

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7403479号
(P7403479)

(45)発行日 令和5年12月22日(2023.12.22)

(24)登録日 令和5年12月14日(2023.12.14)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
請求項の数 17 (全105頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2020-568373(P2020-568373)	(73)特許権者	520476581 ランカブ バイオ ベータ リミテッド スイス国 8 8 0 8 シュヴィーツ, プ フェフィコーン, パーンホーフシュト ラーセ 1
(86)(22)出願日	令和1年5月31日(2019.5.31)	(74)代理人	100107489 弁理士 大塩 竹志
(65)公表番号	特表2021-525544(P2021-525544 A)	(72)発明者	ピュアトワ, ヴァネッサ フランス国 7 4 2 7 0 コンタミーヌ- サルザン, シュマン ドゥ ラ クリュナ ズ 3 2 デ
(43)公表日	令和3年9月27日(2021.9.27)	(72)発明者	マヨッキ, サラ スイス国 1 2 1 2 グラン ランシー, シュマン ドゥ ス-ボワ 3
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/054559	(72)発明者	シュトライン, クラウス
(87)国際公開番号	WO2019/234576		
(87)国際公開日	令和1年12月12日(2019.12.12)		
審査請求日	令和4年5月30日(2022.5.30)		
(31)優先権主張番号	18175655.2		
(32)優先日	平成30年6月3日(2018.6.3)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
(31)優先権主張番号	18175656.0		
(32)優先日	平成30年6月3日(2018.6.3)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C E A C A M 5 および C D 4 7 に対する二重特異性抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 1 の結合部分と、ヒト C D 4 7 に特異的に結合する第 2 の結合部分とを含む、二重特異性抗体であって、

a) 前記第 1 の結合部分が、C D R として配列番号 2 5 の C D R H 1、配列番号 2 6 の C D R H 2 および配列番号 2 7 の C D R H 3 を含む重鎖可変領域と、C D R として、

(i) 配列番号 3 1 の C D R L 1、配列番号 3 2 の C D R L 2 および配列番号 3 3 の C D R L 3、または

(i i) 配列番号 3 4 の C D R L 1、配列番号 3 5 の C D R L 2 および配列番号 3 6 の C D R L 3 を含む軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 前記第 2 の結合部分が、C D R として配列番号 2 5 の C D R H 1、配列番号 2 6 の C D R H 2 および配列番号 2 7 の C D R H 3 を含む重鎖可変領域と、C D R として配列番号 2 8 の C D R L 1、配列番号 2 9 の C D R L 2 および配列番号 3 0 の C D R L 3 を含む軽鎖可変領域とを含む、二重特異性抗体。

【請求項 2】

a) 前記第 1 の結合部分が、配列番号 4 の重鎖可変領域 (V H) と、軽鎖配列である配列番号 6 4 および 6 5 に含まれる V L の群より選択される軽鎖可変領域 (V L) とを含み、ならびに

b) 前記第 2 の結合部分が、

(i) 配列番号 4 の重鎖可変領域と、配列番号 1 0 の軽鎖可変領域と、または

(i i) 配列番号 5 の重鎖可変領域と、配列番号 1 1 の軽鎖可変領域と

を含む、

請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3】

C E A C A M 5 に特異的な前記第 1 の結合部分が、ラムダ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含み、C D 4 7 に特異的な前記第 2 の結合部分が、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含み、または C E A C A M 5 に特異的に結合する前記第 1 の結合部分が、カッパ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含み、C D 4 7 に特異的に結合する前記第 2 の結合部分が、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

10

【請求項 4】

前記二重特異性抗体の各結合部分が、共通重鎖 (c H C) を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 5】

M K N - 4 5 細胞への前記二重特異性抗体の結合曲線の E C 5 0 が、2 0 0 n g / m l 可溶性 C E A C A M 5 の存在下では、可溶性 C E A C A M 5 なしで測定された E C 5 0 と比較して高い濃度の方向に 2 倍超シフトしない、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 6】

カニクイザル C E A C A M 5 と交差反応する、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容され得る賦形剤または担体とを含む医薬組成物。

20

【請求項 8】

癌の処置のための、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の二重特異性抗体を含む組成物、または請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記癌が、結腸直腸癌、N S C L C (非小細胞肺癌)、胃癌、膵臓癌、乳癌、または C E A C A M 5 を発現する腫瘍細胞を含む別の癌である、請求項 8 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 1 0】

前記二重特異性抗体が、C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 3 の結合部分と、ヒト C D 3 に特異的に結合する第 4 の結合部分とを含む第 2 の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて投与されるものである、請求項 8 に記載の組成物または医薬組成物。

30

【請求項 1 1】

インビトロで腫瘍細胞の細胞溶解を誘導するための、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の二重特異性抗体を含む組成物。

【請求項 1 2】

処置のために腫瘍細胞の細胞溶解を誘導するための、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の二重特異性抗体を含む組成物。

40

【請求項 1 3】

前記二重特異性抗体が、C E A - T C B および / または C E A - T C B 1 と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて投与されるものである、請求項 8 に記載の組成物または医薬組成物。

【請求項 1 4】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の二重特異性抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 1 5】

請求項 1 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 1 5 に記載のベクターを含む、宿主細

50

胞。

【請求項 17】

二重特異性抗体の生産のための方法であって、

a) コードされる二重特異性抗体の生産を可能にする条件下で、請求項 15 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞を培養すること、および

b) 前記二重特異性抗体を単離すること

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の参照

本出願と共に提出された電子的に提出された配列表(「4130__002PC08__SeqListing__ST25.txt」、122,709バイト、2019年5月31日作成)の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

発明の分野

本発明は、ヒト癌胎児性抗原CEACAM5(CEA)およびヒトCD47に結合する二重特異性抗体(CEA×CD47二重特異性抗体)に関する。加えて、本発明は、このような二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチド、およびベクター、ならびにこのようなポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関する。本発明はさらに、このような抗体を選択および生産するための方法、ならびに疾患の処置においてこのような抗体を使用する方法に関する。本発明はまた、特にCEA×CD3 T細胞二重特異性抗体(TCB)および/またはPD-1もしくはPD-L1の阻害剤を用いた単剤療法および併用療法におけるCEA×CD47二重特異性抗体の治療的使用に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

ヒトCEAファミリーは29個の遺伝子を含み、このうちの18個(CEAサブグループに属する7個、および妊娠特異的糖タンパク質サブグループに属する11個)が発現される。いくつかのCEAサブグループメンバーは、細胞接着特性を有すると考えられる。CEAは、自然免疫において役割を果たすと考えられる(Hammarstrom S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81(1999))。癌胎児性抗原(CEA、CEACAM5またはCD66e; UniProtKB-P06731)は、癌胎児性抗原関連細胞接着分子(CEACAM)ファミリーのメンバーおよび腫瘍関連抗原である(Gold and Freedman, J Exp. Med., 121:439-462, 1965; Berinstein N.L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002)。CEACAM6(CD66c; UniProtKB-P40199)もまた、癌胎児性抗原(CEA)ファミリーに属する。研究目的で、診断ツールとして、および治療目的で、CEAに対して複数のモノクローナル抗体が作成されている(例えば、国際公開第2012117002号(その全体が参照により組み込まれる)を参照のこと、実施例8f)も参照のこと)。可溶性CEA(本出願では脱落CEAまたはsCEAとも称される)は、確立された腫瘍マーカーである。癌患者の血漿中のレベルは、いくつかの場合では1000ng/mlを超え得るが、健常個体における血漿中濃度は10ng/ml未満である(例えば、Sandler Bら、Anti cancer Res 1999, 19(5B), 4229-33)。Hao C., Zhang G. and Lin Progress in Molecular Biology and Translational Science(2019)は、膵臓癌、結腸直腸癌、肺癌および胃癌では、かなりの割合の患者で100~250ng/mLのCEA血漿濃度が見られ得ることを報告している。これらの癌が局所進行性および/または転移性である場合、このような高レベルが特に観察される。Waneboら、New En

10

20

30

40

50

g. J. Med. (1978)によれば、再発性/転移性結腸癌の21%は、100 ng/mlを超えるsCEAを有する。Hohenbergerら、Annals Surgery (1994)は、ステージデューク4および肝転移の結腸直腸患者では、患者の26%が、50 ng/mLを超えるsCEAを有することを報告している。Jurgensmerierら、Br. J. Cancer (2013)は、転移性結腸直腸癌を患っている数百人の患者を用いたかなり大規模な研究において、これらの患者の24%または25%でsCEAが225 ng/mLを超えることを報告している。可溶性CEAは、腫瘍細胞上のCEAへの結合について、治療用抗CEA抗体と競合し得、抗CEA抗体の有効性の減少を引き起こす可能性がある。癌患者、例えば結腸直腸癌患者の大多数では、これは、100~250 ng/mlのsCEA血漿濃度までの可溶性CEAに対する限定的な交差反応性を有する抗CEA抗体を使用することにより回避され得る。

10

【0004】

マウスモノクローナル抗体PR1A3は、NS1(P3/NS1/I-Ag-4-1)骨髄腫細胞と、正常結腸直腸上皮で免疫化されたマウス由来の脾臓細胞との融合により作成された。Richman P. I. and Bodmer W. F., Int. J. Cancer, 39:317-328, 1987は、マウスモノクローナル抗体PR1A3について記載している。PR1A3のエピトープマッピングは、抗体がCEA分子のB3ドメインおよびGPIアンカーをターゲティングすることを示している(Durbin Hら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4313-4317, 1994)。その結果、PR1A3抗体は膜結合CEAに主に結合し、癌患者の血流に見られ得る可溶性CEA型に結合しない。PR1A3により結合されるエピトープは立体配座エピトープであり、線状エピトープではない(Stewartら、Cancer Immunol Immunother, 47(1999)299-06)。ヒト化PR1A3(hPR1A3)抗体は、例えば、Conaghan P. Jら、Br. J. Cancer, 98(2008)1217-1225および国際公開第2012117002号(その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。

20

【0005】

ヒトPD-1軸アンタゴニストと抗CEA/抗CD3二重特異性抗体との組み合わせにより癌を処置するための方法は、米国特許出願公開第20140242079号および国際公開第2017118657号(これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる)に記載されており、臨床結果は、ASCOカンファレンス2017で発表された(Tabernerら、J Clin Oncol 35, 2017(suppl; abstr 3002))。免疫チェックポイント経路の2つまたはそれを超える異なる標的に結合する免疫チェックポイントアンタゴニストと、CEAおよびT細胞表面抗原に結合するT細胞再誘導剤とを投与することにより腫瘍を処置する方法は、国際公開第2015112534号に記載されている。単ドメイン抗CEACAM6抗体とウレアーゼとのコンジュゲートは、現在臨床試験中である(NCT02309892; 国際公開第2016116907号)。CEACAM5、CEACAM6および顆粒球に結合するクラスI抗体は、米国特許出願公開第20110064653号に記載されている。

30

【0006】

技術水準に記載されている抗CD3抗体はSP34である(Yang SJ, The Journal of Immunology (1986)137; 1097-1100)。SP34は、霊長類およびヒトCD3の両方と反応する。SP34はBD Biosciencesから入手可能である。技術水準に記載されているさらなる抗CD3抗体はUCHT-1である(国際公開第2000041474号を参照のこと)。技術水準に記載されているさらなる抗CD3抗体はBC-3である(Fred Hutchinson Cancer Research Institute; used in Phase I/II trials of GvHD, Anasettiら、Transplantation 54:844(1992))。SP34は、CD3の鎖上のみ存在するエピトープを認識するのに対して(Salmeronら、(1991)J. Immunol. 1

40

50

47:3047を参照のこと)、UCHT-1およびBC-3は、鎖および鎖の両方が寄与するエピトープを認識するという点で、SP-34は、UCHT-1およびBC-3とは異なる。抗CD3抗体もまた、国際公開第2007042261号、国際公開第2008119565号、国際公開第2008119566号、国際公開第2008119567号、国際公開第2010037836号、国際公開第2010037837号、国際公開第2010037838号および米国特許第8236308号(これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。CEAに特異的な結合部分と、CD3に特異的な結合部分とを含む二重特異性抗体は、米国特許出願公開第20140242079号(その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。

【0007】

ヒトCD47(UniProtKB-Q08722(CD47_HUMAN;IAP))は、リガンドのトロンボスポンジン-1(TSP-1)およびシグナル調節タンパク質アルファ(SIRP;CD172a;UniProtKB-P78324)に結合する膜貫通タンパク質であり、免疫系、特にマクロファージに対して「don't eat me」シグナルとして作用し得る。CD47は、アポトーシス、増殖、接着および遊走を含む広範な細胞プロセスに関与する。さらに、それは、免疫および血管新生反応において重要な役割を果たす。CD47は、異なる腫瘍細胞において過剰発現される。CD47に対する抗体は技術水準に記載されており、いくつかは、腫瘍処置のための治療剤として臨床試験中である(Weiskopf K. European Journal of Cancer 76(2017)100-109;Huang Yら、J Thorac Dis 2017;9(2):E168-E174。CD47に結合するIgG1サブクラスの抗体は、Fc依存的に血小板の枯渇およびヘモグロビンの赤血球RBCの減少をもたらし得る(例えば、米国特許出願公開第20140140989号を参照のこと)。この有害効果を回避するために、国際公開第2017196793号では、抗CD47抗体のIgG4サブクラスの突然変異体型(FcyR結合を減少させるためにS228P突然変異およびL235E突然変異を有するIgG4PE)が記載されている。大幅に減少したFcyR結合およびエフェクター機能を有するこのような抗CD47抗体は、このような血小板枯渇をもたらさない。CD47およびCD20に対する単一ドメイン二重特異性抗体は、von Bommel PEら、Oncoimmunol.7(2018)e386361およびPiccione ECら、mAbs 7(2015)946-956により記載されている。Dheilly Eら、Mol. Thera. 25(2017)523-533(国際公開第2014087248号も参照のこと)は、CD19およびCD47に対する二重特異性抗体について記載している。CD19およびCD47に対する二重特異性抗体であって、配列番号5の共通重鎖と、配列番号10の可変軽ドメインVLとを含む二重特異性抗体は、国際公開第2014087248号(その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。

【0008】

ヒトFcRI(CD64)は、単球/マクロファージおよび樹状細胞(DC)に限定され、好中球および肥満細胞上では誘導的に発現される;hFcRIIA(CD32A)はすべての骨髄細胞上において発現されるが、リンパ球上では発現されない;hFcRIIB(CD32B)は、循環B細胞および好塩基球上でのみ高発現され(L.Cassard, F.Joensson, S.Arnaud, M.Daeron, J.Immunol.189(2012(2995-3006)、単球の20%および好中球の4%では低発現され、組織マクロファージおよびDC上において発現されるが、肥満細胞上では発現されない。hFcRIIC(CD32C)は、NK細胞、単球および好中球上において発現される。hFcRIIIA(CD16A)は、NK細胞および単球/マクロファージ上において発現される;hFcRIIIB(CD16B)は、好中球上と、最近実証されているように一部の好塩基球上とにおいて発現される。これらの発現パターンは、hFcRIIAが、肥満細胞、好塩基球、好中球および好酸球により構成的に発現される唯一の活性化IgG受容体であることを強調している(Bruhns P., Blood

10

20

30

40

50

119 (2012) 5640)。IgGの各サブクラスの生物学的活性はほとんど不明である。ヒトでは、IgG受容体(FcR)が非常に多い。それらは、高親和性および低親和性受容体を含む。高親和性および低親和性FcRは両方とも、高いアビディティでIgG免疫複合体に結合するが、高親和性FcRのみが単量体IgGに結合する。ヒトでは、1つの高親和性IgG受容体hFcRI(CD64)と、2つの低親和性IgG受容体ファミリーhFcRIIA、IIBおよびIIC(CD32)ならびにhFcRIIIAおよびIIIB(CD16)がある。hFcRIおよびhFcRIIIAはFcR関連活性化受容体であり、hFcRIIAおよびhFcRIICは単ドメイン活性化受容体であり、hFcRIIBは単ドメイン阻害受容体であり、hFcRIIIIBは、その機能が不明なGPIアンカー型受容体である(Bruhns P. Blood 113 (2009) 3716)。いくつかの研究グループは、重鎖グリコシル化に1,6-フコースを欠く抗体が、FcRIII受容体への増強した結合親和性と、増加したADCC活性とを有することを実証している(Shields, R. Lら、(2002) J Biol. Chem. 277, 26733-26740.; (2002) J Biol. Chem. 8, 8)。加えて、FcRIII受容体への結合親和性とADCC活性との間の相関関係が立証されている(Okazaki, Aら、(2004) J Mol. Biol. 336, 1239-1249; Dall'Ozzo, 2004)。IgG分子は、そのFc領域中に2つのN結合型オリゴ糖(各重鎖に1つ)を有する。任意の糖タンパク質と同様に、抗体は、同じポリペプチド骨格を共有するが、グリコシル化部位に付着した異なるオリゴ糖を有する糖型の集団として産生される。血清IgGのFc領域に通常見られるオリゴ糖は、複雑な二分岐タイプのものであり(Wormaldら、Biochemistry 36:130-38 (1997)、低レベルの末端シアル酸および二分岐型N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)と、様々な程度の末端ガラクトシル化およびコアフコシル化とを有する。いくつかの研究は、FcγR結合に必要な最小炭水化物構造がオリゴ糖コア内にあることを示唆している。Lundら、J. Immunol. 157:4963-69 (1996)。グリカン部分に減少したフコース含有量を有する抗体は、通常のコアフコシル化型抗体と比較して高い抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を示す(Niwa Rら、Cancer Res, 64, 2127-33, 2004)。低/非フコース抗体の増強したADCCの背後にある機構は、FcRIIIa(CD16)へのその増加した親和性である。フコース付加に関与する遺伝子(1,6-フコシルトランスフェラーゼ; FUT8)の両対立遺伝子をノックアウトした細胞株は、米国特許第6946292号、米国特許第7425446号、米国特許第8067232号(これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる)およびhttp://www.potelligent.comに記載されている。チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞における(1,4)-N-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼIII(GnTIII)(二分岐型オリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼ)の過剰発現は、操作されたCHO細胞により産生される抗体のインビトロADCC活性を有意に増加させる。(Umama, Pら、Nature Biotechnol. 17:176-180 (1999)、国際公開第199954342号、米国特許出願公開第20030175884号(これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる))。Fcドメイン内の突然変異もまた、異なるFc受容体へのFcドメインの結合特性を変化させ得る(国際公開第2004063351号、国際公開第2004099249号; 国際公開第2005018669号、国際公開第2005063815号、国際公開第2005110474号、国際公開第2005056759号、国際公開第2005092925号、国際公開第2005018572号、国際公開第2006019447号、国際公開第2006116260号、国際公開第2006023420号、国際公開第2006047350号、国際公開第2006085967号、国際公開第2006105338号、国際公開第2007021841号、国際公開第2007008943号、国際公開第2007024249号、国際公開第2007041635号、国際公開第2007048077号、国際公開第2007044616号、国際公開第2007106707号

10

20

30

40

50

、国際公開第2008022152号、国際公開第2008140603号、国際公開第2008036688号、国際公開第2008091798号、国際公開第2008091954号、国際公開第2008092117号、国際公開第2008098115号、国際公開第2008121160号、国際公開第2008150494号、国際公開第2010033736号、国際公開第2014113510号（これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる））。

【0009】

血液悪性腫瘍の処置において、かなりの進歩がなされている。これは、いくつかのタイプの進行性固形腫瘍の処置においてなされた進歩とは対照的である。その多くがかなり高頻度の進行性腫瘍タイプの無進行生存（PFS）および全生存（OS）は、化学療法の組み合わせパートナーとして、例えばVEGFRまたはERGF Rに対するモノクローナル抗体を用いたおよび用いない新たな化学療法スキームによりある程度改善された。しかし、過去数年間において、進行性/転移性固形腫瘍の多くについて、薬物療法の進歩は限定的であった。多くの期待が癌免疫療法に寄せられており、限定的であるが確かな成功がある。腫瘍は、Tエフェクター細胞およびマクロファージのような他の免疫細胞による破壊からそれらの細胞を保護する手段を発達させる。過去10年間の癌免疫療法は、T細胞を再び適合させて癌細胞に対してそれらを再誘導することに確かにかなりの焦点を当てており、成功している。最も顕著な例は、特定の免疫チェックポイントの阻害剤/活性化因子である。例えば、PD-1軸アンタゴニストのようなチェックポイント阻害剤は、Tエフェクター細胞を再活性化して特定の固形癌と闘うことが示されている。しかし、すべての固形腫瘍タイプが反応性であるわけではなく、反応性のものにおいてさえ、例えば、抗PD-1またはPD-L1抗体による処置からの関連利益を有する患者は、多くの場合、50%よりもかなり少ない。

【0010】

CAR T細胞による養子T細胞療法およびさらにはT細胞二重特異性抗体による治療は、血液悪性腫瘍において有望な臨床結果をもたらした。しかし、様々な固形腫瘍において養子T細胞療法、例えばCAR T細胞を用いた臨床研究は、大部分は奏効率を示さなかったか、またはごくわずかな奏効率を示した（例えば、Xuら、Expert Review of Anticancer Therapy 2017, 17, 1099-1106）。

【0011】

米国特許出願公開第20140242079号および国際公開第2017055389号（これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる）は、CEA×CD3 T細胞二重特異性抗体について記載している。米国特許出願公開第20140242079号からの1つの抗体および国際公開第2017055389号からの1つは両方とも臨床開発中である（clinicaltrials.govを参照のこと；NCT3866239のRO6958688およびNCT03539484のRO7172508）。これらのT細胞二重特異性抗体は、CEA×CD3の異なるエピトープに結合し、異なる腫瘍細胞殺傷効力を有する。ヒトT細胞を用いたインビトロアッセイにおける腫瘍細胞殺傷に関して、国際公開第201705389号に記載されている最も強力なCEA×CD3 T細胞二重特異性抗体は、RO6958688/シビサタマブ（CEA-TCB）よりも10~100倍またはそれを超えて強力である。

【0012】

最近まで、進行性固形腫瘍を有する患者においてT細胞二重特異性抗体TAA×CD3（TAA = 腫瘍関連抗原）を用いた臨床試験の結果は期待外れであった。しかし、CEA×CD3 T細胞二重特異性抗体CEA-TCB（RO6958688/シビサタマブ、例えばBacacら、Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97(2016)；および米国特許出願公開第20140242079号を参照のこと）に関する予備第1相の結果がASCO2017で発表され、単剤療法の進行性結腸直腸癌患者において部分奏効および安定疾患が示されている（J. Tabernerら、J. C

10

20

30

40

50

lin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002))。臨床活用量では、シビサタマブについては、例えば300Nmの血漿濃度が達成された。CEA-TCBをPD-L1阻害抗体と組み合わせた場合、より多くの部分奏効および安定疾患が発生した。これらのデータは、進行性固形腫瘍では、CEA-TCBを用いて有効性を達成し得ることを示している。しかし、単剤療法およびさらにはPD-L1阻害剤との組み合わせでは、患者の大部分が依然として進行中であり、反応している者は、せいぜい部分奏効および安定疾患を示したが、完全奏効は達成されていない。より良好な結果を得るための1つのアプローチは、T細胞二重特異性抗体にPD-1チェックポイント軸の阻害剤を追加するだけでなく、さらなるチェックポイント阻害剤またはアゴニストを追加することであり得る。しかしこれまでのところ、本発明者らの知る限り、このような組み合わせアプローチに関する有望な臨床データはない。進行性固形腫瘍内におけるT細胞の限定的なアベイラビリティは確かに、T細胞二重特異性抗体+PD-1軸阻害剤および/またはT細胞の他のチェックポイント阻害剤もしくはアゴニストを用いて達成可能な有効性を制限する重要な機構である。

10

【0013】

T細胞二重特異性抗体とPD-1軸阻害剤との組み合わせに、進行性固形腫瘍の腫瘍細胞に対してT細胞を再誘導することを目的とする別の治療剤を追加することに代えて、他の免疫細胞、特にマクロファージまたはマクロファージおよびナチュラルキラーNK細胞を腫瘍細胞に再誘導する治療剤を追加することがより成功する可能性がある。本発明は、単剤療法として、または例えばT細胞二重特異性抗体および/もしくはPD-1/PD-L1阻害抗体と組み合わせて、マクロファージおよびさらにはNK細胞をCEA発現固形腫瘍に対して再誘導する二重特異性抗体を取り扱う。

20

【0014】

固形腫瘍におけるCAR-T細胞を用いた期待外れの結果には簡単な説明があり得る - 固形腫瘍に浸透してその中に分布するCAR-T細胞の数は全く十分ではない。血液悪性腫瘍の大部分では、これは確かに異なる；CAR-T細胞は腫瘍細胞に十分にアクセスし得るが、これは、これらの悪性腫瘍における有効性が、固形腫瘍における期待外れの有効性と比較して高いという違いを説明している。加えて、CAR-T細胞は、大部分が強力に免疫抑制的である腫瘍微小環境(TME)により大幅に抑制され得る。

治療において使用されるモノクローナル抗体およびさらには二重特異性抗体は、様々な有害効果を引き起こし得る。重要な毒性問題はサイトカイン放出症候群(CRS)であり、これは、例えばアレムツズマブ、ムロモナブ-CD3、リツキシマブおよびCD19×CD3二重特異性抗体ブリナツモマブによる治療において見られた。抗CD47抗体による処置は、抗CD47抗体媒介性食作用後に炎症促進性サイトカインの量の増加を誘導することも見出された(例えば、米国特許出願公開第20160144009号を参照のこと)。wt IgG1 Fcを有する抗CD47モノクローナル抗体の公知の有害事象は、赤血球RBC食作用/溶解および血小板活性化の増加である(例えば、図8および10において、wt IgG1 Fcを保有する抗CD47抗体B6H12.2により誘導されるRBC食作用および血小板活性化を参照のこと)。

30

本発明は、ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合する二重特異性抗体であって、固形腫瘍の処置について指定された二重特異性抗体を提供する。これらの二重特異性抗体は、高い有効性と、低い毒性、低い免疫原性および好ましい薬物動態特性とを併せ持つ。本発明の二重特異性抗体は、免疫細胞、特にマクロファージおよびNK細胞の関与により、最適化ADC(抗体依存性細胞食作用)およびADCC(抗体依存性細胞傷害)を主に介してそれらの抗腫瘍細胞効果を誘導する。本発明はまた、ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合する二重特異性抗体であって、RO6958688、RO7172508および例えば以下に記載される他のCEA×CD3 T細胞二重特異性抗体のようなCEA×CD3 T細胞二重特異性抗体との併用処置について指定され、ヒトマクロファージの存在下でMKN-45のような腫瘍細胞の強力な食作用を示す二重特異性抗体を提供する。

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【文献】国際公開第2012/117002号	
【文献】米国特許出願公開第2014/0242079号明細書	
【文献】国際公開第2017/118657号	
【文献】国際公開第2015/112534号	
【文献】国際公開第2016/116907号	
【文献】米国特許出願公開第2011/0064653号明細書	
【文献】国際公開第2000/041474号	10
【文献】国際公開第2007/042261号	
【文献】国際公開第2008/119565号	
【文献】国際公開第2008/119566号	
【文献】国際公開第2008/119567号	
【文献】国際公開第2010/037836号	
【文献】国際公開第2010/037837号	
【文献】国際公開第2010/037838号	
【文献】米国特許第8236308号明細書	
【文献】米国特許出願公開第2014/0140989号明細書	
【文献】国際公開第2017/196793号	20
【文献】国際公開第2014/087248号	
【文献】米国特許第6946292号明細書	
【文献】米国特許第7425446号明細書	
【文献】米国特許第8067232号明細書	
【文献】国際公開第1999/54342号	
【文献】米国特許出願公開第2003/0175884号明細書	
【文献】国際公開第2004/063351号	
【文献】国際公開第2004/099249号	
【文献】国際公開第2005/018669号	
【文献】国際公開第2005/063815号	30
【文献】国際公開第2005/110474号	
【文献】国際公開第2005/056759号	
【文献】国際公開第2005/092925号	
【文献】国際公開第2005/018572号	
【文献】国際公開第2006/019447号	
【文献】国際公開第2006/116260号	
【文献】国際公開第2006/023420号	
【文献】国際公開第2006/047350号	
【文献】国際公開第2006/085967号	
【文献】国際公開第2006/105338号	40
【文献】国際公開第2007/021841号	
【文献】国際公開第2007/008943号	
【文献】国際公開第2007/024249号	
【文献】国際公開第2007/041635号	
【文献】国際公開第2007/048077号	
【文献】国際公開第2007/044616号	
【文献】国際公開第2007/106707号	
【文献】国際公開第2008/022152号	
【文献】国際公開第2008/140603号	
【文献】国際公開第2008/036688号	50

【文献】国際公開第2008/091798号
【文献】国際公開第2008/091954号
【文献】国際公開第2008/092117号
【文献】国際公開第2008/098115号
【文献】国際公開第2008/121160号
【文献】国際公開第2008/150494号
【文献】国際公開第2010/033736号
【文献】国際公開第2014/113510号
【文献】国際公開第2017/055389号
【非特許文献】 10
【0016】
【文献】Hammarstrom S., *Semin Cancer Biol.* 9(2) : 67 - 81 (1999)
【文献】Gold and Freedman, *J Exp. Med.*, 121: 439 - 462, 1965
【文献】Berinstein N.L., *J Clin Oncol.*, 20: 2197 - 2207, 2002
【文献】Sandler B, *Anticancer Res* 1999, 19(5B), 4229 - 33
【文献】Hao C., Zhang G. and L. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (2019) 20
【文献】Richman P.I. and Bodmer W.F., *Int. J. Cancer*, 39: 317 - 328, 1987
【文献】Durbin H, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4313 - 4317, 1994
【文献】Stewart B, *Cancer Immunol Immunother*, 47 (1999) 299 - 06
【文献】Conaghan P.J, *Br. J. Cancer*, 98(2008) 1217 - 1225 30
【文献】Tabernero B, *J Clin Oncol* 35, 2017
【文献】Yang SJ, *The Journal of Immunology* (1986) 137; 1097 - 1100
【文献】Fred Hutchinson Cancer Research Institute; used in Phase I/II trials of GvHD, Anasetti B, *Transplantation* 54: 844 (1992)
【文献】Weiskopf K. *European Journal of Cancer* 76 (2017) 100 - 109
【文献】Huang Y, *J Thorac Dis* 2017; 9(2): E168 - E174 40
【文献】von Bommel PE, *Oncoimmunol.* 7(2018) e386361
【文献】Piccione EC, *mAbs* 7(2015) 946 - 956
【文献】Dheilly E, *Mol. Thera.* 25(2017) 523 - 533
【文献】L. Cassard, F. Joensson, S. Arnaud, M. Daeron, *J. Immunol.* 189(2012) (2995 - 3006)
【文献】Bruhns P., *Blood* 119(2012) 5640
【文献】Bruhns P. *Blood* 113(2009) 3716
【文献】Shields, R.L, (2002) *J Biol. Chem.* 277, 26733 - 26740.; (2002) *J Biol. Chem.* 8, 8 50

【文献】Okazaki, A、(2004) J Mol Biol. 336, 1239 - 1249

【文献】Wormald、Biochemistry 36:130 - 38 (1997)

【文献】Lund、J. Immunol. 157:4963 - 69 (1996)

【文献】Niwa R、Cancer Res, 64, 2127 - 33, 2004

【文献】Umana, P、Nature Biotechnol. 17:176 - 180 (1999)

【文献】Xu、Expert Review of Anticancer Therapy 2017, 17, 1099 - 1106

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0017】

一実施形態では、本発明は、ヒトCEACAM5（さらに「CEA」とも称される）に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47（さらに「CD47」とも称される）に特異的に結合する第2の結合部分とを含む二重特異性抗体（さらに「Mab CEA x CD47」または「CEA x CD47二重特異性抗体」とも称される）に関する。

【0018】

一実施形態では、本発明は、ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合する二重特異性抗体であって、Fc領域が、糖操作されていない以外は同じ二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように糖操作されていることを特徴とする二重特異性抗体に関する。

【0019】

一実施形態では、本発明は、第1の結合部分でヒトCEACAM5およびCEACAM6に特異的に結合し、第2の結合部分でヒトCD47に特異的に結合することを特徴とする二重特異性抗体を提供する。一実施形態では、本発明は、ヒトCEACAM5およびヒトCEACAM6に平衡して特異的に結合する二重特異性抗体CEA x CD47に関する。一実施形態では、二重特異性抗体は、ヒト組換えCEACAM5およびCEACAM6に結合することを特徴とし、CEACAM5およびCEACAM6への結合のEC50値が3倍未満異なることを特徴とする（平衡結合、平衡して結合、表5を参照のこと）。結合は、ストレプトアビジン/ビオチンベースのELISAで測定される（実施例8fを参照のこと）。

【0020】

一実施形態では、本発明は、第1の結合部分でヒトCEACAM5およびCEACAM6に特異的に結合し、第2の結合部分でヒトCD47に特異的に結合する二重特異性抗体であって、

a) 前記第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号112のCDRL1、配列番号113のCDRL2および配列番号114のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする二重特異性抗体を提供する。

【0021】

一実施形態では、本発明は、ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合する二重特異性抗体であって、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含み、前記第1の結合部分が、アミノ酸35～144のCEACAM5のIg様Vタイプドメインに結合することを特徴とする二重特異性抗体に関する。

【0022】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明は、ヒトC E A C A M 5およびヒトC D 4 7に特異的に結合する二重特異性抗体であって、ヒトC E A C A M 5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトC D 4 7に特異的に結合する第2の結合部分とを含み、C E A C A M 5への結合について、V KおよびV Hドメインとして配列番号1 0 0および1 0 1の配列のV KおよびV Hを含む抗C E A抗体S M 3 Eと競合することを特徴とする二重特異性抗体に関する。

【0023】

一実施形態では、本発明は、ヒトC E A C A M 5およびヒトC D 4 7に特異的に結合する二重特異性抗体であって、ヒトC E A C A M 5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトC D 4 7に特異的に結合する第2の結合部分とを含み、C E A C A M 5への結合について、抗C E A抗体S M 3 E、V LおよびV Hドメインとして配列番号1 0 2および1 0 3の配列のV LおよびV Hを含むM E D I、V KおよびV Hドメインとして配列番号1 1 0および1 1 1の配列のV KおよびV Hを含むラベツズマブ(L a b)、V KおよびV Hドメインとして配列番号1 0 4および1 0 5の配列のV KおよびV Hを含むS A R、V KおよびV Hドメインとして配列番号1 0 8および1 0 9の配列のV KおよびV Hを含むT 8 6 . 6 6、V KおよびV Hドメインとして配列番号1 0 6および1 0 7の配列のV KおよびV Hを含むC H 1 A 1 Aと競合しないことを特徴とする二重特異性抗体に関する。

【0024】

一実施形態では、本発明は、ヒトC E A C A M 5およびヒトC D 4 7に特異的に結合する二重特異性抗体であって、ヒトC E A C A M 5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトC D 4 7に特異的に結合する第2の結合部分とを含み、前記二重特異性抗体の食作用指数曲線のE C 5 0値が、同じ実験条件下および1 m g / m lヒトI g Gの存在下または1 m g / m lヒトI g Gなしの場合における参照抗体K 2 A C 2 2のE 5 0値の0 . 1 ~ 3倍の範囲内であることを特徴とする二重特異性抗体に関する。さらなる実施形態では、範囲は、0 . 2 ~ 3 . 0、0 . 3 ~ 3 . 0、0 . 5 ~ 2 . 5または1 . 0 ~ 2 . 5である。食作用のE C 5 0値は、食作用指数曲線のE C 5 0値として測定される(イメージングベースの食作用アッセイ、実施例9および図1 2および表3を参照のこと)。

【0025】

一実施形態では、本発明は、ヒトC E A C A M 5およびヒトC D 4 7に特異的に結合する二重特異性抗体であって、ヒトC E A C A M 5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトC D 4 7に特異的に結合する第2の結合部分とを含み、1 m g / m lヒトI g Gの存在下では、前記二重特異性抗体の最大食作用指数(実施例9 . 2を参照のこと; C e l l I n s i g h t (商標)ベースのアッセイ)が、ヒトI g Gが追加されない以外は同じ実験条件下で測定された前記最大食作用指数と比較して3 0 %またはそれを超えて減少しない(例えば、図1 7を参照のこと)ことを特徴とする二重特異性抗体に関する。

【0026】

一実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトC E A C A M 5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトC D 4 7に特異的に結合する第2の結合部分とを含むことを特徴とし、

a) 第1の結合部分が、配列番号1のC D R H 1、配列番号2のC D R H 2および配列番号3のC D R H 3を含む重鎖可変領域と、配列番号1 3のヒトラムダタイプの軽鎖定常ドメインとを含み、

第2の結合部分が、配列番号1のC D R H 1、配列番号2のC D R H 2および配列番号3のC D R H 3を含む重鎖可変領域と、配列番号7のC D R L 1、配列番号8に含まれるA l a A l a S e rのC D R L 2および配列番号9のC D R L 3を含む軽鎖可変領域とを含むか、または

b) 第1の結合部分が、C D Rとして配列番号2 5のC D R H 1、配列番号2 6のC D R H 2および配列番号2 7のC D R H 3を含む重鎖可変領域と、配列番号1 3のヒトラムダタイプの軽鎖定常ドメインとを含み、第2の結合部分が、C D Rとして配列番号2 5のC D R H 1、配列番号2 6のC D R H 2および配列番号2 7のC D R H 3を含む重鎖可変領域と、配列番号2 8のC D R L 1、配列番号2 9のC D R L 2および配列番号3 0のC D R L 3を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 7 】

一実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含むことを特徴とし、

a) 第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、

配列番号31、32および33；配列番号34、35および36、配列番号37、38および39、配列番号40、41および42、配列番号43、44および45、配列番号46、47および48、配列番号49、50および51、配列番号52、53および54、配列番号55、56および57、配列番号58、59および60、配列番号61、62および63、配列番号112、113および114からなる群より選択されるCDRL1、CDRL2およびCDRL3の組み合わせを含む軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする。

【 0 0 2 8 】

一実施形態では、二重特異性抗体は、第1の結合部分において、軽鎖定常ドメインとして配列番号13のヒトラムダタイプドメインを含むことを特徴とする。

【 0 0 2 9 】

一実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含むことを特徴とし、

a) 第1の結合部分が、配列番号4の重鎖可変領域(VH)と、

配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74および配列番号115からなるVLC L領域に含まれるVLの群より選択される軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 第2の結合部分が、配列番号4の重鎖可変領域と、配列番号10の軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする。

【 0 0 3 0 】

一実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含むことを特徴とし、

a) 第1の結合部分が、配列番号5の重鎖と、

配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74および配列番号115からなる群より選択される軽鎖とを含み、

b) 第2の結合部分が、配列番号5の重鎖可変領域と、配列番号11の軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする。

【 0 0 3 1 】

一実施形態では、二重特異性抗体は、第1の結合部分について一価であり、第2の結合部分について一価であることを特徴とする。

【 0 0 3 2 】

一実施形態では、定常および可変フレームワーク領域配列はヒトのものである。

【 0 0 3 3 】

一実施形態では、二重特異性抗体は、第1および第2の結合部分がそれぞれ、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含むことを特徴とする。一実施形態では、二重特異性抗体は、ヒトIgG1タイプのものであることを特徴とする。一実施形態では、二重特異性抗体は全長抗体である。

【 0 0 3 4 】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、CEAに特異的に結合する第1の結合部分であって、カップ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含む第1の結合部

10

20

30

40

50

分と、CD47に特異的に結合する第2の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む第2の結合部分とを含むことを特徴とする（二重特異性抗体、ボディ、タイプ1）。

【0035】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、CEAに特異的な第1の結合部分であって、ラムダ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含む第1の結合部分と、CD47に特異的な第2の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む第2の結合部分とを含むことを特徴とする（二重特異性抗体、ボディ、タイプ2）。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、完全ヒト二重特異性IgG（特に、IgG1）フォーマットのものであり、加えて、タイプ1またはタイプ2の二重特異性抗体である。

10

【0036】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、タイプ1またはタイプ2の二重特異性抗体であり、共通重鎖（cHC）を含むことを特徴とする。

【0037】

一実施形態では、二重特異性抗体は、100nM～600nMの結合親和性で、一実施形態では100nM～500nMの結合親和性でヒトCD47に結合することを特徴とする。

【0038】

一実施形態では、二重特異性抗体は、1～200nMのEC50値でMKN-45細胞に結合することを特徴とする。一実施形態では、二重特異性抗体は、1～50nMのEC50値でMKN-45細胞に結合することを特徴とする。一実施形態では、二重特異性抗体は、50～100nMのEC50値でMKN-45細胞に結合することを特徴とする。一実施形態では、二重特異性抗体は、100～200nMのEC50値でMKN-45細胞に結合することを特徴とする。

20

【0039】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、前記二重特異性抗体による、ヒトマクロファージの存在下におけるMKN-45細胞の食作用の達成可能な最大食作用指数が、5000ng/ml可溶性CEAの存在下では、可溶性CEAなしで測定された食作用指数と比較して20%超減少しないことを特徴とする。

30

【0040】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、前記二重特異性抗体による、ヒトマクロファージの存在下におけるMKN-45細胞の食作用指数曲線のEC50が、200ng/ml可溶性CEAの存在下では、可溶性CEAなしで測定されたEC50と比較して高い濃度の方向に4倍超シフトせず、および/または食作用指数曲線の最大が、200ng/ml sCEAの追加により10%もしくはそれを超えて、15%もしくはそれを超えてもしくは20%もしくはそれを超えて減少しないことを特徴とする（例えば、図20Bを参照のこと）。

【0041】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、MKN-45細胞への前記二重特異性抗体の結合曲線のEC50が、200ng/ml可溶性CEAの存在下では、可溶性CEAなしで測定されたEC50と比較して高い濃度の方向に2倍超シフトしないことを特徴とする（例えば、図20Aを参照のこと）。

40

【0042】

一実施形態では、二重特異性抗体は、それがヒトCEACAM1と交差反応しないことを特徴とする。

【0043】

一実施形態では、二重特異性抗体は、1～50nMのEC50値で、組換えCHO細胞CHO-K1（ATCC（登録商標）CCL-61（商標））上において発現されたヒトCEACAM6に結合することを特徴とする（CEACAM6陰性CHO細胞は、CEA

50

C A M 6 タンパク質を発現させるためにヒト C E A C A M 6 の c D N A を含有するベクターでトランスフェクトされる)。

【 0 0 4 4 】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合するモノクローナル抗体(さらに M A B C E A とも称される)であって、配列番号 2 0 の重鎖可変領域および配列番号 2 1 の軽鎖可変領域を含む 3 0 0 n M の濃度のモノクローナル抗体が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線の E C 5 0 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせないことを特徴とする。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、ヒト C E A C A M 5 および C D 3 に特異的に結合する二重特異性抗体(さらに C E A - T C B とも称される)であって、重鎖として配列番号 9 7 および 9 8 の重鎖と、軽鎖として配列番号 9 6 および 9 9 の軽鎖とを含む 3 0 0 n M の濃度の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線の E C 5 0 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせないことを特徴とする。このような場合、本発明の二重特異性抗体および C E A - T C B は「競合的ではない」として定義され、前記 C E A への結合を有意に妨害せずに C E A に同時に結合することができると考えられる。

10

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、ヒト C E A C A M 5 および C D 3 に特異的に結合する二重特異性抗体(さらに C E A - T C B 1 とも称される)であって、重鎖および軽鎖として配列番号 9 2 ~ 9 5 のアミノ酸配列の鎖を含む 3 0 n M の濃度の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線の E C 5 0 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせないことを特徴とする。このような場合、本発明の二重特異性抗体および C E A - T C B 1 は「競合的ではない」として定義され、前記 C E A への結合を有意に妨害せずに C E A に同時に結合できると考えられる。このような場合、本発明の二重特異性抗体ならびに M A B C E A 、 C E A - T C B および/または C E A - T C B 1 は「競合的ではない」として定義され、前記 C E A へのそれらの結合を有意に妨害せずに C E A に同時に結合できると考えられる。

20

【 0 0 4 6 】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、ヒト C E A C A M 5 および C D 3 に特異的に結合する二重特異性抗体(さらに C E A - T C B 1 とも称される)であって、重鎖および軽鎖として配列番号 9 2 ~ 9 5 のアミノ酸配列の鎖を含む 3 0 n M の濃度の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の食作用指数曲線の E C 5 0 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせないことを特徴とする。このような場合、本発明の二重特異性抗体および C E A - T C B 1 は「競合的ではない」として定義され、前記 C E A へのそれらの結合を有意に妨害せずに C E A に同時に結合できると考えられるので、治療レベルの両薬物が腫瘍組織中に同時に存在する場合であっても、影響を受けない食作用に対するその効果(C E A x C D 4 7)およびさらには影響を受けない T 細胞活性化に対するその効果(C E A x T C B 1)を生じさせ得る(図 1 8 を参照のこと)。

30

【 0 0 4 7 】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、ヒト C E A C A M 5 および C D 3 に特異的に結合する二重特異性抗体(さらに C E A - T C B とも称される)であって、重鎖および軽鎖として配列番号 9 6 ~ 9 9 のアミノ酸配列の鎖を含む 3 0 0 n M の濃度の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の食作用指数曲線の E C 5 0 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせないことを特徴とする。このような場合、本発明の二重特異性抗体および C E A - T C B は「競合的ではない」として定義され、前記 C E A へのそれらの結合を有意に妨害せずに C E A に同時に結合できると考えられるので、治療レベルの両薬物が腫瘍組織中に同時に存在する場合であっても、影響を受けない食作用に対するその効果(C E A x C D 4 7)およびさらには影響を受けない T 細胞活性化に対するその効果(C E A - T C B)を生じさせ得る(図 1 8 を

40

50

参照のこと)。これは、CEA-TCB/TCB1と本発明のCEA×CD47との併用処置を容易にする(図18を参照のこと)。

【0048】

配列番号88~99の配列は、米国特許出願公開第20140242079号または国際公開第2017055389号にしたがう。

【0049】

一実施形態では、CEA-TCBおよびCEA-TCB1のようなCEA×CD3二重特異性抗体と組み合わせた本発明のCEA×CD47二重特異性抗体は、例えば、MKN-45腫瘍細胞と、同じボランティアヒトドナー由来のヒトマクロファージおよびT細胞とを含有するアッセイにおいて、腫瘍細胞の少なくとも相加的なまたはさらには相乗的な%殺傷を示す(図19AおよびBを参照のこと)。

10

【0050】

一実施形態では、二重特異性抗体は、第1の結合部分の重鎖としておよび第2の結合部分の重鎖として共通重鎖(cHC)を含むことを特徴とする。一実施形態では、二重特異性抗体は、各結合部分の前記共通重鎖が、CDRとして配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3または配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含むことを特徴とする。一実施形態では、二重特異性抗体は、各結合部分の前記共通重鎖が、共通可変重ドメイン(cVH)として配列番号4を含むことを特徴とする。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、配列番号5、配列番号23および配列番号24からなる群より選択される共通重鎖(cHC)を含むことを特徴とする。一実施形態では、配列番号5の共通重鎖は、配列番号6に示されている核酸配列によりコードされる。

20

【0051】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、CD47に特異的な第2の結合部分として、CDRとして配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3を含む共通重鎖と、CDRとして配列番号7のCDRL1、配列番号8に含まれるAlaAlaSerのCDRL2および配列番号9のCDRL3を含む軽鎖(LC)とを含むか、またはCDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む共通重鎖と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖(LC)とを含むことを特徴とする。

30

【0052】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、第2の結合部分として、可変重ドメイン(cVH)として配列番号4を含む重鎖と、配列番号10の可変軽ドメイン(VL)とを含むことを特徴とする。

【0053】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、第2の結合部分として、配列番号5を含む重鎖(cHC)と、配列番号11の軽鎖(CL)とを含むことを特徴とする。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、第2の結合部分として、配列番号23を含む重鎖(cHC)と、配列番号11の軽鎖(CL)とを含むことを特徴とする。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、第2の結合部分として、配列番号24を含む重鎖(cHC)と、配列番号11の軽鎖(CL)とを含むことを特徴とする。一実施形態では、配列番号11の軽鎖(LC)は、配列番号12に示されている核酸配列によりコードされる。

40

【0054】

一実施形態では、二重特異性抗体は、CEAに特異的に結合し、配列番号13の軽鎖定常ドメインを含むことを特徴とする。

【0055】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、0.1~10nMのIC50で、MKN-45細胞上のCD47間の相互作用を阻害することを特徴とする。SIRP(SIRP、CD172a;UniProtKB P78324)は、200ng/mlの濃度

50

で使用される (His タグ付き可溶性 S I R P アルファ)。アッセイの詳細は実施例 8 (C D 4 7 抗体の S I R P 遮断活性) に記載されており、結果は表 2 に示されている。

【0056】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、10 nM 未満の二重特異性抗体の E C 5 0 におけるヒトマクロファージによる M K N - 4 5 細胞のような C E A 発現腫瘍細胞株の濃度依存的食作用 (A D C P) を特徴とする。A D C P は、通常は 1 : 3 の E : T 比で、イメージングによる食作用指数 (E C 5 0 または最大) として本発明にしたがって測定される (ヒトマクロファージ; 標的細胞 (腫瘍細胞); 例えば、図 1 2、1 5 および 1 6 を参照のこと)。図 3 B における結果は、1 : 1 の E : T を用いて得られたものである。アッセイの詳細は実施例 9 . 2 に記載されている。

10

【0057】

さらなる情報については、10 nM 未満の二重特異性抗体の E C 5 0 におけるヒトマクロファージによる M K N - 4 5 細胞のような C E A 発現腫瘍細胞株の食作用 (A D C P) 。A D C P はまた、例えば 3 : 1 の E : T 比で、フローサイトメトリーにより測定され得る (ヒトマクロファージ; 標的細胞 (腫瘍細胞); 例えば、図 3 A を参照のこと)。アッセイの詳細は実施例 9 (1 . フローサイトメトリーベースの A D C P アッセイ) に記載されている。

【0058】

一実施形態では、二重特異性抗体は、C E A C A M 5 に特異的に結合するが、M K N - 4 5 のような腫瘍細胞上の C E A C A M 5 への結合について、M A B C E A、C E A - T C B および / または C E A - T C B 1 と競合しないことを特徴とする。

20

【0059】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、M K N - 4 5 細胞への結合の E C 5 0 値 (1 ~ 2 0 0 nM の E C 5 0) が、3 0 0 nM の濃度の M A B C E A もしくは C E A - T C B の追加により、または 3 0 nM の濃度の C E A - T C B 1 の追加により 3 倍未満増加することを特徴とする (競合なし)。

【0060】

一実施形態では、本発明の C E A x C D 4 7 抗体は、B 6 H 1 2 . 2 を用いた同じアッセイ (実施例 1 5) で測定された E C 5 0 と比較して 1 0 0 倍またはそれよりも高い R B C 食作用の E C 5 0 を示す。

30

【0061】

一実施形態では、(アフコシル化の有無にかかわらず w t I g G 1 F c を保有する) 本発明の C E A x C D 4 7 抗体は、最大 2 0 0 μ g / m L の濃度で有意な血小板活性化を示さない (C E A x C D 4 7 二重特異性抗体 K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2 については、実施例 1 5 および実施例 1 5 で言及されている結果を参照のこと)。

【0062】

別の実施形態では、本発明は、改変オリゴ糖を有する F c 領域を有するように本発明の糖操作された二重特異性抗体に関する。驚くべきことに、このような本発明の糖操作された二重特異性抗体は、同じ実験条件下で測定された場合に、糖操作されていない同じ (親) 二重特異性抗体よりも、イメージングベースのアッセイにより測定された食作用指数曲線の少なくとも 3 倍低い E C 5 0 値を特徴とすることが見出された。一実施形態では、食作用指数の E C 5 0 は、5 ~ 1 0 倍低いかまたは 1 0 ~ 3 0 倍低い)。一実施形態では、F c 領域は、糖操作されていない以外は同じ二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように改変されている。別の実施形態では、F c 領域は、糖操作されていない二重特異性抗体と比較して増加した割合の二分岐型オリゴ糖を有する。さらに別の実施形態では、二分岐型オリゴ糖は、主に二分岐型複合体である。別の実施形態では、本発明の糖操作された抗原結合分子は、糖操作されていない二重特異性抗体と比較して増加した割合の前記二重特異性抗体の F c 領域中の二分岐型非フコシル化型オリゴ糖を有する。あるいは、本発明の二重特異性抗体は、糖操作されていない二重特異性抗体と比較して増加した F c 領域中の G I c N A c 残基対フコース残基比を有し得る。一実施形態では、

40

50

二分岐型非フコシル化型オリゴ糖は、主にハイブリッド形態である。あるいは、二分岐型非フコシル化型オリゴ糖は、主に複合体タイプである。

【0063】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、Fc領域中のN結合型オリゴ糖の50%～100%が非フコシル化型であることを特徴とする。

【0064】

一実施形態では、二重特異性抗体は、Fc領域中のN結合型オリゴ糖の50%～100%が二分岐型であることを特徴とする。

【0065】

一実施形態では、二重特異性抗体は、Fc領域中のN結合型オリゴ糖の80%～100%が二分岐型および非フコシル化型であることを特徴とする。

10

【0066】

一実施形態では、二重特異性抗体は、前記糖操作された抗体により誘導された濃度/ADCC曲線(ADCCのEC50の減少または最大の増加(図13および14を参照のこと)が、糖操作されていない以外は同じ二重特異性抗体により誘導されたADCCと比較して少なくとも1.2倍増加していることを特徴とする。一実施形態では、ADCCは、1.2～2.0倍増加している。

【0067】

一実施形態では、二重特異性抗体は、同じ実験条件下で測定された場合に、糖操作されていない以外は同じ(親)二重特異性抗体と比較して、イメージングベースのアッセイにより測定された食作用指数曲線の少なくとも3倍低いEC50値を特徴とする。一実施形態では、食作用指数のEC50は、5～10倍低いまたは10～30倍低い。

20

【0068】

一実施形態では、二重特異性抗体は、前記糖操作された抗体により誘導されてフローサイトメトリーにより測定された最大食作用指数が、糖操作されていない以外は同じ二重特異性抗体により誘導された最大食作用指数と比較して少なくとも1.2倍増加していることを特徴とする。一実施形態では、最大食作用指数は、1.2～2.0倍増加している。

【0069】

一実施形態では、二重特異性抗体は、前記糖操作された抗体により誘導されてイメージングにより測定された最大食作用指数が、糖操作されていない以外は同じ二重特異性抗体により誘導された最大食作用指数と比較して少なくとも1.2倍増加していることを特徴とする。一実施形態では、最大食作用指数は、1.2～2.0倍増加している。

30

【0070】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、一置換S239D、I332E、G236A、二置換I332EおよびG236A、S239DおよびI332E、S239DおよびG236Aならびに三置換S329DおよびI332EおよびG236Aからなる群より選択されるFc領域中の1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換(「Fcアミノ酸置換」)を含むことを特徴とする。

【0071】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、一置換S239D、I332E、G236A、二置換I332EおよびG236A、S239DおよびI332E、S239DおよびG236Aならびに三置換S329DおよびI332EおよびG236Aからなる群より選択されるFc領域中の1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換と、糖操作されていない以外は同じ二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように糖操作されたFc領域とを含むことを特徴とする。

40

【0072】

一実施形態では、Fc領域中の前記置換を含む二重特異性抗体は、前記アミノ酸置換抗体により誘導された濃度/ADCC曲線(ADCCのEC50の減少または最大の増加が、Fc領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない前記抗体により誘導されたADCCと比較して少なくとも1.2倍増加していることを特徴とする。一実施形態では、ADC

50

Cは、1.2～2.0倍増加している。

【0073】

一実施形態では、Fc領域中の前記置換を含む二重特異性抗体は、同じ実験条件下で測定された場合に、Fc領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない同じ(親)二重特異性抗体と比較して、イメージングベースのアッセイにより測定された食作用指数曲線の少なくとも3倍低いEC50値を特徴とする。一実施形態では、食作用指数のEC50は、5～10倍低いかまたは10～30倍低い。

【0074】

一実施形態では、Fc領域中の前記置換を含む二重特異性抗体は、前記アミノ酸置換抗体により誘導されてフローサイトメトリーにより決定された最大食作用(ADCP)が、Fc領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない前記抗体により誘導されたADCPと比較して少なくとも1.2倍増加していることを特徴とする。一実施形態では、ADCPは、1.2～2.0倍増加している。一実施形態では、Fc領域中の前記置換を含む二重特異性抗体は、前記アミノ酸置換抗体により誘導されてイメージングにより決定された最大食作用指数が、Fc領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない前記抗体により誘導されたADCPと比較して少なくとも1.2倍増加していることを特徴とする。一実施形態では、ADCPは、1.2～2.0倍増加している。

【0075】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、Fc領域中のN結合型オリゴ糖の50%～100%、60%～100%、70%～100%または80%～100%が非フコシル化型であることを特徴とする。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、Fc領域中のN結合型オリゴ糖の50%～100%、60%～100%、70%～100%または80%～100%が二分岐型であることを特徴とする。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、Fc領域中のN結合型オリゴ糖の50%～100%、60%～100%、70%～100%または80%～100%が二分岐型非フコシル化型であることを特徴とする。

【0076】

一実施形態では、糖操作された二重特異性抗体は、共通重鎖として配列番号5を含む糖操作されていない二重特異性抗体(以下で定義される標準的な条件でCHO-K1細胞株CHO-K1(ATCC(登録商標)CCL-61(商標))で産生された親二重特異性抗体)と比較して増加したエフェクター機能を含む。

【0077】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、前記糖操作された二重特異性抗体が、1つまたはそれを超える増加したエフェクター機能、例えばFcγRへの増加した結合親和性、マクロファージの増加した結合(増加した抗体依存性細胞食作用; ADCP)、NK細胞の増加した結合(増加した抗体媒介性細胞傷害; ADCC)、および単球への増加した結合からなる群より選択されるものを含むことを特徴とする。

【0078】

抗CD47モノクローナル抗体hu5F9-G4について測定された濃度/食作用指数曲線(2014年から臨床試験で試験、例えばclinical.govを参照のこと)は、1mg/mLの生理学的濃度で追加されたhuIgGをアッセイに追加することにより大きく減少する(イメージングベースのアッセイで測定された食作用曲線のEC50の増加および最大の減少、例えば図17を参照のこと)。

【0079】

驚くべきことに、本発明のCEA×CD47抗体は、EC50の3倍未満のわずかなシフトのみを示し、ヒトIgGが追加された場合に、濃度/食作用指数曲線の最大の有意な減少を示さない(表4を参照のこと)。

【0080】

一実施形態では、本発明のCEA×CD47抗体は、イメージングベースの食作用アッセイへの1mg/mLのhuIgGの追加が、濃度/食作用指数曲線の最大の0.9倍未満の減少および/またはより高い濃度の方向へのEC50の3倍未満のシフトを引き起

10

20

30

40

50

こすことを特徴とする（表 4 を参照のこと）。

【 0 0 8 1 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体をコードすることを特徴とする単離されたポリヌクレオチドである。

【 0 0 8 2 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクターである。

【 0 0 8 3 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞である。

【 0 0 8 4 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体の生産のための方法であって、

a) 本発明の前記抗体の生産を可能にする条件下で、前記二重特異性抗体をコードする発現ベクターを含む宿主細胞を培養すること、および

b) C E A および C D 4 7 に特異的に結合することができる前記抗体を単離することを含むことを特徴とする方法である。

【 0 0 8 5 】

一実施形態では、本発明は、宿主細胞において本発明の糖操作された二重特異性抗体を生産するための方法であって、

a) 本発明の前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件であって、前記二重特異性抗体の F c 領域上に存在するオリゴ糖の改変を可能にする条件下で、(1 , 4) - N - アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I 活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの核酸を発現するように糖操作された宿主細胞を培養すること；および

b) C E A および C D 4 7 に特異的に結合することができる前記糖操作された二重特異性抗体を単離すること

を含む方法を含むことを特徴とする。

【 0 0 8 6 】

一実施形態では、本発明は、宿主細胞において糖操作された二重特異性抗体を生産するための方法であって、

a) 本発明の前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件であって、前記二重特異性抗体の F c 領域上に存在するオリゴ糖の改変を可能にする条件下で、F U T 8 遺伝子の標的破壊により糖操作された宿主細胞を培養すること、および

b) C E A および C D 4 7 に特異的に結合することができる前記糖操作された二重特異性抗体を単離すること

を含む方法を含むことを特徴とする。

【 0 0 8 7 】

一実施形態では、本発明は、宿主細胞において本発明の F c 置換二重特異性抗体を生産するための方法であって、

a) 前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件下で、本発明の F c 置換二重特異性抗体をコードする発現ベクターを含む宿主細胞を培養すること、および

b) C E A および C D 4 7 に特異的に結合することができる前記 F c 置換二重特異性抗体を単離すること

を含む方法を含むことを特徴とする。

【 0 0 8 8 】

本発明のさらなる実施形態は、腫瘍細胞の細胞溶解を誘導する方法であって、前記腫瘍細胞を本発明の二重特異性抗体と接触させることを含む方法である。腫瘍細胞は、好ましくは患者中のヒト腫瘍細胞である。

【 0 0 8 9 】

本発明のさらなる実施形態は、腫瘍細胞が、結腸直腸癌細胞、N S C L C (非小細胞肺癌) 細胞、胃癌細胞、膵臓癌細胞、乳癌細胞、または C E A を発現する別の腫瘍細胞であることを特徴とする本発明の方法である。

【 0 0 9 0 】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に治療有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含む方法である。

【0091】

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体の生存期間を増加させる方法であって、前記被験体に治療有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含む方法である。

【0092】

本発明のさらなる実施形態は、前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(N S C L C)、胃癌、膵臓癌または乳房であることを特徴とする本発明の方法である。

10

【0093】

本発明のさらなる実施形態は、化学療法または放射線療法と組み合わせて本発明の二重特異性抗体をヒト被験体に投与することを特徴とする本発明の方法である。

【0094】

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に治療有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含み、前記二重特異性抗体の食作用のE C 5 0値が、同じ実験条件下ならびに1 m g / m l ヒトI g Gの存在下および/または1 m g / m l ヒトI g Gなしの場合における参照抗体K 2 A C 2 2のE 5 0値の0 . 1 ~ 3 倍の範囲内であることを特徴とする方法である。さらなる実施形態では、範囲は、0 . 2 ~ 3 . 0、0 . 3 ~ 3 . 0、0 . 5 ~ 2 . 5または1 . 0 ~ 2 . 5である。一実施形態では、二重特異性抗体は、1 0 0 n M ~ 6 0 0 n Mの結合親和性で、一実施形態では1 0 0 n M ~ 5 0 0 n Mの結合親和性でヒトC D 4 7に結合することを特徴とする。

20

【0095】

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体を処置する方法における本発明の二重特異性抗体の使用であって、前記方法が、前記被験体に治療有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含み、前記二重特異性抗体の食作用のE C 5 0値が、同じ実験条件下ならびに1 m g / m l ヒトI g Gの存在下および/または1 m g / m l ヒトI g Gなしの場合における参照抗体K 2 A C 2 2のE 5 0値の0 . 1 ~ 3 倍の範囲内であることを特徴とする使用である。さらなる実施形態では、範囲は、0 . 2 ~ 3 . 0、0 . 3 ~ 3 . 0、0 . 5 ~ 2 . 5または1 . 0 ~ 2 . 5である。一実施形態では、二重特異性抗体は、1 0 0 n M ~ 6 0 0 n Mの結合親和性で、一実施形態では1 0 0 n M ~ 5 0 0 n Mの結合親和性でヒトC D 4 7に結合することを特徴とする。

30

【0096】

図13 ~ 17から分かるように、本発明の抗体のA D C CおよびA D C P / 食作用指数値は、1 m g / m l の濃度のヒトI g G (1 m g / m l またはさらにはそれよりも高いヒトI g Gがほとんどの患者に存在する) により影響を受けないか、または少ない程度に影響を受けるにすぎないのに対して、技術水準の抗C D 4 7抗体(h u 5 F 9 - G 4) については、A D C CおよびA D C P値は、1 m g / m l のヒトI g Gの存在下で大きく減少する。

40

【0097】

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体を処置するための医薬の製造における本発明の二重特異性抗体の使用である。

【0098】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の医薬の製造における本発明の二重特異性抗体の使用であって、癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(N S C L C)、胃癌、膵臓癌および乳癌からなる群より選択されることを特徴とする使用である。

【0099】

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトC E A C A M 5に特異的に結合する第3の結合部分と、ヒトC D 3 に特異的に結合す

50

る第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体である。本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体である。

【0100】

本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、CEA-TCBおよび/またはCEA/TCB1と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体である。

10

【0101】

本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体である。本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、前記第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体であって、前記第2の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とする本発明の二重特異性抗体である。

20

【0102】

本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体であって、前記CEA-TCBまたはCEA-TCB1と競合しないことを特徴とする本発明の二重特異性抗体である。

【0103】

本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体であって、前記CEA-TCBまたはCEA-TCB1と競合することを特徴とする本発明の二重特異性抗体である。

30

【0104】

本発明のさらなる実施形態は、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号88の重鎖可変領域および配列番号89の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、ヒトCD3に特異的に結合する第4の結合部分であって、配列番号90の重鎖可変領域および配列番号91の軽鎖可変領域を含む第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の二重特異性抗体である。

【0105】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体および第2の二重特異性抗体が、6~15日間隔で前記被験体に交互に投与されることを特徴とする、本発明の使用のための本発明の二重特異性抗体である。

40

【0106】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体および第2の二重特異性抗体が、6~15日間隔で前記被験体に同時に投与されることを特徴とする、本発明の使用のための本発明の二重特異性抗体である。

【0107】

本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2

50

の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含む本発明の第1の二重特異性抗体であって、300nMの濃度の前記第2の二重特異性抗体が、MKN-45細胞への本発明の二重特異性抗体の食作用指数曲線のEC50を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない本発明の第1の二重特異性抗体である。

【0108】

本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号88の重鎖可変領域および配列番号89の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、ヒトCD3に特異的に結合する第4の結合部分であって、配列番号90の重鎖可変領域および配列番号91の軽鎖可変領域を含む第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含む本発明の第1の二重特異性抗体であって、30nMの濃度の前記第2の二重特異性抗体が、MKN-45細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線のEC50を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない本発明の第1の二重特異性抗体である。

10

【0109】

本発明のさらなる実施形態は、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための本発明の第1の二重特異性抗体であって、300nMの濃度の前記CEA-TCBまたは30nMの濃度のCEA-TCB1が、MKN-45細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線のEC50を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない本発明の第1の二重特異性抗体である。

20

【0110】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の使用のための、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、本発明のヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含む本発明の第1の二重特異性抗体であって、前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌、膵臓癌および乳癌であることを特徴とする本発明の第1の二重特異性抗体である。

30

【0111】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体を含む組成物であって、上記で定義される前記第2の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とし、前記組成物が、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において使用するためのものである組成物である。

【0112】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体を含む組成物であって、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とし、前記組成物が、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において使用するためのものである組成物である。

40

【0113】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体を含む組成物であって、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号88の重鎖可変領域および配列番号89の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、ヒトCD3に特異的に結合する第4の結合部分であって、配列番号90の重鎖可変領域および配列番号91の軽鎖可変領域を含む第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とし、前記組成物が、CEAを発現する癌を有する被験体の処置において使用するためのものである組成物である。本発明のさらなる実施形態は、本発明の二重特異性抗体を含む組成物であって、CEA-TCBおよび/またはCEA-TCB1と競合しないことを特徴

50

とする組成物である。

【0114】

本発明のさらなる実施形態は、腫瘍（癌）、特に固形腫瘍、特にCEAを発現する固形癌、特に結腸直腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌および乳癌と診断されたヒト患者の処置のための方法であって、有効量の本発明の二重特異性抗体と、CEAおよびCD3に対する上記第2の二重特異性抗体（一実施形態では、CEA-TCBまたはCEA-TCB1）とを前記ヒト患者に投与することを含み、続いて、

前記患者に0.1~10mg/kg、さらなる実施形態では0.5~10mg/kg、さらなる実施形態では1~2mg/kgの用量の前記第2の抗CEA×CD3抗体を例えば4~12週間にわたって毎週投与すること、

前記患者に前記第2の抗体を1週間に1回（q1）、2週間に1回（q2w）、3週間に1回（q3w）または必要に応じて4週間に1回（q4w）投与すること、

これらの4~12週間後に、および前記抗CEA×CD3抗体のさらに2または3または4消失半減期後に、前記患者に0.1~20mg/kgの用量の本発明の抗体を投与すること、

前記患者に本発明の前記抗体を1週間に1回（q1）、2週間に1回（q2w）、3週間に1回（q3w）または必要に応じて4週間に1回（q4w）投与すること、本発明の前記抗体の2または3または4消失半減期待機すること、および必要に応じて、CEA×CD3二重特異性抗体投与とそれに続くCEA×CD47二重特異性抗体投与の前記サイクルを反復し、必要に応じてそのサイクルを再び反復することを含む方法である。

【0115】

この「交互」方法は、本発明の抗体および第2の二重特異性抗体が競合的である場合に適用される。

【0116】

本発明の前記CEA×CD3二重特異性抗体およびCEA×CD47二重特異性抗体が競合的ではない場合、2つの二重特異性抗体はまた、患者が、並行して両二重特異性抗体の治療的に有効な血漿および組織濃度を経験する方法（「同時方法」）で投与され得、例えば、患者にほぼ同じ時間に0.1~10mg/kg、さらなる実施形態では0.5~10mg/kg、さらなる実施形態では1~2mg/kgの用量のCEA×CD3二重特異性抗体および1~20mg/kgの本発明のCEA×CD47二重特異性抗体を投与し、続いて、1週間に1回（q1w）または2週間に1回（q2w）または3週間に1回（q3w）または必要に応じて4週間に1回（q4w）の頻度でこれらの組み合わせ投与を1回またはそれを超えて行う。

【0117】

「q1w」という用語は、1週間に1回の投与を意味し；q2wは、2週間ごとの投与を意味する、など。

【0118】

本発明のさらなる実施形態は、本発明の抗体と、薬学的に許容され得る賦形剤または担体とを含む医薬組成物である。

【0119】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬として使用するための、本発明の抗体を含む医薬組成物である。

【0120】

本発明のさらに好ましい実施形態は、固形腫瘍障害の処置における医薬として使用するための、本発明の抗体を含む医薬組成物である。

【0121】

本発明のさらに好ましい実施形態は、結腸直腸癌、NSCLC（非小細胞肺癌）、胃癌、膵臓癌または乳癌の処置における医薬として使用するための、本発明の抗体を含む医薬組成物である。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 2 】

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトC E A C A M 5 に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトC D 3 のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、本発明の二重特異性抗体を含む組成物であって、300 n Mの濃度の前記第2の二重特異性抗体が、M K N - 4 5細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線のE C 5 0を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない組成物である。

【 0 1 2 3 】

本発明のさらなる実施形態は、C E Aを発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトC E A C A M 5 に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号88の重鎖可変領域および配列番号89の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、ヒトC D 3 に特異的に結合する第4の結合部分であって、配列番号90の重鎖可変領域および配列番号91の軽鎖可変領域を含む第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、本発明の二重特異性抗体を含む組成物であって、30 n Mの濃度の前記第2の二重特異性抗体が、M K N - 4 5細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線のE C 5 0をより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない組成物である。

【 0 1 2 4 】

本発明のさらなる実施形態は、癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(N S C L C)、胃癌、膵臓癌または乳癌であることを特徴とする本発明の組成物である。

【 0 1 2 5 】

本発明のさらなる実施形態は、医薬組成物の製造のための本発明の抗体の使用である。

【 0 1 2 6 】

本発明のさらなる実施形態は、医薬組成物の製造のための、本発明の抗体と、薬学的に許容され得る賦形剤または担体との使用である。

【 0 1 2 7 】

本発明のさらなる実施形態は、固形腫瘍障害の処置における医薬の製造のための本発明の抗体の使用である。

【 0 1 2 8 】

本発明のさらなる実施形態は、結腸直腸癌、N S C L C (非小細胞肺癌)、胃癌、膵臓癌または乳癌の処置における本発明の抗体の使用である。

【 0 1 2 9 】

本発明の別の態様は、腫瘍細胞の細胞溶解を誘導する方法であって、前記腫瘍細胞を、上記実施形態のいずれかの二重特異性抗体と接触させることを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、結腸直腸癌細胞、N S C L C (非小細胞肺癌)、胃癌細胞、膵臓癌細胞または乳癌細胞である。

【 0 1 3 0 】

一実施形態では、細胞溶解は、二重特異性抗体の抗体依存性細胞食作用および/または抗体依存性細胞傷害により誘導される。

【 0 1 3 1 】

本発明の別の態様は、C E Aを異常発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に治療有効量の上記実施形態のいずれかの二重特異性抗体を投与することを含む方法を提供する。

【 0 1 3 2 】

本発明の別の態様は、C E Aを異常発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に、ヒトC E AおよびヒトC D 3 に結合する二重特異性抗体と組み合わせて治療有効量の上記実施形態のいずれかの二重特異性抗体を投与することを含む方法を提供する。C E A x C D 4 7抗体およびC E A x C D 3抗体が競合的である場合、それらは、腫瘍細胞の表面上のC E A受容体について競合し、各組み合わせパートナーの受容体の占

10

20

30

40

50

有率および有効性は、それらの結合親和性およびそれらの血漿濃度に依存するので予測困難であり、さらには、2つの薬物の濃度が異なる消失半減期または体からのクリアランスを有する場合には経時的に変化する。したがって、競合的CEA×CD3およびCEA×CD47二重特異性抗体を逐次に（交互に）与えるべきである。CEA×CD3およびCEA×CD47二重特異性抗体が競合的ではないかまたは最小限に競合的であるにすぎない場合、それらを逐次にだけでなく並行して（同時に）も与え得るが、これは、CEA×CD3二重特異性抗体によるT細胞の係合を介した、およびそれと同時にCEA×CD47二重特異性抗体によるマクロファージの係合を介した腫瘍細胞殺傷が相加的であるか、または相乗的でさえあり得るので、非常に有益であり得、これは、両薬物を並行して与えると有効性が増加することを意味する。

10

【0133】

本発明の別の態様は、CEAを異常発現する癌を有する被験体の無進行生存および/または全生存期間を増加させる方法であって、前記被験体に治療有効量の上記実施形態のいずれかの二重特異性抗体を投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、癌は、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌または乳癌、またはCEAを発現する別の癌である。

【0134】

これらの方法の特定の実施形態では、二重特異性抗体は、化学療法または放射線療法と組み合わせて投与される。一実施形態では、被験体は、結腸直腸癌または肺癌または胃癌または膵臓癌または乳癌、またはCEAを発現する別の癌を患っている患者である。

20

【0135】

本発明の別の態様は、CEAを異常発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に、ヒトCEAおよびヒトCD3イプシロンに対する二重特異性抗体と組み合わせて治療有効量の上記実施形態のいずれかの二重特異性抗体を投与することを含む方法を提供する。

【0136】

本発明の別の態様は、CEAを異常発現する癌を有する被験体の無進行生存期間および/または全生存期間を増加させる方法であって、前記被験体に治療有効量の上記実施形態のいずれかの二重特異性抗体を投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、癌は、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌または乳癌である。

30

【0137】

これらの方法の特定の実施形態では、二重特異性抗体は、化学療法または放射線療法と組み合わせて投与される。一実施形態では、被験体は、結腸直腸癌または肺癌または胃癌または膵臓癌または乳癌、またはCEAを発現する別の癌を有する癌患者である。

【0138】

本発明の別の実施形態は、上記処置方法のいずれかのための本発明の二重特異性抗体の使用を提供する。一実施形態では、癌は、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌および乳癌からなる群より選択される。

【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1】図1は、本発明のCEA×CD47二重特異性抗体の一般的な分子フォーマットを示す；完全ヒトIgG1構造はIgGモノクローナル抗体と区別不可能であり、免疫原性および抗薬物抗体ADA形成を最小化するためのaa架橋を有しない；共通重鎖（配列表を参照のこと）；CD47結合部分におけるカップ軽鎖（CLおよびVL）（配列表を参照のこと）；CEA結合部分におけるラムダCL（配列表を参照のこと）およびCEA結合部分におけるラムダまたはカップVL（A）；ADCPおよびADCCを増加させるためのFcの糖操作（低フコース）またはaa突然変異またはその両方（B）。

40

【0140】

【図2】図2は、表面上にTAAおよびCD47を保有する腫瘍細胞へのTAA×CD47二重特異性抗体の結合を示す。1~50nMのEC50によるTAA×CD47の結合

50

(実線。本発明の様々なCEA×CD47抗体の結合曲線については、図11も参照のこと)；破線は、例えば、可溶性CEAによる結合曲線の例示的かつ概略的な潜在的シフトを示す。具体的なデータについては、例えば、MKN-45細胞へのK2AC5および22のような本発明のCEA×CD47二重特異性抗体の結合曲線に対する200ng/mL可溶性CEAの影響を示す図20Aを参照のこと。

【0141】

【図3A】図3Aは、本発明のCD47結合アームを保有するTAA×CD47二重特異性抗体、対応するCD47およびTAA一価抗体、ならびに高親和性抗TAA(MSLN)モノクローナル抗体アマツキシマブを用いた、(CEAおよびメソセリンMSLNのような他のTAAを発現する)ヒト膵臓癌細胞株HPACの(フローサイトメトリーにより評価して食作用の%として表した)食作用の濃度依存的増加を示す。すべての抗体は、野生型IgG1Fc部分を有する。二重特異性抗体は、最も高い食作用を示す。

10

【0142】

【図3B】図3Bは、様々な抗体により誘導された(CellInsightアッセイにより評価して食作用指数として表した)食作用の濃度依存的増加を示す；曲線1：TAAまたはCD47に結合しない対照hIgG1；曲線2：野生型hIgG1Fcを有するTAA×CD47二重特異性抗体；曲線3：野生型hIgG1を有する抗CD47抗体B6H12.2；曲線4：hIgG1Fc部分にDEAaa置換(S329D、I332EおよびG236A)を有するTAA×CD47二重特異性抗体。最も強い食作用は、DEA突然変異Fcを有するTAA×CD47で達成された。

20

【0143】

【図4】図4は、標的細胞として肺癌NCI-H226癌細胞を使用して、すべてが同じ本発明のCD47結合アームを保有する様々なTAA×CD47二重特異性抗体(TAAはメソセリンMSLN)の(Cr51⁺アッセイを用いて評価して%特異的殺傷として表した)ADCC用量反応曲線の例を示す(huボランティアPBMC対腫瘍細胞は50:1)。すべての二重特異性抗体は、高親和性抗TAAモノクローナル抗体アマツキシマブ、抗MSLN mAbよりも強いADCCを示す。

【0144】

【図5】図5は、標的細胞として肺癌NCI-H226癌細胞を使用して、野生型Fcを有するTAA×CD47二重特異性抗体、DEA突然変異を保有するFcを有する対応するTAA×CD47二重特異性抗体、高親和性抗TAAモノクローナル抗体(この図のTAAはCEAではない)、およびヒトIgG1対照抗体の(Cr51⁺アッセイを使用して評価して%特異的殺傷として表した)ADCC用量反応曲線を示す(エフェクター対腫瘍細胞は50:1)。最も強いADCCは、DEA突然変異を保有する二重特異性抗体で観察された。

30

【0145】

【図6】図6は、TAA×CD47二重特異性抗体(実線)および対応する抗CD47一価抗体(破線)による、CEA(TAA)を共発現するMKN-45細胞上において発現されたCD47への可溶性SIRPアルファ結合の濃度依存的遮断を示す。二重特異性抗体のより高い遮断効力は、標的細胞へのより強力な結合およびCD47のTAA共係合依存的遮断によるものである。

40

【0146】

【図7A】図7Aは、200μg/mL以下の抗体と共にインキュベートしたヒト全血中のサイトカインIFNおよびTNFの放出を示す：陰性対照としてのErbitux、陽性対照としての抗CD52抗体Campath、および異なるFc領域以外は同一の抗原結合領域を有する3つの二重特異性抗体(左から右へ)：野生型ヒトIgG1Fc、DEA突然変異(S329DおよびI332E)を有するIgG1Fc、DE突然変異を有するIgG1Fc。biAbCD471oおよびCD471oは、同じCD47×TAA二重特異性抗体を指す。DEA突然変異を保有する二重特異性抗体で観察されたIFNおよびTNF放出は、野生型Fcを有する二重特異性抗体のものよりも高く

50

ない。

【0147】

【図7B】図7Bは、200 μg/mL以下の抗体と共にインキュベートしたヒト全血中のサイトカインIL-6およびIL-8の放出を示す：陰性対照としてのErbitu x、陽性対照としての抗CD52抗体Campath、および異なるFc領域以外は同一の抗原結合領域を有する3つの二重特異性抗体（左から右へ）：野生型ヒトIgG1 Fc、DEA突然変異を有するIgG1 Fc、DE突然変異を有するIgG1 Fc。biAb CD47LoおよびCD47Loは、同じCD47xTAA二重特異性抗体を指す。DEまたはDEA突然変異を保有する二重特異性抗体で観察されたIL-6およびIL-8放出は、野生型Fcを有する二重特異性抗体のものよりも高くない。

10

【0148】

【図8】図8は、様々な抗体により誘導されるモノクローナル抗CD47抗体の主な「抗原シンク」である赤血球(RBC)(細胞表面上において20'000~25'000個のCD47分子を発現するあらゆるRBC)の濃度依存的食作用を示す：野生型Fcを有する抗CD47 huIgG1抗体B6H12.12、野生型Fcを有するCD47xTAA二重特異性抗体、およびDEA突然変異を保有するFcを有する同じCD47xTAA二重特異性抗体。B6H12は、10~100 ng/mL(約0.07~0.7 nM)の濃度でRBC食作用を示すが、野生型huIgG1 Fcを有するTAAxCD47二重特異性抗体は、最大200000 ng/mL(約1350 nM)の濃度でRBC食作用を示さない；DEA突然変異を保有するFc部分を有する以外は同じ二重特異性抗体は、1000 ng/mL(約7 nM)を超える濃度で、野生型Fcと比較して増加したRBCの食作用を示し、これは依然として、抗CD47 huIgG1抗体B6H12のものよりも2~2.5 log高い。

20

【0149】

【図9】図9は、対照hIgG1抗体またはTAAxCD47二重特異性抗体(最初の2週間については30 mg/kg、および最後の2週間については100 mg/kg)のいずれかの静脈内注入を週4回受けた非ヒト霊長類(NHP；カニクイザル)における赤血球数および血小板数を示す。高い曝露にもかかわらず、TAAxCD47二重特異性抗体では、血液学的な数の有意な減少は観察されなかった(30 mg/kgにおける2回目の投与終了時のTAAxCD47二重特異性抗体血漿濃度は約500 nMであった)。

30

【0150】

【図10】図10は、異なる濃度(0~200 μg/mL)の示されている抗体とのヒト全血のインキュベーションにより誘導された(フローサイトメトリーにより評価して%CD62P発現として表した)インビトロ血小板活性化を示す。2 μg/mLおよびそれよりも高い場合に血小板活性化を誘導するB6H12-hIgG1とは対照的に、野生型IgG1 Fcを有するTAAxCD47二重特異性抗体は、最も高い試験濃度(200 μg/mL)であっても血小板活性化を誘導しない。CEAxCD47二重特異性抗体K2AC5およびK2AC22も試験したところ、wt IgG1 Fcを有するバージョンおよびアフコシル化バージョンは、20 μg/mLまで有意な血小板活性化を示さなかった(実施例15を参照のこと)。

40

【0151】

【図11】図11AおよびBは、対応する抗CD47一価抗体と比較した、本発明のCD47xCEA二重特異性抗体の濃度依存的結合を示す。CD47およびCEAを発現する標的細胞(MKN-45)への結合をFACSにより評価した。図11Aは、ピン1に分類された抗体を示し、MKN-45細胞への結合は、SM3E抗体により80%超阻害された；図11Bは、ピン2に分類された抗体を示し、MKN-45細胞への結合は、抗CEA抗体SM3E、MED1、T84.66、SAR、LabおよびCH1A1Aにより阻害されなかった(20%未満)。

【0152】

【図12】図12は、対応する抗CD47一価抗体と比較した、異なる濃度の異なるCD

50

47 × C E A 二重特異性抗体 (K 2 A C 5、K 2 A C 2 2、K 2 A C 2 3、K 2 A C 2 5、K 2 A C 2 6、K 2 A C 2 7、K 2 A C 2 8 および K 2 A C 2 9) により誘導された M K N - 4 5 細胞の (C e l l I n s i g h t アッセイにより評価して食作用指数として表した) 食作用の濃度依存的増加を示す。この実験では、各試験抗体について、1 m g / m L の h I g G (ヒト免疫グロブリン) を追加する。この実験で確立された E C 5 0 値は 0 . 2 ~ 2 0 μ g / m l に含まれ、最大食作用指数 (1 0 μ g / m L) は 3 2 . 5 % ~ 6 9 % の範囲である (試験した個々の C D 4 7 × C E A 二重特異性抗体のデータの要約については、実施例の章の表 3 を参照のこと) 。

【 0 1 5 3 】

【 図 1 3 】 図 1 3 および 1 4 は、野生型ヒト I g G 1 F c 部分またはアフコシル化 F c 部分のいずれかを有する 2 つの選択した本発明の C D 4 7 × C E A 二重特異性抗体 (K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2) および対応する C D 4 7 一価抗体により誘導された (L D H 放出アッセイを使用して評価して M K N 4 5 癌細胞の % 特異的溶解として表した) A D C C の濃度依存的増加を示す。比較のために、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 3 3 3 0 9 3 号に記載されているヒト I g G 4 F c 部分を有する 5 F 9) の配列同一類似体をランした。1 m g / m l ヒト I g G の非存在下 (図 1 3) または存在下 (図 1 4) で、実験を実施した。両実験条件では、アフコシル化 F c を有する抗体バージョンは、対応する野生型 F c 担持バージョンと比較して高い溶解 / 殺傷活性を誘導する (アフコシル化 K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2 二重特異性抗体の E C 5 0 は、w t バージョンと比較して 5 ~ 9 倍低い) 。

10

20

【 図 1 4 】 図 1 3 および 1 4 は、野生型ヒト I g G 1 F c 部分またはアフコシル化 F c 部分のいずれかを有する 2 つの選択した本発明の C D 4 7 × C E A 二重特異性抗体 (K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2) および対応する C D 4 7 一価抗体により誘導された (L D H 放出アッセイを使用して評価して M K N 4 5 癌細胞の % 特異的溶解として表した) A D C C の濃度依存的増加を示す。比較のために、抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 (米国特許出願公開第 2 0 1 6 0 3 3 3 0 9 3 号に記載されているヒト I g G 4 F c 部分を有する 5 F 9) の配列同一類似体をランした。1 m g / m l ヒト I g G の非存在下 (図 1 3) または存在下 (図 1 4) で、実験を実施した。両実験条件では、アフコシル化 F c を有する抗体バージョンは、対応する野生型 F c 担持バージョンと比較して高い溶解 / 殺傷活性を誘導する (アフコシル化 K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2 二重特異性抗体の E C 5 0 は、w t バージョンと比較して 5 ~ 9 倍低い) 。

30

【 0 1 5 4 】

【 図 1 5 】 図 1 5 および 図 1 6 は、野生型ヒト I g G 1 F c 部分またはアフコシル化 F c 部分のいずれかを担持する K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2 C D 4 7 × C E A 二重特異性抗体により誘導された (イメージングベースのアッセイ C e l l I n s i g h t を用いて評価して食作用指数として表した) 食作用の濃度依存的増加を示す。比較のために、(野生型 h I g G 1 F c を有する) 対応する C D 4 7 一価抗体および抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 の配列同一類似体 (5 F 9) をランした。1 m g / m l ヒト I g G の非存在下 (図 1 5) または存在下 (図 1 6) のいずれかで、実験を実施した。両実験条件では、アフコシル化 F c を有する二重特異性抗体バージョンは、対応する野生型 F c 担持バージョンと比較して高い食作用効力を示す (アフコシル化 K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2 二重特異性抗体の E C 5 0 は、w t バージョンと比較して 3 ~ 1 0 倍低い) 。

40

【 図 1 6 】 図 1 5 および 図 1 6 は、野生型ヒト I g G 1 F c 部分またはアフコシル化 F c 部分のいずれかを担持する K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2 C D 4 7 × C E A 二重特異性抗体により誘導された (イメージングベースのアッセイ C e l l I n s i g h t を用いて評価して食作用指数として表した) 食作用の濃度依存的増加を示す。比較のために、(野生型 h I g G 1 F c を有する) 対応する C D 4 7 一価抗体および抗 C D 4 7 抗体 H u 5 F 9 - G 4 の配列同一類似体 (5 F 9) をランした。1 m g / m l ヒト I g G の非存在下 (図 1 5) または存在下 (図 1 6) のいずれかで、実験を実施した。両実験条件では、アフコシル化 F c を有する二重特異性抗体バージョンは、対応する野生型 F c 担持バージョンと比較して高い食作用効力を示す (アフコシル化 K 2 A C 5 および K 2 A C 2 2 二重特異性抗体の E C 5 0 は、w t バージョンと比較して 3 ~ 1 0 倍低い) 。

50

ョンと比較して高い食作用効力を示す（アフコシル化K2AC5およびK2AC22二重特異性抗体のEC50は、wtバージョンと比較して3~10倍低い）。

【0155】

【図17】図17は、1mg/mlのヒトIgGの存在下または非存在下で、2つの選択したCD47×CEA二重特異性抗体（すなわち、K2AC5およびK2AC22）により誘導された（イメージングベースの（CellInsight）を用いて評価して食作用指数として表した）食作用の濃度依存的増加を示す。比較のために、抗CD47抗体Hu5F9-G4（米国特許出願公開第20160333093号に記載されているヒトIgG4Fc部分を担持する5F9）の配列同一類似体をランした。1mg/mLヒトIgGの追加（これは、ヒトではIgGの生理学的血漿濃度よりもさらに低い）は、CD47×CEA二重特異性抗体の効力（すなわち、EC50）にわずかな影響を与えるが、mAb5F9により駆動される活性は劇的に損なわれる（EC50および最大食作用）。

10

【0156】

【図18】図18は、K2AC22CEA×CD47二重特異性抗体により誘導された（イメージングベースのアッセイ（CellInsight）を用いて評価して食作用指数として表した）食作用に対するT細胞再ターゲティングCEA-TCB1（30nM）およびCEA-TCB（300nM）二重特異性抗体（CEA×CD3二重特異性抗体CEA-TCB：RO6958688/シビサタマブ、例えばBacacら、Clin.CancerRes.,22(13),3286-97(2016)および米国特許出願公開第20140242079号を参照のこと；CEA-TCB1：国際公開第2017055389号より）の効果を示す。比較のために、T細胞再ターゲティング二重特異性抗体、CD47×CEA二重特異性抗体および対応するCD47一価抗体を単独で試験した。CEA-TCBもCEA-TCB1も、K2AC22の食作用における濃度依存的活性を損なわない。

20

【0157】

【図19A】図19は、CEA-TCB単独または無関係なhIgG1対照と比較した、単独のまたは0.16nMもしくは0.8nMのCEA-TCBと組み合わせた2つの用量（すなわち、0.37μg/mLまたは1.1μg/mL）の2つの選択した本発明のCD47×CEA二重特異性抗体（K2AC5（図19A）およびK2AC22（図19B））による（同じヒトボランティアドナーから得られたPBMCおよびマクロファージを追加した）混合アッセイにおけるMKN45癌細胞の（発光により評価して殺傷の%として表した）殺傷を示す。（A）CEA×CD3二重特異性抗体CEA-TCB（配列番号96~99）とCEA×CD47二重特異性抗体K2AC5との組み合わせの少なくとも相加的な効果；（B）CEA-TCB+K2AC22についても、少なくとも相加的な効果。

30

【0158】

【図19B】図19は、CEA-TCB単独または無関係なhIgG1対照と比較した、単独のまたは0.16nMもしくは0.8nMのCEA-TCBと組み合わせた2つの用量（すなわち、0.37μg/mLまたは1.1μg/mL）の2つの選択した本発明のCD47×CEA二重特異性抗体（K2AC5（図19A）およびK2AC22（図19B））による（同じヒトボランティアドナーから得られたPBMCおよびマクロファージを追加した）混合アッセイにおけるMKN45癌細胞の（発光により評価して殺傷の%として表した）殺傷を示す。（A）CEA×CD3二重特異性抗体CEA-TCB（配列番号96~99）とCEA×CD47二重特異性抗体K2AC5との組み合わせの少なくとも相加的な効果；（B）CEA-TCB+K2AC22についても、少なくとも相加的な効果。

40

【0159】

【図20】図20は、200ng/mLの脱落CEAの存在下または非存在下における（イメージングベースのアッセイ（CellInsight）を用いて評価して食作用指数として表した）結合（20A）および食作用（20B）に対するCEA×CD47抗体K

50

2 A C 5 および 2 2 の濃度依存的効果を示す。両 C E A x C D 4 7 抗体の結合曲線に対する 2 0 0 n g / m L 可溶性 C E A の有意な影響はない。最大食作用に対する可溶性 C E A の有意な効果はなく、E C 5 0 は 4 倍未満シフトする。

【 0 1 6 0 】

【図 2 1】図 2 1 A は、対応する抗 C D 4 7 一価抗体および無関係な h I g G 1 対照と比較した、M K N - 4 5 細胞への本発明の C D 4 7 x C E A 二重特異性抗体の濃度依存的結合を示す。K 2 A C 3 9 は、ヒト C E A C A M 5 およびヒト C E A C A M 6 と交差反応性の C D 4 7 x C E A 二重特異性抗体候補であるが；K 2 A C 2 2 は C E A C A M 6 と交差反応しない。C D 4 7、C E A C A M 5 および C E A C A M 6 を発現する標的細胞 (M K N - 4 5) への結合を F A C S により評価した。図 2 1 B は、対応する抗 C D 4 7 一価抗体および無関係な h I g G 1 対照と比較した、2 つの異なる C D 4 7 x C E A 二重特異性抗体 (K 2 A C 2 2 および K 2 A C 3 9) により誘導された M K N - 4 5 細胞の (イメージングベースのアッセイ (C e l l I n s i g h t)) により評価して食作用指数として表した) 食作用の濃度依存的増加を示す。K 2 A C 3 9 は、ヒト C E A C A M 5 およびヒト C E A C A M 6 と交差反応性の C D 4 7 x C E A 二重特異性抗体候補であるが；K 2 A C 2 2 は C E A C A M 6 と交差反応しない。この実験では、1 m g / m L のヒト I g G を追加する。K 2 A C 3 9 は、K 2 A C 2 2 と比較して高い M K N 4 5 細胞の食作用を示す。

10

【発明を実施するための形態】

【 0 1 6 1 】

発明の詳細な説明

20

以下のように特に定義がない限り、本明細書では、当技術分野で一般に使用されるように用語を使用する。

【 0 1 6 2 】

本明細書で使用される場合、「抗原結合部分、結合部分」という用語は、その最も広い意味で、C E A、C D 4 7 および C D 3 などの抗原決定基に特異的に結合する抗体の部分を指す。

【 0 1 6 3 】

より具体的には、本明細書で使用される場合、膜結合ヒト癌胎児性抗原 (C E A、C E A C A M 5 と同じ) または C D 4 7 に結合する結合部分は、C E A または C D 4 7、より具体的には細胞表面または膜結合 C E A または C D 4 7 に特異的に結合する。したがって、各結合部分は、C E A または C D 4 7 のいずれかに結合する。「特異的に結合する、に特異的な、に結合する」は、結合が抗原に選択的であり、望ましくないまたは非特異的な相互作用と区別され得ることを意味する。いくつかの実施形態では、非関連非標的タンパク質への抗標的抗体の結合の程度は、例えば表面プラズモン共鳴 (S P R)、例えば B i a c o r e (登録商標)、酵素結合免疫吸着 (E L I S A) またはフローサイトメトリー (F A C S) により測定される場合、前記標的への抗体の結合よりも約 1 0 倍、好ましくは > 1 0 0 倍未満である。標的は、本明細書で議論されるタンパク質、例えば C E A、C D 4 7 および C D 3 である。一実施形態では、C E A 結合部分は、C E A C A M 6 にさらに結合する。

30

【 0 1 6 4 】

「C E A、C D 4 7 に特異的に結合する、C E A、C D 4 7 に結合する、C E A、C D 4 7 に特異的な」は、一実施形態では、C E A および C D 4 7 を発現する腫瘍細胞のターゲティングにおいて抗体が治療剤として有用であるような十分な親和性で、標的 C E A および C D 4 7 に結合することができる抗体、例えば二重特異性抗体を指す。「の E C 5 0 値で M K N - 4 5 細胞に結合する」という用語は、試験される二重特異性抗体濃度が、3 0 0 n M の濃度の抗 C D 4 7 抗体 B 6 H 1 2 . 2 (A T C C (登録商標) H B - 9 7 7 1 (商標)、本明細書では B 6 H 1 2 とも称される) の存在下で 0 . 1 ~ 1 0 0 0 n M であるアッセイ条件を指す。

40

【 0 1 6 5 】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、カニクイザル C E A C A M 5 およびヒト

50

C E A C A M 5 に結合する。

【 0 1 6 6 】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む抗体を指す。一実施形態では、抗体は全長抗体である。本明細書で使用される場合、「抗体重鎖」という用語は、全長抗体について定義される可変領域および定常領域からなる抗体重鎖を指す。本明細書で使用される場合、「抗体軽鎖」という用語は、全長抗体について定義される可変領域および定常領域からなる抗体軽鎖を指す。

【 0 1 6 7 】

「全長抗体」という用語は、2つの「全長抗体重鎖」および2つの「全長抗体軽鎖」からなる抗体を表す。「全長抗体重鎖」は、N末端からC末端方向に、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常重鎖ドメイン1(CH1)、抗体ヒンジ領域(HR)、抗体重鎖定常ドメイン2(CH2)および抗体重鎖定常ドメイン3(CH3)からなるポリペプチドであり、VH-CH1-HR-CH2-CH3と略される。「全長抗体軽鎖」は、N末端からC末端方向に、抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体軽鎖定常ドメイン(CL)からなるポリペプチドであり、VL-CLと略される。抗体軽鎖定常ドメイン(CL)は、 κ (カッパ)または λ (ラムダ)であり得る。2つの全長抗体ドメインは、CLドメインとCH1ドメインとの間および全長抗体重鎖のヒンジ領域間のポリペプチド間ジスルフィド結合を介して互いに連結される。典型的な全長抗体の例は、IgG(例えば、IgG1およびIgG2)、IgM、IgA、IgDおよびIgEのような天然抗体である。本発明の全長抗体は、一実施形態ではヒトIgG1タイプのものであり、さらなる一実施形態では以下で定義されるようにFc部分中に1つもしくはそれを超えるアミノ酸置換を含み、および/またはAsn297で糖操作されている。本発明の全長抗体は、それぞれがVHとVLとの対により形成される2つの結合部分であって、一方がCEAに結合し、他方がCD47に結合する2つの結合部分を含む。

【 0 1 6 8 】

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」(「CDR」)は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非隣接抗原結合部位(抗原結合領域としても公知である)を表す。CDRは「超可変領域」とも称され、その用語は、本明細書では、抗原結合領域を形成する可変領域の部分に関して、「CDR」という用語と互換的に使用される。この特定の領域は、Kabataら、U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)およびChothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) (これらは、参照により本明細書に組み込まれる)により記載されており、それらにおける定義は、互いに比較した場合に重複するまたは一部のアミノ酸残基を含む。IGおよびTRのFR-IMGTおよびCDR-IMGT領域の定義は、"IMGT unique numbering for all IG and TR V-REGIONS of all species: interest for structure and evolution" (Lefranc, M.-Pら、Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003))に基づいており、再配置CDR3-IMGTおよびFR4-IMGTについては、"IMGT unique numbering for V-DOMAIN and V-LIKE-DOMAIN" (Lefranc, M.-Pら、Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003))に基づいている。それにもかかわらず、抗体またはその変異体のCDRを指すためのいずれかの定義の適用は、本明細書で定義および使用される用語の範囲内にあると意図される。IMGTおよびKabataにより定義されるCDRを包含する適切なアミノ酸残基は、以下の配列表に記載されている。特定のCDRを包含する正確な残基番号は、CDRの配列およびサイズに応じて変動する。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮して、どの残基が特定のCDRを含むかをルーチンに決定し得る。本明細書で使用される場合、「配列番号xのCDRL1を含む」という用語は、言及される可変軽鎖のCDRL1部分が配列番号xのものである(CDRL1として配列番号x

10

20

30

40

50

のCDRL1を含む)ことを指す。これは他のCDRにも当てはまる。

【0169】

本明細書で使用される場合、「Fc領域；Fcドメイン」という用語は、IgG重鎖のC末端領域を指す；IgG1抗体の場合、C末端領域は-CH2-CH3を含む(上記を参照のこと)。IgG重鎖のFc領域中の境界はわずかに変動し得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、位置Cys226のアミノ酸残基からカルボキシル末端まで広がるとして定義される。

【0170】

定常領域は技術水準で周知であり、例えば、Kabata, E. Aにより記載されている(例えば、Johnson, G., and Wu, T. T., *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 214-218; Kabata, E. Aら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 2785-2788を参照のこと)。

【0171】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができる任意のポリペプチド決定基を含む。特定の実施形態では、「エピトープ」は、分子の化学的に活性な表面基、例えばアミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルを含み、特定の実施形態では、特定の三次元構造特徴およびまたは特定の電荷特徴を有し得る。エピトープは、抗体が結合する標的の領域である。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、CEACAM5のN末端ドメイン(アミノ酸35~144のIg様Vタイプドメイン、UniProtKB-P06731)に結合する。CEACAM5へのCEACD47二重特異性抗体の結合位置は、エピトープピニングを介して達成される。エピトープピニングでは、ペアワイズコンビナトリアル方式で抗体を試験し、同じ結合領域について競合する抗体をピンと一緒にグループ化する。競合試験は、本明細書では、技術水準にしたがって、および本明細書に記載されているように抗CEA抗体を用いて実施される。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、CEACAM5への結合について、参照抗体SM3Eと競合する(ピン1)。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、CEACAM5への結合について、参照抗体SM3E、MEDI、T84.66、SAR、LabおよびCH1A1Aと競合しない(ピン2)。競合は、0.5 μg/mlの濃度のビオチン化ヒトCEACAM5を固定化し、10 μg/mlの参照と共にインキュベートするアッセイにより測定される。本発明のCEACD47二重特異性抗体のCEACAM5結合部分を含むCEACAM5抗体を0.2 μg/ml、室温で1時間追加する。プレートを洗浄し、結合したCEACAM5 mAbを検出する。

【0172】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、CEACAM5のB3ドメインおよびGPIアンカーに結合する。本発明の一実施形態では、本発明の抗体は、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む抗CEA抗体(MAB CEA)と同じエピトープに結合する。

【0173】

本明細書で使用される場合、「共通重鎖(cHC)」という用語は、N末端からC末端方向に、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常重鎖ドメイン1(CH1)、抗体ヒンジ領域(HR)、抗体重鎖定常ドメイン2(CH2)および抗体重鎖定常ドメイン3(CH3)からなるポリペプチドを指し、VH-CH1-HR-CH2-CH3と略される。本発明の二重特異性抗体に適切な共通重鎖は、国際公開第2012023053号、国際公開第2013088259号、国際公開第2014087248号および国際公開第2016156537号(これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる)に記載されている抗CD47抗体の重鎖である。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体のcHCは、軽鎖CDRとして配列番号1のCDRL1、配列番号2のCDRL2および配列番号3のCDRL3と、重鎖CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3とを含む。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体のcHCは、重鎖可変領域VHとして配列番号4のVH領域を含む。一実施形態で

は、本発明の二重特異性抗体の c H C は、配列番号 5 のものである。一実施形態では、本発明の抗体は、c H C を含む 二重特異性抗体である (ボディ) 。

【 0 1 7 4 】

「 ボディフォーマットは、標準的な I g G 分子と区別不可能な二重特異性抗体であって、標準的なモノクローナル抗体と区別不可能な特徴を有する二重特異性抗体のアフィニティー精製を可能にし (例えば、国際公開第 2 0 1 3 0 8 8 2 5 9 号、国際公開第 2 0 1 2 0 2 3 0 5 3 号を参照のこと) 、患者において免疫原性の可能性がないかまたは低いことを約束する。

【 0 1 7 5 】

共通重鎖を含む本発明の二重特異性抗体は、例えば、国際公開第 2 0 1 2 0 2 3 0 5 3 号 (その全体が参照により組み込まれる) にしたがって作製され得る。国際公開第 2 0 1 2 0 2 3 0 5 3 号に記載されている方法は、ヒト免疫グロブリンと構造が同一の二重特異性抗体を生成する。このタイプの分子は、2 コピーのユニークな重鎖ポリペプチドと、定常カッパドメインに融合された第 1 の軽鎖可変領域と、定常ラムダドメインに融合された第 2 の軽鎖可変領域とから構成される。一方の結合部位は C E A への特異性を示し、他方の部位は C D 4 7 への特異性を示し、それぞれに対して重鎖および各軽鎖が寄与する。軽鎖可変領域は、ラムダまたはカッパファミリーのものであり得、好ましくは、それぞれラムダおよびカッパ定常ドメインに融合される。これは、非天然ポリペプチド結合の生成を回避するために好ましい。しかしながら、第 1 の特異性については、カッパ軽鎖可変ドメインを定常ラムダドメインに融合することにより、または第 2 の特異性については、ラムダ軽鎖可変ドメインを定常カッパドメインに融合することにより、本発明の二重特異性抗体を得ることも可能である。その場合、他の軽鎖は常に、完全にカッパ (V L および C L) または完全にラムダである。国際公開第 2 0 1 2 0 2 3 0 5 3 号に記載されている二重特異性抗体は「 ボディ」である。この - ボディフォーマットは、標準的なモノクローナル抗体と区別不可能な特徴を有する標準的な I g G 分子と区別不可能な二重特異性抗体のアフィニティー精製を可能にするので、例えば、アミノ酸架橋または他の非天然エレメントを含む以前のフォーマットと比較して好ましい。

【 0 1 7 6 】

前記方法の必須工程は、異なる抗原特異性を有する (それぞれが可変軽ドメインおよび可変重ドメインにより含まれる) 2 つの抗体 F v 領域であって、同じ重鎖可変ドメインを共有する 2 つの抗体 F v 領域の同定である。モノクローナル抗体およびその断片の生成について、多数の方法が記載されている。(例えば、Antibodies : A Laboratory Manual , Harlow E , and Lane D , 1988 , Cold Spring Harbor Laboratory Press , Cold Spring Harbor , NY を参照のこと) 。完全ヒト抗体は、CDR 1 および 2 を含む軽鎖および重鎖の両方の配列がヒト遺伝子から生じた抗体分子である。CDR 3 領域はヒト起源のものでよいし、または合成手段により設計されてもよい。このような抗体は、「ヒト抗体」または「完全ヒト抗体」と称される。ヒトモノクローナル抗体は、トリオーム技術 ; ヒト B 細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor ら、1983 Immunol Today 4 : 72 を参照のこと) ; および E B V ハイブリドーマ技術 (Cole ら、1985 In : Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy , Alan R . Liss , Inc . , pp . 77 - 96 を参照のこと) を使用して、ヒトモノクローナル抗体を生産することにより調製され得る。ヒトモノクローナル抗体が利用され得、ヒトハイブリドーマを使用することにより (Cote ら、1983 . Proc Natl Acad Sci USA 80 : 2026 - 2030 を参照のこと) 、または Epstein-Barr virus でヒト B 細胞をインビトロで形質転換することにより (Cole ら、前掲を参照のこと) 生産され得る。

【 0 1 7 7 】

本明細書で使用される場合、「 C E A 、 C E A C A M 5 」という用語は、細胞表面糖タンパク質および腫瘍関連抗原 (Gold and Freedman , J Exp . Med

10

20

30

40

50

. , 1 2 1 : 4 3 9 - 4 6 2 , 1 9 6 5 ; B e r i n s t e i n N L , J C l i n O n c o l . , 2 0 : 2 1 9 7 - 2 2 0 7 , 2 0 0 2) であるヒト癌胎児性抗原 (C E A , C E A C A M - 5 または C D 6 6 e ; U n i P r o t K B - P 0 6 7 3 1) を指す。本明細書で使用される場合、「 C E A C A M 6 」という用語は、癌胎児性抗原関連細胞接着分子 (C E A C A M) ファミリーのメンバーでもあるヒト C E A C A M 6 (C D 6 6 c ; U n i P r o t K B - P 4 0 1 9 9) を指す。本明細書で使用される場合、「 C E A C A M 1 」という用語は、癌胎児性抗原関連細胞接着分子 (C E A C A M) ファミリーのメンバーでもあるヒト C E A C A M 1 (U n i P r o t K B - P 1 3 6 8 8 (C E A M 1 _ H U M A N) を指す。さらなる情報および C E A ファミリーの他のメンバーに関する情報については、 <http://www.uniprot.org> に見られ得る。

10

【 0 1 7 8 】

本明細書で使用される場合、「 M A B C E A 」という用語は、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、配列番号 2 0 の重鎖可変領域および配列番号 2 1 の軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体を指す。本明細書で使用される場合、「 M A B C E A 1 」という用語は、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、配列番号 8 8 の重鎖可変領域および配列番号 8 9 の軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体を指す。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、 M A B C E A 、 M A B C E A 1 、 C E A - T C B または C E A - T C B 1 と競合する；さらなる実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、 M A B C E A 、 M A B C E A 1 、 C E A - T C B または C E A - T C B 1 と競合しない。 M A B C E A および前記可変鎖は、米国特許出願公開第 2 0 1 4 0 2 4 2 0 7 9 号 (米国特許出願公開第 2 0 1 4 0 2 4 2 0 7 9 号 (その全体が参照により組み込まれる) の配列番号 2 1 および 2 7) に記載されている。 M A B C E A の V H および V L を含む二重特異性抗 C E A x 抗 C D 3 抗体 (C E A - T C B) は、 B a c a c a , C l i n . C a n c e r R e s . , 2 2 (1 3) , 3 2 8 6 - 9 7 (2 0 1 6) に記載されている。 M A B C E A 1 の V H および V L を含むさらなる二重特異性 C E A x C D 3 M a b (C E A - T C B 1) は、電荷改変 (C D 3 バインダーにおける V H / V L 交換、 C E A バインダー、ヒト化 C E A バインダーにおける電荷改変) を有する分子 B 「逆 2 + 1 I g G C r o s s F a b」として国際公開第 2 0 1 7 0 5 5 3 8 9 号に記載されている (国際公開第 2 0 1 7 0 5 5 3 8 9 号 (その全体が参照により組み込まれる) の図 3 B および配列番号 3 4 、 3 6 ~ 3 8 を参照のこと) 。

20

30

【 0 1 7 9 】

「本明細書で使用される場合、「 C D 4 7 に特異的に結合する、 C D 4 7 に結合する、 C D 4 7 結合部分」という用語は、本発明の二重特異性抗体の文脈では、 C D 4 7 に対する特異性を指す。 C D 4 7 は複数回膜貫通タンパク質であり、3つの細胞外ドメイン (アミノ酸 1 9 ~ 1 4 1 、 1 9 8 ~ 2 0 7 および 2 5 7 ~ 2 6 8 ; U n i P r o t K B - Q 0 8 7 2 2 を参照のこと) を含む。本明細書で使用される場合、「 C D 4 7 への結合親和性」という用語は、 S P R により測定される。

【 0 1 8 0 】

一実施形態では、 C D 4 7 への本発明の二重特異性抗体の結合は、前記細胞外ドメインの 1 つまたはそれよりも多くを介して起こる。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、ヒト C D 4 7 とヒト S I R P との間の相互作用を阻害する。

40

【 0 1 8 1 】

本明細書で使用される場合、「 C E A に特異的に結合する、 C E A に結合する、 C E A 結合部分」という用語は、本発明の二重特異性抗体の文脈では、細胞の表面上の C E A C A M 5 に対する特異性を指す。細胞上の C E A (C E A C A M 5) への結合は、好ましくは、細胞当たり 2 0 0 . 0 0 0 ~ 6 0 0 . 0 0 0 個の C E A コピーを含む胃腺癌 M K N - 4 5 細胞を用いて測定される。本発明の抗体の濃度は、上記で定義される M K N - 4 5 細胞への結合について得られた E C 5 0 値に関して適切な範囲で変動する。本発明の二重特

50

異性抗体は、このような細胞膜結合 C E A C A M 5 に特異的に結合し、さらなる実施形態では、患者の血液 / 血漿中に見られるような濃度の可溶性 C E A C A M 5 に結合しないかまたは最小限に結合するにすぎず、すなわち、このような濃度の可溶性 C E A は、本発明の二重特異性抗体の有効性に影響を及ぼさないかまたは最小限に影響を及ぼすにすぎない。これは、記載されるように、本発明の二重特異性抗体による M K N - 4 5 細胞の食作用に対する可溶性 C E A の影響により測定される。

【 0 1 8 2 】

本明細書で使用される場合、「膜結合ヒト C E A」という用語は、細胞の膜部分にまたは細胞の表面、特に腫瘍細胞の表面に結合したヒト癌胎児性抗原 (C E A) を指す。「膜結合ヒト C E A」という用語は、特定の状況では、細胞の膜に結合していないが、本発明の抗体が結合する膜結合 C E A エピトープを保存するように構築された C E A を指し得る。

10

【 0 1 8 3 】

本明細書で使用される場合、「可溶性 C E A C A M 5 に対する実質的な交差反応性なし、可溶性 C E A C A M 5 に結合しない」という用語は、本発明の二重特異性抗体の文脈では、このような抗体が、特に膜結合 C E A C A M 5 と比較した場合に、可溶性 C E A C A M 5 への関連結合を示さないことを指す。このような非結合は、以下に記載されるように M K N - 4 5 細胞を用いた食作用アッセイにおける二重特異性抗体の食作用活性に対する可溶性 C E A の低い影響、好ましくは食作用指数のイメージングベースの測定により間接的に決定され得、実施例 9 を参照のこと)。したがって、可溶性 C E A C A M 5 に対する実質的な交差反応性なしは、前記二重特異性抗体による、ヒトマクロファージの存在下における M K N - 4 5 細胞の食作用の達成可能な最大食作用指数 (二重特異性抗体 C E A × C D 4 7 の典型的な濃度 - 食作用指数曲線および達成可能な最大食作用指数は、例えば、図 1 2、1 5、1 6、1 7、2 0 A に示されており、アッセイは実施例 9 . 2 で説明されている) が、2 0 0 n g / m l 可溶性 C E A を食作用アッセイに追加した場合に 2 0 % 超減少しないことを意味する。あるいは、濃度 - 食作用指数曲線の E C 5 0 のシフトが決定され得る。2 0 0 n g / m l 可溶性 C E A の追加は、この E C 5 0 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない。あるいは、細胞上の C E A への本発明の二重特異性抗体の結合に対する可溶性 C E A の影響がないかまたは最小限であることは、フローサイトメトリーにより測定された結合曲線 (このような結合曲線は図 2 0 B に示されている) に対する可溶性 C E A の影響により予想される。フローサイトメトリーアッセイへの 2 0 0 n g / m l 可溶性 C E A の追加は、結合曲線または E C 5 0 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない。

20

30

【 0 1 8 4 】

「可溶性 C E A、脱落 C E A、s C E A」という用語は、細胞膜または細胞表面 (例えば、腫瘍細胞表面) に結合していないかまたはそれから切断された C E A C A M 5 を指す。可溶性 C E A は、例えば、癌を有する被験体の血流中に見られ得る。C E A が細胞膜から脱落すると、G P I アンカーが破壊され、C E A C A M 5 はコンフォメーション変化を受け、これが、本発明の抗体への可溶性 C E A の結合を防止または少なくとも弱体化し得ると想定される。

【 0 1 8 5 】

本明細書で使用される場合、「C E A C A M 6 に対する交差反応性、C E A C A M 6 に特異的に結合する、C E A C A M 6 に結合する、C E A C A M 6 結合部分」という用語は、本発明の二重特異性抗体の文脈では、本発明の二重特異性抗体が細胞の表面 (膜) 上の C E A C A M 5 および C E A C A M 6 を特異的に認識することを指す。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、膜結合 C E A への結合と比較した場合に、膜結合 C E A C A M 6 に特異的に結合する。所定の本発明の二重特異性抗体による細胞表面上の C E A C A M 6 受容体に対する C E A C A M 5 受容体の占有率は、C E A C A M 5 または C E A C A M 6 に対する結合親和性に依存し、例えば、S P R によりこれらの結合親和性を測定すれば容易に計算され得る。

40

【 0 1 8 6 】

50

特定の実施形態では、CEACAM5に特異的に結合する抗体は、癌胎児性抗原関連細胞接着タンパク質、例えばCEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM6、CEACAM7およびCEACAM8に結合しない。特定の実施形態では、CEACAM5に特異的に結合する抗体はまた、同様のEC50でCEACAM6に結合する。
【0187】

本明細書で使用される場合、「CEACAM1および/またはCEACAM3、CEACAM4、CEACAM6、CEACAM7およびCEACAM8に対する実質的な交差反応性なし、前記CEACAMに結合しない」という用語は、本発明の二重特異性抗体の文脈では、このような抗体が、膜結合CEACAM5と比較した場合に、治療血漿濃度(1~1000nM)で前記膜結合CEACAMへのいかなる関連結合も示さないことを指す。CEACAM1および/またはCEACAM5、CEACAM6およびCEACAM8への非結合は、前記CEACAMを発現する組換えCHO細胞への結合曲線のフローサイトメトリーベースの測定により決定され得、CEACAM3および/またはCEACAM4およびCEACAM7への非結合は、前記CEACAMを発現する組換えPEAK細胞への結合曲線の測定により、または組換えCEACAMタンパク質への結合を測定するELISAアッセイにより決定され得る。本明細書で使用される場合、本明細書で言及される化合物(例えば、ヒトIgG)「に結合しない、への非結合」という用語もまた、例えば、このような無関係な結合または非交差反応性を指す。例えば、ELISAでは、このような非関連化合物のOD値は、検出限界のものと同ほぼ等しい。

【0188】

本明細書で使用される場合、「ヒトCEAおよびヒトCD3に結合する二重特異性抗体、CEAxCD3 Mab」という用語は、ヒトCEACAM5およびCD3に結合する二重特異性抗体を意味する。このような抗体は、例えば、「CEA-TCB」および「CEA-TCB1」である。本明細書で使用される場合、「CEA-TCB」は、配列番号1、2、21および22として米国特許出願公開第20140242079号(その全体が参照により組み込まれる)に記載されるCEAおよびCD3に結合する二重特異性抗体を指す。CEA-TCBのアミノ酸配列はまた、本発明の配列番号96~99として記載されている。本明細書で使用される場合、「CEA-TCB1」は、電荷改変(CD3バインダーにおけるVH/VL交換、CEAバインダー、ヒト化CEAバインダーにおける電荷改変;国際公開第2017055389号(その全体が参照により組み込まれる)の図3B、配列番号34、36~38)を有する「逆2+1 IgG CrossFab」フォーマットの分子Bを指す。CEA-TCB1のアミノ酸配列は、本発明の配列番号92~95として記載されている。さらなるCEAxCD3 Mabは、国際公開第2007071426号、国際公開第2013012414号、国際公開第2015112534号、国際公開第2017118675号、米国特許出願公開第20140242079号および国際公開第2017055389号(これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。さらなるCEAxCD3 MabはRO6958688である(例えば、Bacacら、Clin. Cancer Res., 22(13), 3286-97(2016)を参照のこと。一実施形態では、前記CEAxCD3 Mabは競合的であり、および/またはMAB CEAと同じヒトCEACAM5のエピトープに結合する。一実施形態では、前記CEAxCD3 Mabは競合的であり、および/またはMAB CEA1と同じヒトCEACAM5のエピトープに結合する。

【0189】

本明細書で使用される場合、「CD3 Mab、CD3に対する抗体」は、ヒトCD3(UniProtKB-P07766(CD3E_HUMAN))を指す。「CD3に対する抗体、抗CD3抗体」という用語は、CD3に特異的に結合する抗体に関する。一実施形態では、CD3に対する抗体は、抗CD3抗体SP34(BD Biosciences Catalog No. 565983)と同じエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、CD3に対する抗体は、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する。一実施形態では、CD3に対する抗体はヒ

10

20

30

40

50

トCD3 に特異的に結合し、配列番号90の重鎖可変領域および配列番号91の軽鎖可変領域を含む。

【0190】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、MKN-45細胞上に提示されるCEAへの結合について、CEA-TCBおよび/またはCEA-TCB1と競合しない。したがって、300nM(CEA-TCB)または30nM(CEA-TCB1)の濃度のCEA-TCBは、MKN-45細胞に対する本発明の前記二重特異性抗体の食作用指数曲線のEC50を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない。

【0191】

300nMは、治療有効用量のCEA-TCBで患者血漿中で測定された濃度である(J. Taberneroら、J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002))。CEA-TCB1は、前臨床試験ではCEA-TCBよりも約10~100倍強力であるので(結合親和性、腫瘍細胞溶解、国際公開第2017055389号)、EC50のシフトは30nMで試験される。

【0192】

結合の競合は、MKN-45細胞への結合曲線のフローサイトメトリーベースの測定およびこの結合曲線のEC50の決定により決定され得る(例えば、このような結合曲線については、図2および図11を参照のこと)。非競合は、300nMのMAB CEAまたはCEA-TCBがアッセイに追加された場合に、EC50が一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍未満シフトすることを意味する。300nMは、CEA×CD3二重特異性抗体(CEA-TCB)の治療活性用量/血漿濃度の範囲内の濃度である(J. Taberneroら、J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002))。MAB CEA1またはCEA-TCB1による非競合は、30nMのMAB CEA1またはCEA-TCB1がアッセイに追加された場合に、EC50が3倍未満シフトすることを意味する。

【0193】

結合の競合は、MKN-45細胞への結合曲線のフローサイトメトリーベースの測定およびこの結合曲線のEC50の決定により決定され得る(このような結合曲線については、図2および図11を参照のこと)。非競合は、300nMのMAB CEAまたはCEA-TCBがアッセイに追加された場合に、EC50が3倍未満変化することを意味する。300nMは、CEA×CD3二重特異性抗体(CEA-TCB)の治療活性用量/血漿濃度の範囲内の濃度である(J. Taberneroら、J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002))。

【0194】

MAB CEA1またはCEA-TCB1による非競合は、30nMのMAB CEA1またはCEA-TCB1がアッセイに追加された場合に、EC50が3倍未満変化することを意味する。

【0195】

本明細書で使用される場合、「非競合的」という用語は、300nM(MAB-CEA、CEA-TCB)または30nM(MAB CEA1、CEA-TCB1)の濃度の第2の抗体(MAB CEA、MAB CEA1、またはCEA×CD3)に対する二重特異性抗体、例えばCEA-TCBまたはCEA-TCB1)が、MKN-45細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線のEC50を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせないことを意味する。本明細書で使用される場合、「競合的」という用語は、300nMまたは30nM(MAB CEA1またはCEA-TCB1)の濃度の第2の抗体(MAB CEA、MAB CEA1、またはCEA×CD3)に対する二重特異性抗体、例えばCEA-TCBまたはCEA-TCB1)が、MKN-45細胞への本発明の二重特異性抗体の結合曲線のEC50をより高い濃度の方向に3倍超、好ましくは5倍超シフトさせることを意味する。

【0196】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「相補性決定領域」(「CDR」)という用語は、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非隣接抗原結合部位(抗原結合領域としても公知である)を表す。CDRは「超可変領域」とも称され、その用語は、本明細書では、抗原結合領域を形成する可変領域の部分に関して、「CDR」という用語と互換的に使用される。この特定の領域は、Kabataら、U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)およびChothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)により記載されている。Kabataらはまた、任意の抗体に適用可能な可変ドメイン配列のナンバリングシステムを定義した。当業者は、配列それ自体以外のいかなる実験データにも依拠せず、**10** 「Kabataナンバリング」のこのシステムを任意の可変ドメイン配列に明確に割り当て得る。本明細書で使用される場合、「Kabataナンバリング」は、Kabataら、U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)により示されているナンバリングシステムを指す。特に指定がない限り、本発明の二重特異性抗体における特定のアミノ酸残基位置のナンバリングへの言及は、Kabataナンバリングシステムにしたがう。

【0197】

本明細書で使用される場合、「ADCP」という用語は、抗体依存性細胞媒介性食作用を指す。**20**

【0198】

本明細書で使用される場合、本発明の「食作用、食作用のEC50値、食作用の最大、食作用指数」は、「イメージング」によりMKN-45細胞を用いて測定された食作用を指す。例えば、1:1もしくは1:3のエフェクター(マクロファージ):標的(腫瘍)細胞比によるインキュベーションを用いた、またはリードアウトとして「食作用指数」(イメージングにより決定したADCP)を用いた適切なイメージング方法は、実施例9に記載されている。図3Bは、0.1またはさらにそれよりも低いものから約500nMの試験濃度範囲の二重特異性TAAxCD47抗体で決定した達成可能な最大食作用指数を示す。図12、15および16は、本発明のK2AC5およびK2AC22による二重特異性抗体のADCPの結果を示す。本明細書で使用される場合、「前記二重特異性抗体の食作用」は、前記抗体により引き起こされた/誘導された食作用を意味する。抗体K2AC22は、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含み、それにより、第1の結合部分は、配列番号5の重鎖および配列番号65の軽鎖を含み、第2の結合部分は、配列番号5の重鎖および配列番号11の軽鎖を含む。抗体K2AC5は、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含み、それにより、第1の結合部分は、配列番号5の重鎖および配列番号64の軽鎖を含み、第2の結合部分は、配列番号5の重鎖および配列番号11の軽鎖を含む。抗体K2AC10、K2AC13、K2AC18、K2AC23、K2AC25、K2AC26、K2AC27、K2AC28、K2AC29は、同じ重鎖および第2の結合部分軽鎖を含むが、第1の結合部分軽鎖が異なる(表1、配列表を参照のこと)。**30**

【0199】

食作用分野に関するさらなる詳細について、食作用はまた、フローサイトメトリーベースの方法により、例えば、3:1のヒトマクロファージ対標的/腫瘍細胞比で、%食作用として測定され得る(「フローサイトメトリーにより決定したADCP」)(一価TAAおよびCD47抗体ならびにTAAxCD47二重特異性抗体の濃度からの%食作用の依存性については、実施例9および図3Aを参照のこと)。**40**

【0200】

「ヒトIgG、hIgG」という用語は、CD47およびCEACAM5に特異的に結合しないヒト免疫グロブリンIgG(Bio-rad.com社製)の市販の臨床グレー**50**

ドの均一な調製物を指す。

【0201】

CHO細胞において産生される抗体は、典型的には、二分岐型N-アセチルグルコサミン(二分岐型GlcNAc)が非常に少ないかまたは欠如しており、コアフコシル化レベルが高い複雑な二分岐構造を有する。N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIの過剰発現は、抗体上に存在する二分岐型GlcNAcの割合を増加させて、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を改善するために使用されている。RNAiおよび遺伝子欠失技術もまた、抗体上のフコースを減少させまたは排除して、ADCC活性を劇的に増加させるために使用されている(Davis Jら、Biotechnol. Bioeng. 2001; 74: 288-294; Saba JAら、Anal. Biochem. 2002; 305: 16-31; Kanda Yら、J. Biotechnol. 2007; 130: 300-310; Mori Kら、Biotechnol. Bioeng. 2004; 88: 901-908)。

10

【0202】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は糖操作されている。一実施形態では、本発明の糖操作された二重特異性抗体は、配列番号5に含まれるFc部分を含む二重特異性抗体(親抗体)であって、標準的な条件(1000ml容器、温度37℃、pH7.0、インペラー速度80rpm、最小溶存酸素30%; 培養時間14日間)でCHO K1細胞株(ATCC(登録商標)CCL-61(商標))における産生によるグリコシル化を含む二重特異性抗体(親抗体)と比較して増加したADCCおよび/またはADCP活性(食作用指数の減少したEC50および/またはより高い最大)を有する。

20

【0203】

より具体的な実施形態では、ADCCの増加(EC50の減少および/または最大の増加)は、前記親抗体と比較して1.2~2.0またはさらには少なくとも2.0倍である(例えば、図13および14を参照のこと)。

【0204】

より具体的な実施形態では、ADCPの増加(食作用指数曲線のEC50の減少)は、前記親抗体と比較して少なくとも3もしくはさらには5倍またはそれを超える(例えば、図15および16を参照のこと)。

【0205】

本明細書で使用される場合、「GnTII活性を有するポリペプチド、GnTII」という用語は、N結合型オリゴ糖のトリマンノシルコアの結合マンノシドへの-1-4結合におけるN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)残基の付加を触媒することができるポリペプチド、例えば-1,4-マンノシル-糖タンパク質4-N-アセチルグルコサミニル-トランスフェラーゼ(EC2.4.1.144)を指す。

30

【0206】

本明細書で使用される場合、「FUT8」という用語は、1,6-フコシルトランスフェラーゼ(EC:2.4.1.68)を指す。

【0207】

本明細書で使用される場合、「エフェクター機能、Fc媒介性細胞傷害」という用語は、抗体のFc領域(ネイティブ配列Fc領域またはアミノ酸配列変異体Fc領域)に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、限定されないが、Fc受容体結合親和性、抗体依存性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込み、細胞表面受容体のダウンレギュレーションなどが挙げられる。このような免疫機構は、「ヒト免疫エフェクター細胞」による「標的細胞」の溶解につながる。

40

【0208】

本明細書で使用される場合、「糖操作された抗体」という用語は、親抗体と比較して減少した量の、通常はアミノ酸Asn297で前記抗体のFc領域に付着したフコシル化型および/または二分岐型オリゴ糖を含む本発明の二重特異性抗体を指す。

50

【0209】

本明細書で使用される場合、糖操作の文脈における「親抗体、親二重特異性抗体」という用語は、糖操作された抗体と同じアミノ酸組成を含むが糖操作されていない本発明の二重特異性抗体を指す。このような比較のために、親抗体および糖操作された抗体は同じ宿主細胞において産生されるが、第1の場合では、糖操作されていない宿主細胞において産生され、第2の場合では、FUT8遺伝子の標的破壊により操作されたか、または標準的な条件下でGnTII活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現させることにより操作された以外は同じ宿主細胞において産生される（上記を参照のこと）。

【0210】

本明細書で使用される場合、「ヒト免疫エフェクター細胞」という用語は、それらが抗原結合分子またはFc融合タンパク質のFc領域に結合してエフェクター機能を実行することを通じて、それらの表面上にFc受容体をディスプレイする白血球の集団を指す。このような集団としては、限定されないが、末梢血単核細胞（PBMC）および/またはナチュラルキラー（NK）細胞および/またはマクロファージが挙げられ得る。

【0211】

本明細書で使用される場合、「増加したFc媒介性細胞傷害」という用語は、標的細胞を取り囲む培地中で、所定の時間に、所定の濃度の本発明の二重特異性抗体で、上記で定義されるFc媒介性細胞傷害の機構により溶解される「標的細胞」の数の増加、および/または標的細胞を取り囲む培地中で、所定の時間に、Fc媒介性細胞傷害の機構により、所定の数の「標的細胞」の溶解を達成するために必要な本発明の二重特異性抗体の濃度の減少のいずれかとして定義される。Fc媒介性細胞傷害の増加は、本明細書に記載される方法により、変化したグリコシル化パターンを有するように（例えば、グリコシルトランスフェラーゼ、GnTII、または他のグリコシルトランスフェラーゼまたはFUT8破壊を発現するように）操作された宿主細胞により産生されていない以外は、同じ標準条件を使用して同じタイプの宿主細胞により産生された同じ本発明の二重特異性抗体により媒介される細胞傷害に対するものである。

【0212】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、技術水準から公知の適切な方法で、本発明の抗体の重鎖および軽鎖を含む1つまたはそれを超えるベクターを指す。

【0213】

本明細書で使用される場合、「FUT8遺伝子の標的破壊により操作された宿主細胞」は、本発明の抗体を発現することができる宿主細胞であって、加えて、例えば米国特許第8067232号、米国特許第7425446号、米国特許第6946292号（これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる）およびYamane-Ohnuki Nら、Biotech Bioeng.; 87(2004)614-622に記載されているようにFUT8遺伝子の標的破壊により糖操作されることができる宿主細胞を指す。このような宿主細胞において発現される本発明の抗体は、N-アセチルグルコサミンを含有する還元末端を含むFc領域に結合した複合N-グリコシド結合糖鎖を含むFc領域を含み、前記糖鎖は、糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位に結合したフコースを含有しない。

【0214】

本発明はさらに、宿主細胞により産生される、50%~100%、60%~100%、70%~100%、80%~100%または90%~100%の非フコシル化を含むことを特徴とする本発明の二重特異性抗体の生産のための方法であって、前記宿主細胞において、本発明の二重特異性抗体をコードする核酸、およびグリコシルトランスフェラーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸、またはこのような核酸を含むベクターを発現させることを含む方法を対象とする。グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する遺伝子としては、(1,4)-N-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼIII(GnTIII)、 α -マンノシダーゼII(ManII)、(1,4)-ガラクトシルトランス

10

20

30

40

50

フェラーゼ (GalT)、(1,2)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I (GnTI) および (1,2)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ II (GnTII) が挙げられる。一実施形態では、グリコシルトランスフェラーゼ活性を有する遺伝子の組み合わせが、宿主細胞において発現される (例えば、GnTII および ManII)。同様に、前記方法はまた、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子が破壊または別様に不活性化された宿主細胞 (例えば、a1-6 コアフコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子の活性がロックアウトされた宿主細胞) における、二重特異性抗体をコードする 1 つまたはそれを超えるポリヌクレオチドの発現を包含する。別の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、グリコシル化パターンを改変するために GnTII 活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに発現する宿主細胞において産生され得る。特定の実施形態では、GnTII 活性を有するポリペプチドは、ゴルジ内在ポリペプチドのゴルジ局在化ドメインを含む融合ポリペプチドである。別の好ましい実施形態では、GnTII 活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現する宿主細胞における本発明の二重特異性抗体の発現は、増加した Fc 受容体結合親和性および増加したエフェクター機能を有する二重特異性抗体をもたらす。

10

【0215】

本発明はさらに、宿主細胞により産生される、50% ~ 100%、60% ~ 100%、70% ~ 100%、80% ~ 100% または 90% ~ 100% の非フコシル化を含むことを特徴とする本発明の二重特異性抗体の生産のための方法であって、前記宿主細胞において、本発明の二重特異性抗体および破壊 FUT8 遺伝子をコードする核酸を発現させることを含む方法を対象とする。

20

【0216】

一実施形態では、本発明の宿主細胞により産生される変化したグリコシル化を有する二重特異性抗体は、(例えば、グリコシルトランスフェラーゼ遺伝子の発現による) 宿主細胞の改変の結果として、増加した Fc 受容体結合親和性および / または増加したエフェクター機能を示す。好ましくは、増加した Fc 受容体結合親和性は、Fc RIIIIa 受容体などの Fc 活性化受容体への増加した結合である。

【0217】

一実施形態では、非フコシル化型オリゴ糖のパーセンテージは、50% ~ 100%、具体的には 60% ~ 100%、70% ~ 100%、より具体的には 80% ~ 100% である。非フコシル化型オリゴ糖は、ハイブリッドまたは複合体タイプのものであり得る。さらに別の実施形態では、本発明の方法により生産される二重特異性抗体は、本発明の方法によるそのオリゴ糖の改変の結果として、増加した割合の Fc 領域中の二分岐型オリゴ糖を有する。一実施形態では、二分岐型オリゴ糖のパーセンテージは、50% ~ 100%、具体的には 50%、60% ~ 70%、より具体的には 80% である。特に好ましい実施形態では、本発明の宿主細胞および方法により生産される二重特異性抗体は、増加した割合の Fc 領域中の二分岐型非フコシル化型オリゴ糖を有する。二分岐型非フコシル化型オリゴ糖は、ハイブリッドまたは複合体のいずれかであり得る。

30

【0218】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本発明の二重特異性抗体を生成するように操作され得る任意の種類 of 細胞系をカバーする。一実施形態では、宿主細胞は、改変糖型を有する抗原結合分子の生産を可能にするように操作される。特定の実施形態では、宿主細胞は、GnTII 活性を有する増加したレベルの 1 つまたはそれを超えるポリペプチドを発現するようにさらに操作されている。宿主細胞としては、培養細胞、例えば哺乳動物培養細胞、例えば CHO 細胞 (上記を参照のこと)、BHK 細胞、NSO 細胞、SP2/0 細胞、YO 骨髄腫細胞、P3X63 マウス骨髄腫細胞、PER 細胞、PER.C6 細胞またはハイブリドーマ細胞、酵母細胞、昆虫細胞および植物細胞、さらにほんの数例を挙げると、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物または培養植物もしくは動物組織内に含まれる細胞が挙げられる。本発明の糖操作された二重特異性抗体の生産するための宿主細胞は、例えば、米国特許第 6602684 号、米国特許出願公

40

50

開第20040241817号、米国特許出願公開第20030175884号および国際公開第2004065540号に記載されている。あるいは、本発明の二重特異性抗体は、米国特許出願公開第2003/0157108号、欧州特許出願公開第1176195号、国際公開第2003084570号、国際公開第2003085119号および米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許出願公開第2004/093621号、米国特許出願公開第2004/110282号、米国特許出願公開第2004/110704号、米国特許出願公開第2004/132140号（これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる）に開示されている技術にしたがって、減少したFc領域中のフコース残基を有するように糖操作され得る。本発明の糖操作された二重特異性抗体はまた、改変糖タンパク質、例えば国際公開第2003/056914号、国際公開第2004/057002号および国際公開第2004/024927号（これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる）に記載されているものを産生する発現系において生産され得る。

10

【0219】

本発明のさらなる実施形態では、本発明の抗体は、一置換S239D、I332E、G236A、二置換I332EおよびG236A、S239DおよびI332E（「DE置換」）、S239DおよびG236A、ならびに三置換S329DおよびI332EおよびG236A（「DEA置換」）からなる群より選択される1つまたは2つまたは3つのFc領域中のアミノ酸置換（「Fcアミノ酸置換」）を含む；（Richards J Oら、Mol. Cancer Ther. 7（2008）2517-2527）。重鎖のカウントが異なるので、これらのアミノ酸番号は、+/-1、2または3アミノ酸異なり得るが、3つすべてについて同じシフトである。配列番号5の重鎖の場合、1つのアミノ酸シフトがあるので、S329DおよびI332EおよびG236Aは、S328DおよびI331EおよびG235Aを表す。DE置換を有する配列番号5は配列番号23に示されており、DEA置換を有する配列番号5は配列番号24に示されている。二重特異性抗体のADCCおよび/またはADCP活性は、Fc部分のこのようなアミノ酸改変により増加され得る。

20

【0220】

本明細書で使用される場合、Fc置換の文脈における「親抗体、親二重特異性抗体」という用語は、Fc置換抗体と同じアミノ酸組成を含むが、前記置換を有しない本発明の二重特異性抗体を指す。このような比較のために、親抗体およびFc置換抗体は、糖操作された抗体の場合と同様に、同じ条件下で同じ宿主細胞において生産されるが、第1の場合では、Fc置換を有しない宿主細胞において生産され、第2の場合では、このようなFc置換を有する以外は同じ宿主細胞において生産される。有用な宿主細胞株は、例えば、CHO-K1である。

30

【0221】

本明細書で使用される場合、Fc置換を含む本発明の糖操作された二重特異性抗体の文脈における「親抗体、親二重特異性抗体」という用語、したがって、このような親抗体は、Fc置換抗体と同じアミノ酸組成を含むが、前記置換を有しない糖操作されていない各二重特異性抗体である。

40

【0222】

本発明のさらなる実施形態では、二重特異性抗体のADCCおよび/またはADCP活性は、Fc部分の糖操作と組み合わせたFc部分のアミノ酸置換により、各親抗体のADCCおよび/またはADCP活性と比較して増加される。

【0223】

したがって、一実施形態では、本発明は、ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合する二重特異性抗体であって、一置換S239D、I332E、G236A、二置換I332EおよびG236A、S239DおよびI332E、三置換S329DおよびI332EおよびG236Aからなる群より選択される1つまたは2つまたは3つのFc領域中のアミノ酸置換（「Fcアミノ酸置換」）を含み、50%~100%、60%

50

～ 100%、70%～100%、80%～100%または90%～100%のFc部分の非フコシル化を含むことを特徴とする二重特異性抗体を含む。

【0224】

実施例9は、ADCC活性およびさらにはADCP活性の決定に使用されるアッセイについて記載している。

【0225】

ADCCは、以下のようにインビトロADCCアッセイにより測定され得る：

1) アッセイは、二重特異性抗体のCEA結合領域により認識されるCEAを発現することが公知の標的細胞を使用する；

2) アッセイは、エフェクター細胞として、ランダムに選択された健常ドナーの血液から単離されたヒト末梢血単核細胞(PBMC)を使用する；

3) アッセイは、以下のプロトコールにしたがって行われる：

i) 標準的な密度遠心分離手順を使用してPBMCを単離し、RPMI細胞培養培地に細胞 6.25×10^6 個/mlで懸濁する；

ii) 標準的な組織培養方法により標的細胞を成長させ、90%よりも高い生存率で対数増殖期から回収し、RPMI細胞培養培地で洗浄し、 1×10^6 個の細胞について100マイクロキュリーの ^{51}Cr で標識し、細胞培養培地で2回洗浄し、細胞 0.25×10^6 個/mlの密度で細胞培養培地に再懸濁する；

iii) 20マイクロリットルの上記最終標的細胞懸濁液を96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移す；

iv) 細胞培養培地で二重特異性抗体を 4000 ng/ml から 0.12 ng/ml に系列希釈し、20マイクロリットルの得られた抗体溶液を96ウェルマイクロタイタープレート中の標的細胞に追加し、上記全濃度範囲をカバーする様々な抗体濃度を3回反復で試験する；

v) 最大放出(MR)対照については、標識標的細胞を含有するプレート中の3つのさらなるウェルに、二重特異性抗体溶液(上記ポイントiv)に代えて50マイクロリットルの5%(V/V)非イオン性界面活性剤水溶液(Triton, Sigma, St. Louis)を入れる；

vi) 自然放出(SR)対照については、標識標的細胞を含有するプレート中の3つのさらなるウェルに、二重特異性抗体溶液(上記ポイントiv)に代えて20マイクロリットルのRPMI細胞培養培地を入れる；

vii) 次に、96ウェルマイクロタイタープレートを $50 \times g$ で1分間遠心分離し、4で1時間インキュベートする；

viii) 40マイクロリットルのPBMC懸濁液(上記ポイントi)を各ウェルに追加して、エフェクター：標的(E:T)細胞比を50:1にし、プレートを5%CO₂雰囲気下、37のインキュベーター中に4時間置く；

ix) 各ウェルから無細胞上清を回収し、ガンマカウンターを使用して実験放出放射能(ER)を定量する；

x) 式 $(ER - MR) / (MR - SR) \times 100$ (式中、ERは、その抗体濃度について定量された平均放射能(上記ポイントixを参照のこと)であり、MRは、MR対照(上記ポイントvを参照のこと)について定量された平均放射能(上記ポイントixを参照のこと)であり、SRは、SR対照(上記ポイントviを参照のこと)について定量された平均放射能(上記ポイントixを参照のこと)である)にしたがって、各二重特異性抗体濃度について、特異的溶解のパーセンテージを計算する。

【0226】

本明細書で使用される場合、「増加したADCC」は、上記二重特異性抗体試験濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大パーセンテージの増加、および/または上記二重特異性抗体試験濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大パーセンテージの半分を達成するために必要な二重特異性抗体の濃度(EC50)の減少のいずれかとして定義される。ADCCの増加は、GnTIIを過剰発現するように操作された宿主細胞により、またはF

10

20

30

40

50

U T 8 遺伝子の標的破壊により操作された宿主細胞により産生されていない以外は、同じ標準的な生産、精製、製剤化および保存方法を使用して同じタイプの宿主細胞により産生された同じ二重特異性抗体（「親抗体」）により媒介された、上記アッセイを用いて測定された A D C C に対するものである。F c 中のアミノ酸置換の場合、A D C C の増加は、置換を保有しない親二重特異性抗体を用いて測定された A D C C に対するものである。F c 部分中のアミノ酸置換を含む糖操作された二重特異性抗体の場合、A D C C の増加は、置換を保有しない糖操作されていない親二重特異性抗体を用いて測定された A D C C に対するものである。

【0227】

抗 C E A 抗原結合分子を使用する治療用途および方法

10

本発明の C E A C A M x C D 4 7 二重特異性抗体は、単剤療法において、または特に C E A - T C B もしくは C E A - T C B 1 のような C E A x C D 3 T 細胞二重特異性抗体および/もしくは P D - 1 軸アンタゴニストとの併用療法において、主に腫瘍細胞のマクロファージ媒介性食作用による固形腫瘍の処置のために最適化される。本発明の抗体および C E A x C D 3 T 細胞二重特異性抗体は、以下に記載されるように投与され得る。

【0228】

特定の実施形態では、疾患または固形腫瘍は、限定されないが、結腸直腸腫瘍、非小細胞肺腫瘍、胃腫瘍、膵臓腫瘍および乳房腫瘍の群を含む、C E A を発現またはさらには過剰発現する癌である。特定の実施形態では、腫瘍は結腸直腸腫瘍である。本明細書に記載されるすべての治療用途の使用法、使用、組み合わせなどは、特にこれらの腫瘍/疾患の処置のための実施形態である。

20

【0229】

本発明者らは、本発明の抗体が、A D A の中和または有効性の喪失により、低い A D A 形成能を示すかもしくは A D A 形成能を示さず、または曝露の喪失を示すことを認識する。

【0230】

一実施形態では、本発明は、インビボで癌腫（癌、腫瘍、例えばヒト癌腫）、特に C E A 発現腫瘍を処置する方法を提供する。この方法は、被験体に、本発明の二重特異性抗体を含有する医薬有効量の組成物を投与することを含む。「被験体」は、ヒト被験体、一実施形態では、癌/腫瘍/癌腫を患っている患者を意味する。

【0231】

30

様々な腫瘍実体、特に結腸直腸癌腫、膵臓腺癌、胃癌、非小細胞肺癌、乳癌、頭頸部癌腫、子宮癌および膀胱癌などでは、C E A 発現は一般に非常に高い。胃腸管における健全な正常腺上皮では、C E A は、細胞の頂端表面上において偏向パターンで主に発現される。この偏向発現パターンは、全身投与される抗 C E A 単一特異性または二重特異性抗体によるアクセス可能性を制限するので、潜在的な毒性を制限する。本発明の抗体の低親和性 C D 4 7 結合と一緒に、これは、本発明の抗体によるこのような正常細胞の食作用の欠如または制限につながる。胃腸および他の悪性腫瘍の細胞では、この偏向発現パターンは喪失する。C E A は、癌細胞の細胞表面全体にわたって等しく発現されるが、これは、癌細胞が、正常健全細胞よりも本発明の抗体にはるかに良好にアクセス可能であり、本発明の C E A x C D 4 7 二重特異性抗体により、または上記組み合わせにより選択的に殺傷され得ることを意味する。

40

【0232】

一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、進行性固形腫瘍、一実施形態では C E A 発現腫瘍の処置のための単剤療法において使用され得る。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、同時、別個または逐次の組み合わせで C E A x C D 3 M a b と組み合わせて使用される。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、同時、別個または逐次の組み合わせで C E A x C D 3 M a b および/または P D - 1 軸アンタゴニストと組み合わせて使用される。一実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、同時、別個または逐次の組み合わせで P D - 1 軸アンタゴニストと組み合わせて使用される。このような P D - 1 軸アンタゴニストは、例えば、国際公開第 2 0 1 7 1 1 8 6 7 5 号に記載されている。

50

このような組み合わせは、マクロファージおよびT細胞により固形癌を攻撃する。2つのCEAxCD3 Mabが臨床開発中である(CEA-TCBおよびCEA-TCB1; clinicaltrials.govを参照のこと; NCT3866239のRO6958688およびNCT03539484のRO7172508)。MEDI-565は臨床開発中であったが、clinicaltrials.govにおいて進行中の臨床試験を特定することができなかった。一実施形態では、CEAおよびCD3に対する二重特異性抗体として、抗体CEA-TCBまたはCEA-TCB1が使用される。

【0233】

CEA-TCBで使用されるCEAへのバインダーは、抗CEA抗体PR1A3に由来する(例えば、欧州特許第2681244号を参照のこと)。この抗体は、CEAのいわゆるB3ドメインに結合する。CEA-TCBは、CEAに対する低いnM結合親和性を有し、高用量で有効性を示す(用量および患者当たり40~600mg; (例えば、J. Tabernerら、J. Clin. Oncol. 35, 2017 (suppl. Abstr. 3002))を参照のこと)。これらの用量では、細胞表面上のほぼすべてのCEA標的がCEA-TCBにより占有される。CEA-TCBまたはCEA-TCB1とCEAxCD47との組み合わせは、同時に両薬物の治療血漿レベルを生成し、両薬物がCEA抗原に対して非競合的である場合には、最良の結果(相加的またはさらには相乗的)を達成する。

【0234】

本明細書で使用される場合、本発明の抗体と、ヒトCEAおよびヒトCD3に結合する第2の二重特異性抗体との「組み合わせ、同時、別個または逐次の組み合わせ」という用語は、2つの抗体(または、本発明の抗体とCEAxCD3 MabとPD-1軸アンタゴニストとの組み合わせの場合には、3つの抗体)の別個または一緒のいずれかの任意の投与を指し、例えば別個、逐次、同時、併用、時間差または交互投与において併用療法の利益を得るために設計された適切な投与レジメンの一部として、2つまたは3つの抗体が投与される。したがって、2つまたは3つの抗体は、同じ医薬組成物の一部として、または別個の医薬組成物のいずれかで投与され得る。本発明の抗体は、第2の二重特異性抗体の投与の前に、それと同時にまたはその後またはそれらのいくつかの組み合わせで投与され得る。例えば、標準的な処置過程に本発明の抗体が反復間隔で患者に投与される場合、第2の二重特異性抗体は、本発明の抗体の各投与の前に、それと同時にもしくはその後にもしくはそれらのいくつかの組み合わせで、または本発明の抗体による処置に関連して異なる間隔で、または本発明の抗体による処置過程の前に、その間の任意の時点にもしくはその後単回投与で投与され得る。一実施形態では、本発明の抗体および第2の二重特異性抗体は、一実施形態では、本発明の抗体および第2の抗体の投与の間の6~15日間の間隔で交互投与で投与される。このような交互投与では、第1の用量は、本発明の抗体または第2の抗体であり得る。

【0235】

「PD-1軸アンタゴニスト」という用語は、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体を指す。抗PD-1抗体は、例えば、ペンブロリズマブ(Keytruda(登録商標)、MK-3475)、ニボルマブ、ピジリズマブ、ランブロリズマブ、MEDI-0680、PDR001およびREGN2810である。抗PD-1抗体は、例えば、5国際公開第200815671号、国際公開第2013173223号、国際公開第2015026634号、米国特許第7521051号、米国特許第8008449号、米国特許第8354509号、国際公開第2009114335号、国際公開第2015026634号、国際公開第2008156712号、国際公開第2015026634号、国際公開第2003099196号、国際公開第2009101611号、国際公開第2010/027423号、国際公開第2010/027827号、国際公開第2010/027828号、国際公開第2008/156712号および国際公開第2008/156712号(これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。

【0236】

10

20

30

40

50

抗PD-L1抗体は、例えば、アテゾリズマブ、MDX-1105、デュルバルマブおよびアベルマブである。抗PD-L1抗体は、例えば、国際公開第2015026634号、国際公開第2013/019906号、国際公開第2010077634号、米国特許第8383796号、国際公開第2010077634号、国際公開第2007005874号および国際公開第2016007235号（これらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる）に記載されている。

【0237】

本発明の抗体および第2の二重特異性抗体の併用投与に関して、両化合物は、1つの単一剤形で、または別個の剤形で、例えば2つの異なるもしくは同一の剤形で存在し得る。

【0238】

本発明の抗体および第2の抗体がCEACAM5に関して競合しない場合、一実施形態では、医師が所望する場合には、両抗体は同時投与され得る。本発明の抗体および第2の抗体がCEACAM5に関して競合する場合、一実施形態では、両抗体は交互投与で投与される。

【0239】

本発明の抗体は、典型的には、当技術分野で公知のように、患者が処置されている癌の（有効性および安全性の両方の観点から）最も有効な処置を提供する投与レジメンで患者に投与される。好ましくは、腫瘍細胞は、T細胞およびマクロファージにより同時に攻撃され、このアプローチの完全な治療可能性を達成するために、CEA-CD3およびCEA×CD47二重特異性抗体は、細胞表面上のCEAへの結合に関して非競合的でない。

【0240】

上記のように、投与される抗体の量および本発明の抗体の投与のタイミングは、処置されている患者のタイプ（例えば、性別、年齢、体重）および症状、処置されている疾患または症状の重症度、ならびに投与経路に依存し得る。例えば、本発明の抗体および第2の抗体は、0.1~100mg/kg体重/日/週の範囲の用量で、単回もしくは分割投与で、または連続注入により患者に投与され得る。一実施形態では、本発明の抗体および第2の抗体はそれぞれ、0.1~20mg/kgの範囲の用量で患者に投与される。いくつかの場合では、上記範囲の下限未満の投与量レベルが適切であり得るが、他の場合では、いかなる有害な副作用も引き起こさずにさらに高い用量が用いられ得る。

【0241】

本明細書で使用される場合、「抗体の半減期」という用語は、例えば、実施例17に記載されているように、通常の薬物動態アッセイで測定された場合の前記抗体の半減期を指す。本発明の抗体と、CEAおよびCD3に対する第2の二重特異性抗体とは、3~14日間の消失半減期を有する。

【0242】

別の態様では、本発明はまた、疾患、特にCEAが発現される、特に同じ細胞タイプの正常組織と比較してCEAが異常発現される（例えば、細胞表面上において異なるパターンで過剰発現または発現される）細胞増殖障害の処置における本発明の二重特異性抗体の使用を対象とする。このような障害としては、限定されないが、結腸直腸癌、NSCLC（非小細胞肺癌）、胃癌、膵臓癌および乳癌が挙げられる。CEA発現レベルは、当技術分野で公知の方法により（例えば、免疫組織化学アッセイ、免疫蛍光アッセイ、免疫酵素アッセイ、ELISA、フローサイトメトリー、ラジオイムノアッセイなどを介して）決定され得る。

【0243】

一態様では、本発明の二重特異性抗体は、CEAを発現するインビボまたはインビトロの細胞をターゲティングするために使用され得る。本発明の二重特異性抗体は、腫瘍細胞のADCPおよびADCCの誘導を介した腫瘍形成の予防、腫瘍の根絶および腫瘍成長または転移の阻害において特に有用である。本発明の二重特異性抗体は、CEAを発現する任意の腫瘍を処置するために使用され得る。本発明の二重特異性抗体で処置され得る特定

10

20

30

40

50

の悪性腫瘍としては、限定されないが、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、胃癌、膵臓癌および乳癌が挙げられる。

【0244】

本発明の二重特異性抗体は、薬学的に許容され得る剤形、例えばボラスとして静脈内の、または筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所もしくは吸入経路による一定期間にわたる連続注入によりヒトに投与され得るものを含む以下で議論されているもので、哺乳動物、好ましくはヒトに投与される。本発明の二重特異性抗体はまた、腫瘍内、腫瘍周囲、病変内または病変周囲経路により適切に投与されて、局所的および全身的な治療効果を発揮する。

【0245】

疾患の処置について、本発明の二重特異性抗体の適切な投与量は、処置すべき疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、以前の治療、患者の病歴および抗体に対する反応、ならびに主治医の裁量に依存する。本発明の二重特異性抗体は、一度にまたは一連の処置にわたって患者に適切に投与される。本発明は、CEAを発現する腫瘍細胞を選択的に殺傷するための方法を提供する。

【0246】

前記方法は、本発明の二重特異性抗体と前記腫瘍細胞との相互作用を含む。これらの腫瘍細胞は、結腸直腸癌腫、非小細胞肺癌腫（NSCLC）、胃癌腫、膵臓癌腫および乳癌腫を含むヒト癌腫に由来し得る。

【0247】

別の態様では、本発明は、異常なCEA発現に関する疾患を処置するための医薬の製造のための本発明の二重特異性抗体の使用を対象とする。特定の実施形態では、疾患は、限定されないが、結腸直腸腫瘍、非小細胞肺腫瘍、胃腫瘍、膵臓腫瘍および乳房腫瘍を含む、CEAを発現またはさらには過剰発現する癌である。特定の実施形態では、腫瘍は結腸直腸腫瘍である。

【0248】

組成物、製剤、投与量および投与経路

一態様では、本発明は、本発明の二重特異性抗体と、薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物を対象とする。本発明はさらに、癌などの疾患の処置の方法における、または癌などの疾患の処置のための医薬の製造におけるこのような医薬組成物の使用を対象とする。具体的には、本発明は、疾患の処置のための、より具体的には癌の処置のための方法であって、治療有効量の本発明の医薬組成物を投与することを含む方法を対象とする。

【0249】

一態様では、本発明は、上記で定義されるように、ヒト癌腫、腫瘍を処置するための医薬組成物、組み合わせおよび方法を包含する。例えば、本発明は、ヒト癌腫の処置において使用するための医薬組成物であって、医薬有効量の本発明の抗体と、薬学的に許容され得る担体とを含む医薬組成物を含む。

【0250】

本発明の二重特異性抗体組成物は、限定されないが、静脈内、腹腔内、経口、リンパ内または直接腫瘍内投与を含む従来の投与様式を使用して投与され得る。静脈内投与または皮下投与が好ましい。

【0251】

本発明の一態様では、本発明の二重特異性抗体を含有する治療製剤は、所望の純度を有する抗体を任意の薬学的に許容され得る担体、賦形剤または安定剤と混合することにより（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）、凍結乾燥製剤または液体製剤の形態で保存のために調製される。許容され得る担体、賦形剤または安定剤は、用いられる投与量および濃度でレシピエントに非毒性である。インピボ投与に使用すべき製剤は滅菌のものでなければならない。これは、滅菌濾過膜による濾過により容易に達成される。本発明の医薬組成物のための最も有効な投与様式および投与レジメンは、疾患の重症度およ

10

20

30

40

50

び経過、患者の症状および処置に対する反応、ならびに処置医師の判断に依存する。したがって、組成物の投与量は、均一な用量であり得るか、または個々の患者、例えば体重に適合され得る。それにもかかわらず、本発明の組成物の有効用量は、一般に、 $0.1 \sim 20 \text{ mg / kg}$ の範囲内であり得る。

【0252】

本発明の二重特異性抗体は、 150 kD /モルの大きさの分子量を有する。一実施形態では、それらはFc部分を保有する。患者における消失半減期は3～14日間の範囲内である。この半減期は、限定されないが、1日に1回、1週間に1回または2週間ごとに1回の投与を可能にする。

【0253】

本発明の二重特異性抗体およびそれらの各組成物は、限定されないが、液体溶液または懸濁液、錠剤、ピル、粉末、坐剤、ポリマーマイクロカプセルまたは微小胞、リボソームおよび注射液または注入液を含む様々な剤形であり得る。好ましい形態は、投与様式および治療用途に依存する。

【0254】

本発明の二重特異性抗体を含む組成物は、良好な医療行為と合う方法で製剤化、投薬および投与される。この文脈における考慮要因としては、処置されている特定の疾患または障害、処置されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、疾患または障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医者に公知の他の要因が挙げられる。

【0255】

製品

本発明の別の態様では、上記障害の処置、予防および/または診断に有用な材料を含有する製品が提供される。製品は、容器と、容器の上のまたはそれに付随するラベルまたは添付文書とを含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、輸液バッグなどが挙げられる。容器は、様々な材料、例えばガラスまたはプラスチックから形成され得る。容器は、それ自体により、または別の組成物と組み合わせて症状を処置、予防および/もしくは診断するために有効な組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針により穿刺可能なストッパーを有する輸液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の二重特異性抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が、選択した症状を処置するために使用されることを示す。また、製品は、(a)組成物がその中に含まれる第1の容器であって、前記組成物が本発明の二重特異性抗体を含む第1の容器；および(b)組成物がその中に含まれる第2の容器であって、前記組成物がさらなる細胞毒性剤または他の治療剤を含む第2の容器を含み得る。本発明のこの実施形態における製品は、組成物が特定の症状を処置するために使用され得ることを示す添付文書をさらに含み得る。あるいはまたは加えて、製品は、薬学的に許容され得るバッファー、例えば注射用静菌水(BWF I)、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液を含む第2の(または第3の)容器をさらに含み得る。それは、他のバッファー、希釈剤、フィルタ、針およびシリンジを含む商業的および利用者の観点から望ましい他の材料をさらに含み得る。

【0256】

発明のさらなる実施形態

以下の実施形態では、ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合する二重特異性抗体が記載される。

【0257】

1. ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含む、二重特異性抗体。

【0258】

2. Fc領域が、糖操作されていない以外は同じ二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように糖操作されていることを特徴とする、実施形態1に記載の

10

20

30

40

50

二重特異性抗体。

【0259】

3. 前記第1の結合部分が、アミノ酸35～144のCEACAM5のIg様Vタイプドメインに結合することを特徴とする、実施形態1または2に記載の二重特異性抗体。

【0260】

4. 前記二重特異性抗体が、CEACAM5への結合について抗体SM3Eと競合することを特徴とする、実施形態1～3のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0261】

5. 前記二重特異性抗体が、抗体SM3E、MEDI、LAB、SAR、T86.66、CH1A1Aと競合しないことを特徴とする、実施形態1～3のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

【0262】

6. 前記二重特異性抗体の食作用のEC50値が、同じ実験条件下および1mg/mlヒトIgGの存在下または1mg/mlヒトIgGなしの場合における参照抗体K2AC22のEC50値の0.1～10倍の範囲内であることを特徴とする、実施形態1～5のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0263】

7. 1mg/mlヒトIgGの存在下では、イメージングベースのアッセイで測定された食作用指数の最大が、同じ実験条件下におけるヒトIgGなしの食作用と比較して30%超減少しないことを特徴とする、実施形態1～6のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

【0264】

8. 前記第1の結合部分について一価であり、前記第2の結合部分について一価であることを特徴とする、実施形態1～7のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0265】

9. 前記第1および第2の結合部分がそれぞれ、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含むことを特徴とする、実施形態1～8のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0266】

10. ヒトIgG1タイプのものであることを特徴とする、実施形態1～9のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

30

【0267】

11. 定常および可変フレームワーク領域配列がヒトまたはヒト起源のものであることを特徴とする、実施形態1～10のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0268】

12. 全長抗体であることを特徴とする、実施形態1～11のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0269】

13. ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含む第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む第2の結合部分とを含むことを特徴とする、実施形態1～12のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

40

【0270】

14. ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分であって、ラムダ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含む第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む第2の結合部分とを含むことを特徴とする、実施形態1～12のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0271】

50

15. 共通重鎖を含むことを特徴とする、実施形態13または14のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0272】

16. a) 前記第1の結合部分が、配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号13のヒトラムダタイプの軽鎖定常ドメインとを含み、前記第2の結合部分が、配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号7のCDRL1、配列番号8に含まれるAla Ala SerのCDRL2および配列番号9のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含むか、または

b) 前記第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号13のヒトラムダタイプの軽鎖定常ドメインとを含み、前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする、実施形態1~15のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0273】

17. ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含むことを特徴とし、

a) 前記第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、

配列番号31、32および33；配列番号34、35および36、配列番号37、38および39、配列番号40、41および42、配列番号43、44および45、配列番号46、47および48、配列番号49、50および51、配列番号52、53および54、配列番号55、56および57、配列番号58、59および60、配列番号61、62および63、ならびに配列番号112、113および114からなる群より選択されるCDRL1、CDRL2およびCDRL3の組み合わせを含む軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号7のCDRL1、配列番号8に含まれるAla Ala SerのCDRL2および配列番号9のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含むか、または

前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3ならびに必要に応じて配列番号13のヒトラムダタイプの軽鎖定常ドメインを含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする、実施形態1~16のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0274】

18. ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含むことを特徴とし、

a) 前記第1の結合部分が、配列番号4の重鎖可変領域と、

配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74および配列番号115からなるVLC L領域に含まれるVLの群より選択される軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 前記第1の結合部分が、配列番号4の重鎖可変領域と、配列番号10の軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする、実施形態1~17のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0275】

19. ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含むことを特徴とし、

10

20

30

40

50

a) 前記第1の結合部分が、配列番号5の重鎖と、

配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74および配列番号115からなる群より選択される軽鎖とを含み、ならびに

b) 前記第2の結合部分が、配列番号5の重鎖可変領域と、配列番号11の軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする、実施形態1~18のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【0276】

20. ヒトIgG1タイプの全長二重特異性抗体であり、前記第1の結合部分について一価であり、前記第2の結合部分について一価であり、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含む第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む第2の結合部分とを含むか、またはヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分であって、ラムダ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含む第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分であって、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む第2の結合部分とを含むことを特徴とする、実施形態1~19のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

【0277】

21. 100nM~600nM、好ましくは100~500nMの結合親和性でヒトCD47に結合することを特徴とする、実施形態1~20のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

【0278】

22. 1~200nMのEC50値でMKN-45細胞に結合することを特徴とする、実施形態1~21のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0279】

23. 100nM~500nMの結合親和性でヒトCD47に結合し、1~200nMのEC50値でMKN-45細胞に結合することを特徴とする、実施形態1~22のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0280】

24. a) 前記二重特異性抗体による、ヒトマクロファージの存在下におけるMKN-45細胞の食作用指数曲線のEC50が、200ng/ml可溶性CEAの存在下では、可溶性CEAなしで測定されたEC50と比較して高い濃度の方向に4倍超シフトせず、および/もしくは前記食作用指数曲線の最大が、200ng/ml可溶性CEAの追加により10%もしくはそれを超えて、15%もしくはそれを超えてもしくは20%もしくはそれを超えて減少せず、ならびに/または

30

b) MKN-45細胞への前記二重特異性抗体の結合曲線のEC50が、200ng/ml可溶性CEAの存在下では、可溶性CEAなしで測定されたEC50と比較して高い濃度の方向に2倍超シフトしないことを特徴とする、実施形態1~23のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0281】

40

25. ヒト組換えCEACAM5およびCEACAM6に結合し、組換えCEACAM5およびヒトCEACAM6への結合のEC50値が3倍未満異なることを特徴とする、実施形態1~24のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0282】

26. a) 前記第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号112のCDRL1、配列番号113のCDRL2および配列番号114のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含み、

b) 前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番

50

号 28 の C D R L 1、配列番号 29 の C D R L 2 および配列番号 30 の C D R L 3 を含む軽鎖可変領域とを含むことを特徴とする、実施形態 25 に記載の二重特異性抗体。

【0283】

27. ヒト C E A C A M 5 および C D 3 に特異的に結合する二重特異性抗体であって、重鎖として配列番号 97 および 98 の重鎖と、軽鎖として配列番号 96 および 99 の軽鎖とを含む 300 nM の濃度の二重特異性抗体が、MKN-45 細胞への本発明の二重特異性抗体の前記結合曲線の前記 E C 50 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせないことを特徴とする、実施形態 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0284】

28. ヒト C E A C A M 5 および C D 3 に特異的に結合する二重特異性抗体（さらに C E A - T C B 1 とも称される）であって、重鎖および軽鎖として配列番号 92 ~ 95 のアミノ酸配列の鎖を含む 30 nM の濃度の二重特異性抗体が、MKN-45 細胞への本発明の二重特異性抗体の前記結合曲線の前記 E C 50 を一実施形態ではより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせないことを特徴とする、実施形態 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0285】

29. 前記 F c 領域が、各親二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように糖操作されていることを特徴とする、実施形態 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0286】

30. 前記 F c 領域中の N 結合型オリゴ糖の 50% ~ 100% が非フコシル型であることを特徴とする、実施形態 29 に記載の二重特異性抗体。

【0287】

31. 前記 F c 領域中の N 結合型オリゴ糖の 50% ~ 100% が二分岐型であることを特徴とする、実施形態 29 または 30 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0288】

32. 前記 F c 領域中の N 結合型オリゴ糖の 80% ~ 100% が二分岐型および非フコシル化型であることを特徴とする、実施形態 29 から 31 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0289】

33. 前記抗体により誘導された A D C C の E C 50 値および / もしくは A D C C 最大が 1.2 ~ 2.0 倍もしくは少なくとも 2.0 倍増加しており、ならびに / または前記食作用指数曲線の E C 50 値が、前記各親二重特異性抗体により誘導された A D C C の最大および / もしくは E C 50 値と比較して少なくとも 1.2 ~ 2.0 倍もしくは少なくとも 2.0 倍減少していることを特徴とする、実施形態 29 ~ 32 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0290】

34. 前記抗体により誘導されてイメージングにより決定された食作用指数の最大が少なくとも 3 倍増加しており、ならびに / または前記食作用指数曲線の E C 50 値が、前記各親二重特異性抗体により誘導された前記食作用指数の最大または E C 50 値と比較して少なくとも 3 倍または少なくとも 5 倍減少していることを特徴とする、実施形態 29 ~ 33 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0291】

35. 実施形態 29 ~ 34 および 30 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の生産のための方法であって、

a) 前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件であって、前記二重特異性抗体の前記 F c 領域上に存在するオリゴ糖の糖操作改変を可能にする条件下で、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ I I I 活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの核酸を発現するように操作された宿主細胞を培養すること ; および

10

20

30

40

50

b) ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合することができる前記糖操作された二重特異性抗体を単離することを含むことを特徴とする、方法。

【0292】

36. 実施形態29～30および33～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の生産のための方法であって、

a) 前記本発明の糖操作された二重特異性抗体の生産を可能にする条件であって、前記二重特異性抗体の前記Fc領域上に存在するオリゴ糖の糖操作改変を可能にする条件下で、FUT8遺伝子の標的破壊により糖操作された宿主細胞を培養すること、および

b) ヒトCEACAM5およびヒトCD47に特異的に結合することができる前記糖操作された二重特異性抗体を単離することを含むことを特徴とする、方法。

10

【0293】

37. 実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードすることを特徴とする、単離されたポリヌクレオチド。

【0294】

38. 実施形態37に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【0295】

39. 実施形態38に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【0296】

40. 実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

20

【0297】

41. 腫瘍細胞の細胞溶解を誘導する方法であって、前記腫瘍細胞を、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と接触させることを含む、方法。

【0298】

42. 前記腫瘍細胞が、結腸直腸癌細胞、NSCLC(非小細胞肺癌)細胞、胃癌細胞、膵臓癌細胞、乳癌細胞、またはヒトCEACAM5を発現する別の腫瘍細胞であることを特徴とする、実施形態41に記載の方法。

【0299】

43. CEAを発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に治療有効量の実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

30

【0300】

44. CEAを発現する癌を有する被験体の生存期間を増加させる方法であって、前記被験体に治療有効量の実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

【0301】

45. 前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌、膵臓癌または乳癌であることを特徴とする、実施形態43または44に記載の方法。

40

【0302】

46. 化学療法または放射線療法と組み合わせて、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をヒト被験体に投与することを特徴とする、実施形態43～45のいずれか一項に記載の方法。

【0303】

47. CEAを発現する癌を有する被験体を処置するための医薬の製造において使用するための、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0304】

48. 前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌、膵臓癌および乳癌からなる群より選択されることを特徴とする、実施形態47に記載の使用のための二重特

50

異性抗体。

【0305】

49. CEAを発現する癌を有する被験体を処置する方法において使用するための、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、前記方法が、前記被験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み、前記二重特異性抗体の食作用のEC50値が、同じ実験条件下ならびに1mg/mlヒトIgGの存在下および/または1mg/mlヒトIgGなしの場合における、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含む参照抗体K2AC22であって、前記第1の結合部分が、配列番号5の重鎖および配列番号65の軽鎖を含み、前記第2の結合部分が、配列番号5の重鎖および配列番号11の軽鎖を含む参照抗体K2AC22のEC50値の0.1～10倍の範囲内であることを特徴とする、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

【0306】

50. CEAを発現する癌を有するヒト被験体の処置において、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分と、ヒトCD3に特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含む、第1の二重特異性抗体。

【0307】

51. 前記第2の二重特異性抗体の前記第4の結合部分が、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに結合することを特徴とする、実施形態50に記載の使用のための第1の二重特異性抗体。

20

【0308】

52. 前記第2の抗体が、重鎖および軽鎖として配列番号96～99の鎖を含むか、または重鎖および軽鎖として配列番号92～95のアミノ酸配列の鎖を含み、300nMまたは30nMの濃度の前記第2の抗体が、MKN-45細胞への前記第1の二重特異性抗体の前記結合曲線の前記EC50を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせないことを特徴とする、実施形態50または51に記載の使用のための第1の二重特異性抗体。

【0309】

53. CEAを発現する癌を有する被験体の処置において、重鎖および軽鎖として配列番号96～99の鎖を含むか、または重鎖および軽鎖として配列番号92～95のアミノ酸配列の鎖を含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

30

【0310】

54. 重鎖および軽鎖として配列番号96～99の鎖を含むか、または重鎖および軽鎖として配列番号92～95のアミノ酸配列の鎖を含む第2の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とし、ヒトCEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、前記第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、実施形態1～34および50～53のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

40

【0311】

55. ヒトCEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、a)ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含むか、またはb)それぞれ重鎖および軽鎖として配列番号96～99の鎖もしくは重鎖および軽鎖として配列番号92～95のアミノ酸配列の鎖を含む第2の二重特異性抗体と、ヒトCEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、実施形態1～34および50～53のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、300nM(配列番号96～99)または30nM(配列番号92～

50

95) の濃度の前記第2の二重特異性抗体が、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体のMKN-45細胞の前記食作用指数曲線の前記EC50をより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない、実施形態1～34および50～53のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0312】

56. 前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌、膵臓癌および乳癌であることを特徴とする、実施形態50～55のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性抗体。

【0313】

57. 実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体および前記第2の二重特異性抗体が、6～15日間隔で前記被験体に交互にまたは同時に投与されることを特徴とする、実施形態50～56のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性抗体。

10

【0314】

58. ヒトCEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において使用するための、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む組成物であって、a) ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含むか、またはb) 重鎖および軽鎖として配列番号96～99の鎖もしくは重鎖および軽鎖として配列番号92～95のアミノ酸配列の鎖を含む第2の二重特異性抗体と交差反応しないことを特徴とする、組成物。

20

【0315】

59. ヒトCEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、a) ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含むか、またはb) 重鎖および軽鎖として配列番号96～99の鎖もしくは重鎖および軽鎖として配列番号92～95のアミノ酸配列の鎖を含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む組成物であって、300nMまたは30nM(配列番号92～95)の濃度の前記第2の二重特異性抗体が、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体のMKN-45細胞の前記食作用指数曲線の前記EC50を一実施形態ではより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない、組成物。

30

【0316】

60. 前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌、膵臓癌および乳癌であることを特徴とする、実施形態58または59に記載の組成物。

【0317】

61. CEAを発現する癌を有する被験体を処置する方法において使用するための、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、前記方法が、前記被験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、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

40

【0318】

62. CEAを発現する癌を有する被験体の生存期間を増加させる方法において使用するための、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、前記方法が、前記被験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、実施形態1～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【0319】

63. 前記二重特異性抗体が、化学療法または放射線療法と組み合わせてヒト被験体に投与されることを特徴とする、実施形態61または62のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

50

【 0 3 2 0 】

64. 前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、胃癌、膵臓癌または乳癌であることを特徴とする、実施形態60または62のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【表1-1】

表1:配列表

配列番号	以下のものに関する
配列番号1	Mab CD47 CDRH1 (IMGT)
配列番号2	Mab CD47 CDRH2 (IMGT)
配列番号3	Mab CD47 CDRH3 (IMGT)
配列番号4	Mab CD47 VH
配列番号5	Mab CD47重鎖
配列番号6	Mab CD47重鎖 (核酸)
配列番号7	Mab CD47 CDRL1 (IMGT)
配列番号8	Mab CD47 CDRL2 (Ala Ala Serのみ; IMGT)
配列番号9	Mab CD47 CDRL3 (IMGT)
配列番号10	Mab CD47 VL
配列番号11	Mab CD47軽鎖; KA3 (K2)
配列番号12	Mab CD47軽鎖 (核酸); KA3 (K2)
配列番号13	第1の結合部分CL
配列番号14	プライマー実施例12
配列番号15	プライマー実施例12
配列番号16	プライマー実施例12
配列番号17	プライマー実施例12
配列番号18	プライマー実施例12
配列番号19	プライマー実施例12
配列番号20	MAB CEA可変重鎖
配列番号21	MAB CEA可変軽鎖
配列番号22	CD3イプシロンのエピトープ
配列番号23	Mab CD47重鎖, DE置換
配列番号24	Mab CD47重鎖, DEA置換
配列番号25	Mab CD47 CDRH1 (Kabat)
配列番号26	Mab CD47 CDRH2 (Kabat)
配列番号27	Mab CD47 CDRH3 (Kabat)
配列番号28	Mab CD47 CDRL1 (Kabat); KA3
配列番号29	Mab CD47 CDRL2 (Kabat); KA3
配列番号30	Mab CD47 CDRL3 (Kabat); KA3

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

配列番号31	Mab CEA CDRL1; 1D9 (AC5)	
配列番号32	Mab CEA CDRL2; 1D9 (AC5)	
配列番号33	Mab CEA CDRL3; 1D9 (AC5)	
配列番号34	Mab CEA CDRL1; 1G6 (AC22)	
配列番号35	Mab CEA CDRL2; 1G6 (AC22)	
配列番号36	Mab CEA CDRL3; 1G6 (AC22)	
配列番号37	Mab CEA CDRL1; 1D5 (AC10)	10
配列番号38	Mab CEA CDRL2; 1D5 (AC10)	
配列番号39	Mab CEA CDRL3; 1D5 (AC10)	
配列番号40	Mab CEA CDRL1; 2B8 (AC13)	
配列番号41	Mab CEA CDRL2; 2B8 (AC13)	
配列番号42	Mab CEA CDRL3; 2B8 (AC13)	
配列番号43	Mab CEA CDRL1; 1A2 (AC18)	
配列番号44	Mab CEA CDRL2; 1A2 (AC18)	
配列番号45	Mab CEA CDRL3; 1A2 (AC18)	20
配列番号46	Mab CEA CDRL1; 1A8 (AC23)	
配列番号47	Mab CEA CDRL2; 1A8 (AC23)	
配列番号48	Mab CEA CDRL3; 1A8 (AC23)	
配列番号49	Mab CEA CDRL1; 2F4 (AC25)	
配列番号50	Mab CEA CDRL2; 2F4 (AC25)	
配列番号51	Mab CEA CDRL3; 2F4 (AC25)	
配列番号52	Mab CEA CDRL1; 2F7 (AC26)	
配列番号53	Mab CEA CDRL2; 2F7 (AC26)	
配列番号54	Mab CEA CDRL3; 2F7 (AC26)	30
配列番号55	Mab CEA CDRL1; 2C11 (AC27)	
配列番号56	Mab CEA CDRL2; 2C11 (AC27)	
配列番号57	Mab CEA CDRL3; 2C11 (AC27)	
配列番号58	Mab CEA CDRL1; C11 (AC28)	
配列番号59	Mab CEA CDRL2; C11 (AC28)	
配列番号60	Mab CEA CDRL3; C11 (AC28)	
配列番号61	Mab CEA CDRL1; 2B5 (AC29)	
配列番号62	Mab CEA CDRL2; 2B5 (AC29)	40

【表 1 - 3】

配列番号63	Mab CEA CDRL3; 2B5 (AC29)	
配列番号64	Mab CEA 1D9 VLCL2 CEA (AC5)	
配列番号65	Mab CEA 1G6 VLCL2 CEA (AC22)	
配列番号66	Mab CEA 1D5 VLCL2 CEA (AC10)	
配列番号67	Mab CEA 2B8 VLCL2 CEA (AC13)	
配列番号68	Mab CEA 1A2 VLCL2 CEA (AC18)	
配列番号69	Mab CEA 1A8 VLCL2 CEA (AC23)	10
配列番号70	Mab CEA 2F4 VLCL2 CEA (AC25)	
配列番号71	Mab CEA 2F7 VLCL2 CEA (AC26)	
配列番号72	Mab CEA 2C11 VLCL2 CEA (AC27)	
配列番号73	Mab CEA C11 VLCL2 CEA (AC28)	
配列番号74	Mab CEA 2B5 VLCL2 CEA (AC29)	
配列番号75	核酸1D9 VLCL2 CEA (AC5)	
配列番号76	核酸1G6 VLCL2 CEA (AC22)	
配列番号77	核酸1D5 VLCL2 CEA (AC10)	20
配列番号78	核酸2B8 VLCL2 CEA (AC13)	
配列番号79	核酸1A2 VLCL2 CEA (AC18)	
配列番号80	核酸1A8 VLCL2 CEA (AC23)	
配列番号81	核酸2F4 VLCL2 CEA (AC25)	
配列番号82	核酸2F7 VLCL2 CEA (AC26)	
配列番号83	核酸2C11 VLCL2 CEA (AC27)	
配列番号84	核酸C11 VLCL2 CEA (AC28)	
配列番号85	核酸2B5 VLCL2 CEA (AC29)	
配列番号86	ヒトCEA (CEACAM5); 全長DNA	30
配列番号87	ヒトCEA (CEACAM5); 全長タンパク質	
配列番号88	MAB CEA1 VH (配列番号31)およびCEA VH-CH1(EE)-Fc (ホール、P329G LALA)の一部 [配列番号36] aa TCB 国際公開第2017055389号) および配列番号37	
配列番号89	MAB CEA1 VL (配列番号32)およびHum. CEA VL-CL(RK)の一部[配列番号38] aa TCB 国際公開第201705538号	
配列番号90	MAB CD3 VH (配列番号33)およびCD3 VH-CL(CK)	40

【表 1 - 4】

	の一部 aa TCB 国際公開第2017055389号 [配列番号34])	
配列番号91	MAB CD3 VL, (配列番号 34)および CEA VH-CH1(EE)-CD3 VL-CH1-Fc (ノブ、P329G LALA)の一部[配列番号37] aa TCB 国際公開第2017055389号)	
配列番号92	CD3 VH-CL(CK)	10
配列番号93	CEA VH-CH1(EE)-Fc (ホール、P329G LALA)	
配列番号94	CEAVH-CH1(EE)-CD VL-CH1-Fc (ノブ、P329G) LALA)	
配列番号95	CEA VL-CL(RK)	
配列番号96	CD3 CH2527 Cross Fab VL-CH1	
配列番号97	CH1A10 VH CH1 FC ホールP329G LALA	
配列番号98	CH1A1A CD3 CH2527 Cross Fab VH-CK FC ノブP329G LALA	
配列番号99	LC CEA	20
配列番号100	VK_SM3E	
配列番号101	VH_SM3E	
配列番号102	VL_MEDI	
配列番号103	VH_MEDI	
配列番号104	VK_SAR	
配列番号105	VH_SAR	
配列番号106	VK_CH1A1A	
配列番号107	VH_CH1A1A	
配列番号108	VK_T84.66	30
配列番号109	VH_T84.66	
配列番号110	VK_ラベツズマブ	
配列番号111	VH_ラベツズマブ	
配列番号112	Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL1	
配列番号113	Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL2	
配列番号114	Mab CEA 1B2 (AC39) CDRL3	
配列番号115	Mab CEA 1B2 (AC39) VLCL2	
配列番号116	Mab CEA 1B2 (AC39) VLCL2, 核酸	40

配列番号92～95はCEA-TCB1を指し、配列番号96～99はCEA-TCBを指す。

A l a : アラニン ; S e r : セリン

【実施例】

【0321】

実施例1 ヒトCD47のクローニング、発現および精製
クローニング

特定のオリゴヌクレオチドを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、ヒトCD47(hCD47)の細胞外ドメインに対応する配列をヒトcDNAから増幅する。増

幅産物をゲル精製し、pEAK8哺乳動物発現ベクター(Edge Biosystems, Gaithersburg, Md.)にクローニングする。C末端にAvitag(商標)(Avidity, Denver Colo.)およびヘキサヒスチジンタグを導入するようにベクターをさらに改変して、それぞれタンパク質の単一部位ビオチン化およびIMAC(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)による精製を可能にする。DNAシーケンシングにより、構築物を検証する。

【0322】

発現

次いで、Lipofectamine 2000(ThermoFisher Scientific)などのリポソームベースのトランスフェクション試薬を使用して、プラスミドを哺乳動物細胞にトランスフェクトする。トランスフェクション工程は、ごく少量のDNAおよび細胞、典型的には1ウェル当たり 2×10^5 個の細胞および $2 \mu\text{g}$ のプラスミドDNAを必要とし、トランスフェクションを6ウェルプレートで行う。異なる哺乳動物細胞株を使用し得るが、以下に示されている例では、形質転換ヒト胚腎臓単層上皮細胞(PEAK細胞)をトランスフェクトする。これらの細胞は、エピソーム複製プロセスをさらに支援するEBNA-1遺伝子を安定発現し、半接着性であり、標準的な細胞培養条件(5%CO₂; 10%ウシ胎仔血清を補充したDMEM培地中、37℃)下で成長させ得る。24時間後、 $0.5 \sim 2 \mu\text{g/mL}$ ピューロマイシンを含有する培地を追加することにより、細胞を選択的条件下に置く; エピソームベクターを有する細胞は、この抗生物質に対して耐性である。

【0323】

トランスフェクションの2~3週間後、増幅および選択した細胞を生産工程用の使い捨てCELLine(商標)バイオリアクターに注入した。CELLine(商標)は、標準的な細胞培養インキュベーターで使用され得る2コンパートメントバイオリアクターである。より小さな区画(15ml)は細胞を含有し、10kDaのカットオフサイズを有する半透膜により、より大きな(1リットル)培地含有区画から分離される(Bruceら、2002, McDonaldら、2005)。このシステムは、細胞および分泌タンパク質をより小さな区画に保持しながら、栄養素、ゲイズおよび代謝老廃物の拡散を可能にする。上清の回収前に、培養物を7~10日間維持する。培地は血清を含有するので、細胞は良好な生存率を維持し、同じ細胞および容器を使用して複数回の生産ランを行い得る。

【0324】

精製

回収後、遠心分離により、細胞培養上清を清澄化する。次いで、100mMイミダゾールを上清に補充し、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィー樹脂(Qiagen)にロードする。比較的高濃度のイミダゾールは、樹脂への汚染物質の結合を最小化する。カラムの洗浄後、AKTA Primeクロマトグラフィーシステム(Amersham Pharmacia Biotech)により30mLイミダゾール勾配(20~400mMイミダゾール)を使用して、2mL/分の流速でタンパク質を溶出させる。溶出勾配は組換えタンパク質の純度をさらに改善するが、クロマトグラフィーシステムが利用可能ではない場合には、段階的溶出アプローチにより置き換え得る。SDS-PAGEまたはELISAにより溶出画分を分析して、それらの組換えタンパク質含有量を決定し得る。目的の画分をプールし、リン酸緩衝生理食塩水または別の適切なバッファーで平衡化したAmicon 10KDカラム(Millipore)により脱塩する。次いで、様々な技術を使用して、脱塩したタンパク質を定量し、SDS-PAGEによりそれらの純度を分析し得る。製造業者の指示にしたがってビオチンリガーゼ(Avidity, Denver Colo.)を使用して、組換えCD47をインビトロでビオチン化する。脱塩後、ストレプトアビジン磁気ビーズを使用したプルダウンアッセイおよびSDS-PAGE分析により、ビオチン化レベルを評価する。

【0325】

10

20

30

40

50

実施例2 ヒトCEACAMファミリーメンバーのクローニング、発現および精製 クローニング

CEACAM5の完全細胞外ドメイン(ECD)およびA3-B3ドメインに対応する配列は、EurofinsおよびTwist Bioscienceにより合成された。これらの合成遺伝子をpEAK8哺乳動物発現ベクター(Edge Biosystems, Gaithersburg, Md.)にサブクローニングした。C末端にAvitag(商標)(Avidity, Denver Colo.)およびヘキサヒスチジンタグ、ヒトFC領域またはマウスFC領域のいずれかを導入するようにベクターを改変した。DNAシーケンシングにより、構築物を検証した。IMAC(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー)、FcXLまたはCapture Select(商標) IgG-Fc(ms)アフィニーマトリックス(ThermoFisher Scientific)により、組換え可溶性タンパク質の精製を行った。

10

【0326】

PEAKおよび/またはCHO細胞の細胞表面における発現のために、ヒトCEACAM1、3、4、5、6、7、8、18、19、20、21およびカニクイザルCEACAM5の全長バージョンをコードするベクターも生成した。同様に、可溶性全長ヒトCEACAM16もクローニングした。

【0327】

発現および精製

実施例1に詳述されているように、上記組換えタンパク質の発現、精製およびビオチン化を行った。

20

【0328】

実施例3 固定可変重ドメインを含有するヒトscFvライブラリーを使用したCEACAM5 Fvのファージディスプレイ選択

M13バクテリオファージ上にディスプレイされるヒトscFvライブラリーの構築および取り扱いに関する一般的な手順は、Vaughanら、(Nat. Biotech. 1996, 14: 309-314)(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。選択およびスクリーニングのためのライブラリーは、すべてが同じVHドメインを共有するscFvであって、VLドメインのみが多様化されたscFvをコードする。固定VHライブラリーの生成のための方法、ならびに二重特異性抗体の同定およびアセンブリのためのそれらの使用は、米国特許出願公開第2012/0184716号および国際公開第2012/023053号(これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。ヒトCEACAM5に結合するscFvを同定する手順を以下に記載する。

30

【0329】

タンパク質選択

ロータリーミキサー上で、scFvファージライブラリーのアリコート(10¹² pfu)を、3%(w/v)スキムミルクを含有するPBSで室温で1時間ブロックする。ロータリーミキサー上で、ブロックしたファージを、ストレプトアビジン磁気ビーズ(Dynabeads(商標)M-280)で室温で1時間選択除外する。ロータリーミキサー上で、選択除外したファージを、ストレプトアビジン磁性ビーズに捕捉された100nMのビオチン化ヒトCEACAM5またはA3-B3ドメインのいずれかと共に室温で2時間インキュベートする。磁気スタンドを使用してビーズを捕捉し、続いて、PBS/0.1%Tween(登録商標)20で5回洗浄し、PBSで2回洗浄する。ロータリーミキサー上で、ファージを、100nM TEAで室温で30分間溶出させる。溶出させたファージおよびビーズをTris-HCl 1M pH7.4で中和し、10mlの対数増殖期TG1細胞に直接追加し、ゆっくりと振盪しながら(90rpm)37で1時間インキュベートする。感染TG1のアリコートを系列希釈して、選択アウトプットを力価測定する。残りの感染TG1を3800rpmで10分間スピンし、2mlの2xTYに再懸濁し、2xTYAG(100μg/mlアンピシリンおよび2%グルコースを

40

50

有する2 x TY培地) 寒天バイオアッセイプレートに塗る。30 における一晚のインキュベーション後、10 mlの2 x TYをプレートに追加し、細胞を表面から擦り取り、50 mlポリプロピレンチューブに移す。50%グリセロール溶液を細胞懸濁液に追加して、17%グリセロールの最終濃度を得る。選択ラウンドのアリコートをして-80 に保持する。

【0330】

ファージレスキュー

先の選択ラウンドから得られた50 µlの細胞懸濁液を50 mlの2 x TY AGに追加し、0.3~0.5のOD₆₀₀に達するまで、攪拌(240 rpm)しながら37 で成長させる。次いで、 1.2×10^{11} 個のM13K07ヘルパーファージを培養物に超感染させ、37 (90 rpm)で1時間インキュベートする。細胞を3800 rpmで10分間遠心分離し、培地を除去し、ペレットを50 mlの2 x TY AK(100 µg/mlアンピシリンを含有する2 x TY培地; 50 µg/mlカナマイシン)に再懸濁することにより、培地を交換する。次いで、培養物を30 (240 rpm)で一晩成長させる。翌日、ファージ含有上清を次の選択ラウンドに使用する。

【0331】

細胞表面選択

ロータリーミキサー上で、ファージ含有上清を、3%(w/v)スキムミルクを含有するPBSで室温で1時間ブロッキングする。次いで、ヒトCEACAM5を発現しないMKN45 CEACAM5^{KO}で、ブロッキングしたファージを1時間選択除外する。選択除外したファージを、(PBS 3% BSA 0.1% NaN₃でブロッキングした)CEACAM5を発現する 2×10^7 個のMKN45細胞と共に穏やかに攪拌しながら室温で2時間インキュベートする。細胞をペレット化し、PBSで6回洗浄する。結合したファージを76 mMクエン酸で溶出させ、10分間振盪する。Tris-HCl 1M pH8による中和後、細胞を10 mlの対数増殖期TG1に直接追加し、ゆっくりと振盪しながら37 で1時間インキュベートする。感染TG1のアリコートを系列希釈して、選択アウトプットを力価測定する。感染TG1を3800 rpmで10分間スピンドルし、2 mlの2 x TY培地に再懸濁し、2 x TY AG寒天バイオアッセイプレートに塗る。30 における一晚のインキュベーション後、10 mlの2 x TYをプレートに追加し、細胞を表面から擦り取り、50 mlポリプロピレンチューブに移す。50%グリセロール溶液を細胞懸濁液に追加して、17%グリセロールの最終濃度を得る。選択ラウンドのアリコートを-80 に保持する。

【0332】

実施例4 可溶性CEACAM5、CEACAM6およびCEACAM1へのscFv結合/非結合のスクリーニング

結合および機能試験のためのscFvペリプラズム調製

個々のクローンを、0.9 ml/ウェルの2 x TY AG培地(100 µg/mlアンピシリン、0.1%グルコースを含有する2 x TY培地)を含有するディープウェルマイクロタイタープレートに接種し、37 で5~6時間成長させる(240 rpm)。次いで、100 µl/ウェルの2 x TY培地中0.2 mM IPTGを追加して、0.02 mM IPTGの最終濃度を得る。プレートを240 rpmで振盪しながら30 で一晚インキュベートする。ディープウェルプレートを3200 rpm、4 で10分間遠心分離し、上清を慎重に除去する。ペレットを150 µlのTESバッファー(50 mM Tris-HCl (pH8)、1 mM EDTA (pH8)、20%スクロース、完全プロテアーゼ阻害剤, Rocheで補完)に再懸濁する。150 µlの希釈TESバッファー(1:5のTES:水希釈)を追加し、氷上で30分間インキュベートすることにより、低張ショックを生じさせる。プレートを4000 rpm、4 で10分間遠心分離し、細胞および残屑をペレット化する。上清を別のマイクロタイタープレートに慎重に移し、機能アッセイまたは結合アッセイで直ぐに試験するために氷上に保持する。

【0333】

10

20

30

40

50

結合

Cell Insight (商標) 技術を使用して均一アッセイで、CEACAM5への結合に関するscFvのスクリーニングを試験する。384クリアボトムウェルプレート(Corning)の各ウェル中で、以下の試薬を混合する：対照タンパク質については、ビオチン化CEACAM5、ビオチン化ドメインA3-B3またはビオチン化NusAのいずれかでコーティングした30 μ lのストレプトアビジンポリスチレンビーズ懸濁液(Poly Sciences; ビーズ3000個/ウェル); 60 μ lのブロッキングしたscFvペリプラズム調製物; 10 μ lの検出バッファー(5 μ g/mlのマウス抗c-myc抗体; 1:200希釈した抗マウスFc-AlexaFluor(登録商標)647を含有するPBS)。600rpmで5分間混合した後、384ウェルプレートを室温でインキュベートし、2時間後、Cell Insight(商標)CX5ハイコンテンツスクリーニングプラットフォーム(ThermoFisher Scientific)により読み取る。さらなる分析またはシーケンシングのために、NusAではなくCEACAM5の特異的シグナルを与えるscFvを発現するクローンを選択する。

【0334】

CEACAM1、CEACAM6および他のCEACAMへの結合を同じ方法で測定し得る。

【0335】

ファージクローンシーケンシング

単一クローンを、1ml/ウェルのLBAG培地(100 μ g/mlアンピシリンおよび2%グルコースを含むLB培地)を含有する96ディープウェルマイクロタイタープレートに接種し、240rpm、37 $^{\circ}$ Cで一晩成長させる。Zippy-96 Plamis Miniprepキット(Zymo Research)を使用してDNAを抽出し、シーケンシングする。

【0336】

実施例5 IgGへの固定VH候補の再フォーマットおよび哺乳動物細胞における一過性発現

スクリーニングおよびシーケンシングの後、所望の結合特性を有するscFv候補をIgGに再フォーマットし、PEAK細胞への一過性トランスフェクションにより発現させる。選択したscFvのVHおよびVL配列を特定のオリゴヌクレオチドで増幅し、重鎖および軽鎖定常領域を含有する発現ベクターにクローニングし、シーケンシングにより構造物を検証する。製造業者の指示にしたがってLipofectamine 2000(ThermoFisher Scientific)を使用して、発現ベクターを哺乳動物細胞にトランスフェクトする。簡潔に言えば、T75フラスコ中で、3.5 \times 10⁶個のPEAK細胞を、ウシ胎仔血清を含有する25mlの培養培地中で培養する。トランスフェクト細胞を37 $^{\circ}$ Cで5~6日間培養し、OctetRED96機器によりIgG産生を定量する。製造業者の指示にしたがってFcXLアフィニティー樹脂(ThermoFisher Scientific)により、IgG精製のために上清を回収する。簡潔に言えば、トランスフェクト細胞由来の上清を適切な量のFcXL樹脂と共に4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。PBSによる樹脂洗浄の後、サンプルをAmicon Proカラムにロードし、続いて、IgGを50mMグリシンpH3.5で溶出させる。次いで、ヒスチジンNaCl pH6.0バッファーに対してAmicon 50kDaにより、溶出IgG画分を透析し、280nmの吸収によりIgG含有量を定量する。Agilent Bioanalyzer製造業者(Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA)が純度およびIgG完全性を検証する。

【0337】

実施例6 CEACAM5抗体の特性評価

a) CEACAMファミリーの異なるメンバーでトランスフェクトした細胞へのCEACAM5抗体の結合

本発明者らの知識によれば、CEACAMファミリーの異なるメンバーでトランスフェ

10

20

30

40

50

クトした P E A K および / または C H O 細胞を使用してフローサイトメトリーにより、C E A C A M 5 モノクローナル抗体 (m A b) の特異性を示し得る。ヒト C E A C A M 1、3、4、5、6、7、8、18、19、20 および 21 および 20 の全長バージョンをコードするベクターを使用して、実施例 2 に記載されているように、P E A K および / または C H O 細胞の表面においてこれらのタンパク質を発現させる。非トランスフェクト P E A K および / または C H O 細胞を陰性対照として使用する。細胞を回収し、カウントし、生存率についてチェックし、F A C S バッファー (P B S 2 % B S A、0 . 1 % N a N ₃) に細胞 3×10^6 個 / m l で再懸濁する。100 μ l の細胞懸濁液を V 底 96 ウェルプレートに分配する (細胞 3×10^5 個 / ウェル)。1300 r p m、4 で 3 分間遠心分離することにより上清を除去し、細胞を、漸増濃度の本発明の抗体と共に 4 で 15 分間インキュベートする。抗体を F A C S バッファーで希釈し、濃度範囲は 30 p M ~ 500 n M である。細胞を冷 F A C S バッファーで 2 回洗浄し、P E (R - フィコエリトリン) コンジュゲートマウス抗ヒト I g G F c 二次抗体 (S o u t h e r n B i o t e c h、F A C S バッファーで 1 : 100 プレ希釈) と共に 4 でさらに 15 分間再インキュベートする。細胞を冷 F A C S バッファーで 2 回洗浄し、1 : 1500 希釈 T O P R O - 3 (I n v i t r o g e n) を含む 300 μ l の F A C S バッファーに再懸濁する。F A C S C a l i b u r (商 標) (B D B i o s c i e n c e s) を使用して、蛍光を測定する。G r a p h P a d P r i s m 7 ソフトウェアを使用して、用量反応結合曲線をフィッティングする。同じ方法で、C E A C A M 1、C E A C A M 6 および他の C E A C A M を特性評価し得る。簡潔に言えば、精製 M a b を、10 μ g / m l の最終濃度で C E A C A M ファミリータンパク質の 1 つを発現する細胞と共に 30 分間インキュベートする。2 回の洗浄後、C y - 5 コンジュゲート抗ヒト F c 二次抗体 (B D b i o s c i e n c e s) を使用して、結合抗体を検出する。

【0338】

P E コンジュゲート抗ヒト I g G F c 二次抗体により結合抗体が検出されない場合、本発明の抗体は、前記 C E A C A M に結合しないことが分かる。

【0339】

b) カニクイザル C E A C A M 5 との C E A C A M 5 抗体の交差反応性

本発明者らの知識によれば、全長カニクイザル C E A C A M 5 を発現するベクターでトランスフェクトした P E A K C H O 細胞を使用してフローサイトメトリーにより、カニクイザル C E A C A M 5 と交差反応する本発明の C E A C A M 5 モノクローナル抗体の能力を試験し得る。フローサイトメトリーは、前記抗体が c y n o C E A C A M 5 を発現する P E A K C H O 細胞に結合するか、または前記抗体が P E A K C H O 細胞に結合せず前記 C E A C A M にも結合しないかを検出することを可能にする。

【0340】

実施例 7 ラムダおよびカッパ軽鎖を保有する二重特異性抗体の発現および精製

同じ細胞内における 1 つの重鎖および 2 つの軽鎖の同時発現は、3 つの異なる抗体のアセンブリにつながり得る。共発現させるべき鎖の 1 つを発現する複数のベクターのトランスフェクション、または複数の遺伝子発現を駆動するベクターの使用などの異なる方法で、同時発現を達成し得る。異なる抗 C E A C A M 5 抗体をコードするベクターを、同じ共通重鎖を担持する抗 C D 4 7 抗体である抗 C D 4 7 抗体 K a 3 (これは、米国特許出願公開第 2014 / 0303354 号に記載されている) の重鎖および軽鎖 (配列番号 5 および 11) を発現する別のベクターと共にコトランスフェクトする。あるいは、2 つの軽鎖を、米国特許出願公開第 2012 / 0184716 号および国際公開第 2012 / 023053 号 (これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる) に記載されているように 1 つの重鎖、1 つのカッパ軽鎖および 1 つのラムダ軽鎖の共発現を可能にするように以前に生成されたベクター p N o v i H にクローニングする。ヒトサイトメガロウイルスプロモーター (h C M V) により 3 つの遺伝子の発現を駆動し、ベクターはまた、安定細胞株の選択および樹立を可能にするグルタミンシンテターゼ遺伝子 (G S) を含有する。哺乳動物細胞における一過性発現のために、抗 C E A C A M 5 I g G

および抗CD47 IgGの共通VHおよびVL遺伝子をベクターpNovi H にクローニングする。適切な細胞数および(ウシ胎仔血清を含有する)培養培地量を含む適切なフラスコ中で、Peak細胞を培養する。製造業者の指示にしたがってLipofectamine 2000)を使用して、プラスミドDNAを細胞にトランスフェクトする。産生中に、OctetRED96を使用して、トランスフェクト細胞の上清中の抗体濃度を測定する。抗体濃度に応じて、トランスフェクションの5~7日後に上清を回収し、1300gで10分間遠心分離することにより清澄化する。精製プロセスは、3つのアフィニティー工程から構成される。最初に、FcXLアフィニティーマトリックス(ThermoFisher Scientific)をPBSで洗浄し、次いで、清澄化上清に追加する。+4における一晩のインキュベーション後、上清を2000gで10分間遠心分離し、フロースルーを保存し、樹脂をPBSで2回洗浄する。次いで、樹脂をAmicon Proカラムに移し、pH3.0の50mMグリシンを含有する溶液を溶出に使用する。いくつかの溶出画分を生成し、プールし、50kDa Amicon(商標)超遠心フィルタユニット(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)を使用してPBSに対して脱塩する。Nanodrop分光光度計(NanoDrop Technologies, Wilmington, Del.)を使用して、上清由来の全ヒトIgGを含有する溶出産物を定量し、適切な量のカップセレクトアフィニティーマトリックス(GE Healthcare)と共に室温および20rpmで15分間インキュベートする。インキュベーション、樹脂回収、溶出および脱塩工程を前記のように実施する。2回の先の精製と同じプロセスを適用してラムダFabセレクトアフィニティーマトリックス(GE Healthcare)を使用して、最後のアフィニティー精製工程を実施する。Nanodropを使用して、最終産物を定量する。変性および還元条件で電気泳動により、精製二重特異性抗体を分析する。製造業者(Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA)により記載されているように、Protein 80キットと共にAgilent 2100 Bioanalyzerを使用する。4μLの精製サンプルを、ジチオスレイトール(DTT; Sigma Aldrich, St. Louis, Mo.)を補充したサンプルバッファーと混合する。サンプルを95°Cで5分間加熱し、次いで、チップにロードする。Limulus Amebocyte Lysate試験(LAL; Charles River Laboratories, Wilmington, Mass.)を使用して、エンドトキシン汚染について、すべてのサンプルを試験する。

【0341】

実施例8：一価および二重特異性抗体の特性評価

a) 二重ターゲティング二重特異性抗体は、同じ細胞の表面上の2つの異なる抗原に結合する。

本発明者らの知識によれば、細胞表面上の2つの抗原への2つの抗体アームの同時結合(共係合と称される)は、アビディティ機構による親和性の相加的または相乗的な増加をもたらし得る。その結果として、共係合は、1つの単一抗原のみを発現する細胞と比較して、両抗原を発現する細胞に対する高い選択性を付与する。加えて、それらの各標的への二重特異性抗体の2つのアームの親和性を、標的細胞への結合が抗体アームの1つにより主に駆動される方法で設定し得る。例えば、高い親和性でCEACAM5にまたはCEACAM5およびCEACAM6に結合する第1のアームと、低い(しかし、CD47とのCEACAM5またはCEACAM5およびCEACAM6共係合によりCD47/SIRPを阻害するために十分な)親和性でCD47に結合する第2のアームとから構成される二重ターゲティング抗体は、正常細胞と対比して癌細胞におけるCD47の優先的阻害を可能にするはずである。

【0342】

b) ヒトCD47への親和性測定

本発明者らの知識によれば、Biacore T200機器を使用して表面プラズモン共鳴技術により、ヒトCD47への本発明の抗体の結合親和性を評価し得る。ビオチン化

10

20

30

40

50

ヒトCD47可溶性組換えタンパク質を、ストレプトアビジンコーティングセンサーチップ (Series S Sensor Chip SA) 上に捕捉させ得る。次いで、一連の濃度の試験抗体を表面に注入し、各注入の間に表面の再生を行い得る。

【0343】

CD19×CD47 二重特異性抗体を用いて、このような測定を実施した。反復決定で測定した結合親和性は400~500 nMであった。この抗体のCD47結合アームは、本発明のCEA×CD47二重特異性抗体のCD47結合アームと同じものである。本発明者らの知識によれば、本発明のCEA×CD47二重特異性抗体を用いて実施した同じ実験は、このような実験の標準偏差内で同様の結果を提供する。

【0344】

c) 標的腫瘍細胞の表面上のCEACAM5およびCD47の共係合を示す一価および二重特異性抗体のSIRP 遮断活性

本発明者らの知識によれば、標的細胞の表面上の (CEACAM5のような) TAAおよびCD47の共係合の証拠を提供し得る別の一連の実験を実施し得、これは、CD47×CEACAM5 抗体によるCD47-SIRP 相互作用の中和がCEACAM5依存性であることを示す実験である。このような実験では、CD47-SIRP 阻害アッセイにおいて、CD47×CEACAM5 ボディおよび対応する一価抗体の活性を試験し得る。図6は、対応する一価の抗CD47抗体と比較した、本発明の二重特異性抗体と同じCD47結合アームを含有するTAA×CD47二重特異性抗体 (TAAはCEAではない) を用いた結果を示す。

【0345】

d) CD47抗体のSIRP 遮断活性

本発明の二重特異性抗体について示されているSIRP 阻害効力データの測定のための実験設定 (結果については、表2を参照のこと)。

【0346】

可溶性SIRP と、MKN45の表面において発現されるヒトCD47との相互作用をモニタリングする結合SIRP 細胞ベースのアッセイの検出を遮断活性の検出に使用する。本発明の二重特異性抗体を用いた用量反応実験は、IC50値の決定を可能にする。

【0347】

CD47およびCEACAM5の両方を発現するMKN45癌細胞をCFSEバイオレットで染色して、イメージングシステム (CX5) による細胞の検出を可能にする。簡潔に言えば、1ウェル当たり3'000個の染色MKN45細胞を384オプティカルウェルプレート (Costar) に播種し、漸増濃度の本発明の二重特異性抗体 (1.9 pM~333 nM、4回反復) と共に50分間インキュベートする。次いで、抗マウスIgG-Fc AF647結合抗体 (Jackson ImmunoResearch 1:2000希釈) と予混合した一定濃度のSIRP - マウスFcを最終50 ng/mLで追加する。3H30のインキュベーション後、イメージングシステム (CX5, ThermoFisher) を用いてプレートを取得し、検出された結合SIRP により放出された蛍光シグナルを、前記イメージングシステム専用のソフトウェアにより記録する。試験した用量範囲にしたがって蛍光シグナルをプロットし、ソフトウェア (Prism, Graphpad) によりIC50を計算する。

【0348】

表2は、0.22 nM~7 nMの範囲のIC50を示す、CD47/SIRP 結合の阻害におけるいくつかのCEA×CD47二重特異性抗体の効力を示す。

【0349】

e) 参照抗体との競合によるCEACAM5抗体のエピトープビニング

エピトープビニングは、本発明の抗体の結合、例えば第1の結合部分の関連抗CEA (標的タンパク質) 抗体の結合を特性評価するために使用される競合イムノアッセイである。標的タンパク質に結合する抗体の競合遮断プロファイルを、この標的タンパク質にも結合する抗体であって、結合エピトープが既に確立/公開されている抗体に対して作成する

10

20

30

40

50

。これらの参照抗体の1つとの競合は、抗体が同じまたは近い位置のエピトープを有し、それらが一緒に「ビニング」されることを示す。CEACAM5参照抗体と競合するCEACAM5 mAb（これは、本発明の二重特異性抗体の一部である）の能力を、マウスFc領域を保有する以下の参照抗体を用いて組換えヒトCEACAM5に対するELISAにより試験する：SM3E（米国特許出願公開第20050147614号に記載されているSM3E由来のmAbの配列、標準的な方法を使用して生産されたmAb）；MED I（国際公開第2016036678号に記載されているMED I - 565由来のmAb）；SAR（欧州特許出願公開第3199552号に記載されているMab2__VLg5VHg2由来のmAb）；CH1A1A（米国特許出願公開第20120251529号およびKleinら、in *Oncoimmunology*, 2017 Jan 11; 6(3)に記載されているCH1A1A - 2F1由来のmAb）；ヒト化T84.66（国際公開第2017055389号に記載されている変異体1由来のmAb）；LAB（米国特許出願公開第2002/0165360号に記載されているhMN14由来のmAb）。SM3Eは、例えば、CEAのN末端細胞膜遠位部分により結合し、MED Iは中央部分に結合し、CH1A1Aは膜の近くに結合する。

【0350】

ビオチン化ヒトCEACAM5をストレプトアビジンコーティング96ウェルプレートに0.5 μg/mlでコーティングし、10 μg/mlの参照mAbまたはマウスFc領域を保有する無関係なmAbと共に1時間インキュベートする。（各CEAxCD47二重特異性抗体としてではなく二価モノクローナル抗CEA抗体として）CEACAM5 mAbを0.2 μg/mlで室温で1時間追加する。プレートを洗浄し、結合したCEACAM5 mAbを抗ヒトIgG(Fc) - HRP (Jackson ImmunoResearch) で検出する。洗浄後、Amplex Red試薬を用いて、プレートを明らかにする。Synergy HTプレートリーダー (Biotek) により、蛍光シグナルを測定する。

【0351】

結果は表2に示されている。ピン1は、CEACAM5への結合について、各抗体がSM3Eと競合することを意味する。ピン2は、各抗体が上記ツール抗体のいずれとも競合しないことを意味する。表2に掲載されているすべてのCEAxCD47二重特異性抗体について、各抗CEA二価モノクローナル抗体を用いて、競合実験を実施した。CEACAM5へのこのようなモノクローナル抗体の結合が、各ツール抗体により80%またはそれを超えて減少された場合、CEAxCD47二重特異性抗体は、ツール抗体と競合的に結合すると分類されると結論付けた。ツール抗体の追加ありおよびなしの結果を比較した場合に、CEACAM5への各抗CEA二価mAbの結合が20%またはそれ未満減少した場合、CEAxCD47抗体は、ツール抗体と非競合的であると同定される。

【0352】

ピン1：K2AC13、K2AC18、K2AC23、K2AC27、K2AC29

ピン2：K2AC10、K2AC25、K2AC28 K2AC26

本発明の二重特異性抗体に関するピン特性評価、CEAへの結合のEC50値、SIRP 阻害効力およびEC50ならびに最大食作用指数の結果は表2、3および4に示されている。

10

20

30

40

50

【表 2】

表2: CEA \times CD47二重特異性抗体のインビトロ特徴

抗体の名称	ピン特性評価	EC50結合(nM) [#]	SIRP α 阻害効力 (nM) [#]
K2AC5	ピン1	11.3	0.4
K2AC10	ピン2	1.15	0.22
K2AC13	ピン1	190	4
K2AC18	ピン1	131.8	7
K2AC22	ピン1	16.5	0.37
K2AC23	ピン1	76.8	1.6
K2AC25	ピン2	13	0.22
K2AC26	ピン1	12.7	0.32
K2AC27	ピン1	12.5	0.86
K2AC28	ピン2	52.5	0.95
K2AC29	ピン1	14.5	0.72

#MKN45 CEA⁺癌細胞を使用

【表 3】

表3: CEA \times CD47二重特異性抗体のインビトロ機能活性*

抗体の名称	EC50 (μ g/mL)	最大食作用指数
K2AC5	0.44	59 (\pm 4.2)
K2AC22	0.19	69
K2AC23	0.68	67.5 (\pm 2.1)
K2AC25	1.54	48 (\pm 1.4)
K2AC26	> 9.9	46 (\pm 9.9)
K2AC27	>11.7	47 (\pm 1.4)
K2AC28	>19.8	32.5 (\pm 0.7)
K2AC29	>4.4	42 (\pm 5.6)

【表 4】

表4: MKN45細胞を使用した、1mg/mLのhIgG1の存在下または非存在下における2つのCD47 \times CEA二重特異性抗体のEC50および最大食作用指数。

抗体の名称	EC50 食作用 (μ g/mL) – hIgG1なし	EC50 食作用 (μ g/mL) – hIgG1あり	最大食作用指数 – hIgG1なし	最大食作用指数 – hIgG1あり
K2AC5	0.16	0.44	67 (\pm 5.7)	77 (\pm 1.4)
K2AC22	0.25	0.45	85 (\pm 4.2)	92.5 (\pm 3.5)
5F9 hIgG4	0.15	0.62	54 (\pm 1.4)	31 (\pm 2.8)

max. =最大; 10 μ g/mlで評価した最大指数食作用; #MKN45 CEA⁺癌細胞を使用

10

20

30

40

50

【表5】

表5: ELISAによる組換えタンパク質を使用したELISAによる、ヒトCEACAM5またはヒトCEACAM6への結合のEC50。

抗体の名称	CEACAM5への結合のEC50	CEACAM6への結合のEC50
AC22	0.015	非結合
AC39	0.22	0.17

【0353】

10

f) ヒトCEACAM5およびヒトCEACAM6への抗CEA抗体の結合

ビオチン化組換えヒトCEACAM5またはCEACAM6タンパク質を、ストレプトアビジンコーティング96ウェルマイクロプレートに0.5 μg/mLで捕捉させる。プレートを洗浄し、本発明のモノクローナル抗CEA二価抗体を広い濃度範囲(例えば、 $5 \times 10^{-4} \sim 1 \mu\text{g/mL}$)として追加し、1時間インキュベートする。プレートを洗浄し、結合した抗体を抗ヒトIgG(Fc)-HRP(Jackson ImmunoResearch)で検出する。洗浄後、Amplex Red試薬(Molecular Probes)を用いて、プレートを明らかにする。Synergy HTプレートリーダー(Biotek)により、蛍光シグナルを測定する。

【0354】

20

モノクローナル抗体AC39について得られた結果は表5に含まれている; この抗体は、平衡するCEACAM5およびCEACAM6への結合を示すが、これは、CEACAM5およびCEACAM6への結合のEC50が同様である(平衡する、抗体のCEACAM6結合に対するCEACAM5結合のEC50の比の範囲が0.33~3である)ことを意味する。この範囲外の比を有する抗体は、平衡していないと考えられる。

【0355】

実施例9: 二重特異性抗体により媒介されるADCCおよびADCP

a) TAAxCD47二重特異性抗体により媒介されるADCPおよびADCCはTAA依存性である

CD47およびTAAに共係合する二重ターゲティングTAAxCD47抗体の能力は、TAA陰性細胞と比較してTAA陽性細胞への結合の親和性の有意な増加およびCD47-SIRP相互作用のTAA依存的中和をもたらす。そして、これは、CEAxCD47抗体により媒介される効率的および選択的な癌細胞殺傷につながり得る。

30

【0356】

図3Aに示されているADCP実験(フローサイトメトリーベースのアッセイ)から実証された結果は、二重特異性TAAxCD47抗体のADCPが、対応する一価TAAおよび一価CD47抗体と比較して高いことを実証している。図4は、4つの二重特異性TAAxCD47抗体(TAAはメソセリンMSLNである)のADCC(Cr51ベースのアッセイ)が、高親和性抗TAAモノクローナル抗体アマツキシマブ(TAAはMSLNである)と比較して高いことを示している(MSLNを保有する肺癌NCI-H226腫瘍細胞を使用する)。

40

【0357】

b) TAAxCD47抗体を用いて測定したCr51+放出アッセイ

10 ng/mLの組換えhIL-2を補充したRPMI/10%熱不活化FCSを用いて、健常PBMCを37°Cで一晩活性化した。翌日、標的細胞(すなわち、TAAを発現する癌細胞)を100 μCiのCr51(Perkin Elmer、37°C、1時間)と共にインキュベートした。洗浄後、細胞を試験抗体でオプソニン化した(30分間、37°C)。次いで、Cr51ロード癌細胞をPBMC細胞と混合して、エフェクター(PBMC)および標的細胞(TAA発現細胞)間で80:1または50:1の最終比を得た。細胞混合物を37°Cで4時間インキュベートしてから、1500 rpmで10分間遠心

50

分離した。上清を（シンチラントでコーティングした）LumaPlateに移し、カウンターでカウントした。陰性対照（自然Cr51放出）は、エフェクター細胞の非存在下で培地と共にインキュベートしたCr51ロード標的細胞から構成されていた。総溶解対照は、5 μ Lの細胞溶解溶液（Trition X-100）と共にインキュベートしたCr51ロード標的細胞から構成されていた。非特異的溶解対照（ベースライン）は、Abなしでエフェクター細胞と共にインキュベートしたCr51ロード標的細胞から構成されていた。以下の式：%特異的ADCC = $\left(\frac{1 \text{分当たりのサンプル数 (cpm)} - \text{非特異的溶解対照 cpm}}{\text{総溶解対照 cpm} - \text{陰性対照 cpm}} \right) \times 100\%$ を使用して、ADCCパーセンテージを計算した。

【0358】

図5は、wt IgG1 Fcバージョンと、本発明のCEAxCD47抗体と同じCD47アームを保有するCD47xTAA二重特異性抗体（CEAではなくTAA）のさらなるDEA突然変異Fcバージョンとの間の比較実験のADCC（Cr51ベースのアッセイ）の結果を示す。高親和性抗TAA二価mAbの結果も示されている。最も高いADCCは、DEA突然変異を有するIgG1 Fcを保有するTAAxCD47二重特異性抗体であり、続いて、IgG1 Fcを有するCEAxCD47 biAb、およびwt IgG1 Fcを有する二価mAbである。

【0359】

c) LDH放出アッセイにより測定したADCC

以下のアッセイにおいて、CEAxCD47二重特異性抗体のADCCを試験した。

【0360】

10 ng/mLの組換えhIL-2を補充したRPMI/10%熱不活化FCSを用いて、健常PBMcを37 $^{\circ}$ Cで一晩活性化した。翌日、標的細胞（例えば、MKN45癌細胞）を異なる濃度の試験抗体でオプソニン化する。細胞培養インキュベーターにおいて、丸底プレート中で、PBMcおよびオプソニン化標的細胞を50/1のエフェクター/標的比で37 $^{\circ}$ Cで6時間コインキュベートする。このインキュベーション後、上清をオプティカル平底プレートに移し、Rocheの市販キットを用いてマイクロプレートリーダーでODを測定することにより、LDH放出を定量する。以下の式：

【数1】

$$\text{特異的溶解} = \left(\frac{\text{LDH サンプル} - (\text{LDH エフェクター} + \text{標的細胞})}{\text{最大 LDH} - \text{LDH 標的細胞のみ}} \right) \times 100$$

を用いて、特異的溶解の%を計算する。

【0361】

図13は、本発明の二重特異性抗体とそれらの糖操作形態および抗体5F9との間の比較実験の結果を示す。図14は、1 mg/mLヒト免疫グロブリン（IgG）の存在下における、本発明の二重特異性抗体とそれらの糖操作形態および抗体5F9との間の比較実験の結果を示す。

【0362】

d) ADCPアッセイ

2つの方法を使用する。FACSベースの方法では、（少なくとも1つの腫瘍細胞を貪食したマクロファージのパーセンテージを表す）食作用のパーセンテージを決定する。図3Aは、CEAxCD47抗体でも使用したCD47結合アームを保有するTAAxCD47抗体について、このFACSベースのアッセイを用いて得られた結果を示す。Cell Insight CX5ハイコンテンツスクリーニングプラットフォームを使用したイメージングベースの方法では、100個のマクロファージにより貪食された標的細胞の平均数として定義される食作用指数を決定する。図3Bは、CEAxCD47抗体のCD47結合アームを保有するTAAxCD47二重特異性抗体（CEAではなくTAA）を用いて得られた結果を示す。図12、15、16、17、18、20Bおよび21Bは、本発明のCEAxCD47二重特異性抗体を用いて得られた結果を示す。図15は、本発明

10

20

30

40

50

の二重特異性抗体とそれらの糖操作形態および抗CD47抗体5F9との間の比較実験の結果を示す。図16は、患者に通常存在する1mg/mlヒト免疫グロブリン(IgG)の存在下における、本発明の二重特異性抗体とそれらの糖操作形態および抗体5F9との間の比較実験の結果を示す。図17は、1mg/mlヒト免疫グロブリン(1mg/mLまたはそれよりもさらに高いhuIgGが患者に存在する)の存在下または非存在下における本発明の二重特異性抗体の間の比較実験の結果を示す。図18は、30nMのCEA-TCB1または300nMのCEA-TCBの存在下または非存在下におけるK2AC22の濃度/食作用指数曲線を示す。

【0363】

e) 食作用アッセイ：1. Cell Insight CX5ハイコンテンツスクリーニングプラットフォームをベースとするイメージングアッセイおよび2. フローサイトメトリーベースのアッセイ

10

マクロファージの調製：フィコール勾配により、パフィーコートからヒト末梢血単核細胞(PBMC)を単離する。20ng/mLのヒトマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)(PeproTech)の存在下、完全培地(RPMI1640、10%熱不活化胎児牛血清[Invitrogen])、2mM L-グルタミン、1mMピルピン酸ナトリウム、10mM HEPESバッファー、25mg/mLゲンタマイシン(すべてSigma-Aldrich製)および50mM 2-メルカプトエタノール(Thermo Fisher Scientific)中でPBMCを7日間培養することにより、マクロファージを生成する。続いて、細胞培養培地を交換することにより分化段階(+1日目)で非接着細胞を排除し、細胞解離バッファー(Sigma-Aldrich)を使用して、マクロファージに相当する接着細胞を分離し、サイトメトリーベースのADCP実験の場合には、使用日(8日目または9日目)に完全培地で洗浄する。細胞イメージングベースのADCPの場合には、6日目に、細胞解離バッファーを使用してマクロファージを分離し、96オプティカルプレート(costar)に30,000個/ウェルで播種する。

20

【0364】

1. Cell Insight (商標)ベースのアッセイ

マイクロプレートウェルに付着した(カルセインレッドオレンジで染色した)マクロファージを、異なる濃度の試験抗体の存在下で、カルセインAM標識標的腫瘍細胞と共に1:3のエフェクター:標的細胞比で37で2.5時間コインキュベートする。インキュベーション期間の終了時に、上清を完全培養培地に交換し、Cell Insight (商標)CX5ハイコンテンツスクリーニングプラットフォームを用いてマイクロプレートを用いてイメージングする。1ウェル当たり1500個のマクロファージを取得および分析する。食作用は、二重陽性事象(マクロファージ+標的腫瘍細胞)として証明され、Cell Insight (商標)製造業者のソフトウェアにより食作用指数を計算する。

30

【0365】

図12、15、16、17、18、20Bおよび21Bのすべての結果ならびに表3および4に示されているEC50および最大食作用指数値は、CEAを発現するMKN-45細胞と、1:3のエフェクター細胞対標的/腫瘍細胞比とを用いて得られたものである。図3Bにおけるデータは、TAA(これはCEAではない)を保有するNCI-N87細胞と、1:1のエフェクター対標的/腫瘍細胞比とを用いて得られたものである。マクロファージ当たりの提供される腫瘍細胞が多いほど、予想される食作用指数が高いが、これがおそらく、TAA×CD47二重特異性抗体(CEAではなくTAA)について図3Bに示されている食作用指数およびさらにはバックグラウンドシグナルが、本発明の二重特異性抗体の結果を実証する他の図と比較して全体的に低い主な理由である。

40

【0366】

本発明におけるすべてのADCP(食作用)値、範囲などは、特に明示的な記述がない場合には、イメージングベースのアッセイに基づくものである(図3Aにおけるデータは、フローベースのアッセイを用いて得られたものである)。

50

【0367】

2. フローサイトメトリーベースのADCPアッセイ

本発明者らの知識によれば、以下に記載されている方法によっても、ADCPを測定し得る：マクロファージを、異なる濃度の試験抗体の存在下で、CSFE標識標的腫瘍細胞（例えば、MKN-45、LS174TまたはHPAC腫瘍細胞）と共に例えば3：1のエフェクター：標的細胞比で37で2.5時間コインキュベートする。インキュベーション期間の終了時に、ビオチン化抗ヒトCD14抗体およびStrept-Cy5を追加して、マクロファージを標識する。次いで、細胞を洗浄し、フローサイトメトリー分析に供する。食作用は、二重陽性事象CD14+およびCFSE+により証明される。CD14+/CSFE+二重陽性事象と総標的細胞との間の比に100を乗じたものとして、食作用のパーセンテージを表す。図3Aにおけるデータは、TAA（これはCEAではない）を保有するHPAC細胞と、1：1のエフェクター対標的/腫瘍細胞比とを用いて得られたものである。フローサイトメトリーベースのアッセイを使用した。図3Bにおけるデータは、TAA（これはCEAではない）を保有するNCI-N87細胞と、1：1のエフェクター対標的/腫瘍細胞比とを用いて得られたものである。イメージングベースのアッセイを使用した。

10

【0368】

実施例10：MKN-45細胞へのCEA×CD47およびCEA×CD3の結合；CEA×CD3との結合の競合

a) 例えば、CEA発現ヒト胃腺癌細胞（MKN-45、DSMZ ACC 409）でCD47×CEACAM5二重特異性抗体の結合を試験する。

20

細胞を回収し、カウントし、生存率についてチェックし、FACSバッファー（PBS 2% BSA、0.1% NaN₃）に細胞3×10⁶個/mlで再懸濁する。100μlの細胞懸濁液をV底96ウェルプレートに分配する（細胞3×10⁵個/ウェル）。1300rpm、4で3分間遠心分離することにより、上清を除去する。次いで、漸増濃度の本発明の抗体をウェルに追加し、4で15分間インキュベートする。細胞を冷FACSバッファーで2回洗浄し、PE（R-フィコエリトリン）コンジュゲートマウス抗ヒトIgG Fc二次抗体（Southern Biotech、FACSバッファーで1：100プレ希釈）と共に4でさらに15分間再インキュベートする。細胞を冷FACSバッファーで2回洗浄し、1：15000希釈Sytox Blue（Life Technologies）を含む300μlのFACSバッファーに再懸濁する。Cytoflex（Millipore）を使用して、蛍光を測定する。GraphPad Prism7ソフトウェアを使用して、結合曲線およびEC50値を取得および計算する。同じ方法で、MKN-45細胞へのMAB CEAまたはMAB CEA1の結合を試験し得る。図11は、MKN-45細胞へのいくつかのCEA×CD47二重特異性抗体の結合曲線を示す。

30

【0369】

b) CEA×CD3 T細胞二重特異性抗体の追加による、CEA陽性腫瘍細胞株（MKN-45）へのCEA×CD47抗体の結合曲線のシフト。

本発明のCD47×CEACAM5二重特異性抗体と、CEA-TCBまたはCEA-TCB1のようなCEA×CD3 T細胞二重特異性抗体との競合実験に関する本発明者らの知識によれば、MKN-45細胞へのCEACAM5×CD47の結合を、CEA×CD3 T細胞二重特異性抗体の追加の有無以外は上記のように決定して、本発明のCEA×CD47二重特異性抗体の組み合わせパートナーとしてのCEA×CD3 T細胞二重特異性抗体が、CEAへの結合について競合的であるか否かを研究し得る。

40

【0370】

実施例11：フコシル化およびアフコシル化K2AC5およびK2AC22二重特異性抗体の生産および精製

フコシル化およびアフコシル化K2AC5およびK2AC22二重特異性抗体の生産。

【0371】

50

CHOプール(1つはK2AC5のためのものであり、1つはK2AC22のためのものである)を、Thomson erlenデバイスに細胞 0.3×10^6 個/mLの生細胞濃度で接種し、それぞれフコシル化およびアフコシル化抗体の生産について作業容量は700mLまたは100mLである。CDACF培地CDCHOおよび適合供給レジームを使用して、15日間フェドバッチモードですべてのプールを操作する。アフコシル化抗体の生産については、Rillahanら、Nature Chem. Biol. 2012 Jul; 8(7): 661-8により記載されているアフコシル化戦略に基づいて、および欧州特許出願公開第2282773号に基づいて、0、5、8および11日目にフェドバッチプロセス中に、200 μ Mフコース阻害剤(1,3,4-トリ-O-アセチル-2-デオキシ-2-フルオロ-L-フコース)のボラスを追加する。15日間のフェドバッチ培養後に、フコシル化またはアフコシル化抗体を含有するK2AC5およびK2AC22プール上清の回収を実施する。Sartoclear Dynamics(登録商標) Lab V Cell Harvesting Sartorius systemを使用して、CHOプール上清の回収物を清澄化する(供給業者の指示を参照のこと)。
【0372】

フコシル化およびアフコシル化K2AC5およびK2AC22二重特異性抗体の精製
フコシル化およびアフコシル化K2AC5およびK2AC22二重特異性抗体の精製は、3段階アフィニティー精製プロセスである。適切な容量のアフィニティマトリックスを有するカラムを使用するために、精製の開始前に、OctetRED96を使用して、K2AC5およびK2AC22プールの上清中の抗体濃度を測定する。フコシル化またはアフコシル化二重特異性抗体を含有する各清澄化CHOプール上清を、事前調整なしでMabSelect SuRe(MSS)カラム(GE Healthcare)にロードして、細胞培養汚染物質の大部分を除去する。次いで、低pHホールドによりMSS溶出液を処理してウイルスを不活化し、Tris 1M pH9を用いてpH6で中和する。次いで、MSS溶出液をLambdaFabSelect(LFS)カラム(GE Healthcare)にロードして、単一特異性(モノ)を除去する。次いで、LFS溶出液をpH6でpH調整する。LFSをCaptorL(CL)カラム(GE Healthcare)にロードして、単一特異性(モノ)を除去する。保存前に、CL溶出液をpH調整する。次いで、最終材料を濃縮し、最終製剤バッファーにダイアフィルトレーションし、Nanodropを使用してその濃度を調整する。フコシル化およびアフコシル化K2AC5およびK2AC22二重特異性抗体を等分し、送達まで-80で保存する。製造業者(Agilent Technologies, Santa Clara, Calif., USA)により記載されているようにProtein 80キットを使用して、Agilent 2100 Bioanalyzerを用いて変性および還元条件における電気泳動により、大きさについて精製二重特異性抗体を分析する。ACQUITY UPLC H-Class BioSystem(Waters)を使用してサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-UPLC)により、凝集レベルを評価する。Multiphor II電気泳動システム(GE Healthcare)を使用して等電点電気泳動技術(IEF)により、精製二重特異性抗体の電荷変異体分析を実行する。LabChip GXII Touch(Perkin Elmer)によりスループットマイクロチップ-CE法を使用して、フコシル化およびアフコシル化K2AC5およびK2AC22抗体のN結合複合体二岐糖型の相対分布を決定する。Limulus Amebocyte Lysate試験(LAL; Charles River Laboratories, Wilmington, Mass)を使用して、エンドトキシン汚染についてすべての抗体を試験する。糖操作K2AC5は79.68%のアフコシル化を示し、糖操作K2AC22は89.13%のアフコシル化を示す。

【0373】

これらのアフコシル化CEAxCD47二重特異性抗体を使用して、図13、14、15および16に示されている結果を得た。

【0374】

10

20

30

40

50

実施例 12 : F U T 8 (-) 細胞株における発現および精製

あるいは、本発明者らの知識によれば、以下の方法にしたがっても、本発明のアフコシル化二重特異性抗体を生産し得る。

【 0 3 7 5 】

材料および方法は、Naoko Yamane - Ohnukiら、Biotech. Bioeng. ; 87 (2004) 614 - 622にしたがう。

【 0 3 7 6 】

チャイニーズハムスター F U T 8 c D N A の単離

RNeasy (登録商標) Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を使用して CHO / D G 4 4 細胞から全 RNA を単離し、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) のための Superscript 第 1 鎖合成システム (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用してオリゴ d T で逆転写する。マウス F U T 8 c D N A (Hayashi, 2000 ; DNA Seq 11 : 91 - 96) から設計されたプライマー

【 化 1 】

5V-GTCTGAAGCATTATGTGTTGAAGC-3V (配列番号 14) および

5V-GTGAGTACATTCATTGTAAGTGTG-3V (配列番号 15)

を使用して P C R により、一本鎖 CHO / D G 4 4 細胞 c D N A からチャイニーズハムスター F U T 8 c D N A を増幅する。

【 0 3 7 7 】

F U T 8 遺伝子座のターゲティング構築物

2つの置換ベクター p K O F U T 8 N e o および p K O F U T 8 P u r o を使用して、CHO / D G 4 4 細胞における F U T 8 遺伝子の標的破壊を行う。ターゲティング構築物を確立するために、プローブとしてチャイニーズハムスター F U T 8 c D N A を用いて CHO - K 1 細胞 E ゲノムライブラリー (Stratagene, La Jolla, CA) をスクリーニングすることにより、第 1 のコードエクソンを含む F U T 8 遺伝子の 9 . 0 k b 断片を単離する。翻訳開始部位を含有する 234 b p のセグメントを、loxP 部位に隣接するそれぞれプラスミド p K O S e l e c t N e o または p K O S e l e c t P u r o (Lexicon, TX) 由来のネオマイシン耐性遺伝子 (N e o r) カセットまたはピューロマイシン耐性遺伝子 (P u r o r) カセットで置換する。プラスミド p K O S e l e c t D T (Lexicon) のジフテリア毒素遺伝子 (D T) カセットを 5 V 相同領域に挿入する。得られたターゲティング構築物 p K O F U T 8 N e o および p K O F U T 8 P u r o は、1 . 5 k b の 5 V 相同配列および 5 . 3 k b の 3 V 相同配列を含んでいた。トランスフェクション前に、ユニークな S a l I 部位でターゲティング構築物を線状化する。

【 0 3 7 8 】

相同組換え体のトランスフェクションおよびスクリーニング

Bio-Rad GenePulser (登録商標) II を使用して、350 V および 250 A F で 4 A g の線状化 p K O F U T 8 N e o をサブコンフルエント CHO / D G 4 4 細胞 (1 . 6 106) にエレクトロポレーションする。エレクトロポレーション後、600 A g / m L G 4 1 8 (N a c a l a i T e s q u e , K y o t o , J a p a n) を用いて、トランスフェクタントを選択する。以下のプライマー :

【 化 2 】

5V-TTGTGTGACTCTTAAGTCTCAGAG-3V (配列番号 16) および

5V-GAGGCCACTTGTGTAGCGCCAAGTG-3V (配列番号 17)

を使用して、以前に報告されている改変マイクロ抽出法 (Ramirez - Solisら

10

20

30

40

50

、1992; Anal Biochem 201:331-335.)により、96ウェルプレートでゲノムPCRを実施する。

【0379】

ゲノムPCRを使用して得られた1.7kb断片により相同組換え体を同定し、以下のプライマー:

【化3】

5V-GTGAGTCCATGGCTGTCCTG-3V (配列番号 218)および

5V-CCTGACTTGGCTATTCTCAG-3V (配列番号 19)

10

を用いて増幅した221bp断片を使用してサザンブロット分析により確認する。

【0380】

ヘミ接合性クローンを、前記のように、線状化pKOFUT8Puroを使用した第2ラウンドの相同組換えと、15Ag/mLピューロマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)による薬物選択とに供する。Cre-リコンビナーゼ発現ベクターpBS185(Invitrogen)を、同定したホモ接合性破壊体にエレクトロポレーションして、両FUT8対立遺伝子由来の薬物耐性遺伝子カセットを除去する。

【0381】

FUT8(-)細胞によるモノクローナル抗体の産生

本発明の二重特異性抗体をコードする発現ベクターをFUT8(-)細胞株にエレクトロポレーションし、ヒポキサンチンおよびチミジンを欠く培地で選択する。Ex-Cell1(登録商標)301培地(JRH Biosciences, Lenexa, KS)中で、コンフルエントなトランスフェクタントを1週間培養する。MabSelect(商標)(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)を使用して、培養上清から抗体を精製する。さらなる精製工程は、陰イオン/陽イオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、および特に上記カッパまたはラムダ選択樹脂を使用した精製であり得る。

20

【0382】

実施例13:二重特異性抗体のインビボ抗腫瘍活性

本発明者らの知識によれば、異種移植モデルにおいて、例えば以下のモデルにより、本発明の二重特異性抗体の抗腫瘍活性を評価し得る:1または 2×10^6 個のCEA陽性腫瘍細胞、例えばMKN-45またはLS174T細胞をNOD/SCIDマウスに皮下移植する。腫瘍体積を週3回測定する。腫瘍移植片が約 0.1 cm^3 に達した後、マウスをグループ(例えば、マウス4~6匹/群)にランダムに分け、抗体処置を開始する。この実験は、例えば、本発明の二重特異性抗体および陽性対照Mabの効果と比較し得、例えば、.実験の終了(d25)までCD47 Mab B6H12.2抗体を例えば毎週静脈内注射する。例えば、 $50 \sim 1200 \mu\text{g}$ /マウス/注射で抗体を投与する。

30

【0383】

適切なモデルにおいて、本発明の二重特異性抗体とCEAxCD3二重特異性抗体との組み合わせを試験し得る。本発明の抗体とMAB CEA、MAB CEA1またはCEA-TCB CEA-TCB1との組み合わせを試験し得るモデルは、例えば、Bacacra、(Clin. Cancer Res., 22(13);3286-97;2016)に記載されており、特に、CEACAM5xCD47とCEA-TCBまたはCEA-TCB1との組み合わせ研究にも使用される。

40

【0384】

実施例14:健常ヒトドナーヒト血液由来の全血およびPBMCで試験したサイトカイン放出

本発明者らの知識によれば、水中提示で試験抗体(95%v/v血液)による最小希釈で全血(WB CRA)を使用して、インビトロサイトカイン放出アッセイを実施し得る。このアッセイフォーマットは、サイトカイン放出の機構に影響を与え得る生理学的濃度

50

の因子を含有するインビボ環境をより厳密に模倣すると考えられる。しかしながら、このフォーマットは、T細胞媒介性サイトカイン放出（例えば、抗CD28）を予測するのに不十分であると考えられる。

【0385】

また、T細胞媒介性サイトカイン放出（PBMC SP CRA）を評価するために固定化mAb（固相、SP）提示を用いて、健常ヒトドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）を使用して、アッセイを実施し得る。このアッセイフォーマットは、インビボで起こり得るmAbの架橋および高密度提示をシミュレートする（例えば、抗体のFc部分と他の免疫細胞上のFc受容体との相互作用を介した標的のクラスター化または抗薬物抗体によるmAbの架橋）。このフォーマットは、T細胞媒介性サイトカイン放出を予測する。

10

【0386】

CD47×CEA二重特異性抗体のようなTAA×CD47抗体と並行して、各アッセイフォーマットの陰性対照および特定の陽性対照を試験し得る。図7AおよびBを参照のこと。

【0387】

実施例15：赤血球への抗体結合、赤血球の食作用、ならびに血小板活性化および凝集全血結合

本発明者らの知識によれば、健常ドナーから収集したヒト全血サンプルを含むクエン酸塩を、3μg/mLの本発明のAF488結合CEA×CD47二重特異性抗体、B6H12.2またはアイソタイプ対照および表面染色抗体（PE-Cy7抗hCD45およびPE抗hCD41a、血小板のみ）と4で30分間混合し得る。インキュベーション後、全血を2つのサンプルに分ける：赤血球分析の場合には、5μLを希釈し、PBSで洗浄し、血小板分析の場合には、150μLを赤血球溶解液と共にインキュベートし、洗浄する。Cytometerによりサンプルを取得し、FlowJoソフトウェアを用いて分析して、MFI値を決定する。

20

【0388】

赤血球貪食

本発明者らの知識によれば、300×gで遠心分離することにより、ヒト全血からヒト赤血球（RBC）を単離し、PBSで2回洗浄し、CFSE-（カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル）で標識し、マクロファージの追加前に試験抗体と共に37で1時間プレインキュベートし得る。標識RBCを、本発明の抗体または対照（非結合IgG1抗体）の存在下で、ヒトマクロファージと共に200：1の標的対エフェクター比で1時間培養し得る。培養後、細胞を抗CD14-APCで染色し、フローサイトメトリーにより分析する。CD14+事象（マクロファージ）（これはCFSE+でもあるので、少なくとも1つのRBCを貪食している）のパーセントとして食作用を定量した（シングルレットで事象をゲーティング）。マクロファージ染色の後、FACS溶解液を用いて赤血球を溶解させたことを除いて、実施例9に記載されているように食作用およびFACS分析を行う。

30

【0389】

図8は、IgG1抗CD47モノクローナル抗体B6H12.2のRBC食作用が、本発明のCEA×CD47二重特異性抗体のCD47結合アームを含有するIgG1TAA×CD47（CEA×CD47ではない）二重特異性抗体よりもはるかに強力であることを示す。野生型Fcを有するTAA×CD47二重特異性抗体は、試験濃度範囲で食作用を示さなかった。Fcがaa突然変異DEA（S329DおよびI332EおよびG236A）を保有する場合、食作用は検出されるが、B6H12.2抗体のようにより高濃度である。

40

【0390】

インビトロ血小板活性化および凝集

標準的なフローサイトメトリー実験において、7人のヒト健常ドナーの全血中でヒト血小板活性化を誘導するTAA×CD47およびCEA×CD47二重特異性抗体の能力を

50

、表面マーカーCD62Pのアップレギュレーションにより測定した。簡潔に言えば、5 μ Lの全血を10 μ Lの(2xで調製した)各サンプルと共に室温で15分間インキュベートする。各試験抗体を異なる濃度(0、0.02、0.2、2、20および200 μ g/mL)で追加する。血小板活性化を誘導することが公知の陽性対照試薬として含まれるアデノシン二リン酸(ADP)および抗CD9(ALB6)を、それぞれ10 μ Mおよび10 μ g/mLの濃度で追加する。次いで、10 μ Lの抗CD41a-PEおよび10 μ Lの抗CD62P-APCを追加し、暗所、室温で15分間インキュベートした。最後に、500 μ LのCellFix(BD Biosciences、水で1/10希釈)を追加し、200 μ Lの各サンプルをCytofLEXの取得に適切なU底96ウェルプレートに移す。CD41a-PE陽性染色により、血小板を同定する。CD62Pマーカーの発現により、血小板活性化を評価する。

10

【0391】

図10は、7人のボランティアドナー由来の血液で得られた結果を示す。抗TAAモノクローナル抗体もTAAxCD47二重特異性抗体も、関連血小板活性化を誘導しないことが見出された(両方ともwt IgG1Fcを有する)。対照的に、wt IgG1Fcを有する抗CD47抗体B6H12.2は血小板活性化を誘導し、DEA突然変異を保有するFcを有するTAAxCD47 biAbも血小板活性化を示した。

【0392】

また、全血中の血小板活性化について、図10に示されている濃度範囲で、(アフコシル化を有するおよび有しない)CEAxCD47抗体K2AC5およびK2AC22を研究した。TAAxCD47について図10に示されているように、7人のドナーのうちの6人の血液では、有意な血小板活性化は見られなかった。1人のドナーは、陽性対照剤ではまれな血小板活性化を既に示し、次いで、K2AC5および22ではいくらかの血小板活性化も示した。まれな血小板活性化により、この1人のドナーの結果を無視した。

20

【0393】

本発明者らの知識によれば、多血小板血漿(PRP)上で、CD47/CEA二重特異性抗体の存在下における凝集の可能性を評価し得る。10 μ Mおよび5 μ MのADPで、または200、100、20、25および12.5 μ g/mLの試験品で、ならびに生理食塩水またはアイソタイプ対照でPRPをチャレンジする。常に攪拌しながら血栓凝集計T44Vを用いて、血小板刺激(すなわち、10分間)にわたって血小板凝集を評価し得る。Thrombosoft1.6ソフトウェア(SD Innovation, Rouard, France)をデータの分析に使用し得る。

30

【0394】

実施例16: カニクイザル例における血液学的評価

本発明者らの知識によれば、カニクイザルにおいて、(RBCおよび血小板を含む)血液学的パラメータに対する任意の効果について、カニクイザル交差反応性抗体をインピボで試験し得る。本発明の抗体を、例えば、静脈内経路によりカニクイザルに最大100mg/kgの用量で毎週与える。赤血球数および血小板数を含む血液学的パラメータを経時的にモニタリングし、サルにおける対照値(投与前の値)と比較する。ルーチンな方法により、血液学的パラメータを決定する。

40

【0395】

図9における結果は、本発明のCEAxCD47二重特異性抗体のCD47結合アームを含有するIgG1TAAxCD47(CEAxCD47ではない)二重特異性抗体を用いて得られたものである。高用量による反復投与にもかかわらず、RBC数および血小板数に関して、対照動物と処置動物との間に有意差はない。これは、IgG4抗CD47抗体hu5F9-G4(Jie Liuら、(Open access article, PLOS ONE 10(9) September 2015))を用いた公開されている結果とは対照的であり、これは、ヘモグロビンの用量依存的な減少が、約1mg/kgの単回投与で既に始まっていることを示している。IgG4フォーマットを使用して、IgG1フォーマットと比較して赤血球および血小板に対する効果を最小化した。この測

50

定は、 1 mg/kg およびそれ未満の既にかなり低い用量によるものであるにもかかわらず、カニクイザルでは、例えばヘモグロビンの用量依存的な減少が観察される。

【0396】

実施例17：カニクイザルにおける薬物動態特性の決定

本発明者らの知識によれば、単回投与薬物動態研究において、動物を、(雄および雌を含む) $n = \text{サル } 2 \sim 4 \text{ 匹/群}$ の $2 \sim 5$ つの処置群にランダムに分け得る。単回静脈内用量の本発明の二重特異性抗体を動物に投与する ($15 \sim 30$ 分間にわたる注入)。処置群における用量は、 $0.01\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ の範囲である。投与量は最大 5 mL/kg である。実験プロトコールにしたがって、複数の時点、例えば二重特異性抗体の静脈内投与の 0.25 、 1 、 4 、 8 、 24 、 48 、 72 、 96 、 120 、 168 、 240 、 336 、 504 (22日目)、 672 (29日目)、 840 (36日目)、 1008 (43日目)、 1176 (50日目) および 1344 時間 (57日目) 後に、採血を予定する。動物1匹および1時点あたり約 2 mL の血液サンプルを収集する。血清中または血漿中のいずれかで抗体の濃度を測定した。濃度を測定するためにELISA試験を開発および検証する。各サンプルを2回反復で測定する。

10

【0397】

濃度時間曲線から、業界標準のソフトウェア (Phoenix WinNonlin; 非コンパートメント分析) を使用することにより、 C_{max} 、クリアランス、消失半減期、曲線下面積などのようなPKパラメータを決定し得る。

【0398】

$CEA \times CD47$ カップ - ラムダ二重特異性抗体の消失半減期は $3 \sim 14$ 日間の範囲内であると予想され、患者への1週間に1回 ($q1w$) または2週間に1回 ($q2w$) または3週間に1回 ($q3w$) または4週間に1回 ($q4w$) の投与を提案する。

20

【0399】

実施例18：脱落CEAの存在下で二重特異性抗体により媒介されるADCP

標的細胞として使用するMKN45細胞をカルセインAMで染色する。並行して、複数の濃度の試験抗体を、一定用量 (200 ng/mL) の市販の脱落CEA (BioRad) と共にまたはそれなしでインキュベートする。このインキュベーション後、染色MKN-45を、脱落CEAと予混合した抗体を用いて室温で20分間オプソニン化する。次いで、マイクロプレートウェルに付着した (カルセインレッドオレンジで染色した) マクロファージを、オプソニン化標識標的腫瘍細胞と共に $1:3$ のエフェクター: 標的細胞比で 37 で 2.5 時間コインキュベートする。 1 mg/mL のヒトIgGの存在下で、ADCPを実施する。インキュベーション期間の終了時に、上清を完全培養培地に交換し、Cell Insight (商標) CX5ハイコンテンツスクリーニングプラットフォームを用いてマイクロプレートをイメージングする。1ウェル当たり 1500 個のマクロファージを取得および分析する。食作用は、二重陽性事象 (マクロファージ + 貪食された標的腫瘍細胞) として証明され、Cell Insight (商標) 製造業者のソフトウェアにより食作用指数を計算する。結果は図20Bに示されている。

30

【0400】

実施例19：CEA-TCBおよびCEA-TCB1の存在下で二重特異性抗体により媒介されるADCP

40

標的細胞として使用するカルセインAM標識MKN45細胞を、一定量のCEA-TCB (300 nM) またはCEA-TCB1 (30 nM) と共にまたはそれらなしで室温で20分間プレインキュベートする。このインキュベーション後、異なる濃度の試験抗体を適切なウェルに20分間追加する。次いで、マイクロプレートウェルに付着した (カルセインレッドオレンジで染色した) マクロファージを、オプソニン化標識標的腫瘍細胞と共に $1:3$ のエフェクター: 標的細胞比で 37 で 2.5 時間コインキュベートする。 1 mg/mL のヒトhIgGの存在下で、ADCPを実施する。インキュベーション期間の終了時に、上清を完全培養培地に交換し、Cell Insight (商標) CX5ハイコンテンツスクリーニングプラットフォームを用いてマイクロプレートをイメージングする

50

。1ウェル当たり1500個のマクロファージを取得および分析する。食作用は、二重陽性事象(マクロファージ+貪食された標的腫瘍細胞)として証明され、CellInsight(商標)製造業者のソフトウェアにより食作用指数を計算する。

【0401】

図18は、追加したCEA-TCBもCEA-TCB1も、K2AC22により誘導される食作用を減少させないことを示す。驚くべきことに、K2AC22の食作用は、30nM CEA-TCB1の追加によりわずかに増加した。

【0402】

実施例20: CD47×CEAとCEA×CD3との組み合わせによる殺傷アッセイ
 パフィーコートからヒト末梢血単核細胞(PBMC)を単離した。これらのPBMCの一部を、(T細胞の供給源として使用するために)凍結培地(90%FCS10%DMSO)で凍結し、一部を使用して(食作用のセクションで説明されているように)マクロファージを調製した。6日間のマクロファージ分化後、細胞を96ウェルプレートにプレATINGし、37℃でインキュベートした。アッセイの日(マクロファージをプレATINGした2日後)に、対応するマクロファージドナー由来の凍結PBMCを解凍し、マクロファージプレートに追加した。抗体の組み合わせを用いて、すなわち特定の濃度のaCEA×CD47二重特異性抗体と一緒に特定の濃度のCEA×CD3 T細胞二重特異性抗体を用いて、標的細胞(ルシフェラーゼを発現するように操作したMKN45)をオプソニン化した。オプソニン化標的を、マクロファージおよび自己PBMCを含有するプレートに追加し;プレートを37℃で48時間インキュベートした。48時間後、ウェル培地の半分を除去し、2×ルシフェリン溶液をプレートに追加して、150μg/mLの最終濃度を得た。室温における5分間のインキュベーション後、Synergy NEOを使用してプレートを読み取った。(バックグラウンドを差し引いた)発光値を、標的細胞のみを含有する対照で割って100を乗じて、生存率のパーセンテージを計算した。次いで、100から生存率のパーセンテージに差し引くことにより、殺傷のパーセンテージを推定した。

【0403】

図19AおよびBは、様々な濃度のCEA-TCBおよびK2AC5およびK2AC22の組み合わせで得られた結果を示す。

【0404】

本明細書で引用されるすべての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイトおよびアクセッション番号/データベース配列(ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の両方を含む)は、個々の各刊行物、特許、特許出願、インターネットサイトまたはアクセッション番号/データベース配列が参照によりそのように組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、すべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

ヒトCEACAM5に特異的に結合する第1の結合部分と、ヒトCD47に特異的に結合する第2の結合部分とを含む、二重特異性抗体。

(項目2)

糖操作されていない同じ二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように糖操作されたFc領域を含む、項目1に記載の二重特異性抗体。

(項目3)

前記第1の結合部分が、ヒトCEACAM5およびCEACAM6に特異的に結合する、項目1または項目2に記載の二重特異性抗体。

(項目4)

前記第1の結合部分が、ヒトCEACAM5およびヒトCEACAM6に平衡して特異的に結合する、項目3に記載の二重特異性抗体。

(項目5)

10

20

30

40

50

ヒトCEACAM5およびヒトCEACAM6への結合のEC50値が3倍未満異なる(平衡結合)、項目4に記載の二重特異性抗体。

(項目6)

a)前記第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号112のCDRL1、配列番号113のCDRL2および配列番号114のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b)前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含む、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目7)

前記第1の結合部分が、アミノ酸35~144のCEACAM5のIg様Vタイプドメインに結合することを特徴とする、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目8)

CEACAM5への結合について、VKおよびVHドメインとして配列番号100および101の配列のVKおよびVHを含む抗CEACAM5抗体SM3Eと競合することを特徴とする、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目9)

CEACAM5への結合について、抗CEACAM5抗体SM3E、VLおよびVHドメインとして配列番号102および103の配列のVLおよびVHを含むMEDI、VKおよびVHドメインとして配列番号110および111の配列のVKおよびVHを含むラベツズマブ(Lab)、VKおよびVHドメインとして配列番号104および105の配列のVKおよびVHを含むSAR、VKおよびVHドメインとして配列番号108および109の配列のVKおよびVHを含むT86、66、VKおよびVHドメインとして配列番号106および107の配列のVKおよびVHを含むCH1A1Aのいずれとも競合しない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目10)

前記二重特異性抗体の食作用指数曲線のEC50値が、同じ実験条件下および1mg/mlヒトIgGの存在下における参照抗体K2AC22のE50値の0.1~3倍の範囲内である、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目11)

前記二重特異性抗体のMKN45細胞の食作用のEC50値が、同じ実験条件下および1mg/mlヒトIgGの存在下における参照抗体K2AC22のE50値の0.1~10倍の範囲内であることを特徴とする、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目12)

1mg/mlヒトIgGの存在下では、イメージングベースのアッセイで測定された食作用指数の最大が、同じ実験条件下におけるヒトIgGなしの食作用と比較して0.7倍超減少しないことを特徴とする、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目13)

前記EC50範囲が、0.2~3.0、0.3~3.0、0.5~2.5または1.0~2.5である、項目10に記載の二重特異性抗体。

(項目14)

食作用の前記EC50値が、前記食作用指数曲線のEC50値として測定される、項目10または項目11に記載の二重特異性抗体。

(項目15)

1mg/mlヒトIgGの存在下では、前記二重特異性抗体の最大食作用指数が、同じ実験条件下およびヒトIgGの追加なしで測定された前記最大食作用指数と比較して7倍超減少しない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目16)

10

20

30

40

50

a) 前記第1の結合部分が、配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号13のヒトラムダタイプの軽鎖定常ドメインとを含み、前記第2の結合部分が、配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号7のCDRL1、配列番号8に含まれるAla Ala SerのCDRL2および配列番号9のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含むか、または

b) 前記第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号13のヒトラムダタイプの軽鎖定常ドメインとを含み、前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含む、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目17)

a) 前記第1の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、

配列番号31、32および33；配列番号34、35および36、配列番号37、38および39、配列番号40、41および42、配列番号43、44および45、配列番号46、47および48、配列番号49、50および51、配列番号52、53および54、配列番号55、56および57、配列番号58、59および60、配列番号61、62および63、配列番号112、113および114からなる群より選択されるCDRL1、CDRL2およびCDRL3の組み合わせを含む軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む重鎖可変領域と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖可変領域とを含む、項目1～15のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目18)

前記第1の結合部分において、軽鎖定常ドメインとして配列番号13のヒトラムダタイプドメインを含むことを特徴とする、項目1～15のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目19)

a) 前記第1の結合部分が、配列番号4の重鎖可変領域(VH)と、

配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74および配列番号115からなるVLC L領域に含まれるVLの群より選択される軽鎖可変領域とを含み、ならびに

b) 前記第2の結合部分が、配列番号4の重鎖可変領域と、配列番号10の軽鎖可変領域とを含む、項目1～15のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目20)

a) 前記第1の結合部分が、配列番号5の重鎖と、

配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74および配列番号115からなる群より選択される軽鎖とを含み、

b) 前記第2の結合部分が、配列番号5の重鎖可変領域と、配列番号11の軽鎖可変領域とを含む、項目1～15のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目21)

前記第1の結合部分について一価であり、前記第2の結合部分について一価である、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目22)

定常および可変フレームワーク領域配列がヒトのものである、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

(項目 23)

前記第1および第2の結合部分がそれぞれ、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖を含む、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 24)

ヒトIgG1タイプである、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 25)

全長抗体である、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 26)

CEACAM5に特異的に結合する前記第1の結合部分が、カッパ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含み、CD47に特異的に結合する前記第2の結合部分が、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

(項目 27)

CEACAM5に特異的な前記第1の結合部分が、ラムダ軽鎖可変ドメインおよびラムダ軽鎖定常ドメインを含み、CD47に特異的な前記第2の結合部分が、カッパ軽鎖可変ドメインおよびカッパ軽鎖定常ドメインを含む、項目1~25のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 28)

完全ヒト二重特異性IgG1フォーマットである、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

(項目 29)

タイプ1またはタイプ2の二重特異性抗体であり、共通重鎖(cHc)を含む、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 30)

100nM~600nMの結合親和性でヒトCD47に結合することを特徴とする、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 31)

1~200nMのEC50値でMKN-45細胞に結合する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 32)

1~50nMのEC50値でMKN-45細胞に結合する、項目31に記載の二重特異性抗体。

30

(項目 33)

50~100nMのEC50値でMKN-45細胞に結合する、項目31に記載の二重特異性抗体。

(項目 34)

100~200nMのEC50値でMKN-45細胞に結合する、項目31に記載の二重特異性抗体。

(項目 35)

前記二重特異性抗体による、ヒトマクロファージの存在下におけるMKN-45細胞の前記食作用指数曲線の前記EC50が、200ng/ml可溶性CEACAM5の存在下では、可溶性CEACAM5なしで測定されたEC50と比較して高い濃度の方向に4倍超シフトせず、および/または前記食作用指数曲線の最大が、200ng/ml CEACAM5の追加により10%もしくはそれを超えて、15%もしくはそれを超えてもしくは20%もしくはそれを超えて減少しない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

40

(項目 36)

MKN-45細胞への前記二重特異性抗体の結合曲線のEC50が、200ng/ml可溶性CEACAM5の存在下では、可溶性CEACAM5なしで測定されたEC50と比較して高い濃度の方向に2倍超シフトしない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特

50

異性抗体。

(項目37)

ヒトCEACAM1と交差反応しない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目38)

1~50nMのEC50値で、組換えCHO細胞CHO-K1(ATCC(登録商標)CCL-61(商標))上において発現されたヒトCEACAM6に結合する、項目3に記載の二重特異性抗体。

(項目39)

前記CEACAM6陰性CHO細胞が、ヒトCEACAM6のcDNAを含有するベクターでトランスフェクトされる、項目38に記載の二重特異性抗体。

10

(項目40)

ヒトCEACAM5に特異的に結合するモノクローナル抗体であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む300nMの濃度のモノクローナル抗体が、MKN-45細胞へのCEACAM5xCD47二重特異性抗体の結合曲線のEC50をより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目41)

ヒトCEACAM5およびCD3に特異的に結合する二重特異性抗体であって、重鎖として配列番号97および98の重鎖と、軽鎖として配列番号96および99の軽鎖とを含む300nMの濃度の二重特異性抗体が、MKN-45細胞への前記CEACAM5xCD47二重特異性抗体の前記結合曲線の前記EC50をより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

(項目42)

ヒトCEACAM5およびCD3に特異的に結合する二重特異性抗体であって、重鎖および軽鎖として配列番号92~95のアミノ酸配列を含む30nMの濃度の二重特異性抗体が、MKN-45細胞への前記CEACAM5xCD47二重特異性抗体の前記結合曲線の前記EC50をより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目43)

ヒトCEACAM5およびCD3に特異的に結合する二重特異性抗体であって、重鎖および軽鎖として配列番号92~95のアミノ酸配列の鎖を含む30nMの濃度の二重特異性抗体が、MKN-45細胞への前記CEACAM5xCD47二重特異性抗体の前記食作用指数曲線の前記EC50をより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

30

(項目44)

ヒトCEACAM5およびCD3に特異的に結合する二重特異性抗体であって、重鎖および軽鎖として配列番号96~99のアミノ酸配列を含む300nMの濃度の二重特異性抗体が、MKN-45細胞への前記CEACAM5xCD47二重特異性抗体の前記食作用指数曲線の前記EC50をより高い濃度の方向に3倍超シフトさせない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

40

(項目45)

前記第1の結合部分の重鎖としておよび前記第2の結合部分の重鎖として共通重鎖(cHc)を含む、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目46)

各結合部分の前記共通重鎖が、CDRとして配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3または配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含むことを特徴とする、項目45に記載の二重特異性抗体。

(項目47)

50

各結合部分の前記共通重鎖が、共通可変重ドメイン(c V H)として配列番号4を含むことを特徴とする、項目45に記載の二重特異性抗体。

(項目48)

配列番号5、配列番号23および配列番号24からなる群より選択される共通重鎖(c H C)を含むことを特徴とする、項目45に記載の二重特異性抗体。

(項目49)

配列番号5の前記共通重鎖が、配列番号6に示されている核酸配列によりコードされる、項目48に記載の二重特異性抗体。

(項目50)

前記第2の結合部分が、CDRとして配列番号1のCDRH1、配列番号2のCDRH2および配列番号3のCDRH3を含む共通重鎖と、CDRとして配列番号7のCDRL1、配列番号8に含まれるAla Ala SerのCDRL2および配列番号9のCDRL3を含む軽鎖(LC)とを含むか、またはCDRとして配列番号25のCDRH1、配列番号26のCDRH2および配列番号27のCDRH3を含む共通重鎖と、CDRとして配列番号28のCDRL1、配列番号29のCDRL2および配列番号30のCDRL3を含む軽鎖(LC)とを含む、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目51)

前記第2の結合部分が、可変重ドメイン(c V H)として配列番号4を含む重鎖と、配列番号10の可変軽ドメイン(V L)とを含む、項目1~48のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目52)

前記第2の結合部分が、配列番号5の重鎖(c H C)と、配列番号11の軽鎖(C L)とを含む、項目1~48のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目53)

前記第2の結合部分が、配列番号23の重鎖(c H C)と、配列番号11の軽鎖(C L)とを含む、項目1~48のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目54)

前記第2の結合部分が、配列番号24の重鎖(c H C)と、配列番号11の軽鎖(C L)とを含む、項目1~48のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目55)

配列番号11の前記軽鎖(C L)が、配列番号12に示されている核酸配列によりコードされる、項目52~54のいずれかに記載の二重特異性抗体。

(項目56)

CEACAM5に特異的に結合し、配列番号13の軽鎖定常ドメインを含む、項目1~48のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目57)

0.1~10nMのIC50で、MKN-45細胞上のCD47(SIRP、CD172a;UniProtKB P78324)間の相互作用を阻害する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目58)

ヒトマクロファージによる、CEACAM5発現腫瘍細胞株MKN-45の前記食作用指数曲線(イメージングベースのアッセイ)の10nM未満のEC50値を特徴とする、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目59)

CEACAM5に特異的に結合するが、MKN-45腫瘍細胞上のCEACAM5への結合について、MAB CEA、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と競合しない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目60)

MKN-45細胞への前記結合の前記EC50値(1~200nMのEC50)が、300nMの濃度のMAB CEAもしくはCEA-TCBの存在下で、または30nMの濃

10

20

30

40

50

度の C E A - T C B 1 の存在下で 3 倍未満増加する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 1)

B 6 H 1 2 . 2 を用いた同じアッセイで測定された E C 5 0 と比較して 1 0 0 倍またはそれよりも高い R B C 食作用の E C 5 0 を有する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 2)

最大 2 0 0 μ g / m L の濃度で有意な血小板活性化を示さない、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 3)

改変オリゴ糖を有する F c 領域を有するように糖操作されている、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 4)

前記糖操作された二重特異性抗体が、同じ実験条件下で測定された場合に、糖操作されていない前記同じ二重特異性抗体と比較して、前記イメージングベースのアッセイにより測定された前記食作用指数曲線の少なくとも 3 倍低い E C 5 0 値を有する、項目 6 3 に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 5)

前記食作用指数の前記 E C 5 0 が、5 ~ 1 0 倍低いかまたは 1 0 ~ 3 0 倍低い、項目 6 4 に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 6)

糖操作されていない前記二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように改変された F c 領域を有する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 7)

糖操作されていない前記二重特異性抗体と比較して増加した割合の二分岐型オリゴ糖を有するように糖操作された F c 領域を有する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 8)

前記二分岐型オリゴ糖が主に二分岐型複合体である、項目 6 9 に記載の二重特異性抗体。

(項目 6 9)

糖操作されていない前記二重特異性抗体と比較して増加した割合の前記二重特異性抗体の前記 F c 領域中の二分岐型非フコシル化型オリゴ糖を有するように糖操作されている、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 7 0)

糖操作されていない前記二重特異性抗体と比較して増加した前記 F c 領域中の G I c N A c 残基対フコース残基比を有するように糖操作されている、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 7 1)

前記二分岐型非フコシル化型オリゴ糖が主にハイブリッド形態である、項目 7 0 に記載の二重特異性抗体。

(項目 7 2)

前記二分岐型非フコシル化型オリゴ糖が主に複合体タイプである、項目 7 0 に記載の二重特異性抗体。

(項目 7 3)

前記 N 結合型オリゴ糖の 5 0 % ~ 1 0 0 % が非フコシル化型である F c 領域を有する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 7 4)

前記 N 結合型オリゴ糖の 5 0 % ~ 1 0 0 % が二分岐型である F c 領域を有する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 7 5)

10

20

30

40

50

前記N結合型オリゴ糖の80%～100%が二分岐型および非フコシル化型であるFc領域を有する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目76)

糖操作されており、前記糖操作された抗体により誘導された前記濃度ADCC曲線(最大および/またはEC50)が、糖操作されていない前記同じ二重特異性抗体により誘導されたADCCと比較して少なくとも1.2倍増加している、前述の項目1のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目77)

ADCC曲線のADCC最大および/またはEC50値が1.2～2.0倍増加している、項目76に記載の二重特異性抗体。

10

(項目78)

同じ実験条件下で測定された場合に、糖操作されていない前記同じ二重特異性抗体と比較して、前記イメージングベースのアッセイにより測定された前記食作用指数曲線の少なくとも3倍低いEC50値を有する、項目2～77のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目79)

前記食作用指数の前記EC50が5～10倍低い、項目78に記載の二重特異性抗体。

(項目80)

前記食作用指数の前記EC50が10～30倍低い、項目78に記載の二重特異性抗体。

(項目81)

前記糖操作された抗体により誘導されてフローサイトメトリーにより決定された最大ADCP機能が、糖操作されていない前記同じ二重特異性抗体により誘導されたADCPと比較して少なくとも1.2倍増加している、項目2～80のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

(項目82)

前記ADCPが1.2～2.0倍増加している、項目80に記載の二重特異性抗体。

(項目83)

一置換S239D、I332E、G236A、二置換I332EおよびG236A、S239DおよびI332E、S239DおよびG236Aならびに三置換S329DおよびI332EおよびG236Aからなる群より選択される前記Fc領域中の1つ、2つまたは3つのアミノ酸置換を含むことを特徴とする、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

30

(項目84)

糖操作されていない前記同じ二重特異性抗体と比較して減少した数のフコース残基を有するように糖操作されたFc領域を有する、項目83sに記載の二重特異性抗体。

(項目85)

前記アミノ酸置換抗体により誘導されたADCC曲線の前記最大および/またはEC50値が、前記Fc領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない前記二重特異性抗体により誘導されたADCCと比較して少なくとも1.2倍増加している、項目83または84に記載の二重特異性抗体。

(項目86)

ADCCが1.2～2.0倍増加している、項目85に記載の二重特異性抗体。

40

(項目87)

前記Fc領域中の前記置換を含む前記二重特異性抗体が、同じ実験条件下で測定された場合に、Fc領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない前記同じ二重特異性抗体と比較して、前記イメージングベースのアッセイにより測定された前記食作用指数曲線の少なくとも3倍低いEC50値を有する、項目83～86のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目88)

前記食作用指数の前記EC50が5～10倍低い、項目87に記載の二重特異性抗体。

(項目89)

50

前記食作用指数の前記 E C 5 0 が 1 0 ~ 3 0 倍低い、項目 8 7 に記載の二重特異性抗体。
(項目 9 0)

前記 F c 領域中の前記置換を含む前記二重特異性抗体が、前記アミノ酸置換抗体により誘導されてフローサイトメトリーにより決定された最大食作用が、前記 F c 領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない前記抗体により誘導された最大食作用と比較して少なくとも 1 . 2 倍増加していることを特徴とする、項目 8 3 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 1)

前記 A D C P が 1 . 2 ~ 2 . 0 倍増加している、項目 9 0 に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 2)

前記 F c 領域中の前記置換を含む前記二重特異性抗体が、同じ実験条件下で測定された場合に、F c 領域中の前記アミノ酸置換をいずれも含まない前記同じ二重特異性抗体と比較して、前記イメージングベースのアッセイにより測定された前記食作用指数曲線の少なくとも 3 倍低い E C 5 0 値を有する、項目 8 3 ~ 9 1 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 3)

前記食作用指数の価 E C 5 0 が 5 ~ 1 0 倍低い、項目 9 2 に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 4)

前記 F c 領域中の前記 N 結合型オリゴ糖の 5 0 % ~ 1 0 0 %、6 0 % ~ 1 0 0 %、7 0 % ~ 1 0 0 % または 8 0 % ~ 1 0 0 % が非フコシル化型である、項目 2 ~ 9 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 5)

前記 F c 領域中の前記 N 結合型オリゴ糖の 5 0 % ~ 1 0 0 %、6 0 % ~ 1 0 0 %、7 0 % ~ 1 0 0 % または 8 0 % ~ 1 0 0 % が二分岐型である、項目 2 ~ 9 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 6)

前記 F c 領域中の前記 N 結合型オリゴ糖の 5 0 % ~ 1 0 0 %、6 0 % ~ 1 0 0 %、7 0 % ~ 1 0 0 % または 8 0 % ~ 1 0 0 % が二分岐型非フコシル化型である、項目 2 ~ 9 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 7)

前記糖操作された二重特異性抗体が、共通重鎖として配列番号 5 を含む糖操作されていない前記二重特異性抗体と比較して増加したエフェクター機能を含む、項目 2 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 8)

以下のエフェクター機能：

a . F c R への増加した結合親和性、

b . 増加した抗体依存性細胞食作用 (A D C P) を含むマクロファージの増加した結合、

c . 増加した抗体媒介性細胞傷害 (A D C C) を含む N K 細胞の増加した結合、および

d . 単球への増加した結合

の 1 つまたはそれよりも多くの増加を示す、項目 9 7 に記載の二重特異性抗体。

(項目 9 9)

前記イメージングベースの食作用アッセイへの 1 m g / m L の h u I g G の前記追加が、前記濃度 / 食作用指数曲線の前記最大の 0 . 9 倍未満の減少および / またはより高い濃度の方向への前記 E C 5 0 の 3 倍未満のシフトを引き起こす、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 1 0 0)

カニクイザル C E A C A M 5 と交差反応する、前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目 1 0 1)

前述の項目のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードする、単離されたポリヌクレ

10

20

30

40

50

オチド。

(項目102)

項目101に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

(項目103)

項目102に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

(項目104)

本発明の二重特異性抗体の生産のための方法であって、

a) 前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件下で、項目103に記載の宿主細胞を培養すること、および

b) 前記抗体を単離すること

を含む、方法。

(項目105)

前記抗体が、CEACAM5およびCD47に特異的に結合することができる、項目104に記載の方法。

(項目106)

項目2～100のいずれか一項に記載の糖操作された二重特異性抗体を生産するための方法であって、

a) 前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件であって、前記二重特異性抗体の前記Fc領域上に存在するオリゴ糖の改変を可能にする条件下で、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII活性を有するポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸を発現するように糖操作された宿主細胞を培養すること；および

b) CEACAM5およびCD47に特異的に結合することができる前記糖操作された二重特異性抗体を単離すること

を含む、方法。

(項目107)

宿主細胞において項目2～100のいずれか一項に記載の糖操作された二重特異性抗体を生産するための方法であって、

a) 前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件であって、前記二重特異性抗体の前記Fc領域上に存在するオリゴ糖の改変を可能にする条件下で、FUT8遺伝子の標的破壊により糖操作された宿主細胞を培養すること、および

b) CEACAM5およびCD47に特異的に結合することができる前記糖操作された二重特異性抗体を単離すること

を含む、方法。

(項目108)

宿主細胞において項目83～93のいずれか一項に記載のFc置換二重特異性抗体を生産するための方法であって、

a) 前記二重特異性抗体の生産を可能にする条件下で、前記Fc置換二重特異性抗体をコードする発現ベクターを含む宿主細胞を培養すること、および

b) CEACAM5およびCD47に特異的に結合することができる前記Fc置換二重特異性抗体を単離すること

を含む、方法。

(項目109)

腫瘍細胞の細胞溶解を誘導する方法であって、前記腫瘍細胞を、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と接触させることを含む、方法。

(項目110)

前記腫瘍細胞がヒト腫瘍細胞である、項目109に記載の方法。

(項目111)

前記腫瘍細胞が患者中にある、項目109または項目110に記載の方法。

(項目112)

前記腫瘍細胞が、結腸直腸癌細胞、NSCLC(非小細胞肺癌)細胞、胃癌細胞、膵臓癌

10

20

30

40

50

細胞、乳癌細胞、またはCEACAM5を発現する別の腫瘍細胞であることを特徴とする、項目109～111のいずれか一項に記載の方法。

(項目113)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に治療有効量の項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

(項目114)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の生存期間を増加させる方法であって、前記被験体に治療有効量の項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

(項目115)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌、膵臓癌または乳癌であることを特徴とする、項目113または項目114に記載の方法。

(項目116)

化学療法および/または放射線療法と組み合わせて前記二重特異性抗体をヒト被験体に投与する、項目109～115のいずれか一項に記載の方法。

(項目117)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体を処置するための方法であって、前記被験体に治療有効量の項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含み、前記二重特異性抗体の食作用のEC50値が、同じ実験条件下および1mg/mlヒトIgGの存在下における参照抗体K2A22のE50値の0.1～3倍の範囲内であることを特徴とする、方法。

(項目118)

前記EC50範囲が、0.2～3.0、0.3～3.0、0.5～2.5または1.0～2.5である、項目117に記載の方法。

(項目119)

前記二重特異性抗体が、100nM～600nMの結合親和性でヒトCD47に結合することを特徴とする、項目109～118のいずれか一項に記載の方法。

(項目120)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体を処置する方法において使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、前記方法が、前記被験体に治療有効量の本発明の二重特異性抗体を投与することを含み、前記二重特異性抗体の食作用のEC50値が、同じ実験条件下および1mg/mlヒトIgGの存在下における参照抗体K2A22のE50値の0.1～3倍の範囲内であることを特徴とする、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目121)

前記EC50範囲が、0.2～3.0、0.3～3.0、0.5～2.5または1.0～2.5である、項目120に記載の使用のための二重特異性抗体。

(項目122)

100nM～600nMの結合親和性でヒトCD47に結合することを特徴とする、項目120または項目121に記載の使用のための二重特異性抗体。

(項目123)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体を処置するための医薬の製造における、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の使用。

(項目124)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、胃癌、膵臓癌および乳癌からなる群より選択される、項目123に記載の二重特異性抗体の使用。

(項目125)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分と、ヒトCD3に特異的に結合する第4の結合部分とを

10

20

30

40

50

む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目126)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置のために、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目127)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、CEA-TCBおよび/またはCEA-TCB1と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

(項目128)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置のために、ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号20の重鎖可変領域および配列番号21の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、配列番号22のアミノ酸配列を含むヒトCD3のエピトープに特異的に結合する第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目129)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、前記本発明の二重特異性抗体が前記第2の二重特異性抗体と競合しない、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

(項目130)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と競合しないことを特徴とする、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

30

(項目131)

CEACAM5を発現する癌を有する被験体の処置において、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、CEA-TCBまたはCEA-TCB1と競合する、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目132)

ヒトCEACAM5に特異的に結合する第3の結合部分であって、配列番号88の重鎖可変領域および配列番号89の軽鎖可変領域を含む第3の結合部分と、ヒトCD3に特異的に結合する第4の結合部分であって、配列番号90の重鎖可変領域および配列番号91の軽鎖可変領域を含む第4の結合部分とを含む第2の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目1～100のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

40

(項目133)

本発明の二重特異性抗体および前記第2の二重特異性抗体が、6～15日間隔で前記被験体に交互に投与されることを特徴とする、項目125～132のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性抗体。

(項目134)

本発明の二重特異性抗体および前記第2の二重特異性抗体が、6～15日間隔で前記被験体に同時に投与されることを特徴とする、項目125～132のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性抗体。

50

(項目135)

C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 3 の結合部分であって、配列番号 2 0 の重鎖可変領域および配列番号 2 1 の軽鎖可変領域を含む第 3 の結合部分と、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含むヒト C D 3 のエピトープに特異的に結合する第 4 の結合部分とを含む第 2 の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、3 0 0 n M の濃度の前記第 2 の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の前記食作用指数曲線の前記 E C 5 0 の前記 E C 5 0 をより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

(項目136)

C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 3 の結合部分であって、配列番号 8 8 の重鎖可変領域および配列番号 8 9 の軽鎖可変領域を含む第 3 の結合部分と、ヒト C D 3 に特異的に結合する第 4 の結合部分であって、配列番号 9 0 の重鎖可変領域および配列番号 9 1 の軽鎖可変領域を含む第 4 の結合部分とを含む第 2 の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、3 0 0 n M の濃度の前記第 2 の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の前記結合曲線の前記 E C 5 0 をより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

(項目137)

C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において、C E A - T C B または C E A - T C B 1 と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、3 0 0 n M の濃度の前記 C E A - T C B または 3 0 n M の濃度の C E A - T C B 1 が、M K N - 4 5 細胞への本発明の二重特異性抗体の前記結合曲線の前記 E C 5 0 をより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

(項目138)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、胃癌、膵臓癌および乳癌である、項目 1 2 5 ~ 1 3 7 のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性抗体。

30

(項目139)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が、例えば M K N - 4 5 腫瘍細胞と、同じヒトドナー由来のヒトマクロファージおよび T 細胞とを含有するアッセイにおいて、腫瘍細胞の相加的な % 殺傷を示す、項目 1 2 5 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性抗体。

(項目140)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が、例えば M K N - 4 5 腫瘍細胞と、同じヒトドナー由来のヒトマクロファージおよび T 細胞とを含有するアッセイにおいて、腫瘍細胞の相乗的な % 殺傷を示す、項目 1 2 5 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性抗体。

40

(項目141)

項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む組成物であって、前記二重特異性抗体が第 2 の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とし、前記組成物が、C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において使用するためのものである、組成物。

(項目142)

項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む組成物であって、前記二重特異性抗体が、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 3 の結合部分であって、配列番号 2 0 の重鎖可変領域および配列番号 2 1 の軽鎖可変領域を含む第 3 の結合部分と、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含むヒト C D 3 のエピトープに特異的に結合する第 4 の結合部分とを含む第 2 の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とし、前記組成物が、C E A

50

C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において使用するためのものである、組成物。
(項目 1 4 3)

項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む組成物であって、前記二重特異性抗体が、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 3 の結合部分であって、配列番号 8 8 の重鎖可変領域および配列番号 8 9 の軽鎖可変領域を含む第 3 の結合部分と、ヒト C D 3 に特異的に結合する第 4 の結合部分であって、配列番号 9 0 の重鎖可変領域および配列番号 9 1 の軽鎖可変領域を含む第 4 の結合部分とを含む第 2 の二重特異性抗体と競合しないことを特徴とし、前記組成物が、C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において使用するためのものである、組成物。

(項目 1 4 4)

前記二重特異性抗体が C E A - T C B および / または C E A - T C B 1 と競合しないことを特徴とする、項目 1 4 1 ~ 1 4 3 のいずれか一項に記載の組成物。

(項目 1 4 5)

腫瘍を有するヒト患者の処置のための方法であって、有効量の項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体と、C E A C A M 5 および C D 3 に対する第 2 の二重特異性抗体とを前記ヒト患者に投与することを含み、続いて、

(i) 前記患者に 0 . 1 ~ 1 0 m g / k g 、さらなる実施形態では 1 . 0 ~ 2 0 . 0 m g / k g の用量の前記第 2 の抗 C E A C A M 5 x C D 3 抗体を例えば 4 ~ 1 2 週間にわたって毎週投与すること、

(i i) 前記患者に前記第 2 の抗体を 1 週間に 1 回 (q 1) 、 2 週間に 1 回 (q 2 w) 、 3 週間に 1 回 (q 3 w) または必要に応じて 4 週間に 1 回 (q 4 w) 投与すること、

(i i i) これらの 4 ~ 1 2 週間後に、および前記抗 C E A C A M 5 x C D 3 抗体のさらに 2 または 3 または 4 消失半減期後に、前記患者に 1 ~ 2 0 m g / k g の用量の本発明の抗体を投与すること、

(i v) 前記患者に本発明の前記抗体を 1 週間に 1 回 (q 1) 、 2 週間に 1 回 (q 2 w) 、 3 週間に 1 回 (q 3 w) または必要に応じて 4 週間に 1 回 (q 4 w) 投与すること、前記 C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体の 2 または 3 または 4 消失半減期待機すること、および必要に応じて、C E A C A M 5 x C D 3 二重特異性抗体投与とそれに続く C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体投与の前記サイクルを反復し、必要に応じてそのサイクルを再び反復すること

を含む、方法。

(項目 1 4 6)

前記腫瘍が癌である、項目 1 4 5 に記載の方法。

(項目 1 4 7)

前記腫瘍が固形腫瘍である、項目 1 4 5 に記載の方法。

(項目 1 4 8)

前記癌が、C E A C A M 5 を発現する固形癌である、項目 1 4 6 に記載の方法。

(項目 1 4 9)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌 (N S C L C) 、胃癌、膵臓癌または乳癌である、項目 1 4 6 または項目 1 4 8 に記載の方法。

(項目 1 5 0)

前記第 2 の抗体が C E A - T C B である、項目 1 4 5 ~ 1 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5 1)

前記第 2 の抗体が C E A - T C B 1 である、項目 1 4 5 ~ 1 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5 2)

前記 C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が競合的である、項目 1 4 5 ~ 1 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 5 3)

10

20

30

40

50

腫瘍を有するヒト患者の処置のための方法であって、有効量の項目 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体と、C E A C A M 5 および C D 3 に対する第 2 の二重特異性抗体とを投与することを含む、方法。

(項目 154)

前記 C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体ならびに前記 C E A C A M 5 および C D 3 抗体が競合的ではない、項目 153 に記載の方法。

(項目 155)

前記抗体を同時に投与する、項目 153 または項目 154 に記載の方法。

(項目 156)

前記患者にほぼ同じ時間に 0.01 ~ 10 mg / kg の前記 C E A C A M 5 x C D 3 二重特異性抗体および 1 ~ 20 mg / kg の前記 C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体の用量で投与し、続いて、1 週間に 1 回 (q 1 w) または 2 週間に 1 回 (q 2 w) または 3 週間に 1 回 (q 3 w) または必要に応じて 4 週間に 1 回 (q 4 w) の頻度でこれらの組み合わせ投与を 1 回またはそれを超えて行う、項目 153 ~ 155 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 157)

前記 C E A C A M 5 x C D 3 二重特異性抗体を 0.5 ~ 10 mg / kg で投与する、項目 156 に記載の方法。

(項目 158)

前記腫瘍が癌である、項目 153 ~ 157 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 159)

前記腫瘍が固形腫瘍である、項目 153 ~ 158 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 160)

前記癌が、C E A C A M 5 を発現する固形癌である、項目 158 に記載の方法。

(項目 161)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、胃癌、膵臓癌または乳癌である、項目 158 または項目 160 に記載の方法。

(項目 162)

前記第 2 の抗体が C E A - T C B である、項目 153 ~ 161 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 163)

前記第 2 の抗体が C E A - T C B 1 である、項目 153 ~ 161 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 164)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が相加的な有効性を示す、項目 145 ~ 163 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 165)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が相乗的な有効性を示す、項目 145 ~ 163 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 166)

項目 1 ~ 100 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容され得る賦形剤または担体とを含む医薬組成物。

40

(項目 167)

医薬として使用するための、項目 166 に記載の医薬組成物。

(項目 168)

固形腫瘍障害の処置における医薬として使用するための、項目 166 または項目 167 に記載の医薬組成物。

(項目 169)

結腸直腸癌、N S C L C (非小細胞肺癌)、胃癌、膵臓癌または乳癌の処置における医薬として使用するための、項目 166 または項目 167 に記載の医薬組成物。

50

(項目 1 7 0)

C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 3 の結合部分であって、配列番号 2 0 の重鎖可変領域および配列番号 2 1 の軽鎖可変領域を含む第 3 の結合部分と、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含むヒト C D 3 のエピトープに特異的に結合する第 4 の結合部分とを含む第 2 の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の第 1 の二重特異性抗体を含む医薬組成物であって、3 0 0 n M の濃度の前記第 2 の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への前記第 1 の二重特異性抗体の前記結合曲線の前記 E C 5 0 をより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない、医薬組成物。

(項目 1 7 1)

C E A C A M 5 を発現する癌を有する被験体の処置において、ヒト C E A C A M 5 に特異的に結合する第 3 の結合部分であって、配列番号 8 8 の重鎖可変領域および配列番号 8 9 の軽鎖可変領域を含む第 3 の結合部分と、ヒト C D 3 に特異的に結合する第 4 の結合部分であって、配列番号 9 0 の重鎖可変領域および配列番号 9 1 の軽鎖可変領域を含む第 4 の結合部分とを含む第 2 の二重特異性抗体と同時に、別個にまたは逐次に組み合わせて使用するための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の第 1 の二重特異性抗体を含む医薬組成物であって、3 0 n M の濃度の前記第 2 の二重特異性抗体が、M K N - 4 5 細胞への前記第 1 の二重特異性抗体の前記結合曲線の前記 E C 5 0 をより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない、医薬組成物。

(項目 1 7 2)

前記第 2 の二重特異性抗体が、前記結合曲線の前記 E C 5 0 をより高い濃度の方向に 3 倍超シフトさせない、項目 1 7 1 に記載の医薬組成物。

(項目 1 7 3)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、胃癌、膵臓癌または乳癌である、項目 1 6 6 ~ 1 7 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

(項目 1 7 4)

医薬組成物の製造のための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

(項目 1 7 5)

医薬組成物の製造のための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容され得る賦形剤または担体との使用。

(項目 1 7 6)

固形腫瘍障害の処置における医薬の製造のための、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

(項目 1 7 7)

結腸直腸癌、N S C L C (非小細胞肺癌)、胃癌、膵臓癌または乳癌の処置における、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の抗体の使用。

(項目 1 7 8)

腫瘍細胞の細胞溶解を誘導する方法であって、前記腫瘍細胞を、項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と接触させることを含む、方法。

(項目 1 7 9)

前記腫瘍細胞が、結腸直腸癌細胞、N S C L C (非小細胞肺癌)、胃癌細胞、膵臓癌細胞または乳癌細胞である、項目 1 7 8 に記載の方法。

(項目 1 8 0)

前記細胞溶解が、前記二重特異性抗体の抗体依存性細胞食作用および / または抗体依存性細胞傷害により誘導される、項目 1 7 8 および 1 7 9 に記載の方法。

(項目 1 8 1)

C E A C A M 5 を異常発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に治療有効量の項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

(項目 1 8 2)

10

20

30

40

50

C E A C A M 5 を異常発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に、ヒト C E A C A M 5 およびヒト C D 3 に結合する第 2 の二重特異性抗体と組み合わせて治療有効量の項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

(項目 1 8 3)

競合的 C E A C A M 5 x C D 3 および C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体を逐次 / 交互に投与する、項目 1 8 2 に記載の方法。

(項目 1 8 4)

前記 C E A C A M 5 x C D 3 および C E A C A M 5 x C D 4 7 二重特異性抗体が競合的ではないかまたは最小限に競合的であるにすぎない場合、前記 2 つの二重特異性抗体を逐次にまたは並行して / 同時に投与する、項目 1 8 2 に記載の方法。

10

(項目 1 8 5)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が相加的な有効性を示す、項目 1 8 2 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8 6)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が相乗的な有効性を示す、項目 1 8 2 ~ 1 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 8 7)

C E A C A M 5 を異常発現する癌を有する被験体の無進行生存および / または全生存期間を増加させる方法であって、前記被験体に治療有効量の項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

20

(項目 1 8 8)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、胃癌、膵臓癌または乳癌、または C E A C A M 5 を発現する別の癌である、項目 1 8 7 に記載の方法。

(項目 1 8 9)

化学療法および / または放射線療法と組み合わせて前記二重特異性抗体を投与する、項目 1 7 8 ~ 1 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9 0)

前記被験体が、結腸直腸癌または肺癌または胃癌または膵臓癌または乳癌、または C E A C A M 5 を発現する別の癌を患っている患者である、項目 1 7 8 ~ 1 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 1 9 1)

C E A C A M 5 を異常発現する癌を有する被験体を処置する方法であって、前記被験体に、ヒト C E A C A M 5 およびヒト C D 3 イプシロンに対する第 2 の二重特異性抗体と組み合わせて治療有効量の項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

(項目 1 9 2)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が相加的な有効性を示す、項目 1 9 1 に記載の方法。

(項目 1 9 3)

前記二重特異性抗体および前記第 2 の二重特異性抗体が相乗的な有効性を示す、項目 1 9 1 に記載の方法。

40

(項目 1 9 4)

C E A C A M 5 を異常発現する癌を有する被験体の無進行生存期間および / または全生存期間を増加させる方法であって、前記被験体に治療有効量の項目 1 ~ 1 0 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を投与することを含む、方法。

(項目 1 9 5)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、胃癌、膵臓癌または乳癌である、項目 1 9 1 ~ 1 9 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9 6)

50

化学療法または放射線療法と組み合わせて前記二重特異性抗体を投与する、項目 1 9 1 ~ 1 9 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9 7)

前記被験体が、結腸直腸癌または肺癌または胃癌または膵臓癌または乳癌、または C E A C A M 5 を発現する別の癌を有する癌患者である、項目 1 9 1 ~ 1 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 9 8)

項目 1 7 8 ~ 1 9 7 のいずれか一項に記載の処置方法における、項目 1 ~ 9 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の使用。

(項目 1 9 9)

前記癌が、結腸直腸癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、胃癌、膵臓癌および乳癌からなる群より選択される、項目 1 9 8 に記載の使用。

【図面】

【図 1】

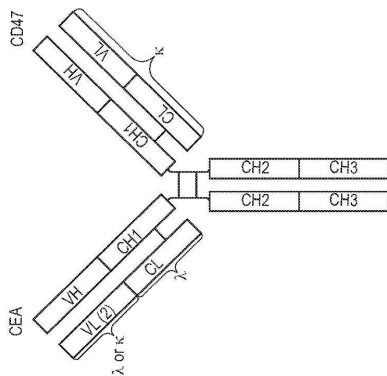


Fig. 1A

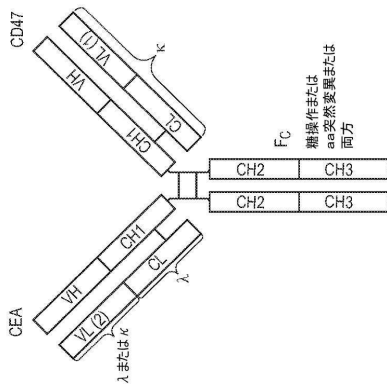


Fig. 1B

【図 2】

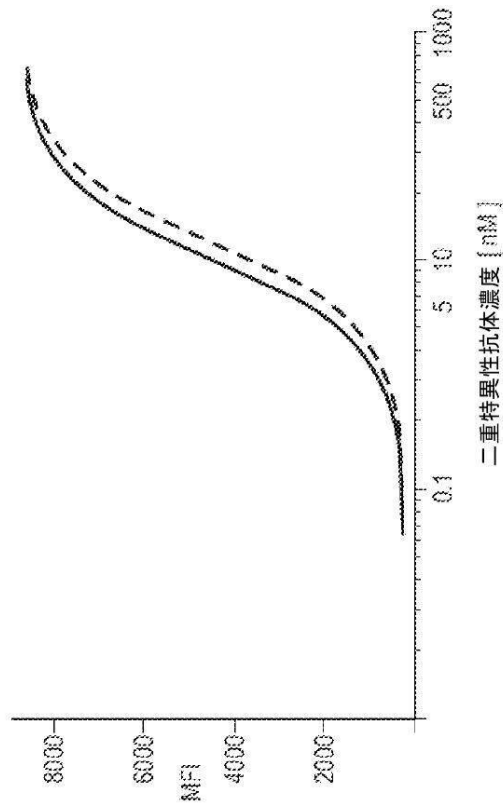


Fig. 2

10

20

30

40

50

【 図 3 A 】

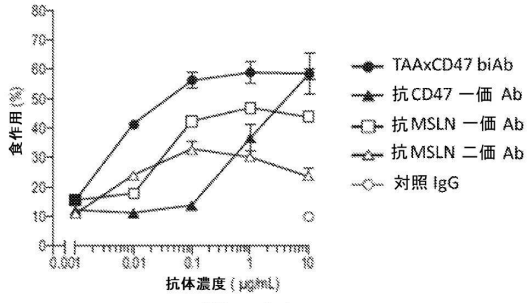
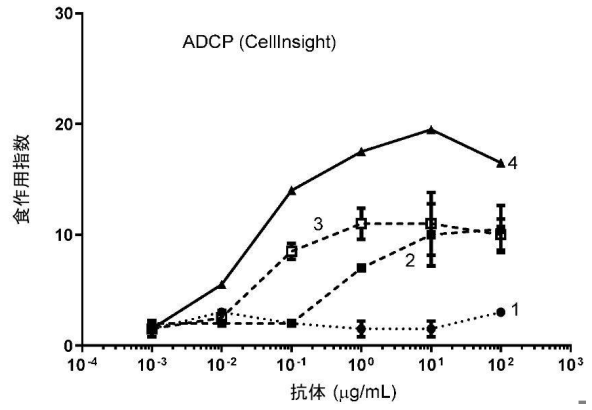


Fig. 3A

【 図 3 B 】

Fig. 3B



10

【 図 4 】

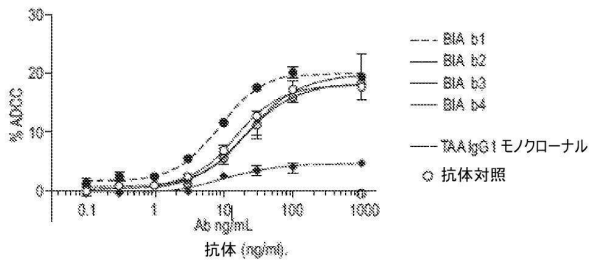


Fig. 4

【 図 5 】

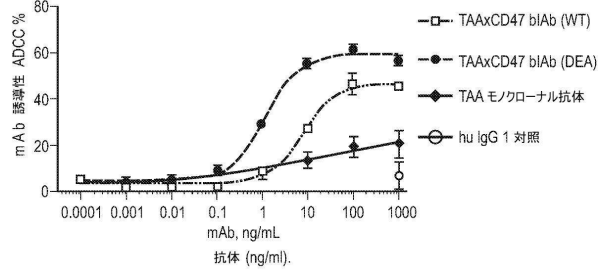


Fig. 5

20

30

40

50

【 図 6 】

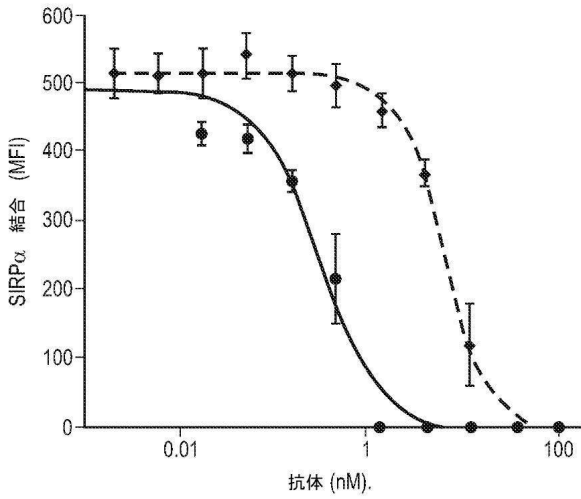


Fig. 6

【 図 7 A 】

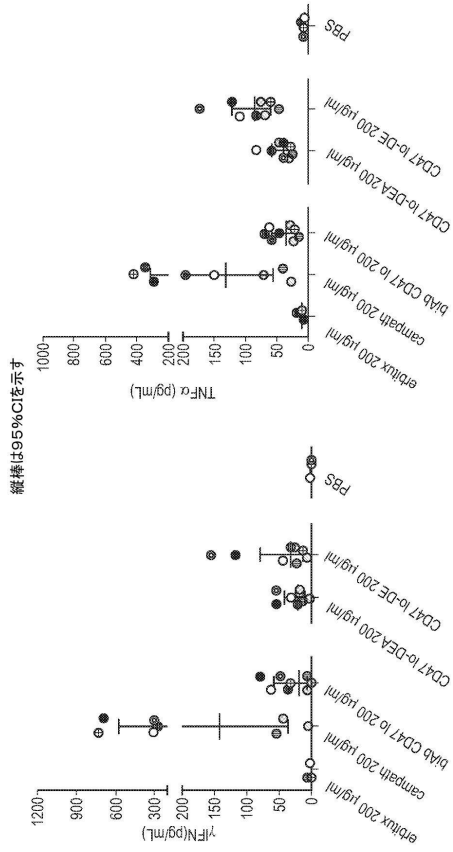


Fig. 7A

10

20

【 図 7 B 】

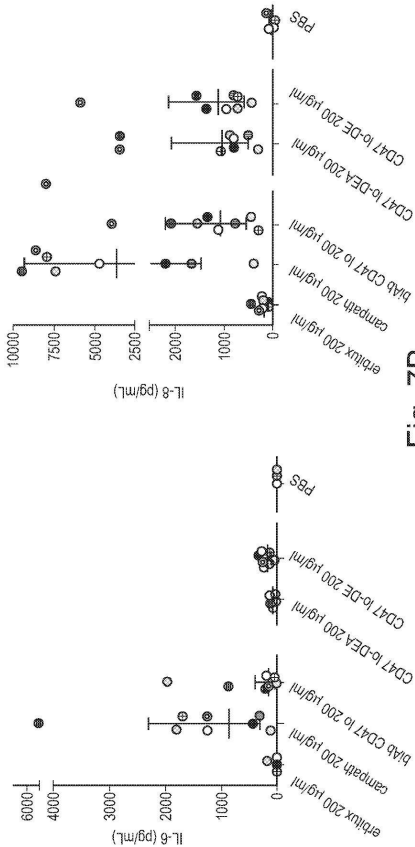


Fig. 7B

【 図 8 】

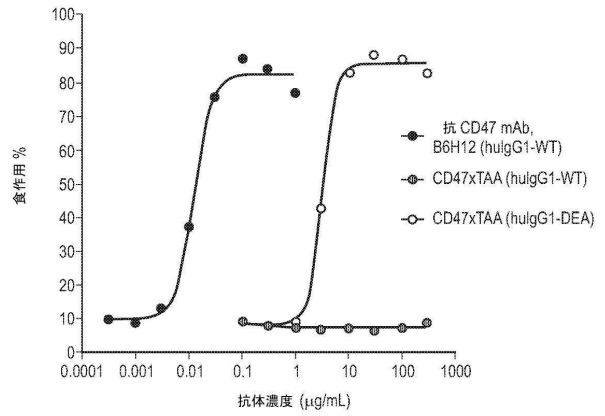


Fig. 8

30

40

50

【 図 9 】

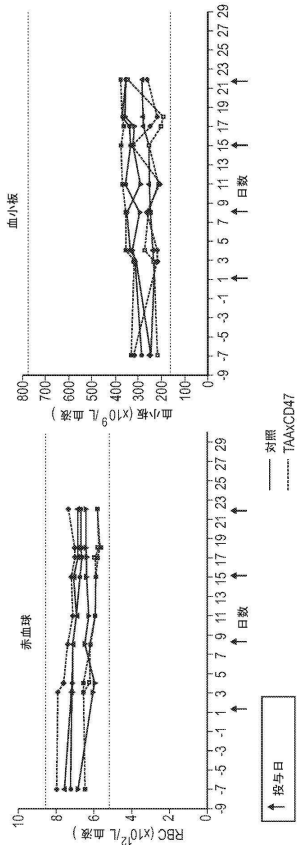


Fig. 9

【 図 10 】

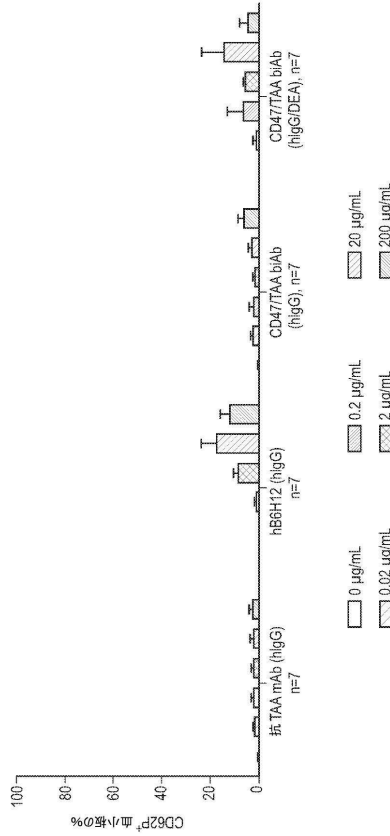


Fig. 10

【 図 11 】

Fig. 11A.

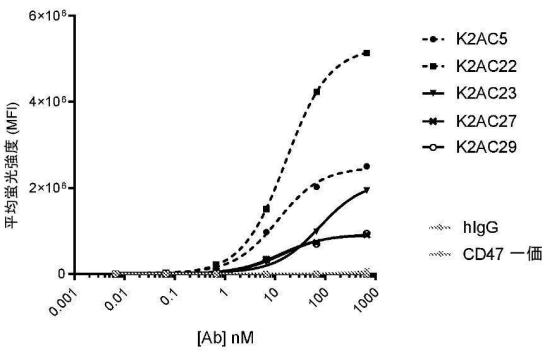
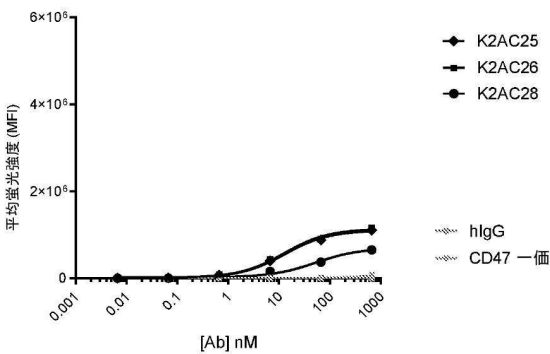
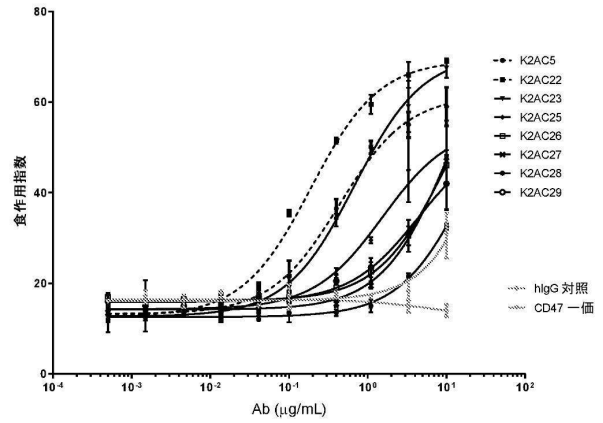


Fig. 11B



【 図 12 】

Figure 12



10

20

30

40

50

【 図 1 3 】

Figure 13 A.

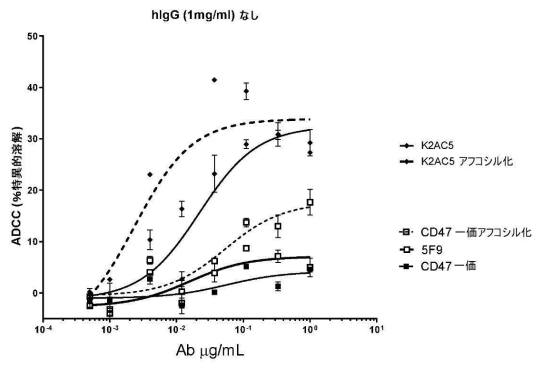
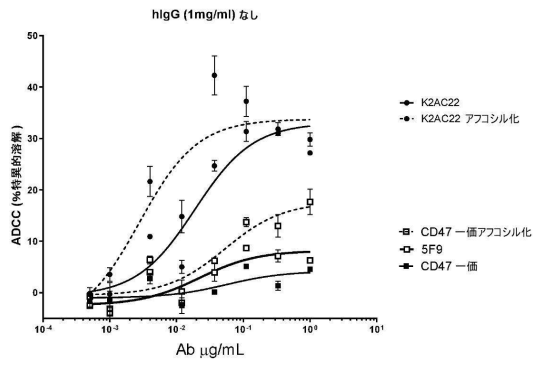


Figure 13 B.



【 図 1 5 】

Figure 15 A.

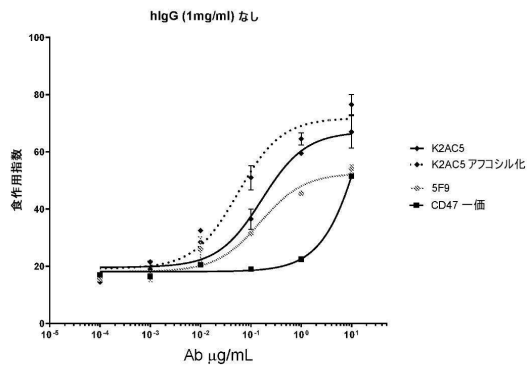
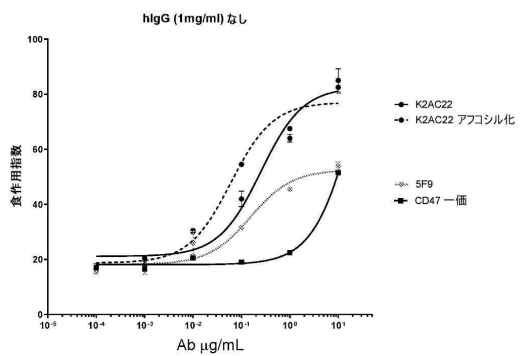


Figure 15 B.



【 図 1 4 】

Figure 14 A.

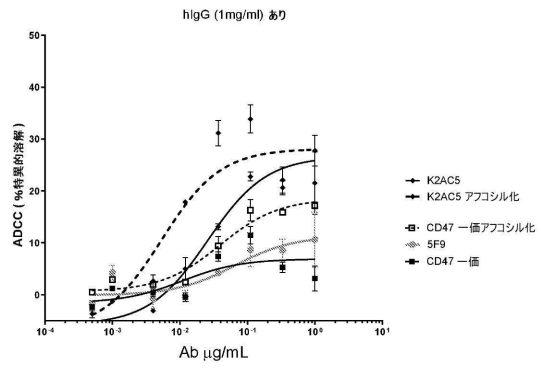
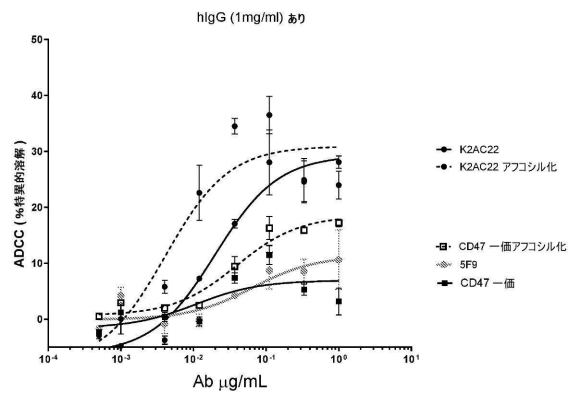


Figure 14 B.



【 図 1 6 】

Figure 16 A.

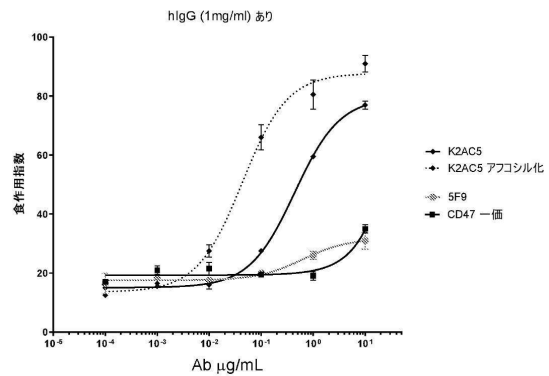
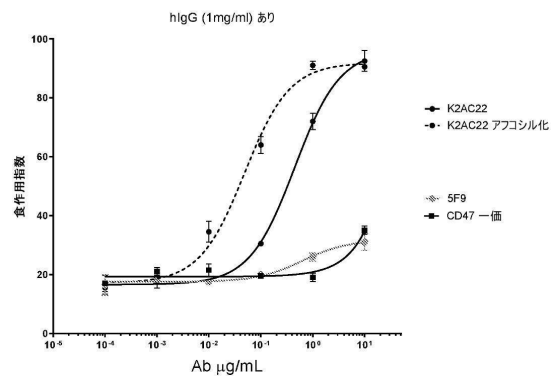


Figure 16 B.



10

20

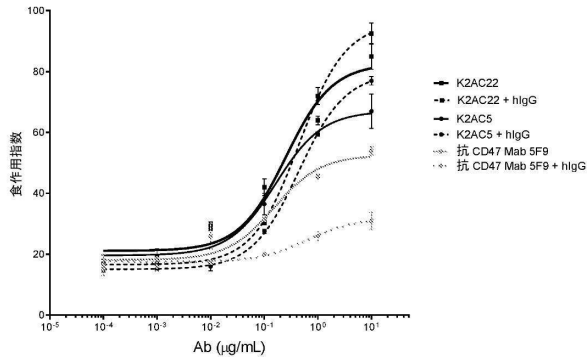
30

40

50

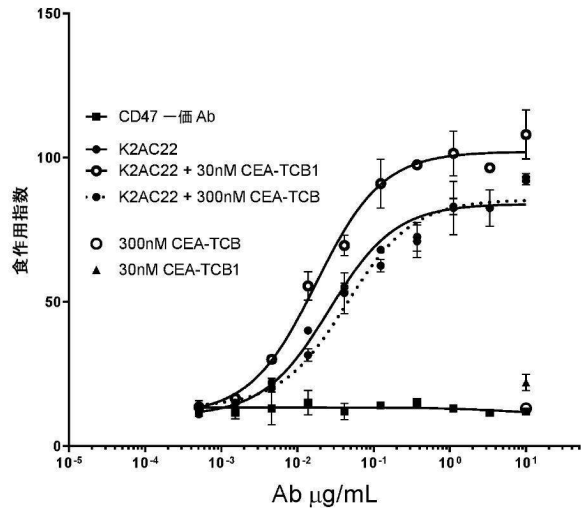
【 17 】

Figure 17



【 18 】

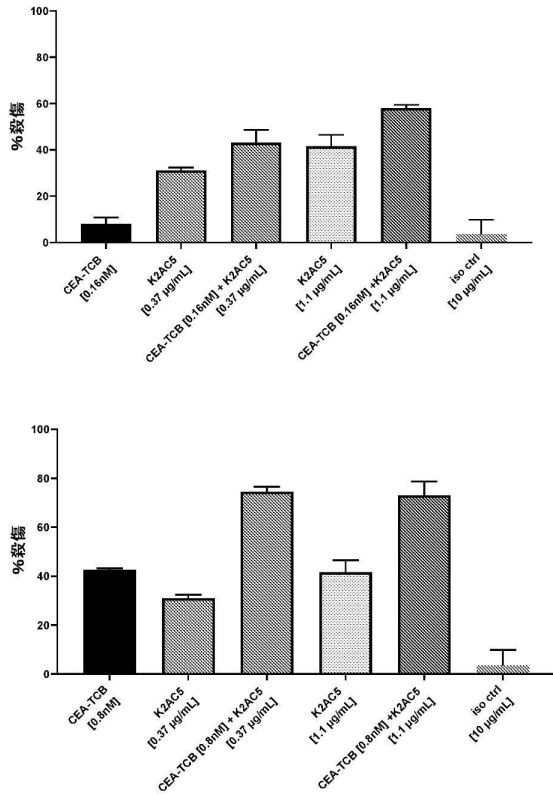
Figure 18



10

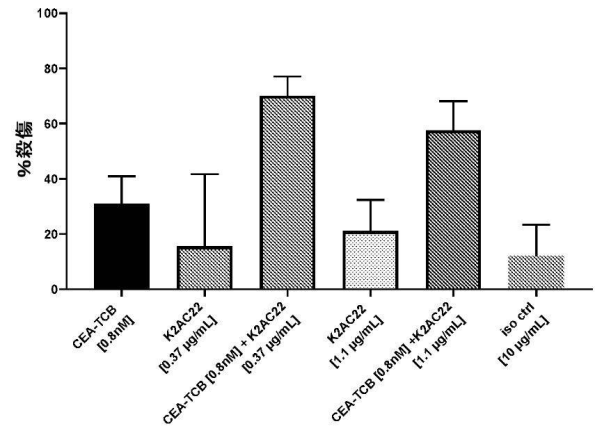
【 19 A 】

Figure 19A.



【 19 B 】

Figure 19B.



20

30

40

50

【 図 2 0 】

Figure 20A

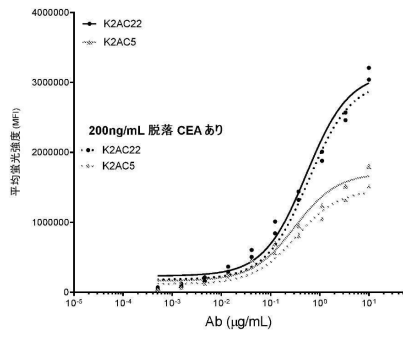
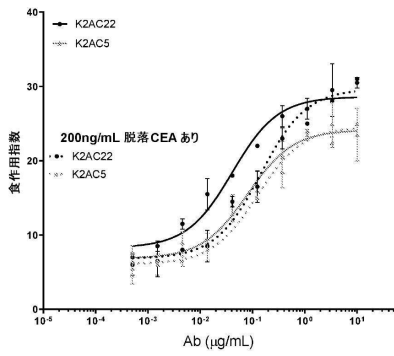
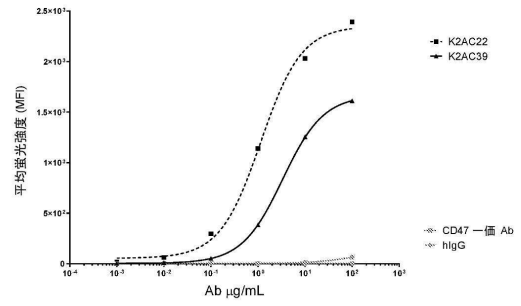


Figure 20B.



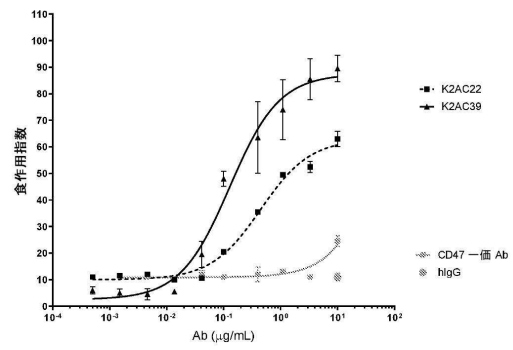
【 図 2 1 】

Figure 21A.



10

Figure 21B.



20

【 配 列 表 】

0007403479000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		
	C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
	C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
	C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
	C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08
	A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
	A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
			A 6 1 K	39/395
				N
				T

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18175657.8

(32)優先日 平成30年6月3日(2018.6.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18175658.6

(32)優先日 平成30年6月3日(2018.6.3)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18188788.6

(32)優先日 平成30年8月13日(2018.8.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18188790.2

(32)優先日 平成30年8月13日(2018.8.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18188792.8

(32)優先日 平成30年8月13日(2018.8.13)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(31)優先権主張番号 18190983.9

(32)優先日 平成30年8月27日(2018.8.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

ドイツ国 6 9 4 6 9 ヴァインハイム, パノラマシュトラッセ 1 4

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 国際公開第2014/087248(WO, A2)

国際公開第2018/098384(WO, A1)

国際公開第2012/023053(WO, A2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 P 2 1 / 0 8

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)