

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7503215号
(P7503215)

(45)発行日 令和6年6月19日(2024.6.19)

(24)登録日 令和6年6月11日(2024.6.11)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62 Z
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N	15/88 (2006.01)	C 1 2 N	15/88 Z
		請求項の数	37 (全98頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-538860(P2023-538860)	(73)特許権者	507316398
(86)(22)出願日	令和4年10月6日(2022.10.6)		ジェンマブ エー／エス
(65)公表番号	特表2023-551744(P2023-551744 A)		デンマーク王国 2 5 0 0 バルビュー
			カール ヤコブセンズ ヴェイ 3 0
(43)公表日	令和5年12月12日(2023.12.12)	(74)代理人	100114188
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/077817		弁理士 小野 誠
(87)国際公開番号	WO2023/057571	(74)代理人	100119253
(87)国際公開日	令和5年4月13日(2023.4.13)		弁理士 金山 賢教
審査請求日	令和5年6月22日(2023.6.22)	(74)代理人	100124855
(31)優先権主張番号	21201712.3		弁理士 坪倉 道明
(32)優先日	令和3年10月8日(2021.10.8)	(74)代理人	100129713
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		弁理士 重森 一輝
早期審査対象出願		(74)代理人	100137213
			弁理士 安藤 健司
		(74)代理人	100143823
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 C D 3 0 及び C D 3 に結合する抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) それぞれ、配列番号 1、2、及び 3 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 1 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 4、5、及び 6 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 1 の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 0 結合領域と、

(i i) それぞれ、配列番号 7、8、及び 9 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 1 0、1 1、及び 1 2 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 結合領域と、

を含む多重特異性抗体であって、

ここで、前記多重特異性抗体は、配列番号 1 7 及び 1 9 に記載される重鎖配列、並びに配列番号 1 8 及び 2 0 に記載される軽鎖配列、を含むか、又はそれらからなる、多重特異性抗体。

【請求項 2】

前記多重特異性抗体が二重特異性抗体である、請求項 1 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の多重特異性抗体をコードする、核酸構築物、又は核酸構築物の組み合わせ。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の核酸構築物を含む、発現ベクター、又は発現ベクターの組み合わせ。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の核酸構築物を含む、送達ビヒクル。

【請求項 6】

前記送達ビヒクルが、粒子である、請求項 5 に記載の送達ビヒクル。

【請求項 7】

前記粒子が、脂質ナノ粒子である、請求項 6 に記載の送達ビヒクル。

【請求項 8】

前記脂質ナノ粒子が、脂質、イオン化可能なアミノ脂質、PEG-脂質、コレステロール、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 7 に記載の送達ビヒクル。

10

【請求項 9】

前記宿主細胞が、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体をコードする 1 つ以上の核酸構築物を含む、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を産生することができる組換え宿主細胞。

【請求項 10】

前記組換え宿主細胞が、CHO 細胞である、請求項 9 に記載の組換え宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1～2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 12】

20

医薬としての使用のための、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 13】

医薬としての使用のための、請求項 3 に記載の核酸構築物。

【請求項 14】

医薬としての使用のための、請求項 5 に記載の送達ビヒクル。

【請求項 15】

医薬としての使用のための、請求項 11 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

がんの治療における使用のための、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

30

【請求項 17】

がんの治療における使用のための、請求項 3 に記載の核酸構築物。

【請求項 18】

がんの治療における使用のための、請求項 5 に記載の送達ビヒクル。

【請求項 19】

がんの治療における使用のための、請求項 11 に記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫（NHL）の治療における使用のための、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 21】

40

ホジキンリンパ腫又は非ホジキンリンパ腫（NHL）の治療における使用のための、請求項 11 に記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

非ホジキンリンパ腫が、T 細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）である、請求項 20 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 23】

非ホジキンリンパ腫が、T 細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）である、請求項 21 に記載の薬学的組成物。

【請求項 24】

T-NHL が、皮膚 T 細胞リンパ腫（CTCL）又は末梢 T 細胞リンパ腫（PTCL）

50

である、請求項 2 2 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 2 5】

T-NHL が、皮膚 T 細胞リンパ腫（CTCL）又は末梢 T 細胞リンパ腫（PTCL）である、請求項 2 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 6】

T 細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）が、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）である、請求項 2 2 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 2 7】

T 細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）が、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）である、請求項 2 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 8】

非ホジキンリンパ腫が、B 細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）である、請求項 2 0 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 2 9】

非ホジキンリンパ腫が、B 細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）である、請求項 2 1 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 0】

前記多重特異性抗体が、静脈内投与されている、請求項 1 2 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 3 1】

前記薬学的組成物が、静脈内投与されている、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 2】

前記多重特異性抗体が、皮下投与されている、請求項 1 2 に記載の多重特異性抗体。

【請求項 3 3】

前記薬学的組成物が、皮下投与されている、請求項 1 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 3 4】

請求項 1 ～ 2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を産生するための方法であって、該方法は、

（i）請求項 1 ～ 2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を産生することができる組換え宿主細胞を、前記抗体が産生される条件下で培養し、
ここで、前記宿主細胞は、前記多重特異性抗体をコードする 1 つ以上の核酸構築物を含み、

（ii）産生された前記多重特異性抗体を培養物から単離する、
ことを含む、方法。

【請求項 3 5】

請求項 1 ～ 2 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体を産生するための方法であって、該方法は；

a) 請求項 1 に記載される CD30 結合領域を含む第 1 の抗体（i）、及び請求項 1 に記載される CD3 結合領域を含む第 2 の抗体（ii）を提供し、ここで、前記抗体が、請求項 2 に記載される更なる特徴を含有してもよく、

ここで、前記第 1 及び第 2 の抗体が、Fc 領域を含み、

ここで、前記第 1 及び第 2 の抗体の第 1 及び第 2 の CH3 領域の配列が、異なり、ひいては前記第 1 及び第 2 の CH3 領域間のヘテロ二量体相互作用が、前記第 1 及び第 2 の CH3 領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強く；

b) 前記第 1 の抗体を前記第 2 の抗体と一緒に、前記ヒンジ領域における前記システインがジスルフィド結合異性化を受けることを可能にするために十分な還元条件下でインキュベートし；そして、

c) 前記第 1 の抗体の第 1 の免疫グロブリン重鎖及び第 1 の免疫グロブリン軽鎖と、前記第 2 の抗体の第 2 の免疫グロブリン重鎖及び第 2 の免疫グロブリン軽鎖と、を含む前記多重特異性抗体を得る；

ことを含む、方法。

【請求項 3 6】

10

20

30

40

50

請求項 1～2 のいずれか一項に定義される抗体と、キットの使用説明書と、を含む、キットオブパーツ。

【請求項 37】

多重特異性抗体を産生するための方法であって、該方法は；

a)

配列番号 17 に記載される重鎖配列、および配列番号 18 に記載される軽鎖配列を含む CD30 結合領域を含む第 1 の抗体、並びに、以下を含む第 2 の抗体を提供するか；

(i) それぞれ、配列番号 7、8、及び 9 に記載される CDR1、CDR2、及び CDR3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 10、11、及び 12 に記載される CDR1、CDR2、及び CDR3 配列と、を含む CD3 結合領域、および

(ii) 第 1 及び第 2 の Fc ポリペプチドからなる Fc 領域であって、ここで、前記第 1 及び第 2 の Fc ポリペプチドが、それぞれ、L234 及び L235 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F 及び E への置換と、ヒト IgG1 重鎖における D265 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の A への置換と、を含む Fc 領域；

又は

配列番号 19 に記載される重鎖配列、および配列番号 20 に記載される軽鎖配列を含む CD3 結合領域を含む第 2 の抗体、並びに、以下を含む第 1 の抗体を提供し；

(i) それぞれ、配列番号 1、2、及び 3 に記載される CDR1、CDR2、及び CDR3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 4、5、及び 6 に記載される CDR1、CDR2、及び CDR3 配列を含む第 2 の軽鎖可変領域と、を含む CD30 結合領域、及び

(ii) 第 1 及び第 2 の Fc ポリペプチドからなる Fc 領域であって、前記第 1 及び第 2 の Fc ポリペプチドが、それぞれ、L234 及び L235 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F 及び E への置換と、ヒト IgG1 重鎖における D265 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の A への置換と、を含む Fc 領域；

ここで、前記第 1 及び第 2 の抗体の前記第 1 及び第 2 の CH3 領域の配列が、異なり、ひいては前記第 1 及び第 2 の CH3 領域間のヘテロ二量体相互作用が、前記第 1 及び第 2 の CH3 領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強く、ここで、前記第 2 の CH3 領域において、F405 に対応する位置にあるアミノ酸が L であり、前記第 1 の CH3 領域において、K409 に対応する位置にあるアミノ酸が R であり；

b) 前記第 1 の抗体を前記第 2 の抗体と一緒に、前記ヒンジ領域における前記システインがジスルフィド結合異性化を受けることを可能にするために十分な還元条件下でインキュベートし；そして、

c) 前記第 1 の抗体の前記第 1 の免疫グロブリン重鎖及び前記第 1 の免疫グロブリン軽鎖と、前記第 2 の抗体の前記第 2 の免疫グロブリン重鎖及び前記第 2 の免疫グロブリン軽鎖と、を含む前記多重特異性抗体を得る

ことを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD30 及び CD3 に結合する多重特異性抗体に関する。本発明は、抗体を含む薬学的組成物、抗体をコードする核酸、抗体を産生する宿主細胞、抗体を産生する方法、及び特にがん療法のための、抗体の使用を更に提供する。

【背景技術】

【0002】

Ki-1 又は TNFRSF8 としても知られる、CD30 は、120 kD の膜貫通糖タンパク質受容体であり、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーのメンバーである (Smith et al. (1994) Cell 76:959-962)。CD30 は、その細胞外ドメインに 6 つのシステインリッチ反復を有するシングルパス I 型膜タンパク質である (Durkop et al. (1992) Cell 68:421-4

10

20

30

40

50

27)。加えて、可溶性形態のCD30 (sCD30) が、潰瘍性大腸炎 (UC) (Giacomelli et al. Clin Exp Immunol. 1998; 111: 532-5) を含む、炎症性疾患、及びCD30陽性血液悪性腫瘍 (Josimovic-Alasevic et al. (1989) Eur J Immunol) を有する患者の血清中で検出されている。sCD30は、TACE/ADAM17及びADAM10などの細胞膜係留性メタロプロテイナーゼによるCD30の細胞外部分の切断産物を表す (Nagata et al., PNAS 2005、Hansen et al., FASEB, 2004)。

【0003】

正常組織では、CD30発現は、主に活性化T及びBリンパ球のサブセットに制限される (Bowen et al. (1996) J Immunol. 156: 442-9、Shanebeck et al. (1995) Eur J Immunol. 25: 2147-53)。CD30発現は、様々なリンパ系腫瘍において検出されている。古典的ホジキンリンパ腫 (cHL) 及び未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) は、高いCD30発現レベルを示す。特に、cHLに典型的に見られる、Reed-Sternberg (RS) 細胞の大部分は、CD30に対して陽性である (Frizzera et al. (1992) Semin. Diagn. Pathol. 9: 291-296)。

【0004】

例えば、CD30標的化抗体-薬物複合体ブレンツキシマブベドチン (BV、SGN-35) は、cHL、ALCL、及びCTCLなどのがんを治療する際に使用されているか又は使用することが推奨されている (Younes et al. J Clin Oncol. 2012 Jun 20; 30 (18): 2183-9、Pro et al. Blood. 2017 Dec 21; 130 (25): 2709-2717、Shea et al. Curr Hematol Malign Rep. 2020 Feb; 15 (1): 9-19)。四価二重特異性CD30×CD16A抗体AFM13は、cHL及びCD30陽性リンパ腫のためのNK細胞媒介性免疫療法として開発されている (Rothe et al. Blood. 2015 Jun 25; 125 (26): 4024-31)。

【0005】

更に、CD30標的化CAR-T細胞療法は、cHL及びCD30陽性リンパ腫のために開発されている。他のCD30抗体は、WO2003059282 (Medarex)、US8257706 (Seattle genetics)、US2010/0239571 (Seattle genetics)、WO2007/040653 (米国政府及び保健)、及びWO2016/0177846 (Affimed) に記載されている。

【0006】

Pohl et al. (1993 Int. J. Cancer, 54: 820-827) は、CD30モノクローナル抗体HRS-3産生ハイブリドーマ細胞とCD3モノクローナル抗体OKT-3産生ハイブリドーマ細胞との融合 (ハイブリッドハイブリドーマ技術) によって生成されたCD3×CD30二重特異性抗体OKT-3/HRS-3を記載する。

【0007】

WO2008/119567は、CD30及びCD3種間特異的二重特異性一本鎖分子の生成及び特徴分析を記載している。

【0008】

US2020/0095330は、2つの抗CD30クローン (8D10及び10C2と名付けられた) の抗CD3 (オルソクローンOKT-3) への化学的ヘテロ抱合に起因するCD3×CD30二重特異性抗体を記載している。

【0009】

しかしながら、これらのCD3×CD30二重特異性抗体のいずれも、臨床環境で試験されていない。

【0010】

10

20

30

40

50

したがって、改善されたCD30標的化がん療法の必要性がある。有効性があり、安全で、良好な製造可能性を有し、かつ／又は長い貯蔵寿命を有するCD30標的化化合物の必要性がある。

【発明の概要】

【0011】

本発明は、ヒト及びカニクイザルCD30及びCD3に結合するT細胞誘導抗体に関する。本発明者らは、いくつかのCD30結合抗体が、二価（モノクローナル）フォーマットでCD30発現細胞に良好に結合するが、一価CD30結合を有する二重特異性フォーマットで強く低減した結合及び細胞傷害性を示すことを見出した。強力な一価CD30結合及び優れた腫瘍細胞殺滅を有する二重特異性抗体が特定された。更に、優れた安定性及び溶解性のために、薬学的製品への開発に好適である、機能的に不活性なFcバックボーンを有する二重特異性抗体が特定された。

10

【0012】

一態様において、本発明は、

(i) それぞれ、配列番号1、2、及び3に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第1の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号4、5、及び6に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第1の軽鎖可変領域と、を含むCD30結合領域と、

(ii) それぞれ、配列番号7、8、及び9に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第2の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号10、11、及び12に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第2の軽鎖可変領域と、を含むCD3結合領域と、

20

を含む多重特異性抗体に関する。

【0013】

更なる態様において、本発明は、本発明による多重特異性抗体をコードする、核酸構築物、又は核酸構築物の組み合わせに関する。

【0014】

更なる態様において、本発明は、本発明による核酸構築物を含む発現ベクター又は送達ビヒクルに関する。

【0015】

更なる態様において、本発明は、本発明による多重特異性抗体を産生することができる組換え宿主細胞に関し、宿主細胞は、本発明による多重特異性抗体をコードする1つ以上の核酸構築物を含む。

30

【0016】

更なる態様において、本発明は、本発明による多重特異性抗体と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物に関する。

【0017】

更なる態様において、本発明は、例えば、がんの治療において、医薬としての使用のための、本発明による多重特異性抗体、核酸構築物、送達ビヒクル、又は薬学的組成物に関する。

40

【0018】

より更なる態様において、本発明は、本発明による多重特異性抗体を産生するための方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】二重特異性CD3×CD30抗体並びにそれらの単一特異性、二価CD3及びCD30対応物の、SU-DHL-1又はHDML-2細胞への結合である。(A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR、bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR、及びIgG1-CD30-MDX060-FEAR、(B) bsG1-hu

50

CD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEALx b12-FEAR、及びIgG1-CD30-hAC10-FEAR、(C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR、bsG1-huCD3-FEALx b12-FEAR、及びIgG1-CD30-HRS-3-FEAR、(D) BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR、bsG1-huCD3-FEALx b12-FEAR、及びIgG1-CD30-HeFi-I-FEAR、(E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEALx b12-FEAR、及びIgG1-CD30-T405-FEAR、(F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR、bsG1-huCD3-FEALx b12-FEAR、及びIgG1-CD30-T105-FEAR、(G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR、bsG1-huCD3-FEALx b12-FEAR、及びIgG1-CD30-T408-FEAR、並びに(H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR、bsG1-huCD3-FEALx b12-FEAR、及びIgG1-CD30-HRS-3-FEARの、SU-DHL-1細胞(左パネル)又はHDL M-2細胞(右パネル)への用量依存的結合。(I) 1.11 µg/mLの濃度でのSU-DHL-1(左パネル)又はHDL M-2細胞(右パネル)へのCD3xCD30二重特異性抗体及びCD30単一特異性抗体の結合。CD30アームに使用される抗体クローンは、x軸上に示される。示されるデータは、1つの代表的な実験についての、フローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値である。

10

20

【図2】bsG1-huCD3xCD30-MDX060のHL及びALCL細胞株への結合である。(A) HDLM-2(HL)、(B) L-428(HL)、(C) DEL(ALCL)、又は(D) KI-JK(ALCL)細胞へのbsG1-huCD3xCD30-MDX060の結合を、フローサイトメトリーによって評価した。二重特異性抗体bsG1-huCD3x b12及びbsG1-b12xCD30-MDX060並びに単一特異性抗体IgG1-CD30-MDX060、IgG1-huCD3、及びIgG1-12を対照として含めた。全ての抗体は、FEAL及び/又はFERR Fcサイレンシング並びにDuoBody(登録商標)技術変異を、示されるようにそれらのFcドメインに含有した。示されるデータは、1つの代表的な実験についての、フローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値である。

30

【図3】SU-DHL-1又はHDL M-2細胞におけるCD3xCD30二重特異性抗体によるインビトロでの細胞傷害性の誘導である。CD3xCD30二重特異性抗体は、CD30陽性腫瘍細胞株SU-DHL-1細胞(左パネル)又はHDL M-2細胞(右パネル)を標的細胞として、T細胞(CD3陽性ADCCエフェクター細胞IV型細胞、Clean Cells、Montaigne、France)をエフェクター細胞として使用して、インビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。以下の抗体を試験した：(A) bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR、bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR、及びIgG1-CD30-MDX060-FEAR、(B) bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR及びIgG1-CD30-hAC10-FEAR、(C) bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR及びIgG1-CD30-HRS-3-FEAR、(D) BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR及びIgG1-CD30-HeFi-I-FEAR、(E) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR及びIgG1-CD30-T405-FEAR、(F) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR及びIgG1-CD30-T105-FEAR、(G) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR及びIgG1-CD30-T408-FEAR、又は(H) bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR及びIgG1-CD30-HRS-3-FEAR。抗体bsG1-huCD3-FEALx b12-FEARを全ての実験に対照として含めた。示されるデータは、生存細胞パーセンテージであり

40

50

、各グラフについてのデータは、1つの代表的な実験から得られた。

【図4】いくつかのALCL及びHL細胞株におけるCD3×CD30二重特異性抗体によるインビトロでのT細胞媒介性細胞傷害性及びT細胞増殖の誘導である。(A-C) CD3×CD30二重特異性抗体を、異なるALCL及びHL細胞株を標的細胞として、精製されたT細胞(A、B)又はADCCエフェクター細胞IV型細胞(C)をエフェクター細胞として使用するインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。CD3×CD30二重特異性抗体は、CD3についてより低い親和性を有する、huCD3-FEAL Fabアーム又はhuCD3-H101G-FEALバリエーション、及びCD30特異的MDX060-FEAR Fabアームを含有した。IgG1-huCD3及びIgG1-b12(A、B)又はbsG1-b12-FEAL×CD30-MDX060-FEAR及びIgG1-CD30-MDX060-FEAR(C)を対照として含めた。示されるデータは、生存細胞パーセンテージであり、各グラフについてのデータは、1つの代表的な実験から得られた。(D) CFSE陽性細胞の数を、HDL M-2細胞(左パネル)又はNC EB-1細胞(右パネル)を標的細胞として用いた細胞傷害性アッセイにおける絶対T細胞数の尺度として評価した。

10

【図5】Exp i 293 F細胞にトランスフェクトされた全長ヒト及びカニクイザルCD30へのCD3×CD30二重特異性抗体の結合である。(A-C) 全長ヒトCD30(B)又はカニクイザルCD30(C)で一過性にトランスフェクトされた野生型Exp i 293 F細胞(A)又はExp i 293 F細胞への一価及び二価CD30抗体の結合。細胞を増加する濃度の以下の抗体とインキュベートした：IgG1-CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-H101G-FEAL×CD30-MDX060-FEAR、bsG1-b12-FEAL×CD30-MDX060-FEAR、及びbsG1-huCD3-FEAL×b12-FEAR。データは、2つの技術的複製のフローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値として提示される。(D) ヒトT細胞又はカニクイザルT細胞への抗体IgG1-CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR、及びbsG1-huCD3-FEAL×b12-FEARの結合。データは、1つの代表的な実験のフローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値として提示される。

20

【図6】Exp i 293 F細胞にトランスフェクトされた全長ヒト及びアカゲザルCD30へのCD3×CD30二重特異性抗体の結合である。一価及び二価CD30抗体の、全長ヒトCD30(左パネル)又はアカゲザルCD30(右パネル)で一過性にトランスフェクトされたExp i 293 F細胞への結合を、フローサイトメトリーによって評価した。以下の抗体を評価した：(A) bsG1-huCD3-FEAL×CD30-hAC10-FEAR及びIgG1-CD30-hAC10-FEAR、(C) bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HRS-3-FEAR及びIgG1-CD30-HRS-3-FEAR、(D) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-HeFi-I-FEAR及びIgG1-CD30-HeFi-I-FEAR、(E) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T405-FEAR及びIgG1-CD30-T405-FEAR、(F) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T105-FEAR及びIgG1-CD30-T105-FEAR、(G) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T408-FEAR及びIgG1-CD30-T408-FEAR、又は(H) bsIgG1-huCD3-FEAL×CD30-T215-FEAR及びIgG1-CD30-HRS-3-FEAR。抗体bsG1-huCD3-FEAL×b12-FEARを全ての実験に陰性対照として含めた。示されるデータは、1つの代表的な実験についての、フローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値である。

30

40

【図7】示差走査蛍光測定(DSF)によって決定される、異なる非活性化変異を有する抗体の熱安定性である。増加する温度での立体構造タンパク質安定性を、DSFによって2通りに評価した。以下の抗体の融解曲線を示す：(A) pH7.4のIgG1-CD30-MDX060-FEAR、(B) pH7.4のIgG1-CD30-MDX060-

50

FERR、(C) pH7.4のIgG1-huCD3-FEAL、及び(D) pH7.4のBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR。

【図8】bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRのHL細胞株への結合である。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの、HL細胞株L-540 (A)、KM-H2 (B)、及びL-1236 (C)への結合をフローサイトメトリーによって評価した。二重特異性抗体bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR及びbsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR並びに単一特異性抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL、及びIgG1-12-FEALを対照として含めた。示されるデータは、1つの代表的な実験についての、フローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値である。

10

【図9】bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRのALCL細胞株への結合である。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRのALCL細胞株SUP-M2 (A)、DL-40 (B)、KARPAS-299 (C)、L-82 (D)、及びSR-786 (E)への結合をフローサイトメトリーによって評価した。二重特異性抗体bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR及びbsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR並びに単一特異性抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL、及びIgG1-12-FEALを対照として含めた。示されるデータは、1つの代表的な実験についての、フローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値である。

20

【図10】bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRのNHL細胞株への結合である。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの、(A) SUP-T1 (TLL)、(B) JVM-2 (MCL)、(C) HH (CTCL)、及び(D) NCEB-1 (MCL)細胞株への結合を、フローサイトメトリーによって評価した。二重特異性抗体bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR及びbsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR並びに単一特異性抗体IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL、及びIgG1-12-FEALを対照として含めた。示されるデータは、1つの代表的な実験についての、フローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値である。

30

【図11】bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの、HEK293細胞にトランスフェクトされた全長ヒト及びアカゲザルCD30への結合である。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの、全長ヒトCD30 (A)又はアカゲザルCD30 (B)で一過性トランスフェクトされたHEK293細胞への結合を、フローサイトメトリーによって評価した。bsG1-huCD3-FEALxb12-FERRを陰性対照として含めた。示されるデータは、1つの代表的な実験についての、フローサイトメトリーによって決定される平均蛍光強度(MFI)値である。

【図12】bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRのT細胞及び腫瘍細胞への同時結合である。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの、蛍光標識された腫瘍細胞及びナイーブT細胞への同時結合を、フローサイトメトリーによって研究した。(A) 二重陽性事象は、 $6 \times 10^{-5} \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ のbsG1huCD3FEALxCD30-MDX060-FERR又は対照抗体bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR、bsG1b12FEALxCD30MDX060-FERR、若しくはIgG1-b12-FEALの存在下での全生存細胞のパーセンテージとして示される。抗体なしでインキュベートされた試料中の二重陽性事象のパーセンテージを点線で示す。(B) $0.12 \mu\text{g}/\text{mL}$ のbsG1huCD3FEALxCD30-MDX060-FERRでインキュベートされた試料中の二重陽性細胞のゲーティング戦略の例。

40

50

【図13】CD3×CD30二重特異性抗体によるインビトロでのT細胞媒介性細胞傷害性及びT細胞活性化の誘導である。CD3×CD30二重特異性抗体のパネルを、CD30陽性腫瘍細胞株Karpas-299を標的細胞として、健常なヒトドナーバフィーコートから精製されたT細胞をエフェクター細胞として使用したインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。これらのアッセイでは、CD25発現をT細胞活性化の尺度としてCD4⁺及びCD8⁺細胞において評価した。以下の抗体を試験した：bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR、BsIgG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR、bsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR、及びbsIgG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR。(A)CD3xCD30抗体によるKarpas-299細胞の細胞傷害性のIC₅₀値。(B)試験抗体によるKarpas-299細胞の最大細胞傷害性のパーセンテージ。(C-F)CD3×CD30抗体によるCD4⁺(C、E)又はCD8⁺(D、F)T細胞におけるCD25(C-D)又はPD-1(E-F)発現の誘導についてのEC₅₀値。データは、6つの異なるドナーから得られたT細胞で行われた2つの独立した実験から得た。統計的値は、示されるクローンとbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRとの間のWilcoxon符号付順位和検定の結果を表す。NS：有意ではない、*：p<0.05。

【図14】bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによるインビトロでの細胞株のT細胞媒介性細胞傷害性。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによる用量依存的T細胞媒介性細胞傷害性を、L-428(A)、KM-H2(B)、SUP-M2(C)、又はKIE-JK(D)腫瘍細胞株を標的細胞として、精製されたT細胞をエフェクター細胞として用いてインビトロで試験した。IgG1-huCD3-FEAL、bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR、及びIgG1-b12-FEALを対照として含めた。示されるデータは、生存細胞パーセンテージであり、各グラフについてのデータは、1つの代表的な実験について得られた。

【図15】L-428及びKIE-JK細胞株におけるbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによるインビトロでのT細胞増殖である。T細胞増殖を、L-428(A、B)又はKIE-JK(C、D)を標的細胞として使用したT細胞媒介性細胞傷害性アッセイにおいて評価した。希釈されたCelltrace Violet染色を有するCD4⁺(A、C)又はCD8⁺(B、D)T細胞をゲーティングし、増殖指数を、T細胞増殖についての尺度として、FlowJoからの増殖モデリングツールを使用して計算した。

【図16】L-428及びKIE-JK細胞株におけるbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによるインビトロでのT細胞活性化マーカーCD69の発現である。T細胞活性化を、L-428(A、B)又はKIE-JK(C、D)を標的細胞として使用したT細胞媒介性細胞傷害性アッセイにおいて評価した。T細胞活性化マーカーCD69の発現を、CD4⁺(A、C)又はCD8⁺(B、D)T細胞において評価した。

【図17】L-428及びKIE-JK細胞株におけるbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによるインビトロでのT細胞活性化マーカーCD25の発現である。T細胞活性化を、L-428(A、B)又はKIE-JK(C、D)を標的細胞として使用したT細胞媒介性細胞傷害性アッセイにおいて評価した。T細胞活性化マーカーCD25の発現を、CD4⁺(A、C)又はCD8⁺(B、D)T細胞において評価した。

【図18】L-428及びK1-JK細胞株におけるb s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R RによるインビトロでのT細胞活性化マーカーPD-1の発現である。T細胞活性化を、L-428 (A、B) 又はK1-JK (C、D) を標的細胞として使用したT細胞媒介性細胞傷害性アッセイにおいて評価した。T細胞活性化マーカーPD-1の発現を、CD4⁺ (A、C) 又はCD8⁺ (B、D) T細胞において評価した。

【図19】b s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R Rによるインビトロでのサイトカイン及びグランザイムB産生である。14の異なるサイトカイン (CD40、IFN γ 、IL-10、IL-12、IL-13、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IP-10、MCP-1、PDL-1、INF α) 及びグランザイムBの濃度を、L-428を標的細胞として使用したインビトロT細胞媒介性細胞傷害性実験中に収集された上清において評価した。サイトカイン及びグランザイムB濃度を、異なる濃度のb s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R又は対照抗体I g G 1-b 1 2-F E A Lで処理された試料について示す。

【図20】変動するエフェクター対標的比でのb s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R RによるインビトロでのT細胞媒介性細胞傷害性及びT細胞増殖である。(A) b s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R Rによる用量依存的T細胞媒介性細胞傷害性を、L-428腫瘍細胞を標的細胞として、精製されたT細胞をエフェクター細胞として1:1、2:1、4:1、又は8:1のE:T比で使用して、インビトロで試験した。b s G 1-h u C D 3-F E A L x b 1 2-F E R Rを対照抗体として含めた。示されるデータは、1つの代表的な実験から得られた、生存細胞パーセンテージである。(B、C) 希釈されたCelltrace Violet染色を有するCD4⁺ (B) 又はCD8⁺ (C) T細胞のパーセンテージを、増殖するT細胞の尺度として示す。

【図21】b s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R RによるインビトロでのT細胞媒介性細胞傷害性及びT細胞増殖の動態である。(A) b s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R RによるT細胞媒介性細胞傷害性の動態を、L-428腫瘍細胞を標的細胞として、精製されたT細胞をエフェクター細胞として4:1のE:T比で使用して、インビトロで試験した。細胞傷害性を、24時間、48時間、及び72時間後に評価した。b s G 1-h u C D 3-F E A L x b 1 2-F E R Rを対照抗体として含めた。示されるデータは、1つの代表的な実験から得られた、生存細胞パーセンテージである。(B、C) 希釈されたCelltrace Violet染色を有するCD4⁺ (B) 又はCD8⁺ (C) T細胞をゲーティングし、増殖指数を、細胞傷害性アッセイにおけるT細胞増殖についての尺度として、FlowJoからの増殖モデリングツールを使用して計算した。

【図22】b s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R RによるインビトロでのT細胞媒介性細胞傷害性及びCD30発現レベルとの相関である。b s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R Rによる最大T細胞媒介性殺滅 (A) 又はT細胞媒介性細胞傷害性のIC₅₀濃度 (B) 対CD30発現レベル間の相関を、8つの腫瘍細胞株において評価した。Spearman順位相関検定 (GraphPad Prismソフトウェア) を使用して、T細胞媒介性細胞傷害性 (最大殺滅又はIC₅₀) とCD30発現との間の相関度の統計的有意性を評価した。

【図23】b s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R Rによる活性化されたT細胞のフラトリサイドである。単離された健常ドナーT細胞を、1 μ g/mLの抗CD3 (OKT-3)、1 μ g/mLの抗CD28、及び0.025 μ g/mLのIL-15で4日間刺激した。活性化 (CD25上方調節) の確認後、T細胞を、増加する濃度のb s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R、b s I g G 1-c t r l x C D 3 0-M D X - 0 6 0-F E R R、b s I g G 1-CD3 x b 1 2、又はI g G 1-b 1 2-F E A Lで48時間インキュベートした。活性化されたCD30⁺T細胞のB s G 1-h u C D 3-F E A L x C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R

10

20

30

40

50

誘導性T細胞フラトリサイドを、いずれの抗体も加えることのない条件における生存T細胞の数に対する各条件における生存T細胞のパーセンテージとして測定した。(A-B)抗CD3、抗CD28、及びIL-15による刺激の72時間後及び96時間後の、CD4⁺又はCD8⁺T細胞中のCD25⁺(A)又はCD30⁺(B)細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーによって決定した。(C)T細胞フラトリサイドは、いずれの抗体も加えることのない条件に対するT細胞生存パーセントとして示された。1つの代表的なT細胞ドナーについてのデータを示す。

【図24】CD30⁺細胞培養物の上清中の可溶性CD30、及びBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの抗腫瘍活性へのその干渉である。(A)ELISAによって測定される、異なる血液腫瘍細胞株の上清中の可溶性CD30(sCD30)濃度を示す。(B)異なる血液腫瘍細胞株において、定量的フローサイトメトリー(ヒトIgGキャリブレーションキット-Biocyte)を使用して決定される、sCD30濃度と細胞表面上のCD30分子の数との間の相関を、Spearman順位相関検定(GraphPad Prismソフトウェア)によって評価した。(C)BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRを、CD30陽性ALCL腫瘍細胞株DELを標的細胞として、健常ドナー単離T細胞をエフェクター細胞として用いたインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。以下の対照抗体が含まれた: BsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、BsG1-huCD3-FEALxb12-FERR、IgG1-huCD30-FEAL、及びIgG1-b12-FEAL。示されるデータは、1つの代表的な実験から得られた、生存細胞パーセンテージである。

【図25】L-428腫瘍細胞におけるBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによるエクスピボでのT細胞媒介性細胞傷害性及びT細胞増殖の誘導である。(A)BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRを、L-428腫瘍細胞を標的細胞として、初代患者由来T細胞をエフェクター細胞として使用したエクスピボ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。ホジキンリンパ腫(HL)、急性骨髄性白血病(AML)、及び末梢T細胞リンパ腫(PTCL)患者由来の末梢血単核細胞(PBMC)を、T細胞の供給源として使用して、CD3依存的腫瘍細胞殺滅を評価した。IgG1-b12-FEALを対照として含めた。示されるデータは、生存標的細胞パーセンテージである。(B-D)T細胞活性化を、陽性細胞パーセンテージとして示される、PBMCサブセット内のCD4⁺/CD8⁺T細胞上のCD69(B)、CD25(C)、及びPD-1(D)マーカーの上方調節によって評価した。

【図26】SCIDマウスにおける静脈内注射後のBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの血漿濃度である。SCIDマウスに、10μg(0.5mg/kg)又は100μg(5mg/kg)の単回IV用量のBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRを注射した。(A)総ヒトIgGをELISAによって決定し、平均ヒトIgG1濃度を経時的にプロットした。(B)平均クリアランス率を、0.5又は5mg/kg用量レベルについてプロットした。点線は、マウスにおける非結合通常ヒトIgG1の標準分布体積に基づく推定クリアランス率を示す。

【図27】膜結合BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRへのC1q結合である。C1qのBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR-オプソニン化、活性化ヒトCD8⁺T細胞、又はCD30⁺NCEB-1細胞への結合を、FITC標識ウサギ抗C1q抗体を使用してフローサイトメトリーによって評価した。(A)C1qの供給源としての正常ヒト血清の存在下での、抗CD3/CD28ビーズで刺激されたヒトCD8⁺T細胞への、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL、又は陽性対照抗体IgG1-CD52-E430Gの結合。示されるデータは、1つの代表的な実験からの複製ウェルからの幾何平均蛍光強度(gMFI)±SDである。(B)C1qの供給源としての正常ヒト血清の存在下での、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、又は陽性対照

10

20

30

40

50

抗体 I g G 1 - 7 D 8 - E 4 3 0 G の C D 3 0 + N C E B - 1 細胞への結合。示されるデータは、1つの代表的な実験からの g M F I である。

【発明を実施するための形態】

【0020】

定義

本明細書で使用される「抗体」という用語は、少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、少なくとも約24時間以上、少なくとも約48時間以上、少なくとも約3、4、5、6、7日以上などの、重要な期間、又は任意の他の関連する機能的に定義された期間（抗原に結合する抗体と関連した生理学的応答を誘導、促進、増強、及び／若しくは調節するのに十分な時間、並びに／又は抗体が内在化されるのに十分な時間など）の半減期を有する、典型的な生理学的及び／又は腫瘍特異的条件下で、抗原に特異的に結合する能力を有する、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子のフラグメント、又はそれらのいずれかの誘導体を指すことを意図している。抗体は、抗原と相互作用することができる結合領域（又は両方とも同じ意味を有する、本明細書において使用され得る結合領域）、免疫グロブリン分子の重鎖及び軽鎖の両方の可変領域を含む結合領域などを含む。抗体は、免疫系の様々な細胞（エフェクター細胞など）及び補体系の成分、例えば、C1q、補体活性化の古典的経路における第1の成分を含む、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る抗体（Ab）の定常領域を含み得る。

【0021】

本発明の文脈において、「抗体」という用語は、モノクローナル抗体（mAb）、抗体様ポリペプチド、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、並びに酵素的切断、ペプチド合成、及び組換えDNA技術などの、任意の既知の技法によって提供される抗原（抗原結合フラグメント）に特異的に結合する能力を保持する「抗体フラグメント」又は「そのフラグメント」を含む。「抗体」という用語は、二重、三重、若しくは多重特異性抗体、及び／又は更なる修飾を有する抗体、例えば、抗体-薬物複合体及び／又はIgG Fcドメインに修飾を有する抗体を含む。本明細書における本開示が別途限定されない限り、本発明に従って定義される抗体は、任意のアイソタイプを保有するか、又はアイソタイプを有さない（例えば、scFv抗体）ことができる。

【0022】

抗体の抗原結合機能は、全長抗体のフラグメントによって行われ得ることが示されている。「抗体」という用語内に包含される結合フラグメントの例としては、(i) Fab' 若しくはFabフラグメント、軽鎖可変ドメイン（VL）、重鎖可変ドメイン（VH）、軽鎖定常領域（CL）、及び重鎖定常領域ドメイン1（CH1）ドメインからなる一価フラグメント、又はWO2007/059782に記載される一価抗体、(ii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント、(iii) VH及びCH1ドメインから本質的になるFdフラグメント、(iv) 抗体の単一アームのVL及びVHドメインから本質的になるFvフラグメント、(v) VHドメインから本質的になり、ドメイン抗体とも呼ばれるHolt et al.; Trends Biotechnol., 2003 Nov; 21(11): 484-90、dAbフラグメントWard et al., Nature 341, 544546 (1989)、(vi) ラクダ科動物又はナノボディRevets et al.; Expert Opin Biol Ther., 2005 Jan; 5(1): 111-24、並びに(vii) 単離された相補性決定領域（CDR）が挙げられる。更に、Fvフラグメントの2つのドメイン、VL及びVHは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、それらが、VL及びVH領域が一価分子（一本鎖抗体又は一本鎖Fv（scFv）として知られる）を形成するために対合する単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって結合され得、例えば、Revets et al.; Expert Opin Biol Ther., 2005 Jan; 5(1): 111-24及びBird et al., Science 242, 42

3 4 2 6 (1 9 8 8) を参照されたい。そのような一本鎖抗体は、別段に記載されない限り、又は文脈によって明確に示されない限り、抗体という用語内に包含される。そのようなフラグメントは、一般に、抗体の意味内に含まれるが、それらは、集合的に、及び各々独立して、本発明の独自の特徴であり、異なる生物学的特性及び有用性を示す。本発明の文脈におけるこれらの及び他の有用な抗体フラグメントは、本明細書において更に論じられる。

【 0 0 2 3 】

最終産物として、又は例えば、二重特異性抗体を制御された F a b -アーム交換 (c F E A) を通して生成するための中間体としてのいずれかの、抗体は、異なるインビトロ又はエクスピボ発現又は産生システムにおいて産生され、それらから、例えば、組換え修飾宿主細胞から、抗体をコードする核酸配列のインビトロ転写及び／又は翻訳を支持する細胞抽出物を使用するハイブリドーマ又はシステムから収集され得る。

【 0 0 2 4 】

本明細書で使用される「免疫グロブリン重鎖」又は「免疫グロブリンの重鎖」という用語は、免疫グロブリンの重鎖のうちの1つを指すことが意図されている。重鎖は、典型的には、重鎖可変領域 (本明細書では V H と略される) 及び免疫グロブリンのアイソタイプを定義する重鎖定常領域 (本明細書では C H と略される) からなる。I g G の重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、C H 1、C H 2、及び C H 3 で構成される。本明細書で使用される「免疫グロブリン」という用語は、典型的には、2対のポリペプチド鎖、1対の軽 (L) 低分子量鎖、及び1対の重 (H) 鎖からなる構造的に関連する糖タンパク質のクラスを指すことが意図され、4つは全てジスルフィド結合によって潜在的に相互接続される。免疫グロブリンの構造は、十分に特徴付けられている (例えば、F u n d a m e n t a l I m m u n o l o g y C h . 7 (P a u l , W . , e d . , 2 n d e d . R a v e n P r e s s , N . Y . (1 9 8 9) を参照されたい)。免疫グロブリンの構造内では、2つの重鎖は、いわゆる「ヒンジ領域」におけるジスルフィド結合を介して相互接続されている。重鎖と同等に、各軽鎖は、典型的には、いくつかの領域、軽鎖可変領域 (本明細書では V L と略される) 及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメイン、C L で構成される。更に、V H 及び V L 領域は、フレームワーク領域 (F R) と称される、より保存された領域が散在している、相補性決定領域 (C D R) とも称される、超可変性の領域 (又は配列及び／若しくは構造的に定義されたループの形態において超可変性であり得る超可変領域) に更に細分化され得る。各 V H 及び V L は、典型的には、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配置された、3つの C D R 及び4つの F R で構成される: F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。

【 0 0 2 5 】

本明細書で使用されるとき、「半分子」、「F a b -アーム」、及び「アーム」という用語は、1つの重鎖-軽鎖対を指す。二重特異性抗体が、第1の抗体「に由来する」半分子抗体、及び第2の抗体「に由来する」半分子抗体を含むと記載されるとき、「～に由来する」という用語は、二重特異性抗体が、任意の既知の方法によって、当該第1及び第2の抗体の各々からの当該半分子を、得られる二重特異性抗体に組換えることによって生成されたことを示す。この文脈において、「組換えること」は、任意の特定の組換え方法によって限定されることを意図するものではなく、よって、例えば、半分子交換によって組換えること、並びに核酸レベルで、及び／又は同じ細胞における2つの半分子の共発現を通して組換えることを含む、本明細書に記載される二重特異性抗体を産生するための方法のうちの全てを含む。

【 0 0 2 6 】

「第1」及び「第2」という用語は、抗体又はそのドメイン若しくは領域の文脈で本明細書において使用されるとき、単に参照しやすいように意図されており、特定の相対位置などを示すことは意図されない。

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される「抗原結合領域」又は「結合領域」という用語は、抗原に結合することができる抗体の領域を指す。抗原は、ポリペプチド、タンパク質、多糖、又はそれらの組み合わせなどの、任意の分子であり得る。抗原は、例えば、細胞、細菌、又はビリオン上に提示され得る。「抗原」及び「標的」という用語は、文脈によって矛盾しない限り、本発明の文脈において交換可能に使用され得る。「抗原結合領域」及び「抗原結合部位」という用語は、文脈によって矛盾しない限り、本発明の文脈において交換可能に使用され得る。

【0028】

本明細書で使用される「 K_D 」(M)という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の平衡解離定数を指し、 k_d を k_a で割ることによって得られる。 K_D はまた、「結合親和性」と称される。

10

【0029】

本明細書で使用される「 k_d 」(sec^{-1})という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。当該値は、 k_{off} 値又はオフレートとも称される。

【0030】

本明細書で使用される「 k_a 」($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$)という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数を指す。当該値は、 k_{on} 値又はオンレートとも称される。

【0031】

本明細書で使用される「結合」という用語は、抗体の、所定の抗原又は標的への、典型的には、抗体をリガンドとして、抗原を分析物として使用するバイオレイヤー干渉法によって決定されるとき、 $1 \text{E}^{-6} \text{M}$ 以下、例えば、 $5 \text{E}^{-7} \text{M}$ 以下、 $1 \text{E}^{-7} \text{M}$ 以下、例えば、 $5 \text{E}^{-8} \text{M}$ 以下、例えば、 $1 \text{E}^{-8} \text{M}$ 以下、例えば、 $5 \text{E}^{-9} \text{M}$ 以下、例えば、 $1 \text{E}^{-9} \text{M}$ 以下、例えば、 $1 \text{E}^{-10} \text{M}$ 以下、又は例えば、 $1 \text{E}^{-11} \text{M}$ 以下の K_D に対応する結合親和性での結合を指し、所定の抗原に、所定の抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)又は密接に関連する抗原への結合についてのその親和性よりも少なくとも10倍低い、例えば、少なくとも100倍低い、例えば、少なくとも1,000倍低い、例えば、少なくとも10,000倍低い、例えば、少なくとも100,000倍低い K_D に対応する親和性で結合する。

20

【0032】

本明細書で使用される「CD30」という用語は、TNFRSF8(腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー8)としても知られる、ヒト分化抗原群30タンパク質を指す。CD30は、様々な種において見出され、よって、「CD30」という用語は、文脈によって矛盾しない限り、ヒトCD30に限定されない場合がある。ヒトCD30の配列は、配列番号39に記載されている。

30

【0033】

本明細書で使用される「CD3」という用語は、T細胞共受容体タンパク質複合体の一部であり、4つの異なる鎖で構成されるヒト分化抗原群3タンパク質を指す。CD3は、様々な種において見出され、よって、「CD3」という用語は、文脈によって矛盾しない限り、ヒトCD3に限定されない場合がある。哺乳動物において、複合体は、CD3 γ (ガンマ)鎖(ヒトCD3 γ 鎖UniProtKB/Swiss-Prot No P09693、又はカニクイザルCD3 γ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI7)、CD3 δ (デルタ)鎖(ヒトCD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No P04234、又はカニクイザルCD3 δ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI8)、2つのCD3 ϵ (イプシロン)鎖(ヒトCD3 ϵ :UniProtKB/Swiss-Prot No P07766、このうち本明細書における配列は配列番号42として組み込まれ、カニクイザルCD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No Q95LI5、又はアカゲザルCD3 ϵ UniProtKB/Swiss-Prot No G7NCB9)、及びCD3 ζ 鎖(ゼータ)鎖(ヒトCD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot No P20963、カニクイザルCD3 ζ UniProtKB/Swiss-Prot No Q09TK0)を含

40

50

む。これらの鎖は、T細胞受容体（TCR）として知られる分子と会合し、Tリンパ球において活性化シグナルを生成する。TCR及びCD3分子は、一緒に、TCR複合体を含む。

【0034】

「抗体結合領域」という用語は、抗体が結合するエピトープを含む、抗原の領域を指す。抗体結合領域は、バイオレイヤー干渉法を使用したエピトープビニングによって、アラニンスキャンによって、又はドメインシャッフルアッセイ（抗原の領域が別の種の領域と交換される抗原構築物を使用し、抗体が依然として抗原に結合するかどうかを決定する）によって決定され得る。抗体との相互作用に關与する抗体結合領域内のアミノ酸は、水素／重水素交換質量分析によって及び／又はその抗原に結合した抗体の結晶学によって決定され得る。

10

【0035】

「エピトープ」という用語は、抗体によって特異的に結合した抗原決定基を意味する。エピトープは、通常、アミノ酸、糖側鎖、又はそれらの組み合わせなどの分子の表面群化からなり、通常、特異的三次元構造特徴、及び特異的電荷特徴を有する。立体構造及び非立体構造エピトープは、前者への結合は、タンパク質又はその多量体の三次元構造を破壊する変性溶媒又は他の薬剤の存在下で失われるが、後者への結合は失われないという点で区別される。エピトープは、結合に直接關与するアミノ酸残基、及び結合に直接關与しない他のアミノ酸残基、例えば、抗体が抗原に結合しているときに効果的にブロック又はカバーされるアミノ酸残基を含み得る。

20

【0036】

「モノクローナル抗体」、「モノクローナルAb」、「モノクローナル抗体組成物」、「mAb」などの用語は、本明細書で使用される場合、単一分子組成の抗体分子の調製物を指し、典型的には、特定のエピトープについて単一の結合特異性及び親和性を示す。モノクローナル抗体は、典型的には、例えば、ハイブリドーマ、安定細胞株などのような、ユニークな親細胞の全てのクローンである同一の細胞によって作製され得る。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変及び定常領域を有する単一結合特異性を示す抗体を指す。ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合した、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック又はトランス染色体非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られたB細胞を含むハイブリドーマによって產生され得る。ヒトモノクローナル抗体は、ヒトB細胞又は形質細胞に由来し得る。モノクローナル抗体はまた、組換え修飾された宿主細胞、又は抗体をコードする核酸配列のインビトロ転写及び／若しくは翻訳を支持する細胞抽出物を使用するシステムから產生され得る。

30

【0037】

本明細書で使用される「アイソタイプ」という用語は、免疫グロブリンクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、若しくはIgM）、又は重鎖定常領域遺伝子によってコードされるIgG1m(z a)及びIgG1m(f)などの、それらの任意のアロタイプを指す。更に、各重鎖アイソタイプは、カップ(k)又はラムダ(λ)軽鎖のいずれかと組み合わせることができる。

40

【0038】

「全長抗体」という用語は、本明細書で使用されるとき、1対の重鎖及び軽鎖、又は2対の重鎖及び軽鎖を含み、各対が、そのアイソタイプの野生型抗体の重鎖－軽鎖対に通常見られるような重鎖及び軽鎖定常及び可変ドメインを含む、抗体（例えば、親抗体又はバリエーション抗体）を指す。よって、例えば、全長IgG1抗体は、VH、CH1、CH2、CH3、ヒンジ、VL、及びCLドメインを含有する。全長バリエーション抗体において、重鎖及び軽鎖定常及び可変ドメインは、特に、全長親又は野生型抗体と比較されるとき、抗体の機能的特性を修飾及び／又は改善するアミノ酸置換を含有し得る。本発明による全長抗体は、(i) CDR配列を、完全な重鎖及び軽鎖配列を含む1つ以上の好適なベクターにクローニングするステップと、(ii) 好適な発現系において重鎖及び軽鎖配列を有す

50

る得られた好適なベクターを発現するステップと、を含む方法によって産生され得る。C D R 配列又は完全可変領域配列のいずれかから開始するとき、全長抗体を産生することは、当業者の知識の範囲内である。よって、当業者は、本発明による全長抗体を生成する方法を知っている。

【0039】

本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語は、ヒト可変ドメインに対する高レベルの配列相同性を含有するように修飾されたヒト抗体定常ドメイン及び非ヒト可変ドメインを含有する、遺伝子操作された非ヒト抗体を指す。これは、一緒に抗原結合部位を形成する、非ヒト抗体相補性決定領域（C D R）の、相同ヒトアクセプターフレームワーク領域（F R）上への移植によって達成することができる（とりわけ、W O 9 2 / 2 2 6 5 3 及び E P 0 6 2 9 2 4 0 を参照されたい）。親抗体の結合親和性及び特異性を完全に再構成するために、親抗体（すなわち、非ヒト抗体）からのフレームワーク残基のいくつかでのヒトフレームワーク残基のいくつかの置換（逆変異）が必要とされ得る。構造的相同性モデリングは、抗体の結合特性にとって重要なフレームワーク領域におけるアミノ酸残基を特定するために役立ち得る。よって、ヒト化抗体は、非ヒト C D R 配列、主に非ヒトアミノ酸配列への1つ以上のアミノ酸逆変異を任意に含むヒトフレームワーク領域、及び完全ヒト定常領域を含み得る。任意に、必ずしも逆変異ではない、追加のアミノ酸修飾は、特に有用な親和性及び生化学的特性などの、好ましい特徴を有するヒト化抗体を得るために、例えば、脱アミド化を回避及び／又は製造を改善する修飾を含むために適用され得る。更に、C D R 及び／又はフレームワーク領域は、例えば、親和性成熟手順を介して、抗原に対する親和性を改善するように修飾され得る。

【0040】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を指す。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダム若しくは部位特異的変異誘発によって、又はインビボでの体細胞変異によって導入される変異）を含み得る。しかしながら、本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来する C D R 配列がヒトフレームワーク配列上に移植されている抗体を含むことを意図していない。本発明のヒトモノクローナル抗体は、従来のモノクローナル抗体方法論、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975) の標準体細胞ハイブリダイゼーション技法を含む、様々な技法によって産生することができる。体細胞ハイブリダイゼーション手順が好ましいが、原則として、モノクローナル抗体を産生するための他の技法、例えば、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを使用する B リンパ球又はファージディスプレイ技法のウイルス又はがん原性形質転換を用いることができる。ヒトモノクローナル抗体は、H C o 1 2 マウス（例えば、W O 0 3 / 0 5 9 2 8 2 を参照されたい）などのような、マウス系ではなく、ヒト免疫系の一部を担持するトランスジェニック又はトランス染色体マウスを用いて生成することができる。

【0041】

本明細書で使用される「F c 領域」という用語は、抗体の2つの重鎖ポリペプチドのN末端からC末端への方で、少なくともヒンジ領域、C H 2 領域、及び C H 3 領域を含む領域を指す。F c ポリペプチドは、典型的には、グリコシル化される。抗体の F c 領域は、免疫系の様々な細胞（エフェクター細胞など）及び補体系の成分を含む、宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。F c 領域は、典型的には、F c R n 及びタンパク質 A にも結合する。

【0042】

本明細書で使用される、「…位のアミノ酸に対応するアミノ酸」などの語句は、ヒト I g G 1 重鎖におけるアミノ酸位置番号を指す。他の免疫グロブリンにおける対応するアミノ酸位置は、ヒト I g G 1 とのアラインメントによって見出され得る。別段の記載がない限り、又は文脈によって矛盾しない限り、定常領域配列のアミノ酸は、本明細書では、E

Uーインデックスのナンバリングに従って番号付けされる (Kabat, E. A. et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition—US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662, 680, 689に記載される)。よって、別の配列におけるアミノ酸又はセグメント「に対応する」1つの配列におけるアミノ酸又はセグメントは、他のアミノ酸又はセグメントと、ALIGN、ClustalW、又は類似物などの標準配列アラインメントプログラムを、典型的にはデフォルト設定で使ってアラインし、ヒトIgG1重鎖に対して少なくとも50%、少なくとも80%、少なくとも90%、又は少なくとも95%の同一性を有するものである。当該技術分野では、配列又は配列中のセグメントをアラインし、それによって、本発明によるアミノ酸位置に対する配列における対応する位置を決定する方法は、周知であると考えられている。

【0043】

本明細書で使用される「ヒンジ領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指す。よって、例えば、ヒトIgG1抗体のヒンジ領域は、Kabat, E. A. et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition—US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662, 680, 689 (1991)に記載されるEuナンバリングに従ってアミノ酸216-230に対応する。しかしながら、ヒンジ領域はまた、本明細書に記載される他のサブタイプのいずれかであり得る。

【0044】

本明細書で使用される「CH1領域」又は「CH1ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のCH1領域を指す。よって、例えば、ヒトIgG1抗体のCH1領域は、Kabat (同上)に記載されるEuナンバリングに従ってアミノ酸118~215に対応する。しかしながら、CH1領域はまた、本明細書に記載される他のサブタイプのいずれかであり得る。

【0045】

本明細書で使用される「CH2領域」又は「CH2ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のCH2領域を指す。よって、例えば、ヒトIgG1抗体のCH2領域は、Kabat (同上)に記載されるEuナンバリングに従ってアミノ酸231~340に対応する。しかしながら、CH2領域はまた、本明細書に記載される他のサブタイプのいずれかであり得る。

【0046】

本明細書で使用される「CH3領域」又は「CH3ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のCH3領域を指す。よって、例えば、ヒトIgG1抗体のCH3領域は、Kabat (同上)に記載されるEuナンバリングに従ってアミノ酸341~447に対応する。しかしながら、CH3領域はまた、本明細書に記載される他のサブタイプのいずれかであり得る。

【0047】

本明細書で使用される、「Fc媒介性エフェクター機能」という用語は、Fc媒介性エフェクター機能がポリペプチド又は抗体のFc領域に起因する、ポリペプチド又は抗体を細胞膜上のその標的又は抗原に結合させた結果である機能を指すことが意図される。Fc媒介性エフェクター機能の例としては、(i) C1q結合、(ii) 補体活性化、(iii) 補体依存的細胞傷害性(CDC)、(iv) 抗体依存的細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)、(v) Fc-ガンマ受容体(FcγR)結合、(vi) 抗体依存的、FcγR媒介性抗原架橋、(vii) 抗体依存的細胞食作用(ADCP)、(viii) 補体依存的細胞傷害性(CDCC)、(ix) 補体増強性細胞傷害性、(x) 抗体によって媒介されるオプソニン化抗体の補体受容体への結合、(xi) オプソニン化、及び(xii) (i) ~ (xi) のいずれかの組み合わせが挙げられる。

【0048】

本明細書で使用される、「不活性 (inertness)」、「不活性 (inert)」又は「非活性化」という用語は、任意のFcγRに結合することができないか、若しくは任意のFcγRに結合し、FcγRのFc媒介性架橋を誘導し、ADCC及びADCPなどのFcγR媒介性エフェクター機能を誘導し、個々の抗体の2つのFc領域を介して標的抗原のFcγR媒介性架橋を誘導する最小限の能力を有し、かつ／又はC1qに結合し、CDC及びCDCCなどの補体媒介性エフェクター機能を誘導することができないFc領域を指す。抗体のFc領域の不活性は、単一特異性又は二重特異性フォーマットで抗体を使用して試験され得る。

【0049】

「一価抗体」という用語は、本発明の文脈において、1つの抗原結合ドメイン（例えば、1つのFabアーム）のみを有する、抗原と相互作用することができる抗体分子を指す。二重特異性などの、多重特異性抗体の文脈では、「一価抗体結合」は、多重特異性抗体の、1つの抗原結合ドメイン（例えば、1つのFabアーム）のみを有する1つの抗原への結合を指す。

【0050】

本発明の文脈における「単一特異性抗体」という用語は、1つの抗原、1つのエピトープのみに対する結合特異性を有する抗体を指す。抗体は、単一特異性、一価抗体（すなわち、1つの抗原結合領域のみを保有する）、単一特異性、二価抗体（例えば、2つの同一の抗原結合領域を有する抗体）、又は単一特異性、多価抗体（例えば、3つ以上の同一の抗原結合領域を有する抗体）であり得る。

【0051】

「多重特異性抗体」という用語は、2つ以上の異なるエピトープに結合する2つ以上の抗原結合ドメインを有する抗体を指す。「二重特異性抗体」という用語は、異なるエピトープに結合する2つの抗原結合ドメイン、例えば、VH及びVL領域の2つの非同一对、2つの非同Fabアーム、又は非同CDR領域を有する2つのFabアームを有する抗体を指す。本発明の文脈において、二重特異性及び多重特異性抗体は、それぞれ、2つ以上の異なるエピトープについての特異性を有する。そのようなエピトープは、同じ又は異なる抗原又は標的上にあり得る。エピトープが異なる抗原上にある場合、そのような抗原は、細胞外マトリックス又はベシクル及び可溶性タンパク質などの同じ細胞又は異なる細胞、細胞型、又は構造上にあり得る。よって、多重特異性及び二重特異性抗体は、複数の抗原、例えば、2つの異なる細胞を架橋することができる場合がある。

【0052】

「二価抗体」という用語は、2つの抗原結合領域を有する抗体を指し、当該抗原結合領域は、同一であり、同じエピトープに結合し得るか、又はそれらは、非同一であり、同じ若しくは異なる抗原上にあり得る異なるエピトープに結合し得る。したがって、二価抗体は、単一特異性抗体又は二重特異性抗体であり得る。

【0053】

本明細書では、「アミノ酸」及び「アミノ酸残基」という用語は、互換的に使用され得、限定的に理解されるものではない。アミノ酸は、各アミノ酸に特異的な側鎖（R基）とともに、アミン（-NH₂）及びカルボキシル（-COOH）官能基を含有する有機化合物である。本発明の文脈において、アミノ酸は、構造及び化学的特徴分析に基づいて分類され得る。よって、アミノ酸のクラスは、以下の表の一方又は両方において反映され得る：

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1

R 基の構造及び一般的な化学的特徴分析に基づく主な分類

クラス	アミノ酸
酸性残基	D 及び E
塩基性残基	K、R、及び H
親水性非荷電残基	S、T、N、及び Q
脂肪族非荷電残基	G、A、V、L、及び I
非極性非荷電残基	C、M、及び P
芳香族残基	F、Y、及び W

10

【表 2】

表 2

アミノ酸残基の代替物理的及び機能的分類

クラス	アミノ酸
ヒドロキシル基含有残基	S 及び T
脂肪族残基	I、L、V、及び M
シクロアルケニル会合残基	F、H、W、及び Y
疎水性残基	A、C、F、G、H、I、L、 M、R、T、V、W、及び Y
負荷電残基	D 及び E
極性残基	C、D、E、H、K、N、Q、 R、S、及び T
正荷電残基	H、K、及び R
小さい残基	A、C、D、G、N、P、S、 T、及び V
非常に小さい残基	A、G、及び S
ターン形成に関与する残基	A、C、D、E、G、H、K、 N、Q、R、S、P、及び T
柔軟性残基	Q、T、K、S、G、P、D、 E、及び R

20

30

40

【0054】

あるアミノ酸の別のアミノ酸への置換は、保存的置換又は非保存的置換として分類され得る。本発明の文脈において、「保存的置換」は、1つのアミノ酸の、類似の構造及び／又は化学的特徴を有する別のアミノ酸での置換であり、1つのアミノ酸残基の、上記2つの表のいずれかで定義される同じクラスの別のアミノ酸残基についてのそのような置換：例えば、保存的置換は、両方とも脂肪族、分岐疎水性であるため、ロイシンのイソロイシンでの置換であり得る。同様に、保存的置換の一例は、両方とも小さい負荷電残基であるため、アスパラギン酸のグルタミン酸での置換である。

【0055】

本発明の文脈において、抗体における置換は、元のアミノ酸－位置の数－置換アミノ酸

50

として示される。

【0056】

アミノ酸について周知の命名法を参照すると、任意のアミノ酸残基を示すために、コード「Xaa」又は「X」を含む、3文字コード、又は1文字コードが使用される。よって、Xaa又はXは、典型的には、20の天然に存在するアミノ酸のいずれかを表し得る。本明細書で使用される「天然に存在する」という用語は、以下のアミノ酸残基：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、及びシステインのうちのいずれか1つを指す。

10

【0057】

したがって、「K409R」又は「Lys409Arg」という表記は、抗体がアミノ酸位置409にあるリジンのアルギニンでの置換を含むことを意味する。所与の位置におけるアミノ酸の、任意の他のアミノ酸への置換は、元のアミノ酸一位置、又は例えば、「K409」と称される。元のアミノ酸及び／又は置換されたアミノ酸が2つ以上であるが、全てではないアミノ酸を含み得る修飾について、2つ以上のアミノ酸は、「，」又は「／」によって分離され得る。例えば、409位のリジンの、アルギニン、アラニン又はフェニルアラニンでの置換は、「Lys409Arg、Ala、Phe」又は「Lys409Arg／Ala／Phe」又は「K409R、A、F」又は「K409R／A／F」又は「K409～R、A、若しくはF」である。そのような呼称は、本発明の文脈において交換可能に使用され得るが、同じ意味及び目的を有し得る。

20

【0058】

更に、「置換」という用語は、任意の1個若しくは他の19個の天然アミノ酸への、又は非天然アミノ酸などの他のアミノ酸への置換を包含する。例えば、409位のアミノ酸Kの置換は、以下の置換の各々を含む：409A、409C、409D、409E、409F、409G、409H、409I、409L、409M、409N、409Q、409R、409S、409T、409V、409W、409P、及び409Y。これらの置換はまた、K409A、K409Cなど、又はK409A、Cなど、又はK409A／C／などと称され得る。同じことが本明細書で言及される各全ての位置への類推によって当てはまり、本明細書ではそのような置換のいずれか1つを特異的に含む。

30

【0059】

本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、発現ベクターなどの核酸が導入された細胞を指すことが意図される。そのような用語は、特定の対象細胞を指すだけでなく、そのような細胞の子孫も含み得ることが意図されることが理解されるべきである。特定の修飾は、変異又は環境の影響のいずれかによって後続世代で発生し得るため、そのような子孫は、実際には、親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で 사용되는「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。組換え宿主細胞（すなわち、組換えタンパク質の産生に使用される宿主細胞）としては、例えば、トランスフェクトーマ、例えば、CHO細胞、HEK-293細胞、Exp1293F細胞、PER.C6細胞、NS0細胞、及びリンパ球性細胞、並びにE.coliなどの原核細胞、並びに植物細胞及び真菌などの他の真核生物宿主が挙げられる。

40

【0060】

本明細書で使用される「トランスフェクトーマ」という用語は、抗体又は標的抗原を発現する組換え真核宿主細胞、例えば、CHO細胞、PER.C6細胞、NS0細胞、HEK-293細胞、Exp1293F細胞、植物細胞、又は酵母細胞を含む、真菌を含む。

【0061】

本発明の目的のために、2つのアミノ酸配列間の配列同一性は、参照配列の長さにかけて、EMBOSSパッケージ（EMBOSS：The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16：276-277）のNeedleプログ

50

ラム、好ましくはバージョン5.0.0以降で実施されるNeedleman-Wunschアルゴリズム (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) を使用して決定される。使用されるパラメータは、10のギャップオープンペナルティ、0.5のギャップ延長ペナルティ、及びEBL O S U M 6 2 (B L O S U M 6 2のE M B O S Sバージョン) 置換マトリックスである。「最長同一性」 (-n o b r i e f オプションを使用して得られる) と標識されたNeedleの出力は、同一性パーセントとして使用され、次のように計算される：

(同一の残基×100) / (アラインメントの長さ-アラインメントのギャップの総数)。
【0062】

類似の残基の保持はまた又は代替的に、BLASTプログラム (例えば、標準設定B L O S U M 6 2、オープンギャップ=11、及び延長ギャップ=1を使用してNCBIを通して利用可能なBLAST 2.2.8) の使用によって決定されるように、類似性スコアによって測定され得る。好適なバリエーションは、典型的には、親又は参照配列に対して少なくとも約55%、少なくとも約65%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%以上 (例えば、約99%) などの、少なくとも約45%の類似性を示す。

【表3】

表3 アミノ酸配列

配列番号	参照	ドメイン	配列
1	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR1	GGSFSAYY
2	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR2	INHGGGT
3	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH_CDR3	ASLTAY
4	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR1	QGISSW
5	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR2	AAS
6	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL_CDR3	QQYDSYPIT
7	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR1	GFTFNTYA
8	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR2	IRSKYNNYAT
9	IgG1-huCD3-FEAL	VH_CDR3	VRXGNFGNSYVSWFAY, 式中、Xは、H又はGである
10	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR1	TGAVTTSNY
11	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR2	GTN
12	IgG1-huCD3-FEAL	VL_CDR3	ALWYSNLWV

13	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VH	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGS�VTVSS
14	IgG1-CD30-MDX060-FERR	VL	DIQMTQSPTSLASVGDRVITICRASQGISSWLTWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYDSYPITFGQGTRLEIK
15	IgG1-huCD3-FEAL	VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRXGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSS, 式中、Xは、H又はGである
16	IgG1-huCD3-FEAL	VL	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
17	IgG1-CD30-MDX060-FERR	完全重鎖	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRTISVDTSKN QFSLKLNSVTAADTAVYYCASLTAYWGQGS�VTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFERGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
18	IgG1-CD30-MDX060-FERR	完全軽鎖	DIQMTQSPTSLASVGDRVITICRASQGISSWLTWYQQ KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYDSYPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

19	IgG1-huCD3- FEAL	完全重鎖	EVKLVESEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYW GQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
20	IgG1-huCD3- FEAL	完全軽鎖	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTI TGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAA PSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
21	IgG1-CD30- hAC10-FEAR	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYYITWVR QAPGQGLEWMGWIYPGSGNTKYNEKFKGRVTMTRDTSI STAYMELSRRLSDDTAVYYCANYGNYWFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP EFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

22	IgG1-CD30- hAC10-FEAR	完全軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVDFDGD SYMN WYQQKPGQPPKLLIYAASNLESGVPDRFSGSGSGDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQSNEDPWTFGGKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
23	IgG1-CD30- HRS-3-FEAR	完全重鎖	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYFTTYTIHWVR QRPBGHLEWIGYINPSSGYS DYNQNFKGKTTLTADKSS NTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARRADYGNYEYTFWYWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSGFSFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	IgG1-CD30- HRS-3-FEAR	完全軽鎖	DIVMTQSPKFMSTSVGDRVTVTCKASQNVGTNVAWFQ QKPGQSPKVLIIYSASYRYS GVPDRFTGSGSGDFTLTIS NVQSEDLAEYFCQQYHTYPLTFGGGKLEINRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

25	IgG1-CD30- HeFi-I-FEAR	完全重鎖	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFSDYYMNWVR QPPGKALEWLGFI RNKANGYTTEFSASVMGRFTISRDDS QSILYLQMN TLRAEDSATYYCARDPPYGNPHYYAMDYW GQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KD YFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	IgG1-CD30- HeFi-I-FEAR	完全軽鎖	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSASGYNYMHW YQQKAGQPPKLLIHLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNI HPVEEEDASTYYCQHS GELPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
27	IgG1-CD30- T405-FEAR	完全重鎖	QVQLQQIGAELVRPGASVKLSCKASGYTFNNYWINWVK QRPGQGLEWIGNIYPSDSRSNYNQKFKDKATLTVDKPS STAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLGSYWGQGLTVTVAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVA VSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

28	IgG1-CD30-T405-FEAR	完全軽鎖	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGVYYCWQGAHFPRTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
29	IgG1-CD30-T105-FEAR	完全重鎖	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWI RQPSGKDLEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTISKDTSS NQVFLKITSVDTADTATYYCARRADGLYFYLDVWGAGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCP APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVVAVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1-CD30-T105-FEAR	完全軽鎖	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVNTNVAWYQ QKPGQSPEALIYSASYRYSQVPDRFTGSGSGTDFTLTISN VQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

31	IgG1-CD30-T408-FEAR	完全重鎖	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVK QRPQGQGLEWIGNIYPSDSYSNQNQKFKDKATLTVDKSS STAYMQLSSPTSEDSAVYYCTLGSYWGQGTLTVTSAAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
32	IgG1-CD30-T408-FEAR	完全軽鎖	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLSDSDGKTYLN WLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCWQGAHFPRTFGGGTKLEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
33	IgG1-CD30-T215-FEAR	完全重鎖	QVTLKESGPGILQPSQTLSTCSFSGFSLSVSGMGVSWI RQPSGKGLEWLAHIHWDDRRSNPSLRSLTISKDTSN NQVFLKITSVDTADTATYYCARRPDLYGNYFFDFWGQG TTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVAVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNV FCFSVMHEALHNHNTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

34	IgG1-CD30-T215-FEAR	完全軽鎖	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVFTNVAWYQ QKLGQSPKPLIYSASYRYSQVDPDRFTGSGSGDTFTLTISD VQSEDLAEYFCQQYNSYPVTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
35	IgG1-huCD3H101G-FEAL	完全重鎖	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KSSLYLQMNNLKTEDTAMYCVRGGNFGNSYVSWFAYW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTH TCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVA VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
36	IgG1-b12-FEAL	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVR QAPGQRFQEWGMWINPYNGNKEFSKAFQDRVFTTADTSA NTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYM DVWGKGTTVIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

37	IgG1-b12- FEAL	完全軽鎖	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATFSCRSSHISIRRRVAWYQH KPGQAPRLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSGTDFTLTITR VEPEDFALYYCQVYGASSYTFGQGTKLERKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLNNFYFPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38	IgG1-b12- FERR	完全重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFIHWVR QAPGQRFQEWGMWINPYNGNKEFSKAFQDRVTFTADTSA NTAYMELRSLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYM DVWGKGTTIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCD KTHTCPPCPAPEFERGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
39	ヒトCD30		FPQDRPFEDTCHGNPSHYDKAVRRCCYRCPMGLFPTQ QCPQRPTDCRKQCEPDYYLDEADRCTACVTCRDDLVE KTPCAWNSSRVCECRPGMFCSTSAVNSCARCFHSHVCP AGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSS GTIPQAKPTPVSPATSSASTMPVRGGTRLAQEAASKLTR APDSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPEGSGDCRKQCEPDY YLDEAGRCTACVCSRDDLVEKTPCAWNSSRTCECRPG MICATSATNSCARCVYPICAAETVTKPQDMAEKDTTFE APPLGTQPCNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTL PIPTSAPVALSSTGKPVLDAGPVLFVWVILVVLVVVGSSAF LLCHRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRS STQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLES LPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKA DTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPHYPE QETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK

10

20

30

40

50

40	カニクイザル CD30		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDKAVRRCCYRCPTGTAQKN TVCEPASPGVSPACASPENCKEPSSGTIPQAKPTPVSPAT SNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTRAPGSPSSVGRPSSDP GLSPTQPCPQGGDCRKQCEPDYYLDEAGRCTACVSCS RDDLVEKTPCAWNSSRICECRPGMICATSATNSCARCVP YPICAAETGTPQDMAEKDTTFFAPPVGTQPDCSPTPEN GEAPASTSPTLSSLVDSQASKTLPIPTSAPIALSSTGKPV DAGPVLFVWVILVLAVVVGSSSTFLLCHRRACRKRIRQKLHL CYPVQTSRPKLELVDSRPRRSSTQFESGTFVTKPSAEELG LMSLPPKETCRNVGAACPESLPLWDASPAGGPSSPRDLP EPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGQGLA GPAEPELEEELEADHAPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEE EGKEDPLPTAASGK
41	アカゲザル CD30		FPQDRPFEDTCRGNPGHYDKAVRRCCYRCMPGLFPTQ QCPQRPADCRKQCEPDYYLDEAGRCTACVSCSRDDLVE KMPCAWNSSRVCECQPGMFCAVSVVNSCARCFHSHVCP AGMIVKFPGTAQKNTVCEPASPGVSPACASPENCKEPSS GTIPQAKPTPVSPATSNASTMPLRGGTRLAQEAASKLTR APGSPSSVGRPSSDPGLSPTQPCPQGGDCRKQCEPDY YLDEAGRCTACVSCSRDDLVEKTPCAWNSSRICECRPG MICATSATNSCARCVPYPICAAETGTPQDMAEKDTTFF APPVGTQPDCSPTPENGEAPASTSPTLSSLVDSQASKTLP IPTSAPIALSSTGKPVLDAGPVLFVWVILVLAVVVGSSSTFLL CHRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSRPKLELVDSRPRRSST QFESGTFVTKPSAEELGLMSLPPKETCRNVGAACPESLPL WDASPAGGPSSPRDLPPEPRVSTEHTNNRIEKIYIMKADT VIVGTVKAELPEGQGLAGPAEPELEEELEADHAPHYPEQE TEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK
42	ヒト CD3 (イブ シロン)		QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQ HNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCY PRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVVDI CITGGLLLLVIYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQN KERPPVPNPDIYPIRKQQRDLYSGLNQRI

10

20

30

40

50

43	カニクイザル CD3		QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQW QHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPE DASHHLYLKARVCENCMEMDMAVATIVVDICITLGLLL LVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRGQNKERPPVP NPDYEPKRGQQDLYSGLNQRI
44	IgG1 定常領域		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
45	IgG1 定常領域	FER 置換あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE R GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
46	IgG1 定常領域	FEA 置換あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

47	IgG1 定常領域	F405L 置換あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSF L LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
48	IgG1 定常領域	K409R 置換あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSF FLYS R LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
49	IgG1 定常領域	FER 置換あり及 び K405L 置換 あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FER R GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSF L LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

50

50	IgG1 定常領域	FER 置換あり及び K409R 置換あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE R GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYS R LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
51	IgG1 定常領域	FEA 置換あり及び K405L 置換あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSF L LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
52	IgG1 定常領域	FEA 置換あり及び K409R 置換あり (太字)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE FE GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV A VSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYS R LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
53	定常領域	ヒトカップ軽鎖の定常領域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

54	定常領域	ヒトラムダ軽鎖 の定常領域	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADSSPVKAGVETTTSPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
55	IgG1-CD30- MDX060-FEAR	完全重鎖	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSAYYWSWIR QPPGKGLEWIGDINHGGGTNYNPSLKSRVTISVDTSKN QFSLKLNSTVAADTAVYYCASLTAYWGQGS�TVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

10

20

【 0 0 6 3 】

本発明の更なる態様及び実施形態

上記のように、第1の態様において、本発明は、

(i) それぞれ、配列番号 1、2、及び 3 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第1の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 4、5、及び 6 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第1の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 0 結合領域と、

(i i) それぞれ、配列番号 7、8、及び 9 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第2の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 10、11、及び 12 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第2の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 結合領域と、

30

を含む多重特異性抗体に関する。

【 0 0 6 4 】

一実施形態において、配列番号 9 における X は、H である。別の実施形態において、配列番号 9 における X は G である。

【 0 0 6 5 】

一実施形態において、第1の重鎖可変領域は、ヒト又はヒト化である。別の実施形態において、第1の軽鎖可変領域は、ヒト又はヒト化である。一実施形態において、第2の重鎖可変領域は、ヒト又はヒト化である。別の実施形態において、第2の軽鎖可変領域は、ヒト又はヒト化である。別の実施形態において、第1の重鎖可変領域及び第1の軽鎖可変領域は、ヒトである。別の実施形態において、第1の重鎖可変領域及び第1の軽鎖可変領域は、ヒト化である。別の実施形態において、第2の重鎖可変領域及び第2の軽鎖可変領域は、ヒトである。別の実施形態において、第2の重鎖可変領域及び第2の軽鎖可変領域は、ヒト化である。別の実施形態において、第1の重鎖可変領域及び第1の軽鎖可変領域は、ヒトであり、第2の重鎖可変領域及び第2の軽鎖可変領域は、ヒトである。別の実施形態において、第1の重鎖可変領域及び第1の軽鎖可変領域は、ヒトであり、第2の重鎖可変領域及び第2の軽鎖可変領域は、ヒト化である。

40

【 0 0 6 6 】

当業者に周知であるように、抗体の各抗原結合領域は、一般に、重鎖可変領域 (V H)

50

及び軽鎖可変領域（V L）を含み、可変領域の各々は、それぞれ、3つのC D R配列、C D R 1、C D R 2、及びC D R 3を含み、それぞれ、4つのフレームワーク配列、F R 1、F R 2、F R 3、及びF R 4を含み得る。この構造は、好ましくは、本発明による抗体にも見出される。一実施形態において、当該4つのフレームワーク配列のうちの1つ、2つ、3つ、又は全ては、ヒトフレームワーク配列である。

【0067】

上記のように、本発明による多重特異性抗体は、ヒトC D 3 0に結合することができる抗原結合領域を含み、その配列は、配列番号39に記載される。特に、本発明による抗体は、ヒトC D 3 0に結合することができる当該抗原結合領域が、細胞、より好ましくは腫瘍細胞に発現されるC D 3 0分子などの、ヒトC D 3 0の細胞外ドメインに結合することができる、抗体である。

10

【0068】

記載されるように、抗体は、それぞれ、配列番号1、2、及び3に記載されるC D R 1、C D R 2、及びC D R 3配列を含む第1の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号4、5、及び6に記載されるC D R 1、C D R 2、及びC D R 3配列を含む第1の軽鎖可変領域と、を含む、C D 3 0結合領域を含む。

【0069】

C D R 1、C D R 2、及びC D R 3領域は、当該技術分野で既知の方法を使用して、可変重鎖及び軽鎖領域から特定することができる。当該可変重鎖及び軽鎖領域からのC D R領域は、I M G Tに従ってアノテーションされている（L e f r a n c, M. - P., T h e I m m u n o l o g i s t, 7, 132-136 (1999)、L e f r a n c, D e v e l o p m e n t a l a n d C o m p a r a t i v e I m m u n o l o g y, 27 (1), 55-77 (2003)を参照されたい）。

20

【0070】

一実施形態において、C D 3 0に結合する抗原結合領域は、
・配列番号13の配列、又は配列番号13の配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、若しくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む（第1の）重鎖可変領域（V H）と、
・配列番号14の配列、又は配列番号14の配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、若しくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む（第1の）軽鎖可変領域（V L）と、
を含む。

30

【0071】

更なる実施形態において、本発明による抗体は、本明細書で定義されるC D 3 0に結合する抗原結合領域の重鎖可変（V H）領域を含み、配列は、配列番号13と比較されるとき、合計で、最大1、2、3、4、又は5つのアミノ酸置換を含む。

【0072】

更なる実施形態において、本発明による抗体は、本明細書で定義されるC D 3 0に結合する抗原結合領域の軽鎖可変（V L）領域を含み、配列は、配列番号14と比較されるとき、合計で、最大1、2、3、4、又は5つのアミノ酸置換を含む。

40

【0073】

更なる実施形態において、第1の重鎖可変領域は、配列番号13に記載される配列を含み、第1の軽鎖可変領域は、配列番号14に記載される配列を含む。

【0074】

ヒトC D 3 0に結合することができるそのような抗原結合領域は、とりわけ、参照によって本明細書に組み込まれる、W O 0 3 0 5 9 2 8 2（M e d a r e x）に記載されている。

【0075】

本発明による当該抗体は、ヒトC D 3 0に結合する抗原結合領域間の平衡解離定数K Dで結合し得、ヒトC D 3 0は、0.1~20 n Mの範囲内、例えば、1.5~2 n Mの範

50

図（一価結合）などの、 $0.5 \sim 5 \text{ nM}$ の範囲内である。当該結合親和性は、バイオレイヤー干渉法によって決定することができる。

【0076】

一実施形態において、本発明の抗体はまた、カニクイザルCD30（配列番号40）に結合することができる。

【0077】

上記のように、本発明による多重特異性抗体は、ヒトCD3に結合することができる抗原結合領域を含む。更に、本発明は、配列番号22に特定されるヒトCD3 ϵ （イプシロン）などの、ヒトCD3 ϵ （イプシロン）に結合することができる本発明による抗体を提供する。そのような抗原結合領域は、初代ヒトT細胞などの、T細胞上に提示されるように、ヒトCD3 ϵ （イプシロン）に結合することができる。

10

【0078】

記載されるように、抗体は、それぞれ、配列番号7、8、及び9に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第2の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号10、11、及び12に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第2の軽鎖可変領域と、を含むCD3結合領域を含む。

【0079】

一実施形態において、CD3に結合する抗原結合領域は、
・配列番号15の配列、又は配列番号15の配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、若しくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む（第2の）重鎖可変領域（VH）と、
・配列番号16の配列、又は配列番号16の配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、若しくは少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む（第2の）軽鎖可変領域（VL）と、
を含む。

20

【0080】

更なる実施形態において、本発明による抗体は、本明細書で定義されるCD3に結合する抗原結合領域の重鎖可変（VH）領域を含み、配列は、配列番号15と比較されるとき、合計で、最大1、2、3、4、又は5つのアミノ酸置換を含む。

【0081】

更なる実施形態において、本発明による抗体は、本明細書で定義されるCD3に結合する抗原結合領域の軽鎖可変（VL）領域を含み、配列は、配列番号16と比較されるとき、合計で、最大1、2、3、4、又は5つのアミノ酸置換を含む。

30

【0082】

更なる実施形態において、第2の重鎖可変領域は、配列番号15に記載される配列を含み、第2の軽鎖可変領域は、配列番号16に記載される配列を含む。一実施形態において、配列番号15におけるXは、Hである。別の実施形態において、配列番号15におけるXは、Gである。

【0083】

ヒトCD3に結合することができるそのような抗原結合領域は、とりわけ、参照によって本明細書に組み込まれる、WO2015/001085（Genmab）に記載されている。本明細書のバリエーション、例えば、XがGである、配列番号9に記載されるVH CDR3領域を含み、XがHである、親抗体よりも低いヒトCD3結合についての親和性を有する、バリエーションは、参照によって本明細書に組み込まれる、WO2017/009442（Genmab）の実施例2に記載されている。

40

【0084】

本発明による当該抗体は、ヒトCD3に結合する抗原結合領域間の平衡解離定数KDで結合し得、ヒトCD3は、 $5 \sim 30 \text{ nM}$ 、例えば、 $10 \sim 20 \text{ nM}$ （一価結合の場合）の範囲内である。

【0085】

50

一実施形態において、本発明の抗体はまた、カニクイザルCD3（配列番号43）に結合することができる。

【0086】

更なる実施形態において、多重特異性抗体は、

(i) 配列番号13に記載される配列を含む第1の重鎖可変領域と、配列番号14に記載される配列を含む第1の軽鎖可変領域と、を含むCD30結合領域と、

(ii) 配列番号15に記載される配列を含む第2の重鎖可変領域と、配列番号16に記載される配列を含む第2の軽鎖可変領域と、を含むCD3結合領域と、を含む。

【0087】

抗体フォーマット

本発明の多重特異性抗体は、2つ以上の特異性、例えば、2つ又は3つ以上の特異性を有し得る。更に、多重特異性抗体は、CD3及び／又はCD30について抗原結合領域の2つ以上のコピーを有し得る。例えば、一実施形態において、抗体は、CD3に結合することができる2つの抗原結合領域、例えば、CD3に結合する2つの同一の結合領域を有する。例えば、別の実施形態において、抗体は、CD30に結合する2つの抗原結合領域、例えば、CD30に結合する2つの同一の結合領域を有する。追加の抗原結合領域は、例えば、定常領域に共有結合したscFvの形態で存在し得る。

【0088】

好ましい実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。二重特異性抗体の多くの異なるフォーマット及び使用が当該技術分野で既知であり、Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul; 20(7): 838-47及び; MAbs, 2012 Mar-Apr; 4(2): 182-97によって、並びにLabrijn et al., 2019 Nat Rev Drug Discov 18(8) 585-608によって概説された。本発明による二重特異性抗体は、それを産生する任意の特定の二重特異性フォーマット又は方法に限定されない場合がある。

【0089】

本発明で使用され得る二重特異性抗体分子の例は、(i) 異なる抗原結合領域を含む2つのアームを有する単一抗体、(ii) 例えば、追加のペプチドリンカーによってタンデムに結合した2つのscFvを介して、2つの異なる標的に特異性を有する一本鎖抗体、(iii) 各軽鎖及び重鎖が短いペプチド結合を通してタンデムに2つの可変ドメインを含む二重可変ドメイン抗体(DVD-Ig) (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-I (商標)) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010))、(iv) 化学的に結合した二重特異性(Fab') 2フラグメント、(v) 標的抗原の各々について2つの結合部位を有する四価二重特異性抗体をもたらす2つの一本鎖ダイアボディの融合体である、Tandab、(vi) 多価分子をもたらすscFvのダイアボディとの組み合わせである、フレキシボディ、(vii) Fabに適用されるとき、異なるFabフラグメントに結合した2つの同一のFabフラグメントからなる三価二重特異性結合タンパク質をもたらすことができる、プロテインキナーゼAにおける「二量体化及びドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「ドックアンドロック」分子、(viii) 例えば、ヒトFabアームの両方の末端に融合した2つのscFvを含む、いわゆるスコピオン分子、並びに(ix) ダイアボディを含む。

【0090】

異なるクラスの二重特異性抗体の更なる例としては、これらに限定されないが、(i) ヘテロ二量体化を強制する相補的CH3ドメインを有するIgG様分子、(ii) 分子の2つ側面が各々、少なくとも2つの異なる抗体のFabフラグメント又はFabフラグメントの一部を含有する、組換えIgG様二重標的化分子、(iii) 全長IgG抗体が、追加のFabフラグメント又はFabフラグメントの一部に融合している、IgG融合分

10

20

30

40

50

子、(i v) 一本鎖 F v 分子又は安定化ダイアボディが、重鎖定常ドメイン、F c 領域、又はその一部に融合している、F c 融合分子、(v) 異なる F a b フラグメントが、一緒に融合している、重鎖定常ドメイン、F c 領域、又はその一部に融合している、F a b 融合分子、並びに (v i) 異なる一本鎖 F v 分子又は異なるダイアボディ又は異なる重鎖抗体 (例えば、ドメイン抗体、ナノボディ) が、互いに又は重鎖定常ドメイン、F c 領域、若しくはその一部に融合した別のタンパク質若しくは担体分子に融合している、s c F v 及びダイアボディベースの重鎖抗体 (例えば、ドメイン抗体、ナノボディ) が挙げられる。

【0091】

相補的 CH3 ドメイン分子を有する I g G 様分子の例としては、これらに限定されないが、トリオマブ／クアドローマ分子 (Trion Pharma／Fresenius Biotech、Roche、WO2011／069104)、いわゆるノブーイントゥーホール分子 (Genentech、WO98／50431)、CrossMAbs (Roche、WO2011／117329)、及び静電適合分子 (Amgen、EP1870459 及び WO2009／089004、Chugai、US2010／0015513、Oncomed、WO2010／129304)、LUZ-Y 分子 (Genentech、Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287 (52) : 43331-9, doi:10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1)、DIG-ボディ及びPIG-ボディ分子 (Pharmabcine、WO2010／134666、WO2014／081202)、鎖交換操作ドメインボディ (SEEDbody) 分子 (EMD Serono、WO2007／110205)、Biclonics 分子 (Merus、WO2013／157953)、FcΔAdp 分子 (Regeneron、WO2010／15792)、二重特異性 I g G1 及び I g G2 分子 (Pfizer／Rinat、WO11／143545)、Azymetric 足場分子 (Zymeworks／Merck、WO2012／058768)、mAb-Fv 分子 (Xencor、WO2011028952)、二価二重特異性抗体 (WO2009／080254)、並びに DuoBody (登録商標) 分子 (Genmab A／S、WO2011／131746) が挙げられる。

【0092】

組換え I g G 様二重標的化分子の例としては、限定されないが、二重標的化 (DT) -I g 分子 (WO2009／058383)、ツインワン抗体 (Genentech、Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610-1614.)、架橋 Mab (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star、WO2008／003116)、Zybody 分子 (Zyngenia、LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr; 5 (2) : 208-18)、共通の軽鎖でのアプローチ (Crucell／Merus、US7, 262, 028)、カップ／ラムダボディ (商標) 分子 (NovImmune、WO2012／023053)、及び CovX-ボディ (CovX／Pfizer、Doppalapudi, V. R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501-506.) が挙げられる。

【0093】

I g G 融合分子の例としては、これらに限定されないが、二重可変ドメイン (DVD) -I g 分子 (Abbott、US7, 612, 181)、二重ドメインダブルヘッド抗体 (Unilever、Sanofi Aventis、WO2010／0226923)、I g G 様二重特異性分子 (ImClone／Eli Lilly、Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32 (2) : 191-8)、Ts2Ab (MedImmune／AZ、Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30; 393 (3) : 672-92)、及び BsAb 分子 (Zymogenetics、WO2010／111625)、HERCULES 分子 (Biogen Idec、US00／7951918)、s c F v 融合分子 (Novartis)、s c F v 融合分子 (Changzhou Adam Biotech Inc、CN／1022

10

20

30

40

50

50246)、並びにTvAb分子(Roche、WO2012/025525、WO2012/025530)が挙げられる。

【0094】

Fc融合分子の例としては、これらに限定されないが、scFv/Fc融合体(Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep; 42(6):1179-88)、SCORPION分子(Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract #5465)、Zymogenetics/BMS、WO2010/111625)、二重親和性再標的化技術(FcベースDART)分子(MacroGenics、WO2008/157379、WO2010/080538)、及び二重(scFv)2-Fab分子(National Research Center for Antibody Medicine-China)が挙げられる。

【0095】

Fab融合二重特異性抗体の例としては、これらに限定されないが、F(ab)2分子(Medarex/AMGEN、Deo et al J Immunol. 1998 Feb 15; 160(4):1677-86.)、二重作用又はBis-Fab分子(Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610-1614.)、ドック-アンド-ロック(DNL)分子(ImmunoMedics、WO2003/074569、WO2005/004809)、二価二重特異性分子(Biotechnol, Schoonjans, J Immunol. 2000 Dec 15; 165(12):7050-7.)、及びFab-Fv分子(UCB-Celltech、WO 2009/040562 A1)が挙げられる。

【0096】

scFv-、ダイアボディーベース、及びドメイン抗体の例としては、これらに限定されないが、二重特異性T細胞エンゲージャー(BiTE)分子(Micromet、WO2005/061547)、タンデムダイアボディ分子(TandAb)(Affimed) Le Gall et al., Protein Eng Des Sel. 2004 Apr; 17(4):357-66.)、DART分子(MacroGenics、WO2008/157379、WO2010/080538)、一本鎖ダイアボディ分子(Lawrence, FEBS Lett. 1998 Apr 3; 425(3):479-84)、TCR様抗体(AIT, ReceptorLogics)、ヒト血清アルブミンscFv融合体(Merrimack、WO2010/059315)、及びCOMBODY分子(Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug; 88(6):667-75.)、二重標的化ナノボディ(Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010)、並びに二重標的化重鎖単ドメイン抗体が挙げられる。

【0097】

一実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、制御されたFab-アーム交換(WO2011/131746 (Genmab)に記載されるなど)を介して得られたダイアボディ、クロスボディ、又は二重特異性抗体である。

【0098】

一実施形態において、本発明の抗体は、二重特異性DuoBody(登録商標)分子(Genmab A/S、WO2011/131746)である。

【0099】

本発明の二重特異性などの、多重特異性抗体は、任意のアイソタイプであり得る。例示的なアイソタイプとしては、これらに限定されないが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4アイソタイプのいずれかが挙げられる。好ましくは、抗体は、例に示されるように、ヒトIgG1アイソタイプであるように選択され得る。ヒト軽鎖定常領域、カッパ若しくはラムダのいずれか、又は両方、例えば、配列番号53及び54に記載され

10

20

30

40

50

る配列が使用され得る。例えば、一実施形態において、CD30結合に関与する軽鎖は、カッパ定常領域を含み、CD3結合に関与する軽鎖は、ラムダ定常領域を含む。一実施形態において、本発明の抗体の両方の重鎖は、IgG1アイソタイプである。一実施形態において、二重特異性抗体の2つの重鎖は、それぞれ、IgG1及びIgG4アイソタイプである。好ましくは、二重特異性抗体は、例に示されるように、ヒトIgG1アイソタイプであるように選択され得る。任意に、好ましくは、選択されたアイソタイプの重鎖及びそのFc領域配列は、好ましくはヒンジ、CH2、及び／又はCH3領域において、二重特異性抗体の生成を可能にするように、かつ／又は不活性を導入するように修飾され得る。

【0100】

一実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、第1及び第2のFcポリペプチドからなるFc領域を含む。

【0101】

一実施形態において、第1のFcポリペプチド及び第1の重鎖可変領域は、同じポリペプチド鎖内に含まれ、第2のFcポリペプチド及び第2の重鎖可変領域は、同じポリペプチド鎖内に含まれる。

【0102】

第1及び第2のFcポリペプチドは、各々、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgD、IgM、若しくはIgAアイソタイプ、又は混合アイソタイプなどの、任意のヒトアイソタイプを含む、任意のアイソタイプであり得る。好ましくは、Fc領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4アイソタイプ、又は混合アイソタイプである。一実施形態において、当該Fc領域は、ヒトIgG1 Fc領域である。

【0103】

更なる実施形態において、多重特異性抗体は、本明細書で定義される全長抗体である。

【0104】

本発明による抗体は、抗体を不活性、又は非活性化抗体にするFc領域における修飾を含み得る。したがって、本明細書に開示される抗体において、一方又は両方の重鎖は、抗体が、当該修飾を含まないことを除いて、同一である抗体と比較してより低い程度でFc媒介性エフェクター機能を誘導するように修飾され得る。Fc媒介性エフェクター機能は、T細胞上でのFc媒介性CD69発現（すなわち、例えば、WO2015/001085に記載される、CD3抗体媒介性、Fcγ受容体依存的CD3架橋の結果としてのCD69発現）を決定することによって、Fcγ受容体に結合することによって、C1qに結合することによって、又はFcγRのFc媒介性架橋の誘導によって測定され得る。特に、重鎖定常配列は、Fc媒介性CD69発現が、野生型（非修飾）抗体と比較されるとき、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%、又は100%低減するように修飾され得、当該Fc媒介性CD69発現は、PBMＣベースの機能アッセイにおいて、例えば、WO2015/001085の実施例3に記載されるフローサイトメトリーによって決定される。重鎖及び軽鎖定常配列の修飾はまた、当該抗体へのC1qの低減した結合をもたらし得る。非修飾抗体と比較して、低減は、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、又は100%であり得、C1q結合は、ELISAによって決定され得る。更に、Fc領域は、当該抗体が、例えば、曲線の線形部分において、非修飾抗体と比較して、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%、又は100%低減したFc媒介性T細胞増殖を媒介するように修飾され得、当該T細胞増殖は、PBMＣベースの機能アッセイにおいて測定される。

【0105】

Fc媒介性エフェクター機能を排除するために、アミノ酸置換、及びそれらの組み合わせが、IgG1アイソタイプ抗体の定常重鎖領域に導入された、広範囲の異なる非活性化抗体フォーマットが開発されている（例えば、Chiu et al., Antibodies 2019 Dec; 8(4): 55、Liu et al., Antibodies

10

20

30

40

50

, 2020 Nov 17; 9 (4) : 64 ; 29 (10) : 457-66, Shields et al., J Biol Chem. 2001 Mar 2; 276 (9) : 6591-604)。

【0106】

例えば、IgG1アイソタイプ抗体において、修飾され得るアミノ酸位置の例としては、L234及びL235位が挙げられる。一実施形態において、第1及び／又は第2のFcポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖におけるL234及び／又はL235位のアミノ酸に対応するアミノ酸の置換を含み、置換は、好ましくは、それぞれ、F及びEへの置換であり、アミノ酸位置は、Euナンバリングによって定義されるとおりである。

【0107】

アミノ酸位置L234及びL235の修飾に加えて、更なる位置が修飾され得ることが理解される。よって、更なる実施形態において、第1及び第2のFcポリペプチドは、それぞれ、L234及びL235位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F及びEへの置換を含み、第1及び／又は第2のFcポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖におけるG236位のアミノ酸に対応するアミノ酸の置換を更に含み、置換は、好ましくはRへの置換である。

【0108】

別の実施形態において、第1及び第2のFcポリペプチドは、それぞれ、L234及びL235位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F及びEへの置換を含み、第1及び第2のFcポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖におけるG236位のアミノ酸に対応するアミノ酸の置換を更に含み、置換は、好ましくはRへの置換である。

【0109】

別の実施形態において、第1及び第2のFcポリペプチドは、それぞれ、L234及びL235位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F及びEへの置換を含み、第1及び／又は第2のFcポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖におけるD265位のアミノ酸に対応するアミノ酸の置換を更に含み、置換は、好ましくはAへの置換である。

【0110】

別の実施形態において、第1及び第2のFcポリペプチドは、それぞれ、L234及びL235位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F及びEへの置換を含み、第1及び第2のFcポリペプチドは、ヒトIgG1重鎖におけるD265位のアミノ酸に対応するアミノ酸の置換を更に含み、置換は、好ましくはAへの置換である。

【0111】

別の実施形態において、第1及び第2のFcポリペプチドのうちの一方は、それぞれ、L234、L235、及びG236位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及びRへの置換を含み、他方のFcポリペプチドは、それぞれ、L234、L235E、及びD265位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及びAへの置換を含む。

【0112】

更なる実施形態において、第1のFcポリペプチドは、それぞれ、L234、L235、及びG236位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及びRへの置換を含み、第2のFcポリペプチドは、それぞれ、L234、L235E、及びD265位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及びAへの置換を含み、アミノ酸位置は、Euナンバリングによって定義されるとおりである。

【0113】

例えば、そのようなFc領域置換を有する定常領域は、とりわけ、そのような置換を有さない、配列番号44と比較することができる、配列番号45、46、49、50、51、及び52に提供される。一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号45、46、49、50、51、及び52からなる群から選択される配列を含む。

【0114】

一実施形態において、本発明の多重特異性又は二重特異性抗体は、異なる第1及び第2のCH3領域を含むFc領域を含み、ひいては当該第1及び第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は、当該第1及び第2のCH3領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強

10

20

30

40

50

い。これらの相互作用及びそれらを達成することができる方法についての詳細は、参照によって本明細書に組み込まれる、WO 2011/131746 及び WO 2013/060867 (Genmab) に提供される。安定、ヘテロ二量体抗体は、例えば、CH3 領域における少数のみの非対称的な変異を含有する2つのホモ二量体出発抗体に基づいて、WO 2008/119353 及び WO 2011/131746 に提供される、いわゆる Fab-アーム交換によって高収率で得ることができる。

【0115】

特定の実施形態において、本発明は、当該第1のFcポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置にあるアミノ酸が、Rであり、当該第2のFcポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置にあるアミノ酸が、Lであるか、又はその逆も同様である、抗体を提供する。

10

【0116】

更なる実施形態において、第1のFcポリペプチドにおいて、K409に対応する位置にあるアミノ酸はRであり、第2のFcポリペプチドにおいて、F405に対応する位置にあるアミノ酸はLである。

【0117】

したがって、一実施形態において、第1のFcポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、Y407、及びK409からなる群から選択される位置に対応する位置にあるアミノ酸のうちの少なくとも1つは、置換されており、第2のFcポリペプチドにおいて、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、Y407、及びK409からなる群から選択される位置に対応する位置にあるアミノ酸のうちの少なくとも1つは、置換されており、第1及び第2のFcポリペプチドにおける当該置換は、同じ位置ではなく、アミノ酸位置は、Euナンバリングによって定義されるとおりである。例えば、そのようなFc領域置換を有する定常領域は、とりわけ、そのような置換を有さない、配列番号44と比較することができる、配列番号47、48、49、50、51、及び52に提供される。一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号47、48、49、50、51、及び52からなる群から選択される配列を含む。

20

【0118】

好ましくは、第1のFcポリペプチドにおいて、F405に対応する位置にあるアミノ酸は、Lであり、第2のFcポリペプチドにおいて、K409に対応する位置にあるアミノ酸は、Rであるか、又はその逆もまた同様である。

30

【0119】

よって、一実施形態において、第1及び第2のFcポリペプチドのうちの一方は、それぞれ、L234、L235、G236、及びF405位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、R、及びLへの置換を含み、他方のFcポリペプチドは、それぞれ、L234、L235E、D265、及びK409位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、A、及びRへの置換を含む。

【0120】

別の実施形態において、第1及び第2のFcポリペプチドのうちの一方は、それぞれ、L234、L235、G236、及びK409位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、R、及びRへの置換を含み、他方のFcポリペプチドは、それぞれ、L234、L235E、D265、及びF405位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、A、及びLへの置換を含む。

40

【0121】

更なる実施形態において、本発明は、
(i) それぞれ、配列番号1、2、及び3に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第1の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号4、5、及び6に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第1の軽鎖可変領域と、を含むCD30結合領域と、

50

(i i) それぞれ、配列番号 7、8、及び 9 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 10、11、及び 12 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 結合領域と、を含み、

ここで、多重特異性抗体が、二重特異性抗体であり、第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドからなる F c 領域を含み、

ここで、第 1 の F c ポリペプチド及び第 1 の重鎖可変領域が、同じポリペプチド鎖内に含まれ、そしてここで、第 2 の F c ポリペプチド及び第 2 の重鎖可変領域が、同じポリペプチド鎖内に含まれ、

ここで、第 1 の F c ポリペプチドが、それぞれ、L 2 3 4、L 2 3 5、及び G 2 3 6 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及び R への置換を含み、そして、第 2 の F c ポリペプチドが、それぞれ、L 2 3 4、L 2 3 5、及び D 2 6 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及び A への置換を含み、ここで、アミノ酸位置が、E u ナンバリングによって定義されるとおりであり、そして

ここで、第 1 の F c ポリペプチドにおいて、K 4 0 9 に対応する位置にあるアミノ酸は R であり、そして

ここで、第 2 の F c ポリペプチドにおいて、F 4 0 5 に対応する位置にあるアミノ酸は L である。

【 0 1 2 2 】

更なる実施形態において、本発明は、

(i) それぞれ、配列番号 1、2、及び 3 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 1 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 4、5、及び 6 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 1 の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 0 結合領域と、

(i i) それぞれ、配列番号 7、8、及び 9 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 10、11、及び 12 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 結合領域と、を含む多重特異性抗体に関し、

ここで、多重特異性抗体は、二重特異性抗体であり、そして、第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドからなる F c 領域を含み、

ここで、第 1 の F c ポリペプチド及び第 1 の重鎖可変領域は、同じポリペプチド鎖内に含まれ、そしてここで、第 2 の F c ポリペプチド及び第 2 の重鎖可変領域は、同じポリペプチド鎖内に含まれ、

ここで、第 1 の F c ポリペプチドは、それぞれ、L 2 3 4、L 2 3 5、及び D 2 6 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及び A への置換を含み、そして、第 2 の F c ポリペプチドは、それぞれ、L 2 3 4、L 2 3 5、及び D 2 6 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F、E、及び A への置換を含み、ここで、アミノ酸位置は、E u ナンバリングによって定義されるとおりであり、そして、

ここで、第 1 の F c ポリペプチドにおいて、K 4 0 9 に対応する位置にあるアミノ酸は R であり、そして

ここで、第 2 の F c ポリペプチドにおいて、F 4 0 5 に対応する位置にあるアミノ酸は L である。

【 0 1 2 3 】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 17 及び 19 に記載される重鎖配列、並びに配列番号 18 及び 20 に記載される軽鎖配列を含むか、又はそれらからなる。

【 0 1 2 4 】

更なる実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 17 及び 19 に記載される重鎖配列、並びに配列番号 18 及び 20 に記載される軽鎖配列を含むか、又はそれらからなり、当該抗体は、二重特異性抗体である。

【 0 1 2 5 】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 17 及び 35 に記載される重鎖配列、並びに配列番号 18 及び 20 に記載される軽鎖配列を含むか、又はそれらからなる。

【0126】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 55 及び 19 に記載される重鎖配列、並びに配列番号 18 及び 20 に記載される軽鎖配列を含むか、又はそれらからなる。

【0127】

一実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 55 及び 35 に記載される重鎖配列、並びに配列番号 18 及び 20 に記載される軽鎖配列を含むか、又はそれらからなる。

【0128】

なお更なる実施形態において、本発明の抗体は、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E A R 又は b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R である。より更なる実施形態において、本発明の抗体は、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R である。

【0129】

配列番号 44 ~ 52 及び 55 に列挙される定常領域配列は、C 末端リジン (K) を含まない。しかしながら、これらの F c 領域が由来するヒトにおいて見出される天然に存在する配列において、そのような C 末端リジンは、オープンリーディングフレームの一部として存在し得る。組換え抗体の細胞培養物産生中に、この末端リジンは、内因性カルボキシペプチダーゼによるタンパク質分解によって切断され得、同じ配列を有するが C 末端リジンを欠く定常領域をもたらす。抗体の製造目的のために、この末端リジンをコードする D N A は、抗体がリジンなしで産生されるように、配列から省略され得る。抗体をコードする配列からの C 末端リジンの省略は、C 末端リジンの存在に対して抗体の均質性を増加させ得る。末端リジンをコードするか、又はコードしない核酸配列から産生される抗体は、C 末端リジンの処理の程度が、例えば、C H O ベースの産生系で産生された抗体を使用するとき、典型的には高いため、配列において及び機能において実質的に同一である (D i c k , L . W . e t a l . B i o t e c h n o l . B i o e n g . 2 0 0 8 ; 1 0 0 : 1 1 3 2 - 1 1 4 3) 。したがって、本発明による抗体は、本明細書に列挙されるような C 末端リジンをコードすることなく又は有することなく生成することができることが理解される。よって、製造目的のために、C 末端リジンを有することなく抗体を生成することができる。

【0130】

代替の実施形態において、本発明による多重特異性抗体は、F c 領域を含む古典的な全長抗体ではない。例えば、一実施形態において、

(i) C D 3 0 結合領域及び／若しくは C D 3 結合領域は、F a b であるか、

(i i) C D 3 0 結合領域及び／若しくは C D 3 結合領域は、s c F v であるか、

(i i i) C D 3 0 結合領域は、F a b であり、C D 3 結合領域は、s c F v であるか、又は

(i v) C D 3 0 結合領域は、s c F v であり、C D 3 結合領域は、F a b である。

【0131】

結合、細胞傷害性、及び T 細胞活性化

ヒト C D 3 及びヒト C D 3 0 に結合することができる本明細書に記載される、二重特異性抗体などの、抗体は、ヒト C D 3 0 発現がん細胞に T 細胞を有利に標的化し、それによって当該がん細胞の T 細胞媒介性殺滅を誘導することができる。

【0132】

上述のように、好ましくは、本発明による抗体は、不活性であり、更に、抗体は、以下の特徴のうちの 1 つ以上を含む：

a) 例えば、本明細書における実施例に記載される例について、フローサイトメトリーを使用して試験されるとき、S U - D H L - 1 細胞、S U P - M 2 細胞、D L - 4 0 細胞、K A R P A S - 2 9 9 細胞、L - 8 2 細胞、S R - 7 8 6 細胞、L - 5 4 0 細胞、K M - H 2 細胞、L - 1 2 3 6 細胞、J V M - 2 細胞、H H 細胞、N C E B - 1 細胞、及び／又

10

20

30

40

50

- はHDL M-2細胞などの、CD30発現ヒト腫瘍細胞に結合することができ、
- b) 本明細書における実施例に記載されるようにアッセイされるとき、例えば、精製されたPBMC、ADCCエフェクター細胞、又はT細胞をエフェクター細胞として使用するとき、CD30発現ヒト腫瘍細胞の濃度依存的細胞傷害性を媒介することができ、
- c) 本明細書における実施例に記載されるようにアッセイされるとき、例えば、精製されたPBMC又はT細胞をエフェクター細胞として使用するとき、SU-DHL-1細胞、L-428細胞、KM-H2細胞、SUP-M2細胞、KIE-JK細胞、及びHDL M-2細胞からなる群から選択される1つ以上のヒトCD30発現腫瘍細胞株の濃度依存的細胞傷害性を媒介することができ、
- d) 例えば、本明細書における実施例に記載されるようにアッセイされるとき、CD30発現ヒト腫瘍細胞の存在下でインビトロでT細胞の増殖を誘導することができ、
- e) 本明細書における実施例に記載されるようにアッセイされるとき、SU-DHL-1細胞、L-428細胞、KIE-JK細胞、及びHDL M-2細胞からなる群から選択される1つ以上のCD30発現ヒト腫瘍細胞株の存在下でインビトロでT細胞を活性化することができ、
- f) 本明細書における例に記載されるようにアッセイされるとき、サイトカイン及びグランザイムBのT細胞によるインビトロでの用量依存的産生を誘導することができ、
- g) 本明細書における例に記載されるようにアッセイされるとき、CD30が活性化されたT細胞の垂集団上で発現されても、T細胞のフラトリサイドをもたらさないことができ、
- かつ／あるいは
- h) 本明細書における例に記載されるようにアッセイされるとき、sCD30の存在下でもT細胞媒介性細胞傷害性を誘導することができる。

10

20

【0133】

一実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、0.020 µg/ml未満のような、0.025 µg/ml未満などの、0.030 µg/ml未満のような、0.035 µg/ml未満などの、0.040 µg/ml未満のような、0.045 µg/ml未満などの、0.050 µg/ml未満のEC₅₀濃度でT細胞媒介性細胞傷害性を誘導する。

【0134】

更なる実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、90%を超えるような、85%を超えるなどの、80%を超えるT細胞媒介性細胞傷害性を誘導する場合、最大の溶解を有する。

30

【0135】

一実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、0.03 µg/ml未満のような、0.035 µg/ml未満などの、0.04 µg/ml未満のような、0.045 µg/ml未満などの、0.05 µg/ml未満のCD25発現のEC₅₀濃度を有するCD4⁺ T細胞活性化を誘導する。更なる実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、0.0007 µg/ml未満のような、0.0008 µg/ml未満などの、0.0009 µg/ml未満のような、0.001 µg/ml未満などの、0.005 µg/ml未満のCD25発現のEC₅₀濃度を有するCD8⁺ T細胞活性化を誘導する。

40

【0136】

一実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、0.0009 µg/ml未満のような、0.001 µg/ml

50

未満などの、 $0.002 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のような、 $0.003 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満などの、 $0.004 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のCD69発現のEC₅₀濃度を有するCD4⁺ T細胞活性化を誘導する。更なる実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、 $0.0015 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のような、 $0.0020 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満などの、 $0.0025 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のような、 $0.0030 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満などの、 $0.0035 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のCD69発現のEC₅₀濃度を有するCD8⁺ T細胞活性化を誘導する。

【0137】

一実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、 $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のような、 $0.006 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満などの、 $0.007 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のような、 $0.008 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満などの、 $0.01 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のPD-1発現のEC₅₀濃度を有するCD4⁺ T細胞活性化を誘導する。更なる実施形態において、本明細書に記載される抗体は、本明細書において実施例に記載されるように、例えば、L-428腫瘍細胞を使用し、フローサイトメトリーによって測定してアッセイされるとき、 $0.003 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のような、 $0.004 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満などの、 $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のような、 $0.006 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満などの、 $0.007 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満のPD-1発現のEC₅₀濃度を有するCD8⁺ T細胞活性化を誘導する。

【0138】

アッセイは、当業者に一般的に知られるように行われ得、任意に、4:1のエフェクター細胞対標的細胞(E:T)の比、及び/又は任意に、72時間のインキュベーション期間を含み得る。アッセイは、例えば、腫瘍細胞、好ましくは、標識された腫瘍細胞、例えば、L-428腫瘍細胞を提供すること、本明細書に記載される抗体を、好ましくは段階希釈で添加すること、T細胞、好ましくは標識されたT細胞を、4:1のE:Tであるエフェクター対標的の比で提供し、72時間インキュベートすること、任意に、CD4、CD8、CD25、CD69、及び/又はPD-1などの関連パラメータについて染色すること、並びに最終的に、FACSのようなフローサイトメトリーを使用して細胞を分析することによって実施することができる。生きた細胞及び/又はT細胞増殖/活性化%は、当業者に公知の分析によって得られたデータから計算され得る。

【0139】

本発明の抗体の産生

ハイブリッドハイブリドーマ及び化学的複合化方法(Marvin and Zhu (2005) Acta Pharmacol Sin 26:649)などの従来の方法は、本発明の二重特異性抗体などの、多重特異性の調製に使用することができる。異なる重鎖及び軽鎖からなる、2つの抗体の宿主細胞における共発現は、所望の二重特異性抗体に加えて、可能な抗体産物の混合物をもたらす、これは次いで、例えば、親和性クロマトグラフィー又は類似の方法によって単離することができる。

【0140】

前述のように、異なる抗体構築物の共発現時に、機能的二重特異性産物の形成を優先する戦略、例えば、Lindhofer et al. (1995 J Immunol 155:219)によって記載される方法も使用することができる。異なる抗体を産生するラット及びマウスヒドローマの融合は、優先的な種制限重鎖/軽鎖対合のために、限られた数のヘテロ二量体タンパク質をもたらす。ホモ二量体に対してヘテロ二量体の形成を促進する別の戦略は、第1の重鎖ポリペプチド及び第2の重鎖ポリペプチド中の対応する空洞に隆起が導入され、ひいては隆起をこれら2つの重鎖の界面で空洞内に配置して、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体の形成を妨げる「ノブ-イントゥ-ホール」戦略である。「隆起」は、第1のポリペプチドの界面からより大きな側鎖で小さなアミノ酸側鎖を置き換えることによって構築される。隆起と同一又は類似のサイズの補正的「空洞」は

、大きなアミノ酸側鎖をより小さな側鎖で置き換えることによって、第2のポリペプチドの界面に作製される（米国特許第5,731,168号）。EP1870459（Chugai）及びWO2009/089004（Amgen）は、宿主細胞における異なる抗体ドメインの共発現時にヘテロ二量体形成を優先するための他の戦略を記載する。これらの方法では、ホモ二量体形成が静電的に好ましくなく、ヘテロ二量体化が静電的に好ましいように、両方のCH3ドメインにおいてCH3-CH3界面を構成する1つ以上の残基が、荷電アミノ酸で置き換えられる。WO2007/110205（Merck）は、IgA及びIgG CH3ドメイン間の差異がヘテロ二量体化を促進するために利用される、更に別の戦略を記載する。

【0141】

二重特異性抗体を産生するための別のインビトロ方法は、WO2008/119353（Genmab）に記載されており、二重特異性抗体は、還元条件下でのインキュベーション時に、2つの単一特異性IgG4又はIgG4様抗体間での「Fabアーム」又は「半分子」交換（重鎖及び結合した軽鎖の交換）によって形成される。得られる産物は、異なる配列を含み得る2つのFabアームを有する二重特異性抗体である。

【0142】

本発明の二重特異性CD3×CD30抗体を調製するための好ましい方法は、以下のステップを含む、WO2011/131746及びWO13/060867（Genmab）に記載される方法を含む：

- a) Fc領域を含む第1の抗体を提供し、当該Fc領域が、第1のCH3領域を含み；
- b) 第2のFc領域を含む第2の抗体を提供し、当該Fc領域が、第2のCH3領域を含み、

ここで、第1の抗体が、CD30抗体であり、そして、第2の抗体が、CD3抗体であるか、又はその逆もまた同様であり、

ここで、当該第1及び第2のCH3領域の配列が、異なり、ひいては当該第1及び第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が、当該第1及び第2のCH3領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強く；

- c) 当該第1の抗体を当該第2の抗体と一緒に還元条件下でインキュベートし；そして
- d) 当該二重特異性CD×CD30抗体を得る。

【0143】

同様に、本発明は、本発明による多重特異性、例えば、二重特異性抗体を産生するための方法に関し、該方法は、

- a) 本明細書に記載されるCD30結合領域を含む第1のホモ二量体抗体と、本明細書に記載されるCD3結合領域を含む第2のホモ二量体抗体と、を提供し、ここで、当該抗体が、Fc領域を含み、任意に本明細書に記載される更なる特徴を含み、

ここで、第1及び第2の抗体の第1及び第2のCH3領域の配列が、異なり、ひいては第1及び第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が、第1及び第2のCH3領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強く；

- b) 第1の抗体を第2の抗体と一緒に、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合異性化を受けることを可能にするために十分な還元条件下でインキュベートし；そして

c) 第1の抗体の第1の免疫グロブリン重鎖及び第1の免疫グロブリン軽鎖と、第2の抗体の第2の免疫グロブリン重鎖及び第2の免疫グロブリン軽鎖と、を含む本発明のヘテロ二量体多重特異性抗体を得る、

ことを含む。

【0144】

一実施形態において、当該第1の抗体は、当該第2の抗体と一緒に、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合異性化を受けることを可能にするために十分な還元条件下でインキュベートされ、得られるヘテロ二量体抗体における当該第1及び第2の抗体間のヘテロ二量体相互作用は、37℃で24時間後に0.5mMのGSHでFabアーム交換が発生しないようなものである。

【0145】

理論に限定されることなく、ステップc)において、親抗体のヒンジ領域における重鎖ジスルフィド結合は、低減され、得られるシステインは、次いで、別の親抗体分子のシステイン残基と重鎖間ジスルフィド結合を形成することができる（元々は異なる特異性を有する）。この方法の一実施形態において、ステップc)における還元条件は、還元剤、例えば、以下からなる群から選択される還元剤の添加を含む：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、好ましくは2-メルカプトエチルアミン、ジチオスレイトール、及びトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィンからなる群から選択される還元剤。好ましい実施形態において、還元剤は、2-メルカプトエチルアミンである。更なる実施形態において、ステップc)は、例えば、還元剤の除去によって、例えば、脱塩によって、非還元性又は低還元性になる条件を復元することを含む。

10

【0146】

更なる態様において、本発明は、以下を含む単一特異性抗体に関する；

(i) それぞれ、配列番号1、2、及び3に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第1の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号4、5、及び6に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第1の軽鎖可変領域と、を含むCD30結合領域、および

20

(ii) 第1及び第2のFcポリペプチドからなるFc領域であって、第1及び第2のFcポリペプチドが、それぞれ、L234及びL235位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F及びEへの置換を含み、そしてここで、第1及び第2のFcポリペプチドが、ヒトIgG1重鎖におけるG236位のアミノ酸に対応するアミノ酸の置換を更に含み、ここで、置換が、好ましくはRへの置換であり、ここで、アミノ酸位置が、Euナンバリングによって定義されるとおりである、Fc領域。

【0147】

一実施形態において、第1の重鎖可変領域は、配列番号13に記載される配列を含み、第1の軽鎖可変領域は、配列番号14に記載される配列を含む。

【0148】

更なる態様において、本発明は、以下を含む単一特異性抗体に関する；

30

(i) それぞれ、配列番号7、8、及び9に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第2の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号10、11、及び12に記載されるCDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む第2の軽鎖可変領域と、を含むCD3結合領域、および

(ii) 第1及び第2のFcポリペプチドからなるFc領域であって、第1及び第2のFcポリペプチドが、それぞれ、L234及びL235位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F及びEへの置換を含み、そしてここで、第1及び第2のFcポリペプチドが、ヒトIgG1重鎖におけるG236位のアミノ酸に対応するアミノ酸の置換を更に含み、ここで、置換が、好ましくはRへの置換であり、ここで、アミノ酸位置が、Euナンバリングによって定義されるとおりである、Fc領域。

40

【0149】

一実施形態において、配列番号9におけるXは、Hである。別の実施形態において、配列番号9におけるXは、Gである。一実施形態において、第2の重鎖可変領域は、配列番号15に記載される配列を含み、第2の軽鎖可変領域は、配列番号16に記載される配列を含む。

【0150】

一実施形態において、上記の単一特異性抗体は、全長抗体である。好ましくは、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、Y407、及びK409からなる群から選択される位置に対応する位置にあるアミノ酸のうちの少なくとも1つは置換されており、好ましくは、F405に対応する位置にあるアミノ酸はLで

50

あるか、又は、K 4 0 9 に対応する位置にあるアミノ酸は R である。

【0151】

更なる態様において、本発明は、多重特異性抗体を産生するための方法に関し、該方法は、

a) 本明細書における上記のような第 1 の単一特異性 C D 3 0 抗体、及び、以下を含む第 2 の抗体、を提供するか；

(i) それぞれ、配列番号 7、8、及び 9 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 10、11、及び 12 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の軽鎖可変領域と、を含む C D 3 結合領域、および

(ii) 第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドからなる F c 領域であって、第 1 及び第 2 のポリペプチドが、それぞれ、L 2 3 4 及び L 2 3 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F 及び E への置換と、ヒト I g G 1 重鎖における D 2 6 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、A への置換と、を含む F c 領域、

又は

本明細書における上記のような第 2 の単一特異性 C D 3 抗体、及び、以下を含む第 1 の抗体、を提供し；

(i) それぞれ、配列番号 1、2、及び 3 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 4、5、及び 6 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の軽鎖可変領域と、を含む、C D 3 0 結合領域、および

(ii) 第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドからなる F c 領域であって、第 1 及び第 2 のポリペプチドが、それぞれ、L 2 3 4 及び L 2 3 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F 及び E への置換と、ヒト I g G 1 重鎖における D 2 6 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、A への置換と、を含む、F c 領域；

ここで、第 1 及び第 2 の抗体の第 1 及び第 2 の C H 3 領域の配列が、異なり、ひいては第 1 及び第 2 の C H 3 領域間のヘテロ二量体相互作用が、第 1 及び第 2 の C H 3 領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強く、ここで、好ましくは、第 1 の C H 3 領域において、F 4 0 5 に対応する位置にあるアミノ酸が L であり、そして、第 2 の C H 3 領域において、K 4 0 9 に対応する位置にあるアミノ酸が R であるか、又はその逆もまた同様であり；

b) 第 1 の抗体を第 2 の抗体と一緒に、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合異性化を受けることを可能にするために十分な還元条件下でインキュベートし；そして

c) 第 1 の抗体の第 1 の免疫グロブリン重鎖及び第 1 の免疫グロブリン軽鎖と、第 2 の抗体の第 2 の免疫グロブリン重鎖及び第 2 の免疫グロブリン軽鎖と、を含む多重特異性抗体を得る、

ことを含む、方法。

【0152】

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載される多重特異性抗体を産生するための方法に関し、該方法は、

a) 本明細書に記載される第 1 の単一特異性 C D 3 0 抗体、および、以下を含む第 2 の抗体、を提供し；

(i) それぞれ、配列番号 7、8、及び 9 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の重鎖可変領域と、それぞれ、配列番号 10、11、及び 12 に記載される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む第 2 の軽鎖可変領域と、を含む、C D 3 結合領域、および

(ii) 第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドからなる F c 領域であって、第 1 及び第 2 のポリペプチドが、それぞれ、L 2 3 4 及び L 2 3 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、F 及び E への置換と、ヒト I g G 1 重鎖における D 2 6 5 位のアミノ酸に対応するアミノ酸の、A への置換と、を含む、F c 領域、

ここで、第 1 及び第 2 の抗体の第 1 及び第 2 の C H 3 領域の配列が、異なり、ひいては

第1及び第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が、第1及び第2のCH3領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強く、ここで、好ましくは、第1のCH3領域において、K409に対応する位置にあるアミノ酸がRであり、そして、第2のCH3領域において、F405に対応する位置にあるアミノ酸がLである；

b) 第1の抗体を第2の抗体と一緒に、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合異性化を受けることを可能にするために十分な還元条件下でインキュベートし；そして

c) 第1の抗体の第1の免疫グロブリン重鎖及び第1の免疫グロブリン軽鎖と、第2の抗体の第2の免疫グロブリン重鎖及び第2の免疫グロブリン軽鎖と、を含む多重特異性抗体を得る、

ことを含む。

10

【0153】

本発明は、本明細書に記載される方法によって得られる多重特異性抗体に更に関する。

【0154】

上記の方法において、CD30及び／又はCD3に結合することができる第1又は第2のホモ二量体抗体を提供するステップは、以下のステップを含み得る；

－1以上の当該抗体を産生するための発現ベクターを含有する細胞を提供するステップ、

－細胞を1以上の当該抗体を産生させるステップ、その後、

－1又は複数の当該抗体を得て、それによって1以上の当該抗体を提供するステップ。

【0155】

この方法の一実施形態において、当該第1及び／又は第2のホモ二量体抗体は、全長抗体である。

20

【0156】

第1及び第2のホモ二量体抗体のFc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4を含むが、これらに限定されない、任意のアイソタイプであり得る。この方法の一実施形態において、当該第1及び当該第2のホモ二量体抗体の両方のFc領域は、IgG1アイソタイプである。別の実施形態において、当該ホモ二量体抗体のFc領域の一方は、IgG1アイソタイプであり、他方は、IgG4アイソタイプである。後者の実施形態において、得られる二重特異性抗体は、IgG1のFc領域及びIgG4のFc領域を含み、よって、エフェクター機能の活性化に関して興味深い中間体特性を有し得る。

【0157】

30

更なる実施形態において、ホモ二量体出発抗体のうちの1つは、プロテインAに結合しないように操作されており、よって産物をプロテインAカラム上に通すことによってヘテロ二量体抗体をホモ二量体出発抗体から分離することを可能にし、フロースルーを除去し、ヘテロ二量体抗体をプロテインAカラムから溶出させて、精製されたヘテロ二量体抗体組成物を得る。

【0158】

上述のように、ホモ二量体出発抗体の第1及び第2のCH3領域の配列は、異なり得、ひいては当該第1及び第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用は、当該第1及び第2のCH3領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強い。これらの相互作用及びそれらを達成することができる方法についての詳細は、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる、WO2011/131746及びWO2013/060867 (Genmab) に提供される。

40

【0159】

特に、安定な二重特異性CD3×CD30抗体は、それぞれ、CD30及びCD3に結合し、CH3領域に少数のみの、かなり保存的な非対称変異を含有する2つのホモ二量体出発抗体に基づいて、本発明の上記方法を使用して高収率で得ることができる。非対称変異は、当該第1及び第2のCH3領域の配列が非同位位置でアミノ酸置換を含有することを意味する。

【0160】

本発明の多重特異性、例えば、二重特異性抗体はまた、単一細胞における第1及び第2

50

のポリペプチドをコードする構築物の共発現によって得られ得る。

【0161】

よって、更なる態様において、本発明は、本発明による多重特異性抗体をコードする核酸構築物、又は核酸構築物の組み合わせに関し、そのような核酸構築物を含む発現ベクター、又は発現ベクターの組み合わせに関する。

【0162】

更に、本発明は、本発明による多重特異性抗体を産生することができる組換え宿主細胞に関し、宿主細胞は、本発明による多重特異性抗体をコードする1つ以上の核酸構築物を含む。

【0163】

したがって、本発明はまた、本発明による多重特異性抗体を産生するための方法に関し、該方法は、

(i) 抗体が産生される条件下で本発明の組換え宿主細胞を培養することと、

(ii) 産生された多重特異性抗体を培養物から単離することと、を含む。

【0164】

一実施形態において、当該方法は、以下のステップを含む：

a) 第1の抗体重鎖の第1のFc領域及び第1の抗原結合領域を含む第1のポリペプチドをコードする第1の核酸構築物を提供し、当該第1のFc領域が、第1のCH3領域を含み、

b) 第2の抗体重鎖の第2のFc領域及び第2の抗原結合領域を含む第2のポリペプチドをコードする第2の核酸構築物を提供し、当該第2のFc領域が、第2のCH3領域を含み、

ここで、当該第1及び第2のCH3領域の配列が、異なり、ひいては当該第1及び第2のCH3領域間のヘテロ二量体相互作用が、当該第1及び第2のCH3領域のホモ二量体相互作用の各々よりも強く、ここで、任意に、当該第1及び第2の核酸構築物が、当該第1及び第2の抗体の軽鎖配列をコードし；

c) 当該第1及び第2の核酸構築物を宿主細胞において共発現させ；そして

d) 当該ヘテロ二量体タンパク質を細胞培養物から得る。

【0165】

好ましくは、F405に対応する位置にあるコードされたアミノ酸は、第1のCH3領域にあるLであり、K409に対応する位置にあるコードされたアミノ酸は、第2のCH3領域にあるRであるか、又はその逆もまた同様である。

【0166】

プロモーター、エンハンサーなどを含む、好適な発現ベクター、及び抗体の産生に好適な宿主細胞は、当該技術分野で周知である。宿主細胞の例としては、酵母、細菌、及び哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)又はヒト、例えば、ヒト胚性腎臓(HEK)細胞が挙げられる。

【0167】

本明細書に定義される核酸、又は1つ以上の核酸は、RNA又はDNAであり得る。本明細書で定義される核酸、又は1つ以上の核酸は、哺乳動物細胞における発現における使用のためのものであり得る。したがって、更に、本発明は、本明細書で定義される、核酸又は核酸(複数)を含む、1以上の細胞を提供する。

【0168】

本発明の文脈における核酸は、染色体、非染色体、及び合成核酸ベクター(好適な発現制御要素のセットを含む核酸配列)を含む、任意の好適なベクターであり得る、発現ベクターであり得る。そのようなベクターの例としては、SV40の誘導体、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミド及びファージDNAの組み合わせに由来するベクター、並びにウイルス核酸(RNA又はDNA)ベクターが挙げられる。一実施形態において、CD30又はCD3抗体コード核酸は、例えば、直鎖発現要素(例えば、Sykes and Johnston, Nat Biotech 1

10

20

30

40

50

7, 355 59 (1997)に記載される)、コンパクト核酸ベクター(例えば、US 6, 077, 835及び/又はWO 00/70087に記載される)、pBR322、pUC 19/18、若しくはpUC 118/119などのプラスミドベクター、「ミッジ」最小サイズの核酸ベクター(例えば、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793 800 (2001)に記載される)を含む、裸のDNA若しくはRNAベクターに、又はCaP04沈澱構築物(例えば、WO2000/46147、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551 55 (1986)、Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)、及びCoraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)に記載される)などの、沈澱核酸ベクター構築物として含まれる。そのような核酸ベクター及びその使用法は、当該技術分野で周知である(例えば、US 5, 589, 466及びUS 5, 973, 972を参照されたい)。

【0169】

一実施形態において、ベクターは、細菌細胞におけるCD30抗体及び/又はCD3抗体の発現に適している。そのようなベクターの例としては、BlueScript (Stratagene)、pINベクター (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503 5509 (1989))、pETベクター (Novagen, Madison WI) などのような発現ベクターが挙げられる。

【0170】

発現ベクターはまた、又は代替的に、酵母系における発現に好適なベクターであり得る。酵母系における発現に好適な任意のベクターが使用され得る。好適なベクターとしては、例えば、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、及びPGHなどの構成的又は誘導性プロモーターを含むベクターが挙げられる (F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987))、及びGrant et al., Methods in Enzymol 153, 516 544 (1987)において概説される)。

【0171】

核酸及び/又は発現ベクターはまた、分泌/局在化配列をコードする核酸配列を含み得、これは、新生ポリペプチド鎖などの、ポリペプチドを、細胞周辺腔又は細胞培養培地に標的化することができる。そのような配列は、当該技術分野で既知であり、分泌リーダー又はシグナルペプチドを含む。核酸及び/又は発現ベクターは、(二重特異性)抗体の成分が発現されるように、発現、すなわち、核酸の転写及び/又は翻訳を促進する任意の好適な要素を含み得る。核酸及び/又はベクターは、任意の好適なプロモーター、エンハンサー、及び他の発現促進要素と会合する。そのような要素の例としては、強い発現プロモーター(例えば、ヒトCMV IEプロモーター/エンハンサー、並びにRSV、SV40、SL3 3、MMTV、及びHIV LTRプロモーター)、有効なポリ(A)終結配列、E. coliにおけるプラスミド産物の複製起点、選択可能なマーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、及び/又は便利なクローニング部位(例えば、ポリリンカー)が挙げられる。核酸は、CMV IEなどの構成的プロモーターとは対照的に、誘導性プロモーターも含み得る。

【0172】

組成物及び(医学的)使用

更に、本発明は、本明細書に定義される抗体を含む組成物を提供する。好ましくは、そのような組成物は、薬学的組成物であり、すなわち、抗体は、薬学的に許容される担体に含まれる。

【0173】

薬学的組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示されるもの

10

20

30

40

50

などの従来の技法に従って製剤化され得る。本発明の薬学的組成物は、例えば、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、洗剤（例えば、Tween-20又はTween-80などの、非イオン性洗剤）、安定剤（例えば、糖又はタンパク質を含まないアミノ酸）、防腐剤、組織固定剤、可溶化剤、及び／又は薬学的組成物中の包含に好適な他の材料を含み得る。

【0174】

薬学的組成物は、任意の好適な経路及びモードによって投与され得る。一実施形態において、薬学的組成物は、静脈内又は皮下注射又は注入によって投与される。

【0175】

本発明による抗体、組成物、又は薬学的組成物は、好ましくは、医薬としての使用のためのものである。

【0176】

本発明による抗体、組成物、又は薬学的組成物は、好ましくは、疾患の治療における使用のためのものである。

【0177】

特に、本発明の二重特異性抗体は、様々な形態のがんの治療のために使用され得る。

【0178】

一態様において、本発明は、対象においてがんを治療するための方法を提供し、その方法は、治療有効量の本発明の多重特異性抗体の投与を含む。更なる実施形態において、本発明は、対象において、CD30を発現する細胞を含む障害を治療するための方法を提供し、その方法は、治療有効量の本発明の多重特異性抗体の投与を含む。

【0179】

前述のように、本発明による方法及び使用において企図することができる好適な疾患は、がんである。当該がんは、最も好ましくは、CD30の発現を特徴とする。がんにおけるCD30の発現は、PCR、免疫染色、又はFACS分析などの、当該技術分野で既知の方法を使用して、すなわち、CD30転写物及び／又はタンパク質の発現の検出をして、容易に決定することができる。ヒトCD30に結合することができる本明細書に記載される抗体は、例えば、免疫染色及び／又はFACS分析などにおいて使用され得る。

【0180】

一態様において、本発明は、ホジキンリンパ腫又は未分化大細胞リンパ腫の治療における使用のための、本発明による多重特異性抗体、組成物、又は薬学的組成物に関する。

【0181】

更なる態様において、本発明は、ホジキンリンパ腫（HL）又は非ホジキンリンパ腫（NHL）の治療における使用のための、本発明による多重特異性抗体、組成物、又は薬学的組成物に関する。

【0182】

一実施形態において、ホジキンリンパ腫は、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）である。

【0183】

一実施形態において、非ホジキンリンパ腫は、T細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）又はB細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）である。更なる実施形態において、非ホジキンリンパ腫は、T細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）である。

【0184】

更なる実施形態において、T細胞非ホジキンリンパ腫は、末梢T細胞リンパ腫（PTCL）又は皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）である。なお更なる実施形態において、T細胞非ホジキンリンパ腫（T-NHL）は、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）である。なお更なる実施形態において、末梢T細胞リンパ腫（PTCL）は、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）である。

【0185】

一実施形態において、B細胞非ホジキンリンパ腫（B-NHL）は、マントル細胞リンパ腫（MCL）である。

【0186】

10

20

30

40

50

より更なる実施形態において、ホジキンリンパ腫（HL）は、再発性及び難治性ホジキンリンパ腫である。更なる実施形態において、ホジキンリンパ腫（HL）は、CD30＋ホジキンリンパ腫である。なお更なる実施形態において、ホジキンリンパ腫（HL）は、再発性及び難治性CD30＋ホジキンリンパ腫である。より更なる実施形態において、ホジキンリンパ腫（HL）は、再発性及び難治性CD30＋古典的ホジキンリンパ腫である。
【0187】

より更なる実施形態において、非ホジキンリンパ腫（NHL）は、再発性及び難治性非ホジキンリンパ腫である。更なる実施形態において、非ホジキンリンパ腫（NHL）は、CD30＋非ホジキンリンパ腫である。なお更なる実施形態において、非ホジキンリンパ腫（NHL）は、再発性及び難治性CD30＋非ホジキンリンパ腫である。

10

【0188】

更なる実施形態において、ホジキンリンパ腫（HL）又は非ホジキンリンパ腫（NHL）の治療における使用のための本発明による多重特異性抗体、組成物、又は薬学的組成物は、静脈内及び／又は皮下、好ましくは皮下投与されているか、又は投与された。

【0189】

更なる実施形態において、がんと診断されている患者は、がん細胞におけるCD30発現の評価に供され得、CD30が検出されるとき、これは低～高の範囲であり得、そのような患者は、本発明による抗体での治療に選択され得る。しかしながら、治療について患者を選択する際にそのような評価を含めることが必ずしも要件ではない場合がある。

【0190】

20

本発明の多重特異性抗体は、CD30を発現する細胞を含む障害の診断及び治療を含む多数のインビトロ及びインビボ診断及び治療有用性を有する。例えば、抗体は、様々な障害を治療、予防、及び／又は診断するために、培養物中の細胞に、例えば、インビトロ若しくはエクスピボで、又は対象に、例えば、インビボで投与することができる。本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、ヒト及び非ヒト個体を含むことが意図される。

【0191】

一態様において、本発明は、本明細書に開示される実施形態のいずれか1つに記載の多重特異性抗体を含む診断用組成物に関する。

【0192】

一実施形態において、診断用組成物は、多重特異性抗体での治療から利益を得得るであろう患者をスクリーニングし、選択するために使用されるコンパニオン診断薬である。

30

【0193】

キット

本発明は、上記に開示される抗体を含むキットオブパーツ、例えば、コンパニオン診断薬としての／患者の集団内で、本明細書において上記で定義される抗体での治療に応答する傾向を有する患者を特定するための、又は患者の治療に使用されるときに当該抗体の有効性若しくは抗腫瘍活性を予想するための使用のためのキットであって、上記に定義される抗体と当該キットの使用説明書とを含む、キットを提供する。

【0194】

一実施形態において、本発明は、多重特異性CD3×CD30抗体を含む容器と、CD30発現細胞及びCD3発現細胞の架橋を検出するための1つ以上の試薬と、を含む、がんの診断のためのキットを提供する。試薬は、例えば、蛍光タグ、酵素タグ、又は他の検出可能なタグを含み得る。試薬はまた、酵素反応のための二次又は三次抗体又は試薬を含み得、酵素反応は、視覚化され得る産物を産生する。

40

【0195】

更なる態様において、本発明は、本明細書に開示される実施形態のいずれか1つによる多重特異性抗体の投与時に、患者に由来する試料においてCD30発現細胞及びCD3発現細胞間の架橋が生じるかを検出するための方法に関し、該方法は、

(i) 試料を、本明細書に開示される実施形態のいずれか1つによる多重特異性抗体と、当該二重特異性抗体とCD30発現細胞及びCD3発現細胞との間の複合体の形成を可能

50

にする条件下で接触させ、そして、
(i i) 複合体が形成されたかを分析する、
ことを含む。

【 0 1 9 6 】

核酸構築物及び送達ビヒクルの送達

更なる態様において、本発明は、インビボ発現のための本発明の抗体をコードする核酸構築物の投与に関する。抗体をコードする核酸のインビボ発現のために、当該核酸は、典型的には、核酸が対象の細胞に入るために好適な形態で投与される。インビボ発現のための核酸を送達するための異なる方法が存在し、機械的手段及び化学的手段を含む方法の両方を含む。例えば、そのような方法は、エレクトロポレーション又は核酸を皮膚上に入れ墨することを含み得る (P a t e l e t a l . , 2 0 1 8 , C e l l R e p o r t s 2 5 , 1 9 8 2 - 1 9 9 3) 。対象への核酸の投与に好適な他の方法は、好適な製剤中の核酸の投与を伴う。

【 0 1 9 7 】

よって、本発明はまた、本発明による核酸又は核酸の組み合わせを含む送達ビヒクルに関する。いくつかの実施形態において、当該送達ビヒクルは、脂質製剤であり得る。製剤の脂質は、粒子、例えば、脂質ナノ粒子 (L N P) であり得る。本発明の核酸又は核酸の組み合わせは、当該粒子内、例えば、当該 L N P 内にカプセル化され得る。インビボ発現のための対象への核酸の投与に好適な異なる脂質製剤は、当業者に周知である。例えば、当該脂質製剤は、典型的には、脂質、イオン化可能なアミノ脂質、 P E G 脂質、コレステロール、又はそれらの任意の組み合わせを含み得る。

【 0 1 9 8 】

治療抗体の発現のための対象への核酸の投与に好適な脂質製剤の調製のための様々な形態及び方法は、当該技術分野で周知である。そのような脂質製剤の例としては、US 2 0 1 8 / 0 1 7 0 8 6 6 (A r c t u r u s) 、 E P 2 3 9 1 3 4 3 (A r b u t u s) 、 W O 2 0 1 8 / 0 0 6 0 5 2 (P r o t i v a) 、 W O 2 0 1 4 / 1 5 2 7 7 4 (S h i r e H u m a n G e n e t i c s) 、 E P 2 9 7 2 3 6 0 (T r a n s l a t e B i o) 、 US 1 0 1 9 5 1 5 6 (M o d e r n a) 、及び US 2 0 1 9 / 0 0 2 2 2 4 7 (A c u i t a s) に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 9 9 】

したがって、更なる態様において、本発明は、(a) 医薬としての使用のための、好ましくはホジキンリンパ腫又は未分化大細胞リンパ腫の治療などの、がんの治療における使用のための、本発明による核酸構築物又は本発明による送達ビヒクルに関する。

【 0 2 0 0 】

本発明は、以下の例によって更に例示され、これは、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【 0 2 0 1 】

実施例 1 2-MEA 誘導 F a b - アーム交換による C D 3 × C D 3 0 二重特異性抗体の生成

以下の抗体を実施例に使用した：

【 0 2 0 2 】

ヒト化 C D 3 抗体

W O 2 0 1 5 / 0 0 1 0 8 5 (G e n m a b) の実施例 1 に記載される I g G 1 - h u C D 3 - H 1 L 1 である。I g G 1 - h u C D 3 - H 1 L 1 は、本明細書において「I g G 1 - h u C D 3」と称される。

W O 2 0 1 7 / 0 0 9 4 4 2 (G e n m a b) の実施例 2 に記載される I g G 1 - h u C D 3 - H 1 L 1 - H 1 0 1 G である。I g G 1 - h u C D 3 - H 1 L 1 - H 1 0 1 G は、本明細書において「I g G 1 - h u C D 3 - H 1 0 1 G」と称される。

【 0 2 0 3 】

CD30抗体

HuMab 5F11とも称される、MDX-060は、WO2003/059282 (Medarex) に開示されている。hAC10 (又はSGN-30) は、US8257706及びUS20100239571 (Seattle genetics) に開示されている。HRS-3は、WO2016/0177846 (Affimed) に開示されている。HeFi-1、T405、T105、T408、及びT215は、WO2007/040653 (米国政府及び保健) に開示されている。

【0204】**抗体発現**

抗体配列を、pcDNA3.3発現ベクター (Invitrogen、US) にクローニングし、FcドメインにおいてFcサイレンシング及び／又はDuoBody (登録商標) 技術アミノ酸置換あり又はなしで、IgG1、κ又はIgG1、λとして発現させた (下記を参照されたい)。全ての抗体を、本質的に製造業者によって記載されるように、Expifectamine (商標) 293 (Thermo Fisher Scientific、cat. no. A14525) を使用して、Exp293F (商標) 細胞 (Thermo Fisher Scientific、US、cat. no. A14527) において関連する重鎖及び軽鎖発現ベクターを共トランスフェクションすることによって、無血清条件下で産生した。

【0205】**二重特異性抗体の生成**

二重特異性抗体を、DuoBody (登録商標) プラットフォーム技術、すなわち、WO2011/147986、WO2011/131746及びWO2013/060867 (Genmab) 並びにLabrijnet al. (Labrijnet al., PNAS 2013, 110:5145-50、Gramer et al., Mabs 2013, 5:962-973) に記載される2-MEA誘導された制御されたFab-アーム交換 (cFAE) を使用してインビトロで生成した。この方法によって二重特異性抗体の生成を可能にするために、CH3ドメインにおける単一変異を保有するIgG1分子を生成した: 1つの親IgG1抗体においては、F405L変異 (すなわち、CD3抗体又は対照、HIV-1 gp120特異的、抗体) であり、他の親IgG1抗体においては、K409R変異 (すなわち、CD30又は対照抗体) である。これらの変異に加えて、親IgG1抗体は、IgG Fc受容体 (Fcガンマ受容体) 及び／又は補体因子、例えば、C1q: L234F、L235E、D265A (FEA、US2015/0337049) 若しくはL234F、L235E、G236R (FER) と相互作用することができないFcドメインをもたらす置換を含んだ。

【0206】

Fcサイレンシング及びDuoBody (登録商標) 技術変異の組み合わせは、以下のよう

L234F、L235E、D265A、及びF405L: FEAL

L234F、L235E、D265A、及びK409R: FEAR

L234F、L235E、G236R、及びK409R: FERR

【0207】

親抗体の重鎖 (HC) 及び軽鎖 (LC) 配列は、以下の配列番号で記載される:

10

20

30

40

50

【表 4】

IgG1-huCD3-FEAL:	配列番号 19(HC)及び配列番号 20(LC)。
IgG1-huCD3-H101G-FEAL:	配列番号 35(HC)及び配列番号 20(LC)。
IgG1-CD30-MDX060-FERR:	配列番号 17(HC)及び配列番号 18(LC)。
IgG1-CD30-MDX060-FEAR:	配列番号 55(HC)及び配列番号 18(LC)。
IgG1-CD30-hAC10-FEAR:	配列番号 21(HC)及び配列番号 22(LC)。
IgG1-CD30-HRS-3-FEAR:	配列番号 23(HC)及び配列番号 24(LC)。
IgG1-CD30-HeFi-I-FEAR:	配列番号 25(HC)及び配列番号 26(LC)。
IgG1-CD30-T405-FEAR:	配列番号 27(HC)及び配列番号 28(LC)。
IgG1-CD30-T105-FEAR:	配列番号 29(HC)及び配列番号 30(LC)。
IgG1-CD30-T408-FEAR:	配列番号 31(HC)及び配列番号 32(LC)。
IgG1-CD30-T215-FEAR:	配列番号 33(HC)及び配列番号 34(LC)。

10

20

【0208】

二重特異性抗体を生成するために、2つの親抗体を等モル比でPBS緩衝液（リン酸塩緩衝生理食塩水、8.7mMの HPO_4^{2-} 、1.8mMの H_2PO_4^- 、163.9mMの Na^+ 、140.3mMの Cl^- 、pH7.4）中で混合した。2-メルカプトエチルアミン-HCl（2-MEA）を75mMの最終濃度に加え、反応混合物を31℃で5時間インキュベートした。2-MEAを、製造業者のプロトコルに従って10kDaの分子量カットオフSlide-A-Lyzerキャリッジ（Thermo Fisher Scientific）を使用してPBS緩衝液中への透析によって除去した。試料を4℃で一晩保存して、ジスルフィド結合の再酸化及び無傷の二重特異性抗体の形成を可能にした。cFAEの有効性は、Gramer et al. (MAbs. 2013 Nov 1; 5(6):962-973.) によって記載されるエレクトロスプレーイオン化質量分析（ESI-MS）によって評価されるように、>95%であった。

30

【0209】

非結合対照抗体b12

IgG1-b12は、HIV-1 gp120特異的抗体（Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230(3):812-23）であり、それは、例のいくつかにおいて陰性、非結合対照抗体として使用される。重鎖の配列及び軽鎖の配列は、本明細書において、それぞれ、配列番号36及び37（FEAL）又はそれぞれ、配列番号38及び37（FERR）として含まれる。

【0210】

実施例2-ヒトホジキンリンパ腫（HL）、未分化大細胞リンパ腫（ALCL）、及びTLL細胞株におけるCD30発現

40

CD30表面発現レベルを、定量的フローサイトメトリー（ヒトIgGキャリブレーターキット、Biocytex, cat no. CP010）を使用して、HL、ALCL、及びTLL細胞株（表4）のパネルにおいて評価した。細胞（ 5×10^4 細胞/ウェル）を、ポリスチレン96ウェル丸底プレート（Greiner bio-one, cat no. 650180）において50μLの染色緩衝液（0.1%ウシ血清アルブミン [BSA、画分V、Roche, cat no. 10735086001] 及び0.02% NaN3 [Sigma Aldrich, cat no. 13412] で補足されたPBS [Lonza, cat no. BE17-517Q]）中の10μg/mLのIgG1-

50

CD30-MDX060-FERRと4℃で30分間インキュベートした。並行して、ヒトIgGキャリブレーターキット（Biocytex、cat. no. CP010）を、本質的に製造業者の指示に従って使用して標準曲線を生成した。ビーズ当たり十分に定義された数のヒトIgGモノクローナル抗体を含む較正ビーズを、同じR-PE複合化二次抗体（Jackson ImmunoResearch, UK、cat. no. 109-116-098、1:500希釈）と4℃で光から保護して30分間インキュベートした。細胞及びビーズをFACS緩衝液で洗浄し、FACS Celestaフローサイトメーター（BD Biosciences, USA）でフローサイトメトリーによって分析した。ヒトIgGキャリブレーターキットを使用して得られた標準曲線を使用して、GraphPad Prism Softwareを使用して、細胞当たりの結合したIgG1-CD30-MDX060-FERR抗体（ABC）の数を補間し、細胞表面上で発現したCD30分子の数の推定値を表した。

【0211】

表4及び5は、定量下限（LLOQ）を上回るCD30発現がSUP-T1を除く全ての細胞株において観察されたことを示す。

【表5】

表4：細胞株の概要及びCD30の発現

細胞株	腫瘍型	カタログ	供給業者	CD30 発現(ABC)		
				中央	範囲	n
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	145,723	61,779-271,304	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	120,725	102,787-133,437	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	56,578	51,737-87,841	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	19,720	17,283-29,129	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	15,406	11,102-18,333	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4,548	4,054-4,838	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127,616	70,495-172,019	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104,947	69,630-133,464	3
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	124,669	77,610-139,598	3
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	122,003	55,416-153,484	3

SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	6,129	37,047-93,777	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	75,238	72,529-80,697	2
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19,399	20,608-18,189	2
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

【0212】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 5：細胞株の概要及びCD30の平均発現

細胞株	腫瘍型	カタログ	供給業者	CD30 発現(ABC)		
				平均	範囲	n
DEL	ALCL	ACC 338	DSMZ	110,301	55,416 – 153,484	3
DL-40	ALCL	JCRB1337	JCRB	98,174	60,392 – 156,229	3
HDLM-2	HL	CRL-2965	ATCC	64,510	51,737 – 87,841	3
HH	CTCL	ACC 707	DSMZ	161,740	122,598 – 206,774	3
HuT 78	ALCL	TIB-161	ATCC	19,399	20,608-18,189	2
JVM-2	MCL	ACC 12	DSMZ	25,842	12,644 – 43,081	3
KARPAS-299	ALCL	06072604	PHE	91,426	77,730-106,058	3
KI-JK	ALCL	ACC 695	DSMZ	118,794	77,610 – 139,598	3
KM-H2	HL	ACC 8	DSMZ	22,044	17,283 – 29,129	3
L-1236	HL	ACC 530	DSMZ	4,480	4,054 – 4,838	3
L-428	HL	ACC 197	DSMZ	117,743	102,787 – 133,437	3
L-540	HL	ACC 72	DSMZ	159,602	61,779 – 271,304	3
L-82	ALCL	ACC 597	DSMZ	127,616	70,495 – 172,019	3
NCEB-1	MCL	CRL-3005	ATCC	14,947	11,102 – 18,333	3
SR-786	ALCL	ACC 369	DSMZ	104,497	69,630 – 133,464	3
SU-DHL-1	ALCL	ACC 356	DSMZ	76,613	72,529-80,697	2
SUP-M2	ALCL	ACC 509	DSMZ	66,129	37,047 – 93,777	3
SUP-T1	TLL	CRL-1942	ATCC	<LLOQ ^a	-	3

a < LLOQ、定量下限未満（3300ABC）

【0213】

実施例3－未分化大細胞リンパ腫（ALCL）細胞などのヒトホジキンリンパ腫（HL）及び非ホジキンリンパ腫（NHL）へのCD3×CD30二重特異性抗体の結合

CD3×CD30二重特異性抗体の、2つのCD30発現ヒト腫瘍細胞株SU-DHL-1（ALCL、ATCC、cat. no. ACC 356）及びHDLM-2（HL、ATCC、cat. no. CRL-2965）への結合をフローサイトメトリーによって分析した。

【0214】

細胞（ 3×10^4 細胞／ウェル）を、ポリスチレン96ウェル丸底プレート（Greiner bio-one、cat. no. 650180）において50μLの染色緩衝液中の抗体の段階希釈液（3倍希釈ステップで0.0046～10μg/mLの範囲）と4℃で30分間インキュベートした。染色緩衝液中で2回洗浄した後、細胞を50μLの二次抗体と4℃で30分間インキュベートした。二次抗体として、染色緩衝液中で1：400に希釈されたR-PE複合化ヤギ抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch、UK、cat. no. 109-116-098）を使用した。次に、細胞を染色緩衝液中で2回洗浄し、TO-PRO-3ヨウ化物（Thermo Fisher Scientific、cat. no. T3605、1：8000希釈）で補足された100μLの染色緩衝液に再懸濁し、FACS Celestaフローサイトメーター（BD Biosciences、USA）で分析した。FSC／SSC及びTO-PRO-3染色の不在に基づいて、生きた細胞をゲーティングした。結合曲線を、GraphPad Prism V7.02ソフトウェア（GraphPad Software、San Di

e g o、C A、U S A) を使用して対数変換データの非線形回帰 (可変勾配でのシグモイド用量応答、4 パラメータ) によって分析した。

【0215】

結果

図1は、CD3 x CD30二重特異性抗体bsG1-huCD3-FEAL x CD30-MDX060-FEAR (A)、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-hAC10-FEAR (B)、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-HRS-3-FEAR (C)、BsG1-huCD3-FEAL x CD30-HeFi-I-FEAR (D)、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-T405-FEAR (E)、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-T105-FEAR (F)、BisIgG1-huCD3-FEAL x CD30-T408-FEAR (G)、及びbsG1-huCD3-FEAL x CD30-T215-FEAR (H) の、SU-DHL-1 (左パネル) 及びHDL M-2 (右パネル) 腫瘍細胞への用量応答結合曲線を示す。

10

【0216】

1. 11 µg/mL の濃度で、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-HRS-3-FEAR、及びbsG1-huCD3-FEAL x CD30-T105-FEARは、単一特異性、二価CD30親抗体IgG1-CD30-MDX060-FEAR、IgG1-CD30-hAC10-FEAR、IgG1-CD30-HRS-3-FEAR、及びIgG1-CD30-T105-FEARの結合を比較したときに同様の結合を示した (図1I)。

20

【0217】

対照的に、1. 11 µg/mL の濃度で、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-T408-FEAR、及びbsG1-huCD3-FEAL x CD30-T215-FEARの結合は、単一特異性、二価CD30親抗体IgG1-CD30-T405-FEAR、IgG1-CD30-T408-FEAR、及びIgG1-CD30-T215-FEARの、SU-DHL-1及びHDL M-2細胞への結合よりも低かった (図1I)。

【0218】

全体的に、1. 11 µg/mL の濃度でのbsG1-huCD3-FEAL x CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-HRS-3-FEAR、BsG1-huCD3-FEAL x CD30-HeFi-I-FEAR、及びbsG1-huCD3-FEAL x CD30-T105-FEARの結合は、同じ濃度でのbsG1-huCD3-FEAL x CD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEAL x CD30-T408-FEAR、及びbsG1-huCD3-FEAL x CD30-T215-FEARの結合よりも高かった (図1I)。

30

【0219】

これらの実験に含まれた陰性対照抗体BsG1-huCD3-FEAL x b12-FEARは、SU-DHL-1及びHDL M-2細胞への結合を示さず、SU-DHL-1又はHDL M-2細胞のいずれもCD3を発現しないことを示す。

40

【0220】

結論として、CD30抗体クローンT405、T408、及びT215は、二価フォーマットと比較して一価において低減した結合を示し、一方でクローンMDX060、hAC10、HRS-3、及びT105は、一価及び二価フォーマットの両方で、CD30発現腫瘍細胞への効率的な結合を示した。

【0221】

図2は、(A) HDL M-2 (HL)、(B) L-428 (HL)、(C) DEL (ALLCL)、及び(D) KI-JK (ALLCL) 細胞へのbsG1-huCD3-FEAL x CD30-MDX060-FERRの用量応答結合曲線を示す。BsG1-huCD3

50

－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rは、単一特異性、二価C D 3 0親抗体I g G 1－C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rと比較されるとき、同様の最大結合を示した。陰性対照抗体b s G 1－h u C D 3－F E A L x b 1 2－F E A R、I g G 1－h u C D 3－F E A L、及びI g G 1－b 1 2－F E A Lは、これらの細胞株のいずれへの結合も示さず、これらの細胞が細胞表面上でC D 3を発現しないことを示した。これらのデータは、b s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E E RのH L及びA L C L細胞株への効率的な結合を確認した。

【0222】

表6は、2つの独立した実験において評価される、b s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E A RのH D L M－2、L－4 2 8、D E L、及びK I－J K細胞への結合についてのE C ₅₀値を示す。E C ₅₀値は、0.05～0.30 µg/mLの範囲であった。

【表7】

表6：b s G 1－h u C D 3 x C D 3 0－M D X 0 6 0の結合についてのE C ₅₀値

細胞株	E C ₅₀ (µg/mL)	
	N=1	N=2
HDLM-2	0.1450	0.1197
L-428	0.1539	0.0705
DEL	0.3018	0.0568
KI-JK	0.1602	0.0735

【0223】

図8、9、及び10は、b s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rの、C D 3 0発現H L細胞株（図8）、A L C L細胞株（図9）、及びN H L細胞株（図10）への用量応答結合曲線を示す。全ての細胞株において、B s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rは、一価対照抗体B s G 1－b 1 2－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rと比較して同様の最大結合を示した。単一特異性、二価C D 3 0親抗体I g G 1－C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rは、全ての細胞株への用量依存的結合を示したが、B s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rと比較してより低い最大結合を示した。陰性対照抗体b s G 1－h u C D 3－F E A L x b 1 2－F E A R、I g G 1－h u C D 3－F E A L、及びI g G 1－b 1 2－F E A Lは、これらの細胞株のいずれへの結合も示さず、これらの細胞が細胞表面上でC D 3を発現しないことを示した。これらのデータは、b s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rの、H L細胞株、A L C L及びC T C L細胞株などのT－N H L、並びにM C L細胞株などのB－N H Lへの効率的な結合を確認した。

【0224】

表7は、2つ又は3つの独立した実験において評価される、b s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rの、H L、T－N H L、及びB－N H L細胞株への結合についてのE C ₅₀値を示す。E C ₅₀値は、0.12～0.35 µg/mLの範囲であった。

10

20

30

40

50

【表 8】

表 7 : b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R の結合につ
いての E C ₅₀ 値

細胞株		C D 3 0 結合		
名称	がんタイプ	平均結合 E C ₅₀	範囲結合 E C ₅₀ (μg/mL)	n 検定
L-540	HL	0.3229	0.2020 - 0.4694	3
L-428	HL	0.1743	0.1742 - 0.1744	2
KM-H2	HL	0.1587	0.1405 - 0.1824	3
L-1236	HL	0.2019	0.1628 - 0.2247	3
HDLM-2	HL	0.1674	0.1253 - 0.2206	3
L-82	ALCL	0.1999	0.1845 - 0.2153	2
SR-786	ALCL	0.3279	0.1735 - 0.5499	3
KI-JK	ALCL	0.1914	0.1431 - 0.2582	3
SUP-M2	ALCL	0.1667	0.1336 - 0.2225	3
DL-40	ALCL	0.2364	0.1698 - 0.3472	3
DEL	ALCL	0.2011	0.1430 - 0.2674	3
KARPAS-299	ALCL	0.2015	0.1343 - 0.2686	2
SUP-T1	TLL	0.3458	0.2572 - 0.4344	2
JVM-2	MCL	0.1257	0.1068 - 0.1411	3
NCEB-1	MCL	0.1564	0.1180 - 0.2000	3
HH	CTCL	0.1951	0.1559 - 0.2425	3

【 0 2 2 5 】

実施例 4 - C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体によるインビトロでの T 細胞媒介性細胞傷害性及び T 細胞増殖の誘導

C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体を、C D 3 0 陽性腫瘍細胞株を標的細胞として、T 細胞をエフェクター細胞として使用して、インビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。T 細胞の供給源として、C D 3 陽性 A D C C エフェクター細胞 I V 型 (C l e a n C e l l s 、 M o n t a i g u 、 F r a n c e) 又は精製された T 細胞 (実施例 5 に記載される) を使用して、C D 3 依存的腫瘍細胞殺滅を評価した。

【 0 2 2 6 】

S U - D H L - 1 (A L C L) 、 H u T 7 8 (A L C L) 、 H D L M - 2 (H L) 、 N C E B - 1 (M C L) 、又は L 5 4 0 (H L) 細胞を、10,000 細胞 / ウェルの密度でポリスチレン 96 ウェル丸底プレート (G r e i n e r b i o - o n e 、 c a t . n o . 6 5 0 1 8 0) に播種した。エフェクター細胞を、0.5 μ M の C F S E (カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル、C e l l S i g n a l l i n g T e c h n o l o g y 、 D a n v e r s 、 M A 、 c a t . n o . C 3 4 5 5 4) で 37 ° C で 20 分間標識し、腫瘍細胞に E : T 比 = 10 : 1 (A D C C エフェクター細胞) 又は 7 : 1 (精製 T 細胞) で添加した。二重特異性 C D 3 x C D 3 0 、 b 1 2 x C D 3 0 、又は C D 3 x b 1 2 抗体、又は単一特異性二価 C D 3 0 抗体の段階希釈液を添加し (10 ~ 0.041 μ g / m L の範囲の最終濃度、3 倍希釈液) 、細胞を 37 ° C で 72 時間インキュベートし

た。いくつかの実験では、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E A R のバリエーションを、C D 3 についての親和性が低減した、H 1 0 1 G 変異を含有する C D 3 結合アームと使用した (W O 2 0 1 7 / 0 0 9 4 4 2, G e n m a b)。1 0 0 μ L の染色緩衝液中で 2 回洗浄した後、細胞を、T O - P R O - 3 ヨウ化物 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, c a t. n o. T 3 6 0 5、1 : 4 0 0 0 希釈) を含有する染色緩衝液に再懸濁し、F A C S C e l e s t a フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s, U S A) で分析した。

【0227】

5 μ M のスタウロスポリン (S i g m a - A l d r i c h, U S, c a t. n o. S 6 9 4 2) で処理された腫瘍細胞試料の生存率を 0 % に設定し、未処理の腫瘍細胞試料の生存率を 1 0 0 % に設定した。

10

【0228】

「生存細胞パーセンテージ」を次のように計算した：

生存細胞 % = ([細胞数試料 - 細胞数スタウロスポリン処理標的細胞] / [細胞数未処理標的細胞 - 細胞数スタウロスポリン処理標的細胞]) $\times$ 1 0 0。C F S E 陽性細胞を、T 細胞増殖を評価するための T 細胞の絶対数の尺度として計数した。

【0229】

用量応答曲線を、G r a p h P a d P r i s m V 8 ソフトウェア (G r a p h P a d S o f t w a r e, S a n D i e g o, C A, U S A) を使用して非線形回帰 (可変勾配でのシグモイド用量応答) によって分析した。

20

【0230】

結果

C D 3 $\times$ C D 3 0 二重特異性抗体は、C D 3 0 陽性腫瘍細胞株 S U - D H L - 1 細胞又は H D L M - 2 細胞を標的細胞として、A D C C エフェクター細胞 I V 型細胞 (C l e a n C e l l s, M o n t a i g u, F r a n c e) をエフェクター細胞として使用して、インビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。

【0231】

図 3 は、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E A R (A)、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - h A C 1 0 - F E A R (B)、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - H R S - 3 - F E A R (C)、B s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - H e F i - I - F E A R (D)、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 4 0 5 - F E A R (E)、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 1 0 5 - F E A R (F)、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 4 0 8 - F E A R (G)、及び b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 2 1 5 - F E A R (H) が、S U - D H L - 1 (左パネル) 又は H D L M - 2 (右パネル) 細胞の用量依存的 T 細胞媒介性細胞傷害性 (生存細胞 % の減少として示される) を誘導したことを示す。

30

【0232】

単一特異性、二価 C D 3 0 抗体 I g G 1 - M D X 0 6 0 - F E A R (A)、I g G 1 - C D 3 0 - h A C 1 0 - F E A R (B)、I g G 1 - C D 3 0 - H R S - 3 - F E A R (C)、I g G 1 - C D 3 0 - H e F i - I - F E A R (D)、I g G 1 - C D 3 0 - T 4 0 5 - F E A R (E)、I g G 1 - C D 3 0 - T 1 0 5 - F E A R (F)、I g G 1 - C D 3 0 - T 4 0 8 - F E A R (G)、及び I g G 1 - C D 3 0 - T 2 1 5 - F E A R (H) は、T 細胞媒介性細胞傷害性を誘導しなかった。対照抗体 b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x b 1 2 - F E A R はまた、S U - D H L - 1 又は H D L M - 2 細胞の T 細胞媒介性細胞傷害性を誘導しなかった。

40

【0233】

加えて、C D 3 $\times$ C D 3 0 二重特異性抗体を、異なる M C L、A L C L、及び H L 細胞株を標的細胞として、並びに精製された T 細胞又は A D C C エフェクター細胞 I V 型細胞をエフェクター細胞として使用するインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。図 4 A ~ B は、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E A R によ

50

って誘導されたSU-DHL-1、HuT78、又はNCEB-1細胞のT細胞媒介性細胞傷害性が、低減した親和性を有するCD3結合アームを有するこの抗体のバリエーション（bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR）と比較してより強力であることを示す。HDLM-2細胞の同様の最大T細胞媒介性細胞傷害性は、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR及びbsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEARによって誘導された（図4B）。対照として含まれた、二価、単一特異性抗体IgG1-huCD3-FEAL又はIgG1-b12-FEARとのインキュベーションは、これらの細胞株において細胞傷害性を誘導しなかった。L540細胞の強力な同様のT細胞媒介性細胞傷害性は、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR及びbsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEARによって試験された最も低い濃度（0.014 µg/mL、図4C）で誘導された。対照抗体bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR又はIgG1-MDX060-FEARは、L540細胞のT細胞媒介性細胞傷害性を誘導しなかった。

【0234】

結論として、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEARは、様々なCD30発現MCL、ALL、及びHL腫瘍細胞株の強力な殺滅を誘導した。CD3アームのVH CDR3の101位にHを含有するbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEARは、101位にGを含有するより低親和性のCD3アームを有するバリエーションと比較して、CD30発現MCL及びALL腫瘍細胞を殺滅することにおいてより強力である。

【0235】

標的細胞としてHDLM-2細胞（左パネル）又はNCEB-1細胞（右パネル）を使用する細胞傷害性アッセイでは、CFSE陽性細胞の数を絶対T細胞数の尺度として評価した。図4Dは、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR又はbsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEARによって誘導されたHDLM-2及びNCEB-1細胞のT細胞媒介性細胞傷害性（図4Bを参照されたい）が、T細胞数における用量依存的増加と関連していたことを示す。一般的には、同様のT細胞数は、このアッセイにおいてbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR又はbsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEARとのインキュベーション後に計数した。1 µg/mLよりも高い濃度でbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEARとインキュベートされたNCEB-1細胞との共培養物において、低減したT細胞数が観察された。対照抗体IgG1-b12-FEALは、これらの実験においてT細胞数に影響を及ぼさなかった。

【0236】

結論として、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEARは、様々なCD30発現ALL、HL及びMCL腫瘍細胞株の存在下で、T細胞増殖を誘導した。

【0237】

実施例5-Exp1293F細胞において発現されたヒト、カニクイザル、又はアカゲザルCD30へのCD3xCD30二重特異性抗体の結合

ヒトCD30又はカニクイザルCD30で一過性トランスフェクトされたExp1293細胞の形質膜への二重特異性CD3xCD30抗体及び単一特異性、二価CD30抗体の結合を、フローサイトメトリーによって分析した。

【0238】

HEK-293F又はHEK-293細胞におけるヒト、カニクイザル、又はアカゲザルCD30の一過性発現

様々な全長CD30バリエーションの発現のための以下のコドン最適化された構築物を生成した：ヒト（Homo sapiens）CD30（huCD30、UniProtアク

10

20

30

40

50

セッション番号P28908)、カニクイザル (*Macaca fascicularis*) CD30 (mfCD30、Uniprotアクセッション番号A0A2K5VW07) (配列番号40)、及びアカゲザル (*Macaca mulatta*) CD30 (mmCD30、Uniprotアクセッション番号A0A1D5RK03) (配列番号41)。構築物は、クローニングに好適な制限部位及び最適なKozak (GCCGCCACC) 配列 (Kozak, M., Gene 1999; 234 (2): 187-208) を含有した。全長ヒトCD30、カニクイザル、及びアカゲザルCD30コドン最適化構築物を、哺乳動物発現ベクターpcDNA3.3 (Invitrogen) においてクローニングし、本質的に製造業者によって記載されるようにExpi293F発現プラットフォーム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, cat. no. A14527) を使用して発現させた。実験の別のセットでは、全長ヒトCD30又はカニクイザルCD30構築物をHEK-293細胞において発現させた。

【0239】

Expi293細胞において発現されたヒト、カニクイザル、又はアカゲザルCD30へのCD3×CD30二重特異性抗体の結合

細胞 (3×10^4 細胞/ウェル) をポリスチレン96ウェル丸底プレート (Greiner bio-one, cat. no. 650180) において、100 μ L 染色緩衝液中の抗体 (3倍希釈ステップで0.005~10 μ g/mLの範囲) と4℃で30分間インキュベートした。実験は技術的重複で行った。染色緩衝液中で2回洗浄した後、細胞を、50 μ Lの二次抗体中で4℃で30分間インキュベートした。二次抗体として、染色緩衝液中で1:400で希釈されたR-PE複合化ヤギー抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch, UK, cat. no. 109-116-098) を使用した。細胞を、染色緩衝液中で2回洗浄し、0.4% EDTAを含む30 μ Lの染色緩衝液に再懸濁し、iQue Screener (Intellicyt Corporation, USA) で分析した。結合曲線を、GraphPad Prism V9.0.0ソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用して非線形回帰 (可変勾配でのシグモイド用量応答) を使用して分析した。

【0240】

HEK293細胞において発現されたヒト、カニクイザル、又はアカゲザルCD30へのCD3×CD30二重特異性抗体の結合

細胞 (3×10^4 細胞/ウェル) をポリスチレン96ウェル丸底プレート (Thermo Scientific, cat. no. 163320) において、50 μ L 染色緩衝液中の抗体 (4倍希釈ステップで0.0002~50 μ g/mLの範囲) と4℃で30分間インキュベートした。実験は技術的重複で行った。染色緩衝液中で2回洗浄した後、細胞を、50 μ Lの二次抗体中で4℃で30分間インキュベートした。二次抗体として、染色緩衝液中で1:200で希釈されたR-PE複合化ヤギー抗ヒトIgG (Jackson ImmunoResearch, UK, cat. no. 109-116-098) を使用した。細胞を、染色緩衝液中で2回洗浄し、1:10,000に希釈された0.4% EDTA及びToPro-3生存性マーカー (Invitrogen, cat. no. T3605) を含む30 μ Lの染色緩衝液に再懸濁した。細胞を、iQue Screener (Intellicyt Corporation, USA) 上で分析した。結合曲線を、GraphPad Prism V9.0.0ソフトウェア (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用して非線形回帰 (可変勾配でのシグモイド用量応答) を使用して分析した。

【0241】

ヒトT細胞又はカニクイザルPBMCへのCD3×CD30二重特異性抗体の結合

カニクイザルPBMC (Tebu-Bio, The Netherlands, cat. no. PBMC MFA-10) 又は精製されたヒトT細胞を、ポリスチレン96ウェル丸底プレートに播種した。T細胞は、ヒトドナーバフィーコート (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) に由来し、RosetteSepヒ

10

20

30

40

50

トT細胞濃縮カクテル (Stemcell Technologies、France、cat. no. 15061) を製造業者の指示に従って使用して単離した。細胞 (3×10^4 細胞/ウェル) を、30分間 4°C で $50 \mu\text{L}$ の染色緩衝液中の抗体 IgG1-CD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR、及び bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR の段階希釈 (3倍希釈ステップで $0.0001 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ の範囲) とインキュベートした。染色緩衝液で2回洗浄した後、細胞を30分間 4°C で $50 \mu\text{L}$ の二次R-PE複合化ヤギ抗ヒトIgG抗体中でインキュベートした (1:400希釈)。染色緩衝液中で2回洗浄した後、T細胞を、T細胞マーカーCD3 (1:100、Miltenyi biotec、クローン10D12、APCに複合化)、CD4 (1:50、eBioscience、クローンOKT4、APC-Cy7に複合化)、CD8 (1:100、Biolegend、クローンRPA-T8、AF700に複合化)、並びにT細胞活性化マーカーCD69 (1:50、BD Biosciences、クローンAB2439、FITCに複合化)、CD25 (1:50、eBioscience、クローンBC96、PE-Cy7に複合化)、及びCD279/PD1 (1:50、BD Biosciences、クローンAEH12.2H7、BV605に複合化) について染色した。UltraCompビーズ ($5 \mu\text{L}$ 、Invitrogen、cat. no. 01-2222-42) での単一染色試料を、フローサイトメーターの補正調整に使用した。 4°C での30分のインキュベーション後、細胞を染色緩衝液で2回洗浄し、 $100 \mu\text{L}$ の染色緩衝液中に再懸濁し、FACS Fortessa (BD Biosciences) を使用して分析した。FlowJo (BD Biosciences) を使用してデータを処理した。

【0242】

結果

CD30 標的化二重特異性抗体 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-H101G-FEALxCD30-MDX060-FEAR、及び bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FEAR は、野生型 Expi293F 細胞 (図5A) への結合を示さなかったが、huCD30 (図5B) 又はmfCD30 (図5C) でトランスフェクトされた Expi293F 細胞への用量依存的結合を示した。これらの二重特異性抗体の結合は、単一特異性、二価CD30抗体 IgG1-CD30-MDX060-FEAR の結合と同等であった。予想どおり、陰性対照抗体 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR は、野生型又はhuCD30若しくはmfCD30トランスフェクトされた Expi293F 細胞への結合を示さなかった。同様に、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR は、huCD30 (図11A) 又はmfCD30 (図11B) でトランスフェクトされたHEK293細胞への用量依存的結合を示し、陰性対照抗体 bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR は、huCD30-又はmfCD30-トランスフェクトされたHEK293細胞への結合を示さなかった。これは、CD30 標的化抗体MDX060が、HEK細胞において発現されるヒト及びカニクイザルCD30の両方に、二価及び一価フォーマットで効率的に結合することを示す。

【0243】

図5Dは、CD3xCD30二重特異性抗体 bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR 及び対照二重特異性抗体 bsG1-huCD3-FEALxb12-FEAR が、初代ヒト及びカニクイザルT細胞に効率的に結合したことを示す。これは、これらのCD3 標的化二重特異性抗体が、T細胞上で内因的に発現されるヒト及びカニクイザルCD3の両方に効率的に結合することを示す。IgG1-CD30-MDX060二価、親抗体は、ヒト又はカニクイザルT細胞に結合せず、CD30がこれらの細胞上で発現されなかったことを示した。

【0244】

CD3xCD30二重特異性抗体及び単一特異性親CD30抗体のパネルの、huCD30又はmmCD30でトランスフェクトされた Expi293F 細胞への結合を、フロ

ーサイトメトリーによって評価した。CD3×CD30二重特異性抗体bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FEAR(図6A)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-hAC10-FEAR(図6B)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HRS-3-FEAR(図6C)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T405-FEAR(図6E)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T105-FEAR(図6F)、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-T408-FEAR(図6G)、及びbsG1-huCD3-FEAL×CD30-T215-FEAR(図6H)は、huCD30又はmmCD30を発現する細胞への等しい結合を示した。同様に、親、単一特異性CD30抗体クローンは、huCD30又はmmCD30を発現する細胞に等しい結合を示した。対照的に、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-HeFi-I-FEAR及び親、単一特異性CD30抗体IgG1-CD30-HeFi-I-FEARは、huCD30への結合を示したが、mmCD30への結合は示さなかった(図6D)。

10

【0245】

実施例6-DSF分析による単一特異性及び二重特異性非活性化抗体バリエーションの立体構造安定性の評価

定常重鎖領域に非活性化変異を保有する二価単一特異性CD30、CD3、及び二重特異性CD3×CD30 IgG1抗体バリエーションのタンパク質安定性特徴を、示差走査蛍光定量法(DSF)を使用して評価した。

【0246】

IgG1-CD30-MDX060-FEAR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL、及びBsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERRの試料を、約1mg/mLの濃度でPBS pH7.4で製剤化した。

20

【0247】

立体構造安定性を評価するために、DSFを、IgGの展開時に露出した疎水性領域への外因性染料Sypro-Orange(DMSO中の5000倍濃縮物、Cat # S5692、Sigma-Aldrich)の結合によって引き起こされる蛍光強度の変化を検出することができるiQ5多色リアルタイムPCR検出システム(Bio-Rad)において行った。Sypro-Orangeを、pH7.4のPBS(Hyclone GE Healthcare)中で320倍に希釈した。熱融解曲線は、分析されたIgGの制御された段階的な熱変性の際に増加する蛍光を測定することから導出することができる。したがって、5µLの抗体溶液(PBS中1mg/mL)の重複試料を、iQ96ウェルPCRプレートにおいてpH7.4のPBS中の20µLの希釈されたSypro-Orangeに添加した。蛍光は、増分当たり0.5°Cの段階的増分及び15秒の持続時間と全てのウェルの蛍光を記録するのに必要な時間で、25°C~95°Cの範囲の増加する温度で記録した。データを、Bio-Rad CFX Manager Software 3.0を使用して分析し、融点を、ソフトウェアによって蛍光対温度グラフから決定した。

30

【0248】

結果

40

図7及び表8は、IgG1-CD30-MDX060-FERRの融解温度(T_m)が69.0°Cであることを示し、これは、pH7.4(64.5°C)でのIgG1-CD30-MDX060-FEARの T_m よりも高い。これは、IgG1-CD30-MDX060-FERRが、IgG1-CD30-MDX060-FEARよりも高い立体構造安定性を有することを示し、FERバックボーンを含むIgG1-CD30-MDX060が、FEAバックボーンを含むIgG1-CD30-MDX060よりも高い立体構造安定性を有することを示す。BsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERRの融解温度は、64.5°Cであることが決定され、これは、2つの親抗体IgG1-huCD3-FEAL(62.5°C)及びIgG1-CD30-MDX060-FE

50

R R (6 9 . 0 ° C) について決定された T_m の間である。

【表 9】

表 8 : 示差走査蛍光測定 (D S F) によって決定される示された抗体の融解温度 (T_m)

抗体	T_m (°C)
IgG1-CD30-MDX060-FEAR	64.5

IgG1-CD30-MDX060-FERR	69.0
IgG1-huCD3-FEAL	62.5
BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR	64.5

10

【 0 2 4 9 】

実施例 7 - b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R の T 細胞及び腫瘍細胞への同時結合

b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R の腫瘍細胞及びナイーブ T 細胞への同時結合を研究した。

【 0 2 5 0 】

健常ドナーから単離された凍結 T 細胞を解凍し、0.25mM の Celltrace Violet (Pacific Blue、Invitrogen、cat no. C34557A) で 37 ° C で 15 分間標識した。L-428 腫瘍細胞を、Celltrace FarRed (APC、Invitrogen cat no. C34564A) で 37 ° C で 15 分間標識し、T 細胞に 1 : 1 の E : T 比で添加した。b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R 又は対照抗体 b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x b 1 2 - F E A R、b s G 1 b 1 2 F E A L x C D 3 0 M D X 0 6 0 - F E R R、若しくは I g G 1 - b 1 2 - F E A L の段階希釈液を添加し ($6 \times 10^{-5} \sim 10 \mu g / mL$ の範囲の最終濃度、3 倍希釈液)、細胞を 4 ° C で 2 時間インキュベートした。インキュベーション後、生存性マーカー 7 - A A D (B D Bioscience、cat. no 559925) を添加し (100 倍最終希釈液)、細胞を FACS Celesta フローサイトメーター (B D Biosciences) 上で分析した。

20

【 0 2 5 1 】

結果

図 1 2 は、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R が、腫瘍細胞の T 細胞への b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R 媒介性架橋 (同時結合) の尺度として C D 3 ⁺ C D 3 0 ⁺ 二重陽性事象 (フローサイトメトリー染色において CellTrace FarRed 及び CellTrace Violet の両方を発現する細胞) の形成を誘導することを示す。二重陽性事象の増加は、抗体濃度依存的であり、ベル形状の曲線を示した。対照抗体 b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x b 1 2 - F E A R、b s G 1 b 1 2 F E A L x C D 3 0 M D X 0 6 0 - F E R R、若しくは I g G 1 - b 1 2 - F E A L とインキュベートされた試料、又は抗体なしでインキュベートされた試料において、腫瘍細胞及び T 細胞の架橋の増加は観察されなかった (A)。図 1 2 B は、CellTrace FarRed 及び CellTrace Violet の両方を発現する細胞のパーセンテージによって検出される、腫瘍細胞及びナイーブ T 細胞への b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R の同時結合を示す (B)。

30

40

【 0 2 5 2 】

これらのデータは、b s G 1 h u C D 3 F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R が、C D 3 0 ⁺ 腫瘍細胞及び C D 3 ⁺ T 細胞を同時に結合及び架橋することができることを示す。

50

【0253】

実施例8-CD3×CD30二重特異性抗体によるインビトロでのT細胞媒介性細胞傷害性及びT細胞活性化の誘導

CD3×CD30二重特異性抗体のパネルによるKarpas-299腫瘍細胞のT細胞媒介性細胞傷害性及び関連するT細胞活性化を評価した。以下の抗体を評価した：bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR、bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR、及びbsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR。

【0254】

T細胞は、健常なヒトドナーバフィーコート（Sanquin、Amsterdam、The Netherlands）から得られ、RosetteSep（商標）ヒトT細胞濃縮カクテル（Stemcell Technologies、France、cat. no. 15061）を製造業者の指示に従って使用して単離した。T細胞を、Celltrace Violet（Invitrogen、cat. no. C34557A、最終濃度5μM）で15分間37℃で標識した。並行して、Karpas-299腫瘍細胞を、Celltrace FarRed（Invitrogen、cat. no. C34564A、最終濃度2μM）で15分間37℃で標識した。標識後、5倍の体積の氷冷DBSIを添加し、RTで5分間インキュベートした。細胞をペレット化し、培地に再懸濁し、腫瘍細胞を50,000細胞／ウェルの密度で96ウェルプレート（Greiner-bio-one、The Netherlands、cat. no. 655180）に播種した。二重特異性CD3×CD30抗体の段階希釈液（1,000～0.051ng/mLの範囲の最終濃度、3倍希釈液）を添加し、プレートを室温で15分間インキュベートした。T細胞を、4：1のエフェクター対標的（E：T）比で腫瘍細胞に添加し、プレートを72時間37℃でインキュベートした。PBS／0.1%BSA／0.02%アジド（染色緩衝液）で2回洗浄した後、細胞を、T細胞マーカーCD4（1：50、Biolegend、cat. no. 300521、Pacific Blueに複合化）、CD8（1：100、BD Biosciences、FITCに複合化）、及びT細胞活性化マーカーCD69（1：50、Biolegend、cat. no. 310934、BV650に複合化）、CD25（1：100、Invitrogen、cat. no. 25-0259-42、PE-Cy7に複合化）、及びCD279／PD-1（1：50、Biolegend、cat. no. 329930、BV605に複合化）について染色した。Ultracompbーズ（5μL、Invitrogen、cat. no. 01-2222-42）での単一染色試料を含め、フローサイトメーターの補正調整に使用した。4℃での30分のインキュベーション後、プレートを染色緩衝液で2回洗浄し、細胞を7-AAD（染色緩衝液中で1：100に希釈）で4℃で10分間染色した。FACS Celesta（BD Biosciences）を使用して細胞を分析した。FlowJo（BD Biosciences）を使用してデータを処理した。

【0255】

用量応答曲線を、GraphPad Prism V7.02ソフトウェア（GraphPad Software、San Diego、CA、USA）を使用した非線形回帰分析（可変勾配でのシグモイド用量応答）を使用して生成した。

【0256】

結果

図13A及びBは、全てのCD3×CD30抗体が、Karpas-299細胞のT細胞媒介性細胞傷害性を誘導することを示す。CD30クローンMDX060（bsG1-

h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R 及び b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E A R) を使用して生成された C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体は、試験された全ての他のクローンと比較して、K a r p a s - 2 9 9 細胞を殺滅することにおいてより効果的であった。実際には、M D X 0 6 0 ベースの C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体は、C D 3 0 クローン H R S - 3、H e F i - I、T 1 0 5、T 4 0 5、T 4 0 8、又は T 2 1 5 を使用して生成された C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体 (b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - H R S - 3 - F E A R、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - H e F i - I - F E A R、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 1 0 5 - F E A R、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 4 0 5 - F E A R、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 4 0 8 - F E A R、及び b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 2 1 5 - F E A R、図 1 3 A) よりも有意に低い I C ₅₀ 値を示した。更に、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R 及び b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E A R は、C D 3 0 クローン h A C 1 0、H e F i - I、T 4 0 5、T 4 0 8、又は T 2 1 5 を使用して生成された C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体 (b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - h A C 1 0 - F E A R、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - H e F i - I - F E A R、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 4 0 5 - F E A R、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 4 0 8 - F E A R、及び b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - T 2 1 5 - F E A R、図 1 3 B) と比較してより高い最大殺滅を誘導した。図 1 3 C 及び D は、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R 及び b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E A R が、C D 4⁺ T 細胞 (図 1 3 C) 又は C D 8⁺ T 細胞 (図 1 3 D) における T 細胞活性化の尺度として、C D 2 5 の発現を誘導することに、他の C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体のいずれかよりも有効 (低い E C ₅₀ 値) であることを示す。P D - 1 (図 1 3 E 及び F) 及び C D 6 9 (データ図示せず) の発現について同様の結果が観察された。F E A R 又は F E R R 変異を含む 2 つの M D X 0 6 0 ベースの C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体間で、T 細胞媒介性殺滅又は T 細胞活性化における差は観察されなかった。

【 0 2 5 7 】

二重特異性抗体 b s G 1 - h u C D 3 x C D 3 0 - M X 0 6 0 はまた、試験された他のパネル C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体と比較して、L - 4 2 8 細胞の T 細胞媒介性細胞傷害性を誘導することにより有効であった (データ図示せず)。

【 0 2 5 8 】

これらの実験において使用された C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体のパネルによって誘導された T 細胞媒介性細胞傷害性の平均 I C ₅₀ 濃度及び最大溶解パーセント、並びに T 細胞活性化 (C D 2 5 発現) の E C ₅₀ 濃度を表 9 に要約する。

【 0 2 5 9 】

結論として、これらのデータは、b s G 1 h u C D 3 x C D 3 0 - M D X 0 6 0 が、T 細胞媒介性細胞傷害性を誘導することに評価された他の C D 3 x C D 3 0 二重特異性抗体のいずれかよりも有効であったことを実証した。

10

20

30

40

50

【表 10】

表 9 : CD3×CD30 二重特異性抗体のパネルによって誘導された Karpas-299 細胞の T 細胞媒介性細胞傷害性の IC₅₀ 濃度及び最大溶解パーセント、並びに T 細胞活性化 (CD25 発現) の EC₅₀ 濃度。

抗体	細胞傷害性		T 細胞活性化(CD25 発現)		T 細胞活性化(PD-1 発現)	
			CD4+T 細胞	CD8+T 細胞	CD4+T 細胞	CD8+T 細胞
	IC ₅₀ (μg/mL)	最大溶解 (%)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)
	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)	平均 (SD)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR	0.029 (0.004)	52.328 (3.929)	0.023 (0.004)	0.020 (0.005)	0.025 (0.006)	0.023 (0.009)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FEAR	0.033 (0.004)	53.703 (5.949)	0.024 (0.004)	0.020 (0.005)	0.024 (0.006)	0.027 (0.009)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-hAC10-FEAR	0.032 (0.006)	37.765 (5.340)	0.046 (0.011)	0.054 (0.021)	0.056 (0.021)	0.057 (0.031)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-HRS-3-FEAR	0.068 (0.011)	47.472 (6.539)	0.089 (0.031)	0.079 (0.031)	0.123 (0.046)	0.112 (0.047)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-HeFi-I-FEAR	0.052 (0.011)	42.987 (6.603)	0.069 (0.013)	0.076 (0.016)	0.075 (0.024)	0.083 (0.023)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T105-FEAR	0.042 (0.007)	52.582 (5.344)	0.056 (0.010)	0.060 (0.017)	0.064 (0.021)	0.065 (0.024)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T405-FEAR	0.078 (0.023)	41.667 (4.560)	0.093 (0.027)	0.080 (0.056)	0.138 (0.054)	0.140 (0.126)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T408-FEAR	0.226 (0.112)	41.295 (5.482)	0.172 (0.046)	0.134 (0.077)	0.286 (0.104)	0.220 (0.126)
bsG1-huCD3-FEALxCD30-T215-FEAR	0.077 (0.032)	42.840 (6.464)	0.092 (0.036)	0.105 (0.063)	0.355 (0.476)	0.281 (0.308)

実施例 9 - bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR によるインビトロでの T 細胞媒介性細胞傷害性、T 細胞増殖、及び T 細胞活性化の誘導

腫瘍細胞の T 細胞媒介性細胞傷害性並びに bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR による関連する T 細胞増殖及び活性化を、HL 及び ALLCL 細胞株において評価した。T 細胞は、健常なヒトドナーバフィーコート (Sanquin、Amsterdam、The Netherlands) から得られ、RosetteSep (商標) ヒト T 細胞濃縮カクテル (Stemcell Technologies、France、cat. no. 15061) を製造業者の指示に従って使用して単離した。T 細胞を、Celltrace Violet (Invitrogen、cat. no. C34557A、最終濃度 5 μM) で 15 分間 37℃ で標識した。並行して、腫瘍細胞 L-428、KI-JK、KM-H2、又は SUP-M2 を、Celltrace FarRed (Invitrogen、cat. no. C34564A、最終濃度 2 μM) で 15 分間 37℃ で標識した。標識後、5 倍の体積の氷冷 DBSI を添加し、RT で 5 分間

インキュベートした。細胞をペレット化し、培地に再懸濁し、腫瘍細胞を50,000細胞／ウェルの密度で96ウェルプレート（Greiner-bio-one、The Netherlands、cat. no. 655180）に播種した。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR又は対照抗体IgG1-huCD3-FEAL、bsG1-huCD3-FEALxb12-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR、bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR、IgG1-b12-FEALの段階希釈液を添加し（1,000～0.051ng／mLの範囲の最終濃度、3倍希釈液）、プレートをRTで15分間インキュベートした。T細胞を、4：1のエフェクター対標的（E：T）比で腫瘍細胞に添加し、プレートを72時間37℃でインキュベートした。PBS／0.1%BSA／0.02%アジド（染色緩衝液）で2回洗浄した後、細胞を、T細胞マーカーCD4（1：50、Biolegend、cat. no. 300521、Pacific Blueに複合化）、CD8（1：100、BD Biosciences、cat. no. 345772、FITCに複合化）、及びT細胞活性化マーカーCD69（1：50、Biolegend、cat. no. 310934、BV650に複合化）、CD25（1：100、Invitrogen、cat. no. 25-0259-42、PE-Cy7に複合化）、及びCD279／PD-1（1：50、Biolegend、cat. no. 329930、BV605に複合化）について染色した。Ultracompiーズ（5μL、Invitrogen、cat. no. 01-2222-42）での単一染色試料を含め、フローサイトメーターの補正調整に使用した。4℃での30分のインキュベーション後、プレートを染色緩衝液で2回洗浄し、細胞を7-AAD（染色緩衝液中で1：100に希釈）で4℃で10分間染色した。FACS Celesta（BD Biosciences）を使用して細胞を分析し、FlowJo（BD Biosciences）を使用してデータを処理した。

10

20

【0260】

生きた標的細胞のパーセンテージを、以下の式を使用して計算した：－生きた標的細胞％＝（各条件における生きた、単一Celltrace FarRed標識細胞の絶対数／いずれの抗体も加えることなく標的細胞及びT細胞のみを含む条件における生きた、単一Celltrace FarRed標識細胞の絶対数）×100。

【0261】

T細胞増殖を、CD4⁺又はCD8⁺ T細胞を希釈されたCelltrace Violet染色でゲーティングすることによって評価した。増殖指数を、FlowJoの増殖モデリングツールを使用して計算した。生成ピークを自動的に適合させ、増殖指数値を以下の式に従って計算した：

30

【0262】

増殖指数＝細胞の総量／培養の開始時の細胞の量＝（G0＋G1＋G2＋G3＋G4＋G5＋G6）／（G0＋G1：2＋G2：4＋G3：8＋G4：16＋G5：32＋G6：64）。Gn＝生成nピークにおける細胞数（n＝0～6）。

【0263】

用量応答曲線を、GraphPad Prism V7.02ソフトウェア（Graph Pad Software、San Diego、CA、USA）を使用した非線形回帰分析（可変勾配でのシグモイド用量応答）を使用して生成した。

40

【0264】

結果

図14は、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRが、インビトロでL-428（HL）、KM-H2（HL）、SUP-M2（ALCL）、及びKI-JK（ALCL）細胞株において用量依存的T細胞媒介性細胞傷害性を誘導したことを示す。L-428及びKI-JK細胞におけるbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによって誘導されるT細胞媒介性細胞傷害性の平均IC50濃度を表10に要約する。対照抗体IgG1-huCD3-FEAL、bsG1-

50

h u C D 3 - F E A L x b 1 2 - F E R R、I g G 1 - C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R、b s G 1 - b 1 2 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R、I g G 1 - b 1 2 - F E A L とインキュベートされた細胞において、又は抗体なしでインキュベートされた試料において、細胞傷害性は観察されなかった。

【0265】

図15、16、17、及び18は、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R によって誘導されたL-428及びK1-JK細胞のT細胞媒介性細胞傷害性が、C D 4 ⁺ 及びC D 8 ⁺ T細胞増殖（図15）並びにT細胞活性化マーカーC D 6 9（図16）、C D 2 5（図17）、及びP D - 1（図18）の発現と関連していたことを示す。これらの実験におけるb s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R によって誘導されるT細胞増殖及び活性化の平均E C 5 0 濃度を表10に要約する。

10

【0266】

したがって、b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R は、インビトロでHL及びALCL細胞株における用量依存的T細胞媒介性細胞傷害を誘導し、これは、T細胞増殖及び活性化と関連していた。

【0267】

20

30

40

50

【表 1 1】

表 1 0 : L - 4 2 8 及び K I - J K 細胞における b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R によって誘導される T 細胞媒介性細胞傷害性の E C ₅₀ 濃度、並びに C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ 細胞の関連 T 細胞増殖及び活性化。

腫瘍細胞株		L-428	KI-JK
細胞傷害性			
	平均 I C 5 0 (μ g / m L)	0.002	0.0015
	範囲 I C 5 0 (μ g / m L)	0.001216 - 0.003439	0.0008858 - 0.001904
T 細胞型		CD4 ⁺	CD8 ⁺
T 細胞増殖			

PI	平均 E C 5 0 (μ g / m L)	0.0051	0.00096	0.00606	0.00213
	範囲 EC50(μg/mL)	0.003727 - 0.006534	0.0002052 - 0.002255	0.00338 - 0.007501	0.001103 - 0.002715
T 細胞活性化					
CD69	平均 CD69 EC50(μg/mL)	0.00083	0.00121	0.00146	0.00171
	範囲 CD69 EC50(μg/mL)	0.0001221 - 0.001647	3.252E-14 - 0.002421	0.0004487 - 0.002086	4.694E-11 - 0.005097
CD25	平均 CD25 EC50(μg/mL)	0.00261	0.00061	0.00599	0.00656
	範囲 CD25 EC50(μg/mL)	0.002164 - 0.002898	0.000298 - 0.001006	0.004483 - 0.007791	0.001901 - 0.01562
PD-1	平均 PD-1 EC50(μg/mL)	0.00491	0.00257	0.0112	0.00696
	範囲 PD-1 EC50(μg/mL)	0.004387 - 0.005433	0.001302 - 0.003412	0.009616 - 0.01222	0.005845 - 0.009151
n 検定		3	3	3	3

【0 2 6 8】

実施例 1 0 - b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R によるインビトロでのサイトカイン産生の誘導

b s G 1 - h u C D 3 - F E A L x C D 3 0 - M D X 0 6 0 - F E R R によって誘導されるサイトカイン及びグランザイム B 産生は、実施例 9 に記載されるように、L - 4 2 8 標的細胞及び健常なドナー T 細胞を用いたインビトロ T 細胞媒介性細胞傷害性実験中に収集された上清において評価した。上清は、- 2 0 ° C で保存し、分析のために解凍した。1 4 の異なるサイトカイン (C D 4 0 、 I F N γ 、 I L - 1 0 、 I L - 1 2 、 I L - 1 3 、 I L - 1 b 、 I L - 2 、 I L - 4 、 I L - 6 、 I L - 8 、 I P - 1 0 、 M C P - 1 、 P D L - 1 、 T N F α) 及びグランザイム B の濃度を、R & D システムによってカスタムメイドのビーズベースの多重免疫アッセイ (l u m i n e x) を使用して測定した。

【0 2 6 9】

結果

増加した濃度は、主に $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ の存在下での $L-428$ 細胞及び T 細胞の共培養物からの上清中のグランザイム B 並びにサイトカイン $I F N \gamma$ 、 $I L-13$ 、及び $T N F \alpha$ ($>2000 pg/mL$) について観察された。対照抗体 $I g G 1-b 1 2-F E A L$ と比較されるとき、 $C D 4 0$ 、 $I L-10$ 、 $I L-12$ 、 $I L-1 \beta$ 、 $I L-2$ 、 $I L-4$ 、 $I L 6$ 、及び $I P-10$ サイトカイン濃度について中程度の増加が観察された。 $I L-8$ 、 $M C P-1$ 、及び $P D L 1$ のレベルは、対照抗体 $I g G 1-b 1 2-F E A L$ と比較して調節されなかった (図 19)。

【0270】

よって、 $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ による T 細胞媒介性細胞傷害性及び T 細胞活性化は、サイトカイン及びグランザイム B の用量依存的産生と関連していた。

【0271】

実施例 11-変動するエフェクター対標的比で精製された T 細胞をエフェクター細胞として使用した $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ によるインビトロでの T 細胞媒介性細胞傷害性の誘導

二重特異性抗体 $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ の存在下での T 細胞媒介性腫瘍細胞殺滅の最適なエフェクター対標的細胞比を決定するために、インビトロ細胞傷害性アッセイを、 $C D 3 0$ 陽性腫瘍細胞株 $L-428$ を標的細胞として、精製された T 細胞をエフェクター細胞として変動するエフェクター対標的細胞 ($E:T$) 比で使用して行った。

【0272】

T 細胞媒介性細胞傷害性を、 T 細胞が $1:1$ 、 $2:1$ 、 $4:1$ 、又は $8:1$ の変動するエフェクター対標的 ($E:T$) 細胞比で腫瘍細胞に添加されたことを除いて、本質的に実施例 9 に記載されるように評価した。

【0273】

結果

図 20A は、用量依存的 T 細胞媒介性細胞傷害性が、 $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ によって全ての $E:T$ 比で誘導され、最大の腫瘍細胞殺滅 (20% 未満の生存腫瘍細胞) が $4:1$ 及び $8:1$ の $E:T$ 比で観察されたことを示す。これに沿って、 $C D 4^{+}$ 及び $C D 8^{+}$ T 細胞増殖は、全ての $E:T$ 細胞比で、最も顕著には $4:1$ 及び $8:1$ の $E:T$ 比で観察された (図 20B-C)。試験された $E:T$ 比のいずれでも、対照抗体 $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times b 1 2-F E R R$ によって特異的な T 細胞媒介性細胞傷害性又は T 細胞増殖は誘導されなかった。

【0274】

併せると、これらのデータは、インビトロでの $L-428$ 腫瘍細胞の $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ 誘導性 T 細胞媒介性細胞傷害性が、 $4:1$ 及び $8:1$ の $E:T$ 比で最も効果的であったことを示す。

【0275】

実施例 12- $b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ によるインビトロでの T 細胞媒介性細胞傷害性及び T 細胞増殖の動態

$b s G 1-h u C D 3-F E A L \times C D 3 0-M D X 0 6 0-F E R R$ の存在下での T 細胞媒介性腫瘍細胞殺滅の動態を評価するために、 $C D 3 0$ 陽性腫瘍細胞株 $L-428$ を標的細胞として精製された T 細胞をエフェクター細胞として使用して、変動するインキュベーション期間でインビトロ細胞傷害性アッセイを実施した。

【0276】

T 細胞媒介性細胞傷害性は、腫瘍細胞細胞傷害性及び T 細胞増殖が 24 時間、 48 時間及び 72 時間後に評価されたことを除いて、本質的に実施例 9 に記載されるように評価した。

10

20

30

40

50

【0277】

結果

図21は、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRが、48時間及び72時間後に用量依存的T細胞媒介性細胞傷害性を誘導したが、24時間後に有意なT細胞媒介性細胞傷害性は観察されなかったことを示す。用量依存的CD4⁺及びCD8⁺T細胞増殖は、72時間後にbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによって誘導されたが、24時間又は48時間後にT細胞増殖は観察されなかった(図21B及びC)。

【0278】

併せると、これらのデータは、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRが時間依存的な方法で腫瘍細胞のT細胞媒介性細胞傷害性及びT細胞増殖を誘導したことを示す。

【0279】

実施例13-インビトロでのbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR誘導性T細胞媒介性細胞傷害性とのCD30発現レベルの相関

8つのCD30発現腫瘍細胞株のbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによるT細胞媒介性殺滅を、実施例9に記載されるインビトロ細胞傷害性アッセイにおいて、4:1のE:T比を使用して決定した。以下の細胞株を使用した: L-428、KM-H2、DEL、KI-JK、KARPAS-299、SUP-M2、NCEB-1及びJVM-2。これらの腫瘍細胞株について、CD30発現レベルを、実施例2で詳述される定量的フローサイトメトリーによって評価した。

【0280】

結果

図22は、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRが、68%~98%の最大標的細胞殺滅でインビトロで全ての細胞株においてT細胞媒介性細胞傷害性を誘導したことを示す。bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによる最大T細胞媒介性腫瘍細胞殺滅は、CD30発現のレベルと有意に相関していた(図22A)。

【0281】

図22Bでは、各細胞株についてbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの存在下でのT細胞媒介性殺滅のEC₅₀を、CD30発現レベルに対してプロットし、陰性であるが有意ではない傾向を示す。

【0282】

よって、これらのデータは、インビトロでのCD30発現レベルとbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR誘導性最大T細胞媒介性細胞傷害性との間の正の相関を示す。

【0283】

実施例14-BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによる活性化されたT細胞のフラトリサイド

活性化されたCD30⁺T細胞のBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR誘導性T細胞フラトリサイドをインビトロで評価した。

【0284】

96ウェルプレート(Greiner-bio-one、The Netherlands、cat. no. 655180)を、100µLのPBS中1µg/mL抗ヒトCD3(クローンOKT3、Invitrogen、cat. no. 16-0037-85)の溶液でコーティングした。プレートを37℃で4時間インキュベートした。抗体溶液を除去した後、100µLのPBSでウェルを洗浄した。T細胞は、健常なヒトドナーバフィーコート(Sanquin、Amsterdam、The Netherlands)から得られ、RosetteSep(商標)ヒトT細胞濃縮カクテル(Stemcell Technologies、France、cat. no. 15061)を製造業者の指

10

20

30

40

50

示に従って使用して単離した。精製されたT細胞を、10%の鉄を含む熱不活性化ドナーウシ血清 (DBSI、Gibco、cat. no. 20731-030) 及びペニシリン／ストレプトマイシン (pen/strep、Lonza、cat. no. DE17-603E) で補足された、T細胞培地 (25mMのHEPES及びL-グルタミン (Lonza、cat. no. BE12-115F) を含むRoswell Park Memorial Institute [RPMI] -1640培地) に 2×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁し、100 μ LのT細胞懸濁液 (200,000個のT細胞を含有する) を、抗CD3コーティングされたプレートの各ウェルに添加した。更に、2 μ g/mLの抗CD28 (クローンCD28.2、Invitrogen、cat. no. 16-0289-85) 及び0.05 μ g/mLのIL-15 (ThermoFisher、cat. no. PHC9151) で補足された100 μ LのT細胞培養培地を各ウェルに添加した。次いで、T細胞を37℃で96時間インキュベートした。

【0285】

96時間後、T細胞を収集し、 2×10^6 細胞/mLの濃度でT細胞培地に再懸濁させた。フローサイトメトリー分析を行って、CD30及びT細胞活性化マーカーの発現を測定した。簡潔には、細胞のアリコートにPBS/0.1%BSA/0.02%アジド (染色緩衝液) で洗浄し、50 μ Lの1000倍希釈FVS510生存性色素 (BD Biosciences、cat. no. 564406) で染色し、15分間室温でインキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で洗浄し、CD30 (1:50、Biolegend、cat. no. 333906、PEに複合化)、T細胞マーカーCD4 (1:50、Biolegend、cat. no. 300506、FITCに複合化)、CD8 (1:100、Biolegend、cat. no. 301028、AF700に複合化)、及びT細胞活性化マーカーCD69 (1:50、Biolegend、cat. no. 310910、APCに複合化)、CD25 (1:100、Invitrogen、cat. no. 25-0259-42、PE-Cy7に複合化)、及びCD279/PD1 (1:50、Biolegend、cat. no. 329924、BV605に複合化) について染色した。UltraCompビーズ (5 μ L、Invitrogen、cat. no. 01-2222-42) での単一染色試料を含め、フローサイトメーターの補正調整に使用した。4℃で30分のインキュベーション後、プレートを染色緩衝液で2回洗浄した。FACS Celesta (BD Biosciences) を用いて細胞を分析し、FlowJo (BD Biosciences) を用いてデータを処理した。

【0286】

BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRが活性化されたT細胞のフラトリサイドを誘導することができるかを評価するために、刺激されたT細胞を、200,000細胞/ウェルの密度で96ウェルプレートに播種した。その後、50 μ LのBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、又は、対照抗体、すなわち、bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEALxb12-MDX060-FERR、若しくはIgG1-b12を、各ウェルに添加した (T細胞培地中での3倍希釈ステップにおける0.003~3.3 μ g/mLの範囲の最終濃度)。プレートを37℃で48時間インキュベートした。

【0287】

染色緩衝液で2回洗浄した後、細胞を、FVS510生存性染料で染色し、結果としてT細胞マーカーCD4及びCD8、並びにT細胞活性化マーカーCD69、CD25、及びCD279/PD1について染色した。FACS Celesta (BD Biosciences) を使用してフローサイトメトリー分析を行い、FlowJo (BD Biosciences) を使用してデータを処理した。

【0288】

用量応答曲線を、GraphPad Prism V7.02ソフトウェア (GraphPad Software、San Diego、CA、USA) を使用して生成した。

10

20

30

40

50

【0289】

結果

図23は、細胞マーカーCD25（T細胞活性化）（A）及びCD30（B）が、インキュベーションの72時間後にそれぞれ54～63%及び21～27%のT細胞において発現したことを示す。CD25及びCD30の発現は、96時間のインキュベーション後に更に誘導された（CD25：80～83%及びCD30：27～33%）。図23Cは、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、bsG1-b12-FEALxCD30-MDX060-FERR、bsG1-huCD3-FEALxb12-MDX060-FERR、又はIgG1-b12の増加する用量が、活性化されたT細胞の低減した生存率と関連していなかったことを示す。

10

【0290】

したがって、活性化されたT細胞の亜集団上でのCD30発現は、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRとのインキュベーション時にT細胞のフラトリサイドをもたらさなかった。

【0291】

実施例15-BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの抗腫瘍活性でのsCD30の干渉

細胞表面CD30の脱落及び可溶性CD30（sCD30）の生成を、17の異なる血液学的CD30⁺腫瘍細胞株において評価した。

【0292】

新鮮な培地中に細胞を播種してから3日後に細胞培養物から収集された25μLの未希釈上清中のsCD30の濃度を、「ヒトsCD30 ELISAキット」（Invitrogen、cat. no. BMS240）を製造業者の指示に従って使用して、ヒトCD30の定量的検出のためのELISAアッセイによって測定した。

20

【0293】

結果

図24Aは、細胞培養上清中のsCD30の濃度を示す。示されるように、変動する濃度のsCD30が異なる細胞株由来の細胞培養上清中で検出された。図24Bは、細胞培養上清中のsCD30の濃度が実施例2に前述された定量的フローサイトメトリー（ヒトIgGキャリブレーターキット、Biocytex、cat no. CP010）によって測定される場合、CD30膜発現レベルと有意に相関したことを示す。

30

【0294】

sCD30が強力なBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR誘導性T細胞媒介性細胞傷害性をブロックすることができるかを評価するために、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRによるT細胞媒介性細胞傷害性を、DEL腫瘍細胞（ALCL）において評価し、これは上清（129ng/mL）において高レベルのsCD30を示した。T細胞媒介性細胞傷害性アッセイを、前述のように行った（実施例8）。図24Cは、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRがこの細胞株において強力なT細胞媒介性細胞傷害性を誘導したことを示し、86%の最大腫瘍細胞殺滅は、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRが、sCD30の存在下でインビトロで強力なT細胞媒介性細胞傷害性を依然として誘導することができたことを示す。

40

【0295】

よって、sCD30濃度は、細胞型間で変動し、細胞表面上のCD30発現のレベルと相関した。更に、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRは、sCD30の存在下でインビトロでの強力なT細胞媒介性細胞傷害性を依然として誘導することができた。

【0296】

実施例16-患者由来の末梢血単核T細胞をエフェクター細胞として使用したbsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRのエキスピボ細胞傷害性

50

CD3×CD30二重特異性抗体を、CD30陽性腫瘍細胞株を標的細胞として、初代患者由来T細胞をエフェクター細胞として使用してエクスピボ細胞傷害性アッセイにおいて試験した。T細胞の供給源として、ホジキンリンパ腫（HL）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、及び急性骨髄性白血病（AML）患者由来の末梢血単核細胞（PBMC、Discovery Life Sciences、表11）を使用して、CD3依存的腫瘍細胞殺滅を評価した。

【0297】

L-428腫瘍細胞を、Celltrace FarRed（Invitrogen、cat. no. C34564A、最終濃度2μM）で15分間37℃で標識した。標識後、5倍の体積の氷冷DBSIを室温で5分間インキュベートした。細胞をペレット化し、培地に再懸濁し、腫瘍細胞を50,000細胞／ウェルの密度で96ウェルプレート（Greiner-bio-one、The Netherlands、cat. no. 655180）に播種した。bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERR及び対照抗体IgG1-b12-FEALの段階希釈液（1,000～0.051ng/mLの範囲の最終濃度、3倍希釈液）を添加し、プレートを室温で15分間インキュベートした。PBMCを解凍し、計数し、培地（RPMI1640／10%FBS／1%ペニシリンーストレプトマイシン／1%グルタミン酸塩）に再懸濁した後、8：1のエフェクター対標的（E：T）比で腫瘍細胞に添加し、プレートを37℃で72時間インキュベートした。PBS／0.1%BSA／0.02%アジド（染色緩衝液）で2回洗浄した後、細胞を染色して、CD3（T細胞、Invitrogen、cat. 48-0037）、CD14（単球／マクロファージ、Biolegend、cat. 301834）、CD19（B細胞、Biolegend、cat. 302246）、CD16（単球／マクロファージ、BD Biosciences、cat. no. 556618）、CD56（NK細胞、BD Biosciences、cat. no. 564849）、及びCD66b（顆粒球、Biolegend、cat. no. 305116）を使用した異なる細胞集団を区別した。細胞を、T細胞マーカーCD4（1：50、Biolegend、cat. no. 300521、Pacific Blueに複合化）、CD8（1：100、BD Biosciences、cat. no. 345772、FITCに複合化）、及びT細胞活性化マーカーCD69（1：50、Biolegend、cat. no. 310934、BV650に複合化）、CD25（1：100、Invitrogen、cat. no. 25-0259-42、PE-Cy7に複合化）、及びCD279／PD1（1：50、Biolegend、cat. no. 329930、BV605に複合化）について更に染色した。Ultracompe beads（5μL、Invitrogen、cat. no. 01-2222-42）での単一染色試料を含め、フローサイトメーターの補正調整に使用した。4℃での30分のインキュベーション後、プレートを染色緩衝液で2回洗浄し、細胞を7-AAD（染色緩衝液中で1：100に希釈）で4℃で10分間染色した。FACS Celesta（BD Biosciences）を使用して細胞を分析し、FlowJo（BD Biosciences）を使用してデータを処理した。用量応答曲線を、GraphPad Prism V7.02ソフトウェア（GraphPad Software、San Diego、CA、USA）を使用した非線形回帰分析（可変勾配でのシグモイド用量応答）を使用して生成した。

【0298】

生きた標的細胞のパーセンテージを、以下の式を使用して計算した：－生きた標的細胞％＝（各条件における生きた、単一Celltrace FarRed標識細胞の絶対数／いずれの抗体も加えることなく標的細胞及びT細胞のみを含む条件における生きた、単一Celltrace FarRed標識細胞の絶対数）×100。

【0299】

結果

図25Aは、bsG1-huCD3-FEAL×CD30-MDX060-FERRが、健常な対照ドナー並びに異なるHL及びNHL患者ドナーの両方に由来するT細胞によ

って媒介される72時間後のL-428腫瘍細胞の用量依存的細胞傷害性を誘導したことを示す。細胞傷害性は、CD69、CD25、及びPD-1の上方調節によって例示されるT細胞活性化及び増殖と関連していた(図25B-D)。対照抗体IgG1-b12-FEALについて、T細胞媒介性細胞傷害性は観察されなかった。ドナーE(AML)について、L-428腫瘍細胞のT細胞媒介性細胞傷害性は観察されず、これはPBMC試料内のT細胞の低頻度に起因し得る(表11)。

【0300】

併せて、これらのデータは、HL及びNHL患者からの末梢血T細胞が、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの存在下で腫瘍細胞株のT細胞媒介性細胞傷害性を誘導することができることを例示する。

【0301】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

表 1 1．初代患者 P BMC 試料特徴

試料番号	コード	起源	処理（T x）状態	会社	細胞生存率(%)	T細胞の頻度（%）
A	100000537	ホジキン、結節硬化型ホジキンリンパ腫	ステージ IV、処理前	Discovery Life Sciences	63.5	71.1
B	120328910	ホジキンリンパ腫	処理前		81.7	56.1
C	17A0D69A3	ホジキン、混合細胞型ホジキンリンパ腫	処理前		87.5	35.6
D	D4931CBAB	ホジキン、結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫	ステージ II-A、処理前、CD20+		63.95	59.9
E	200003963	急性骨髄性白血病（AML）	活性処理、試験された E B V		65.55	17.4
F	121426858	NHL、末梢 T細胞リンパ腫（PTCL）－非特定型	ステージ I I I、処理後、処理 CHP＋アドセトリス／アドリアマイシン		66.2	68
HC		健常対照 PBMC	N.A.	Sanquin	86.55	48.4

【 0 3 0 2】

実施例 1 7－S C I Dマウスにおける B s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rの薬物動態特性の評価

1 1～1 2 週齢、雌の腫瘍を含まない S C I Dマウス（C．B－1 7／I c r H a n（登録商標）H s d－P r k d c s c i dマウス、E n v i g o）（群当たり 3 匹のマウス）に、1 μ g（0．0 5 m g／k g）、1 0 μ g（0．5 m g／k g）又は 1 0 0 μ g（5 m g／k g）の B s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rの単回用量を静脈内（I V）注射した。B s G 1－h u C D 3－F E A L x C D 3 0－M D X 0 6 0－F E R Rがマウスタンパク質と交差反応しないため、実験は、標的媒介性ク

リアランスの不在下で抗体クリアランスを研究するように設定した。

【0303】

40 μ Lの血液試料を、抗体投与の10分、4～6時間、24時間、2日、7日、14日及び21日後に、経頰静脈穿刺又は伏在静脈穿刺から収集した。血液を、K2-EDTA含有バイアル (Sarstedt、Microvette CB300、cat. No. 16.444.100) に収集し、10,000 gで10分間遠心分離した。血漿上清を、標識されたエッペンドルフバイアルに移し、血漿IgG濃度決定まで-80℃で保存した。

【0304】

ヒトIgG濃度は、総ヒトIgG酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) を使用して決定した。2 μ g/mLの濃度で一晩4℃で96ウェルMicrolon ELISAプレート (Greiner、German) にコーティングされた100 μ LのPBS (BioTrading、cat. no. K654F500PP) 中のマウス抗ヒトIgG-カップクロンMH16 (CLB Sanquin、The Netherlands、cat. no. M1268) を捕捉抗体として使用した。プレートをPBSA (0.2%ウシ血清アルブミン [BSA] を含むPBS) で室温 (RT) で1時間ブロックした後、試料を添加し、PBSA中で段階希釈し、プレートシェーカー上で1時間RTでインキュベートした。プレートを、300 μ LのPBST (0.05%のTween 20で補足されたPBS) で3回洗浄し、その後ヤギ抗ヒトIgG免疫グロブリン (Jackson、West Grace、PA、cat. no. 109-035-098、0.2%のBSAで補足されたPBST中の1:10,000) を用いて室温で1時間インキュベートした。光から保護された2,2'-アジノービス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸) (ABTS、Roche、cat. no. 11112422001及び11112597001) とのインキュベーション前、プレートを300 μ LのPBSTで3回洗浄した。100 μ Lの2%シュウ酸 (Sigma-Aldrich、cat. no. 33506) を添加することによって反応を停止させ、室温で10分間インキュベートした。吸光度は、ELx808吸光度マイクロプレートリーダー (Biotek、Winooski、VT) で405 nmで測定した。

【0305】

参照抗体ヒトIgG1 λ (純粋なタンパク質30C、cat. No. BP078) から標準曲線を生成して (濃度範囲: 1 mg/mL [3 μ L])、PBSTA中の3倍希釈液で更に希釈した。注射された材料を用いて第2の標準曲線を生成し、1 mg/mL (3.6 μ Lの抗体) の濃度で5 mg/kgの用量から調製し、PBSTA中の3倍希釈液に更に希釈した。

【0306】

結果

参照標準から、校正曲線を、Microsoft Excelの4パラメータロジスティックフィット曲線を使用して未知の補間によって計算した。血漿試料中のヒトIgG1濃度を、プロットされた校正曲線の方程式から計算し (図26A)、曲線下面積 (AUC) を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して計算した。血液サンプリングの最終日 (21日目) までのIgGクリアランスを、式D*1.000/AUCによって決定し、式中、Dは、注射の用量 (1 mg/kg) である (図26B)。

【0307】

BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRは、マウスタンパク質と交差反応せず、薬物動態特性は、よって、他の非結合野生型ヒトIgG1分子と同等であると予想されるであろう。全ての用量群について予想されたヒトIgG血漿濃度は、約100 μ g/mL (約5 mg/kg)、10 μ g/mL (約0.5 mg/kg)、又は1 μ g/mL (約0.05 mg/kg) であると計算された。全ての時点について、0.05 mg/kgで処理された動物からの試料は測定可能ではなかった。BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの血漿クリアランス率は、通常

のヒトIgG1の予測された血漿クリアランス率と同等であった。平均最大ヒトIgG血漿濃度(C_{max})は、通常のヒトIgG1の予測されたC_{max}と同等であった。

【0308】

よって、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRの薬物動態プロファイルは、標的結合の不在下で非腫瘍保有SCIDマウスにおける通常のヒトIgG1について予測されるものと同等である。

【0309】

実施例18-BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRへのC1q結合の評価

補体タンパク質C1qの、膜結合BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、又はBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRが生成された親抗体、すなわち、IgG1-huCD3-FEAL及びIgG1-CD30-MDX060-FERRへの結合を、CD3又はCD30発現細胞のいずれかを用いて評価した。

【0310】

A. CD3発現細胞に結合したBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRへのC1q結合

補体タンパク質C1qの、CD3結合BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR及びIgG1-huCD3-FEALへの結合を、刺激されたヒトCD8⁺T細胞を用いて試験した。IgG1-CD52-E430Gは、CD52抗体CAMPATH-1Hに基づくVH及びVLDメインを有し、細胞表面に結合したときにC1qに効率的に結合することが知られているFc増強バックボーンを有する、陽性対照として含まれた。非結合陰性対照抗体として、IgG1-b12-FERR及びIgG1-b12が含まれた。

【0311】

ヒトCD8⁺T細胞を、健常なボランティアから得られたバフィーコート(Sanquin)から陰性選択によってRosetteSep(商標)Human CD8⁺T細胞濃縮カクテル(Stemcell Technologies、cat. No. 15023C.2)を製造業者の指示に従って使用して精製(濃縮)した。精製されたT細胞を、10%の鉄を含む熱不活性化ドナーウシ血清(DBSI、Gibco、cat. no. 20731-030)及びペニシリン/ストレプトマイシン(pen/strep、Lonza、cat. no. DE17-603E)で補足された、T細胞培地(25mMのHEPES及びL-グルタミン(Lonza、cat. no. BE12-115F)を含むRoswell Park Memorial Institute[RPMI]-1640培地)に再懸濁した。抗CD3/CD28ビーズ(Dynabeads(商標)Human T-Activator CD3/CD28、ThermoFisher Scientific、cat. No. 11132D)をPBSで洗浄し、T細胞培地に再懸濁した。ビーズを、濃縮されたヒトCD8⁺T細胞に1:1比で添加し、37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。次に、磁石を使用してビーズを除去し、細胞をPBS中で2回洗浄し、再度計数した。

【0312】

BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR及びIgG1-huCD3-FEALの、活性化CD8⁺T細胞への結合は、BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR及びIgG1-huCD3-FEAL(30μg/mL)、並びにR-フィコエリトリン(PE)複合化ヤギ抗ヒトIgGF(ab')₂(GMB FACS緩衝液中で1:200に希釈、Jackson ImmunoResearch、cat. no. 109-116-098)を使用して、フローサイトメトリーによって確認された。

【0313】

活性化CD8⁺T細胞を、丸底96ウェルプレート(30,000細胞/ウェル)にお

10

20

30

40

50

いて播種し、ペレット化し、30 μ Lのアッセイ培地（0.1% [w/v] のウシ血清アルブミン画分V（BSA、Roche、cat. no. 10735086001）及びペニシリン／ストレプトマイシンで補足された、25mMのHEPES及びL-グルタミンを含むRPMI-1640）に再懸濁した。その後、50 μ LのBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、IgG1-huCD3-FEAL、IgG1-b12-FERR、IgG1-CD52-E430G、又はIgG1-b12（アッセイ培地中で3倍希釈ステップでの 1.7×10^{-4} –30 μ g/mLの最終濃度）を、ウェルの各々に添加し、37℃で15分間インキュベートして、抗体が細胞に結合することを可能にした。

【0314】

C1qの供給源として、ヒト血清（20 μ L／ウェル、Sanquin、ロット20L15-02）を20%の最終濃度まで添加した。細胞を、氷上で45分間インキュベートし、続いて、低温GMB FACS緩衝液で2回洗浄し、50 μ Lのフルオレセインイソチオシアネート（FITC）複合化ウサギ抗ヒトC1q（20 μ g/mLの最終濃度（DAKO、cat. no. F0254）、GMB FACS緩衝液中で1：75に希釈）と、アロフィコシアニン複合化マウス抗CD8（BD Biosciences、cat. no. 555369、GMB FACS緩衝液中で1：50に希釈）の存在下又は不在下で、4℃で30分間、暗所でインキュベートした。細胞を、低温GMB FACS緩衝液で2回洗浄し、2mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA、Sigma-Aldrich、cat. no. 03690）、及び4', 6-ジアミジノー-2-フェニルインドール（DAPI）生存性色素（1：5,000、BD Pharmingen、cat. no. 564907）で補足された20 μ LのGMB FACS緩衝液に再懸濁した。（DAPI排除によって特定される）生存細胞へのC1q結合を、iQue3スクリーナー（Intellicyt Corporation）でフローサイトメトリーによって分析した。データを、iQueソフトウェア（Intellicyt Corporation、ForeCyt（登録商標）Enterprise Client Edition 6.2 [R3]、Version 6.2.652）を使用して分析した。結合曲線を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して非線形回帰分析（可変勾配でのシグモイド用量応答）を使用して分析した。

【0315】

結果

図27Aは、用量依存的C1q結合が膜結合IgG1-CD52-E430Gに対して観察されたが、C1q結合が、膜結合BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR若しくはIgG1-huCD3-FEALに対して又は非結合対照抗体に対して観察されなかったことを示す。

【0316】

B. CD30発現細胞に結合したBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRへのC1q結合

補体タンパク質C1qのCD30結合BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR及びIgG1-huCD30-MDX060-FERRへの結合を、NCEB-1マントル細胞リンパ腫細胞を使用して試験した。陽性対照として、IgG1-7D8-E430G（抗CD20）が含まれ、これは不活性変異を含まず、C1qへの結合能力を保持する。非結合陰性対照抗体として、IgG1-b12-FERRが含まれた。

【0317】

NCEB-1細胞を、0.1%のウシ血清アルブミン（BSA、画分V、Roche、cat. no. 10735086001）及び1%のペニシリン／ストレプトマイシン（Gibco、cat. no. 15140-122）を含有するアッセイ培地（RPMI-1640（Lonza、Switzerland、cat. no. BE12-115F））中で 2×10^6 細胞/mLの濃度で懸濁した。腫瘍細胞（50 μ L中100,000細胞

10

20

30

40

50

胞)を、96ウェル丸底プレート(Greiner Bio、cat no. 650180)に添加した。次に、30 μ LのBsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR、IgG1-CD30-MDX060-FERR又は対照抗体(アッセイ培地中で希釈された3倍希釈ステップでの5.6 $\times 10^{-5}$ -10 μ g/mLの最終濃度)を、ウェルの各々に添加し、37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートして、抗体が細胞に結合することを可能にする。

【0318】

細胞の半分(40 μ Lの抗体を含有する細胞懸濁液)を、抗体結合を確認するために異なるプレートに播種した。BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR及びIgG1-CD30-MDX060-FERRの、NCEB-1細胞への結合は、R-フィコエリトリン(PE)複合化ヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂(FACS緩衝液中で1:500に希釈、Jackson ImmunoResearch、cat. no. 109-116-098)を使用して、フローサイトメトリーによって確認された。

10

【0319】

ヒト血清(10 μ L/ウェル、Sanquin、ロット21K04-01)を、残りの40 μ Lの細胞懸濁液(最終濃度の20%)に添加し、45分間氷上でインキュベートし、続いてFACS緩衝液で洗浄し、25 μ LのFITC複合化ウサギ抗C1q抗体(20 μ L/mLの最終濃度(DAKO、cat no. F0254)、FACS緩衝液中で希釈)と暗所で4 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。細胞を、低温FACS緩衝液で洗浄し、TO-PRO(商標)-3生存性染料(1:5000、ThermoFisher、cat. no. T3605)で補足された30 μ LのFACS緩衝液中に再懸濁し、iQue3 Screener(Intellicyt Corporation)上で測定した。データを、iQueソフトウェア(Intellicyt Corporation、ForeCyt(登録商標)Enterprise Client Edition 6.2[R3]、Version 6.2.652)を使用して分析した。結合曲線を、GraphPad Prismソフトウェアを使用して非線形回帰分析(可変勾配でのシグモイド用量応答)を使用して分析した。

20

【0320】

結果

30

図27Bは、用量依存的C1q結合が膜結合IgG1-CD20-E430Gに対して観察されたが、C1q結合が膜結合BsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERR若しくはIgG1-CD30-MDX060-FERRに対して、又は非結合対照抗体に対して観察されなかったことを示す。

【0321】

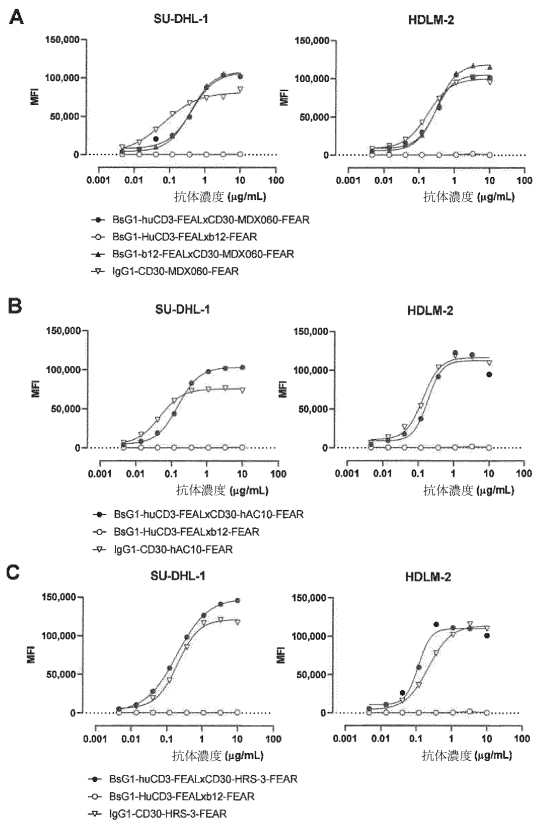
よって、これらの結果は、bsG1-huCD3-FEALxCD30-MDX060-FERRがC1qに結合しないことを実証し、機能的に不活性なバックボーンを確認した。

40

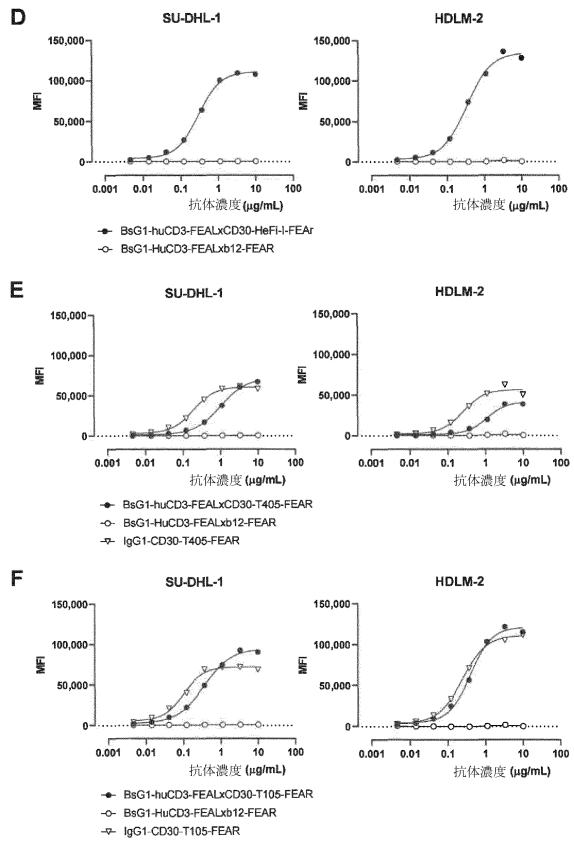
50

【図面】

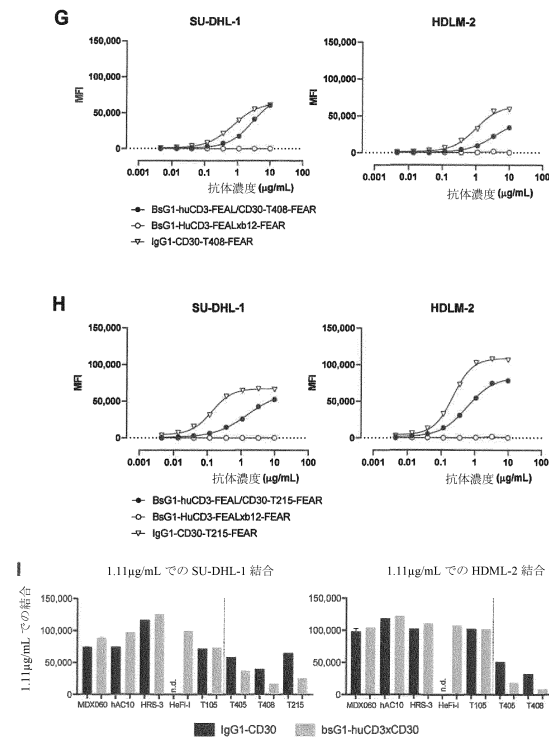
【図 1 - 1】



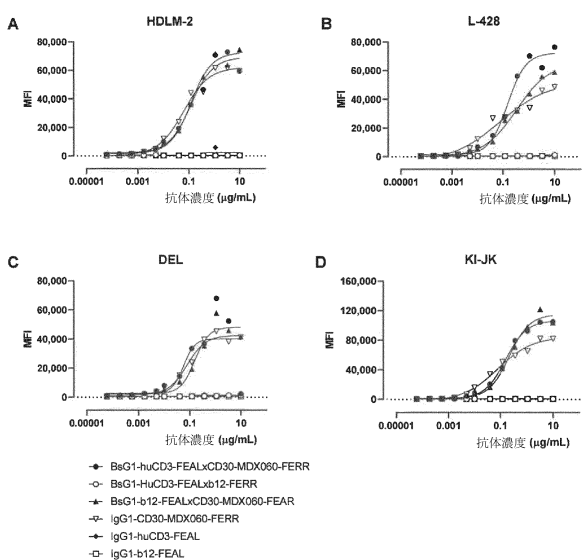
【図 1 - 2】



【図 1 - 3】



【図 2】



10

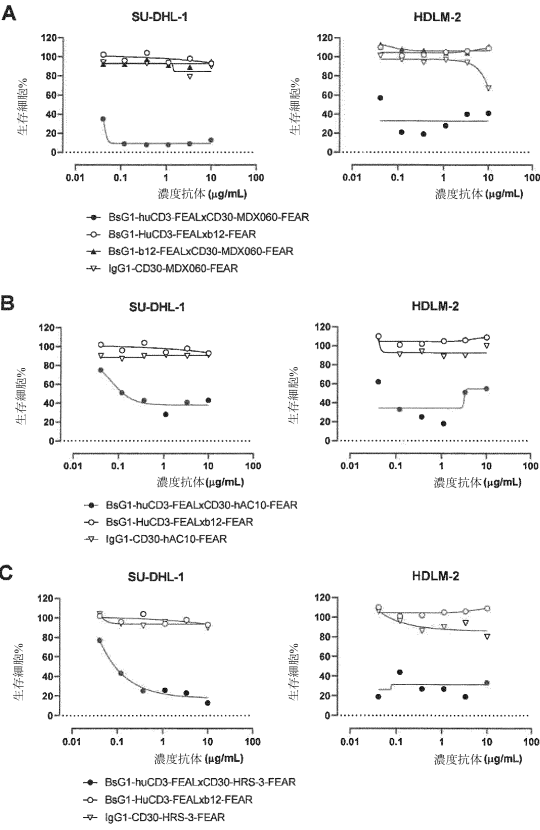
20

30

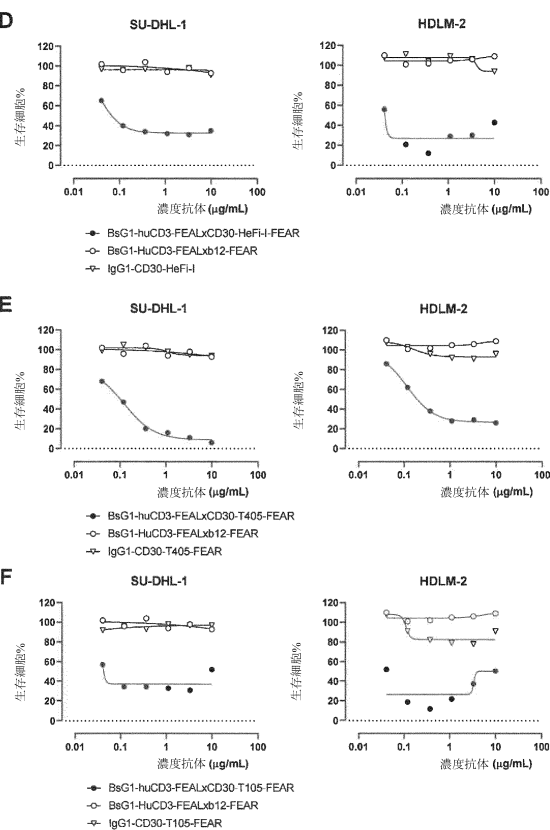
40

50

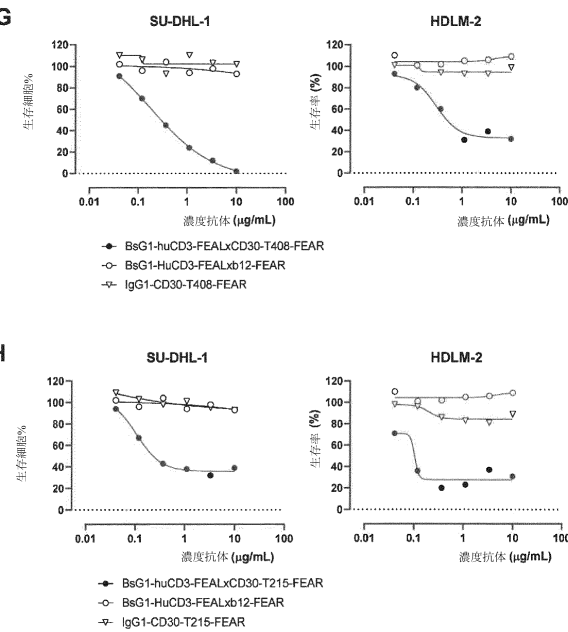
【図 3 - 1】



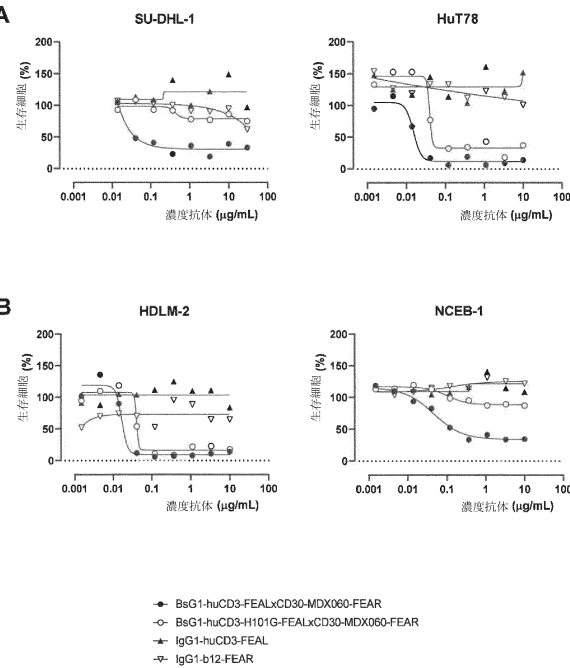
【図 3 - 2】



【図 3 - 3】



【図 4 - 1】



10

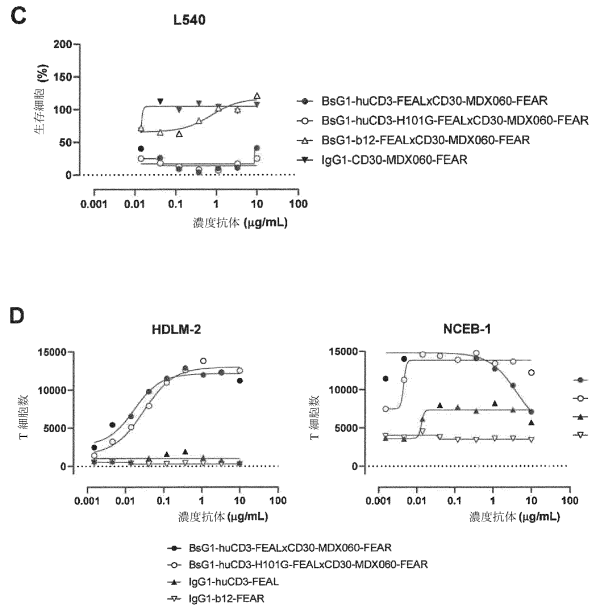
20

30

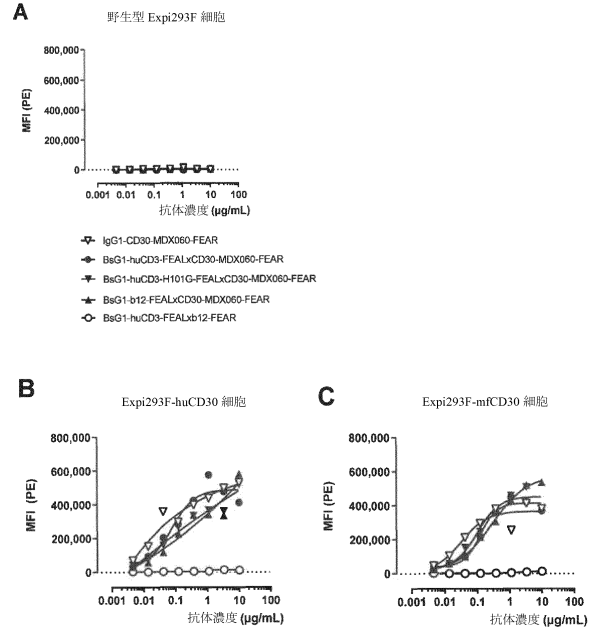
40

50

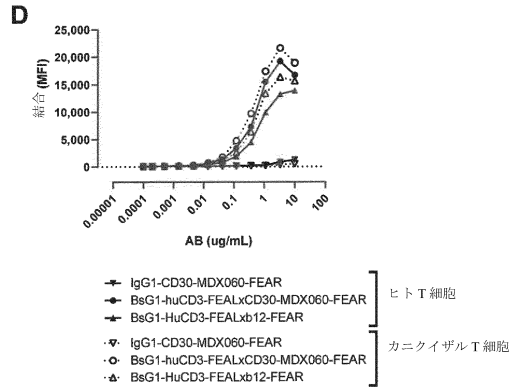
【図 4 - 2】



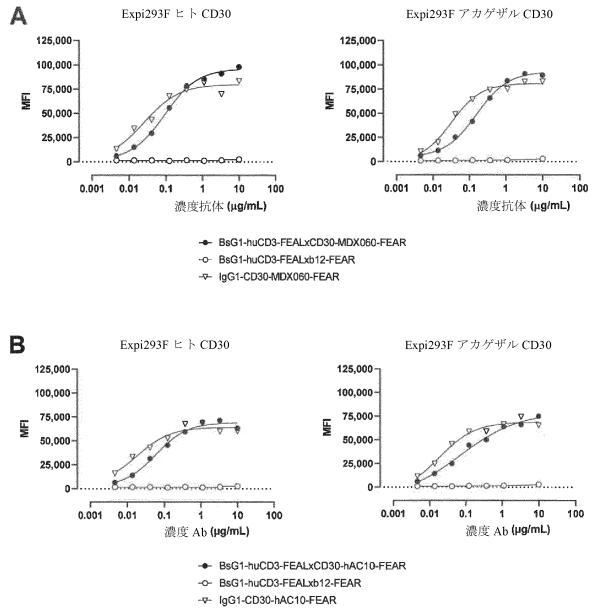
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



【図 6 - 1】



10

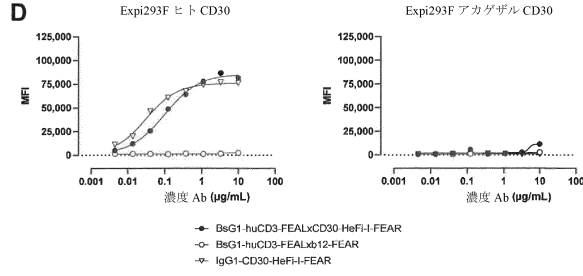
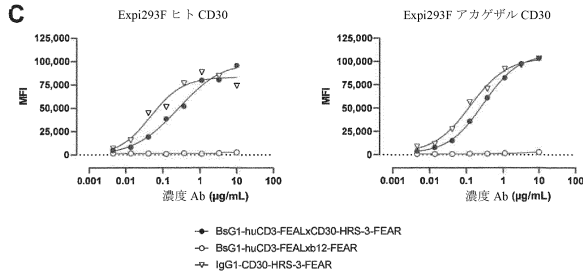
20

30

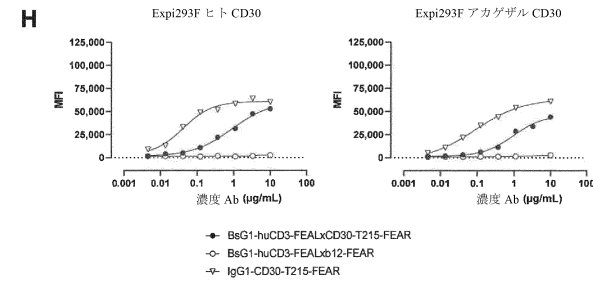
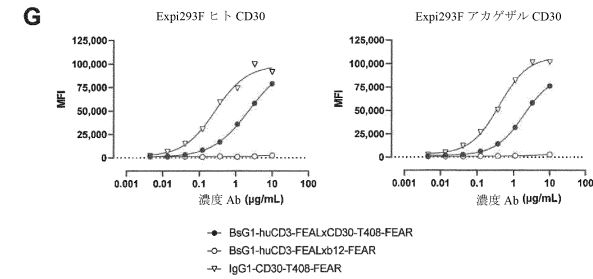
40

50

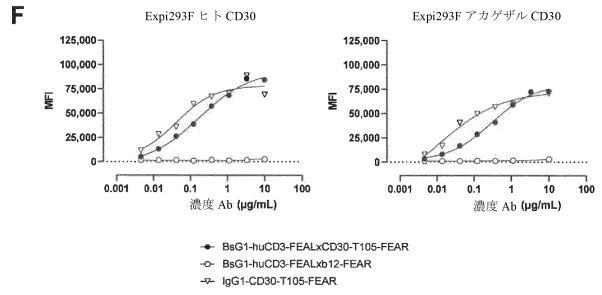
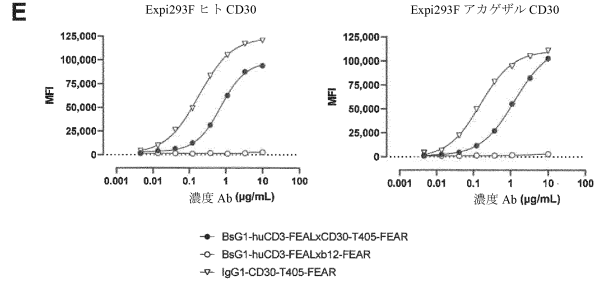
【図 6 - 2】



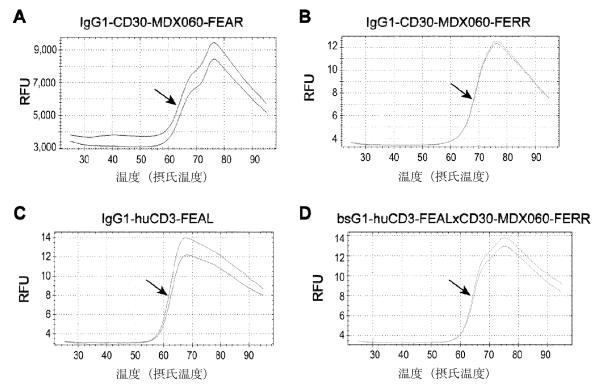
【図 6 - 4】



【図 6 - 3】



【図 7】



10

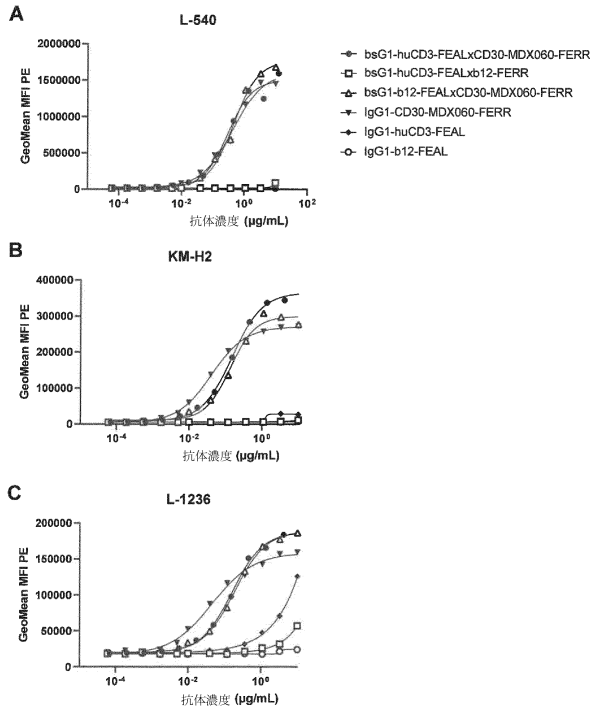
20

30

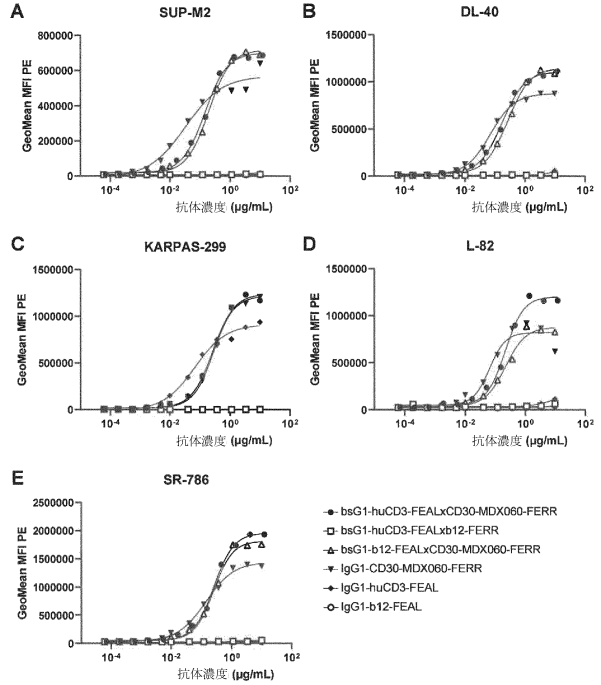
40

50

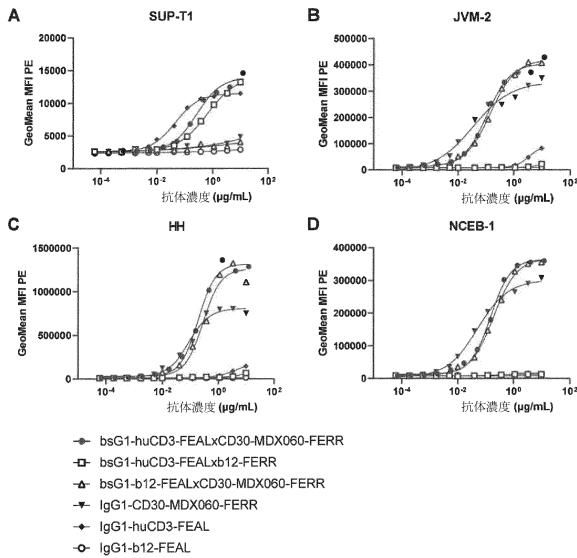
【図 8】



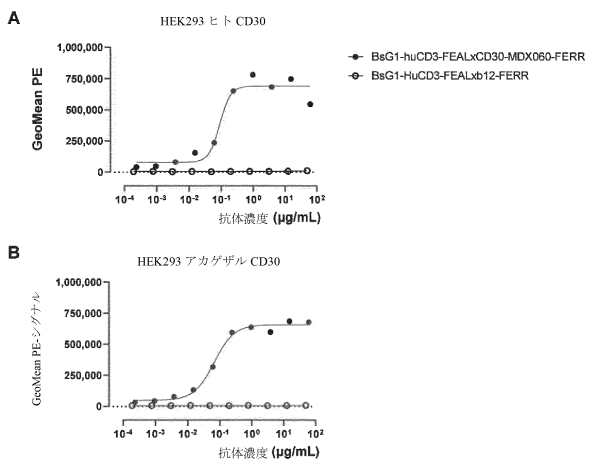
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

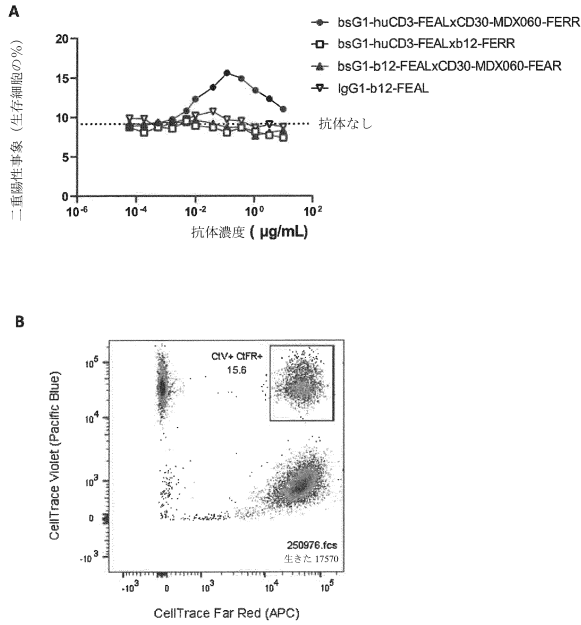
20

30

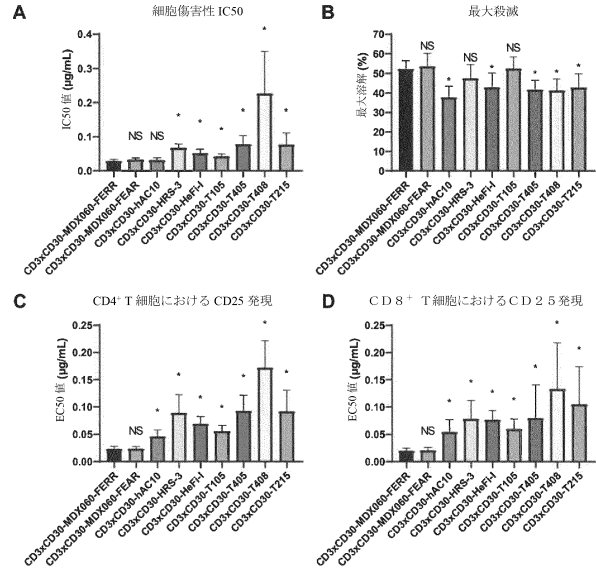
40

50

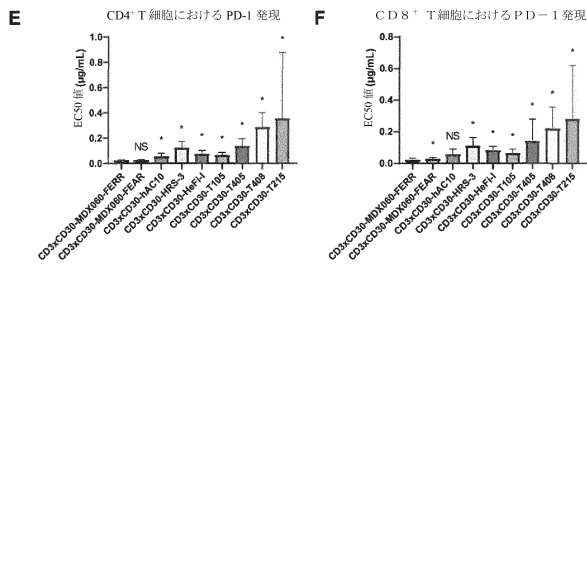
【図 1 2】



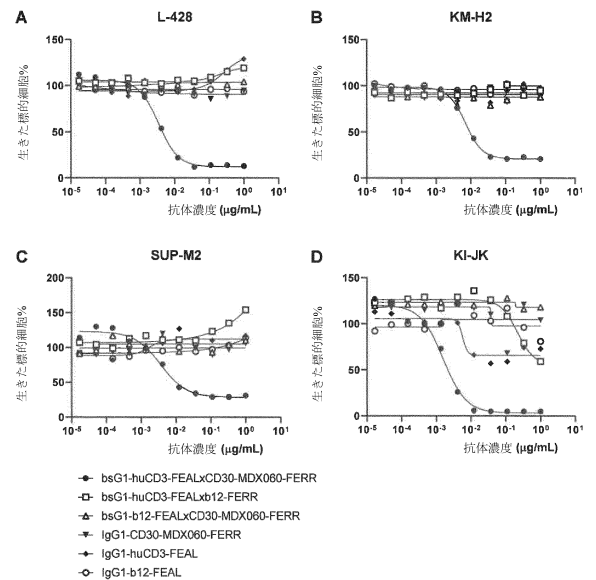
【図 1 3 - 1】



【図 1 3 - 2】



【図 1 4】



10

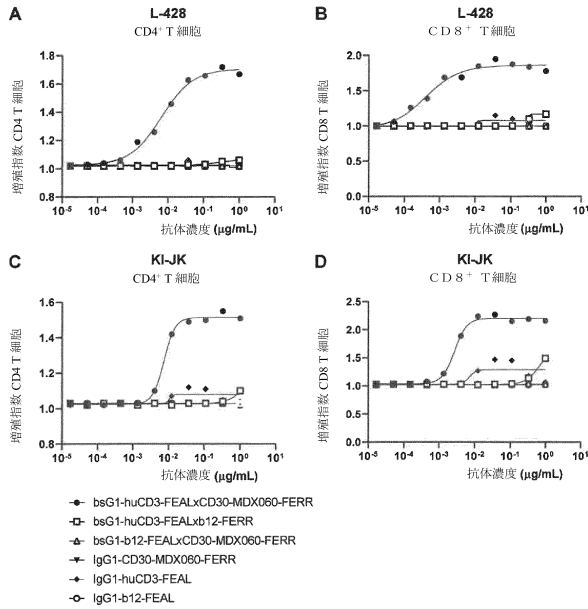
20

30

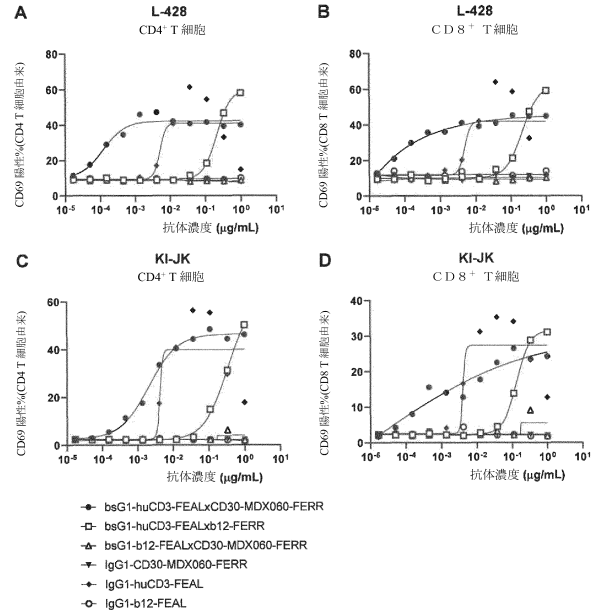
40

50

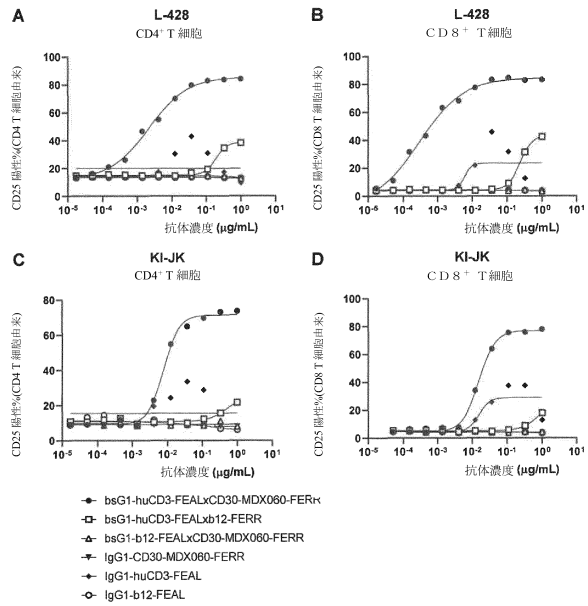
【図 15】



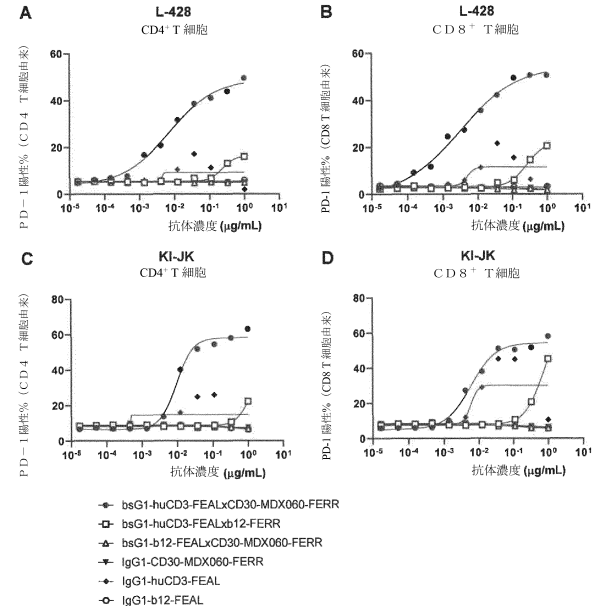
【図 16】



【図 17】



【図 18】



10

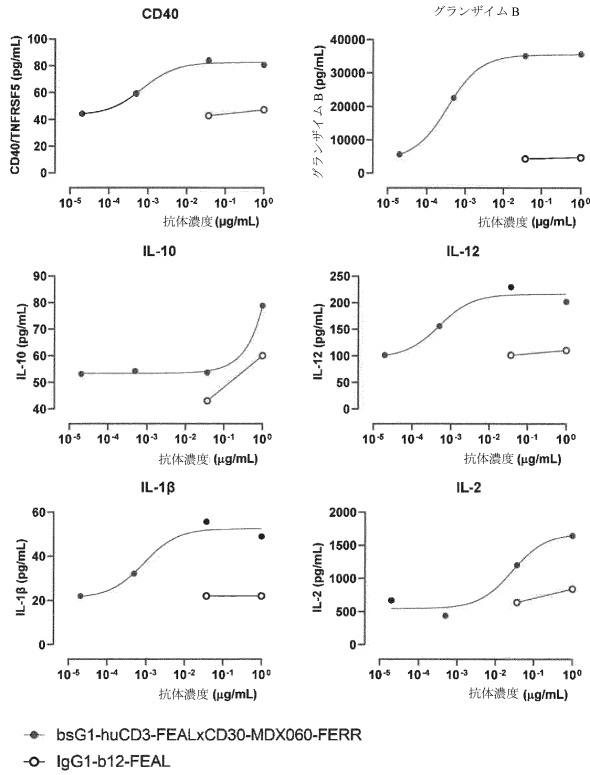
20

30

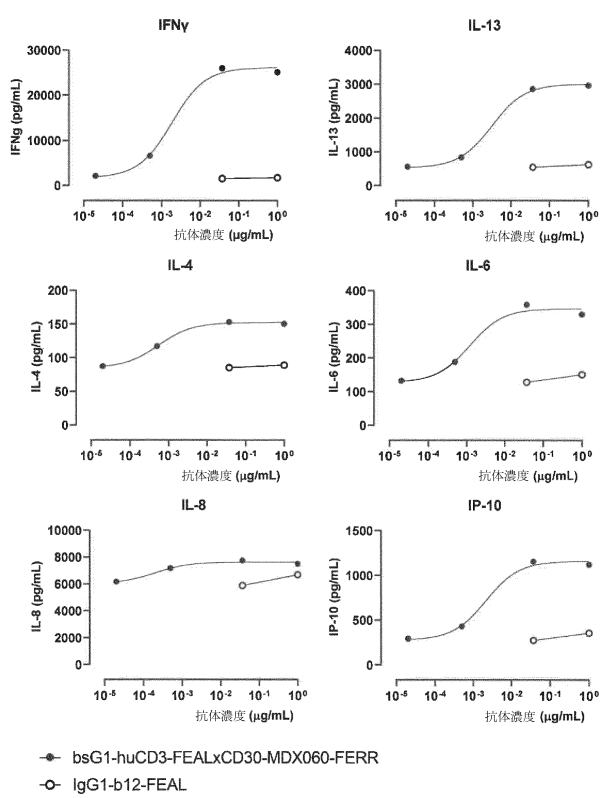
40

50

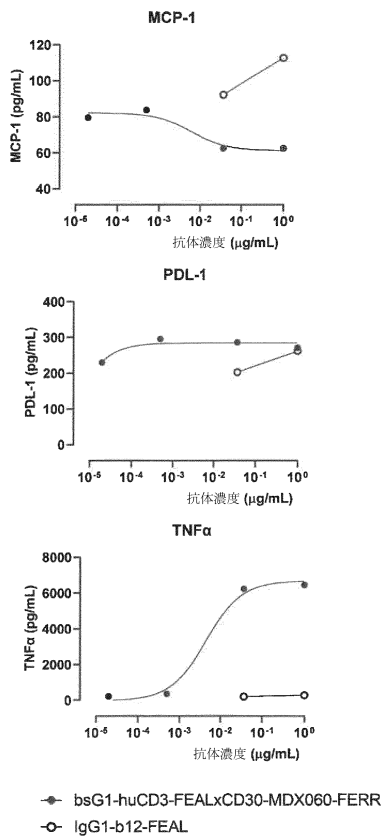
【図 19-1】



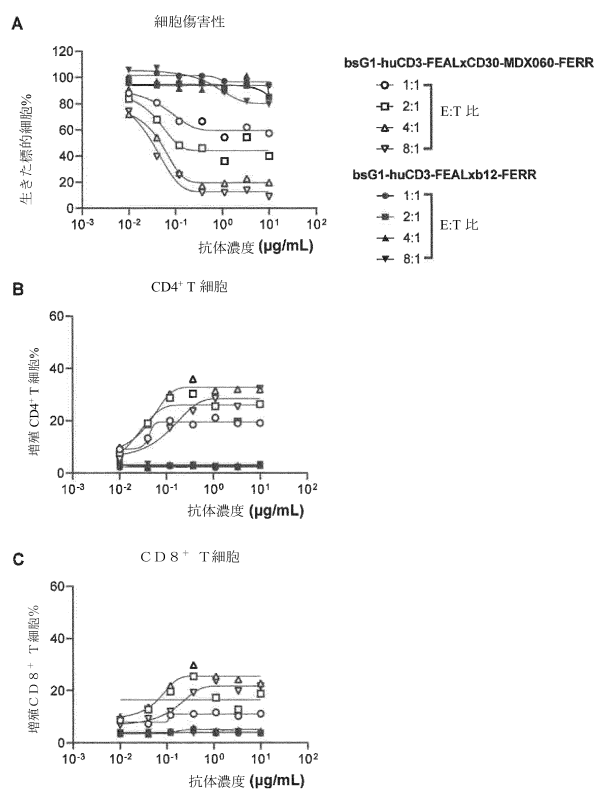
【図 19-2】



【図 19-3】



【図 20】



10

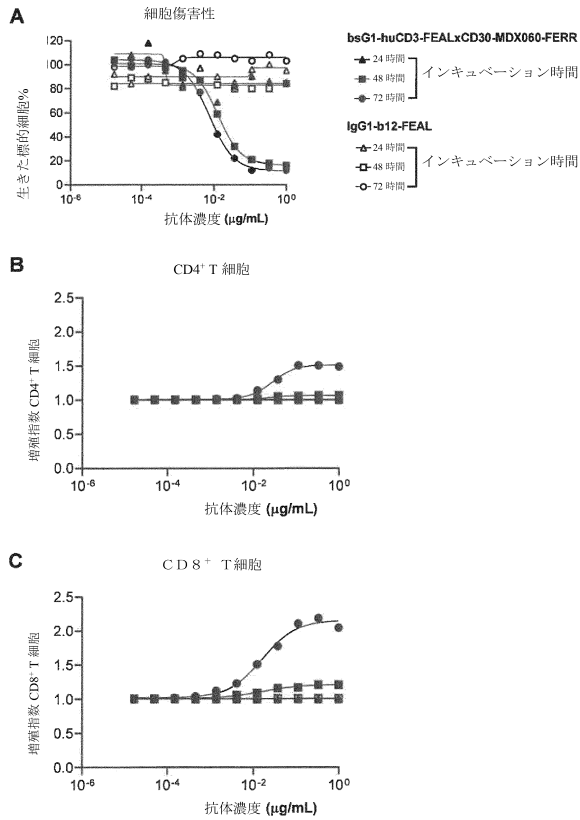
20

30

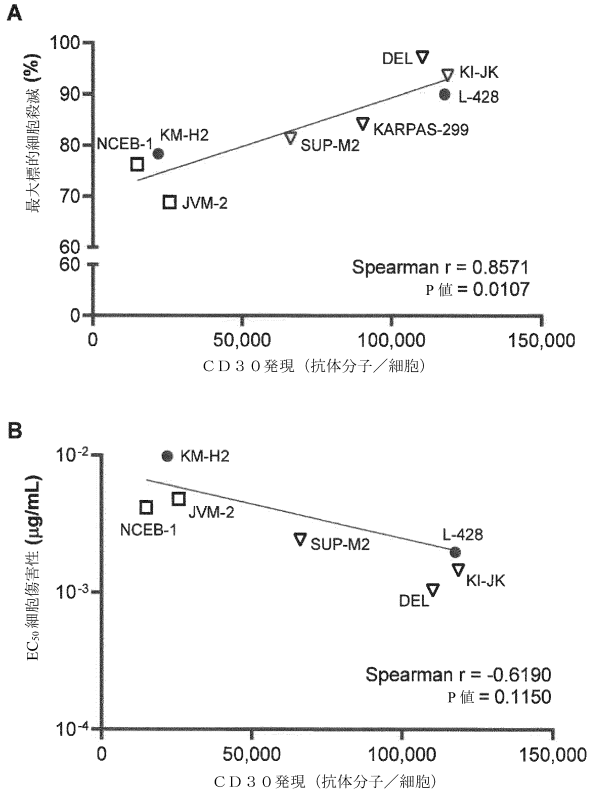
40

50

【図 2 1】



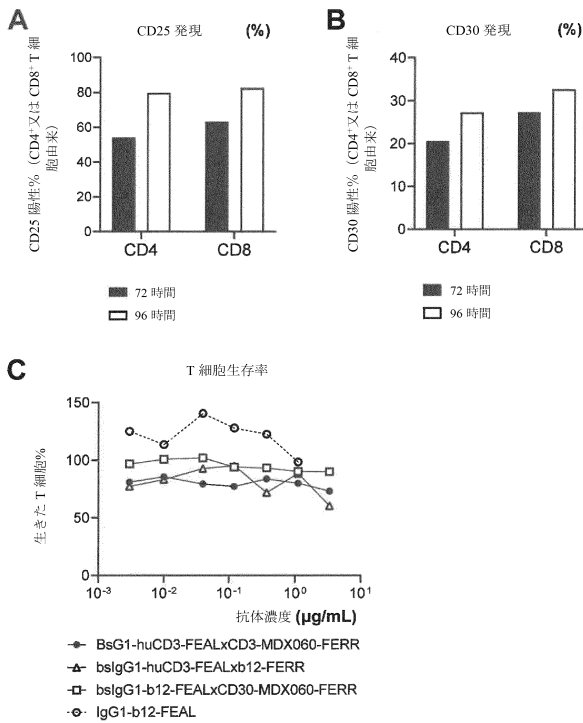
【図 2 2】



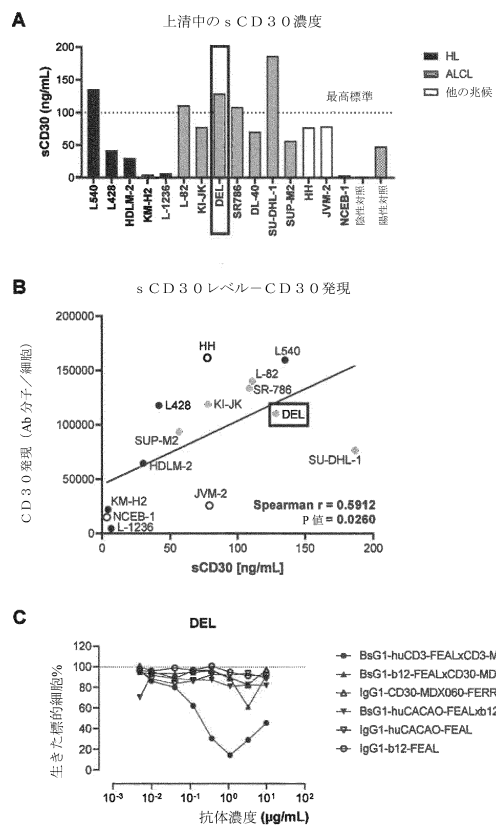
10

20

【図 2 3】



【図 2 4】

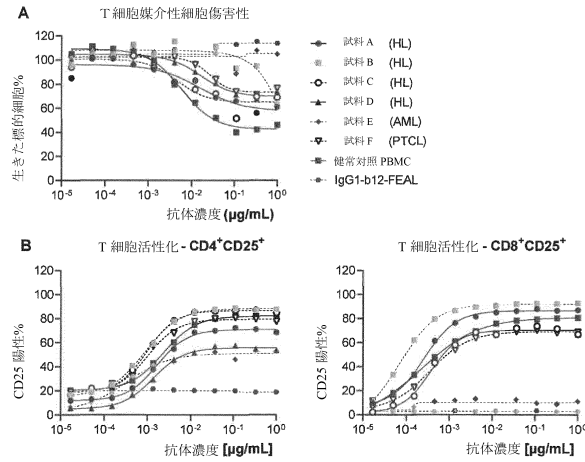


30

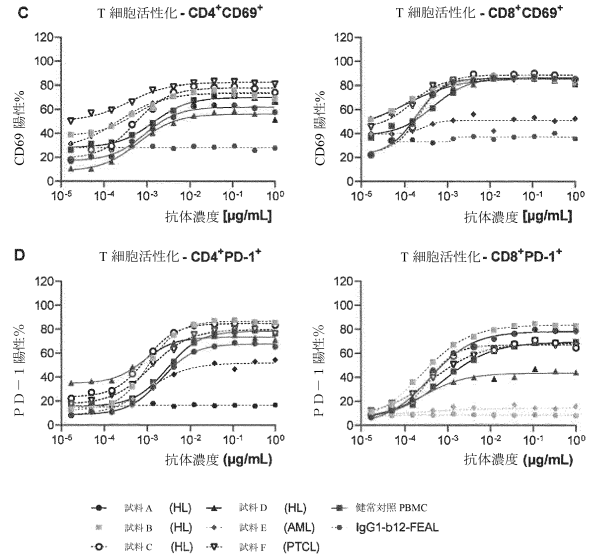
40

50

【図 2 5 - 1】

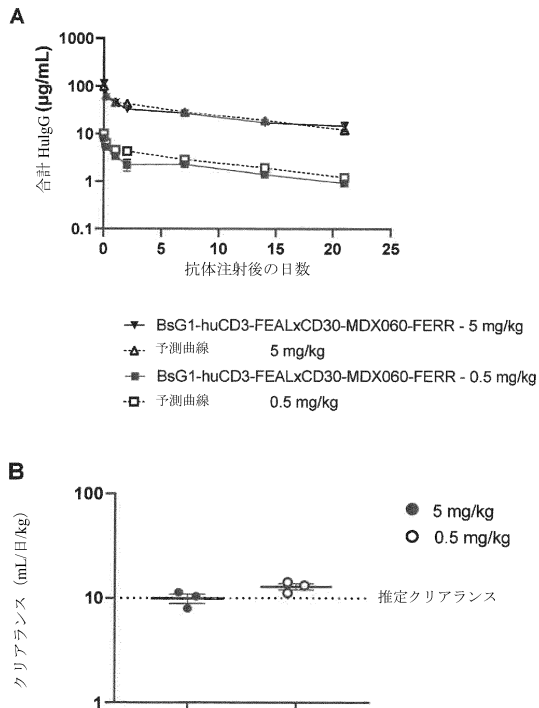


【図 2 5 - 2】

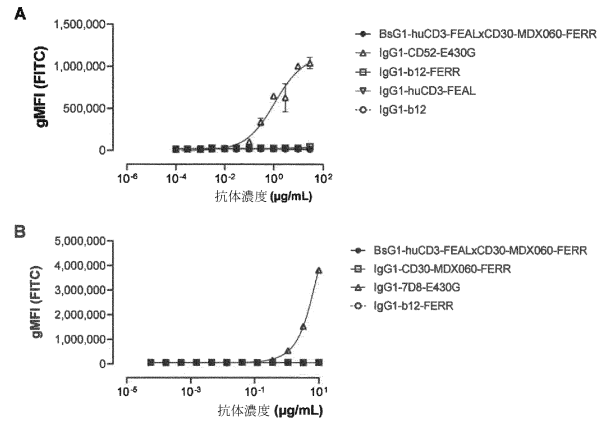


10

【図 2 6】



【図 2 7】



20

30

40

【配列表】

0007503215000001.xml

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/85 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 K 9/00 (2006.01)
 A 6 1 K 47/44 (2017.01)
 A 6 1 K 47/28 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/85 Z
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 K 9/00
 A 6 1 K 47/44
 A 6 1 K 47/28
 A 6 1 P 35/00

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川寄 洋祐

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 サティン, デイビッド

オランダ国、ユトレヒト・3 5 8 4・シーティール、ウブサララン・1 5、ジェンマブ ビー。ブイ。気付

(72)発明者 エンゲルバーツ, パトリック

オランダ国、ユトレヒト・3 5 8 4・シーティール、ウブサララン・1 5、ジェンマブ ビー。ブイ。気付

(72)発明者 ケンパー, クリステル

オランダ国、ユトレヒト・3 5 8 4・シーティール、ウブサララン・1 5、ジェンマブ ビー。ブイ。気付

(72)発明者 ブレイ, エステル・シー・ダブリュー

オランダ国、ユトレヒト・3 5 8 4・シーティール、ウブサララン・1 5、ジェンマブ ビー。ブイ。気付

(72)発明者 オースティンディー, シモーネ

オランダ国、ユトレヒト・3 5 8 4・シーティール、ウブサララン・1 5、ジェンマブ ビー。ブイ。気付

(72)発明者 アレムデヒ, ファルシッド

オランダ国、ユトレヒト・3 5 8 4・シーティール、ウブサララン・1 5、ジェンマブ ビー。ブイ。気付

審査官 野村 英雄

(56)参考文献

国際公開第2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 (WO, A 2)

米国特許出願公開第2 0 1 9 / 0 2 8 4 2 7 8 (US, A 1)

米国特許出願公開第2 0 2 0 / 0 2 3 9 5 7 9 (US, A 1)

国際公開第2 0 2 0 / 0 6 8 7 7 4 (WO, A 1)

OLDHAM, R.A.A., et al., "T cells armed with novel anti-CD30/anti-CD3 bispecific antibodies for immunotherapy of CD30+ malignancies.", MOLECULAR THERAPY, 2019年04月30日, Vol.27, No.4, Supplement 1, p.387, [838]

BAUER, S., et al., al., "Immunotherapy of human tumors with T-cell-activating bispecific a

ntibodies: stimulation of cytotoxic pathways in vivo.", CANCER RESEARCH, 1999年04月15日, Vol.59, No.8, pp,1961-1965

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

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

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

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

P u b M e d