

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離組換え抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、

a) 配列番号 662 を含む重鎖相補性決定領域 (HCDR) 1、配列番号 663 を含む HCDR 2、及び配列番号 664 を含む HCDR 3 を含む重鎖、並びに配列番号 671 を含む軽鎖相補性決定領域 (LCDR) 1、配列番号 673 を含む LCDR 2、及び配列番号 690 を含む LCDR 3 を含む軽鎖；

b) 配列番号 652 を含む重鎖可変領域及び配列番号 661 を含む軽鎖可変領域；

c) 配列番号 640 を含む重鎖、及び配列番号 676 を含む軽鎖；

d) 配列番号 657 を含む重鎖可変領域及び配列番号 678 を含む軽鎖可変領域；又は

e) 配列番号 675 を含む重鎖、及び配列番号 677 を含む軽鎖を含む、単離組換え抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 2】

約 300 nM 以下の結合親和性でカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 又はヒトの CD3d、又は CD3e、又は CD3e 及び CD3d に特異的に結合する、単離組換え抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記結合親和性が約 100 nM 以下である、請求項 2 に記載の単離組換え抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

前記結合親和性が、フローサイトメトリー又は +25 における Proteon 表面プラズモン共鳴アッセイ Proteon XPR36 システムによって測定される、請求項 2 又は 3 に記載の単離組換え抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 5】

以下の特性のうちの一つ、二つ、三つ、又は四つを有する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の単離組換え抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片：

a) 300 nM 以下の計算 EC50 でヒト及びカニクイザルの CD3 + Tリンパ球に結合し、300 nM 以下の計算 EC50 でカニクイザル CD3 発現 HEK 細胞に結合し、CD3 + Tリンパ球への結合とカニクイザル CD3 発現 HEK 細胞への結合との間の計算 EC50 の差は 5 倍未満であり、前記計算 EC50 は、フローサイトメトリーを使用して

30

で全細胞結合アッセイで測定される；

b) 300 nM 以下の平衡解離定数 (K_D) でヒト由来の組換え CD3d (配列番号 691) に結合、又はヒト由来の組換え CD3e (配列番号 636) に結合、又はカニクイザル由来の組換え CD3d (配列番号 692) に結合、又はカニクイザル由来の組換え CD3e (配列番号 693) に結合し、前記 K_D は、+25 で Proteon 表面プラズモン共鳴アッセイ Proteon XPR36 システムを使用して測定される；

c) X線結晶解析により決定したとき、CD3e の残基 1 ~ 6 に結合する；あるいは

d) 蛍光活性化細胞選別アッセイによって決定したとき、cOCT3 又は SP34-2 と同様の程度まで、T細胞を活性化するか又は CD69 発現を誘導する。

40

【請求項 6】

抗体定常ドメインに少なくとも一つの置換を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片であって、前記少なくとも一つの置換が、

a) 重鎖置換 K409R、F405L、又は F405L 及び R409K を含む、

b) 重鎖置換 S228P、F234A、及び L235A を含む、

c) 重鎖置換 L234A、G237A、P238S、H268A、A330S、及び P331S を含み、前記抗体が、IgG1 アイソタイプである、又は

d) 重鎖置換 S228P を含み、前記抗体が、IgG4 アイソタイプであり、

残基の付番が EU インデックスに準拠する、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 7】

それぞれ配列番号 662、663、664、671、673、及び 690 の前記 HCD

50

R 1、前記 H C D R 2、前記 H C D R 3、前記 L C D R 1、前記 L C D R 2、及び前記 L C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

それぞれ配列番号 6 4 0 及び 6 7 6 の重鎖配列 (H C) 及び軽鎖配列 (L C) を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 10】

それぞれ配列番号 6 5 7 及び 6 7 8 の V H 及び V L を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。 10

【請求項 11】

それぞれ配列番号 6 7 5 及び 6 7 7 の H C 及び L C を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 12】

それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、6 7 1、6 7 3、及び 6 9 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 13】

それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の V H 及び V L を含む、抗体又はその抗原結合断片。 20

【請求項 14】

それぞれ配列番号 6 4 0 及び 6 7 6 の H C 及び L C を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 15】

それぞれ配列番号 6 5 7 及び 6 7 8 の V H 及び V L を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 16】

それぞれ配列番号 6 7 5 及び 6 7 7 の H C 及び L C を含む、抗体又はその抗原結合断片。 30

【請求項 17】

前記抗体が、ヒトである又はヒト化されている、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 18】

前記抗体が、I g G 4 又は I g G 1 アイソタイプである、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 19】

前記抗体の F c に 1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は 10 個の置換を含む、請求項 18 に記載の抗体。

【請求項 20】

配列番号 6 3 9 の H C 及び配列番号 6 4 6 の L C を含む、抗体又はその抗原結合断片であって、 40

a) D 4 3 G、L 4 9 M、L 5 0 I、S 6 2 N、Q 8 5 E の軽鎖置換、

b) D 4 3 G、V 4 8 L、L 4 9 M、L 5 0 I、S 6 2 N、Q 8 5 E、H 8 9 Y の軽鎖置換、

c) R 1 0 G、R 1 3 K、V 7 3 I、R 7 0 K、T 8 3 S、L 9 6 V の重鎖置換、

d) 軽鎖置換 D 4 3 G、V 4 8 L、L 4 9 M、L 5 0 I、S 6 2 N、Q 8 5 E、又は H 8 9 Y のいずれか 1 つ、又は

e) 重鎖置換 R 1 0 G、R 1 3 K、V 7 3 I、R 7 9 K、T 8 3 S、又は L 9 6 V のいずれか 1 つ、

を含む少なくとも 1 つの置換を含み、 50

残基の付番が E U インデックスに準拠する、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

前記抗体が、二重特異性又は多重特異性である、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 2】

C D 3 に特異的に結合する第 1 のドメイン及び第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 のドメインを含む二重特異性抗体であって、前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、6 7 1、6 7 3、及び 6 9 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、二重特異性抗体。

【請求項 2 3】

前記第 1 のドメイン及び第 2 のドメインが I g G 4 アイソタイプであり、前記第 1 又は第 2 のドメインが、S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、L 2 3 5 A、F 4 0 5 L、及び R 4 0 9 K の重鎖置換を含み、前記第 1 又は第 2 のドメインの他方のドメインが、S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、及び L 2 3 5 A の重鎖置換を含み、残基の付番が E U インデックスに準拠する、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 4】

前記第 1 及び / 又は第 2 のドメインが、F 4 0 5 L、又は F 4 0 5 L 及び R 4 0 9 K 置換を含む、C H 3 定常ドメインにおける少なくとも 1 つの置換を含み、残基の付番が E U インデックスに準拠する、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 5】

前記第 1 又は第 2 のドメインの一方が、F 4 0 5 L の重鎖置換を含み、前記第 1 又は第 2 のドメインの他方が、K 4 0 9 R の重鎖置換を含み、残基の付番が E U インデックスに準拠する、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 6】

前記第 1 のドメイン及び第 2 のドメインが、I g G 4 アイソタイプであり、前記第 1 又は第 2 のドメインの一方が、S 2 2 8 P の重鎖置換を含み、前記第 1 又は第 2 のドメインの他方が、S 2 2 8 P、F 4 0 5 L、及び R 4 0 9 K の重鎖置換を含み、残基の付番が E U インデックスに準拠する、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 7】

前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の V H 及び V L を含む、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 8】

前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 6 4 0 及び 6 7 6 の H C 及び L C を含む、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 9】

前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 6 5 7 及び 6 7 8 の V H 及び V L を含む、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 0】

前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 6 7 5 及び 6 7 7 の H C 及び L C を含む、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 1】

前記第 2 の抗原が、免疫エフェクター細胞以外の標的細胞上で発現する細胞表面抗原である、請求項 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 2】

前記細胞表面抗原が、腫瘍関連抗原である、請求項 3 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 3】

前記第 2 の抗原が、C D 3 3、I L 1 R A P、P S M A、又は T M E F F 2 である、請求項 2 4 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3 4】

請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容できる担体とを含む、医

10

20

30

40

50

薬組成物。

【請求項 35】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の抗体をコードしている、ポリヌクレオチド。

【請求項 36】

請求項 35 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 37】

請求項 36 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 38】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の抗体を産生する方法であって、前記抗体が発現する条件で請求項 37 に記載の宿主細胞を培養することと、前記宿主細胞によって産生された前記抗体を回収することと、を含む、方法。

10

【請求項 39】

対象における癌を治療する方法であって、前記癌を治療するのに十分な時間にわたって、それを必要としている前記対象に、治療有効量の請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の単離抗体を投与することを含む、方法。

【請求項 40】

前記癌が、固形腫瘍又は血液悪性腫瘍である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記固形腫瘍が、前立腺癌、結腸直腸癌、胃癌、腎明細胞癌、膀胱癌、肺癌、扁平上皮癌、神経膠腫、乳癌、腎臓癌、血管新生障害、腎明細胞癌 (CCRC)、膵臓癌、腎癌、尿路上皮癌、又は肝臓腺癌である、請求項 40 に記載の方法。

20

【請求項 42】

前記前立腺癌が、難治性前立腺癌、前立腺上皮内腫瘍、アンドロゲン非依存性前立腺癌、又は悪性前立腺癌である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病 (AML)、骨髄異形成症候群 (MDS)、急性リンパ性白血病 (ALL)、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL)、慢性骨髄性白血病 (CML)、又は芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍 (DPDCN) である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 44】

前記抗体が、第 2 の治療剤と組み合わせて投与される、請求項 38 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 45】

治療において使用するための、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 46】

請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の抗体に結合する、抗イディオタイプ抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(配列表)

40

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出済みであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれている配列表を含む。2019年5月3日に作成された上記 ASCII コピーは、JB I 5 1 3 5 W O P C T 1 _ Sequence _ listing . txt というファイル名で、サイズは 588 KB である。

【0002】

(発明の分野)

本明細書に提供される開示は、ヒト及び非ヒト CD3 に特異的に結合することができる抗表面抗原分類 3 (CD3) 抗体及びその抗原結合断片、具体的には、非ヒト哺乳類 (例えば、カニクイザル) の CD3 と交差反応性である抗 CD3 抗体及び抗原結合断片; ヒト及び非ヒト前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に特異的に結合することができる PSMA 抗

50

体及びその抗原結合断片；ヒト及び非ヒトIL1RAPに特異的に結合することができるIL1RAP抗体及びその抗原結合断片；ヒト及び非ヒトCD33に特異的に結合することができるCD33抗体及びその抗原結合断片；並びにCD3、PSMA、IL1RAP、CD33、CD3及びPSMA、CD3及びIL1RAP、又はCD3及びCD33に特異的に結合することができる二重特異性抗体に関する。本開示はまた、癌、自己免疫性及び/又は炎症性疾患、並びに他の病態の治療における、このような抗体及び抗原結合断片の使用にも関する。

【背景技術】

【0003】

二重特異性抗体及び抗体断片は、腫瘍細胞を殺傷するために細胞溶解性T細胞を動員する手段として検討されてきた。しかしながら、多くのT細胞動員二重特異性抗体の臨床的使用は、好ましくない薬物動態、潜在的な免疫原性、及び製造上の問題を含む課題によって制限されている。したがって、低い毒性及び好ましい製造プロファイルを示す、腫瘍細胞を殺傷するために細胞溶解性T細胞を動員する二重特異性抗体が非常に必要とされている。

10

【0004】

ヒトCD3 T細胞抗原受容体タンパク質複合体は、6本の異なる鎖：CD3 鎖 (SwissProt P09693)、CD3 鎖 (SwissProt P04234)、2本のCD3 鎖 (SwissProt P07766)、及び1本のCD3 鎖ホモダイマー (SwissProt P20963) (: :)で構成され、これは、T細胞受容体の 及び 鎖に会合する。この複合体は、いくつかの細胞内シグナル伝達経路への抗原認識の連関において重要な役割を果たす。CD3複合体は、シグナル伝達を媒介し、その結果、T細胞が活性化され、増殖する。CD3は、免疫応答に必要なある。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

配列番号662を含む重鎖相補性決定領域(HCDR)1、配列番号663を含むHCDR2、及び配列番号664を含むHCDR3を含む重鎖、並びに配列番号671を含む軽鎖相補性決定領域(LCDR)1、配列番号673を含むLCDR2、及び配列番号690を含むLCDR3を含む軽鎖；配列番号652を含む重鎖可変領域及び配列番号661を含む軽鎖可変領域；配列番号640を含む重鎖及び配列番号676を含む軽鎖を含むか；又は配列番号662を含むHCDR1、配列番号663を含むHCDR2、及び配列番号664を含むHCDR3を含む重鎖、並びに配列番号773を含むLCDR1、配列番号673を含むLCDR2、及び配列番号690を含むLCDR3を含む軽鎖；配列番号657を含む重鎖可変領域及び配列番号678を含む軽鎖可変領域；若しくは配列番号675を含む重鎖及び配列番号678を含む軽鎖を含む、単離組換え抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、本明細書に提供される。

30

【0006】

また、約300nM以下の結合親和性でカニクイザル(Macaca fascicularis)又はヒトのCD3d、又はCD3e、又はCD3e及びCD3dに特異的に結合する単離組換え抗CD3抗体又はその抗原結合断片も本明細書に提供される。

40

【0007】

いくつかの実施形態では、単離組換え抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、以下の特性のうちの一つ、二つ、三つ、又は四つを有する：

- ・20nM以下の計算EC50でヒト及びカニクイザルのCD3+Tリンパ球に結合し、40nM以下の計算EC50でカニクイザルCD3発現HEK細胞に結合し、CD3+Tリンパ球への結合とカニクイザルCD3発現HEK細胞への結合との間の計算EC50の差は5倍未満であり、計算EC50は、フローサイトメトリーを使用して0で全細胞結合アッセイで測定される；

50

・ 12 nM以下の平衡解離定数 (KD) でヒト由来の組換えCD3d (配列番号691) に結合、又はヒト由来の組換えCD3e (配列番号636) 若しくはカニクイザル由来の組換えCD3d (配列番号692) に結合し、KDは、+25 でProteon表面プラズモン共鳴アッセイProteon XPR36システムを使用して測定される；

・ X線結晶解析により決定したとき、CD3eの残基1~6に結合する；あるいは

・ 蛍光活性化細胞選別アッセイによって決定したとき、cOCT3又はSP34-2と同様の程度まで、T細胞を活性化するか又はCD69発現を誘導する。

【0008】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3；それぞれ配列番号652及び661のVH及びVL；又はそれぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含む。

10

【0009】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号662、663、664、773、673、及び690のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3；それぞれ配列番号657及び678のVH及びVL；又はそれぞれ配列番号675及び677のHC及びLCを含む。

【0010】

更に、CD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインを含む二重特異性抗体であって、当該第1のドメインが本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む、二重特異性抗体が本明細書に提供される。

20

【0011】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び670のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む第1のドメインと、それぞれ配列番号697、683、698、699、792、及び686のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む第2のドメインと、を含み得る；

【0012】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含む第1のドメインと、それぞれ配列番号681及び682のVH及びVLを含む第2のドメインと、を含み得る。

30

【0013】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、それぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含む第1のドメインと、それぞれ配列番号679及び680のHC及びLCを含む第2のドメインと、を含み得る。

【0014】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び670のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む第1のドメインと、それぞれ配列番号704、705、706、707、708、及び709のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む第2のドメインと、を含み得る。

40

【0015】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含む第1のドメインと、それぞれ配列番号702及び703のVH及びVLを含む第2のドメインと、を含み得る。

【0016】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、それぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含む第1のドメインと、それぞれ配列番号700及び701のHC及びLCを含む第2のドメインと、を含み得る。

【0017】

50

本開示は、更に、300 nM以下の親和性で組換えカニクイザル又はヒトCD3d又はCD3eを発現する細胞に結合する第1のドメインであって、細胞への結合がフローサイトメトリーによって測定される第1のドメインと、PSMAに特異的に結合する第2のドメインと、を含む単離二重特異性CD3×PSMA抗体を提供する。

【0018】

いくつかの実施形態では、二重特異性CD3×PSMA抗体は、以下の第1のドメインを含む：

- ・20 nM以下の計算EC50でヒト及びカニクイザルのCD3+Tリンパ球に結合し、40 nM以下の計算EC50でカニクイザルCD3発現HEK細胞に結合し、CD3+Tリンパ球への結合とカニクイザルCD3発現HEK細胞への結合との間の計算EC50の差は5倍未満であり、計算EC50は、フローサイトメトリーを使用して0で全細胞結合アッセイで測定される；

- ・12 nM以下の平衡解離定数(KD)でヒト由来の組換えCD3d(配列番号691)に結合、又はヒト由来の組換えCD3e(配列番号636)に結合、又はカニクイザル由来の組換えCD3d(配列番号692)に結合、又はカニクイザル由来の組換えCD3e(配列番号693)に結合し、KDは、+25でProteon表面プラズモン共鳴アッセイProteon XPR36システムを使用して測定される；

- ・ペプチドマッピング分析により検出したとき、メチオニンの酸化モトリプトファンの酸化も示さない、又はアスパラギンの脱アミドを示さない、又はアスパラギンの異性を示さない；

- ・X線結晶解析により決定したとき、CD3eの残基1~6に結合する；あるいは

- ・蛍光活性化細胞選別アッセイによって決定したとき、cOKT3又はSP34-2と同様の程度まで、T細胞を活性化するか又はCD69発現を誘導する。

【0019】

また、本明細書に記載の抗体と、薬学的に許容できる担体と、を含む医薬組成物も記載される。

【0020】

本開示は、更に、抗体が発現する条件で本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片をコードしているポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞を培養することと、当該宿主細胞によって産生された抗体を回収することと、を含む、本明細書に記載の抗体を産生する方法を提供する。二重特異性CD3×PSMA抗体を産生する方法は、2つの同一のHC1及び2つの同一のLC1を有する単一特異性二価CD3抗体を、2つの同一のHC2及び2つの同一のLC2を有する単一特異性二価PSMA抗体と、約1:1のモル比の混合物で合わせることに、当該混合物に還元剤を導入することと、当該混合物を約90分間~約6時間インキュベートすることと、当該還元剤を除去することと、当該HC1、当該LC1、当該HC2、及び当該LC2を含む二重特異性CD3×PSMA抗体を精製することと、を含み得る。

【0021】

対象における癌を治療する方法であって、当該癌を治療するのに十分な時間にわたって、治療有効量の単離抗体を、それを必要としている当該対象に投与することを含む、方法が更に記載される。

【0022】

本開示は、また、本明細書に記載の抗体を含む、キットを提供する。キットは、抗体を検出するための試薬及び使用説明書を更に含み得る。

【図面の簡単な説明】

【0023】

発明の概要、並びに以下の発明を実施するための形態は、添付の図面と併せて読むことで、更に理解される。開示される抗体及び方法を説明する目的で、当該抗体及び方法の例示的な実施形態を図面中に示す。但し、当該抗体及び方法は、開示される特定の実施形態に限定されるものではない。図面は、以下の通りである。

10

20

30

40

50

【図1A】Omni Ratで産生された抗CD3抗体を示す。Omni Ratにおいて産生された活性抗CD3 mAbのVH (図1A) 及びVL (図1B) 配列を、IMGT由来のヒト生殖系列配列とアラインメントした。CDR領域には下線を引いた。配列の相違を太字で示す。それぞれ全て記載順に、図1Aは、配列番号651、651、653、656、655、20、654及び717を開示し、図1Bは、配列番号658、688、660、659、659、659、659及び718を開示する。

【図1B】Omni Ratで産生された抗CD3抗体を示す。Omni Ratにおいて産生された活性抗CD3 mAbのVH (図1A) 及びVL (図1B) 配列を、IMGT由来のヒト生殖系列配列とアラインメントした。CDR領域には下線を引いた。配列の相違を太字で示す。それぞれ全て記載順に、図1Aは、配列番号651、651、653、656、655、20、654及び717を開示し、図1Bは、配列番号658、688、660、659、659、659、659及び718を開示する。

【図2】ヒト精製CD3+Tリンパ球に対する個々のラットハイブリドーマ上清の結合能力を評価するための細胞ベースの結合アッセイを示す。

【図3】カニクイザル精製CD3+Tリンパ球に対する個々のラットハイブリドーマ上清の結合能力を評価するための細胞ベースの結合アッセイを示す。

【図4】既知のエピトープを有し、カニクイザルCD3と交差反応性である市販の抗ヒトCD3抗体SP34-2と競合する能力について評価したハイブリドーマ上清の競合アッセイ結果を示す。

【図5】初代ヒトT細胞における抗CD3抗体の代表的な結合曲線を示す。

【図6】初代ヒトT細胞における抗CD3抗体のAlexaFluor488コンジュゲートSP34-2との代表的な競合結合曲線を示す。

【図7】軽鎖(LC)が遺伝子操作されたBLW-2E6 mAbの初代ヒトT細胞への結合を示す。

【図8】重鎖(HC)が遺伝子操作されたBLW-2E6の初代ヒトT細胞への結合を示す。

【図9】FACS分析によるヒトT細胞におけるAlexaFluor (商標) (AF) 488 CD3飽和を示す。得られた平均蛍光強度値を抗体分子濃度の関数としてプロットした。各ドナーについてKd値を導出し、平均値を得た。ヒトT細胞についての飽和結合定数(Kd T)は、 5.6 ± 1.0 nM ($n = 4$)であると導出され、Kd結合親和性を求めるために本明細書で使用した。分析中に少なくとも60%の生存率基準を満たさなかったことから、1人のヒトドナーを除外した。図の凡例における「LS」識別子は、個々のヒトT細胞ドナーを指す。

【図10】AlexaFluor488 SP-34抗CD3抗体に対する結合についての競合について、二価抗CD3抗体、CD3B376、及びCD3B450の阻害曲線を示す。IC50値は、それぞれ29及び60 nMであると導出された。

【図11】hCD3 (1-27) - Tn25に結合するBLW-2E6変異体のセンサグラムを示す。

【図12A】DSCによる抗CD3抗体CD3B376 (図12A)、CD3B450 (図12B)、CD3B389 (図12C)、CD3B467 (図12D)の熱安定性、及び全ての候補のサーモグラムのオーバーレイ (図12E)を示す。

【図12B】DSCによる抗CD3抗体CD3B376 (図12A)、CD3B450 (図12B)、CD3B389 (図12C)、CD3B467 (図12D)の熱安定性、及び全ての候補のサーモグラムのオーバーレイ (図12E)を示す。

【図12C】DSCによる抗CD3抗体CD3B376 (図12A)、CD3B450 (図12B)、CD3B389 (図12C)、CD3B467 (図12D)の熱安定性、及び全ての候補のサーモグラムのオーバーレイ (図12E)を示す。

【図12D】DSCによる抗CD3抗体CD3B376 (図12A)、CD3B450 (図12B)、CD3B389 (図12C)、CD3B467 (図12D)の熱安定性、及び全ての候補のサーモグラムのオーバーレイ (図12E)を示す。

10

20

30

40

50

【図12E】DSCによる抗CD3抗体CD3B376(図12A)、CD3B450(図12B)、CD3B389(図12C)、CD3B467(図12D)の熱安定性、及び全ての候補のサーモグラムのオーバーレイ(図12E)を示す。

【図13A】抗CD3抗体の熱安定性の比較を示す；CD3B376及びCD3B389のサーモグラムのオーバーレイ(図13A)；CD3B450及びCD3B467のサーモグラムのオーバーレイ(図13B)。

【図13B】抗CD3抗体の熱安定性の比較を示す；CD3B376及びCD3B389のサーモグラムのオーバーレイ(図13A)；CD3B450及びCD3B467のサーモグラムのオーバーレイ(図13B)。

【図14】親和性成熟PSMA×CD3二重特異性抗体のサブセットのLNCaP細胞結合を示す。

【図15】親和性成熟PSMA×CD3二重特異性抗体のサブセットのLNCaP細胞結合を示す。

【図16】親和性成熟PSMA×CD3二重特異性抗体のPSMA陰性PC3細胞結合を示す。

【図17】機能性細胞殺傷アッセイにおけるPSMA×CD3親和性成熟二重特異性Abの結果を示す。

【図19】CD3B334：CD3複合体における抗体-抗原相互作用を示す。楕円形内はCD3残基であり、ボックス内はCD3B334残基である。

【図20】CD69活性化によって測定したときの、ハイブリドーマヒットのT細胞を活性化する能力を判定するために使用した初代ヒト及びカニクイザルT細胞ベースのアッセイを示す。

【図21】T細胞ヒト化NSGマウスにおけるLncAP AR、TBヒト前立腺異種移植片におけるPS3B79の抗腫瘍有効性を示す。皮下LncAP AR、TB腫瘍を週2回測定し、その結果を、平均腫瘍体積として提示し、 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ で表した(*、 $p < 0.0001$)。

【図22】T細胞ヒト化NSGマウスにおけるLncAP AR、TBヒト前立腺異種移植片におけるPS3B90の抗腫瘍有効性を示す。皮下LncAP AR、TB腫瘍を週2回測定し、その結果を、平均腫瘍体積として提示し、 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ で表した(*、 $p < 0.0001$)。

【図23A】ヒトLNCaP細胞に対する抗PSMAファージパンニングヒットの滴定曲線を示す。図23Aは、ヒットG9-PSM M18、M25、M50、M52、M56、M57、及びM59の滴定曲線を示し；図23Bは、M52及びM110を示し；図23Cは、M85、M87、及びM81を示し；図23Dは、M52及びM84を示す。図23Dでは、哺乳類で発現した上清を、octetを介してFab発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒトLNCaP、PSMG5(カニクイザル-PSMA HEK)、又はPSMG9(チンパンジー-PSMA HEK)細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度(GeomFI)をFab濃度に対してプロットした。

【図23B】ヒトLNCaP細胞に対する抗PSMAファージパンニングヒットの滴定曲線を示す。図23Aは、ヒットG9-PSM M18、M25、M50、M52、M56、M57、及びM59の滴定曲線を示し；図23Bは、M52及びM110を示し；図23Cは、M85、M87、及びM81を示し；図23Dは、M52及びM84を示す。図23Dでは、哺乳類で発現した上清を、octetを介してFab発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒトLNCaP、PSMG5(カニクイザル-PSMA HEK)、又はPSMG9(チンパンジー-PSMA HEK)細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度(GeomFI)をFab濃度に対してプロットした。

【図23C】ヒトLNCaP細胞に対する抗PSMAファージパンニングヒットの滴定曲線を示す。図23Aは、ヒットG9-PSM M18、M25、M50、M52、M56

10

20

30

40

50

、M57、及びM59の滴定曲線を示し；図23Bは、M52及びM110を示し；図23Cは、M85、M87、及びM81を示し；図23Dは、M52及びM84を示す。図23Dでは、哺乳類で発現した上清を、octetを介してFab発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒトLNCAP、PSMG5（カニクイザル-PSMA HEK）、又はPSMG9（チンパンジー-PSMA HEK）細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度（GeoMFI）をFab濃度に対してプロットした。

【図23D】ヒトLNCaP細胞に対する抗PSMAファージパンニングヒットの滴定曲線を示す。図23Aは、ヒットG9-PSM M18、M25、M50、M52、M56、M57、及びM59の滴定曲線を示し；図23Bは、M52及びM110を示し；図23Cは、M85、M87、及びM81を示し；図23Dは、M52及びM84を示す。図23Dでは、哺乳類で発現した上清を、octetを介してFab発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒトLNCAP、PSMG5（カニクイザル-PSMA HEK）、又はPSMG9（チンパンジー-PSMA HEK）細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度（GeoMFI）をFab濃度に対してプロットした。

【図24A】チンパンジー-PSMA発現HEK細胞に対する抗PSMAファージパンニングヒットの滴定曲線を示す。（チンパンジー-PSMA HEKに対する抗PSMAファージパンニングヒットの哺乳類Fab上清滴定曲線）。図24Aは、ヒットG9-PSM M18、M25、M50、M52、M56、M57、及びM59の滴定曲線を示し；図24Bは、M52及びM110を示し；図24Cは、M81、M52、M85、及びM87を示し；図24Dは、M52及びM84を示す。図24Dでは、哺乳類で発現した上清を、octetを介してFab発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒトLNCAP、PSMG5（カニクイザル-PSMA HEK）、又はPSMG9（チンパンジー-PSMA HEK）細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度（GeoMFI）をFab濃度に対してプロットした。

【図24B】チンパンジー-PSMA発現HEK細胞に対する抗PSMAファージパンニングヒットの滴定曲線を示す。（チンパンジー-PSMA HEKに対する抗PSMAファージパンニングヒットの哺乳類Fab上清滴定曲線）。図24Aは、ヒットG9-PSM M18、M25、M50、M52、M56、M57、及びM59の滴定曲線を示し；図24Bは、M52及びM110を示し；図24Cは、M81、M52、M85、及びM87を示し；図24Dは、M52及びM84を示す。図24Dでは、哺乳類で発現した上清を、octetを介してFab発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒトLNCAP、PSMG5（カニクイザル-PSMA HEK）、又はPSMG9（チンパンジー-PSMA HEK）細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度（GeoMFI）をFab濃度に対してプロットした。

【図24C】チンパンジー-PSMA発現HEK細胞に対する抗PSMAファージパンニングヒットの滴定曲線を示す。（チンパンジー-PSMA HEKに対する抗PSMAファージパンニングヒットの哺乳類Fab上清滴定曲線）。図24Aは、ヒットG9-PSM M18、M25、M50、M52、M56、M57、及びM59の滴定曲線を示し；図24Bは、M52及びM110を示し；図24Cは、M81、M52、M85、及びM87を示し；図24Dは、M52及びM84を示す。図24Dでは、哺乳類で発現した上清を、octetを介してFab発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒトLNCAP、PSMG5（カニクイザル-PSMA HEK）、又はPSMG9（チンパンジー-PSMA HEK）細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度（GeoMFI）をFab濃度に対してプロットした。

【図24D】チンパンジー-PSMA発現HEK細胞に対する抗PSMAファージパンニ

10

20

30

40

50

ングヒットの滴定曲線を示す。(チンパンジー - P S M A H E K に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの哺乳類 F a b 上清滴定曲線)。図 2 4 A は、ヒット G 9 - P S M M 1 8、M 2 5、M 5 0、M 5 2、M 5 6、M 5 7、及び M 5 9 の滴定曲線を示し；図 2 4 B は、M 5 2 及び M 1 1 0 を示し；図 2 4 C は、M 8 1、M 5 2、M 8 5、及び M 8 7 を示し；図 2 4 D は、M 5 2 及び M 8 4 を示す。図 2 4 D では、哺乳類で発現した上清を、o c t e t を介して F a b 発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒト L N C A P、P S M G 5 (カニクイザル - P S M A H E K)、又は P S M G 9 (チンパンジー - P S M A H E K) 細胞のいずれかに対して滴定した。G r a p h P a d P r i z m を用いて、幾何平均蛍光強度 (G e o M F I) を F a b 濃度に対してプロットした。

10

【図 2 5 A】カニクイザル P S M A 発現 H E K 細胞に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの滴定曲線を示す。(カニクイザル - P S M A H E K に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの哺乳類 F a b 上清滴定曲線)。図 2 5 A は、ヒット G 9 - P S M M 1 8、M 2 5、M 5 0、M 5 2、M 5 6、M 5 7、及び M 5 9 の滴定曲線を示し；図 2 5 B は、M 5 2 及び M 1 1 0 を示し；図 2 5 C は、M 8 1、M 5 2、M 8 5、及び M 8 7 を示し；図 2 5 D は、M 5 2 及び M 8 4 を示す。図 2 5 D では、哺乳類で発現した上清を、o c t e t を介して F a b 発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒト L N C A P、P S M G 5 (カニクイザル - P S M A H E K)、又は P S M G 9 (チンパンジー - P S M A H E K) 細胞のいずれかに対して滴定した。G r a p h P a d P r i z m を用いて、幾何平均蛍光強度 (G e o M F I) を F a b 濃度に対してプロットした。

20

【図 2 5 B】カニクイザル P S M A 発現 H E K 細胞に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの滴定曲線を示す。(カニクイザル - P S M A H E K に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの哺乳類 F a b 上清滴定曲線)。図 2 5 A は、ヒット G 9 - P S M M 1 8、M 2 5、M 5 0、M 5 2、M 5 6、M 5 7、及び M 5 9 の滴定曲線を示し；図 2 5 B は、M 5 2 及び M 1 1 0 を示し；図 2 5 C は、M 8 1、M 5 2、M 8 5、及び M 8 7 を示し；図 2 5 D は、M 5 2 及び M 8 4 を示す。図 2 5 D では、哺乳類で発現した上清を、o c t e t を介して F a b 発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒト L N C A P、P S M G 5 (カニクイザル - P S M A H E K)、又は P S M G 9 (チンパンジー - P S M A H E K) 細胞のいずれかに対して滴定した。G r a p h P a d P r i z m を用いて、幾何平均蛍光強度 (G e o M F I) を F a b 濃度に対してプロットした。

30

【図 2 5 C】カニクイザル P S M A 発現 H E K 細胞に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの滴定曲線を示す。(カニクイザル - P S M A H E K に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの哺乳類 F a b 上清滴定曲線)。図 2 5 A は、ヒット G 9 - P S M M 1 8、M 2 5、M 5 0、M 5 2、M 5 6、M 5 7、及び M 5 9 の滴定曲線を示し；図 2 5 B は、M 5 2 及び M 1 1 0 を示し；図 2 5 C は、M 8 1、M 5 2、M 8 5、及び M 8 7 を示し；図 2 5 D は、M 5 2 及び M 8 4 を示す。図 2 5 D では、哺乳類で発現した上清を、o c t e t を介して F a b 発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して、ヒト L N C A P、P S M G 5 (カニクイザル - P S M A H E K)、又は P S M G 9 (チンパンジー - P S M A H E K) 細胞のいずれかに対して滴定した。G r a p h P a d P r i z m を用いて、幾何平均蛍光強度 (G e o M F I) を F a b 濃度に対してプロットした。

40

【図 2 5 D】カニクイザル P S M A 発現 H E K 細胞に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの滴定曲線を示す。(カニクイザル - P S M A H E K に対する抗 P S M A フェージパンニングヒットの哺乳類 F a b 上清滴定曲線)。図 2 5 A は、ヒット G 9 - P S M M 1 8、M 2 5、M 5 0、M 5 2、M 5 6、M 5 7、及び M 5 9 の滴定曲線を示し；図 2 5 B は、M 5 2 及び M 1 1 0 を示し；図 2 5 C は、M 8 1、M 5 2、M 8 5、及び M 8 7 を示し；図 2 5 D は、M 5 2 及び M 8 4 を示す。図 2 5 D では、哺乳類で発現した上清を、o c t e t を介して F a b 発現について正規化し、フローサイトメトリーを使用して

50

、ヒト LNCAP、PSMGS (カニクイザル - PSMA HEK)、又は PSMG9 (チンパンジー - PSMA HEK) 細胞のいずれかに対して滴定した。GraphPad Prismを用いて、幾何平均蛍光強度 (GeoMFI) を Fab 濃度に対してプロットした。

【図 26】ヒト PSMA ECD ホモダイマーに結合した PSMM84 Fab の全体構造を示す。

【図 27】PSMB83 軽鎖との PSMA の主要な相互作用の近接図を示す。

【図 28】PSMB83 重鎖との PSMA の主要な相互作用の近接図を示す。

【図 29】ヒト (配列番号 719)、マウス (配列番号 720)、及びカニクイザル (cyno) (配列番号 721) の PSMA の配列内の PSMB83 のエピトープ残基の比較を示す。影付きはエピトープ残基であり、配列の相違を下線によって示す。

【図 30】PSMB83 のパラトープ残基を示す。下線は CDR であり、影付きはパラトープ残基である。図 30 は、記載順にそれぞれ配列番号 722 ~ 727 を開示する。

【図 31】PSMA と PSMM84 との間に形成された直接接触を含む相互作用マップを示す。ファンデルワールス相互作用を破線で示し、実線は水素結合であり、矢印は骨格原子を指し示す。

【図 32】親 PSMB83 の発現と比較したときの PSMM84 由来の抗 PSMA Fab クローンの発現レベルを示す。生の発光数を対数濃度に対してプロットした。

【図 33】親 PSMM84 の結合と比較したときの PSMB83 由来の抗 PSMA Fab クローンのヒト PSMA に対する結合を示す。生の発光数を対数濃度に対してプロットした。

【図 34】親 PSMB83 の結合と比較したときの PSMB83 由来の抗 PSMA Fab クローンのカニクイザル PSMA に対する結合を示す。生の発光数を対数濃度に対してプロットした。

【図 35】48 時間後の全血における LAMA-84 20 細胞の IC3B19 及び IC3B34 エクスピボ媒介 T 細胞細胞傷害を示す。IC3B19 及び IC3B34 の濃度を、図の下部の表に提供する。

【図 36】48 時間後の全血における IC3B19 及び IC3B34 エクスピボ媒介 T 細胞活性化を示す。IC3B19 及び IC3B34 の濃度を、図の下部の表に提供する。

【図 37A】T 細胞及び IL1RAP + 標的細胞株 LAMA-84 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、IC3B19 及び IC3B34 媒介会合を示す。上清を、外因性 LAMA-84 IL1RAP + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 15 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 10 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24 時間後の IC3B19 及び IC3B34 によって媒介される T 細胞 IL-1 放出 (図 37A) 並びに対応する 4PL 回帰パラメータ推定 (図 37B) を示す。

【図 37B】T 細胞及び IL1RAP + 標的細胞株 LAMA-84 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、IC3B19 及び IC3B34 媒介会合を示す。上清を、外因性 LAMA-84 IL1RAP + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 15 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 10 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24 時間後の IC3B19 及び IC3B34 によって媒介される T 細胞 IL-1 放出 (図 37A) 並びに対応する 4PL 回帰パラメータ推定 (図 37B) を示す。

【図 38A】T 細胞及び IL1RAP + 標的細胞株 LAMA-84 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、IC3B19 及び IC3B34 媒介会合を示す。上清を、外因性 LAMA-84 IL1RAP + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 15 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 10 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48 時間後の IC3B19 及び IC3B34 によって媒介される T 細胞 IL-1 放出 (図 38A) 並びに対応する 4PL 回帰パラメータ推定 (図 38B) を示す。

10

20

30

40

50

【図38B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞）の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血（n=15ドナー）細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-1放出（図38A）並びに対応する4PL回帰パラメータ推定（図38B）を示す。

【図39A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞）の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血（n=15ドナー）細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-2放出（図39A）並びに対応する4PL回帰パラメータ推定（図39B）を示す。

【図39B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞）の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血（n=15ドナー）細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-2放出（図39A）並びに対応する4PL回帰パラメータ推定（図39B）を示す。

【図40A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞）の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血（n=15ドナー）細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-2放出（図40A）並びに対応する4PL回帰パラメータ推定（図40B）を示す。

【図40B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞）の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血（n=15ドナー）細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-2放出（図40A）並びに対応する4PL回帰パラメータ推定（図40B）を示す。

【図41A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞）の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血（n=15ドナー）細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-4放出（図41A）並びに対応する4PL回帰パラメータ推定（図41B）を示す。

【図41B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞）の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血（n=15ドナー）細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-4放出（図41A）並びに対応する4PL回帰パラメータ推定（図41B）を示す。

【図42】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84（内因的及び外因的に添

10

20

30

40

50

加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-4放出を示す。

【図43A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-6放出(図43A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図43B)を示す。

10

【図43B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-6放出(図43A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図43B)を示す。

【図44】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-6放出を示す。

20

【図45】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-8放出を示す。

30

【図46】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-8放出を示す。

【図47A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-10放出(図47A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図47B)を示す。

40

【図47B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IL-10放出(図47A)並びに対応する4PL回帰パラメ

50

ータ推定 (図 4 7 B) を示す。

【 図 4 8 A 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 1 0 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48 時間後の I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 によって媒介される T 細胞 I L - 1 0 放出 (図 4 8 A) 並びに対応する 4 P L 回帰パラメータ推定 (図 4 8 B) を示す。

【 図 4 8 B 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 1 0 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48 時間後の I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 によって媒介される T 細胞 I L - 1 0 放出 (図 4 8 A) 並びに対応する 4 P L 回帰パラメータ推定 (図 4 8 B) を示す。

【 図 4 9 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 1 0 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24 時間後の I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 によって媒介される T 細胞 I L - 1 2 p 7 0 放出を示す。

【 図 5 0 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 1 0 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48 時間後の I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 によって媒介される T 細胞 I L - 1 2 p 7 0 放出を示す。

【 図 5 1 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 1 0 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24 時間後の I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 によって媒介される T 細胞 I L - 1 3 放出を示す。

【 図 5 2 A 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 1 0 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48 時間後の I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 によって媒介される T 細胞 I L - 1 3 放出 (図 5 2 A) 並びに対応する 4 P L 回帰パラメータ推定 (図 5 2 B) を示す。

【 図 5 2 B 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷害及び T 細胞活性化アッセイから 1 0 個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48 時間後の I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 によって媒介される T 細胞 I L - 1 3 放出 (図 5 2 A) 並びに対応する 4 P L 回帰パラメータ推定 (図 5 2 B) を示す。

【 図 5 3 A 】 T 細胞及び I L 1 R A P + 標的細胞株 L A M A - 8 4 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) の、 I C 3 B 1 9 及び I C 3 B 3 4 媒介会合を示す。上清を、外因性 L A M A - 8 4 I L 1 R A P + 腫瘍細胞株を添加した全血 (n = 1 5 ドナー) 細胞傷

10

20

30

40

50

害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IFN-放出(図25 53A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図53B)を示す。

【図53B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IFN-放出(図25 53A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図53B)を示す。

10

【図54A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IFN-放出(図54A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図54B)を示す。

【図54B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞IFN-放出(図54A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図54B)を示す。

20

【図55A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞TNF-放出(図55A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図55B)を示す。

30

【図55B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。24時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞TNF-放出(図55A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図55B)を示す。

【図56A】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞TNF-放出(図56A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図56B)を示す。

40

【図56B】T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84(内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞)の、IC3B19及びIC3B34媒介会合を示す。上清を、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した全血(n=15ドナー)細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて評価した。統

50

計的に有意な差異を太字のテキストで示す。48時間後のIC3B19及びIC3B34によって媒介されるT細胞TNF-放出(図56A)並びに対応する4PL回帰パラメータ推定(図56B)を示す。

【図57】IC3B19及びIC3B34は、NCI-H1975細胞において標的特異的細胞傷害を誘導したが、ヌルアームを有する二重特異性抗体(IAPB57×B23B49又はB23B39×CD3B219)は誘導しなかったことを示す。このアッセイでは、細胞傷害EC50は、IC3B19とIC3B34との間で3倍異なり、それぞれ0.018及び0.057nMの値である。

【図58】T細胞ヒト化NSGマウスにおけるH1975ヒトNSCLC異種移植片におけるIAPB57×CD3B376の抗腫瘍有効性を示す。皮下H1975腫瘍を週2回測定し、その結果を、平均腫瘍体積として提示し、 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$ で表した、* $p < 0.0001$ 。

【図59】様々な抗PSMAコンストラクトの等電点の比較を示す。

【図60】CNT05825対照分子と比較した波長の変化をプロットする。対照CNT0607は、特徴的に強い自己相互作用を示す。エラーバーは、3回の測定からの標準偏差を表す。

【図61】抗PSMA交差相互作用アッセイにおける、IgG及び対照カラムの保持時間の比較を示す。

【図62A】新鮮AML患者全血における芽球の細胞傷害及びT細胞活性化についての抗CD3アームCD3B219及びCD3B376を使用したCD33×CD3二重特異性抗体のエクスピボ評価を示す。図2Aは、CD33二重特異性抗体又はCD3×ヌル対照を使用したAML細胞の全細胞傷害のパーセントを示す。図2Bは、CD33二重特異性抗体又はCD3×ヌル対照によって誘導されたT細胞活性化を示す。Fc遮断薬は添加しなかった。

【図62B】新鮮AML患者全血における芽球の細胞傷害及びT細胞活性化についての抗CD3アームCD3B219及びCD3B376を使用したCD33×CD3二重特異性抗体のエクスピボ評価を示す。図2Aは、CD33二重特異性抗体又はCD3×ヌル対照を使用したAML細胞の全細胞傷害のパーセントを示す。図2Bは、CD33二重特異性抗体又はCD3×ヌル対照によって誘導されたT細胞活性化を示す。Fc遮断薬は添加しなかった。

【図63A】CD33×CD3 T細胞媒介性細胞傷害アッセイを示す。抗CD3アームCD3B219及び抗CD3B376を使用したCD33×CD3二重特異性抗体を、ヒト汎T細胞、及びCD33 SNPrs12459419変異について野生型(KG1、図3A)、ヘテロ接合型(SH2、図3B)、又はホモ接合型(OCIAML3、図3C)のいずれかであるAML細胞株と共にインキュベートした。37、5%CO₂で48時間後、フローサイトメトリーによって全腫瘍細胞傷害を測定した。

【図63B】CD33×CD3 T細胞媒介性細胞傷害アッセイを示す。抗CD3アームCD3B219及び抗CD3B376を使用したCD33×CD3二重特異性抗体を、ヒト汎T細胞、及びCD33 SNPrs12459419変異について野生型(KG1、図3A)、ヘテロ接合型(SH2、図3B)、又はホモ接合型(OCIAML3、図3C)のいずれかであるAML細胞株と共にインキュベートした。37、5%CO₂で48時間後、フローサイトメトリーによって全腫瘍細胞傷害を測定した。

【図63C】CD33×CD3 T細胞媒介性細胞傷害アッセイを示す。抗CD3アームCD3B219及び抗CD3B376を使用したCD33×CD3二重特異性抗体を、ヒト汎T細胞、及びCD33 SNPrs12459419変異について野生型(KG1、図3A)、ヘテロ接合型(SH2、図3B)、又はホモ接合型(OCIAML3、図3C)のいずれかであるAML細胞株と共にインキュベートした。37、5%CO₂で48時間後、フローサイトメトリーによって全腫瘍細胞傷害を測定した。

【図64A】正常健常ヒト全血(N=6人のドナー)に外因的に添加されたMOLM-13細胞の細胞傷害に対する、CD3B219又はCD3B376のいずれかと対形成した

10

20

30

40

50

C33B904抗体のエキスピボ評価：48時間目における、CD33×CD3二重特異性抗体及びそれぞれのヌル×CD3対照を使用した、MOLM-13細胞(図4A)及びCD33⁺CD14⁺単球(図4B)の細胞傷害のパーセントを示す。

【図64B】正常健康ヒト全血(N=6人のドナー)に外因的に添加されたMOLM-13細胞の細胞傷害に対する、CD3B219又はCD3B376のいずれかと対形成したC33B904抗体のエキスピボ評価：48時間目における、CD33×CD3二重特異性抗体及びそれぞれのヌル×CD3対照を使用した、MOLM-13細胞(図4A)及びCD33⁺CD14⁺単球(図4B)の細胞傷害のパーセントを示す。

【図65A】6頭の正常カニクイザルドナー由来の新鮮全血における単球の細胞傷害及びT細胞活性化に対する抗CD3アームCD3B219及びCD3B376を使用したCD33×CD3二重特異性抗体のエキスピボ評価を示す。図5Aは、CD33二重特異性抗体又はCD3×ヌル対照を使用したCD33⁺CD14⁺カニクイザル単球の全細胞傷害のパーセントを示す。図5Bは、CD33二重特異性抗体又はそのCD3×ヌル対照によって誘導されたT細胞活性化を示す。Fc遮断薬は添加しなかった。

【図65B】6頭の正常カニクイザルドナー由来の新鮮全血における単球の細胞傷害及びT細胞活性化に対する抗CD3アームCD3B219及びCD3B376を使用したCD33×CD3二重特異性抗体のエキスピボ評価を示す。図5Aは、CD33二重特異性抗体又はCD3×ヌル対照を使用したCD33⁺CD14⁺カニクイザル単球の全細胞傷害のパーセントを示す。図5Bは、CD33二重特異性抗体又はそのCD3×ヌル対照によって誘導されたT細胞活性化を示す。Fc遮断薬は添加しなかった。

【図66】T細胞ヒト化NSGマウスにおけるMOLM-13ヒトAML異種移植片におけるC3CB189の抗腫瘍有効性を示す。播種性MOLM-13腫瘍を生物発光(BLI)について週2回撮像し、その結果を、平均放射輝度($p/s/cm^2/sr$)±SEM(n=8~10/群)として提示した。*処理対対照についてp=0.0001、Bonferroni検定を伴う二元配置分散分析により計算。

【図67】T細胞ヒト化NSGマウスにおけるMOLM-13ヒトAML異種移植片におけるC3CB189で処理された動物の生存率を示す。MOLM-13担持マウスの生存率を、 Kaplan-Meier曲線を使用してグラフで表し、ロランク(Mantel-Cox)検定によって評価する。*処理群対対照群についてp=0.0001。

【図68】T細胞ヒト化NSGマウスにおけるMOLM-13ヒトAML異種移植片におけるC3CB88の抗腫瘍有効性を示す。播種性MOLM-13腫瘍を生物発光(BLI)について週2回撮像し、その結果を、平均放射輝度($p/s/cm^2/sr$)±SEM(n=8~10/群)として提示した。*処理対対照についてp=0.0001、Bonferroni検定を伴う二元配置分散分析により計算。

【図69】T細胞ヒト化NSGマウスにおけるMOLM-13ヒトAML異種移植片におけるC3CB88で処理された動物の生存率を示す。MOLM-13担持マウスの生存率を、 Kaplan-Meier曲線を使用してグラフで表し、ロランク(Mantel-Cox)検定によって評価する。*処理群対対照群についてp=0.05。

【図70】選択抗TMEFF2抗体重鎖可変領域(VH)のアラインメントを示す。VH領域は、各行の先頭の配列番号によって特定される。

【図71】選択抗TMEFF2抗体軽鎖可変領域(VL)のアラインメントを示す。VH領域は、各行の先頭の配列番号によって特定される。

【図72】雄NGSマウスにおけるエキスピボLnCaP前立腺癌モデルにおける、0.5mg/kgのTMCB132で処理した各マウスの平均腫瘍体積の減少を示す。

【図73】T細胞ヒト化NSGマウスにおける樹立されたLnCaP異種移植片における、TMEB762×CD3B376の有効性を示す。

【図74】TMCB132の投与に回答した、LnCaP前立腺癌細胞におけるT細胞活性化を示す。

【図75】TMCB132のT細胞媒介性細胞傷害を示す。

【図76】T細胞ヒト化マウスにおけるTMCB132の抗腫瘍有効性を示す。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0024】

本明細書に引用されている特許及び特許出願を含む（但しそれらに限定されない）全ての刊行物は、完全に記載されているかのように参照により、本明細書に組み込まれる。

【0025】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的でのみ使用され、限定を意図するものではないと理解すべきである。特に断らない限り、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0026】

本明細書に記載されているものと同様又は同等の任意の方法及び材料を、本発明の試験を実施するために使用することができるが、例示的な材料及び方法を本明細書に記載する。本発明を説明及び特許請求する上で以下の用語が使用される。

【0027】

本明細書及び添付の「特許請求の範囲」において使用されるとき、「a」、「an」、及び「the」という単数形は、その内容について別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を包含する。したがって、例えば、「細胞(a cell)」という言及には、2つ以上の細胞の組み合わせ、及びこれに類するものなどが含まれる。

【0028】

「特異的結合」又は「特異的に結合する」又は「結合する」とは、抗体が抗原又はかかる抗原内部のエピトープに、他の抗原に対しより高い親和性で結合することを指す。典型的には、抗体は、約 5×10^{-8} M以下、例えば約 1×10^{-9} M以下、約 1×10^{-10} M以下、約 1×10^{-11} M以下、又は約 1×10^{-12} M以下の平衡解離定数(K_D)で抗原又は抗原内のエピトープに結合し、非特異性抗原(例えば、BSA、カゼイン)への結合に関しては、典型的には、その K_D より少なくとも100倍小さい K_D で結合する。解離定数は標準的手法を用いて測定することができる。しかし、抗原又は抗原内のエピトープに特異的に結合する抗体は、他の関連抗原、例えば、ヒト又はサル、例えば、Macaca fascicularis(カニクイザル、cyno)又はPan troglodytes(チンパンジー、chimp)などの他の種由来の同じ抗原(ホモログ)に対して交差反応性を有する場合がある。単一特異性抗体は、1つの抗原又は1つのエピトープに特異的に結合するのに対し、二重特異性抗体は、2つの異なる抗原又は2つの異なるエピトープに特異的に結合する。

【0029】

「抗体」は、広義の意味を有し、マウス、ヒト、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体、抗原結合断片、二重特異性又は多重特異性抗体、ダイマー、テトラマー又は多量体(マルチマー)抗体、単鎖抗体、ドメイン抗体、並びに必要とされる特異性の抗原結合部位を含む任意の他の改変された立体配置の免疫グロブリン分子を含む、免疫グロブリン分子を含む。「完全長抗体分子」は、ジスルフィド結合によって相互に接続されている2本の重鎖(heavy chain、HC)及び2本の軽鎖(light chain、LC)、並びにこれらの多量体(例えば、IgM)から構成される。各重鎖は、重鎖可変領域(heavy chain variable region、VH)、並びに重鎖定常領域(ドメインCH1、ヒンジ、CH2、及びCH3からなる)から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(light chain variable region、VL)及び軽鎖定常領域(constant region、CL)から構成される。VH領域及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)が散在している、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に更に細分類され得る。各VH及びVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4で配置された、3つのCDR及び4つのFRセグメントで構成される。

【0030】

「相補性決定領域(CDR)」は、抗原に結合する抗体の領域である。CDRは、Ka

10

20

30

40

50

bat (Wu et al. (1970) J Exp Med 132:211-50) (Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)、Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196:901-17)、IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27:55-77)、及びAbM (Martin and Thornton (1996) J Biol Chem 271:800-15)などの、様々な記述を使用して定義することができる。様々な記述と、可変領域の付番との対応が記載されている(例えば、Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27:55-77; Honnegger and Pluckthun, (2001) J Mol Biol 309:657-70; International Immunogenetics (IMGT) データベース; ウェブソース、[http://www_imgt_org](http://www.imgt.org)を参照のこと)。UCL Business PLCによるabYsisなどの利用可能なプログラムを使用して、CDRを描写することができる。本明細書で使用する場合、用語「CDR」、「HCDR1」、「HCDR2」、「HCDR3」、「LCDR1」、「LCDR2」、及び「LCDR3」は、明細書で別途明示的に記載のない限り、上述したKabata、Chothia、IMGT、又はAbMの方法のいずれかにより定義されるCDRを含む。

10

20

【0031】

免疫グロブリンは、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、5つの主要なクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMに割り当てられ得る。IgA及びIgGは、アイソタイプのIgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4として更に細分類される。どのような脊椎動物種の抗体軽鎖も、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明確に異なるタイプ、すなわち、カッパ()及びラムダ()のうちの一方に割り当てることができる。

【0032】

「抗原結合断片」とは、抗原に結合する免疫グロブリン分子の一部を意味する。抗原結合断片は合成ポリペプチド、酵素により入手可能なポリペプチド、又は遺伝子組換えされたポリペプチドであってよく、VH、VL、VH及びVL、Fab、F(ab')₂、Fd及びFv断片、1つのVHドメイン又は1つのVLドメインからなるドメイン抗体(dAb)、サメ可変性IgNARDドメイン、ラクダ化VHドメイン、FR3-CDR3-FR4部分などの、抗体のCDRを再現したアミノ酸残基からなる最小の認識単位、HCDR1、HCDR2、及び/又はHCDR3、並びにLCDR1、LCDR2、及び/又はLCDR3が挙げられる。VH及びVLドメインは互いに、合成リンカーを介して連結し、様々なタイプの一本鎖抗体設計を形成することができ、VH及びVLドメインが、別々の一本鎖抗体コンストラクトにより発現される場合は、VH/VLドメインが分子内、又は分子間で対形成し、一価の抗原結合部位、例えば一本鎖Fv(single chain Fv、scFv)又はディアボディを形成することができ、これらは、例えば国際公開第1998/44001号、同第1988/01649号、同第1994/13804号、及び同第1992/01047号に記載されている。

30

40

【0033】

「モノクローナル抗体」とは、抗体分子の実質的に均質な母集団(即ち、母集団を含む個別の抗体が、抗体重鎖からC末端リジンを除去する、又は、アミノ酸異性化若しくはアミド分解、メチオニン酸化若しくはアスパラギン若しくはグルタミンアミド分解などの翻訳後修飾といった、可能な周知の変更を除いて同一である)から入手される抗体を意味する。モノクローナル抗体は典型的には、1つの抗原性エピトープに結合する。二重特異性モノクローナル抗体は、2つの異なる抗原性エピトープに結合する。モノクローナル抗体は、抗体集団内で不均一なグリコシル化を有し得る。モノクローナル抗体は、単一特異性

50

であってよく、又は、二重特異性などの多重特異性であってよく、一価、二価、又は多価であってよい。

【0034】

「単離抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体又は抗体断片を指す（例えば、ある抗原に特異的に結合する単離抗体は、当該抗原以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。二重特異性CD3抗体の場合、二重特異性抗体は、CD3及び第2の抗原の両方に特異的に結合する。「単離抗体」は、純度が80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の抗体など、高純度に単離された抗体を包含する。

10

【0035】

「ヒト化抗体」とは、少なくとも1つのCDRが非ヒト種に由来し、少なくとも1つのフレームワークがヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体を意味する。ヒト化抗体は、フレームワークに置換を含むことができるため、フレームワークは、発現したヒト免疫グロブリン又はヒト免疫グロブリン生殖細胞系列遺伝子配列の厳密なコピーではない場合がある。

【0036】

「ヒト抗体」とは、ヒト対象に投与されるときに、最小の免疫応答を有するように最適化された抗体を意味する。ヒト抗体の可変領域は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体が定常領域又は定常領域の一部を含む場合、当該定常領域もヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体は、ヒト抗体の可変領域がヒト生殖系列免疫グロブリン又は再編成された免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られた場合、ヒト起源の配列に「由来する」重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。このような例示的な系は、ファージにディスプレイされたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリ、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座を保有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばマウス又はラットを含む。「ヒト抗体」は、典型的には、ヒト抗体及びヒト免疫グロブリン遺伝子座を得るために使用した系の違い、フレームワーク若しくはCDRへの体細胞変異の導入若しくは置換の意図的な導入、又はこれらの両方により、ヒトで発現した免疫グロブリンと比較したときにアミノ酸の違いを含有する。典型的には、「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン又は再編成された免疫グロブリン遺伝子によってコードされているアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一である。場合によっては、「ヒト抗体」は、例えば、Knappik et al. (2000) J Mol Biol 296:57-86に記載されているヒトフレームワーク配列分析から導かれたコンセンサスフレームワーク配列、又は例えば、Shi et al. (2010) J Mol Biol 397:385-96及び国際公開第2009/085462号に記載されている、ファージにディスプレイされたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリに組み込まれた合成HCDR3を含有しているもよい。

20

30

【0037】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列同一性パーセントが最大になるように、配列同一性の一部として保存的置換を全く考慮することなく、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入した後の、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを求める目的のためのアラインメントは、当該技術分野における技能の範囲内で様々な方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかしなが

40

50

ら、本明細書の目的のために、配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用してアミノ酸配列同一性%の値が生成される。A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. により作成され、ソースコードは、米国著作権局 (Washington D. C., 20559) にユーザ文書と共に提出されており、米国著作権登録番号 TXU510087 として登録されている。A L I G N - 2 プログラムは、Genentech, Inc. (South San Francisco, Calif.) から公的に入手可能であるか、又はソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N - 2 プログラムは、デジタル UNIX V4.0D を含む UNIX オペレーティングシステムで使用するためにコンパイルする必要がある。全ての配列比較パラメータは、A L I G N - 2 プログラムによって設定され、変化しない。アミノ酸配列比較のため 10
に A L I G N - 2 を使用する場合、所与のアミノ酸配列 B への、との、に対する所与のアミノ酸配列 A のアミノ酸配列同一性% (あるいは、所与のアミノ酸配列 B に、と、又はに対して同一である特定のアミノ酸配列%を有する又は含む所与のアミノ酸配列 A とも言うことができる) は、以下のように計算される:

$100 \times \text{割合 } X / Y$ 、

(式中、X は、A 及び B の配列アライメントプログラム A L I G N - 2 によるアライメントにおいてそのプログラムによって完全一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Y は、B 中のアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さと同じでない場合、A の B に対するアミノ酸配列同一性%は、B の A に対するアミノ酸配列同一性%と等しくはないことが理解されるであろう。特に明記しない限り、
20
本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性%の値は、A L I G N - 2 コンピュータプログラムを使用して直前の段落に記載の通り得られる。

【0038】

抗原結合部位が非ヒト種に由来する抗体は、「ヒト抗体」の定義には含まれない。

【0039】

「組換え物」は、異なる供給源由来のセグメントが結合されて組換え DNA、抗体、又はタンパク質を産生するときに、組換え手段によって調製、発現、作製、又は単離される DNA、抗体、及び他のタンパク質を指す。

【0040】

「エピトープ」とは、抗体が特異的に結合する抗原の一部分を指す。エピトープは、典型的には、アミノ酸又は多糖側鎖などの部分の化学的に活性な(極性、非極性又は疎水性など)表面基からなり、特定の三次元構造特性に加えて特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、配座上の空間単位を形成する連続的な及び/又は不連続なアミノ酸によって構成され得る。不連続なエピトープでは、抗原の直鎖配列の異なる部分にあるアミノ酸が、タンパク質分子の折り畳みにより三次元空間でごく近接するようになる。抗体「エピトープ」は、エピトープを識別するために使用する方法論によって異なる。

【0041】

「パラトープ」は、抗原に特異的に結合する抗体の部分に指す。パラトープは、事実上線形であってもよく、又は線形の一連のアミノ酸ではなく、抗体の隣接していないアミノ酸同士の空間的な関係することによって形成される不連続なものであってもよい。「軽鎖パラトープ」及び「重鎖パラトープ」又は「軽鎖パラトープのアミノ酸残基」及び「重鎖パラトープのアミノ酸残基」はそれぞれ、抗原と接触する抗体の軽鎖残基及び重鎖残基を指し、あるいは概して「抗体パラトープ残基」は、抗原と接触するこれらの抗体アミノ酸を指す。

【0042】

「二重特異性」は、2つの異なる抗原、又は同じ抗原中の2つの異なるエピトープと特異的に結合する抗体を指す。二重特異性抗体は、他の関連抗原、例えば、ヒト又はサル、例えば、カニクイザル(cyno)又はチンパンジーなどの他の種由来の同じ抗原(ホモログ)に対して交差反応性を有し得る、あるいは、2つ以上の異なる抗原間で共有されているエピトープに結合し得る。

10

20

30

40

50

【0043】

「多重特異性」とは、同じ抗原内の2つ以上の異なる抗原、又は2つ以上の異なるエピトープに特異的に結合する抗体を意味する。多重特異性抗体は、他の関連抗原、例えば、ヒト又はサル、例えば、カニクイザル(cyno)又はチンパンジーなどの他の種由来の同じ抗原(ホモログ)に対して交差反応性を有し得る、あるいは、2つ以上の異なる抗原間で共有されているエピトープに結合し得る。

【0044】

「変異体」は、1つ以上の改変、例えば、1つ以上の置換、挿入、又は欠失によって参照ポリペプチド又は参照ポリヌクレオチドとは異なるポリペプチド又はポリヌクレオチドを指す。

10

【0045】

「ベクター」は、生体系内で複製可能な、又はそのような系間を移動することができる、ポリヌクレオチドを指す。ベクターポリヌクレオチドは、典型的には、ベクターを複製することができる生物学的要素を利用して細胞、ウイルス、動物、植物などの生体系及び再構成された生体系におけるこれらポリヌクレオチドの複製又は維持を促進する機能を有する、複製起点、プロモータ、ポリアデニル化シグナル、及び選択マーカーなどの要素を含有する。ベクターポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖のDNA若しくはRNA分子、又はこれらのハイブリッドであり得る。

【0046】

「発現ベクター」は、発現ベクター中に存在するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの翻訳を指令するために、生体系又は再構成された生体系において利用できるベクターを指す。

20

【0047】

「ポリヌクレオチド」とは、糖-リン酸骨格又は他の等価な共有結合化学によって共有結合しているヌクレオチド鎖を含む分子を指す。二本鎖及び一本鎖のDNA及びRNAが、ポリヌクレオチドの典型例である。「ポリヌクレオチド」とは、糖-リン酸骨格により共有結合した、又は他の等価な共有結合性化学反応により結合したヌクレオチド鎖を含む合成分子を指し得、cDNAは、例示的な合成ポリヌクレオチドである。

【0048】

「ポリペプチド」又は「タンパク質」は、ペプチド結合によって連結されてポリペプチドを形成する少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を指す。50個未満のアミノ酸からなる小分子ポリペプチドは、「ペプチド」と称され得る。

30

【0049】

「フローサイトメトリー」は、流体が少なくとも1つのレーザーを通過する際に当該流体中の粒子の物理的及び化学的特性を分析するために使用される技術である。細胞成分を蛍光標識し、次いで、レーザーによって励起して、様々な波長で発光させる(Adan, et al, Critical Reviews in Biotechnology (2016) 1549-7801)。

【0050】

「抗イディオタイプ(抗Id)抗体」は、抗体の抗原決定基(例えば、パルトープ又はCDR)を認識する抗体である。抗イディオタイプ抗体を産生又は調製するプロセスは、当該技術分野において概ね知られている。(Lathey, J. et al Immunology 1986 57(1): 29-35)。抗Id抗体は、抗原をブロックするものであっても、しないものであってもよい。抗原をブロックする抗Id抗体は、サンプル中の遊離抗体、例えばCD3を検出するために使用することができる。ブロックしない抗Id抗体は、サンプル中の全抗体(遊離しているもの、抗原に一部結合しているもの、又は抗原に完全に結合しているもの)を検出するために使用することができる。抗Id抗体は、抗Id抗体が調製されている抗体で動物を免疫化することによって調製することができる。本明細書に記載されるいくつかの実施形態では、抗イディオタイプ抗体は、サンプル中の治療抗体のレベルを検出するために使用される。

40

50

【0051】

また、更に別の動物で免疫応答を誘導する免疫原として抗I d抗体を使用して、いわゆる抗 - 抗I d抗体を産生することもできる。抗抗I d抗体は、抗I d抗体を誘導した元のm A bとエピトープが同一であり得る。したがって、m A bのイデオタイプ決定基に対する抗体を使用することによって、同一の特異性の抗体を発現する他のクローンを同定することが可能である。抗I d抗体は様々であってよく（それにより、抗I d抗体変異体が産生される）、及び/又は抗C D 3抗体に関して本明細書の他の箇所に記載されているものなどの任意の好適な技術によって誘導体化してもよい。

【0052】

P S M Aは、前立腺特異性膜抗原を指す。P a n t r o g l o d y t e s（チンパンジー又はc h i m pとも称される）P S M Aのアミノ酸配列を配列番号49に示す。細胞外ドメインは、配列番号49の残基44～750にまたがり、膜貫通ドメインは、残基20～43にまたがり、細胞質ドメインは、残基1～19にまたがる。M a c a c a f a s c i c u l a r i s（カニクイザル、マカク、又はc y n oとも称される）P S M Aのアミノ酸配列を配列番号50に示す。細胞外ドメインは、配列番号50の残基44～750にまたがり、膜貫通ドメインは、残基20～43にまたがり、細胞質ドメインは、残基1～19にまたがる。ヒトP S M Aのアミノ酸配列を配列番号51に示す。細胞外ドメインは、配列番号51の残基44～750にまたがり、膜貫通ドメインは、残基20～43にまたがり、細胞質ドメインは、残基1～19にまたがる。

【0053】

本明細書全体を通して、「C D 3特異的」又は「C D 3に特異的に結合する」又は「抗C D 3抗体」は、C D 3 - 細胞外ドメイン（E C D）（配列番号636）に特異的に結合する抗体を含む、C D 3 - ポリペプチド（配列番号635）に特異的に結合する抗体を指す。C D 3 - は、C D 3 - 、 - 、及び - 、並びにT細胞受容体 / 及び / ヘテロダイマーと一緒に、T細胞受容体 - C D 3複合体を形成する。この複合体は、いくつかの細胞内シグナル伝達経路への抗原認識の連関において重要な役割を果たす。C D 3複合体は、シグナル伝達を媒介し、その結果、T細胞が活性化され、増殖する。C D 3は、免疫応答に必要である。

【0054】

配列番号635（ヒトC D 3）

M Q S G T H W R V L G L C L L S V G V W G Q D G N E E M G G I T Q T P Y K V S
I S G T T V I L T C P Q Y P G S E I L W Q H N D K N I G G D E D D K N I G S D E
D H L S L K E F S E L E Q S G Y Y V C Y P R G S K P E D A N F Y L Y L R A R V C
E N C M E M D V M S V A T I V I V D I C I T G G L L L L V Y Y W S K N R K A K A
K P V T R G A G A G G R Q R G Q N K E R P P P V P N P D Y E P I R K G Q R D L Y
S G L N Q R R I

【0055】

配列番号636（ヒトC D 3 細胞外ドメイン）

D G N E E M G G I T Q T P Y K V S I S G T T V I L T C P Q Y P G S E I L W Q H
N D K N I G G D E D D K N I G S D E D H L S L K E F S E L E Q S G Y Y V C Y P R
G S K P E D A N F Y L Y L R A R V C E N C M E M D

【0056】

本明細書で使用するとき、用語「インターロイキン - 1受容体アクセサリタンパク質」、「I L 1 R A P」、及び「I L 1 - R A P」は、具体的には、例えば、G e n B a n k A c c e s s i o n N o . A A B 8 4 0 5 9、N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : N P _ 0 0 2 1 7 3 . 1、及びU n i P r o t K B / S w i s s - P r o t A c c e s s i o n N o . Q 9 N P H 3 - 1に記載されているような、ヒトI L 1 R A Pタンパク質を含む（H u a n g e t a l . , 1 9 9 7 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A . 9 4 (2 4) , 1 2 8 2 9 - 1 2 8 3 2も参照）。I L 1 R A Pはまた、科学文献においてI L 1 R 3、C 3 o r f 1 3、F L J 3 7 7 8 8、I

10

20

30

40

50

L - 1 R A c P 及び E G 3 5 5 6 としても知られている。

【 0 0 5 7 】

「 C D 3 3 」は、表面抗原分類 3 3 タンパク質を指す。 C D 3 3 は、 6 7 キロダルトン (k D) の 1 回膜貫通糖タンパク質であり、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (シグレック) ファミリーのメンバーである。 C D 3 3 は、主に骨髄分化抗原であると考えられ、骨髄前駆細胞、好中球、及びマクロファージでは低発現し、循環単球及び樹状細胞では高発現する。ヒト C D 3 3 細胞外ドメイン (U n i p r o t P 2 0 1 3 8) (配列番号 6 3 6) 及びカニクイザル C D 3 3 (X P _ 0 0 5 5 9 0 1 3 8 . 1) は、本開示による C D 3 3 特異性抗体の生成に使用するためのタンパク質の例である。

【 0 0 5 8 】

「 T M E F F 2 」は、 E G F 様ドメイン及びトモレグリン 2 と呼ばれる 2 つのフォリスタチン様ドメイン 2 を含むヒト膜貫通タンパク質を指す。完全長ヒト T M E F F 2 のアミノ酸配列を配列番号 7 7 に示す。 T M E F F 2 の細胞外ドメインを配列番号 5 7 5 に示し、完全長 T M E F F 2 の残基 4 0 ~ 3 7 4 にまたがる。 T M E F F 2 細胞外ドメインは、 3 つの異なるサブドメイン、 K a z a l 様 1 (残基 8 5 ~ 1 3 7)、 K a z a l 様 2 (残基 1 7 6 ~ 2 2 9)、及び E G F ドメイン (残基 2 6 1 ~ 3 0 1) を保有する。 T M E F F 2 E G F ドメインを配列番号 5 7 7 に示す。 T M E F F 2 「膜近位領域」は、 E G F ドメイン及び N - C 末端リンカー領域 (例えば、配列番号 7 7 の完全長ヒト T M E F F 2 の残基 2 3 0 ~ 3 2 0) を包含する、配列番号 6 2 9 の T M E F F 2 領域を指す。本明細書におけるタンパク質、ポリペプチド、及びタンパク質断片に対する全ての言及は、非ヒト種由来のものであると明示的に指定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド、又はタンパク質断片のヒトバージョンを指すことを意図する。したがって、「 T M E F F 2 」は、非ヒト種、例えば、「マウス T M E F F 2 」又は「サル T M E F F 2 」などの非ヒト種由来のものであると指定されない限り、ヒト T M E F F 2 を意味する。

【 0 0 5 9 】

配列番号 7 7 (完全長ヒト T M E F F 2)

M V L W E S P R Q C S S W T L C E G F C W L L L L P V M L L I V A R P V K L A
A F P T S L S D C Q T P T G W N C S G Y D D R E N D L F L C D T N T C K F D G E
C L R I G D T V T C V C Q F K C N N D Y V P V C G S N G E S Y Q N E C Y L R Q A
A C K Q Q S E I L V V S E G S C A T D A G S G S G D G V H E G S G E T S Q K E T
S T C D I C Q F G A E C D E D A E D V W C V C N I D C S Q T N F N P L C A S D G
K S Y D N A C Q I K E A S C Q K Q E K I E V M S L G R C Q D N T T T T T K S E D
G H Y A R T D Y A E N A N K L E E S A R E H H I P C P E H Y N G F C M H G K C E
H S I N M Q E P S C R C D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L Y V V P G P V R F Q Y
V L I A A V I G T I Q I A V I C V V V L C I T R K C P R S N R I H R Q K Q N T G
H Y S S D N T T R A S T R L I

【 0 0 6 0 】

配列番号 5 7 5 (ヒト T M E F F 2 の細胞外ドメイン)

F P T S L S D C Q T P T G W N C S G Y D D R E N D L F L C D T N T C K F D G E
C L R I G D T V T C V C Q F K C N N D Y V P V C G S N G E S Y Q N E C Y L R Q A
A C K Q Q S E I L V V S E G S C A T D A G S G S G D G V H E G S G E T S Q K E T
S T C D I C Q F G A E C D E D A E D V W C V C N I D C S Q T N F N P L C A S D G
K S Y D N A C Q I K E A S C Q K Q E K I E V M S L G R C Q D N T T T T T K S E D
G H Y A R T D Y A E N A N K L E E S A R E H H I P C P E H Y N G F C M H G K C E
H S I N M Q E P S C R C D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L Y V V P G P V R F Q Y
V L I A A V I G T I Q I A V I C V V V L C I T R K C P R S N R I H R Q K Q N T G
H Y S S D N T T R A S T R L I

【 0 0 6 1 】

T M E F F 2 E G F ドメイン配列番号 5 7 7

H H I P C P E H Y N G F C M H G K C E H S I N M Q E P S C R C D A G Y T G Q H

10

20

30

40

50

C E

【0062】

T M E F F 2 膜近位領域配列番号629

N T T T T T K S E D G H Y A R T D Y A E N A N K L E E S A R E H H I P C P E H
 Y N G F C M H G K C E H S I N M Q E P S C R C D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L
 Y V V P G P V R F Q Y V

【0063】

「T M E F F 2 陽性癌」は、測定可能なレベルの T M E F F 2 タンパク質を示す癌組織又は癌細胞を指す。T M E F F 2 タンパク質のレベルは、生細胞又は溶解細胞に対して周知のアッセイ、例えば、E L I S A、免疫蛍光、フローサイトメトリー、又はラジオイムノアッセイを使用して測定することができる。「過剰発現」、「過剰発現した」、及び「過剰発現している」は、互換的に、参照サンプルと比較したときに測定可能な高いレベルの腫瘍抗原を有する癌細胞、悪性細胞、又は癌組織などのサンプルを指す。過剰発現は、遺伝子増幅によって、又は転写若しくは翻訳の増加によって引き起こされ得る。サンプル中のタンパク質の発現及び過剰発現は、例えば、生細胞又は溶解細胞に対して周知のアッセイ、例えば、E L I S A、免疫蛍光、フローサイトメトリー、又はラジオイムノアッセイを使用して測定することができる。サンプル中のポリヌクレオチドの発現及び過剰発現は、例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、サザンブロッティング、又は P C R 技術を使用して測定することができる。サンプル中のタンパク質又はポリヌクレオチドのレベルが参照サンプルと比較したときに少なくとも 1.5 倍高いとき、タンパク質又はポリヌクレオチドは過剰発現している。参照サンプルの選択は周知である。

10

20

【0064】

「サンプル」は、対象から単離された類似の流体、細胞、又は組織に加えて、対象の体内に存在する流体、細胞、又は組織の収集物を指す。例示的なサンプルは、血液、血清及び漿膜液、血漿、リンパ液、尿、唾液、嚢胞液、涙液、糞便、喀痰などの体液、分泌組織及び器官の粘膜からの分泌液、腔分泌液、非固形腫瘍に関連するものなどの腹水、胸膜腔、心膜腔、腹膜腔、腹腔、及び他の体腔の流体、気管支洗浄によって回収された流体、対象又は生物供給源、例えば、細胞及び器官の培養培地（細胞又は器官の馴化培地を含む）、洗浄液などと接触した液体溶液、組織生検、穿刺吸引、又は外科的に切除された腫瘍組織である。

30

【0065】

本明細書で使用するとき、「癌細胞」又は「腫瘍細胞」は、インビボ、エクスビボ、又は組織培養のいずれかにおいて、自然発生的な又は導入された表現型の変化を有する癌性、前癌性、又は形質転換細胞を指す。これらの変化は、必ずしも新たな遺伝物質の取り込みを伴うものではない。形質転換は、形質転換ウイルスの感染及び新たなゲノム核酸の組み込み、又は外因性の核酸の取り込みにより生じ得るが、自然発生的に又は発癌物質に対する曝露後にも生じる場合があり、それによって内因性遺伝子に変異する。形質転換/癌は、インビトロ、インビボ、及びエクスビボにおける、形態学的変化、細胞の不死化、異常な増殖の制御、病巣の形成、増殖、悪性病変、腫瘍特異的マーカーレベルの調節、侵襲性、ヌードマウスなどの好適な動物宿主における腫瘍増殖などによって例示される (F r e s h n e y , C u l t u r e o f A n i m a l C e l l s : A M a n u a l o f B a s i c T e c h n i q u e (第3版、1994年))。

40

【0066】

特に明記しない限り、本明細書に記載される濃度又は濃度範囲などのあらゆる数値は、全ての場合において、「約」という用語によって修飾されているものとして理解されるべきである。したがって、数値は、典型的には、記載される値の $\pm 10\%$ を含む。例えば、 1 mg/mL の濃度は $0.9 \text{ mg/mL} \sim 1.1 \text{ mg/mL}$ を含む。同様に、 $1\% \sim 10\%$ (w/v) の濃度範囲は $0.9\% (w/v) \sim 11\% (w/v)$ を含む。本明細書で使用する場合、数値範囲の使用は、文脈上そうでない旨が明確に示されない限り、その範囲内の整数及び値の分数を含む、全ての可能な部分範囲、その範囲内の全ての個々の数値を

50

明示的に含む。

【0067】

「エフェクター抗原」は、細胞傷害、貪食作用、抗原提示、及び/又はサイトカイン放出を刺激又は誘発することができる免疫系の細胞からの抗原である。このようなエフェクター抗原は、例えば、限定するものではないが、T細胞及びナチュラルキラー(NK)細胞である。エフェクター抗原の好適な特異性の例としては、T細胞についてはCD3又はCD3などのCD3サブユニット、及びNK細胞についてはCD16が挙げられるが、これらに限定されない。エフェクター細胞のこのような細胞表面分子は、細胞殺傷を媒介するのに好適である。エフェクター細胞は、細胞傷害、貪食作用、抗原提示、及び/又はサイトカイン放出を刺激又は誘発することができる免疫系の細胞である。このようなエフェクター細胞は、例えば、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、顆粒球、単球、マクロファージ、樹状細胞、及び抗原提示細胞であるが、これらに限定されない。エフェクター細胞の好適な特異性の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：T細胞についてはCD2、CD3及びCD3eなどのCD3サブユニット、CD5、CD28、及びT細胞受容体(TCR)の他の構成要素；NK細胞についてはCD16、CD16A、CD25、CD38、CD44、CD56、CD69、CD94、CD335(NKp46)、CD336、(NKp44)、CD337(NKp30)、NKp80、NKG2C及びNKG2D、DNAM、NCR；顆粒球についてはCD18、CD64、及びCD89；単球及びマクロファージについてはCD18、CD32、CD64、CD89、及びマンノース受容体；樹状細胞についてはCD64及びマンノース受容体；並びにCD35。本発明の特定の実施形態では、エフェクター細胞の特異性、すなわち細胞表面分子は、二重特異性又は多重特異性分子のこのような細胞表面分子への結合時に細胞殺傷を媒介し、それによって、細胞溶解又はアポトーシスを誘導するのに好適である。

10

20

30

40

50

【0068】

「二重特異性CD3抗体」は、CD3に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインを含む分子、例えば、CD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインを含む二重特異性抗体を指す。CD3及び第2の抗原に特異的に結合するドメインは、典型的にはV_H/V_L対である。二重特異性CD3抗体は、CD3又は第2の抗原のいずれかへの結合に関して一価であってもよい。いくつかの実施形態では、第2の又は標的抗原は、免疫エフェクター細胞以外の標的細胞上で発現する細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、第2の抗原は、腫瘍関連抗原(TAA)である。例示的なTAAは、PSMA、CD33、IL1RAP、及びTMEFF2である。

【0069】

「二重特異性PSMA×CD3抗体」、「PSMA/CD3抗体」、「二重特異性抗PSMA×CD3抗体」、又は「抗PSMA/CD3抗体」などは、PSMAに特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインと、CD3に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインとを含む分子を指す。PSMA及びCD3に特異的に結合するドメインは、典型的にはV_H/V_L対である。二重特異性抗PSMA×CD3抗体は、PSMA又はCD3のいずれかへの結合に関して一価であってもよい。

【0070】

「二重特異性CD33×CD3抗体」、「CD33/CD3抗体」、「二重特異性抗CD33×CD3抗体」、又は「抗CD33/CD3抗体」などは、CD33に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインと、CD3に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインとを含む分子を指す。CD33及びCD3に特異的に結合するドメインは、典型的にはV_H/V_L対である。二重特異性抗CD33×CD3抗体は、CD33又はCD3のいずれかへの結合に関して一価であってもよい。

【0071】

「二重特異性IL1RAP×CD3抗体」、「IL1RAP/CD3抗体」、「二重特異性抗IL1RAP×CD3抗体」、又は「抗IL1RAP/CD3抗体」などは、IL

1 R A P に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインと、C D 3 に特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインとを含む分子を指す。I L 1 R A P 及びC D 3 に特異的に結合するドメインは、典型的にはV_H / V_L 対である。二重特異性抗I L 1 R A P × C D 3 抗体は、I L 1 R A P 又はC D 3 のいずれかへの結合に関して一価であってもよい。

【0072】

「二重特異性抗T M E F F 2 / 抗C D 3 抗体」、T M E F F 2 / C D 3 抗体、T M E F F 2 × C D 3 抗体などは、T M E F F 2 及びC D 3 に結合する抗体を指す。

【0073】

「価数」とは、分子中の抗原に対して特異的な結合部位が明記された数で存在することを意味する。そのため、用語「1価」、「2価」、「4価」、及び「6価」はそれぞれ、抗原に対して特異的な結合部位が分子中に1個、2個、4個、及び6個存在することを指す。「多価」とは、分子中に抗原に対して特異的な結合部位が2つ以上存在することを指す。

10

【0074】

「抗原特異的C D 4 + 又はC D 8 + T細胞」は、特定の抗原によって活性化されるC D 4 + 若しくはC D 8 + T細胞、又はその免疫刺激性エピトープを指す。

【0075】

「対象」は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」としては、例えば、哺乳類及び非哺乳類、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの全ての脊椎動物が挙げられる。注記されている場合を除き、「患者」及び「対象」という用語は、互換的に使用される。

20

【0076】

本明細書全体を通して、抗体の定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、特に明示的に指定しない限り、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) に記載されているEUインデックスに準拠する。

【0077】

【表1】

30

表1. 本明細書で使用する従来のアミノ酸の1文字及び3文字コード。

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Gln	E
グルタミン	Glu	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

40

【0078】

物質の組成

50

本発明は、抗CD3抗体及びその抗原結合断片、PSMAに特異的に結合する抗体及びその抗原結合断片、CD33に特異的に結合する抗体及びその抗原結合断片、IL1RAPに特異的に結合する抗体及びその抗原結合断片、CD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインを含む多重特異性抗体、並びにCD3とPSMA、CD33、IL1RAP、及びTMFF2のうちの一つ以上とに特異的に結合する多重特異性抗体を提供する。本発明は、本発明の抗体又はその相補的核酸をコードしているポリペプチド及びポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、並びにこれらを作製する方法及び使用する方法を提供する。

【0079】

本明細書に記載される抗体の全般的な態様

10

本明細書に記載の抗CD3特異性抗体又は抗原結合断片は、記載される抗CD3抗体又は抗原結合断片の生物学的特性（例えば、結合親和性又は免疫エフェクター活性）を保持している、1つ又は複数のアミノ酸の置換、欠失、又は付加を有する変異体を含む。本発明の文脈において、下記注釈は、別途記載のない限り、変異を説明するのに使用される。
i) 所与の位置におけるアミノ酸の置換は、例えば、K409Rと記載される。K409Rは、409位におけるリジンのアルギニンによる置換を意味する。ii) 特定の変異体について、特定の三文字又は一文字コードは、コードXaa及びXを含めて、アミノ酸残基を示すのに使用される。このため、409位におけるリジンについてのアルギニンの置換は、K409Rと指定され、又は409位におけるリジンについての任意のアミノ酸残基の置換は、K409Xと指定される。409位におけるリジンの欠失の場合には、この欠失は、K409*により示される。当業者であれば、1つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、又は付加を有する変異体を産生することができる。

20

【0080】

これらの変異体としては、(a) 1つ又は2つ以上のアミノ酸残基が保存的又は非保存的アミノ酸により置換されている変異体、(b) 1つ又は2つ以上のアミノ酸がポリペプチドに付加され、又は同ポリペプチドから欠失している変異体、(c) 1つ又は2つ以上のアミノ酸が置換基を含む変異体、及び(d) ポリペプチドが別のペプチド又はポリペプチド、例えば、融合パートナー、タンパク質タグ、又は他の化学部分と融合した変異体、を挙げることができる。これらは、ポリペプチドに有用な特性、例えば、抗体に対するエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分等を付与してもよい。本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントは、保存的又は非保存的位置のいずれかにおいてある種からのアミノ酸残基が別の種における対応する残基に置換されている変異体を含んでもよい。他の実施形態では、非保存的位置におけるアミノ酸残基は、保存的又は非保存的残基により置換される。これらの変異体を得るための手法は、遺伝的（欠失、変異等）、化学的、及び酵素的手法を含めて、当業者に既知である。

30

【0081】

本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片は、IgM、IgD、IgG、IgA、又はIgEアイソタイプであってよい。いくつかの実施形態では、抗体アイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4アイソタイプである。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG1アイソタイプである。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG2アイソタイプである。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG3アイソタイプである。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG4アイソタイプである。抗体又はその抗原結合断片の特異性は、CDRのアミノ酸配列及び配置によって部分的に決定される。したがって、あるアイソタイプのCDRは、抗原特異性を変化させることなく、別のアイソタイプに導入することができる。したがって、このような抗体アイソタイプは、記載された抗体又は抗原結合フラグメントの範囲内にある。

40

【0082】

IgGクラスは、ヒトにおいて、4つのアイソタイプ：IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4に分割される。これらのアイソタイプは、CH1、CH2、及びCH3領域のアミノ酸配列において95%超の相同性を共有するが、ヒンジ領域のアミノ酸組成及

50

び構造においては大きな差異を示す。Fc領域は、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞貪食作用（ADCP）、及び補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介する。ADCCでは、Fc領域が、免疫エフェクター細胞、例えば、ナチュラルキラー細胞及びマクロファージの表面上のFc受容体（FcR）に結合して、標的細胞の溶解を引き起こす。CDCでは、抗体が、細胞表面における補体カスケードを誘発することにより標的細胞の殺傷を媒介する。ADCPでは、抗体が、マクロファージ又は樹状細胞などの貪食細胞による内部移行により抗体被膜標的細胞の排除を媒介する。本明細書に記載の抗体としては、Fc領域が様々なエフェクター機能を調節するように改変されている改変バージョンを含む、IgGアイソタイプのいずれかと組み合わせられて可変ドメインに記載された特徴を有する抗体が挙げられる。

10

【0083】

治療抗体の多くの用途では、細胞枯渇による安全上のリスクを生じる可能性が潜在的にあるため、Fc媒介エフェクター機能は望ましくない。エフェクター機能の改変は、Fc領域を遺伝子操作してFcR又は補体因子への結合を低減することにより達成され得る。活性化（FcRI、FcRIIa、FcRIIIa、及びFcRIIIb）及び阻害性（FcRIIb）FcR又は補体第1成分（C1q）へのIgGの結合は、ヒンジ領域及びCH2ドメインに位置する残基に依存する。IgG1、IgG2、及びIgG4に変異を導入して、Fc媒介エフェクター機能を低下又はサイレンシングさせることができる。本明細書に記載された抗体は、これらの改変を含んでもよい。

20

【0084】

いくつかの実施形態では、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、及び/又は抗IL1RAP抗体は、以下の特性のうちの一つ以上を有する遺伝子操作されたFc領域を含む：（a）親Fcと比較してエフェクター機能が低下している；（b）FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIIb、及び/若しくはFcRIIIaに対する親和性が低下している、（c）FcRIに対する親和性が低下している、（d）FcRIIaに対する親和性が低下している、（e）FcRIIIbに対する親和性が低下している、又は（f）FcRIIIaに対する親和性が低下している。

【0085】

いくつかの実施形態では、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、及び/又は抗IL1RAP抗体は、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4アイソタイプである。抗体がIgG4アイソタイプを有するいくつかの実施形態では、抗体は、野生型IgG4アイソタイプと比較して、そのFc領域中にS228P、F234A、及びL235A置換を含有する。抗体がIgG1アイソタイプを有するいくつかの実施形態では、抗体は、そのFc領域中にL234A及びL235A置換を含有する。本明細書に記載された抗体は、これらの改変を含んでもよい。

30

【0086】

いくつかの実施形態では、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、及び/又は抗IL1RAP抗体は、任意選択で重鎖置換S228Pを含むIgG4アイソタイプである。

【0087】

いくつかの実施形態では、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、及び/又は抗IL1RAP抗体は、野生型IgG1と比較して、任意選択で重鎖置換L234A、G237A、P238S、H268A、A330S、及びP331Sを含むIgG1アイソタイプである。

40

【0088】

いくつかの実施形態では、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、及び/又は抗IL1RAP抗体は、野生型IgG2と比較して、任意選択で重鎖置換L234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330S、及びP331Sを含むIgG2アイソタイプである。

【0089】

野生型IgG4

50

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
 S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K
 T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S
 V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V
 D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
 K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T
 K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
 S L S L S L G K (配列番号 6 0 2)

10

【 0 0 9 0 】

野生型 I g G 1

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
 S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q
 T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G
 G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
 W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
 K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D
 E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
 V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y
 T Q K S L S L S P G K (配列番号 6 0 1)

20

【 0 0 9 1 】

野生型 I g G 2

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
 S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q
 T Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V
 F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D
 G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K
 C K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K
 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S
 D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 L S L S P G K (配列番号 7 1 1)

30

【 0 0 9 2 】

特定の実施形態では、標識された抗 C D 3、抗 P S M A、抗 C D 3 3、及び / 又は抗 I L 1 R A P 抗体が提供される。例示的な直接検出される標識又は部分（例えば、蛍光、発色団、高電子密度、化学発光、及び放射性標識）並びに（例えば、酵素反応又は分子間相互作用を通して）間接的に検出される標識及び部分（例えば、酵素又はリガンド）。例示的な標識としては、放射性標識（例えば、³²P、¹⁴C、¹¹¹I、¹²⁵I、³H、¹³¹I）、蛍光標識（Dy Light（登録商標）649など）、エピトープタグ、ピオチン、発色団標識、ECL標識、又は酵素が挙げられる。より詳細には、記載された標識としては、ルテニウム、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びベータガラクトシダーゼ、ポリヒスチジン（HISタグ）、アクリジン染料、シアニン染料、フルオロン染料、オキサジン染料、フェナントリジン染料、ローダミン染料、Alexafluor（登録商標）染料などが挙げられる。

40

【 0 0 9 3 】

記載される抗 C D 3、抗 P S M A、抗 C D 3 3、及び / 又は抗 I L 1 R A P 抗体、並びに抗原結合断片に加えて、記載される抗体及び抗原結合断片をコード可能なポリヌクレオチド配列も提供される。記載されるポリヌクレオチドを含むベクターも提供され、同様に、本明細書に提供される抗 C D 3、抗 P S M A、抗 C D 3 3、及び / 若しくは抗 I L 1 R A P 抗体、又は抗原結合断片を発現している細胞も提供される。また、開示されたベクタ

50

ーを発現可能な細胞も記載される。これらの細胞は、哺乳類細胞（例えば、293F細胞、CHO細胞）、昆虫細胞（例えば、Sf7細胞）、酵母細胞、植物細胞、又は細菌細胞（例えば、大腸菌）であってもよい。記載された抗体はまた、ハイブリドーマ細胞により産生することができる。

【0094】

単一特異性抗体の生成

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体、抗PSMA、抗CD33、抗TMEFF2、及び/又は抗IL1RAP抗体はヒトである。

【0095】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体、抗PSMA、抗CD33、抗TMEFF2、及び/又は抗IL1RAP抗体はヒト化されている。

10

【0096】

本明細書に記載の本発明の単一特異性抗体（例えば、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、抗TMEFF2、及び/又は抗IL1RAP抗体）は、様々な技術を使用して生成され得る。例えば、Kohler and Milstein, Nature 256: 495, 1975のハイブリドーマ法を使用してモノクローナル抗体を生成することができる。ハイブリドーマ法では、マウス又は他の宿主動物、例えばハムスター、ラット、又はニワトリを、ヒト、チンパンジー、又はマカクのPSMA、CD33、IL1RAP、TMEFF2、若しくはCD3、又はPSMA、CD33、IL1RAP、TMEFF2、若しくはCD3の断片、例えば、PSMA、CD33、IL1RAP、TMEFF2、若しくはCD3の細胞外ドメインで免疫化し、続いて、標準的な方法を使用して、免疫化した動物由来の脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986)）。1個の不死化したハイブリドーマ細胞から発生したコロニーを、結合特異性、交差反応性又はその欠如、及び抗原親和性などの所望の特性を有する抗体の産生についてスクリーニングする。

20

【0097】

様々な宿主動物を使用して、本明細書に記載の本発明の抗CD3、抗PSMA、抗CD33、TMEFF2、及び/又は抗IL1RAP抗体を産生することができる。例えば、Balb/cマウスを使用して、マウス抗ヒトPSMA抗体を生成することができる。Balb/cマウス及び他のヒト以外の動物において作製された抗体を、よりヒトに近い配列を生成するための様々な技術を使用してヒト化することもできる。

30

【0098】

ヒトアクセプターフレームワークの選択を含む例示的なヒト化技術は公知であり、CDRグラフト化（米国特許第5,225,539号）、SDRグラフト化（米国特許第6,818,749号）、リサーフェシング（Padlan (1991) Mol Immunol 28: 489 - 499）、特異性決定残基のリサーフェシング（米国特許出願公開第2010/0261620号）、ヒトフレームワーク適応（米国特許第8,748,356）、又は超ヒト化（米国特許第7,709,226号）を含む。これらの方法では、CDRの長さの類似性若しくはカノニカル構造の同一性、又はこれらの組み合わせに基づいて、親フレームワークに対する全体的な相同性に基づき選択され得るヒトフレームワークに親抗体のCDRを導入する。

40

【0099】

ヒト化抗体は、国際公開第1090/007861号及び同第1992/22653号に記載されているものなどの技術によって、結合親和性を保存するように変化させたフレームワーク支持残基を組み込むことによって（復帰変異）、又はCDRのいずれかに変動を導入して、例えば抗体の親和性を改善することによって、所望の抗原に対するその選択性又は親和性を改善するように更に最適化させてもよい。

【0100】

50

自身のゲノムにヒト免疫グロブリン (Ig) 遺伝子座を有する、マウス又はラットなどのトランスジェニック動物を使用して、標的タンパク質に対するヒト抗体を生成することができ、これらは例えば、以下に記載されている：米国特許第 6,150,584号、国際公開第 99/45962号、同第 2002/066630号、同第 2002/43478号、同第 2002/043478号、及び同第 1990/04036号、Lonberg et al (1994) Nature 368:856-9; Green et al (1994) Nature Genet. 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) Exp. Med. 188:483-95; Lonberg and Huszar (1995) Int Rev Immunol 13:65-93; Bruggemann et al., (1991) Eur J Immunol 21:1323-1326; Fishwild et al., (1996) Nat Biotechnol 14:845-851; Mendez et al., (1997) Nat Genet 15:146-156; Green (1999) J Immunol Methods 231:11-23; Yang et al., (1999) Cancer Res 59:1236-1243; Bruggemann and Tassig (1997) Curr Opin Biotechnol 8:455-458。このような動物の内在的な免疫グロブリン遺伝子座を破壊又は欠失させてもよく、相同又は非同組換えを使用して、導入染色体 (transchromosome) を使用して、又はミニ遺伝子を使用して、少なくとも1つの完全な又は部分的なヒト免疫グロブリン遺伝子座を動物のゲノムに挿入してもよい。Regeneron (<http://www.regeneron.com>)、Harbour Antibodies (<http://www.harbourantibodies.com>)、Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (<http://www.omtinc.net>)、KyMab (<http://www.kymab.com>)、Trianni (<http://www.trianni.com>)、及びAblexis (<http://www.ablexis.com>)などの企業は、上記の技術を使用して、選択抗原を標的としたヒト抗体を提供するべく取り組んでいる場合がある。

【0101】

ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリから選択することができ、この場合、ファージは、ヒト免疫グロブリン又はその一部、例えば、Fab、単鎖抗体 (scFv)、又は不對若しくは対合抗体の可変領域を発現するように遺伝子操作されている (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86; Krebs et al., (2001) J Immunol Meth 254:67-84; Vaughan et al., (1996) Nature Biotechnology 14:309-314; Sheets et al., (1998) PITAS (USA) 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter (1991) J Mol Biol 227:381; Marks et al., (1991) J Mol Biol 222:581)。本発明の抗体は、例えば、Sheet et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96及び国際公開第 09/085462号)に記載の通り、バクテリオファージ pIXコートタンパク質との融合タンパク質として抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を発現しているファージディスプレイライブラリから単離され得る。ライブラリを、ヒト及び/又はカニクイザルの P5MA、CD33、IL1RAP、TMEFF2、又はCD3のファージ結合についてスクリーニングし、得られた陽性クローンを更に特性評価し、Fabをクローンの溶解物から単離し、完全長のIgGとして発現させることができる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は、例えば、米国特許第 5,223,409号、同第 5,403,484号、同第 5,571,698号、同第 5,427,908号、同第 5,580,717号、同第 5,969,108号、同第 6,172,197号、同第 5,885,793号、同第 6,521,404号、同第 6,544,731号、同第 6,555,313号、同第 6,582,915号、及び同第 6,593,081号に記載されている。

【0102】

免疫原性抗原の調製及びモノクローナル抗体の産生は、組換えタンパク質産生などの任意の好適な技術を使用して実施することができる。免疫原性抗原は、精製タンパク質、あるいは全細胞又は細胞若しくは組織抽出物を含むタンパク質混合物の形態で動物に投与されてもよく、抗原は、当該抗原又はその一部をコードしている核酸から動物の体内でデノボ形成されてもよい。

【0103】

二重特異性及び多重特異性CD3抗体の生成及び使用

本発明は、CD3に特異的に結合する第1のドメインと、第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性及び多重特異性抗体を提供する。第2の抗原は、腫瘍関連抗原(TAA)又は病原性細胞上の抗原であってよい。

10

【0104】

CD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体及び多重特異性抗体を遺伝子操作するために使用することができる例示的な抗CD3抗体としては、それぞれ表7A及び7Bに示されるV_H/V_L配列及び重鎖/軽鎖CDRを含むCD3抗体、並びに表10及び表11及び添付のテキストに記載されているその遺伝子操作された変異体が挙げられる。例えば、本明細書に記載のCD3抗体CD3B312、CD3B313、CD3B314、CD3B315、CD3B316、CD3B317、CD3B337、CD3B373、CD3B376、CD3B389、CD3B450、及びCD3B467のCDR及び/又はV_H/V_Lドメインを使用して、CD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性及び多重特異性抗体を生成することができる。

20

【0105】

本明細書に記載の抗CD3抗体のCDR及び/又はV_H/V_Lドメインを、CD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体に組み込むことができる。

【0106】

本明細書に記載の抗CD3抗体のCDR及び/又はV_H/V_Lドメインを、本明細書及び表23に記載のPSMA結合V_H/V_Lドメインを含む二重特異性抗体に組み込むことができる。本明細書に記載の抗CD3抗体及び/又はV_H/V_Lドメインを、本明細書及び表30に記載のIL1RAP結合V_H/V_Lドメインを含む二重特異性抗体に組み込むことができる。本明細書に記載の抗CD3抗体のCDR及び/又はV_H/V_Lドメインを、本明細書及び表38に記載のCD33結合V_H/V_Lドメインを含む二重特異性抗体に組み込むことができる。例えば、本明細書に記載のPSMA抗体PSMB119、PSMB120、PSMB121、PSMB122、PSMB123、PSMB87、PSMB126、PSMB127、PSMB128、PSMB129、PSMB130、PSMB120、PSMB121、PSMB122、PSMB123、PSMB127、PSMB128、PSMB130、PSMB344、PSMB345、PSMB346、PSMB347、PSMB349、PSMB358、PSMB359、PSMB360、PSMB361、PSMB362、PSMB363、及びPSMB365のV_H/V_Lドメインを使用して、二重特異性PSMA×CD3抗体を生成することができる。

30

40

【0107】

例示的なTAAは、PSMA、CD33、TMEFF2、及びIL1RAPである。本明細書に提供される例示的な多重特異性PSMA×CD3、CD33×CD3、TMEFF2×CD3、及びIL1RAP×CD3抗体は、CD3に特異的に結合する第1のドメインと、PSMA、CD33、TMEFF2、又はIL1RAPに特異的に結合する第2のドメインとを有する。二重特異性PSMA×CD3分子を遺伝子操作するために使用することができる例示的な抗PSMA抗体は、本明細書に記載されているものであり、これは、表23に列挙する重鎖及び軽鎖配列を含むがこれらに限定されない重鎖及び軽鎖配列を含み得る。二重特異性IL1RAP×CD3分子を遺伝子操作するために使用すること

50

ができる例示的な抗 I L 1 R A P 抗体は、本明細書に記載されているものであり、これは、表 3 5 に提供される重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むがこれらに限定されない重鎖及び軽鎖可変領域配列を含み得る。二重特異性 C D 3 3 × C D 3 分子を遺伝子操作するために使用することができる例示的な抗 C D 3 3 抗体は、本明細書に記載されているものであり、これは、表 4 3 に提供される重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むがこれらに限定されない重鎖及び軽鎖可変領域配列を含み得る。二重特異性 T M E F F 2 × C D 3 分子を遺伝子操作するために使用することができる例示的な抗 T M E F F 2 抗体は、本明細書に記載されているものであり、これは、表 5 9、表 6 6 ~ 6 8 に提供される重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むがこれらに限定されない重鎖及び軽鎖可変領域配列を含み得る。

【 0 1 0 8 】

生成された二重特異性抗体は、C D 3 及び / 若しくは第 2 の抗原への結合について、並びに / 又は第 2 の抗原を発現する細胞の T 細胞媒介性殺傷などの所望の機能特性について試験することができる。

【 0 1 0 9 】

本明細書に提供される二重特異性抗体は、完全長抗体構造を有する抗体を含む。

【 0 1 1 0 】

「 F a b アーム」又は「半分子」とは、抗原に特異的に結合する 1 つの重鎖 - 軽鎖対を意味する。

【 0 1 1 1 】

本明細書に記載の完全長二重特異性抗体は、例えば、インビトロにおける無細胞環境において又は共発現を使用して N のいずれかで異なる特異性を有する 2 つの抗体半分子のヘテロダイマーを形成するのに好都合になるように、各半分子における重鎖 C H 3 界面に置換を導入することによって、2 つの単一特異性二価抗体間での F a b アーム交換（又は半分子交換）を使用して生成され得る。F a b アーム交換反応は、ジスルフィド結合異性化反応及び C H 3 ドメインの解離 - 会合の結果である。親単一特異性抗体のヒンジ領域における重鎖ジスルフィド結合は減少する。親単一特異性抗体のうちの 1 つの得られた遊離システインは、第 2 の親単一特異性抗体分子のシステイン残基と重鎖内ジスルフィド結合を形成し、同時に、親抗体の C H 3 ドメインは、解離 - 会合により解放及び再形成する。F a b アームの C H 3 ドメインは、ホモダイマー化よりヘテロダイマー化に好都合になるように改変されてもよい。得られる生成物は、各々が異なるエピトープ、すなわち、C D 3 上のエピトープ及び第 2 の抗原上のエピトープに結合する、2 つの F a b アーム又は半分子を有する二重特異性抗体である。

【 0 1 1 2 】

「ホモダイマー化」とは、同一の C H 3 アミノ酸配列を有する 2 本の重鎖の相互作用を意味する。「ホモダイマー」とは、同一の C H 3 アミノ酸配列を有する 2 本の重鎖を有する抗体を意味する。

【 0 1 1 3 】

「ヘテロダイマー化」とは、同一でない C H 3 アミノ酸配列を有する 2 本の重鎖の相互作用を意味する。「ヘテロダイマー」とは、同一でない C H 3 アミノ酸配列を有する 2 本の重鎖を有する抗体を意味する。

【 0 1 1 4 】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、T r i o m a b / Q u a d r o m a (T r i o n P h a r m a / F r e s e n i u s B i o t e c h)、K n o b - i n - H o l e (G e n e n t e c h)、C r o s s M A b (R o c h e)、及び静電的一致 (C h u g a i , A m g e n , N o v o N o r d i s k , O n c o m e d)、L U Z - Y (G e n e n t e c h)、S t r a n d E x c h a n g e E n g i n e e r e d D o m a i n b o d y (S E E D b o d y) (E M D S e r o n o)、B i c l o n i c (M e r u s)、並びに D u o B o d y (登録商標) T e c h n o l o g y (G e n m a b A / S) などの設計を含む。

【 0 1 1 5 】

10

20

30

40

50

Triomab quadroma技術を使用して、本発明の抗CD3抗体のVH及びVLが組み込まれた完全長二重特異性抗体を生成することができる。Triomab技術は、2つの親キメラ抗体、IgG2aを有する1つの親mAbと、ラットIgG2b定常領域を有する第2の親mAbとの間のFabアーム交換を促進し、キメラ二重特異性抗体をもたらす。

【0116】

「ノブ-イン-ホール」戦略（例えば、国際公開第2006/028936号を参照されたい）を使用して、完全長二重特異性抗体を生成することができる。簡潔に述べると、ヒトIgGにおけるCH3ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸は、ヘテロダイマー形成を促進するために、CH3ドメイン相互作用に影響を及ぼす位置において変異され得る。小さな側鎖を有するアミノ酸（ホール）が、第1の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入され、大きな側鎖を有するアミノ酸（ノブ）が、第2の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入される。2つの抗体の共発現後に、ヘテロダイマーが、「ホール」を有する重鎖と「ノブ」を有する重鎖との優先的な相互作用の結果として形成される。ノブ及びホールを形成する例示的なCH3置換ペアは、T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S、及びT366W/T366S__L368A__Y407Vである（第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける修飾位置/第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける修飾位置として表現）。

10

【0117】

CrossMAb技術を使用して、完全長二重特異性抗体を生成することができる。CrossMAbは、「ノブ-イン-ホール」戦略を利用してFabアーム交換を促進することに加えて、半アームのうちの一つに、得られる二重特異性抗体の正しい軽鎖対形成を保証するために交換されたCH1及びCLドメインを有する（例えば、米国特許第8,242,247号を参照されたい）。

20

【0118】

他の交差戦略を使用して、一方のアーム又は両方のアームのいずれかにおける、重鎖と軽鎖との間若しくは二重特異性抗体の重鎖内の、可変領域若しくは定常領域、又は両方の領域を交換することによって、完全長二重特異性抗体を生成することができる。これらの交換としては、例えば、国際公開第2009/080254号、同第2009/080251号、同第2009/018386号、及び同第2009/080252号に記載されるVH-CH1とVL-CL、VHとVL、CH3とCL、及びCH3とCH1が挙げられる。

30

【0119】

他の戦略、例えば、あるCH3表面における正に荷電した残基及び第2のCH3表面における負に荷電した残基を置換することによる静電的相互作用を使用する重鎖ヘテロダイマー化の促進は、米国特許出願公開第2010/0015133号、米国特許出願公開第2009/0182127号、米国特許出願公開第2010/028637号、又は米国特許出願公開第2011/0123532号に記載されるように使用することができる。他の戦略では、ヘテロダイマー化は、米国特許出願公開第2012/0149876号又は米国特許出願公開第2013/0195849号に記載されるように、下記置換：L351Y__F405A__Y407V/T394W、T366I__K392M__T394W/F405A__Y407V、T366L__K392M__T394W/F405A__Y407V、L351Y__Y407A/T366A__K409F、L351Y__Y407A/T366V__K409F、Y407A/T366A__K409F、又はT350V__L351Y__F405A__Y407V/T350V__T366L__K392L__T394W（第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける修飾位置/第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける修飾位置として表現）により促進されてもよい。

40

【0120】

LUZ-Y技術を利用して、二重特異性抗体を生成することができる。この技術では、

50

Wraniak et al., (2012) J Biol Chem 287(52): 42221-9に記載の通り、ロイシンジッパーをCH3ドメインのC末端に付加して、精製後に除去される親mAbからのヘテロダイマーアセンブリを駆動する。

【0121】

SEEDbody技術を利用して、二重特異性抗体を生成することができる。SEEDbodyは、それらの定常ドメインにおいて、米国特許出願公開第2007/0287170号に記載されるように、ヘテロダイマー化を促進するためにIgA残基で置換された選択IgG残基を有する。

【0122】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、国際公開第2011/131746号)に記載の方法に従って、2つの単一特異性ホモダイマー抗体のCH3領域に非対称な変異を導入し、ジスルフィド結合を異性化させる還元条件下で、2つの親単一特異性ホモダイマー抗体から二重特異性ヘテロダイマー抗体を形成することによって、無細胞環境においてインビトロで生成され得る。この方法では、第1の単一特異性二価抗体(すなわち、第2の抗原に特異的に結合する抗体、例えば、抗PSMA、抗CD33、抗TMFF2、又は抗IL1RAP抗体)及び第2の単一特異性二価抗体(例えば、抗CD3抗体)を、ヘテロダイマーの安定性を促進するCH3ドメインにおける特定の置換を有するように遺伝子操作し;これらの抗体は、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合を異性化させるのに十分な還元条件下において共にインキュベートされ、それにより、Fabアーム交換により二重特異性抗体が生成される。インキュベート条件は、非還元条件に戻される。使用され得る例示的な還元剤は、2-メルカプトエチルアミン(2-MEA)、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスリトール(DTE)、グルタチオン、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、L-システイン、及びβ-メルカプトエタノールである。例えば、少なくとも20の温度で、少なくとも25mMの2-MEAの存在下又は少なくとも0.5mMのジチオスレイトールの存在下で、pH5~8、例えばpH7.0又はpH7.4で、少なくとも90分間のインキュベートを用いることができる。

【0123】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、CD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体は、抗体のCH3定常ドメインに少なくとも1つの置換を含む。

【0124】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、抗体のCH3定常ドメインにおける少なくとも1つの置換は、K409R、F405L、又はF405L及びR409K置換であり、残基の付番はEUインデックスに準拠する。

【0125】

抗体ドメイン及び付番は、周知である。「非対称」とは、抗体内の2本の別の重鎖の2つのCH3ドメインにおける、同一でない置換を意味する。IgG1CH3領域は通常、IgG1上の残基341~446(残基付番はEUインデックスに従う)からなる。

【0126】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、IgG1アイソタイプであり、野生型IgG1と比較して、抗体の第1の重鎖(HC1)におけるF405L置換及び抗体の第2の重鎖(HC2)におけるK409R置換を含む。

【0127】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、IgG1アイソタイプであり、野生型IgG1と比較して、抗体の第1の重鎖(HC1)におけるK409R置換及び抗体の第2の重鎖(HC2)におけるF405L置換を含む。

【0128】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、IgG4アイソタイプであり、野生型IgG4と比較して、HC1におけるS228P置換並びにHC2におけ

10

20

30

40

50

る S 2 2 8 P、F 4 0 5 L、及び R 4 0 9 K 置換を含む。

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、I g G 4 アイソタイプであり、野生型 I g G 4 と比較して、H C 1 における S 2 2 8 P、F 4 0 5 L、及び R 4 0 9 K 置換、並びに H C 2 における S 2 2 8 P 置換を含む。

【 0 1 3 0 】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、I g G 4 アイソタイプであり、野生型 I g G 4 と比較して、H C 1 における S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、及び L 2 3 5 A 置換、並びに H C 2 における S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、L 2 3 5 A、F 4 0 5 L、及び R 4 0 9 K 置換を含む。

10

【 0 1 3 1 】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、I g G 4 アイソタイプであり、野生型 I g G 4 と比較して、H C 1 における S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、L 2 3 5 A、F 4 0 5 L、及び R 4 0 9 K 置換、並びに H C 2 における S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、及び L 2 3 5 A 置換を含む。

【 0 1 3 2 】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、残基位置 3 5 0、3 6 6、3 6 8、3 7 0、3 9 9、4 0 5、4 0 7、又は 4 0 9 において H C 1 及び H C 2 における少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、6 つ、7 つ、又は 8 つの非対称置換を含み、残基の付番は E U インデックスに準拠する。

20

【 0 1 3 3 】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、残基位置 3 5 0、3 7 0、4 0 5、又は 4 0 9 において H C 1 及び H C 2 における少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、又は 4 つの非対称置換を含み、残基の付番は E U インデックスに準拠する。

【 0 1 3 4 】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、残基位置 4 0 5 又は 4 0 9 において H C 1 及び H C 2 における少なくとも 1 つの非対称置換を含み、残基の付番は E U インデックスに準拠する。

【 0 1 3 5 】

置換は、典型的には、標準方法を使用して抗体の定常ドメインなどの分子に対して D N A レベルで行われる。

30

【 0 1 3 6 】

本発明の抗体は、様々な周知の抗体形態に改変されてもよい。

【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、クロスボディである。

【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態では、本発明の二重特異性抗体としては、組換え I g G 様二重標的分子（分子の 2 つの側が各々、少なくとも 2 つの異なる抗体の F a b 断片又は F a b 断片の一部を含有する）、I g G 融合分子（完全長 I g G 抗体が、余分の F a b 断片又は F a b 断片の一部に融合される）、F c 融合分子（一本鎖 F v 分子又は安定化された二重特異性抗体が、重鎖定常ドメイン、F c 領域、又はその一部に融合される）、F a b 融合分子（異なる F a b 断片が 1 つに融合される）、S c F v 及びディアボディに基づく抗体及び重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）（異なる一本鎖 F v 分子又は異なる二重特異性抗体又は異なる重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）が、互いに融合するか、又は別のタンパク質若しくは担体分子に融合する）が挙げられる。

40

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、組換え I g G 様二重標的化分子としては、D u a l T a r g e t i n g (D T) - I g (G S K / D o m a n t i s)、T w o - i n - o n e A n t i b o d y (G e n e n t e c h)、及び m A b 2 (F - S t a r) が挙げられる。

【 0 1 4 0 】

50

いくつかの実施形態では、IgG融合分子としては、Dual Variable Domain (DVD) - Ig (Abbott)、Ts2Ab (MedImmune/AZ)、及びBsAb (Zymogenetics)、HERCULES (Biogen Idec)、並びにTvAb (Roche)が挙げられる。

【0141】

いくつかの実施形態では、Fc融合分子としては、ScFv/Fc Fusions (Academic Institution)、SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS)、及びDual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics)が挙げられる。

10

【0142】

いくつかの実施形態では、Fab融合二重特異性抗体としては、F(ab)₂ (Medarex/AMGEN)、Dual-Action or Bis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics)、Bivalent Bispecific (Biotecol)、及びFab-Fv (UCB-Celltech)が挙げられる。ScFv-、ディアボディに基づく抗体及びドメイン抗体としては、Bispecific T Cell Engager (BITE) (Micromet)、Tandem Diabody (Tandab) (Affimed)、Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics)、Single-chain Diabody (Academic)、TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics)、Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack)、及びCOMBODY (Epigen Biotech)、二重標的ナノボディ (dual targeting nanobody) (Ablynx)、二重標的重鎖のみのドメイン抗体 (dual targeting heavy chain only domain antibody)が挙げられる。様々なフォーマットの二重特異性抗体が、例えば、Chames and Baty (2009) Curr Opin Drug Disc Dev 12:276及びNunez-Prado et al., (2015) Drug Discovery Today 20(5):588-594に記載されている。

20

【0143】

表2は、本発明の二重特異性抗体を生成するために使用することができる、本明細書に記載の例示的なモノクローナル抗体をまとめたものである。

30

【0144】

【表 2】

表 2. 本発明の二重特異性抗体を生成するために使用することができる例示的なモノクローナル抗体

第1のドメイン	第2のドメイン			
	抗CD3	抗PSMA	抗CD33	抗IL1RAP
CD3B312	PSMB87	C33B760	IAPB3	
CD3B313	PSMB119	C33B777	IAPB9	
CD3B314	PSMB120	C33B778	IAPB17	
CD3B315	PSMB121	C33B782	IAPB23	
CD3B316	PSMB122	C33B792	IAPB25	10
CD3B317	PSMB123	C33B799	IAPB29	
CD3B337	PSMB124	C33B806	IAPB38	
CD3B373	PSMB126	C33B830	IAPB47	
CD3B376	PSMB127	C33B836	IAPB55	
CD3B389	PSMB129	C33B903	IAPB57	
CD3B450	PSMB130	C33B904	IAPB61	
CD3B467	PSMB344	C33B905	IAPB62	
	PSMB345	C33B907	IAPB63	
	PSMB346	C33B908	IAPB64	
	PSMB347		IAPB65	
	PSMB349			20
	PSMB358			
	PSMB359			
	PSMB360			
	PSMB361			
	PSMB362			
	PSMB363			
	PSMB365			

【0145】

二重特異性 T M E F F 2 × C D 3 分子を遺伝子操作するために使用することができる例示的な抗 T M E F F 2 抗体は、本明細書に記載されているものであり、これは、表 5 9、表 6 6 ~ 6 8 に提供される重鎖及び軽鎖可変領域配列を含むがこれらに限定されない重鎖及び軽鎖可変領域配列を含み得る。

【0146】

いくつかの実施形態では、抗 C D 3 抗体は、多重特異性抗体、例えば、C D 3 に特異的に結合する第 1 のドメインと第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 のドメインとを含む二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、第 2 の又は標的抗原は、免疫エフェクター細胞以外の標的細胞上で発現する細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、第 2 の抗原は、T A A である。例示的な T A A は、P S M A、C D 3 3、T M E F F 2、及び I L 1 R A P である。

【0147】

本発明は、C D 3 に特異的に結合する第 1 のドメインと、第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 のドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0148】

いくつかの実施形態では、第 1 のドメインは、それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、6 7 1、6 7 3、及び 6 9 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のドメインは、それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の V H 及び V L を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のドメインは、それぞれ配列番号 6 4 0 及び 6 7 6 の H C 及び L C を含む。いくつかの実施形態では、第 1 のドメインは、それぞれ配列番号 6 5 7 及び 6 7 8 の V H 及び V L を含む

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、第1のドメインは、それぞれ配列番号675及び677のHC及びLCを含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、第1のドメインは、それぞれ配列番号662、663、664、773、673、及び690のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。いくつかの実施形態では、第1のドメインは、それぞれ配列番号657及び678のVH及びVLを含む。いくつかの実施形態では、第1のドメインは、それぞれ配列番号675及び677のHC及びLCを含む。

【0150】

本発明は、また、治療において使用するための、本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む、二重特異性抗体を提供する。

10

【0151】

本発明は、また、細胞増殖性障害の治療において使用するための、本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む、二重特異性抗体を提供する。

【0152】

本発明は、また、癌の治療において使用するための、本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む、二重特異性抗体を提供する。

20

【0153】

本発明は、また、自己免疫疾患の治療において使用するための、本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む、二重特異性抗体を提供する。

【0154】

本発明は、また、癌を治療するための医薬の製造において使用するための、本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む、二重特異性抗体を提供する。

【0155】

本発明は、また、自己免疫障害を治療するための医薬の製造において使用するための、本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む、二重特異性抗体を提供する。

30

【0156】

本発明の更なる態様は、それを必要としている対象における細胞増殖性疾患又は自己免疫疾患を治療する方法であって、治療有効量の本発明の抗CD3抗体を当該対象に投与することを含む、方法である。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体は、約0.01mg/kg～約10mg/kgの投与量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体は、約0.1mg/kg～約10mg/kgの投与量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体は、約1mg/kgの投与量で対象に投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体は、皮下に、静脈内に、筋肉内に、局所的に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植によって、吸入によって、髄腔内に、脳室内に、又は鼻腔内に投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体は、皮下投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、又は本発

40

50

明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体は、静脈内投与される。

【0157】

前述の使用又は方法のいずれかにおいて、細胞増殖性疾患は癌である。いくつかの実施形態では、癌は、食道癌、胃癌、小腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、乳癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、B細胞リンパ腫、B細胞白血病、多発性骨髄腫、腎癌、前立腺癌、肝臓癌、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、神経膠芽腫、胚中心B細胞様（GCB）DLBCL、活性化B細胞様（ABC）DLBCL、濾胞性リンパ腫（FL）、マントル細胞リンパ腫（MCL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ性白血病（CLL）、辺縁帯リンパ腫（MZL）、小リンパ性白血病（SLL）、リンパ形質細胞性リンパ腫（LL）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症（WM）、中枢神経系リンパ腫（CNSL）、パーキットリンパ腫（BL）、B細胞性リンパ性白血病、脾臓辺縁帯リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、脾臓リンパ腫/白血病・分類不能型、脾臓びまん性赤血球小細胞型B細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病変異体、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、重鎖疾患、形質細胞骨髄腫、骨の孤立性形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、粘膜関連リンパ組織の節外性辺縁帯リンパ腫（MALTリンパ腫）、節性辺縁帯リンパ腫、小児節性辺縁帯リンパ腫、小児濾胞性リンパ腫、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫、T細胞/組織球豊富型大細胞型B細胞リンパ腫、CNSの原発性DLBCL、原発性皮膚DLBCL・下肢型、高齢者のEBV陽性DLBCL、慢性炎症に関連するDLBCL、リンパ腫様肉芽腫症、縦隔（胸腺）原発大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、ALK陽性大細胞型B細胞リンパ腫、形質芽球性リンパ腫、HHV8関連多中心性キャスルマン病において生じる大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫とパーキットリンパ腫との中間の特徴を有する分類不能B細胞リンパ腫、古典的ホジキンリンパ腫、及び軽鎖アミロイドーシスからなる群から選択される。

10

20

【0158】

いくつかの実施形態では、癌は、食道癌である。いくつかの実施形態では、癌は、腺癌、例えば、転移性腺癌（例えば、結腸直腸腺癌、胃腺癌、又は膵臓腺癌）である。

【0159】

前述の使用又は方法のいずれかにおいて、自己免疫障害は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑症（ITP）、血栓性血小板減少紫斑症（TTP）、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、IgA腎症、IgM多発ニューロパシー、重症筋無力症、血管炎、真性糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群、糸球体腎炎、視神経脊髄炎（NMO）、及びIgGニューロパシーからなる群から選択され得る。

30

【0160】

別の態様では、本発明は、(a)本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインを含む、前述の抗CD3抗体又は二重特異性抗体のいずれか1つを含む組成物と、(b)細胞増殖性障害を治療又は進行を遅延させるために対象に当該組成物を投与するための指示書を含む添付文書と、を含むキットを特徴とする。用語「添付文書」は、このような治療用製品の適応症、用法、投与量、投与、併用療法、禁忌、及び/又は使用に関する警告に関する情報を含む、治療用製品の市販のパッケージに通常的に含まれている指示書を指すために使用される。

40

【0161】

前述の使用又は方法のいずれかにおいて、対象はヒトであってよい。

【0162】

ポリヌクレオチド、ベクター、及び宿主細胞

また、本発明の抗CD3抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメインと第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインとを含む二重特異性抗体をコードしている、単離ポリヌクレオチドも開示される。本明細書で提供される可変ドメインをコード可

50

能な単離ポリヌクレオチドは、本発明の抗体又は抗原結合断片を産生するために同一の又は異なるベクターに含まれ得る。

【0163】

いくつかの実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、リーダー配列をコードしているポリヌクレオチドを含む。当技術分野において既知の任意のリーダー配列を利用することができる。リーダー配列をコードしているポリヌクレオチドは、制限エンドヌクレアーゼ切断部位又は翻訳開始部位を含み得る。

【0164】

本発明のポリヌクレオチドを含むベクターも提供される。ベクターは、発現ベクターであり得る。発現ベクターは、1つ以上の追加配列を含有してもよい。この追加配列には、例えば、制御配列（例えば、プロモータ、エンハンサー）、選択マーカー、及びポリアデニル化シグナルが挙げられるが、これらに限定されない。広い各種の宿主細胞を形質転換するためのベクターは公知であり、プラスミド、ファージミド、コスミド、バキュロウイルス、バクミド、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、並びに、他の細菌、酵母、及びウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0165】

本明細書の範囲内にある組換え発現ベクターは、好適な制御エレメントに操作可能に連結することができる少なくとも1つの組換えタンパク質をコードしている合成又はcDNA由来の核酸断片を含む。このような調節エレメントとしては、転写プロモータ、好適なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終了を制御する配列を挙げることができる。発現ベクター、特に、哺乳類の発現ベクターはまた、1つ以上の非転写エレメント、例えば、複製の起点、発現される遺伝子に連結された好適なプロモータ及びエンハンサー、他の5'又は3'フランキング非転写配列、5'又は3'非翻訳配列（例えば、必須リボソーム結合部位）、ポリアデニル化部位、スプライドナー及びアクセプター部位、又は転写終了配列を含んでもよい。宿主において複製する能力を付与する複製の起点もまた包含されてもよい。

20

【0166】

脊椎動物細胞を形質転換するのに使用される発現ベクター中の転写及び翻訳制御配列は、ウイルス資源により提供することができる。例示的なベクターは、Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)に記載されたように構築されてもよい。Biol. 280 (1983)。

30

【0167】

いくつかの実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントのコード配列は、強力な構成的プロモータ、例えば、下記遺伝子：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ベータアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン等のためのプロモータの制御下に置かれる。加えて、多くのウイルスプロモータが、真核細胞中で恒常的に機能し、記載された実施形態での使用に適している。このようなウイルスプロモータとしては、サイトメガロウイルス（CMV）中間初期プロモータ、SV40の初期及び後期プロモータ、マウス乳癌ウイルス（MMTV）プロモータ、モロニー白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、エプスタインバーウイルス（EBV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、及び他のレトロウイルスの長末端反復配列（LTR）、並びに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、PSMA特異性抗体又はその抗原結合断片のコード配列は、誘導性プロモータ、例えば、メタロチオネインプロモータ、テトラサイクリン誘導性プロモータ、ドキシサイクリン誘導性プロモータ、1つ以上のインターフェロン刺激応答エレメント（ISRE）、例えば、プロテインキナーゼR2', 5'-オリゴアデニレート合成酵素、Mx遺伝子、ADAR1などを含有するプロモータの制御下に置かれる。

40

【0168】

本明細書に記載されたベクターは、1つ以上の配列内リボソーム進入部位（IRES）

50

を含有してもよい。IRES配列の融合ベクター内への包含は、一部のタンパク質の発現を増強させるのに有益であり得る。いくつかの実施形態では、ベクター系は、1つ又は2つ以上のポリアデニル化部位（例えば、SV40）を含むこととなる。この部位は、前述の核酸配列のうちのいずれかの上流又は下流にあってもよい。ベクターの成分は、近接して連結されてもよく、又は遺伝子産物を発現させるのに最適な間隔を提供するように（すなわち、ORF間に「スペーサー」ヌクレオチドを導入することにより）配置されてもよく、若しくは別の方法で位置付けられてもよい。調節エレメント、例えば、IRESモチーフはまた、発現に最適な間隔を提供するように配置されてもよい。

【0169】

ベクターは、当技術分野において既知の選択マーカースを含んでもよい。選択マーカースとしては、陽性及び陰性選択マーカース、例えば、抗生物質抵抗性遺伝子（例えば、ネオマイシン抵抗性遺伝子、ヒグロマイシン抵抗性遺伝子、カナマイシン抵抗性遺伝子、テトラサイクリン抵抗性遺伝子、ペニシリン抵抗性遺伝子）、グルタミン酸合成酵素遺伝子、ガンシクロビル選択用のHSV-TK、HSV-TK誘導体、又は6-メチルプリン選択用の細菌のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子（Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)）が挙げられる。（余白）選択マーカースをコードする核酸配列又はクローニング部位は、対象となるポリペプチドをコードする核酸配列又はクローニング部位の上流又は下流にあってもよい。

10

【0170】

本明細書に記載されたベクターを使用して、記載された抗体又は抗原結合フラグメントをコードする遺伝子により種々の細胞を形質転換することができる。例えば、ベクターは、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、抗TMEFF2、若しくは抗IL1RAP抗体、又は抗原結合断片を産生する細胞を生成するために使用され得る。したがって、本発明は、本発明のベクターを含む、宿主細胞も提供する。

20

【0171】

外来遺伝子を細胞内に導入するための数多くの手法が、当技術分野において既知であり、本明細書に記載され例示された種々の実施形態に従って、記載された方法を行う目的で組換え細胞を作成するのに使用することができる。使用される手法は、異種遺伝子配列が細胞の子孫により遺伝及び発現可能であり、かつレシピエント細胞に必須の成育及び生理学的機能を損なうことのないよう、異種遺伝子配列を宿主細胞に安定して導入するものである必要がある。使用することができる手法としては、染色体導入法（例えば、細胞融合、染色体媒介性遺伝子導入、マイクロ細胞媒介性遺伝子導入）、物理的方法（例えば、トランスフェクション、スフェロプラスト融合、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム担体）、ウイルスベクター導入（例えば、組換えDNAウイルス、組換えRNAウイルス）等が挙げられる（Clinic, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)）に記載）が、これらに限定されない。Ther. 69-92 (1985)）。哺乳類細胞による細菌プロトプラストのリン酸カルシウム沈殿及びポリエチレングリコール（PEG）誘導融合を使用してもまた、細胞を形質転換することができる。

30

【0172】

本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片の発現に使用するのに好適な細胞は、好ましくは、真核細胞、より好ましくは、植物、げっ歯類、又はヒト起源の細胞であり、例えば、特にNSO、CHO、CHOK1、perC.6、Tk-ts13、BHK、HEK293細胞、COS-7、T98G、CV-1/EBNA、L細胞、C127、3T3、HeLa、NS1、Sp2/0骨髓腫細胞、及びBHK細胞株であるが、これらに限定されない。加えて、抗体の発現は、ハイブリドーマ細胞を使用して達成されてもよい。ハイブリドーマを生成するための方法は、当該技術分野において十分確立されている。

40

【0173】

本発明の発現ベクターで形質転換された細胞を、本発明の抗体又は抗原結合断片の組換え発現について選択又はスクリーニングしてよい。組換え陽性細胞は、タンパク質改変又

50

は変化させた翻訳後修飾により、所望の表現型、例えば、高レベルの発現、向上した増殖特性、又は所望の生化学的特性を有するタンパク質を生成する能力を示すサブクローンについて、増殖され、スクリーニングされる。これらの表現型は、所与のサブクローンの本来の特性又は変異によるものであり得る。変異は、化学薬品、UV波長光、照射、ウイルス、挿入変異源、DNAミスマッチ修復の阻害、又はこのような方法の組み合わせにより生じ得る。

【0174】

医薬組成物 / 投与

本発明は、本発明の抗体と、薬学的に許容できる担体と、を含む、医薬組成物も提供する。治療用途では、本発明の抗体は、薬学的に許容できる担体中に活性成分として有効量の抗体を含有する医薬組成物として調製することができる。「担体」は、本発明の抗体と共に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、又はビヒクルを指す。このようなビヒクルは、水、及び石油、動物、植物、又は合成物由来のものを含む油、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの液体であってよい。例えば、0.4%生理食塩水及び0.3%グリシンを用いてよい。これらの溶液は滅菌され、概して粒子状物質を含まない。これらは、従来周知の滅菌技術（例えば、濾過）によって滅菌することができる。組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容できる補助物質、例えば、pH調整剤及び緩衝剤、安定剤、増粘剤、潤滑剤及び着色剤などを含有し得る。このような医薬製剤中の本発明の抗体の濃度は、約0.5重量%未満から通常少なくとも約1重量%まで、最大で15又は20重量%まで変動し得、また、選択される具体的な投与方法に従って、必要とされる用量、流体体積、粘度などに主に基づいて選択され得る。好適なビヒクル及び製剤（他のヒトタンパク質、例えばヒト血清アルブミンを含む）は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691 - 1092に記載されており、特にpp. 958 - 989を参照されたい。

10

20

【0175】

本発明の抗体を治療的に使用するための投与方法は、例えば、錠剤、カプセル剤、液剤、粉剤、ゲル、粒子の、注射器、埋め込み式装置、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプに入れられた製剤を使用する非経口投与、例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、又は皮下、肺内、経粘膜（経口、鼻腔内、膣内、直腸）投与；又は当該技術分野において周知の、当業者によって認識される他の手段であり得る。部位特異的投与は、例えば、腫瘍内、関節内、気管支内、腹内、関節包内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎臓内、網膜内、脊髄内、滑液嚢内、胸郭内、子宮内、血管内、膀胱内、病巣内、膣内、直腸内、口腔内、舌下、鼻腔内、又は経皮送達によって達成され得る。

30

【0176】

本発明の抗体は、任意の好適な経路によって、例えば、静脈内（i.v.）注入若しくはボーラス注射によって非経口的に、筋肉内に、又は皮下に、又は腹腔内に、対象に投与してよい。i.v.注入は、例えば、15、30、60、90、120、180若しくは240分間、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11若しくは12時間にわたって投与され得る。

40

【0177】

対象に与えられる用量は、治療される疾患を緩和するか又は少なくとも部分的に停止させるのに十分（「治療有効量」）であり、時には、0.005mg～約100mg/kg、例えば、約0.05mg～約30mg/kg、若しくは約5mg～約25mg/kg、又は約4mg/kg、約8mg/kg、約16mg/kg、若しくは約24mg/kg、又は、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9若しくは10mg/kgであってよい

50

が、更により高い量、例えば、約15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、40、50、60、70、80、90、又は100mg/kgであってもよい。

【0178】

例えば、50、100、200、500、若しくは1000mgの一定の単位用量を与えてもよく、又は用量は、患者の表面積に基づいて、例えば、500、400、300、250、200、若しくは100mg/m²であってもよい。通常、1~8用量（例えば、1、2、3、4、5、6、7、又は8）が患者を治療するために投与されるが、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、又はそれよりも多い用量を与えてもよい。

10

【0179】

本発明の抗体の投与は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、1ヶ月、5週間、6週間、7週間、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月後に、又はそれ以上後に繰り返すことができる。治療過程を繰り返してもよく、長期にわたる投与も同様に可能である。繰り返し投与は、同一用量であっても異なる用量であってもよい。例えば、本明細書に記載される本発明の抗体は、静脈内注入によって、8週間にわたって1週間間隔で8mg/kg又は16mg/kgで投与し、続いて、更に16週間にわたって2週間ごとに8mg/kg又は16mg/kgで投与し、続いて、4週間ごとに8mg/kg又は16mg/kgで投与してよい。

【0180】

例えば、本明細書に記載の方法における抗体は、単回投与、又は24、12、8、6、4若しくは2時間ごとの分割投与、又はこれらの任意の組み合わせを使用して、約0.1~100mg/kg、例えば、1日あたり0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90、又は100mg/kgの量の1日投薬量として、治療開始後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39又は40日目のうちの少なくとも1日に、あるいは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20週目のうちの少なくとも1週に、あるいはこれらの任意の組み合わせで提供され得る。

20

30

【0181】

また、本明細書に記載の方法における抗体は、癌の発現リスクを低下させる、癌の進行における事象の発生の開始を遅延させる、及び/又は癌が寛解したときの再発リスクを低下させるために予防的に投与されてもよい。

【0182】

本明細書に提供される抗体を、保存のために凍結乾燥し、使用前に好適な担体で再構成してもよい。この技術は、従来のタンパク質調製物に関して効果的であることが示されており、周知の凍結乾燥及び再構成技術を用いることができる。

40

【0183】

CD3、PSMA、CD33、IL1RAP、TMEFF2、又は標的抗原及びCD3を検出する方法

サンプル中のCD3、PSMA、CD33、TMEFF2、又はIL1RAPを検出する方法であって、サンプルを得ることと、当該サンプルを本発明の抗CD3、抗PSMA、抗CD33、抗TMEFF2、又は抗IL1RAP抗体と接触させることと、当該サンプル中のCD3、PSMA、CD33、TMEFF2、又はIL1RAPに結合した抗体を検出することと、を含む、方法が本明細書に提供される。

【0184】

更に、サンプル中のCD3及び第2の抗原（例えば、PSMA、CD33、TMEFF

50

2、又はIL1RAP)を検出する方法であって、サンプルを得ることと、当該サンプルを、CD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインを含む二重特異性抗体と接触させることと、当該サンプル中のCD3及び当該第2の抗原に結合した抗体を検出することと、を含む、方法が提供される。

【0185】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞(すなわち、遊離細胞)、組織(例えば、外科的に切除された腫瘍組織、穿刺吸引を含む生検)、組織学的調製物などに由来してよい。

【0186】

本発明の抗体は、既知の方法を使用して検出することができる。例示的な方法としては、蛍光若しくは化学発光標識、又は放射線標識を使用して抗体を直接標識すること、あるいは本発明の抗体に、ビオチン、酵素、又はエピトプタグなどの容易に検出可能な部分を結合させることが挙げられる。例示的な標識及び部分は、ルテニウム、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びベータガラクトシダーゼ、ポリ-ヒスチジン(HISタグ)、アクリジン染料、シアニン染料、フルオロン染料、オキサジン染料、フェナントリジン染料、ローダミン染料、及びAlexafluor(登録商標)染料である。

【0187】

本明細書で提供される抗体は、サンプル中のCD3、PSMA、CD33、IL1RAP、TMEFF2、又はCD3、及び第2の抗原を検出するために、様々なアッセイで使用することができる。例示的なアッセイは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散、電気化学発光(ECL)イムノアッセイ、免疫組織化学的検査、蛍光活性化細胞選別(FACS)、又はELISAアッセイである。

【0188】

抗体キット

本発明はまた、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、抗TMEFF2、若しくは抗IL1RAP抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原若しくはその抗原結合断片に特異的に結合する第2のドメインを含む二重特異性抗体、又はこれらの抗原結合断片のうちの一つ以上を含む、キットも提供する。記載されるキットは、抗CD3、抗PSMA、抗CD33、抗TMEFF2、若しくは抗IL1RAP抗体、又は本発明のCD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインを含む二重特異性抗体を使用する方法、あるいは当業者に公知の他の方法を実行するために使用することができる。いくつかの実施形態では、記載されるキットは、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片と、生体サンプル中のCD3、又はPSMA、CD33、IL1RAP、TMEFF2などの第2の抗原の存在の検出において使用するための試薬とを含んでいてよい。したがって、記載されるキットは、本明細書に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、及び使用していないときに抗体若しくは断片を収容しておくための容器、抗体若しくは断片の使用説明書、固体支持体に固定された抗体若しくは断片、及び/又は本明細書に記載の抗体若しくは断片の検出可能に標識された形態のうちの一つ以上を含んでいてよい。

【0189】

本発明は、また、PSMAに特異的に結合する本明細書に記載の抗体を含む、キットも提供する。本発明は、また、CD33に特異的に結合する本明細書に記載の抗体を含む、キットも提供する。本発明は、また、IL1RAPに特異的に結合する本明細書に記載の抗体を含む、キットも提供する。本発明は、また、TMEFF2に特異的に結合する本明細書に記載の抗体を含む、キットも提供する。

【0190】

10

20

30

40

50

キットは、治療的使用のために、及び診断キットとして使用することができる。

【0191】

キットは、生体サンプル中のCD3、PSMA、CD33、IL1RAP、TMEFF2、及び/又は第2の抗原の存在を検出するために使用され得る。

【0192】

いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の本発明の抗体と、当該抗体を検出するための試薬とを含む。キットは、使用説明書；他の試薬、例えば、標識、治療薬、又はキレート化若しくは別の方法のカップリングに有用な剤、標識若しくは治療薬に対する抗体、又は放射線防護組成物；投与するために当該抗体を調製するための装置又は他の材料；薬学的に許容できる担体、及び対象に投与するためのデバイス又は他の材料を含む、1つ以上の他の構成要素を含み得る。

10

【0193】

いくつかの実施形態では、キットは、容器内の本発明の抗体と、キットの使用説明書とを含む。

【0194】

いくつかの実施形態では、キットにおける抗体は標識されている。

【0195】

CD3特異性抗体

単離抗CD3抗体が本明細書に記載される。本発明の抗CD3抗体は、ヒトCD3及び任意選択でカニクイザルCD3に結合する。いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体及びその断片は、互いの5倍以内の親和性でヒト及びカニクイザルCD3に結合する。換言すれば、抗体結合の差は、5倍未満である。この場合、本発明の抗CD3抗体は、霊長類におけるCD3の安全性、活性、及び/又は薬物動態プロファイルの前臨床評価のため、並びに、ヒトにおいて薬物として使用することができる。換言すれば、同じCD3特異性分子を、前臨床動物試験並びにヒトにおける臨床試験において使用することができる。このヒト/カニクイザル交差反応性は、種特異的な代替分子と比較して高度に同等の結果及び動物試験の予測力の大きな増大をもたらす。いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体及びその断片は、CD3e/dサブユニットによって形成されるエピトープに結合する。CD3特異性抗体は、ヒトであっても、ヒト化されていても、又はキメラであってもよい。また、OmniRat (Open Monoclonal Technologies (「OMT」)、Palo Alto, California, USA, omniab.com) で生成されたヒト抗体も本明細書に例示される。

20

30

【0196】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、抗CD3抗体又はその断片は、以下の特性のうちの一つ、二つ、三つ、四つ、又は五つを有する：

a) 20 nM以下の計算EC50でヒト及びカニクイザルのCD3+Tリンパ球に結合し、40 nM以下の計算EC50でカニクイザルCD3発現HEK細胞に結合し、CD3+Tリンパ球への結合とカニクイザルCD3発現HEK細胞への結合との間の計算EC50の差は5倍未満であり、計算EC50は、フローサイトメトリーを使用して0で全細胞結合アッセイで測定される；

40

b) 12 nM以下の平衡解離定数(K_D)でヒト由来の組換えCD3d(配列番号691)に結合、又はヒト由来の組換えCD3e(配列番号636)に結合、又はカニクイザル由来の組換えCD3e(配列番号693)に結合し、 K_D は、+25でProteon表面プラズモン共鳴アッセイProteOn XPR36システムを使用して測定される；

c) ペプチドマッピング分析により検出したとき、メチオニンの酸化モトリプトファンの酸化も示さない、又はアスパラギンの脱アミドを示さない、又はアスパラギンの異性化を示さない；

d) X線結晶解析により決定したとき、CD3eの残基1~6に結合する；又は

e) 蛍光活性化細胞選別アッセイによって決定したとき、cOKT3又はSP34-2

50

と同様の程度まで、T細胞を活性化するか又はCD69発現を誘導する。

【0197】

本発明の抗CD3抗体及びその断片は、フローサイトメトリーによって決定したとき、約5nM～約1000nM、好ましくは約5nM～約50nM、約50nM～約100nM、約100nM～約200nM、約200nM～約300nM、約300nM～約400nM、約400nM～約500nM、約500nM～約600nM、約600nM～約700nM、約700nM～約800nM、約800nM～約900nM、及び約900nM～約1000nM、より好ましくは約5nM～約300nMである、ヒトCD3を発現しているヒトT細胞に対するインビトロ結合親和性(K_d)を有する。

【0198】

いくつかの態様では、本発明の抗CD3抗体及びその断片は、フローサイトメトリーによって決定したとき、約5nM～約1000nM、好ましくは約5nM～約50nM、約50nM～約100nM、約100nM～約200nM、約200nM～約300nM、約300nM～約400nM、約400nM～約500nM、約500nM～約600nM、約600nM～約700nM、約700nM～約800nM、約800nM～約900nM、及び約900nM～約1000nM、より好ましくは約5nM～約300nM、最も好ましくは約100nMである、ヒトCD3を発現しているヒトT細胞に対するインビトロ結合親和性(K_d)を有する二価抗体である。

【0199】

いくつかの態様では、本発明の抗CD3抗体及びその断片は、フローサイトメトリーによって決定したとき、約5nM～約1000nM、好ましくは約5nM～約50nM、約50nM～約100nM、約100nM～約200nM、約200nM～約300nM、約300nM～約400nM、約400nM～約500nM、約500nM～約600nM、約600nM～約700nM、約700nM～約800nM、約800nM～約900nM、及び約900nM～約1000nM、より好ましくは約100nM～約250nM、最も好ましくは約250nMである、ヒトCD3を発現しているヒトT細胞に対するインビトロ結合親和性(K_d)を有する一価コンストラクトである。

【0200】

一態様では、本明細書に記載の抗CD3抗体及びその断片は、フローサイトメトリーを使用して測定された初代ヒトT細胞に対してAlexaFluor488コンジュゲートSP34-2抗体を使用する競合結合アッセイによって決定したとき、CD3の結合について市販のCD3抗体SP34-2(BD Biosciences 551916)と競合する。

【0201】

一態様では、抗CD3抗体及びその断片は、ペプチドマッピングによって決定したとき、翻訳後修飾を示さず、例えば、酸化を示さず、脱アミドを示さず、及びアスパラギン酸の異性化を示さない。

【0202】

一態様では、抗CD3抗体及びその断片は、フローサイトメトリーを用いたT細胞ベースのアッセイによって決定したとき、ヒト及びカニクイザルT細胞におけるSP34-2並びにヒトT細胞におけるcOKT3と同様の程度までT細胞を活性化し、CD69発現を誘導するのに効果的である。

【0203】

一態様では、本明細書に記載の抗CD3抗体及びその断片は、約400kcal/mol以上、約410kcal/mol以上、約420kcal/mol以上、約430kcal/mol以上、約440kcal/mol以上、約45kcal/mol以上、約460kcal/mol以上、約470kcal/mol以上、約480kcal/mol以上、約490kcal/mol以上、約500kcal/mol以上、約510kcal/mol以上、約520kcal/mol以上、約530kcal/mol以上、約540kcal/mol以上、又は約550kcal/mol以上のアンフォールディング

10

20

30

40

50

の全エンタルピーを有する。特定の態様では、本発明の抗CD3抗体及びその断片は、約418 kcal/mol、545 kcal/mol、約402 kcal/mol、又は約406 kcal/molのアンフォールディングの全エンタルピーを有し、抗CD3抗体は、それぞれ、CD3B376 (IgG4 PAA)、CD3B450 (IgG4 PAA)、CD3B389 (IgG1)、及びCD3B467 (IgG1)分子である。

【0204】

例示的なこのような抗体としては、CD3B311、CD3B312、CD3B313、CD3B314、CD3B315、CD3B316、CD3B317、CD3B334、CD3B376、CD3B389、CD3B450、並びに一価フォーマットに遺伝子操作されたCD3B467及びCD3B376及びCD3B450が挙げられる。

10

【0205】

本発明の抗CD3抗体又は抗原結合断片は、様々な形態で存在することができるが、表7Aに示されている抗体可変ドメインセグメント又はCDR、及びその遺伝子操作された変異体、例えば、表9及び表10、並びにそれに付随する説明に示されているか又は記載されているもののうちの1つ以上を含む。

【0206】

本発明は、また、表7Bに記載の抗体のいずれか1つのHC DR1、HC DR2、及びHC DR3を含む重鎖を含む、抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。本発明は、また、表7Bに記載の抗体のいずれか1つのHC DR1、HC DR2、及びHC DR3を含む重鎖と、表7Bに記載の抗体のいずれか1つのLC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む軽鎖と、を含む、抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、表7Bに記載の抗体のいずれか1つのHC DR1、HC DR2、及びHC DR3を含む重鎖と、表7Bに記載の抗体のいずれか1つのLC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む軽鎖と、を含む抗体又はその抗原結合断片と、CD3に対する結合について競合する。

20

【0207】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、配列番号651、652、653、654、655、687、又は656の重鎖可変領域(VH)に含有されているHC DR1、HC DR2、及びHC DR3を含み、当該HC DR1、HC DR2、及びHC DR3は、Chothia、Kabata、又はIMGTによって定義される。

30

【0208】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、配列番号658、659、694、660、688、又は661の軽鎖可変領域(VL)に含有されているLC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含み、当該LC DR1、LC DR2、及びLC DR3は、Chothia、Kabata、又はIMGTによって定義される。

【0209】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、以下を含む：

- 配列番号662、665、又は666のHC DR1；
- 配列番号663、689、又は695のHC DR2；
- 配列番号664のHC DR3。

40

【0210】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、以下を含む：

- 配列番号773、710、674又は671のLC DR1；
- 配列番号669又は673のLC DR2；
- 配列番号670のLC DR3。

【0211】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、以下を含む

50

:

配列番号 662、665、又は 666 の HCDR1；
 配列番号 663、689、又は 695 の HCDR2；
 配列番号 664 の HCDR3；
 配列番号 773、710、674 又は 671 の LCDR1；
 配列番号 669 又は 673 の LCDR2；
 配列番号 670 の LCDR3。

【0212】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、以下の HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 を含む：

10

それぞれ、配列番号 662、663、及び 664；
 それぞれ、配列番号 662、695、及び 664；
 それぞれ、配列番号 665、663、及び 664；
 それぞれ、配列番号 665、695、及び 664；
 それぞれ、配列番号 662、689、及び 664；
 それぞれ、配列番号 666、663、及び 664；
 それぞれ、配列番号 666、695、及び 664；
 それぞれ、配列番号 665、689、及び 664；又は
 それぞれ、配列番号 666、689、及び 664。

【0213】

20

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、以下の LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む：

それぞれ、配列番号 773、669、及び 670；
 それぞれ、配列番号 773、673、及び 670；
 それぞれ、配列番号 710、673、及び 670；
 それぞれ、配列番号 674、673、及び 670；
 それぞれ、配列番号 671、673、及び 690；
 それぞれ、配列番号 773、673、及び 690；
 それぞれ、配列番号 671、669、及び 670；又は
 それぞれ、配列番号 776、673、及び 670。

30

【0214】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、663、664、773、669、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0215】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、663、664、773、673、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0216】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、663、664、671、669、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

40

【0217】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、663、664、671、673、及び 690 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0218】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、695、664、773、669、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

50

【0219】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号662、695、664、773、673、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0220】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号662、695、664、671、669、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0221】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号662、695、664、671、673、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

10

【0222】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、663、664、773、669、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0223】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、663、664、773、673、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

20

【0224】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、663、664、671、669、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0225】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、663、664、671、673、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0226】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、695、664、773、669、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

30

【0227】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、695、664、773、673、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0228】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、695、664、776、669、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

40

【0229】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号665、695、664、776、673、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0230】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号666、663、664、773、669、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む。

【0231】

いくつかの実施形態では、本発明の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配

50

列番号 666、663、664、773、673、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 666、663、664、776、669、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0233】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 666、663、664、671、673、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

10

【0234】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 666、695、664、773、669、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0235】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 666、695、664、773、673、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0236】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 666、695、664、671、669、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

20

【0237】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 666、695、664、671、673、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0238】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、689、664、671、673、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

30

【0239】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、663、664、710、673、及び 670 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0240】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、663、664、671、673、及び 690 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0241】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、それぞれ配列番号 662、663、664、773、673、及び 690 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

40

【0242】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合断片の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 709、640、641、642、643、675、若しくは 644 の重鎖 (HC) 配列、及び / 又は配列番号 645、716、649、676、677、若しくは 650 の軽鎖 (LC) 配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合断片の抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 709、640、641、642、643、675、又は 644 と少なくとも 85%、好ましくは 90%、より好ましくは 95% 以上、例えば 95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一のポリペプチド配列を有す

50

るHC、及び配列番号645、716、649、676、677、又は650と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%以上、例えば95%、96%、97%、98%、又は99%同一のポリペプチド配列を有するLCを含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合断片の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、配列番号709、640、641、642、643、675、又は644と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%以上、例えば95%、96%、97%、98%、又は99%同一のポリペプチド配列を有するHC、及び配列番号645、716、649、676、677、又は650と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%以上、例えば95%、96%、97%、98%、又は99%同一のポリペプチド配列を有するLCを含み、CDR領域に配列の変動は存在しない。

10

【0243】

いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合断片の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、配列番号651、652、657、653、654、655、687、若しくは656の重鎖可変領域(VH)配列、及び/又は配列番号658、659、694、660、688、678、若しくは661の軽鎖可変領域(VL)配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合断片の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、配列番号651、652、657、653、654、655、687、又は656と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%以上、例えば95%、96%、97%、98%、又は99%同一のポリペプチド配列を有するVH、及び配列番号658、659、694、660、688、678、又は661と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%以上、例えば95%、96%、97%、98%、又は99%同一のポリペプチド配列を有するVLを含む。いくつかの実施形態では、本発明の抗原結合断片の抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、配列番号651、652、657、653、654、655、687、又は656と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%以上、例えば95%、96%、97%、98%、又は99%同一のポリペプチド配列を有するVH、及び配列番号658、659、694、660、688、678、又は661と少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%以上、例えば95%、96%、97%、98%、又は99%同一のポリペプチド配列を有するVLを含み、CDR領域に配列の変動は存在しない。

20

【0244】**P S M A 特異性抗体**

P S M A に結合する抗体及びその断片は、チンパンジー標的抗原に結合する。一実施形態では、抗体及びその断片は、互いの5倍以内の親和性でヒト及びマカクP S M A 標的抗原に結合する。換言すれば、抗体結合の差は、5倍未満である。この場合、同一抗体分子は、霊長類におけるP S M A の安全性、活性、及び/又は薬物動態プロファイルの前臨床評価のため、並びに、ヒトにおいて薬物として使用することができる。換言すれば、同じP S M A 特異性分子を、前臨床動物試験並びにヒトにおける臨床試験において使用することができる。これは、種特異的な代替分子と比較して高度に同等の結果及び動物試験の予測力の大きな増大をもたらす。P S M A ドメインは、種間特異的、すなわち、ヒト及びマカク抗原と反応性であるため、本発明の抗体又はその断片は、霊長類におけるこれらの結合ドメインの安全性、活性、及び/又は薬物動態プロファイルの前臨床評価のため、そして、同一形態で、ヒトにおいて薬物として使用することができる。

30

40

【0245】

本発明は、また、P S M A に特異的に結合する多重特異性抗体を提供する。本発明によれば、二重特異性、すなわち二機能性抗体を使用して、2つの異なる治療標的を会合させるか、又は2つの異なる機能を発揮させることができる。このような抗体を使用して、免疫エフェクター細胞、例えばT-又はNK-細胞を特定の標的細胞に向かって動員することができる。様々な抗体断片に基づく分子は、公知であり、例えば癌治療のために研究中である。

【0246】

50

本発明は、また、P S M A × 「エフェクター抗原」二重特異性抗体も提供する。一実施形態では、P S M A × 「エフェクター抗原」二重特異性抗体のエフェクター抗原は、C D 3である。同一分子を、前臨床動物試験、並びに臨床試験、更にはヒトにおける治療において使用することができる、P S M A × C D 3二重特異性抗体を生成することが可能であることが本発明で見出された。これは、それぞれヒトP S M A及びヒトC D 3への結合に加えて、チンパンジー及びマカクの抗原のホモログにも結合する、P S M A × C D 3二重特異性抗体の同定による。本発明のP S M A × C D 3二重特異性抗体は、癌を含むがこれらに限定されない様々な疾患に対する治療剤として使用することができる。上記に鑑みて、系統的に（ヒトから）遠い種において試験するための代替標的P S M A × C D 3二重特異性抗体を構築する必要がなくなる。結果として、同一分子を、臨床試験においてヒト

10

20

30

40

50

【0247】

本明細書に記載のいくつかの実施形態では、P S M Aに特異的に結合する単離抗体又はその抗体断片は、以下の特性のうちの1つ、2つ、3つ、4つ、又は5つを有する：

a . 2 5 n M以下の平衡解離定数 (K_D) でチンパンジーP S M A細胞外ドメイン (E C D) に結合し、K_Dは、+ 2 5 でP r o t e o n X P R 3 6システムを使用して測定される、

b . 2 0 n M以下の計算E C 5 0でL N C a P細胞に結合し、4 0 n M以下の計算E C 5 0でカニクイザルP S M A発現H E K細胞に結合し、L N C a P細胞への結合とカニクイザルP S M A発現H E K細胞への結合との間の計算E C 5 0の差は5倍未満であり、計算E C 5 0は、フローサイトメトリーを使用して0 で全細胞結合アッセイにおいて測定される、

c . 1 2 n M以下の平衡解離定数 (K_D) でヒト (配列番号5 5)、チンパンジー (配列番号5 2)、及びカニクイザル (配列番号5 3) 由来の組換えP S M A E C Dに結合し、K_Dは、+ 2 5 でP r o t e o n表面プラズモン共鳴アッセイP r o t e o n X P R 3 6システムを使用して測定される、

d . 抗C D 3抗体と二重特異性抗体において対になったときに、L N C a P細胞、C 4 2細胞、ヒトP S M A発現H E K細胞、若しくはカニクイザルP S M A発現H E K細胞のT細胞媒介性殺傷を示し、当該T細胞媒介性殺傷は、クロム - 5 1若しくはカスパーゼ3 / 7活性化アッセイによって測定される、又は

e . 配座エピトープを認識し、当該エピトープは、ヒトP S M A (配列番号5 1) の残基I 1 3 8、F 2 3 5、P 2 3 7、G 2 3 8、D 2 4 4、Y 2 9 9、Y 3 0 0、Q 3 0 3、K 3 0 4、E 3 0 7、及びK 3 2 4 - P 3 2 6で構成される

【0248】

例示的なこのような抗体又はその断片は、本明細書に記載のP S M A抗体P S M B 1 1 9、P S M B 1 2 0、P S M B 1 2 1、P S M B 1 2 2、P S M B 1 2 3、P S M B 8 7、P S M B 1 2 6、P S M B 1 2 7、P S M B 1 2 8、P S M B 1 2 9、P S M B 1 3 0、P S M B 1 2 0、P S M B 1 2 1、P S M B 1 2 2、P S M B 1 2 3、P S M B 1 2 7、P S M B 1 2 8、P S M B 1 3 0、P S M B 3 4 4、P S M B 3 4 5、P S M B 3 4 6、P S M B 3 4 7、P S M B 3 4 9、P S M B 3 5 8、P S M B 3 5 9、P S M B 3 6 0、P S M B 3 6 1、P S M B 3 6 2、P S M B 3 6 3、及びP S M B 3 6 5である。

【0249】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のP S M Aに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号5 6、5 7、5 8、5 9、6 0、及び6 1のH C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3を含む。

【0250】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のP S M Aに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号6 2、6 3、6 4、6 5、6 0、及び6 6のH C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3を含む。

【0251】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号67、68、69、70、71、及び72のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0252】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号73、74、75、76、60、及び61のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0253】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号78、79、80、81、82、及び83のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

10

【0254】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号84、85、86、87、60、及び88のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0255】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号89、90、91、92、93、及び94のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

20

【0256】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号95、96、97、65、60、及び66のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0257】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号84、98、99、100、82、及び101のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0258】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号89、90、102、103、104、及び105のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

30

【0259】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号89、90、106、103、104、及び105のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0260】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号107、108、109、76、60、及び88のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

40

【0261】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号78、1、80、81、82、及び83のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0262】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号78、1、80、81、82、及び83のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む。

【0263】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明のPSMAに特異的に結合

50

する抗体は、それぞれ配列番号 78、1、80、4、82、及び 686 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0264】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、1、80、81、792、及び 686 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0265】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、2、80、81、82、及び 83 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

10

【0266】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、3、80、81、82、及び 5 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0267】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、3、80、81、82、及び 83 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0268】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、3、80、4、82、及び 686 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

20

【0269】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、3、80、81、792、及び 686 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0270】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、2、81、81、82、及び 5 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

30

【0271】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、2、80、4、792、及び 686 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0272】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、2、80、4、792、及び 686 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

【0273】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、それぞれ配列番号 78、683、80、81、792、及び 686 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む。

40

【0274】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、配列番号 6、7、8、110、112、114、116、118、120、121、123、125、126、128、130、又は 681 の重鎖可変領域 (VH) を含む。本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、配列番号 9、111、113、115、117、119、122、124、127、129、131、又は 682 の軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0275】

50

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、配列番号 1 2、1 3、1 3 2、1 3 4、1 3 6、1 3 8、1 4 0、1 4 1、1 4 3、1 4 5、1 4 6、1 4 8、1 5 0、1 5 1、又は 6 7 9 の重鎖配列を含む。

【0276】

本明細書に記載の本発明のいくつかの実施形態では、本発明の P S M A に特異的に結合する抗体は、配列場号 1 4、1 5、7 5、1 3 3、1 3 5、1 3 7、1 3 9、1 4 2、1 4 4、1 4 7、1 4 9、又は 6 8 0 の軽鎖配列を含む。

【0277】

C D 3 3 特異性抗体

本発明の C D 3 3 特異性抗体は、C D 3 3 及び / 又は C D 3 に対する高親和性結合、C D 3 3 及び / 又は C D 3 に対する高い特異性、並びに単独で又は他の抗癌療法と組み合わせ投与されたときに癌を治療又は予防する能力を含むがこれらに限定されない、1 つ以上の望ましい機能特性を有する。

【0278】

特定の実施形態では、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、C D 3 3 の C 2 ドメインに結合する。特定の実施形態では、単離モノクローナル抗体又はその抗原結合断片は、C D 3 3 の V ドメインに結合する。完全長ヒト C D 3 3 は、Uniprot P 2 0 1 3 8 (配列番号 2 4 4) によって提供される。

【0279】

本明細書で使用するとき、「C D 3 3 に特異的に結合する」抗体とは、C D 3 3、好ましくはヒト C D 3 3、好ましくは C D 3 3 の C 2 ドメインに対し、 1×10^{-7} M 以下、好ましくは 1×10^{-8} M 以下、より好ましくは 5×10^{-9} M 以下、 1×10^{-9} M 以下、 5×10^{-10} M 以下、又は 1×10^{-10} M 以下の K D で結合する抗体を指す。

【0280】

本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片は、様々な形態で存在し得るが、表 3 9 及び 4 0 に示される抗体 C D R のうちの 1 つ以上を含む。

【0281】

C D 3 3 に特異的に結合する組換え抗体及び抗原結合断片が本明細書に記載される。いくつかの実施形態では、C D 3 3 特異性抗体又は抗原結合断片は、ヒト I g G 又はその誘導体である。本明細書に例示される C D 3 3 特異性抗体又は抗原結合断片は、ヒトであるが、例示される抗体又は抗原結合断片は、キメラ化されていてもよい。

【0282】

いくつかの実施形態では、表 3 9 に記載の抗体のいずれか 1 つの C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む重鎖を含む、C D 3 3 特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態では、表 3 9 に記載の抗体のいずれか 1 つの C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む重鎖と、表 4 0 に記載の抗体のいずれか 1 つの C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む軽鎖と、を含む、C D 3 3 特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。

【0283】

いくつかの実施形態では、表 3 8 に示される重鎖可変領域を含む C D 3 3 特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態では、表 3 8 に示される軽鎖可変領域を含む C D 3 3 特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。

【0284】

この項で論じられ、表 3 8 に示される抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、二重特異性コンストラクトに含めるのに好適である。例えば、C D 3 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、エフェクターアームは C D 3 アームである。C D 3 3 × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、6 7 1、6 7 3、及び 6 7 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む。C D 3 3 × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の V H 及

10

20

30

40

50

びVLを含む。CD33×CD3二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、CD3アームは、それぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含む。

【0285】

CD33×CD3二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、CD3アームは、それぞれ配列番号662、663、664、773、673、及び670のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む。CD33×CD3二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、CD3アームは、それぞれ配列番号657及び678のVH及びVLを含む。CD33×CD3二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、CD3アームは、それぞれ配列番号675及び677のHC及びLCを含む。

【0286】

特定の実施形態では、抗CD33抗体又はその抗原結合断片は、配列番号267、260、275、270、262、258、257、281、292、291、261、269、280、259、263、264、265、266、272、277、279、284、若しくは285と少なくとも95%同一のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は配列番号287、314、309、301、298、297、290、332、331、302、310、320、300、304、305、306、307、317、319、324、若しくは325と少なくとも95%同一のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含み、当該抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号257若しくは258と少なくとも95%同一のポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、又は配列番号298若しくは299と少なくとも95%同一のポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域を含む。

【0287】

IL1RAP特異性抗体

本明細書で使用する時、用語「インターロイキン-1受容体アクセサリタンパク質」、「IL1RAP」、及び「IL1-RAP」は、具体的には、例えば、GenBank Accession No. AAB84059、NCBI Reference Sequence: NP_002173.1、及びUniProtKB/Swiss-Prot Accession No. Q9NPH3-1に記載されているような、ヒトIL1RAPタンパク質(配列番号576)を含む(Huang et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94(24), 12829-12832も参照)。IL1RAPはまた、科学文献においてIL1R3、C3orf13、FLJ37788、IL-1RAP及びEG3556としても知られている。

【0288】

本明細書に記載された抗体又は抗原結合断片は、様々な形態で存在し得るが、表29に示される抗体CDRのうちの1つ以上を含む。

【0289】

本明細書において、IL1RAPに特異的に結合する、組換え抗体及び抗原結合フラグメントが記載されている。いくつかの実施形態では、IL1RAP特異性抗体又は抗原結合断片は、ヒトIgG又はその誘導体である。本明細書に例示されるIL1RAP特異性抗体又は抗原結合断片は、ヒトであるが、例示される抗体又は抗原結合断片は、キメラ化されていてもよい。

【0290】

いくつかの実施形態では、表29に記載の抗体のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖を含む、IL1RAP特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態では、表29に記載の抗体のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖と、表29に記載の抗体のいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む軽鎖と、を含む、IL1RAP特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。

【0291】

いくつかの実施形態では、表30に示される抗体のいずれか1つの重鎖可変領域を含む

10

20

30

40

50

、 I L 1 R A P 特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態では、表 3 0 に示される抗体のいずれか 1 つの軽鎖可変領域を含む、 I L 1 R A P 特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。いくつかの実施形態では、表 3 0 に示される抗体のいずれか 1 つの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、 I L 1 R A P 特異性抗体又はその抗原結合断片が提供される。

【 0 2 9 2 】

この項で論じられ、表 3 0 に示される抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、標的アームが抗 I L 1 R A P アームである二重特異性コンストラクトに含めるのに好適である。例えば、 I L 1 R A P 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、エフェクターアームは C D 3 アームである。 I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、 C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、6 7 1、6 7 3、及び 6 7 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む。 I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、 C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の V H 及び V L を含む。 I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、 C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 4 0 及び 6 7 6 の H C 及び L C を含む。

10

【 0 2 9 3 】

I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、 C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、7 7 3、6 7 3、及び 6 7 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む。 I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、 C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 5 7 及び 6 7 8 の V H 及び V L を含む。 I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体のいくつかの実施形態では、 C D 3 アームは、それぞれ配列番号 6 7 5 及び 6 7 7 の H C 及び L C を含む。

20

【 0 2 9 4 】

T M E F F 2 特異性抗体

本発明は、 T M E F F 2 の配列番号 6 2 9 の膜近位領域に結合する、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。 T M E F F 2 の膜近位領域に結合する本発明の抗 T M E F F 2 抗体は、細胞によって内部移行しない。いかなる特定の理論にも束縛されるものではないが、内部移行しない抗 T M E F F 2 抗体は、内部移行する抗 T M E F F 2 抗体と比較したとき、 T M E F F 2 の内部移行及び分解の欠如から生じる抗体エフェクター機能によって媒介される発癌作用が改善されていると予想することができる。

30

【 0 2 9 5 】

「膜近位領域に結合する」とは、水素/重水素交換 (H / D 交換) を用いて同定された抗体エピトープ残基の 9 0 % が、 T M E F F 2 の膜近位領域内に存在することを意味する。エピトープ残基は、 H / D 交換による重水素化レベルの少なくとも 5 % の差によって、試験抗体により保護されるものである。例示的なこのような抗体は、本明細書に記載の T M E B 6 7 5、T M E B 5 7 0、T M E B 6 7 4、T M E B 5 6 5、T M E B 7 6 2、及び T M E B 7 5 7 である。

【 0 2 9 6 】

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、残基 H G K C E H S I N M Q E P S C (配列番号 5 9 2) 又は D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L (配列番号 6 0 0) 内で T M E F F 2 の膜近位領域に結合する。残基 H G K C E H S I N M Q E P S C (配列番号 5 9 2) 内で結合する例示的な抗 T M E F F 2 抗体は、 T M E B 5 7 0 である。残基 D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L (配列番号 6 0 0) 内で結合する例示的な抗 T M E F F 2 抗体は、 T M E B 6 7 5 である。 T M E B 6 7 5 変異体 T M E B 7 6 2 及び T M E B 7 5 7 も、残基 D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L (配列番号 6 0 0) 内で T M E F F 2 の膜近位領域に結合すると予想される。

40

【 0 2 9 7 】

H / D 交換アッセイでは、組換え的に発現させた T M E F F 2 E C D を、抗体の存在

50

又は非存在下、重水素化水中で所定の時間にわたってインキュベートし、その結果、抗体によって保護されていない交換可能な水素原子での重水素が組み込まれ、続いて、タンパク質のプロテアーゼ消化及びLC-MSを使用するペプチド断片の分析を行う。H/D交換アッセイは、公知のプロトコルを使用して行うことができる。例示的なプロトコルを実施例5に記載する。

【0298】

本発明は、また、配列番号25の重鎖可変領域(VH)及び配列番号28の軽鎖可変領域(VL)、配列番号589のVH及び配列番号29のVL、配列番号27のVH及び配列番号30のVL、配列番号589のVH及び配列番号31のVL、配列番号604のVH及び配列番号607のVL、又は配列番号612のVH及び配列番号613のVLを含む参照抗体と、TMEFF2の膜近位領域への結合について競合する、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0299】

TMEFF2の膜近位領域への試験抗体の結合についての参照抗体との競合は、周知の方法を用いてインビトロでアッセイすることができる。例えば、非標識抗体の存在下におけるMSD SulfoTag(商標)NHS-エステル標識試験抗体の、TMEFF2の膜近位領域への結合は、ELISA法によって評価することができるか、又はBiacore分析法若しくはフローサイトメトリーを用いて競合を実証することもできる。試験抗体がTMEFF2の膜近位領域への参照抗体の結合を85%以上、例えば、90%以上、又は95%以上阻害するとき、試験抗体はTMEFF2への結合に関して参照抗体と競合している。

20

【0300】

本発明は、また、以下の重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3、軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、LCDR2、及びLCDR3を含む単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する：

それぞれ、配列番号582、584、587、18、588、及び22、

それぞれ、配列番号583、585、16、19、21、及び23、

それぞれ、配列番号582、586、17、18、588、及び24、

それぞれ、配列番号583、585、16、18、588、及び22、又は

それぞれ、配列番号582、584、587、18、588、及び603。

30

【0301】

いくつかの実施形態では、本発明の単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、約 0.4×10^{-9} M以下の平衡解離定数(K_D)でTMEFF2の膜近位領域に結合し、 K_D は、室温においてpH4.5~5.0の酢酸バッファ中で表面プラズモン共鳴を使用して測定される。

【0302】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、約 0.1×10^{-10} M~約 0.4×10^{-9} Mの K_D でTMEFF2の膜近位領域に結合する。

【0303】

TMEFF2の膜近位領域に対する抗体の親和性は、任意の好適な方法を用いて実験により決定することができる。例示的な方法は、ProteOn XPR36、Biacore3000又はKinExA装置、ELISA、若しくは当業者に既知の競合的結合アッセイを利用する。抗体のTMEFF2に対する親和性の測定値は、異なる条件(例えば、オスモル濃度、pH)下で測定した場合に異なり得る。したがって、親和性及び他の結合パラメータ(例えば、 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})の測定は、典型的には、標準化された条件及び本明細書に記載のバッファなどの標準化されたバッファを用いて行われる。例えばBiacore 3000又はProteOnを使用した親和性測定での内部エラー(標準偏差(SD)として測定されるもの)は典型的に、典型的な検出範囲内で測定した場合、5~33%の範囲内であり得ることが当業者には分かるであろう。したがって、「約」という用語は、 K_D 値に言及する場合、アッセイにおける典型的な標準偏差を反映する

40

50

。例えば、 K_D が 1×10^{-9} M の場合の典型的な SD は、最大 $\pm 0.33 \times 10^{-9}$ M である。

【0304】

本発明は、また、 $VH3_3-23$ (配列番号53) 又は $VH1_1-69$ (配列番号54) に由来する重鎖可変領域 (VH) フレームワークを含む、 $TMEFF2$ の膜近位領域に結合する単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0305】

本発明は、また、 VKI_L11 (配列番号55) 又は $VKIIII_A27$ (配列番号591) に由来する軽鎖可変領域 (VL) フレームワークを含む、 $TMEFF2$ の膜近位領域に結合する単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0306】

本発明は、また、それぞれ配列番号53の $VH3_3-23$ 又は配列番号55の VKI_L11 に由来する VH フレームワーク及び VL フレームワークを含む、 $TMEFF2$ の膜近位領域に結合する単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0307】

本発明は、また、それぞれ配列番号54の $VH1_1-69$ 及び配列番号591の $VKIIII_A27$ に由来する VH フレームワーク及び VL フレームワークを含む、 $TMEFF2$ の膜近位領域に結合する単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0308】

本発明は、また、それぞれ配列番号54の $VH1_1-69$ 及び配列番号55の VKI_L11 に由来する VH フレームワーク及び VL フレームワークを含む、 $TMEFF2$ の膜近位領域に結合する単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0309】

特定のフレームワーク又は生殖系列配列「に由来する」重鎖又は軽鎖可変領域を含む抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系から、例えば、本明細書で論じるトランスジェニックマウス、ラット、若しくはニワトリ、又はファージディスプレイライブラリなどから得られる抗体を指す。生殖細胞系列配列に由来する特定のフレームワークを含有する抗体は、例えば自然発生する体細胞変異又は意図的な置換が原因で、その由来となった配列と比較したときにアミノ酸の違いを含み得る。

【0310】

本発明は、また、それぞれ配列番号582、584、587、18、588、及び22の $HCDR1$ 、 $HCDR2$ 、 $HCDR3$ 、 $LCDR1$ 、 $LCDR2$ 、及び $LCDR3$ を含む、抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【0311】

いくつかの実施形態では、単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号25の VH 及び配列番号28の VL を含む。

【0312】

いくつかの実施形態では、 VH は、配列番号39のポリヌクレオチドによってコードされており、 VL は、配列番号42のポリヌクレオチドによってコードされている。

【0313】

いくつかの実施形態では、単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号32の HC 及び配列番号35の LC を含む。

40

【0314】

いくつかの実施形態では、 HC は、配列番号46のポリヌクレオチドによってコードされており、 VL は、配列番号49のポリヌクレオチドによってコードされている。

【0315】

本発明は、また、それぞれ配列番号583、585、16、19、21、及び23の $HCDR1$ 、 $HCDR2$ 、 $HCDR3$ 、 $LCDR1$ 、 $LCDR2$ 、及び $LCDR3$ を含む、単離抗 $TMEFF2$ 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0316】

50

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 5 8 9 の V H 及び配列番号 2 9 の V L を含む。

【 0 3 1 7 】

いくつかの実施形態では、V H は、配列番号 4 0 のポリヌクレオチドによってコードされており、V L は、配列番号 4 3 のポリヌクレオチドによってコードされている。

【 0 3 1 8 】

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 3 の H C 及び配列番号 3 6 の L C を含む。

【 0 3 1 9 】

いくつかの実施形態では、H C は、配列番号 4 7 のポリヌクレオチドによってコードされており、L C は、配列番号 5 0 のポリヌクレオチドによってコードされている。

10

【 0 3 2 0 】

本発明は、また、それぞれ配列番号 5 8 2、5 8 6、1 7、1 8、5 8 8、及び 2 4 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 3 2 1 】

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 2 7 の V H 及び配列番号 3 0 の V L を含む。

【 0 3 2 2 】

いくつかの実施形態では、V H は、配列番号 4 1 のポリヌクレオチドによってコードされており、V L は、配列番号 4 4 のポリヌクレオチドによってコードされている。

20

【 0 3 2 3 】

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 4 の H C 及び配列番号 3 7 の L C を含む。

【 0 3 2 4 】

いくつかの実施形態では、H C は、配列番号 4 8 のポリヌクレオチドによってコードされており、L C は、配列番号 5 1 のポリヌクレオチドによってコードされている。

【 0 3 2 5 】

本発明は、また、それぞれ配列番号 5 8 3、5 8 5、1 6、1 8、5 8 8、及び 2 2 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【 0 3 2 6 】

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 5 8 9 の V H 及び配列番号 3 1 の V L を含む。

【 0 3 2 7 】

いくつかの実施形態では、V H は、配列番号 4 0 のポリヌクレオチドによってコードされており、V L は、配列番号 4 5 のポリヌクレオチドによってコードされている。

【 0 3 2 8 】

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 3 の H C 及び配列番号 3 8 の L C を含む。

40

【 0 3 2 9 】

いくつかの実施形態では、H C は、配列番号 4 7 のポリヌクレオチドによってコードされており、L C は、配列番号 5 9 0 のポリヌクレオチドによってコードされている。

【 0 3 3 0 】

本発明は、また、それぞれ配列番号 5 8 2、5 8 4、5 8 7、1 8、5 8 8、及び 6 0 3 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 3 3 1 】

いくつかの実施形態では、単離抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 6 0 4 の V H 及び配列番号 6 0 7 の V L を含む。

50

【0332】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号618のポリヌクレオチドによってコードされており、VLは、配列番号619のポリヌクレオチドによってコードされている。

【0333】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号614のHC及び配列番号615のLCを含む。

【0334】

いくつかの実施形態では、HCは、配列番号620のポリヌクレオチドによってコードされており、LCは、配列番号621のポリヌクレオチドによってコードされている。

【0335】

本発明は、また、それぞれ配列番号582、584、587、18、588、及び603のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0336】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号612のVH及び配列番号613のVLを含む。

【0337】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号622のポリヌクレオチドによってコードされており、VLは、配列番号623のポリヌクレオチドによってコードされている。

【0338】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号616のHC及び配列番号617のLCを含む。

【0339】

いくつかの実施形態では、HCは、配列番号624のポリヌクレオチドによってコードされており、LCは、配列番号625のポリヌクレオチドによってコードされている。

【0340】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、多重特異性抗体である。

【0341】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、二重特異性抗体である。

【0342】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2二重特異性抗体又はその抗原結合断片は、T細胞抗原に結合する。

【0343】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2二重特異性抗体又はその抗原結合断片は、CD3に結合する。

【0344】

いくつかの実施形態では、単離抗TMEFF2二重特異性抗体又はその抗原-結合断片は、CD3に結合する。

【0345】

本発明の例示的な抗TMEFF2抗体のVH、VL、HC DR、LC DR、HC、及びLC配列を、表60～67に示す。

【0346】

実施例で説明する実施形態は、一方が重鎖に由来し、一方が軽鎖に由来する可変ドメインの対を含むが、当業者であれば、代替的な実施形態が単一の重鎖又は軽鎖可変ドメインを含み得ることを認識するであろう。単一の可変ドメインを用いて、TMEFF2に結合することができる2ドメイン特異性抗原結合断片を形成することができる可変ドメインについてスクリーニングすることができる。スクリーニングは、例えば、国際公開第1992/01047号に開示されている階層的二重コンビナトリアルアプローチ(hierarchic

10

20

30

40

50

al dual combinatorial approach) を用いたファージディスプレイスクリーニング法によって行うことができる。このアプローチでは、VH鎖又はVL鎖のいずれかのクローンを含む個別のコロニーを用いて、他方の鎖(VL鎖又はVH鎖)をコードしているクローンの完全なライブラリに感染させ、得られた二本鎖特異性抗原結合ドメインを公知の方法及び本明細書に記載されるものを用いてファージディスプレイ技術に従って選択する。したがって、個別のVH及びVLポリペプチド鎖は、国際公開第1992/01047号に開示されている方法を用いて、追加の抗TMEFF2抗体を同定するのに有用である。

【0347】

二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体

本発明は、また、TMEFF2に結合する第1のドメイン及びCD3に結合する第2のドメインを含む、単離二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、抗体が、TMEFF2の膜近位領域に結合する、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。いずれの特定の理論にも束縛されるものではないが、TMEFF2の膜近位領域に結合する二重特異性抗体は、腫瘍細胞のT細胞媒介性殺傷の媒介においてより効率的であり得る。

【0348】

本発明は、また、TMEFF2に結合する第1のドメイン及びCD3に結合する第2のドメインを含む単離二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、抗体が、配列番号25の重鎖可変領域(VH)及び配列番号28の軽鎖可変領域(VL)、配列番号589のVH及び配列番号29のVL、配列番号27のVH及び配列番号30のVL、配列番号589のVH及び配列番号31のVL、配列番号604のVH及び配列番号607のVL、又は配列番号612のVH及び配列番号613のVLを含む参照抗体と、TMEFF2の膜近位領域への結合について競合する、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0349】

いくつかの実施形態では、単離二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、約 0.4×10^{-9} M以下の解離定数(K_D)でTMEFF2の膜近位領域に結合し、 K_D は、室温においてpH4.5~5.0の酢酸バッファ中で表面プラズモン共鳴を使用して測定される。

【0350】

いくつかの実施形態では、単離二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、約 0.1×10^{-10} M~約 0.4×10^{-9} Mの K_D でTMEFF2の膜近位領域に結合する。

【0351】

本発明は、また、第1のドメインが、以下のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む、単離二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する：

それぞれ、配列番号582、584、587、18、588、及び22、

それぞれ、配列番号583、585、16、19、21、及び23、

それぞれ、配列番号582、586、17、18、588、及び24、

それぞれ、配列番号583、585、16、18、588、及び22、又は

それぞれ、配列番号582、584、587、18、588、及び603。

【0352】

本発明は、また、第2のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む、単離二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0353】

本発明は、また、第1のドメインが、以下を含む、単離二重特異性抗TMEFF2 / 抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する：

配列番号 25 の V H 及び配列番号 28 の V L、
 配列番号 589 の V H 及び配列番号 29 の V L、
 配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L、
 配列番号 589 の V H 及び配列番号 31 の V L、
 配列番号 604 の V H 及び配列番号 607 の V L、又は
 配列番号 612 の V H 及び配列番号 613 の V L。

【0354】

本発明は、また、第 2 のドメインが、以下を含む、単離二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する：

配列番号 652 の V H 及び配列番号 661 の V L。

10

【0355】

いくつかの実施形態では、第 2 のドメインは、配列番号 657 の V H 及び配列番号 658 の V L を含む。

【0356】

本発明は、また、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメイン及び C D 3 に結合する第 2 のドメインを含む、単離二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、

当該第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 582、584、587、18、588、及び 22 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、当該第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 662、663、664、671、673、及び 690 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む；

20

当該第 1 のドメインが、配列番号 25 の V H 及び配列番号 28 の V L を含み、当該第 2 のドメインが、配列番号 652 の V H 及び配列番号 661 の V L を含む；

当該第 1 のドメインが、配列番号 25 の V H 及び配列番号 28 の V L を含み、当該第 2 のドメインが、配列番号 657 の V H 及び配列番号 678 の V L を含む；

当該二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号 32 の H C 1、配列番号 35 の L C 1、配列番号 640 の H C 2、及び配列番号 676 の L C 2 を含む；並びに / 又は

当該二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号 32 の H C 1、配列番号 35 の L C 1、配列番号 675 の H C 2、及び配列番号 677 の L C 2 を含む、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【0357】

本発明は、また、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメイン及び C D 3 に結合する第 2 のドメインを含む、単離二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、

当該第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 583、585、16、19、21、及び 23 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、当該第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 662、663、664、671、673、及び 690 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む；

40

当該第 1 のドメインが、配列番号 589 の V H 及び配列番号 29 の V L を含み、当該第 2 のドメインが、配列番号 652 の V H 及び配列番号 661 の V L を含む；

当該第 1 のドメインが、配列番号 589 の V H 及び配列番号 29 の V L を含み、当該第 2 のドメインが、配列番号 657 の V H 及び配列番号 678 の V L を含む；並びに / 又は

当該二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号 33 の H C 1、配列番号 36 の L C 1、配列番号 640 の H C 2、及び配列番号 676 の L C 2 を含む；

当該二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片が、配列番号 33 の H C 1、配列番号 36 の L C 1、配列番号 675 の H C 2、及び配列番号 677 の L C

50

2を含む、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0358】

本発明は、また、TMEFF2に結合する第1のドメイン及びCD3に結合する第2のドメインを含む、単離二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

当該第1のドメインが、それぞれ配列番号582、586、17、18、588、及び24のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む；

10

当該第1のドメインが、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号652のVH及び配列番号661のVLを含む；

当該第1のドメインが、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号657のVH及び配列番号678のVLを含む；並びに/又は

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号34のHC1、配列番号37のLC1、配列番号640のHC2、及び配列番号676のLC2を含む；

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号34のHC1、配列番号37のLC1、配列番号675のHC2、及び配列番号677のLC2を含む、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0359】

本発明は、また、TMEFF2に結合する第1のドメイン及びCD3に結合する第2のドメインを含む、単離二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

当該第1のドメインが、それぞれ配列番号583、585、16、18、588、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む；

当該第1のドメインが、配列番号589のVH及び配列番号31のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号652のVH及び配列番号661のVLを含む；

30

当該第1のドメインが、配列番号589のVH及び配列番号31のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号657のVH及び配列番号678のVLを含む；並びに/又は

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号640のHC2、及び配列番号676のLC2を含む；

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号675のHC2、及び配列番号677のLC2を含む、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0360】

本発明は、また、TMEFF2に結合する第1のドメイン及びCD3に結合する第2のドメインを含む、単離二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

当該第1のドメインが、それぞれ配列番号582、584、587、18、588、及び603のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む；

当該第1のドメインが、配列番号604のVH及び配列番号607のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号652のVH及び配列番号661のVLを含む；

50

当該第1のドメインが、配列番号604のVH及び配列番号607のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号657のVH及び配列番号678のVLを含む；並びに/又は

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号614のHC1、配列番号615のLC1、配列番号640のHC2、及び配列番号676のLC2を含む；

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号614のHC1、配列番号615のLC1、配列番号675のHC2、及び配列番号677のLC2を含む、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0361】

本発明は、また、TMEFF2に結合する第1のドメイン及びCD3に結合する第2のドメインを含む、単離二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

当該第1のドメインが、それぞれ配列番号582、584、587、18、588、及び603のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む；

当該第1のドメインが、配列番号612のVH及び配列番号613のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号652のVH及び配列番号661のVLを含む；

当該第1のドメインが、配列番号612のVH及び配列番号613のVLを含み、当該第2のドメインが、配列番号657のVH及び配列番号678のVLを含む；並びに/又は

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号616のHC1、配列番号617のLC1、配列番号640のHC2、及び配列番号676のLC2を含む；

当該二重特異性抗TMEFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号616のHC1、配列番号617のLC1、配列番号675のHC2、及び配列番号677のLC2を含む、単離二重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0362】

実施形態：

本発明は、以下の非限定的な実施形態を提供する。

1. 単離組換え抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

a) 配列番号662を含む重鎖相補性決定領域(HC DR)1、配列番号663を含むHC DR2、及び配列番号664を含むHC DR3を含む重鎖、並びに配列番号671を含む軽鎖相補性決定領域(LC DR)1、配列番号673を含むLC DR2、及び配列番号690を含むLC DR3を含む軽鎖；

b) 配列番号652を含む重鎖可変領域及び配列番号661を含む軽鎖可変領域；

c) 配列番号640を含む重鎖、及び配列番号676を含む軽鎖；

d) 配列番号662を含むHC DR1、配列番号663を含むHC DR2、及び配列番号664を含むHC DR3を含む重鎖、並びに配列番号673を含むLC DR1、配列番号673を含むLC DR2、及び配列番号690を含むLC DR3を含む軽鎖；

e) 配列番号657を含む重鎖可変領域及び配列番号678を含む軽鎖可変領域；あるいは

f) 配列番号675を含む重鎖及び配列番号678を含む軽鎖を含む、単離組換え抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

2. 約300 nM以下の結合親和性でカニクイザル(*Macaca fascicularis*)又はヒトのCD3d、又はCD3e、又はCD3e及びCD3dに特異的に結合する、単離組換え抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

3. 当該結合親和性が約100 nM以下である、実施形態2に記載の単離組換え抗CD

10

20

30

40

50

3 抗体又はその抗原結合断片。

4 . 当該結合親和性が、フローサイトメトリー又は + 2 5 における P r o t e o n 表面プラズモン共鳴アッセイ P r o t e o n X P R 3 6 システムによって測定される、実施形態 2 又は 3 に記載の単離組換え抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片。

5 . 以下の特性のうちの一つ、二つ、三つ、又は四つを有する、実施形態 1 ~ 4 のいずれか一つに記載の単離組換え抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片 :

a) 3 0 0 n M 以下の計算 E C 5 0 でヒト及びカニクイザルの C D 3 + T リンパ球に結合し、3 0 0 n M 以下の計算 E C 5 0 でカニクイザル C D 3 発現 H E K 細胞に結合し、C D 3 + T リンパ球への結合とカニクイザル C D 3 発現 H E K 細胞への結合との間の計算 E C 5 0 の差は 5 倍未満であり、計算 E C 5 0 は、フローサイトメトリーを使用して 0 10
で全細胞結合アッセイで測定される ;

b) 3 0 0 n M 以下の平衡解離定数 (K_D) でヒト由来の組換え C D 3 d (配列番号 6 9 1) に結合、又はヒト由来の組換え C D 3 e (配列番号 6 3 6) に結合、又はカニクイザル由来の組換え C D 3 d (配列番号 6 9 2) に結合、又はカニクイザル由来の組換え C D 3 e (配列番号 6 9 3) に結合し、 K_D は、+ 2 5 で P r o t e o n 表面プラズモン共鳴アッセイ P r o t e o n X P R 3 6 システムを使用して測定される ;

c) X 線結晶解析により決定したとき、C D 3 e の残基 1 ~ 6 に結合する ; 又は

d) 蛍光活性化細胞選別アッセイによって決定したとき、c O K T 3 又は S P 3 4 - 2 と同様の程度まで、T 細胞を活性化するか又は C D 6 9 発現を誘導する。

6 . 抗体定常ドメインに少なくとも一つの置換を含む、実施形態 1 ~ 5 のいずれか一つ 20
に記載の抗体又はその抗原結合断片であって、当該少なくとも一つの置換が、

a) 重鎖置換 K 4 0 9 R、F 4 0 5 L、又は F 4 0 5 L 及び R 4 0 9 K を含む、

b) 重鎖置換 S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、及び L 2 3 5 A を含む、

c) 重鎖置換 L 2 3 4 A、G 2 3 7 A、P 2 3 8 S、H 2 6 8 A、A 3 3 0 S、及び P 3 3 1 S を含み、当該抗体が、I g G 1 アイソタイプである、又は

d) 重鎖置換 S 2 2 8 P を含み、当該抗体が、I g G 4 アイソタイプであり、
残基の付番が E U インデックスに準拠する、抗体又はその抗原結合断片。

7 . それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、6 7 1、6 7 3、及び 6 9 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、実施 30
形態 1 ~ 6 のいずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合断片。

8 . それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含む、実施形態 1 ~ 7 のいずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合断片。

9 . それぞれ配列番号 6 4 0 及び 6 7 6 の重鎖配列 (H C) 及び軽鎖配列 (L C) を含む、実施形態 1 ~ 8 のいずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合断片。

1 0 . それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、7 7 3、6 7 3、及び 6 9 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、実施 30
形態 1 ~ 5 のいずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合断片。

1 1 . それぞれ配列番号 6 5 7 及び 6 7 8 の V H 及び V L を含む、実施形態 1 ~ 5 のい 40
ずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合断片。

1 2 . それぞれ配列番号 6 7 5 及び 6 7 7 の H C 及び L C を含む、実施形態 1 ~ 5 のい 40
ずれか一つに記載の抗体又はその抗原結合断片。

1 3 . それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、6 7 1、6 7 3、及び 6 9 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、抗 40
体又はその抗原結合断片。

1 4 . それぞれ配列番号 6 5 2 及び 6 6 1 の V H 及び V L を含む、抗体又はその抗原結 40
合断片。

1 5 . それぞれ配列番号 6 4 0 及び 6 7 6 の H C 及び L C を含む、抗体又はその抗原結 40
合断片。

1 6 . それぞれ配列番号 6 6 2、6 6 3、6 6 4、7 7 3、6 7 3、及び 6 9 0 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含む、抗 50
体又はその抗原結合断片。

体又はその抗原結合断片。

17．それぞれ配列番号657及び678のVH及びVLを含む、抗体又はその抗原結合断片。

18．それぞれ配列番号675及び677のHC及びLCを含む、抗体又はその抗原結合断片。

19．当該抗体が、ヒトである又はヒト化されている、実施形態1～18のいずれか1つに記載の抗体又はその抗原結合断片。

20．当該抗体が、IgG4又はIgG1アイソタイプである、実施形態19に記載の抗体。

21．当該抗体のFcに1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10個の置換を含む、実施形態20に記載の抗体。

22．実施形態18に記載の抗体であって、

a) D43G、L49M、L50I、S62N、Q85Eの軽鎖置換、

b) D43G、V48L、L49M、L50I、S62N、Q85E、H89Yの軽鎖置換、

c) R10G、R13K、V73I、R70K、T83S、L96Vの重鎖置換、

d) 軽鎖置換D43G、V48L、L49M、L50I、S62N、Q85E、又はH89Yのいずれか1つ、又は

e) 重鎖置換R10G、R13K、V73I、R79K、T83S、又はL96Vのいずれか1つ、

を含み、

軽鎖置換の残基付番は、配列番号661に準拠し、重鎖置換については、配列番号652に準拠する、抗体。

23．当該抗体が、二重特異性又は多重特異性である、実施形態1～22のいずれか1つに記載の抗体。

24．CD3に特異的に結合する第1のドメイン及び第2の抗原に特異的に結合する第2のドメインを含む二重特異性抗体であって、当該第1のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む、二重特異性抗体。

25．当該第1のドメイン及び第2のドメインがIgG4アイソタイプであり、当該第1又は第2のドメインが、S228P、F234A、L235A、F405L、及びR409Kの重鎖置換を含み、当該第1又は第2のドメインの他方のドメインが、S228P、F234A、及びL235Aの重鎖置換を含み、残基の付番はEUインデックスに従う、実施形態24に記載の二重特異性抗体。

26．当該第1及び/又は第2のドメインが、F405L、又はF405L及びR409K置換を含む、CH3定常ドメインにおける少なくとも1つの置換を含み、残基の付番はEUインデックスに準拠する、実施形態24に記載の二重特異性抗体。

27．当該第1又は第2のドメインの一方が、F405Lの重鎖置換を含み、当該第1又は第2のドメインの他方が、K409Rの重鎖置換を含み、残基の付番がEUインデックスに準拠する、実施形態24に記載の二重特異性抗体。

28．当該第1のドメイン及び第2のドメインが、IgG4アイソタイプであり、当該第1又は第2のドメインの一方が、S228Pの重鎖置換を含み、当該第1又は第2のドメインの他方が、S228P、F405L、及びR409Kの重鎖置換を含み、残基の付番がEUインデックスに準拠する、実施形態24に記載の二重特異性抗体。

29．当該第1のドメインが、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含む、請求項24に記載の二重特異性抗体。

30．当該第1のドメインが、それぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含む、請求項24に記載の二重特異性抗体。

31．当該第1のドメインが、それぞれ配列番号657及び678のVH及びVLを含む、請求項24に記載の二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

32. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号675及び677のHC及びLCを含む、請求項24に記載の二重特異性抗体。

33. 当該第2の抗原が、免疫エフェクター細胞以外の標的細胞上で発現する細胞表面抗原である、請求項24に記載の二重特異性抗体。

34. 当該細胞表面抗原が、腫瘍関連抗原である、請求項33に記載の二重特異性抗体。

35. 当該第2の抗原が、CD33、IL1RAP、PSMA、又はTMEFF2である、請求項24～34のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

36. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号78、683、80、81、792、及び686のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む、実施形態35に記載の二重特異性抗体。

37. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号681及び682のVH及びVLを含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。

38. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号679及び680のHC及びLCを含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。

39. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号78、3、80、81、792、及び686のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。

40. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号8及び682のVH及びVLを含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。(余白)。

41. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号13及び680のHC及びLCを含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。

42. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び690のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号78、79、80、81、82、及び83のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。

43. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号116及び117のVH及びVLを含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。

44. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号640及び676のHC及びLCを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号138及び139のHC及びLCを含む、実施形態33に記載の二重特異性抗体。

45. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び670のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号164、165、166、167、168、及び169のHC DR1、HC DR2、HC DR3、LC DR1、LC DR2、及びLC DR3を含む、実施形態31に記載の二重特異性抗体。

46. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号215及び216のVH及びVLを含む、実施形態31に記載の二重特異性抗体。

47. 当該第1のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、6

10

20

30

40

50

73、及び670のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号349、390、341、471、513、及び555のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む、実施形態31に記載の二重特異性抗体。

48．当該第1のドメインが、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号267及び306のVH及びVLを含む、実施形態31に記載の二重特異性抗体。

49．当該第1のドメインが、それぞれ配列番号662、663、664、671、673、及び670のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号363、404、445、485、527、及び569のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む、実施形態31に記載の二重特異性抗体。

50．当該第1のドメインが、それぞれ配列番号652及び661のVH及びVLを含み、当該第2のドメインが、それぞれ配列番号281及び320のVH及びVLを含む、実施形態31に記載の二重特異性抗体。

51．実施形態1～50のいずれか1つに記載の抗体と、薬学的に許容できる担体とを含む、医薬組成物。

52．実施形態1～50のいずれか1つに記載の抗体をコードしている、ポリヌクレオチド。

53．実施形態52に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

54．実施形態53に記載のベクターを含む、宿主細胞。

55．実施形態1～50のいずれか1つに記載の抗体を産生する方法であって、当該抗体が発現する条件で実施形態52に記載の宿主細胞を培養することと、当該宿主細胞によって産生された当該抗体を回収することと、を含む、方法。

56．対象における癌を治療する方法であって、当該癌を治療するのに十分な時間にならないうちに、それを必要としている当該対象に、治療有効量の実施形態1～50のいずれか1つに記載の単離抗体を投与することを含む、方法。

57．当該癌が、固形腫瘍又は血液悪性腫瘍である、実施形態56に記載の方法。

58．当該固形腫瘍が、前立腺癌、結腸直腸癌、胃癌、腎明細胞癌、膀胱癌、肺癌、扁平上皮癌、神経膠腫、乳癌、腎臓癌、血管新生障害、腎明細胞癌(CCRCC)、膵臓癌、腎癌、尿路上皮癌、又は肝臓腺癌である、実施形態57に記載の方法。

59．当該前立腺癌が、難治性前立腺癌、前立腺上皮内腫瘍、アンドロゲン非依存性前立腺癌、又は悪性前立腺癌である、実施形態58に記載の方法。

60．当該血液悪性腫瘍が、急性骨髄性白血病(AML)、骨髄異形成症候群(MDS)、急性リンパ性白血病(ALL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、慢性骨髄性白血病(CML)、又は芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(DPDCN)である、実施形態57に記載の方法。

61．当該抗体が、第2の治療剤と組み合わせて投与される、実施形態56～60のいずれか1つに記載の方法。

62．治療において使用するための、実施形態1～50のいずれか1つに記載の抗体。

63．実施形態1～50のいずれか1つに記載の抗体に結合する抗イディオタイプ抗体。

【実施例】

【0363】

1 抗CD3mAbのデノボ生成及び機能特性評価

1-1 CD3モノクローナル抗体を生成するためのCD3抗原によるOmniRats(登録商標)の免疫化

OmniRats(登録商標)を、ヒトCD3e及びヒトCD3d;カニクイザルCD3e及びカニクイザルCD3dをコードしている特許品ベクター(Aldevron, Fargo, North Dakota, USA)で免疫化した。動物を、ヒト及びカニク

10

20

30

40

50

イザルDNAで交互にブーストした。6回目の適用から、動物に同じインサートを有する最適化されたベクターを投与した。リンパ節由来の細胞を、Ag8骨髄腫細胞株と融合させた。融合BLW由来の細胞4000万個を、IgM枯渇後、3枚の96ウェルプレートに置いた。融合BLX由来の細胞13300万個を、IgMを枯渇させていない、9枚の96ウェルプレートに置いた。

【0364】

a)スクリーニングベクター：pOPT-CD3e-hum-epsilon-TCE.OMT+pOPT-CD3d-hum-delta.OMT、1:1(pOPT-CD3e/d-hum-mix)、及びpcDNA3.1-CD3e-cyn-delta+pOPT-CD3e/d-cyn-mix)にクローニングしたヒト及びカニクイザルcDNAを一過的にトランスフェクトした細胞で、細胞ベースのELISA(CELLISA)により、融合BLW(リンパ球の磁気ビーズ枯渇あり)及びBLX(リンパ球の磁気ビーズ枯渇なし)からのハイブリドーマ上清を分析した。ヒト及びカニクイザルcDNA配列(及び対応するアミノ酸配列)を表4に提供する。CELLISA陰性対照については、トランスフェクトされていない哺乳類細胞をハイブリドーマ上清と共にインキュベートし、二次Bethyl抗体で検出した。CELLISAトランスフェクション対照については、上記のコンストラクトでトランスフェクトした哺乳類細胞を、抗タグ抗体で検出した。

10

【0365】

ハイブリドーマ上清を、CD3陽性及びCD3陰性Jurkat細胞：Jurkat CD3+(E6-1)及びJurkat CD3-(J.RT3-T3.5)においてフローサイトメトリー(FACS)により更に分析した。FACS陰性対照については、CD3陰性Jurkat細胞(J.RT3-T3.5)を希釈バッファと共にインキュベートし、Southern抗ラットIgHRP及びBethyl抗ラットIgG1、2a、2b、2c-HRP二次抗体で検出した。

20

【0366】

一過的にトランスフェクトされた細胞に提示されたヒト及びカニクイザルCD3e/d複合体について、又はヒトCD3e/d複合体の場合、Jurkat CD3+(E6-1)細胞において、融合BLW及び融合BLX由来のハイブリドーマのハイブリドーマ上清中の抗体の特異性は、一過的にトランスフェクトされた細胞に対するCELLISAによって、並びにJurkat細胞株に対してFACSで試験した場合に証明された(表3)。陰性対照として機能する実験サンプル中のいずれのサンプルについても有意なシグナルは検出されなかった。

30

【0367】

【表3】

表3. 細胞ベースのELISA (上) 及びフローサイトメトリー (下) による個々のハイブリドーマ上清の特異性の試験。CELISA値は、各サンプルの相対蛍光単位 (rfu) を表す。FACS値は、各サンプルの相対蛍光強度の幾何学的平均 (幾何平均) を表す。

細胞ベースのELISA(相対蛍光単位)							
ハイブリドーマ上清を、以下でトランスフェクトされた細胞においてインキュベートした:							
		pOPT-CD3e/d-hum-mix		pcDNA3.1-CD3e/d-cyn-mix		トランスフェクトされていないCHO陰性対照	
BLW: 免疫化群MR14-379ラット1及び2由来のリンパ球と融合 (IgM+の磁気ビーズ枯渇を適用)							
番号	クローン	Rfu	陽性%	Rfu	陽性%	Rfu	陽性%
1	BLW-2B4	689	101	230	47	30	
2	BLW-2E6	231	34	121	25	20	
3	BLW-3B4	867	127	320	66	24	
BLX: 免疫化群MR14-379ラット1及び2由来のリンパ球と融合 (IgM+の磁気ビーズ枯渇なし)							
番号	クローン	Rfu	陽性%	Rfu	陽性%	Rfu	陽性%
4	BLX-1F8	689	101	230	47	30	
5	BLX-2E9	867	127	320	66	24	
6	BLX-3F4	896	131	371	76	17	
7	BLX-3G8	759	111	340	70	22	
8	BLX-4D9	1042	153	483	99	24	
9	BLX-6A2	110	16	38	8	19	
	陽性対照	682	100	488	100	-	
	陰性対照	25	4	42	9	-	
フローサイトメトリー(FACS)							
Jurkat細胞株においてインキュベートしたハイブリドーマ上清							
		Jurkat CD3+(E6-1)		Jurkat CD3-(J. RT3. T3. 5)陰性対照			
BLW: 免疫化群MR14-379ラット1及び2由来のリンパ球と融合 (IgM+の磁気ビーズ枯渇を適用)							
番号	クローン	幾何平均	陽性%	幾何平均	陽性%		
1	BLW-2B4	148034	53	4012			
2	BLW-2E6	7503	3	687			
3	BLW-3B4	198849	72	2884			
BLX: 免疫化群MR14-379ラット1及び2由来のリンパ球と融合 (IgM+の磁気ビーズ枯渇なし)							
番号	クローン	幾何平均	陽性%	幾何平均	陽性%		
4	BLX-1F8	148034	53	4012			
5	BLX-2E9	198849	72	2884			
6	BLX-3F4	181963	66	4613			
7	BLX-3G8	214697	77	3096			
8	BLX-4D9	25839	9	1471			
9	BLX-6A2	3385	1	1219			
	陽性対照	277338	100	2051			
	陰性対照	869	0	599			

【0368】

【表 4】

表 4. 免疫化に使用した CD 3 配列

ヒトCD3d	NP_000723.1(www.uniprot.org/uniprot/P04234)(配列番号691)
ヒトCD3e	(NP_000724.1(www.uniprot.org/uniprot/P07766)(配列番号636)
カニクイザルCD3d	XP_001097302(www.uniprot.org/uniprot/Q95LI8)(配列番号692)
カニクイザルCD3e	CD3e+TCE(www.uniprot.org/uniprot/Q95LI5)(配列番号693)

10

【0369】

1-2 クローニング抗 CD 3 抗体

OmniRats (OMT, Palo Alto, California, USA) で抗ヒト CD 3 抗体を生成した。これらのクローンの可変領域(「V領域」)配列をゲノム配列から抽出し、解析した。得られた全ての配列は、ヒト Ig G 重鎖又は 軽鎖のいずれかであり、配列、特に LC が高い相同性を示した。配列を生殖細胞系列にアラインメントすると、フレームワークにおいていくつかの変異が示された(図 1)。V 領域 DNA 配列を合成し、哺乳類発現ベクターに、重鎖配列をヒト Ig G 1 ベクターに、軽鎖配列をヒトベクターにクローニングした。配列を表 6 及び 7 に示す。7 つの mAb にタンパク質識別子を割り当てた(表 5 A)。

20

【0370】

CD 3 B 3 1 2 を最も代表的なクローンとして選択し、S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、L 2 3 5 A 変異を有し、表 5 B に示すようにタンパク質識別子を割り当てた、ヒト Ig G 1 及び Ig G 4 P A A に、重鎖配列をクローニングした。これらを使用して二重特異性抗体を生成し、細胞傷害を通して T 細胞リダイレクション機能を実証した。

【0371】

【表 5】

表 5 A. クローンのペプチド ID 及びタンパク質 ID

クローンID	HCペプチドID	LCペプチドID	タンパク質ID
BLW-2B4	CD3H218	CD3L123	CD3B311
BLW-2E6	CD3H219	CD3L124	CD3B312
BLW-3B4	CD3H218	CD3L125	CD3B313
BLX-1F8	CD3H220	CD3L126	CD3B314
BLX-2E9	CD3H221	CD3L124	CD3B315
BLX-3F4	CD3H222	CD3L124	CD3B316
BLX-3G8	CD3H223	CD3L124	CD3B317

30

【0372】

【表 6】

表 5 B. CD 3 B 3 1 2 を最も代表的なクローンとして選択し、変異を有し、タンパク質識別子を割り当てた、ヒト Ig G 1 σ 及び Ig G 4 P A A に重鎖配列をクローニングした。

40

IgG1	IgG1 σ	IgG4PAA
CD3B312	CD3B337	CD3B373

【0373】

【表 7 - 1】

表 6. 7 個のモノクローナル CD 3 抗体の重鎖及び軽鎖配列

タンパク質AA ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号	
CD3B311 (BLW-2B4)	HCペプチドID: CD3H218 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVFNNAAWTWIRQSPSR GLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSV KSRLTVNPDTSRNQFTLQLKSVT PEDTALYYCSRGYSSSFYDWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(637)	LCペプチドID: CD3L123 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLEYEV SKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADY HCCSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	(645)	10
CD3B312 (BLW-2E6)	HCペプチドID: CD3H219 QVRLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVFNNAAWSWIRQSPS RGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVT VKSRLTVNPDTSRNQFTLQLTSV TPEDTALYYCARGYSSSFYDWG GGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(640)	LCペプチドID: CD3L124 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLEYEV SKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADY HCCSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	(646)	20 30
CD3B313 (BLW-3B4)	HCペプチドID: CD3H218 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTC AISGDSVFNNGAWSWIRQSPS RGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVS VKSRLTVNPDTSRNQFTLQLNSV TPEDTALYYCARGYSSSFYDWG GGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPP PKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(638)	LCペプチドID: CD3L125 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLEYEV SKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADY HCCSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	(649)	40

【表 7 - 2】

(表 6 の続き)

タンパク質AA ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号	
CD3B314 (BLX-1F8)	HCペプチドID: CD3H220 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLC AISGDSVFNNAAWSWIRQSPS RGGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVS VKSRTVNPDTSRNQFTLQLKSV TPEDTALYYCSRGYSSSFYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(641)	LCペプチドID: CD3L126 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSDIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLYEV SKRPSGVSSRFSGSKSD NTASLTISGLQAEDQADY HCCSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	(650)	10
CD3B315 (BLX-2E9)	HCペプチドID: CD3H221 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLC AISGDSVFNNAAWSWIRQSPS RGGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVS VKSRTVNPDTSRNQFTLQLNSV TPEDTALYYCVRGYSSSFYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(642)	LCペプチドID: CD3L124 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSRDIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLYEV SKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADY HCCSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	(647)	20 30
CD3B316 (BLX-3F4)	HCペプチドID: CD3H222 QVQLQQSGPRLVLRPSQTLSTLC AISGDSVFNNAAWSWIRQSPS RGGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVS VKSRTVNPDTSRNQFTLQLNSV TPEDTALYYCARGYSSSFYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	(643)	LCペプチドID: CD3L124 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLYEV SKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADY HCCSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	(646)	40

【表 7 - 3】

(表 6 の続き)

タンパク質AA ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号
CD3B317 (BLX-3G8)	HCペプチドID: CD3H223 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTC AISGDSVFNNAAWSWIRQSPS RGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVS VKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSV TPEDTALYYCVRGYSSSFYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQS SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKVEPKSCD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNNHTQKSLSLSPGK	(644)	LCペプチドID: CD3L124 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSRDIGTYKFVS WYQQHPDKAPKVLLYEV NKRPSGVSSRFSGSKSG NTASLTISGLQAEDQADY HCCSYAGSGTLLFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNN KYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	(648)

10

20

【 0 3 7 6 】

【表 8】

表 7 A. 上記の 9 つの第 1 のパネルからの、7 つのモノクローナル CD 3 抗体の HC 及び LC アイソタイプを有する VH 及び VL 配列 (表 3 を参照)。全ての HC アイソタイプは、h u I g G 1 _ G 1 m (1 7) であった。全ての LC アイソタイプは、h u L a m b d a 2 であった。

Fab ID	ペプチドID	VH (SEQ ID NO:)	ペプチドID	VL (SEQ ID NO:)
CD3B311	CD3H218	qvqlqqsgpglvkpsqtlsitcais gdsfvnnaawswirqpsrgle wlgtrtyrskwlydyavsvksritv npdtsrnqftlqlnsvtpedtalyy cvrqysssfdywgqgtlvtvss (651)	CD3L123	qsaltqpasvsgspgqsitisctgtsrd igtykfvswyqqhpdkapkvlllyevnk rpsgvssrfsgsksgntasltisglqae dqadyhccsyagsgtllfgggtkltvl (658)
CD3B312	CD3H219	qvqlqqsgprlvrpsqtlsitcaisg dsfvnnaawswirqpsrglew lgrtyrskwlydyavsvksritvn pdtsrnqftlqlnsvtpedtalyyca rgysssfdywgqgtlvtvss (652)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitisctgtss nigtykfvswyqqhpdkapkvlllyevs krpsgvssrfsgsksgntasltisglqa edqadyhccsyagsgtllfgggtkltvl (659)
CD3B313	CD3H218	qvqlqqsgpglvkpsqtlsitcais gdsfvnnaawswirqpsrgle wlgtrtyrskwlydyavsvksritv npdtsrnqftlqlnsvtpedtalyy cvrqysssfdywgqgtlvtvss (687)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitisctgtsrd igtykfvswyqqhpdkapkvlllyevsk rpsgvssrfsgsksgntasltisglqae dqadyhccsyagsgtllfgggtkltvl (688)
CD3B314	CD3H220	qvqlqqsgpglvkpsqtlsitcais gdsfvnnaawswirqpsrgle wlgtrtyrskwlydyavsvksritv npdtsrnqftlqlksvtpedtalyyc srgysssfdywgqgtlvtvss (653)	CD3L126	qsaltqpasvsgspgqsitisctgtss digtykfvswyqqhpdkapkvlllyevs krpsgvssrfsgsksdntasltisglqa edqadyhccsyagsgtllfgggtkltvl (660)
CD3B315	CD3H221	qvqlqqsgpglvkpsqtlsitcais gdsfvnngawswirqpsrgle wlgtrtyrskwlydyavsvksritv npdtsrnqftlqlnsvtpedtalyy cargysssfdywgqgtlvtvss (654)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitisctgtss nigtykfvswyqqhpdkapkvlllyevs krpsgvssrfsgsksgntasltisglqa edqadyhccsyagsgtllfgggtkltvl (659)
CD3B316	CD3H222	qvrlqqsgpglvkpsqtlsitcais gdsfvnnaawswirqpsrgle wlgtrtyrskwlydyavtvksritv npdtsrnqftlqltsvtpedtalyyc argysssfdywgqgtlvtvss (655)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitisctgtss nigtykfvswyqqhpdkapkvlllyevs krpsgvssrfsgsksgntasltisglqa edqadyhccsyagsgtllfgggtkltvl (659)
CD3B317	CD3H223	qvqlqqsgpglvkpsqtlsitcais gdsfvnnaawtwirqpsrgle wlgtrtyrskwlydyavsvksritv npdtsrnqftlqlksvtpedtalyyc srgysssfdywgqgtlvtvss (656)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitisctgtss nigtykfvswyqqhpdkapkvlllyevs krpsgvssrfsgsksgntasltisglqa edqadyhccsyagsgtllfgggtkltvl (659)

10

20

30

【 0 3 7 7 】

40

【表 9】

表 7 B. 上記の 9 つの第 1 のパネルからの、7 つのモノクローナル CD 3 抗体の HC 及び LC アイソタイプを有する CDR 配列 (表 3 を参照)。配列は、K a b a t に従って定義する。全ての HC アイソタイプは、h u I g G 1 _ G 1 m (1 7) であった。全ての LC アイソタイプは、h u L a m b d a 2 であった。

FAB ID	ペプチドID	CDR(配列番号)		
		CDR1	CDR2	CDR3
CD3B311	HC CD3H218	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L123	TGTSRDIGTYKFVS (667)	EVNKRPS (669)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B312	HC CD3H219	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B313	HC CD3H218	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSRDIGTYKFVS (672)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B314	HC CD3H220	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L126	TGTSSDIGTYKFVS (674)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B315	HC CD3H221	NNNGAWS (665)	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B316	HC CD3H222	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDYAVTVKS (689)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B317	HC CD3H223	NNNAAWT (666)	RTYYRSKWLYDYAVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)

10

20

30

【 0 3 7 8 】

1 - 3 ヒト及びカニクイザル精製 T 細胞への結合についてのハイブリドーマのスクリーニング

ヒト (図 2) 及びカニクイザル (図 3) の精製 CD 3 + T リンパ球に対する個々のラットハイブリドーマ上清の結合能力を評価するために、細胞ベースの結合アッセイを設計した。T 細胞を計数し、 1×10^6 細胞 / mL に希釈し、 $0.5 \mu\text{L} / \text{mL}$ の Live / Dead Fixable Green Dead Cell Stain (Life Technologies、L - 2301) と共にインキュベートした。次に、細胞を、 $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ (1×10^5 細胞 / ウェル) で U 底 (Falcon 353077) プレートに分注した。プレートを 300g で 5 分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を除去した。プレートを短時間ボルテックスして、細胞を再懸濁させた。ハイブリドーマ上清を FACS 染色バッファ (BSA、BD Biosciences 554657) で $4.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ に希釈し、次いで、最低濃度が $0.006 \mu\text{g} / \text{mL}$ になるように 1 : 3 希釈度で 6 回連続希釈した。マウス抗ヒト CD 3 の陽性対照 (SP34 - 2、BD Biosciences 551916) 及び陰性アイソタイプ対照 (マウス Ig G 1 BD Biosciences 556648) も $4.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ に希釈した。 $50 \mu\text{L}$ の各サンプルを T 細胞に添加し、4 で 1 時間インキュベートした。細胞を、染色バッファで 1 回洗浄し、二次 AF 647 ヤギ抗マウス Ig G (Life Technol

40

50

ologies、A21235)又はAF647ヤギ抗ラットIgG(Life Technologies、A21247)を、適切な種(ハイブリドーマサンプルについては抗ラット、対照抗体については抗マウス)に従って、50µL中10µg/mLで添加した。プレートを4℃で45分間インキュベートし、染色バッファで2回洗浄した。細胞を、25µLのランニングバッファ(染色バッファ+1mMEDTA(Life technologies、AM9260G)+0.1%プルロニックF-68(Life Technologies 24040-032))に再懸濁させ、Intellicytシステム(Intellicyt Corp.)で読み取った。結果を図2及び3に示す。

【0379】

他の実験では、精製ヒトT細胞を、U底プレートに 1.1×10^5 細胞/ウェルでプレーティングした。プレートを300gで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を除去した。プレートを短時間ボルテックスして、細胞を再懸濁させた。ハイブリドーマ上清をFACS染色バッファ(BSA、BD Biosciences 554657)で30µg/mLに希釈し、次いで、最低濃度が0.00017µg/mLになるように1:3希釈度で11回連続希釈した。50µLの各サンプルをT細胞に添加し、4℃で1時間インキュベートした。細胞を染色バッファで1回洗浄し、二次DyLight 650ヤギ抗ラットIgG(Bethyl、A110-239D5)を50µL中10µg/mLで添加した。プレートを4℃で1時間インキュベートし、染色バッファで2回洗浄した。細胞を30µLのFACSバッファに再懸濁させ、Hypercyteフローサイトメータ(Intellicyt Corp.)で読み取った。初代ヒトT細胞に結合する抗CD3クローンの代表的な用量応答曲線を図5に示す。

【0380】

SP34-2(既知のエピトープを有し、カニクイザルCD3と交差反応性である市販の抗ヒトCD3抗体)との代表的な競合結合曲線を図6に示す。初期スクリーニング結果を表8にまとめる。クローンのうちの6つは陽性結合を示し、また、初代ヒトT細胞への結合についてSP34-2と競合する。

【0381】

1-4 SP34-2市販CD3抗体との競合アッセイ

また、既知のエピトープを有し、カニクイザルCD3と交差反応性である、市販の抗ヒトCD3抗体SP34-2と競合する能力について、ハイブリドーマ上清を評価した。最初に、AF488蛍光標識SP34-2(BD、557705)の濃度滴定曲線で実施して、以下の競合アッセイのためにSP34-2の固定濃度を決定した。簡潔に述べると、ヒト精製T細胞を、PBSで 1×10^6 細胞/mLに希釈した。Fcブロック(Human TruStain Fc Block, Biolegend, 422302)を5µL/100µL細胞で添加し、100µL/ウェルでU底プレートにプレーティングした。AF488 SP34-2及びAF488標識されたアイソタイプ対照(AF488マウスIgG1、BD、400129)を、1:2希釈スキームで50µg/mLから0.049µg/mLに連続希釈した。プレートを300xgで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を除去した。プレートを穏やかにボルテックスして、細胞を再懸濁させた。50µLの各AF488 SP34-2希釈液を細胞に添加し、4℃で1時間インキュベートした。プレートを染色バッファで2回、ランニングバッファ(染色バッファ+1mMEDTA(Life technologies、AM9260G)+0.1%プルロニックF-68(Life Technologies 24040-032))で1回洗浄した。細胞を、25µLのランニングバッファに再懸濁させ、HTFCスクリーニングシステム(Intellicyt Corporation)で読み取った。用量応答曲線に基づいて、競合アッセイのために、2µg/mLのSP34-2の固定濃度を選択した。

【0382】

精製T細胞への結合が実証された7つのハイブリドーマを、ヒトT細胞に結合するSP34-2との競合についてアッセイした(図4)。対照抗体を競合アッセイに含めた。非

標識マウス抗ヒトCD3、SP34-2抗体及びマウス抗ヒトCD3、UCHT1抗体を陽性対照として使用し、ラットIgG及びマウスアイソタイプを、AF488標識SP34-2の陰性対照として使用した。精製ヒトT細胞を、PBSで 1×10^6 細胞/mLの濃度に希釈した。細胞100 μ Lあたり5 μ LのFcブロック(Human TruStain Fc Block、Biolegend、422302)及び細胞1mLあたり0.5 μ LのLive/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain(Life Technologies L10120)を細胞に添加し、4で15分間インキュベートした。次に、1ウェルあたり 10^5 個の細胞(1×10^5 細胞/ウェル)を96ウェルU底プレート(Falcon 353077)に分注した。プレートを300 \times gで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を除去した。プレートを穏やかにボルテックスして、細胞を再懸濁させた。ハイブリドーマ上清及び対照抗体を、FACS染色バッファ(BSA、BD Biosciences 554657)で所望の最終濃度の2倍に希釈した。35 μ Lの2 \times ハイブリドーマ上清及び対照抗体を35 μ Lの2 \times AF488 SP34-2(4 μ g/mL)と混合して、所望の1 \times 濃度のハイブリドーマ上清、1 \times 濃度の対照抗体、及び2 μ g/mLのAF488 SP34-2を得た。ハイブリドーマ上清及び対照抗体を、ある濃度範囲で7点滴定を用いてアッセイした。ハイブリドーマ上清は200 μ g/mLから0.08 μ g/mLまでアッセイし、対照抗体は100 μ g/mLから0.04 μ g/mLまでアッセイした。2 μ g/mLのAF488 SP34-2を含む1 \times ハイブリドーマ上清又は1 \times 対照抗体50 μ LをT細胞に添加し、4で2時間インキュベートした。プレートを染色バッファで2回、ランニングバッファ(染色バッファ+1mM EDTA(Life technologies、AM9260G)+0.1%プルロニックF-68(Life Technologies 24040-032))で1回洗浄した。細胞を、25 μ Lのランニングバッファに再懸濁させ、HTFCスクリーニングシステム(IntelliCyt Corporation)で読み取った。SP34-2(既知のエピトープを有し、カニクイザルCD3と交差反応性である、市販の抗ヒトCD3抗体)との代表的な競合結合曲線を図4及び6に示す。初期スクリーニング結果を表8にまとめる。クローンのうちの6つは陽性結合を示し、また、初代ヒトT細胞への結合についてSP34-2と競合した。

10

20

【0383】

図4に示すように、7つの抗体は、同様の曲線でSP34-2と競合した。対照SP34-2に対する曲線の右側シフトは、弱くなる結合親和性を示す。アイソタイプ対照ラットIgGは、予想どおり、SP34-2と競合しなかった。

30

【0384】

【表 10】

表 8. 初代ヒト T 細胞における抗 CD 3 抗体結合のまとめ。抗 CD 3 クローン BLX-4E5、BLX-5H7、BLX-8B4、BLX-8B6、BLX-8G8、及び BLW-1E3 は、ヒト T 細胞への結合について陽性であり、SP34-2 結合と競合した。

Abクローン	ヒトT細胞と結合	SP34-2と競合
BLW-2B4	+	+
BLW-2E6	+	+
BLW-3B4	+	+
BLX-1F8	+	+
BLX-2E9	+	+
BLX-3F4	+	+
BLX-3G8	+	+
BLX-1G10	-	-
BLX-3H6	-	-
BLX-4E5	+	+
BLX-5H7	+	+
BLX-8B4	+	+
BLX-8B6	+	+
BLX-8G8	+	+
BLW-1E3	+	+
BLW-1F1	+	-
BLW-2C4	-	-
BLW-2C11	-	-
BLW-2F9	-	-
BLW-3B5	-	-
BLW-3H5	-	-

10

20

【 0 3 8 5 】

1 - 5 CD 6 9 のアップレギュレーションにより測定したときの T 細胞活性化についてのハイブリドーマヒットのスクリーニング

30

初代ヒト及びカニクイザル T 細胞ベースのアッセイを使用して、ハイブリドーマヒットの T 細胞を活性化する能力を判定した。これは、TCR 活性化の交差連結効果を再現するために、抗体をプレートにコーティングすることによって達成された。活性化の際、T 細胞は、タンパク質、CD 6 9 の表面発現をアップレギュレートすることが知られている。未知のサンプル又は対照（陽性対照：インハウス、Okt-3 B I S B 2 6 4 . 0 0 2、B D B i o s c i e n c e S P - 3 4 - 2 # 5 5 1 9 1 6；陰性対照：抗 CD 2 0、インハウス、B I S B 2 6 6 . 0 0 4）を含む 10 µg / mL の抗体調製物 50 µL を 96 ウェルプレート（C o s t a r # 3 3 6 1）にコーティングすることによって、実験を実施した。プレートを 4 で一晩インキュベートした。翌日、プレートを PBS で 2 回洗浄した。冷凍した初代 T 細胞（ヒトは B i o l o g i c a l S p e c i a l i t i e s 又は H e m a c a r e から供給され；カニクイザルは W o r l d W i d e P r i m a t e s から供給された）を解凍し、生存数について計数し、R P M I 1 6 4 0 培地（10% H I F B S (G i b c o # 1 0 0 6 2) を含む G i b c o # 1 1 8 7 5) 中に 2×10^6 細胞 / mL で再懸濁させた。100 µL の細胞をプレートに添加し、37C、5% CO₂ で一晩（約 16 時間）インキュベートした。翌日、プレートを 1300 rpm で 3 分間回転させて細胞をペレット化し、上清を廃棄した。細胞を PBS で 1 回洗浄し、既に述べた通り回転させた。PBS 中 Live / Dead Green Fixable Dye (L i f e T e c h n o l o g i e s # L 2 3 1 0 1) の 2.5% 溶液 10 µL を各ウェルに添加し、室温及び暗所で 10 分間インキュベートした。次に、F A C S バッファ (B D B i o s c i e n c e s # 5 5 4 6 5 7) 中抗 CD 6 9 A F 4 8 8 (

40

50

Biolegend #310916ロット#B125271)の1%溶液50 μ Lを添加し、プレートを4で45分間インキュベートした。既に述べた通り細胞をペレット化し、上清を廃棄し150 μ LのFACSバッファに再懸濁させることによって、プレートを2回洗浄した。最後の洗浄後、細胞を150 μ LのFACSバッファに再懸濁させ、FACS Cantoで読み取った。図20にみられるように、抗CD69染色の測定された平均蛍光強度によって示されるように、陽性対照cOkt3及びSP34-2は、ヒトT細胞におけるCD69のアプレギュレーションを誘導した。SP34-2のみがカニクイザルT細胞でCD69発現を誘導したが、これは、サルからヒトまで保存されているCD3配列の領域に結合するためである。OKT3抗CD3クローンは、カニクイザルCD3に結合せず、CD69のアプレギュレーションを誘導しなかった。ヒト及びカニクイザルT細胞の両方における陰性対照は、T細胞で発現しない抗CD20であった。T細胞活性化について試験したハイブリドマクローンのうちのいくつかは、陽性対照と同様の程度まで、すなわち2B4、2E6、3B4、1F8、2E9、3F4、3G8、4E5、5H7、8B4、8G8、及び1F1と同様の程度までCD69発現を誘導した。また、5H7、8B4、及び8G8を除いて、ほとんどは、カニクイザルT細胞に結合し、活性化した。

10

【0386】**1-6 BLW-2E6のフレームワーク遺伝子操作**

クローンは、ヒト免疫グロブリン生殖細胞系列の配列と比較して高い相同性を示し、フレームワーク変異を有していた(図1A及び1B)。クローン2E6を選択して、標準的なフレームワーク配列を適合させた。HCにおける6つの変異及びLCにおける7つの変異全てを個々に又は組み合わせてヒト生殖細胞系列配列に復帰変異させた(表9)。変異したV領域DNA配列を合成し、その親コンストラクトと同じ哺乳類発現ベクターにクローニングした。HC及びLCコンストラクトをマトリックスフォーマットを介して対にして、個々の又は組み合わせの変異を有するタンパク質を生成し、タンパク質活性を試験した。LCにおけるV48は、生殖細胞系列に変更し戻すことができなかった。他の全ての復帰変異は、重大なものではなかったが、ある程度まで活性を低下させた。

20

【0387】

【表 1 1】

表 9. BLW-2E6 フレームワーク変異体。

重鎖のヒト生殖細胞系列への復帰変異	ペプチドID
WT	CD3H219
R10G	CD3H225
R13K	CD3H226
V73I	CD3H227
R79K	CD3H228
T83S	CD3H229
L96V	CD3H230
R10G/R13K/V73I/R79K/T83S/L96V	CD3H231
軽鎖のヒト生殖細胞系列への復帰変異	ペプチドID
WT	CD3L124
D43G	CD3L128
V48L	CD3L129
L49M	CD3L130
L50I	CD3L131
S62N	CD3L132
Q85E	CD3L133
H89Y	CD3L134
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E	CD3L135
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y	CD3L137
D43G/V48L/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y	CD3L136
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y/C91V	CD3L197

10

20

30

40

50

【0388】

1つのハイブリドーマクローン、BLW-2E6に対してフレームワーク変異で遺伝子操作した結果、80個の変異体クローンが得られ、そのうちのいくつかを表10に示す。80個の変異体クローンを、初代ヒトT細胞への結合についてアッセイした(図7及び8)。T細胞を計数し、 1×10^6 細胞/mLに希釈し、細胞100 μ Lあたり5 μ LのFcブロック(Human TruStain Fc Block、Biolegend、422302)及び細胞100 μ Lあたり0.5 μ /mLのLive/Dead Fixable Green Dead Cell Stain(Life Technologies、L-2301)と共にインキュベートした。次に、細胞を、100 μ L/ウェル(1×10^5 細胞/ウェル)で96ウェルU底プレート(Falcon 353077)に分注した。プレートを300 \times gで5分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を除去した。プレートを穏やかに短時間ボルテックスして、細胞を再懸濁させた。ハイブリドーマ上清をFACS染色バッファ(BSA、BD Biosciences 554657)で7.5 μ g/mL、1.5 μ g/mL、0.3 μ g/mL、及び0.06 μ g/mLに希釈した。50 μ Lの各サンプルをT細胞に添加し、4で1時間インキュベートした。細胞を染色バッファで1回洗浄し、5 μ g/mLの二次AF647ヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂(Jackson ImmunoResearchカタログ109-605-097)50 μ Lを細胞に添加した。プレートを4で45分間インキュベートし、染色バッファで2回、ランニングバッファ(染色バッファ+1mM EDTA(Life technologies、AM9260G)+0.1%ブルニックF-68(Life Technologies 24040-032))で1回洗浄した。細胞を、25 μ Lのランニングバッファに再懸濁させ、HTFCスクリーニングシステム(IntelliCyt Corporation)で読み取った。結果は、位置48におけるLCの変化が結合を無効にし、その結果、変異が持ち越されなかったことを示す。全ての位置が生殖系列に戻ったHC(CD3H231)では、結合のわずかな減少がみられた。

【0389】

1-7 BLW-2E6 LCのC91スキニング

クローン2E6及びその誘導体は、発現が乏しく、タンパク質の凝集が観察された。軽鎖の1つの残基、C91は、翻訳後修飾(PTM)リスクを有すると予測され、タンパク質の安定性を改善するために他の全ての可能なアミノ酸を変異させた(表10)。変異したV領域DNA配列を合成し、その親コンストラクトと同じヒト発現ベクターにクローニングした。SPR結果は、位置91におけるバリン又はロイシンに対する変化が、結合親和性を劇的には変化させないことを示した。この変化は野生型配列にも組み込まれ、上記フレームワーク適応の結果、抗体CD3B376(CD3H219/CD3L150)及びCD3B450(CD3H231/CD3L197)が得られた。CD3B376及びCD3B450をIgG4PAAとしてクローニングした(S228P、F234A、L235A変異を有するIgG4)。

10

【0390】

CD3B376の配列情報を以下に提供する:

CD3H219 HCアミノ酸配列(配列番号640):

QVQLQQSGPRLVLRPSQTLSTCAISGDSVFNNAAWSWIR
QSPSRGLEWLGRTYYSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRN
QFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDFYWGQGTLLVTVSS
ASTKGPSPVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEAAGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD
DGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGK

20

【0391】

CD3H219 HC核酸配列(配列番号712)

caggctgcagctgcagcagctctggccctagactcgtgcgg
ccttcccagaccctgtctctgacctgtgccatctccggcg
actccgtgttcaacaaacggccctgggtcctggatccg
gcagagcccttctagaggcctggaaatggctggggccggacc
tactaccgggtccaagtggctgtacgactacggcgtgtccg
tgaagtcccggatcacccgtgaaccctgacaccctcccggaa
ccagttcacccctgcagcctgaacctcgtgacccctgaggac
accgcccctgtactactgcgccagaggctactcctcctcct
tcgactattgggggccagggccaccctcgtgaccggtgtcctc
t

30

【0392】

CD3L150 LCアミノ酸配列(配列番号676):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQ
HPDKAPKVLLEYVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGL
QAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAAPSVT
LFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK
AGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTH
EGSTVEKTVAPTECS

40

【0393】

CD3L150 LC核酸配列(配列番号713)

cagctctgctctgaccagcctgcctccgtgtcttggtctct

50

c c c g g c c a g t c c a t c a c c a t c a g c t g t a c c g g c a c c t c c t
 c c a a c a t c g g c a c c t a c a a g t t c g t g t c c t g g t a t c a g c a
 g c a c c c c g a c a a g g c c c c c a a a g t g c t g c t g t a c g a g g t g
 t c c a a g c g g c c c t c t g g c g t g t c c t c c a g a t t c t c c g g c t
 c c a a g t c t g g c a a c a c c g c c t c c c t g a c c a t c a g c g g a c t
 g c a g g c t g a g g a c c a g g c c g a c t a c c a c t g t g t g t c c t a c
 g c t g g c t c t g g c a c c c t g c t g t t t g g c g g a g g c a c c a a g c
 t g a c c g t g c t g

【0394】

CD3H219のVHアミノ酸配列(配列番号652):

10

q v q l q q s g p r l v r p s q t l s l t c a i s g d s v f n n n a a w s w i r
 q s p s r g l e w l g r t y y r s k w l y d y a v s v k s r i t v n p d t s r n
 q f t l q l n s v t p e d t a l y y c a r g y s s s f d y w g q g t l v t v s s

【0395】

CD3L150のVLアミノ酸配列(配列番号661):

q s a l t q p a s v s g s p g q s i t i s c t g t s s n i g t y k f v s w y q q
 h p d k a p k v l l y e v s k r p s g v s s r f s g s k s g n t a s l t i s g l
 q a e d q a d y h c V s y a g s g t l l f g g g t k l t v l

【0396】

CD3H219のHCDR1(配列番号662): NNNAAWS

20

【0397】

CD3H219のHCDR2(配列番号663): RTYYRSKWLYDYAVSVKS

【0398】

CD3H219のHCDR3(配列番号664): GYSSSSFYD

【0399】

CD3L150のLCDR1(配列番号671): TGTSSNIGTYKFVS

【0400】

CD3L150のLCDR2(配列番号673): EVSKRPS

【0401】

CD3L150のLCDR3(配列番号690): VSYAGSGTLL

30

【0402】

CD3B450の配列情報を以下に提供する:

CD3H231 HCアミノ酸配列(配列番号675):

Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C A I S G D S V F N N N A A W S W I R
 Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W L Y D Y A V S V K S R I T I N P D T S K N
 Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A R G Y S S S F D Y W G Q G T L V T V S S
 A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T
 Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V
 F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D
 G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K
 C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
 N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S
 D G S F L L Y S K L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 L S L S L G K

40

【0403】

CD3H231 HC核酸配列(配列番号714):

c a g g t g c a g c t g c a g c a g a g c g g c c c c g g c c t g g t c a a g c
 c c a g c c a g a c c c t g a g c c t g a c c t g c g c c a t c a g c g g c g a

50

c a g c g t g t t c a a c a a c a a c g c c g c c t g g t c c t g g a t c c g c
c a g a g c c c c a g c c g c g g c c t g g a g t g g c t g g g c c g c a c c t
a c t a c c g c a g c a a g t g g c t g t a c g a c t a c g c c g t g t c c g t
g a a g t c c c g c a t c a c c a t c a a c c c c g a c a c c a g c a a g a a c
c a g t t c t c c c t g c a g c t g a a c a g c g t g a c c c c c g a g g a c a
c c g c c g t g t a c t a c t g c g c c c g c g g c t a c a g c a g c a g c t t
c g a c t a c t g g g g c c a g g g c a c c c t g g t c a c c g t g t c c a g c
【0404】

CD3L197 LCアミノ酸配列(配列番号677):

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S N I G T Y K F V S W Y Q Q
H P G K A P K V M I Y E V S K R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L T I S G L
Q A E D E A D Y Y C V S Y A G S G T L L F G G G T K L T V L G Q P K A A P S V T
L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K
A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T
H E G S T V E K T V A P T E C S

10

【0405】

CD3L197 LC核酸配列(配列番号715):

C a g t c t g c t c t g a c c c a g c c t g c c t c c g t g t c t g g c t c t
c c c g g c c a g t c c a t c a c c a t c a g c t g t a c c g g c a c c t c c t
c c a a c a t c g g c a c c t a c a a g t t c g t g t c c t g g t a t c a g c a
g c a c c c c g g c a a g g c c c c c a a a g t g a t g a t c t a c g a g g t g
t c c a a g c g g c c c t c c g g c g t g t c c a a c a g a t t c t c c g g c t
c c a a g t c c g g c a a c a c c g c c t c c c t g a c a a t c a g c g g a c t
g c a g g c c g a g g a c g a g g c c g a c t a c t a c t g t g t g t c c t a c
g c c g g c t c t g g c a c c c t g c t g t t t g g c g g c g g a a c a a a g c
t g a c c g t g c t g

20

【0406】

CD3H231のVHアミノ酸配列(配列番号657): q v q l q q s g p g l v k
p s q t l s l t c a i s g d s v f n n n a a w s w i r q s p s r g l e w l g r t
y y r s k w l y d y a v s v k s r i t i n p d t s k n q f s l q l n s v t p e d
t a v y y c a r g y s s s f d y w g q g t l v t v s s

30

【0407】

CD3L197のVLアミノ酸配列(配列番号678):

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S N I G T Y K F V S W Y Q
Q H P G K A P K V M I Y E V S K R P S G V S N R F S G S K S G N T A S L T I S G
L Q A E D E A D Y Y C V S Y A G S G T L L F G G G T K L T V L

【0408】

CD3H231のHCDR1(配列番号662): N N N A A W S

【0409】

CD3H231のHCDR2(配列番号663): R T Y Y R S K W L Y D Y A V S V
K S

40

【0410】

CD3H231のHCDR3(配列番号664): G Y S S S F D Y

【0411】

CD3L197のLCDR1(配列番号671): T G T S S N I G T Y K F V S

【0412】

CD3L197のLCDR2(配列番号673): E V S K R P S

【0413】

CD3L197のLCDR3(配列番号690): V S Y A G S G T L L

【0414】

50

【表 1 2】

表 1 0. C 9 1 スキャニングによる B L W - 2 E 6 L C の遺伝子操作された変異体

C91スキャニング	ペプチドID
CD3 2E6 LC	CD3L124
CD3 2E6 LC、C91S	CD3L146
CD3 2E6 LC、C91G	CD3L147
CD3 2E6 LC、C91E	CD3L148
CD3 2E6 LC、C91D	CD3L149
CD3 2E6 LC、C91V	CD3L150
CD3 2E6 LC、C91A	CD3L151
CD3 2E6 LC、C91R	CD3L152
CD3 2E6 LC、C91K	CD3L153
CD3 2E6 LC、C91N	CD3L154
CD3 2E6 LC、C91M	CD3L155
CD3 2E6 LC、C91I	CD3L156
CD3 2E6 LC、C91T	CD3L157
CD3 2E6 LC、C91W	CD3L158
CD3 2E6 LC、C91Y	CD3L159
CD3 2E6 LC、C91L	CD3L160
CD3 2E6 LC、C91F	CD3L161
CD3 2E6 LC、C91Q	CD3L162
CD3 2E6 LC、C91H	CD3L163
CD3 2E6 LC、C91P	CD3L164

10

20

【 0 4 1 5 】

1 - 8 ProteOn SPRによるhCD3 コンストラクトに対するBLW-2E6 CD3mAbの結合

C末端Tencon25融合体を含む組換えヒトCD3 (1-27) (Janssen production、hCD3 (1-27) - Tn25と称される) に対する、軽鎖及び/又は重鎖に点変異を有するBLW-2E6抗CD3mAbの結合を、ProteOn SPR (Bio-Rad) により測定した。0.005% Tween-20を含有するPBS中流量30µL/分で、GLC Sensor Chip (Bio-Rad、カタログ番号176-5011) に垂直に配向された6つのリガンドチャンネル全てにおいて、酢酸バッファ、pH5.0中30µg/mLでのアミンカップリングを介して、ヤギ抗ヒトFc IgG (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-005-098) を直接固定化した。固定化密度は、平均で約6000応答単位 (RU) であり、異なるチャンネル間の変動は5%未満であった。垂直リガンド配向で1.5µg/mL (1000~1250RU) において抗ヒトFc IgG表面に5つの異なるmAbを捕捉し、6番目のリガンドチャンネルは、リガンドなし表面对照であった。5つの濃度の3倍希釈系列中1µM濃度のhCD3 (1-27) - Tn25をアナライトとして流して、捕捉されたmAbに水平配向で結合させた。また、捕捉されたmAbの解離及びベースラインでの安定性をモニタリングするために、6番目のバッファサンプルを注入した。hCD3 (1-27) - Tn25の全濃度について、100µL/分の流量で30分間解離相をモニタリングした。抗原及び結合mAbを除去するために18秒パルス0.8%リン酸を用いて、次の相互作用サイクルのために結合表面を再生した。応答データから次の2セットの基準データを減算することによって生データを処理した：1) Agと空のチップ表面との間での非特異的相互作用を補正するためのスポット間シグナル；2) 経時的な捕捉されたmAb表面の解離に起因するベースラインの揺れを補正するためのバッファチャンネルシグナル。各mAbについて全濃度において処理したデータを1:1の単純なラングミュア結合モデルにグローバルフィットさせて、反応速度定数 (k_{on} 、 k_{off}) 及び親和性 (K_D) 定数の推定値を抽出した。結果を表11に与える。

30

40

50

【 0 4 1 6 】

【 表 1 3 】

表 1 1. hCD3 ϵ (1-27) - Tn25 (N=1) に結合するBLW-2E6
変異体の反応速度／親和性のまとめ

タンパク質 AA ID	重鎖	軽鎖	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)	HC変異	LC変異
C3B312	CD3H219	CD3L124	9.08E+04	1.87E-03	20.6	野生型	野生型
CD3B376	CD3H219	CD3L150	1.02E+05	2.37E-03	23.3	野生型	C91V
該当なし	CD3H219	CD3L160	9.84E+04	4.05E-03	41.1	野生型	C91L
該当なし	CD3H219	CD3L137	6.13E+04	2.02E-03	32.9	野生型	D43G/L49M /L50I/S62N /Q85E/ H89Y
CD3B334	CD3H231	CD3L137	6.96E+04	5.54E-03	79.6	R10G/R13K /V73I/R79K /T83S/L96V	D43G/L49M /L50I/S62N /Q85E/ H89Y

10

N / A = 該当なし

【 0 4 1 7 】

1 - 9 ヒトT細胞に対する抗CD3モノクローナル抗体の結合

CD3B376及びCD3B450のヒトT細胞に対するインビトロ結合親和性を、抗原特異的標的アームとの交差後にフローサイトメリーによって判定した。抗CD3トレーサー分子(KdT)の飽和結合定数を求めるために、ヒトT細胞に対して予備試験を実施した。次いで、滴定された濃度の試験mAbを用いる競合結合アッセイにおいて、固定濃度のトレーサー([T])を使用した。試験分子のIC50(50%阻害が達成される濃度)値を使用して、以下の式： $K_d = IC50 / (1 + ([T] / K_d T))$ を使用して結合親和性(K_d)を求めた。5人のヒトドナーを使用して、トレーサー、市販のAlexaFluor488 SP34-2抗CD3(BioScience#557705)の飽和結合定数(K_dT)を求めた(データは示さず)。

20

【 0 4 1 8 】

トレーサーの飽和結合定数(K_dT)の決定

方法：ヒト汎T細胞を、使用するまで窒素タンク内で低温保存した。T細胞を解凍し、PBSで洗浄し、FACS染色バッファに再懸濁させ、計数し(生存率に留意して)、 0.5×10^6 細胞/mLで再懸濁させた。Far Red Live/Dead stain(Life Technologies、AKA Invitrogen #L34974)(バイアルに50 μ LのDMSO)を 1×10^6 細胞あたり1 μ Lで添加し；FcRブロッカー(Miltenyi Biotec#130-059-901)(0.5×10^6 あたり1:20希釈液1mL)をそれぞれ10分間にわたって細胞に添加した。細胞を50,000細胞/ウェルでプレティングし、洗浄した。漸増濃度のAlexaFluor488 SP-34抗CD3を4で2時間にわたってT細胞に添加した。細胞を洗浄して非結合抗体を除去し、15分間固定し、洗浄し、1mM EDTAを含有するFACS染色バッファ中に再懸濁させた。

30

40

【 0 4 1 9 】

iQue Intellicyte Flow Cytometerを使用して結合を測定した。T細胞集団、続いて細胞個片、続いて生細胞(FL4)について細胞をゲーティングした。各ウェルについて、染色の幾何平均(FL1)を求めた。

【 0 4 2 0 】

得られた平均蛍光強度値を抗体分子濃度の関数としてプロットし、一部位結合分析(全結合)においてPrismソフトウェアを使用して分析した(図9)。ソフトウェアは、質量作用の法則に従う受容体(ヒト汎T細胞上のCD3)への抗体分子の結合を説明する、対応するK_d値を計算する。式は以下の通りである： $Y = (B_{max} \times X) / (K_d +$

50

X) ; (式中、 B_{max} は最大結合であり、 K_d は、最大半量結合に達するのに必要なリガンドの濃度である)。

【0421】

結果：各ドナーについて K_d 値を導出し、平均値を得た。ヒト T 細胞についての飽和結合定数 ($K_d T$) は、 $5.6 \pm 1.0 \text{ nM}$ ($n = 4$) であると導出され、 K_d 結合親和性を求めるために既に述べた式で使用した。

【0422】

競合アッセイによる抗 CD3 mAb の結合親和性の決定

方法：CD3 に対する二価抗体を用いて競合結合試験を行った。

・抗 CD3 二価：CD3 B376 及び CD3 B450 (図 10)

ヒト汎 T 細胞を使用して、試験 mAb の結合親和性を求めた。使用したトレーサーは、市販の AlexaFluor488 SP-34 抗 CD3 (BioScience # 557705) であり、このトレーサーの飽和結合定数は上記の通りである。

【0423】

T 細胞を、使用するまで窒素タンク内で低温保存した。T 細胞を解凍し、PBS で洗浄し、FACS 染色バッファに再懸濁させ、生存率に留意して計数し、 0.5×10^6 細胞/mL で再懸濁させた。Far Red Live/Dead stain (Life Technologies、AKA Invitrogen # L34974) (パイアルに $50 \mu\text{L}$ の DMSO) を 1×10^6 細胞あたり $1 \mu\text{L}$ で添加し；FcR ブロッカー (Miltenyi Biotec # 130-059-901) (0.5×10^6 あたり 1 : 20 希釈液 1 mL) をそれぞれ 10 分間にわたって細胞に添加した。細胞を $50,000$ 細胞/ウェルでプレATING し、洗浄した。

【0424】

mAb (及びアイソタイプ対照) を、出発濃度 1000 又は $200 \mu\text{g/mL}$ ($2 \times$) から 1 : 2 連続希釈し、固定濃度 ($5 \mu\text{g/mL}$; $2 \times$) のトレーサーと一緒に混合して、 $1 \times$ 濃度を得た。したがって、トレーサーの最終濃度 ($1 \times$) は、 $2.5 \mu\text{g/mL} = 16.6 \text{ nM}$ であった。混合物を 4 で 2 時間にわたって T 細胞に添加した。次いで、細胞を洗浄して非結合抗体を除去し、15 分間固定し、洗浄し、 1 mM EDTA を含有する FACS 染色バッファ中に再懸濁させた。

【0425】

iQue Intellicyte Flow Cytometer を使用して結合を測定した。T 細胞集団、続いて細胞個片、続いて生細胞 (FL4) について細胞をゲーティングした。各ウェルについて、染色の幾何平均 (FL1) を求めた。取得した平均蛍光強度値を \log 抗体分子濃度 (nM に変換) の関数としてプロットし、それから EC50 / IC50 値 (nM) が導出されるシグモイド用量応答 (可変勾配) において Prism ソフトウェアを使用して分析した。以下の式： $K_d = IC50 / (1 + ([T] / K_d T))$) を用いて結合親和性 (K_d) を導出した。式中、 K_d は、競合相手 (非標識分子) の親和性であり、試験化合物の IC50 は nM 単位であり、 $[T]$ は、トレーサーの濃度 (16.6 nM) であり、 $K_d T$ は、飽和結合によって決定されるトレーサーの K_d である (ヒトについては 5.6 nM)。

【0426】

モノクローナル及び二重特異性抗体の産生

本発明の二重特異性 CD3 抗体は、Labrijn et al., 2013, PNAS, vol. 110 (13) : 5145 - 5150 ; 国際公開第 2011 / 131746 号 ; 又は Labrijn et al., 2014, Nat Protoc, 9 (10) : 2450 - 63 に記載の通り、制御された Fab アーム交換 (FAE) によって生成され得る。簡潔に述べると、このインビトロ法では、2 つの完全長親二価抗体が提供され、各々がヘテロダイマー形成に好都合な抗体 CH3 領域における変異を含み、その結果、各々の親抗体由来の半アームを含有する二重特異性抗体が得られる。ヘテロダイマー形成に好都合になるように使用され得る変異は、IgG1 抗体の場合、一方の親抗体では F40

10

20

30

40

50

5 L、他方の親抗体では R 4 0 9 K であるか、又は I g G 4 抗体の場合、野生型 C H 3 を保持しながら、一方の親抗体で F 4 0 5 L 及び K 4 0 9 R である。

【 0 4 2 7 】

単一特異性抗体を、C M V プロモータ下において H E K 細胞株中で発現させた。

【 0 4 2 8 】

親抗体を、1 0 0 m M N a A c p H 3 . 5 の溶出バッファ、並びに 2 M T r i s p H 7 . 5 及び 1 5 0 m M の N a C l の中和バッファを用いたプロテイン A カラムを使用して精製した。P D 1 0 (S e p h a d e x G 2 5 M) カラムを用いて m a b を脱塩し、D - P B S、p H 7 . 2 バッファに透析した。

【 0 4 2 9 】

精製後、親抗体を、7 5 m M システアミン - H C l 中の還元条件下で混合し、3 1 で 4 時間インキュベートした。組換え反応はモル濃度比に基づいており、設定量の標的親（例えば、1 0 m g 又は約 7 1 . 8 ナノモル）を C D 3 抗体（例えば、約 6 7 . 8 ナノモル）と組み合わせ、標的親抗体を C D 3 抗体の 6 % 過剰で添加した。その後、組換え物を P B S に対して透析して、還元剤を除去した。組換え後に残存する未反応の C D 3 親抗体の量を最小化するために、過剰な標的親抗体（比）を用いて二重特異性抗体反応を行った。親 m A b の部分的な減少に続いて、P B S 中に一晚透析することによって還元剤を除去した。

【 0 4 3 0 】

結果：図 1 0 は、A l e x a F l u o r 4 8 8 S P - 3 4 抗 C D 3 トレーサー抗体に対する結合についての競合について、二価及び一価抗 C D 3 コンストラクト、C D 3 B 3 7 6 及び C D 3 B 4 5 0 の阻害曲線を示す。漸増濃度の試験抗 C D 3 抗体は、A l e x a F l u o r 4 8 8 トレーサー抗体の結合を減少させ、したがって、平均蛍光強度（M F I）を減少させる。I C 5 0 値を生成し、前述の式を使用して、 K_d 親和性を計算し、表 1 3 にまとめた。

【 0 4 3 1 】

C D 3 B 3 7 6 結合部位は、二価及び一価の両方の形態で C D 3 B 4 5 0 よりも強固であった。

【 0 4 3 2 】

【表 1 4】

表 1 3 . 抗 C D 3 二価及び一価 C D 3 B 3 7 6 及び C D 3 B 4 5 0 コンストラクトの I C 5 0 及び K_d 親和性値

コンストラクト	抗CD3	IC50(nM)	K_d (nM)
二価	CD3B376	29	7.3
	CD3B450	60	15
一価コンストラクト	CD3B376	409	103
	CD3B450	1011	254

【 0 4 3 3 】

1 - 1 0 抗 C D 3 モノクローナル抗体の配座安定性

抗 C D 3 抗体 C D 3 B 3 7 6、C D 3 B 3 8 9 (C D 3 B 3 7 6 の I g G 1 パービジョン；重鎖は配列番号 7 2 9 であり；軽鎖は配列番号 6 7 6 である)、C D 3 B 4 5 0、及び C D 3 B 4 6 7 (C D 3 B 4 5 0 の I g G 1 パービジョン；重鎖は配列番号 7 2 8 であり；軽鎖は配列番号 6 7 7 である) の配座安定性を示差走査熱量測定 (D S C) によって判定した。熱転移の midpoint T_m を、A b 候補のそれぞれの熱変性プロファイルから決定した。図 1 2 A ~ 図 1 2 E は、P B S 中の抗 C D 3 抗体の熱変性プロファイルを示す。表 1 4 は、D S C によって決定したときの抗 C D 3 抗体の熱的アンフォールディングについての T_m 及びエンタルピー値 (ΔH) のまとめを含む。

【 0 4 3 4 】

D S C 結果は、全ての抗 C D 3 抗体 C D 3 B 3 7 6、C D 3 B 3 8 9、C D 3 B 4 5 0

10

20

30

40

50

、及びCD3B467が折り畳まれたドメインを有することを示す。アンフォールディングの開始に基づいて、各抗体の相対的安定性は以下の通りであった：CD3B389 < CD3B467 < CD3B376 < CD3B450。DSCによって試験した抗CD3分子は、その熱安定性においてある程度の差を示した。CD3B376 (IgG4 PAA) 分子は、59.7、62.4、及び69.2 で3つの部分的に未分解転移を示し、アンフォールディングの全エンタルピーは417.6 kcal/molであったが、CD3B450 (IgG4 PAA) 分子は、62.5及び66.3 で2つの未分解転移を示し、アンフォールディングの全エンタルピーは545.1 kcal/molであった。CD3B389 (IgG1) 分子は、54.6、58.2、73.1、及び77.1 で4つの転移を示し、アンフォールディングの全エンタルピーは401.7 kcal/molであったが、CD3B467 (IgG1) 分子は、56.3、59.6、66.5、及び75.6 で4つの転移を示し、アンフォールディングの全エンタルピーは406.2 kcal/molであった。

10

【0435】

【表15】

表14. PBS中の抗CD3抗体の熱転移データのまとめ。値は、2回の実行の平均を表す。HC及びLCペプチド (括弧内は配列番号) についての配列情報を提供する。

	CD3B376 HC: 配列番号640 LC: 配列番号676		CD3B450 HC: 配列番号675 LC: 配列番号677		CD3B389 HC: 配列番号729 LC: 配列番号676		CD3B467 HC: 配列番号728 LC: 配列番号677	
	平均	エラー	平均	エラー	平均	エラー	平均	エラー
Tm1(°C)	59.7	0.1	62.5	0.9	54.6	0.1	56.3	0.1
ΔH1(cal/mol)	151900.0	4200.0	158175.0	64025.0	166150.0	2450.0	98160.0	17840.0
Tm2(°C)	62.4	0.1	66.3	0.2	58.2	0.1	59.6	0.0
ΔH2(cal/mol)	202200.0	4300.0	386900.0	71000.0	62050.0	1290.0	72900.0	370.0
Tm3(°C)	69.2	0.0	NA	NA	73.5	0.1	66.5	0.0
ΔH3(cal/mol)	63450.0	2080.0	NA	NA	101900.0	1600.0	92785.0	6785.0
Tm4(°C)	NA	NA	NA	NA	77.1	0.0	75.6	0.1
ΔH3(cal/mol)	NA	NA	NA	NA	71560.0	2500.0	142400.0	4800.0
Total ΔH	601000.0	NA	545075.0	NA	401660.0	NA	406245.0	NA

20

30

【0436】

2つのIgG1抗体は、対応するIgG4 PAA抗体と比較 (同じ可変ドメインを有する分子を比較) してより低い安定性を示し、第1の転移のTmは5~6 低い (図13A及び図13B及び表14)。

【0437】

1-11 CD3eのN末端ペプチドとの複合体におけるCD3B334 Fabの結晶構造

40

抗CD3 mAb CD3B334 (CD3H231/CD3L137) を改変して、抗体中の多数のフレームワーク残基をヒト生殖系列残基で置き換えることによって、「ヒト度」指数を増加させた。この手順により、以下の変異を有する抗体CD3B334が得られた：親VL CD3L124と比較したとき、VLにおいてD43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y、親VH CD3H219と比較したとき、VHにおいてR10G/R13k/V73I/R79K/T83S/L96V。CD3B334のHisタグ付きFab断片を、HEK293 Exp i細胞において発現させ、アフィニティークロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。ヒトCD3eのN末端の9merペプチドを、New England Peptide (口

50

ットV1108-19/21)で合成し、モル比10:1(ペプチド過剰)でFabと混合した。0.1M Tris、pH8.5中4Mギ酸ナトリウムを含有する溶液から蒸気拡散法により複合体を結晶化させた。結晶は、66.5×69.4×100.4の単位格子寸法及び非対称ユニット内の1つの複合分子を有する斜方晶空間群P212121に属する。検索モデルとしてFabの結晶構造を使用して、分子置換法により1.8の分解能でこの複合体の構造を決定した。

【0438】

CD3B334は、CD3eの残基1~6に結合した。ペプチドのN末端Glnは、ピログルタミン酸塩形態であり、疎水性環境では、HCDR3のF107とLCDR3のL99との間にあった(図18)。HCDR2からの2つのアルギニン残基R52及びR56を、CD3の酸性残基と静電相互作用で会合させた。合計で、16残基がCD3B334パラトープを形成した。LCDR2を除く全てのCDRからの残基が、CD3ペプチドと直接接触していた(4以内の距離)(図19を参照)。

10

【0439】

2 PSMA抗体

2-1 PSMA細胞株の生成

標準的な分子生物学技術を使用して、CMVプロモータを含むインハウス発現ベクターを使用して、抗PSMAリードを評価するためのスクリーニングツールとして使用するために、完全長チンパンジーPSMA(H2Q3K5__PANTR、配列番号49)又は完全長カニクイザルPSMA(EHH56646.1、配列番号50)を提示する発現ベクターを生成した。標準的な方法を使用して、ベクターを懸濁液中のHEK293F細胞に一過的にトランスフェクションした。トランスフェクトされた293F懸濁細胞を、増殖培地+血清中にプレティングしたところ、接着性になり、安定したプラスミドの組み込みについて選択した。単一細胞集団を連続希釈により選択し、(アイソタイプ対照としてのR-PE抗ウサギ二次抗体(カタログ番号#111-116-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.)及びウサギポリクローナルIgG(カタログ番号SC-532, Santa Cruz Biotechnology)と共に、一次抗体としてPSMAL抗体(Center)親和性精製ウサギポリクローナル抗体(カタログ番号OAB02483, Aviva Systems Biology)を使用して、PSMA表面受容体の発現をFACSにより定量した。

20

30

【0440】

完全長ヒトPSMA(FOLH1__HUMAN、配列番号51)及びPSMA陽性細胞を選択するためのピューロマイシンを含有するレンチウイルス(Genecopoeia、カタログ番号EX-G0050-Lv105-10)を使用して、ヒトPSMA発現細胞株を生成した。PSMAについて陰性であるHEK293F細胞(ATCC)に、レンチウイルス粒子を形質導入して、ヒトPSMAを過剰発現させた。形質導入後、プールされた細胞を処理することによって、PSMA及び耐性マーカーを陽性発現している細胞を選択し、DMEM+10%HI FBS(Life Technologies)中で増殖させ、様々な濃度のピューロマイシン(Life Technologies)を補給した。

40

【0441】

HEK生成細胞株に加えて、いくつかの市販の細胞株を、ファージバニング及び結合及び細胞傷害アッセイに使用した。LNCaPクローンFGC細胞(ATCCカタログ番号CRL-1740)は、市販のヒト前立腺癌細胞株である。C4-2B細胞は、元々MD Andersonで開発されたものであり、インビボで増殖させ、骨髄に転移したLNCaP FGCに由来する(Thalman, et al 1994, Cancer Research 54, 2577-81)。

【0442】

2-2 可溶性PSMA ECDタンパク質の生成

50

組換えチンパンジー P S M A 細胞外ドメイン (E C D) タンパク質 (C h i m p P S M A E C D、配列番号 5 2) をパニングのために生成し、標準的な分子生物学的技術を使用し、C M V プロモータを含むインハウス発現ベクターを使用して抗 P S M A リードを評価した。N 末端シグナル配列 (配列番号 5 9 4)、N 末端 A v i タグ (配列番号 5 9 5)、及び 6 - H i s タグ (配列番号 5 9 6) を含むチンパンジー P S M A E C D 遺伝子断片 (配列番号 4 9 のアミノ酸 4 4 ~ 7 5 0) を、標準的な分子生物学的技術を使用し、C M V プロモータを含むインハウス発現ベクターを使用してクローニングし、2 9 3 E x p i 細胞 (I n v i t r o g e n) で一過的に発現させた。遺伝子合成技術を使用して c D N A を調製した (米国特許第 6 , 6 7 0 , 1 2 7 号、米国特許第 6 , 5 2 1 , 4 2 7 号)。上清を回収し、遠心分離して清澄化した。タンパク質を、1) H i s T r a p H P カラム (G E H e a l t h c a r e) を用いた I M A C 精製、及び 2) サイズ排除精製 (S u p e r d e x 2 0 0、G e H e a l t h c a r e) の 2 段階精製プロセスを用いて精製し、ここでの溶出バッファは、P S M A のダイマー化を安定させるために 0 . 5 m M Z n C l ₂ を含有するダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、カルシウム、マグネシウム (T h e r m o f i s h e r、# 1 4 0 4 0) である。対象とするタンパク質を含む画分をプールし、タンパク質濃度を A 2 8 0 によって測定した。この材料を、結合及び親和性の測定のために使用し、P S M G 8 と称する。

10

【 0 4 4 3 】

チンパンジー P S M A E C D もパニングのためにビオチン化した。A v i タグを含有するタンパク質をビオチン化するために哺乳類細胞にコトランスフェクトする B i r A プラスミドを、インハウスで作製した。B i r A コード領域 (配列番号 5 9 7) を、マウス I g G 重鎖 (配列番号 5 9 8) 由来のシグナルペプチドに融合させ、E R 保持シグナル (K D E L (配列番号 7 1 6)) を C 末端に付加して、B i r A プラスミド (配列番号 5 9 9) を作製した。構築した遺伝子を、C M V プロモータの制御下にある発現ベクターにクローニングした。ビオチン化 P S M A 抗原を産生するために、P S M A プラスミド D N A を、B i r A プラスミドに対して 4 倍過剰 (w / w) でトランスフェクションミックスに添加した。

20

【 0 4 4 4 】

B i r A 発現コンストラクトのコトランスフェクションにより A v i タグを介してチンパンジー P S M A E C D タンパク質のビオチン化を実施し、得られた分泌タンパク質を、1) H i s T r a p H P カラム (G E H e a l t h c a r e) を用いた I M A C 精製、及び 2) サイズ排除精製 (S u p e r d e x 2 0 0、G e H e a l t h c a r e) の 2 段階精製プロセスを用いて精製し、ここでの溶出バッファは、P S M A のダイマー化を安定させるために 0 . 5 m M Z n C l ₂ を含有するダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、カルシウム、マグネシウム (T h e r m o f i s h e r、# 1 4 0 4 0) である。このタンパク質を、ファージパニング試験で使用する前に内毒素について試験した。

30

【 0 4 4 5 】

N 末端シグナル (配列番号 5 9 4)、N 末端 A v i - (配列番号 5 9 5) 及び 6 H i s - (配列番号 5 9 6) タグを含む配列番号 5 0 のアミノ酸 4 4 ~ 7 5 0 に対応する組換えカニクイザル P S M A 細胞外ドメイン (E C D) タンパク質 (カニクイザル P S M A E C D、配列番号 5 3) をクローニングし、チンパンジー P S M A E C D について前述したように発現させた。B i r A 発現コンストラクトのコトランスフェクションにより A v i タグを介してカニクイザル P S M A E C D タンパク質のビオチン化を実施し、得られた分泌タンパク質を、I M A C H i s T r a p H P カラム (G E H e a l t h c a r e) 及び M o n o A v i d i n カラムを用いて 2 段階精製することによって精製した。このタンパク質を、ファージパニング試験で使用する前に内毒素について試験した。この材料を、結合及び親和性の測定のためにも使用し、P S M G 1 と称する。

40

【 0 4 4 6 】

I g G 1 F c (配列番号 5 9 3) を含む第 2 の組換えカニクイザル P S M A E C D タンパク質 (カニクイザル P S M A F c、配列番号 5 4) をクローニングし、標準的な

50

分子生物学的技術を用いてCMVプロモータを含むインハウス発現ベクターを用いて発現させた。Cyno PSMA Fcタンパク質を、293HEK-expi細胞で一過的に発現させた。HEK293 Expi細胞におけるPSMG3の一過的トランスフェクション物を、トランスフェクションの5日後に収集し、遠心分離(30分、6000rpm)により清澄化し、濾過した(0.2µ PES膜、Corning)。標準曲線を作成するために使用済み培地(spent medium)にスパイクされた精製既知IgG(同じアイソタイプ)を使用し、Octet機器(ForteBio)でIgGの相対量を求めた。

【0447】

清澄化されたカニクイザルPSMA Fc上清を、平衡化された(PBS、pH7.2)HiTrap MabSelect Sure Protein Aカラム(GE Healthcare)に、レジン1mLあたり約30mgのタンパク質の相対濃度でロードした。ローディング後、カラムをdPBS、pH7.2で洗浄し、10カラム体積の0.1M酢酸ナトリウム、pH3.5で溶出した。ピーク画分をプールし、2M Tris、pH7で中和し、濾過した(0.2µ)。中和したタンパク質サンプルを、Ca²⁺、Mg²⁺、及び0.5mM ZnCl₂、pH7.2を含有するdPBSの3つの改変物に対して、4で一晩透析した。翌日、サンプルを透析から取り出し、濾過し(0.2µ)、BioTek Synergy HTTM分光光度計で280nmの吸光度によってタンパク質濃度を求めた。精製したタンパク質の量を、SDS-PAGE、及び解析サイズ排除HPLC(Dionex HPLCシステム)によって評価した。LALアッセイ(Pyrotek Associates of Cape Cod)を用いて内毒素レベルを測定した。精製したタンパク質を4で保存した。

10

20

【0448】

N末端Avi-及び6Hisタグ(配列番号596)を含む配列番号51のアミノ酸44~750に対応する組換えヒトPSMA細胞外ドメイン(ECD)タンパク質(ヒトPSMA ECD、配列番号55)をクローニングし、チンパンジー及びカニクイザルのPSMA ECDタンパク質について前述したように、発現させ、精製した。

【0449】

2-3 抗チンパンジー及び抗ヒトPSMA Fabの同定

組換えタンパク質を用いたパニング

4つのヒトVL生殖系列遺伝子(A27、B3、L6、O12)ライブラリと対になったVH1-69、3-23、及び5-51重鎖ライブラリからなるデノボヒトFab-pIXライブラリ[Shi, L., et al J Mol Biol, 2010.397(2): p.385-396. 国際公開第2009/085462号]の第1の溶液パニングを、製造元のプロトコルに従ってビオチン化チンパンジーPSMA ECDでコーティングされたストレプトアビジンビーズ(Invitrogenカタログ番号112.05D、ロット番号62992920)にファージを捕捉し、続いて、製造元のプロトコルに従ってカニクイザルPSMA-FcでコーティングされたProtGビーズ(Invitrogen、カタログ番号10003D)にファージを捕捉し、続いて、製造元のプロトコルに従ってビオチン化チンパンジーPSMA ECDでコーティングされたSera-mag Double Speed magnetic Neutravidinビーズ(Thermo、カタログ番号7815-2104-011150)にファージを捕捉する1ラウンドを含む交互パニングアプローチを使用して実施した。このパニングから、2つのヒット: PSMM18及びPSMM25を得た。

30

40

【0450】

抗PSMA Fabの全細胞パニング

インプットとしての上記のチンパンジーECDパニング実験又は新たなデノボファージライブラリからの、ラウンド#1アウトプットを使用して、全細胞に対して追加のパニング実験を行った。簡潔に述べると、ヘルパーファージ感染によってファージを産生し、当該技術分野において公知の標準的なプロトコルに従ってPEG/NaCl沈殿により濃縮した。静かに揺動させながら、4で一晩、トランスフェクトされていない親HEK29

50

3 F細胞上でファージライブラリを予め排除した (pre-cleared)。PEG / NaCl 沈殿後、予め排除したライブラリを、チンパンジー P S M A を発現している H E K 2 9 3 細胞又は L N C A P 細胞と共に、4 で 2 時間、静かに揺動させながらインキュベートした。未結合のファージの除去及びファージに結合している細胞の回収を F i c o l l 勾配により行い、数回の洗浄段階後、結合ファージを保有する細胞を、揺動させることなく、37 で 30 分間、1 mL の T G - 1 大腸菌培養物と共にインキュベートした。得られた混合物を L B - カルベニシリン - 1 % グルコースプレート上にプレティングし、37 で一晩増殖させた。次いで、その後のパニングラウンドのためにプロセスを繰り返した。

【0451】

大腸菌上清を生成するためのファージ F a b - p I X の F a b - H i s への変換

得られたファージ F a b - p I X ヒットを標準的な手順を用いて F a b - H i s に変換した。プラスミド DNA をファージパニングした大腸菌 (P l a s m i d P l u s M a x i K i t 、 Q i a g e n カタログ番号 1 2 9 6 3) から単離し、N h e I / S p e I 制限酵素消化に供した。得られた 5 4 0 0 及び 1 0 0 b p の断片を 0 . 8 % アガロースゲルで分離し、5 4 0 0 b p の断片をゲル精製した (M i n E l u t e P C R 精製キット、Q i a g e n カタログ番号 2 8 0 0 6) 。精製した 5 4 0 0 b p のバンドを、T 4 リガーゼを使用してセルフライゲーションさせ、得られた生成物 (F a b - h i s 融合体をコードしている) を、T G - 1 大腸菌株に形質転換し戻し、クローニング的に単離した。1 m M I P T G を含む培養物を一晩誘導することによって、クローンから F a b - H i s 上清を生成した。一晩培養物を遠心分離した後、清澄化した上清は下流アッセイで使用する準備が整った。様々な F a b - h i s 上清の相対発現レベルを求めるために、連続希釈した上清に対する抗カップ (S o u t h e r n B i o t e c h カタログ番号 2 0 6 1 - 0 5) E L I S A を実施した。試験した全てのクローンが、同様の F a b - h i s 発現を示した (データは示さず) 。

【0452】

大腸菌由来の F a b - h i s 融合体の細胞結合

大腸菌上清由来の個々の F a b - h i s 融合体の P S M A 発現細胞への結合能力を評価するために、細胞ベースの結合アッセイを設計した。p I X 切除後の全てのパニング実験のラウンド 3 のアウトプットから個々の F a b クローンを単離した。F a b クローンを、チンパンジー及びカニクイザルの P S M A 発現 H E K 細胞、並びに L N C a P 細胞におけるヒト P S M A への結合について試験した。簡潔に述べると、P S M A 発現細胞を、1 ウェルあたり 2 0 0 , 0 0 0 の密度で V 底プレート (C o s t a r 3 3 5 7) に分注し、氷上で 1 時間、F a b 断片を発現している (1 0 0 μ L) 上清と共にインキュベートした。2 % F B S を含有する P B S で細胞を 2 回洗浄し、氷上で 1 時間、マウス抗ヒトカップ - R P E 抗体 (L i f e T e c h n o l o g i e s カタログ番号 M H 1 0 5 1 4) で染色した。2 % F B S を含有する P B S で細胞を 2 回洗浄し、1 0 0 L μ の同じ洗浄バッファ中に再懸濁させた。B D F A C S アレイフローサイトメーターでプレートを読み取った。前方散乱及び側方散乱を使用して細胞の健全集団をライブゲーティングし、次いで、P E 染色のためにこのゲート内の細胞を分析することによって、F A C S データを F l o w J o ソフトウェアで分析した。平均蛍光強度 (M F I) を計算し、M i c r o s o f t E x c e l にエクスポートした。3 種全ての P S M A (カニクイザル、チンパンジー、及びヒト) に対してバックグラウンドの 3 倍の結合を示し、H E K 2 9 3 細胞株への結合は示さなかった F a b クローンを、「予備陽性」とラベル付けした。F a b を配列決定し、再スクリーニングのために哺乳類発現ベクターにクローニングするために持ち越した。哺乳類細胞で発現した F a b 上清の P S M A 発現細胞株への結合から、真の陽性を選択した。

【0453】

哺乳類 F a b の調製

大腸菌 F a b を哺乳類発現 F a b に変換するために、製造元のプロトコルに従って、I n - F u s i o n H D クローニング (C l o n T e c h カタログ番号 6 3 8 9 1 8) を

10

20

30

40

50

使用した。簡潔に述べると、一次スクリーニングを通過し、哺乳類 F a b フォーマットに移されるクローンのヌクレオチド配列を、「InFu Primer Finder v 1.2.3」プログラム（インハウスで開発したソフトウェア）にロードし、これによって、h u K a p p a _ m u I g G S P 及び h u G 1 F a b 発現ベクターへの In - F u s i o n クローニングのための P C R 断片を生成するために使用されるアイソタイプ特異的 P C R プライマーのリストを生成する。これらのベクターは、p c D N A 3 . 1 に基づかない C M V プロモータを有するインハウスベクターである。In - f u s i o n プロセスに続いて、大腸菌クローンを単離し、配列を確認し、標準的なプロトコルを用いて H E K 2 9 3 細胞にトランスフェクトした。5日後にトランスフェクションから 2 0 m L の上清を収集することにより、P S M A 発現細胞株への結合を確認するための哺乳類 P S M A F a b を調製した。

10

【 0 4 5 4 】

哺乳類 s u p フォーマットにおける全細胞パニングからのヒットの再スクリーニング
既に記載した全細胞結合アッセイを用いて、哺乳類で発現した F a b 上清の確認を行った。ヒト P S M A (L N C a P)、チンパンジー、及びカニクイザル細胞への F a b の結合を試験することに加えて、親 H E K 細胞株に結合しないことについてのカウンタースクリーニングを行った。表 1 9 は、P S M A 発現細胞に結合する哺乳類 F a b 上清のヒットプロファイルを示す。大腸菌の上清からのヒットの多くは、哺乳類で発現したタンパク質では確認されなかった。P S M M 4 8 は、カニクイザル P S M A 発現細胞への高い結合、及びチンパンジー P S M A 発現細胞へのいくらかの結合を示したが、ヒト P S M A を発現する L N C a P 細胞へは結合しなかった。P S M M 5 6 は同様のプロファイルを示したが、L N C a P 細胞にいくらか結合した。P S M M 6 9 ~ 8 0 は、L N C a P 細胞に結合したが、チンパンジー P S M A 発現細胞にもカニクイザル P S M A 発現細胞にも結合しなかった。哺乳類 F a b s u p P S M M 5 2、M 5 6、及び M 5 7 は、3 つ全ての細胞株に結合した。P S M M 5 0、M 5 1、及び M 5 4 は、より多くのチンパンジー又はカニクイザルへの結合を示す。M 5 8 は、わずかなチンパンジー及びカニクイザルへの結合を示した。

20

【 0 4 5 5 】

【表 16 - 1】

表 19. Geo-MFI (平均蛍光強度) によって測定した PSMA 発現細胞に対する
哺乳類 Fab タンパク質結合のヒットプロファイル

Fab ID (Fab DNA ID)	カニクイザル	チンパンジー	LNCaP	親HEK
PSMB10 (PSMM10)	244	81.6	—	248
PSMB11 (PSMM11)	19	6.6	—	8.14
PSMB12 (PSMM12)	31.6	8.05	—	12.6
PSMB13 (PSMM13)	57.8	18.2	—	50.5
PSMB14 (PSMM14)	32.6	13.1	—	22.2
PSMB15 (PSMM15)	40.4	18.5	—	38
PSMB16 (PSMM16)	175	220	—	6.39
PSMB17 (PSMM17)	34.9	22.4	—	40.1
PSMB18 (PSMM18)	696	439	—	8.71
PSMB19 (PSMM19)	53.7	—	5.15	4.47
PSMB20 (PSMM20)	5.75	—	5.85	41.3
PSMB21 (PSMM21)	94.4	—	20.7	372
PSMB22 (PSMM22)	9.07	—	7.92	54.9
PSMB23 (PSMM23)	16.4	—	6.66	164
PSMB24 (PSMM24)	14.6	9.6	4.09	3.96
PSMB25 (PSMM25)	15.2	11.3	16.9	4.09
PSMB26 (PSMM26)	9.48	—	7.26	114
PSMB27 (PSMM27)	20	—	7.56	136
PSMB28 (PSMM28)	29.7	—	8.88	302
PSMB29 (PSMM29)	6.87	—	5.7	72.8
PSMB30 (PSMM30)	5.16	—	4.58	45
PSMB31 (PSMM31)	5.99	—	—	25.5
PSMB32 (PSMM32)	4.81	—	—	27.1
PSMB33 (PSMM33)	5.14	—	—	40.1
PSMB34 (PSMM34)	17.9	—	—	107
PSMB35 (PSMM35)	58.5	—	—	231
PSMB36 (PSMM36)	5.05	—	—	6.96
PSMB37 (PSMM37)	23.4	—	—	178
PSMB38 (PSMM38)	4.05	—	—	7.7
PSMB39 (PSMM39)	10.2	—	—	166
PSMB40 (PSMM40)	66.9	—	—	348
PSMB41 (PSMM41)	5.39	—	—	12
PSMB42 (PSMM42)	7.35	—	—	25.8
PSMB43 (PSMM43)	8.73	—	—	7.18
PSMB44 (PSMM44)	12.6	—	—	48.9
PSMB45 (PSMM45)	22.4	—	—	43.1
PSMB46 (PSMM46)	3.88	—	—	5.29
PSMB47 (PSMM48)	101	25.5	3.46	2.85
PSMB48 (PSMM49)	2.72	3.18	2.68	2.72
PSMB49 (PSMM50)	51.6	22	3.22	3.48

10

20

30

40

【 0 4 5 6 】

【表 16 - 2】

(表 19 の続き)

Fab ID (Fab DNA ID)	カニクイザル	チンパンジー	LNCaP	親HEK
PSMB51 (PSMM52)	285	231	41.5	2.68
PSMB52 (PSMM53)	39.2	6.89	2.67	2.56
PSMB53 (PSMM54)	27.6	17.8	4	2.6
PSMB54 (PSMM55)	2.7	2.75	2.65	2.79
PSMB55 (PSMM56)	226	180	17.2	2.58
PSMB56 (PSMM57)	95.6	34.7	24.5	2.52
PSMB57 (PSMM58)	19.8	11	3.26	2.68
PSMB58 (PSMM59)	121	192	25.3	2.67
PSMB59 (PSMM60)	4.96	9.69	6.04	3
PSMB60 (PSMM61)	2.28	3.07	87.3	4.64
PSMB61 (PSMM62)	2.1	3.16	135	2.98
PSMB62 (PSMM63)	7.17	4.43	54.9	9.09
PSMB63 (PSMM64)	2.07	2.95	27	2.82
PSMB64 (PSMM65)	2.39	3.26	70.5	3.05
PSMB65 (PSMM66)	2.3	3.13	32.4	4.25
PSMB66 (PSMM67)	2.14	3	24.6	2.83
PSMB67 (PSMM68)	2.23	2.95	21	2.95
PSMB68 (PSMM69)	5.44	—	134	35.3
PSMB69 (PSMM70)	2.29	3.38	25.5	3.35
PSMB70 (PSMM71)	2.22	3.49	15.5	3.26
PSMB71 (PSMM72)	2.54	4.4	18.5	3.07
PSMB72 (PSMM73)	2.13	3.53	227	3.02
PSMB73 (PSMM74)	2.97	4.13	125	11.1
PSMB74 (PSMM75)	120	—	178	132
PSMB75 (PSMM76)	2.99	3.04	173	7.89
PSMB76 (PSMM77)	3.75	3.99	138	3.95
PSMB77 (PSMM78)	4.68	3.96	144	4.71
PSMB78 (PSMM79)	25.2	—	378	24.4
PSMB79 (PSMM80)	38.4	—	512	157
PSMB80 (PSMM81)	19.6	18.6	20.9	6.61
PSMB81 (PSMM82)	2.63	2.06	4.07	2.69
PSMB82 (PSMM83)	2.79	2.23	4.11	2.76
PSMB83 (PSMM84)	2.59	2.28	4.09	2.74
PSMB84 (PSMM85)	750	729	192	3.15
PSMB85 (PSMM86)	2.84	2.59	2.33	3.24
PSMB86 (PSMM87)	224	176	31.7	2.82
PSMB87 (PSMM88)	2.63	2.27	4.23	2.91
PSMB88 (PSMM89)	37.7	29.7	30.3	7.6
PSMB89 (PSMM90)	27.1	27.3	53.2	39.5
PSMB90 (PSMM91)	26.7	24.7	47.1	36.4
PSMB91 (PSMM92)	8.97	6.16	13	6.63
PSMB92 (PSMM93)	20	16.5	57.1	50

10

20

30

40

【 0 4 5 7 】

【表 16 - 3】

(表 19 の続き)

Fab ID (Fab DNA ID)	カニクイザル	チンパンジー	LNCaP	親HEK
PSMB93(PSMM94)	5.13	9.62	2.5	3.66
PSMB94(PSMM95)	5.12	2.67	2.22	3.57
PSMB95(PSMM96)	8.9	8.82	13.4	11.4
PSMB96(PSMM97)	2.4	3.25	2.53	4.03
PSMB97(PSMM98)	2.57	4.73	2.52	3.7
PSMB99(PSMM100)	9.95	2.4	2.39	4.03
PSMB100(PSMM101)	4.03	2.52	2.33	3.37
PSMB100(PSMM101)	3.5	2.86	2.48	4.57
PSMB101(PSMM102)	5.49	3.18	2.23	3.33
PSMB102(PSMM103)	2.4	2.42	2.16	3.2
PSMB103(PSMM104)	3.52	3.26	2.58	4.44
PSMB104(PSMM105)	2.15	2.5	2.34	3.95
PSMB105(PSMM106)	2.03	2.39	2.18	3.39
PSMB106(PSMM107)	2	2.4	2.27	3.59
PSMB107(PSMM108)	2	2.47	2.33	3.49
PSMB108(PSMM109)	2	2.58	2.28	3.46
PSMB109(PSMM110)	321	326	34.9	6.11
PSMB110(PSMM111)	2.3	2.31	2.31	3.4
PSMB111(PSMM112)	2.32	2.31	—	3.21
PSMB112(PSMM113)	6.28	5.7	2.71	3.28
PSMB113(PSMM114)	2.82	2.95	2.32	3.29
PSMB114(PSMM115)	2.78	2.47	4.3	3.14
PSMB115(PSMM116)	2.66	2.59	2.2	3.14
PSMB46(PSMM117)	4.54	3.18	2.21	4.79
PSMB67(PSMM118)	3.95	4.3	3	6.13
PSMB74(PSMM119)	7.94	13	3.16	12.5
PSMB78(PSMM120)	5.08	4.79	22.3	6.82
PSMB81(PSMM121)	3.66	3.83	3.05	5.11
PSMB82(PSMM122)	15.1	28.4	10.8	24.3
PSMB83(PSMM123)	37.5	42.1	3.04	4.88
PSMB85(PSMM124)	34.6	52.9	20.7	46.8
PSMB87(PSMM125)	4.23	3.74	2.26	4.73
PSMB89(PSMM126)	51.8	53.1	11.7	6.27
PSMB90(PSMM127)	42.8	30.2	7.74	5.99
PSMB91(PSMM128)	3.9	27.6	2.37	4.32
PSMB92(PSMM129)	45.7	37.3	12.1	7.4
PSMB93(PSMM130)	5.13	7.85	4.11	7.82
PSMB94(PSMM131)	3.67	3.23	2.32	4.72
PSMB95(PSMM132)	4.05	3.64	2.56	5.57
PSMB96(PSMM133)	3.91	4.54	2.37	4.65
PSMB97(PSMM134)	3.22	3.16	4.08	4.22
PSMB98(PSMM135)	15.6	12.7	2.22	4.21
PSMB99(PSMM136)	4.08	3.26	2.22	5.04

10

20

30

40

【 0 4 5 8 】

【表 16 - 4】

(表 19 の続き)

Fab ID (Fab DNA ID)	カニクイザル	チンパンジー	LNCaP	親HEK
PSMB100(PSMM137)	5.24	3.82	2.16	4.83
PSMB101(PSMM138)	3.84	3.14	2.23	4.52
PSMB102(PSMM139)	4.51	3.82	2.23	4.59
PSMB103(PSMM140)	6.81	4.27	2.21	5.41
PSMB104(PSMM141)	7.52	4.35	2.26	4.39
PSMB105(PSMM142)	5.03	11.2	4.87	7.28
PSMB106(PSMM143)	3.87	3.8	2.73	4.9
PSMB107(PSMM144)	3.3	3.35	2.3	4.64
PSMB108(PSMM145)	6.78	3.83	2.33	4.98
PSMB110(PSMM146)	4.03	3.23	2.28	5.3
PSMB111(PSMM147)	3.71	3.26	2.36	5.11
PSMB112(PSMM148)	4.54	3.26	2.26	4.86
PSMB113(PSMM149)	84.3	104	51.7	94.2
PSMB114(PSMM150)	3.31	3.26	2.21	5.14
PSMB115(PSMM151)	3.55	3.43	2.3	4.21

10

【0459】

20

哺乳類で発現した Fab の用量応答曲線

哺乳類で発現した Fab クローンが、未希釈 Fab 上清として PSMA 発現細胞株への陽性結合について確認されてから、上清を Octet 又はタンパク質ゲルによりタンパク質濃度に対して正規化し、用量応答曲線を完成させて、前述のプロトコルを用いて PSMA 結合を確認した。図 23 ~ 図 25 は、3つの PSMA 発現細胞の全てに対する結合が実証されたヒットの滴定曲線を示す。図 23 A、23 B、23 C、及び 23 D は、抗 PSMA パニングヒット対 LNCaP 細胞の滴定曲線を示す。図 24 A、24 B、24 C、及び 24 D は、抗 PSMA パニングヒット対チンパンジー PSMA HEK 細胞の滴定曲線を示す。図 25 A、25 B、25 C、及び 25 D は、抗 PSMA パニングヒット対カニクイザル PSMA HEK 細胞の滴定曲線を示す。ヒット間の結合プロファイルを、異なる種の PSMA を発現する細胞株にわたって比較した。PSMM52 上清を、実験にわたって陽性対照として使用した。CDR における N - 結合型グリコシル化部位、PSMA 陰性親 HEK 細胞株への結合、又は PSMA 陽性細胞株への結合の欠如から、いくつかのヒットを優先から外した。11個の Fab ヒットが残っており、10個のヒットをヒト IgG4 - PAA 重鎖コンストラクトにクローニングし、PSMA x CD3 二重特異性抗体を生成するために使用した。これらのヒットは、互いの3倍以内の種間結合を示し、PSMA 陽性標的の T 細胞リダイレクション殺傷について試験される二重特異性抗体フォーマットに移した。各ヒットについてのパニング抗原を表 20 に示す。

30

【0460】

【表 17】

40

表 20. パニングヒットのそれぞれに対する抗原

ラウンド1の抗原	ラウンド2~3の抗原	ヒット	ヒットの識別
チンパンジー-PSMA ECD	カニクイザル PSMA ECD	2	PSMM18、PSMM25
チンパンジー-PSMA ECD	チンパンジー-PSMA HEK	9	PSMM50、PSMM52、PSMM57、PSMM59、PSMM110、PSMM56、PSMM85、PSMM84
LNCaP	チンパンジー-PSMA HEK	2	PSMM87、PSMM81

【0461】

50

抗 P S M A m A b の調製

3つ全ての P S M A 発現細胞への結合が実証された合計 12 個のクローンを、最終的には、制限クローニングによって F c 置換 S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、及び L 2 3 5 A (P A A) アイソタイプを有する m A b I g G 4 に変換した。簡潔に述べると、初期スクリーニングを通過した F a b クローンに対応するコンストラクトを H i n d I I I 及び A p a I で消化した。ゲル精製した断片を、完全 m A b 発現のために C M V p r o m o t e r v D R 0 0 0 2 1 5、ヒト I g G 4 - P A A F c を含有する C M V 駆動発現ベクターを含む、発現ベクターにライゲーションした。これにより、二重特異性抗体の迅速生成が可能になった。既に記載した発現ベクターを使用して、各 P S M A m a b の重鎖及び軽鎖を発現させ、両方のベクターを m A b の発現のために 2 9 3 E x p i 又は C H O 細胞株に一過的にコトランスフェクトした。ファージパニングから生成された種間陽性 P S M A F a b の C D R 配列を以下の表 2 1 に示す。選択された F a b の V H 及び V L 配列を以下の表 2 2 に示す。F a b から生成された m A b の重鎖及び軽鎖配列を表 2 3 に示す。

10

【 0 4 6 2 】

【表 18】

表 21. フェージパニングからの Fab の CDR 配列 (Kabat により定義)
(対応する配列番号を括弧内に列挙する)

FAB ID		CDR (配列番号)		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB109	HC	NAWIS (62)	WINPESGRANYAQKFQG (63)	ELYLVYSTYYYAFDY (64)
	LC	RASQSIDRWLN (65)	AASSLQS (60)	QQSPRYPLT (66)
PSMB86	HC	SYDIS (67)	GIPIEGTANYAQKFQG (68)	DYPAGYGFDY (69)
	LC	RASQSVSSSYLA (70)	GASSRAT (71)	QQYGSSPLT (72)
PSMB84	HC	SDWMS (73)	AISGNGGSTHEYADSVKG (74)	DPYYYYDGDSDSYGMDV (75)
	LC	RASQSISSYLN (76)	AASSLQS (60)	QQSYSTP (61)
PSMB83	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSVKG (79)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB56	HC	SYAIS (84)	WISPYNGNANYAQKFQG (85)	DSDRSYNLDY (86)
	LC	RASQSIGWLN (87)	AASSLQS (60)	QQSYSTPLT (88)
PSMB55	HC	SYWIG (89)	IIYPGDS TRYSPSFQG (90)	GLPIWYLDY (91)
	LC	RASQSVASDLA (92)	FASNRAT (93)	QQSITWPFT (94)
PSMB51	HC	SYAIS (95)	WIIPYNGNANYAQKFQG (96)	VNSAALVWERLDY (97)
	LC	RASQSIDRWLN (65)	AASSLQS (60)	QQSPRYPLT (66)
PSMB49	HC	SYAIS (84)	GIPIFGTANYAQKFQG (98)	ASRVWHASYGYLDY (99)
	LC	RASQSVSKWLA (100)	DASNRAT (82)	QQRFTAPWT (101)
PSMB25	HC	SYWIG (89)	IIYPGDS TRYSPSFQG (90)	GWAYDRGLDY (102)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNYLA (103)	WASTRES (104)	QQYYSTPLT (105)
PSMB18	HC	SYWIG (89)	IIYPGDS TRYSPSFQG (90)	AYHYSKGLDY (106)
	LC	KSSQSVLYSSNNKNYLA (103)	WASTRES (104)	QQYYSTPLT (105)
PSMB80	HC	DY AIS (107)	RIDPIEGTANYAQKFQG (108)	DRYYYYDGVVWYSDYFDY Y (109)
	LC	RASQSISSYLN (76)	AASSLQS (60)	QQSYSTPLT (88)
PSMB58	HC	SYWIS (56)	IIYPGDSYTRYSPSFQG (57)	DYEWELFDSRLDY (58)
	LC	RASQSISSYLN (59)	AASSLQS (60)	QQSYSTP (61)

10

20

30

40

【0463】

【表 19 - 1】

表 22. PSMA Fab の VH 及び VL 配列

FAB ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
PSMB109	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGWISPYNGNANYAQKFGGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVNSAALVWERLDYW GGGTLVTVSS	110	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSIDRWLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSPRY PLTFGGGQTKVEIK	111
PSMB86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFKSYDISWVRQAPGQG LEWMMGGIPIEGTANYAQKFGGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDYPAGYGFYWGQG TLVTVSS	112	EIVLTQSPGTLSLSPGERA TLSCRASQSVSSSYLAWY QKPGQAPRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYCQQYGSS PLTFGGGQTKVEIK	113
PSMB84	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFDSWMSWVRQAPGK GLEWVSAISGNGGSTEYADSVKQ RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDPYYYDGDSDYYGM DVWYGGQGLVTVSS	114	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSISSYLWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGGGQTKVEIK	115
PSMB83	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSVKGR FTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSYDSSLYVGDYFDY WGQGLVTVSS	116	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNW PLTFGGGQTKVEIK	117
PSMB80	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFDDYAISWVRQAPGQGL EWMGRIDPIEGTANYAQKFGGRV TITADESTSTAYMELSSLRSED AVYYCARDRYYYDGVYWYSDYFD YWGGQGLVTVSS	118	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSISSYLWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGGGQTKVEIK	119
PSMB58	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWISWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDSYTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARDYEWELFDSRLDYWGQ GTLVTVSS	120	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSISSYLWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGGGQTKVEIK	115
PSMB56	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGWISPYNGNANYAQKFGGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARSDRSYNLDYWGQG TLVTVSS	121	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSIGWLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYST PLTFGGGQTKVEIK	122
PSMB55	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDSYTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGLPIWYLDYWGQGLVTV VSSA	123	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVASDLAWYQ QKPGQAPRLLIYFASNRA GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQSITWP FTFGGQTKVEIK	124

10

20

30

40

【 0 4 6 4 】

【表 19 - 2】

(表 22 の続き)

FAB ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
PSMB51	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGWIIIPYNGNANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARVNSAALVWERLDYW GQGTLVTVSS	125	DIQMTQSPSSLSASVGD VTITCRASQSIDRWLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSPRY PLTFGQGTKVEIK	111
PSMB49	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVT ITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARASRVWHASYGYLDYWG QGTLVTVSS	126	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSKWLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRFTAP WTFGQGTKVEIK	127
PSMB25	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGWAYDRGLDYWGQGT LTVSS	128	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDVAVYYC QQYYSTPLTFGQGTKVEIK	129
PSMB18	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARAYHYSKGLDYWGQGT LTVSS	130	DIVMTQSPDSLAVSLGERA TINCKSSQSVLYSSNNKNY LAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSG TDFTLTISLQAEDVAVYYC QQYYSTPLTFGQGTKVEIK	131

10

20

【 0 4 6 5 】

【表 20 - 1】

表 23 対応する配列番号と共に P S M A モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖配列

mAb ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号
PSMB129 (FAB PSMB109)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWM GWISPYNGNANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR VNSAALVWERLDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	132	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCRASQSIDRWL NWFYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGS GGTDFTLTISLQPED FATYYCQQSPRYPLTFG QGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYLSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	133
PSMB130 (FAB PSMB86)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFKSYDISWVRQAPGGGLEWM GGIPIEGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSED TAVYYCARD YPAGYGFYWGQGLTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK	134	EIVLTQSPGTLTSLSPGE RATLSCRASQSVSSSY LAWYQQKPGQAPRLLIY GASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGS SPLTFG QGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYLSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	135
PSMB128 (FAB PSMB84)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFDSDWMSWVRQAPGKGLEW VSAISGNGGST EYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDPY YYYD GDSYYGMDVWGQGLT TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPS SLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK	136	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITTCRASQSISSYL NWFYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGS GGTDFTLTISLQPED FATYYCQQSYSTPLTFG QGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYLSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	137

10

20

30

40

【表 20 - 2】

(表 23 の続き)

mAb ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号	
PSMB127 (FAB PSMB83)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	138	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISSLEPEDF AVYYCQQRSNWPLTFG QGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	139	10
PSMB126 (FAB PSMB80)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFDDYAIWVRQAPGGGLEWM GRIDPIEGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARD RYYVDGVYWYSDYFDYWGGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSLGK	140	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYSTPLTFG QGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	137	20
PSMB124 (FAB PSMB56)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAIWVRQAPGGGLEWM GWISPYNGNANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR DSDRSYNLDYWGGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNQKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK	141	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSIGWL NWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQSYSTPLTFG QGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	142	40

【表 20 - 3】

(表 23 の続き)

mAb ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号	
PSMB123 (FAB PSMB55)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVVISAD KSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAR GLPIWYLDYWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGK TYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTEPVTCTVVDVSDQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGK	143	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVASDL AWYQQKPGQAPRLLIYF ASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISLLEPEDFA VYYCQQSITWPFTEFGGQ TKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	144	10
PSMB122 (FAB PSMB51)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWM GWIIIPYNGNANYAQKFQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR VNSAALVWERLDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSD QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	145	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCRASQSIDRWL NRYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQSPRYPLTFG QGTEKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	133	20
PSMB121 (FAB PSMB49)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADE STSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR SRVWHASYGYLDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTEPVTCTVVDVSD QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	146	EIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASQSVSKWL AWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARFSGSG SGTDFTLTISLLEPEDF AVYYCQQRFTAPWTFG QGTEKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	147	40

【表 20 - 4】

(表 23 の続き)

mAb ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号	
PSMB120 (FAB PSMB25)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISAD KSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAR GWAYDRGLDYWGQGLTIVTSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSL SLSLGK	148	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQYYST PLTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSL STLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	149	10
PSMB119 (FAB PSMB18)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISAD KSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAR AYHYSKGLDYWGQGLTIVTSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSL SLSLGK	150	DIVMTQSPDSLAVSLGE RATINCKSSQSVLYSSN NKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTRESGVPDR FSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQQYYST PLTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSTYSL STLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC	149	20
PSMB87 (FAB PSMB58)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEW MGIIYPGDSYTRYSPSFQGGQVTISAD KSISTAYLQWSSLKASDTAMYCAR DYEWELFDSRLDYWGQGLTIVTSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSV VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SLGKTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSLGK	151	DIQMTQSPSSLSASVG DRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPED FATYYCQQSYSTPLTFG QGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTE QDSKSTYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	137	40

配列番号130のVH及び配列番号131のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB119を生成した。配列番号128のVH及び配列番号129のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB120を生成した。配列番号126のVH及び配列番号127のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB121を生成した。配列番号125のVH及び配列番号111のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB122を生成した。配列番号123のVH及び配列番号124のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB123を生成した。配列番号121のVH及び配列番号122のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB124を生成した。配列番号118のVH及び配列番号119のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB126を生成した。配列番号116のVH及び配列番号117のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB127を生成した。配列番号114のVH及び配列番号115のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB128を生成した。配列番号110のVH及び配列番号111のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB129を生成した。配列番号112のVH及び配列番号113のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、F234A、及びL235A置換を有するIgG4定常領域とを含む単一特異性抗PSMA抗体PSMB130を生成した。

【0470】

2-5 抗PSMA Fab PSMB83 (別名PSMM84) に結合したヒトPSMA ECDの結晶構造

PSMAは、細胞表面上で発現するホモダイマータンパク質である。PSMAは、ペプチダーゼ活性を有する大きなECDドメイン(705残基)、1回貫通TMドメイン、及び短い19残基の細胞内ドメインで構成される、1モノマーあたり750残基のII型内在性糖タンパク質である。PSMAと抗体との間の結合部位についてより深く理解するために、二重特異性抗体PS3B27の抗PSMA Fabアームに結合したヒトPSMAの細胞外領域(ECD)の結晶構造を3.15 Åの分解能で決定した。

【0471】

ヒトPSMA(残基44~750)の細胞外領域を、N末端gp67シグナルペプチド、続いて、切断可能なヘキサヒスチジntag(配列番号596)を含むHigh Five(商標)昆虫細胞で発現させた。最初のNi²⁺-NTA親和性捕捉、TEVに媒介されるヒスチジntagの切断、続いて、逆アフィニティークロマトグラフィー段階、及び最後のサイズ排除クロマトグラフィー段階を含む3段階手順により、上清から分泌タンパク質を精製した。精製されたPSMA-ECDを液体窒素中で急速冷凍し、10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、2mM CaCl₂、0.1mM ZnCl₂ 中において-80 °Cで保存した。

【0472】

二重特異性抗体PS3B27における親抗PSMA FabアームであるPSMB83(別名PSMM84)のFabを、ヘキサヒスチジntag(配列番号596)を含むHEK293 Exp1細胞で発現させ、アフィニティークロマトグラフィー(HisTrap、GE Healthcare)及びサイズ排除クロマトグラフィー(SEC-300、

10

20

30

40

50

Phenomenex Yarra) を用いて精製した。Fab を、50 mM NaCl、20 mM Tris pH 7.4 中において 4 で保存した。

【0473】

3段階手順によってヒトPSMA ECD/PSMB83 Fab複合体を調製した。最初に、Fabを20 mM MES pH 6.0、150 mM NaClにバッファ交換した。次いで、Fab及びPSMAを混合し(PSMAモノマーに対して1.5モル過剰のFab)、20 mM MES pH 6.0に透析しながら、4で一晩インキュベートした。最後に、複合体を20 mM MES pH 6.0中でmonoS 5/50カラムに結合させ、NaCl勾配で溶出した。

【0474】

20におけるシッティングドロップ蒸気拡散法及びMosquito LCPロボット(TTP Labtech)を用いて、X線回折に好適な結晶を得た。マイクロシード及び最初は7.3 mg/mLのPSMA/Fab複合体を用いて、18% PEG 3 kDa、0.2 M (NH₄)₂SO₄、0.1 M Tris pH 8.5から、ヒトPSMA ECDに結合したPSMB83 Fabの結晶を成長させた。最初は8.8 mg/mLのFabを用いて、25% PEG 3 kDa、0.2 M LiCl、0.1 M 酢酸、pH 4.5から遊離PSMB83 Fabの結晶を得た。

【0475】

Phaser (Phaser Crystallographic Software, University of Cambridge) による分子置換(MR)によって構造を解析した。PSMB83 (別名PSMM84) Fab構造のMR検索モデルは、PDBコード4M6Oであった。MR検索モデルとしてPSMA (PDBコード: 2C6G) 及びPSMB83 Fab (1.93 分解能の構造、データは示さない) の結晶構造を使用して、PSMA/Fab複合体構造を解析した。PHENIXにより構造を精密化し(Adams, et al, 2004)、COOTを用いてモデル調整を行った(Emmley and Cowtan, 2004)。他の全ての結晶学的計算をCCP4プログラムスイートで行った(Collaborative Computational Project Number 4, 1994)。PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.4.1, Schrodinger, LLC) で全ての分子グラフィクスを作成し、相補性決定領域(CDR) をKabataの定義を用いて決定した。

【0476】

PSMA/Fab構造は、Fab軽鎖残基1~211、Fab重鎖残基1~224 (無秩序である残基138~146を除く)、及びPSMA残基56~750を含み、これは、プロテアーゼ(残基56~116及び352~590)、アピカル(残基117~351) 及びヘリカル(残基591~750)ドメイン、並びにPSMAダイマーサブユニットあたり10個の可能なN-結合型グリカンのうちの7個(Asn-76、-121、-140、-195、-459、-476、及び-638) に対応する。PSMA活性部位は、3つのドメイン間の界面に位置し、ヒスチジン(H377及びH553) 及びグルタミン酸/アスパラギン酸(D387、触媒活性を有するE424、E425、及びD453) の残基、並びに水分子が配位している2個の垂鉛原子を含有している。結晶非対称単位は、PSMB83 Fabと同様に結合した各サブユニットを有する1つのPSMAダイマーを含有する。Fab/PSMAの結合部位は、結合残基の信頼できる位置決めを可能にする電子密度マップによってよく定義される。Fab及びPSMA分子は、図26~図31で逐次付番される。

【0477】

PSMB83エピトープ、パラトープ、及び相互作用。二重特異性抗体PS3B27における親抗PSMA FabアームであるPSMB83は、PSMAのアピカルドメインにおける配座エピトープ及び不連続エピトープを認識する(図26)。Fabに埋もれているPSMA表面積は、約700²である。具体的には、PSMB83エピトープ残基

10

20

30

40

50

は、I 1 3 8、F 2 3 5、P 2 3 7、G 2 3 8、D 2 4 4、Y 2 9 9、Y 3 0 0、Q 3 0 3、K 3 0 4、E 3 0 7、及びK 3 2 4 ~ P 3 2 6である。ヘリックス 7 (残基Y 2 9 9 ~ E 3 0 7) はエピトープの優勢領域であり、F a b重鎖及び軽鎖C D Rにわたって結合する。ヘリックスの一端において、Y 2 9 9及びY 3 0 0は、F a b残基Y 5 7^H、W 9 4^L、並びにP S M A残基F 2 3 5及びP 2 3 7と芳香族クラスタを形成し、一方、他のヘリックス末端におけるE 3 0 7は、R 9 1^Lとの塩架橋及び水素結合Y 3 2^Lを形成する。図 2 7及び図 2 8は、P S M B 8 3軽鎖及び重鎖とのP S M Aの主な相互作用を示す。P S M B 8 3エピトープ残基は、ヒトとカニクイザルとの間で保存されており(図 2 9)、二重特異性抗体P S 3 B 2 7は、ヒト及びカニクイザルP S M Aと同様の親和性で結合することが実証された。対照的に、ヒトの、マウスG 2 3 8 A及び特にY 3 0 0 Dのエピトープへの変異は、ヒトと比較してマウスP S M Aに対するP S M B 8 3結合親和性が低いと予想される。Y 3 0 0 D変異は、N 5 9^Hとの水素結合接触及びW 9 4^Lとのスタッキング相互作用を妨害する。

10

【0478】

P S M B 8 3パラトープは、C D R - L 2及び - C D R - H 1を除く全てのC D R由来の残基で構成されている(図 3 0)。具体的には、パラトープ残基は、軽鎖S 3 0^L、Y 3 2^L、R 9 1^L、S 9 2^L、W 9 4^L、並びに重鎖G 5 6^H ~ N 5 9^H、K 6 5^H、G 6 6^H、Y 1 0 1^H、V 1 0 7^H、及びD 1 0 9^Hである。図 3 1は、P S M AとP S M B 8 3との間の相互作用接触を示す。エピトープのアクセス可能な位置は、P S 3 B 2 7二重特異性抗体におけるP S M B 8 3 F a bアームの膜結合P S M Aへの結合を促進し、一方、他のF a bアームは、T細胞膜におけるC D 3に依然として結合している。P S M B 8 3は、抗体が活性部位から離れて結合し、酵素機能に影響を及ぼす可能性があるP S M Aにおける何らかの大きな構造変化、例えば、活性部位を閉鎖するループ移動又は触媒残基の置換(F a bに結合している及び結合していない(B a r i n k a E t a l, 2 0 0 7)構造におけるP S M A分子のC重ね合わせについては0.3のR M S D)を引き起こさないので、P S M A酵素活性を阻害しないと予想される。

20

【0479】

2 - 6 抗P S M A親和性成熟

親P S M B 1 2 7 (f a b I D = P S M B 8 3、別名P S M M 8 4)と比較して結合親和性が増加した抗体を同定するために、2つのP S M A親和性成熟ライブラリからの抗P S M A F a bファージクローンに対して親和性成熟を行った。P S M B 1 2 7の親和性成熟のために2つのライブラリを生成した)。第1のライブラリにおいて、重鎖C D R 1及びC D R 2を表 2 4 (P H 9 H 9 L 1)の設計に従ってランダム化した。H - C D R 3断片をp D R 0 0 0 0 2 4 0 3 2からP C Rで増幅させ、S a c I I + X h o Iで消化した。この断片をP H 9 H 9 L 1 / P H 9 L 3ライブラリにクローニングした。これを大腸菌M C 1 0 6 1 F'細胞に形質転換し、このF a bライブラリをディスプレイするファージを生成した。第2のライブラリにおいて、軽鎖C D Rを表 2 5 (P H 9 L 3 L 3)の設計に従ってランダム化した。P S M B 8 3 (P S M H 3 6 0)からの重鎖をP C Rで増幅し、N c o I + X h o Iで消化した。この断片をP H 9 L 3 L 3ライブラリDNA (E L N: デノボ2 0 1 0ファージライブラリS R I - 0 2 1)にクローニングした。これを大腸菌M C 1 0 6 1 F'細胞に形質転換し、このF a bライブラリをディスプレイするファージを生成した。

30

40

【0480】

【表 2 1】

表 2 4 : P H 9 H 9 L 1 ライブラリ設計

位置	親AA	ライブラリAA
30	S	D, K, S
31	S	D, N, S, T
32	Y	A, D, S, Y
33	A	A, D, G, S, W, Y
35	S	H, N, S
50	A	A, E, L, N, R, T, W, Y
52	S	A, D, L, N, R, S
54	S	A, E, N, S, Y
57	S	D, N, R, S, T, Y
59	Y	E, G, N, Q, R, Y

10

【 0 4 8 1】

【表 2 2】

表 2 5 : P H 9 L 3 L 3 ライブラリ設計

位置	親AA	ライブラリAA
30	S	D, N, R, S
31	S	N, S, T
32	Y	D, N, R, S, Y
49	Y	E, H, K, Y
50	D	D, G, S, W, Y
53	N	D, N, S, T, Y
91	R	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
92	S	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
93	N	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
94	W	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
96	L	F, I, L, N, R, W, Y

20

30

【 0 4 8 2】

P S M A 親和性成熟 F a b - p I X ライブラリの溶液パニングを、3ラウンドにわたってピオチン化ヒト P S M A E C D に対して行った。ファージに結合した抗原を、製造元のプロトコルに従ってニュートラアビジンビーズ (G E H e a l t h C a r e L i f e S c i e n c e カタログ番号 7 8 1 5 2 1 0 4 0 1 1 1 5 0) に捕捉し、続いて、1 x P B S T (t w e e n 2 0 中 0 . 0 5 %) で広範に洗浄し、500倍モル過剰のピオチン化抗原中非標識 P S M A E C D と共に1時間インキュベートした。このパニングにより、クローン、P S M X P 4 6 R 3 _ 5 9 H 0 9、P S M X P 4 6 R 3 _ 5 9 H 0 6、P S M X P 4 6 R 3 _ 5 9 E 0 3、P S M X P 4 6 R 3 _ 5 9 C 0 9、P S M X P 4 6 R 3 _ 5 9 H 0 1、P S M X P 4 6 R 3 _ 5 9 F 1 1、及び P S M X P 4 6 R 3 _ 5 9 F 0 7 が得られた。

40

【 0 4 8 3】

抗 P S M A f a b クローンの発現レベルを決定するために、96ウェル M a x i s o r b プレートを、4 で一晚抗ヒト F d I g G でコーティングし、洗浄し、3% ミルク - P B S - 0 . 0 5 % T w e e n で1時間ブロッキングした。最後のウェルブランクを用いて、11個の希釈液についてファージ上清サンプルをブロッキングバッファで2倍連続希釈した。100 μ L のこれらの溶液を、コーティングされたプレート上に1時間にわたって捕捉した。プレートを洗浄し、100 μ L の抗 F (a b ') 2 - H R P 抗体を1時間にわたって添加した。プレートを洗浄し、100 μ L のペルオキシダーゼ試薬で発色させ、E n v i s i o n で発光を読み取った (図 3 2) 。

50

【0484】

抗PSMA Fabクローンのヒト及びカニクイザル組換えタンパク質への結合を決定するために、96ウェルMaxisorbプレートを、4 で一晚、5 µg/mLのニュートラアビジン100 µLでコーティングした。プレートを洗浄し、3%ミルク-PBS-0.05%Tweenで1時間ブロックした。組換えビオチン化ヒト及びカニクイザルPSMAタンパク質を、室温で1時間にわたって、2.5 µg/mLで捕捉した。プレートを洗浄し、2倍連続希釈したfab上清100 µLを、RTで1時間にわたって捕捉した。プレートを洗浄し、次いで、PBST中0.3%ミルク200 µLと共に2.5時間インキュベートして、親和性の弱いfabの一部を洗い流した。次いで、新たなPBST中の0.3%ミルク200 µLと共に更に30分間インキュベートして、親和性の弱いfabを更に除去した。プレートを洗浄し、100 µLの抗F(ab')₂-HRP抗体を1時間にわたって添加した。プレートを洗浄し、100 µLのペルオキシダーゼ試薬で発色させ、Envisionで発光を読み取った(図33及び34)。

10

【0485】

図32は、親Fab及び親和性成熟Fabのタンパク質発現が類似していることを示す。y軸の値は、希釈曲線にわたってfabタンパク質の存在量に等しい検出試薬の発光を表し、発光の読み取り値が高いほど、連続的な2倍希釈で減少させたウェル内のタンパク質がより多い。親和性成熟fabを有するウェルにはより多くのタンパク質が存在していたが、EC50値(最大応答の半分を与えるタンパク質の濃度である)によって示されるように、親に対する増加は最大で5倍である。これらのデータは、図33におけるPSMA結合プロファイルの差を示しており、図34は、Fab濃度の差によるものではない。

20

【0486】

図33は、親和性成熟Fabのヒト組換え抗原に対する結合が親抗PSMA Fab(PSMB83)よりも改善されたことを示す。ここでもまた、グラフのy軸は、発光値を表す。この場合、値が大きいほど、ヒトPSMAタンパク質に結合したFabがより多いことを意味する。これは、(x軸に沿って)Fabの濃度を増加させるにつれて高い発光値が生じる、結合の尺度である。高濃度であってもシグナルが存在しないことによって実証されるように、これらの条件下での親Fabの結合はごくわずかであった(x軸に沿った白丸)。親和性成熟fabの結合は、試験された濃度にわたって観察され、これは、ヒトPSMAタンパク質に対する結合能がより強いことと等しい。ヒトPSMAタンパク質に対する親Fab結合がゼロであることに鑑みて、EC50を生成することはできなかった。

30

【0487】

図34は、親和性成熟Fabのカニクイザル組換え抗原に対する結合が親抗PSMA Fab(PSMB83)よりも改善されたことを示す。ここでもまた、グラフのy軸は、発光値を表す。この場合、値が大きいほど、カニクイザルPSMAタンパク質に結合したFabがより多いことを意味する。これは、(x軸に沿って)Fabの濃度を増加させるにつれて高い発光値が生じる、結合の尺度である。高濃度であってもシグナルが存在しないことによって実証されるように、これらの条件下での親Fabの結合はごくわずかであった(x軸に沿った白丸)。親和性成熟Fabの結合は、試験された濃度にわたって観察され、これは、ヒトPSMAタンパク質に対する結合能がより強いことと等しい。ヒトPSMAタンパク質に対する親Fab結合がゼロであることに鑑みて、直接比較するためのEC50を生成することはできなかった。

40

【0488】

全体として、ファージのFab結合プロファイルは、ヒト及びカニクイザル組換え抗原に対する結合が親抗PSMA mAb(PSMB127)よりも改善されたことを示す。この改善は、Fab発現レベルに対して正規化された親和性成熟Fabの結合を示す図34及び図35によって実証されるように、Fab発現プロファイルの違いの結果ではない。ELISAスクリーニングから同定された上位5つのFab候補を、IgG4 PAAにおいてモノクローナル抗体フォーマットで産生した。表26は、後続のMab識別子を

50

列挙し、表 2 7 及び表 2 8 は、それぞれ、その可変領域の配列並びに重鎖及び軽鎖の配列を示す。

【 0 4 8 9 】

【 表 2 3 】

表 2 6 : E L I S A に基づいて同定された上位 5 つの親和性成熟抗体

ウェルID	HC 配列番号	LC 配列番号	MABタンパク質ID
PSMXP46R3__59C09	PSMH859	PSML160	PSMB346
PSMXP46R3__59E03	PSMH859	PSML159	PSMB345
PSMXP46R3__59F07	PSMH862	PSML158	PSMB349
PSMXP46R3__59H01	PSMH860	PH9L3	PSMB347
PSMXP46R3__59H06	PSMH859	PH9L3	PSMB344

10

【 0 4 9 0 】

【 表 2 4 】

表 2 7 . 上位 5 つの P S M A F a b 候補の V H 及び V L 配列

MAB ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
PSMB344	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSMKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEIK	117
PSMB345	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSMKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSNYLAW YQQKPGQAPRLLIHDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEIK	9
PSMB346	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSMKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEIK	682
PSMB347	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSMKSRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEIK	117
PSMB349	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSLKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTKVEI K	10

20

30

40

【 0 4 9 1 】

【表 25 - 1】

表 28. I g G 4 P A Aにおけるモノクローナル抗体フォーマットにおける
上位 5 つの P S M A 候補の重鎖及び軽鎖配列

mAb ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号
PSMB344	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLE WVSEISGSGGYTNYADSMKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLLSLGLK	11	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQR NWPLTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	139
PSMB345	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLE WVSEISGSGGYTNYADSMKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLLSLGLK	11	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNYLAWYQ QKPGQAPRLLIHDAASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQR NWPLTFGQGTKEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	14
PSMB346	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLE WVSEISGSGGYTNYADSMKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLLSLGLK	11	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASYRAT GIPARFSGSGSGTDFTLT SSLEPEDFAVYYCQQRN WPLTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	680

10

20

30

40

【表 25 - 2】

(表 28 の続き)

mAb ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号
PSMB347	EVQLLES GGGGLVQP GGSRLR LSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLE WVSEISGSGGYTNYADSMKSRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGG GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK	12	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRS NWPLTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPRKAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	139
PSMB349	EVQLLES GGGGLVQP GGSRLR LSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLE WVSEISGSGGYTNYADSLKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARDSYDSSLYVGDYFDYWGG GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK	13	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRG NWPLTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPRKAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	15

10

20

30

【0493】

3つの異なるHC及び4つの異なるLCをマトリックス形式で組み合わせて、ヒットの相違を拡大した(表29)。PSMH860のCDR2におけるメチオニンが翻訳後リスクであることに鑑みて、M64Lを有する新たな配列が生成され、PSMH865として同定した。PSM865はPSML160と対になって、Mab PSMB365を生成した。

40

【0494】

【表 2 6】

表 2 9 : 組み合わせた 3 つの重鎖及び 4 つの軽鎖のマトリックス形式

	PSMH859	PSMH860	PSMH862
PH9L3	PSMB344	PSMB347	PSMB358
PSML158	--	PSMB361	PSMB349
PSML159	PSMB345	PSMB362	PSMB359
PSML160	PSMB346	PSMB363	PSMB360

【 0 4 9 5】

表 3 0 及び 3 1 は、それぞれ、マトリックスで組換えた可変領域の配列並びに重鎖及び軽鎖の配列を示す。

10

【 0 4 9 6】

【表 2 7】

表 3 0 . マトリックスで組換えた P S M A ヒットの V H 及び V L 配列

MAB ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
PSMB358	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S L K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	8	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEIK	117
PSMB359	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S L K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	8	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSNYLAW YQQKPGQAPRLLIHDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEIK	9
PSMB360	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S L K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	8	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEIK	682
PSMB361	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S M K S R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	7	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTKVEIK	10
PSMB362	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S M K S R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	7	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSNYLAW YQQKPGQAPRLLIHDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEIK	9
PSMB363	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S M K S R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	7	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEIK	682
PSMB365	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S L K S R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S	681	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEIK	682

20

30

40

50

【 0 4 9 7 】

【 表 2 8 - 1 】

表 3 1 . マトリックスで組換えた P S M A ヒットの重鎖及び軽鎖配列

MAB ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号
PSMB358	EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S L K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K	13	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSELEPEDFAVYYCQQ RSNWPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	139
PSMB359	EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S L K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K	13	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSNYLAW YQQKPGQAPRLLIHDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSELEPEDFAVYYCQQ RRNWPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	14
PSMB360	EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K S D A M H W V R Q A P G K G L E W V S E I S G S G G Y T N Y A D S L K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D S Y D S S L Y V G D Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K	13	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSELEPEDFAVYYCQQ RRNWPLTFGGGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	680

10

20

30

40

50

【 0 4 9 8 】

【 表 2 8 - 2 】

(表 3 1 の続き)

MAB ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号	
PSMB361	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGGGTYNYADSMKSRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK	12	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSELEPEDFAVYYCQQ RGNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVEFIPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	15	10
PSMB362	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGGGTYNYADSMKSRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK	12	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSNYLAW YQQKPGQAPRLLIHDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSELEPEDFAVYYCQQ RRNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVEFIPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	14	20
PSMB363	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGGGTYNYADSMKSRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK	12	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSELEPEDFAVYYCQQ RRNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVEFIPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	680	40

【 0 4 9 9 】

【 表 2 8 - 3 】

(表 3 1 の続き)

MAB ID	重鎖アミノ酸配列	配列番号	軽鎖アミノ酸配列	配列番号
PSMB365	EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAA SGFTFKSDAMHWVRQAPGKGLEW VSEISGSGGYTNYADSLKSRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDSYDSSLYVGDYFDYWGGGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK	679	EIVLTQSPATLSLSPGER ATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQQ RRNWPLTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNFFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYSLSSTL TLISKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	631

10

20

【 0 5 0 0 】

表 3 2 は、全ての親和性成熟 P S M A ヒットについての C D R 配列を示す。

【 0 5 0 1 】

【表 29】

表 32. 親和性成熟PSMAヒットのCDR配列

MAB ID		CDR(配列番号)		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB344	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMKG (1)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB345	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMKG (1)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSNYLA (4)	DASNRAT (82)	QQRNWPLT (686)
PSMB346	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMKG (1)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)
PSMB347	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMKS (2)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB349	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLKG (3)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRGNWPLT (5)
PSMB358	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLKG (3)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB359	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLKG (3)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSNYLA (4)	DASNRAT (82)	QQRNWPLT (686)
PSMB360	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLKG (3)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)
PSMB361	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMKS (2)	DSYDSSLYVGDYFDY (632)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRGNWPLT (5)
PSMB362	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMKS (2)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSNYLA (4)	DASNRAT (685)	QQRNWPLT (686)
PSMB363	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMKS (2)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (630)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)
PSMB365	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLKS (683)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)

【0502】

3 PSMA × CD3 二重特異性抗体の調製及び機能評価

3 - 1 PSMA × CD3 二重特異性抗体の生成

10

20

30

40

50

2種類の親和性成熟PSMA×CD3二重特異性抗体を生成した：高親和性CD3アームCD3B376（VH配列番号652、VL配列番号661、HC配列番号640、LC配列番号676）CD3アーム又は低親和性CD3B450（VH配列番号657、VL配列番号678、HC配列番号675、LC配列番号677）アームで組換えされた標的アーム（例えば、親和性成熟抗PSMA）に特異的なものである。

【0503】

これらの親mAbは、ターゲティング親（PSMA）が409RGenMab変異（IgG4のネイティブアミノ酸）を含有し、一方、殺傷親（CD3）はF405LGenMab変異及びR409K変異を含有する、GenMabフォーマット（Labrijet al, 2013）である。単一特異性抗CD3抗体を、そのFc領域にFc置換S228P、F234A、L235A、F405L及びR409K（CD3アーム）（EUインデックスに従って付番）を有するIgG4として発現させた。ターゲティング親（PSMA）は、Fc置換S228P、F234A、L235Aを有するヒトIgG4上にある。単一特異性抗体を、CMVプロモータ下においてHEK細胞株中で発現させた。

10

【0504】

親PSMA及びCD3抗体を、100mM NaAc pH3.5の溶出バッファ及び2.5M Tris pH7.2の中和バッファを用いたプロテインAカラムを使用して精製した。中和された親mAbを使用して、PSMA×CD3二重特異性抗体を作製した。親mAbの一部を、更に、分析測定及びアッセイのために、D-PBS、pH7.2バッファにバッファ交換した。

20

【0505】

精製後、制御されたFabアーム交換を行い、二重特異性抗体を作製した。親PSMA抗体を、75mM -2-MEA（2-メルカプトエチルアミン）中の還元条件下で所望の親CD3抗体と混合し、31で4時間又は室温で一晩インキュベートした。組換え反応は、モル比に基づくものであり、ここでは、組換え後に残存するCD3親mAbを最小化するために6%過剰のPSMA親mAbを使用した。その後、組換え物を1×DPBS、pH7.2に対して透析して、還元剤を除去した。

【0506】

組換え反応で使用した親mAb（すなわち、PSMA、CD3、又はヌル）と共に、産生された最終二重特異性抗体を表33に列挙する。

30

【0507】

選択されたPSMAヒットを非殺傷アーム（ヌル）と対にして、試験目的のための陰性対照を作製した。対照二重特異性抗体の場合、B2M1、IgG4 PAAフォーマット（VH配列番号610、VL配列番号611）におけるRSV抗体を生成し、精製し、それぞれ、CD3アームCD3B219-F405L、R409Kのいずれかと組み合わせるCD3B288（CD3×ヌル）を、又はPSMAアームPSMB122、PSMB126、PSMB130のいずれかと組み合わせるPS3B37、PS3B39及びPS3B40（PSMA×ヌル）を生成した。これらのPSMA特異的親和性成熟Mabを（上記の方法のように）CD3B219及びCD3B376と交差させて、表32に示す二重特異性抗体を生成した。

40

【0508】

【表 3 0】

表 3 3. 親和性成熟 P S M A ヒットから生成された親和性成熟 P S M A × C D 3 二重特異性抗体の生成

ID	アーム1	HC	LC	アーム2	HC	LC
PS3B60	PSMB344	PSMH859	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B61	PSMB345	PSMH859	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B62	PSMB346	PSMH859	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B63	PSMB347	PSMH860	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B64	PSMB349	PSMH862	PSML158	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B70	PSMB358	PSMH862	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B71	PSMB359	PSMH862	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B72	PSMB360	PSMH862	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B73	PSMB361	PSMH860	PSML158	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B74	PSMB362	PSMH860	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B75	PSMB363	PSMH860	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B76	PSMB358	PSMH862	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B77	PSMB349	PSMH862	PSML158	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B78	PSMB359	PSMH862	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B79	PSMB360	PSMH862	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B80	PSMB347	PSMH860	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B81	PSMB361	PSMH860	PSML158	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B82	PSMB362	PSMH860	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B83	PSMB363	PSMH860	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B84	PSMB344	PSMH859	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B85	PSMB345	PSMH859	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B86	PSMB346	PSMH859	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B90	PSMB365	PSMH865	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150

10

20

【 0 5 0 9】

3 - 2 L N C A P 細胞結合における P S M A × C D 3 親和性成熟二重特異性 A b の評価

30

P S M A × C D 3 二重特異性抗体を、P S M A 陽性細胞株、L N C A P、P S M A 陰性細胞株、P C 3 への結合について試験した。P S M A 二重特異性抗体の結合能を評価するために、(既に記載した通りの)細胞結合アッセイを利用した。二重特異性抗体をタンパク質濃度について正規化した後、ヒト又はカニクイザル P S M A のいずれかを発現している同じ数の細胞と共にインキュベートした。各濃度の M F I をフローサイトメトリーによって収集し、濃度の関数としてプロットした。データを \log_{10} を介して変換し、次いでプロットした。結合曲線の非線形回帰を行って、E C 5 0 を求めた。

【 0 5 1 0】

これらの相対値を、標的細胞に対する P S M A 結合をランク付けするために使用した。図 1 4 ~ 1 6 は、調製した全ての二重特異性抗体の L N C A P 結合を示す。図 1 6 では、コンストラクトのいずれも P S M A 陰性細胞株への結合を示さなかった。図 1 4 及び図 1 5 では、親和性成熟ヒットは全て、親 M a b、P S 2 B 2 7 と比較して、曲線の左側へのシフト及び c M a x の増加を通して結合親和性の増加を示した。

40

【 0 5 1 1】

組換えカニクイザル P S M A E C D とヒト P S M A E C D との親和性成熟二重特異性抗体の相互作用を、組換えチンパンジー P S M A E C D について既に記載した通り、P r o t e O n X P R 3 6 システム (B i o R a d) を使用して表面プラズモン共鳴 (S P R) によって試験した。二重特異性抗体の全てが、実質的に同じ親和性で両標的に結合し、K D は、ヒト P S M A E C D については 0 . 0 5 n M ~ 0 . 2 7 n M の範囲であ

50

り、カニクイザル P S M A E C D については 0 . 0 5 n M ~ 0 . 2 3 n M の範囲である。

【 0 5 1 2 】

3 - 3 機能性細胞殺傷アッセイにおける P S M A x C D 3 親和性成熟二重特異性 A b の評価

上記データ、親和性測定値、及び配列同一性に基づいて、C D 3 B 2 1 9 又は C D 3 B 3 7 6 のいずれかとの二重特異性物として、3つの P S M A 抗体、P S M B 3 4 7、P S M B 3 6 0、及び P S M B 3 6 5 を、P S M A 特異的なリダイレクトされた T 細胞の細胞傷害を媒介する能力について更に特性評価した。活性カスパーゼ 3 / 7 による蛍光基質の切断を介して細胞殺傷を間接的に測定するカスパーゼ細胞傷害アッセイを用いて、T 細胞媒介性殺傷を測定した。基質の切断により蛍光 D N A 色素が得られ、蛍光は細胞核に制限される。同じ座標でウェルを正確に撮像することができる電動式 1 0 倍対物レンズを使用して、アッセイの全過程を通して各ウェルにおいて繰り返し蛍光測定を行う。規定のサイズ制限に基づいて及び / 又は二次標識の使用を通して、標的細胞集団を特定する。冷凍した汎 C D 3 + T 細胞 (B i o l o g i c a l S p e c i a l t y C o r p o r a t i o n , C o l m a r , P A から購入) を、正常健康ドナーから陰性選択によって単離した。P S M A を発現している前立腺癌細胞 (L N C a P , C 4 2) を、1 0 % H I F B S + 補給物 (L i f e T e c h n o l o g i e s から購入) を含む R P M I 1 6 4 0 中で培養した。

10

【 0 5 1 3 】

T 細胞及び標的細胞を、選択試薬なしで、フェノールレッド不含 R P M I + 1 0 % F B S 及び補給物 (L i f e T e c h n o l o g i e s) 中、3 : 1 のエフェクター対標的比 (E : T) で合わせ、製造元ガイドラインに従って細胞各 1 m L に対して 0 . 6 μ L の N u c V i e w カスパーゼ試薬 (E s s e n B i o s c i e n c e) を添加した。総体積 0 . 1 m L の細胞を、透明な 9 6 ウェル平底プレート (B D F a l c o n) の適切なウェルに添加した。P S 3 B 2 7 (C D 3 x P S M A)、C D 3 B 2 8 8 (C D 3 x γ)、又は P S 3 B 4 6 (P S M A x γ) 二重特異性抗体を、上記のように調製したフェノールレッド不含 R P M I 中 2 x 最終濃度で調製し、0 . 1 m L の化合物を各ウェルに添加した。ウェルの縁部における細胞凝集を最小化するために室温で 3 0 分間インキュベートした後、プレートを Z o o m I n c u c y t e 機器 (E s s e n B i o s c i e n c e) に移した。I n c u c y t e 機器は、3 7 $^{\circ}$ C、5 % C O 2 に設定された加湿インキュベータ内に存在する。

20

30

【 0 5 1 4 】

I n c u c y t e における処理の解像度は、製造ガイドラインに従って、試験される各細胞株に対して設計した。カスパーゼシグナルにおいてプラトーが観察され、続いて、最高濃度の試験化合物を含有するウェルにおける最大シグナルから 3 回以上の連続的な減少が観察されるまで、6 時間ごとに測定を行った。図 1 7 のデータが示すように、P S 3 B 8 0、P S 3 B 7 9、P S 3 B 8 9、P S 3 B 9 0、P S 3 B 6 3、及び P S 3 B 7 2 の曲線は左にシフトし、これは P S 3 B 2 7 に対する効力の増加を示す。 γ アーム対照は、予想どおり細胞死を誘導しなかった。

40

【 0 5 1 5 】

3 - 4 ヒト化 N S G マウスにおける L n C a P 異種移植片の腫瘍形成予防における抗腫瘍有効性

ヒト T 細胞で腹腔内 (i p) ヒト化された雄 N O D . C g - P r k d c ^{s c i d} I L 2 r g ^{t m 1 W j 1} / S z J (N S G) マウスにおける、樹立された 3 D L n C a P A R . T B ヒト前立腺癌異種移植片において、P S 3 B 7 9 及び P S 3 B 9 0 の有効性を評価した。2 . 5 若しくは 5 m g / k g の P S 3 B 7 9 及び P S 3 B 9 0、又は γ x C D 3 B 3 7 6 抗体対照を、合計 8 回、3 6、3 9、4 3、4 7、5 0、5 3、5 6、6 0、及び 6 3 日目に q 3 d ~ q 4 d で投与した。1 群あたり 9 頭の動物が残っていた試験の最後の日である腫瘍移植後 5 3 日目に、腫瘍増殖抑制 (% T G I) を計算した。 γ x C

50

D3対照と比較して統計的に有意な腫瘍増殖阻害は、PS3B79については5mg/kgで42% TGI (Bonferroni検定を伴う二元配置分散分析、* p 0.001、図21)、並びにPS3B90については2.5及び5mg/kgでそれぞれ53%及び33% TGI (Bonferroni検定を伴う二元配置分散分析、* p 0.001、図22)が観察された。したがって、CD3B376は、インビボでT細胞活性化及び細胞傷害を誘導することができ、その結果、高親和性PSMA結合アーム、PSMB360及びPSMB365を有する二重特異性フォーマットにおける腫瘍増殖阻害をもたらすことができる。

【0516】

4 IL1RAP×CD3二重特異性抗体の調製及び機能評価

本開示の二重特異性抗体に使用され、使用するのに好適なIL1RAPモノクローナル抗体は、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第20170121420(A1)号に記載されている。15個の単一特異性IL1RAP抗体(米国特許出願公開第20170121420(A1)号の表6を参照されたい)は、Fc置換S228P、L234A、及びL235Aを有するIgG4として発現した。CD3親mAbは、S228P、L234A、L235A、F405L、及びR409Kを有するIgG4として発現した(EUインデックスに従って付番)。配列番号92のVH及び配列番号93のVLを有するVH及びVL領域と、S228P、L234A、L235A、F405L、及びR409K置換を有するIgG4定常領域とを含む単特異性抗CD3抗体CD3B220も生成した。

【0517】

プロテインAカラムを用い、標準的な方法を用いて単一特異性抗体を精製した。溶出後、プールをpH7に中和し、1×D-PBS、pH7.2に透析した。

【0518】

(国際公開第2011/131746号に記載の通り)制御されたFabアーム交換を通して単一特異性CD3 mAb(CD3B376:配列番号652のVH及び配列番号661のVL又はCD3B450:配列番号657のVH及び配列番号678のVL)及び単一特異性IL1RAP mAbと組み合わせることにより、二重特異性IL1RAP×CD3抗体を生成した。簡潔に述べると、DPBS、pH7~7.4中約1~20mg/mLの、モル比1.08:1の抗IL1RAP/抗CD3抗体を75mMの2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)と混合し、25~37°Cにおいて2~6時間インキュベートし、続いて、透析、ダイアフィルトレーション、接線流濾過により2-MEAを除去して、還元剤を除去し、二重特異性抗体の形成を可能にした。

【0519】

IL1RAP×CD3二重特異性抗体の重鎖及び軽鎖を以下の表34に示す。

【0520】

10

20

30

【表 3 1】

表 3 4. I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体 (括弧内は配列番号) の生成のために
 選択された 1 5 個の I L 1 R A P m A b の C D R 配列。

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
IAPB47	GYSFTSYW (152)	IYPSDSYT (153)	ARRNSAEN YADLDY (154)	QSISSND (155)	YAS (156)	QQSFTAPLT (157)
IAPB38	GFTFSNYA (158)	INYGGGSK (159)	AKDYGPFDY (160)	QSVDDW (161)	TAS (162)	QQYHHWPL T (163)
IAPB57	GGSISSSTY Y (164)	IYFTGST (165)	AKEDDSSG YYSFDY (166)	QGISSY (167)	AAS (168)	QQVNSYPL T (169)
IAPB61	GVSISSTY Y (170)	IYFTGNT (171)	GSLFGDYG FDY (172)	QFISSN (173)	GAS (174)	QQYNNWPS T (175)
IAPB62	GYTFNTYA (176)	INTNTGNP (177)	ARRYFDWL LGAFDI (178)	QGISSW (179)	AAS (168)	QQANSFPL T (180)
IAPB3	GGTFSSYA (181)	ISAIFGTA (182)	ARGNSFHA LWDYAFDY (183)	QSVLYSSN NKNY (184)	WAS (185)	QQYYSTPLT (186)
IAPB17	GGTFSSYA (181)	IIPIFGNA (187)	ARTIYLDYV HILDY (188)	QSVLYSSN NKNY (184)	WAS (185)	QQYYSTPLT (186)
IAPB23	GFTFSNYW (189)	IRYDGGGSK (190)	AKDAYPPY SFDY (191)	QSVSSY (192)	DAS (193)	QQRSNWPL T (194)
IAPB25	GFTFSSYA (195)	ISGSGGST (196)	AKGDEYYYP DPLDY (197)	QSISSY (198)	AAS (168)	QQSYSTPLT (199)
IAPB29	GFTFSNYA (158)	ISGSGGST (196)	AKEWSSYF GLDY (200)	QSISSY (198)	AAS (168)	QQSYSTPLT (199)
IAPB9	GGTFSSYA (181)	ISPIFGTA (201)	ARRYDNFA RSGDLDY (202)	QSISSY (198)	AAS (168)	QQSYSTPLT (199)
IAPB55	GVSISSTY Y (170)	IYFTGNT (171)	GSLFGDYG FDY (172)	QFISSN (173)	GAS (174)	QQYNNWPF T (203)
IAPB63	GYTFNTYA (176)	INTNTGNP (177)	ARRYFDWL LGAFDI (178)	SSDVGDN Y (204)	DVS (205)	ASYAGNYN VV (206)
IAPB64	GYTFNTYA (176)	INTNTGNP (177)	ARRYFDWL LGAFDI (178)	SSDVGDN Y (204)	DVS (205)	SSYAGNYN VV (207)
IAPB65	GGTFSSYA (181)	ISAIFGTA (182)	ARHLHNAI LDY (208)	QSVSNF (209)	GAS (174)	QQGKHWP WT (210)

10

20

30

40

【 0 5 2 1】

1 5 個の I L 1 R A P m A b の V H 及び V L 配列を以下の表 3 5 に示す。

【 0 5 2 2】

【表 3 2 - 1】

表 3 5. I L 1 R A P × C D 3 二重特異性抗体を生成するための I L 1 R A P m A b の V H 及び V L 配列。

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
IAPB47	EVQLVQSGAEVKKPGESLK ISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPSDSY TRYSPSFQGGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYCY ARRNSAENYADLDYWGGG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGPCPCPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	211	EIVLTQSPGTLSSLSPGERA TLSCRASQSSINDLNWYQ QKPGKAPKLLIYYASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT INSLQPEDFATYYCQQSFT APLTFGGGKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSSTLTSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	212
IAPB38	EVQLLESQGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVSGINYG GSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDYGPFALDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGPCPCPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	213	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVDDWLAWY QQKPGQAPRLLIYTASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQY HHWPLTFGGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSSTLTS KADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	214

10

20

30

40

【表 3 2 - 2】

(表 3 5 の続き)

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
IAPB57	QLQLQESGPGGLVKPSETLSL TCTVSGGSISSSTYYWGWIR QPPGKGLEWIGSIYFTGSTD YNPSLKSRVVISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCAK EDDSSGYYSFDYWGGNL VTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK	215	DIQLTQSPSFLSASVGDV TITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPEDFATYYCQQVN SYPLTFGGGKTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	216
IAPB61	QLQLQESGPGGLVKPSETLSL TCTVSGVSISSSTYYWGWL RQPPGMGLEWTGSIYFTGN TYYNPSLKSRVTISVDTSRN QFSLKLSSVTAADTAVYYC GSLFGDYGYFDYWGGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEVVEVSNQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK	217	EIVMTQSPATLSVPPGERA TLSCRASQFISSNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNN WPSTFGPGTKVDIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	218

10

20

30

40

【表 3 2 - 3】

(表 3 5 の続き)

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
IAPB62	QVQLVQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWV RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFSLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVVHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	219	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISLQPEDFATYYCQQA NSFPLTFGGGKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	220
IAPB3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGISAIFFT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYY CARGNSFHALWDYAFDYW GGGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVVHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	221	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFLTISLQAEDVAV YCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	222

10

20

30

40

【表 3 2 - 4】
 (表 3 5 の続き)

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
IAPB17	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGN ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYY CARTIIYLDYVHILDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSG EDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	223	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	222
IAPB23	EVQLLESQGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYWMNWV RQAPGKGLEWVSAIRYDGG SKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDAYPPYSFDYWGG GTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDPKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSG EDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	224	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYSLSSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	225

10

20

30

40

【表 3 2 - 5】

(表 3 5 の続き)

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号	
IAPB25	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G D E Y Y P D P L D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V Y S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K	226	DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQSYS TPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SIVCLLNNFYPRKAVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	227	10 20
IAPB29	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S N Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K E W S S Y F G L D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K	228	DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQSYS TPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SIVCLLNNFYPRKAVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	227	30 40

【表 3 2 - 6】

(表 3 5 の続き)

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
IAPB9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGWISPIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYY CARRYDNFARSGDLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPYTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	229	DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSSISYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	227
IAPB55	QLQLQESGPGLVKPSETLSL TCTVSGVSISSSTYYWGWL RQPPGMGLEWTGSIYFTGN TYYNPSLKSRTISVDTSRN QFSLKLSVTAADTAVYYC GSLFGDYGYFDYWGGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSL LGK	633	EIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCRASQFISNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNN WPFTFGPGHCVDIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	230

10

20

30

40

【表 3 2 - 7】

(表 3 5 の続き)

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
IAPB63	QVQLVQSGSELKKGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWV RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFSLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	219	QSALTQPRSVSGSPGHSV TISCTGTSSDVG DYNVVS WYQQRPGKVPKLLIYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDAIFYCA SYAGNYNVVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	231
IAPB64	QVQLVQSGSELKKGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWV RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFSLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	219	QSALTQPRSVSGSPGHSV TISCTGTSSDVG DYNVVS WYQQRPGKVPKLLIYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDAIFYCS SYAGNYNVVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	232

10

20

30

40

【表 3 2 - 8】

(表 3 5 の続き)

ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
IAPB65	QVQLVQSGAEVKKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGISAIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDTAVYY CARHLHNAIHLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDLAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK	233	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNFLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLI SSLEPEDFAVYYCQQGKH WPWTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	234

10

20

【0530】

4 - 1 全血T細胞傷害アッセイにおけるIL1RAP二重特異性抗体の評価

方法：腫瘍細胞株LAMA-84をDPBSで洗浄した後、 1.0×10^6 細胞/mL (CFSE) で、室温で8分間、CFSE (150 μ L DMSOに再懸濁し、1:10,000希釈) と共にインキュベートした。染色をHIFBSでクエンチし、培地で洗浄した後、 2×10^5 細胞/mLで完全培地に再懸濁させた。等体積の全血及びCFSE染色腫瘍細胞を96ウェルプレートの各ウェルにおいて合わせた。それぞれのウェルに抗体 (10 μ LのDPBS中に再懸濁) を添加した後、全てのプレートを37、5%CO₂で48時間インキュベートした。未希釈のCD25-PEを全血の各ウェルに直接添加し、室温で30分間インキュベートし、光から保護した。次いで、細胞を1500rpmで5分間遠心分離し、200 μ Lの複数種赤血球溶解バッファで溶解し、更に4回繰り返した。細胞をDPBSで1回洗浄し、Live/Dead Near-IR (DPBSで希釈) で15分間染色した (表36)。各ウェルを洗浄し、FACSバッファ中に再懸濁させた後、BD FACS CANTO IIで細胞を取得した。

30

40

【0531】

【表 3 3】

表 3 6 . 全血T細胞細胞傷害染色パネル

抗原	チャネル	クローン	希釈	供給元	カタログ番号
CD25	PE	BC96	1:100	Biolegend	302606
CD4	PerCP	RPA-T4	1:100	Biolegend	300528
CD8	APC	HIT8a	1:100	Biolegend	300912
Live/Dead	APC-Cy7	NA*	1:200	Invitrogen	L34976

50

* N A = 該当なし

【0532】

FACS CANTO II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ)での細胞取得は、 1×10^4 腫瘍細胞に限定された。細胞集団を特定するためのFSC及びSSC、次いで、CFSE陽性腫瘍事象、最後に、腫瘍細胞傷害を評価するためのLive/Dead Near-IRでゲーティングすることによって、腫瘍細胞死を評価した。細胞集団を特定するためのFSC及びSSC、CFSE陰性事象、生細胞を評価するためのNear-IR陰性事象、次いで、CD25陽性細胞でゲーティングすることによって、T細胞活性化を評価した。死腫瘍細胞又はCD25陽性細胞のいずれかの百分率を、GraphPad Prism 6を用いてグラフ化し、非線形曲線フィットで分析した。非線形混合効果モデルを使用して集団 EC_{50} 値を求めるために、プログラム「R」において追加の統計分析を評価した。

10

【0533】

結果：sIL1RAPを含有する生理学的末梢全血状態を再現するために、IC3B19 (IAPB57 \times CD3B219)及びIC3B34 (IAPB57 \times CD3B376)を、全血を利用するエキスピボT細胞リダイレクションアッセイにおいて評価した。外因的に添加したIL1RAP⁺LAMA-84細胞株 (2×10^4 細胞/ウェル)を、48時間かけてIC3B19、IC3B34、及びヌルアーム対照二重特異性抗体と共に健常対照ヒト末梢全血 (n = 15 ドナーサンプル)に添加した。図53に示す通り、IC3B19及びIC3B34は、48時間後にエキスピボにおいてIL1RAP⁺LAMA-84細胞株の同様のT細胞媒介細胞傷害を誘導した。図53に提示されるIC3B19及びIC3B34細胞傷害の EC_{50} 値は、それぞれ2.097及び2.762であった(表37)。同様に、図54によって表されるIC3B19及びIC3B34によるT細胞活性化(CD25)の EC_{50} 値は、それぞれ4.237及び7.825 nMであった(表38)。ヌルアーム対照二重特異性抗体は全て、図53及び図54に示すように、検出可能なレベルの細胞傷害もT細胞活性化も誘導しなかった。細胞傷害及びT細胞活性化の概ねのレベルは、IC3B19及びIC3B34の両方の間で類似していた。

20

【0534】

【表34】

表37. LAMA-84細胞株におけるIC3B19及びIC3B34の細胞傷害の EC_{50} (nM) 濃度

30

有効濃度(nM)	IC3B19	IC3B34
EC_{50}	2.097	2.762

【0535】

【表35】

表38. LAMA-84細胞株におけるIC3B19及びIC3B34のT細胞活性化の EC_{50} (nM) 濃度

40

有効濃度(nM)	IC3B19	IC3B34
EC_{50}	4.237	7.825

【0536】

4-2 24及び48時間における全血T細胞細胞傷害アッセイにおけるIL1RAP \times CD3二重特異性Abによるサイトカイン放出の評価

方法：実施例4-1の24時間及び48時間のサンプルからの凍結上清を、氷上で解凍した。使用前に、プレートを4で5分間500gで遠心分離し、次いで、氷上に戻した。ELISAのために1:2、1:25、及び1:1000の希釈比のMSD Diluent 2を使用して、U底96ウェルプレート(Falcon)において連続希釈液を調製した。

【0537】

50

上清を遠心分離している間、MSDアッセイプレート (ProInflammatory Panel I V - Plex、カタログ番号K15049G-4、ロット番号K008572) を製造元のプロトコルに従って予め洗浄した。提供された較正物質を1.0 mLのMSD Diluent 2で再構成することにより、標準曲線を作成した。50マイクロリットルの各サンプル又は標準を、予め洗浄したMSDプレートに直接添加した。その後のインキュベート及び洗浄は、全て製造元のプロトコルに従って実施した。MSD Sector Imagerでアッセイプレートを読み取った。

【0538】

IC3B19とIC3B34との間で応答を比較するために、2つの方法を使用した。

【0539】

混合効果を有する線形回帰

この方法では、対になったドナーを考慮した用量相互作用及びランダム効果による化合物、用量、及び化合物について固定効果を有する線形回帰モデルを構築した。次いで、各濃度でIC3B19とIC3B34との間の事後比較を行い、多重比較のためにp値を適切に調整した。

【0540】

混合効果を有する非線形 (4パラメータ) 回帰

それぞれの化合物の最小、最大、logEC50、及び傾きについての固定効果パラメータと、対にしたドナー効果を考慮するランダム効果項とを有する非線形回帰モデルを用いて、IC3B19及びIC3B34を一緒にモデル化した。点推定値及びその信頼区間を抽出し、これらの別個のモデルから目視比較のためにプロットした。対象となるパラメータの合同推定値を使用したモデルを構築し、次いで、そのモデルを対数尤度検定を使用して元のモデルと比較することによって、各パラメータについて有意差を検定した。精巧にするために、IC3B19の最小、IC3B19の最大、IC3B19のlogEC50、IC3B19の傾き、IC3B34の最小、IC3B34の最大、IC3B34のlogEC50、及びIC3B34の傾きのパラメータを用いたモデルが存在する。最小値が有意に異なるかどうかをチェックするために、最小について単一の共有パラメータが存在することを除いて、全て同じパラメータを有する第2のモデルを構築する。第1のモデルの対数尤度 (モデルがどのくらい良好にデータにフィッティングするかの全体的な尺度) を、第2のモデルの対数尤度と比較する。それらが互いに有意には異なっていない場合、最小が互いに有意には異なっていないと結論付けることができる。同様に、対数尤度が互いに有意に異なる場合、最小が有意に異なる結論付けるであろう。

【0541】

多くの場合、2つの理由のうちの1つから、モデル又はパラメータ比較を計算できなかった: 1. 4パラメータロジスティック回帰自体を計算するにはデータが扱いにくかった、又は2. パラメータ推定間の差が大きすぎて、合同モデルが失敗した。第1の場合、結果は報告せず、まとめの表には「NA」と示す。第2の場合も結果は報告しないが、有意の省略表現として「Sig」とまとめの表に示す。これらのパラメータの周囲の95%信頼区間は個別に推定可能であり、重なり合わないため、これらは有意に異なるが、正確なp値は未知であると考えられることができる。

【0542】

差は、0.05以下のp値で統計的に有意であると考えられる。全ての分析をR、バージョン3.3.2.で実施した。

【0543】

結果: T細胞及びIL1RAP+標的細胞株LAMA-84 (内因的及び外因的に添加された腫瘍細胞) のIC3B19及びIC3B34媒介会合の結果、T細胞サイトカイン放出が生じた。IC3B19とIC3B34との間のサイトカイン放出の差を求めるために、実施例1のセクションで論じた通り、外因性LAMA-84 IL1RAP+腫瘍細胞株を添加した、全血 (n=15ドナー) 細胞傷害及びT細胞活性化アッセイから10個の炎症促進性サイトカインについて上清を評価した。評価した10個のサイトカインのう

10

20

30

40

50

ち、IL-8及びIL-12p70を除いて、ほとんどのサイトカインは、IC3B19及びIC3B34の両方に応答して測定可能な用量依存性放出をもたらした。表39に示すように、IL-10、IL-2、TNF- α 、及びINF- γ が、最も強力なEC50(nM)放出をもたらした。加えて、サイトカインの大部分及び両時点で、IC3B34分子はEC50(nM)の効力を低下させ、これは統計的に有意であった。例外は、IL-4(24時間)、IL-6(24及び48時間)、IL-8(24及び48時間)、IL-12p70(24時間及び48時間)、IL-13(24時間)、INF- γ (24時間及び48時間)、及びTNF- α (24時間)であり、IC3B19とIC3B34との間でEC50(nM)値には統計的に有意な差がなかった。

【0544】

10

【表36】

表39. IC3B19及びIC3B34の4パラメータロジスティック回帰のまとめの表。太字のテキストは、IC3B19とIC3B34との間でのEC50(nM)値における統計的有意差を示す。個々のサイトカイン放出実験の結果を、示した図番号に示す。

サイトカイン	図番号	実験	EC50	Slope	最小	最大
IL-1ベータ	図37	24時間	0.0027	0.3046	0.0268	0.2033
IL-1ベータ	図38	48時間	0.0010	0.3951	0.2543	0.0528
IL-2	図39	24時間	0.0001	0.0256	0.3103	0.6466
IL-2	図40	48時間	Sig.	0.2079	0.0158	0.0008
IL-4	図41	24時間	0.2415	0.4668	0.2942	0.0043
IL-4	図42	48時間	NA	NA	NA	NA
IL-6	図43	24時間	Sig.	0.0819	0.1151	0.5224
IL-6	図44	48時間	NA	NA	NA	NA
IL-8	図45	24時間	NA	NA	NA	NA
IL-8	図46	48時間	NA	NA	NA	NA
IL-10	図47	24時間	<0.0001	0.0010	0.3406	0.7036
IL-10	図48	48時間	<0.0001	0.2702	0.0011	0.0004
IL-12p70	図49	24時間	NA	NA	NA	NA
IL-12p70	図50	48時間	NA	NA	NA	NA
IL-13	図51	24時間	NA	NA	NA	NA
IL-13	図52	48時間	0.0106	0.8268	<0.0001	<0.0001
INF- γ	図53	24時間	0.0065	0.6920	0.4644	0.3179
INF- γ	図54	48時間	0.0266	0.1678	0.2695	0.0319
TNF- α	図55	24時間	0.0016	0.0128	0.1443	0.7895
TNF- α	図56	48時間	0.0004	0.5553	0.0043	0.5216

20

30

【0545】

4-3 カスパーゼ細胞傷害アッセイにおけるIL1RAP二重特異性抗体の評価

IC3B19及びIC3B34のT細胞媒介性殺傷を、第2の種類細胞傷害アッセイを用いて測定した。カスパーゼ細胞傷害アッセイは、活性カスパーゼ3/7による蛍光基質の切断を介して細胞殺傷を間接的に測定する。基質の切断により蛍光DNA色素が得られ、蛍光は細胞核に制限される。同じ座標でウェルを正確に撮像することができる電動式10倍対物レンズを使用して、アッセイの全過程を通して各ウェルにおいて繰り返し蛍光測定を行う。規定のサイズ制限に基づいて、標的細胞集団を特定する。

40

【0546】

冷凍した汎CD3+T細胞(Biological Speciality Corporation, Colmar, PAから購入)を、正常健康ドナーから陰性選択によって単離した。標的細胞(NCI-H1975細胞、IL1RAPを発現しているヒト肺腺癌細胞株)を、10%熱不活化FBS、1mMピルビン酸ナトリウム、及び0.1mM非必

50

須アミノ酸 (Life Technologies) を補給した RPMI 1640 / Glutamax (25 mM HEPES バッファ) 培地中で培養した。

【0547】

標的細胞を、実験開始の16時間前に、補給物を含有するフェノールレッド不含 RPMI 培地 50 μ L 中 20,000 細胞/ウェルで、組織培養処理された透明な平底プレート (Costar) にプレATINGした。細胞を室温 (RT) で20分間インキュベートして、ウェル内で細胞を均一に分布させ、次いで、細胞を 37 及び 5% CO₂ で一晩インキュベートした。

【0548】

実験日に、T細胞を計数し、補給物を含有するフェノールレッド不含 RPMI 培地中 1.0×10^6 細胞/mL に希釈し、10 μ M の作用濃度については Nuc - View TM 488 カスパーゼ - 3 / 7 基質 (Essen Biosciences) と組み合わせた。組み合わせた T細胞及びカスパーゼ - 3 / 7 基質 100 μ L を、カスパーゼ - 3 / 7 基質の最終濃度 5 μ M で各ウェルに添加した。

10

【0549】

IC3B19 (IAPB57 \times CD3B219)、IC3B34 (IAPB57 \times CD3B376)、CD3B288 (ヌル \times CD3B219)、及び IAPB57 \times ヌル (IAPB101) 二重特異性抗体を、補給物を含有するフェノールレッド不含 RPMI 培地中 4 \times 最終濃度で調製し、各ウェルに 50 μ L の抗体を添加した。室温で20分間インキュベートしてウェル内の分布を均一にした後、プレートを Zoom Incucyte 機器 (Essen Bioscience) に移した。Incucyte 機器は、37、5% CO₂ に設定された加湿インキュベータ内に存在する。

20

【0550】

NCI - H1975 細胞について、Incucyte における処理の解像度を設計した。この処理の解像度は、T細胞をサイズによって除外しながら、標的細胞のカスパーゼ活性を明確に特定する。測定は、T0 及び 120 時間まで 6 時間ごとに行った。最大シグナルは、処理後 72 時間であると判定され、その時点でデータを分析した。

【0551】

アッセイが完了した後、NCCI H1975 の処理解像度を用いて各プレートを分析した。蛍光生データを Incucyte Zoom ソフトウェアからエクスポートし、GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) にペーストした。GraphPad において各ウェルの曲線下面積 (AUC) を計算することによって、カスパーゼ 3 / 7 活性を求めた。Log₁₀ nM 抗体濃度の関数として AUC 値をプロットした。各濃度応答曲線の EC₅₀ (ナノモル (nM)) を、非線形回帰 (シグモイド用量応答、- 可変の傾き) に従って報告した。各アッセイは、2 つの技術的複製物を含んでおり、各技術的複製物を 4 回測定した。

30

【0552】

IC3B19 及び IC3B34 はいずれも、NCI - H1975 細胞において標的的特異的細胞傷害を誘導したが、ヌルアームを有する二重特異性抗体 (IAPB57 \times B23B49 又は B23B39 \times CD3B219) は誘導しなかった (図 57)。このアッセイでは、細胞傷害 EC₅₀ は、IC3B19 と IC3B34 との間で 3 倍異なり、それぞれ 0.018 及び 0.057 nM の値である。

40

【0553】

4 - 4 T細胞ヒト化 NSG マウスの H1975 ヒト NSCLC 異種移植片における IAPB57 \times CD3B376 の有効性

IAPB57 \times CD3B376 二重特異性抗体 IC3B34 の有効性を、ヒト T細胞でヒト化された雌 NOD.Cg - Prkdcscid Il2rgtm1Wjl / SzJ (NSG) マウスにおける樹立された H1975 ヒト非小細胞肺癌 (NSCLC) 異種移植片において評価した。0.1、0.35、若しくは 1 mg / kg の IAPB57 \times CD3B376、又は ヌル \times CD3 抗体対照を、合計 4 回 14、18、21、及び 25 日目に投

50

与した。1群あたり10頭の動物が残っていた試験の最後の日である腫瘍移植後29日目に、腫瘍増殖抑制(%TGI)を計算した。ヌル×CD3対照と比較して統計的に有意な腫瘍増殖阻害は、0.35及び1mg/kgのIAPB57×CD3B376で観察され、それぞれ63%及び89% TGIであった(Bonferroni検定を伴う二元配置分散分析、 $p < 0.0001$ 、図58)。

【0554】

5 CD33抗体

5-1 抗原の生成

免疫化及びアッセイのためにC末端で融合させたC58S変異を有するヒト血清アルブミン(HSA)の変異型モノマー形態、Uniprot P02768を有する又は有しない、ヒト及びカニクイザルのCD33タンパク質を産生した。6-ヒスチジンタグ(配列番号596)を含むCD33タンパク質抗原をコードしているcDNAを合成的に合成し、標準的な分子生物学的技術を用いて、アクチンプロモーターの下にある哺乳類分泌発現ベクターにクローニングした。

10

【0555】

Uniprot P20138(配列番号235)由来の完全長ヒトCD33細胞外ドメイン(ECD)(ヒトCD33 ECD)を、N末端でHSAの有り無しでシグナル配列と融合させ、続いて、C末端で6ヒスチジンタグ(配列番号596)と融合させた(HSAを含むhCD33 ECD及びhCD33 ECDのみ)。製造元のプロトコルに従ってExpifectamineを使用して、HEK293由来細胞、Exp293(Gibco/Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA)にヒトCD33 ECD発現コンストラクトを一過的にトランスフェクトした。軌道振盪器において8%CO₂で37°Cにおいて5日間細胞をインキュベートした後、収集した。発現した細胞を遠心分離により除去し、Ni Sepharose 6 Fast Flow resin(GE Healthcare; Little Chalfont, United Kingdom)を使用する固定化金属アフィニティークロマトグラフィー、続いて、ダルツベッコリン酸生理食塩水バッファpH7.2(1×DPBS)中におけるSuperdex 200分取サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)(GE Healthcare)を使用して、可溶性CD33を培地から精製した。ジスルフィド凝集体を全て除くSEC溶出画分を合わせ、滅菌濾過して、免疫化及びCD33アッセイのための最終タンパク質を得た。A280によってタンパク質濃度を求め、SDS-PAGE及び分析SEC(Phenomenex; Torrance, CA)によって精製タンパク質の品質を評価した。EndoSafe-PTS Cartridges、発色性LALアッセイ(Charles River; Wilmington, MA)を使用して、内毒素測定を実施した。

20

30

【0556】

ヒトCD33 ECDサブドメインタンパク質、hCD33 V-ドメイン-HSA、hCD33 V-ドメイン-his、hCD33 C2ドメイン-HSA、及びhCD33 C2ドメイン-Hisを同様に構築し、発現させ、完全長ヒトCD33 ECDとして精製した。

40

【0557】

Genbank配列XP_005590138.1に基づいて、免疫化及び交差選択性アッセイのためのカニクイザルCD33コンストラクト、カニクイザルCD33 ECD-HSA、カニクイザルCD33-Hisも生成した。カニクイザルCD33タンパク質の発現及び精製は、ヒトCD33タンパク質と同様であった。

【0558】

製造元の条件に従ってSureLink Chromagenic Biotin Labelingキット(SeraCare KPL)を使用して、50mMのリン酸ナトリウムpH7.2中でスクリーニングのためのCD33抗原をビオチン化した。簡潔に述べると、ビオチンのタンパク質に対するモル比4:1で25mMのビオチン原液をCD3

50

3タンパク質に添加し、穏やかに回転させながら室温で30分間インキュベートし、次いで、4に切り替えて更に2時間インキュベートした。1×DPBSへのバッファ交換によって、組み込まれていないビオチンを除去した。NanoDropを使用してA280nm及びA354nmで測定することによって、タンパク質濃度及びビオチンの組み込みを求めた。上記抗原のそれぞれの配列については表40を参照されたい。

【0559】

【表37】

表40：抗原配列

タンパク質の名称	タンパク質ID	配列番号
カニクイザルCD33 ECD-HSA	C33W1	236
ヒトCD33 ECD-HSA	C33W2	237
ヒトCD33-V-HSA	C33W3	238
ヒトCD33-C2-HSA	C33W4	239
ヒトCD33-V-His	C33W8	240
ヒトCD33 C2-His	C33W9	241
ヒトCD33 ECD-His	C33W49	242
カニクイザルCD33 ECD-His	C33W50	243
ヒトCD33完全長		244
カニクイザルCD33完全長		245

10

20

【0560】

5-2 CD33発現同質遺伝子細胞株の生成

完全長のヒトCD33又はカニクイザルCD33とCD33陽性細胞を選択するためのピューロマイシンとを含有するレンチウイルス(Genecopoeia; Rockville, MD)を使用して、ヒト及びカニクイザルのCD33発現細胞株を生成した。CD33について陰性であるHEK293F細胞(ATCC)に、レンチウイルス粒子を形質導入して、ヒトCD33及びカニクイザルCD33を過剰発現させた。形質導入後、プールされた細胞を処理することによって、CD33及び耐性マーカーを陽性発現している細胞を選択し、DMEM+10%HI FBS(Life Technologies; Carlsbad, CA)中で増殖させ、様々な濃度のピューロマイシン(Life Technologies)を補給した。

30

【0561】

HEK生成細胞株に加えて、いくつかの市販の細胞株を、結合及び細胞傷害アッセイに使用した。これらはMOLM13、KG1、SH2、OCIAML3、及びMV411を含んでおり、American Type Culture Collection又はDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturenのいずれかから入手し、10% FBSを含む完全RPMI培養培地中、37、5%CO₂で培養した。

【0562】

5-3 免疫化キャンペーン

Omni Rat

ヒト免疫グロブリントランスジェニックラット系統(Omni Rat(登録商標); Ligand Pharmaceuticals; San Diego, CA)を使用して、ヒトCD33モノクローナル抗体発現ハイブリドーマ細胞を開発した。Omni Rat(登録商標)は、キメラヒト/ラットIgH遺伝子座(ラットC_H遺伝子座に連結された天然立体構造の22のヒトV_H、全てのヒトD及びJ_Hセグメントを含む)を完全にヒトのIgL遺伝子座(J_H-C_Lに連結された12のV_L及びJ_H-C_Lに連結された16のV_L)と共に含有する(例えば、Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4):1481-1490を参照)。したがって、このラットは、ラット免疫グロブリンの発現減少を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖

40

50

の導入遺伝子がクラススイッチ及び体細胞変異を受けて、完全にヒトの可変領域を有する高親和性キメラヒト/ラットIgGモノクローナル抗体が生成される。Omni Rat (登録商標)の調製及び使用、並びにこのようなラットが有するゲノム改変は、Bruggemannらの国際公開第2014/093908号に記載されている。

【0563】

組換えヒト及びカニクイザルCD33 (それぞれ、huCD33 ECD-HSA及びカニクイザルCD33 ECD-HSA)で免疫化したとき、このトランスジェニックラットは、ヒトCD33に対するキメラヒト-ラットIgG抗体を産生し、そのうちのいくつかはカニクイザルCD33にも結合する。

【0564】

8頭のOmni Ratを、huCD33 ECD-HSA及びカニクイザルCD33 ECD-HSAのどちらかで免疫化した。46日間の免疫化レジメン後、8頭のOmni Rat全てからリンパ節を摘出し、ハイブリドーマを生成するために使用した。81枚の96ウェルプレートのハイブリドーマ上清を、標準的な技術を用いて結合ELISA及びAlphaLISAを介してスクリーニングし、そのうち128個のハイブリドーマ上清を、huCD33 ECD-HSA及びカニクイザルCD33 ECD-HSAへの特異的結合について選択した。128個の上清の大部分が、huCD33又はcyCD33を過剰発現している細胞への結合についても陽性であった。

【0565】

6頭の追加のOmni RatをrhucD33のみで免疫化した。31日間の免疫化レジメン後、6頭のOmni Rat全てからリンパ節を摘出し、ハイブリドーマを生成するために使用した。30枚の96ウェルプレートのハイブリドーマ上清を、標準的な技術を用いて結合ELISAを介してスクリーニングし、そのうち94個のハイブリドーマ上清を、huCD33 ECD-HSA及びカニクイザルCD33 ECD-HSAへの特異的結合について選択した。陽性クローンからハイブリドーマ溶解物を調製し、下記v領域クローニングに進めた。

【0566】

Omni Mouse

ヒト免疫グロブリントランスジェニックマウス系統 (Omni Mouse (登録商標) ; Ligand Pharmaceuticals) を使用して、ヒトCD33モノクローナル抗体発現ハイブリドーマ細胞を開発した。Omni Mouse (登録商標) は、完全ヒトIgL遺伝子座と一緒にキメラヒト/ラットIgH遺伝子座を含有する。このマウスは、マウス免疫グロブリンの発現減少を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖の導入遺伝子がクラススイッチ及び体細胞変異を受けて、完全にヒトの可変領域を有する高親和性キメラヒト/ラットIgGモノクローナル抗体が生成される。

【0567】

組換えヒト及びカニクイザルCD33 (それぞれ、huCD33 ECD-HSA及びカニクイザルCD33 ECD-HSA)で免疫化したとき、このトランスジェニックマウスは、ヒトCD33に対するキメラヒト/ラットIgG抗体を産生し、そのうちのいくつかはカニクイザルCD33にも結合する。

【0568】

4頭のOmni Mouseを、huCD33 ECD-HSA及びカニクイザルCD33 ECD-HSAのどちらかで免疫化した。53日間の免疫化レジメン後、4頭のOmni Mouse全てから脾臓及びリンパ節を摘出し、ハイブリドーマを生成するために使用した。48枚の96ウェルプレートのハイブリドーマ上清を、結合ELISA及びAlphaLISAを介してスクリーニングし、そのうち8個のハイブリドーマ上清を、huCD33 ECD-HSA及びカニクイザルCD33 ECD-HSAへの特異的結合について選択した。陽性クローンからハイブリドーマ溶解物を調製し、下記v領域クローニングに進めた。

【0569】

10

20

30

40

50

V領域クローニング

ハイブリドーマ細胞溶解物からの全RNAを、製造元のプロトコルに従ってRNasy 96キット (Qiagen; Hilden, Germany) を使用して精製し、得られたRNAをDrop Senseを使用して定量化し、-80 で保存した、又はInvitrogen SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen; Carlsbad, CA) を使用してcDNAを合成した。それぞれ重鎖、鎖、及び鎖の定常領域にアニーリングされた遺伝子特異的プライマーを使用して、第1の鎖のcDNA合成を実施した。RT-PCR反応混合物は、最高3 µgの精製RNA、遺伝子特異的プライマー、dNTPミックス、反応バッファ、25 mM MgCl₂、DTT、RNase OUT (商標) (40 U/µL、Invitrogen)、及びSuperScript (商標) III RT (200 U/µL、Invitrogenカタログ番号18080-051) で構成されており、50 で50分間及び85 で5分間インキュベートされる。得られた一本鎖cDNAを-20 で保存した、又は一本鎖DNAをPCR増幅させた。PLATINUM Pfxポリメラーゼ (Invitrogen) を使用してPCR反応を行った。最適化されたPCR条件を使用して、それぞれ、リーダー配列並びに重鎖、及び鎖の定常領域に、フォワード及びリバースプライマーをアニーリングさせることによって、v領域断片を増幅させた。得られたPCR断片をゲルに流し、予め設計しておいたプライマーを使用して配列決定して、v領域配列を得た。得られたv領域配列の.abiファイルを収集し、Janssen Biologics Discoveryで作成されたSanger v領域配列解析プログラムによって分析した。回収されたv領域のAA配列を内部データベースに登録し、コドンを最適化し、所望のヒト抗体アイソタイプの適切な定常領域: IgG1 F405L及びIgG4 PAAを保有するpUnderベースの発現ベクターにクローニングした。合計76個のOMNIRat抗体及び8個のOMNIMouse抗体のクローニングに成功し、更なる特性評価に進めた。以下の表は、OMNIRatキャンペーンで同定された上位32 (表41を参照されたい) 及びOMNIMouseキャンペーンで同定された8 (表42を参照されたい) 由来の配列をまとめたものであり、OMNIRat抗体のうちのいくつかをIgG1及びIgG4 PAAにクローニングし、OMNIMouseキャンペーンからは全てをIgG1及びIgG4 PAAの両方にクローニングした。

【0570】

10

20

30

【表 3 8】

表 4 1 : OMN I R a t における C D 3 3 免疫化を介して同定された抗体配列

mAb	HC ID	HCアイソタイプ	LC ID
C33B46	C33H108	hulgG1F405L	C33L74
C33B48	C33H80	hulgG1F405L	C33L73
C33B52	C33H42	hulgG1F405L	C33L8
C33B54	C33H44	hulgG1F405L	C33L10
C33B55	C33H45	hulgG1F405L	C33L11
C33B56	C33H46	hulgG1F405L	IAPL24
C33B61	C33H48	hulgG1F405L	C33L58
C33B62	C33H49	hulgG1F405L	C33L59
C33B63	C33H51	hulgG1F405L	C33L34
C33B64	C33H52	hulgG1F405L	N46L109
C33B66	C33H55	hulgG1F405L	C33L42
C33B72	C33H65	hulgG1F405L	C33L47
C33B73	C33H66	hulgG1F405L	C33L60
C33B75	C33H70	hulgG1F405L	N46L109
C33B77	C33H72	hulgG1F405L	C33L40
C33B79	C33H74	hulgG1F405L	C33L38
C33B80	C33H76	hulgG1F405L	C33L39
C33B82	C33H78	hulgG1F405L	C33L57
C33B83	C33H81	hulgG1F405L	C33L53
C33B87	C33H87	hulgG1F405L	C33L35
C33B88	C33H88	hulgG1F405L	C33L61
C33B89	C33H90	hulgG1F405L	C33L51
C33B94	C33H98	hulgG1F405L	C33L69
C33B95	C33H98	hulgG1F405L	IAPL24
C33B96	C33H99	hulgG1F405L	C33L37
C33B101	C33H69	hulgG1F405L	C4LL152
C33B107	C33H68	hulgG1F405L	C33L17
C33B120	C33H87	hulgG1F405L	C33L41
C33B122	C33H92	hulgG1F405L	C33L30
C33B123	C33H91	hulgG1F405L	C33L44
C33B124	C33H73	hulgG1F405L	C33L32
C33B125	C33H84	hulgG1F405L	C33L66
C33B760	C33H45	huIgG4 PAA	C33L11
C33B777	C33H65	huIgG4 PAA	C33L47
C33B778	C33H66	huIgG4 PAA	C33L60
C33B782	C33H72	huIgG4 PAA	C33L40
C33B792	C33H87	huIgG4 PAA	C33L35
C33B799	C33H98	huIgG4 PAA	C33L69
C33B806	C33H69	huIgG4 PAA	C4LL152
C33B830	C33H84	huIgG4 PAA	C33L66
C33B836	C33H80	huIgG4 PAA	C33L73
C33B937	C33H66	huIgG4 PAA	C33L132

H C : 重鎖、L C : 軽鎖

【 0 5 7 1 】

10

20

30

40

【表 3 9】

表 4 2 : OMN I M o u s e における C D 3 3 免疫化を介して同定された抗体配列

mAb	HC ID	LC ID
C33B901	C33H249	C33L115
C33B902	C33H250	C33L116
C33B903	C33H251	C33L117
C33B904	C33H252	C33L118
C33B905	C33H253	C33L119
C33B906	C33H254	C33L120
C33B907	C33H255	C33L121
C33B908	C33H256	C33L122
C33B909	C33H249	C33L115
C33B910	C33H250	C33L116
C33B911	C33H251	C33L117
C33B912	C33H252	C33L118
C33B913	C33H253	C33L119
C33B914	C33H254	C33L120
C33B915	C33H255	C33L121
C33B916	C33H256	C33L122

HC : 重鎖、LC : 軽鎖

【 0 5 7 2 】

5 - 4 Expi293 小規模トランスフェクション及び精製

免疫化キャンペーン及びその後の (Ig G 1 F 4 0 5 L 及び Ig G 4 P A A への)
v 領域クローニングで同定された抗体を発現させ、小さな 2 mL スケールを介して精製した。Expi293 (商標) 細胞 (ThermoFisher Scientific) を、Expi293 (商標) 発現培地に $1.25 \times 10^5 \sim 2.25 \times 10^5$ 生存細胞 / mL の密度で播種し、37 °C、7% CO₂ のシェーカーインキュベータ (INFORS HT Multitron Pro) においてポリカーボネート製、使い捨て、滅菌、排気、パッフルなしの三角振盪フラスコ内で培養した。125 mL ~ 2 L の振盪フラスコにおける通常的な細胞増殖の場合、振盪直径 19 mm の振盪器については振盪速度を 130 rpm に設定した。細胞を継代培養し、この場合、生存率 98 ~ 99% で、密度が $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 生存細胞 / mL で対数増殖に達した。

【 0 5 7 3 】

トランスフェクションの日に、生存細胞密度及び生存率を求めた。細胞を、 3×10^6 生存細胞 / mL の密度でトランスフェクトした。最適なトランスフェクションのために、TE バッファ (10 mM Tris - HCl、1 mM EDTA、pH 8.0) 中 0.1 mg / mL の濃度の滅菌重鎖及び軽鎖プラスミド DNA を使用する。

【 0 5 7 4 】

製造元のトランスフェクションプロトコル (ThermoFisher Public ation Number MAN0007814) に従って、Expi293 (商標) 細胞をトランスフェクトした。24 ウェルディープウェルプレート (GE Health care) においてトランスフェクションを行った。簡潔に述べると、プラスミド DNA を、以下の比で 0.1 mL の OptiMEM (商標) 培地 (ThermoFisher Scientific) で希釈した : 0.250 µg の重鎖 DNA : 0.750 µg の軽鎖 DNA : 0.5 µg の pAdvantage。5 µL の ExpiFectamine (商標) 293 トランスフェクション試薬を希釈し、95 µL の OptiMEM (商標) 培地と穏やかに混合し、1 分間インキュベートした。希釈した ExpiFectamine (商標) 293 試薬を希釈した DNA に添加し、穏やかに混合し、ExpiFectamine (商標) 293 / プラスミド DNA 複合体を室温で 40 分間インキュベートした。

インキュベーション後、37℃、7%CO₂のシェーカーインキュベータにおいて一晩インキュベートした複合体に、1.8mLのExpi293(商標)細胞を添加した。

【0575】

トランスフェクション後1日目に、10μLのExpiFectamine(商標)293 Enhancer 1及び100μLのExpiFectamine 293(商標) Enhancer 2を添加し、プレートを更に5日間インキュベータに戻した。トランスフェクション後6日目に850×Gで15分間遠心分離することによって培養物を収集した後、精製した。

【0576】

上記で調製した1.7mLの清澄化した発現上清を、新たな2mL96ディープウェルプレートに移した。MabSelect SuRe(GE Healthcare)及びDPBS-/スラリーの1:4混合物800μLを、96ウェルAcroprep Advance 1μmガラスフィルタープレート(Pall)の全てのウェルにピペティングすることによって、精製プレートを調製した。200mbarの減圧をプレートに加えて過剰なPBSを除去し、その後、800μLの新鮮PBSで洗浄した。200mbarの減圧を加えて、洗浄パuffaを除去した。次いで、PBSで洗浄したレジンに清澄化した上清を移し、穏やかに混合し、15分間インキュベートした。インキュベーション後、200mbarの減圧を加えて上清を除去した。洗浄と洗浄との間に200mbarの真空圧力を加えながら、MabSelect SuReをPBSで3回洗浄し、25mM酢酸ナトリウム、pH5(TEKNOVA; Hollister, CA)で1回洗浄して、過剰のパuffaを除去した。0.1M酢酸ナトリウム、pH3.5を使用してレジンに結合しているmAbを溶出し、効果的に解離させるために10分間インキュベートした。フィルタープレートを96ディープウェルプレートの上に置き、1000gで2分間遠心分離することを介して溶出したmAbをボトムプレートに回収した。80μLの2.5Mトリス酢酸塩、pH7.2を添加してmAbを中和した。mAbを、96ウェルDispodIALYZERプレート(Harvard Apparatus; Holliston, MA)においてPBSに一晩透析し、96ディープウェルプレートの上に配置された96ウェルAcroprep Advance 0.2μm Suporフィルタープレート(Pall; Port Washington, NY)に移し、デスクトップ遠心分離において1,500gで15分間遠心分離することを介してタンパク質溶液を濾過した。DropSense Instrument(Trinean)を使用して、濾液に対するA280測定により、タンパク質濃度を求めた。

【0577】

10

20

30

【表 40 - 1】

表 43 : CD33 mAb 重鎖及び軽鎖可変領域

HC ID	配列番号	アミノ酸配列
B23H1	246	QITLKESGPTLVKPTQTTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWL AHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVLTMTNMDPVDATAYYC YGFYGFAYWGQGLTVTVSS
CD3H141	247	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC ARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
CD3H219	20	QVQLQQSGPRLVPSQTLSTLCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEW LGRYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYC ARGYSSSFYWGQGLTVTVSS
C33H42	248	QLQLQESGPGPLVNPSETLSHTCTVSGGSISSSSHYWGWRQPPGKGLEW IGKIYYSGNTYYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKMSSVTAADTAVYYCARLA DVVVVPAARYFDSWGQGLTVTVSS
C33H44	249	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEW LGRYYRSKWYNDYAVSVRSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYHC ARETMFRGLMDYWGQGLTVTVSS
C33H45	250	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWV AVISYDGSNKYCADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DFRSLDWLPPDSTSYDGMVWGQGTTVTVSS
C33H46	251	QVQLVQSGSELKKPGASVKVCSCKASGYTFTNYAMNWRQAPGGGLEWM GWINTNTGNPTYAQAFTRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARD REVRDYWGQGLTVTVSS
C33H48	252	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSTNYWGWIRQPPGKGLEWI GTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLA DVVVVPAARYFDYWGQGLTVTVSS
C33H49	253	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSSGFYWGWRQPPRKGLEWI GTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARLA DVVVVPAARYFDNWGQGLTVTVSS
C33H51	254	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISTGRYYWGWIRQPPGKGIWI GNIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARLG SLVVVPAAMSFYWGQGLTVTVSS
C33H52	255	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWVRQPPGKGLEW IGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTALYYCARL GSLVVVPAAMSFYWGQGLTVTVSS
C33H55	256	QVQLQESGPGPLVKPSGTLSTLCAVSGGSISSNWSWVRQPPGRGLEW IGEYHSGNTNNSPSLKSRTISADKSKNQFSLKLSSVTAADTAVYFCARII AVARYFDSWGQGLTVTVSS
C33H65	257	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV VVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DFRDFDWLPPDSTSYHGMDVWGQGTTVTVSS
C33H66	258	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCAK DFRDFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTVTVSS
C33H68	259	EVQLLESAGGLVQPGGSLGLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLNWW SAIDYSGNDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK ESQLLHGLFEHWGQGLTVTVSS
C33H69	26	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLDWI GSINYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLRSVTAADTAVYYCARLD GYESPFYWGQGLTVTVSS
C33H70	261	QLQLQESGPGPLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWIRQPPGKGLEWI GSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLG SLVVVPAAMSFYWGQGLTVTVSS
C33H72	262	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQHGEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRDLGYFDYWGQGLTVTVSS
C33H73	263	EVQLLESAGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSSYAMTWVRQAPGKGLEWV STINISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTKG GYSSGPFYWGQGLTVSVSS

10

20

30

40

【表 40 - 2】

(表 43 の続き)

HC ID	配列番号	アミノ酸配列
C33H74	264	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASRFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVHYCAK DFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGT TTVTVSS
C33H76	265	EVQLLES GGGVLVQP GGS LRLSCAASGFTFN YAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTY NSGYDGD F DYWGQGT LTVTVSS
C33H78	266	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAK DFRYFDWLPPDSSSYGMDVWGQGT TTVTVSS
C33H80	267	QVQLVQSGSELRKPGASVKV SCKASGYTFTNYAMN WVRQAPGQGLEWM GWINTNTGNPTYAQQFTGRFV FSLDTSVSSAYLQISSLKAEDTAMYYCAT DRDRGTDYWGQGT LTVTVSS
C33H81	268	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSAYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCAK DFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGT TTVTVSS
C33H84	269	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DFRSFDWLPPDSTSYGMDVWGQGT TTVTVSS
C33H87	270	EVQLVESGGGFVQP GGS LRLSCAASGFTFSSY WMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDN VKNLSLYLQMNSLRTE DTAVYYCAR DRDLGYFDYWGQGT LTVTVSS
C33H88	271	QVQLVQSGSELK KPGASVKV SCKASGYTLTRS AMN WVRQAPGQGLEW MGWINTNTGNPTYAQQFTGRFV FSLDTSVNTAYLLISLKTEDTAVYYCAS DILPGYHEDYWGQGT LTVTVSS
C33H90	272	QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSA AWN WIRQSPSRGLEW LGRTYYSK WYNDYALSVQSRITINPDT SKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC AREVAVAASF DYWGQGT LTVTVSS
C33H91	273	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSRSHYWG WIRQPPGVGLEWI GSIYYTGSTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLA DIVVVAARYFDYWGQGT LTVTVSS
C33H92	274	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSYWGWIRQPPGKGP EWI GSIYSSGNTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLISMTAADTAVFYCARLA ATIVVPAARYFDCWGGQGT LTVTVSS
C33H98	275	EVQLVESGGGFVQP GGS LRLSCAASGFTFSSY WMSWVRQAPGKGLEWV ANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRDLGYFDYWGQGT LTVTVSS
C33H99	276	EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSY WMTWVRPAPGKGLEWV ANIKRDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AANSLYLQMNSLRVEDTAVYYCAR PFYDHF DYWGQGT LTVTVSS
C33H108	277	QVQLVQSGSELK KPGASVKV SCKASGYTFSTY AMN WVRQAPGQGLEWM GWINTNTGNPTYAQQFTGRFV FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARD RDRGTDYWGQGT LTVTVSS
C33H249	278	EVQLVESGGGLVQP GRS LRLSCVASGFTFDDY AIHWVRQAPGKGLEWVS GLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLKTEDTAFYYCTKD TPYGDYFDYWGQGT LTVTVSS
C33H250	279	EVQLVESGGGLVQP GRS LRLSCAGSGFTFDDY AIHWVRQAPGKGLEWVS GLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQLNSLKTEDTAFYYCAKD SPYGDYFDYWGQGT LTVTVSS
C33H251	280	EVQLVESGGGLVQP GRS LRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKGLEWV SGIGWGGSIYADSVKGRFKISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DSPYGDFFDYWGQGT LTVTVSS
C33H252	281	EVQLVESGGGLVQP GRS LRLSCAASGFTFDDY AMHWVRQAPGKGLEWV SGIGWGGSIYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAK DSPYGDFFDYWGQGT LTVTVSS
C33H253	282	EVQLLES GGGVLVQP GGS LKL SCTASGFTFRSYAMSWVRQAPGKGLEWV SAINGYGDGRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYSCAK DQGFGE LFFDYWGQGT LTVTVSS
C33H254	283	QVQLVESGGGVVQP GRS LRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPDKGLEWV AVIWF DGN NKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRELLFDYWGQGT LTVTVSS

10

20

30

40

【表 4 0 - 3】

(表 4 3 の続き)

HC ID	配列番号	アミノ酸配列
C33H255	284	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPGEGLWV SGISWNGGDMVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCV KDMPYFDLFTGSDYIYGMVWGGGTTVTVSS
C33H256	285	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWV AVIWYVGGSHKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DGSLECFDYWGQGLTVTVSS
LC ID	配列番号	アミノ酸配列
B23L3	286	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPGQPPK LLIYAASNPESGVPDFRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQIIEDPW TFGQGTKEIK
CD3L66	287	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVL
CD3L150	52	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFSWYQQHPDKAPKVL YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLL FGGGTKLTVL
C33L8	288	SYELTQPPSVSVSPGQTASIICSGDKLGNKYACWYQQKPGQSPVLVIYQD SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAWDSSTVVF TKVTVL
C33L10	289	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGSNIGSKSVHWYQQKPGQAPVMVYD DSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDS SSDVVFGG GGTKLTVL
C33L11	290	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHKLGDKYACWYQQKPGQSPVVIYQD SKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVF GGG TKLTVL
IAPL24	291	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSPVLVIYQD SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVF GG GKLTTL
C33L58	292	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSPVLVIYQD YKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVF GTG TKVTVL
C33L59	293	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSPVLVIYQD YKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYYCQAWDISTVVF GTGT KTVTVL
C33L34	294	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQLRPGQSPILVIYQD SNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTWVF GGG GKLTTL
N46L109	295	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSPVLVIYQD SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTWVF GGG GKLTTL
C33L42	296	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGIKSVHWYQQKPGQAPVLVYD SDRPPGIPERFSGSNSGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDS SSDHVVFG GGTKLTVL
C33L47	297	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSPVVIYQD RKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVF GGG TKLTVL
C33L60	298	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDYACWYQQKPGQSPVLVIYQD GKRPSGIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRNTVVF GGG GKLTTL
C33L17	299	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKAGQP PKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFILIISSLQAEDVAVYYCQYYGT PWTFGQGTKEIK
C4LL152	300	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYA ASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQANSFPFTFGP GKVDIK
C33L40	301	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGAKFASWYQQKPGQSPVLVIYQD NKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAWDSSTVVF GGG TKLTVL

10

20

30

40

【表 40 - 4】

(表 43 の続き)

HC ID	配列番号	アミノ酸配列
C33L32	302	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVVRWYQQKTGQSPVLVMYQ DSKRPSGIRERFYGSNSGNTATPTISGTQAVDEAEYQCQAWDSSTGVVFG GGTKLTVL
C33L38	303	SYELTQPPSVSVPPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQD NKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWGRNTVVFGG GTKLTVL
C33L39	304	QSALTQPASVSGSPGQSIPISSTGTSSDDGKNNIVSWYQQHPGKAPKLMI YKDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEADYHCCSYAGASNH VVFGGGTKLTVL
C33L57	305	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGNKYACWYQQKPGQSPVVVYQ DRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGG GTKLTVL
C33L73	306	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDYNYVSWYQQHPGKVPKLMI YDVSNRPSGVSNRFSGSMGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSSAL EVFGGGTKLTVL
C33L53	307	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQD NKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSNTVVFGG GTKLTVL
C33L66	308	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVIHQ DRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGG GTKLTVL
C33L35	309	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYASWYQQKPGQSPVLVIYQD TKRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYHCQAWDSSTVVFGG GTKLTVL
C33L61	310	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGINSVGSYDLVSWYQQHPGKAPKLLIY DGSERPSGVFGRFSGSKSDNTTSLTISGLQAEDEAAYCCSYEVTTTYVV FGGGTKLTVL
C33L51	311	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWSQQKPGQAPVLVVYD DSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSNSDHVVF GGGTKLTVL
C33L44	312	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQD SNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISETQAMDEADYYCQAWDSSTVYVFGT TKVTVL
C33L30	313	SYELTQPPSVSVSPGQTVSISCSGDRLGDKYACWYQQKPGQSPVLVIYQ DSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVYVFGT GTKVTVL
C33L69	314	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFACWYQQKPGQSPVLVIYQD SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGG GTKLTVL
C33L37	315	SYVLTQPPSVAVAPGQTARITCGGSNIGKISVHWYQQKAGQAPVLVVHDD RARPSGIPERLGSNSGTTATLTISRVEVGDEADYYCQVWNSSSVHPVFG GGTKLTVL
C33L74	316	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDNYVSWYQQHPGKAPKLMI YDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYYCSSYSSSTLE VFGGGTKLTVL
C33L115	317	DIQMTQSPSSVWASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPNLLIYR SSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNSFPYTFGG GTKLEIK
C33L116	318	DIQMTQSPSSEWASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYG ASSWQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQDNSFPYTFGG GTKLEIK
C33L117	319	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQP PKLLISWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYYSS TPYTFGGQGTKLEIK
C33L118	320	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQP PKLLISWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYYSS TPYTFGGQGTKLEIK

10

20

30

40

【表 4 0 - 5】
 (表 4 3 の続き)

HC ID	配列番号	アミノ酸配列
C33L119	321	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYK ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFATYCCQQYNSYPWTFGG GTKVEIK
C33L120	322	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDMYACWYQQKPGQSPLVVIYQ DSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQTDTRIAVFGG GTNLTVL
C33L121	323	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGNEHVCWYHQKPGQSPVLVIYQN NKRPSGIPERFSGSNSGNTATLSISGTQATDEADYYCQAWDSTTAVFGGG TKLTVL
C33L122	324	SYELTQPPSVSVSPGQTANISCSGVTLGYNAYWYQQKPGQSPILVISQD TQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQAWDITTVLFGGGT KLTVL
C33L132	325	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQD GKRPSGIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRNTVVFGG GTKLTVL
C33L41	326	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYASWYQQKPGQSPVLVIYQD SKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGG GTKLTVL

10

【 0 5 8 2 】

20

【表 4 1】

表 4 4 : C D 3 3 m A b の重鎖 C D R 1 ~ 3 配列

HC ID	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
B23H1	GFSLSTSGMG	327	IYWDDDK	368	ARLYGFTYGFAY	409
CD3H141	GFTFNTYA	328	IRSKYNNYAT	369	ARHGNFGNSYVSWFAY	410
CD3H219	GDSVFNNNA	329	TYRYSKWLY	370	ARGYSSSFYD	411
C33H42	GGSISSSSHY	330	IYYSGNT	371	ARLADVVPAAARYFDS	412
C33H44	GDSVSSNSAA	331	TYRYSKWYN	372	ARETMFRGLMDY	413
C33H45	GFTFSSYG	332	ISYDGSNK	373	AKDFRSLDWLPPDSTS YDGM DV	414
C33H46	GYTFTNYA	333	INTNTGNP	374	ARDREVRDY	415
C33H48	GGSIIRSTNYY	334	IYYSGNT	375	ARLADVVPAAARYFDY	416
C33H49	GGSISSSGFY	335	IYYSGNT	376	ARLADVVPAAARYFDN	417
C33H51	GGSISTGRYY	336	IYYSGNT	377	ARLGLVVPAAAMSFYD	418
C33H52	GGSISSSSYY	337	IYSSGNT	378	ARLGLVVPAAAMSFYD	419
C33H55	GGSISSSNW	338	IYHSGNT	379	ARIIVARYFDS	420
C33H65	GFTFSSYG	339	ISYDGSNK	380	AKDFRDFDWLPPDSTS YHGMDV	421
C33H66	GFTFSSYG	340	ISYDGSNK	381	AKDFRDFDWLPPDSASYHGMDV	422
C33H68	GFTFSGYA	341	IDYSGNDT	382	AKESQLLHGLFEH	423
C33H69	GGSISSSSYY	342	INYSGST	383	ARLDGYESPFYD	424
C33H70	GGSISSSSYY	343	IYSSGNT	384	ARLGLVVPAAAMSFYD	425
C33H72	GFTFSSYW	344	IKQHGSEK	385	ARDRDLGYFDY	426
C33H73	RFTFSSYA	345	INISGGST	386	TKGGYSSGPFYD	427
C33H74	RFTFSSYG	346	ISYDGSNK	387	AKDFRDFDWLPPDSASYHGMDV	428
C33H76	GFTFNYA	347	ISGSGGST	388	ARTYNSGYDGDYD	429
C33H78	GFTFSSYG	348	ISYDGSNK	389	AKDFRYFDWLPPDSSSYGMDV	430
C33H80	GYTFTNYA	349	INTNTGNP	390	ATDRDRGTDY	431
C33H81	GFTFSAYG	350	ISYDGSNK	391	AKDFRDFDWLPPDSASYHGMDV	432
C33H84	GFTFSSYG	351	ISYDGSNK	392	AKDFRDFDWLPPDSTS YGMDV	433
C33H87	GFTFSSYW	352	IKQHGSEK	393	ARDRDLGYFDY	434
C33H88	GYTLTRSA	353	INTNTGNP	394	ASDILPGYHEDY	435
C33H90	GDSVSSNSAA	354	TYRYSKWYN	395	AREVAVAASFYD	436
C33H91	GGSISSRSY	355	IYYTGST	396	ARLADIVVPAAARYFDY	437
C33H92	GGSISSSSYY	356	IYSSGNT	397	ARLAATIVVPAAARYFDC	438
C33H98	GFTFSSYW	357	IKQHGSEK	398	ARDRDLGYFDY	439
C33H99	GFTFSSYW	358	IKRDGGEK	399	ARPFYDHFYD	440
C33H108	GYTFSTYA	359	INTNTGNP	400	ARDRDRGTDY	441
C33H249	GFTFDDYA	360	LSWNGGNI	401	TKDTPYGDYFDY	442
C33H250	GFTFDDYA	361	LSWNGGNI	402	AKDSPYGDYFDY	443
C33H251	GFTFDDYA	362	IGWSGGSI	403	AKDSPYGDFFDY	444
C33H252	GFTFDDYA	363	IGWSGGSI	404	AKDSPYGDFFDY	445
C33H253	GFTFRSYA	364	INGYGDGR	405	AKDQGFELFFDY	446
C33H254	GFTFSYYG	365	IWFDGNNK	406	ARDRELLFDY	447
C33H255	GFTFDDYA	366	ISWNGGDM	407	VKDMPYFDLFTGSDYYYYGMDV	448
C33H256	GFTFSNYG	367	IWYVGS HK	408	ARDGSLCFDY	449

10

20

30

40

【 0 5 8 3 】

【表 4 2】

表 4 5 : C D 3 m A b の軽鎖 C D R 1 ~ 3 配列

LC ID	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
B23L3	QSVDYNGISY	450	AAS	492	QQIIEDPWT	534
CD3L66	TGAVTTSNY	451	GTN	493	ALWYSNLWV	535
CD3L150	SSNIGTYKF	452	EVS	494	VSYAGSGTLL	536
C33L8	KLGNKY	453	QDS	495	QAWDSSTYV	537
C33L10	NIGSKS	454	DDS	496	QVWDS SSDVV	538
C33L11	KLGDY	455	KDS	497	QAWDSSTVV	539
IAPL24	KLGDY	456	QDS	498	QAWDSSTVV	540
C33L58	KLGDY	457	QDY	499	QAWDSSTYV	541
C33L59	KLGDY	458	QDY	500	QAWDISTYV	542
C33L34	KLGDY	459	QDS	501	QAWDSSTWV	543
N46L109	KLGDY	460	QDS	502	QAWDSSTWV	544
C33L42	NIGIKS	461	DDS	503	QVWDS SSDHV	545
C33L47	KLGDY	462	QDR	504	QAWDSSTVV	546
C33L60	KLGDY	463	QDG	505	QAWDRNTVV	547
C33L17	QSVLYSSNNKNY	464	WAS	506	QQYYGTPWT	548
C4LL152	QGISSW	465	AAS	507	QQANSFPFT	549
C33L40	KLGAKF	466	QDN	508	QAWDSSTVV	550
C33L32	KLGDY	467	QDS	509	QAWDSSTGVV	551
C33L38	KLGDY	468	QDN	510	QAWGRNTVV	552
C33L39	SSDDGKNNI	469	KDS	511	CSYAGASNHV	553
C33L57	ELGNKY	470	QDR	512	QAWDSSTVV	554
C33L73	SSDVGDYNY	471	DVS	513	SSYSSSSALEV	555
C33L53	KLGDY	472	QDN	514	QAWDSNTVV	556
C33L66	KLGDY	473	QDR	515	QAWDSSTVV	557
C33L35	KLGNKY	474	QDT	516	QAWDSSTVV	558
C33L61	NSDVGSYDL	475	DGS	517	CSYEVTTTYVV	559
C33L51	NIGSKS	476	DDS	518	QVWDSNSDHVV	560
C33L44	KLGDY	477	QDS	519	QAWDSSTYV	561
C33L30	RLGDY	478	QDS	520	QAWDSSSYV	562
C33L69	KLGSKF	479	QDS	521	QAWDSSTVV	563
C33L37	NIGKIS	480	DDR	522	QVWNSSSVHPV	564
C33L74	SSDVGDYNY	481	DVS	523	SSYSSSTTLEV	565
C33L115	QGISSW	482	RSS	524	QQDNSFPYT	566
C33L116	QGISSW	483	GAS	525	QQDNSFPYT	567
C33L117	QTVLYSSNNKNY	484	WAS	526	QHYYSTPYT	568
C33L118	QTVFYSSNNKNY	485	WAS	527	QHYYSTPYT	569
C33L119	QSISW	486	KAS	528	QQYNSYPWT	570
C33L120	ELGDMY	487	QDS	529	QTWDTRIAV	571
C33L121	NLGNEH	488	QNN	530	QAWDSTTAV	572
C33L122	TLGYNY	489	QDT	531	QAWDITTVL	573
C33L132	KLGDY	490	QDG	532	QAWDRNTVV	574
C33L41	KLGNKY	491	QDS	533	QAWDSSTVV	634

【 0 5 8 4 】

5 - 5 抗 C D 3 3 m A b の特性評価

免疫化を介して同定し、v 領域クローニングし、続いて、発現及び精製した O M N I R a t 抗体を、C D 3 3 発現細胞への結合及び組換え抗原への結合について更に特性評価し

10

20

30

40

50

た。精製抗体を、ヒトCD33又はカニクイザルCD33(上記の通り生成)を発現している安定的にトランスフェクトされたHEK293F細胞への結合について、陰性対照としての親HEK293Fと共に評価した。非酵素的解離バッファ(Thermo Scientific)を使用して、細胞を組織培養フラスコから収集した。フラスコをPBSで2回すすぎ、解離バッファをフラスコに添加し、細胞が非接着性になるまでフラスコを37で10分間インキュベートした。細胞を300gで5分間遠心分離し、染色バッファ(Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ)に 1.0×10^6 細胞/mLで再懸濁させた。50,000細胞/ウェルの各細胞型を、丸底プレート(Becton Dickinson)における染色バッファ50 μ LにプレATINGした。2 \times 濃度の試験mAb又はアイソタイプ対照50 μ Lを3つの希釈濃度及びゼロ(120nM、12nM、及び1.2nM、並びに0nM)で添加し、得られた溶液を4で30分間インキュベートした。各プレートの全てのウェルに100 μ Lの染色バッファを添加し、プレートを300gで5分間回転させ、バッファを除去し、各プレートの全てのウェルに200 μ Lの染色バッファを添加し、プレートを300gで5分間回転させ、バッファを除去した。50 μ Lの2 μ g/mLヤギ抗ヒトFc AF647二次抗体(Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA)をプレートの全てのウェルに添加し、プレートを4で30分間インキュベートした。プレートの全てのウェルに100 μ Lの染色バッファを添加し、プレートを300gで5分間回転させ、バッファを除去した。200 μ Lのランニングバッファ(ランニングバッファは、染色バッファ、1mM EDTA、0.1%プルロニック酸である)をプレートの全てのウェルに添加し、プレートを300gで5分間回転させ、バッファを除去した。Sytox Green live/dead色素(ThermoFisher)を含有するランニングバッファ30 μ Lを細胞の入った全てのウェルに添加し、プレートをiQue IntelliCytフローサイトメータで読み取った。細胞を前方対側方散乱でゲーティングして細胞片を除去し、次いで、個片、次いで、Sytox染色を除外した生細胞でゲーティングした。AF647チャンネルにおける平均蛍光強度によって抗体結合を評価した。

【0585】

精製mAbの生物物理的結合特性の評価を開始するために、オフプレートスクリーニングを実施した。76個のOMNIRat抗CD33mAbを、組換えヒトCD33 ECD-HSA(C33W2)及びカニクイザルCD33 ECD-HSA(C33W1)タンパク質(Janssen production)への結合について試験し、IBIS MX96 SPRiプラットフォーム(Carterra; Newton, PA)によってオフプレートを測定した。IBIS機器において10分間の会合時間で、CMD50mセンサチップ(Xantec、ロットCMD50m0415.a)を使用し、酢酸バッファpH4.5中100 μ g/mLのアミンカップリングを介して、ヤギ抗ヒトFc IgG(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-005-098)を直接固定化した。約9000Rusの平均GAH-Fc固定化レベルが達成された。センサチップをContinuous Flow Microspotter(CFM)ユニットに移して、10分間10 μ g/mLで各抗CD33mAbを捕捉した。再生なしの単一サイクルの反応速度論により、結合をIBIS SPRiで測定した。各抗原濃度系列(3倍希釈系列で3 μ M)を低濃度(0.46nM)から高濃度(3 μ M)まで逐次注入して、ランニングバッファとしてPBST(0.005%Tweenを含むPBS)を使用して、5分間の会合時間及び15分間の解離時間で、捕捉されたmAbに結合させた。生の結合データ(.trixファイルフォーマット)を参照し、SprintXソフトウェア(Wasatch、バージョン1.9.3.2)を使用して整列させた後、1:1結合反応速度分析(Wasatch、バージョン2.0.0.33)のためにScrubberソフトウェア(バージョン2.0)にエクスポート(.ibmxファイルフォーマット)して、 k_{off} 結果を抽出した。

【0586】

以下の表 4 6 は、ヒト及びカニクイザル CD 3 3 発現細胞株への結合、並びに組換え抗原に対する結合（抗原のうちの一つについて少なくとも $> 10 e^{-3}$ のオフレート）によって評価したときの上位 3 2 のクローンをまとめたものである。これらの 3 2 個のうち、4 個を除いた全てが、ヒト又はカニクイザル発現細胞のいずれかへの認識可能な結合を示した。3 2 個全てを、エピトープマッピング及び全反応速度分析を介した更なる特性評価に進めた。

【 0 5 8 7 】

【表 4 3】

表 4 6. OMN I R a t 由来の抗 CD 3 3 抗体の細胞結合及びオフレート分析

タンパク質 AA ID	Mon%	60nM CD33	6nM CD33	0.6nM CD33	0nM CD33	K_D
C33B48	91.96	400995.84	428948.75	391157.69	91.12	5.47E-05
C33B73	100.00	201493.02	33443.28	4034.64	93.98	9.12E-05
C33B125	98.48	258779.13	79728.78	9203.75	78.26	1.54E-04
C33B55	96.39	188278.42	59155.10	7625.56	105.39	2.15E-04
C33B96	98.75	476040.28	475653.41	187925.80	55.23	2.28E-04
C33B124	100.00	798.33	126.37	90.26	172.03	2.38E-04
C33B72	96.94	328194.72	105474.59	12506.85	93.32	2.84E-04
C33B79	100.00	236644.03	41925.89	4988.81	77.78	3.28E-04
C33B77	92.11	241787.16	88691.05	11484.97	69.46	3.37E-04
C33B82	96.21	188508.56	41264.92	5033.60	73.44	3.41E-04
C33B87	100.00	242185.48	79532.87	12547.05	73.65	3.52E-04
C33B80	98.33	5799.64	409.97	114.93	88.88	3.84E-04
C33B101	96.91	268805.28	204984.16	35513.63	70.07	3.98E-04
C33B83	98.07	92956.55	7856.70	1020.48	87.37	4.61E-04
C33B46	95.81	509865.97	447627.97	418017.22	134.53	4.67E-04
C33B94	98.31	200142.00	93852.22	13274.87	89.59	5.38E-04
C33B88	98.36	393148.13	481100.91	274293.53	94.81	8.25E-04
C33B66	98.71	444680.31	313288.41	56628.04	129.73	8.59E-04
C33B120	97.63	190036.14	60357.11	7054.28	92.94	1.40E-03
C33B64	98.13	200158.36	54138.77	7556.04	114.85	1.71E-03
C33B52	96.76	196557.09	46286.13	6751.01	82.46	3.13E-03
C33B56	95.59	143.73	79.73	111.95	138.04	4.02E-03
C33B75	98.68	163795.25	29603.57	4517.81	95.94	4.16E-03
C33B107	96.90	375388.25	339798.53	161369.64	86.54	4.44E-03
C33B63	98.79	247758.77	62221.71	9671.48	86.34	4.57E-03
C33B95	97.77	154556.58	44354.07	6402.00	87.38	5.99E-03
C33B61	98.87	198777.34	38699.10	5308.45	79.84	6.71E-03
C33B89	100.00	315.38	119.12	65.61	70.94	8.11E-03
C33B122	98.49	259183.69	84281.03	14291.17	65.01	8.74E-03
C33B62	99.05	157786.36	37359.44	6092.03	75.00	1.00E-02
C33B123	95.08	224078.95	88155.99	8864.39	71.05	1.03E-02
C33B54	100.00	147753.30	27461.06	3766.69	61.26	2.48E-02

【 0 5 8 8 】

10

20

30

40

【表 4 4】

表 4 6 の続き

タンパク質 AA ID	60nM カニクイザル CD33	6nM カニクイザル CD33	0.6nM カニクイザル CD33	0nM カニクイザル CD33	カニクイザル CD33結合K _D
C33B48	56491.32	47326.85	43351.12	94.01	1.20E-04
C33B73	14799.14	6987.92	795.57	72.51	4.08E-04
C33B125	15603.45	11526.47	3458.27	70.22	3.51E-04
C33B55	16020.78	9994.42	2433.94	69.38	1.16E-04
C33B96	37273.19	20087.29	11574.59	86.31	8.19E-04
C33B124	593.00	132.19	77.26	98.41	4.77E-04
C33B72	19422.07	13975.14	3894.84	90.81	7.63E-04
C33B79	15538.97	6427.73	1082.85	63.59	6.82E-03
C33B77	17516.20	11665.49	3601.76	85.23	4.18E-04
C33B82	14269.38	6622.07	1540.09	84.24	6.70E-04
C33B87	19597.18	12652.44	3266.36	103.07	2.28E-04
C33B80	4612.58	248.60	108.93	82.38	2.66E-04
C33B101	48016.75	46115.96	17989.37	79.69	1.06E-04
C33B83	5304.40	687.44	159.37	87.35	2.17E-03
C33B46	49840.14	49816.36	49729.78	92.05	1.48E-04
C33B94	16126.84	10782.54	3183.70	87.82	5.37E-04
C33B88	50388.18	43928.95	43940.23	90.13	3.89E-04
C33B66	48905.04	49076.39	42160.22	77.96	9.33E-05
C33B120	13211.32	7865.37	2726.18	75.77	8.54E-04
C33B64	21109.59	9685.04	3102.56	99.82	1.21E-03
C33B52	12582.90	8444.39	2063.44	75.24	1.20E-03
C33B56	104.27	85.94	78.56	83.31	8.46E-04
C33B75	12194.41	5577.80	1709.40	124.32	1.20E-03
C33B107	50325.07	47810.05	36786.69	55.11	1.35E-04
C33B63	18322.71	11642.38	2879.89	87.94	9.47E-04
C33B95	14774.34	9594.12	1637.99	80.81	6.98E-03
C33B61	13552.71	8211.09	1595.90	106.84	1.83E-03
C33B89	47301.14	34193.78	23334.20	112.80	4.65E-05
C33B122	19740.29	13907.32	5838.25	82.53	1.45E-03
C33B62	12737.71	5620.17	1922.97	934.44	1.32E-03
C33B123	10665.93	10404.03	3232.18	61.08	2.74E-03
C33B54	50466.68	43011.75	38091.89	28785.80	1.35E-04

10

20

30

【 0 5 8 9 】

次いで、mAbのパネルを、完全親和性分析及びエピトープマッピングについて更に特性評価した。抗CD33mAbの組換えヒトCD33 ECD-HSA (C33W2) 及びカニクイザルCD33 ECD-HSA (C33W1) への結合を、Protein SPR (Bio-Rad) によって測定した。0.005% Tween-20を含有するPBS中流量30μL/分で、GLC Sensor Chip (Bio-Rad、カタログ番号176-5011) に垂直に配向された6つのリガンドチャンネル全てにおける酢酸バッファpH5.0中30μg/mLでのアミンカップリングを介して、ヤギ抗ヒトFc IgG (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-005-098) を直接固定化した。固定化密度は、平均で約5000応答単位 (RU) であり、異なるチャンネル間の変動は5%未満であった。垂直リガンド配向で0.25又は0.5μg/mL (160~300RU) において抗ヒトFc IgG表面に異なるmAbを捕捉し、6番目のリガンドチャンネルは、リガンドなし表面对照であった。5つの濃度の

40

50

3倍希釈系列中0.3 μM濃度のヒト及びカニクイザルCD33-HSAタンパク質をアナライトとし流して、捕捉されたmAbに水平配向で結合させた。また、捕捉されたmAbの解離及びベースラインでの安定性をモニタリングするために、6番目のチャンネルにバッファサンプルを注入した。ヒト及びカニクイザルCD33-HSAの全ての濃度の解離相を、C33B782への結合については15分間、C33B912(hIgG4を有するC33B904と同一)への結合については60分間、流量100 μL/分でモニタリングした後、0.85%リン酸の18秒間パルスを使用して再生して、抗原及び結合したmAbを除去した。以下から応答データを減じた後に二重参照することによって生データを処理した：1) Agと空のチップ表面との間で非特異的相互作用を補正するためのインタースポット；2) 経時的な捕捉されたmAb表面の解離に起因するベースラインの揺れを補正するためのバッファチャンネル。各mAbについて全抗原濃度において処理したデータを1:1の単純なラングミュア結合モデルにグローバルフィットさせて、反応速度(k_{on} 、 k_{off})及び親和性(K_d)定数の推定値を抽出した。

10

【0590】

mAbのパネルが全て1つの個別のエピトープに結合するか、又は広いエピトープをカバーするかを判定するために、エピトープビニング実験を行った。CMD-200Mセンサリズムチップを使用して、IBIS SPRI機器(Carterra)において、CD33mAbの競合的エピトープビニングを行った。別々のContinuous Flow Microspotter(CFM)を使用して、酢酸バッファ(pH4.5)中10 μg/mLで、アミンカップリングを介してチップに各抗CD33抗体を直接固定化した。次いで、プリントされたセンサチップを、Classical又は「Sandwich」ビニングフォーマットを使用してビニング分析のためにIBIS機器に移した。50 nMのヒトCD33 ECD-HSA(C33W2)を逐次注入し、続いて、133 nMの溶液で競合アナライトとして抗CD33 mAbを1回注入して、抗原及び抗体の各逐次注入サイクル後に表面再生を伴って固定化された抗CD33mAbに結合させることによって、ビニングを行った。

20

【0591】

再生前及び再生後の固定化されたmAbの活性をモニタリングするために、実験の開始時及び終了時に、競合mAbを全く含まないバッファ注入を行って、抗原のみの結合活性を測定した。バッファ(抗原のみ)結合に対する競合mAb結合の応答は、溶液中の抗体が固定化されたmAbへの抗原結合をブロック又はサンドイッチするかどうかの指標である。生のビニングデータ(.trixファイルフォーマット)を参照し、SprintXソフトウェア(Wasatch、バージョン1.9.3.2)を使用してゼロにした後、分析のためにビニングソフトウェアHtTools.exe(Wasatch、バージョン2.0.0.33)にエクスポート(.ibmxファイルフォーマット)した。20 RU未満の抗原応答を有する抗体及び自己ブロックしなかった抗体を除去することにより、データを精選した。競合mAb応答を、抗原のみの結合応答に対して正規化した。正規化された応答が<0.25である抗体はブロッカーを意味し、正規化された応答が0.25である抗体は、非ブロッカー/サンドイッチャーを意味した。組み合わされたデンドログラムプロットにおいて高さ2.5におけるカットを使用して、異なるピンを予測した。

30

40

【0592】

以下の表は、32個の選択mAbの全反応速度分析及びエピトープビニングをまとめたものである。ヒト及びカニクイザルCD33の両方に対してナノモル濃度以下の親和性を有する抗CD33mAbは合計8個存在し、これらのmAbは3つの別個のエピトープピンに対応し、一方、より大きなパネルは、様々な親和性及び7個の別個のエピトープピンを有する。

【0593】

【表 4 5】

表 4 7. OMN I R a t 由来のm A b の全反応速度分析及びエピトープビニング

ヒトCD33 ECD-HSA					
タンパク質AA ID	V領域ID	ka(1/Ms)	kd(1/s)	K _D (M)	エピトープビン
C33B48	C33F53	1.62E+06	1.82E-05	1.12E-11	1
C33B46	C33F51	1.45E+06	1.99E-03	1.38E-09	1
C33B66	C33F71	3.85E+04	2.03E-03	5.29E-08	1
C33B107	C33F112	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	1
C33B88	C33F93	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	1
C33B96	C33F101	2.26E+05	4.36E-04	1.92E-09	3
C33B101	C33F106	1.62E+05	1.08E-03	6.64E-09	3
C33B73	C33F78	5.59E+05	5.59E-05	1.00E-10	4
C33B125	C33F130	9.92E+05	1.34E-04	1.40E-10	4
C33B55	C33F60	9.85E+05	2.53E-04	2.60E-10	4
C33B82	C33F87	4.45E+05	2.70E-04	6.10E-10	4
C33B83	C33F88	2.70E+05	5.21E-04	1.93E-09	4
C33B75	C33F80	3.85E+05	4.41E-03	1.14E-08	4
C33B123	C33F128	1.02E+06	1.52E-02	1.48E-08	4
C33B52	C33F57	2.06E+05	3.96E-03	1.92E-08	4
C33B61	C33F66	4.89E+05	1.05E-02	2.14E-08	4
C33B62	C33F67	5.07E+05	1.26E-02	2.49E-08	4
C33B64	C33F69	4.33E+05	2.21E-03	5.10E-09	4
C33B63	C33F68	5.33E+05	3.74E-03	7.01E-09	4
C33B122	C33F127	7.47E+05	7.12E-03	9.53E-09	4
C33B72	C33F77	8.71E+05	2.00E-04	2.30E-10	5
C33B79	C33F84	5.15E+05	3.90E-04	7.60E-10	5
C33B77	C33F82	8.28E+05	2.62E-04	3.20E-10	6
C33B87	C33F92	7.20E+05	4.32E-04	6.00E-10	6
C33B94	C33F99	9.22E+05	5.85E-04	6.30E-10	6
C33B95	C33F100	4.82E+05	7.40E-03	1.54E-08	6
C33B120	C33F125	5.75E+05	1.68E-03	2.93E-09	6
C33B89	C33F94	低結合	低結合	低結合	8
C33B54	C33F59	低結合	低結合	低結合	9
C33B124	C33F129	3.57E+05	1.24E-04	3.50E-10	NB
C33B80	C33F85	3.23E+05	4.25E-04	1.32E-09	NB
C33B56	C33F61	低結合	低結合	低結合	NB

【 0 5 9 4 】

10

20

30

【表 4 6】

表 4 7 の続き

カニクイザルCD33 ECD-HSA					
タンパク質 AA ID	V領域ID	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	エピトープピン
C33B48	C33F53	4.31E+06	1.58E-04	3.66E-11	1
C33B46	C33F51	2.97E+06	3.75E-04	1.26E-10	1
C33B66	C33F71	1.22E+06	2.66E-04	2.17E-10	1
C33B107	C33F112	3.31E+05	7.01E-05	2.12E-10	1
C33B88	C33F93	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	1
C33B96	C33F101	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	3
C33B101	C33F106	2.25E+05	2.69E-04	1.20E-09	3
C33B73	C33F78	6.00E+05	5.08E-04	8.46E-10	4
C33B125	C33F130	1.12E+06	3.39E-04	3.04E-10	4
C33B55	C33F60	1.16E+06	8.37E-05	7.23E-11	4
C33B82	C33F87	5.45E+05	7.51E-04	1.38E-09	4
C33B83	C33F88	2.47E+05	2.88E-03	1.17E-08	4
C33B75	C33F80	6.16E+05	1.32E-03	2.15E-09	4
C33B123	C33F128	1.26E+06	3.39E-03	2.69E-09	4
C33B52	C33F57	3.13E+05	1.48E-03	4.74E-09	4
C33B61	C33F66	7.34E+05	1.62E-03	2.21E-09	4
C33B62	C33F67	8.05E+05	1.49E-03	1.85E-09	4
C33B64	C33F69	5.90E+05	1.01E-03	1.71E-09	4
C33B63	C33F68	7.23E+05	8.80E-04	1.22E-09	4
C33B122	C33F127	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	結合/ フィッティングなし	4
C33B72	C33F77	9.19E+05	5.40E-04	5.87E-10	5
C33B79	C33F84	5.48E+05	2.20E-03	4.01E-09	5
C33B77	C33F82	1.08E+06	2.66E-04	2.47E-10	6
C33B87	C33F92	1.12E+06	2.64E-04	2.36E-10	6
C33B94	C33F99	1.10E+06	5.20E-04	4.73E-10	6
C33B95	C33F100	8.44E+05	8.06E-03	9.56E-09	6
C33B120	C33F125	8.76E+05	9.02E-04	1.03E-09	6
C33B89	C33F94	2.65E+05	2.01E-04	7.60E-10	8
C33B54	C33F59	1.32E+06	6.37E-04	4.84E-10	9
C33B124	C33F129	4.67E+05	4.72E-04	1.01E-09	NB
C33B80	C33F85	4.92E+05	2.59E-04	5.27E-10	NB
C33B56	C33F61	低結合	低結合	低結合	NB

10

20

30

40

【0595】

OmniMouseパネル(合計8個のmAb)を別々に生成し、細胞への結合について更に特性評価した。細胞結合を上記のように行い、以下の表にまとめた。試験した8個のmAbのうち、6個はCD33発現細胞に直接結合したが、2個はしなかった。

【0596】

【表 4 7】

表 4 8. ヒト及びカニクイザル発現細胞株に対する OMN I M o u s e 由来 m A b の細胞結合

mAb	親				ヒトCD33			
	60nM	6nM	0.6nM	0nM	60nM	6nM	0.6nM	0nM
C33B909	253.50	206.04	169.77	119.51	176.49	170.25	154.00	191.28
C33B910	193.52	176.14	108.46	190.17	213.55	183.33	151.25	155.29
C33B911	1466.02	389.41	186.22	113.30	237954.27	100333.48	13501.02	114.07
C33B912	977.91	273.07	140.62	124.53	237140.86	101295.70	15726.96	149.54
C33B913	174.49	118.08	123.26	129.07	518952.00	409071.06	204694.14	127.82
C33B914	181.37	142.74	139.10	113.48	304350.88	315129.56	153252.58	185.45
C33B915	101.28	147.65	143.51	100.00	390477.25	362902.66	138398.56	112.22
C33B916	416.08	145.16	115.70	91.75	447815.47	404033.19	192941.55	167.07

10

【0597】

【表 4 8】

表 4 8 の続き

mAb	カニクイザルCD33			
	60nM	6nM	0.6nM	0nM
C33B909	180.33	135.33	115.73	124.03
C33B910	202.42	135.18	116.71	175.97
C33B911	17036.56	7729.14	1935.16	97.94
C33B912	15070.88	7271.38	1726.03	124.69
C33B913	40661.90	36920.95	35224.10	106.19
C33B914	44964.85	33368.26	22086.01	86.76
C33B915	37495.34	35692.21	36165.59	113.92
C33B916	41004.43	33294.78	22790.61	104.43

20

【0598】

細胞上で CD 3 3 に結合している 6 つの m A b を、上記の方法を使用して組換え抗原に対する全反応速度分析を介して生物物理学的に更に特性評価し、以下の表にまとめた。試験した 6 つの m A b のうち、1 つは、ピコモル濃度の親和性でヒト CD 3 3 に (C 3 3 B 9 1 2)、及び、カニクイザル CD 3 3 に対してはナノモル濃度以下で結合し、一方、1 つは、ヒト CD 3 3 に対しては非常に強い親和性を有していたが、カニクイザル CD 3 3 (C 3 3 B 9 1 1) に対してはわずかなノモル濃度の親和性しか有していなかった。更に 2 つのクローンは、ヒト及びカニクイザル CD 3 3 (C 3 3 B 9 1 3 及び C 3 3 B 9 1 6) の両方に対してナノモル濃度以下であったが、いずれも親和性は C 3 3 B 9 1 2 の範囲ではなかった。

30

【0599】

【表 4 9】

表 4 9. OMN I M o u s e 由来の m A b の全反応速度分析

mAb	ヒトCD33 ECD-HSA			カニクイザルCD33 ECD-HSA		
	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$
C33B911	1.10E+06	4.14E-05	3.78E-11	1.15E+06	1.15E-03	1.00E-09
C33B912	1.42E+06	4.29E-05	3.02E-11	1.50E+06	6.50E-04	4.33E-10
C33B913	6.60E+05	6.40E-04	9.69E-10	2.56E+06	3.08E-04	1.20E-10
C33B914	4.44E+05	9.80E-03	2.21E-08	5.29E+05	2.33E-04	4.40E-10
C33B915	2.18E+05	9.89E-04	4.53E-09	3.81E+06	8.93E-05	2.34E-11
C33B916	6.27E+05	4.11E-04	6.55E-10	4.73E+05	4.03E-04	8.52E-10

40

【0600】

先の OMN I R a t キャンペーンで既に同定されたいくつかの対照 m A に加えて、O M

50

NIMouse由来の6つの細胞結合mAbについてもエピトープビンング実験を実施した。ヒトCD33に対するそのナノモル濃度以下の親和性及び異なるエピトープビンの数に基づいて、対照mAbを選択した。ビンングソフトウェアHtToolsは、実験ごとにエピトープビン数を割り当てるので、既に定義されたエピトープビンに対するいくつかの対照を有することが、交差比較のために重要であった。2つのOMNIMouse由来のヒトCD33高親和性クローン(C33B911及びC33B912)は両方とも、上記のビン4(この実験におけるビン4)からのクローンにビンングしたが、ナノモル濃度以下のクローン(C33B916)は、C33B836(上記実験におけるビン1)と共にこの実験における2にビンングした。

【0601】

【表50】

表50: OMNIMouse抗CD33 mAbのエピトープビン

mAb	V領域ID	エピトープビン
C33B915	C33F553	1
C33B916	C33F554	2
C33B836	C33F53	2
C33B914	C33F552	2
C33B913	C33F551	3
C33B806	C33F106	3
C33B911	C33F549	4
C33B912	C33F550	4
C33B778	C33F78	4
C33B830	C33F130	4
C33B782	C33F82	5
C33B792	C33F92	5
C33B799	C33F99	5
C33B760	C33F60	6
C33B777	C33F77	7

【0602】

CD33は、2つのIgGドメイン、膜遠位Vドメイン、及び膜近位C2ドメインで構成される。SNPrs12459419は、CD33プレmRNA転写物の選択的オルタナティブプライシングを引き起こして、C2のみの形態を細胞上で発現させ得るので、このドメインを標的とすることにより、臨床的有益性を与えることができる。2つのドメインのうちのいずれにmAbが結合可能であったかを確認するために、結合抗原としてヒトCD33ECD-HSA、ヒトCD33V-HSA、及びヒトCD33C2-HSAを使用して、4つの異なるエピトープビンをカバーする、最高結合能力を有する6つのmAbに対して上記プロトコルに従ってオフレートスクリーニングを行った。以下の表に示すように、ビン4に予め分類された2つのクローンは、両方ともhuCD33C2ドメインに結合したが、huCD33Vドメインには結合せず、一方、ビン2及び3のクローンは、Vドメインには結合したが、C2ドメインには結合しなかった。ビン5に分類された2つのクローンは、いずれのドメインにも結合しなかったため、その正確な結合位置は、2つのドメインにまたがっている可能性がある。3つの市販のmAbをこの実験に含めたところ(WM53(EMD Millipore; Darmstadt, Germany)、P67.7(Biolegend, San Diego, CA)、及びLS Bioクローン906(LifeSpan Biosciences, Seattle, WA))、全てVドメインへの結合は示したが、C2ドメインへの結合は示さなかった。表51のC2ドメイン結合データに関連して表42及び45のエピトープビンを見ると、ヒト完全長タンパク質に対して約25nMから約30pMの親和性の範囲でC2ドメインに潜在的に結合し得るmAbが合計15個存在する。

10

20

30

40

50

【0603】

【表51】

表51. オフレートドメイン結合

	huCD33 ECD-HSA	huCD33-V-HSA	huCD33-C2-HSA	エピトープピン
タンパク質ID	$k_d(1/s)$	$k_d(1/s)$	$k_d(1/s)$	
C33B912	1.29E-05	結合応答なし/低い	6.68E-05	4
C33B778	4.72E-05	結合応答なし/低い	2.57E-03	4
C33B782	2.58E-04	結合応答なし/低い	結合応答なし/低い	5
C33B792	4.27E-04	結合応答なし/低い	結合応答なし/低い	5
C33B836	5.52E-05	3.71E-05	結合応答なし/低い	2
C33B806	1.36E-03	3.18E-03	結合応答なし/低い	3
WM53	2.37E-03	3.78E-02	結合応答なし/低い	
P67.7	1.05E-03	2.43E-03	結合応答なし/低い	
LSBio クローン906	2.45E-03	4.34E-02	結合応答なし/低い	

10

【0604】

更にインビボ及びインビトロ試験を裏付けるために、スケールアップ及びfabアーム交換のために選択クローン(C33B836、C33B782、C33B778、C33B904、C33B806、C33B830、C33B937、C33B792、C33B760、及びC33B777)を選択して、抗CD3抗体を含む二重特異性分子を生成した。ExpiCHO-S(商標)細胞(ThermoFisher Scientific)を、 $1.25 \times 10^5 \sim 2.25 \times 10^5$ 生存細胞/mLでExpiCHO(商標)発現培地に播種し、37、7%CO₂のシェーカーインキュベータ(INFORS HT Multitron Pro)においてポリカーボネート製、使い捨て、滅菌、排気、パッフルなし三角振盪フラスコ内で培養した。125mL~2Lの振盪フラスコにおけるルーチンな細胞増殖の場合、振盪直径19mmの振盪器については振盪速度を130rpmに設定した。細胞を継代培養し、この場合、生存率98~99%で、密度が $4 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ 生存細胞/mLで対数増殖に達した。

20

【0605】

トランスフェクションの2日前に、必要とされる培養体積に対して 1.5×10^6 生存細胞/mLでExpiCHO-S(商標)細胞を播種した。トランスフェクションの日に、生存細胞密度及び生存率を求めた。細胞を、 6×10^6 生存細胞/mLの密度でトランスフェクトした。最適なトランスフェクションのために、TEバッファ(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、pH8.0)中1mg/mL濃度の滅菌重鎖及び軽鎖プラスミドDNAを使用した。

30

【0606】

製造元のMax Titerトランスフェクションプロトコル(ThermoFisher Publication Number MAN0014337)に従って、ExpiCHO-S(商標)細胞をトランスフェクトした。以下に示す全ての量及び体積は、最終的なトランスフェクトされた培養体積1mLあたりであった。簡潔に述べると、プラスミドDNAを、以下の比で0.04mLの冷OptiPRO(商標)培地(ThermoFisher Scientific)で希釈した: 0.125gの重鎖DNA: 0.375gの軽鎖DNA: 0.5gのpAdvantage。6.4μLのExpiFectamine(商標)CHOトランスフェクション試薬を希釈し、0.04mLの冷OptiPRO(商標)培地と穏やかに混合し、1分間インキュベートした。希釈したExpiFectamine(商標)CHO試薬を希釈したDNAに添加し、穏やかに混合し、ExpiFectamine(商標)CHO/プラスミドDNA複合体を室温で5分間インキュベートした。インキュベーション後、複合体をシェーカーフラスコ内のExpiCHO-S(商標)細胞に添加し、37、7%CO₂のシェーカーインキュベータ内で

40

50

晩インキュベートした。

【0607】

Max Titer プロトコルのために、トランスフェクション後1日目に、6 μ L の ExpiFectamine (商標) CHO Enhancer 及び160 μ L の ExpiCHO (商標) Feed を添加し、フラスコを32、7% CO₂ のシェーカーインキュベータに移した。トランスフェクション後5日目に、2回目の160 μ L の ExpiCHO (商標) Feed をフラスコに添加し、振盪しながら32 のインキュベータに戻した。トランスフェクション後12日目に培養物を収集し、5000 rpm で15分間遠心分離し、0.2 μ m Acropak 1500 フィルターカプセル (Pall) を通して清澄化した。

10

【0608】

MabSelect SURE (GE Healthcare) を使用して、発現した抗体を清澄化した上清から精製した。MabSelect SURE Protein A カラムを、1 x D-PBS、pH 7.2 で平衡化した後、個々の培養上清をロードした。未結合タンパク質を、1 x D-PBS、pH 7.2 で広範囲にわたって洗浄することによって除去した。結合タンパク質を0.1 M の酢酸ナトリウム、pH 3.5 で溶出した。ピーク画分を2.5 M Tris (pH 7.2) で中和し、プールした。中和された画分プールを、アッセイ及び生物物理的特性評価のために1 x dPBS に透析した、又は二重特異性アセンブリに利用した。

20

【0609】

各溶出プールのタンパク質濃度をOD 280 nm での吸光度を測定することによって求め、アミノ酸配列に基づいて吸光度、吸光係数を用いて計算した。

【0610】

6 CD33 x CD3 二重特異性抗体の調製及び機能評価

6-1 精製された親mAbを使用したFabアーム交換

CD33 x CD3 二重特異性抗体の形成は、2つの親mAb、ターゲティングアームに特異的なもの (例えば、CD33) 及びエフェクターアームに特異的なもの (例えばCD3) を必要とする。CD33 mAb を高親和性 (CD3B376: 配列番号652のVH及び配列番号661のVL) 又は低親和性CD3アーム (CD3B450: 配列番号657のVH及び配列番号678のVL) アームで組換えた。これらの親mAb (CD33及びCD3アーム) は、ターゲティング親 (CD33) が409R Genmab変異 (IgG4のネイティブアミノ酸) を含有し、一方、殺傷親 (CD3) はF405L変異及びR409Kを含有する、IgG4 PAAフォーマット (Labrijn et al, 2013) である。単一特異性抗CD3抗体を、そのFc領域にFc置換S228P、F234A、L235A、F405L及びR409K (CD3アーム) (EUインデックスに従って付番) を有するIgG4として発現させた。単一特異性抗体を、上記のように発現させ、精製した。精製後、親CD33抗体を、75 mM 2-MEA (2-メルカプトエチルアミン) 中の還元条件下で所望の親CD3抗体と混合し、31 で5時間又は室温で一晩インキュベートした。組換え反応は、モル濃度比に基づいており、設定量のCD33抗体 (例えば、10 mg又は約74.6 ナノモル) をCD3抗体 (例えば、約67.8 ナノモル) と組み合わせ、CD33抗体をCD3抗体の6%過剰量で添加した。CD33抗体原液の濃度は、0.8 ~ 6 mg/mL で変化し、組換え反応の体積は、各対形成で変化した。その後、組換え反応物をPBSに対して一晩透析して、還元剤を除去した。組換え後に残存する未反応のCD3親抗体の量を最小化するために、過剰のCD33抗体 (比) を用いてCD33 x CD3 二重特異性抗体反応を行った。

30

40

【0611】

組換え反応で使用した親mAb (すなわち、CD33、CD3、又はヌル) と共に、産生された最終的なCD33 x CD3 二重特異性抗体を表47に列挙する。

【0612】

選択されたCD33ヒットはまた、非殺傷アーム (ヌル) と対形成して、試験目的のた

50

めの陰性対照が生じた。対照二重特異性抗体については、B2M1、IgG4 PAAフォーマットにおけるRSV抗体を生成し、精製し、CD3アームCD3B219又はCD3B376-F405L、R409Kのいずれかと組み合わせて、それぞれ、CD3B288(CD3×ヌル)及びCD3B510(CD3B376×ヌル)を生成した。CD3アームをB23B49と組み合わせて、表52のようにCD33×ヌルを生成した。

【0613】

【表52-1】

表52：CD33×CD3二重特異性抗体

二重特異性Ab	親	HC Pep ID	VH Pep SEQ ID	LC Pep ID	VL Pep SEQ ID
C3CB7	C33B836	C33H80	267	C33L73	306
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB5	C33B830	C33H84	269	C33L66	308
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB4	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB16	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB14	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB12	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB11	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB10	C33B777	C33H65	257	C33L47	297
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB8	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB97	C33B836	C33H80	267	C33L73	306
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB98	C33B830	C33H84	269	C33L66	287
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB99	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB100	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB101	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB102	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB103	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB104	C33B777	C33H65	257	C33L47	297
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB105	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C33B941	C33B836	C33H80	267	C33L73	306
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286

【0614】

【表 5 2 - 2】
(表 5 2 の続き)

二重特異性Ab	親	HC Pep ID	VH Pep SEQ ID	LC Pep ID	VL Pep SEQ ID
C33B942	C33B830	C33H84	269	C33L66	308
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B943	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B944	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B945	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B946	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B947	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B948	C33B777	C33H65	256	C33L47	297
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B949	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
CD3B288	B23B39	B23H1	246	B23L3	286
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
CD3B510	B23B39	B23H1	246	B23L3	286
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB87	C33B903	C33H251	280	C33L117	319
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB88	C33B904	C33H252	281	C33L118	320
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB89	C33B905	C33H253	282	C33L119	321
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB90	C33B907	C33H255	284	C33L121	323
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB91	C33B908	C33H256	285	C33L122	324
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB189	C33B904	C33H252	281	C33L118	320
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661

P e p : ペプチド ; N u c : ヌクレオチド ; S E Q I D : 配列番号

【 0 6 1 5 】

6 - 2 A M L 一次サンプルにおける A M L 芽球及び T 細胞の活性化の、エクスピボにおける C D 3 3 × C D 3 によって媒介される減少

C D 3 3 × C D 3 二重特異性抗体の細胞傷害能を更に評価するために、上位 4 個の抗体を使用して、A M L 患者全血を使用するエクスピボ細胞傷害アッセイを行った (図 6 2) 。このアッセイは患者の血液中の自家 T 細胞の存在に依存するので、このアッセイでは、追加の T 細胞を供給することなく 4 8 時間にわたって A M L 患者由来の希釈された全血に様々な二重特異性抗体 (C D 3 アーム C D 3 B 2 1 9 及び C D 3 B 3 7 6 のいずれかと対形成した C D 3 3 抗体) を添加した。4 8 時間目に、サンプルを C D 3 P e r C P C y 5 . 5 、 C D 2 5 P E 、 C D 3 3 F I T C 、及び C D 3 8 A P C で染色した (全ての抗体は B i o l e g e n d ; S a n D i e g o , C A から購入した) 。次いで、サンプルを 1 × L y s e R B C L y s i s B u f f e r (e B i o s c i e n c e) で少なくとも 3 回洗浄した。次いで、サンプルを、 L I V E / D E A D (登録商標) F i x

able Near-IR Dead Cell Stainバッファ (Life Technologies) で染色した。まず、二重特異性抗体の存在下で、AML患者癌細胞の画分 (CD3⁻CD38⁺細胞として定義) 中の生CD33⁺細胞を定量することによって、腫瘍細胞傷害の程度を求めた。以下の等式を使用して、PBS / 未処理対照に対するパーセントとして細胞傷害を計算した: (PBS / 未処理対照中のCD33⁺% - 処理サンプル中のCD33⁺%) / (PBS / 未処理対照中のCD33⁺%)。CD3⁺画分中のCD25⁺事象のパーセントとしてT細胞活性化を計算した。

【0616】

図62に示すように、CD3アーム (CD3B376及びCD3B219) のいずれかと対形成した全てのCD33リード抗体は、48時間後、T細胞の活性化と相関する総細胞傷害の用量依存的な減少を促進した。ヌルアーム対照抗体 (ヌル×CD3B219及びヌル×CD3B376) は、腫瘍細胞傷害もT細胞活性化も示さなかった。この結果も、CD33×CD3二重特異性抗体が自家状況において機能することを証明する。これらの結果は、4つの他のAMLドナーサンプルの代表的なものである (データは示さない)。表53は、CD33×CD3多重特異性抗体で生成されたEC₅₀値をまとめたものである。EC₅₀値から分かるように、C3アーム (C3CB88、C3CB189) のいずれかと対形成したC33B904、及びCD3アーム (C3CB7、C3CB97) のいずれかと対形成したC33B836が、最も強力かつ有効な抗体であった。したがって、更なる特性評価ではこれらの4つの抗体に焦点をあてた。

【0617】

【表53】

表53: CD33×CD3のT細胞媒介性エクスピボ細胞傷害アッセイ。8個のCD33×CD3二重特異性抗体のEC₅₀値のまとめ

二重特異性抗体ID	初代AML細胞殺傷EC ₅₀ (nM)
C3CB11	3.958
C3CB12	2.635
C3CB7	0.3315
C3CB88	0.6722
C3CB103	4.186
C3CB102	4.973
C3CB97	~0.2316
C3CB189	0.5782

【0618】

6-3 CD33×CD3二重特異性抗体がCD33のC2ドメインに結合し、CD33一塩基多型 (SNP) 発現細胞株の細胞傷害を誘導することの証明。

CD33×CD3二重特異性抗体を用いたインビトロT細胞媒介細胞傷害アッセイ

最近の研究によって、AML集団の約50%に一塩基多型型 (SNP) rs12459419が存在し、CD33のエクソン2がスキップされ、その結果、CD33のVドメインが欠失することが示された。この研究はまた、CD33のVドメインに結合するMy10targがSNPを発現する患者において有効性を有さなかったため、再発リスクが低下し、AML集団の約50%において生存率が改善されたことも示した (Lamba et al 2017, JCO, CD33 Splicing Polymorphism Determines Gemtuzumab Ozogamicin Response in De Novo Acute Myeloid Leukemia: Report From Randomized Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531)。上述の研究におけるMy10targに関するデータに鑑みて、インビトロT細胞媒介性細胞傷害アッセイを行って、CD3アーム (CD3B219又はCD3B376) と対形成したCD33ヒット (V結合C33B836対C2結合C33B904) が、SNPrs1245941

10

20

30

40

50

9 発現細胞株の殺傷を媒介するかどうかを評価した。簡潔に述べると、エフェクター細胞 (Biological Speciality から購入した汎 T 細胞) を収集し、計数し、洗浄し、10% FBS (Invitrogen) を含む RPMI (Invitrogen) 細胞培地中 1×10^6 細胞/mL になるように再懸濁させた。標的細胞 (KG1、SH2、及び OCIAML3) を CFSE (Invitrogen) で標識し、10% FBS を含む RPMI 中 2×10^5 細胞/mL になるように再懸濁させた。KG1、SH2 及び OCIAML3 は、それぞれ、CD33 SNPrs12459419 変異の野生型、ヘテロ接合型、及びホモ接合型を表すように選択した。エフェクター細胞及び CFSE 標識標的細胞を、滅菌 96 ウェル丸底プレートにおいてエフェクター：標的比 (E:T) = 5:1 で混合した。10 μ L の Fc ブロック (ReoPro Fc 断片) を、5 μ L の二重特異性抗体のアリコートと共に、様々な濃度を含有する各ウェルに添加した。培養物を、5% CO₂ 下、37 で 48 時間インキュベートした。48 時間後、LIVE/DEAD (登録商標) Fixable Near-IR Dead Cell Stain バッファ (Life technologies) をサンプルに添加し、培養物を、RT で暗所において 20 分間インキュベートし、洗浄し、100~200 μ L の FAC バッファに再懸濁させた。CANTOII フローサイトメータ (BD Biosciences) を使用して、薬剤誘導細胞傷害を決定し、FlowJo ソフトウェア又は Dive ソフトウェア (BD Biosciences) により分析した。対象となる集団は、二重陽性 CFSE+/live/dead+ 細胞である。図 63 に示すように、ヌルアーム対照 (ヌル x CD3B219 及びヌル x CD3B376) とは異なり、V 結合及び C2 結合 CD33 x CD3 多重特異性抗体は、48 時間で SNPrs12459419 変異細胞株 KG1 について CD33+ 野生型の T 細胞リダイレクトによる細胞傷害を誘導した。対照的に、V バインダー C33B836 (C3CB97、C3CB7) とは異なり、C2 結合 C33B904 と対になった二重特異性抗体 (C3CB189、C3CB88) のみが、それぞれ rs12459419 SNP 変異についてヘテロ接合型又はホモ接合性であった SH2 及び OCIAML3 細胞株の細胞傷害を媒介した。この理由から、C33B904 と対形成した二重特異性抗体 (C3CB189、C3CB88) を、更なる分析及び特性評価に進めた。まとめると、これらのデータは、C33B904 と対形成した二重特異性抗体などの CD33 C2 結合二重特異性抗体が、V 結合競合因子抗 CD33 抗体よりも広範な AML 患者群において有効性を示す能力を有することを示唆している。

【0619】

6-4 エクスビボで CD33 x CD3 は、エクスビボ全血 MOLM-13 細胞傷害アッセイにおいて MOLM-13 及び単球におけるスパイクの低減を媒介した。

MOLM-13 細胞及び正常ヒト単球におけるスパイクの排除における CD33 x CD3 二重特異性抗体の細胞傷害能を評価するために、外因的に添加された CD33+ AML 細胞株 MOLM-13 と共に正常健康ヒト全血を使用するエクスビボ細胞傷害アッセイを利用した。このアッセイはドナーの血液中の自家 T 細胞の存在に依存するので、上記実験と同様に、追加の T 細胞を供給することなく 48 時間にわたって 6 人の異なる正常ヒトドナー由来の希釈された全血に様々な二重特異性抗体 (CD3 アーム CD3B219 及び CD3B376 のいずれかと対形成した CD33 抗体) を添加した。希釈前に、各ドナーの血液中の T 細胞の濃度を調べた。次いで、AML 患者サンプルにおけるエフェクター：標的比を再現するためにエフェクター：標的比 (E:T) が 1:5 になるように、血液を CFSE (Invitrogen) 標識 MOLM-13 細胞で希釈した。48 時間目に、サンプルを CD3 PerCP Cy5.5、CD25 PE、CD33 FITC、及び CD14 Pacific Blue で染色した (全ての抗体は Biolegend から購入した)。次いで、サンプルを 1 x Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience) で少なくとも 3 回洗浄した。次いで、サンプルを、LIVE/DEAD (登録商標) Fixable Near-IR Dead Cell Stain バッファ (Life Technologies) で染色した。まず、二重特異性抗体の存在下で、CD14+ 単球の画分中の生 CD33+ 細胞を定量することによって、腫瘍細胞

傷害の程度を求めた。死CFSE⁺細胞のパーセントを調べることにより、MOLM-13細胞の細胞傷害を判定した。以下の等式を使用して、PBS/未処理対照に対するパーセントとして単球の細胞傷害を計算した： $(\text{PBS/未処理対照中のCD33}^+\text{CD14}^+\% - \text{処理サンプル中のCD33}^+\text{CD14}^+\%) / (\text{PBS/未処理対照中のCD33}^+\text{CD14}^+\%)$ 。図64のデータは、両方のCD33×CD3二重特異性抗体（CD3アーム、CD3B376及びCD3B219のいずれかと対になった同じCD33リードC33B904）が、48時間でMOLM-13細胞及びCD33⁺単球の細胞傷害を特異的に誘導することを示す。ヌルアーム対照を、陰性二重特異性抗体対照として使用した。ヌルアーム対照は、MOLM-13及びCD33⁺単球の細胞傷害活性をほとんど乃至全く示さなかった。これらのデータは、6人の異なる正常ドナーの平均値を示す。MOLM-13及びCD14⁺単球の細胞傷害についての平均EC₅₀値を表54に示す。

【0620】

【表54】

表54. CD33×CD3のT細胞媒介エクスピボ細胞傷害アッセイ。

2個のCD33×CD3二重特異性抗体についてのEC₅₀値のまとめ。

二重特異性抗体ID	MOLM13殺傷EC ₅₀ (nM)	CD33 ⁺ CD14 ⁺ 殺傷EC ₅₀ (nM)
C3CB189	0.1677	1.156
C3CB88	0.671	0.506

【0621】

6-5 カニクイザルに対するCD33×CD3二重特異性抗体の種交差反応性の証明エクスピボにおいて、CD33×CD3は、カニクイザル全血を用いたエクスピボ細胞傷害アッセイにおいて単球の減少を媒介した

機能的交差反応性を証明し、正常カニクイザル単球の排除におけるCD33×CD3二重特異性抗体の細胞傷害能を評価するために、健常カニクイザル全血を使用したエクスピボ細胞傷害アッセイを利用した。このアッセイはドナーの血液中の自家T細胞の存在に依存するので、上記実験と同様に、追加のT細胞を供給することなく48時間にわたって6頭の異なる正常カニクイザルドナー由来の希釈された全血に様々な二重特異性抗体（CD3アームCD3B219及びCD3B376のいずれかと対形成したCD33抗体）を添加した。48時間目に、サンプルをCD3 PerCP Cy5.5、CD25 PE、CD33 FITC、及びCD14 Pacific Blueで染色した（全ての抗体は、Miltenyi; Bergisch Gladbach, Germanyから購入したCD33抗体を除いてBiolegendから購入した）。次いで、1×Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience)でサンプルを少なくとも3回洗浄した後、LIVE/DEAD（登録商標）Fixable Near-IR Dead Cell Stainバッファ（Life Technologies）で染色した。まず、二重特異性抗体の存在下で、CD14⁺単球の画分中の生CD33⁺細胞を定量することによって、単球細胞傷害の程度を求めた。以下の等式を使用して、PBS/未処理対照に対するパーセントとして細胞傷害を計算した： $(\text{PBS/未処理対照中のCD33}^+\text{CD14}^+\% - \text{処理サンプル中のCD33}^+\text{CD14}^+\%) / (\text{PBS/未処理対照中のCD33}^+\text{CD14}^+\%)$ 。CD3⁺画分中のCD25⁺事象のパーセントとしてT細胞活性化を計算した。図65のデータは、両方のCD33×CD3二重特異性抗体（CD3アーム、CD3B376及びCD3B219のいずれかと対になった同じCD33リードC33B904）が、48時間でCD33⁺単球の細胞傷害及びT細胞活性化を特異的に誘導したことを示す。ヌルアーム対照を、陰性二重特異性抗体対照として使用したところ、ほとんど乃至全く細胞傷害もT細胞活性も示さなかった。表55は、6頭の異なるカニクイザルドナーの平均値を示す。

【0622】

10

20

30

40

【表 5 5】

表 5 5 : CD33×CD3 T細胞媒介エクスピボ細胞傷害アッセイ。2 個の CD33×CD3 二重特異性抗体についての EC₅₀ 値のまとめ。

タンパク質AA ID	CD33 ⁺ CD14 ⁺ 殺傷EC ₅₀ (nM)	T細胞活性化EC ₅₀ (nM)
C3CB189	3.60	0.02
C3CB88	0.89	0.02

【0623】

6-6 T細胞ヒト化NSGマウスにおけるMOLM-13ヒトAML異種移植片におけるC3CB189及びC3CB88の有効性

2000万個のT細胞でヒト化された雌NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)マウスにおける、樹立されたルシフェラーゼでトランスフェクトされた播種性MOLM-13ヒト急性骨髄性白血病(AML)異種移植片において、C3CB189及びC3CB88の有効性を評価した。静脈内腫瘍移植後5日目にライブイオルミネッセンスイメージング(BLI)によって、動物をn=10/群に無作為化した。0.005、0.05、及び0.5mg/kgのC3CB189及びC3CB88、又は0.5mg/kgのヌル×CD3抗体対照を、6週間にわたって3~4日毎に腹腔内投与した。

【0624】

腫瘍移植後13日目に、1群あたり少なくとも8頭の動物が残存していた場合、バイオルミネッセンスによって決定したときの腫瘍増殖阻害(%TGI)を計算した。ヌル×CD3対照と比較して、全ての濃度のC3CB189(図66)及びC3CB88(図68)で統計的に有意な腫瘍増殖阻害が観察された。ヌル×CD3処理対照と比較して、0.005、0.05、及び0.5mg/kgのC3CB189は、それぞれ76%、100%、及び82%の腫瘍増殖阻害を惹起し、0.005、0.05、及び0.5mg/kgのC3CB88は、それぞれ100%、100%、及び91%の腫瘍増殖阻害を惹起した。

【0625】

C3CB189及びC3CB88による処理の結果、腫瘍量が低減し、ヌル×CD3対照群の16日中央生存期間よりも大きく寿命が延長(ILS)された。全用量にわたって、C3CB189で処理した動物は、19~27.5日間の中央生存期間を有しており(図67)、C3CB88で処理した動物は、26~28.5日間の中央生存期間を有していた(図69)。対照群と比較して、0.005、0.05、及び0.5mg/kgのC3CB189は、それぞれ19%、72%、及び50%寿命を延長させ、C3CB88は、それぞれ63%、78%及び72%の寿命延長をもたらした。

【0626】

7 TMEFF2抗体

7-1 抗原の生成

UniProtアクセッション番号Q9UIK5配列に基づいて、ヒト細胞外ドメイン(ECD)TMEFF2を産生した。C末端に6×Hisタグ(配列番号596)及びAviタグ配列を有するECDコンストラクトを設計した(コンストラクトTMEW1;配列番号578)。FS2及びEGFドメインを含有するコンストラクト(アミノ酸151~320は、6×Hisタグ(配列番号596)及びaviタグ配列とのヒト血清アルブミン(HSA)融合体として設計した(コンストラクトTMEW7;配列番号579)。6×Hisタグ(配列番号596)を有する(コンストラクトTMEW19;配列番号580)又はHisタグを有するラットIgG1Fcに融合している(コンストラクトTMEW20;配列番号581)TMEFF2膜近位ドメイン(残基230~320)を含有するコンストラクトを設計した。TMEFF2の残基230~320は、TMEFF2の残基261~301にまたがるEGFドメインを含有する。製造元のプロトコルに従ってExpifectamineを使用して、HEK293由来細胞、Exp293(G

10

20

30

40

50

ibco/Thermo Fisher Scientific) にヒト TMEFF2 ECD 発現コンストラクトを一過的にトランスフェクトした。軌道振盪器において 8% CO₂ で 37 °C において 5 日間細胞をインキュベートした後、収集した。発現した細胞を遠心分離により除去し、Ni Sepharose 6 Fast Flow resin (GE Healthcare) を使用する固定化金属アフィニティクロマトグラフィー、続いて、ダルツベッコリン酸生理食塩水バッファ pH 7.2 (1 × DPBS) 中における Superdex 200 分取サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) (GE Healthcare) を使用して、His タグを有する可溶性 TMEFF2 タンパク質を培地から精製した。生成された抗原のアミノ酸列を表 58 に示す。

【0627】

【表56】

表58.

タンパク質 AA ID	説明	アミノ酸配列
TMEW1 (配列番号578)	TMEFF2-FL-ECD- His-Avitag	FPTSLSDCQPTPTGWNCSSGYDDRENDLFLCDTNTCK FDGECLRIGDVTVCVCQFKCNDYVPCGSGNGESY QNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDAGSGSG DGVHEGSGETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDV WCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASC QKQEKIEVMSLGRCDNNTTTTTKSEDGHYARTDYA ENANKLEESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSIN MQEPSCRC DAGYTGGHCEKKDYSVLYVVPVRF QYVGGGSHHHHHHLNDIFEAQKIEWHE
TMEW7 (配列番号579)	FS2-EGF-Tev-HSA (C34S)-His-Avitag	SGETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDVWCVCNID CSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQKQEKIE VMSLGRCDNNTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLE ESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSC RCDAGYTGGHCEKKDYSVLYVVPVRFQYVGGSG SGSENLYFQGVRSDDAHKSEVAHRFKDLGEENF KALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA DESAENCDSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLRPEVDVMC TAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKR YKAAFTECCQAADKAAACLLPKLDELREDEGKASSAK QRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFA EVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYI CENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY ARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLKQNCLEFQELGEYKFK NALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCK HPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTF HADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK AVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKKLVAAS QAALGLGGGSHHHHHHLNDIFEAQKIEWHE
TMEW19 (配列番号580)	spTMEFF2(230-320) G3S-H6	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREHHIP CPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGG HCEKKDYSVLYVVPVRFQYVGGGSHHHHHH
TMEW20 (配列番号581)	spTMEFF2(230-320) -G3S-ratIgG1Fc	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREHHIP CPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGG HCEKKDYSVLYVVPVRFQYVGGGSPRNCGGDC KPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVLTLTPKVTCVVV DISQDDPEVHFSWFVDDVEVHTAQRPEEQFNST FRSVSELPILHQDWLNGRTFRCKVTSAAFPSPIEKT ISKPEGRTQVPHVYTMSPKTEEMTQNEVSITCMVK GFYPPDIYVEWQMNGQPQENYKNTPTMDTDGSY FLYSKLNKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNNHTE KSLSHSPGKGGGSHHHHHH

10

20

30

40

50

【0628】

7-2 抗TMEFF2抗体の生成

ヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現しているトランスジェニックラット (Omni Rat (登録商標)) を用いた抗体生成。Omni Rat (登録商標) は、キメラヒト/ラットIgH遺伝子座 (ラットC_H遺伝子座に連結された天然立体構造の22のヒトV_H、全てのヒトD及びJ_Hセグメントを含む) を完全にヒトのIgL遺伝子座 (J - C に連結された12のV_L及びJ - C に連結された16のV_L) と共に含有する (例えば、Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490を参照)。したがって、このラットは、ラット免疫グロブリンの発現減少を示し、免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖の導入遺伝子がクラススイッチ及び体細胞変異を受けて、完全にヒトの可変領域を有する高親和性キメラヒト/ラットIgGモノクローナル抗体が生成される。Omni Rat (登録商標) の調製及び使用、並びにこのようなラットが有しているゲノム改変は、国際公開第14/093908号に記載されている。

10

【0629】

Omni Ratを、ヒトTMEFF2コンストラクトFS2 - EGF - Tev - HSA (C34S) - His - Aviタグ (TMEW7、配列番号579) で免疫化し、コンストラクトspTMEFF2 (230 - 320) G3S - RA IgG1Fc (TMEW20、配列番号581) でブーストした。89日間の免疫化レジメン後、ラットからリンパ節を摘出し、ハイブリドーマを生成するために使用し、ELISA及び/又はSPARCL (Spatial Proximity Analyte Reagent Capture Luminescence) によるヒトTMEFF2 - FL - ECD - HIS - Aviタグ (TMEW1) タンパク質への結合についてハイブリドーマ上清をスクリーニングした。TMEFF2 ECD、FS2 - EGF、又はEGFドメインのみのTMEFF2に対する結合の二次ELISA及びSPARCLスクリーニングのために、いくつかの上清を選択した。スクリーニング結果に基づいて、いくつかのハイブリドーマクローンを配列決定し、発現させ、機能性について特性評価した。

20

【0630】

ファージディスプレイライブラリからの抗体生成

Shi et al., J Mol Biol 397: 385 - 96, 2010及び国際公開第2009/085462号) に記載の通り、2セットのデノボpIXファージディスプレイライブラリから標準的な方法を使用してTMEFF2結合Fabを選択した。簡潔に述べると、ヒトスカフォールドを多様化させることによってV3.0及びV5.0と呼ばれる2セットのライブラリを生成し、ここでは、生殖系列VH遺伝子IGHV1 - 69*01、IGHV3 - 23*01、及びIGHV5 - 51*01を、H3ループを介してヒトIGHJ - 4ミニ遺伝子で組換え (V5.0ではIGHJ - 6ミニ遺伝子も用いた)、並びに、ヒト生殖系列VLカップ遺伝子O12 (IGKV1 - 39*01)、L6 (IGKV3 - 11*01)、A27 (IGKV3 - 20*01)、及びB3 (IGKV4 - 1*01) をIGKJ - 1ミニ遺伝子で組換えて、完全なVH及びVLドメインを構築した。多様化のために、タンパク質及びペプチド抗原と高頻度で接触するH1、H2、L1、L2及びL3ループ周辺の重鎖及び軽鎖可変領域内の位置を選択した。選択した位置における配列多様性は、それぞれのIGHV又はIGLV遺伝子のIGHV又はIGLV生殖系列遺伝子ファミリーにおいて各々の位置に存在する残基に制限した。H3ループにおける多様性は、V3.0ライブラリについては7~14アミノ酸長、V5.0ライブラリについては6~19アミノ酸長の短鎖乃至中鎖の合成ループを使用して作製した。H3におけるアミノ酸分布は、ヒト抗体において観察されるアミノ酸の変動を再現するよう設計された。ライブラリを作製するために利用したスカフォールドは、そのヒトVH及びVL生殖系列遺伝子の由来に従って命名した。V3.0及びV5.0のセットの両方について、3つの重鎖ライブラリを各々、4個の生殖系列軽鎖又は生殖系列軽鎖ライブラリと組み合わせて、選択実験に使用されるライブラリの各セットについて12の固有のVH

30

40

50

: V L の組み合わせを作製した。

【0631】

V領域クローニング

ファージのハイブリドーマ細胞溶解物からの全RNAを、製造元のプロトコルに従って RNeasy 96キット (Qiagen) を用いて精製した。得られたRNAを、Drop Senseを使用して定量し、-80 で保存したか又はRT-PCR (Invitrogen) により Invitrogen SuperScript III First-Strand Synthesis System を用いてcDNA合成に使用した。それぞれ重鎖、鎖、及び鎖の定常領域にアニーリングする遺伝子特異的プライマーを使用して、第1の鎖のcDNA合成を実施した。RT-PCR反応混合物は、最高3 μ gの精製RNA、遺伝子特異的プライマー、dNTPミックス、反応バッファ、25mM $MgCl_2$ 、DTT、RNaseOUT (商標) (40U/ μ L、Invitrogen)、及びSuperScript (商標) III RT (200U/L、Invitrogen) カタログ番号18080-051) で構成されており、50 で50分間及び85 で5分間インキュベートした。得られた一本鎖cDNAを-20 で保存した、又はPCR増幅に直接使用した。PLATINUM Pfxポリメラーゼ (Invitrogen) を使用してPCR反応を行った。最適化されたPCR条件を使用して、それぞれ、リーダー配列並びに重鎖、及び鎖の定常領域に、フォワード及びリバースプライマーをアニーリングさせることによって、v領域断片を増幅させた。得られたPCR断片を配列決定し、回収したv領域のアミノ酸配列のコドン最適化し、S228P、F234A、及びL235A変異を有するIgG4定常領域を有するpUnderベースの発現ベクター (IgG4PAAアイソタイプ) にクローニングした。

10

20

【0632】

Expi293小規模トランスフェクション及び精製

免疫化キャンペーン又はファージディスプレイから同定された選択抗体をクローニングし、IgG1PAAとして発現させ、小さい2mLスケールで精製した。Expi293 (商標) 細胞 (ThermoFisher Scientific) を、Expi293 (商標) 発現培地に $1.25 \times 10^5 \sim 2.25 \times 10^5$ 生存細胞/mLの密度で播種し、37、7% CO_2 で125mL~2L振盪フラスコ内において培養した。細胞を継代培養し、この場合、生存率98~99%で、密度が $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 生存細胞/mLで対数増殖に達した。

30

【0633】

トランスフェクションの日に、生存細胞密度及び生存率を求めた。製造元のトランスフェクションプロトコル (ThermoFisher Publication Number MAN0007814) に従って、 3×10^6 生存細胞/mLの密度で細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後6日目に $850 \times G$ で15分間遠心分離することによって培養物を収集した後、精製した。mAb Select Sure resin (GE Healthcare) を使用して清澄化した上清から抗体を精製し、PBSに透析した。DropSense Instrument (Trinean) を使用して、濾液に対するA280測定により、タンパク質濃度を求めた。

40

【0634】

7-3 抗TMEFF2抗体の特性評価

抗TMEFF2抗体は高親和性でTMEFF2に結合する。

TMEFF2 ECD (TMEW1: TMEFF2-FL ECD-His-Aviタグ) 及び/又は膜近位領域 (TMEW19: spTMEFF2 (230-320) G3S-H6) への選択IgG4PAA抗TMEFF2抗体の結合を、Proteon (TMEB674、TMEB675、TMEB565及びTMEB570) 又はBiacore SPR (TMEB762及びTMEB757) を用いて評価した。選択された抗体の結合の反応速度パラメータを表59に示す。抗TMEFF2抗体は、ピコモル濃度の親和性でTMEFF2 ECD及びTMEFF2膜近位領域の両方に結合することが見出された

50

。【0635】

【表57】

表59.

抗体	抗原	TMEFF2ドメイン	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(nM)
TMEB674	TMEW1	ECD	2.01E+06	1.62E-04	0.10
TMEB674	TMEW19	MP*	8.37E+05	1.75E-04	0.20
TMEB675	TMEW1	ECD	2.65E+06	1.53E-04	0.10
TMEB675	TMEW19	MP	9.72E+05	1.58E-04	0.20
TMEB565	TMEW1	ECD	3.84E+05	9.13E-06	0.02
TMEB565	TMEW19	MP	7.77E+05	6.39E-06	0.01
TMEB570	TMEW1	ECD	4.64E+05	5.13E-05	0.11
TMEB570	TMEW19	MP	7.62E+05	4.67E-05	0.06
TMEB762	TMEW1	ECD	5.41E+05	1.74E-04	0.32
TMEB757	TMEW1	ECD	5.42E+05	1.67E-04	0.31

*MP: 膜近位領域

10

【0636】

ProteOn SPR

抗TMEFF2 mAbのヒトTMEFF2のECD及び膜近位領域への結合を、ProteOn SPR (Bio-Rad)によって測定した。精製されたmAb (PBST中1 µg/mLの最終濃度に希釈した)をアッセイにおいてリガンドとして使用し、Fc捕捉を介してヤギ抗ヒト(GAH) IgG Fcに固定化した。GAH IgG Fcのアミンカップリングのために、EDC (40 mM)及びNHS (10 mM)の1:1混合物を注入直前に混合してチップ表面を活性化し、垂直配向で注入した。次いで、酢酸バッファ (pH 5.0)中GAH-Fc (30 µg/mL)抗体を、垂直配向で30 µL/分で300秒間表面上に流した。続いて、1 Mエタノールアミン (pH 8.5)を同じ配向で注入することによって、表面における残りの反応性カルボキシル基を全て不活化させた。固定化のために抗体を1 µg/mLの濃度で使用した。抗体を水平方向に表面上に流した。5つの濃度の3倍希釈系列 (最高濃度は100~600 nMの範囲)のヒトTMEFF2 ECD又は膜近位領域を、捕捉された分子に結合させるために垂直配向でアナライトとして流した。また、ベースラインシグナルにおける任意のドリフトをモニタリングするために、垂直方向で6番目のチャンネルにバッファサンプルを注入した。全ての濃度についての会合及び解離相を、100 µL/分の流速でそれぞれ3分間及び30 (又は15)分間モニタリングした。結合抗原を除去するために18秒パルスの0.8%リン酸を用いて、次の相互作用サイクルのために結合表面を再生した。応答データから2セットの参照データを減じることによって生データを処理した: 1) 抗原と空のチップ表面との間の非特異的相互作用を補正するためのインタースポットシグナル; 2) 非特異的ベースラインドリフトを補正するための空のチャンネルシグナル (チップ上にPBSTのみを流した場合)。

20

30

40

【0637】

Biacore 8K SPR

抗TMEFF2 mAbのヒトTMEFF2 ECDへの結合を、Biacore 8K SPRによって測定した。アッセイのフォーマットは、高密度抗ヒトFc表面を使用してmAを捕捉した後、単一サイクルの反応速度論による方法を用いてヒトTMEFF2濃度滴定を注入するためのものであった。HBSP (GE) バッファ中流量30 µL/分でCM5 Sensor Chip (GE)において、フローセル1及び2に10 mM酢酸バッファ、pH 4.5中30 g/mLでのアミンカップリングを介してヤギ抗ヒトFc IgG (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-005-098)を直接固定化した。mAbを、フローセル2において0.5 µg/mL (約

50

200 ~ 300 RU) で抗ヒトFc IgG表面上に捕捉した。次いで、ランニングバッファをHBS-P + 100 μg/mL BSAに変更した。3倍希釈系列中の30 nM濃度のTMEFF2 ECDを、単一サイクルの反応速度論による方法を用いて低濃度から高濃度まで注入した。最後、すなわち最高濃度の注入の30分後にオフレートモニタリングし、次いで、0.8%リン酸(Bio-Rad)を用いて表面を再生した。同じmAbを捕捉し、同じサンプルランの条件を使用して、バッファブランクのランも完了した。応答データから2セットの参照データを減じることによって生データを処理した：1) サンプルフローセル2から減じた参照フローセル1、及び2) 実験ランから減じたバッファブランクのラン。各mAbについて全濃度において処理したデータを1:1の単純なラングミュア結合モデルにグローバルフィットさせて、反応速度定数(k_{on}、k_{off})及び親和性(K_D)定数の推定値を抽出した。

【0638】

抗TMEFF2抗体の熱安定性

TMEB675は、DSC(示差走査熱量測定)により通常よりも低い熱安定性プロファイルを示し、アンフォールディング開始T_m = 52 であり、第1の熱転移(T_{m1}) = 60.4 であった。TMEB675の配列のより厳密な検査(実施例4を参照)は、重鎖及び軽鎖のフレームワーク領域内の体細胞超変異(SHM)の存在を示した。いくつかの再遺伝子操作された変異体をサブクローニングし、発現させ、精製し、DSCによりプロファイリングした。得られたmAb TMEB762及びTMEFB757は、望ましい熱安定性プロファイルを示した(それぞれT_{m1} = 69.4 及びT_{m1} = 69.7)。TMEB675と比較して、TMEB762は、重鎖において以下のアミノ酸改変：R14P、P20L、H81Qを有し、一方、TMEFB757は、重鎖において以下のアミノ酸改変：R14P及びP20Lを有していた。TMEB675と比較して、TMEB762は、軽鎖において以下のアミノ酸改変：A1D及びA91Pを有し、一方、TMEFB757は、軽鎖にA91Pを有していた。残基の付番はKababに従う。TMEB675、TMEB762のTMEFF2 ECDへの結合の反応速度パラメータを表59に示す。

【0639】

7-4 抗TMEFF2抗体の構造特定

標準的な技術を用いて、抗体のcDNA配列及びアミノ酸翻訳物を得た。ポリペプチド配列の決定後、可変領域又は完全長抗体をコードしているいくつかの抗体cDNAを、発現をスケールアップするための標準的な方法を用いてコドン最適化した。

【0640】

表60は、選択抗TMEFF2抗体のHC DR1及びHC DR2アミノ酸配列を示す。

【0641】

表61は、選択抗TMEFF2抗体のHC DR3のアミノ酸配列を示す。

【0642】

表62は、選択抗TMEFF2抗体のLC DR1及びLC DR2アミノ酸配列を示す。

【0643】

表63は、選択抗TMEFF2のLC DR3のアミノ酸配列を示す。

【0644】

表64は、選択抗TMEFF2のVH及びVLアミノ酸配列を示す。

【0645】

表65は、選択抗TMEFF2抗体の重鎖及び軽鎖の配列番号を示す。

【0646】

表66は、選択抗TMEFF2の重鎖アミノ酸配列を示す。

【0647】

表67は、選択抗TMEFF2の軽鎖アミノ酸配列を示す。

【0648】

表68は、様々な抗TMEFF2抗体鎖をコードしているポリヌクレオチドの配列番号

を示す。

【 0 6 4 9 】

【 表 5 8 】

表 6 0.

mAb	HCDR1の配列	HCDR1の配列番号	HCDR2の配列	HCDR2の配列番号
TMEB675	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSVKG	584
TMEB570	SYYSIS	583	GIIPISGRANYAQKFQG	585
TMEB674	SYSMS	582	VISGGGSFTSYADSVKG	586
TMEB565	SYYSIS	583	GIIPISGRANYAQKFQG	585
TMEB762	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSVKG	584
TMEB757	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSVKG	584

10

【 0 6 5 0 】

【 表 5 9 】

表 6 1.

mAb	HCDR3配列	HCDR3の配列番号
TMEB675	MPLNSPHDY	587
TMEB570	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB674	MPLNSPHDC	17
TMEB565	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB762	MPLNSPHDY	587
TMEB757	MPLNSPHDY	587

20

【 0 6 5 1 】

【 表 6 0 】

表 6 2.

mAb	LCDR1のアミノ酸	LCDR1の配列番号	LCDR2のアミノ酸	LCDR2の配列番号
TMEB675	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB570	RASQSVSTYYLA	19	GASYRAT	21
TMEB674	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB565	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB762	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
TMEB757	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588

30

【 0 6 5 2 】

【 表 6 1 】

表 6 3.

mAb	LCDR3のアミノ酸	LCDR3の配列番号
TMEB675	LQDYNALYALT	22
TMEB570	QQYGHSPIT	23
TMEB674	LQDYNYSLT	24
TMEB565	LQDYNALYALT	22
TMEB762	LQDYNALYALT	603
TMEB757	LQDYNALYALT	603

40

【 0 6 5 3 】

【表 6 2】

表 6 4.

抗体	VH名	VHアミノ酸配列	VHの配列番号	VL名	VLアミノ酸配列	VLの配列番号
TMEB675	TMEH411	EVQLLES GGGLVQR GGSLRPS CAASGFT FSSYSMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSG GFTDYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLHMN SLRAEDTAVYYCAR MPLNSPHDYWGQG TLVTVSS	25	TMEL127	AIQMTQSPSSLS ASVGDRVITICR ASQGIRNDLGWY QKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAT YYCLQDYNALYALT FGGGTKVEIK	28
TMEB570	TMEH396	QVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCASGGT FSSYYISWVRQAPG QGLEWMGGIIPISGR ANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARD GYSSGRSTTYAFDY WGQGLTVTVSS	589	TMEL112	EIVLTQSPGTLSSL SPGERATLSCRA SQSVSTYLLAWY QKPGQAPRLLI YGASYRATGIPD RFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAV YYCQQYGHSPITF GGGTKVEIK	29
TMEB674	TMEH410	EVQLLES GGGLVQP PGGSLRLSCAASGF TFSSYSMSWVRQA PGKGLEWVSVISGG GSFTSYADSVKGRF TISRDNSENNTLYLQ MSSLRAEDTAFYYC ARMPNSPHDCWG QGTLVTVSS	27	TMEL126	AIQMTQSPSSLS ASVGDRVITICR ASQGIRNDLGWY QKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAT YYCLQDYNYSLT FGGGTKVEIR	30
TMEB565	TMEH396	QVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCASGGT FSSYYISWVRQAPG QGLEWMGGIIPISGR ANYAQKFQGRVTIT ADESTSTAYMELSS LRSEDTAVYYCARD GYSSGRSTTYAFDY WGQGLTVTVSS	589	TMEL111	EIVLTQSPGTLSSL SPGERATLSCRA SQSVATYLLAWY QKPGQAPRLLI YGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAV YYCQQYGNPITF GGGTKVEIK	31
TMEB762	TMEH459	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSSYSMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSG GFTDYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR MPLNSPHDYWGQG TLVTVSS	604	DL3L129	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVITICR ASQGIRNDLGWY QKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAT YYCLQDYNPLTF GGGTKVEIK	607
TMEB757	TMEH460	EVQLLES GGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FSSYSMSWVRQAP GKGLEWVSVISGSG GFTDYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLHMN SLRAEDTAVYYCAR MPLNSPHDYWGQG TLVTVSS	612	B76L85	AIQMTQSPSSLS ASVGDRVITICR ASQGIRNDLGWY QKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAT YYCLQDYNPLTF GGGTKVEIK	613

10

20

30

40

【表 6 3】

表 6 5.

抗体	VH名	VL名	HCタンパク質配列番号	LCタンパク質配列番号
TMEB675	TMEH411	TMEL127	32	35
TMEB570	TMEH396	TMEL112	33	36
TMEB674	TMEH410	TMEL126	34	37
TMEB565	TMEH396	TMEL111	33	38
TMEB762	TMEH459	DL3L129	614	615
TMEB757	TMEH460	B76L85	616	617

10

【 0 6 5 5】

【表 6 4】

表 6 6.

HCタンパク質配列番号	HCのアミノ酸配列
32 (TMEB675 HC)	evqllesggglvqrggslrpscaasgftfssysmswvrqapgkglewvsvvisgsggftdyadsvkgrftisr dskntlylhmnslraedtavyycarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaal gclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgktytcnvdhkpsntkvdkr veskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevh naktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqprepqvylppsqe emtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrlytdksrwqegnvfscsv mhealhnhytqkslsislglk
33 (TMEB570, TMEB565 HC)	qvqlvqsgaevkkpgssvkvsvckasggftfssyiswvrqapgqglewmggiipisgranyaqkfqrvti tadeststamelslrsedtavyycardgyssgrsttyafdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrst sestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgktytcnvdhkps ntkvdkrveskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyv dgvevhnaktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqprepqvyl lppsqeemtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrlytdksrwqeg nvfscsvmhealhnhytqkslsislglk
34 (TMEB674 HC)	evqllesggglvqppggslrlscaasgftfssysmswvrqapgkglewvsvvisgggftsdyadsvkgrftis rdnsntlylqmsslraedtafyycarmplnsphdcwgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaa lgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgktytcnvdhkpsntkvdk rveskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevh naktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqprepqvylppsqe emtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrlytdksrwqegnvfscsv mhealhnhytqkslsislglk
614 (TMEB762 HC)	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssysmswvrqapgkglewvsvvisgsggftdyadsvkgrftisr dskntlylhmnslraedtavyycarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaal gclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgktytcnvdhkpsntkvdkr veskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevh naktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqprepqvylppsqe emtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrlytdksrwqegnvfscsv mhealhnhytqkslsislglk
616 (TMEB757 HC)	evqllesggglvqpggslrlscaasgftfssysmswvrqapgkglewvsvvisgsggftdyadsvkgrftisr dskntlylhmnslraedtavyycarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaal gclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlqssglyslssvvtvpssslgktytcnvdhkpsntkvdkr veskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmsirtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevh naktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiectiskakgqprepqvylppsqe emtknqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflysrlytdksrwqegnvfscsv mhealhnhytqkslsislglk

20

30

40

【 0 6 5 6】

【表 6 5】

表 6 7.

LC タンパク質の 配列番号	LCのアミノ酸配列
35 (TMEB675 LC)	aiqmtqspsslsasvqdrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftl tisslqpedfatyyclqdynyaltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
36 (TMEB570 LC)	eivltqspgtlslspgeratlscrasqsvstyylawyqqkpgqaprlliygasyratgipdrfsgsgsgtdftli srlepedfavyyccqyghspitfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
37 (TMEB674 LC)	aiqmtqspsslsasvqdrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftl tisslqpedfatyyclqdynysltfgggtkveirrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
38 (TMEB565 LC)	eivltqspgtlslspgeratlscrasqsvatyylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftli srlepedfavyyccqygynpitfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
615 (TMEB762 LC)	diqmtqspsslsasvqdrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftl tisslqpedfatyyclqdynypltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec
617 (TMEB757 LC)	aiqmtqspsslsasvqdrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftl tisslqpedfatyyclqdynypltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

10

20

【 0 6 5 7】

【表 6 6】

表 6 8.

抗体	VH cDNA 配列番号	VL cDNA 配列番号	HC cDNA 配列番号	LC cDNA 配列番号
TMEB675	39	42	46	49
TMEB570	40	43	47	50
TMEB674	41	44	48	51
TMEB565	40	45	47	590
TMEB762	618	619	620	621
TMEB757	622	623	624	625

30

【 0 6 5 8】

配列番号 39 (T M E B 6 7 5 V H c D N A)

G a g g t g c a g c t g c t g g a a a g c g g c g g a g g c c t g g t g c a g
a g a g g a g g a a g c c t g a g a c c c a g c t g t g c c g c c a g c g g c t
t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t c a g g c a g g c
c c c t g g c a a a g g a c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t t a g c g g c
a g c g g c g g c t t c a c c g a t t a c g c c g a c a g c g t g a a g g g c a
g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a t a g c a a g a a c a c c c t g t a
c c t g c a c a t g a a c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c g t g
t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c t c a c g a c t
a c t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t g a c c g t g t c c a g c

40

【 0 6 5 9】

配列番号 40 (T M E B 5 7 0 , T M E B 5 6 5 V H c D N A)

C a g g t g c a g c t g g t g c a g a g c g g c g c g g a a g t g a a a a a
c c g g g c a g c a g c g t g a a a g t g a g c t g c a a a g c g a g c g g c g
g c a c c t t c a g c t c c t a t t a c a t t a g c t g g g t g c g c c a g g c
g c c g g g c c a g g g c c t g g a a t g g a t g g g t g g c a t t a t c c c a

50

a t c a g t g g g c g t g c t a a t t a t g c g c a g a a a t t t c a g g g c c
g c g t g a c c a t t a c c g c t g a t g a a a g c a c c a g c a c c g c g t a
t a t g g a a c t g a g c a g c c t g c g c a g c g a a g a t a c c g c g g t g
t a t t a t t g c g c g c g c g a c g g c t a c a g t a g t g g a c g t a g c a
c a a c a t a c g c a t t t g a c t a t t g g g g c c a g g g c a c c c t g g t
g a c c g t g t c g a g t

【0660】

配列番号41 (TMEB674 VH cDNA)

G a a g t g c a g c t g c t g g a g a g c g g a g g a g g a c t g g t g c a g
c c t c c t g g c g g a a g c c t g a g a c t g a g c t g c g c c g c t a g c g
g c t t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t g a g a c a
g g c t c c t g g c a a g g g c c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t c a g c
g g c g g a g g c a g c t t t a c c a g c t a c g c c g a c a g c g t g a a g g
g c a g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a c a g c a a c a a c a c c c t
g t a c c t g c a g a t g a g c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c
t t c t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c c a t g
a c t g c t g g g g a c a g g g c a c c c t g g t g a c c g t g a g c a g c

10

【0661】

配列番号42 (TMEB675 VL cDNA)

G c c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t
a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c
a g g g c a t c a g a a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c
c g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c
c t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g a a g c g g c a
g c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c
c g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c
t a c g c c c t g a c a t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a
a g

20

【0662】

配列番号43 (TMEB570 VL cDNA)

G a a a t t g t g c t g a c c c a g a g c c c g g g c a c c c t g a g c c t g
a g c c c g g g c g a a c g c g c g a c c c t g a g c t g c c g c g c g a g c c
a g a g c g t t t c c a c a t a c t a c c t g g c g t g g t a t c a g c a g a a
a c c g g g c c a g g c g c c g c g c c t g c t g a t t t a c g g t g c c t c c
t a t c g c g c g a c c g g c a t t c c g g a t c g c t t t a g c g g c a g c g
g t t c c g g c a c c g a t t t t a c c c t g a c c a t t a g c c g c c t g g a
a c c g g a a g a t t t t g c g g t g t a t t a t t g c c a g c a g t a c g g t
c a c a g c c c g a t t a c t t t t g g c c a g g g c a c c a a a g t g g a a a
t c a a a

30

【0663】

配列番号44 (TMEB674 VL cDNA)

G c c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t
a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c
a g g g c a t c a g g a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c
c g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c
c t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g c a g c g g a a
g c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c t c c a g c c t g c a g c c
c g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c
t a c a g c c t g a c c t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a
g g

40

50

【0664】

配列番号45 (TMEB565 VL cDNA)

G a a a t t g t g c t g a c c c a g a g c c c g g g c a c c c t g a g c c t g
a g c c c g g g c g a a c g c g c g a c c c t g a g c t g c c g c g c g a g c c
a g a g c g t t g c c a c c t a t t a t c t t g c g t g g t a t c a g c a g a a
a c c g g g c c a g g c g c c g c g c c t g c t g a t t t a c g g t g c a t c c
t c c c g t g c g a c c g g c a t t c c g g a t c g c t t t a g c g g c a g c g
g t t c c g g c a c c g a t t t t a c c c t g a c c a t t a g c c g c c t g g a
a c c g g a a g a t t t t g c g g t g t a t t a t t g c c a g c a g t a c g g c
t a t a a c c c a a t t a c c t t t g g c c a g g g c a c c a a a g t g g a a a
t c a a a

10

【0665】

配列番号46 (TMEB675 HC cDNA)

g a g g t g c a g c t g c t g g a a a g c g g c g g a g g c c t g g t g c a g
a g a g g a g g a a g c c t g a g a c c c a g c t g t g c c g c c a g c g g c t
t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t c a g g c a g g c
c c c t g g c a a a g g a c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t t a g c g g c
a g c g g c g g c t t c a c c g a t t a c g c c g a c a g c g t g a a g g g c a
g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a t a g c a a g a a c a c c c t g t a
c c t g c a c a t g a a c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c g t g
t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c t c a c g a c t
a c t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t g a c c g t g t c c a g c g c t t c
c a c c a a g g g c c c a t c c g t c t t c c c c t g g c g c c c t g c t c c
a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c t g g g c t g c c t g g
t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g t g g a a
c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c c g g c t
g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g c g t g g
t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c g a a a a c c t a c a c
c t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a a g g t g g a c
a a g a g a g t t g a g t c c a a a t a t g g t c c c c a t g c c c a c c a t
g c c c a g c a c c t g a g g c c g c c g g g g a c c a t c a g t c t t c c t
g t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c t c t c a t g a t c t c c c g g
a c c c c t g a g g t c a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a g g
a a g a c c c c g a g g t c c a g t t c a a c t g g t a c g t g g a t g g c g t
g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g
t t c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c
t g c a c c a g g a c t g g c t g a a c g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a
g g t c t c c a a c a a a g g c c t c c c g t c c t c c a t c g a g a a a a c c
a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a g c c a c a g g t g t
a c a c c c t g c c c c c a t c c c a g g a g g a g a t g a c c a a g a a c c a
g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a c c c c a g c
g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a
a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g
c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a g g c t a a c c g t g g a c a a g a g c
a g g t g g c a g g a g g g g a a t g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c
a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c a c a g a a g a g c c t c t c
c c t g t c t c t g g g t a a a

20

30

40

【0666】

配列番号47 (TMEB570, TMEB565 HC cDNA)

c a g g t g c a g c t g g t g c a g a g c g g c g c g g a a g t g a a a a a a

50

c c g g g c a g c a g c g t g a a a g t g a g c t g c a a a g c g a g c g g c g
 g c a c c t t c a g c t c c t a t t a c a t t a g c t g g g t g c g c c a g g c
 g c c g g g c c a g g g c c t g g a a t g g a t g g g t g g c a t t a t c c c a
 a t c a g t g g g c g t g c t a a t t a t g c g c a g a a a t t t c a g g g c c
 g c g t g a c c a t t a c c g c t g a t g a a a g c a c c a g c a c c g c g t a
 t a t g g a a c t g a g c a g c c t g c g c a g c g a a g a t a c c g c g g t g
 t a t t a t t g c g c g c g c g a c g g c t a c a g t a g t g g a c g t a g c a
 c a a c a t a c g c a t t t g a c t a t t g g g g c c a g g g c a c c c t g g t
 g a c c g t g t c g a g t g c t t c c a c c a a g g g c c c a t c c g t c t t c
 c c c c t g g c g c c c t g c t c c a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g
 c c g c c c t g g g c t g c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c
 g g t g a c g g t g t c g t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c
 g t g c a c a c c t t c c c g g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t
 a c t c c c t c a g c a g c g t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t
 g g g c a c g a a a a c c t a c a c c t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c
 a g c a a c a c c a a g g t g g a c a a g a g a g t t g a g t c c a a a t a t g
 g t c c c c c a t g c c c a c c a t g c c c a g c a c c t g a g g c c g c c g g
 g g g a c c a t c a g t c t t c c t g t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c
 a c t c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c a c g t g c g t g g
 t g g t g g a c g t g a g c c a g g a a g a c c c c g a g g t c c a g t t c a a
 c t g g t a c g t g g a t g g c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a
 a a g c c g c g g g a g g a g c a g t t c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g
 t c a g c g t c c t c a c c g t c c t g c a c c a g g a c t g g c t g a a c g g
 c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a a c a a a g g c c t c c c g
 t c c t c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c
 c c c g a g a g c c a c a g g t g t a c a c c c t g c c c c a t c c c a g g a
 g g a g a t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c
 a a a g g c t t c t a c c c c a g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a
 g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c
 c g t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a g g
 c t a a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g g a g g g g a a t g t c t
 t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a
 c a c a c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c t g g g t a a a

10

20

30

【0667】

配列番号48 (T M E B 6 7 4 H C c D N A)

g a a g t g c a g c t g c t g g a g a g c g g a g g a g g a c t g g t g c a g
 c c t c c t g g c g g a a g c c t g a g a c t g a g c t g c g c c g c t a g c g
 g c t t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t g a g a c a
 g g c t c c t g g c a a g g g c c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t c a g c
 g g c g g a g g c a g c t t t a c c a g c t a c g c c g a c a g c g t g a a g g
 g c a g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a c a g c a a c a a c a c c c t
 g t a c c t g c a g a t g a g c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c
 t t c t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c c c a t g
 a c t g c t g g g g a c a g g g c a c c c t g g t g a c c g t g a g c a g c g c
 t t c c a c c a a g g g c c c a t c c g t c t t c c c c t g g c g c c c t g c
 t c c a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c t g g g c t g c c
 t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g t g
 g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c c g
 g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g c g
 t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c g a a a a c c t a

40

50

c a c c t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a a g g t g
g a c a a g a g a g t t g a g t c c a a a t a t g g t c c c c c a t g c c c a c
c a t g c c c a g c a c c t g a g g c c g c c g g g g g a c c a t c a g t c t t
c c t g t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c t c t c a t g a t c t c c
c g g a c c c c t g a g g t c a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c
a g g a a g a c c c c g a g g t c c a g t t c a a c t g g t a c g t g g a t g g
c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g
c a g t t c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g
t c c t g c a c c a g g a c t g g c t g a a c g g c a a g g a g t a c a a g t g
c a a g g t c t c c a a c a a a g g c c t c c c g t c c t c c a t c g a g a a a
a c c a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a g c c a c a g g
t g t a c a c c c t g c c c c c a t c c c a g g a g g a g a t g a c c a a g a a
c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a c c c c
a g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g
a g a a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a
c g g c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a g g c t a a c c g t g g a c a a g
a g c a g g t g g c a g g a g g g g a a t g t c t t c t c a t g c t c c g t g a
t g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c a c a g a a g a g c c t
c t c c c t g t c t c t g g g t a a a

10

【0668】

20

配列番号49 (T M E B 6 7 5 L C c D N A)

G c c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t
a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c
a g g g c a t c a g a a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c
c g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c
c t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g a a g c g g c a
g c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c
c g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c
t a c g c c c t g a c a t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a
a g c g t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c
a t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g
t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c
a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a
g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c
a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g
a g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g
c c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g
t g t

30

【0669】

40

配列番号50 (T M E B 5 7 0 L C c D N A)

G a a a t t g t g c t g a c c c a g a g c c c g g g c a c c c t g a g c c t g
a g c c c g g g c g a a c g c g c g a c c c t g a g c t g c c g c g c g a g c c
a g a g c g t t t c c a c a t a c t a c c t g g c g t g g t a t c a g c a g a a
a c c g g g c c a g g c g c c g c g c c t g c t g a t t t a c g g t g c c t c c
t a t c g c g c g a c c g g c a t t c c g g a t c g c t t t a g c g g c a g c g
g t t c c g g c a c c g a t t t t a c c c t g a c c a t t a g c c g c c t g g a
a c c g g a a g a t t t t g c g g t g t a t t a t t g c c a g c a g t a c g g t
c a c a g c c c g a t t a c t t t t g g c c a g g g c a c c a a a g t g g a a a
t c a a a c g t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c
g c c a t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t

50

g t g t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g
t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c
c c a g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c
t a c a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t
a c g a g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a
g g g c c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g a
g a g t g t

【0670】

配列番号51 (TMEB674 LC cDNA)

c c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t a
g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c a
g g g c a t c a g g a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c c
g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c c
t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g c a g c g g a a g
c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c t c c a g c c t g c a g c c c
g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c t
a c a g c c t g a c c t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a g
g c g t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a
t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t
g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a
g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g
g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a
g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a
g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c
c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t
g t

10
20

【0671】

配列番号590 (TMEB565 LC cDNA)

G a a a t t g t g c t g a c c c a g a g c c c g g g c a c c c t g a g c c t g
a g c c c g g g c g a a c g c g c g a c c c t g a g c t g c c g c g c g a g c c
a g a g c g t t g c c a c c t a t t a t c t t g c g t g g t a t c a g c a g a a
a c c g g g c c a g g c g c c g c g c c t g c t g a t t t a c g g t g c a t c c
t c c c g t g c g a c c g g c a t t c c g g a t c g c t t t a g c g g c a g c g
g t t c c g g c a c c g a t t t t a c c c t g a c c a t t a g c c g c c t g g a
a c c g g a a g a t t t t g c g g t g t a t t a t t g c c a g c a g t a c g g c
t a t a a c c c a a t t a c c t t t g g c c a g g g c a c c a a a g t g g a a a
t c a a a c g t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c
g c c a t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t
g t g t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g
t a c a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c
c c a g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c
t a c a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t
a c g a g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a
g g g c c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a
g a g t g t

30
40

【0672】

配列番号618 (TMEB762 VH cDNA)

g a g g t g c a g c t g c t g g a a a g c g g c g g a g g c c t g g t g c a g
c c c g g a g g a a g c c t g a g a c t c a g c t g t g c c g c c a g c g g c t
t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t c a g g c a g g c

50

c c c t g g c a a a g g a c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t t a g c g g c
a g c g g c g g c t t c a c c g a t t a c g c c g a c a g c g t g a a g g g c a
g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a t a g c a a g a a c a c c c t g t a
c c t g c a g a t g a a c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c g t g
t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c t c a c g a c t
a c t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t g a c c g t g t c c a g c

【0673】

配列番号619 (TMEB762 VL cDNA)

g a c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t
a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c
a g g g c a t c a g a a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c
c g g c a a g g c c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c
c t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g a a g c g g c a
g c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c
c g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c
t a c c c c c t g a c a t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a
a g

10

【0674】

配列番号620 (TMEB762 HC cDNA)

g a g g t g c a g c t g c t g g a a a g c g g c g g a g g c c t g g t g c a g
c c c g g a g g a a g c c t g a g a c t c a g c t g t g c c g c c a g c g g c t
t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t c a g g c a g g c
c c c t g g c a a a g g a c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t t a g c g g c
a g c g g c g g c t t c a c c g a t t a c g c c g a c a g c g t g a a g g g c a
g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a t a g c a a g a a c a c c c t g t a
c c t g c a g a t g a a c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c g t g
t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c t c a c g a c t
a c t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t g a c c g t g t c c a g c g c t t c
c a c c a a g g g c c c a t c c g t c t t c c c c c t g g c g c c c t g c t c c
a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c t g g g c t g c c t g g
t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g t g g a a
c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c c g g c t
g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g c g t g g
t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c g a a a a c c t a c a c
t t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a a g g t g g a c
a a g a g a g t t g a g t c c a a a t a t g g t c c c c a t g c c c a c c a t
g c c c a g c a c c t g a g g c c g c c g g g g a c c a t c a g t c t t c c t
g t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c t c t c a t g a t c t c c c g g
a c c c c t g a g g t c a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a g g
a a g a c c c c g a g g t c c a g t t c a a c t g g t a c g t g g a t g g c g t
g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g
t t c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c
t g c a c c a g g a c t g g c t g a a c g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a
g g t c t c c a a c a a a g g c c t c c c g t c c t c c a t c g a g a a a a c c
a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c g a g a g c c a c a g g t g t
a c a c c c t g c c c c a t c c c a g g a g g a g a t g a c c a a g a a c c a
g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a c c c c a g c
g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a
a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g
c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a g g c t a a c c g t g g a c a a g a g c

20

30

40

50

a g a t g g c a g g a g g g g a a t g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c
a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c a c a g a a g a g c c t c t c
c c t g t c t c t g g g t a a a

【0675】

配列番号621 (TMEB762 LC cDNA)

g a c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t
a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c
a g g g c a t c a g a a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c
c g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c
c t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g a a g c g g c a
g c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c
c g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c
t a c c c c c t g a c a t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a
a g c g t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c
a t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g
t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c
a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a
g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c
a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g
a g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g
c c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g
t g t t a g

10

20

【0676】

配列番号622 (TMEB757 VH cDNA)

g a g g t g c a g c t g c t g g a a a g c g g c g g a g g c c t g g t g c a g
c c c g g a g g a a g c c t g a g a c t c a g c t g t g c c g c c a g c g g c t
t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t c a g g c a g g c
c c c t g g c a a a g g a c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t t a g c g g c
a g c g g c g g c t t c a c c g a t t a c g c c g a c a g c g t g a a g g g c a
g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a t a g c a a g a a c a c c c t g t a
c c t g c a c a t g a a c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c g t g
t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c t c a c g a c t
a c t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t g a c c g t g t c c a g c

30

【0677】

配列番号623 (TMEB757 VL cDNA)

g c c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t
a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c
a g g g c a t c a g a a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c
c g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c
c t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g a a g c g g c a
g c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c
c g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c
t a c c c c c t g a c a t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a
a g

40

【0678】

配列番号624 (TMEB757 HC cDNA)

g a g g t g c a g c t g c t g g a a a g c g g c g g a g g c c t g g t g c a g
c c c g g a g g a a g c c t g a g a c t c a g c t g t g c c g c c a g c g g c t
t c a c c t t c a g c a g c t a c a g c a t g a g c t g g g t c a g g c a g g c
c c c t g g c a a a g g a c t g g a g t g g g t g a g c g t g a t t a g c g g c

50

a g c g g c g g c t t c a c c g a t t a c g c c g a c a g c g t g a a g g g c a
 g g t t c a c c a t c a g c a g g g a c a a t a g c a a g a a c a c c c t g t a
 c c t g c a c a t g a a c a g c c t g a g g g c c g a g g a c a c c g c c g t g
 t a c t a c t g c g c c a g g a t g c c c c t g a a c a g c c c t c a c g a c t
 a c t g g g g c c a g g g a a c c c t g g t g a c c g t g t c c a g c g c t t c
 c a c c a a g g g c c c a t c c g t c t t c c c c c t g g c g c c c t g c t c c
 a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c t g g g c t g c c t g g
 t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g t g g a a
 c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c c g g c t
 g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g c g t g g
 t g a c c g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c g a a a a c c t a c a c
 t t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a a g g t g g a c
 a a g a g a g t t g a g t c c a a a t a t g g t c c c c c a t g c c c a c c a t
 g c c c a g c a c c t g a g g c c g c c g g g g g a c c a t c a g t c t t c c t
 g t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c t c t c a t g a t c t c c c g g
 a c c c c t g a g g t c a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a g g
 a a g a c c c c g a g g t c c a g t t c a a c t g g t a c g t g g a t g g c g t
 g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g
 t t c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c
 t g c a c c a g g a c t g g c t g a a c g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a
 g g t c t c c a a c a a a g g c c t c c c g t c c t c c a t c g a g a a a a c c
 a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a g c c a c a g g t g t
 a c a c c c t g c c c c a t c c c a g g a g g a g a t g a c c a a g a a c c a
 g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a c c c c a g c
 g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a
 a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g
 c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a g g c t a a c c g t g g a c a a g a g c
 a g a t g g c a g g a g g g g a a t g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c
 a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c a c a g a a g a g c c t c t c
 c c t g t c t c t g g g t a a a

10

20

30

【0679】

配列番号625 (TMEB757 LC cDNA)

g c c a t c c a g a t g a c c c a g a g c c c t a g c a g c c t g a g c g c t
 a g c g t g g g c g a c a g g g t g a c c a t c a c c t g c a g g g c c a g c c
 a g g g c a t c a g a a a c g a c c t g g g c t g g t a c c a g c a g a a g c c
 c g g c a a g g c c c c a a g c t g c t g a t c t a c g c c g c c a g c a g c
 c t g c a g a g c g g a g t g c c t a g c a g g t t c a g c g g a a g c g g c a
 g c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c
 c g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g c c t g c a g g a c t a c a a c
 t a c c c c c t g a c a t t c g g c g g c g g c a c c a a g g t g g a g a t c a
 a g c g t a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c
 a t c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g
 t g c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c
 a g t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a
 g g a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c
 a g c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g
 a g a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g
 c c t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g
 t g t t a g

40

【0680】

50

選択抗TMEFF2抗体のフレームワークを、表69に示す。

【0681】

【表67】

表69.

抗体	VHフレームワーク	VHフレームワーク 配列番号	VLフレームワーク	VLフレームワーク 配列番号
TMEB675	VH3__3-23	53	VKI__L11	55
TMEB570	VH1__1-69	54	VKIII__A27	591
TMEB674	VH3__3-23	53	VKI__L11	55
TMEB565	VH1__1-69	54	VKI__L11	55
TMEB762	VH3__3-23	53	VKI__L11	55
TMEB757	VH3__3-23	53	VKI__L11	55

10

【0682】

配列番号53 (VH3__3-23フレームワーク)

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q
A P G K G L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K W G Q G T L V T V S S

【0683】

配列番号54 (VH1__1-69フレームワーク)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S C K A S G G T F S S Y A I S W V
R Q A P G Q G L E W M G G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S
T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R

20

【0684】

配列番号55 (VKI__L11フレームワーク)

a i q m t q s p s s l s a s v g d r v t i t c r a s q g i r n d l g w y q q k
p g k a p k l l i y a a s s l q s g v p s r f s g s g s g t d f t l t i s s l
q p e d f a t y y c l q d y n y p

【0685】

配列番号591 (VKIII__A27フレームワーク)

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q
K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R
L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P

30

【0686】

7-5 抗TMEFF2抗体のエピトープマッピング

H/D交換を使用して、TMEB570及びTMEB675のエピトープマッピングを行った。TMEW1 (配列番号578)を、これらのアッセイにおいてTMEFF2の供給源として使用した。

【0687】

130 μLの対照バッファ (50 mMリン酸、100 mM塩化ナトリウム、pH 7.4) 中10 μgのTMEW1を、130 μLの4 M塩酸グアニジン、0.85 M TCEPバッファ (最終的なpHは2.5であった) を添加し、混合物を10 で3分間インキュベートすることによって変性させた。次いで、混合物を、インハウスでパッキングしたペプシン/プロテアーゼXIII (w/w、1:1) カラム (2.1 × 30 mm) を使用したオンカラムペプシン/プロテアーゼXIII消化に供した。得られたペプチドを、Q ExactiveTM Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo) に接続されたWaters Acquity UPLCで構成されるUPLC-MSシステムを使用して分析した。ペプチドを、2% 34%の溶媒B (アセトニトリル中、0.2%ギ酸) の16.5分の勾配で50 mm × 1 mmのC8カラム上で分離した。溶媒Aは、水中0.2%ギ酸であった。注入バ

40

50

ルブ、及びペプシン/プロテアーゼX I I Iカラム、及びそれらに関連する接続チューブは、10 で維持された冷却ボックス内で維持した。第2の切換弁、C8カラム、及びそれらに関連するステンレス鋼の接続チューブは、-6 で維持された別の冷却循環ボックス内にあった。TMEW1配列に対するMS/MSデータをMascoで検索することを通じて、ペプチド同定を行った。プリカーサー及びプロダクトイオンに対する質量許容差は、それぞれ7 ppm及び0.02 Daであった。

【0688】

10 µLのTMEW1 (5 µg)、又は10 µLのTMEW1及びTMEB570又はTMEB675混合物 (5 µg : 15 µg) を、10 で0秒、30秒、360秒、3600秒、又は14400秒、120 µLの重水標識バッファ (50 mMリン酸ナトリウム、100 mM塩化ナトリウム、pH 7.4) と共にインキュベートした。各時点での水素/重水素 (H/D) 交換を、2回で実施した。130 µLの4 M塩酸グアニジン、0.85 M TCEPバッファ (最終的なpHは2.5であった) を添加することによって、水素/重水素交換をクエンチした。その後、クエンチしたサンプルを、上記に記載されるようにオンカラムペプシン/プロテアーゼX I I I消化及びLC-MS分析に供した。質量スペクトルはMSのみのモードで記録した。

10

【0689】

MSの生データを、HDX Work Bench、H/D交換MSデータを分析するためのソフトウェアを使用して処理した (Pascal et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521)。重水素化ペプチドとその天然形態 (t0) との平均質量差を使用して、重水素レベルを算出した。タンパク質の約97~99%を特定のペプチドにマッピングすることができた。重水素ビルドアップ曲線は、ペプチドの交換時間にわたって、傾きにおいて有意な差を示した。

20

【0690】

TMEB570エピトープ：TMEW1は、残基235~249 (配列番号575に従って残基付番) で重水素取り込みのわずかな減少を示し、例えば、膜近位領域内の残基HGKCEHSINMQEPSC (配列番号592) は、TMEB570への結合時にH/D交換から保護されていた。

【0691】

TMEB675エピトープ：TMEW1は、残基252~268 (配列番号575に従って残基付番) で重水素取り込みのわずかな減少を示し、例えば、膜近位領域内の残基DAGYTGQHCEKKDYSVL (配列番号600) は、TMEB675への結合時にH/D交換から保護されていた。

30

【0692】

したがって、TMEB570 TMEFF2エピトープ残基は、HGKCEHSINMQEPSC (配列番号592) を包含し、TMEB675エピトープ残基は、DAGYTGQHCEKKDYSVL (配列番号600) を包含していた。両抗体は、膜近位領域内でTMEFF2に結合した。

【0693】

7-6 二重特異性TMEFF2 x CD3抗体の生成
 選択単一特異性抗TMEFF2及び抗CD3抗体 (実施例1~7を参照) を、IgG4 / として発現させた。F405L及びR409K置換 (EU付番) を抗CD3抗体に導入したが、抗TMEFF2抗体は野生型IgG4を有していた。位置405及び409における置換に加えて、IgG4 mAbは、S228P、F234A、及びL235A置換を有するように遺伝子操作された。

40

【0694】

単一特異性抗体を発現させ、プロテインAカラム (HiTrap Mab Select SuReカラム) を使用する標準的な方法を使用して精製した。溶出後、プールを、D-PBS、pH 7.2の中に透析した。

【0695】

50

国際公開第2011/131746号に記載の通り、インビトロF a bアーム交換において単一特異的TMEFF2 mAbと単一特異的CD3 mAbとを組み合わせることにより、二重特異性TMEFF2 x CD3抗体を生成した。簡潔に述べると、PBS、pH7~7.4中約1~20mg/の、モル比1:1の各抗体を75mMの2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)と一緒に混合し、25~37において2~6時間インキュベートし、続いて、標準的な方法を使用して透析、ダイアフィルトレーション、接線流濾過、及び/又はスピン細胞濾過により2-MEAを除去した。

【0696】

標準的な方法を用いて、残留親抗TMEFF2及び抗CD3抗体を最小化するために、疎水性相互作用クロマトグラフィーを用いてインビトロF a bアーム交換を行った後、二重特異性抗体を更に精製した。

10

【0697】

表73及び表74は、生成された二重特異性抗体を示す。

【0698】

【表68】

表73.

二重特異性抗体	親(TMEFF2アーム/ CD3アーム)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
TMCB132	TMEB675	582	584	587	18	588	22
	CD3B376	662	663	664	671	673	690
TMCB131	TMEB570	583	585	16	19	21	23
	CD3B376	662	663	664	671	673	690
TMCB150	TMEB762	582	584	587	18	588	603
	CD3B376	662	663	664	671	673	690

20

【0699】

【表69】

表74.

二重特異性抗体	親(TMEFF2アーム/ CD3アーム)	VH	VL	HC	LC
TMCB132	TMEB675	25	28	32	35
	CD3B376	652	661	640	676
TMCB131	TMEB570	589	29	33	36
	CD3B376	652	661	640	676
TMCB150	TMEB762	604	607	614	615
	CD3B376	652	661	640	676

30

【0700】

7-7 二重特異性TMEFF2 x CD3抗体の特性評価

分析超遠心分離(AUC)による純度分析

40

分析超遠心分離(AUC)によって、溶液中の巨大分子のサイズ、形状、凝集の状態、及び可逆的相互作用を決定することができる。沈降速度(SV)は、遠心分離スピンドルとして、サンプルホルダー(セル)の外半径に移動する巨大分子の濃度勾配を可能にするAUC技術である。これにより、分子のサイズ及び形状の要因である沈降係数の決定が可能になり、それは、各分子に固有である。Beckman Optima AUC機器をこの目的のために使用した。1.2cmのBeckmanセンターピース(50Krpmの速度に設定)及び石英窓を備える遠心セルにサンプルをロードした。細胞を集め、130lbまでトルクを与える。遠心セルを、An-50(8穴)又はAn-60(4穴)ローターに入れ、AUCチャンバ内に配置した。ランを開始する前に、チャンバ内のローターで少なくとも1時間、AUCの温度を20.5に平衡化した。スキャンカウント(250

50

スキャン)、スキャン収集の頻度(90秒)、データ分解能(10 μ M)、280nmの波長で、mAbサンプルについて40Krpmでランを実行した。直接境界フィッティングソフトウェアSEDANALを使用してデータを分析した。二重特異性抗体TMCB150及びその親mAbの純度を測定した。TMCB150は、AUCによって決定したとき、97.1%モノマー、2.8%ダイマーモノマーを示し、凝集を示さず、更なる生物物理的特性評価のために一過的に発現させた研究材料について許容可能な基準を満たした。TMEB762は、95.5%モノマー、4.5%ダイマーを示し、凝集は示さなかったが、一方、CD3B376は、97.7%モノマー及び2.2%ダイマーを示し、凝集は示さなかった。最低2段階精製された分子の>5%の凝集体レベルは、生物活性、溶解性、安定性、及び貯蔵寿命に有意な影響を及ぼし得る。

10

【0701】

DSCによる抗TMEFF2/CD3二重特異性物の配座安定性

TMCB150熱アンフォールディングをDSC(示差走査熱量測定)によって決定し、これは、アンフォールディング開始 $T_m = 52.6$ であり、 61.8 で第1の熱転移(T_{m1})、 67.6 で第2の熱転移(T_{m2})、及び 75.5 で第3の熱転移(T_{m3})を示した。上記の通りDSCによって評価した親抗体(抗TMEFF2、TMEB762、及び抗CD3、CD3B376)の熱転移プロファイルに基づいて、TMCB150の T_{m1} は、CD3B376 FABのアンフォールディングに対応し、TMCB150の T_{m3} は、TMEB762 Fabのアンフォールディング転移に対応する。

20

【0702】

血清安定性

ヒト血清成分に対する非特異的又はオフターゲット結合についてのリード候補の特性を評価するために、血清安定性アッセイを展開する。これにより、不十分な薬物動態及び生物分布特性を予測することができる。蛍光ベースのクロマトグラフィー法を使用して、TMCB150の結合及び安定性をバッファ及びヒト血清の両方において評価する。二重特異性抗体を、Alexa Fluor 488コンジュゲート(製造元の指示書に従ったInvitrogenキット)で標識し、4及び37で2日間、Hepesバッファ及びヒト血清(Sigma、カタログ番号H4522)中でインキュベートし、次いで、蛍光検出器を備えたAgilent HPLCシステムを用いてSEC-HPLCにより分析する。各ピークの曲線下面積の積分から凝集率を計算する。TMCB150は、時間ゼロにおいてHepesバッファ中で2.4%の凝集を示し、摂氏4度及び37度において2日後にそれぞれ2.0%及び1.3%の凝集を示した。ヒト血清において、TMCB150は、時間ゼロで1.7%の凝集、そして、摂氏4度及び37度の両方で2日後に1.1%の凝集を示した。

30

【0703】

非特異的結合

リード分子の、無関係な表面への非特異的結合を、バイオセンサー技術(Biacore 8K)によって決定する。無関係なタンパク質でコーティングされたSPR表面上に抗体を通過させる。抗体がこれらの無関係な表面に対して有意な結合を示す場合、その抗体は、インビボ特性が乏しく、製造上の問題を示すと予測される。リード分子を最終濃度1 μ Mで試験する。無関係な表面としては、負に帯電しているタンパク質(ダイズトリプシン阻害剤)、正に帯電しているタンパク質(リゾチーム及び-デフェンシン)、疎水性(Rh-インテグリンa4b7)、ヒトIgG、粘着性タンパク質(Rh-CD19)が挙げられる。この実験では、適切な対照を使用する。リードを2つの表面上に流し、一方はブランクであり、他方は直接固定化された分子を有する。試験表面RUからブランクRUを減じることによって、応答単位(RU)レベルを求める。TMCB150及び親mAbのRUを以下の表に示す。応答単位100は、帯電/疎水性/IgG表面への非特異的結合のリスクが高いことを予測し、これは、製造中に問題を生じさせ、PK特性が不十分であると解釈される。抗体のいずれも、無関係な表面に対する非特異的結合を示さず、このことから、製造及びインビボ挙動についてのリスクが低い、乃至無いと予測される

40

50

。【0704】

【表70】

表75.

	STI	B-デフェンシン- 3	ヒトIgG	リゾチーム	rh-インテグリン a4b7	rh-CD19
TMCB150	1.6	6.4	7.5	4.2	0	3.4
TMEB762	0	4.1	8.4	4.6	0	3.3
CD3B376	19.5	3.1	0.4	0.2	0	0

10

【0705】

高濃度安定性

注入体積を減少させて皮下投与を容易にするために、多くのモノクローナル抗体は高濃度（100 mg/mL）で製剤化される。加えて、全てのモノクローナル抗体は、精製プロセス中に一時的に高濃度（50 mg/mL）に曝される。したがって、高濃度安定性は、これらの分子の重要な品質属性である。30 kDa MWC膜を備えた遠心限外濾過装置を用いて濃縮を行う。最初に、5.1～5.3 mgの各タンパク質を同じ出発濃度に希釈し、15分間隔で4000×gで遠心分離した。各15分間の遠心分離段階の終了時に、濃縮器を遠心分離器から取り出し、残りのサンプル体積の視覚的推定値を記録する。SoloVPE機器によって濃度を測定する。濃縮したサンプルを4℃及び40℃で2週間インキュベートし、一定時間間隔でアリコートを引き出し、分析SECにより完全性を確認した。TMCB150及び親mAb（CD3B376及びTMEB762）は正常に濃縮された。TMCB150の最終濃度は99.4 mg/mLであり、親mAbの濃度は52.2 mg/mL（TMEB762）及び52.6 mg/mL（CD3B376）であった。濃度は4℃及び40℃で2週間同じままであり、これは、分子が、凝集の可能性もエッペンドルフチューブへの吸着の可能性もない、良好な内部特性を有することを示唆している。SECピークの積分から測定した種%（A：凝集体；M：モノマー；F：断片）を以下の表に提供する。高濃度では、40℃で2週間保管した後、分子はインタクトであり、凝集体は4～5%であり、断片は0.3%であり、このことから良好な貯蔵寿命が予測される。

20

30

【0706】

【表71】

表76.

	時間ゼロ			2週間、4℃			2週間、40℃		
	A	M	F	A	M	F	A	M	F
TMCB150	0.8	99.2	0	1.4	98.6	0	3.6	96.1	0.3
TMEB762	2.5	97.5	0	2.7	97.3	0	3.1	96.9	0
CD3B376	1.1	98.9	0	2.5	97.5	0	5.1	94.7	0.2

【0707】

動態排除アッセイ（KinExA）による抗TMEFF2/CD3二重特異性抗体の親和性決定

KinExA 3200機器（Sapidyne Instruments, Inc.）を使用して、二重特異性mAb TMCB150及びその二価TMEFF2親TMEB762 mAbの、ヒトTMEFF2細胞外ドメイン（ECD）に対する溶液平衡親和性 K_D を測定した。10 mM HEPES、150 mM NaCl、0.05%界面活性剤P20、pH 7.4、0.1% BSA、及び0.02% NaN₃中における一定濃度の抗TMEFF2 mAbを用いて、ヒトTMEFF2細胞外ドメイン（ECD）の連続希釈物を調製した。結合相互作用が平衡に達するまで、反応混合物をRTでインキュベートした。KinExAソフトウェアシミュレーションを使用して、インキュベーションの

40

50

継続時間を求めた。ビス - アクリルアミド / アズラクトンコポリマー (Pierce Biotechnology, Inc.) で構成されるプレ活性化ビーズにおけるアミンカップリングによる TMEFF2 - ECD の直接共有結合性固定化によって、ビーズを調製した。インキュベーション後、混合物を TMEFF2 修飾ビーズに通し、蛍光標識された二次抗体を使用して捕捉抗体を検出することによって、混合物中の遊離抗体を評価するために、サンプルを KinExA 機器で実験した。KinExA Pro ソフトウェアを使用して、データを 1 : 1 結合モデルにフィッティングさせた。

【0708】

【表72】

表77.

10

mAbサンプル	K_D pM	95% CI、 K_D pM
TMCB150	63.6	55.8~71.9
TMEB762	46.1	38.0~55.1

【0709】

抗 TMEFF2 / CD3 二重特異性抗体の N 末端 CD3 ペプチドに対する結合親和性の測定

Biacore 8K (GE Healthcare) 及び抗ヒト Fc バイオセンサー表面を使用して実施した SPR によって、反応速度定数を測定した。抗ヒト免疫グロブリン抗体を、CM4 センサチップ (GE Healthcare) の表面に共有結合させた。対象となる抗体を抗ヒト免疫グロブリンセンサチップ上に捕捉し、続いて、0.05% 界面活性剤 P20 (Tween (商標) 20) 及び 100 μ g / mL BSA を含有する HEPES 緩衝生理食塩水中に様々な濃度で N 末端 CD3 ペプチドを注入した。100 μ L / 分で 0.8% リン酸 30 μ L を 2 パルス注入して、表面を再生した。報告データは、捕捉抗体を含む流動細胞と、捕捉抗体を含まない参照細胞との間の SPR シグナルの差異である。基準 - 引算シグナル (reference-subtracted signal) からブランク注入のデータを引算することによって、シグナルに対する器具の追加の寄与を除去した。BIA Evaluation ソフトウェア (BIAcore, Inc.) を使用して全ての濃度 (グローバルフィット) における会合及び解離相を 1 : 1 結合モデルにフィッティングさせることにより、データを分析した。95% CI \times 標準偏差 / 反復の数の平方根の t 値によって計算される平均 + 95% CI (信頼間隔) として、データを報告する。

20

30

【0710】

【表73】

表78.

mAbサンプル	平均 k_{on} (1/Ms)	平均 k_{off} (1/s)	平均 K_D , nM	95% CI、 K_D pM
TMCB150	3.57E+04	1.03E-03	28.7	24.4-34.3
CD3B376	4.33E+04	1.17E-03	26.9	21.1-34.4

【0711】

7 - 8 二重特異性 TMEFF2 \times CD3 抗体は、前立腺癌細胞の T 細胞媒介性殺傷に効果的である。

40

前立腺癌細胞の T 細胞媒介性殺傷

選択二重特異性 TMEFF2 \times CD3 抗体を、前立腺癌細胞の T 細胞媒介性殺傷を媒介する能力について評価した。

【0712】

活性カスパーゼ 3 / 7 による蛍光基質の切断を介して細胞殺傷を間接的に測定するカスパーゼ細胞傷害アッセイを用いて、TMEFF2 \times CD3 二重特異性抗体の T 細胞媒介性殺傷を測定した。基質の切断により蛍光 DNA 色素が得られ、蛍光は細胞核に制限される。同じ座標でウェルを正確に撮像することができる電動式 10 倍対物レンズを使用して、

50

アッセイの全過程を通して各ウェルにおいて繰り返し蛍光測定を行う。規定のサイズ制限に基づいて及び/又は二次標識の使用を通して、標的細胞集団を特定する。

【0713】

冷凍した汎CD3⁺T細胞(Biological Specialty Corporation, Colmar, PA)を、正常健常ドナーから陰性選択によって単離した。TMEFF2を発現している前立腺癌細胞(LNCaP-AR)を、10% HIFBS+補給物(Life Technologies)を含むRPMI 1640中で培養した。T細胞及び標的細胞を、選択試薬なしで、フェノールレッド不含RPMI+10% FBS及び補給物(Life Technologies)中、3:1のエフェクター対標的比(E:T)で合わせ、製造元ガイドラインに従って細胞各1mLに対して0.6µLのNucViewカスパーゼ試薬(Essen Bioscience)を添加した。総体積0.1mLの細胞を、透明な96ウェル平底プレート(BD Falcon)の適切なウェルに添加した。TMEFF2×CD3二重特異性抗体を、上記のように調製したフェノールレッド不含RPMI中2×最終濃度で調製し、0.1mLの化合物を各ウェルに添加した。ウェルの縁部における細胞凝集を最小化するために室温で30分間インキュベートした後、37℃、5%CO₂で保持したZoom Incucyte機器(Essen Bioscience)にプレートを移した。

10

【0714】

Incucyteにおける処理の解像度は、製造ガイドラインに従って、試験される各細胞株に対して設計した。カスパーゼシグナルにおいてプラトーが観察され、続いて、最高濃度の試験化合物を含有するウェルにおける最大シグナルから3回以上の連続的な減少が観察されるまで、6時間ごとに測定を行った。

20

【0715】

アッセイが完了した後、適切な処理解像度を用いて各プレートを分析した。蛍光生データをIncucyte Zoomソフトウェアからエクスポートし、GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)にペーストした。GraphPadにおいて各ウェルの曲線下面積(AUC)を計算することによって、カスパーゼ3/7活性を求めた。Log10nM化合物の関数としてAUC値をプロットした。各用量曲線のEC50(ナノモル(nM))を、非線形回帰分析(4パラメータフィット、最小二乗)に従って報告した。各アッセイは、最低3つの生物学的複製物を含有しており、5人の健常ドナー由来のT細胞を使用して各細胞株を試験した。非線形回帰モデルを使用して、非臨床統計によってデータを更に分析した。

30

【0716】

二重特異性TMEFF2×CD3抗体は、インビボ前立腺癌腫瘍モデルにおいて効果的である。

【0717】

選択二重特異性抗体を、雄NSGマウスにおけるエクスビボLNCaP前立腺癌モデルで試験した。試験のために、0.2mL/動物の50%Cultrex中10⁶個のLNCaP細胞を、0日目に皮下注射により右側腹部に投与した。腫瘍が約100~150mm³の体積に達したときに動物を無作為化し、15日目に20⁶T細胞/マウスを腹腔内注入した。各群で10頭の動物を使用した。T細胞注射の1~3日後に、抗体による処理を開始した。抗体を週2回腹腔内投与した。投与前に、全ての動物にIVIG+Fcブロックを投与した。腫瘍が約1200mm³に達するまで、腫瘍体積及び体重を週2回評価した。処理群を表79に示す。これらのアッセイでは、CD3結合アームとHIV gp120に結合するヌルアームとを有するCD3×ヌル抗体を陰性対照として使用した。

40

【0718】

【表 7 4】

表 7 9.

群	処理	用量
1	CD3 × ヌル	5mg/kg
6	TMCB131 (TMEB570 × CD3B376)	5mg/kg
7	TMCB131 (TMEB570 × CD3B376)	0.5mg/kg
8	TMCB132 (TMEB675 × CD3B376)	5mg/kg
9	TMCB132 (TMEB675 × CD3B376)	0.5mg/kg

【0719】

表 8 0 は、腫瘍移植後の各群あたりの 3 8 日目の腫瘍増殖阻害率を示す。

10

【0720】

図 7 2 は、腫瘍移植後の経時的な平均腫瘍体積の減少を示す。図 7 3 は、0.05、0.1、又は 0.5 mg/kg の TMEB762 × CD3B376 で処理した各マウスの平均腫瘍体積の減少を示す。

【0721】

【表 7 5】

表 8 0.

処理	38日目の%TGI
CNT07008 (ヌル × CD3)	
TMCB132 (TMEB675 × CD3B376) 5mg/kg	48
TMCB132 (TMEB675 × CD3B376) 0.5mg/kg	47.7
TMCB131 (TMEB570 × CD3B376) 5mg/kg	23.3
TMCB131 (TMEB570 × CD3B376) 0.5mg/kg	35

20

【0722】

20e6個のT細胞でヒト化された雄 NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) マウスにおける、樹立された LNCaP 異種移植片において、TMEB762 × CD3B376 (TMCB150) の有効性も評価した。動物を、腫瘍移植後 13 日目に平均腫瘍体積によって各々 10 頭の動物群に無作為化した。0.5、0.1、及び 0.05 mg/kg の TMEB762 × CD3B376 又は 0.5 mg/kg の ヌル × CD3B376 抗体対照を、5 週間にわたって週 2 回 IP 投与した。腫瘍移植後 35 日目に、1 群あたり少なくとも 8 頭の動物が残っていた場合、腫瘍体積によって決定したときの腫瘍増殖阻害 (%TGI) を計算した。ヌル × CD3 対照と比較して統計的に有意な腫瘍増殖阻害は、0.5 及び 0.1 mg/kg の TMEB762 × CD3B376 では観察されたが、0.05 mg/kg では観察されなかった (図 7 3、p 0.0001)。ヌル × CD3 処理対照と比較して、0.5、0.1、及び 0.05 mg/kg の TMEB762 × CD3B376 は、それぞれ 110%、88%、及び 25% の腫瘍増殖阻害を惹起した。TMEB762 × CD3B376 処理の結果、それぞれ 0.5 及び 0.1 mg/kg で 7 及び 3 頭の完全奏功が得られた。皮下 LNCaP 腫瘍を週 2 回キャリパーで測定し、結果を平均腫瘍体積 (mm³) ± SEM (1 群あたり 8 頭のマウスが残っていた) として提示した。

30

40

【0723】

TMCB132 の投与に应答した T 細胞活性化

Lncap 前立腺癌細胞における T 細胞活性化を、フローサイトメトリーによって、具体的には、TMCB132 による処理の 72 時間後に、6 人の別個の正常な健常ドナー (9642、9672、9762、9772、9832、9852) における CD3+ / CD8+ T 細胞の CD25 陽性を評価することによって測定した (図 7 4)。Lncap 前立腺癌細胞に対する TMCB132 の投与に应答して、3 : 1 エフェクター : 標的比で添加された CD3+ 汎 T 細胞の活性化が観察された。

50

【0724】

インビトロにおけるTMCB132のT細胞媒介細胞傷害。

T細胞媒介性細胞傷害アッセイを使用して、Incucyteプラットフォームでライブタイムラプスイメージングを使用して、インビトロにおけるTMCB132の細胞傷害能を評価した。3:1の(エフェクター:標的)エフェクター:標的比(E:T比)で、健常ドナー由来の単離汎ヒトCD3+T細胞の存在下で、TMEFF2陽性細胞株LnCaPにおいてTMCB132を試験した。96時間の期間にわたって活性カスパーゼ3/7の蛍光シグナルを測定することによって、アポトーシスによる細胞死をモニタリングした。TMCB132は、時間の経過とともに、生存LnCaP細胞の減少を用量依存的に促進した。カスパーゼ3/7活性又は蛍光シグナルの用量依存的増加は、T細胞の存在下でLnCaP細胞における細胞死を示した(図75)。データは、TMCB132が、LnCaP腫瘍細胞においてT細胞媒介死を誘導するのに効果的であることを示唆している。

10

【0725】

T細胞ヒト化マウスにおける樹立されたSCヒト前立腺異種移植片におけるTMCB132の有効性。

TMCB132の抗腫瘍有効性を、 2×10^6 個のT細胞でヒト化された雄NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)マウスの樹立された皮下(SC)ヒト前立腺LnCaP異種移植片において評価した。動物を、腫瘍移植後13日目に平均腫瘍体積によってそれぞれ10頭の動物群に無作為化した。0.5、0.1、及び0.05mg/kgのTMEB132又は0.5mg/kgのヌル×CD3B219抗体対照を、4週間にわたって週2回IP投与した。腫瘍移植後45日目に、1群あたり少なくとも7頭の動物が残っていた場合、腫瘍体積によって決定したときの腫瘍増殖阻害(%TGI)を計算した。ヌル×CD3対照と比較して統計的に有意な腫瘍増殖阻害は、0.5及び0.1及び0.05mg/kgのTMEB132で観察された(図75、p0001)。ヌル×CD3処理対照と比較して、0.5、0.1、及び0.05mg/kgのTMEB132は、それぞれ102%、109%、及び47%の腫瘍増殖阻害を惹起した。TMEB132処理の結果、それぞれ0.5、0.1及び0.05mg/kgで3、2、及び1頭の完全奏功が得られた。

20

30

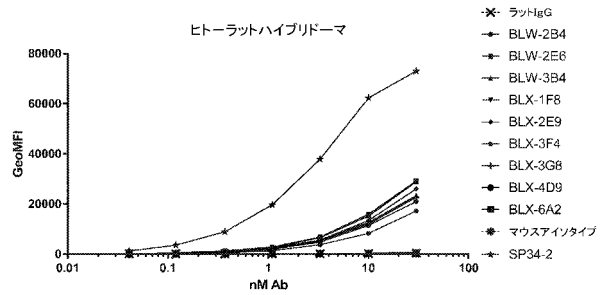
【 図 1 A 】

VH	1	50
BLW-2B4- γ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
BLW-3B4- γ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-1F8- γ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-3G8- γ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-3F4- γ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
BLW-2E6- γ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-2E9- γ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
IGHV6-1*01_ホモ	(1) QVQLQSGPGLVLPKPSQILSLTCAISGDSVFNNAAMSWIRQSPSRGLEWL	
	CDR1	
	51	100
BLW-2B4- γ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
BLW-3B4- γ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
BLX-1F8- γ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
BLX-3G8- γ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
BLX-3F4- γ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
BLW-2E6- γ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
BLX-2E9- γ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
IGHV6-1*01_ホモ	(51) GRYYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDIALYYCV	
	CDR2	
	101	120
BLW-2B4- γ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
BLW-3B4- γ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
BLX-1F8- γ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
BLX-3G8- γ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
BLX-3F4- γ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
BLW-2E6- γ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
BLX-2E9- γ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
IGHV6-1*01_ホモ	(101) RGYSSSEFDYWGQGITLVTVSS	
	CDR3	

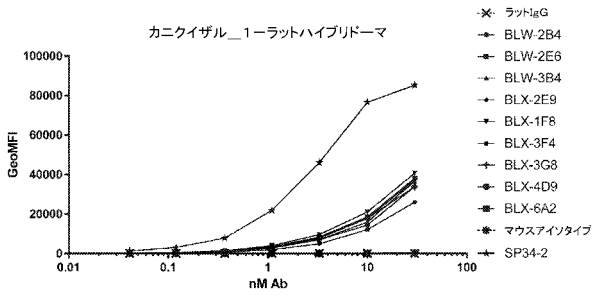
【 図 1 B 】

VL	1	50
BLW-2B4- λ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
BLW-3B4- λ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
BLX-1F8- λ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
BLW-2E6- λ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
BLX-2E9- λ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
BLX-3F4- λ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
BLX-3G8- λ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
IGLV2-23*02_ホモ	(1) QSALTQPAVSGSGPGQSITISCTGTSRDITGTYKRVSWYQQHPKAPKRVLL	
	CDR1	
	51	100
BLW-2B4- λ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLW-3B4- λ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-1F8- λ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLW-2E6- λ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-2E9- λ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-3F4- λ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-3G8- λ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
IGLV2-23*02_ホモ	(51) YEVSRRPFGVSSRFSGSKSGNTASLTIISGLQAEQDQADYHCCSYAGSGTLL	
	CDR2	
	101	
BLW-2B4- λ	(101) FGGGKLTIVL	
BLW-3B4- λ	(101) FGGGKLTIVL	
BLX-1F8- λ	(101) FGGGKLTIVL	
BLW-2E6- λ	(101) FGGGKLTIVL	
BLX-2E9- λ	(101) FGGGKLTIVL	
BLX-3F4- λ	(101) FGGGKLTIVL	
BLX-3G8- λ	(101) FGGGKLTIVL	
IGLV2-23*02_ホモ	(101) FGGGKLTIVL	
	CDR3	

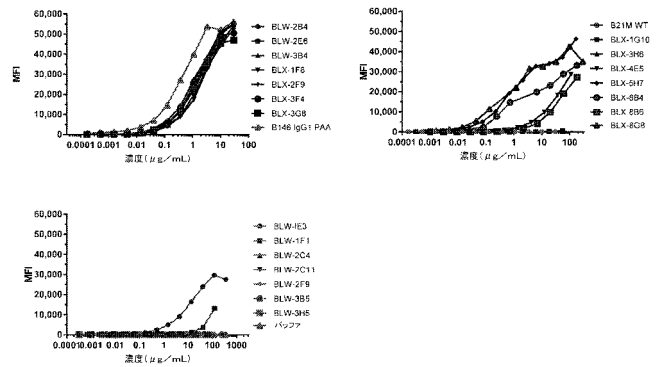
【 図 2 】



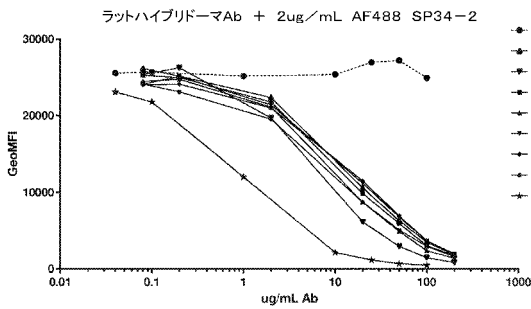
【 図 3 】



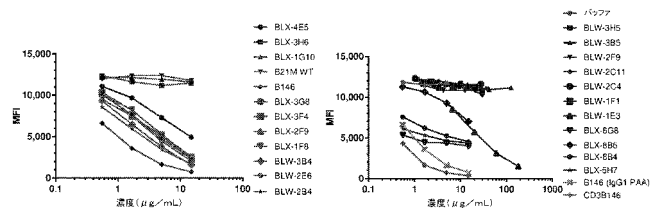
【 図 5 】



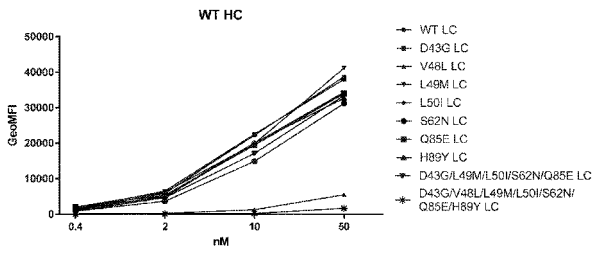
【 図 4 】



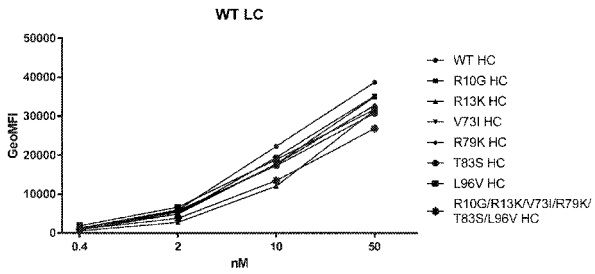
【 図 6 】



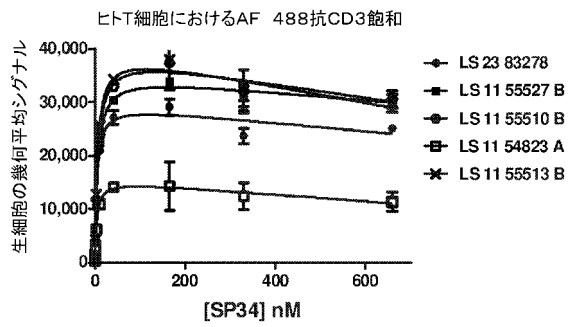
【 図 7 】



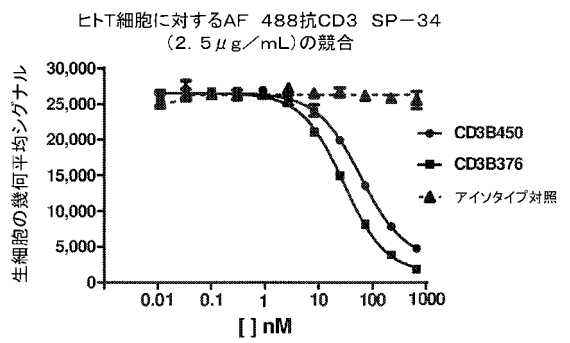
【 図 8 】



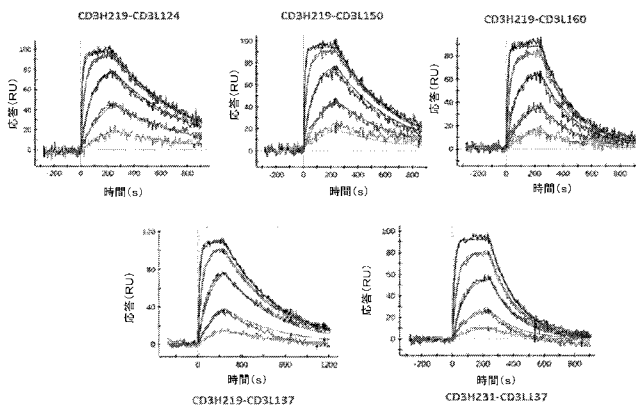
【 図 9 】



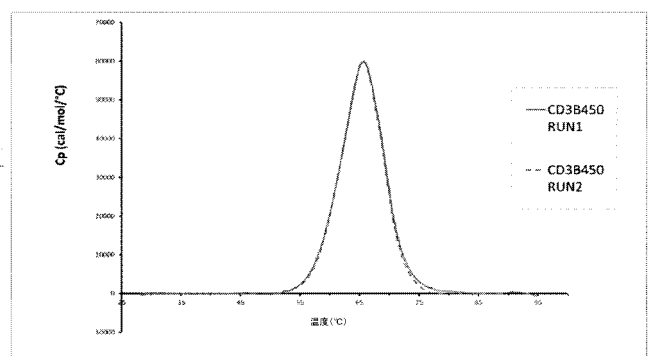
【 図 10 】



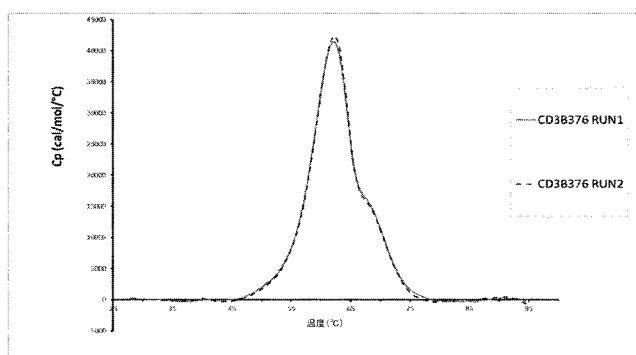
【 図 11 】



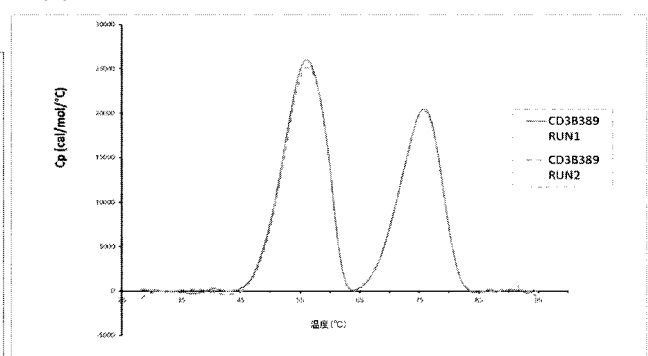
【 図 12 B 】



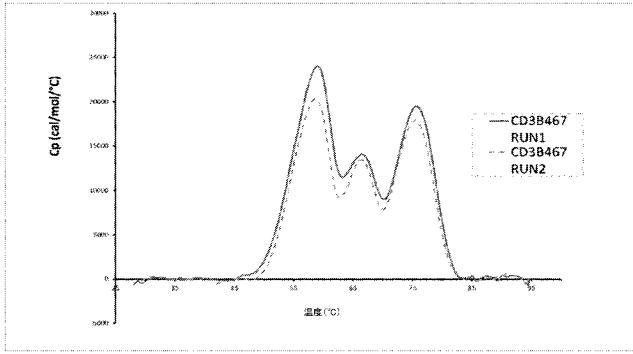
【 図 12 A 】



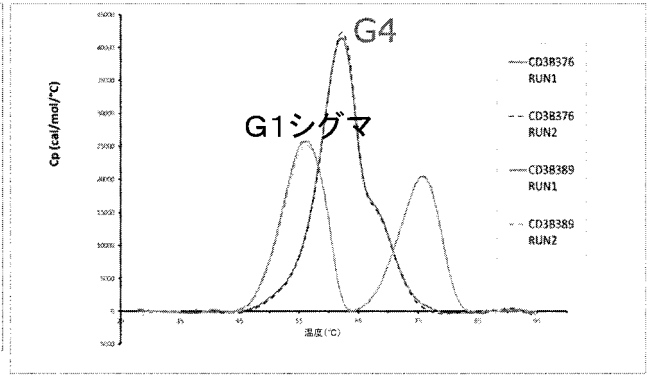
【 図 12 C 】



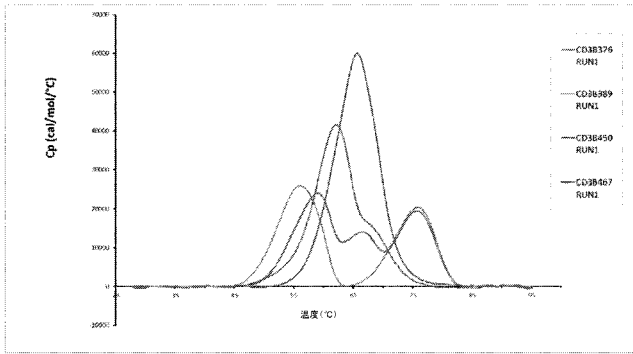
【 図 1 2 D 】



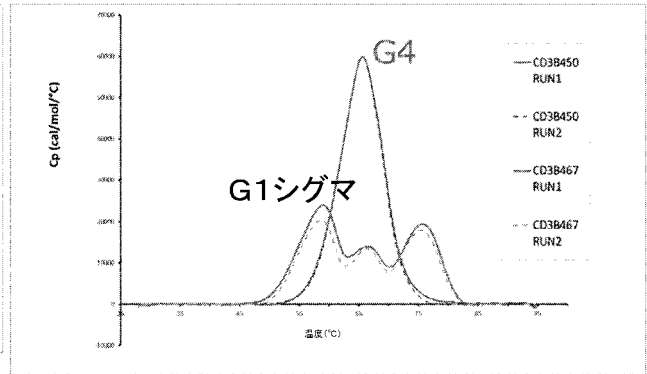
【 図 1 3 A 】



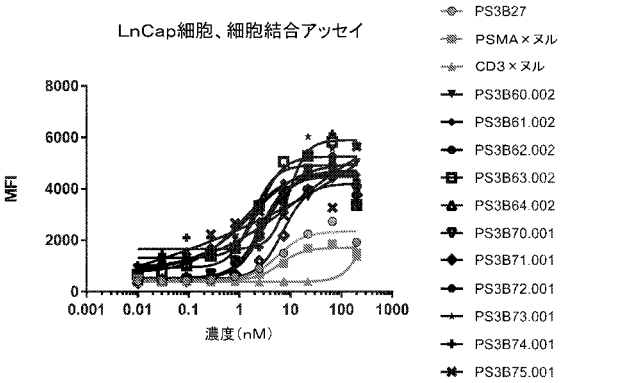
【 図 1 2 E 】



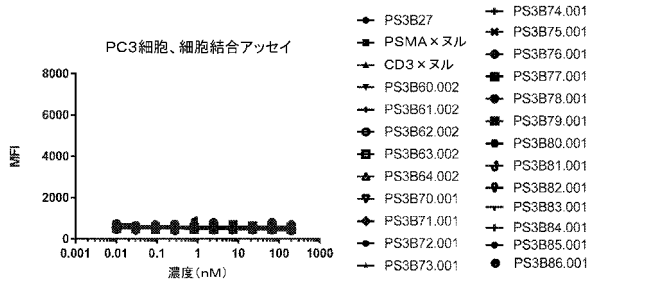
【 図 1 3 B 】



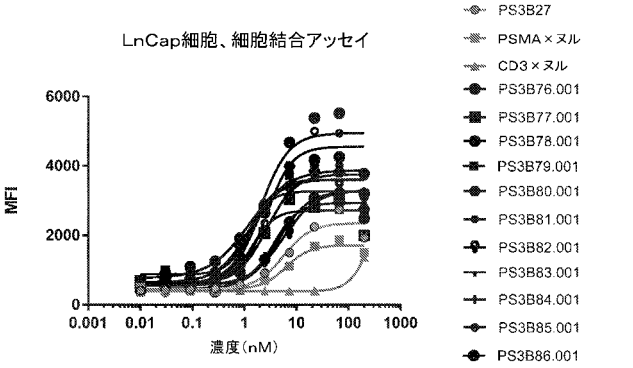
【 図 1 4 】



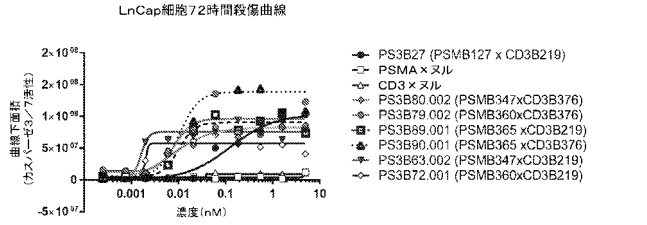
【 図 1 6 】



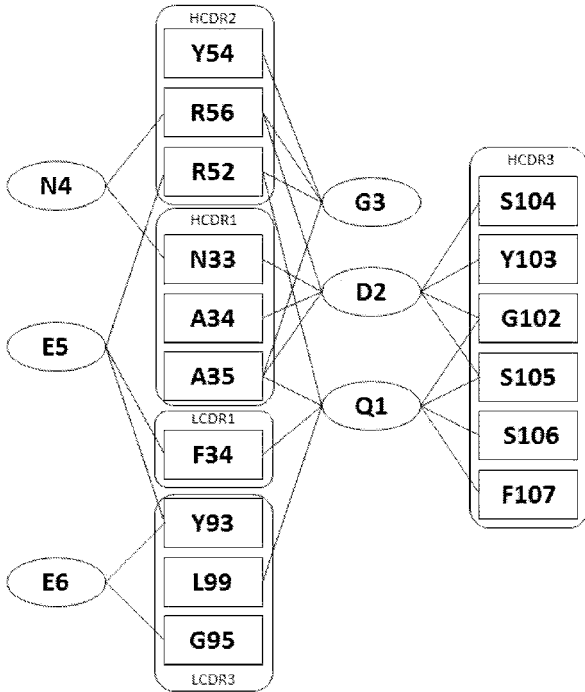
【 図 1 5 】



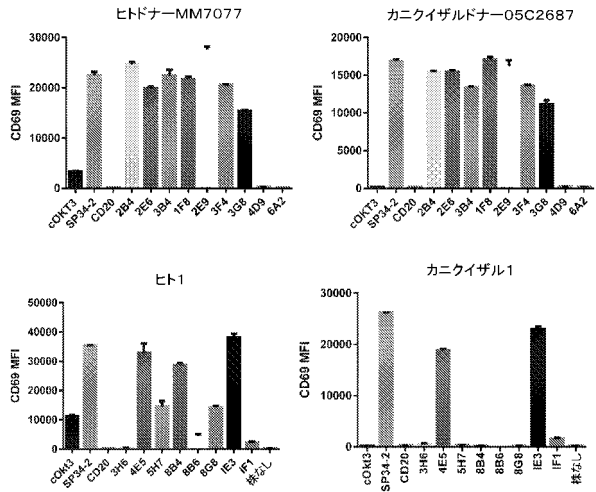
【 図 1 7 】



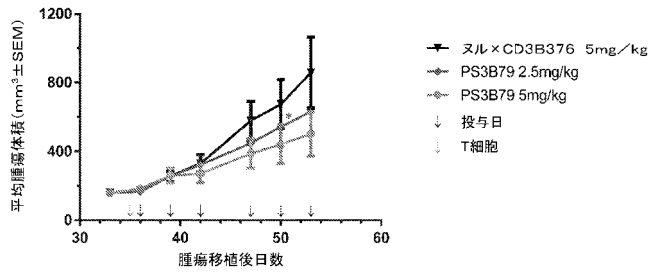
【 図 19 】



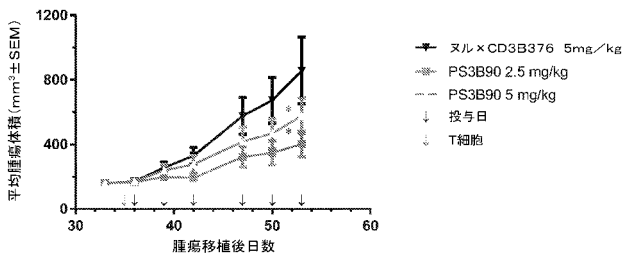
【 図 20 】



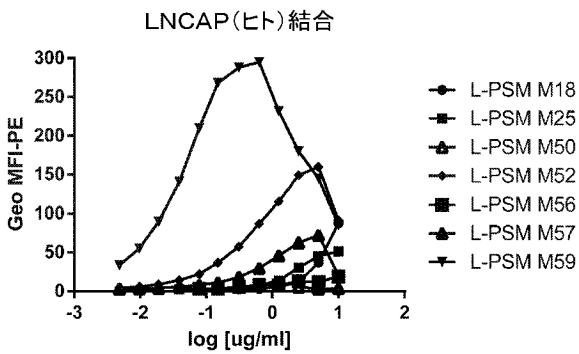
【 図 21 】



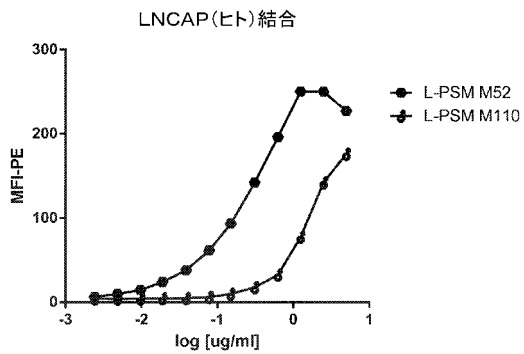
【 図 22 】



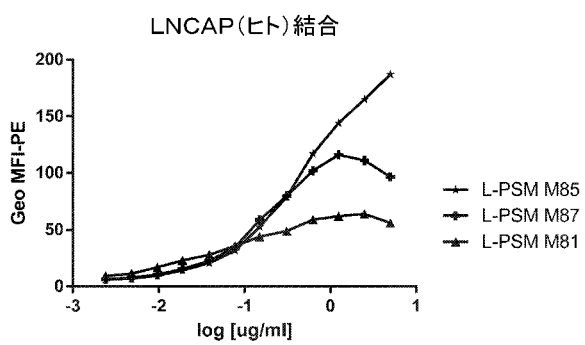
【 図 23 A 】



【 図 23 B 】

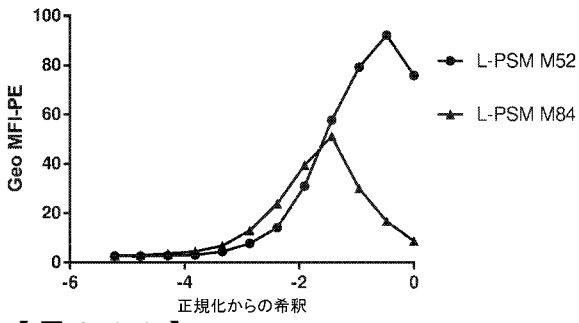


【 図 23 C 】



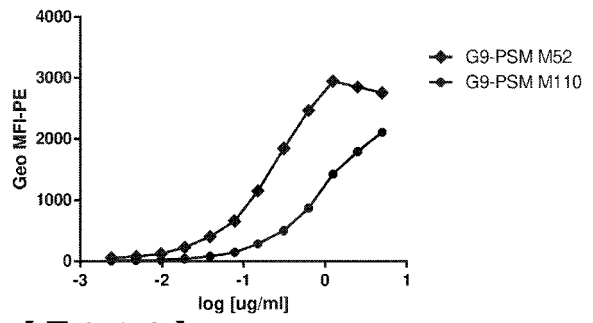
【 図 2 3 D 】

LNCAP(ヒト)結合



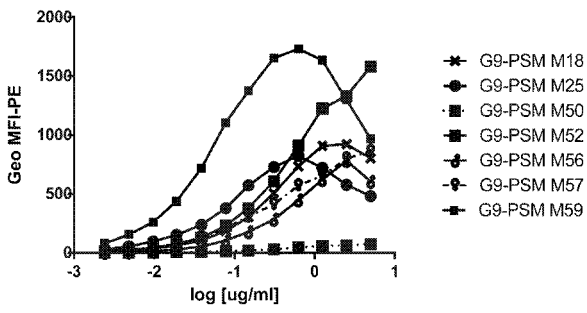
【 図 2 4 B 】

PSMG9(チンパンジー)結合



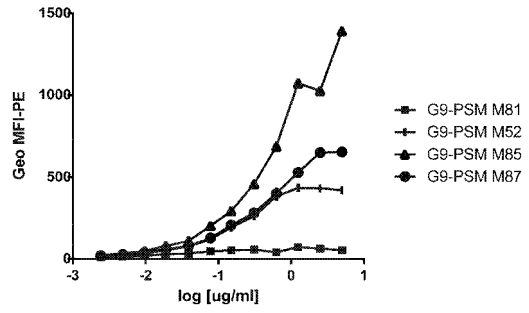
【 図 2 4 A 】

PSMG9(チンパンジー)結合



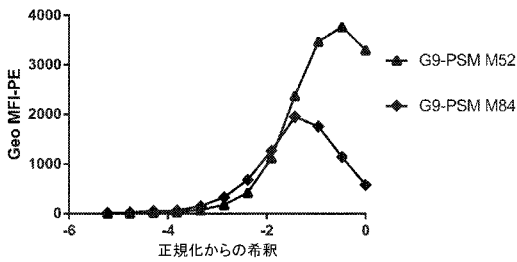
【 図 2 4 C 】

PSMG9(チンパンジー)結合



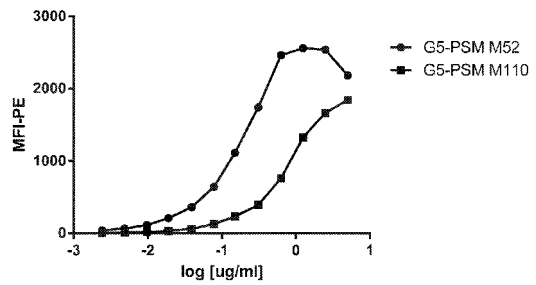
【 図 2 4 D 】

PSMG9(チンパンジー)結合



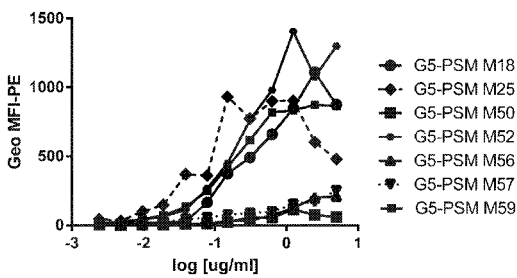
【 図 2 5 B 】

PSMG5(カニクイザル)結合



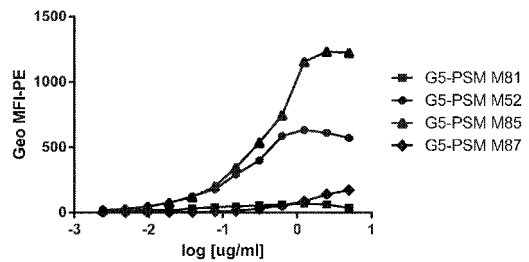
【 図 2 5 A 】

PSMG5(カニクイザル)結合

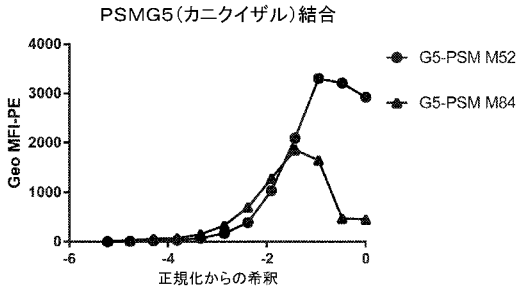


【 図 2 5 C 】

PSMG5(カニクイザル)結合

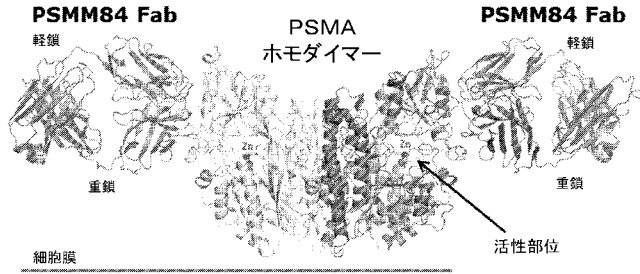


【 図 2 5 D 】

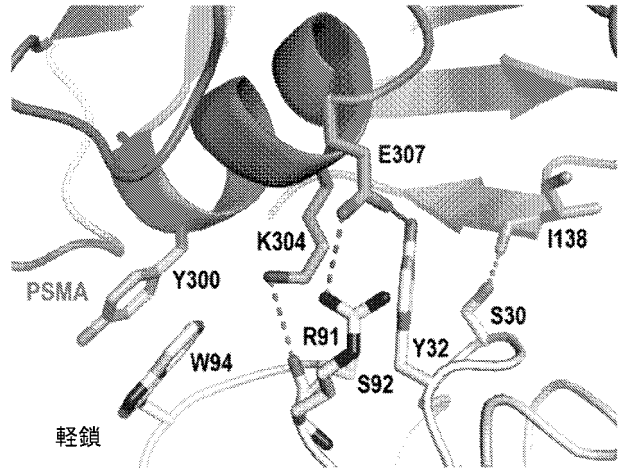


【 図 2 6 】

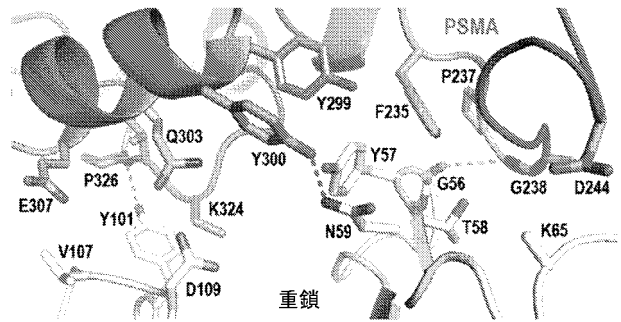
PSMAに結合しているPSMM84 Fabの全体構造



【 図 2 7 】



【 図 2 8 】



【 図 2 9 】

PSMM84のエピトープ残基

ヒPSMA	(11)	NKLLHETDSAYLAKRFRGAGALVLAGSPVLLDFQNFIRSSNEAI-NCTPKDKMKAFLULKAKAIDKFKLNYETGLPHLAGDQRQQL
マウスPSMA	(11)	NKDAQQRLSAPLGGKQKRVYSYLVDAIIGPLIGKQKQNFIPISSEAIQVYSHGGRKFRFLKAKAIDKFKLNYETGLPHLAGDQAFEL
cynoPSMA	(11)	NKLLHETDSAYLAKRFRGAGALVLAGSPVLLDFQNFIRSSNEAI-NCTPKDKMKAFLULKAKAIDKFKLNYETGLPHLAGDQRQQL
ヒPSMA	(53)	AKGLQSKQKRFGLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
マウスPSMA	(53)	AKGLQSKQKRFGLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
cynoPSMA	(53)	AKGLQSKQKRFGLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
ヒPSMA	(187)	KLKRRKMLICGDFVLIWAKYQYKRVGKKNAGLAKGAVLYLSDYDVFQKASVITLQGNLFGQVQGVQVLIIGLADQDPLTQVWANKYVYK
マウスPSMA	(187)	KLKRRKMLICGDFVLIWAKYQYKRVGKKNAGLAKGAVLYLSDYDVFQKASVITLQGNLFGQVQGVQVLIIGLADQDPLTQVWANKYVYK
cynoPSMA	(187)	KLKRRKMLICGDFVLIWAKYQYKRVGKKNAGLAKGAVLYLSDYDVFQKASVITLQGNLFGQVQGVQVLIIGLADQDPLTQVWANKYVYK
ヒPSMA	(281)	NSLAAKVCLEGLVYHFLVYDQKLEKCGSAPFLSSKNSKVVYVAVGQKTSVFTQVEMHISQENLYKILVYIGLADQDPLTQVWANKYVYK
マウスPSMA	(281)	NSLAAKVCLEGLVYHFLVYDQKLEKCGSAPFLSSKNSKVVYVAVGQKTSVFTQVEMHISQENLYKILVYIGLADQDPLTQVWANKYVYK
cynoPSMA	(281)	NSLAAKVCLEGLVYHFLVYDQKLEKCGSAPFLSSKNSKVVYVAVGQKTSVFTQVEMHISQENLYKILVYIGLADQDPLTQVWANKYVYK
ヒPSMA	(375)	QSHRQDQVQGLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
マウスPSMA	(375)	QSHRQDQVQGLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
cynoPSMA	(375)	QSHRQDQVQGLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
ヒPSMA	(465)	LWVQKMLVYKRLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
マウスPSMA	(465)	LWVQKMLVYKRLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
cynoPSMA	(465)	LWVQKMLVYKRLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
ヒPSMA	(563)	KRFYDQRKHLVAVQVGGVYELANSILVLPFDQVAVLVKVDATYSISRRHPGEMVYDVSFDSLSAVKQTEFAKFSKRLQDQKLS
マウスPSMA	(563)	KRFYDQRKHLVAVQVGGVYELANSILVLPFDQVAVLVKVDATYSISRRHPGEMVYDVSFDSLSAVKQTEFAKFSKRLQDQKLS
cynoPSMA	(563)	KRFYDQRKHLVAVQVGGVYELANSILVLPFDQVAVLVKVDATYSISRRHPGEMVYDVSFDSLSAVKQTEFAKFSKRLQDQKLS
ヒPSMA	(657)	NFYVYKRLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
マウスPSMA	(657)	NFYVYKRLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF
cynoPSMA	(657)	NFYVYKRLDQKLAHYVLLSYNPTTRKFFYSIINLQWRFAVLSLPPRFQYVAVYSLVPPFAFPPQDQPDQVLYVYKRTGTF

斜字はヒトエピトープ残基である。斜線の欄を下線で示す。

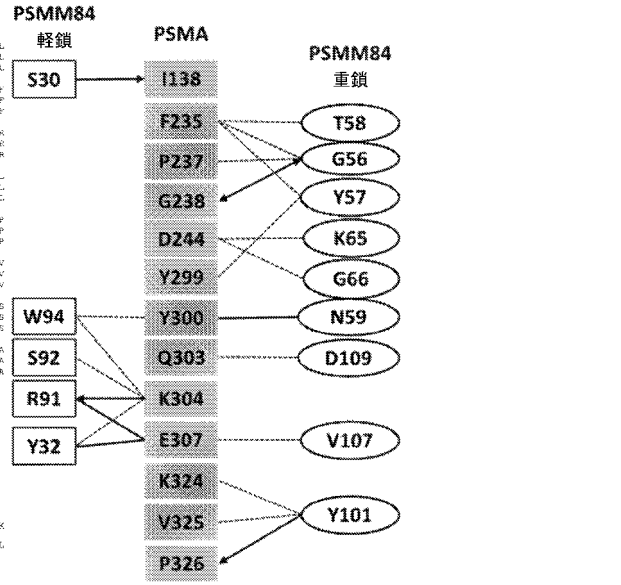
【 図 3 0 】

PSMM84のハラトープ残基

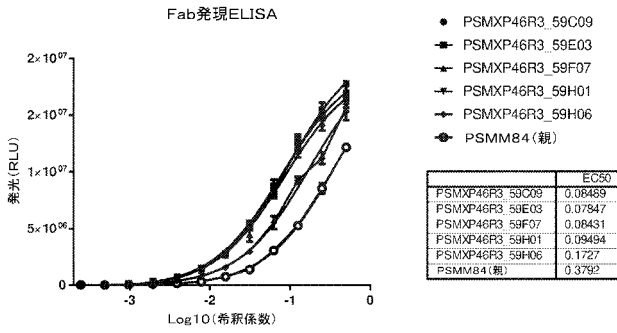
PSMM84のハラトープ	(1)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASQEFIFKSDAHHWVQAPQKGLKLVYISGSGGVYVADSVKGRFTISRDNK
PSMM84_HC	(77)	NTLYLQMSLRLEDVAVYCARDSSLYVDFYDYGQGLTVTVSSATKQFVFFLAPSSKSTSOCTAAIGCL
PSMM84_HC	(153)	WVQVFPFVTVSRNKGALTSGVHTFAVLIQSSLYLSSVYVFPSSSLGDTQYTIQNNKPSNTKDKVKVEPKSC
PSMM84_LC	(1)	EIVLTQSFATLSLSPGERATLSCASQSSVYVADSVKGRFTISRDNK
PSMM84_LC	(73)	LTLSLSEPEDFAVYVQGLKLVYISGSGGVYVADSVKGRFTISRDNK
PSMM84_LC	(145)	KVQNKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSFYSLSLTLTSLKADYERKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNREGC

下線はCDR領域であり、斜字はハラトープ残基である。

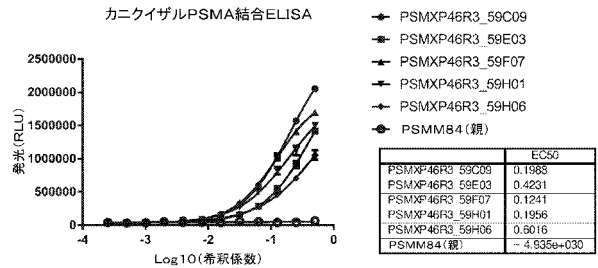
【 図 3 1 】



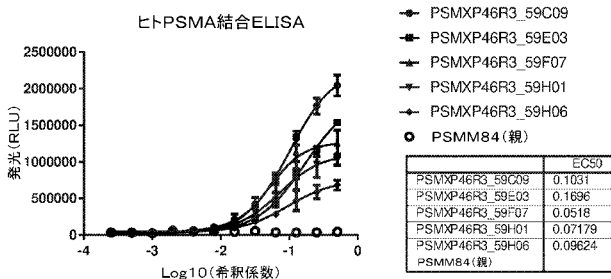
【 図 3 2 】



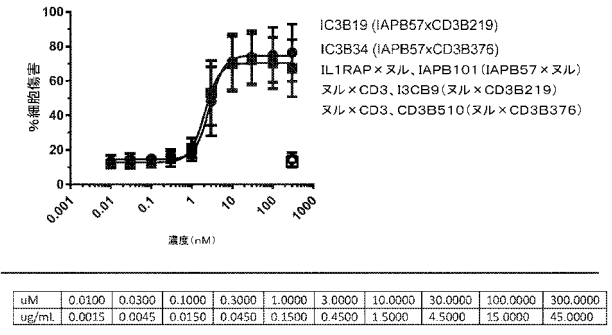
【 図 3 4 】



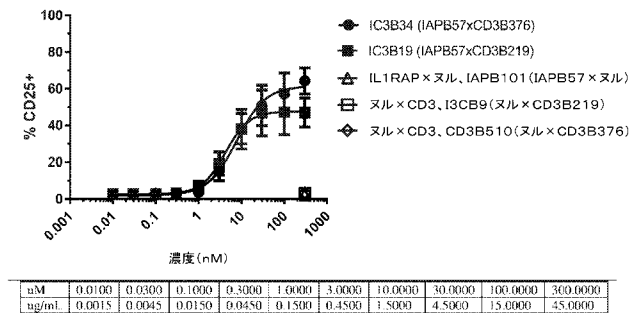
【 図 3 3 】



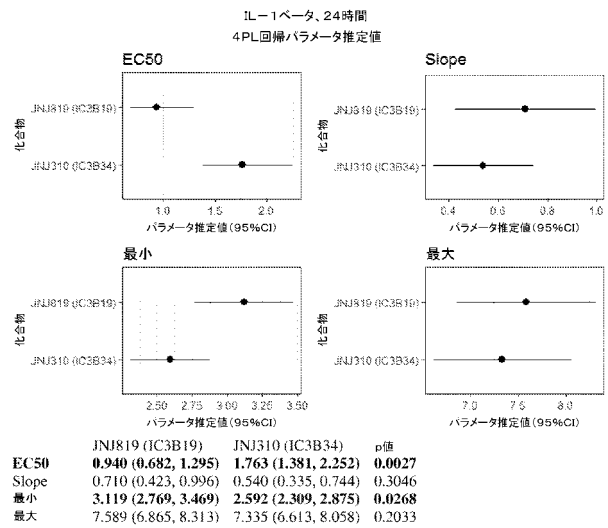
【 図 3 5 】



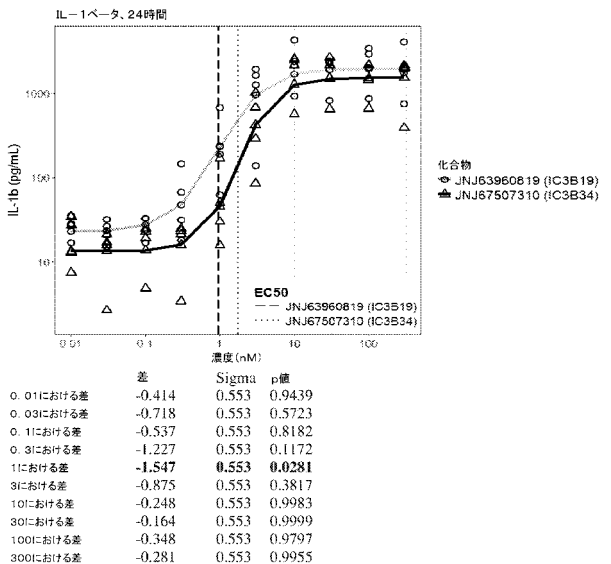
【 図 3 6 】



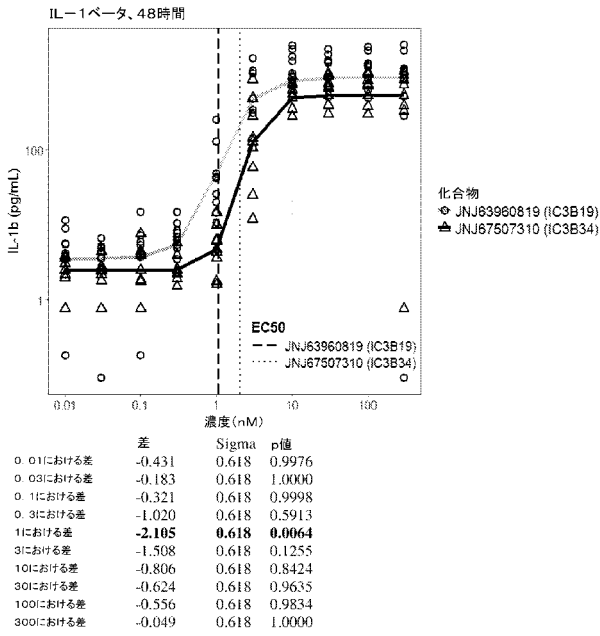
【 図 3 7 B 】



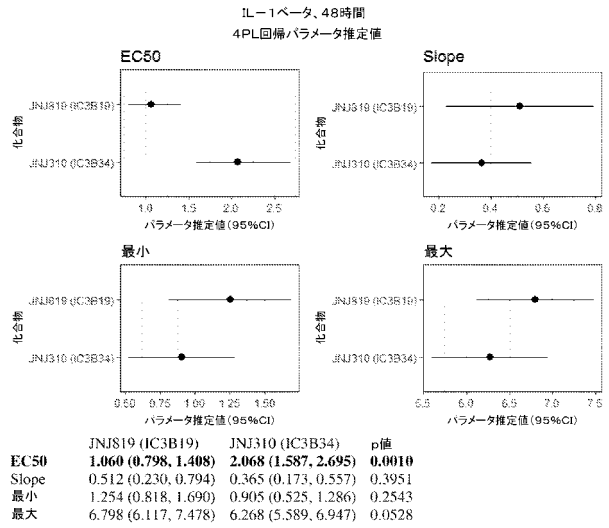
【 図 3 7 A 】



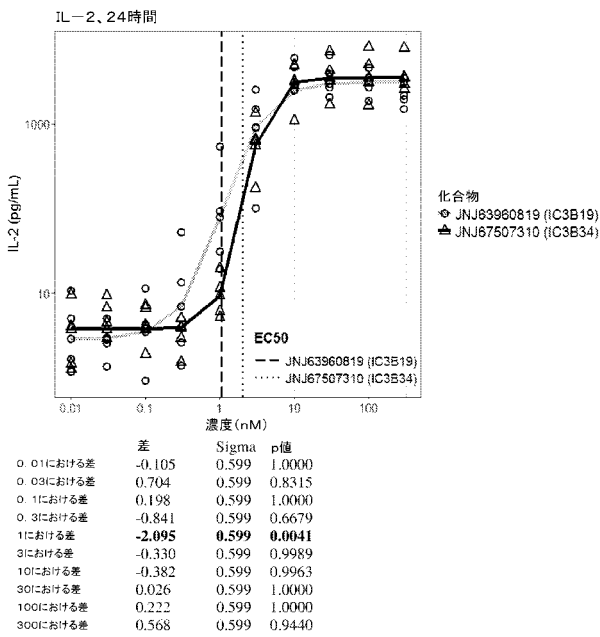
【図38A】



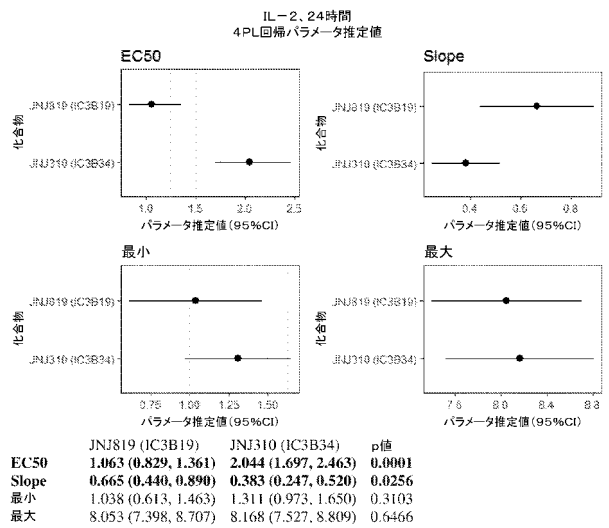
【図38B】



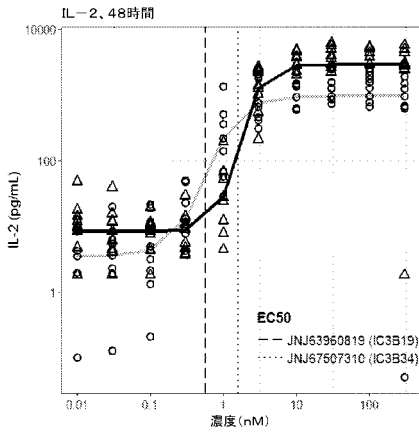
【図39A】



【図39B】

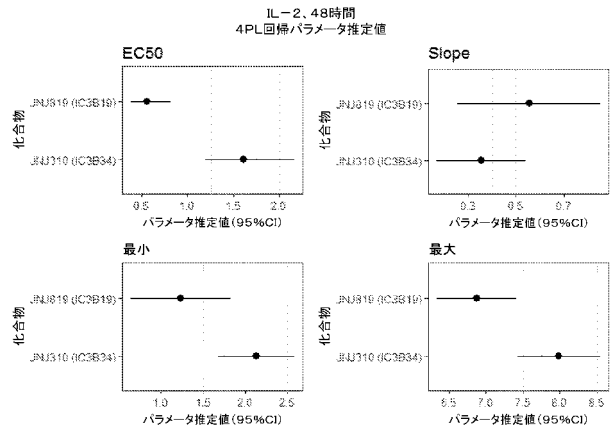


【図40A】



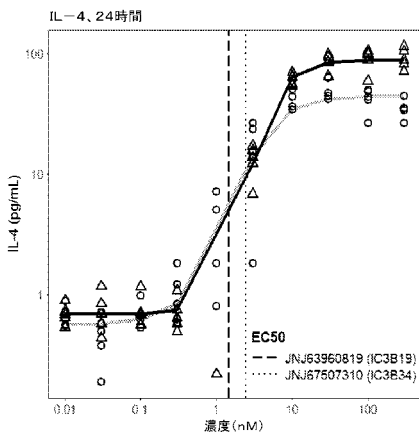
	差	Sigma	p値
0.01における差	0.928	0.676	0.8169
0.03における差	0.859	0.676	0.8755
0.1における差	0.737	0.676	0.9485
0.3における差	-0.567	0.676	0.9917
1における差	-1.950	0.676	0.0370
3における差	0.372	0.676	0.9998
10における差	0.954	0.676	0.7914
30における差	0.987	0.676	0.7576
100における差	1.066	0.676	0.6693
300における差	1.488	0.676	0.2289

【図40B】



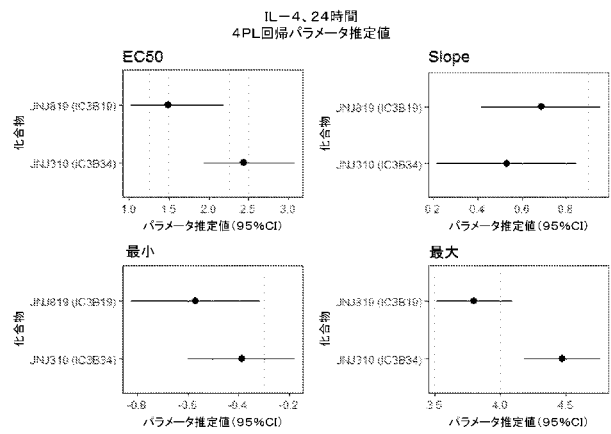
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p値
EC50	0.558 (0.380, 0.821)	1.611 (1.199, 2.166)	Sig.
Slope	0.554 (0.256, 0.851)	0.353 (0.168, 0.539)	0.2079
最小	1.231 (0.638, 1.824)	2.129 (1.674, 2.584)	0.0158
最大	6.874 (6.327, 7.421)	7.988 (7.425, 8.551)	0.0008

【図41A】



	差	Sigma	p値
0.01における差	-0.010	0.301	1.0000
0.03における差	0.563	0.301	0.3761
0.1における差	0.110	0.301	1.0000
0.3における差	-0.361	0.301	0.8592
1における差	0.081	0.301	1.0000
3における差	0.253	0.301	0.9815
10における差	0.439	0.301	0.6850
30における差	0.780	0.301	0.0749
100における差	1.031	0.301	0.0054

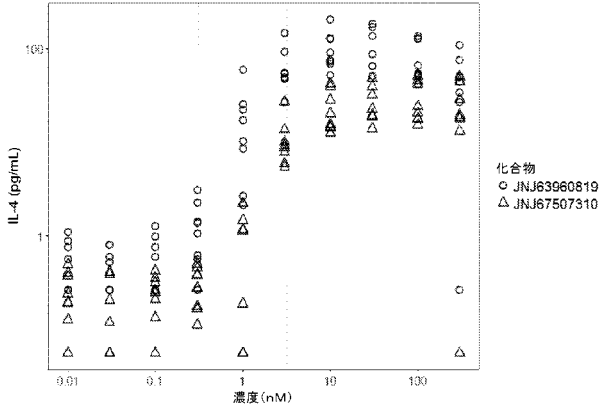
【図41B】



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p値
EC50	1.493 (1.016, 2.192)	2.440 (1.932, 3.081)	0.2415
Slope	0.686 (0.416, 0.957)	0.532 (0.214, 0.849)	0.4668
最小	-0.570 (-0.827, -0.313)	-0.387 (-0.598, -0.176)	0.2942
最大	3.799 (3.510, 4.088)	4.476 (4.183, 4.769)	0.0043

【 図 4 2 】

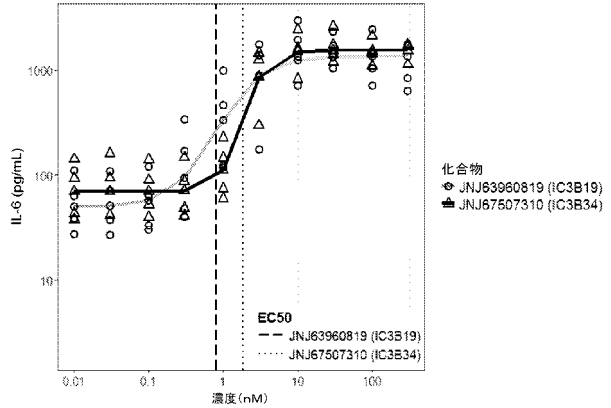
IL-4、Log10スケールでの48時間応答



	差	Sigma	p値
0.01における差	-0.756	0.474	0.6568
0.03における差	-0.882	0.474	0.4482
0.1における差	-0.795	0.474	0.5915
0.3における差	-1.337	0.474	0.0454
1における差	-3.54	0.474	<0.0001
3における差	-1.786	0.474	0.0016
10における差	-1.504	0.474	0.0146
30における差	-1.329	0.474	0.0475
100における差	-1.043	0.474	0.2301
300における差	-0.831	0.474	0.5305

【 図 4 3 A 】

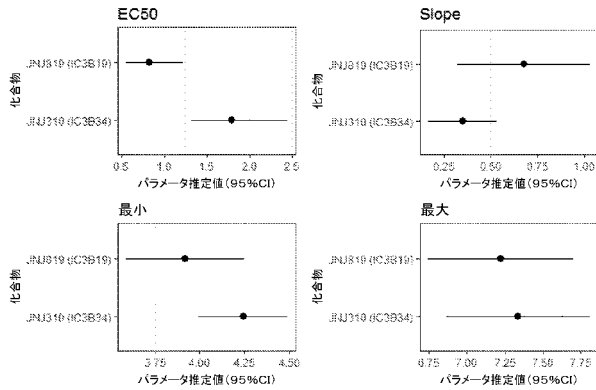
IL-6、24時間



	差	Sigma	p値
0.01における差	0.263	0.456	0.9990
0.03における差	0.302	0.456	0.9970
0.1における差	0.304	0.456	0.9968
0.3における差	-0.367	0.456	0.9866
1における差	-0.962	0.456	0.2340
3における差	-0.059	0.456	1.0000
10における差	-0.037	0.456	1.0000
30における差	0.056	0.456	1.0000
100における差	0.156	0.456	1.0000
300における差	0.314	0.456	0.9958

【 図 4 3 B 】

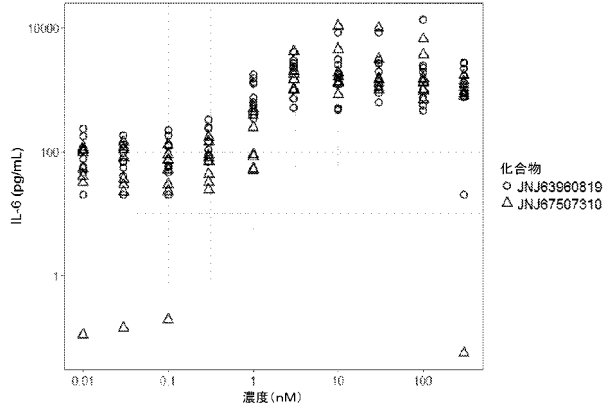
IL-6、24時間
4PL回帰パラメータ推定値



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p値
EC50	0.821 (0.549, 1.229)	1.796 (1.320, 2.444)	0.0819
Slope	0.678 (0.324, 1.031)	0.349 (0.162, 0.536)	0.1151
最小	3.917 (3.582, 4.252)	4.243 (3.993, 4.493)	0.5224
最大	7.221 (6.742, 7.700)	7.337 (6.865, 7.808)	

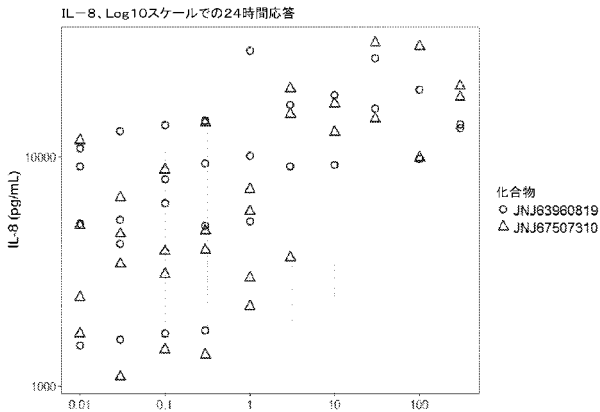
【 図 4 4 】

IL-6、Log10スケールでの48時間応答



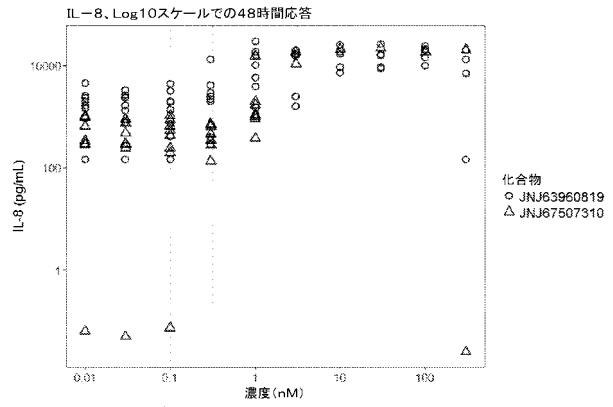
	差	Sigma	p値
0.01における差	-0.948	0.698	0.8438
0.03における差	-0.875	0.698	0.8982
0.1における差	-1.071	0.698	0.7261
0.3における差	-0.811	0.698	0.9349
1における差	-1.724	0.698	0.1254
3における差	-0.090	0.698	1.0000
10における差	0.207	0.698	1.0000
30における差	-0.061	0.698	1.0000
100における差	-0.001	0.698	1.0000
300における差	-1.001	0.698	0.7966

【 図 4 5 】



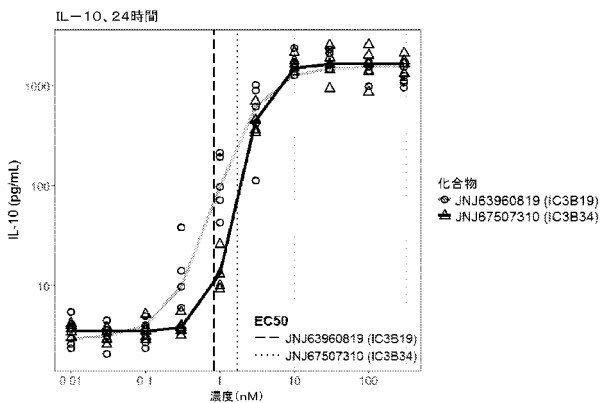
	差	Sigma	p値
0.01における差	-0.285	0.560	0.9985
0.03における差	-0.349	0.560	0.9927
0.1における差	-0.512	0.560	0.9192
0.3における差	-0.299	0.560	0.9977
1における差	-1.276	0.576	0.1433
3における差	-0.311	0.621	0.9986
10における差	0.158	0.649	1.0000
30における差	0.062	0.649	1.0000
100における差	0.259	0.649	0.9998
300における差	0.386	0.649	0.9948

【 図 4 6 】



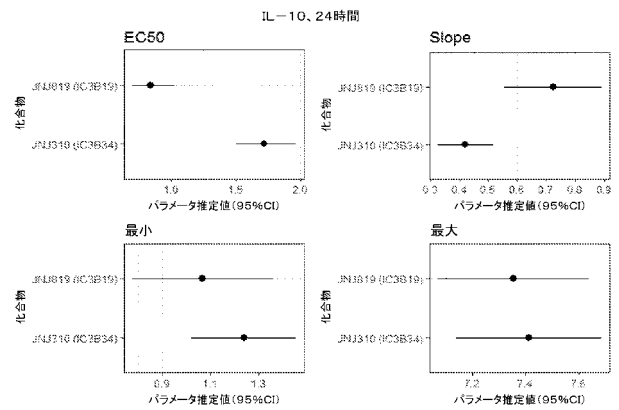
	差	Sigma	p値
0.01における差	-2.073	1.303	0.3365
0.03における差	-2.198	1.303	0.2873
0.1における差	-1.972	1.303	0.3811
0.3における差	-2.753	1.309	0.1302
1における差	-2.650	1.309	0.1533
3における差	-0.834	1.419	0.9715
10における差	-0.880	1.551	0.9766
30における差	-0.819	1.551	0.9847
100における差	-1.189	1.551	0.8961
300における差	-1.909	1.445	0.5029

【 図 4 7 A 】



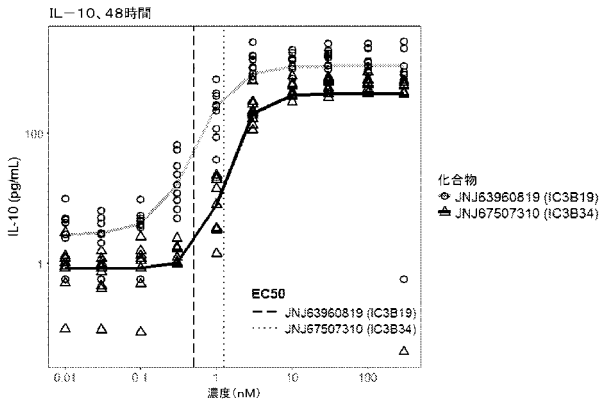
	差	Sigma	p値
0.01における差	0.098	0.325	1.0000
0.03における差	-0.077	0.325	1.0000
0.1における差	0.127	0.325	1.0000
0.3における差	-0.963	0.325	0.0293
1における差	-2.09	0.325	<0.0001
3における差	-0.026	0.325	1.0000
10における差	-0.037	0.325	1.0000
30における差	-0.245	0.325	0.9967
100における差	0.098	0.325	1.0000
300における差	0.375	0.325	0.9308

【 図 4 7 B 】



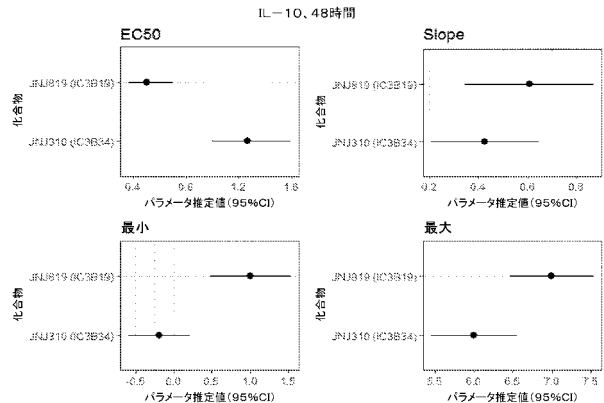
	JNJ63960819 (IC3B19)	JNJ67507310 (IC3B34)	p値
EC50	0.844 (0.698, 1.021)	1.718 (1.500, 1.968)	<0.0001
Slope	0.724 (0.557, 0.892)	0.421 (0.325, 0.517)	0.0010
最小	1.067 (0.775, 1.359)	1.237 (1.020, 1.453)	0.3406
最大	7.353 (7.070, 7.636)	7.413 (7.140, 7.686)	0.7036

【図 48 A】



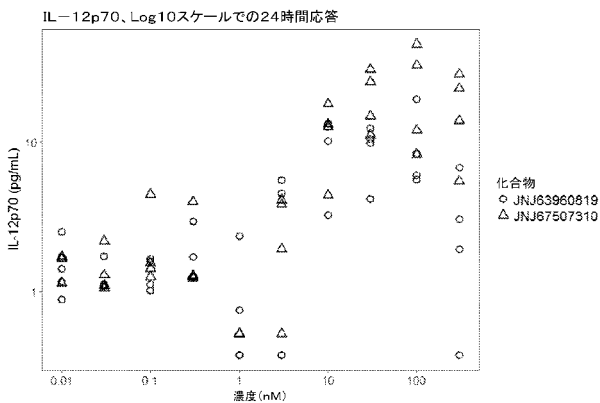
濃度 (nM)	差	Sigma	p値
0.01	-1.404	0.583	0.1405
0.03	-1.391	0.583	0.1484
0.1	-1.472	0.583	0.1043
0.3	-2.546	0.583	1e-04
1	-3.33	0.583	<0.0001
3	-1.693	0.583	0.0352
10	-0.98	0.583	0.5852
30	-1.011	0.583	0.5434
100	-0.898	0.583	0.6952
300	-0.956	0.583	0.6178

【図 48 B】



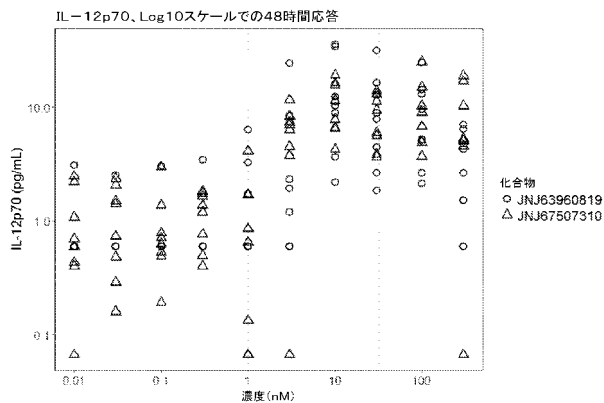
	JNJ63960819 (IC3B19)	JNJ67507310 (IC3B34)	p値
EC50	0.503 (0.362, 0.697)	1.263 (1.000, 1.595)	<0.0001
Slope	0.607 (0.344, 0.870)	0.425 (0.206, 0.644)	0.2702
最小	1.006 (0.471, 1.540)	-0.192 (-0.599, 0.214)	0.0011
最大	6.999 (6.459, 7.539)	6.004 (5.453, 6.554)	0.0004

【図 49】



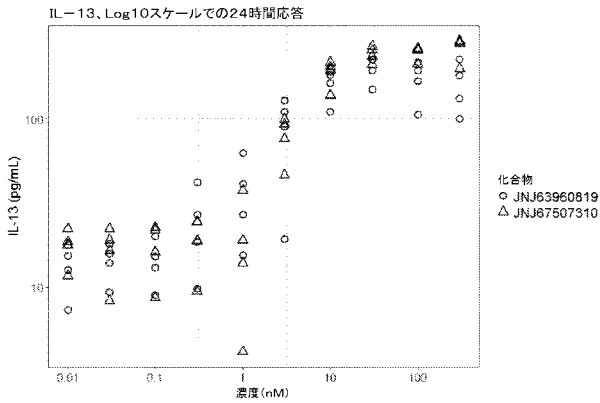
濃度 (nM)	差	Sigma	p値
0.01	0.096	0.485	1.0000
0.03	0.081	0.485	1.0000
0.1	0.351	0.485	0.9953
0.3	0.002	0.485	1.0000
1	-0.302	0.485	0.9986
3	0.369	0.485	0.9931
10	0.216	0.485	0.9999
30	0.792	0.485	0.5672
100	0.814	0.485	0.5321
300	2.024	0.485	0.0003

【図 50】



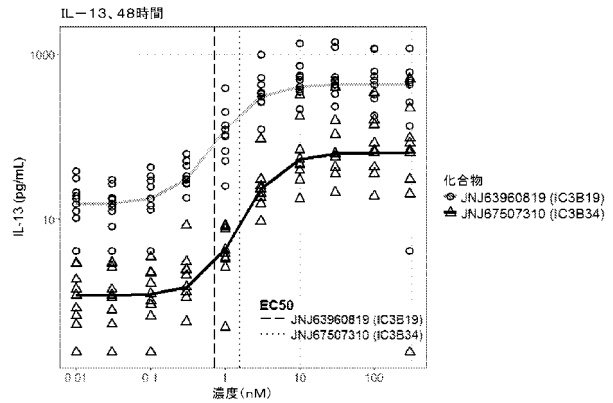
濃度 (nM)	差	Sigma	p値
0.01	-0.140	0.503	1.0000
0.03	0.108	0.503	1.0000
0.1	-0.022	0.503	1.0000
0.3	0.324	0.503	0.9988
1	-0.822	0.503	0.6083
3	0.623	0.503	0.8814
10	-0.059	0.503	1.0000
30	-0.022	0.503	1.0000
100	0.178	0.503	1.0000
300	0.718	0.503	0.7659

【図 5 1】



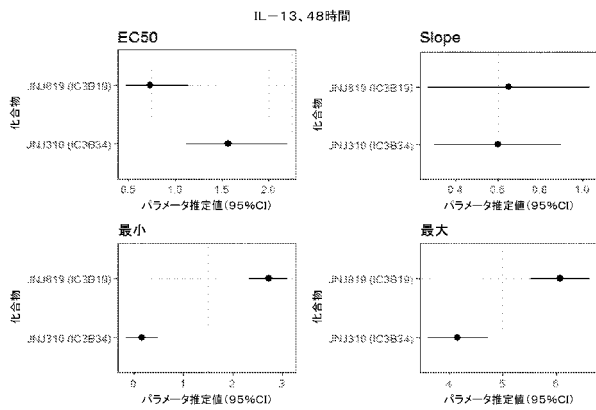
	差	Sigma	p値
0.01における差	0.307	0.312	0.8941
0.03における差	0.108	0.312	1.0000
0.1における差	0.161	0.312	0.9985
0.3における差	-0.170	0.312	0.9978
1における差	-0.817	0.312	0.0565
3における差	0.071	0.312	1.0000
10における差	0.159	0.312	0.9987
30における差	0.212	0.312	0.9886
100における差	0.593	0.312	0.7092
300における差	0.536	0.312	0.3785

【図 5 2 A】



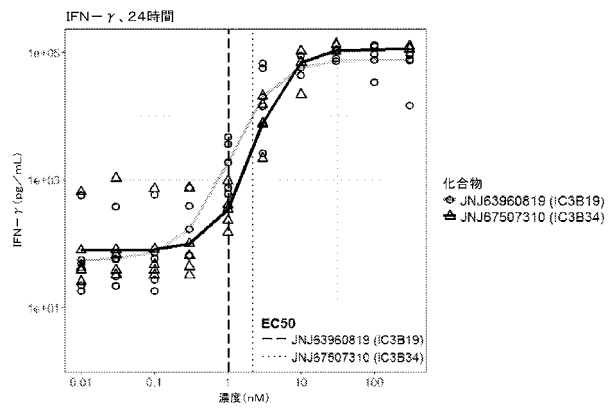
	差	Sigma	p値
0.01における差	-2.735	0.49	<0.0001
0.03における差	-2.489	0.49	<0.0001
0.1における差	-2.726	0.49	<0.0001
0.3における差	-2.846	0.49	<0.0001
1における差	-3.337	0.49	<0.0001
3における差	-2.707	0.49	<0.0001
10における差	-2.132	0.49	1e-04
30における差	-2.005	0.49	4e-04
100における差	-1.869	0.49	0.0014
300における差	-1.753	0.49	0.0034

【図 5 2 B】



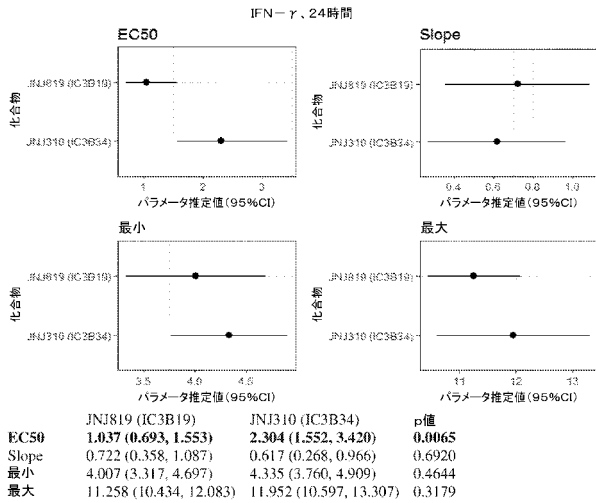
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p値
EC50	0.731 (0.467, 1.143)	1.564 (1.111, 2.202)	0.0106
Slope	0.651 (0.270, 1.033)	0.599 (0.300, 0.899)	0.8268
最小	2.729 (2.341, 3.118)	0.162 (-0.165, 0.490)	<0.0001
最大	6.077 (5.523, 6.630)	4.155 (3.590, 4.721)	<0.0001

【図 5 3 A】

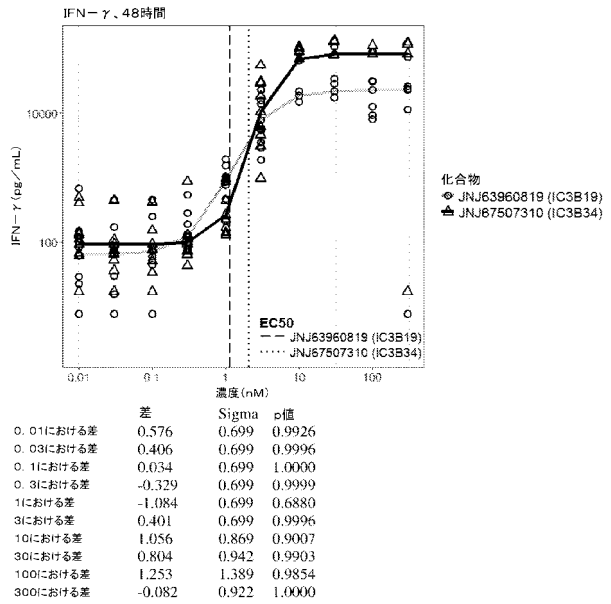


	差	Sigma	p値
0.01における差	0.220	0.927	1.0000
0.03における差	0.448	0.927	0.9991
0.1における差	0.225	0.927	1.0000
0.3における差	-0.735	0.927	0.9718
1における差	-1.596	0.927	0.4007
3における差	-0.836	0.927	0.9413
10における差	-0.060	1.123	1.0000
30における差	0.538	1.123	0.9992
100における差	1.510	1.206	0.7439

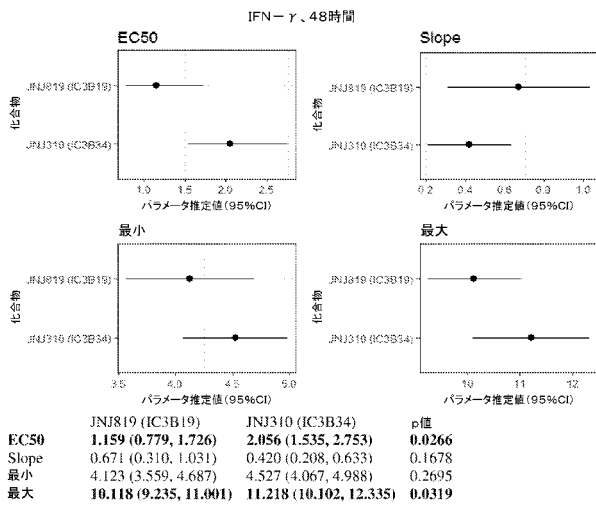
【 図 5 3 B 】



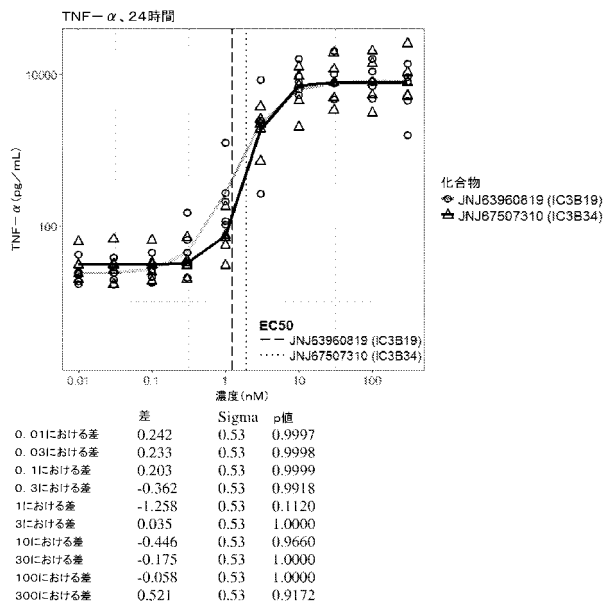
【 図 5 4 A 】



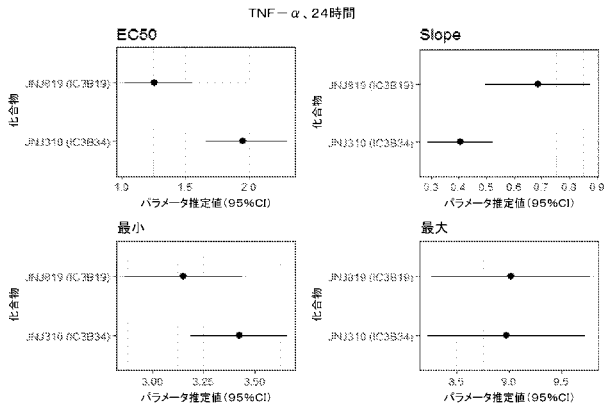
【 図 5 4 B 】



【 図 5 5 A 】

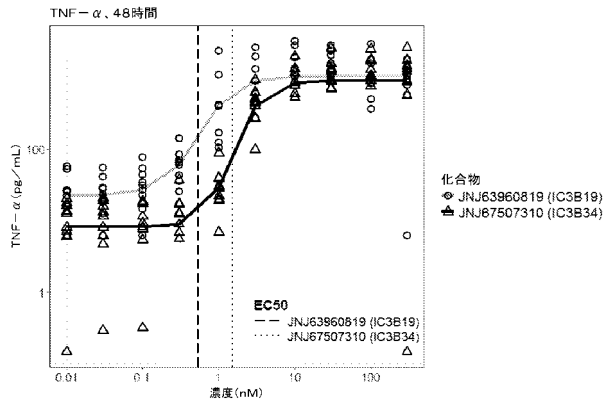


【 図 5 5 B 】



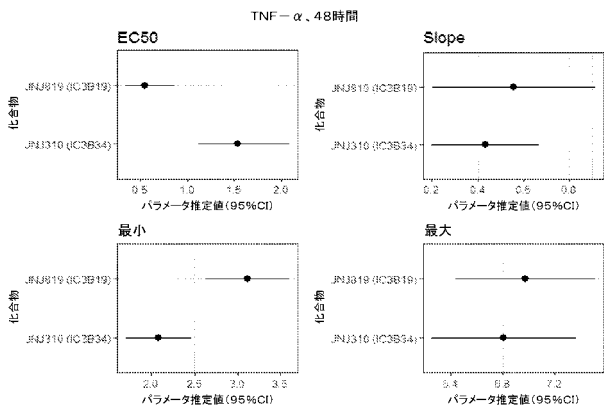
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p値
EC50	1.260 (1.022, 1.555)	1.952 (1.658, 2.298)	0.0016
Slope	0.686 (0.495, 0.876)	0.405 (0.287, 0.523)	0.0128
最小	3.151 (2.860, 3.441)	3.425 (3.187, 3.663)	0.1443
最大	9.019 (8.263, 9.775)	8.973 (8.226, 9.720)	0.7895

【 図 5 6 A 】



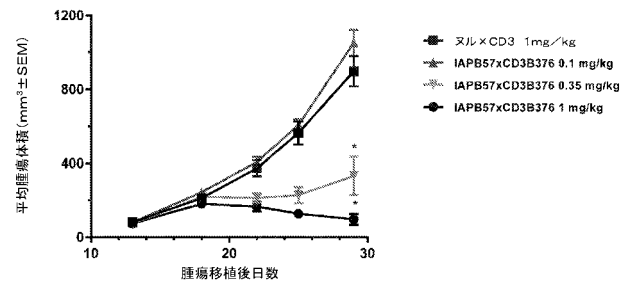
差	Sigma	p値
0.01における差	-1.21	0.579 0.2840
0.03における差	-1.099	0.579 0.4088
0.1における差	-1.365	0.579 0.1560
0.3における差	-1.471	0.579 0.0982
1における差	-2.66	0.579 <0.0001
3における差	-0.718	0.579 0.8826
10における差	-0.497	0.579 0.9889
30における差	-0.245	0.579 1.0000
100における差	0.243	0.579 1.0000
300における差	-0.33	0.579 0.9996

【 図 5 6 B 】

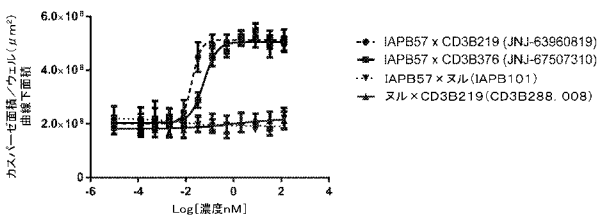


	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p値
EC50	0.546 (0.344, 0.866)	1.530 (1.122, 2.087)	0.0004
Slope	0.558 (0.202, 0.915)	0.433 (0.197, 0.668)	0.5553
最小	3.116 (2.628, 3.604)	2.083 (1.699, 2.467)	0.0043
最大	6.973 (6.431, 7.515)	6.807 (6.248, 7.365)	0.5216

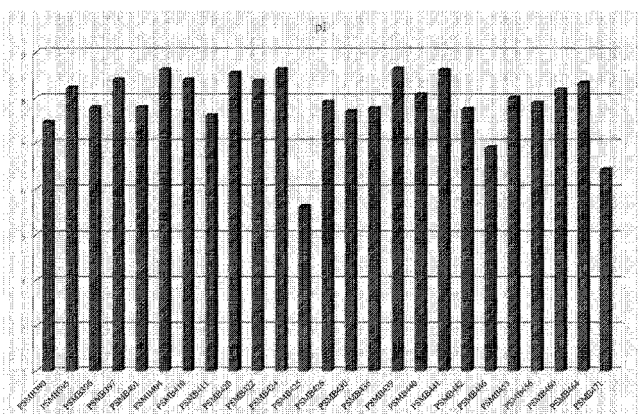
【 図 5 8 】



【 図 5 7 】



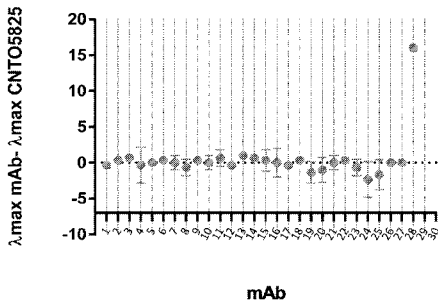
【 図 5 9 】



	IL1RAP親和性 (nM)	細胞傷害EC50 (nM)
JNJ-63960819	0.04	0.018
JNJ-67507310	0.02	0.057

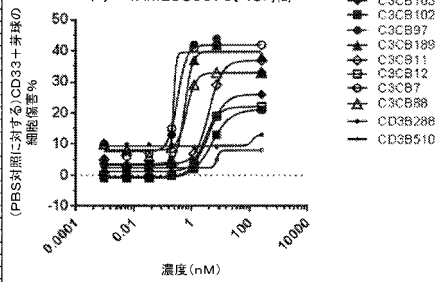
【 図 6 0 】

(CNT05825に対する)PSMA mAbの
自己会合性



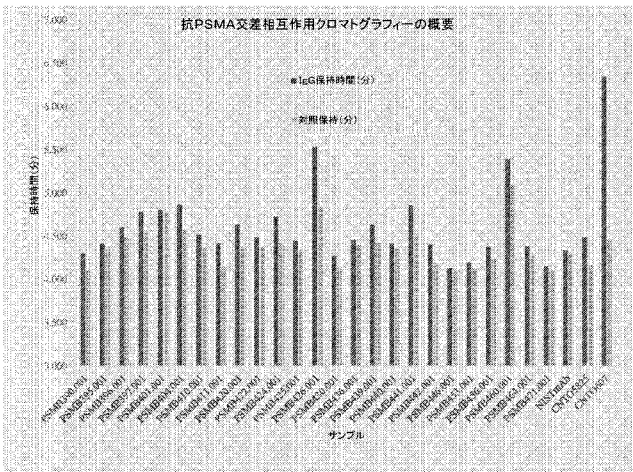
【 図 6 2 A 】

04292017 WB殺傷
ドナー:AMLUS0076、48時間



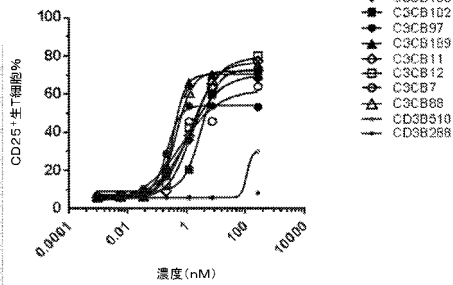
mAb
1 PSMB395.00.1
2 PSMB396.00.1
3 PSMB397.00.1
4 PSMB397.00.1
5 PSMB401.00.1
6 PSMB404.00.1
7 PSMB410.00.1
8 PSMB411.00.1
9 PSMB420.00.1
10 PSMB422.00.1
11 PSMB424.00.1
12 PSMB425.00.1
13 PSMB426.00.1
14 PSMB430.00.1
15 PSMB436.00.1
16 PSMB439.00.1
17 PSMB440.00.1
18 PSMB441.00.1
19 PSMB442.00.1
20 PSMB446.00.1
21 PSMB465.00.1
22 PSMB466.00.1
23 PSMB469.00.1
24 PSMB464.00.1
25 PSMB471.00.1
26 NIS1A6
27 CNT05825
28 CNT0607

【 図 6 1 】



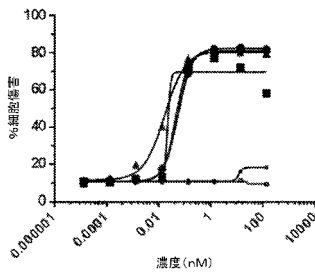
【 図 6 2 B 】

04292017 WB殺傷
ドナー:AMLUS0076、48時間

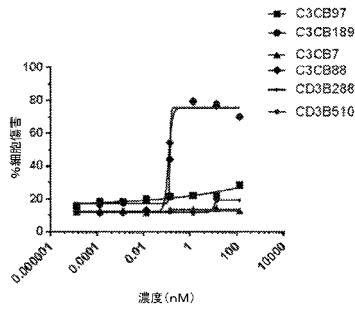


【 図 6 3 A 】

WT+CC
KG1

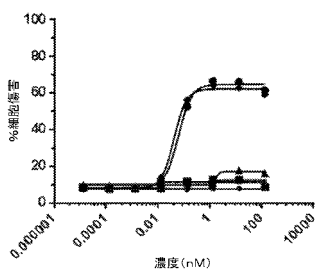


【 図 6 3 C 】



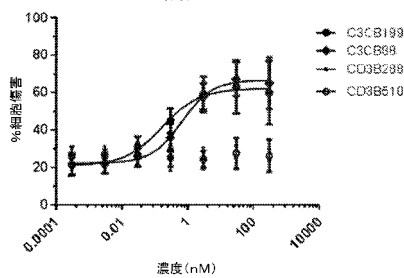
【 図 6 3 B 】

HeteroCT
SH-2

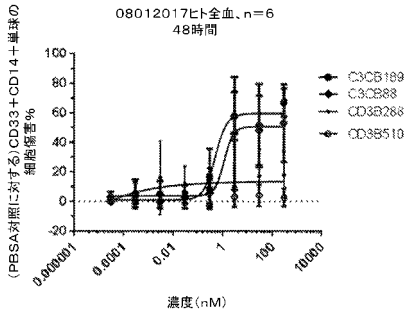


【 図 6 4 A 】

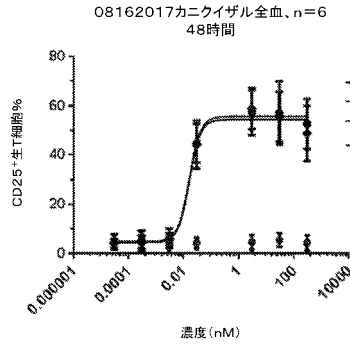
08012017正常ヒト血液中のMOLM13
48時間、ET1:5



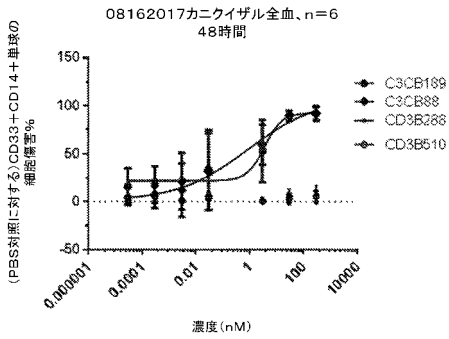
【 図 6 4 B 】



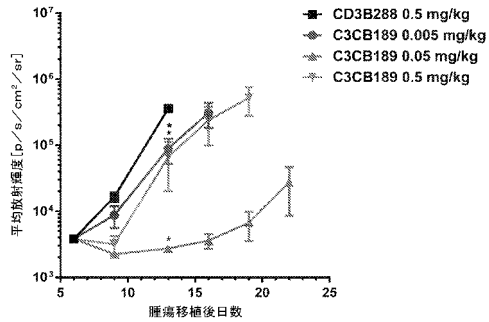
【 図 6 5 B 】



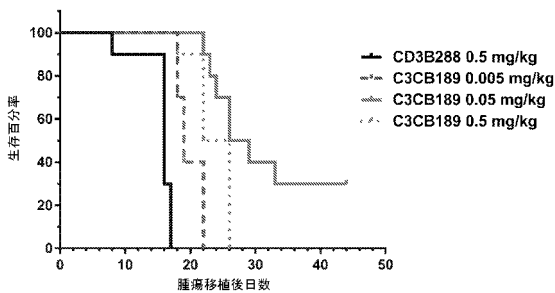
【 図 6 5 A 】



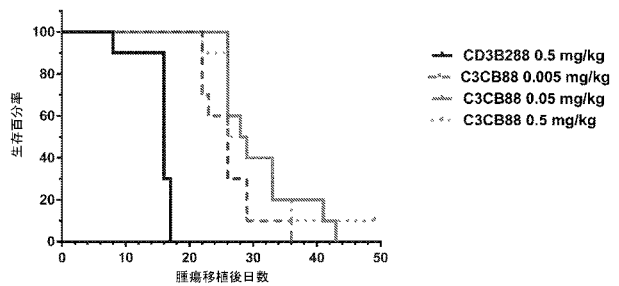
【 図 6 6 】



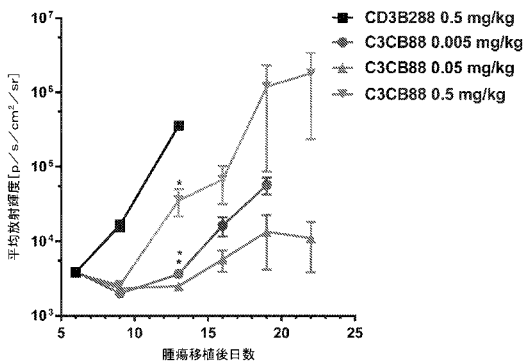
【 図 6 7 】



【 図 6 9 】



【 図 6 8 】



【 図 7 0 】

```

25 EVQLLESGGGLVQR-CGSLRPSCAASGFTFS
27 EVQLLESGGGLVQPPGGLRLSCAASGFTFS
87 EVQLLESGGGLVQF-CGSLRLSCAASGFTFS
89 EVQLLESGGGLVQF-CGSLRLSCAASGFTFS
*****

25 SYMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGPTDY
27 SYMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGPTSY
87 SYMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGPTDY
89 SYMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGPTDY
*****

25 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
27 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAED
87 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAED
89 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
*****

25 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSS
27 TAVYYCARMPLNSPHDCWGGQGLTVTVSS
87 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSS
89 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSS
*****

```

【 図 7 1 】

```

28      AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
30      AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
88      DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
90      AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIR
      *****

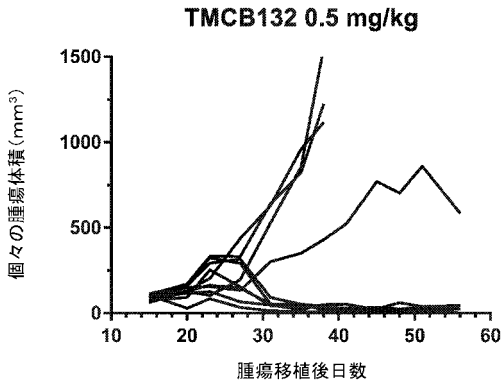
28      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
30      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
88      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
90      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
      *****

28      RFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCLQ
30      RFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCLQ
88      RFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCLQ
90      RFGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCLQ
      *****

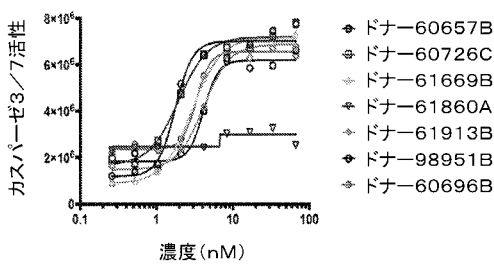
28      DYNYLTFGGGKVEIK
30      DYNYSLTFGGGKVEIR
88      DYNYLTFGGGKVEIK
90      DYNYLTFGGGKVEIK
      *****

```

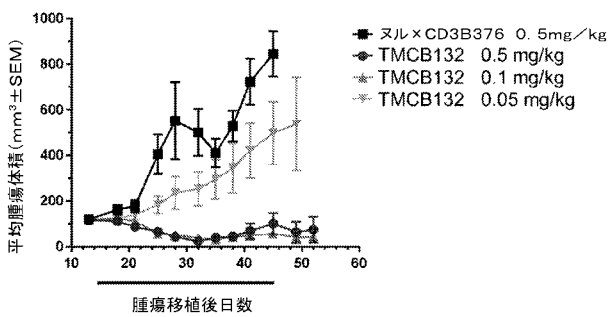
【 図 7 2 】



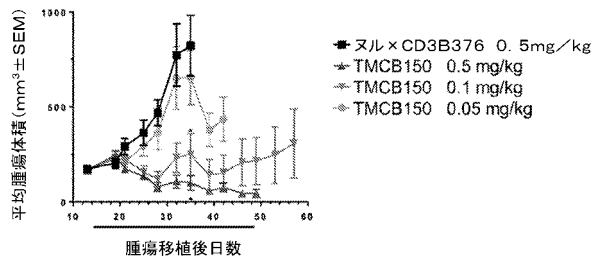
【 図 7 5 】



【 図 7 6 】

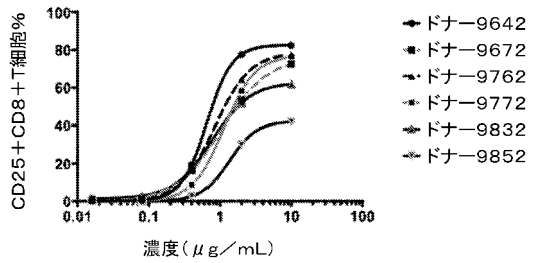


【 図 7 3 】



*処理対照についてp≤0.0001、線形混合効果分析、続いて、ペアワイズ比較によって計算。X軸の下のバーは、投与期間を表す。

【 図 7 4 】



【配列表】

2021524249000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2019/054188

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K14/47 C07K16/30 A61P35/00 A61P35/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 982 693 A1 (AFFIMED THERAPEUTICS AG [DE]) 10 February 2016 (2016-02-10) The whole document, in particular, para.48 and Table 1	1-45
X	----- WO 2015/181098 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 3 December 2015 (2015-12-03) The whole document, in particular the examples ----- -/--	1-45
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 7 January 2020		Date of mailing of the international search report 23/01/2020
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Chapman, Rob

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2019/054188

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PAN YING ET AL: "Anti-idiotypic antibodies: Biological function and structural studies", THE FASEB JOURNAL, FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY, US, vol. 9, no. 1, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 43-49, XP002526815, ISSN: 0892-6638 The whole document, in particular, the abstract</p> <p>-----</p>	46
T	<p>Www.Rockland-Inc.Com: "Anti-Idiotypic Antibody Production Service", , 12 November 2019 (2019-11-12), XP055642733, Retrieved from the Internet: URL:https://rockland-inc.com/anti-idiotypic-antibody-production.aspx [retrieved on 2019-11-14] The whole document, in particular, the first paragraph</p> <p>-----</p>	46
T	<p>HEINZ KOHLER ET AL: "The Promise of Anti-idiotypic Revisited", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 10, 1 April 2019 (2019-04-01), XP055642738, CH ISSN: 1664-3224, DOI: 10.3389/fimmu.2019.00808 the whole document</p> <p>-----</p>	46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2019/054188

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/054188**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

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

2. Claims Nos.: 1-4, 12-16(all partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2019/054188

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-45

Agents comprising an antibody binding domain directed to CD3, comprising the HCDR1, the HCDR2, the HCDR3, the LCDR1, the LCDR2, and the LCDR3 of SEQ ID NOs:662, 663, 664, 671, 673, and 690, respectively, and related subject-matter

2. claim: 46

Anti-idiotypic antibodies to an antibody binding domain directed to CD3, comprising the HCDR1, the HCDR2, the HCDR3, the LCDR1, the LCDR2, and the LCDR3 of SEQ ID NOs:662, 663, 664, 671, 673, and 690, respectively.

International Application No. PCT/IB2019/054188

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-4, 12-16(all partially)

The present application contains 46 claims, of which 17 are independent. There is no clear distinction between the independent claims 1, 2, 12-16, 20 and 22 because of overlapping scope. There are so many claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, as it is particularly burdensome for a skilled person to establish the subject-matter for which protection is sought. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19 and 9.25).

The search was based on the subject-matter that, as far as can be understood, could reasonably be expected to be claimed later in the procedure, and the corresponding claims, namely an antibody binding domain directed to CD3, comprising the HCDR1, the HCDR2, the HCDR3, the LCDR1, the LCDR2, and the LCDR3 of SEQ ID NOs:662, 663, 664, 671, 673, and 690, respectively.

The applicant/representative is informed that the search is the responsibility of the ISA under Chapter I of the PCT, the procedure before the ISA is closed and that there is no provision in the PCT for a review of or an appeal against the findings of the ISA by the IPEA.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2019/054188

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2982693	A1	10-02-2016	
		AU 2015299039 A1	02-03-2017
		BR 112017002422 A2	28-11-2017
		CA 2957462 A1	11-02-2016
		CN 107001468 A	01-08-2017
		EP 2982693 A1	10-02-2016
		EP 3177646 A1	14-06-2017
		JP 2017529067 A	05-10-2017
		RU 2017105120 A	10-09-2018
		US 2016039934 A1	11-02-2016
		WO 2016020444 A1	11-02-2016

WO 2015181098	A1	03-12-2015	
		AU 2015266077 A1	29-09-2016
		BR 112016022819 A2	16-01-2018
		CA 2942453 A1	03-12-2015
		CN 106459201 A	22-02-2017
		EP 3149041 A1	05-04-2017
		JP 2017516786 A	22-06-2017
		KR 20170003591 A	09-01-2017
		SG 11201609950Y A	29-12-2016
		US 2017233475 A1	17-08-2017
		WO 2015181098 A1	03-12-2015

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
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	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	13/10 (2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	13/02 (2006.01)	A 6 1 P	13/02	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	19/08	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

- (74) 代理人 100149010
弁理士 星川 亮
- (74) 代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72) 発明者 ゴーデット, フランソワ
アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72) 発明者 ギルズ - コマー, ジル
アメリカ合衆国 1 9 3 3 5 ペンシルベニア州, ダウニングトン ブレイクリー ロード 3 1
- (72) 発明者 ハイドリッヒ, ブラッドリー
アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72) 発明者 ヒュアン, チチ
アメリカ合衆国 1 9 3 5 5 ペンシルベニア州, モルバーン, ドブス イン 2 2
- (72) 発明者 ケイン, コリー

アメリカ合衆国 19477 ペンシルベニア州, スプリングハウス, マッキーンロード 1
400

(72)発明者 マクデイド, ロナン

イギリス国 イーエイチ2 2 ジェージー エジンバラ, ジョージストリート 63エー, ザ
オークションハウス, サードフロア

(72)発明者 ネメス-スィー, ジェニファー

アメリカ合衆国 19477 ペンシルベニア州, スプリングハウス, マッキーンロード 1
400

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE10 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AB01 BA02 CA25 CA44

4C084 AA19 NA05 ZC412

4C085 AA14 AA16 BB36 CC23 DD62 EE01 EE03

4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA28 FA74