完全に防ぐことができず、任意のミスフィット分子の残留画分がいずれも生成物から分離されにくく、且つ、このような方法が２つの抗体配列に対して大量の突然変異等の遺伝子工学的改造を行う必要があり、簡単かつ汎用という目的を達成することができないことである。

【０００７】
また、ＣＤ３特異性を含むＩｇＧ様構造の二重特異性抗体は、ＦｃγＲと結合する能力を有するため、無制限の長時間のＴ細胞活性化をもたらす可能性があり、且つ、このような活性化は、標的細胞によって制限されず、標的抗原に結合するか否かに関わらず、ＦｃγＲを発現する組織内（例えば、造血、リンパおよび細網内皮系内）においていずれも活性化されたＴ細胞を発見する。このようなＴ細胞の全身性活性化は、サイトカインの大量の放出に伴い、これは、Ｔ細胞がサイトカインまたは抗体を活性化する治療の応用過程における深刻な有害反応である。従い、このようなＴ細胞を媒介して殺傷する抗ＣＤ３二重特異性抗体は、Ｆｃにより媒介されるＴ細胞の全身性活性化を回避する必要があり、免疫エフェクター細胞の標的細胞組織内での制限的な活性化を許容し、即ち、二重特異性抗体と対応する標的抗原との結合に一意に依存する。
【０００８】
従い、本分野は、製品の半減期、安定性、安全性および生産可能性の面で性能が改善される新型な二重特異性分子の開発が差し迫って必要となる。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００９】
本発明は、免疫エフェクター細胞抗原ＣＤ３および腫瘍関連抗原（Ｔｕｍｏｒ－Ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　Ａｎｔｉｇｅｎ、ＴＡＡ）を標的とする４価の相同二量体型二重特異性抗体分子を提供すること目的とし、このような二重特異性抗体は、体内で腫瘍細胞を著しく抑制または殺傷することができるが、ＴＡＡを低発現した正常細胞に対する非特異的殺傷作用が著しく低下するとともに、制御されたエフェクター細胞の過剰な活性化による毒副作用を有し、且つ、その物理化学性能および体内安定性がいずれも著しく向上する。
【課題を解決するための手段】
【００１０】
本発明の第１の態様において、２本の同じポリペプチド鎖により共有結合で４価の相同二量体を形成し、各本のポリペプチド鎖は、Ｎ端からＣ端まで、腫瘍関連抗原に特異的に結合する第１の一本鎖Ｆｖ（抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖ）、エフェクター細胞抗原ＣＤ３に特異的に結合する第２の一本鎖Ｆｖ（抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ）、およびＦｃ断片を順に含む二重特異性抗体であって、第１の一本鎖Ｆｖと第２の一本鎖Ｆｖとはリンカーペプチドを介して連結され、第２の一本鎖ＦｖとＦｃ断片とは直接連結されるか、またはリンカーペプチドを介して連結され、且つ、前記Ｆｃ断片はエフェクター機能を有しない二重特異性抗体を提供する。
【００１１】
ここで、第１の一本鎖Ｆｖは、腫瘍関連抗原に対して特異性を有し、それに含まれるＶＨドメインとＶＬドメインとはリンカーペプチド（Ｌ１）を介して連結され、前記ＶＨとＬ１とＶＬとは、ＶＨ－Ｌ１－ＶＬまたはＶＬ－Ｌ１－ＶＨの順で並べ、且つ、前記リンカーペプチドＬ１のアミノ酸配列は（ＧＧＧＧＸ）$_n$であり、ＸはＳｅｒまたはＡｌａを含み、ＸはＳｅｒであることが好ましく、ｎは１～５の自然数であり、ｎは３であることが好ましい。
【００１２】
例示的には、前記腫瘍関連抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ３９、ＣＤ４０、ＣＤ４７、ＣＤ５２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤ１２３、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＢＣＭＡ、ＣＡ１２５、ＣＥＡ、ＣＳ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＥＧＦＲ、ＥｐＣＡＭ、ＦＬＴ３、ｇｐＡ３３、ＧＰＣ－３、Ｈｅｒ２、ＭＥＧＥ－Ａ３、ＮＹＥＳＯ１、ＰＳＭＡ、ＴＡＧ－７２、ＣＩＸ、葉酸塩結合タンパク質、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ２、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、カドヘリン（Ｃａｄｈｅｒｉｎ）、インテグリン（Ｉｎｔｅｇｒｉｎ）、メソテリン（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ）、Ｃｌａｕｄｉｎ１８、αＶβ３、α５β１、ＥＲＢＢ３、ｃ－ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＥＰＨＡ３、ＴＲＡＩＬＲ１、ＴＲＡＩＬＲ２、ＲＡＮＫＬ、Ｂ７タンパク質フ

ファミリー、ムチンファミリー（Ｍｕｃｉｎ）、ＦＡＰ、およびテネイシン（Ｔｅｎａｓｃｉｎ）を含んでもよいが、これらに限定されない。好ましくは、前記腫瘍関連抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３８、ＢＣＭＡ、ＣＳ１、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、ＣＡ１２５、Ｍｕｃｉｎ１、ＧＰＣ－３、およびＭｅｓｏｔｈｅｌｉｎである。

【００１３】

例えば、本発明の表６－１において、いくつかの好ましい腫瘍関連抗原に対する第１の一本鎖ＦｖのＶＨドメインおよびその相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３）のアミノ酸配列と、ＶＬドメインおよびその相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３）のアミノ酸配列とを例示的に列挙する。

【００１４】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ１９に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９、１０および１１に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２、１３および１４に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７、１８および１９に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０、２１および２２に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５、２６および２７に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８、２９および３０に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｖ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３３、３４および３５に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３６、３７および３８に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に

類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
から選ばれる。
【００１５】
好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２０に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４１、４２および４３に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４４、４５および４６に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４９、５０および５１に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５２、５３および５４に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５７、５８および５９に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６０、６１および６２に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
（ｉｖ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６５、６６および６７に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６８、６９および７０に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
から選ばれる。
【００１６】
好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２２に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７３、７４および７５に示すとおりであるか、または上記配列のうち

のいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７６、７７および７８に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８１、８２および８３に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８４、８５および８６に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

から選ばれる。

【００１７】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３０に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８９、９０および９１に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９２、９３および９４に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９７、９８および９９に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１００、１０１および１０２に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

から選ばれる。

【００１８】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥｐＣＡＭに特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０５、１０６および１０７に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０８、１０９およ

び１１０に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１３、１１４および１１５に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１６、１１７および１１８に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

から選ばれる。

【００１９】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＥＡに特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２１、１２２および１２３に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２４、１２５および１２６に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２９、１３０および１３１に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３２、１３３および１３４に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３７、１３８および１３９に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４０、１４１および１４２に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

から選ばれる。

【００２０】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｈｅｒ２に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４５、１４６および１４７に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４８、１４９および１５０に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５３、１５４および１５５に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５６、１５７および１５８に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６１、１６２および１６３に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６４、１６５および１６６に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

から選ばれる。

【００２１】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥＧＦＲに特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６９、１７０および１７１に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７２、１７３および１７４に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７７、１７８および１７９に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８０、１８１および１８２に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば

、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
（ｉｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８５、１８６および１８７に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８８、１８９および１９０に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
から選ばれる。
【００２２】
好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＧＰＣ－３に特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９３、１９４および１９５に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９６、１９７および１９８に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列である。
【００２３】
好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎに特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０１、２０２および２０３に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０４、２０５および２０６に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列である。
【００２４】
好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｕｃｉｎ１に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０９、２１０および２１１に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１２、２１３および２１４に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞ

れＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１７、２１８および２１９に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２０、２２１および２２２に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であるグループ、

から選ばれる。

【００２５】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＡ１２５に特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２５、２２６および２２７に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２８、２２９および２３０に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列である。

【００２６】

好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＢＣＭＡに特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３３、２３４および２３５に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３６、２３７および２３８に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列である。

【００２７】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ１９に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３１に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３２に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｖ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：３９に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４０に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

から選ばれる。

【００２８】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２０に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４７に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：４８に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５５に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：５６に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６３に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：６４に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｖ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７１に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７２に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）

配列を含むグループ、
から選ばれる。
【００２９】
より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ２２に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：７９に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８０に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８７に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８８に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、
から選ばれる。
【００３０】
より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３０に特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９５に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：９６に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、
（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０３に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１０４に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、
から選ばれる。
【００３１】
より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥｐＣＡＭに特異的に結合し、
（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１１に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１２に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１１９に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２０に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

から選ばれる。

【００３２】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＥＡに特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２７に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１２８に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３５に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１３６に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４３に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１４４に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

から選ばれる。

【００３３】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｈｅｒ２に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５１に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５２に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１５９に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ

ＩＤ　ＮＯ：１６０に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６７に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１６８に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

から選ばれる。

【００３４】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＥＧＦＲに特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７５に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１７６に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８３に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１８４に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９１に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９２に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

から選ばれる。

【００３５】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＧＰＣ－３に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１９９に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２００に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含む。

【００３６】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎに特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０７に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２０８に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含む。

【００３７】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、Ｍｕｃｉｎ１に特異的に結合し、

（ｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１５に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２１６に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

（ｉｉ）ＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２３に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２２４に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含むグループ、

から選ばれる。

【００３８】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＣＡ１２５に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３１に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３２に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含む。

【００３９】

より好ましくは、前記第１の一本鎖Ｆｖは、ＢＣＭＡに特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２３９に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４０に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含む。

【００４０】

ここで、本発明に記載の第１の一本鎖Ｆｖと第２の一本鎖Ｆｖとを連結するリンカーペプチド（Ｌ２）は、フレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成される。

【００４１】

更に、前記フレキシブルペプチドは２つ以上のアミノ酸を含み、好ましくは、Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ａｌａ（Ａ）、およびＴｈｒ（Ｔ）といういくつかのアミノ酸から選ばれる。より好ましくは、前記フレキシブルペプチドはＧおよびＳ残基を含む。最も好ましくは、前記フレキシブルペプチドのアミノ酸組成の構造の一般式は、ＧｘＳｙ（ＧＧＧＧＳ）$_z$であり、ただし、ｘ、ｙおよびｚは０以上の整数で、ｘ＋ｙ＋ｚ≧１である。例えば、１つの好ましい実施例において、前記フレキシブルペプチドのアミノ酸配列はＧ$_2$（ＧＧＧＧＳ）$_3$である。

【００４２】

更に、前記リジッドペプチドは、天然ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのβ－サブユニットのカルボキシル基の末端の１１８～１４５－位のアミノ酸で構成される全長配列（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５７に示すように）またはその裁断された断片（以下、ＣＴＰと総称する）に由来する。好ましくは、前記ＣＴＰリジッドペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５７のＮ端の１０個のアミノ酸、即ち、ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳ（ＣＴＰ^1）を含み、または、前記ＣＴＰリジッドペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５７のＣ端の１４個のアミノ酸、即ち、ＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱ（ＣＴＰ^2）を含み、また、別の実施例において、前記ＣＴＰリジッドペプチドは、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５７のＮ端の１６個のアミノ酸、即ち、ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲ（ＣＴＰ^3）を含み、更に、別の実施例において、前記ＣＴＰリジッドペプチドは、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンβ－サブユニットの１１８－位から開始して１４５－位まで終了する２８個のアミノ酸、即ち、ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱ（ＣＴＰ^4）を含む。

【００４３】

例えば、本発明の表６－３において、いくつかの好ましい第１の一本鎖Ｆｖと第２の一本鎖Ｆｖとを連結するリンカーペプチドＬ２のアミノ酸配列を例示的に列挙する。

【００４４】

本発明の１つの好ましい実施例において、前記リンカーペプチドのアミノ酸配列は、ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ：２５８に示すように、そのフレキシブルペプチドのアミノ酸組成がＧ$_2$（ＧＧＧＧＳ）$_3$であり、そのリジッドペプチドのアミノ酸組成がＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳ（即ち、ＣＴＰ^1）である。

【００４５】

ここで、第２の一本鎖Ｆｖは、免疫エフェクター細胞抗原ＣＤ３に対して特異性を有し、それに含まれるＶＨドメインとＶＬドメインとはリンカーペプチド（Ｌ３）を介して連結され、前記ＶＨとＬ３とＶＬとは、ＶＨ－Ｌ３－ＶＬまたはＶＬ－Ｌ３－ＶＨの順で並べ、且つ、前記リンカーペプチドＬ３のアミノ酸配列は（ＧＧＧＧＸ）$_n$であり、ＸはＳｅｒまたはＡｌａを含み、ＸはＳｅｒであることが好ましく、ｎは１～５の自然数であり、ｎは３であることが好ましい。

【００４６】

好ましくは、前記二重特異性抗体の第２の一本鎖Ｆｖは、体外ＦＡＣＳ結合分析測定において、約５０ｎＭよりも大きい、または１００ｎＭよりも大きい、または３００ｎＭよりも大きい、または５００ｎＭよりも大きいＥＣ$_{50}$値でエフェクター細胞に結合し、より好ましくは、前記二重特異性抗体の第２の一本鎖Ｆｖは、ヒトＣＤ３に結合できるだけでなく、更にカニクイザルまたはアカゲザルのＣＤ３に特異的に結合することもできる。本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、１３２．３ｎＭのＥＣ$_{50}$値でエフェクター細胞に特異的に結合する。

【００４７】

例えば、本発明の表６－２において、いくつかの好ましい抗－ＣＤ３ ｓｃＦｖのＶＨドメインおよびその相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３）のアミノ酸配列と、ＶＬドメインおよびその相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３）のアミノ酸配列とを例示的に列挙する。

【００４８】

好ましくは、前記第２の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３に特異的に結合し、そのＶＨドメインに

含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４１、２４２および２４３に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４４、２４５および２４６に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列である。

【００４９】

好ましくは、前記第２の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３に特異的に結合し、そのＶＨドメインに含まれるＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３が、それぞれ　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４９、２５０および２５１に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列であり、そのＶＬドメインに含まれるＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３が、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５２、２５３および２５４に示すとおりであるか、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列である。

【００５０】

より好ましくは、前記第２の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４７に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４８に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含む。

【００５１】

より好ましくは、前記第２の一本鎖Ｆｖは、ＣＤ３に特異的に結合し、そのＶＨドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５５に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含み、そのＶＬドメインが、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５６に示すアミノ酸配列、または上記配列のうちのいずれかとほぼ同じ（例えば、少なくとも８０％、８５％、９０％、９２％、９５％、９７％、９８％、９９％もしくはより高度に類似する、または１つ以上のアミノ酸置換（例えば、保存的置換）を有する）配列を含む。

【００５２】

ここで、本発明に係るＦｃ断片は、第２の一本鎖Ｆｖに直接またはリンカーペプチドＬ４を介して連結され、且つ、前記リンカーペプチドＬ４は、１～２０個のアミノ酸を含み、好ましくは、Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ａｌａ（Ａ）およびＴｈｒ（Ｔ）といういくつかのアミノ酸から選ばれ、より好ましくは、前記リンカーペプチドＬ４は、Ｇｌｙ（Ｇ）およびＳｅｒ（Ｓ）から選ばれ、更に好ましくは、前記リンカーペプチドＬ４の組成が（ＧＧＧＧＳ）ｎであり、ｎ＝１、２、３、または４である。本発明の１つの好ましい実施例において、前記Ｆｃ断片は第２の一本鎖Ｆｖに直接連結されている。

【００５３】

別の態様において、本発明に係るＦｃ断片は、ヒト免疫グロブリンの重鎖定常領域に由来するヒンジ領域、ＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含み、例えば、いくつかの実施形態において、本発明に係るＦｃ断片の由来は、例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、

ＩｇＧ４、ＩｇＭ、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤおよびＩｇＥの重鎖定常領域から選ばれ、特に、例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４の重鎖定常領域から選ばれ、更に、ヒトＩｇＧ１、またはＩｇＧ４の重鎖定常領域から選ばれ、且つ、前記Ｆｃ断片は、由来する天然配列と比べて１つまたは複数のアミノ酸の置換、欠失、または付加（例えば、最大で２０個、最大で１５個、最大で１０個、または最大で５つの置換、欠失、または付加）を有する。

【００５４】

いくつかの好ましい実施形態において、本発明に係る二重特異性抗体分子の性質（例えば、Ｆｃ受容体結合、抗体グリコシル化、エフェクター細胞機能、または補体機能のうちの１つ以上の特性を改変する）を修飾するために、前記Ｆｃ断片は改変され、例えば、突然変異される。

【００５５】

例えば、本発明に係る二重特異性抗体は、エフェクター機能が改変された（例えば、低減または除去）アミノ酸の置換、欠失、または付加を有するＦｃ変異体を含む。抗体のＦｃ領域は、ＡＤＣＣ、ＡＤＣＰ、ＣＤＣ等のようないくつかの重要なエフェクター機能を媒介する。抗体のＦｃ領域におけるアミノ酸残基を置換することにより、抗体のエフェクタリガンド（例えば、ＦｃγＲまたは補体Ｃ１ｑ）に対する親和性を改変し、エフェクター機能を改変する方法は本分野で知られている（例えば、ＥＰ　３８８、１５１Ａ１、ＵＳ５６４、８２６０、ＵＳ　５６２、４８２１、Ｎａｔｓｕｍｅ　Ａら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６８：３８６３～３８７２、２００８、Ｉｄｕｓｏｇｉｅ　ＥＥら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６６：２５７１～２５７５、２００１、Ｌａｚａｒ　ＧＡら、ＰＮＡＳ、１０３：４００５～４０１０、２００６、Ｓｈｉｅｌｄｓ　ＲＬら、ＪＢＣ、２７６：６５９１～６６０４、２００１、Ｓｔａｖｅｎｈａｇｅｎ　ＪＢら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，６７：８８８２～８８９０、２００７、Ｓｔａｖｅｎｈａｇｅｎ　ＪＢら、Ａｄｖａｎ．Ｅｎｚｙｍｅ．Ｒｅｇｕｌ．，４８：１５２～１６４、２００８、Ａｌｅｇｒｅ　ＭＬら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８：３４６１～３４６８、　１９９２、およびＫａｎｅｋｏ Ｅら、Ｂｉｏｄｒｕｇｓ、２５：１～１１、２０１１を参照）。本発明のいくつかの好ましい実施例において、Ｆｃ受容体の相互作用を改変するために抗体の定常領域におけるアミノ酸Ｌ２３５（ＥＵ番号）を修飾し、例えば、Ｌ２３５Ｅ、またはＬ２３５Ａを修飾する。別の好ましい実施例において、抗体の定常領域におけるアミノ酸２３４および２３５を同時に修飾し、例えば、Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａ（Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ）（ＥＵ番号）を同時に修飾する。

【００５６】

例えば、本発明に係る二重特異性抗体は、循環半減期が延長されたアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するＦｃ変異体を含んでもよい。研究により、Ｍ２５２Ｙ／Ｓ２５４Ｔ／Ｔ２５６Ｅ、Ｍ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓ、またはＴ２５０Ｑ／Ｍ４２８Ｌがいずれも抗体の霊長類動物における半減期を延長できることが発見した。より多くの新生児受容体（ＦｃＲｎ）との結合親和性が増強されたＦｃ変異体に含まれる突然変異のサイトは、中国発明特許ＣＮ２０１２８００６６６６３．２、ＵＳ２００５／００１４９３４Ａ１、ＷＯ９７／４３３１６、ＵＳ５８６９０４６、ＵＳ５７４７０３、ＷＯ９６／３２４７８を参照することができる。本発明のいくつかの好ましい実施例において、ＦｃＲｎ受容体との結合親和性を増強するために抗体の定常領域におけるアミノ酸Ｍ４２８（ＥＵ番号）を修飾し、例えば、Ｍ４２８Ｌを修飾する。別の好ましい実施例において、抗体の定常領域におけるアミノ酸２５０および４２８（ＥＵ番号）を同時に修飾し、例えば、Ｔ２５０ＱおよびＭ４２８Ｌ（Ｔ２５０Ｑ／Ｍ４２８Ｌ）を同時に修飾する。

【００５７】

例えば、本発明に係る二重特異性抗体は、Ｆｃグリコシル化を低減または除去できるアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するＦｃ変異体を含んでもよい。例えば、Ｆｃ変異体は、アミノ酸サイト２９７（ＥＵ番号）に正常に存在するＮ－に連結されたグリカンが低下したグリコシル化を含む。Ｎ２９７－位のグリコシル化はＩｇＧの活性に大きく影響

を及ぼし、該サイトグリコシル化が除去されると、ＩｇＧ分子ＣＨ２の上半部分の配座に影響を及ぼし、ＦｃγＲｓに対する結合能力が失われ、抗体に関連する生物活性に影響を及ぼす。本発明のいくつかの好ましい実施例において、抗体のグリコシル化を回避するためにヒトＩｇＧの定常領域におけるアミノ酸Ｎ２９７（ＥＵ番号）を修飾し、例えば、Ｎ２９７Ａを修飾する。

【００５８】

例えば、本発明に係る二重特異性抗体は、荷電不均一性を除去するアミノ酸の置換、欠失、または付加を有するＦｃ変異体を含んでもよい。エンジニアリング細胞の発現過程で発生する様々な翻訳後修飾は、いずれもモノクローナル抗体の荷電不均一性を引き起こし、ＩｇＧ抗体Ｃ末端のリジンの不均一性はそのうちの１つの主な原因であり、重鎖のＣ端のリジンＫは、抗体の生産過程で一定の割合の欠失が現れて荷電不均一性を引き起こし、更に抗体の安定性、有効性、免疫原性、または薬物動態学に影響を及ぼす可能性がある。本発明のいくつかの好ましい実施例において、ＩｇＧ抗体Ｃ末端のＫ４４７（ＥＵ番号）を除去または欠失させ、抗体の荷電不均一性を除去して発現生成物の均一性を向上させる。

【００５９】

本発明の表６－４において、いくつかの好ましいＦｃ断片のアミノ酸配列を例示的に列挙する。野生型ヒトＩｇＧのｃ領域を含む二重特異性抗体と比べ、本発明に係る二重特異性抗体に含まれるＦｃ断片は、ヒトＦｃγＲｓ（ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、またはＦｃγＲＩＩＩａ）およびＣ１ｑの少なくとも１種に対して低下した親和性を示し、減少したエフェクター細胞機能または補体機能を有する。例えば、本発明の１つの好ましい実施例において、二重特異性抗体に含まれるＦｃ断片はヒトＩｇＧ１に由来し、且つ、Ｌ２３４ＡおよびＬ２３５Ａ置換（Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ）を有し、ＦｃγＲＩに対して低下した結合能力を示す。また、本発明に係る二重特異性抗体に含まれる前記Ｆｃ断片は、他の１種または複数種の特性（例えば、ＦｃＲｎ受容体との結合能力、抗体のグリコシル化、または抗体の荷電不均一性等）を改変させるアミノ酸置換を更に含んでもよい。例えば、本発明の１つの好ましい実施例において、前記Ｆｃ断片のアミノ酸配列はＳＥＱ　ＩＤＮＯ：２６３に示すように、由来する天然配列と比べてＬ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｔ２５０Ｑ／Ｎ２９７Ａ／Ｐ３３１Ｓ／Ｍ４２８Ｌのアミノ酸の置換または代替を有し、且つ、Ｋ４４７が欠失または削除される。

【００６０】

本発明に係る二重特異性抗体分子は、２本の相同のポリペプチド鎖でＦｃ断片のヒンジ領域の鎖間ジスルフィド結合により４価の相同二量体を形成し、各本のポリペプチド鎖は、Ｎ端からＣ端まで、抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖ、リンカーペプチド、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ、およびＦｃ断片で順に構成され、例えば、本発明の表６－５において、いくつかの好ましい二重特異性抗体のアミノ酸配列を例示的に列挙する。

【００６１】

本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ１９およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、

（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６４に示す配列、

（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６４に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、

または

（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６４に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、

のとおりである。

【００６２】

いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。

【００６３】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ１９およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８３に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８３に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８３に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００６４】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００６５】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ２０およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６６に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６６に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６６に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００６６】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００６７】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ２２およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６８に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６８に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６８に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００６８】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００６９】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＣＤ３０およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７０に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７０に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、

または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
　または
　（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７０に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
　のとおりである。
【００７０】
　いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００７１】
　本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＥｐＣＡＭおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
　（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７２に示す配列、
　（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７２に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
　または
　（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７２に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
　のとおりである。
【００７２】
　いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００７３】
　本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＣＥＡおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
　（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７４に示す配列、
　（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７４に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
　または
　（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７４に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
　のとおりである。
【００７４】
　いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００７５】
　本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＨｅｒ２およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
　（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示す配列、
　（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
　または
　（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：８に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくと

も９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００７６】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００７７】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＥＧＦＲおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７７に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７７に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７７に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００７８】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００７９】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＧＰＣ－３およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７９に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７９に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７９に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００８０】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００８１】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＭｅｓｏｔｈｅｌｉｎおよびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８１に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８１に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８１に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００８２】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。

【００８３】
本発明の１つの好ましい実施例において、前記二重特異性抗体は、ヒトＭｕｃｉｎ１およびＣＤ３に結合し、そのアミノ酸配列は、
（ｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８５に示す配列、
（ｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８５に示す配列と比べて１つまたは複数の置換、欠失、または付加（例えば、１つ、２つ、３つ、４つ、または５つの置換、欠失、または付加）を有する配列、
または
（ｉｉｉ）ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８５に示す配列と少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％、または１００％の配列同一性を有する配列、
のとおりである。
【００８４】
いくつかの好ましい実施形態において、（ｉｉ）に記載の置換は保存的置換である。
【００８５】
本発明の第２の態様において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子を提供する。
【００８６】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６５に示すヌクレオチド配列である。
【００８７】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６７に示すヌクレオチド配列である。
【００８８】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２６９に示すヌクレオチド配列である。
【００８９】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７１に示すヌクレオチド配列である。
【００９０】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７３に示すヌクレオチド配列である。
【００９１】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７５に示すヌクレオチド配列である。
【００９２】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７６に示すヌクレオチド配列である。
【００９３】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２７８に示すヌクレオチド配列である。
【００９４】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８０に示すヌクレオチド配列である。
【００９５】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８２に示すヌクレオチド配列である。
【００９６】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８４に示すヌクレオチド配列である。

【００９７】
本発明の好ましい実施例において、上記二重特異性抗体をコードするＤＮＡ分子は、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２８６に示すヌクレオチド配列である。
【００９８】
本発明の第３の態様において、上記ＤＮＡ分子を含むベクターを提供する。
【００９９】
本発明の第４の態様において、上記ベクターを含む宿主細胞であって、前記宿主細胞は、原核細胞、酵母、または、ＣＨＯ細胞、ＮＳ０細胞、または他の哺乳動物細胞のような哺乳動物細胞を含み、好ましくはＣＨＯ細胞である宿主細胞を提供する。
【０１００】
本発明の第５の態様において、上記二重特異性抗体および医薬的に許容される賦形剤、ベクター、または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。
【０１０１】
本発明の第６の態様において、
（ａ）二重特異性抗体の融合遺伝子を取得し、二重特異性抗体の発現ベクターを構築することと、（ｂ）遺伝子工学的手法により上記発現ベクターを宿主細胞にトランスフェクションすることと、（ｃ）前記二重特異性抗体の産生が許容された条件で上記宿主細胞を培養することと、（ｄ）産生された前記抗体を分離、精製することとを含む本発明に係る二重特異性抗体を調製する方法であって、
ステップ（ａ）に記載の発現ベクターは、プラスミド、細菌およびウイルスから選ばれる１種または複数種であり、好ましくは、前記発現ベクターはＰＣＤＮＡ３．１であり、
ステップ（ｂ）は、遺伝子工学的手法により構築したベクターを宿主細胞にトランスフェクションし、前記宿主細胞は、原核細胞、酵母、またはＣＨＯ細胞、ＮＳ０細胞もしくは他の哺乳動物細胞のような哺乳動物細胞を含み、好ましくはＣＨＯ細胞であり、
ステップ（ｄ）は、タンパク質Ａアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換、疎水性クロマトグラフィー、またはモレキュラーシーブ方法を含む通常の免疫グロブリン精製方法により、前記二重特異性抗体を分離、精製する方法を更に提供する。
【０１０２】
本発明の第７の態様において、前記二重特異性抗体の、腫瘍を治療、予防、または緩和する薬剤の調製における使用であって、前記癌の実例は、中皮腫、扁平上皮腫、骨髄腫、骨肉腫、膠芽腫、神経膠腫、悪性上皮性腫瘍、腺癌、メラノーマ、肉腫、急性および慢性白血病、リンパ腫および髄膜腫、ホジキン病、セザリー症候群、多発性骨髄腫、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、喉頭癌、乳癌、頭頸部癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸癌、膣癌、胃癌、腎細胞癌、腎癌、膵臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、肝臓胆管癌、骨癌、皮膚癌および血液癌、鼻腔と副鼻腔癌、鼻咽頭癌、口腔癌、中咽頭癌、喉頭癌、喉下部癌、唾液腺癌、縦隔膜癌、胃癌、小腸癌、結腸癌、直腸および肛門領域の癌、尿管癌、尿道癌、陰茎癌、精巣癌、外陰癌、内分泌系癌、中枢神経系癌および形質細胞腫を含んでもよいが、これらに限定されない使用を提供する。
【０１０３】
本発明の第８の態様において、患者／被験者個体に治療有効量の前記二重特異性抗体を投与することを含む前記二重特異性抗体を免疫応答または機能の増強または刺激に用いる方法を提供する。
【０１０４】
本発明の第９の態様において、前記二重特異性抗体を腫瘍の治療、進展の遅延、再発の低減／抑制に使用する方法であって、有効量の前記二重特異性抗体を、前記以上の疾患または病症に罹患する個体に投与または使用することを含み、前記腫瘍の実例は、中皮腫、扁平上皮腫、骨髄腫、骨肉腫、膠芽腫、神経膠腫、悪性上皮性腫瘍、腺癌、メラノーマ、肉腫、急性および慢性白血病、リンパ腫および髄膜腫、ホジキン病、セザリー症候群、多発性骨髄腫、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、喉頭癌、乳癌、頭頸部癌、膀胱癌、子宮癌、皮膚癌、前立腺癌、子宮頸癌、膣癌、胃癌、腎細胞癌、腎癌、膵臓癌、結腸直腸癌、

子宮内膜癌、食道癌、肝臓胆管癌、骨癌、皮膚癌および血液癌、鼻腔と副鼻腔癌、鼻咽頭癌、口腔癌、中咽頭癌、喉頭癌、喉下部癌、唾液腺癌、縦隔膜癌、胃癌、小腸癌、結腸癌、直腸および肛門領域の癌、尿管癌、尿道癌、陰茎癌、精巣癌、外陰癌、内分泌系癌、中枢神経系癌および形質細胞腫を含んでもよいが、これらに限定されない方法を提供する。

【発明の効果】

【０１０５】

本発明に開示された技術案は、以下のような有益な技術的効果を取得する。

【０１０６】

１、本発明に係る二重特異性抗体に含まれる抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖは、二重抗体のＮ端に位置し、空間構成が変化し、ＴＡＡとの結合能力がある条件で弱くなる可能性があり、特に、弱発現または低発現したＴＡＡの正常細胞に結合しにくく、非特異的殺傷を減少するが、過発現または高発現したＴＡＡの細胞に対する結合特異性が著しく低下せず、良好な体内殺傷効果を示す。これにより分かるように、標的抗原が腫瘍細胞のみに発現し、または本発明に係る二重特異性抗体が標的抗原を過発現した腫瘍細胞のみに特異的に結合する場合、免疫エフェクター細胞の制限性は標的細胞の組織内のみで活性化され、前記二重特異性抗体の正常細胞に対する非特異的殺傷およびサイトカインの随伴放出が最低に低減され、臨床治療における毒副作用を低減することができる。

【０１０７】

２、本発明に係る二重特異性抗体が選択した抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖは、微弱な結合親和性（EC_{50}値が、約５０ｎＭよりも大きい、または１００ｎＭよりも大きい、または３００ｎＭよりも大きい、または５００ｎＭよりも大きい）でエフェクター細胞と特異的に結合し、また、抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖとＦｃとの間に包埋され、且つそのＮ端に位置するリンカーペプチドＬ３に含まれるＣＴＰリジッドペプチドおよびそのＣ端に位置するＦｃ断片がいずれも抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖの抗原の結合領域を部分的に「遮蔽」または「シールド」したため、このような立体障害の効果により、より微弱な結合親和性（例えば、１μＭよりも大きい）でＣＤ３に結合することで、Ｔ細胞に対する活性化刺激能力が弱くなるため、サイトカインの過剰放出を制限し、従って、より高い安全性を有する。また、本発明に使用される抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖは、ヒトとカニクイザルおよび／またはアカゲザルのＣＤ３天然抗原に同時に結合することができ、その臨床前毒性学的評価は代替分子を再構築する必要がなく、且つ、取得した有効用量、毒性用量および毒性副反応がより客観的で正確となり、臨床用量の変換を直接行って臨床研究のリスクを低減することができる。また、本発明に係る二重特異性抗体が２価の抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖを創造的に使用することにより、前記二重特異性抗体は、構成設計で従来技術において一般的に使用されるヘテロ二量体型（含まれる抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖが１価である）の非対称構造を回避するため、重鎖間のミスフィットの問題が存在せず、下流の精製ステップを簡略化する。且つ、意外には、体外細胞結合試験で抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとＴ細胞との非特異的結合が観察されず、且つ、細胞活性化程度（ＩＬ－２等のサイトカインの放出）が安全かつ有効な範囲内に制御され、即ち、本発明に使用される２価の抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ構造は、Ｔ細胞の過剰な活性化を非抗原依存的に誘導することを引き起こすことがなく、２価の抗－ＣＤ３ドメインを含む他の二重特異性抗体は、Ｔ細胞の制御不能な過剰活性化が一般的に存在するため、抗－ＣＤ３二重特異性抗体は、設計時に、一般的に２価の抗－ＣＤ３構造の導入を回避する。

【０１０８】

３、本発明に係る二重特異性抗体に含まれる修飾されたＦｃ断片は、ＦｃγＲと結合する能力を有さず、ＦｃγＲにより媒介されるＴ細胞の全身性活性化を回避するため、免疫エフェクター細胞が標的細胞組織内のみで制限的に活性化されることが許容される。

【０１０９】

４、本発明に係る二重特異性抗体は相同二量体型であり、重鎖および軽鎖のミスフィットの問題が存在せず、下流の生産プロセスが安定し、精製ステップが簡単かつ効率的であり、発現生成物が均一であり、且つ、その物理化学性能および体内安定性がいずれも著し

く向上する。
【０１１０】
５、本発明に係る二重特異性抗体は、Ｆｃ断片を含むため、長い体内循環半減期を有し、薬物動態学試験により、マウスおよびカニクイザルの体内における循環半減期がそれぞれ約４０ｈおよび８ｈであり、その臨床投与頻度を大きく低減することが分かった。
［発明の詳細］
【０１１１】
［略語および定義］
Ｈｅｒ２　ヒト表皮成長因子受容体２
ＢｉＡｂ　二重特異性抗体（ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ａｎｔｉｂｏｄｙ）
ＣＤＲ　Ｋａｂａｔ番号システムで規定された免疫グロブリンの可変領域における相補性決定領域
EC_{50}　５０％の効能または結合を産生する濃度
ＥＬＩＳＡ　酵素結合免疫吸着測定
ＦＲ　抗体のフレームワーク領域：ＣＤＲ領域を除外する免疫グロブリンの可変領域
ＨＲＰ　西洋ワサビペルオキシダーゼ
ＩＬ－２　インターロイキン２
ＩＦＮ　インターフェロン
IC_{50}　５０％の抑制を産生する濃度
ＩｇＧ　免疫グロブリンＧ
Ｋａｂａｔ　Ｅｌｖｉｎ　Ａ　Ｋａｂａｔにより提唱された免疫グロブリンの比較および番号システム
ｍＡｂ　モノクローナル抗体
ＰＣＲ　ポリメラーゼ連鎖反応
Ｖ領域　異なる抗体間の配列が可変なＩｇＧ鎖セグメントであり、軽鎖の１０９－位のＫａｂａｔ残基および重鎖の１１３－位の残基まで延在する
ＶＨ　免疫グロブリンの重鎖の可変領域
ＶＫ　免疫グロブリンのκ軽鎖の可変領域
K_D　平衡解離定数
k_a　結合速度定数
k_d　解離速度定数
【０１１２】
本発明において、特に断りのない限り、本発明に使用される科学および技術用語は、当業者が一般的に理解する意味を有する。本発明に使用される抗体またはその断片は、アミノ酸の欠失、挿入、置換、付加、および／または組換えのような本分野で知られている通常の技術および／または他の修飾方法を単独でまたは組み合わせて使用して更に修飾することができる。１種の抗体のアミノ酸配列に基づいてそのＤＮＡ配列にこのような修飾の方法を導入することは、当業者に周知のことであり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、分子クローン：実験マニュアル、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ（１９８９）Ｎ．Ｙ．である。指摘された修飾は、核酸レベルで行われることが好ましい。それと同時に、本発明をより良好に理解するために、以下、関連用語の定義および解釈を提供する。
【０１１３】
「ＣＤ１９」は分化クラスタ１９のポリペプチドであり、シングルチャネルＩ型の膜貫通糖タンパク質であり、２つのＩｇ様Ｃ２型（免疫グロブリン様）ドメインおよび１つの比較的大きな細胞質末端を含み、哺乳動物種で高度に保存的である。ＣＤ１９は、ほとんどのＢ系譜の細胞および濾胞細胞で発現し、Ｂリンパ球の分化に必要であり、且つ、Ｂ細胞の重要な共受容体としてＣＤ２１とＣＤ８１とＣＤ２２５とともに作用する。従い、ＣＤ１９は、常にＢリンパ球発育、Ｂ細胞リンパ腫およびＢリンパ球白血病の生物診断標識として使用される。また、ＣＤ１９における突然変異は、深刻な免疫不全症候群に関連す

る。ＣＤ１９標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＣＤ１９の任意の変異体、イソ型、誘導体および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＣＤ１９遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１１４】

「ＣＤ２０」は分化クラスタ２０のポリペプチドであり、４回膜貫通のタンパク質に属し、Ｂリンパ球の表面の特有の分化抗原であり、９０％以上のＢリンパ腫細胞および正常なＢリンパ球に発現し、造血幹細胞、原始Ｂリンパ球、正常な血球および他の組織に発現せず、抗体と結合した後、顕著な内化および脱落がなく、抗原変調が発生せず、Ｂ細胞リンパ腫を治療する理想的な作用標的点とすることができる。ＣＤ２０は、主に、ＡＤＣＣ、ＣＤＣ等の作用により抗腫瘍作用を発揮する。近年、ＣＤ２０標的点に対する適応症はまずます拡大され、例えば、自己免疫疾患（多発性硬化症（ＭＳ）、クローン病（ＣＤ）を含む）、炎症性疾患（例えば、潰瘍性大腸炎（ＵＣ））等を含む。ＣＤ２０標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＣＤ２０の任意の変異体、イソ型、誘導体および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＣＤ２０遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１１５】

「ＣＤ２２」は分化クラスタ２２のポリペプチドであり、Ｉｇドメインを有し、成熟Ｂ細胞表面の膜貫通受容体である。ヒトの体内で、ＣＤ２２は、主に、Ｂ細胞表面受容体の過剰活性化を抑制し、自己免疫疾患に罹患するリスク（例えば、全身性エリテマトーデス）を低減する。ＣＤ２２に関連する適応症は、例えば、Ｂ細胞リンパ腫、急性慢性白血病、および他のＢ細胞発育異常とＢ細胞依存性自己免疫疾患に関連する病症を含む。ＣＤ２２標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＣＤ２２の任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＣＤ２２遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１１６】

「ＣＤ３０」は腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）受容体のスーパーファミリーメンバーであり、Ｉ型の膜貫通糖タンパク質に属し、生理的で活性化されたＢおよびＴリンパ球として発現する。ＣＤ３０は、主に、全てのホジキンリンパ腫（ＨＬ）、いくつかのＢ細胞リンパ腫、いくつかのＴ細胞リンパ腫、およびＮＫ細胞リンパ腫のようなリンパを起源とする腫瘍に発現し、非病理状態で活性化されたＴ細胞、Ｂ細胞の表面に低発現し、正常細胞に発現しないため、対応する腫瘍マーカーおよび疾患診断の指標とすることができる。ＣＤ３０標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＣＤ３０の任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＣＤ３０遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１１７】

「ＥｐＣＡＭ（上皮細胞接着分子）」は膜貫通糖タンパク質であり、結腸癌から最も早く発見されたＴＡＡである。ＥｐＣＡＭは、異なる程度でほとんどのヒトの腫瘍に過発現し、例えば、肺癌、食管癌、胃癌、乳癌、結腸直腸癌、肝癌、前立腺癌、卵巣癌を含み、腫瘍診断および予後判断に密に関連する。また、ＥｐＣＡＭの過発現は、既にＥｐＣＡＭ抗体および腫瘍関連ワクチンの臨床実験で開発されて適用される。ＥｐＣＡＭ標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＥｐＣＡＭの任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＥｐＣＡＭ遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１１８】

「ＣＥＡ（癌胎児性抗原）」は酸性糖タンパク質であり、腫瘍細胞の表面に存在する抗

原であり、ヒト胚抗原特性を有し、内胚葉を起源とする消化系癌に広く存在し、例えば、胃腸管腫瘍、肝癌、膵臓癌を含み、小細胞肺癌、乳癌、甲状腺髄様癌、癌様体にも存在できる。従い、広域スペクトルの腫瘍マーカーとして様々な腫瘍の診断および治療に使用できる。ＣＥＡ標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＣＥＡの任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＣＥＡ遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１１９】

「Ｈｅｒ２（ヒト表皮成長因子受容体２）」はヒト表皮成長因子受容体のファミリーメンバーであり、多くの腫瘍の発生、発展および病状の軽重はその活性の大きさに密に関連する。遺伝子突然変異または増幅が発生可能であるほか、ｈｅｒ２の上昇は下流の２つの信号伝達経路を活性化し、滝式連鎖反応を引き起こし、細胞の無限増殖を促進し、最終的に癌を引き起こすことができる。また、ｈｅｒ２は、様々な転移関連メカニズムを開始して腫瘍細胞の転移能力を増加することができる。Ｈｅｒ２遺伝子の増幅または過発現は、例えば、乳癌、卵巣癌、胃癌、肺腺癌、前立腺癌、侵襲性子宮癌等の様々な腫瘍で発生する。Ｈｅｒ２標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、Ｈｅｒ２の任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＨｅｒ２遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。種相同体はアカゲザルＨｅｒ２を含む。

【０１２０】

「ＥＧＦＲ（表皮成長因子受容体）」は表皮成長因子受容体のファミリーメンバーであり、哺乳動物の上皮細胞、線維芽細胞、膠細胞、角質細胞等の細胞の表面に広く分布され、腫瘍細胞の増殖、血管生成、腫瘍侵襲、転移および細胞のアポトーシスの抑制に関連する。ＥＧＦＲの突然変異または過発現は、一般的に腫瘍を引き起こし、膠細胞、腎癌、肺癌、前立腺癌、膵臓癌、乳癌等のような多くの実体腫瘍を含む組織においていずれもＥＧＦＲの高発現または異常発現が存在する。ＥＧＦＲ標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＥＧＦＲの任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＥＧＦＲ遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１２１】

「ＧＰＣ－３（グリピカン３）」はグリピカンのファミリーメンバーであり、ほとんどの胚組織に高発現し、細胞増殖の抑制因子である。ＧＰＣ－３の欠失はＳＧＢＳ（過成長症候群）を引き起こすことができ、且つ、ＨＣＣの早期組織に過発現し、肝細胞癌（ＨＣＣ）、メラノーマ、卵巣癌、前立腺癌等の様々な癌に関連する。また、ＧＰＣ－３は、悪性中皮腫、乳癌、肺癌、胃癌、卵巣細胞癌等の悪性腫瘍で発現がサイレンシングとなり、正常組織で発現しないか低発現するため、様々な腫瘍治療および診断の生物マーカーとすることができる。ＧＰＣ－３標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＧＰＣ－３の任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＧＰＣ－３遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１２２】

「Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ（メソテリン）」はメソテリンファミリーに属し、前巨核球の増強因子であり、フューリンのインベルターゼによるタンパク質の加水分解により、巨核球の増強因子（ＭＰＦ）とメソテリンとの２本の鎖に切断することができる。メソテリンは腫瘍分化抗原であり、通常、胸膜、腹膜および心膜ライナーの中皮細胞に存在する。メソテリンは、中皮腫、卵巣癌、肺癌、膵臓癌等のような様々な腫瘍で過発現して免疫原性を有するため、腫瘍マーカーまたは治療性癌ワクチンの抗原標的として使用することがで

きる。Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎの任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＭｅｓｏｔｈｅｌｉｎ遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１２３】

「Ｍｕｃｉｎ１（細胞表面関連ムチン１）」はムチンのメンバーであり、肺、乳腺、胃および膵臓等の組織器官を含む上皮細胞の頂端の表面に発現する。Ｍｕｃｉｎ１の過剰発現、異常の細胞内局在およびグリコシル化変化はいずれも癌に関連し、結腸癌、乳癌、卵巣癌、肺癌および膵臓癌を含んでもよいが、これらに限定されない。免疫組織化学技術により、広範な分泌性上皮細胞、間葉系腫瘍（例えば、滑膜肉腫および卵巣の顆粒膜細胞腫）、およびその腫瘍相当物でＭｕｃｉｎ１を同定することができる。且つ、Ｍｕｃｉｎ１は、腺癌に由来して細胞質拡散による中皮腫（細胞膜および関連する微絨毛に限られる）を区別することができる。従い、Ｍｕｃｉｎ１は、以上の関連疾患または病症と、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を診断して治療するために使用できる。該用語は、Ｍｕｃｉｎ１の任意の変異体、イソ型、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＭｕｃｉｎ１遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１２４】

「ＣＡ１２５（糖類抗原１２５）」は卵巣癌関連抗原であり、胎児の体腔上皮組織に起源し、胸膜、心膜、腹膜、子宮内膜、生殖管および羊膜等の中皮組織細胞の表面に普遍的に分布されている。これらの部位に悪性病変が発生したり、炎症により刺激されたりすると、血清中のＣＡ１２５のレベルは著しく上昇する。最も多く研究された卵巣癌マーカーとして、ＣＡ１２５は、卵巣癌の早期スクリーニング、診断、治療および予後の応用研究でいずれも報告されている。卵巣癌の良性嚢腫瘍および悪性嚢性上皮腫の穿刺液において、ＣＡ１２５のレベルは明らかに上昇することができる。消化管の悪性腫瘍（例えば、膵臓癌、肝癌、胃癌、腸癌）および慢性膵臓炎、慢性肝炎、肝硬変、肺腺癌、骨盤炎症性病変、子宮内膜症の場合、血清ＣＡ１２５のレベルも上昇する。ＣＡ１２５の様々な癌および炎症における研究に鑑み、以上の関連疾患のスクリーニング、診断、治療に広く使用することができる。ＣＡ１２５標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＣＡ１２５の任意の変異体、イソ型、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＣＡ１２５遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１２５】

「ＢＣＭＡ（Ｂ細胞の成熟抗原）」は腫瘍壊死因子受容体のスーパーファミリーメンバーに属し、成熟Ｂリンパ球に優先的に発現し、且つ、形質芽細胞（即ち、形質細胞の前駆体）および形質細胞の表面に発現する。脾臓、リンパ節、胸腺、副腎および肝臓において、いずれもＢＣＭＡのＲＮＡが検出でき、複数のＢ細胞系が成熟した後、そのＢＣＭＡ ｍＲＮＡのレベルも増加する。ＢＣＭＡは、白血病、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫）、多発性骨髄腫、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス）等の様々な疾患に関連するため、関連するＢ細胞疾患に関する潜在的なターゲットとすることができる。ＢＣＭＡ標的点に対する適応症は、他の従来技術で発見されたおよび将来発見する関連疾患または病症を更に含む。該用語は、ＢＣＭＡの任意の変異体、イソ型、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＢＣＭＡ遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１２６】

ＣＤ３分子は、Ｔ細胞膜上の重要な分化抗原であり、成熟したＴ細胞の特徴的な標識であり、６本のペプチド鎖で構成され、非共有結合でＴ細胞抗原受容体（ＴＣＲ）とＴＣＲ－ＣＤ３複合体を構成し、ＴＣＲ－ＣＤ３複合体の細胞スラリー内組み立てに参与するだけでなく、更に各ポリペプチド鎖の細胞スラリー領域の免疫受容チロシン活性化モチーフ

（ｉｍｍｕｎｏｒｅｃｅｐｔｏｒｔｙｒｏｓｉｎｅ－ｂａｓｅｄａｃｔｉｖａｔｉｏｎｍｏｔｉｆ、ＩＴＡＭ）により抗原刺激信号を伝達する。ＣＤ３分子の主要機能は、ＴＣＲ構造を安定化し、Ｔ細胞の活性化信号を伝達し、ＴＣＲが抗原を特異的に識別して結合すると、ＣＤ３は、信号をＴ細胞の細胞スラリー内に伝達することに参与し、Ｔ細胞の活性化を誘導する第１の信号とし、Ｔ細胞の抗原識別および免疫応答の産生過程で極めて重要な作用を有することである。

【０１２７】

「ＣＤ３」とは、Ｔ細胞受容体複合体の一部として３つの異なる鎖ＣＤ３ε、ＣＤ３δおよびＣＤ３γで構成されることを意味する。ＣＤ３は、Ｔ細胞で、例えば、抗ＣＤ３抗体のそれに対する固定作用によるクラスタリング（ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ）によりＴ細胞の活性化を引き起こし、Ｔ細胞受容体により媒介される活性化に類似するが、ＴＣＲクローンの特異性に依存しない。ほとんどの抗ＣＤ３抗体がＣＤ３ε鎖を識別する。本発明におけるＴ細胞表面受容体ＣＤ３を特異的に識別する第２の機能領域は、ＣＤ３を特異的に識別できれば制限されず、例えば、ＵＳ７９９４２８９、ＵＳ６７５０３２５、ＵＳ６７０６２６５、ＵＳ５９６８５０９、ＵＳ８０７６４５９、ＵＳ７７２８１１４、ＵＳ２０１００１８３６１５という特許に記載されたＣＤ３抗体であるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明に使用される抗ヒトＣＤ３抗体はカニクイザルおよび／またはアカゲザルと交差反応性を有し、例えば、ＷＯ２０１６１３０７２６、ＵＳ２００５０１７６０２８、ＷＯ２００７０４２２６１、またはＷＯ２００８１１９５６５という特許に記載された抗ヒトＣＤ３抗体であるが、これらに限定されない。該用語は、任意のＣＤ３変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、細胞により天然に発現されるか、または前述した鎖をコードする遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞で発現される。

【０１２８】

「超可変領域」または「ＣＤＲ領域」または「相補性決定領域」という用語は、抗原結合を担当する抗体のアミノ酸残基を指し、非連続的なアミノ酸配列である。ＣＤＲ領域の配列は、ＩＭＧＴ、Ｋａｂａｔ、ＣｈｏｔｈｉａおよびＡｂＭ方法で定義された、または本分野でよく知られている任意のＣＤＲ領域の配列の確定方法により同定された可変領域内のアミノ酸残基であってもよい。例えば、超可変領域は、配列比較で規定された「相補性決定領域」または「ＣＤＲ」に由来するアミノ酸残基、例えば、軽鎖の可変ドメインの２４～３４（Ｌ１）、５０～５６（Ｌ２）および８９～９７（Ｌ３）－位の残基と重鎖の可変ドメインの３１～３５（Ｈ１）、５０～６５（Ｈ２）および９５～１０２（Ｈ３）－位の残基（Ｋａｂａｔら、１９９１、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（免疫目的物のタンパク質配列）、第５版、Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．を参照）、および／または構造に基づいて規定された「超可変リング」（ＨＶＬ）に由来する残基、例えば、軽鎖の可変ドメインの２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）および９１～９６（Ｌ３）－位の残基と重鎖の可変ドメインの２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）および９６～１０１（Ｈ３）位の残基（ＣｈｏｔｈｉａおよびＬｅｓｋｌ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１～９１７、１９８７を参照）というアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」残基または「ＦＲ」残基は、本発明で定義された超可変領域の残基以外の可変ドメイン残基である。いくつかの実施形態において、本発明の抗体またはその抗原結合断片に含まれるＣＤＲは、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、またはＩＭＧＴ番号システムにより確定されることが好ましい。当業者は、配列自体以外の任意のデータに依存せずに各システムに任意の可変ドメイン配列を明確に付与することができる。例えば、抗体のＫａｂａｔ残基番号を付与する方式は、抗体配列と各「標準」番号配列との相同領域を対照するにより確定できる。本発明が提供する配列の番号に基づき、配列表における任意の可変領域の配列の番号を確定する形態は、完全に当業者の通常の技術範囲内にある。

【０１２９】

「一本鎖Ｆｖ抗体」（または「ｓｃＦｖ抗体」）という用語は、抗体のＶＨおよびＶＬドメインを含む抗体断片を指し、リンカー（ｌｉｎｋｅｒ）を介して連結される重鎖の可変領域（ＶＨ）および軽鎖の可変領域（ＶＬ）の組換えタンパク質であり、リンカーは、この２つのドメインを架橋させて抗原結合サイトを形成し、リンカーの配列は、一般的にフレキシブルペプチドで構成され、例えば、G_2（ＧＧＧＧＳ）$_3$であるが、これらに限定されない。ｓｃＦｖの大きさは一般的に１つの完全な抗体の１／６である。一本鎖抗体は、１つのヌクレオチド鎖でコードされた１本のアミノ酸鎖の配列であることが好ましい。ｓｃＦｖの概要は、Ｐｌｕｃｋｔｈｕｎ（１９９４）Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（モノクローナル抗体の薬理学）、第１１３巻、ＲｏｓｅｎｂｕｒｇおよびＭｏｏｒｅにより編集され、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、２６９～３１５ページを参照することができる。更に、国際特許出願公開番号ＷＯ８８／０１６４９、米国特許第４９４６７７８号および第５２６０２０３号を参照する。

【０１３０】

「Ｆａｂ断片」という用語は、１本の軽鎖および１本の重鎖のＣＨ１と可変領域とで構成される。Ｆａｂ分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。「Ｆａｂ抗体」の大きさは、完全な抗体の１／３であり、１つの抗原結合サイトのみを含む。

【０１３１】

「Ｆａｂ’断片」という用語は、１本の軽鎖および１本の重鎖のＶＨドメイン、ＣＨ１ドメイン、およびＣＨ１とＣＨ２ドメインとの間の定常領域の部分を含む。

【０１３２】

「Ｆ（ａｂ’）２断片」という用語は、２本の軽鎖および２本の重鎖のＶＨドメイン、ＣＨ１ドメイン、およびＣＨ１とＣＨ２ドメインとの間の定常領域の部分を含み、これにより、２本の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合を形成する。従い、Ｆ（ａｂ’）２断片は、２本の重鎖間のジスルフィド結合により一体に保持される２つのＦａｂ’断片で構成される。

【０１３３】

「Ｆｃ領域」という用語は、抗体の重鎖の定常領域断片を指し、少なくともヒンジ領域、ＣＨ２およびＣＨ３ドメインを含む。

【０１３４】

「Ｆｖ領域」という用語は、重鎖と軽鎖との両者に由来する可変領域を含むが、定常領域が欠け、完全な抗原識別および結合サイトを含む最小の断片である。

【０１３５】

「抗体断片」または「抗原結合断片」という用語は、抗原（例えば、Ｈｅｒ２）との特異的な結合能力を保留する抗体の抗原結合断片および抗体類似体を指し、通常、少なくとも一部の親抗体（Ｐａｒｅｎｔａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体断片は、親抗体の少なくとも一部の結合特異性を保留する。通常、モルで活性を表す場合、抗体断片は、少なくとも１０％の親結合活性を保留する。好ましくは、抗体断片は、少なくとも２０％、５０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％の親抗体のターゲットに対する結合親和性を保留する。抗体断片は、Ｆａｂ断片、Ｆａｂ’断片、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆｖ断片、Ｆｄ断片、相補性決定領域（ＣＤＲ）断片、ジスルフィド結合安定性タンパク質（ｄｓＦｖ）等と、線形抗体（Ｌｉｎｅａｒ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）、一本鎖抗体（例えば、ｓｃＦｖ単一抗体）（技術はＧｅｎｍａｂに由来する）、２価の一本鎖抗体、一本鎖ファージ抗体、単一ドメイン抗体（Ｓｉｎｇｌｅ Ｄｏｍａｉｎ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）（例えば、ＶＨドメイン抗体）、ドメイン抗体（技術はＡｂＩｙｎｘに由来する）と、抗体断片で形成された多特異的抗体（例えば、３鎖抗体、４鎖抗体等）と、キメラ抗体（Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）（例えば、ヒト由来マウス抗体）のような工学的改造された抗体と、ヘテロコンジュゲート抗体（Ｈｅｔｅｒｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ）等とを含んでもよいが、これらに限定されない。これらの抗体断片は、当業者に知られている通常の技術で取得され、完全な抗体と同じ

方法でこれらの断片の実用性をスクリーニングする。

【０１３６】

「リンカーペプチド」という用語は、２つのポリペプチドを連結するペプチドを指し、ここで、前記リンカーペプチドは、２つの免疫グロブリンの可変領域または１つの可変領域であってもよい。リンカーペプチドの長さは、０～３０個のアミノ酸または０～４０個のアミノ酸であってもよい。いくつかの実施形態において、リンカーペプチドは、０～２５、０～２０、または０～１８個のアミノ酸の長さであってもよい。いくつかの実施形態において、リンカーペプチドは、１４、１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、または５個以下のアミノ酸長のペプチドであってもよい。他の実施形態において、リンカーペプチドは、０～２５、５～１５、１０～２０、１５～２０、２０～３０、または３０～４０個のアミノ酸長であってもよい。他の実施形態において、リンカーペプチドは、約０、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、または３０個のアミノ酸長であってもよい。リンカーペプチドは当業者に知られているものである。リンカーペプチドの調製は、本分野の任意の方法を採用してもよい。例えば、リンカーペプチドは合成によるものであってもよい。

【０１３７】

「重鎖の定常領域」という用語は、免疫グロブリンの重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。重鎖の定常領域を含むポリペプチドは、ＣＨ１ドメイン、ヒンジ（例えば、上部ヒンジ領域、中間ヒンジ領域、および／または下部ヒンジ領域）ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン、またはその変異体、または断片のうちの１種を少なくとも含む。例えば、本発明に使用される抗原結合ポリペプチドは、ＣＨ１ドメインを有するポリペプチド鎖と、ＣＨ１ドメイン、少なくとも一部のヒンジドメインおよびＣＨ２ドメインを有するポリペプチドと、ＣＨ１ドメインおよびＣＨ３ドメインを有するポリペプチド鎖と、ＣＨ１ドメイン、少なくとも一部のヒンジドメインおよびＣＨ３ドメインを有するポリペプチド鎖と、またはＣＨ１ドメイン、少なくとも一部のヒンジ構造、ＣＨ２ドメイン、およびＣＨ３ドメインを有するポリペプチド鎖とを含んでもよい。別の実施例において、本発明のポリペプチドは、ＣＨ３ドメインを有するポリペプチド鎖を含む。また、本発明に使用される抗体は、少なくとも一部のＣＨ２ドメイン（例えば、全てまたは一部のＣＨ２ドメイン）が欠ける可能性がある。上述したように、当業者は、重鎖の定常領域が修正される可能性があるため、それらがアミノ酸配列で天然に存在する免疫グロブリン分子と異なることを理解すべきである。

【０１３８】

「軽鎖の定常領域」という用語は、抗体の軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。好ましくは、前記軽鎖の定常領域は、定常ｋａｐｐａドメインと定常ｌａｍｂｄａドメインとのうちの少なくとも１つを含む。

【０１３９】

「ＶＨドメイン」という用語は、免疫グロブリンの重鎖のアミノ基末端の可変ドメインを含み、「ＣＨ１ドメイン」という用語は、免疫グロブリンの重鎖の第１（アミノ基末端であることが多い）の定常領域を含む。ＣＨ１ドメインはＶＨドメインに隣接し、且つ、免疫グロブリンの重鎖分子のヒンジ領域のアミノ基末端である。

【０１４０】

「結合」は、抗原上の特定のエピトープとそれに対応する抗体との間の親和性相互作用を定義し、一般的に、「特異的識別」とも理解される。「特異的識別」は、本発明の二重特異性抗体が、ターゲット抗原以外の任意のポリペプチドと交差反応しない、またはほぼ交差反応しないことを意味する。特異性の程度は免疫学的技術により判断でき、ウエスタンブロッティング、免疫アフィニティークロマトグラフィー、フローサイトメトリー等を含んでもよいが、これらに限定されない。本発明において、特異的識別は、フローサイトメトリーにより確定されることが好ましく、具体的な場合、特異的識別の標準は、当業者が把握している本分野の常識により判断することができる。

【０１４１】
「体内半減期」という用語は、ターゲットポリペプチドが所定の動物の循環における生物半減期を指し、動物で循環および／または他の組織から該動物の循環に存在する量の一半を除去するために必要な時間として表される。
【０１４２】
「同一性」という用語は、２つのポリペプチド間、または２つの核酸間の配列のマッチング状況を指すために用いられる。比較する２つの配列のうちのある位置がいずれも同じ塩基またはアミノ酸のモノマーサブユニットにより占められている（例えば、２つのＤＮＡ分子のそれぞれにおけるある位置がいずれもアデニンにより占められ、または２つのポリペプチドのそれぞれにおけるある位置がいずれもリジンにより占められている）場合、各分子は該位置で同一である。２つの配列間の「パーセント同一性」は、この２つの配列が共有するマッチング位置数を、比較する位置数で割って×１００関数である。例えば、２つの配列の１０個の位置のうち、６つがマッチングすれば、この２つの配列は６０％の同一性を有する。例えば、ＤＮＡ配列ＣＴＧＡＣＴおよびＣＡＧＧＴＴが５０％の同一性（合計６つの位置のうち、３つの位置がマッチングしている）を共有する。通常、２つの配列を照合して最大の同一性を生成する時に比較する。このような照合は、例えば、Ａｌｉｇｎプログラム（ＤＮＡｓｔａｒ、Ｉｎｃ．）のようなコンピュータプログラムで行いやすい方法（Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら（１９７０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４８：４４３～４５３）を使用することにより実現できる。更に、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に統合されたＥ．ＭｅｙｅｒｓおよびＷ．Ｍｉｌｌｅｒ（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ Ｂｉｏｓｃｉ．，４：１１～１７（１９８８））のアルゴリズムを使用し、ＰＡＭ１２０重み残基テーブル（ｗｅｉｇｈｔ ｒｅｓｉｄｕｅ ｔａｂｌｅ）、１２のギャップ長ペナルティおよび４のギャップペナルティで２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を測定することもできる。また、ＧＣＧパッケージ（ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍから取得できる）に統合されたＧＡＰプログラムにおけるＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ（Ｊ．ＭｏＩ．Ｂｉｏｌ．，４８：４４４－４５３（１９７０））のアルゴリズムを使用し、Ｂｌｏｓｓｕｍ ６２マトリックスまたはＰＡＭ２５０マトリックス、１６、１４、１２、１０、８、６、または４のギャップ重み（ｇａｐ ｗｅｉｇｈｔ）、および１、２、３、４、５、または６の長さ重みで２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を測定することができる。
【０１４３】
「Ｆｃ領域」または「Ｆｃ断片」という用語は、免疫グロブリンの重鎖のＣ端領域を指し、ヒンジ領域の少なくとも一部、ＣＨ２ドメインおよびＣＨ３ドメインを含み、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）に位置するＦｃ受容体との結合、または古典的な補体系の第１の成分（Ｃ１ｑ）との結合を含む免疫グロブリンと宿主組織または因子との結合を媒介し、天然配列Ｆｃ領域および変異Ｆｃ領域を含む。
【０１４４】
通常、ヒトＩｇＧの重鎖のＦｃ領域は、そのＣｙｓ２２６またはＰｒｏ２３０位置のアミノ酸残基からカルボキシル基の末端までのセグメントであるが、その境界が変化する可能性がある。Ｆｃ領域のＣ－末端のリジン（残基４４７、ＥＵ番号システムによる）は存在してもよいし、存在しなくてもよい。Ｆｃは、更に隔離されたこの領域を指すこともできるし、またはＦｃを含むタンパク質ポリペプチドの場合、例えば、「Ｆｃ領域を含む結合タンパク質」は、「Ｆｃ融合タンパク質」（例えば、抗体またはイムノアドヘシン）とも呼ばれる。本発明の抗体における天然配列Ｆｃ領域は、哺乳動物（例えば、ヒト）ＩｇＧ１、ＩｇＧ２（ＩｇＧ２Ａ、ＩｇＧ２Ｂ）、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４を含む。ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域において、少なくとも２つの対立遺伝子のタイプが知られている。いくつかの実施形態において、哺乳動物のＦｃポリペプチドアミノ酸配列の配列に対し、２本のＦｃポリペプチド鎖のアミノ酸配列における１００個あたりのアミノ酸において１０個程度のアミノ酸の単一アミノ酸の置換、挿入および／または欠失を有する。いくつかの実施形態において、上記異なりは、半減期を延長するＦｃの改変、ＦｃＲｎとの結合を増加す

る改変、ＦｃγＲ受容体（ＦｃγＲ）結合を抑制する改変、および／またはＡＤＣＣおよびＣＤＣを低減または除去する改変であってもよい。

【０１４５】

「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」という用語は、免疫グロブリンのＦｃ領域と結合する受容体を指す。ＦｃＲは、天然配列であるヒトＦｃＲであってもよいし、ＩｇＧ抗体と結合するＦｃＲ（γ受容体）であってもよいし、これらの受容体の対立遺伝子の変異体および可変な剪断接着形式であってもよい。ＦｃγＲファミリーは、３種の活性化受容体（マウスにおけるＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＩおよびＦｃγＲＩＶ、ヒトにおけるＦｃγＲＩＡ、ＦｃγＲＩＩＡおよびＦｃγＲＩＩＩＡ）および１種の抑制性受容体（ＦｃγＲＩＩｂまたは同等のＦｃγＲＩＩＢ）で構成される。ＦｃγＲＩＩ受容体は、ＦｃγＲＩＩＡ（「活性化受容体」）およびＦｃγＲＩＩＢ（「抑制受容体」）を含み、それらが類似するアミノ酸配列を有する。ＦｃγＲＩＩＡの細胞質ドメインには、免疫受容体がチロシンに基づく活性化モチーフ（ＩＴＡＭ）が含まれている。ＦｃγＲＩＩＢの細胞質ドメインには、免疫受容体がチロシンに基づく抑制モチーフ（ＩＴＩＭ）が含まれている（Ｍ．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５：２０３～２３４（１９９７）を参照）。ほとんどの天然エフェクター細胞タイプは、１種または複数種の活性化ＦｃγＲと抑制性ＦｃγＲＩＩｂとを共発現する一方、ＮＫ細胞は、１種の活性化Ｆｃ受容体（マウスにおけるＦｃγＲＩＩＩおよびヒトにおけるＦｃγＲＩＩＩＡ）を選択的に発現するが、マウスおよびヒトで抑制性ＦｃγＲＩＩｂを発現しない。ヒトＩｇＧ１はほとんどのヒトＦｃ受容体と結合し、それに結合する活性化Ｆｃ受容体のタイプの面で、マウスＩｇＧ２ａに相当すると考えられる。「ＦｃＲ」という用語は、本発明で他のＦｃＲをカバーし、将来同定するものを含む。ＦｃＲｎとの結合の測定方法は知られているものである（例えば、Ｇｈｅｔｉｅ Ｖら、Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ、１８：５９２－８、１９９７）、Ｇｈｅｔｉｅ Ｖら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、１５：６３７－４０、１９９７）を参照）。例えば、ヒトＦｃＲｎを発現するトランスジェニックマウスまたはトランスフェクションされたヒト細胞系において、ヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドのＦｃＲｎとの体内結合および血清半減期を測定することができる。「Ｆｃ受容体」または「ＦｃＲ」という用語は、新生児受容体ＦｃＲｎを更に含み、親ＩｇＧを胎児に転移することを担当する（（Ｇｕｙｅｒ ＲＬら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１１７：５８７、１９７６）および（Ｋｉｍ ＹＪら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２４：２４９、１９９４））。

【０１４６】

「ヒト由来抗体」という用語は、遺伝子工学的手法により改造された非ヒト由来抗体を指し、そのアミノ酸配列は、ヒト由来抗体の配列との相同性を向上させるために修飾される。非ヒト抗体のＣＤＲドメイン外の大部分または全てのアミノ酸、例えば、マウス抗体は、ヒト免疫グロブリンに由来する対応するアミノ酸により置換され、１つまたは複数のＣＤＲ領域内の大部分または全てのアミノ酸は改変されていない。小分子アミノ酸の付加、削除、挿入、置換、または修飾は、抗体の特定の抗原との結合能力を除去しない限り許容される。「ヒト由来」抗体は、原始抗体に類似する抗原特異性を保留する。ＣＤＲの由来は特に限定されず、任意の動物に由来してもよい。例えば、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、または非ヒト霊長類動物（例えば、カニクイザル）抗体に由来するものを利用することができる。本発明に使用可能なヒトフレームワークの実例は、ＫＯＬ、ＮＥＷＭ、ＲＥＩ、ＥＵ、ＴＵＲ、ＴＥＩ、ＬＡＹおよびＰＯＭ（Ｋａｂａｔら、同上）である。例えば、ＫＯＬおよびＮＥＷＭは重鎖に使用でき、ＲＥＩは軽鎖およびＥＵに使用でき、ＬＡＹおよびＰＯＭは重鎖と軽鎖との両者に使用できる。または、人種系配列を使用することができる。これらは、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ２．ｍｒｃ－ｌｍｂ．ｃａｍ．ａｃ．ｕｋ／ｖｂａｓｅ／ｌｉｓｔ２．ｐｈｐというウェブサイトから取得できる。本発明のヒト由来抗体分子において、受容体の重鎖および軽鎖は同じ抗体に由来する必要がなく、且つ、必要な場合、異なる鎖に由来するフレームワーク領域を有する複合鎖を含んでもよい。

【０１４７】

「サイトカイン」という用語は、一般的に１種の細胞群から放出された、細胞間媒体と

して別の細胞に作用する、または該タンパク質を生成する細胞に対して自己分泌の影響を有するタンパク質を指す。このようなサイトカインの例は、リンホカインと、モノカインと、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－１７Ａ－Ｆのようなインターロイキン（「ＩＬ」）と、ＴＮＦ－α、またはＴＮＦ－βのような腫瘍壊死因子と、白血病抑制因子（「ＬＩＦ」）のような他のポリペプチド因子とを含む。

【０１４８】

「免疫結合」および「免疫結合性質」という用語は１種の非共有相互作用を指し、免疫グロブリン分子と抗原（該抗原にとって、免疫グロブリンは特異的である）との間で発生する。免疫結合相互作用の強度または親和性は、相互作用できる平衡解離定数（K_D）で表すことができ、K_D値が小さければ小さいほど、親和性が高いことを表す。選択されたポリペプチドの免疫結合性質は、本分野で公知の方法で定量することができる。１つの方法は、抗原結合サイト／抗原複合体の形成および解離の速度を測定することに関する。「結合速度定数」（K_aまたはK_{on}）と「解離速度定数」（K_dまたはK_{off}）との両者は、いずれも濃度、会合と解離の実際速率により計算することができる。（Ｍａｌｍｑｖｉｓｔ　Ｍら、Ｎａｔｕｒｅ、３６１：１８６～１８７、１９９３参照）。k_d／k_aの比率は解離定数K_Dに等しい（通常、Ｄａｖｉｅｓ　Ｃら、Ａｎｎｕａｌ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，５９：４３９～４７３、１９９０参照）。任意の有効な方法でK_D、k_aおよびk_d値を測定することができる。

【０１４９】

「交差反応」という用語は、本発明に係る抗体の、異なる種に由来する腫瘍関連抗原と結合する能力を指す。例えば、本発明に係るヒトＴＡＡと結合する抗体は、他の種に由来するＴＡＡ（例えば、カニクイザルのＴＡＡ）と結合することもできる。交差反応性は、結合測定法（例えば、ＳＰＲ、ＥＬＩＳＡ）で精製抗原との特定の反応性、またはＴＡＡを生理的に発現する細胞との結合、または他の方式でＴＡＡを生理的に発現する細胞機能との相互作用を検出することにより測定できる。本分野で知られている結合親和性を測定する分析の実例は、表面プラズモン共鳴（例えば、Ｂｉａｃｏｒｅ）または類似する技術（例えば、Ｋｉｎｅｘａ、またはＯｃｔｅｔ）を含む。

【０１５０】

「EC_{50}」という用語は、抗体またはその抗原結合断片を用いて行われる体外または体内測定において、５０％応答を誘導する抗体またはその抗原結合断片の濃度の最大応答、即ち、最大応答とベースラインとの間の半分を指す。

【０１５１】

「エフェクター細胞」とは、免疫系の１種の細胞を指し、１種または複数種のＦｃＲを発現し、１種または複数種のエフェクター機能を媒介する。好ましくは、該細胞は、少なくとも１種のタイプの活性化Ｆｃ受容体、例えば、ヒトＦｃγＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を実行する。ＡＤＣＣを媒介するヒト白血球の実例は、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、ＮＫ細胞、単核球、マクロファージ、好中球、および好酸球を含む。エフェクター細胞は、例えば、Ｔ細胞も含む。それらは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含んでもよいが、これらに限定されない任意の生物体に由来してもよい。

【０１５２】

「エフェクター機能」という用語は、抗体のＦｃ領域（天然配列のＦｃ領域またはアミノ酸配列変異体のＦｃ領域）に起因する生物学的活性を指し、抗体のアイソタイプに従って変化する。抗体のエフェクター機能の例は、Ｆｃ受容体結合親和性、ＡＤＣＣ、ＡＤＣＰ、ＣＤＣ、細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）の低下、Ｂ細胞活性化、サイトカイン分泌、抗体および抗原－抗体複合体の半減期／除去率等を含んでもよいが、これらに限定されない。抗体のエフェクター機能を改変する方法は本分野で知られているものであり、例えば、Ｆｃ領域に突然変異を導入することにより行う。

【０１５３】

「抗体依存性細胞により媒介される細胞毒性（ＡＤＣＣ）」という用語は、細胞毒性の形式を指し、Ｉｇは、細胞毒性細胞（例えば、ＮＫ細胞、好中球、またはマクロファージ

）に存在するＦｃＲと結合することにより、これらの細胞毒性エフェクター細胞を抗原に付着された標的細胞に特異的に結合させ、その後、細胞毒素を分泌することで標的細胞を殺す。抗体のＡＤＣＣ活性の検出方法は本分野で知られているものであり、例えば、測定待ち抗体とＦｃＲ（例えば、ＣＤ１６ａ）との間の結合活性を測定することにより評価することができる。

【０１５４】

「抗体依存性細胞により媒介される貪食作用（ＡＤＣＰ）」という用語は、細胞により媒介される反応を指し、該反応において、ＦｃγＲを発現する非特異性細胞傷害活性細胞は、標的細胞に結合する抗体を識別した後、該標的細胞の貪食を引き起こす。

【０１５５】

「補体依存的な細胞毒性（ＣＤＣ）」という用語は、補体成分Ｃ１ｑと抗体Ｆｃとを結合させることにより補体カスケードを活性化する細胞毒性の形式を指す。抗体のＣＤＣ活性の検出方法は本分野で知られているものであり、例えば、測定待ち抗体とＦｃ受容体（例えば、Ｃ１ｑ）との間の結合活性を測定することにより評価することができる。

【０１５６】

「医薬的に許容されるベクターおよび／または賦形剤および／または安定剤」という用語は、薬理学および／または生理学で被験者および活性成分に合わせるベクターおよび／または賦形剤および／または安定剤を指し、それらの使用される用量および濃度は、それに暴露された細胞または哺乳動物に対して無毒である。ｐＨ調整剤、界面活性剤、アジュバント、イオン強度増強剤、希釈剤、浸透圧を維持する試薬、吸収を遅延させる試薬、防腐剤を含んでもよいが、これらに限定されない。例えば、ｐＨ調整剤は、リン酸塩緩衝液を含んでもよいが、これらに限定されない。界面活性剤は、陽イオン、陰イオン、または、非イオン性界面活性剤、例えば、Ｔｗｅｅｎ－８０を含んでもよいが、これらに限定されない。イオン強度増強剤は、塩化ナトリウムを含んでもよいが、これらに限定されない。防腐剤は、様々な抗細菌試薬および抗真菌試薬を含んでもよいが、これらに限定されず、例えば、パラオキシ安息香酸エステル、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等である。浸透圧を維持する試薬は、糖、ＮａＣｌ及その類似体を含んでもよいが、これらに限定されない。吸収を遅延させる試薬は、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含んでもよいが、これらに限定されない。希釈剤は、水、水性緩衝液（例えば、緩衝生理食塩水）、アルコール、および多価アルコール（例えば、グリセリン）等を含んでもよいが、これらに限定されない。防腐剤は、様々な抗細菌試薬および抗真菌試薬、例えば、チメロサール、２－フェノキシエタノール、パラオキシ安息香酸エステル、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等を含んでもよいが、これらに限定されない。安定剤は、当業者が通常理解する意味を有し、薬剤における活性成分の所望の活性を安定化することができ、グルタミン酸ナトリウム、ゼラチン、ＳＰＧＡ、糖類（例えば、ソルビトール、マンニトール、デンプン、ショ糖、乳糖、デキストラン、またはデキストラン）、アミノ酸（例えば、グルタミン酸、グリシン）、タンパク質（例えば、乾燥ホエー、アルブミン、またはカゼイン）、またはその分解生成物（例えば、ラクトアルブミン加水分解物）等を含んでもよいが、これらに限定されない。

【０１５７】

「有効量」という用語は、所望の効果を取得できるまたは少なくとも部分的に取得できる量を指す。例えば、疾患（例えば、腫瘍または感染）予防有効量とは、単独で使用するまたは別の１種または複数種の治療剤と組み合わせて使用する場合、疾患（例えば、腫瘍、または感染）の発生を予防、阻止、または遅延できる量を指す。疾患治療有効量とは、単独で使用するまたは別の１種または複数種の治療剤と組み合わせて使用する場合、疾患に罹患している患者の疾患およびその合併症を治癒または少なくとも部分的に阻止できる量を指す。このような有効量を測定することは、完全に当業者の能力範囲内にある。例えば、治療用途に有効な量は、治療待ち疾患の重篤度、患者自身の免疫系の全体的な状態、年齢、体重および性別のような患者の一般的な状況、薬剤の投与方式、および同時に使用される他の治療等に依存する。治療に関する「有効」および「有効性」という用語は、薬

理学的有効性と生理学的安全性との両者を含む。薬理学的有効性とは、薬剤の患者の病症または症状を解消させる能力を指す。生理学的安全性とは、薬剤投与による細胞、器官および／または生物体レベルでの毒性または他の不良な生理効果（不良作用）のレベルを指す。

【０１５８】

被験者に対する「治療」または「療法」は、疾患に関連する症状、合併症、病症、または生化学的指標の出現、進展、発展、重篤度、または再発を逆転、軽減、改善、抑制、緩和、または防止することを目的として被験者に対して行われる任意のタイプの介入、または処理、または活性剤の投与を指す。

【０１５９】

「Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）」という用語は、Ｔ細胞、即ち、Ｔリンパ球の表面に存在する特殊な受容体を指す。体内のＴ細胞受容体は、いくつかのタンパク質の複合体として存在する。Ｔ細胞受容体は、通常、２つの単独なペプチド鎖を有し、通常、Ｔ細胞受容体αおよびβ（ＴＣＲαおよびＴＣＲβ）鎖であり、いくつかのＴ細胞でＴ細胞受容体γおよびδ（ＴＣＲγおよびＴＣＲδ）である。複合体における他のタンパク質は、ＣＤ３εγおよびＣＤ３εδヘテロ二量体のようなＣＤ３タンパク質であり、最も重要なのは、６つのＩＴＡＭモチーフのＣＤ３ζ相同二量体がある。ＣＤ３ζにおけるＩＴＡＭモチーフは、Ｌｃｋによりリン酸化されて逆にＺＡＰ－７０を募集することができる。Ｌｃｋおよび／またはＺＡＰ－７０は、多くの他の分子でチロシンをリン酸化することができ、特に、ＣＤ２８、ＬＡＴおよびＳＬＰ－７６であり、これにより、これらのタンパク質を囲む信号が複合体凝集を伝導することが許容される。

【０１６０】

「二重特異性抗体」という用語は、本発明の二重特異性抗体を指し、例えば、抗Ｈｅｒ２抗体またはその抗原結合断片が誘導化できるか、または別のペプチドまたはタンパク質（例えば、ＴＡＡ、サイトカインおよび細胞表面受容体）のような別の機能性分子に連結されて少なくとも２種の異なる結合サイトまたは標的分子と結合する二重特異性分子を生成することができる。本発明の二重特異性分子を作成するために、本発明の抗体を機能で（例えば、化学カップリング、遺伝子融合、非共有結合、または他の方式により）別の抗体、抗体断片、ペプチド、または結合模倣物のような１種または複数種の他の結合分子に連結することにより、二重特異性分子を産生することができる。例えば、「二重特異性抗体」とは、２つの可変ドメインまたはｓｃＦｖ単位を含むことで得られた抗体が２種の異なる抗原を識別することを指す。本分野では、二重特異性抗体の多くの異なる形式および使用が知られている（Ｃｈａｍｅｓ　Ｐら、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃ．Ｄｅｖ．，１２：．２７６、２００９、Ｓｐｉｅｓｓ　Ｃら、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６７：９５～１０６、２０１５）。

【０１６１】

「ｈＣＧ－βカルボキシル基末端ペプチド（ＣＴＰ）」という用語は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（ｈＣＧ）に由来するβ－サブユニットカルボキシル末端の短いペプチドである。卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、黄体化ホルモン（ＬＨ）、甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、および絨毛性性腺刺激ホルモン（ｈＣＧ）という４種の生殖に関連するポリペプチド系ホルモンは、同じα－サブユニットおよびそれぞれ特異的なβ－サブユニットを含む。他の３種のホルモンと比べ、ｈＣＧの体内半減期が明らかに延長され、これは主にそのβ－サブユニットにおける特有のカルボキシル基末端のペプチド（ＣＴＰ）に起因する。ＣＴＰは３７個のアミノ酸残基を含み、４つのＯ－グリコシル化サイトを有し、糖側鎖末端はシアル酸残基である。負に帯電して高度にシアル酸化されたＣＴＰは、腎臓による除去作用に抵抗してタンパク質の体内での半減期を延長することができる（Ｆａｒｅｓ　ＦＡら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８９：４３０４～４３０８、１９９２）。

【０１６２】

「グリコシル化」という用語は、オリゴ糖（一体に連結された２つ以上の単糖を含み、

例えば、一体に連結された２つ～約１２個の単糖の炭水化物）が付着して糖タンパク質を形成することを指す。オリゴ糖側鎖は、通常、Ｎ－連結またはＯ－連結を介して糖タンパク質の骨格に連結される。本発明に開示された抗体のオリゴ糖は、通常、Ｆｃ領域に連結されたＣＨ２ドメインであり、Ｎ－連結のオリゴ糖とする。「Ｎ－連結のグリコシル化」とは、炭水化物類部分が糖タンパク質鎖のアスパラギン残基に連結されることを指す。例えば、技術者は、マウスＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、およびヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＤのＣＨ２ドメインにおけるそれぞれが、残基２９７箇所にＮ－連結のグリコシル化用の単一サイトがあることを識別することができる。

【０１６３】

［相同抗体］

更なる態様において、本発明の抗体に含まれる重鎖および軽鎖の可変領域に含まれるアミノ酸配列は、本発明に係る好ましい抗体のアミノ酸配列と相同であり、且つ、ここで、前記抗体は、本発明に係る、例えば、Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体の所望の機能特性を保留する。

【０１６４】

［保存的修飾を有する抗体］

「保存的修飾」という用語は、アミノ酸修飾が該アミノ酸配列を含む抗体の結合特徴に著しく影響を及ぼすまたは改変することがないことを意味する。このような保存的修飾は、アミノ酸の置換、付加および欠失を含む。修飾は、本分野で知られている標準的技術、例えば、定点変異誘導およびＰＣＲにより媒介される利点により本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基を、類似する側鎖を有するアミノ酸残基で置換することを指す。本分野で、類似する側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーについては既に詳細に説明した。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、電荷を持たない極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β－分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。従い、同一側鎖ファミリーに由来する他のアミノ酸残基で本発明の抗体ＣＤＲ領域における１つまたは複数のアミノ酸残基を置換することができる。

【０１６５】

［新生児受容体（ＦｃＲｎ）との結合親和性が改変されたＦｃ変異体］

ここで使用される「ＦｃＲｎ」とは、ＩｇＧ抗体のＦｃ領域と結合する少なくとも一部がＦｃＲｎ遺伝子によりコードされるタンパク質を指す。ＦｃＲｎは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ子およびサルを含んでもよいが、これらに限定されない任意の生物体に由来してもよい。機能性ＦｃＲｎタンパク質は、よく重鎖および軽鎖と呼ばれる２本のポリペプチドを含み、軽鎖はβ－２－マイクログロブリンであり、重鎖はＦｃＲｎ遺伝子によりコードされる。

【０１６６】

本発明は、ＦｃＲｎとの結合が調節された抗体（調節は、結合の増加および低減を含む）に関する。例えば、ある場合、増加された結合により、細胞が抗体を再循環させ、且つ、これにより、例えば、治療抗体の半減期を延長する。ある場合、ＦｃＲｎとの結合を低減することは必要であり、例えば、放射線マーカーを含む診断抗体または治療抗体として使用される場合である。また、ＦｃＲｎとの結合が増加することを示すとともに、ＦｃγＲｓのような他のＦｃ受容体との結合が改変された抗体は、本発明に使用できる。

【０１６７】

本発明は、ＦｃＲｎとの結合力を調節するアミノ酸修飾を含む抗体に関する。特殊な意義を持つのは、ｐＨが低い場合、ＦｃＲｎとの結合親和性が増加することを示すが、ｐＨ

が高い場合、結合はほぼ改変を示さずにＦｃ領域の抗体またはその機能性変異体を最低限に含むことである。

【０１６８】

［新生児受容体（ＦｃＲｎ）との結合親和性が増強されたＦｃ変異体］

ＩｇＧの血漿半減期は、ＦｃＲｎとの結合に依存し、一般的にｐＨ６．０の時に結合し、ｐＨ７．４（血漿ｐＨ）の時に解離する。両者の結合サイトに対する研究により、ｐＨ６．０の時に結合能力が増加するようにＩｇＧにおけるＦｃＲｎと結合するサイトを改造する。ＦｃＲｎとの結合に重要なヒトＦｃγドメインのいくつかの残基の突然変異が、血清半減期を増加できることが既に証明されている。Ｔ２５０、Ｍ２５２、Ｓ２５４、Ｔ２５６、Ｖ３０８、Ｅ３８０、Ｍ４２８およびＮ４３４（ＥＵ番号）における突然変異が、ＦｃＲｎとの結合親和性を増加または低減できることが報告されている（Ｒｏｏｐｅｎｉａｎ　ＤＣら、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，７：７１５～７２５、２００７）。韓国特許番号ＫＲ１０－１０２７４２７は、増加されたＦｃＲｎとの結合親和性を有するトラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）の変異体を開示し、且つ、これらの変異体は、２５７Ｃ、２５７Ｍ、２５７Ｌ、２５７Ｎ、２５７Ｙ、２７９Ｑ、２７９Ｙ、３０８Ｆおよび３０８Ｙから選ばれる１つ以上のアミノ酸修飾を含む。韓国特許公開番号ＫＲ２０１０－００９９１７９は、ベバシズマブ（Ａｖａｓｔｉｎｅ、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）の変異体を提供し、且つ、これらの変異体は、Ｎ４３４Ｓ、Ｍ２５２Ｙ／Ｍ４２８Ｌ、Ｍ２５２Ｙ／Ｎ４３４ＳおよびＭ４２８Ｌ／Ｎ４３４Ｓに含まれるアミノ酸修飾により、増加された体内半減期を示す。また、Ｈｉｎｔｏｎらも、Ｔ２５０ＱとＭ４２８Ｌとの２つの変異体が、それぞれＦｃＲｎとの結合を３倍および７倍増加させることを発見した。２つのサイトを同時に変異させると、結合が２８倍増加する。アカゲザル体内で、Ｍ４２８ＬまたはＴ２５０ＱＭ／４２８Ｌの変異体は、血漿半減期が２倍増加することを示す（Ｈｉｎｔｏｎ　ＰＲら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７６：３４６～３５６、２００６）。新生児受容体（ＦｃＲｎ）との結合親和性が増強されたＦｃ変異体に含まれるより多くの突然変異サイトは、中国発明特許ＣＮ２０１２８００６６６６３．２を参照することができる。また、５種のヒト由来抗体のＦｃ断片をＴ２５０Ｑ／Ｍ４２８Ｌ変異させることが、ＦｃとＦｃＲｎとの相互作用を改善するだけでなく、且つ、その後の体内薬物動態学試験において、皮下注射で投与すると、Ｆｃ突然変異抗体が野生型抗体と比べて薬物動態学パラメータが改善され、例えば、体内暴露量が増加し、除去率が低下し、皮下生物利用度が向上したことが発見されたという研究がある（Ｄａｔｔａ－ＭａｎｎａＡら、ＭＡｂｓ．Ｔａｙｌｏｒ＆Ｆｒａｎｃｉｓ、４：２６７～２７３、２０１２）。

【０１６９】

本発明の抗体とＦｃＲｎとの親和性を増強できる他の突然変異点は、２２６、２２７、２３０、２３３、２３９、２４１、２４３、２４６、２５９、２６４、２６５、２６７、２６９、２７０、２７６、２８４、２８５、２８８、２８９、２９０、２９１、２９２、２９４、２９８、２９９、３０１、３０２、３０３、３０５、３０７、３０９、３１１、３１５、３１７、３２０、３２２、３２５、３２７、３３０、３３２、３３４、３３５、３３８、３４０、３４２、３４３、３４５、３４７、３５０、３５２、３５４、３５５、３５６、３５９、３６０、３６１、３６２、３６９、３７０、３７１、３７５、３７８、３８２、３８３、３８４、３８５、３８６、３８７、３８９、３９０、３９２、３９３、３９４、３９５、３９６、３９７、３９８、３９９、４００、４０１、４０３、４０４、４０８、４１１、４１２、４１４、４１５、４１６、４１８、４１９、４２０、４２１、４２２、４２４、４２６、４３３、４３８、４３９、４４０、４４３、４４４、４４５、４４６というアミノ酸修飾含んでもよいが、これらに限定されず、ここで、Ｆｃ領域におけるアミノ酸の番号はＫａｂａｔ中のＥＵインデックスの番号である。

【０１７０】

ＦｃＲｎとの結合親和性が増強されたＦｃ変異体は、他の一切の公知のアミノ酸修飾サイトおよび発見されていないアミノ酸修飾サイトを更に含む。

【０１７１】

好ましい実施形態において、ＩｇＧ変異体を最適化して増加または低減されたＦｃＲｎ親和性、および増加または低減されたヒトＦｃγＲを有させることができ、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、ＦｃγＲＩＩｂ、ＦｃγＲＩＩｃ、ＦｃγＲＩＩＩａおよびそれらの対立遺伝子変異を含むＦｃγＲＩＩＩｂ親和性を含んでもよいが、これらに限定されない。

【０１７２】

優先的には、ＩｇＧ変異体のＦｃリガンドの特異性はその治療応用を決定する。所定のＩｇＧ変異体の治療用の目的は、標的抗原のエピトープまたは形式、および治療待ち疾患または適応症に依存する。ほとんどの標的適応症にとって、増強されたＦｃＲｎとの結合はより好ましく、その原因は、増強されたＦｃＲｎとの結合が血清半減期を延長させることができるためである。長い血清半減期は、治療時に低い頻度および用量で投与することを許容する。繰り返し投与する必要のある適応症を反応させるために該治療剤を投与する場合、このような特性は特に好ましい。いくつかの標的適応症にとって、変異体Ｆｃが増加された除去または低減された血清半減期を有する必要がある場合、例えば、Ｆｃポリペプチドが現像剤または放射治療剤として使用される場合、低減されたＦｃＲｎ親和性は特に好ましい。

【０１７３】

従来技術の公知方法により該ポリペプチドのＦｃＲｎに対する親和性を評価することができる。例えば、当業者は、適当なＥＬＩＳＡ測定を行うことができる。例えば、実施例５．６に記載されるように、適当なＥＬＩＳＡ測定により、変異体および親本のＦｃＲｎとの結合強度を比較することができる。ＰＨが７．０である場合、変異体および親本ポリペプチドに対して検出された特異的信号を比較し、変異体の特異的信号が親本ポリペプチドの特異的信号よりも少なくとも１．９倍弱い場合、それは本発明の好ましい変異体であり、更に臨床応用に適用される。

【０１７４】

ＦｃＲｎは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含んでもよいが、これらに限定されない任意の生物に由来してもよい。

【０１７５】

［ＦｃγＲとの結合を抑制する改変］

本発明に係る「ＦｃγＲとの結合を抑制する改変」とは、Ｆｃポリペプチド鎖におけるＦｃγＲＩＩＡ、ＦｃγＲＩＩＢおよび／またはＦｃγＲＩＩＩＡとの結合を抑制する１つまたは複数の挿入、欠失、または置換を指し、前記結合は、例えば、競合ベースの結合実験（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ、Ｗａｌｔｈａｍ、ＭＡ）により測定される。これらの改変は、二重特異性抗体の一部であるＦｃポリペプチド鎖に含まれてもよい。より具体的には、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）との結合を抑制する改変は、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、またはＮ２９７位のグリコシル化を抑制する任意の改変を含み、Ｎ２９７での任意の置換を含む。また、Ｎ２９７位のグリコシル化を抑制する改変と共に、別のジスルフィド架橋を確立することにより二量体のＦｃ領域を安定化する別の改変も予測されている。ＦｃγＲとの結合を抑制する改変の更なる実例は、一方本のＦｃポリペプチド鎖でのＤ２６５Ａの改変と、他方本のＦｃポリペプチド鎖でのＡ３２７Ｑの改変とを含む。上記いくつかの突然変異は、Ｘｕ Ｄら、Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００：１６～２６、２０００に記載され、ここで、上記突然変異およびその活性評価を記載している部分は、引用の方式で本発明に援用される。以上はＥＵ番号に基づくものである。

【０１７６】

例えば、本発明に係る二重特異性抗体のＦｃγＲとの結合を抑制する改変に含まれるＦｃ断片は、ヒトＦｃγＲｓ（ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、またはＦｃγＲＩＩＩａ）とＣ１ｑとの少なくとも１種に対して低減された親和性を示し、減少されたエフェクター細胞機能または補体機能を有する。

【０１７７】

他のＦｃγＲとの結合を抑制する改変は、公知技術および将来発見される可能性があるサイトとその修飾を含む。

【０１７８】
ＦｃγＲは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含んでもよいが、これらに限定されない任意の生物に由来してもよい。
【０１７９】
［半減期を延長するＦｃの改変］
本発明に係る「半減期を延長するＦｃの改変」とは、同じＦｃポリペプチドを含むが、改変を含まない類似するＦｃタンパク質の半減期と比べ、Ｆｃポリペプチド鎖で、改変を含むＦｃポリペプチド鎖のタンパク質の体内半減期を延長させる改変を指す。前記改変は、二重特異性抗体の一部であるＦｃポリペプチド鎖に含まれてもよい。Ｔ２５０Ｑ、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４ＴおよびＴ２５６Ｅ（２５０－位のトレオニンがグルタミンに変わり、２５２－位のメチオニンがチロシンに変わり、２５４－位のセリンがトレオニンに変わり、２５６－位のトレオニンがグルタミン酸に変わり、ＥＵ番号に基づいて番号を付ける）の改変は、半減期を延長するＦｃの改変であり、合わせて、単独で、または任意に組み合わせて使用することができる。これらの改変および他のいくつかの改変は、米国特許７０８３７８４に詳細に記述されている。米国特許７０８３７８４におけるこのような改変を記載している部分は、引用の方式により本発明に援用される。
【０１８０】
同様に、Ｍ４２８ＬおよびＮ４３４Ｓは、半減期を延長するＦｃの改変であり、合わせて、単独で、または任意に組み合わせて使用することができる。これらの改変および他のいくつかの改変は、米国特許出願公開テキスト２０１０／０２３４５７５および米国特許７６７０６００に詳細に記載されている。米国特許出願公開テキスト２０１０／０２３４５７５および米国特許７６７０６００におけるこのような改変を記載している部分は、引用の方式により本発明に援用される。
【０１８１】
また、本発明の定義に従い、２５０、２５１、２５２、２５９、３０７、３０８、３３２、３７８、３８０、４２８、４３０、４３４、４３６というサイトの１つにおける任意の置換は、いずれも半減期を延長するＦｃの改変と考えることができる。これらの改変のうちのそれぞれまたはこれらの改変の組み合わせは、本発明に係る二重特異性抗体の半減期を延長するために使用できる。半減期の延長に使用できる他の改変は、２０１２年１２月１７日に提出された国際出願ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／０７０１４６（公開番号：ＷＯ２０１３／０９６２２１）に詳細に記載されている。この出願における上記改変を記載している部分は、引用の形式により本発明に援用される。
【０１８２】
半減期を延長するＦｃの改変は、公知技術および将来発見される可能性があるサイトとその修飾を更に含む。
【０１８３】
Ｆｃは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含んでもよいが、これらに限定されない任意の生物に由来してもよい。
【０１８４】
［二重特異性抗体の調製方法］
本分野の任意の既知の方法で本発明の二重特異性抗体を調製することができる。二重特異性抗体の早期の構築方法には、化学架橋法、またはハイブリッド－ハイブリドーマ法もしくはクワドローマ法がある（例えば、Ｓｔａｅｒｚ ＵＤら、Ｎａｔｕｒｅ、３１４：６２８－３１、１９８５、Ｍｉｌｓｔｅｉｎ Ｃら、Ｎａｔｕｒｅ、３０５：５３７－５４０、１９８３、Ｋａｒｐｏｖｓｋｙ Ｂら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１６０：１６８６－１７０１、１９８４）。化学カップリング法は、２つの異なるモノクローナル抗体を化学カップリングの方式で連結し、二重特異性モノクローナル抗体を調製することである。例えば、２種の異なるモノクローナル抗体の化学結合、または、例えば、２つのＦａｂ断片のような２つの抗体断片の化学結合である。ハイブリッド－ハイブリドーマ法は、細胞ハイブリダイゼーション法または三元ハイブリドーマの方式で二重特異性モノクローナル

抗体を生成することであり、これらの細胞ハイブリドーマまたは三元ハイブリドーマが、構築されたハイブリドーマの融合、または確立されたハイブリドーマとマウスから得られたリンパ球との融合により得られる。これらの技術はＢｉＡｂの製造に使用されるが、抗原結合サイトを含む異なる組み合わせの混合群が生成し、タンパク質の発現が難しく、ターゲットＢｉＡｂを精製する必要があり、収率が低く、生産コストが高い等のような産生された様々な問題により、このような複合体は使用されにくくなる。

【０１８５】

最近の方法は、遺伝子工学的手法により改造されたコンストラクトを利用し、必要のない副生成物を除去するために徹底的に精製する必要がなく単一のＢｉＡｂの均質生成物を生成することができる。このようなコンストラクトは、直列に連結されたｓｃＦｖ、二抗体、直列に連結された二抗体、二重可変ドメイン抗体、およびＣｈ１／ＣｋドメインまたはＤＮＬＴＭのモチーフを使用するヘテロ二量体を含む（Ｃｈａｍｅｓ＆Ｂａｔｙ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｄｒｕｇ．Ｄｉｓｃｏｖ．Ｄｅｖｅｌ．，１２：２７６－８３、２００９、Ｃｈａｍｅｓ＆Ｂａｔｙ、ｍＡｂｓ、１：５３９－４７）。関連する精製技術は公知のものである。

【０１８６】

［腫瘍表面抗原］

「腫瘍表面抗原」という用語は、腫瘍細胞または内部の表面にあるまたは提示することができる抗原を指す。いくつかの癌細胞抗原は、いくつかの正常細胞の表面にも発現し、腫瘍－関連抗原と呼ぶことができる。正常細胞と比べると、これらの腫瘍－関連抗原は、腫瘍細胞に過発現でき、または正常組織と比べて腫瘍組織の構造が密でないため、前記抗原は腫瘍細胞で抗体と結合しやすい。これらの抗原は、正常細胞により提示せずに腫瘍細胞のみにより提示することができる。腫瘍抗原は、腫瘍細胞のみに発現してもよいし、または正常細胞と比べた腫瘍特異的突然変異を表してもよい。対応する抗原は、腫瘍－特異性抗原と呼ぶことができる。

【０１８７】

「腫瘍関連抗原」は、宿主で免疫反応をトリガして腫瘍細胞を同定するために使用し、且つ、癌治療で可能な候補とすることができる。この抗原は、免疫系をよく避ける正常なタンパク質、通常ごく少量で生成されたタンパク質、通常ある発育段階のみで生成されたタンパク質、またはその構造が突然変異により修正されたタンパク質を含む可能性がある。

【０１８８】

大量の腫瘍抗原は本分野で知られており、且つ、スクリーニングにより同定された新たな腫瘍抗原を容易に確定することができる。腫瘍抗原の非制限的な実例は、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、α－アクチン－４、Ａ３、Ａ３３抗体に対して特異性を有する抗原、（ＡＦＰ）、α－アクチン－４、Ａ３、Ａ３３抗体に対して特異性を有する抗原、ＡＲＴ－４、Ｂ７、Ｂａ７３３、 ＢＡＧＥ、ＢｒＥ３－抗原、ＣＡ１２５、ＣＡＭＥＬ、ＣＡＰ－１、炭酸無水物酵素ＩＸ、ＣＡＳＰ－８／ｍ、ＣＣＣＬ１９、ＣＣＣＬ２１、ＣＤ１、ＣＤ１ａ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ８、ＣＤ１１Ａ、ＣＤ１４、ＣＤ１５、ＣＤ１６、ＣＤ１８、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２１、ＣＤ２２、ＣＤ２３、ＣＤ２５、ＣＤ２９、ＣＤ３０、ＣＤ３２ｂ、ＣＤ３３、ＣＤ３７、ＣＤ３８、ＣＤ４０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４６、ＣＤ４７、ＣＤ５２、ＣＤ５４、ＣＤ５５、ＣＤ５９、ＣＤ６４、ＣＤ６６ａ－ｅ、ＣＤ６７、ＣＤ７０、ＣＤ７０Ｌ、ＣＤ７４、ＣＤ７９ａ、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ９５、ＣＤ１２３、ＣＤ１２６、ＣＤ１３２、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＣＤ１４７、ＣＤ１５４、ＣＤＣ２７、ＢＣＭＡ、ＣＳ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＥｐＣＡＭ、ＦＬＴ３、ｇｐＡ３３、ＧＰＣ－３、Ｈｅｒ２、ＭＥＧＥ－Ａ３、ＮＹＥＳＯ１、ＣＩＸ、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ２、ＣＤＫ－４／ｍ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＣＴＬＡ－４、ＣＸＣＲ４、ＣＸＣＲ７、ＣＸＣＬ１２、ＨＩＦ－１α、結腸特異性抗原ｐ（ＣＳＡｐ）、ＣＥＡ（ＣＥＡＣＡＭ５）、ＣＥＡＣＡＭ６、ｃ－Ｍｅｔ、ＤＡＭ、ＥＧＦＲ、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ＥＧＰ－１（ＴＲＯＰ－２）、ＥＧＰ－２、ＥＬＦ２－Ｍ、Ｅｐ－ＣＡＭ、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）、Ｆｌｔ－１、Ｆｌｔ－３、葉酸塩結合

タンパク質、Ｇ２５０抗原、ＧＡＧＥ、ｇｐ１００、ＧＲＯ－β、ＨＬＡ－ＤＲ、ＨＭ１．２４、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（ＨＣＧ）およびそのサブユニット、ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ＨＭＧＢ－１、酸欠誘導因子（ＨＩＦ－１）、ＨＳＰ７０－２Ｍ、ＨＳＴ－２、Ｉａ、ＩＧＦ－１Ｒ、ＩＦＮ－γ、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－β、ＩＦＮ－λ、ＩＬ－４Ｒ、ＩＬ－６Ｒ、ＩＬ－１３Ｒ、ＩＬ－１５Ｒ、ＩＬ－１７Ｒ、ＩＬ－１８Ｒ、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＬ－２３、ＩＬ－２５、インスリン様成長因子－１（ＩＧＦ－１）、ＫＣ４－抗原、ＫＳ－１－抗原、ＫＳ１－４、Ｌｅ－Ｙ、ＬＤＲ／ＦＵＴ、マクロファージマイグレーション抑制因子（ＭＩＦ）、ＭＡＧＥ、ＭＡＧＥ－３、ＭＡＲＴ－１、ＭＡＲＴ－２、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＴＲＡＧ－３、ｍＣＲＰ、ＭＣＰ－１、ＭＩＰ－１Ａ、ＭＩＰ－１Ｂ、ＭＩＦ、ＭＵＣ１、ＭＵＣ２、ＭＵＣ３、ＭＵＣ４、ＭＵＣ５ａｃ、ＭＵＣ１３、ＭＵＣ１６、ＭＵＭ－１／２、ＭＵＭ－３、ＮＣＡ６６、ＮＣＡ９５、ＮＣＡ９０、ＰＡＭ４抗原、膵臓癌ムチン、ＰＤ－１受容体、胎盤成長因子、ｐ５３、ＰＬＡＧＬ２、前立腺酸性ホスファターゼ、ＰＳＡ、ＰＲＡＭＥ、ＰＳＭＡ、ＰｌＧＦ、ＩＬＧＦ、ＩＬＧＦ－１Ｒ、ＩＬ－６、ＩＬ－２５、ＲＳ５、ＲＡＮＴＥＳ、Ｔ１０１、ＳＡＧＥ、Ｓ１００、サバイビン、サバイビン－２Ｂ、ＴＡＣ、ＴＡＧ－７２、テネイノシン、ＴＲＡＩＬ受容体、ＴＮＦ－α、Ｔｎ抗原、Ｔｈｏｍｓｏｎ－Ｆｒｉｅｄｅｎｒｅｉｃｈ抗原、腫瘍壊死抗原、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、カドヘリン（Ｃａｄｈｅｒｉｎ）、インテグリン（Ｉｎｔｅｇｒｉｎ）、メソテリン（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ）、Ｃｌａｕｄｉｎ１８、αＶβ３、α５β１、ＥＲＢＢ３、ＩＧＦ１Ｒ、ＥＰＨＡ３、ＴＲＡＩＬＲ１、ＴＲＡＩＬＲ２、ＲＡＮＫＬ、ムチンファミリー、ＦＡＰ、テネイシン（Ｔｅｎａｓｃｉｎ）、ＥＤ－Ｂフィブロネクチン、ＷＴ－１、１７－１Ａ－抗原、補体因子Ｃ３、Ｃ３ａ、Ｃ３ｂ、Ｃ５ａ、Ｃ５、血管生成マーカー、ｂｃｌ－２、ｂｃｌ－６、Ｋｒａｓ、発癌性遺伝子マーカーおよび発癌性遺伝子生成物（例えば、Ｓｅｎｓｉ Ｍら、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１２：５０２３－３２、２００６、Ｐａｒｍｉａｎｉ Ｊら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７８：１９７５－７９、２００７、Ｎｏｖｅｌｌｉｎｏ Ｌら、Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．，５４：１８７－２０７、２００５参照）を含む。好ましくは、本発明に係るＴＡＡは、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３８、ＢＣＭＡ、ＣＳ１、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、Ｍｕｃｉｎ１、ＣＡ１２５、ＧＰＣ－３およびＭｅｓｏｔｈｅｌｉｎである。

【０１８９】

該用語は、ＴＡＡの任意の変異体、イソ型、誘導体、および種相同体を更に含み、腫瘍細胞を含む細胞により天然に発現されるか、またはＴＡＡ遺伝子やｃＤＮＡでトランスフェクションされた細胞により発現される。

【０１９０】

ＴＡＡは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含んでもよいが、これらに限定されない任意の生物に由来してもよく、好ましくは、ヒトのＴＡＡに由来する。

【０１９１】

［標的細胞および標的細胞に発現する標的細胞タンパク質］

上述したように、二重特異性抗体は、エフェクター細胞タンパク質および標的細胞タンパク質に結合することができる。例えば、前記標的細胞タンパク質は、癌細胞、病原体により感染された細胞、または疾患（例えば、炎性、自己免疫疾患）を媒介する細胞の表面に発現することができる。いくつかの実施形態において、高レベルの発現が必要ではないが、該標的細胞タンパク質は標的細胞の表面に高度に発現することができる。いくつかの実施形態において、該標的細胞タンパク質は標的細胞の表面に発現しないか、または低発現する。

【０１９２】

標的細胞が癌細胞である場合、本発明に係る相同二量体の二重特異性抗体は、上記癌細胞抗原に結合することができる。癌細胞抗原はヒトのタンパク質であってもよいし、または他の種に由来するタンパク質であってもよい。

【０１９３】
いくつかの実施例において、前記標的細胞タンパク質は、腫瘍細胞の表面で選択的に発現するまたは過発現するまたは発現しないタンパク質であってもよい。
【０１９４】
いくつかの実施例において、前記標的細胞タンパク質は、リンパシステム関連疾患を媒介する細胞表面のタンパク質であってもよい。
【０１９５】
他の態様において、標的細胞は、自己免疫疾患または炎性疾患を媒介する細胞であってもよい。例えば、喘息中のヒトの好酸球は標的細胞であってもよく、このような場合、ＥＧＦモジュール含有ムチン様ホルモン受容体（ＥＭＲ１）は、標的細胞タンパク質とすることができる。好ましくは、全身性エリテマトーデスの患者で、過剰のヒトＢ細胞は標的細胞とすることができ、このような場合、例えば、ＣＤ１９またはＣＤ２０は標的細胞のタンパク質とすることができる。他の自己免疫疾患において、過剰のヒトＴｈ２Ｔ細胞は標的細胞とすることができ、このような場合、例えば、ＣＣＲ４は標的細胞のタンパク質とすることができる。同様に、標的細胞は、アテローム性動脈硬化症、慢性閉塞性肺疾患（ＣＯＰＤ）、肝硬変、強皮症、腎移植線維症、腎同種移植腎病、または肺線維症（特発性肺線維症および／またはイディオタイプ肺高血圧を含む）を媒介する線維症細胞であってもよい。前記線維症の場合、例えば、線維芽細胞活性化タンパク質α（ＦＡＰα）は標的細胞タンパク質であってもよい。
【０１９６】
いくつかの実施例において、標的細胞タンパク質は、感染した細胞表面に選択的に発現するタンパク質であってもよい。例えば、Ｂ型肝炎ウイルス（ＨＢＶ）、またはＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）に感染した場合、前記標的細胞タンパク質は、感染された細胞表面に発現するＨＢＶまたはＨＣＶのエンベロープタンパク質であってもよい。他の実施形態において、前記標的細胞タンパク質は、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）がＨＩＶに感染した細胞でコードするｇｐ１２０であってもよい。
【０１９７】
いくつかの実施例において、標的細胞は、感染および感染性関連疾患を媒介する細胞であってもよい。
【０１９８】
いくつかの実施例において、標的細胞は、免疫不全関連疾患を媒介する細胞であってもよい。
【０１９９】
いくつかの実施例において、標的細胞は、他の関連疾患を媒介する細胞であってもよく、公知技術および将来発展する可能性がある部分を含む。
【０２００】
二重特異性抗体は、マウス、ラット、ウサギ、新世界サルおよび／または旧世界サル種等に由来する標的細胞タンパク質に結合することができる。前記種は、ハツカネズミ（Ｍｕｓｍｕｓｃｕｌｕｓ）、クマネズミ（Ｒａｔｔｕｓｒａｔｔｕｓ）、ドブネズミ（Ｒａｔｔｕｓｎｏｒｖｅｇｉｃｕｓ）、カニクイザル（Ｍａｃａｃａｆａｓｃｉｃｕｌａｒｉｓ）、マントヒヒ（ｈａｍａｄｒｙａｓｂａｂｏｏｎ）、Ｐａｐｉｏｈａｍａｄｒｙａｓ、ギニアヒヒ（Ｇｕｉｎｅａｂａｂｏｏｎ）、Ｐａｐｉｏｐａｐｉｏ、オリーブヒヒ（ｏｌｉｖｅｂａｂｏｏｎ）、アヌビスヒヒ（Ｐａｐｉｏａｎｕｂｉｓ）、キイロヒヒ（ｙｅｌｌｏｗｂａｂｏｏｎ）、サバンナヒヒ（Ｐａｐｉｏｃｙｎｏｃｅｐｈａｌｕｓ）、チャクマヒヒ（Ｃｈａｃｍａｂａｂｏｏｎ）、Ｐａｐｉｏｕｒｓｉｎｕｓ、コモンマーモセット（Ｃａｌｌｉｔｈｒｉｘｊａｃｃｈｕｓ）、ワタボウシタマリン（ＳａｇｕｉｎｕｓＯｅｄｉｐｕｓ）、およびリスザル（Ｓａｉｍｉｒｉｓｃｉｕｒｅｕｓ）という種を含んでもよいが、これらに限定されない。
【０２０１】
［癌］

「癌」という用語は、体内の異常細胞が制御されずに成長することを特徴とする疾患を指す。「癌」は、良性癌、悪性癌、休眠腫瘍または微転移を含む。癌は、原発性悪性細胞または腫瘍（例えば、細胞が被験者の体内の原始悪性疾患または腫瘍サイト以外の部位にマイグレーションされていない腫瘍）および続発性悪性細胞または腫瘍（例えば、転移による腫瘍が悪性細胞に転移されるか、または腫瘍細胞が原始腫瘍サイトと異なる二次サイトにマイグレーションされる）を含む。癌は、血液学悪性腫瘍も含む。「血液学的悪性腫瘍」は、リンパ腫、白血病、骨髄腫またはリンパ悪性腫瘍、および脾癌およびリンパ節腫瘍を含む。

【０２０２】

好ましい実施形態において、本発明の二重特異性抗体、または本発明の抗体をコードする核酸またはポリヌクレオチド、または免疫コンジュゲート、または医薬組成物、または組み合わせ療法は、癌の治療、予防、または緩和に有用である。癌の実例は、癌腫、リンパ腫、膠芽細胞腫、メラノーマ、肉腫、白血病、骨髄腫、またはリンパ悪性疾患を含んでもよいが、これらに限定されない。このような癌の更なる特定の実例は以下のように、扁平上皮癌（例えば、上皮扁平上皮癌）、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、星状細胞腫、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、肝細胞癌、胃部癌、または胃癌（胃腸癌を含む）、膵臓癌、多形性膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腫、肝細胞癌腫、神経内分泌腫瘍、甲状腺髄様癌、甲状腺分化癌、乳癌、卵巣癌、結腸癌、直腸癌、子宮内膜癌、または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、または腎癌、前立腺癌、陰門癌、肛門癌、陰茎癌および頭頸部癌を含む。

【０２０３】

癌または悪性病の他の実例は、急性小児リンパ芽球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、成人（原発性）肝細胞癌、成人（原発性）肝癌、成人急性リンパ球性白血病、成人急性骨髄性白血病、成人ホジキンリンパ腫、成人リンパ球性リンパ腫、成人非ホジキンリンパ腫、成人原発性肝癌、成人軟組織肉腫、ＡＩＤＳ関連性リンパ腫、ＡＩＤＳ関連性悪性病、肛門癌、星状細胞腫、胆管癌、膀胱癌、骨癌、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、乳癌、腎盂と尿管癌、中枢神経系（原発性）リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、脳星状細胞腫、子宮頸癌、小児（原発性）肝細胞癌、小児（原発性）肝癌、小児急性リンパ芽球性白血病、小児急性骨髄性白血病、小児脳幹神経膠腫、小児小脳星状細胞腫、小児脳星状細胞腫、小児頭蓋外胚細胞腫、小児ホジキン病、小児ホジキンリンパ腫、小児視床下部と視覚路神経膠腫、小児リンパ芽球性白血病、小児髄芽細胞腫、小児非ホジキンリンパ腫、小児松果体とテント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児原発性肝癌、小児横紋筋肉腫、小児軟組織肉腫、小児視覚路と視床下部神経膠腫、慢性リンパ球性白血病、慢性髄細胞性白血病、結腸癌、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、内分泌膵島細胞癌、子宮内膜癌、上衣腫瘍、上皮癌、食道癌、ユーイング肉腫と関連腫瘍、外分泌膵臓癌、頭蓋外胚細胞腫、性腺外胚細胞腫、肝外胆管癌、眼癌、女性乳癌、ゴーシェ病、胆嚢癌、胃部癌、胃腸管良性腫瘍、胃腸管腫瘍、胚細胞腫、妊娠性絨毛腫瘍、毛細胞白血病、頭頸部癌、肝細胞癌、ホジキンリンパ腫、高ガンマグロブリン血症、下咽頭癌、腸癌、眼球内黒色腫、膵島細胞癌、膵島細胞膵臓癌、カポジ肉腫、腎癌、喉頭癌、口唇と口腔癌、肝癌、肺癌、リンパ増殖性疾患、マクログロブリン血症、男性乳癌、悪性中皮腫、悪性胸腺腫、髄芽細胞腫、メラノーマ、中皮腫、転移性原発巣秘匿性頸部扁平上皮癌、転移性原発性頸部扁平上皮癌、転移性頸部扁平上皮癌、多発性骨髄腫、多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍、骨髄発育不良症候群、髄細胞性白血病、骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患、鼻腔と副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非メラノーマ皮膚癌、非小細胞肺癌、転移性原発巣秘匿性頸部扁平上皮癌、中咽頭癌、骨肉腫／悪性線維肉腫、骨肉腫／悪性線維組織細胞腫、骨肉腫／骨格の悪性線維組織細胞腫、卵巣上皮癌、卵巣胚細胞腫、卵巣低悪性度腫瘍、膵臓癌、パラプロテイン血症、真性赤血球増加症、副甲状腺癌、陰茎癌、クロム親和性細胞腫、下垂体部腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性肝癌、前立腺癌、直腸癌、腎細胞癌、腎盂と尿管癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、唾液腺癌、サルコイドーシス肉腫、セザリー症候群、皮膚癌、小細胞肺癌、小腸癌、軟組織肉腫

、頸部扁平上皮癌、胃癌、テント上原始神経外胚葉性腫瘍と松果体腫、Ｔ細胞リンパ腫、精巣癌、胸腺腫、甲状腺癌、腎盂と尿管の移行マイグレーション細胞癌、移行マイグレーション腎盂と尿管癌、絨毛性腫瘍、尿管と腎盂細胞癌、尿管癌、子宮癌、子宮肉腫、膣癌、視覚路と視床下部神経膠腫、陰門癌、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍、および以上に列挙した器官システムに位置する余分な腫瘍以外の任意の他の過剰増殖性疾患を含んでもよいが、これらに限定されない。

【０２０４】

［組み合わせ療法］

本発明は、二重特異性抗体、または本発明の抗体をコードする核酸、またはポリヌクレオチド、または免疫コンジュゲート、または医薬組成物が１種または複数種の活性治療剤（例えば、化学治療剤）または他の予防または治療モード（例えば、放射線）と組み合わせることができる使用を含む。このような組み合わせ療法において、各活性剤は、常に異なる相補的な作用メカニズムを有し、組み合わせ療法は相乗効果をもたらす可能性がある。組み合わせ療法は、免疫反応に影響を及ぼす（例えば、反応を増強または活性化する）治療剤と、腫瘍／癌細胞に影響を及ぼす（例えば、抑制または死滅する）治療剤とを含む。組み合わせ療法は、薬剤耐性癌細胞の発生の可能性を低減することができる。組み合わせ療法は、試薬のうちの１種または複数種に関連する副作用を減少または除去するために、試薬のうちの１種または複数種の試薬用量の減少を許容する。このような組み合わせ療法は、潜在的な疾患、病症、または病状に対して相乗的な治療または予防作用を有することができる。

【０２０５】

「組み合わせ」は、個別に投与できる療法を含み、例えば、単独投与に対して個別に配合する（例えば、セットで提供できる）療法と、単一の配合物（即ち、「共配合物」）と共に投与する療法とを含む。いくつかの実施例において、本発明の二重特異性抗体、または本発明の抗体をコードする核酸、またはポリヌクレオチド、または免疫コンジュゲート、または医薬組成物は、順に投与することができる。他の実施例において、二重特異性抗体、または本発明の抗体をコードする核酸、またはポリヌクレオチド、または免疫コンジュゲート、または医薬組成物は、同時に投与することができる。本発明の二重特異性抗体、または本発明の抗体をコードする核酸、またはポリヌクレオチド、または免疫コンジュゲート、または医薬組成物は、少なくとも１種の他の（活性）薬剤と任意の方式で組み合わせて使用することができる。

【０２０６】

本発明の二重特異性抗体による治療は、治療待ち病症に有効な他の治療と組み合わせることができる。本発明の抗体の組み合わせ治療の非限定的実例は、手術、化学療法、放射線治療、免疫療法、遺伝子療法、ＤＮＡ療法、ＲＮＡ療法、ナノ療法、ウイルス療法、補助療法を含む。

【０２０７】

組み合わせ療法は、他の一切の公知技術における既存したおよび将来発展可能な部分を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【０２０８】

【図１－１】二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ、ＡＢ７Ｋ４、ＡＢ７Ｋ５、ＡＢ７Ｋ６、ＡＢ７Ｋ７、およびＡＢ７Ｋ８の構成はそれぞれａ、ｂ、ｃ、ｄ、ｅ、およびｆに示すとおりである。

【図１－２】二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７発現プラスミドクロマトグラムを示す。該発現プラスミドは全長９２９３ｂｐであり、９つの主な遺伝子断片を含み、１．ｈＣＭＶプロモーター、２．ターゲット遺伝子、３．ＥＭＣＶ　ＩＲＥＳ、４．ｍＤＨＦＲスクリーニング遺伝子、５．Ｓｙｎターミネータ配列、６．ＳＶ４０プロモーター、７．カナマイシン耐性遺伝子、８．ＳＶ４０ターミネータ配列、９．ＰＵＣレプリコンを含む。

【図１－３】ＡＢ７Ｋ７の精製サンプルのＳＥＣ－ＨＰＬＣ検出の結果である。

【図１－４】ＡＢ７Ｋ７の精製サンプルのＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動の結果である。
【図１－５】ＡＢ７Ｋ７の２５℃の加速実験でのＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果である。
【図１－６】ＡＢ７Ｋ７の凍結融解実験でのＳＤＳ－ＰＡＧＥの結果である。
【図２－１】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ４の腫瘍細胞ＢＴ４７４に結合する能力を検出する図である。
【図２－２】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ５の腫瘍細胞ＢＴ４７４に結合する能力を検出する図である。
【図２－３】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ６の腫瘍細胞ＢＴ４７４に結合する能力を検出する図である。
【図２－４】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ７の腫瘍細胞ＢＴ４７４に結合する能力を検出する図である。
【図２－５】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ８の腫瘍細胞ＢＴ４７４に結合する能力を検出する図である。
【図２－６】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ４のエフェクター細胞ＣＩＫに結合する能力を検出する図である。
【図２－７】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ５のエフェクター細胞ＣＩＫに結合する能力を検出する図である。
【図２－８】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ６のエフェクター細胞ＣＩＫに結合する能力を検出する図である。
【図２－９】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ７のエフェクター細胞ＣＩＫに結合する能力を検出する図である。
【図２－１０】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ８のエフェクター細胞ＣＩＫに結合する能力を検出する図である。
【図２－１１】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ７ＫのカニクイザルのＴ細胞に結合する能力を検出する図である。
【図２－１２】ＥＬＩＳＡにより５種のＡｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体のＣＤ３およびＨｅｒ２分子に結合する能力を検出する図である。
【図２－１３】プレートリーダにより５種のＡｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体の遺伝子細胞株Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化して報告する能力を検出する図である。
【図２－１４】ＣＴＰリンカーペプチドと抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ　ＶＨ構造とをモデリングする図である。
【図２－１５】ＧＳリンカーペプチドと抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ　ＶＨ構造とをモデリングする図である。
【図２－１６】抗－ＣＤ３　ＦｖとＣＤ３のｅｐｓｉｌｏｎ鎖との分子ドッキングモデルである。
【図３－１】ＮＣＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とＨＣＣ１９５４細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７の体内腫瘍抑制効果である。
【図３－２】ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト乳癌細胞ＨＣＣ１９５４とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ７の体内腫瘍抑制効果である。
【図３－３】異なる投与頻度でのＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト乳癌細胞ＨＣＣ１９５４とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ７およびＡＢ７Ｋ８の体内腫瘍抑制効果である。
【図３－４】ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とＳＫ－ＯＶ－３細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ７の体内腫瘍抑制効果である。
【図３－５】ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とＨＴ－２９細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ７の体内腫瘍抑制効果である。
【図３－６】ＣＤ３４免疫が再構成されたＮＰＧマウスの皮下にヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ７の体内腫瘍抑制効果である。
【図３－７】ＰＢＭＣ免疫が再構成されたＮＰＧマウスにヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を接種したマウス移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ７の体内腫瘍抑制効果である。

【図４－１】ＮＣＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７の腫瘍抑制効果である。
【図４－２】ＮＰＧマウスの皮下にヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を単独で接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ７Ｋ７の腫瘍抑制効果である。
【図４－３】二重抗体ＡＢ７Ｋ７およびＡＢ７Ｋ８を複数回投与した後の正常なカニクイザルの体重の変化曲線である。
【図５－１】ＳＤラットにおいて２種のＥＬＩＳＡ方法で二重抗体ＡＢ７Ｋ７を検出する場合の血中濃度－時間曲線である。
【図５－２】ＳＤラットにおいて２種のＥＬＩＳＡ方法で二重抗体ＡＢ７Ｋ８を検出する場合の血中濃度－時間曲線である。
【図５－３】カニクイザル体内における二重抗体ＡＢ７Ｋ７およびＡＢ７Ｋ８の血中濃度－時間曲線である。
【図５－４】ｐＨ６．０時の二重抗体ＡＢ７Ｋ、ＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ７のＦｃＲｎに結合する能力の測定である。
【図５－５】ｐＨ７．０時の二重抗体ＡＢ７Ｋ、ＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ７のＦｃＲｎに結合する能力の測定である。
【図６－１】ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスの皮下にヒトＰＢＭＣ細胞とＨｕｈ－７細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ９Ｋの体内腫瘍抑制効果である。
【図６－２】ＣＤ３４免疫が再構成されたＮＰＧマウスの皮下にヒト肝癌Ｈｕｈ－７細胞を接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ９Ｋの体内腫瘍抑制効果である。
【図６－３】ＣＤ３４免疫が再構成されたＮＰＧマウスの皮下にヒト肝癌Ｈｕｈ－７細胞を接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ９Ｋの体内腫瘍抑制効果である。
【図７－１】フローサイトメトリーで二重特異性抗体ＡＢ２ＫのＣＤ２０陽性腫瘍細胞に結合する能力を検出する図である。
【図７－２】二重特異性抗体ＡＢ２ＫおよびＡＢ７Ｋ７がエフェクター細胞を媒介してＲａｊｉ－ｌｕｃ細胞を殺傷する能力である。
【図７－３】レポータージーン法で二重特異性抗体ＡＢ２ＫおよびＡＢ７Ｋ７がＪｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴＲＥ　Ｌｕｃ細胞を活性化する能力を検出する図である。
【図７－４】ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ２Ｋの体内腫瘍抑制効果である。
【図７－５】ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｄａｕｄｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ２Ｋの体内腫瘍抑制効果である。
【図８】二重抗体ＡＢ２Ｋを複数回投与した後の正常なカニクイザルの白血球およびリンパ球の変化曲線である。
【図９－１】ＦＡＣＳによりＡｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体の腫瘍細胞Ｒａｊｉに結合する能力を検出する図である。
【図９－２】ＦＡＣＳによりＡｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体のエフェクター細胞ＣＩＫに結合する能力を検出する図である。
【図９－３】ＦＡＣＳにより二重特異性抗体ＡＢ１Ｋ２およびＡＢ２３Ｐ１０のカニクイザルのＴ細胞に結合する能力を検出する図である。
【図９－４】ＥＬＩＳＡにより４種のＡｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体のＣＤ３およびＣＤ１９分子に結合する能力を検出する図である。
【図９－５】プレートリーダによりＡＢ１Ｋ２およびＡＢ２３Ｐ８二重特異性抗体がレポータージーン細胞株Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化する能力を検出する図である。
【図９－６】プレートリーダにより４種のＡｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体がレポータージーン細胞株Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化する能力を検出する図である。
【図１０－１】ＡＢ１１KのＭｕｃｉｎ１抗原を高発現する腫瘍細胞およびヒトまたはカ

ニクイザルの初代Ｔ細胞との結合である。
【図１０－２】ＡＢ１１Ｋが増幅されたＴ細胞を媒介して腫瘍細胞を殺傷する能力である。
【図１０－３】ＡＢ１１ＫがＰＢＭＣを媒介して腫瘍細胞を殺傷する能力である。
【図１０－４】ＡＢ１１ＫがＴ細胞を特異的に活性化する能力である。
【図１１】ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト皮膚癌Ａ４３１細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体ＡＢ８Ｋの体内腫瘍抑制効果である。
【発明を実施するための形態】
【０２０９】
以下の実施例により本発明について更に説明し、前記実施例は、更に限定するものとして説明されるべきではない。ここで、本明細書に引用される全ての図面および全ての参照文献、特許、および開示された特許出願の内容を参照として明確に本発明に援用する。
【０２１０】
実施例１、異なる構造のＡｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体の設計および調製
【０２１１】
１．１、異なる構造の二重特異性抗体の設計
【０２１２】
適切な構成の二重特異性抗体をスクリーニングするために、Ｈｅｒ２およびＣＤ３に対して６種の異なる構成の二重特異性抗体を設計し、ここで、ＡＢ７Ｋ５、ＡＢ７Ｋ６およびＡＢ７Ｋ８は一本鎖の２価の二重特異性抗体であり、ＡＢ７Ｋ、ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７は二本鎖の４価の二重特異性抗体（図１－１参照）であり、ここで、ＡＢ７Ｋ８のみがＦｃ断片を含まなかった。具体的には、上記４種の構成の二重特異性抗体の構成、そのＮ端からＣ端への方向の構成、およびそのアミノ酸配列番号は表１－１に示すとおりであった。６種の二重特異性抗体の具体的な構造の組成特性についての説明はいかのとおりであった。
【０２１３】
ここで、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋは、抗Ｈｅｒ２の全長抗体の２本の重鎖のＣ端がリンカーペプチド（Ｌ１）を介してそれぞれ１つの抗ＣＤ３のｓｃＦｖドメインに連結することで構成された。ＡＢ７Ｋに含まれるＨｅｒ２に対する完全抗体のアミノ酸配列は、モノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の配列（ＩＭＧＴデータベースＩＮＮ ７６３７）を参照し、それに含まれるＦｃ断片がヒトＩｇＧ１に由来し、Ｄ３５６Ｅ／Ｌ３５８Ｍ突然変異（ＥＵ番号）を有した。そのリンカーペプチドＬ１は、フレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、且つ、フレキシブルペプチドの組成がＧＳ（ＧＧＧＧＳ）$_3$であり、リジッドペプチドがＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳＬＰＳＰＳＲＬＰＧＰＳＤＴＰＩＬＰＱであった。ここで、抗ＣＤ３ ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のリンカーペプチドＬ２の組成が（ＧＧＧＧＳ）$_3$であった。
【０２１４】
ここで、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ４は、抗Ｈｅｒ２の全長抗体の２本の軽鎖のＣ端がリンカーペプチド（Ｌ１）を介してそれぞれ１つの抗ＣＤ３のｓｃＦｖドメインに連結することで構成された。ＡＢ７Ｋ４に含まれるＨｅｒ２に対する完全抗体の重鎖の可変領域のアミノ酸配列は、モノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の可変領域の配列を参照し、その軽鎖のアミノ酸配列は、モノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の軽鎖のアミノ酸配列（ＩＭＧＴデータベースＩＮＮ ７６３７）を参照した。ＡＢ７Ｋ４重鎖に含まれるＦｃ断片はヒトＩｇＧ１に由来し、複数のアミノ酸の代替／置換を有し、それぞれがＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｔ２５０Ｑ、Ｎ２９７Ａ、Ｐ３３１ＳおよびＭ４２８Ｌ（ＥＵ番号）であるおとともに、Ｆｃ断片のＣ末端のＫ４４７（ＥＵ番号）を削除／欠失した。そのリンカーペプチドＬ１は、フレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、且つ、フレキシブルペプチドの組成がG_2（ＧＧＧＧＳ）$_3$であり、リジッドペプチドがＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳであった。ここで、抗ＣＤ３ ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のリンカーペプチドＬ２の組成が（ＧＧＧＧＳ）$_3$であった。
【０２１５】

ここで、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ５は、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖ、Ｆｃ断片、リンカーペプチドＬ２および抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖを順次直列に連結することで構成され、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖおよび抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖの内部のＶＨとＶＬとの間は、それぞれリンカーペプチドＬ１およびＬ３を介して連結された。ＡＢ７Ｋ５に含まれるＨｅｒ２に対するｓｃＦｖのアミノ酸配列は、モノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の可変領域の配列を参照した。ＡＢ７Ｋ５に含まれるＦｃ断片はヒトＩｇＧ１に由来し、複数のアミノ酸の代替／置換を有し、それぞれがＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｔ２５０Ｑ、Ｎ２９７Ａ、Ｐ３３１Ｓ、Ｔ３６６Ｒ、Ｌ３６８Ｈ、Ｋ４０９ＴおよびＭ４２８Ｌ（ＥＵ番号）であった。ここで、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｔ３６６Ｒ、Ｌ３６８ＨおよびＫ４０９Ｔという５つのサイトの突然変異は、Ｆｃ断片間の重合の発生を防止して一本鎖の２価の二重特異性抗体を形成させることができた。Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｐ３３１Ｓ突然変異を担持しているＦｃ断片は、ＡＤＣＣおよびＣＤＣの活性を除去した。Ｔ２５０Ｑ／Ｍ４２８Ｌ突然変異を担持していることにより、Ｆｃ断片と受容体ＦｃＲｎとの結合親和性を増強してその半減期を延長させることができた。Ｎ２９７Ａ突然変異により、抗体のグリコシル化が回避され、ＦｃγＲｓとの結合能力が失った。また、更にＦｃ断片のＣ末端のＫ４４７（ＥＵ番号）を削除／欠失し、抗体の荷電不均一性を除去した。そのリンカーペプチド（Ｌ２）はフレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、且つ、フレキシブルペプチドがいずれも$Ｇ_2$（ＧＧＧＧＳ）$_3$であり、リジッドペプチドがＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳであった。各ｓｃＦｖの内部のリンカーペプチドＬ１およびＬ３の組成がいずれも（ＧＧＧＧＳ）$_3$であった。

【０２１６】

ここで、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ６は、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖ、リンカーペプチドＬ２、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ、およびＦｃ断片を順次直列に連結することで構成され、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖおよび抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖの内部のＶＨとＶＬとの間は、それぞれリンカーペプチドＬ１およびＬ３を介して連結された。ＡＢ７Ｋ６に含まれるＦｃ断片はヒトＩｇＧ１に由来し、複数のアミノ酸の代替／置換を有し、それぞれがＣ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｔ２５０Ｑ、Ｎ２９７Ａ、Ｐ３３１Ｓ、Ｔ３６６Ｒ、Ｌ３６８Ｈ、Ｋ４０９ＴおよびＭ４２８Ｌ（ＥＵ番号）であった。ここで、Ｃ２２６Ｓ、Ｃ２２９Ｓ、Ｔ３６６Ｒ、Ｌ３６８ＨおよびＫ４０９Ｔという５つのサイトの突然変異は、Ｆｃ断片間の重合の発生を防止して一本鎖の２価の二重特異性抗体を形成させることができた。Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ／Ｐ３３１Ｓ突然変異を担持しているＦｃ断片は、ＡＤＣＣおよびＣＤＣ活性を除去し、Ｔ２５０Ｑ／Ｍ４２８Ｌ突然変異を担持していることにより、Ｆｃ断片と受容体ＦｃＲｎとの結合親和性を増強してその半減期を延長することができた。Ｎ２９７Ａ突然変異により、抗体のグリコシル化が回避され、ＦｃγＲｓとの結合能力を失った。また、更にＦｃ断片のＣ末端のＫ４４７（ＥＵ番号）を削除／欠失し、抗体の荷電不均一性を除去した。そのリンカーペプチド（Ｌ２）はフレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、フレキシブルペプチドがいずれも$Ｇ_2$（ＧＧＧＧＳ）$_3$であり、リジッドペプチドがＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳであった。各ｓｃＦｖの内部のリンカーペプチドＬ１およびＬ３の組成がいずれも（ＧＧＧＧＳ）$_3$であった。

【０２１７】

ここで、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７は、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖ、リンカーペプチドＬ２、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ、およびＦｃ断片を順次直列に連結することで構成され、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖおよび抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖの内部のＶＨとＶＬとの間は、それぞれリンカーペプチドＬ１およびＬ３を介して連結された。ＡＢ７Ｋ７に含まれるＨｅｒ２に対するｓｃＦｖのアミノ酸配列は、モノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の可変領域の配列を参照した。ＡＢ７Ｋ７に含まれるＦｃ断片はヒトＩｇＧ１に由来し、複数のアミノ酸の代替／置換を有し、それぞれがＬ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｔ２５０Ｑ、Ｎ２９７Ａ、Ｐ３３１ＳおよびＭ４２８Ｌ（ＥＵ番号）であるとともに、更にＦｃ断片のＣ末端のＫ４４７（ＥＵ番号）を削除／欠失した。そのリンカーペプチド（Ｌ２）はフレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、且つ、フレキシブルペプチドがいず

れもＧ$_2$（ＧＧＧＧＳ）$_3$であり、リジッドペプチドがＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳであった。各ｓｃＦｖの内部のリンカーペプチドＬ１およびＬ３の組成がいずれも（ＧＧＧＧＳ）$_3$であった。

【０２１８】

ここで、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ８は、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖ、リンカーペプチドＬ２、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖおよびＨｉｓタグを順次直列に連結することで構成され、抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖおよび抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖの内部のＶＨとＶＬとの間は、それぞれリンカーペプチドＬ１およびＬ３を介して連結された。ＡＢ７Ｋ８に含まれるＨｅｒ２に対するｓｃＦｖのアミノ酸配列は、モノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）の可変領域の配列を参照した。ＡＢ７Ｋ８は、抗体の精製を容易にするように、抗－ＣＤ３ｓｃＦｖのＣ末端にＨｉｓタグを付加し、組成がＨＨＨＨＨＨＨＨであった。そのリンカーペプチド（Ｌ２）はフレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、且つ、フレキシブルペプチドがいずれもＧ２（ＧＧＧＧＳ）３であり、リジッドペプチドがＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳであった。各ｓｃＦｖの内部のリンカーペプチドＬ１およびＬ３の組成がいずれも（ＧＧＧＧＳ）$_3$であった。

【０２１９】

上記６種の二重特異性抗体に含まれる抗ＣＤ３－ｓｃＦｖのＶＨおよびＶＬアミノ酸配列は、それぞれＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４７およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２４８に示すように、且つ、ＶＨとＶＬとの間は（ＧＧＧＧＳ）$_3$を介して連結され、該モノクローナル抗体（ＣＤ３－３と命名される）は、ヒトおよびカニクイザルのＣＤ３抗原に特異的に結合し、且つ、ＣＤ３と微弱な結合親和性を有した。

【０２２０】

【表１】

表１－１　４種の異なる構造のＨｅｒ２およびＣＤ３に対する二重特異性抗体

	コード	構成	Ｎ端からＣ端までの組成	アミノ酸配列の番号
一本鎖の２価の二重特異性抗体	AB7K5	scFv-mFc-scFv	$[VH\text{-}L1\text{-}VL]_{Her2}$-mFc-L2-$[VH\text{-}L3\text{-}VL]_{CD3}$	SEQ ID NO：1
	AB7K6	scFv-scFv-mFc	$[VH\text{-}L1\text{-}VL]_{Her2}$-L2-$[VH\text{-}L3\text{-}VL]_{CD3}$-mFc	SEQ ID NO：2
	AB7K8	scFv-scFv-His tag	$[VH\text{-}L1\text{-}VL]_{Her2}$-L2-$[VH\text{-}L3\text{-}VL]_{CD3}$-$H_8$	SEQ ID NO：3
二本鎖の４価の二重特異性抗体	AB7K	lgG(H)-scFv	$[VH\text{-}CH]_{Her2}$-L1-$[VH\text{-}L2\text{-}VL]_{CD3}$	SEQ ID NO：4
			$[VL\text{-}CL]_{Her2}$	SEQ ID NO：5
	AB7K4	lgG(L)-scFv	$[VH\text{-}CH]_{Her2}$	SEQ ID NO：6
			$[VL\text{-}CL]_{Her2}$-L1-$[VH\text{-}L2\text{-}VL]_{CD3}$	SEQ ID NO：7
	AB7K7	scFv-scFv-mFc	$[VH\text{-}L1\text{-}VL]_{Her2}$-L2-$[VH\text{-}L3\text{-}VL]_{CD3}$-mFc	SEQ ID NO：8

備考：表中のＬｎは、異なる構造単位間のリンカーペプチドを表し、ｎは、二重特異性抗体のＮ端からＣ端までの異なる構造単位間に含まれるリンカーペプチドの並び順に従って順に番号を付けるものである。

【０２２１】

１．２、二重特異性抗体分子の発現ベクターの構築

【０２２２】

通常の分子生物学的方法で上記５種の二重特異性抗体のコード遺伝子を合成し、取得した融合遺伝子のコードｃＤＮＡをＰＣＤＮＡ３．１で改造された真核発現プラスミドｐＣＭＡＢ２Ｍの対応する酵素切断サイト間にそれぞれ挿入し、ここで、ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ４の重鎖および軽鎖は、１つのベクターに構築されてもよいし、２つの異なるベクタ

ーにそれぞれ構築されてもよい。例えば、ＡＢ７Ｋ７の発現プラスミドクロマトグラムは図１－２に示すように、該プラスミドは、サイトメガロウイルスの早期プロモーターを含み、哺乳動物細胞が外来遺伝子を高レベルに発現するために必要なエンハンサーであった。プラスミドｐＣＭＡＢ２Ｍは、選択的マーカーを更に含み、細菌でカナマイシン耐性を有することができ、哺乳動物細胞でＧ４１８耐性を有することができた。また、宿主細胞がＤＨＦＲ遺伝子発現欠陥型である場合、ｐＣＭＡＢ２Ｍの発現ベクターはマウスのジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）遺伝子を含み、メトトレキサート（ＭＴＸ）が存在する場合、ターゲット遺伝子とＤＨＦＲ遺伝子とを共増幅することができた（米国特許ＵＳ４３９９２１６を参照）。

【０２２３】

１．３、二重特異性抗体分子の発現

【０２２４】

二重特異性抗体を発現するために、上記構築した発現プラスミドを哺乳動物の宿主細胞系にトランスフェクションした。高レベルの発現を安定化するために、好ましい宿主細胞系はＤＨＦＲ酵素欠陥型ＣＨＯ－細胞であり（米国特許ＵＳ４８１８６７９を参照）、本実施例における宿主細胞は、ＣＨＯ誘導細胞株ＤＸＢ１１を選択した。１つの好ましいトランスフェクション方法はエレクトロポレーションであり、リン酸カルシウム共沈降、リポフェクションを含む他の方法を使用してもよい。エレクトロポレーションにおいて、３００Ｖの電界および１５００μＦｄのコンデンサに設定されたＧｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒエレクトロポレーター（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）を使用し、キュベット内の5×10^{7}個の細胞に５０μｇの発現ベクタープラスミドＤＮＡを加えた。２日間トランスフェクションした後、培地を０．６ｍｇ／ｍＬのＧ４１８を含む成長培地に変更した。サブクローンのトランスフェクタントを限界希釈し、ＥＬＩＳＡ方法で各細胞系の分泌率を測定した。二重特異性抗体を高レベルに発現した細胞株をスクリーニングした。

【０２２５】

融合タンパク質の高レベルの発現を実現するために、ＭＴＸ医薬により抑制されたＤＨＦＲ遺伝子を用いて共増幅を行うことが好ましい。濃度が逓増したＭＴＸを含む成長培地において、ＤＨＦＲ遺伝子を用いてトランスフェクションされた融合タンパク質遺伝子を共増幅した。ＤＨＦＲ発現が陽性であるサブクローンを限界希釈し、次第加圧して６μＭＭＴＸと高い培地で成長できたトランスフェクタントをスクリーニングし、その分泌率を測定し、外来タンパク質を高発現した細胞系をスクリーニングした。分泌率が約５（好ましくは、約１５）μｇ／10^{6}（即ち、百万）個の細胞／２４ｈを超えた細胞系を、無血清培地で適応性浮遊培養した。その後、細胞上清を収集して二重特異性抗体を分離して精製した。

【０２２６】

適切な構成の二重特異性抗体をスクリーニングするために、以下、いくつかの構成の二重特異性抗体の精製プロセス、安定性、体外と体内の生物学的機能、安全性、および薬物動態学等についてそれぞれドラッガビリティ評価を行った。

【０２２７】

１．４、二重特異性抗体の精製プロセスおよび安定性試験

【０２２８】

抗体の精製は、一般的に、粗精製（サンプルの捕獲）、中間精製、および精細精製という３ステップの精製策略を採用した。粗精製段階において、通常、アフィニティークロマトグラフィーを利用してターゲット抗体を捕獲し、不純なタンパク質、核酸、エンドトキシン、およびウイルスのようなサンプル中の大量の不純物を効果的に除去することができた。中間精製のステップでは、疎水性クロマトグラフィーまたはＣＨＴヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用いて大部分の残留された不純物タンパク質および重合体を除去することが多かった。精細精製では、イオン交換クロマトグラフィーまたはゲルろ過クロマトグラフィー（モレキュラーシーブ）を用いてターゲット抗体と性質が近い残留され

た少量または微量の不純物タンパク質を除去し、更にＨＣＰ、ＤＮＡ等の汚染物を除去することが多かった。

【０２２９】

本発明は、金属キレートアフィニティークロマトグラフィーカラム（例えば、ＧＥ社のＨｉｓＴｒａｐ　ＦＦ等）を利用してＨｉｓ－ｔａｇを融合した二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ８の培養上清を粗精製することができた。Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ／Ｇアフィニティークロマトグラフィーカラム（例えば、ＧＥ社のＭａｂｓｅｌｅｃｔ　ＳＵＲＥ等）を利用してＦｃを含む二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ４、ＡＢ７Ｋ５、ＡＢ７Ｋ６、ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ７を粗精製することができた。上記粗精製生成物は、更に中間精製および精細精製のステップを経て、最終的に高純度、高品質の精製したターゲット抗体を取得し、その後、脱塩カラム（例えば、ＧＥ社のＨｉＴｒａｐ　ｄｅｓａｕｌｔｉｎｇ等）を利用して上記二重特異性抗体の保存緩衝液をＰＢＳまたは他の適当な緩衝液に置換した。

【０２３０】

（ａ）二本鎖の４価の二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７の精製

【０２３１】

ＡＢ７Ｋ７を例とし、このような４価の相同二量体構成の二重特異性抗体の具体的な精製ステップおよび態様を説明した。

【０２３２】

３ステップのクロマトグラフィー法を採用して二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７を精製した。それぞれがアフィニティークロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィーおよび陰イオン交換クロマトグラフィーであった（本実施例で採用されたタンパク質精製装置は、米国ＧＥ社のＡＫＴＡ　ｐｕｒｅ　２５Ｍであった。本実施例で採用された試薬は、いずれも国薬グループ化学試薬有限公司から購入し、純度はいずれも分析レベルであった）。

【０２３３】

ステップ１、アフィニティークロマトグラフィー：ＧＥ社のＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅアフィニティークロマトグラフィー媒体または他の市販のアフィニティー媒体（例えば、Ｂｓｅｔｃｈｒｏｍ社のＤｉａｍｏｎｄ　ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ等）を採用してサンプルの捕獲、濃縮および一部の汚染物の除去を行った。まず、平衡ｂｕｆｆｅｒ（２０ｍＭのＰＢ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を用い、１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ平衡化させ、清澄された発酵液を、１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でサンプルローディングを行い、担持量が２０ｍｇ／ｍ以下であり、サンプルローディングが終了した後、平衡ｂｕｆｆｅｒ（２０ｍＭのＰＢ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．４）を用いて１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ平衡化させ、結合していない成分を洗い流し、洗浄ｂｕｆｆｅｒ　１（５０ｍＭのＮａＡｃ－ＨＡｃ、１ＭのＮａＣｌ、ｐＨ５．０）を用いて１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積だけ洗い流し、一部の汚染物を除去し、洗浄ｂｕｆｆｅｒ　２（５０ｍＭのＮａＡｃ－ＨＡｃ、ｐＨ５．０）を用いて１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ平衡化させ、その後、溶出ｂｕｆｆｅｒ（４０ｍＭのＮａＡｃ－ＨＡｃ、ｐＨ３．５）を用いて１００ｃｍ／ｈ以下の線形流速でターゲット生成物を溶出し、ターゲットピークを収集した。

【０２３４】

ステップ２、疎水性クロマトグラフィー：Ｂｓｅｔｃｈｒｏｍ社のＢｕｔｙｌ　ＨＰまたは他の市販の疎水性クロマトグラフィー媒体（例えば、ＧＥのＢｕｔｙｌ　ＨＰ等）を使用して中間精製を行い、重合体の含有量を低減するために用いられた。ターゲットタンパク質が重合すると、重合体と単量体との間には、電荷特性および疎水性を含む性質上の違いが存在し、疎水性の違いで両者を分離した。まず、平衡ｂｕｆｆｅｒ（２０ｍＭのＰＢ、０．３Ｍの（NH_4）$2SO_4$、ｐＨ７．０）を用いて１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ平衡化させ、次

に、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離されたターゲットタンパク質を２Ｍの（ＮＨ$_4$）２ＳＯ$_4$溶液でコンダクタンスを４０～５０ｍｓ／ｃｍに調整し、その後、サンプルローディングを行い、担持量を＜２０ｍｇ／ｍｌに制御し、サンプルローディングが終了した後、平衡ｂｕｆｆｅｒ（２０ｍＭのＰＢ、０．３Ｍの（ＮＨ$_4$）２ＳＯ$_4$、ｐＨ７．０）を使用して１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ洗い流し、最後にターゲットタンパク質溶出を行い、溶出ｂｕｆｆｅｒ（２０ｍＭのＰＢ、ｐＨ７．０）を用いてそれぞれ４０％、８０％および１００％の溶出ｂｕｆｆｅｒにて１００ｃｍ／ｈ以下の線形流速で３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ溶出し、溶出成分を段階的に収集し、それぞれＳＥＣ－ＨＰＬＣで検出した。単量体の百分率が９０％よりも大きいターゲット成分を合わせて次のステップのクロマトグラフィーを行った。

【０２３５】

ステップ３、陰イオン交換クロマトグラフィー：Ｂｓｅｔｃｈｒｏｍ社のＱ－ＨＰまたは他の市販の陰イオン交換クロマトグラフィー媒体（例えば、ＧＥのＱＨＰ、ＴＯＳＯＨのＴｏｙｏｐｅａｒｌ　ＧｉｇａＣａｐ　Ｑ－６５０、天地人和のＤＥＡＥ　Ｂｅａｄｓ　６ＦＦ、Ｓｅｐａｘ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのＧｅｎｅｒｉｋ　ＭＣ－Ｑ、ＭｅｒｃｋのＦｒａｃｔｏｇｅｌ　ＥＭＤ　ＴＭＡＥ、ＰａｌｌのＱ　Ｃｅｒａｍｉｃ　ＨｙｐｅｒＤＦ）を用いて精細精製を行い、構造変異体を分離し、ＨＣＰ、ＤＮＡ等の汚染物を更に除去した。まず、平衡ｂｕｆｆｅｒ（２０ｍＭのＰＢ、ｐＨ７．０）を用いて１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ洗い流し、ステップ２の疎水性クロマトグラフィー分離により得られたターゲットタンパク質に対してサンプルローディングを行い、流れを収集し、サンプルローディングが終了した後、平衡ｂｕｆｆｅｒ（２０ｍＭのＰＢ、ｐＨ７．０）を用いて１００～２００ｃｍ／ｈの線形流速でクロマトグラフィーカラムを３～５つのカラム体積（ＣＶ）だけ洗い流し、流れ成分を段階的に収集し、サンプルに対してタンパク質の含有量、ＳＥＣ－ＨＰＬＣおよび電気泳動検出をそれぞれ行った。

【０２３６】

サンプルのＳＥＣ－ＨＰＬＣ純度結果およびＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動結果は、それぞれ図１－３および図１－４に示すように、ここで、ＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果により、３ステップのクロマトグラフィー後の二重特異性抗体の主ピークの純度が９５％以上に達し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動のバンド形が予測に合致し、非還元電気泳動（１８０ＫＤａ）であり、還元後に明らかな（９０ＫＤａ）一本鎖のバンドが取得できたことが分かった。

【０２３７】

（ｂ）一本鎖の２価の二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ６の精製

【０２３８】

ＡＢ７Ｋ５は、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａアフィニティークロマトグラフィーおよびヒドロキシアパタイト（ＣＨＴ）クロマトグラフィーで精製され、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ検出により、その純度が低く、収率が高くなく、更に発現生産量が極めて低いという問題が存在することが発見された。

【０２３９】

別の一本鎖の２価の二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ６には、同様にプロセス開発の困難度が大きいという問題が存在し、ＡＢ７Ｋ６は、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａアフィニティークロマトグラフィーおよびモレキュラーシーブクロマトグラフィー Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００で２ステップの精製を行った後、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより検出すると、その純度が定量しにくく、主ピークに明らかな「肩ピーク」があることが発見された。また、その発現生産量が極めて低く、非常に不安定で、４℃の冷蔵庫において２４ｈ置いた後、そのＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果におけるピーク形が変化し、２つのピークから１つの主ピークに変更したことが発見され、ピーク出現時間により、それが一本鎖から二本鎖構造に変換したことによる可能性があると推測される。以上から、ＡＢ７Ｋ６の現在のプロセス開発の困難度が大きく、プロセス拡大および産業化を実現しにくいことが分かった。

【０２４０】
以上をまとめ、ＡＢ７Ｋ７はＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ６に対し、プロセス開発の面で顕著な優位性を有し、生産量が高く、精製方法が簡単で効率的であり、下流のプロセスが安定している等の利点を有する。、また、ＡＢ７Ｋ７の異なる緩衝液体系および異なる貯蔵条件での物理化学性能の安定性を更に考察した。
【０２４１】
ｃ）二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７の安定性試験
【０２４２】
ＡＢ７Ｋ７タンパク質のクエン酸塩（２０ｍＭのクエン酸塩、ｐＨ５．５）およびヒスチヒスチジン塩緩衝系（２０ｍＭのヒスチジン塩、ｐＨ５．５）における安定性をそれぞれ考察した。ＡＢ７Ｋ７タンパク質を２５℃の加速条件で４週間貯蔵し、タンパク質の安定性を評価した。
【０２４３】
ＡＢ７Ｋ７タンパク質を上記クエン酸塩（Ｆ２）およびヒスチジン塩（Ｆ３）緩衝液内にそれぞれ液交換し、濃度を０．５ｍｇ／ｍＬに調節し、上記２種の緩衝系にいずれも８％のショ糖（ｗ／ｖ）および０．０２％のＰＳ８０（ｗ／ｖ）を補助材として加えた。０．２２μｍのＰＥＳフィルムシリンジフィルタで濾過し、それぞれ２ｍＬのバイアル瓶に分注し、１瓶あたり０．８ｍＬとし、分注が終了すると直ちにプラグを押圧してキャッピングした。表１－２のスキームに基づいてサンプルを異なる安定性箱に入れ、各サンプリングポイントからサンプルを取り出して検出して分析し、検出項目は、サンプルの外観、濃度、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ検出によるサンプルの純度、ＨＭＷ％、ＬＭＷ％および濁度測定（Ａ３４０）を含む。
【０２４４】
【表２】

表１－２　安定性のテストスキーム

条件	T_0	サンプリングポイントおよび検出項目		
40℃	X, Y	１週間	２週間	４週間
		X, Y	X	X, Y
25℃		１週間	２週間	４週間
		X, Y	X	X, Y
凍結融解（－７０℃／室温）		３つのサイクル		
		X, Y		

備考：Ｘ＝外観、濃度、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（還元&非還元）、Ｙ＝濁度（Ａ３４０）

【０２４５】
２種の製剤処方を２５℃で０～４週間貯蔵した後の外観、濃度、濁度およびＳＥＣ－ＨＰＬＣ検出の結果は、表１－３および表１－４に示すとおりであり、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（還元／非還元）結果は、図１－５に示すとおりであった。２つの処方の外観、濃度の結果はいずれも明らかな変化がなかった。ＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果において、Ｆ２およびＦ３の２つの処方のＳＥＣの結果は明らかな変化がなく、４週間後の純度はそれぞれ９７．９％および９８．２％であった。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（還元／非還元）の結果はＬＭＷ％の結果の傾向とほぼ一致し、Ｆ２およびＦ３の変化は軽微であった。
【０２４６】
ＡＢ７Ｋ７タンパク質の２種の緩衝系における折り畳み解消温度を知るために、ＤＳＦ

の方式により２種の処方におけるＴｍ（折り畳み解消温度）およびＴｍｏｎｓｅｔ（タンパク質の折り畳み解消が開始する温度）を検出し、結果は表１－５に示すとおりであった。２つ処方のＴｍｏｎｓｅｔ値はいずれも低く、Ｆ２およびＦ３のＴｍｏｎｓｅｔ値はいずれも４５℃よりも低かった。

【０２４７】

【表３】

表１－３　２５℃の加速実験による外観、濃度、濁度の結果

	外観				濃度				濁度 A340		
	T0	1W	2W	4W	T0	1W	2W	4W	T0*	1W	4W
F2	無色透明の液体であり、異物が見られない				0.46	0.46	0.45	0.46	0.003	0.004	0.002
F3					0.47	0.46	0.45	0.47	0.004	0.003	0.005

＊Ｔ０濁度検出のサンプルは、１回の凍結融解を経たサンプルである。

【０２４８】

【表４】

表１－４　２５℃の加速実験によるＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果

	SEC-Purity%				SEC-HMW%				SEC-LMW%			
	T0	1W	2W	4W	T0	1W	2W	4W	T0	1W	2W	4W
F2	97.5	98.3	98.5	97.9	2.5	1.5	1.5	1.5	0	0.3	0.0	0.6
F3	97.7	98.8	98.7	98.2	2.3	1.2	1.3	1.2	0	0.0	0.0	0.6

【０２４９】

【表５】

表１－５　ＤＳＦの結果

	Tmonset (℃)	Tm1 (℃)	Tm2 (℃)
F2	42.0	46.0	60.5
F3	41.0	45.0	58.0

【０２５０】

それと同時に、３回の凍結融解実験を行い、凍結融解（－７０℃／室温、３回繰り返し凍結融解する）過程におけるＡＢ７Ｋ７タンパク質の上記２種の緩衝系における安定性状況を考察し、サンプルの準備およびテストスキームは同上であった。

【０２５１】

サンプルの外観、濃度、濁度およびＳＥＣ－ＨＰＬＣ検出の結果は表１－６に示すとおりであり、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（還元／非還元）の結果は図１－６に示すとおりであった。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（非還元）の結果において、Ｆ２およびＦ３という２つの処方は、３回の凍結融解を経た後、各検出項目の結果には明らかな変化がなかった。

【０２５２】

【表６】

表１－６　凍結融解実験による外観、濃度、濁度およびＳＥＣ－ＨＰＬＣの結果

	外観		濃度		濁度 A340		SEC-Purity%		SEC-HMW%		SEC-LMW%	
	T0	FT-3C	T0	FT-3C	T0	FT-3C	T0	FT-3C	T0	FT-3C	T0	FT-3C
F2	無色透明の液体であり、異物が見られない	無色透明の液体であり、異物が見られない	0.46	0.46	0.003	0.005	97.5	98.4	2.5	1.6	0	0.0
F3			0.47	0.48	0.004	0.005	97.7	98.5	2.3	1.4	0	0.2

＊Ｔ０濁度検出のサンプルは、１回の凍結融解を経たサンプルである。

【０２５３】

実施例２、Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体の体外生物学的機能の評価

【０２５４】

２．１、二重特異性抗体とエフェクター細胞および標的細胞との結合活性の測定（ＦＡＣＳ）

【０２５５】

ａ）フローサイトメトリー法を利用して二重特異性抗体とＨｅｒ２陽性腫瘍細胞ＢＴ－４７４との結合活性を検出した

【０２５６】

Ｈｅｒ２発現が陽性である腫瘍細胞ＢＴ－４７４細胞（上海中国科学院細胞バンク）を培養し、０．２５％のトリプシンで消化し、遠心により細胞を収集した。収集した細胞を１％のＰＢＳＢで重懸濁し、細胞密度を２×１０^{6}個／ｍｌに調整し、９６ウェルプレートに置き、ウェル毎に１００μｌ（２×１０^{5}個の細胞）とし、４℃で０．５ｈ密閉した。密閉後の細胞を遠心して上清を捨て、希釈した一連の濃度の二重特異性抗体を加え、４℃で１ｈインキュベートし、遠心して上清を取り除き、１％のＢＳＡのＰＢＳ溶液（ＰＢＳＢ）で３回洗浄し、希釈したＡＦ４８８で標識されたヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体またはマウス抗６×Ｈｉｓ　ＩｇＧ抗体を加え、４℃で遮光して１ｈインキュベートし、遠心して上清を取り除き、１％のＰＢＳＢで２回洗浄し、更にウェル毎に１００μｌの１％のパラホルムアルデヒド（ＰＦ）で重懸濁し、フローサイトメーターで信号強度を検出した。また、平均蛍光強度をＹ軸とし、抗体濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、二重特異性抗体の腫瘍細胞ＢＴ－４７４に結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０２５７】

その結果、異なる構造の二重特異性抗体およびＨｅｒ２過発現腫瘍細胞がいずれも良好な結合活性を有することが分かった。図２－１～図２－５は、異なる構造の二重特異性抗体の腫瘍細胞ＢＴ－４７４との結合の曲線を示した。表２－１に示すように、ＡＢ７ＫおよびＡＢ７Ｋ４の腫瘍細胞と結合するＥＣ$_{50}$は５ｎＭ程度にあり、ＡＢ７Ｋ７の腫瘍細胞と結合するＥＣ$_{50}$が５０ｎＭに近く、ＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ８の腫瘍細胞と結合するＥＣ$_{50}$が１００ｎＭであり、ＡＢ７Ｋ６の腫瘍細胞と結合するＥＣ$_{50}$が２００ｎＭ以上と高かった。

【０２５８】

【表７】

表２－１　Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体の腫瘍細胞ＢＴ４７４との結合能力の測定

	AB7K	AB7K4	AB7K5	AB7K6	AB7K7	AB7K8
EC_{50} (nM)	5.009	4.388	125.0	239.9	51.98	125.3

【０２５９】

ｂ）ＦＡＣＳを利用して二重特異性抗体のヒトのＴ細胞との結合活性を検出した

【０２６０】

密度勾配遠心法を採用してヒトの新鮮な血液からＰＢＭＣを調製し、１０％の熱不活化ＦＢＳを含む１６４０培地で重懸濁し、２μｇ／ｍｌのＯＫＴ３を加えて２４ｈ活性化した後、２５０ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を加えて７日間増幅培養し、調製してＣＩＫ細胞（Ｃｙｔｏｋｉｎｅ－Ｉｎｄｕｃｅｄ　Ｋｉｌｌｅｒ　ｃｅｌｌｓ）を取得し、フローサイトメーターによる検出を経て、細胞表面のＣＤ３発現が陽性であった。測定待ちサンプルの調製および測定方法は、実施例２．１ａ）と同様であった。１％のＰＦで重懸濁した細胞を装置で検出し、平均蛍光強度でソフトウェアＯｒｉｇｉｎＰｒｏ　８により分析し、各二重特異性抗体のヒトＣＩＫ細胞と結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０２６１】

その結果、各二重特異性抗体のＣＩＫ細胞との結合に大きな差が存在することを示した（図２－６～図２－１０）。表２－２に示すように、ＡＢ７ＫのＥＣ$_{50}$は約２０ｎＭであり、ＡＢ７Ｋ４の結果はそれに相当し、ＡＢ７Ｋ７はそれと６倍以上異なり、ＡＢ７Ｋ５、ＡＢ７Ｋ６、ＡＢ７Ｋ８はいずれもそれと１０倍以上異なったことが分かった。

【０２６２】

【表８】

表２－２　Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体のエフェクター細胞ＣＩＫとの結合能力の測定

	AB7K	AB7K4	AB7K5	AB7K6	AB7K7	AB7K8
EC_{50} (nM)	20.51	19.44	375.2	241.7	132.3	504.1

【０２６３】

ｃ）ＦＡＣＳにより二重特異性抗体のカニクイザルＣＩＫ細胞膜表面のＣＤ３との交差反応性を検出した

【０２６４】

密度勾配遠心法を採用してカニクイザルの新鮮な血液からＰＢＭＣを調製し、１０％の熱不活化ＦＢＳを含む１６４０培地で重懸濁し、２μｇ／ｍｌのＯＫＴ３を加えて２４ｈ活性化した後、２５０ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を加えて７日間増幅培養し、カニクイザルＣＩＫ細胞を取得して使用に備えた。ヒトＣＩＫ細胞およびカニクイザルＣＩＫ細胞を遠心して収集し、その後の実験過程は上記実施例と同じであった。１％のパラホルムアルデヒド溶液で重懸濁した細胞を装置で検出し、平均蛍光強度でソフトウェアＯｒｉｇｉｎＰｒｏ　８により分析し、二重特異性抗体のヒトＣＩＫ細胞およびカニクイザルＣＩＫ細胞にそれぞれ結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０２６５】

図２－１１に示すように、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋはカニクイザルの Ｔ細胞にも良好に結合でき、且つ、そのカニクイザルのＴ細胞に結合する能力とヒトのＴ細胞に結合する能力とがほぼ相当し、フローサイトメーターによりその結合のＥＣ$_{50}$が約２６ｎＭであることを検出した。二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ４、ＡＢ７Ｋ５、ＡＢ７Ｋ６、ＡＢ７Ｋ７およびＡＢ７Ｋ８は、ＡＢ７Ｋと同様に、カニクイザルのＴ細胞に特異的に結合することができた。

【０２６６】

２．２、二重特異性抗体の抗原と結合する能力の測定

【０２６７】

二抗原サンドイッチＥＬＩＳＡ法により二重特異性抗体の可溶ＣＤ３およびＨｅｒ２との結合を同定した。

【０２６８】

Ｈｅｒ２タンパク質（北京シノバイオロジカル社、品番１０００４－Ｈ０８Ｈ４）をＰＢＳで０．１μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、９６ウェルプレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、４℃一晩コーティングした。その後、１％の脱脂粉乳を用いて室温で１ｈ密閉した。それと同時に、各二重特異性抗体を希釈し、４倍の勾配で希釈し、合計１１個の濃度勾配を有した。その後で、ＰＢＳＴで９６ウェルプレートを洗浄し、希釈した二重特異性抗体を加え、抗体を加えない対照ウェルを設け、室温で１ｈインキュベートした。結合していない二重特異性抗体をＰＢＳＴで洗浄し、ビオチニル化されたＣＤ３Ｅ＆ＣＤ３Ｄ（ＡＣＲＯ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ、品番ＣＤＤ－Ｈ８２Ｗ１）を５０ｎｇ／ｍｌでｓｔｒｅｐｔａｖｄｉｎ ＨＲＰ（ＢＤ、品番５５４０６６）と混合して９６ウェルプレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、室温で１ｈインキュベートした。その後、９６ウェルプレートをＰＢＳＴで洗浄し、ＴＭＢを加え、１００μｌ／ウェルとし、室温で１５ｍｉｎ発色させ、その後、０．２ＭのＨ$_2$ＳＯ$_4$を加えて発色反応を終了させた。プレートリーダでＡ４５０－６２０ｎｍの吸光値を検出した。ソフトウェアＯｒｉｇｉｎＰｒｏ ８により分析し、二重特異性抗体の２つの抗原に結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０２６９】

その結果、各二重特異性抗体がいずれもＣＤ３とＨｅｒ２分子とを同時に特異的に結合することができ、且つ、抗体濃度の変化に従って良好な用量依存性を示す（図２－１２）ことが分かった。いくつかの二重特異性抗体の可溶ＣＤ３およびＨｅｒ２との結合能力は、表２－３に示すように、そのＥＣ$_{50}$値が０．０３ｎＭ～３．８ｎＭであり、２桁異なった。ここで、ＡＢ７Ｋの結合活性は最も良く、ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７はそれと１桁異なり、ＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ８の結合活性が最も弱かった。

【０２７０】

【表９】

表２－３ Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体のＣＤ３およびＨｅｒ２分子と結合する能力の測定

	AB7K	AB7K4	AB7K5	AB7K7	AB7K8
EC_{50} (nM)	0.03128	0.1518	1.004	0.1398	3.815

【０２７１】

２．３、レポータージーン細胞株で二重特異性抗体のＴ細胞を活性化する能力を評価した

【０２７２】

ＮＦＡＴ ＲＥレポータージーンを含むＪｕｒｋａｔ Ｔ細胞（ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、品番６０６２１）は、二重特異性抗体と標的細胞とが同時に存在する場合にルシフェラーゼを過発現することができ、ルシフェラーゼの活性を検出することによりＪｕｒｋａｔ Ｔ細胞の活性化程度を定量する。二重特異性抗体の濃度をＸ軸とし、フルオレセ

イン信号をＹ軸とし、４パラメータ曲線をフィッティングした。

【０２７３】

図２－１３の実験結果により、Ｈｅｒ２を標的とするモノクローナル抗体ＨｅｒｃｅｐｔｉｎはＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化できなかったことが分かった。２つの抗体が全て存在する場合にのみ、Ｔ細胞が活性化された。各抗体のＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化する能力を表２－４に示し、ここで、ＡＢ７Ｋ４のＴ細胞を活性化する能力が最も強く、ＡＢ７Ｋ８のＴ細胞を活性化する能力が最も弱く、そのＥＣ$_{50}$値が１桁異なった。

【０２７４】

【表１０】

表２－４　Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体のレポータージーン細胞株Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化する能力の測定

	AB7K	AB7K4	AB7K5	AB7K7	AB7K8	Herceptin
EC_{50} (nM)	0.02263	0.01338	0.05357	0.08952	0.1575	0.009907

【０２７５】

２．４、二重特異性抗体のＴ細胞を媒介して腫瘍細胞を殺傷する能力

【０２７６】

正常に培養した腫瘍細胞系は、ＳＫ－ＢＲ－３、ＭＣＦ－７、ＨＣＣ１９３７、ＮＣＩ－Ｎ８７、ＨＣＣ１９５４細胞（いずれも上海中科院細胞バンクから購入）を標的細胞として含み、０．２５％のトリプシンで消化し、単細胞懸濁液を調製し、細胞密度を２×１０^{5}個／ｍｌに調整し、９６ウェル細胞培養プレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、一夜培養した。実験設計に従って対応する抗体を希釈して５０μｌ／ウェルとし、抗体を入れる必要のないウェルを同じ体積の培地で補充した。その後、標的細胞数の５倍のエフェクター細胞（ヒトＰＢＭＣまたは増幅培養したＣＩＫ細胞）を加えて１００μｌ／ウェルとし、対照ウェルを設け、エフェクター細胞を入れる必要のないウェルを、同じ体積の培地で補充した。４８ｈ培養した後、９６ウェルプレートの上清を捨て、ＰＢＳで３回洗浄し、１０％のＣＣＫ－８を含む完全培地を加えて１００μｌ／ウェルとし、３７℃で４ｈインキュベートし、プレートリーダでＡ４５０～６２０ｎｍの吸光値を検出した。ソフトウェアＯｒｉｇｉｎＰｒｏ　８により分析し、各二重特異性抗体と同じ標的点のモノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎの腫瘍細胞の殺傷を媒介する能力を計算して比較した。

【０２７７】

各二重特異性抗体のエフェクター細胞を媒介して腫瘍細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$値を表２－５にまとめ、その結果、各二重特異性抗体は、Ｈｅｒ２が高発現した腫瘍細胞（例えば、ＳＫ－ＢＲ－３、ＮＣＩ－Ｎ８７およびＨＣＣ１９５４）に対していずれも非常に顕著な殺傷作用を示し、且つ、用量依存性を示したことが分かった。各二重特異性抗体（特に、ＡＢ７Ｋ７）は、Ｈｅｒ２が低発現した乳癌細胞ＭＣＦ－７に対しても良好な殺傷効果を示した。Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ耐薬の細胞株ＨＣＣ１９５４に対して、各二重特異性抗体も良好な殺傷作用を有し、Ｈｅｒ２発現が陰性（ごく少量が発現した）である細胞株ＨＣＣ１９３７に対して、各二重特異性抗体は、最も高い２つの濃度のみで殺傷作用を示した。

【０２７８】

【表１１】

表２－５　二重特異性抗体のＰＢＭＣを媒介して異なる腫瘍細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$値

EC_{50} (nM)	AB7K7	AB7K8	AB7K5	Herceptin
	～0.001	～0.002	～0.001	-
SK-BR-3	～0.001	0.011	-	0.067
MCF-7	～0.005	0.079	0.055	-
	0.659	～2.269	1.223	-
HCC1937	0.579	4.011	-	>6.667
NCI-N87	0.015	0.034	-	0.129
HCC1954	0.002	0.018	-	0.050

備考：～は、ほぼ等しいことを表し、－は、検出されていないことを表す。

【０２７９】
２．５、コンピュータ技術を採用してＧＳ－ＣＴＰリンカーペプチドの抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとＣＤ３分子との結合能力に対する影響を評価した
【０２８０】
コンピュータソフトウェアを採用してＧＳ－ＣＴＰリンカーペプチドを含む抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ　ＶＨに対して構造のモデリングを行い、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとその抗原ＣＤ３のｅｐｓｉｌｏｎ鎖の分子とのドッキングに対して空間配座のシミュレーションおよび予測を行った。
【０２８１】
二重抗体ＡＢ７Ｋ７における抗－Ｈｅｒ２　ｓｃＦｖと抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとの間に位置するＧＳ－ＣＴＰリンカーペプチド配列は（ＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳ）であり、前半はＧＳフレキシブルペプチド（ＧＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ）で、後半はＣＴＰリジッドペプチド（ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳ）であった。リジッドＣＴＰ部分（ＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳ）は抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ　ＶＨのＮ端に連結されている。ｐｈｙｒｅ２ソフトウェアにより３次元構造をモデリングし、構造上で、ＣＴＰペプチドセグメントが抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖのＶＨのＣＤＲ１領域をコーティングし（図２－１４）、ＣＤ３抗体とその抗原との結合を阻害するまたは不利にする可能性があった。ＧＳリンカーペプチド（ＣＴＰを除去し、ＧＳフレキシブルペプチドのみを含む）に連結された抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖのＶＨは、ｐｈｙｒｅ２ソフトウェアで３次元構造をモデリングし、ＧＳリンカーペプチドがＣＤＲ領域から離れ（図２－１５）、抗原と抗体との結合に影響を及ぼすことがないことを発見した。ＧＳリンカーペプチドがＣＤＲ領域に接近しても、その自体の柔軟性により、抗原と抗体との結合領域から自由に離れることができるため、抗原と抗体との結合に影響を及ぼすこともない。
【０２８２】
更に、Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ｓｔｕｄｉｏソフトウェアで抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとその抗原ＣＤ３のｅｐｓｉｌｏｎ鎖の分子とのドッキング状況をシミュレーションした。二本鎖の抗－ＣＤ３　ＦＶが抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖの構造と高度に類似しているため、抗－ＣＤ３　ｓｃＦの代わりに二本鎖の抗－ＣＤ３　ＦＶを用いて構造のシミュレーションを行った。シミュレーションの結果により、抗原ＣＤ３のｅｐｓｉｌｏｎ鎖が抗－ＣＤ３　ＦｖのＶＨのＣＤＲ２およびＣＤＲ３に結合するが、ＣＤＲ１領域に結合しないことが分かり（図２－１６）、そのＶＨのＣＤＲ１領域にコーティングされたＣＴＰは、抗－ＣＤ３　ｓｃ

Ｆｖと抗原との結合を干渉しないことを表すようであった。しかし、ＣＤ３分子が１つの複合体であり、１つのＣＤ３のｇａｍｍａ鎖、１つのＣＤ３のｄｅｌｔａ鎖および２つＣＤ３のｅｐｓｉｌｏｎ鎖を含むことを考えると、該ＣＤ３分子がＴＣＲおよびＺｅｔａ鎖と共にＴ細胞受容体の複合体を構成した。抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖのＶＨのＣＤＲ１にコーティングされたＣＴＰペプチドセグメントは抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとその抗原ＣＤ３のｅｐｓｉｌｏｎ鎖との結合を直接干渉しないが、ＣＴＰペプチドセグメントは、Ｔ細胞受容体の複合体のある構成タンパク質との空間構造での接触により、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとその抗原ＣＤ３のｅｐｓｉｌｏｎ鎖との結合に影響を間接的に及ぼす可能性があった。

【０２８３】

抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖのＶＨのＣＤＲ１領域にコーティングされたＣＴＰの存在により、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとその抗原との結合親和性が大きく低下し、Ｔ細胞の過剰活性化によるサイトカインの大量の放出を引き起こすことがなく、いくつかのＴ細胞により媒介される不要な非特異的殺傷を回避する。

【０２８４】

実施例３、Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体のマウス移植腫瘍モデルにおける薬効学的研究

【０２８５】

３．１、ＮＣＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞とを共接種した移植腫瘍モデル

【０２８６】

Ｈｅｒ２発現が陽性であるヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を選択し、ＮＣＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とＨＣＣ１９５４細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。

【０２８７】

正常なヒトの末梢血を取り、密度勾配遠心法（Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ^{TM}、ヒトリンパ球分離液、ＳＴＥＭＣＥＬＬ）でヒトＰＢＭＣ細胞を分離し、その後、ＲＰＭＩ－１６４０培養液に１０％の不活化したＦＢＳ重懸濁を加え、且つ、終濃度１μｇ／ｍｌのＯＫＴ３および２５０ＩＵ／ｍｌのヒトＩＬ－２を加え、３日間培養した後、３００ｇで５ｍｉｎ遠心してから液交換し、ＲＰＭＩ－１６４０に１０％の不活化したＦＢＳを加えて細胞を培養するとともに、２５０ＩＵ／ｍｌのヒトＩＬ－２を加え、その後、２日間毎に新鮮な培養液を添加し、１０日目まで培養し、ＣＩＫ細胞を収集した。７～８週齢の雌ＮＣＧマウス（ＧｅｍＰｈａｒｍａｔｅｃｈ社から購入）を選択し、対数成長期にあるＨＣＣ１９５４細胞（ＡＴＣＣ）を収集し、５×１０^{6}個のＨＣＣ１９５４細胞と５×１０^{5}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＣＧマウスの右側背部皮下に接種した。１ｈ後、マウスを体重で７グループにランダムに分け、グループ毎に５匹であり、対応する薬剤をそれぞれ腹腔投与し、陽性対照グループおよびＰＢＳ対照グループにいずれも週に２回投与し、合計３回投与し、陽性対照グループに用量がそれぞれ１ｍｇ／ｋｇおよび３ｍｇ／ｋｇのＨｅｒｃｅｐｔｉｎ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ、Ｒｏｃｈｅ社）を投与し、ＰＢＳ対照グループに同じ体積のＰＢＳ溶液を投与した。投与グループに毎日二重抗体ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７を投与し、投与量がそれぞれ０．１ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇであり、合計１０回投与した。投与当日を０日目と記し、電子式ノギスで腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、以下の式で腫瘍体積を計算し、

【数１】

$$(mm^3) = [D \times d^2] / 2$$

且つ、以下の式により各投与グループの腫瘍成長抑制率を計算した。

【数２】

$$TGI\ (\%) = (1 - \text{投与グループ体積} / \text{対照グループ体積}) \times 100\%$$

【０２８８】
図３－１に示すように、投与後の３３日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１４９４．６１±５００．２８mm^{3}であり、１ｍｇ／ｋｇのＨｅｒｃｅｐｔｉｎ投与グループの平均腫瘍体積が１３２７．２９±３７６．６５mm^{3}であり、３ｍｇ／ｋｇのＨｅｒｃｅｐｔｉｎ投与グループの平均腫瘍体積が５１０．４９±１０６．０７mm^{3}で、ＴＧＩが６５．８４％であり、ＰＢＳ対照グループに対して著しい差がなかった。０．１ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ４投与グループの平均腫瘍体積がそれぞれ３０４．１０±１０８．５０mm^{3}および７９．７０±５８．１４mm^{3}であり、ＴＧＩがそれぞれ７９．６５％および９４．６７％であり、ＰＢＳ対照グループに対していずれも著しい差（Ｐ＜０．０５）があった。０．１ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ７投与グループの平均腫瘍体積がそれぞれ３８５．８２±９５．４１mm^{3}および２０９．９８±５１．７４mm^{3}であり、ＴＧＩがそれぞれ７４．１９％および８５．９５％であり、ＰＢＳ対照グループに対していずれも著しい差（Ｐ＜０．０５）があった。以上の結果により、異なる用量の二重抗体ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７は、いずれも動物体内でヒト免疫細胞を活性化することにより腫瘍細胞の成長を抑制することができ、良好な抗腫瘍効果を示し、同じ１ｍｇ／ｋｇの用量で、二重抗体の腫瘍抑制効果がモノクローナル抗体Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎよりも明らかに優れていることが分かった。

【０２８９】
３．２、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞とを共接種した移植腫瘍モデル

【０２９０】
Ｈｅｒ２発現が陽性であるヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を選択し、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト乳癌細胞ＨＣＣ１９５４とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。

【０２９１】
実施例３．１における方法によりＣＩＫ細胞を取得した。７～８週齢の雌ＮＰＧマウス（Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｖｉｔａｌｓｔａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入）を選択し、対数成長期にあるＨＣＣ１９５４細胞（ＡＴＣＣ）を収集し、５×１０^{6}個のＨＣＣ１９５４細胞と５×１０^{5}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。腫瘍が６日間成長した後、マウスを腫瘍体積および体重によって３グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、対応する医薬をそれぞれ腹腔投与し、具体的には、ＡＢ７Ｋ７投与グループの用量がそれぞれ０．１ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇであり、週に２回投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳ溶液を投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（mm^3）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０２９２】
図３－２に示すように、投与後の２１日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が８２１．７３±２０１．８２mm^{3}であり、０．１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ７投与グループの平均腫瘍体積が４３５．６０±５１．０４mm^{3}で、ＴＧＩが５０．８３％であり、対照グループに対して著しい差がなかった。１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ７投与グループの平均腫瘍体積がそれぞれ４０．９８±１２．６４mm^{3}で、ＴＧＩが９５．３７％であり、対照グループに対していずれも顕著な差（Ｐ＜０．０１）があった。上記結果により、腫瘍が一定の大きさに成長してから二重抗体ＡＢ７Ｋ７を投与しても依然として良好な治療効果を有し、０．１ｍｇ／ｋｇの低用量で５０％の腫瘍抑制効果があり、１ｍｇ／ｋｇ投与グループの６匹のマウスのうち、４匹のマウスの腫瘍が完全に解消され、また、２匹の腫瘍体積も１００mm^{3}よりも小さく、グループ分け時の体積よりも小さく（グループ分け時に該グループの平均腫瘍体積が１６１．３７±１８．９８mm^{3}であった）、二重抗体ＡＢ７Ｋ７は良好な腫瘍治療の作用を有することが分かった。

【０２９３】

また、上記移植腫瘍モデルにおいて二重抗体ＡＢ７Ｋ７およびＡＢ７Ｋ８の２種の投与頻度で腫瘍成長に対する抑制作用を更に考察した。上記方法によりＣＩＫ細胞を取得し、７～８週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、５×１０^{6}個のＨＣＣ１９５４細胞と５×１０^{5}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。１ｈ後、マウスを体重によって６グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、対応する医薬をそれぞれ腹腔投与した。具体的には、対照グループおよびＨｅｒｃｅｐｔｉｎ投与グループにいずれも週に２回投与し、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎの投与量が３ｍｇ／ｋｇであり、対照グループに同じ体積のＰＢＳ溶液を投与した。二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７の投与量が１ｍｇ／ｋｇであり、ＡＢ７Ｋ８の投与量が０．７ｍｇ／ｋｇであり、２種の投与頻度をそれぞれ設け、ＱＤグループに毎日１回投与し、１０日間連続して投与し、ＢＩＷグループに週に２回投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、上記式により各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０２９４】

図３－３に示すように、投与後の２５日目、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１５８８．１２±１２０．４６ｍｍ^{3}であり、３ｍｇ／ｋｇのＨｅｒｃｅｐｔｉｎ投与グループの平均腫瘍体積が３６１．７２±１３４．７０ｍｍ^{3}であり、ＡＢ７Ｋ７のＱＤ投与グループおよびＢＩＷ投与グループの平均腫瘍体積がそれぞれ２６０．１８±４５．９６ｍｍ^{3}および２３９．３９±４０．６２ｍｍ^{3}であり、ＴＧＩがそれぞれ８３．６２％および８４．９３％であり、ＰＢＳ対照グループに対していずれも極めて顕著な差（Ｐ＜０．０１）があり、ＡＢ７Ｋ８のＱＤ投与グループおよびＢＩＷ投与グループの平均腫瘍体積がそれぞれ２８４．９８±２６．６２ｍｍ^{3}および６４７．１４±１１８．４９ｍｍ^{3}であり、ＴＧＩがそれぞれ８２．０６％および５９．２５％であり、ＰＢＳ対照グループに対していずれも極めて顕著な差（Ｐ＜０．０１）があった。上記結果から見られるように、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７は、ＱＤグループであってもＢＩＷグループであっても、抗腫瘍効果がいずれもＨｅｒｃｅｐｔｉｎよりも優れ、同じモル量で、ＱＤグループのＡＢ７Ｋ８およびＡＢ７Ｋ７の腫瘍抑制効果が相当し、ＢＩＷグループのＡＢ７Ｋ７はＡＢ７Ｋ８よりも顕著に優れた抗腫瘍効果を示し、これは、ＡＢ７Ｋ８がＢｉＴＥ構成の二重特異性抗体であり、Ｆｃドメインがなく、ＡＢ７Ｋ７がＡＢ７Ｋ８よりも半減期がより長いためであると推測され、臨床投与頻度が低下してより良好な治療効果が得られることが予測できる。

【０２９５】

３．３、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト卵巣癌ＳＫ－ＯＶ－３細胞とを共接種した移植腫瘍モデル

【０２９６】

Ｈｅｒ２発現が陽性であるヒト卵巣癌ＳＫ－ＯＶ－３細胞を選択し、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とＳＫ－ＯＶ－３細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。

【０２９７】

正常なヒトの末梢血を取り、密度勾配遠心法でヒトＰＢＭＣ細胞を分離し、その後、ＭｃＣｏｙ’ｓ　５Ａ培養液に１０％の不活化したＦＢＳを加えて重懸濁し、且つ、終濃度１μｇ／ｍｌのＯＫＴ３および２５０ＩＵ／ｍｌヒトＩＬ－２を加え、３日間後に、３００ｇで５ｍｉｎ遠心して上清を除去し、ＲＰＭＩ－１６４０に１０％の不活化したＦＢＳを加えて細胞を重懸濁するとともに、２５０ＩＵ／ｍｌのヒトＩＬ－２を加えて培養した。２日間毎に新鮮な培養液を添加し、１０日目まで培養し、ＣＩＫ細胞を収集した。７～８週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、対数成長期にあるＳＫ－ＯＶ－３細胞（中科院上海細胞バンクから購入）を収集し、３×１０^{6}個のＳＫ－ＯＶ－３細胞と３×１０^{5}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。接種してから１ｈ後に、マウスを体重で７グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、対応する医薬をそれぞれ腹腔投与し、ＨｅｒｃｅｐｔｉｎおよびＡＢ７Ｋ７投与グループにいずれも１ｍｇ／

ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇおよび０．０４ｍｇ／ｋｇそれぞれ投与し、投与頻度がいずれも週に２回投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳを投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（mm^3）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０２９８】

図３－４に示すように、投与後の２１日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が８３４．０９±４５．６４mm^3であり、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎの１ｍｇ／ｋｇ、０．２ｍｇ／ｋｇおよび０．０４ｍｇ／ｋｇ用量での平均腫瘍体積がそれぞれ６４４．８４±５８．２２mm^3、８８４．９５±３８．６３mm^3および８１５．７９±７８．３９mm^3であり、ＡＢ７Ｋ７の全ての投与グループの腫瘍はいずれも完全に解消された。上記結果により、卵巣癌ＳＫ－ＯＶ－３モデルにおいて、ＡＢ７Ｋ７が極めて低用量の０．０４ｍｇ／ｋｇでも依然として腫瘍を完全に解消することができ、極めて良好な抗腫瘍効果を示すことが分かった。

【０２９９】

３．４、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒト結腸癌細胞ＨＴ－２９細胞とを共接種した移植腫瘍モデル

【０３００】

Ｈｅｒ２発現が陽性であるヒト結腸癌ＨＴ－２９細胞を選択し、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とＨＴ－２９細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。

【０３０１】

実施例３．１における方法によりＣＩＫ細胞を取得した。７～８週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、対数成長期にあるＨＴ－２９細胞（中科院上海細胞バンクから購入）を収集し、３×10^6個のＨＴ－２９細胞と３×10^6個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。接種してから１ｈ後に、マウスを体重によって５グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、対応する医薬をそれぞれ腹腔投与し、具体的には、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎの投与量が３ｍｇ／ｋｇであり、ＡＢ７Ｋ７投与グループの用量がそれぞれ３ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇおよび０．３ｍｇ／ｋｇであり、全ての投与グループにいずれも週に２回投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳを投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（mm^3）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０３０２】

図３～５に示すように、投与後の２１日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１８８０．５２±３３８．２６mm^3であり、３ｍｇ／ｋｇのＨｅｒｃｅｐｔｉｎの平均腫瘍体積が１４６１．３６±１７７．９４mm^3であり、ＡＢ７Ｋ７の３ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇおよび０．３ｍｇ／ｋｇ用量の投与グループにおける平均腫瘍体積がそれぞれ１３．９４±７．０６mm^3、２６．３１±１０．７５mm^3および１０．４７±６．７１mm^3であり、ここで、０．３ｍｇ／ｋｇ投与グループで４匹のマウスの腫瘍が完全に解消され、１ｍｇ／ｋｇ投与グループで３匹のマウスの腫瘍が完全に解消され、３ｍｇ／ｋｇ投与グループで４匹のマウスの腫瘍が完全に解消された。上記結果により、結腸癌ＨＴ－２９モデルにおいて、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎはこの腫瘍モデルに対してほぼ薬効がないが、ＡＢ７Ｋ７は３つの用量でいずれもマウスの腫瘍を完全に解消し、極めて低い用量でも良好な抗腫瘍効果を示すことが分かった。

【０３０３】

３．５、ＣＤ３４免疫が再構成されたＮＰＧマウスにヒト乳癌ＨＣＣ１９５４を接種した移植腫瘍モデル

【０３０４】

Ｈｅｒ２発現が陽性であるヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を選択し、ＣＤ３４免疫が再構

成されたＮＰＧマウスの皮下にヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。

【０３０５】

ＣＤ３４陽性選別ビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃから購入）を用いて新鮮な臍帯血からＣＤ３４陽性の造血幹細胞を集め、３～４週齢の雌ＮＰＧマウス（Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｖｉｔａｌｓｔａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入）を選択し、ＣＤ３４陽性の造血幹細胞を尾静脈に注射し、マウス体内でヒトの免疫系を再構築した。１６週間後、マウスの後眼窩静脈叢から採血してフローサイトメトリーを行い、ヒトＣＤ４５の割合が１５％よりも大きいマウスを免疫の再構築が成功したマウスと見なした。対数成長期にあるＨＣＣ１９５４細胞を収集し、５×１０^{6}個のＨＣＣ１９５４細胞を免疫が再構成されたマウスの右側背部皮下に接種した。１ｈ後、マウスを体重によって３グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、用量１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ７およびＨｅｒｃｅｐｔｉｎをそれぞれ腹腔投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳを投与し、週に２回投与し、合計６回投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０３０６】

図３－６に示すように、投与後の２１日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が４７５．２３±５８．８２ｍｍ^{3}であり、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ投与グループの平均腫瘍体積が２９３．２７±６６．３５ｍｍ^{3}で、ＴＧＩが３８．２９％であり、対照グループに対して著しい差がなかった。ＡＢ７Ｋ７投与グループの平均腫瘍体積が０．６７±０．６７ｍｍ^{3}で、ＴＧＩが９９．８６％であり、全ての腫瘍がほとんど解消され、対照グループに対していずれも顕著な差（Ｐ＜０．０１）があった。以上の結果により、二重抗体ＡＢ７Ｋ７がＣＤ３４免疫再構築モデルにおいて極めて良好な抗腫瘍効果を有することが分かった。

【０３０７】

３．６、ＰＢＭＣ免疫が再構成されたＮＰＧマウスにヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を接種した移植腫瘍モデル

【０３０８】

Ｈｅｒ２発現が陽性であるＨＣＣ１９５４細胞を選択し、ＰＢＭＣ免疫が再構成されたＮＰＧマウスにヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を接種したマウス移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。

【０３０９】

正常なヒトの末梢血を取り、密度勾配遠心法でヒトＰＢＭＣ細胞を分離し、５～６週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、ヒトＰＢＭＣ細胞を腹腔に注射し、マウス体内でヒト免疫系を再構築した。ＰＢＭＣを注射してから７日間後に、対数成長期にあるＨＣＣ１９５４細胞を収集し、５×１０^{6}個のＨＣＣ１９５４細胞をマウスの右側背部皮下に接種した。ＰＢＭＣを注射してから１３日間後に、後眼窩静脈叢から採血してフローサイトメトリーを行い、ｈｕｍａｎ　ＣＤ４５の割合が１５％よりも大きいマウスを免疫の再構築が成功したマウスと見なした。ＰＢＭＣを注射してから１４日間後に、免疫が成功したマウスを腫瘍体積および体重によって２グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、用量１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ７を腹腔投与し、対照グループにＰＢＳを投与し、週に３回投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０３１０】

図３－７に示すように、投与後の２３日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１２２４．０５±２２４．３９ｍｍ^{3}であり、ＡＢ７Ｋ７投与グループの平均腫瘍体積が３２．００±０．００ｍｍ^{3}で、ＴＧＩが９７．４１％であり、全ての腫瘍がいずれも解消され、対照グループに対していずれも顕著な差（Ｐ＜０．００１）があった。以上の結果

により、二重機能特異性抗体ＡＢ７Ｋ７がＰＢＭＣ免疫再構築モデルにおいて極めて良好な抗腫瘍効果を有することが分かった。

【０３１１】

実施例４、Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体の安全性の評価

【０３１２】

４．１、二重特異性抗体は、Ｈｅｒ２発現が陰性である腫瘍細胞に対する非特異的殺傷を媒介することができなかった

【０３１３】

Ｈｅｒ２発現が陰性であるヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞を選択し、ＮＣＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおいて二重抗体が腫瘍成長を抑制するか否かを観察した。

【０３１４】

実施例３．１における方法によりＣＩＫ細胞を取得した。７～８週齢の雌ＮＣＧマウスを選択し、対数成長期にあるＲａｊｉ細胞（中科院上海細胞バンクから購入）を収集し、５×１０^{6}個のＲａｊｉ細胞と２×１０^{6}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＣＧマウスの右側背部皮下に接種した。１ｈ後、マウスを体重で３グループにランダムに分け、グループ毎に５匹であり、投与グループに用量１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７をそれぞれ腹腔投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳ溶液を投与し、毎日１回投与し、１０日間連続して投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０３１５】

図４－１に示すように、投与後の２５日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が２４３９．８８±１９３．６６ｍｍ^{3}であり、ＡＢ７Ｋ４投与グループの平均腫瘍体積が２４０８．８１±２１２．４４ｍｍ^{3}であり、ＡＢ７Ｋ７投与グループの平均腫瘍体積が２５９８．１１±２８９．３５ｍｍ^{3}であり、２つの投与グループ平均腫瘍体積が対照グループに対していずれも差がなかった。以上の結果により、二重抗体ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７は、Ｈｅｒ２発現が陰性である細胞株でいずれも非特性殺傷が観察されず、ＡＢ７Ｋ４およびＡＢ７Ｋ７が体内でＴ細胞の非標的組織に対する殺傷（即ち、二重特異性抗体と対応する標的抗原との結合に一意に依存する）を媒介せず、オフターゲット毒性がなく、安全性が高かったことが分かった。

【０３１６】

４．２、二重特異性抗体の腫瘍細胞に対する殺傷がＴ細胞の活性化に依存した

【０３１７】

Ｈｅｒ２発現が陽性であるヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を選択し、ＮＰＧマウスの皮下にヒト乳癌ＨＣＣ１９５４細胞を単独で接種した移植腫瘍モデルにおいて二重抗体が腫瘍成長を抑制するか否かを観察した。

【０３１８】

７～８週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、対数成長期にあるＨＣＣ１９５４細胞を収集し、５×１０^{6}個のＨＣＣ１９５４細胞とＭａｔｒｉｇｅｌマトリゲル（Ｃｏｒｎｉｎｇ、品番：３５４２３４）とを体積比１：１で均一に混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。腫瘍が６日間成長した後、マウスを腫瘍体積および体重によって３グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、投与グループに用量３ｍｇ／ｋｇのＨｅｒｃｅｐｔｉｎおよび１ｍｇ／ｋｇのＡＢ７Ｋ７をそれぞれ腹腔投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳを投与し、週に２回投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０３１９】

図４－２に示すように、投与後の２１日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１

３１１．３５±２１５．７０ｍｍ^{3}であり、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ投与グループの平均腫瘍体積が２７３．９８±６０．１０ｍｍ^{3}であり、ＡＢ７Ｋ７投与グループの平均腫瘍体積が１２４３．２０±３４０．３１ｍｍ^{3}であり、対照グループに対して差がなかった。以上の結果により、ＡＢ７Ｋ７がヒト免疫細胞の存在がない場合にＨＣＣ１９５４皮下腫瘍の成長を抑制しないことで、二重抗体ＡＢ７Ｋ７は腫瘍細胞を殺傷できるために免疫エフェクター細胞の媒介を介する必要があることを表し、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎのように主にＦｃγＲにより媒介されたＡＤＣＣまたはＣＤＣ効果に依存して腫瘍細胞を殺傷するのではなく、ＡＢ７Ｋ７に含まれるＦｃ変異体がＦｃγＲに結合できないことが証明され、その受容体ＦｃγＲの広範な発現によるＴ細胞の全身性活性化を媒介することを回避できるため、薬剤の安全性がより高いことが分かった。

【０３２０】

４．３、二重特異性抗体の正常なカニクイザル対する毒性の評価

【０３２１】

３～４歳の雌の成年カニクイザル（広州相観生物科技有限公司から購入）を選択し、体重が３～４ｋｇで、３グループに分け、グループ毎に１匹とし、それぞれが溶媒対照グループ、ＡＢ７Ｋ７投与グループおよびＡＢ７Ｋ８投与グループであった。投与方式は、ペリスタポンプで１ｈ静脈点滴し、それぞれ０日目（Ｄ０）、７日目（Ｄ７）、２１日目（Ｄ２１）および２８日目（Ｄ２８）に投与し、合計４回投与し、薬剤用量が逓増したことであった。それと同時に、毎週動物の体重を量った。投与量および体積は以下の表４－１に示すとおりであった。

【０３２２】

Ｄ０に投与した後、ＡＢ７Ｋ８投与グループのカニクイザルは、傾眠、瞳孔が縮小する現象が現れ、翌日正常に回復し、他のグループに異常がなかった。Ｄ７に投与した後、ＡＢ７Ｋ７投与グループのカニクイザルは、投与してから２～３ｈ後に嘔吐症状が現れ、投与の翌日正常に回復し、他のグループに異常がなかった。Ｄ２１に投与した後、ＡＢ７Ｋ７投与グループのカニクイザルは、投与してから３ｈ後に食物を嘔吐する症状が現れ、ゼリー状の糞便を排泄し、ＡＢ７Ｋ８投与グループは、投与してから１ｈ後に食物を嘔吐する症状が現れ、２グループのカニクイザルは、投与の翌日全て正常に回復した。Ｄ２８に投与してから４０～５０ｍｉｎ後、ＡＢ７Ｋ７およびＡＢ７Ｋ８投与グループはいずれも嘔吐症状が現れ、３ｈ後に動物が排出した糞便にいずれもゼリー状の粘着液があり、６ｈ後、ＡＢ７Ｋ７投与グループの動物は魚の臭みがある水のような糞便を排出した。２４ｈ後、動物はいずれも正常に回復し、飲食が正常となった。カニクイザルの体重変化は図４－３に示すように、矢印が投与時間を表し、各グループの体重がいずれも大きく変化せず、正常な生理値範囲内で変動していることが見られた。

【０３２３】

【表１２】

表４－１　カニクイザルの急性毒性の評価および投与アレンジ

グループ	試薬の名称	投与体積	投与量
G1	溶媒対照グループ	D0：5 mL/kg D7：5 mL/kg D21：10 mL/kg D28：10 mL/kg	N/A
G2	AB7K7	D0：5 mL/kg D7：5 mL/kg D21：10 mL/kg D28：10 mL/kg	D0：0.06 mg/kg D7：0.3 mg/kg D21：1.5 mg/kg D28：3 mg/kg
G3	AB7K8	D0：5 mL/kg D7：5 mL/kg D21：10 mL/kg D28：10 mL/kg	D0：0.04 mg/kg D7：0.2 mg/kg D21：1 mg/kg D28：2 mg/kg

【０３２４】

本実験の過程で観察された異なる程度の下痢は、腸管内の関連受容体の発現に関連する可能性があり、二重抗体がＨｅｒ１／Ｈｅｒ２またはＨｅｒ２／Ｈｅｒ３のヘテロ二量体を抑制した後に腸管の塩素イオンのアンバランスを引き起こすことによるものと推測され、薬理作用の延伸に属し、投与してから２４ｈ後に正常に回復することができった。ＡＢ７Ｋ７が３ｍｇ／ｋｇという高い投与量に達すると、カニクイザルは依然として良好な耐性を有し、マウスの薬効実験の結果により、低用量のＡＢ７Ｋ７が良好な抗腫瘍効果を表し、ＡＢ７Ｋ７の治療ウィンドウが広く、安全性が高いことを示すことが分かった。

【０３２５】

実施例５、Ａｎｔｉ－Ｈｅｒ２×ＣＤ３抗体の薬物動態学研究

【０３２６】

５．１、二重抗体ＡＢ７Ｋ７のＳＤラット体内での薬物動態学実験

【０３２７】

ＡＢ７Ｋ７を１ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈投与の方式により４匹の健康なＳＤラット（ＳＨＡＮＧＨＡＩ　ＳＬＡＣ　ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ　ＡＮＩＭＡＬから購入）に注射した。採血時点が、それぞれ１ｈ、３ｈ、６ｈ、２４ｈ、７２ｈ、９６ｈ、１２０ｈ、１６８ｈ、２１６ｈおよび６４ｈであった。各時点で一定量の全血を採取し、血清を分離した後、２種のＥＬＩＳＡ方法で血清中の薬品濃度を測定した。

【０３２８】

方法１、抗ＡＢ７Ｋ７抗体Ａ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）を用いてプレートをコーティングし、プレートコーティング濃度が０．５μｇ／ｍＬであった。ＡＢ７Ｋ７を１００ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ、２５ｎｇ／ｍＬ、１２．５ｎｇ／ｍＬ、６．２５ｎｇ／ｍＬ、３．１２５ｎｇ／ｍＬおよび１．５６ｎｇ／ｍＬで設定して検量線を確立した。ＨＲＰで抗ＡＢ７Ｋ７抗体Ｂ（安源医薬科技（上海）有限公司、ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ－ＨＲＰ）をマークし、使用濃度が１：５０００であり、最後に、ＴＭＢで発色した。ＰＫＳｏｌｖｅｒソフトウェアを利用して薬物動態学パラメータを計算し、具体的なパラメータは表５－１に示すとおりであった。

【０３２９】
方法２、ＳＤラットの血清中の薬品濃度を検出した。抗ＡＢ７Ｋ７抗体Ａ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）を用いてプレートをコーティングし、プレートコーティング濃度が０．５μｇ／ｍＬであった。ＡＢ７Ｋ７を５ｎｇ／ｍＬ、２．５ｎｇ／ｍＬ、１．２５ｎｇ／ｍＬ、０．６２５ｎｇ／ｍＬ、０．３１２５ｎｇ／ｍＬ、０．１５６ｎｇ／ｍＬおよび０．０７８ｎｇ／ｍＬで設定して検量線を確立した。マウス抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ－ＨＲＰ（安源医薬科技（上海）有限公司）を１：５０００で加え、最後に、ＴＭＢで発色した。ＰＫＳｏｌｖｅｒソフトウェアを利用して薬物動態学パラメータを計算し、具体的なパラメータは表５－２に示すとおりであった。

【０３３０】
図５－１は、２種の異なる検出方法でＡＢ７Ｋ７のラット体内での血中濃度を検出することを示し、２種の異なる検出方法で血中のＡＢ７Ｋ７の濃度を検出し、得た血中濃度はほぼ一致し、計算した薬物動態学パラメータがほぼ同じであり、ＡＢ７Ｋ７が体内で完全な分子の形式で代謝され、その生物学的機能が確保できることを意味した。

【０３３１】
【表１３】
表５－１　二重抗体ＡＢ７Ｋ７のＳＤラット内の薬物動態学パラメータ（方法１）

AB7K7	$t_{1/2}$（h）	AUC 0-inf_ob（ng/mL*h）	Vz_obs（μg)/(ng/mL)）	Cl_obs(μg)/(ng/mL)/h
薬物動態学パラメータ	42.10	550236.77	0.02351	3.811E-4

【０３３２】
【表１４】
表５－２　二重抗体ＡＢ７Ｋ７のＳＤラット内の薬物動態学パラメータ（方法２）

AB7K7	$t_{1/2}$（h）	AUC 0-inf_ob（ng/mL*h）	Vz_obs（μg)/(ng/mL)）	Cl_obs(μg)/(ng/mL)/h
薬物動態学パラメータ	41.02	706126.89	0.01720	2.899E-4

【０３３３】
５．２、二重抗体ＡＢ７Ｋ７のＮＰＧモデルマウス体内での薬物動態学実験

【０３３４】
ＮＰＧマウス（Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｖｉｔａｌｓｔａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入）に投与する１週間前にＨＣＣ１９５４細胞（中科院中国科学院生化学細胞生物学研究所から購入）を接種し、接種密度が３．５×１０^{6}／匹であった。投与する２日前にＣＩＫ細胞を蘇生させ、２４ｈ培養してから細胞を収集してマウス体内に静脈注射した。マウスを３グループにランダムに分け、グループ毎に４匹とした。３つの投与グループ投与量が、それぞれ０．３ｍｇ／ｋｇ、１ｍｇ／ｋｇおよび３ｍｇ／ｋｇであった。採血時点がそれぞれ１ｈ、３ｈ、６ｈ、２４ｈ、４８ｈ、７２ｈ、９６ｈ、１２０ｈ、１６８ｈ、２１６ｈおよび２６４ｈであった。各時点で一定量の全血を採取し、血清を分離した後、ＥＬＩＳＡ方法で血清中の薬品濃度を測定した。

【０３３５】
抗ＡＢ７Ｋ７抗体Ａ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）を用いてプレートをコーティングし、プレートコーティング濃度が０．５μｇ／ｍＬであった。ＡＢ７Ｋ７を１００ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ、２５ｎｇ／ｍＬ、１２．５ｎｇ／ｍＬ、６．２５ｎｇ／ｍＬ、３．１２５ｎｇ／ｍＬおよび１．５６ｎｇ／ｍＬで設定して検量線を確立した。ＨＲＰで抗ＡＢ７Ｋ７抗体Ｂ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）をマークし、使用濃度が１：

５０００であり、最後に、ＴＭＢで発色した。ＰＫＳｏｌｖｅｒソフトウェアを利用して薬物動態学パラメータを計算し、具体的なパラメータは表５－３に示すとおりであった。表５－３から見られるように、ＡＢ７Ｋ７のＮＰＧモデルマウス体内での薬物動態学パラメータは、ＳＤラット体内での薬物動態学パラメータと数値で大きな差がなかった。

【０３３６】

【表１５】

表５－３　二重抗体ＡＢ７Ｋ７のＮＰＧモデルマウスでの薬物動態学パラメータ

パラメータ / グループ	$t_{1/2}$（h）	AUC0-inf_obs（ng/mL*h）	Vz_ob（μg)/(ng/mL)）	Cl_obs(μg)/(ng/mL)/h
0.3 mg/kg IV	39.54	79932.39	0.004872	8.968E-05
1 mg/kg　IV	42.70	597036.63	0.002461	3.996E-05
3 mg/kg　IV	46.03	2171649.41	0.002292	3.469E-05

【０３３７】

５．３、二重抗体ＡＢ７Ｋ８のＳＤラット体内での薬物動態学実験

【０３３８】

ＡＢ７Ｋ８をそれぞれ１ｍｇ／ｋｇおよび３ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈投与の方式により３匹の健康なＳＤラットに注射した。採血時点が、それぞれ０．２５ｈ、０．５ｈ、１ｈ、２ｈ、３ｈ、４ｈ、５ｈおよび７ｈであった。各時点で一定量の全血を採取し、血清を分離した後、ＥＬＩＳＡ方法で血清中の薬品濃度を検出した。

【０３３９】

抗ＡＢ７Ｋ８抗体Ｃ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）を用いてプレートをコーティングし、プレートコーティング濃度が２．５μｇ／ｍＬであった。ＡＢ７Ｋ８を２５ｎｇ／ｍＬ、１２．５ｎｇ／ｍＬ、６．２５ｎｇ／ｍＬ、３．１２５ｎｇ／ｍＬ、１．５６ｎｇ／ｍＬおよび０．７８ｎｇ／ｍＬで設定して検量線を確立した。ＨＲＰで抗－ｈｉｓの抗体（安源医薬科技（上海）有限公司）をマークし、使用濃度が１：５０００であり、最後に、ＴＭＢで発色した。ＰＫＳｏｌｖｅｒソフトウェアを利用して薬物動態学パラメータを計算し、具体的なパラメータは表５－４に示すとおりであった。

【０３４０】

ＡＢ７Ｋ８は、２種の用量で、得られた薬物動態学パラメータ$Ｔ_{1／2}$がほぼ一致し、そのＳＤラット体内で線形代謝動態学を示していることが分かった。ＡＢ７Ｋ８はＦｃを含まないため、その$Ｔ_{1／2}$が非常に短く、ＡＢ７Ｋ７と比べて約２０倍短くなった。

【０３４１】

【表１６】

表５－４　二重抗体ＡＢ７Ｋ８のＳＤラット内の薬物動態学パラメータ

AB7K8	$t_{1/2}$（h）	AUC 0-inf_ob（ng/mL*h）	Vz_obs（μg)/(ng/mL)）	Cl_obs(μg)/(ng/mL)/h
1 mg/kg　IV	2.27	4623.14	0.17082	0.05191
3 mg/kg　IV	1.98	20608.77	0.10220	0.03579

【０３４２】

５．４、二重抗体ＡＢ７ＫのＳＤラット体内での薬物動態学実験

【０３４３】

ＡＢ７Ｋを０．８ｍｇ／ｋｇの用量で尾静脈投与の方式により４匹の健康なＳＤラット

に注射した。採血時点が、それぞれ２ｈ、２４ｈ、４８ｈ、７２ｈ、９６ｈ、１２０ｈ、１４４ｈ、１６８ｈ、２１６ｈおよび２６４ｈであった。各時点で一定量の全血を採取し、血清を分離した後、２種のＥＬＩＳＡ方法で血清中の薬品濃度を測定した。

【０３４４】

方法１、抗ＡＢ７Ｋ抗体Ａ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）を用いてプレートをコーティングし、プレートコーティング濃度が１μｇ／ｍＬであった。ＡＢ７Ｋを２０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、２．５ｎｇ／ｍＬ、１．２５ｎｇ／ｍＬ、０．６２５ｎｇ／ｍＬおよび０．３１２５ｎｇ／ｍＬで設定して検量線を確立した。２５ｎｇ／ｍＬのビオチンでマークされたヒトＣＤ３Ｅ＆ＣＤ３Ｄ（Ａｃｒｏ、品番ＣＤＤ－Ｈ８２Ｗ０）を加え、１ｈインキュベートしてから１：５００で希釈されたＨＲＰマークのストレプトアビジン（ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、品番５５４０６６）を加え、最後に、ＴＭＢで発色した。ＰＫＳｏｌｖｅｒソフトウェアを利用して薬物動態学パラメータを計算し、具体的なパラメータは表５－５に示すとおりであった。

【０３４５】

【表１７】

表５－５　二重抗体ＡＢ７Ｋの薬物動態学パラメータ

AB7K	$t_{1/2}$（h）	AUC 0-inf_ob（ng/mL*h）	Vz_obs（μg)/(ng/mL)）	Cl_obs(μg)/(ng/mL)/h
薬物動態学パラメータ	60.47	1022788.69	0.01726	1.985E-4

【０３４６】

方法２、抗ＡＢ７Ｋの抗体Ａ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）を用いてプレートをコーティングし、プレートコーティング濃度が１μｇ／ｍＬであった。ＡＢ７Ｋを２０ｎｇ／ｍＬ、１０ｎｇ／ｍＬ、５ｎｇ／ｍＬ、２．５ｎｇ／ｍＬ、１．２５ｎｇ／ｍＬ、０．６２５ｎｇ／ｍＬおよび０．３１２５ｎｇ／ｍＬで設定して検量線を確立した。マウス抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ－ＨＲＰ（１：１０００で希釈）（安源医薬科技（上海）有限公司）を加え、１ｈインキュベートし、最後に、ＴＭＢで発色した。

【０３４７】

図５－２は、２種の異なる検出方法でＡＢ７Ｋのラット体内での血中濃度を検出することを示し、結果により、２種の検出方法で測定した結果の差が大きいことが分かった。曲線の最初の２つの点（２ｈ、１Ｄ）の濃度はまだ近かったが、翌日以降、２種の方法で測定した濃度の差が大きくなり、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖと抗－Ｈｅｒ２抗体の重鎖間のリンカーペプチドが切断だれた可能性があると推測された。ＡＢ７Ｋは、体内での構造が安定せず、その生物学的機能を発揮できなかった一方、改良されたＡＢ７Ｋ７は体内で完全な形式で代謝でき、その生物学的機能を正常に発揮することができた。

【０３４８】

５．５、二重抗体ＡＢ７Ｋ７およびＡＢ７Ｋ８のカニクイザル体内での薬物動態学実験

【０３４９】

カニクイザル（広州相観生物科技有限公司から購入）を３グループに分け、グループ毎に１匹とし、性別が雌で、体重が３～４ｋｇであった。グループ１（Ｇ１－１）はブランクグループであり、グループ２（Ｇ２－１）はＡＢ７Ｋ７投与グループで、投与量が０．３ｍｇ／ｋｇであり、グループ３（Ｇ３－１）はＡＢ７Ｋ８投与グループで、投与量が０．２ｍｇ／ｋｇであった。採血時点がそれぞれ１５ｍｉｎ、１ｈ、３ｈ、６ｈ、２４ｈ、４８ｈ、７２ｈ、９６ｈ、１４４ｈ、１９２ｈ、２４０ｈおよび２８８ｈで、合計１３個の時間であった。採血して血清を収集し、－８０℃で凍結保存し、その後、ＥＬＩＳＡ方法で血清中の薬品濃度を測定した。

【０３５０】

抗ＡＢ７Ｋ７抗体Ａ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）を用いてプレートをコーティングし、プレートコーティング濃度が０．５μｇ／ｍＬであった。ＡＢ７Ｋ７を１００ｎｇ／ｍＬ、５０ｎｇ／ｍＬ、２５ｎｇ／ｍＬ、１２．５ｎｇ／ｍＬ、６．２５ｎｇ／ｍＬ、３．１２５ｎｇ／ｍＬ、１．５６ｎｇ／ｍＬで設定して検量線を確立した。ＨＲＰで抗ＡＢ７Ｋ７抗体Ｂ（安源医薬科技（上海）有限公司、ｍｏｕｓｅ－ａｎｔｉ－ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ）をマークし、使用濃度が１：５０００であり、最後に、ＴＭＢで発色した。ＰＫＳｏｌｖｅｒソフトウェアを利用して薬物動態学パラメータを計算し、具体的なパラメータは表５－６に示すとおりであった。

【０３５１】

図５－３は、ＡＢ７Ｋ７のラット体内での血中濃度を示し、ＡＢ７Ｋ７の正常なカニクイザル体内での$T_{1/2}$が僅か８時間程度であった。ＡＢ７Ｋ８は、血中濃度－時間曲線における点が少なすぎるため、薬物動態学パラメータを計算することができなかった。しかし、血中濃度－時間曲線から見られるように、正常なカニクイザル体内でＡＢ７Ｋ７はＡＢ７Ｋ８よりも半減期がかなりなかった。

【０３５２】

【表１８】

表５－６　二重抗体ＡＢ７Ｋ７のカニクイザル体内での薬物動態学パラメータ

AB7K7	$t_{1/2}$（h）	AUC 0-inf_obs ng/mL*h）	Vz_obs（μg)/(ng/mL)）	Cl_obs(μg)/(ng/mL)/h
薬物動態学パラメータ	7.95	87995.48	0.1563	0.01364

【０３５３】

５．６、ＥＬＩＳＡ技術により二重特異性抗体のＦｃＲｎと結合する能力を評価した

【０３５４】

各抗体をＰＢＳ溶液で１０μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、９６ウェルプレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、４℃一晩コーティングした。その後、１％の脱脂粉乳を用いて室温で１ｈ密閉した。それと同時に、それぞれｐＨ６．０および７．０の希釈液を用いてビオチンｂｉｏｔｉｎでマークされたＦｃＲｎタンパク質（ＡＣＲＯ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ、品番ＦＣＭ－Ｈ８２８６）を希釈し、４倍の勾配で希釈し、合計１１個の濃度勾配を有した。同じｐＨのＰＢＳＴで９６ウェルプレートをそれぞれ洗浄し、同じｐＨの希釈液で希釈された二重特異性抗体を加え、抗体を加えない対照ウェルを設け、室温で１ｈインキュベートした。同じｐＨのＰＢＳＴ溶液でプレートを洗浄し、ストレプトアビジン－ＨＲＰ（ＢＤ、品番５５４０６６）を９６ウェルプレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、室温で０．５ｈインキュベートした。その後、９６ウェルプレートをＰＢＳＴで洗浄し、ＴＭＢを加えて１００μｌ／ウェルとし、室温で１５ｍｉｎ発色させ、その後、０．２ＭのH_2SO_4を加えて発色反応を終了させた。プレートリーダでＡ４５０ｎｍ～６２０ｎｍの吸光値を検出した。ソフトウェアＯｒｉｇｉｎＰｒｏ　８により分析し、二重特異性抗体のＦｃＲｎに結合するEC_{50}値を計算した。

【０３５５】

結果により、異なるｐＨ条件で各抗体のＦｃＲｎとの結合能力が異なることが分かり、体内ＰＫのデータと合わせ、二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７の半減期がＡＢ７Ｋよりも長いが、Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎよりも短いと分析でき、これは、臨床応用に更に寄与する可能性がある（図５－４および図５－５）。表５－７および表５－８は、それぞれｐＨ６．０および７．０時の各抗体のＦｃＲｎとの結合能力の測定結果を示した。

【０３５６】

【表１９】

表５－７　ｐＨ６．０時の二重抗体ＡＢ７Ｋ、ＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ７のＦｃＲｎと結合する能力の測定

	Herceptin	AB7K	AB7K5	AB7K7
EC_{50} (μg/ml)	2.591	0.8027	1.706	0.4630

【０３５７】

【表２０】

表５－８　ｐＨ７．０時の二重抗体ＡＢ７Ｋ、ＡＢ７Ｋ５およびＡＢ７Ｋ７のＦｃＲｎと結合する能力の測定

	Herceptin	AB7K	AB7K5	AB7K7
EC_{50} (μg/ml)	～287.1	1.651	13.43	4.838

【０３５８】

実施例６、ｓｃＦｖ１－ｓｃＦｖ２－Ｆｃ構成の二重特異性抗体の調製

【０３５９】

上記６種の抗－Ｈｅｒ２×ＣＤ３二重特異性抗体に対する多面的な研究の結果により、ＡＢ７Ｋ７というｓｃＦｖ１－ｓｃＦｖ２－Ｆｃ構成の二重特異性抗体は、調製しやすく、精製方法が簡単かつ効率的で、且つ、調製および保存過程で安定性が良いという利点を有することを確定できた。より好ましくは、正常細胞に対する非特異的殺傷作用が微弱であり、制御されたエフェクター細胞の過剰な活性化による可能性がある毒副作用等を有するという顕著な優位性を有し、ドラッガビリティが良好であった。

【０３６０】

実施例１における二重特異性抗体ＡＢ７Ｋ７の構成設計および調製方法を参照し、一連の免疫エフェクター細胞抗原ＣＤ３分子および腫瘍関連抗原を標的とする二重特異性抗体分子を構築し、このような二重特異性抗体分子は、２本の同じポリペプチド鎖でＦｃ断片のヒンジ領域の鎖間ジスルフィド結合を介して４価の相同二量体を結合して形成し、各本のポリペプチド鎖は、Ｎ端からＣ端まで、抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖ、リンカーペプチド、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖ、およびＦｃ断片で順に構成され、以下、各二重特異性抗体の各構造単位の分子組成について具体的に説明した。

【０３６１】

ここで、前記腫瘍関連抗原は、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ２５、ＣＤ３０、ＣＤ３３、ＣＤ３８、ＣＤ３９、ＣＤ４０、ＣＤ４７、ＣＤ５２、ＣＤ７３、ＣＤ７４、ＣＤ１２３、ＣＤ１３３、ＣＤ１３８、ＢＣＭＡ、ＣＡ１２５、ＣＥＡ、ＣＳ１、ＤＬＬ３、ＤＬＬ４、ＥＧＦＲ、ＥｐＣＡＭ、ＦＬＴ３、ｇｐＡ３３、ＧＰＣ－３、Ｈｅｒ２、ＭＥＧＥ－Ａ３、ＮＹＥＳＯ１、ＰＳＭＡ、ＴＡＧ－７２、ＣＩＸ、葉酸塩結合タンパク質、ＧＤ２、ＧＤ３、ＧＭ２、ＶＥＧＦ、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、カドヘリン（Ｃａｄｈｅｒｉｎ）、インテグリン（Ｉｎｔｅｇｒｉｎ）、メソテリン（Ｍｅｓｏｔｈｅｌｉｎ）、Ｃｌａｕｄｉｎ１８、αＶβ３、α５β１、ＥＲＢＢ３、ｃ－ＭＥＴ、ＩＧＦ１Ｒ、ＥＰＨＡ３、ＴＲＡＩＬＲ１、ＴＲＡＩＬＲ２、ＲＡＮＫＬ、Ｂ７タンパク質ファミリー、ムチンファミリー（Ｍｕｃｉｎ）、ＦＡＰ、およびテネイシン（Ｔｅｎａｓｃｉｎ）を含んでもよいが、これらに限定されない。好ましくは、前記腫瘍関連抗原はＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２２、ＣＤ３０、ＣＤ３８、ＢＣＭＡ、ＣＳ１、ＥｐＣＡＭ、ＣＥＡ、Ｈｅｒ２、ＥＧＦＲ、ＣＡ１２５、Ｍｕｃｉｎ１、ＧＰＣ－３、およびＭｅｓｏｔｈｅｌ

ｉｎであった。

【０３６２】

表６－１は、いくつかの好ましい腫瘍関連抗原に対する第１の一本鎖ＦｖのＶＨドメインおよびその相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３）のアミノ酸配列と、ＶＬドメインおよびその相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３）のアミノ酸配列とを列挙し、そのＣＤＲ領域に含まれるアミノ酸残基は、Ｋａｂａｔルールに基づいて定義された。ここで、抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のリンカーペプチドアミノ酸組成は（ＧＧＧＧＳ）ｎであり、ｎ＝１、２、３、４、または５であった。

【０３６３】

【表２１】

表６－１　二重特異性抗体に含まれる抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖのアミノ酸配列およびそのＣＤＲ領域のアミノ酸配列

CD19		
SEQ ID NO: 9	HCDR1	SYWMN
SEQ ID NO: 10	HCDR2	QIWPGDGDTNYNGKFKG
SEQ ID NO: 11	HCDR3	RETTTVGRYYYAMDY
SEQ ID NO: 12	LCDR1	KASQSVDYDGDSYLN

SEQ ID NO: 13	LCDR2	DASNLVS
SEQ ID NO: 14	LCDR3	QQSTEDPWT
SEQ ID NO: 15	VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAY MQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTV TVSS
SEQ ID NO: 16	VL	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWY QQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIH PVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK
CD19		
SEQ ID NO: 17	HCDR1	SNWMH
SEQ ID NO: 18	HCDR2	EIDPSDSYTNYNQNFQG
SEQ ID NO: 19	HCDR3	GSNPYYYAMDY
SEQ ID NO: 20	LCDR1	SASSGVNYMH
SEQ ID NO: 21	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 22	LCDR3	HQRGSYT
SEQ ID NO: 23	VH	QVQLVQPGAEVVKPGASVKLSCKTSGYTFTSNWMHWVKQA PGQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQNFQGKAKLTVDKSTSTAY MEVSSLRSDDTAVYYCARGSNPYYYAMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO: 24	VL	EIVLTQSPAIMSASPGERVTMTCSASSGVNYMHWYQQKPG TSPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYSLTISSMEPE DAATYYCHQRGSYTFGGGTKLEIK
CD19		
SEQ ID NO: 25	HCDR1	TSGMGVG
SEQ ID NO: 26	HCDR2	HIWWDDDKRYNPALKS
SEQ ID NO: 27	HCDR3	MELWSYYFDY
SEQ ID NO: 28	LCDR1	SASSSVSYMH
SEQ ID NO: 29	LCDR2	DTSKLAS
SEQ ID NO: 30	LCDR3	FQGSVYPFT
SEQ ID NO: 31	VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISTSGMGVGWIR QHPGKGLEWIGHIWWDDDKRYNPALKSRVTISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCARMELWSYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 32	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG QAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPE DVAVYYCFQGSVYPFTFGQGTKLEIK
CD19		
SEQ ID NO: 33	HCDR1	SSWMN
SEQ ID NO: 34	HCDR2	RIYPGDGDTNYNVKFKG
SEQ ID NO: 35	HCDR3	SGFITTVRDFDY
SEQ ID NO: 36	LCDR1	RASESVDTFGISFMN
SEQ ID NO: 37	LCDR2	EASNQGS
SEQ ID NO: 38	LCDR3	QQSKEVPFT
SEQ ID NO: 39	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSSWMNWVRQA

		PGKGLEWVGRIYPGDGDTNYNVKFKGRFTISRDDSKNSLY LQMNSLKTEDTAVYYCARSGFITTVRDFDYWGQGTLVTVS S
SEQ ID NO: 40	VL	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASESVDTFGISFMNWF QQKPDQSPKLLIHEASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIN SLEAEDAATYYCQQSKEVPFTFGGGTKVEIK
		CD20
SEQ ID NO: 41	HCDR1	SYNMH
SEQ ID NO: 42	HCDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG
SEQ ID NO: 43	HCDR3	STYYGGDWYFNV
SEQ ID NO: 44	LCDR1	RASSSVSYIH
SEQ ID NO: 45	LCDR2	ATSNLAS
SEQ ID NO: 46	LCDR3	QQWTSNPPT
SEQ ID NO: 47	VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQT PGRGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAY MQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS A
SEQ ID NO: 48	VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPG SSPKPWIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIK
		CD20
SEQ ID NO: 49	HCDR1	NYYIH
SEQ ID NO: 50	HCDR2	WIYPGDGNTKYNEKFKG
SEQ ID NO: 51	HCDR3	DSYSNYYFDY
SEQ ID NO: 52	LCDR1	RASSSVSYMH
SEQ ID NO: 53	LCDR2	APSNLAS
SEQ ID NO: 54	LCDR3	QQWSFNPPT
SEQ ID NO: 55	VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQA PGQGLEWIGWIYPGDGNTKYNEKFKGRATLTADTSTSTAY LELSSLRSEDTAVYYCARDSYSNYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 56	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVSYMHWYQQKPG KAPKPLIYAPSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQWSFNPPTFGQGTKVEIK
		CD20
SEQ ID NO: 57	HCDR1	YSWIN
SEQ ID NO: 58	HCDR2	RIFPGDGDTDYNGKFKG
SEQ ID NO: 59	HCDR3	NVFDGYWLVY
SEQ ID NO: 60	LCDR1	RSSKSLLHSNGITYLY
SEQ ID NO: 61	LCDR2	QMSNLVS
SEQ ID NO: 62	LCDR3	AQNLELPYT
SEQ ID NO: 63	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQA PGQGLEWMGRIFPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 64	VL	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYLYW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIK
CD20		
SEQ ID NO: 65	HCDR1	DYAMH
SEQ ID NO: 66	HCDR2	TISWNSGSIGYADSVKG
SEQ ID NO: 67	HCDR3	DIQYGNYYYGMDV
SEQ ID NO: 68	LCDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 69	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 70	LCDR3	QQRSNWPIT
SEQ ID NO: 71	VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQA PGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAKKSLY LQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTTVTV SS
SEQ ID NO: 72	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTRLEIK
CD22		
SEQ ID NO: 73	HCDR1	RSWMN
SEQ ID NO: 74	HCDR2	RIYPGDGDTNYSGKFKG
SEQ ID NO: 75	HCDR3	DGSSWDWYFDV
SEQ ID NO: 76	LCDR1	RSSQSIVHSVGNTFLE
SEQ ID NO: 77	LCDR2	KVSNRFS
SEQ ID NO: 78	LCDR3	FQGSQFPYT
SEQ ID NO: 79	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQA PGKGLEWVGRIYPGDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWYFDVWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 80	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEW YQQKPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQGTKVEIK
CD22		
SEQ ID NO: 81	HCDR1	IYDMS
SEQ ID NO: 82	HCDR2	YISSGGGTTYYPDTVKG
SEQ ID NO: 83	HCDR3	HSGYGTHWGVLFAY
SEQ ID NO: 84	LCDR1	RASQDISNYLN
SEQ ID NO: 85	LCDR2	YTSILHS
SEQ ID NO: 86	LCDR3	QQGNTLPWT
SEQ ID NO: 87	VH	EVQLVESASTGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSIYDMSWV RQTPEKCLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRFTISRDNAKN TLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHSGYGTHWGVLFAYWGQGT LVT
SEQ ID NO: 88	VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKP DGTVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQ

		EDFATYFCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK
CD30		
SEQ ID NO: 89	HCDR1	DYYIT
SEQ ID NO: 90	HCDR2	WIYPGSGNTKYNEKFKG
SEQ ID NO: 91	HCDR3	YGNYWFAY
SEQ ID NO: 92	LCDR1	KASQSVDFDGDSYMN
SEQ ID NO: 93	LCDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 94	LCDR3	QQSNEDPWT
SEQ ID NO: 95	VH	QIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQK PGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAF MQLSSLTSEDTAVYFCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSA
SEQ ID NO: 96	VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGDSYMNWY QQKPGQPPKVLIYAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIH PVEEEDAATYYCQQSNEDPWTFGGGTKLEIK
CD30		
SEQ ID NO: 97	HCDR1	AYYWS
SEQ ID NO: 98	HCDR2	DINHGGGTNYNPSLKS
SEQ ID NO: 99	HCDR3	LTAY
SEQ ID NO: 100	LCDR1	RASQGISSWLT
SEQ ID NO: 101	LCDR2	AASSLQS
SEQ ID NO: 102	LCDR3	QQYDSYPIT
SEQ ID NO: 103	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIRQP PGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGSLVTVSS
SEQ ID NO: 104	VL	DIQMTQSPTSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLTWYQQKP EKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYDSYPITFGQGTRLEIK
EpCAM		
SEQ ID NO: 105	HCDR1	SYGMH
SEQ ID NO: 106	HCDR2	VISYDGSNKYYADSVKG
SEQ ID NO: 107	HCDR3	DMGWGSGWRPYYYYGMDV
SEQ ID NO: 108	LCDR1	RTSQSISSYLN
SEQ ID NO: 109	LCDR2	WASTRES
SEQ ID NO: 110	LCDR3	QQSYDIPYT
SEQ ID NO: 111	VH	EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQG TTVTVSS
SEQ ID NO: 112	VL	ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKP GQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIK
EpCAM		
SEQ ID NO: 113	HCDR1	NYGMN

SEQ ID NO: 114	HCDR2	WINTYTGESTYADSFKG
SEQ ID NO: 115	HCDR3	FAIKGDY
SEQ ID NO: 116	LCDR1	RSTKSLLHSNGITYLY
SEQ ID NO: 117	LCDR2	QMSNLAS
SEQ ID NO: 118	LCDR3	AQNLEIPRT
SEQ ID NO: 119	VH	EVQLVQSGPGLVQPGGSVRISCAASGYTFTNYGMNWVKQA PGKGLEWMGWINTYTGESTYADSFKGRFTFSLDTSASAAY LQINSLRAEDTAVYYCARFAIKGDYWGQGTLLTVSS
SEQ ID NO: 120	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSTKSLLHSNGITYLYW YQQKPGKAPKLLIYQMSNLASGVPSRFSSSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCAQNLEIPRTFGQGTKVELK
CEA		
SEQ ID NO: 121	HCDR1	DTYMH
SEQ ID NO: 122	HCDR2	RIDPANGNSKYADSVKG
SEQ ID NO: 123	HCDR3	FGYYVSDYAMAY
SEQ ID NO: 124	LCDR1	RAGESVDIFGVGFLH
SEQ ID NO: 125	LCDR2	RASNLES
SEQ ID NO: 126	LCDR3	QQTNEDPYT
SEQ ID NO: 127	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYMHWVRQA PGKGLEWVARIDPANGNSKYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVS S
SEQ ID NO: 128	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAGESVDIFGVGFLHWY QQKPGKAPKLLIYRASNLESGVPSRFSGSGSRTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQTNEDPYTFGQGTKVEIK
CEA		
SEQ ID NO: 129	HCDR1	TYWMS
SEQ ID NO: 130	HCDR2	EIHPDSSTINYAPSLKD
SEQ ID NO: 131	HCDR3	LYFGFPWFAY
SEQ ID NO: 132	LCDR1	KASQDVGTSVA
SEQ ID NO: 133	LCDR2	WTSTRHT
SEQ ID NO: 134	LCDR3	QQYSLYRS
SEQ ID NO: 135	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFDFTTYWMSWVRQA PGKGLEWIGEIHPDSSTINYAPSLKDRFTISRDNAKNTLF LQMDSLRPEDTGVYFCASLYFGFPWFAYWGQGTPVTVSS
SEQ ID NO: 136	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTSVAWYQQKP GKAPKLLIYWTSTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQP EDIATYYCQQYSLYRSFGQGTKVEIK
CEA		
SEQ ID NO: 137	HCDR1	EFGMN
SEQ ID NO: 138	HCDR2	WINTKTGEATYVEEFKG
SEQ ID NO: 139	HCDR3	WDFAYYVEAMDY
SEQ ID NO: 140	LCDR1	KASAAVGTYVA

SEQ ID NO: 141	LCDR2	SASYRKR
SEQ ID NO: 142	LCDR3	HQYYTYPLFT
SEQ ID NO: 143	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEFGMNWVRQA PGQGLEWMGWINTKTGEATYVEEFKGRVTFTTDTSTSTAY MELRSLRSDDTAVYYCARWDFAYYVEAMDYWGQGTTVTVS S
SEQ ID NO: 144	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASAAVGTYVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRKRGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCHQYYTYPLFTFGQGTKLEIK
Her2		
SEQ ID NO: 145	HCDR1	DTYIH
SEQ ID NO: 146	HCDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 147	HCDR3	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 148	LCDR1	RASQDVNTAVA
SEQ ID NO: 149	LCDR2	SASFLYS
SEQ ID NO: 150	LCDR3	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 151	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAY LQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 152	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK
Her2		
SEQ ID NO: 153	HCDR1	DYTMD
SEQ ID NO: 154	HCDR2	DVNPNSGGSIYNQRFKG
SEQ ID NO: 155	HCDR3	NLGPSFYFDY
SEQ ID NO: 156	LCDR1	KASQDVSIGVA
SEQ ID NO: 157	LCDR2	SASYRYT
SEQ ID NO: 158	LCDR3	QQYYIYPYT
SEQ ID NO: 159	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQA PGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 160	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKP GKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK
Her2		
SEQ ID NO: 161	HCDR1	DTYIH
SEQ ID NO: 162	HCDR2	RIYPTNGYTRYDPKFQD
SEQ ID NO: 163	HCDR3	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 164	LCDR1	KASQDVNTAVA
SEQ ID NO: 165	LCDR2	SASFRYT
SEQ ID NO: 166	LCDR3	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 167	VH	QVQLQQSGPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQR

		PEQGLEWIGRIYPTNGYTRYDPKFQDKATITADTSSNTAY LQVSRLTSEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGASVTVSS
SEQ ID NO: 168	VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKP GHSPKLLIYSASFRYTGVPDRFTGSRSGTDFTFTISSVQA EDLAVYYCQQHYTTPPTFGGGTKVEIK
EGFR		
SEQ ID NO: 169	HCDR1	NYGVH
SEQ ID NO: 170	HCDR2	VIWSGGNTDYNTPFTS
SEQ ID NO: 171	HCDR3	ALTYYDYEFAY
SEQ ID NO: 172	LCDR1	RASQSIGTNIH
SEQ ID NO: 173	LCDR2	YASESIS
SEQ ID NO: 174	LCDR3	QQNNNWPTT
SEQ ID NO: 175	VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQS PGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF KMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSA
SEQ ID NO: 176	VL	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRT NGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES EDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK
EGFR		
SEQ ID NO: 177	HCDR1	SGDYYWS
SEQ ID NO: 178	HCDR2	YIYYSGSTDYNPSLKS
SEQ ID NO: 179	HCDR3	VSIFGVGTFDY
SEQ ID NO: 180	LCDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 181	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 182	LCDR3	HQYGSTPLT
SEQ ID NO: 183	VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSISSGDYYWSWIR QPPGKGLEWIGYIYYSGSTDYNPSLKSRVTMSVDTSKNQF SLKVNSVTAADTAVYYCARVSIFGVGTFDYWGQGTLVTVS S
SEQ ID NO: 184	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCHQYGSTPLTFGGGTKAEIK
EGFR		
SEQ ID NO: 185	HCDR1	NYYIY
SEQ ID NO: 186	HCDR2	GINPTSGGSNFNEKFKT
SEQ ID NO: 187	HCDR3	QGLWFDSDGRGFDF
SEQ ID NO: 188	LCDR1	RSSQNIVHSNGNTYLD
SEQ ID NO: 189	LCDR2	KVSNRFS
SEQ ID NO: 190	LCDR3	FQYSHVPWT
SEQ ID NO: 191	VH	QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYYIYWVRQA PGQGLEWIGGINPTSGGSNFNEKFKTRVTITVDESTNTAY MELSSLRSEDTAFYFCARQGLWFDSDGRGFDFWGQGSTVT VSS

SEQ ID NO: 192	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQNIVHSNGNTYLDW YQQTPGKAPKLLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTFTI SSLQPEDIATYYCFQYSHVPWTFGQGTKLQIT
GPC-3		
SEQ ID NO: 193	HCDR1	DYEMH
SEQ ID NO: 194	HCDR2	AIDPQTGNTAFNQKFKG
SEQ ID NO: 195	HCDR3	FYSLTY
SEQ ID NO: 196	LCDR1	RSSQSIVHSNGNTYLQ
SEQ ID NO: 197	LCDR2	KVSNRFS
SEQ ID NO: 198	LCDR3	FQGSHFPYA
SEQ ID NO: 199	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVKQA PGQGLEWIGAIDPQTGNTAFNQKFKGRVTLTRDKSSSTVY MELSSLRSEDTAVYYCTRFYSLTYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 200	VL	DVLMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSIVHSNGNTYLQW YLQRPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTYFTLKI SRVEAEDVGVYYCFQGSHFPYAFGGGTKVEIK
Mesothelin		
SEQ ID NO: 201	HCDR1	IYGMH
SEQ ID NO: 202	HCDR2	VIWYDGSHEYYADSVKG
SEQ ID NO: 203	HCDR3	DGDYYDSGSPLDY
SEQ ID NO: 204	LCDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 205	LCDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 206	LCDR3	QQRSNWPLT
SEQ ID NO: 207	VH	QVYLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGITFSIYGMHWVRQA PGKGLEWVAVIWYDGSHEYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LLMNSLRAEDTAVYYCARDGDYYDSGSPLDYWGQGTLVTV SS
SEQ ID NO: 208	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK
Mucin1		
SEQ ID NO: 209	HCDR1	SYVLH
SEQ ID NO: 210	HCDR2	YINPYNDGTQYNEKFKG
SEQ ID NO: 211	HCDR3	GFGGSYGFAY
SEQ ID NO: 212	LCDR1	SASSSVSSSYLY
SEQ ID NO: 213	LCDR2	STSNLAS
SEQ ID NO: 214	LCDR3	HQWNRYPYT
SEQ ID NO: 215	VH	QVQLQQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTFPSYVLHWVKQA PGQGLEWIGYINPYNDGTQYNEKFKGKATLTRDTSINTAY MELSRLRSDDTAVYYCARGFGGSYGFAYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 216	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTMTCSASSSVSSSYLYWYQQK PGKAPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLQ PEDSASYFCHQWNRYPYTFGGGTRLEIK

Mucin1		
SEQ ID NO: 217	HCDR1	NYWMN
SEQ ID NO: 218	HCDR2	EIRLKSNNYTTHYAESVKG
SEQ ID NO: 219	HCDR3	HYYFDY
SEQ ID NO: 220	LCDR1	RSSKSLLHSNGITYFF
SEQ ID NO: 221	LCDR2	QMSNLAS
SEQ ID NO: 222	LCDR3	AQNLELPPT
SEQ ID NO: 223	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCVASGFPFSNYWMNWVRQA PGKGLEWVGEIRLKSNNYTTHYAESVKGRFTISRDDSKNS LYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHYYFDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID NO: 224	VL	DIVMTQSPLSNPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGITYFFW YLQKPGQSPQLLIYQMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLRI SRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGQGTKVEIK
CA125		
SEQ ID NO: 225	HCDR1	SYAMS
SEQ ID NO: 226	HCDR2	TISSAGGYIFYSDSVQG
SEQ ID NO: 227	HCDR3	QGFGNYGDYYAMDY
SEQ ID NO: 228	LCDR1	KSSQSLLNSRTRKNQLA
SEQ ID NO: 229	LCDR2	WASTRQS
SEQ ID NO: 230	LCDR3	QQSYNLLT
SEQ ID NO: 231	VH	VKLQESGGGFVKPGGSLKVSCAASGFTFSSYAMSWVRLSP EMRLEWVATISSAGGYIFYSDSVQGRFTISRDNAKNTLHL QMGSLRSGDTAMYYCARQGFGNYGDYYAMDYWGQGTTVTV SS
SEQ ID NO: 232	VL	DIELTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNQLA WYQQKPGQSPELLIYWASTRQSGVPDRFTGSGSGTDFTLT ISSVQAEDLAVYYCQQSYNLLTFGPGTKLEVK
BCMA		
SEQ ID NO: 233	HCDR1	NYWMH
SEQ ID NO: 234	HCDR2	ATYRGHSDTYYNQKFKG
SEQ ID NO: 235	HCDR3	GAIYDGYDVLDN
SEQ ID NO: 236	LCDR1	SASQDISNYLN
SEQ ID NO: 237	LCDR2	YTSNLHS
SEQ ID NO: 238	LCDR3	QQYRKLPWT
SEQ ID NO: 239	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSNYWMHWVRQA PGQGLEWMGATYRGHSDTYYNQKFKGRVTITADKSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGAIYDGYDVLDNWGQGTLVTVS S
SEQ ID NO: 240	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYYTSNLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQYRKLPWTFGQGTKLEIK

【０３６４】

ここで、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖは、体外ＦＡＣＳ結合分析測定において、約５０ｎＭよりも大きい、または１００ｎＭよりも大きい、または３００ｎＭよりも大きい、または５００ｎＭよりも大きいＥＣ$_{50}$値でエフェクター細胞に結合し、より好ましくは、前記二重特異性抗体の第２の一本鎖ＦｖヒトＣＤ３に結合できるだけでなく、更にカニクイザルまたはアカゲザルのＣＤ３に特異的に結合することもできた。

【０３６５】

表６－２において、いくつかの好ましい抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖのＶＨドメインおよびその相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３）のアミノ酸配列と、ＶＬ

ドメインおよびその相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３）のアミノ酸配列とを列挙し、そのＣＤＲ領域に含まれるアミノ酸残基はＫａｂａｔルールに基づいて定義される。ここで、抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖのＶＨとＶＬとの間のリンカーペプチドアミノ酸組成が（ＧＧＧＧＳ）ｎであり、ｎ＝１、２、３、４、または５であった。

【０３６６】

【表２２】

表６－２　二重特異性抗体に含まれる抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖのアミノ酸配列およびそのＣＤＲ領域アミノ酸配列

CD3-3		
SEQ ID NO: 241	HCDR1	TYAMN
SEQ ID NO: 242	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 243	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO: 244	LCDR1	RSSTGAVTTSNYAN
SEQ ID NO: 245	LCDR2	GTNKRAP
SEQ ID NO: 246	LCDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO: 247	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO: 248	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
CD3-4		
SEQ ID NO: 249	HCDR1	KYAMN
SEQ ID NO: 250	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD
SEQ ID NO: 251	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY
SEQ ID NO: 252	LCDR1	GSSTGAVTSGYYPN
SEQ ID NO: 253	LCDR2	GTKFLAP
SEQ ID NO: 254	LCDR3	ALWYSNRWV
SEQ ID NO: 255	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTL VTVSS
SEQ ID NO: 256	VL	ELVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGYYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL

【０３６７】

ここで、抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖと抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとを連結するリンカーペプチドはフレキシブルペプチドおよびリジッドペプチドで構成され、好ましくは、フレキシブルペプチドのアミノ酸組成の構造一般式は$(GGGGS)_z$であり、ここで、ｘ、ｙおよびｚは０以上の整数であり、ｘ＋ｙ＋ｚ≧１であった。リジッドペプチドは、天然ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンのβ－サブユニットのカルボキシル基末端の１１８～１４５－位アミノ酸組成の全長配列（例えば、ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２５７に示す）またはその裁断された断片に由来し、好ましくは、前記ＣＴＰリジッドペプチド組成はＳＳＳＳＫＡＰＰＰＳ（CTP^1）であった。表６－３において、抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖと抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとを連結するいくつかの好ましいリンカーペプチドのアミノ酸配列を列挙した。

【０３６８】

【表２３】

表６－３　抗－ＴＡＡ　ｓｃＦｖと抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖとを連結するリンカーペプチドのアミノ酸配列

SEQ ID NO: 258	$G_2(GGGGS)_3CTP^1$	GGGGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPPS
SEQ ID NO: 259	$(GGGGS)_3CTP^1$	GGGGSGGGGSGGGGSSSSSKAPPPS
SEQ ID NO: 260	$GS(GGGGS)_2CTP^1$	GSGGGGSGGGGSSSSSKAPPPS
SEQ ID NO: 261	$(GGGGS)_1CTP^4$	GGGGSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ

【０３６９】

ここで、Ｆｃ断片は、直接またはリンカーペプチドを介して抗－ＣＤ３　ｓｃＦｖに連結され、リンカーペプチドは１～２０個のアミノ酸を含み、好ましくは、Ｇｌｙ（Ｇ）、Ｓｅｒ（Ｓ）、Ａｌａ（Ａ）およびＴｈｒ（Ｔ）といういくつかのアミノ酸から選ばれ、より好ましくは、Ｇｌｙ（Ｇ）およびＳｅｒ（Ｓ）から選ばれ、最も好ましくは、前記リンカーペプチドの組成が（ＧＧＧＧＳ）ｎであり、ｎ＝１、２、３、または４であった。

【０３７０】

Ｆｃ断片は、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４の重鎖定常領域から選ばれることが好ましく、特に、ヒトＩｇＧ１、またはＩｇＧ４の重鎖定常領域から選ばれ、且つ、Ｆｃは、二重特異性抗体分子の性質を修飾するための突然変異したものであり、例えば、ヒトＦｃγＲｓ（ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩａ、またはＦｃγＲＩＩＩａ）およびＣ１ｑの少なくとも１種に対して低下した親和性を表し、減少したエフェクター細胞機能または補体機能を有した。また、Ｆｃ断片は、他の１種または複数種の特性（例えば、ＦｃＲｎ受容体と結合する能力、抗体グリコシル化、または抗体荷電不均一性等）を改変させるアミノ酸置換を更に含んでもよい。

【０３７１】

表６－４において、１つまたは複数のアミノ酸突然変異を有するいくつかのＦｃ断片のアミノ酸配列を列挙した。

【０３７２】

【表２４】

表６－４　ヒトＩｇＧ　Ｆｃのアミノ酸配列

IgG1 Fc(L234A,L235A)変異体の定常領域のアミノ酸配列（EU番号）	
SEQ ID NO: 262	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK
IgG1(L234A,L235A, T250Q,N297A,P331S,M428L,K447⁻)変異体の定常領域のアミノ酸配列（EU番号）	
SEQ ID NO: 263	DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDQ LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYASTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVLHE ALHNHYTQKS LSLSPG~~K~~

【０３７３】
表６－５において、いくつかの好ましい二重特異性抗体のアミノ酸および対応するヌクレオチド配列を例示的に列挙した。
【０３７４】
【表２５】

表６－５　複数種のｓｃＦｖ－ｓｃＦｖ－Ｆｃ構成の二重特異性抗体

抗体コード	標的点	アミノ酸配列番号	ヌクレオチド配列番号
AB1K1	Anti-CD19×CD3	SEQ ID NO: 264	SEQ ID NO: 265
AB1K2	Anti-CD19×CD3	SEQ ID NO: 283	SEQ ID NO: 284
AB2K	Anti-CD20×CD3	SEQ ID NO: 266	SEQ ID NO: 267
AB3K	Anti-CD22×CD3	SEQ ID NO: 268	SEQ ID NO: 269
AB4K	Anti-CD30×CD3	SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 271
AB5K	Anti-EpCAM×CD3	SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 273
AB6K	Anti-CEA×CD3	SEQ ID NO: 274	SEQ ID NO: 275
AB7K7	Anti-Her2×CD3	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 276
AB8K	Anti-EGFR×CD3	SEQ ID NO: 277	SEQ ID NO: 278
AB9K	Anti-GPC-3×CD3	SEQ ID NO: 279	SEQ ID NO: 280
AB10K	Anti-Mesothelin×CD3	SEQ ID NO: 281	SEQ ID NO: 282
AB11k	Anti-Mucin1×CD3	SEQ ID NO: 285	SEQ ID NO: 286

【０３７５】
実施例７、Ａｎｔｉ－ＧＰＣ－３×ＣＤ３二重特異性抗体のマウス移植腫瘍モデルにおける薬効学的研究
【０３７６】
７．１、ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスの皮下にヒトＰＢＭＣ細胞とヒト肝癌Ｈｕｈ－７細胞とを共接種した移植腫瘍モデル
【０３７７】
ＧＰＣ－３発現が陽性であるヒト肝癌Ｈｕｈ－７細胞を選択し、ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスの皮下にヒトＰＢＭＣ細胞とＨｕｈ－７細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。
【０３７８】
正常なヒトの末梢血を取り、密度勾配遠心法でヒトＰＢＭＣ細胞を分離し、７～８週齢の雌ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウス（上海霊暢生物科技有限公司から購入）を選択し、対数成長期にあるＨｕｈ－７細胞を収集した。３×１０^{6}個のＨｕｈ－７細胞と３×１０^{6}個のＰＢＭＣ細胞とを混合し、ＮＯＤ－ＳＣＩＤマウスの右側背部皮下に接種した。１ｈ後、マウスを体重で２グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、投与グループに１ｍｇ／ｋｇのＡＢ９Ｋを腹腔投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳ溶液を投与し、毎日１回投与し、６日間連続して投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。
【０３７９】
図６－１に示すように、投与後の２１日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１３１１．０３±１４４．８９ｍｍ^{3}であり、ＡＢ９Ｋ投与グループの平均腫瘍体積が６０．８３±１２．６３ｍｍ^{3}で、ＴＧＩが９５．３６％であり、１匹のマウスの腫瘍が完全に解消され、対照グループに対していずれも顕著な差（Ｐ＜０．０１）があった。以上の結果により、ＰＢＭＣにおける大部分が活性化されていない原始Ｔ細胞であり、二重抗体ＡＢ９Ｋは動物体内で原始Ｔ細胞を活性化させ、Ｔ細胞と標的細胞Ｈｕｈ－７との距離を

近接させることができ、これにより、Ｔ細胞は腫瘍細胞を直接殺傷して腫瘍の成長を抑制することができ、ＡＢ９Ｋは１ｍｇ／ｋｇの用量で非常に良好な抗腫瘍効果を有することが分かった。

【０３８０】

７．２、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデル

【０３８１】

ＧＰＣ－３発現が陰性であるヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞を選択し、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内性腫瘍抑制効果を観察した。

【０３８２】

実施例３．１における方法によりＣＩＫ細胞を取得し、７～８週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、対数成長期にあるＲａｊｉ細胞を収集し、５×１０^{6}個のＲａｊｉ細胞と２×１０^{6}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。１ｈ後、マウスを体重で３グループにランダムに分け、グループ毎に５匹であり、投与グループに用量１ｍｇ／ｋｇのＡＢ９Ｋを腹腔投与し、対照グループに同じ体積のＰＢＳ溶液を投与し、毎日１回投与し、１０日間連続して投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０３８３】

結果は図６－２に示すように、投与してから２６日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が２６３６．６６±１９６．６２ｍｍ^{3}であり、ＡＢ９Ｋ投与グループの平均腫瘍体積が２７３９．５７±２２０．１３ｍｍ^{3}であり、対照グループに対して著しい差がなかった。以上の結果により、二重抗体ＡＢ９Ｋは、ＧＰＣ－３発現が陰性である細胞株で非特異的殺傷が観察されず、二重抗体が体内でＴ細胞の非標的組織に対する殺傷を媒介せず、医薬毒性がなく、安全性が高いことを示すことが分かった。

【０３８４】

７．３、ＣＤ３４免疫が再構成されたＮＰＧマウスにヒト肝癌Ｈｕｈ－７細胞を接種した移植腫瘍モデル

【０３８５】

ＧＰＣ－３発現が陽性であるヒト肝癌Ｈｕｈ－７細胞を選択し、ＣＤ３４免疫が再構成されたＮＰＧマウスの皮下にヒト肝癌Ｈｕｈ－７細胞を接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果であるを観察した。

【０３８６】

実施例３．５における方法によりＣＤ３４免疫が再構成されたＮＰＧマウスを調製した。対数期にあるＨｕｈ－７細胞を収集し、２．５×１０^{6}個のＨｕｈ－７細胞を免疫が再構成されたマウスの右側背部皮下に接種した。接種してから４日間後、マウスを腫瘍体積および体重で２グループにランダムに分け、グループ毎に７匹とし、投与グループに１ｍｇ／ｋｇのＡＢ９Ｋを腹腔投与し、ＰＢＳ対照グループに同じ体積のＰＢＳ溶液を投与し、実験が終了したまで毎日１回投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０３８７】

図６－３に示すように、投与後の２１日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が２１０２．８４±２７５．７１ｍｍ^{3}であり、１ｍｇ／ｋｇのＡＢ９Ｋ投与グループの平均腫瘍体積が３２５．０１±２８２．２１ｍｍ^{3}で、ＴＧＩが８６．５３％であり、４匹のマウスの腫瘍が完全に解消され、対照グループに対していずれも顕著な差（Ｐ＜０．０１）があった。以上の結果により、二重抗体ＡＢ９ＫがＣＤ３４免疫再構築モデルにおいて

極めて良好な抗腫瘍効果を有することが分かった。

【０３８８】

実施例８、Ａｎｔｉ－ＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性抗体の体外生物学的機能の評価およびマウス移植腫瘍モデルにおける薬効学的研究

【０３８９】

８．１、フローサイトメトリー法を利用してＡＢ２ＫのＣＤ２０陽性腫瘍細胞との結合活性を検出した

【０３９０】

Ｒａｊｉ細胞（中科院細胞バンクから購入）を培養し、遠心により細胞を収集して１％のＰＢＳＢで重懸濁し、細胞密度を２×１０^{6}個／ｍｌに調整し、９６ウェルプレートに置き、ウェル毎に１００μｌ（２×１０^{5}個の細胞）とした。その後、希釈した一連の濃度の二重特異性抗体を加え、４℃で１ｈインキュベートし、遠心して上清を取り除き、１％のＢＳＡのＰＢＳ溶液（ＰＢＳＢ）で３回洗浄し、希釈したＡＦ４８８で標識されたヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｃ．，品番１０９－５４５－０８８）またはマウス抗６×ｈｉｓ ＩｇＧ抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、品番ＩＣ０５０Ｐ）を加え、４℃で遮光して１ｈインキュベートし、遠心して上清を取り除き、１％のＰＢＳＢで２回洗浄し、更にウェル毎に１００μｌの１％のパラホルムアルデヒドで重懸濁し、フローサイトメーターで信号強度を検出した。また、平均蛍光強度をＹ軸とし、抗体濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、ＡＢ２ＫのＲａｊｉ細胞に結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０３９１】

図７－１に示すように、ＡＢ２ＫはＣＤ２０陽性細胞と良好に結合することができ、その信号強度が抗体濃度に比例し、ＡＢ２ＫのＲａｊｉ細胞に結合するＥＣ$_{50}$値を約６９．９７ｎＭと計算した。

【０３９２】

８．２、ＡＢ２Ｋがエフェクター細胞によるＣＤ２０陽性腫瘍細胞の標的殺傷を媒介した

【０３９３】

正常に培養したＲａｊｉ－ｌｕｃ細胞（Ｂｅｉｊｉｎｇ Ｂｉｏｃｙｔｏｇｅｎ社から購入）、細胞密度を１×１０^{5}個／ｍｌに調整し、９６ウェル白色プレートに入れて４０μｌ／ウェルとした。それと同時に、一連の勾配のＡＢ２Ｋ抗体を希釈し、上記９６ウェル白色プレートに入れ、ＣＩＫの細胞密度を５×１０５／ｍｌに調整し、９６ウェル白色プレートに入れて４０μｌ／ウェルとし、エフェクター－標的比Ｅ：Ｔ＝５：１とし、３７℃で２４ｈ培養した。２４ｈ後に、白色プレートを取り出し、ウェル毎に１００μｌのＯｎｅ－Ｇｌｏ（Ｐｒｏｍｅｇａ、品番Ｅ６１２０）溶液を加え、室温で少なくとも３ｍｉｎ置いた。プレートリーダでルミネセンス値を検出した。蛍光強度をＹ軸とし、抗体濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、ＡＢ２ＫのＲａｊｉ－ｌｕｃ細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０３９４】

図７－２に示すように、ＡＢ２Ｋのエフェクター細胞を媒介してＲａｊｉ－ｌｕｃ細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$は４２．８ｎｇ／ｍｌのみであり、更に標的点特異性を有し、陰性対照としてのＡＢ７Ｋ７のＥＣ$_{50}$は２２９．５ｎｇ／ｍｌであり、Ｒａｊｉ－ｌｕｃ細胞に対してほぼ殺傷作用がなかった。

【０３９５】

８．３、レポータージーン細胞株で二重特異性抗体のＴ細胞を活性化する能力を評価した

【０３９６】

ＮＦＡＴ ＲＥレポータージーンを含むＪｕｒｋａｔ Ｔ細胞（ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、品番６０６２１）は、二重特異性抗体とＣＤ２０陽性Ｒａｊｉ細胞とが同時に存在する場合にルシフェラーゼを過発現することができ、ルシフェラーゼの活性を検出することによりＪｕｒｋａｔ Ｔ細胞の活性化程度を定量した。二重特異性抗体の濃度をＸ軸とし、フルオレセイン信号をＹ軸とし、４パラメータ曲線をフィッティングした。

【０３９７】
図７－３に示すように、ＡＢ２ＫはＪｕｒｋａｔ ＮＦＡＴＲＥ Ｌｕｃ細胞を特異的に活性化することができ、$ＥＣ_{５０}$値が０．２００６μｇ／ｍｌであり、且つ、その濃度が信号強度に比例し、陰性対照としてのＡＢ７Ｋ７はＴ細胞を活性化する能力をほぼ持たない。
【０３９８】
８．４、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデル
【０３９９】
ＣＤ２０発現が陽性であるヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞を選択し、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｒａｊｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。
【０４００】
実施例３．１における方法によりＣＩＫ細胞を取得し、７～８週齢の雌ＮＰＧマウス（Ｂｅｉｊｉｎｇ Ｖｉｔａｌｓｔａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙから購入）を選択し、対数成長期にあるＲａｊｉ細胞を収集し、４×１０^{６}個のＲａｊｉ細胞と８×１０^{５}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。１ｈ後、マウスを体重で５グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、対応する医薬をそれぞれ腹腔投与し、具体的には、全ての投与グループにいずれも週に２回投与し、Ｒｉｔｕｘａｎ（Ｒｉｔｕｘａｎ、Ｒｏｃｈｅ社製薬）および二重機能抗体ＡＢ２Ｋをそれぞれ１ｍｇ／ｋｇおよび０．１ｍｇ／ｋｇ投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（$ｍｍ^{３}$）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。
【０４０１】
図７－４に示すように、投与してから２４日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１７６６．８４±１５５．６２$ｍｍ^{３}$であり、１ｍｇ／ｋｇのＲｉｔｕｘａｎ投与グループの平均腫瘍体積が６４７．９２±２７７．１１$ｍｍ^{３}$で、ＴＧＩが６３．３３％であり、対照グループに対して顕著な差（Ｐ＜０．０１）があり、０．１ｍｇ／ｋｇのＲｉｔｕｘａｎ投与グループの平均腫瘍体積が１８９３．８１±１８６．９９$ｍｍ^{３}$であり、薬効がなく、ＡＢ２Ｋの１ｍｇ／ｋｇ投与グループの平均腫瘍体積が１１６．１８±３９．５０$ｍｍ^{３}$で、ＴＧＩが９３．４２％であり、対照グループに対していずれも顕著な差（Ｐ＜０．０１）があり、ＡＢ２Ｋの０．１ｍｇ／ｋｇ投与グループの平均腫瘍体積が１２２６．０３±３４０．０５$ｍｍ^{３}$で、ＴＧＩが３０．６１％であり、対照グループに対して著しい差がなかった。上記結果により、二重機能特異性抗体ＡＢ２Ｋは、動物体内でヒト免疫細胞を活性化することにより腫瘍細胞の成長を抑制し、同じ用量で、二重抗体の薬効がモノクローナル抗体Ｒｉｔｕｘａｎよりも優れ、良好な抗腫瘍効果を示すことが分かった。
【０４０２】
８．５、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｄａｕｄｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデル
【０４０３】
ＣＤ２０発現が陽性であるヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｄａｕｄｉ細胞を選択し、ＮＰＧマウスの皮下にヒトＣＩＫ細胞とヒトＢｕｒｋｋｉｔ’ｓリンパ腫Ｄａｕｄｉ細胞とを共接種した移植腫瘍モデルにおける二重抗体の体内腫瘍抑制効果を観察した。
【０４０４】
実施例３．１における方法によりＣＩＫ細胞を取得し、７～８週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、対数成長期にあるＤａｕｄｉ細胞（中科院細胞バンクから購入）を収集し、４×１０^{６}個のＤａｕｄｉ細胞と８×１０^{５}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。１時間後、マウスを体重で５グループにランダムに分け、グループ

毎に６匹であり、対応する医薬をそれぞれ腹腔投与し、全ての投与グループにいずれも週に２回投与した。Ｒｉｔｕｘａｎおよび二重機能抗体ＡＢ２Ｋをそれぞれ１ｍｇ／ｋｇおよび０．１ｍｇ／ｋｇ投与した。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（mm^3）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０４０５】

図７－５に示すように、投与してから３０日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が８８９．６８±１９２．１３mm^3であり、１ｍｇ／ｋｇのＲｉｔｕｘａｎ投与グループの平均腫瘍体積が２４１．５１±４４．９１mm^3で、ＴＧＩが７２．８５％であり、対照グループに対して顕著な差（Ｐ＜０．０１）があり、０．１ｍｇ／ｋｇのＲｉｔｕｘａｎ投与グループの平均腫瘍体積が７４６．１１±２９９．７１mm^3であり、対照グループに対して著しい差がなく、ＡＢ２Ｋの１ｍｇ／ｋｇ投与グループの平均腫瘍体積が７２．０５±１１．８９mm^3で、ＴＧＩが９１．９％であり、対照グループに対していずれも顕著な差（Ｐ＜０．０１）があり、ＡＢ２Ｋの０．１ｍｇ／ｋｇ投与グループの平均腫瘍体積が７５．３６±１１．８１mm^3で、ＴＧＩが９１．５３％であり、対照グループに対して顕著な差（Ｐ＜０．０１）があった。上記結果により、二重機能特異性抗体ＡＢ２Ｋは動物体内でヒト免疫細胞を活性化することにより腫瘍細胞の成長を抑制し、同じ用量で、二重抗体の薬効がモノクローナル抗体Ｒｉｔｕｘａｎよりも優れ、低用量のＡＢ２Ｋも良好な抗腫瘍効果を示すことが分かった。

【０４０６】

実施例９、Ａｎｔｉ－ＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性抗体の安全性評価

【０４０７】

ＡＢ２Ｋの毒性反応状況を評価し、後続の毒性試験のために適当な用量範囲および観察指標を確定した。３～４歳の雌の成年カニクイザル（広州相観生物科技有限公司から購入）を選択し、体重３～４ｋｇで、２グループに分け、グループ毎に１匹とし、溶媒対照グループおよびＡＢ２Ｋ投与グループに分けた。投与方式がペリスタポンプで１ｈ静脈点滴することであり、投与量および体積は以下の表７に示すとおりであった。それぞれ０日目（Ｄ０）、７日目（Ｄ７）、２１日目（Ｄ２１）および２８日目（Ｄ２８）に投与し、合計４回投与し、医薬用量を逓増した。それと同時に、毎週動物の体重を量った。

【０４０８】

【表２６】

表７、カニクイザルの急性毒性の評価および投与アレンジ

グループ	試薬の名称	投与体積	投与量
G1	溶媒対照组	D0：5 mL/kg D7：5 mL/kg D21：10 mL/kg D28：10 mL/kg	N/A
G2	AB2K	D0：5 mL/kg D7：5 mL/kg D21：10 mL/kg D28：10 mL/kg	D0：0.06 mg/kg D7：0.3 mg/kg D21：1.5 mg/kg D28：3 mg/kg

【０４０９】

試験期間において、動物の臨床症状、体重、食事量、体温、心電図、血圧、臨床病理指標（血球計数、血液凝固機能指標および血液生化学）、リンパ球サブセット、サイトカイン、薬剤血漿中濃度測定および毒性分析を周期的に監視した。ＡＢ２Ｋを投与した後、カニクイザルのバイタルサインに異常反応がなく、体重が安定し、体温変化の変動幅が溶媒

対照グループに類似し、投与期間で各動物は死亡または瀕死したことが見られなかった。図８に示すように、ＡＢ２Ｋグループに投与した後、カニクイザルの白血球の変化は対照グループの変化傾向に類似し、初回に０．０６ｍｇ／ｋｇのＡＢ２Ｋを投与することがリンパ球への影響が大きくなく、２回目に投与してから１ｈ～６ｈ後に、投与グループの動物のリンパ球の細胞数が急激に低下し、２４時間後に正常に回復した。投与回数の増加に伴って用量が増加しつつあるが、ＡＢ２Ｋがリンパ球の細胞数の減少に与える影響がますます弱くなった。また、初回にＡＢ２Ｋを投与した後、ＩＬ－２、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α因子の放出を促進し、ＩＬ－５の放出を微弱に刺激するが、ＩＦＮ－γの放出を刺激しなかった。投与回数の増加に伴い、ＡＢ２Ｋがサイトカインに対する放出促進作用はますます明らかでなくなり、生体が二重特異性抗体の刺激に適用していることが示唆された。

【０４１０】

実施例１０、Ａｎｔｉ－ＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性抗体の薬物動態学評価

【０４１１】

雌のカニクイザルを２グループに分け、グループ毎に１匹とし、体重が３～４ｋｇであった。グループ１がブランクグループであり、グループ２がＡＢ２Ｋ投与グループであり、投与量を０．３ｍｇ／ｋｇとした。採血時点がそれぞれ１５ｍｉｎ、１ｈ、３ｈ、６ｈ、１０ｈ、２４ｈ、３０ｈ、４８ｈ、５４ｈ、７２ｈ、９６ｈおよび１４４ｈであり、合計１３個の時間であった。採血して血清を収集し、－８０℃で凍結保存した。

【０４１２】

ＥＬＩＳＡ方法を採用して血清中のＡＢ２Ｋの薬剤濃度を測定し、ＰＫＳｏｌｖｅｒソフトウェアを利用して薬物動態学パラメータを計算し、具体的なパラメータは表８に示すとおりであった。結果により、ＡＢ２Ｋの正常カニクイザル体内でのＴ１／２が８．５時間程度であることが分かった。

【０４１３】

【表２７】

表８、二重抗体ＡＢ２Ｋのカニクイザル体内での薬物動態学パラメータ

AB2K	$t_{1/2}$(h)	AUC 0-inf_obs (μg/mL*h)	Vz_obs (μg/kg)/(μg/mL)	Cl_obs (μg/kg)/(μg/mL)/h
薬物動態学パラメータ	8.45	168.63	21.68	1.78

【０４１４】

実施例１１、Ａｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体の体外生物学的機能の評価

【０４１５】

１１．１、二重特異性抗体のエフェクター細胞および標的細胞との結合活性の測定（ＦＡＣＳ）

【０４１６】

ａ）フローサイトメトリー法を利用して二重特異性抗体のＣＤ１９陽性腫瘍細胞Ｒａｊｉとの結合活性を検出した

【０４１７】

ＣＤ１９発現が陽性である腫瘍細胞Ｒａｊｉ細胞を培養し、遠心により細胞を収集した。収集した細胞を１％のＰＢＳＢで重懸濁し、細胞密度を２×１０^{6}個／ｍｌに調整し、９６ウェルプレートに置き、ウェル毎に１００μｌ（２×１０^{5}個の細胞）とし、４℃で０．５ｈ密閉した。密閉後の細胞を遠心して上清を捨て、希釈した一連の濃度の二重特異性抗体ＡＢ１Ｋ２と同型ＣＤ１９二重特異性抗体ＡＢ２３Ｐ８、ＡＢ２３Ｐ９およびＡＢ２３Ｐ１０とを加え、４℃で１ｈインキュベートし、遠心して上清を取り除き、１％のＢＳＡのＰＢＳＢで３回洗浄し、ＡＦ６４７でマークされた希釈されたヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体を加え、４℃で遮光して１ｈインキュベートし、遠心して上清を取り除き、１％のＰＢ

ＳＢで２回洗浄し、更に１００μｌの１％のＰＦでウェル毎に重懸濁し、フローサイトメーターで信号強度を検出した。また、平均蛍光強度をＹ軸とし、抗体濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、二重特異性抗体の腫瘍細胞Ｒａｊｉと結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０４１８】

結果により、異なる構造の二重特異性抗体がいずれもＣＤ１９過発現腫瘍細胞と良好な結合活性を有することが分かった。図９－１は、異なる構造の二重特異性抗体の腫瘍細胞Ｒａｊｉとの結合曲線を示した。表９－１に示すように、４つの二重特異性分子のＲａｊｉ細胞と結合するＥＣ$_{50}$はいずれもｎＭレベルにあった。

【０４１９】

【表２８】

表９－１　Ａｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体の腫瘍細胞Ｒａｊｉとの結合能力の測定

	AB1K2	AB23P8	AB23P9	AB23P10
EC_{50} (nM)	1.393	1.924	2.600	2.678

【０４２０】

ｂ）ＦＡＣＳを利用して二重特異性抗体のヒトのＴ細胞との結合活性を検出した

【０４２１】

密度勾配遠心法を採用してヒトの新鮮な血液からＰＢＭＣを調製し、１０％の熱不活化ＦＢＳを含む１６４０培地で重懸濁し、２μｇ／ｍｌのＣＤ３抗体を加えて２４ｈ活性化した後、２５０ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を加えて７日間増幅培養し、増幅したＴ細胞を調製し、フローサイトメーターによる検出を経て、細胞表面のＣＤ３発現が陽性になった。測定待ちサンプルの調製および測定方法は実施例１１．１ａ）と同様であった。１％のＰＦで重懸濁した細胞を装置で検出し、平均蛍光強度でソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、各二重特異性抗体のヒトのＴ細胞と結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０４２２】

図９－２の結果により、各二重特異性抗体がいずれもＣＩＫと良好な結合活性を有することが分かった。表９－２に示すように、ＡＢ１Ｋ２のＥＣ$_{50}$が約１６ｎＭであり、ＡＢ２３Ｐ８の結果がそれに相当し、ＡＢ２３Ｐ９、ＡＢ２３Ｐ１０のＥＣ$_{50}$が約５０ｎＭおよび３０ｎＭであった。

【０４２３】

【表２９】

表９－２　Ａｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体のエフェクター細胞ＣＩＫとの結合能力の測定

	AB1K2	AB23P8	AB23P9	AB23P10
EC_{50} (nM)	15.69	16.69	49.52	32.41

【０４２４】

ｃ）ＦＡＣＳにより二重特異性抗体のカニクイザルＣＩＫ細胞膜表面のＣＤ３との交差反応性を検出した

【０４２５】

密度勾配遠心法を採用してカニクイザルの新鮮な血液からＰＢＭＣを調製し、１０％の

熱不活化ＦＢＳを含む１６４０培地で重懸濁し、２μｇ／ｍｌのＯＫＴ３を加えて２４ｈ活性化した後、２５０ＩＵ／ｍｌのＩＬ－２を加えて７日間増幅培養し、カニクイザルＣＩＫ細胞を取得して使用に備えた。ヒトＣＩＫ細胞およびカニクイザルＣＩＫ細胞を遠心して収集した。測定待ちサンプルの調製および測定方法は実施例１１．１ａ）と同様であった。１％のパラホルムアルデヒド溶液で重懸濁した細胞を装置で検出し、平均蛍光強度でソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、二重特異性抗体のヒトＣＩＫ細胞およびカニクイザルＣＩＫ細胞とそれぞれ結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０４２６】

図９－３に示すように、二重特異性抗体ＡＢ１Ｋ２およびＡＢ２３Ｐ１０のカニクイザルのＴ細胞との結合能力にほぼ差がなく、フローサイトメーターにより、その結合するＥＣ$_{50}$が約５．５ｎＭであり、且つ、２つの二重特異性抗体のカニクイザルのＴ細胞との結合能力がヒトのＴ細胞との結合能力よりも強いことが検出された。

【０４２７】

１１．２、二重特異性抗体の抗原との結合能力の測定

【０４２８】

二抗原サンドイッチＥＬＩＳＡ法により二重特異性抗体の可溶ＣＤ３およびＣＤ１９との結合を同定した。

【０４２９】

ＣＤ１９タンパク質（ＡＣＲＯ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、品番ＣＤ９－Ｈ５２５１）をＰＢＳで１μｇ／ｍｌの濃度に希釈し、９６ウェルプレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、４℃で一晩コーティングした。その後、１％の脱脂粉乳を用いて室温で１ｈ密閉した。それと同時に、各二重特異性抗体を希釈し、５倍の勾配で希釈し、合計１０個の濃度勾配とした。その後、ＰＢＳＴで９６ウェルプレートを洗浄し、希釈した二重特異性抗体を加え、抗体を加えない対照ウェルを設け、室温で２ｈインキュベートした。結合していない二重特異性抗体をＰＢＳＴで洗浄し、ビオチニル化されたＣＤ３Ｅ＆ＣＤ３Ｄ（ＡＣＲＯ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ、品番ＣＤＤ－Ｈ８２Ｗ１）を５０ｎｇ／ｍｌでＳｔｒｅｐｔａｖｄｉｎ ＨＲＰ（ＢＤ、品番５５４０６６）と混合して９６ウェルプレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、室温で１ｈインキュベートした。その後、９６ウェルプレートをＰＢＳＴで洗浄し、ＴＭＢを加えて１００μｌ／ウェルとし、室温で１５ｍｉｎ発色させ、その後、０．２ＭのＨ$_2$ＳＯ$_4$を加えて発色反応を終了させた。プレートリーダでＡ４５０～６２０ｎｍの吸光値を検出した。ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、二重特異性抗体の２つの抗原に結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０４３０】

結果により、各二重特異性抗体がいずれもＣＤ３とＣＤ１９分子とを同時に特異的に結合することができ、且つ、抗体濃度の変化に従って良好な用量依存性を示す（図９－４）ことが分かった。複数種の二重特異性抗体の可溶ＣＤ３およびＣＤ１９との結合能力は表９－３に示すように、そのＥＣ$_{50}$値が０．１９ｎＭ～０．４７ｎＭであり、両端の結合能力にほぼ差がなかった。

【０４３１】

【表３０】

表９－３　Ａｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体のＣＤ３およびＣＤ１９分子との結合能力の測定

	AB1K2	AB23P8	AB23P9	AB23P10
EC_{50} (nM)	0.2185	0.1925	0.2211	0.4704

【０４３２】

１１．３、レポータージーン細胞株で二重特異性抗体のＴ細胞を活性化する能力を評価した

【０４３３】

ＮＦＡＴ　ＲＥレポータージーンを含むＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞は、二重特異性抗体と標的細胞Ｒａｊｉ細胞とが同時に存在する場合、ルシフェラーゼを過発現し、ルシフェラーゼの活性を検出することによりＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞の活性化程度を定量することができた。二重特異性抗体の濃度をＸ軸とし、フルオレセイン信号をＹ軸とし、４パラメータ曲線をフィッティングした。

【０４３４】

図９－５～図９－６の実験結果により、ＣＤ１９過発現標的細胞が存在しない場合、Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞はほぼ活性化できず、二重抗体および両端の標的細胞が全て存在する場合にのみ、Ｔ細胞が活性化された。各抗体のＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化する能力を表９－４に示し、各二重特異性抗体のＪｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化する能力はほぼ相当した。

【０４３５】

【表３１】

表９－４　Ａｎｔｉ－ＣＤ１９×ＣＤ３二重特異性抗体のレポータージーン細胞株Ｊｕｒｋａｔ　Ｔ細胞を活性化する能力の測定

	AB1K2	AB23P8	AB23P9	AB23P10	Blincyto
EC_{50} (nM)	1.080	1.123	0.8527	0.7093	2.714

【０４３６】

１１．４、二重特異性抗体のＴ細胞を媒介して腫瘍細胞を殺傷する能力

【０４３７】

正常に培養された腫瘍細胞系は、Ｒａｊｉ－Ｌｕｃ、ＮＡＬＭ６、Ｒｅｈ細胞（いずれも上海中科院細胞バンクから購入）を標的細胞として含み、細胞懸濁液を収集し、遠心し、細胞密度を２×１０^{5}個／ｍｌに調整し、９６ウェル細胞培養プレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、一夜培養した。実験設計に従って対応する抗体を希釈して５０μｌ／ウェルとし、抗体を入れる必要のないウェルを同じ体積の培地で補充した。その後、標的細胞数の５倍のエフェクター細胞を加え（ヒトＰＢＭＣまたは増幅培養したＣＩＫ細胞）、１００μｌ／ウェルとし、対照ウェルを設け、エフェクター細胞を入れる必要のないウェルを、同じ体積の培地で補充した。４８ｈ培養した後、Ｒａｊｉ－Ｌｕｃ細胞をＳｔｅａｄｙ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で検出し、他の細胞をＣｙｔｏＴｏｘ９６　Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　Ａｓｓａｙ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で検出した。検出結果をＹ軸とし、二重特異性抗体濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄにより分析し、各二重特異性抗体の腫瘍細胞の殺傷を媒介する能力を計算して比較した。

【０４３８】

各二重特異性抗体のエフェクター細胞を媒介して腫瘍細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$値を表９－５～表９－７にまとめ、結果により、各二重特異性抗体は、ＣＤ１９が高発現した腫瘍細胞に対していずれも非常に顕著な殺傷作用を示し、そのＥＣ$_{50}$がｐＭレベルに達し、且つ、用量依存性を示すことが分かった。

【０４３９】

【表３２】

表９－５　二重特異性抗体のＣＩＫを媒介して腫瘍細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$値

EC_{50} (pM)	AB1K2	AB23P8	AB23P9	AB23P10	Blincyto
Raji-LUC	0.6988	0.5861	0.1480	0.1280	0.5952
	0.2024	-	-	0.4834	5.654

備考：－は、検出されていないことを表す。

【０４４０】
【表３３】

表９－６　二重特異性抗体のＰＢＭＣを媒介して腫瘍細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$値

EC_{50} (pM)	AB1K2	AB23P8	AB23P9	AB23P10	Blincyto
Raji-LUC	1.225	1.025	1.014	0.9462	5.452
	1.254	-	-	1.254	21.22
	-	-	-	4.176	22.58

備考：－は、検出されていないことを表す。

【０４４１】
【表３４】

表９－７：二重特異性抗体のＣＩＫを媒介して異なる腫瘍細胞を殺傷するＥＣ$_{50}$値

EC_{50} (pM)	AB1K2	AB23P10	Blincyto
NALM6	-	4.402	77.29
Reh	1.709	1.640	11.87

備考：－は、検出されていないことを表す。

【０４４２】
実施例１２、Ａｎｔｉ－Ｍｕｃｉｎ１×ＣＤ３二重特異性抗体の体外生物学的機能の評価
【０４４３】
１２．１、ＡＢ１１Ｋの、Ｍｕｃｉｎ１が高発現した腫瘍細胞およびヒトまたはカニクイザルの初代Ｔ細胞との結合活性
【０４４４】
ヒト乳癌細胞ＭＣＦ－７、ＢＴ－５４９、ＨＣＣ７０、Ｔ－４７ＤおよびＨＣＣ１９５４、ヒト卵巣癌細胞ＳＫ－ＯＶ－３、ヒト子宮頸癌細胞Ｈｅｌａおよびヒト結腸癌細胞ＨＴ－２９を培養し、ここで、ＭＣＦ－７、ＢＴ－５４９、Ｔ－４７Ｄ、ＨＣＣ１９５４、ＳＫ－ＯＶ－３、ＨｅｌａおよびＨＴ－２９細胞は中国科学院細胞バンクから購入され、ＨＣＣ７０は南京科佰生物科技有限公司から購入された。上記細胞をそれぞれトリプシンで消化した後、遠心して収集し、１％のＰＢＳＢで重懸濁し、細胞密度をそれぞれ５×１０^{5}個／ｍｌに調整し、９６ウェルプレートに置いて１００μｌ／ウェルとし、４℃で３０ｍｉｎ密閉した。ヒトまたはカニクイザルの初代Ｔ細胞は、遠心により細胞を収集し、

１％のＰＢＳＢで重懸濁し、細胞密度をそれぞれ５×１０^{5}個／ｍｌに調整し、９６ウェルプレートに置いて１００μｌ／ウェルとし、４℃で３０ｍｉｎ密閉した。１％のＰＢＳＢで細胞を１回洗浄した。その後、希釈した一連の濃度のＡＢ１１Ｋを１００μｌ／ウェルで加え、４℃で１ｈインキュベートした。遠心して上清を取り除き、１％のＰＢＳＢで２回洗浄し、希釈したＡＦ６４７ ｇｏａｔ ａｎｔｉ ｈｕｍａｎ ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｃ．１：２５０で希釈）を加え、１００μｌ／ウェルとし、４℃で遮光して１ｈインキュベートした。遠心して上清を取り除き、プレートを洗浄した後、４％のＰＦＡを１５０μｌ／ウェルで加えて細胞を重懸濁し、フローサイトメーターで信号強度を検出した。平均蛍光強度をＹ軸とし、抗体のモル濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ６により分析し、ＡＢ１１Ｋの上記腫瘍細胞およびヒトまたはカニクイザルの初代Ｔ細胞と結合するＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０４４５】

図１０－１および表１０－１に示すように、細胞レベルで、ＡＢ１１Ｋは上記腫瘍細胞およびヒトまたはカニクイザルの初代Ｔ細胞と結合し、その信号強度が抗体濃度に比例し、ＡＢ１１Ｋの上記腫瘍細胞と結合するＥＣ$_{50}$が５ｎＭ～３００ｎＭ間に達していると計算し、ここで、Ｔ－４７ＤおよびＨｅｌａとの結合が最も強く、次はＨＣＣ７０、ＨＣＣ１９５４、ＳＫＯＶ－３およびＢＴ－５４９であり、ＭＣＦ－７およびＨＴ－２９との結合が弱く、上部プラトーに達していなかった。ＡＢ１１ＫのヒトまたはカニクイザルのＴ細胞と結合するＥＣ$_{50}$値がそれぞれ１３．４３ｎＭおよび９．９９６ｎＭであり、そのカニクイザルのＴ細胞に結合する能力とヒトのＴ細胞に結合する能力とがほぼ相当した。

【０４４６】

【表３５】

表１０－１　ＡＢ１１Ｋの、Ｍｕｃｉｎ１が高発現した腫瘍細胞またはヒトやカニクイザルのＴ細胞と結合するＥＣ$_{50}$の結果

細胞名称	EC_{50}（nM）
MCF-7	/
BT-549	287.2
HCC70	58.98
T-47D	5.053
HCC1954	81.24
Hela	5.515
SK-OV-3	93.72
HT-29	/
ヒトのＴ細胞	13.43
カニクイザルのＴ細胞	9.996

【０４４７】

１２．２、ＡＢ１１ＫのＴ細胞を媒介して腫瘍細胞を殺傷する能力

【０４４８】

正常に培養したＭＣＦ－７、ＢＴ－５４９、ＨＣＣ７０、Ｔ－４７Ｄ、ＨＣＣ１９５４、ＳＫ－ＯＶ－３、ＨｅｌａおよびＨＴ－２９細胞をそれぞれ標的細胞とし、トリプシンで消化した後、細胞密度を２×１０^{5}個／ｍｌに調整し、９６ウェル細胞培養プレートに入れて１００μｌ／ウェルとし、３７℃にて５％のＣＯ$_{2}$で一夜培養した。Ｔ細胞グループに対応する標的細胞数の５倍のエフェクター細胞（増幅培養したＴ細胞）を加え、ＰＢ

ＭＣグループに対応する標的細胞数の１０倍のエフェクター細胞（健康なボランティアのＰＢＭＣ）を加え、１００μｌ／ウェルとした。空白のウェルおよびエフェクター細胞を入れる必要のないウェルを設けた。ＡＢ１１Ｋを培地で５０μｇ／ｍＬに希釈し、４倍比で希釈した後、５０μｌ／ウェルで９６ウェルプレートに入れ、３７℃にて５％のCO_2で４８ｈ培養した。細胞培養板をＰＢＳで３回洗浄し、浮遊細胞を除去した。１０％のＣＣＫ－８を含む培地を加え、１００μｌ／ウェルとし、３７℃にて５％のCO_2で４ｈインキュベートした。４５０ｎｍおよび６２０ｎｍでデータを読み取り、［ＯＤ４５０－ＯＤ６２０］の数値に基づいて抗体の特異的殺傷率を計算し、式は以下のとおりである。

【数３】

$$\text{抗体特異的殺傷率}\ (\%)=\frac{[OD450-OD620]_{(エフェクター細胞+標的細胞グループ)}-[OD450-OD620]_{(抗体処理グループ)}}{[OD450-OD620]_{(エフェクター細胞+標的細胞グループ)}-[OD450-OD620]_{(ブランクグループ)}}\times 100\%$$

【０４４９】

特異的殺傷率（％）をＹ軸とし、抗体のモル濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　６により分析し、ＡＢ１１Ｋの腫瘍標的細胞の殺傷を媒介するEC_{50}を計算した。

【０４５０】

図１０－２、１０－３および表１０－２に示すように、二重特異性抗体ＡＢ１１Ｋがエフェクター細胞を媒介してＭｕｃｉｎ１が高発現した腫瘍細胞を殺傷することは、顕著な殺傷作用を示し、増幅したＴ細胞をエフェクター細胞とする場合、ＡＢ１１Ｋの最大の特異的殺傷がいずれも９９％以上に達し、ここで、ＭＣＦ－７、ＢＴ－５４９、ＨＣＣ７０およびＴ－４７Ｄに対する特異的殺傷効果が最も良く、EC_{50}が１００ｐＭ～２００ｐＭに達し、次はＨｅｌａ、ＨＣＣ１９５４およびＳＫ－ＯＶ－３であり、ＨＴ－２９を特異的殺傷する効果が弱く、EC_{50}が大きく、約１５７７ｐＭであった。ＰＢＭＣをエフェクター細胞とする場合、ＡＢ１１ＫのＭＣＦ－７、ＢＴ－５４９を特異的殺傷する効果が最も良く、最大の特異的殺傷が９５％以上に達し、EC_{50}がそれぞれ１３１．２ｐＭおよび９５５．９ｐＭであり、次はＨＣＣ１９５４およびＨＣＣ７０であり、ＨｅｌａおよびＨＴ－２９を特異的殺傷するEC_{50}が大きく、それぞれ４８１０ｐＭおよび９５５０ｐＭであった。

【０４５１】

【表３６】

表１０－２　ＡＢ１１Ｋのエフェクター細胞を媒介して腫瘍細胞を殺傷するEC_{50}の結果

細胞名称	Ｔ細胞を媒介して殺傷するＥＣ５０（ｐＭ）	ＰＢＭＣを媒介して殺傷するＥＣ５０（ｐＭ）
MCF-7	152.7	131.2
BT-549	140.9	955.9
HCC70	185.4	595.2
T-47D	84.53	/
HCC1954	280.9	1893
Hela	278.2	4810
SK-OV-3	689.4	/
HT-29	1577	9550

【０４５２】

１２．３、二重特異性抗体のＴ細胞を活性化する能力の評価

【０４５３】

ＮＦＡＴ ＲＥレポータージーンを含むＪｕｒｋａｔ Ｔ細胞（ＢＰＳ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅから購入）は、二重特異性抗体とＭｕｃｉｎ１陽性細胞が同時に存在する場合、ルシフェラーゼを過発現し、ルシフェラーゼの活性を検出することによりＪｕｒｋａｔ Ｔ細胞の活性化程度を定量することができた。

【０４５４】

具体的には、ＭＣＦ－７、ＢＴ－５４９、ＨＣＣ７０、Ｔ－４７Ｄ、ＨＣＣ１９５４、ＳＫ－ＯＶ－３、ＨｅｌａおよびＨＴ－２９細胞をトリプシンで消化した後、細胞密度２×１０^{5}個／ｍｌに調整し、５０μｌ／ウェルで９６ウェル細胞培養プレートに入れ、３７℃にて５％のCO_2で一夜培養した。Ｊｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ細胞は、細胞密度を２．５×１０^{6}個／ｍｌに調整し、４０μｌ／ウェルとした。ＡＢ１１Ｋを培地で４００μｇ／ｍＬに希釈し、４倍比で希釈した後、１０μｌ／ウェルで９６ウェル細胞培養プレートに入れ、３７℃にて５％のCO_2インキュベーターで４ｈインキュベートした。Ｓｔｅａｄｙ－ＧＩｏ（登録商標） Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅを加え、１００μｌ／ウェルとし、５ｍｉｎ反応させた後、プレートリーダでルミネセンス値を検出した。フルオレセイン強度をＹ軸とし、抗体のモル濃度をＸ軸とし、ソフトウェアＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ６により分析し、二重特異性抗体のＴ細胞を活性化するEC_{50}を計算した。

【０４５５】

図１０－４および表１０－３に示すように、ＡＢ１１Ｋは、Ｊｕｒｋａｔ－ＮＦＡＴ細胞を特異的に活性化することができ、EC_{50}値がいずれもｎＭレベルにあり、且つ、その濃度が信号強度に比例した。

【０４５６】

【表３７】

表１０－３ ＡＢ１１ＫのＴ細胞を活性化する能力のEC_{50}の結果

細胞名称	Ｔ細胞を活性化する EC_{50}（ｐＭ）
MCF-7	14.22
BT-549	10.49
HCC70	3.016
T-47D	0.6294
HCC1954	5.599
Hela	7.241
SK-OV-3	10.37
HT-29	6.711

【０４５７】

実施例１３、Ａｎｔｉ－ＥＧＦＲ×ＣＤ３二重特異性抗体のマウス移植腫瘍モデルでの薬効学的研究

【０４５８】

ＥＧＦＲが高発現したヒト皮膚癌Ａ４３１細胞マウス移植腫瘍モデルを選択し、抗ＥＧＦＲ×ＣＤ３二重機能特異性抗体ＡＢ８Ｋ、ＡＢ２ＫおよびＥｒｂｉｔｕｘ（Ｅｒｂｉｔｕｘ、Ｍｅｒｃｋ ＫＧａＡ製薬）に対して体内で腫瘍成長を抑制する薬効学的研究を行った。

【０４５９】

実施例３．１における方法によりＣＩＫ細胞を取得し、対数成長期にあるＡ４３１細胞を収集した。７～８週齢の雌ＮＰＧマウスを選択し、３×１０^{6}個のＡ４３１細胞と１×

１０^{6}個のＣＩＫ細胞とを混合し、ＮＰＧマウスの右側背部皮下に接種した。１時間後、マウスを体重で５グループにランダムに分け、グループ毎に６匹であり、対応する薬剤を腹腔投与した。全ての投与グループおよび対照グループＰＢＳグループにいずれも週に２回投与し、ＡＢ２ＫおよびＥｒｂｉｔｕｘの投与量が１ｍｇ／ｋｇであった。ＡＢ８Ｋの投与量を１ｍｇ／ｋｇおよび０．１ｍｇ／ｋｇとした。投与当日を０日目と記し、腫瘍の最大直径（Ｄ）および最小直径（ｄ）を週に２回測定し、且つ、実施例３．１における式に基づいて各グループの腫瘍体積（ｍｍ^{3}）および各投与グループの腫瘍成長抑制率ＴＧＩ（％）を計算した。

【０４６０】

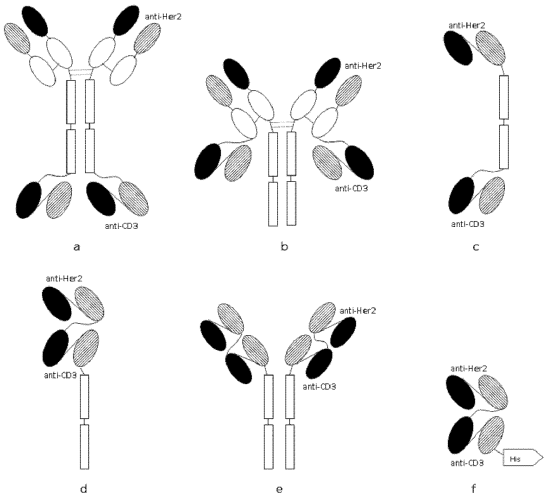
図１１に示すように、投与してから１７日目に、ＰＢＳ対照グループの平均腫瘍体積が１３７０．７６±２１６．３５ｍｍ^{3}であり、１ｍｇ／ｋｇのＥｒｂｉｔｕｘ投与グループの平均腫瘍体積が１０６０．３５±１１５．８６ｍｍ^{3}であり、対照グループに対して著しい差がなく、１ｍｇ／ｋｇ　ＡＢ２Ｋ投与グループの平均腫瘍体積が８７７．７６±１２０．３８ｍｍ^{3}であり、対照グループに対して著しい差がなく、０．１ｍｇ／ｋｇおよび１ｍｇ／ｋｇのＡＢ８Ｋ投与グループの平均腫瘍体積がそれぞれ２３３．３０±１３５．５１ｍｍ^{3}および８．１４±８．１４ｍｍ^{3}であり、ＴＧＩがそれぞれ８２．９８％および９８．３６％であり、対照グループに対していずれも顕著な差（ｐ＜０．０１）があり、ここで、ＡＢ８Ｋの１ｍｇ／ｋｇ用量グループの６匹のマウスのうち、５匹のマウスの腫瘍が完全に解消された。ＡＢ２ＫはＡＢ８Ｋの同型対照であり、Ａ４３１細胞はＣＤ２０を発現せず、ＡＢ２Ｋはこのモデルで薬効が見られなかったことにより、二重抗体の構造が相対的に安全で、非特異的殺傷作用を引き起こさないことが示唆された。ＣＩＫ細胞の９０％以上がいずれも活性化されたＴ細胞であり、ＡＢ８Ｋは動物体内でヒト免疫細胞を活性化することにより腫瘍細胞を抑制して殺傷し、１ｍｇ／ｋｇの用量で腫瘍の成長を完全に抑制することができ、０．１ｍｇ／ｋｇの用量でも良好な抗腫瘍効果を示した。

【０４６１】

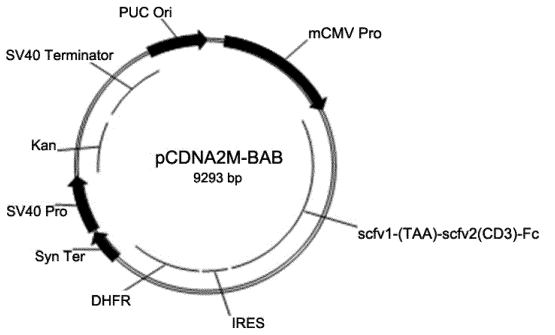
本発明に記載された全ての文献は、それぞれが参照として単独で引用されるように、いずれも参照として本発明に引用される。また、本発明の上記説明内容を閲読した後、当業者は、本発明に対して様々な改良または修正を行うことができ、これらの等価形式は同様に本発明の特許請求の範囲に限定される範囲内に含まれることが理解されるべきである。

【図面】

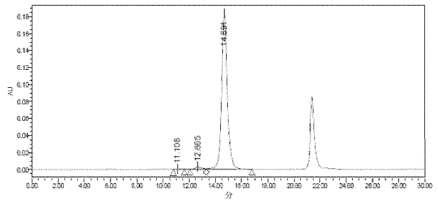
【図１－１】



【図１－２】



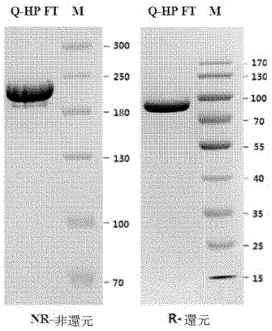
【図１－３】



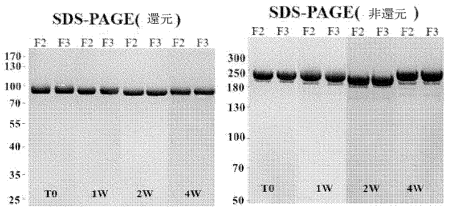
ピーク結果

	名称	保留時間（分）	開始時間（分）	終了時間（分）	面積（μV・s）	高さ（μV）	%面積	積分タイプ	USP分離度	対称因子	USPテーリング	理論段数
1		11.108	10.778	11.625	10528	539	0.16	BB		1.282	1.282	6537.3
2		12.665	12.065	13.305	95949	2775	1.89	BV	2.108			3106.9
3		14.691	13.305	16.792	5586292	183734	98.13	VB	2.250	1.109	1.189	6302.4

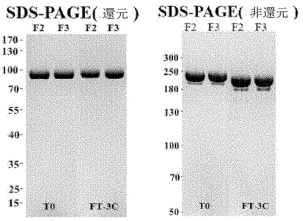
【図１－４】



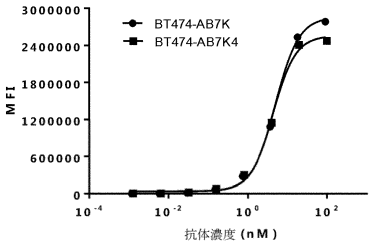
【図１－５】



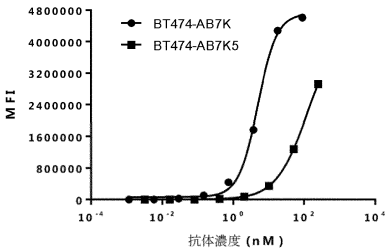
【図１－６】



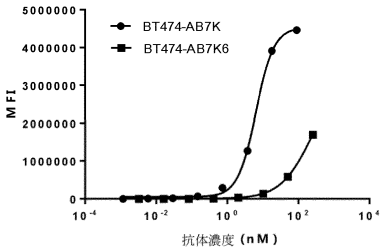
【図２－１】



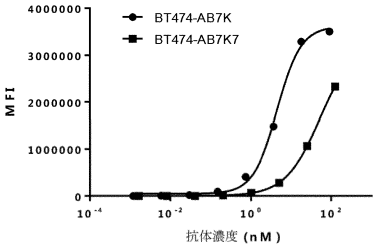
【図２－２】



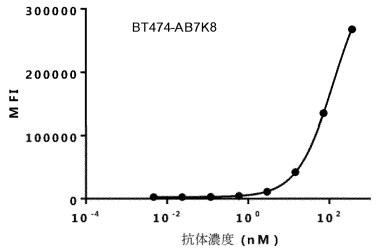
【図２－３】



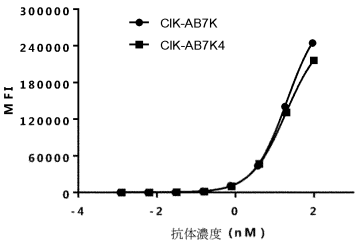
【図２－４】



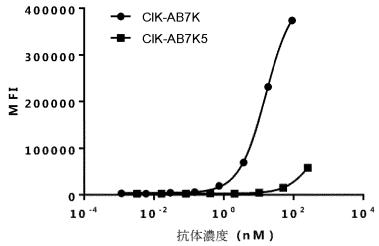
【図２－５】



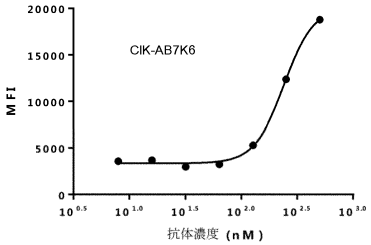
【図２－６】



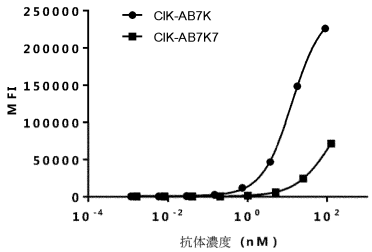
【図２－７】



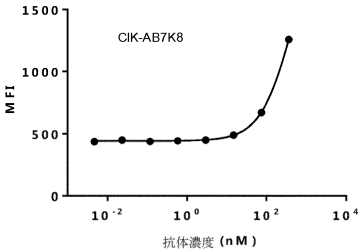
【図２－８】



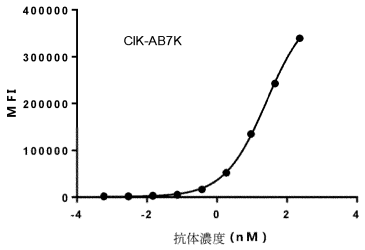
【図２－９】



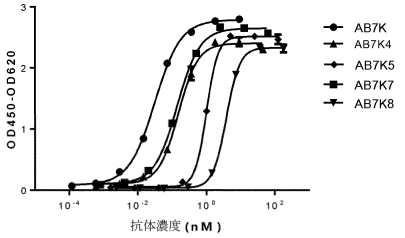
【図２－１０】



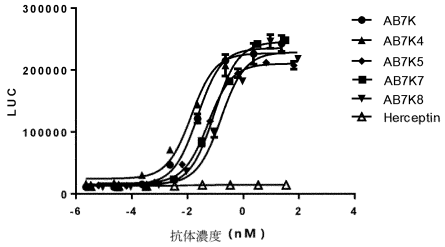
【図２－１１】



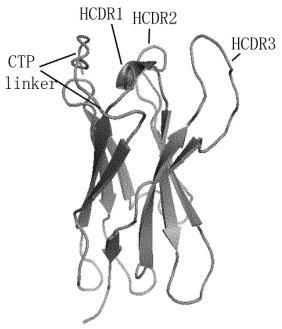
【図２－１２】



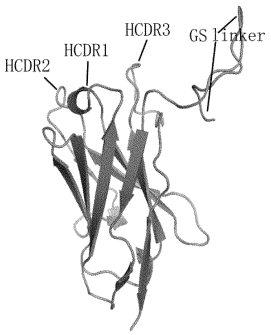
【図２－１３】



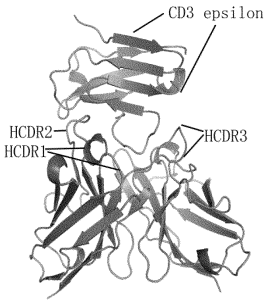
【図２－１４】



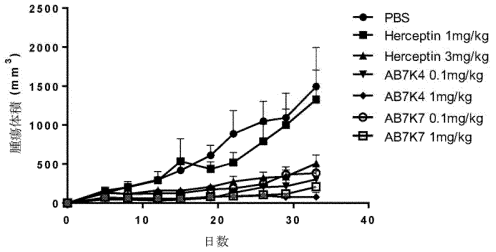
【図２－１５】



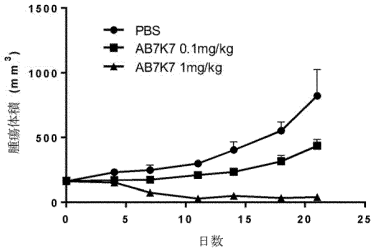
【図２－１６】



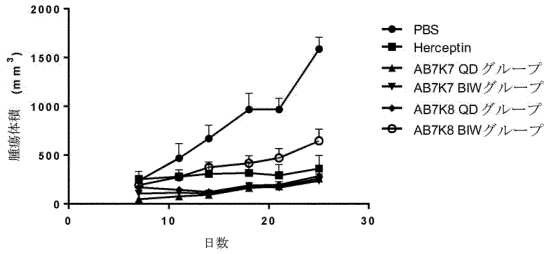
【図３－１】



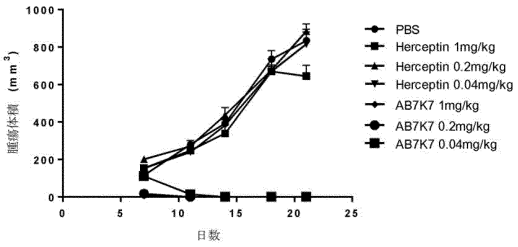
【図３－２】



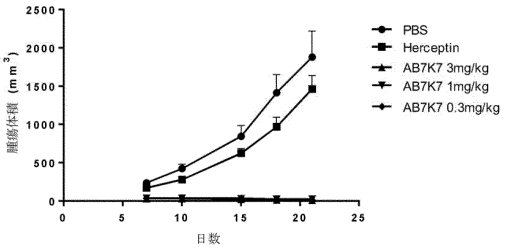
【図３－３】



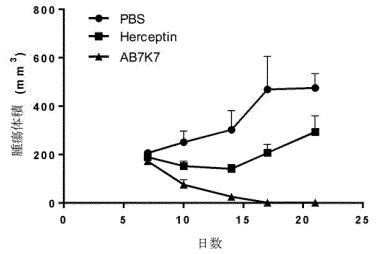
【図３－４】



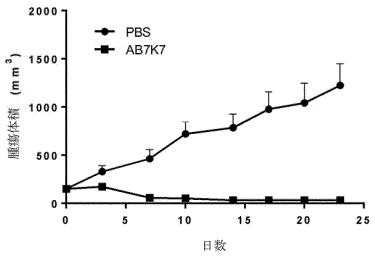
【図３－５】



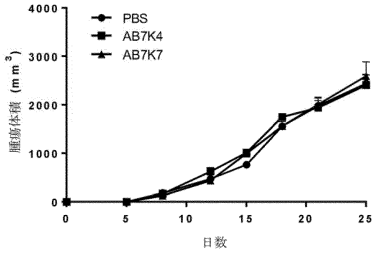
【図３－６】



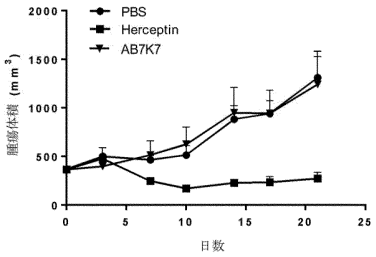
【図３－７】



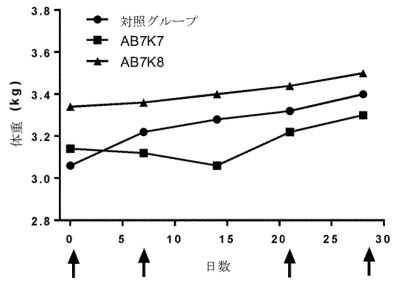
【図４－１】



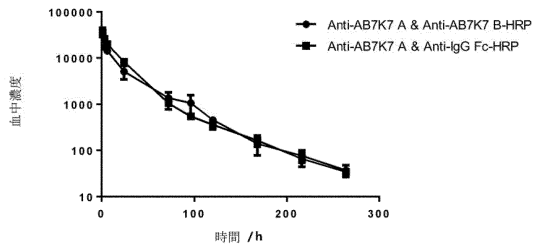
【図４－２】



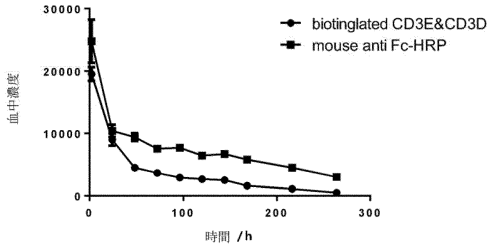
【図４－３】



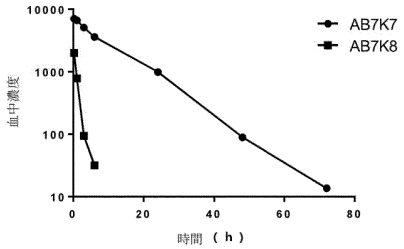
【図５－１】



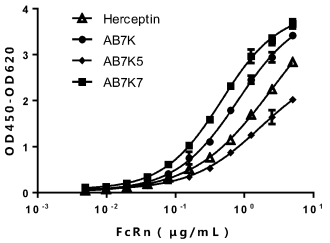
【図５－２】



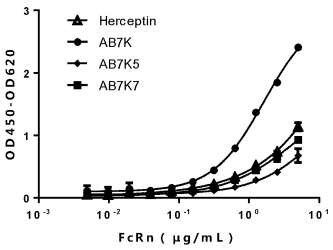
【図５－３】



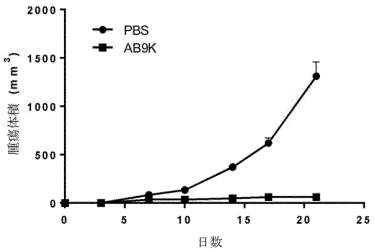
【図５－４】



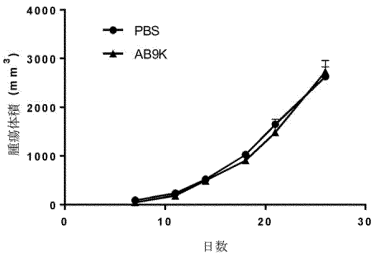
【図５－５】



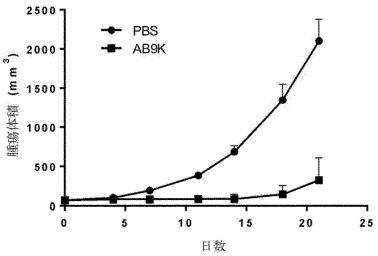
【図６－１】



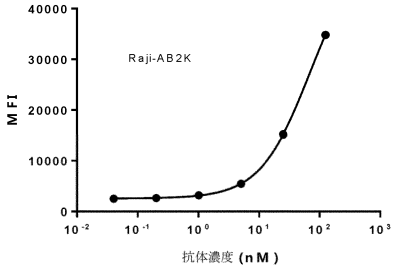
【図６－２】



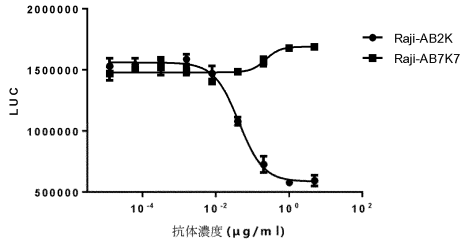
【図６－３】



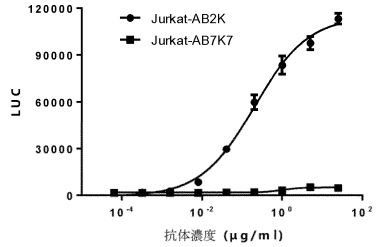
【図７－１】



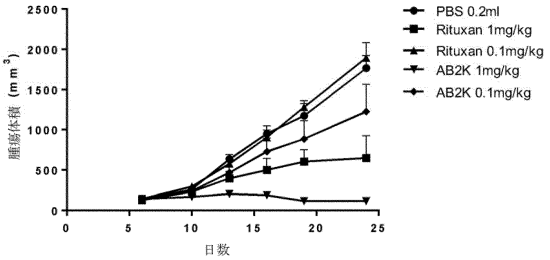
【図７－２】



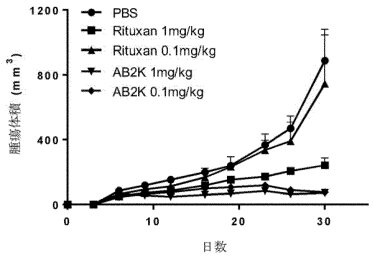
【図７－３】



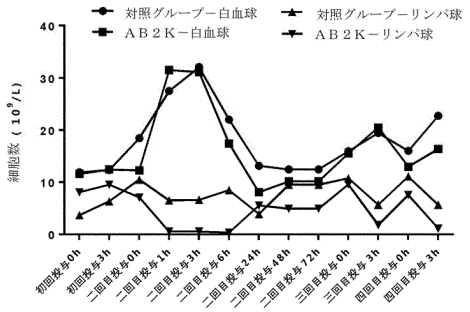
【図７－４】



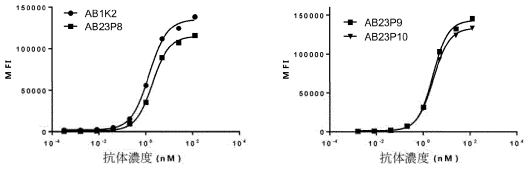
【図７－５】



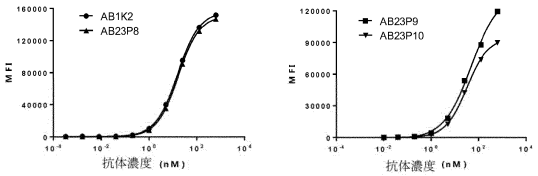
【図８】



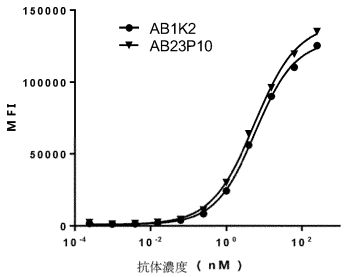
【図９－１】



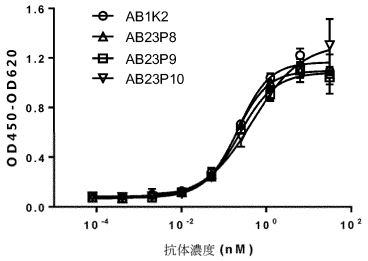
【図９－２】



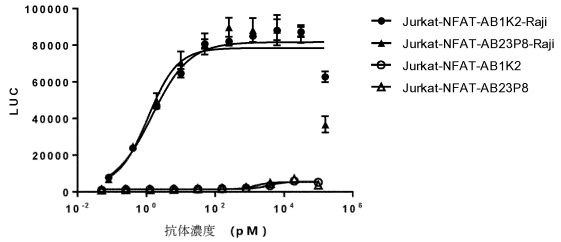
【図９－３】



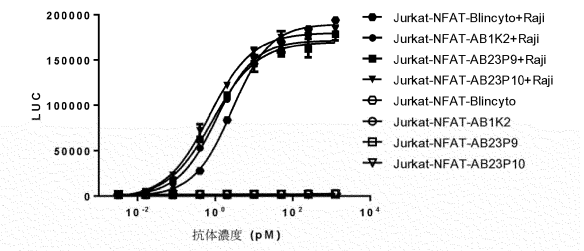
【図９－４】



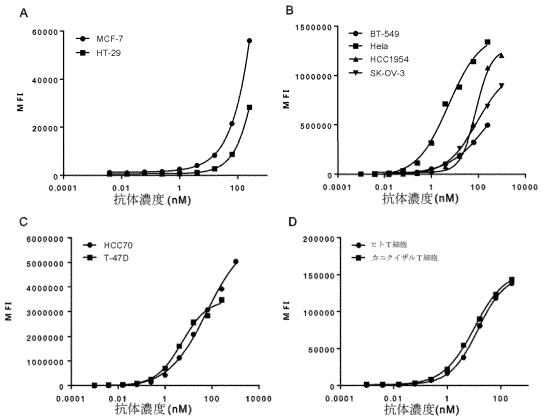
【図９－５】



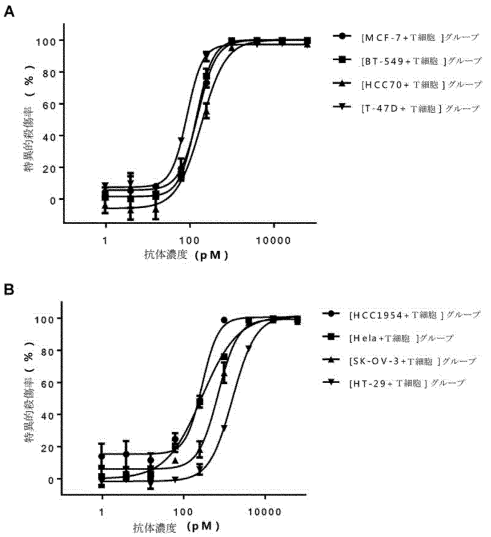
【図９－６】



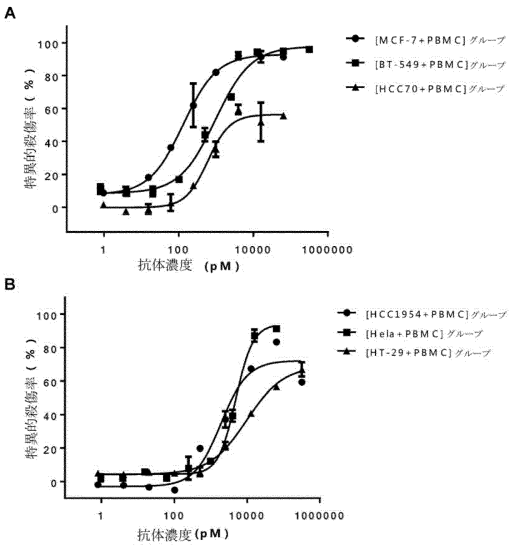
【図１０－１】



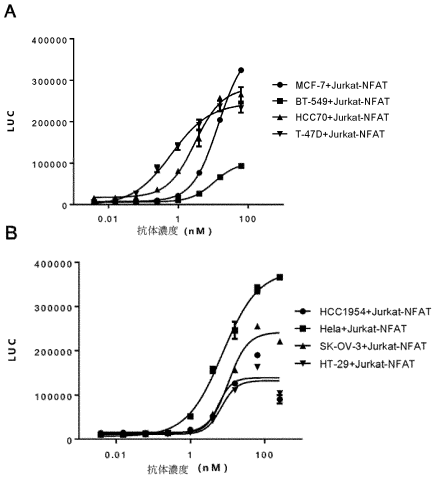
【図１０－２】



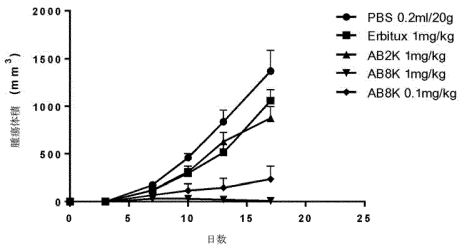
【図１０－３】



【図１０－４】



【図１１】



【配列表】

0007308560000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI		
A61P	*37/04*	*(2006.01)*	A61P	35/00	
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	A61P	37/04	
C07K	*16/30*	*(2006.01)*	C07K	16/28	
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/30	
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C07K	16/46	
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/19	
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	1/21	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	5/10	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/13	
C12P	*21/02*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C
			C12P	21/08	

弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 馬 心魯
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 賈 世香
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 厳 源
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 張 玉華
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 周 利
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 孫 日龍
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 崔 雪原
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 余 霊菊
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 ▲ヤン▼ 玉潔
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 金 蛍蛍
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 熊 耀
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 李 媛麗
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 陳 思
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 劉 雪梅
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８
(72)発明者 ▲チョウ▼ 家昇
中国上海市浦東新区紫▲ヘイ▼路９０８弄３号 郵便番号：２０１３１８

審査官 山▲崎▼ 真奈

(56)参考文献
特開２０１７－１８６３０１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１９／２２２４２８（WO，Ａ１）
特開２０１２－１６１３２４（ＪＰ，Ａ）
特表２０１８－５０９９０１（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１６／０３５５６００（ＵＳ，Ａ１）

特表２０１４－５２９４０２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５１４２８７（ＪＰ，Ａ）
ASANO, R. et al.，Cytotoxic Enhancement of a Bispecific Diabody by Format Conversion to Tandem Single-chain Variable Fragment (taFv)，THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY，2011年，Vol.286, No.3，pp.1812-1818
WU, X. et al.，Tandem bispecific neutralizing antibody eliminates HIV-1 infection in humanized mice，The Journal of Clinical Investigation，2018年06月，Vol.128, No.6，pp.2239-2251
KIM, H. et al.，Application of bispecific antibody against antigen and hapten for immunodetection and immunopurification，Experimental & Molecular Medicine，2013年，Vol.45, e43，pp.1-7
Grit Lorenczewski, MS et al.，Generation of a Half-Life Extended Anti-CD19 BiTE(R) Antibody Construct Compatible with Once-Weekly Dosing for Treatment of CD19-Positive Malignancies，Blood blood，2017年，Vol.130, Suppl_1
ZOU, J. et al.，Immunotherapy based on bispecific T-cell engager with hIgG1 Fc sequence as a new therapeutic strategy in multiple myeloma，Cancer Sci，2015年，Vol.106, No.5，pp.512-521

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)

ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ