

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-510098
(P2024-510098A)

(43)公表日 令和6年3月6日(2024.3.6)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全102頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-550109(P2023-550109)	(71)出願人	519274183		
(86)(22)出願日	令和4年2月18日(2022.2.18)		イノベント バイオロジクス (スーチョ		
(85)翻訳文提出日	令和5年8月18日(2023.8.18)		ウ) カンパニー, リミティド		
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/076832		中華人民共和国, チアンスー	2 1 5 1	
(87)国際公開番号	WO2022/174813		2 3, スーチョウ インダストリアル パ		
(87)国際公開日	令和4年8月25日(2022.8.25)		ーク スーチョウ, トンピン ストリート		
(31)優先権主張番号	202110189359.8		1 6 8		
(32)優先日	令和3年2月19日(2021.2.19)	(74)代理人	100099759		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		弁理士 青木 篤		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100123582		
	,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(		弁理士 三橋 真二		
	AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A	(74)代理人	100117019		
	T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR		弁理士 渡辺 陽一		
	,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,	(74)代理人	100141977		
	最終頁に続く		弁理士 中島 勝		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗G P R C 5 D x B C M A x C D 3 三重特異性抗体およびその使用

(57)【要約】
本発明は、三重特異性抗原結合タンパク質に関し、より具体的には、G P R C 5 DとB C M Aの2種類の腫瘍抗原とT細胞表面抗原C D 3 に特異的に結合する三重特異性抗体、およびそれを含む医薬組成物、調製方法ならびに使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

三重特異性 Y 型抗体分子であって、下記の式 (I) :

$$(M1 : M2 - (X1) p) - Fc : : Fc - (X2) q, \quad (I)$$

の構造を有し、式中、

前記 M1 および前記 M2 は、前記抗体分子の第 1 抗体アームおよび第 2 抗体アームをそれぞれ表し、かつ前記 M1 および前記 M2 は、第 1 と第 2 抗原に結合する抗原結合部位をそれぞれ含み、前記抗原結合部位は Fab または scFab、好ましくは Fab であり、

前記 Fc : : Fc は、抗体分子のステムを表し、ペアリングして二量体化された第 1 の Fc ドメインおよび第 2 の Fc ドメインで構成され、ここで前記第 1 と第 2 抗体アームは、直接または連結ペプチド（好ましくはヒンジ領域）を介して前記第 1 の Fc ドメインおよび第 2 の Fc ドメインの N 末端にそれぞれ連結され、

前記 X1 は、前記抗体アームの C 末端に複合された複合成分を表し、前記 X2 は、前記ステムの C 末端に複合された複合成分を表し、ここで前記複合成分は、第 3 抗原に結合する抗原結合部位を含み、かつ

式中、p と q は、0、1 もしくは 2 の整数をそれぞれ表し、p と q のうちの 1 つは 0 であり、

好ましくは、式中、p = 0 の場合、q = 1 であり、前記 M1 および前記 M2 の抗原結合部位はそれぞれ Fab または scFab であり、複合成分 X2 は前記抗体分子のステムの 2 つの Fc ドメインのうちの 1 つに複合され、あるいは

q = 0 の場合、p = 2 であり、前記 M1 および前記 M2 の抗原結合部位はそれぞれ Fab であり、複合成分 X1 は前記抗体分子の前記抗体アーム M1 および M2 の両方の Fab 軽鎖に複合され、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して GPRC5D、B2M および CD3 から選択される、

三重特異性 Y 型抗体分子。

【請求項 2】

前記複合成分は、scFv、Fv、dsFv および dsAb、好ましくは scFv から選択される抗原結合部位を含む、

請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 3】

前記抗体分子は、

$$(M1 : M2) - Fc : : Fc - (X2) q, \quad (Format_2)$$

の構造を有し、式中、

q = 1、

前記 M1 および前記 M2 は、第 1 と第 2 抗原に結合する抗原結合部位 Fab または scFab、好ましくは Fab をそれぞれ含み、かつ

前記 X2 は、第 3 抗原に結合する抗原結合部位 scFv、好ましくは ds scFv を含み、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して GPRC5D、B2M および CD3 から選択される、

請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 4】

前記抗体分子は、

$$(M1 : M2 - (X1) p) - Fc : : Fc, \quad (Format_7)$$

の構造を有し、式中、

p = 2、

前記 M1 および前記 M2 は、第 1 と第 2 抗原に結合する抗原結合部位 Fab をそれぞれ含み、かつ

前記 X1 は、第 3 抗原に結合する抗原結合部位 scFv、好ましくは ds scFv を含

み、

ここで、第1、第2および第3抗原は互いに異なり、互いに独立してGPRC5D、B
CMAおよびCD3から選択される、

請求項1に記載の抗体分子。

【請求項5】

前記抗体アームのFab抗原結合部位は2本の鎖を含み、その1本の鎖はN末端からC
末端までVH-CH1を含み、もう1本の鎖はN末端からC末端までVL-CLを含み、
または、その1本の鎖はN末端からC末端までVH-CLを含み、もう1本の鎖はN末端
からC末端までVL-CH1を含む、

請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体分子。

10

【請求項6】

前記複合成分に含まれたscFvはN末端からC末端まで、VH-リンカー-VLまたは
VL-リンカー-CHを含む、

請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体分子。

【請求項7】

前記第1のFcドメインおよび第2のFcドメインは、IgG1、IgG2もしくはI
gG4免疫グロブリンに由来するFcドメイン、好ましくは、IgG1免疫グロブリンに
由来するFcドメイン、より好ましくは、ヒトIgG1免疫グロブリンに由来するFcド
メインである、

請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体分子。

20

【請求項8】

GPRC5Dに結合する抗原結合部位は、以下の群：

(a) 配列番号1～3のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号4～6のLCD
R1～3配列を含むVL、

(b) 配列番号7～8のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号10～12のL
CDR1～3配列を含むVL、

(c) 配列番号13～15のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号16～18
のLCDR1～3配列を含むVL、または

(d) 配列番号19～21のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号22～24
のLCDR1～3配列を含むVL、

30

から選択されるVHとVLを含み、

好ましくは、前記抗原結合部位は、以下の群：配列番号25／26、配列番号27／2
8、配列番号29／30および配列番号31／32から選択されるVHとVLアミノ酸配
列対を含み、

かつ好ましくは、前記抗原結合部位がdsScFvである場合、前記VHとVL配列に
導入されたシステイン置換、例えば、VH配列の44位とVL配列の100位でのシステ
イン置換をさらに含む、

請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体分子。

【請求項9】

CD3に結合する抗原結合部位は、以下の群：

40

(a) 配列番号41～43のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号44～46
のLCDR1～3配列を含むVL、または

(b) 配列番号47、42、43のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号44
～46のLCDR1～3配列を含むVL、

から選択されるVHとVLを含み、

好ましくは、前記抗原結合部位は、以下の群：配列番号48／49、配列番号50／4
9、かつより好ましくは配列番号48／49から選択されるVHとVLアミノ酸配列対を
含み、

かつ好ましくは、前記抗原結合部位がdsScFvである場合、前記VHとVL配列に
導入されたシステイン置換、例えば、VH配列の44位とVL配列の100位でのシステ

50

イン置換をさらに含む、

請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体分子。

【請求項 10】

BCMA に結合する抗原結合部位は、以下の VH と VL :

配列番号 33 ～ 35 の HCDR1 ～ 3 配列を含む VH および配列番号 36 ～ 38 の LCDR1 ～ 3 配列を含む VL を含み、

好ましくは、前記抗原結合部位は、配列番号 39 / 40 という VH と VL アミノ酸配列対を含み、

かつ好ましくは、前記抗原結合部位が ds sc Fv である場合、前記 VH と VL 配列に導入されたシステイン置換、例えば、VH 配列の 44 位と VL 配列の 100 位でのシステイン置換をさらに含む、

請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体分子。

【請求項 11】

前記抗体分子は、第 1 重鎖ポリペプチド鎖、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖、第 2 重鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなり、ここで、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン VH、免疫グロブリン CH1 ドメインおよび Fc ドメインを含み、

第 1 軽鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、軽鎖可変ドメイン VL、免疫グロブリン CL ドメインを含み、

第 2 重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン VH、免疫グロブリン CH1 ドメインおよび Fc ドメインを含み、

第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、軽鎖可変ドメイン VL、免疫グロブリン CL ドメインを含み、

かつ、ここで、第 1 重鎖ポリペプチド鎖または第 2 重鎖ポリペプチド鎖は、直接または好ましくは連結ペプチド（例えば（G4S）2 または TS（G4S）2）を介してその Fc ドメインの C 末端に複合された sc Fv ドメインをさらに含み、

ここで、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖の VH-CH1 と第 1 軽鎖ポリペプチド鎖の VL-CL がペアリングして第 1 抗原に結合する第 1 抗体アーム（M1）を形成し、

第 2 重鎖ポリペプチド鎖の VH-CH1 と第 2 軽鎖ポリペプチド鎖の VL-CL がペアリングして第 2 抗原に結合する第 2 抗体アーム（M1）を形成し、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖の Fc ドメインと第 2 重鎖ポリペプチド鎖の Fc ドメインがペアリングおよび二量体化されて抗体ステム（Fc::Fc）を形成し、かつ

第 1 重鎖ポリペプチド鎖または第 2 重鎖ポリペプチド鎖の C 末端に複合された sc Fv ドメインは、第 3 抗原に結合する複合成分（X2）を形成し、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原はそれぞれ異なり、互いに独立して GPRC5D、BCMA および CD3 から選択される、

請求項 3 に記載の抗体分子。

【請求項 12】

前記抗体分子は、第 1 重鎖ポリペプチド鎖、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖、第 2 重鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなり、ここで、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン VH、免疫グロブリン CH1 ドメインおよび Fc ドメインを含み、

第 1 軽鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、軽鎖可変ドメイン VL、免疫グロブリン CL ドメインを含み、

第 2 重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン VH、免疫グロブリン CH1 ドメインおよび Fc ドメインを含み、

第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、軽鎖可変ドメイン VL、免疫グロブリン CL ドメインを含み、

かつ、ここで、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は、直接または

10

20

30

40

50

好ましくは連結ペプチド（例えば（G 4 S）₂またはT S（G 4 S）₂）を介してそのCドメインのC末端に複合されたs c F vドメインをさらに含み、

ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖のV H－C H 1と第1軽鎖ポリペプチド鎖のV L－C Lがペアリングして第1抗原に結合する第1抗体アーム（M 1）を形成し、

第2重鎖ポリペプチド鎖のV H－C H 1と第2軽鎖ポリペプチド鎖のV L－C Lがペアリングして第2抗原に結合する第2抗体アーム（M 1）を形成し、

第1重鎖ポリペプチド鎖のF cドメインと第2重鎖ポリペプチド鎖のF cドメインがペアリングおよび二量体化されて抗体ステム（F c：：F c）を形成し、かつ

第1軽鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖のC末端に複合されたs c F vドメインは、第3抗原に結合する複合成分（X 1）を形成し、

ここで、第1、第2および第3抗原はそれぞれ異なり、互いに独立してG P R C 5 D、B C M AおよびC D 3から選択される、

請求項4に記載の抗体分子。

【請求項13】

（a）前記抗体分子の抗体アームM 1および抗体アームM 2は、G P R C 5 DおよびC D 3にそれぞれ結合され、かつ複合成分はB C M Aに結合される、あるいは

（b）前記抗体分子の抗体アームM 1および抗体アームM 2は、B C M AおよびC D 3にそれぞれ結合され、かつ複合成分はG P R C 5 Dに結合される、あるいは

（c）前記抗体分子の抗体アームM 1および抗体アームM 2は、G P R C 5 DおよびB C M Aにそれぞれ結合され、かつ複合成分はC D 3に結合される、

請求項11もしくは12に記載の抗体分子。

【請求項14】

第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなり、ここで、

（a）第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号65のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号66のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号67のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号68のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、あるいは

（b）第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号69のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号70のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号71のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号68のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、あるいは

（c）第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号72のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号73のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号74のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列

10

20

30

40

50

%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号95もしくは97のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項12に記載の抗体分子。

【請求項16】

GPRC5Dに特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、以下：

(i) それぞれ配列番号1～6に示される重鎖可変ドメインHCDR1、2および3の配列ならびに軽鎖可変ドメインLCDR1、2および3の配列、または

(ii) それぞれ配列番号7～12に示される重鎖可変ドメインHCDR1、2および3の配列ならびに軽鎖可変ドメインLCDR1、2および3の配列、または

(iii) それぞれ配列番号13～18に示される重鎖可変ドメインHCDR1、2および3の配列ならびに軽鎖可変ドメインLCDR1、2および3の配列、または

(iv) それぞれ配列番号19～24に示される重鎖可変ドメインHCDR1、2および3の配列ならびに軽鎖可変ドメインLCDR1、2および3の配列、または

(v) それぞれ配列番号13、110および15～18に示される重鎖可変ドメインHCDR1、2および3の配列ならびに軽鎖可変ドメインLCDR1、2および3の配列、から選択されるCDR配列の組み合わせを含む、

抗体またはその抗原結合断片。

【請求項17】

(a) 配列番号25に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号26に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(b) 配列番号27に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号28に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) 配列番号29に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号30に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(d) 配列番号31に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号32に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(e) 配列番号98に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号99に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(f) 配列番号100に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号101に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

から選択されるV HとV Lアミノ酸配列の組み合わせを含み、

場合により、前記V HとV L配列には、導入したシステイン置換、例えば、V H配列の44位およびV L配列の100位でのシステイン置換が含まれ、このようにして前記V HとV Lとの間にジスルフィド結合を形成する、

請求項16に記載の抗体。

【請求項18】

単一特異性、二重特異性または三重特異性抗体であり、好ましくは、前記抗体は、C D3に結合する抗原結合部位をさらに含み、または、B C M Aに結合する抗原結合部位およびC D3に結合する抗原結合部位をさらに含む、

請求項16もしくは17に記載の抗体。

10

【請求項19】

G P R C 5 DおよびC D3に結合する二重特異性抗体であり、

好ましくは、ここで、前記抗体は、C D3に結合する以下の群：

(a) 配列番号41～43のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号44～46のL C D R 1～3配列を含むV L、または

(b) 配列番号47、42、43のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号44～46のL C D R 1～3配列を含むV L、

から選択されるV HとV L対を含み、

好ましくは、以下の群：配列番号48／49および配列番号50／49から選択されるV HとV Lアミノ酸配列対を含み、

20

場合により、前記V HとV L配列には、導入したシステイン置換、例えば、V H配列の44位およびV L配列の100位でのシステイン置換が含まれ、このようにして前記V HとV Lとの間にジスルフィド結合を形成する、

請求項18に記載の抗体。

【請求項20】

請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体分子をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項21】

請求項20に記載のポリヌクレオチドを含み、好ましくは発現ベクターである、ベクター。

【請求項22】

請求項20に記載のポリヌクレオチドまたは請求項21に記載のベクターを含む、例えば、哺乳動物細胞である、宿主細胞。

30

【請求項23】

請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体分子を製造するための方法であって、

前記抗体を発現するのに適するポリペプチド鎖の条件で前記ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することと、前記ポリペプチド鎖を前記抗体分子に組み立てるのに適する条件でポリペプチド鎖を組み立てて前記抗体を生成することと、を含み、好ましくは、

前記方法は、前記抗体分子を発現するのに適する第1重鎖ポリペプチド鎖および第1軽鎖ポリペプチド鎖の条件で、前記第1重鎖および第1軽鎖をコードするものを含む宿主細胞を培養し、第1親タンパク質を生成するステップ(i)と、前記抗体分子を発現するのに適する第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖の条件で、前記第2重鎖および第2軽鎖をコードするものを含む宿主細胞を培養し、第2親タンパク質を生成するステップ(ii)と、第1親タンパク質と第2親タンパク質とを等モル比率で混合し、インビトロで適切な酸化還元条件に置いて組み立てて前記抗体ステップを形成するステップ(ii)と、を含む、方法。

40

【請求項24】

請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体分子と薬学的に許容可能なベクターとを含む、医薬組成物。

【請求項25】

50

請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の抗体分子、請求項 24 に記載の医薬組成物の、インビボおよび／またはインビトロでの以下の使用：

- －細胞の表面に G P R C 5 D 抗原を発現することを含む、10 n M 未満の K D などの高親和性で、G P R C 5 D 抗原に結合すること、
- －T 細胞（例えば、C D 4 + および／または C D 8 + T 細胞）を、その表面に G P R C 5 D を発現する細胞、特に G P R C 5 D 陽性腫瘍細胞を標的とすること、
- －T 細胞（例えば、C D 4 + および／または C D 8 + T 細胞）を、その表面に B C M A を発現する細胞、特に B C M A 陽性腫瘍細胞を標的とすること、
- －T 細胞の C D 3 下流シグナル伝達経路を活性化すること、
- －G P R C 5 D 陽性および／または B C M A 陽性の腫瘍細胞に対する T 細胞の殺傷効果を介在すること、
- －T 細胞が T N F - α 、I F N - γ 、および I L - 2 などのサイトカインを放出するように誘導すること、
- －G P R C 5 D 陽性および／または B C M A 陽性の腫瘍細胞を抑制または殺傷すること、または
- －B C M A 陽性患者集団、G P R C 5 D 陽性患者集団、または抗 B C M A 分子を投与した後の B C M A 喪失を伴う G P R C 5 D 陽性患者集団を治療するなど、G P R C 5 D 陽性および／または B C M A 陽性の多発性骨髄腫を治療すること。

10

【請求項 26】

前記抗体分子または医薬組成物は、個体において疾患を治療および／または予防するための薬物として使用され、あるいは疾患の診断ツールとして使用され、好ましくは、前記個体は哺乳動物、より好ましくはヒトである、請求項 25 に記載の使用。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、三重特異性抗原結合タンパク質に関し、より具体的には、G P R C 5 D と B C M A の 2 種類の腫瘍抗原と T 細胞表面抗原 C D 3 に特異的に結合する三重特異性抗体、およびそれを含む医薬組成物、調製方法ならびに使用に関する。

【背景技術】

【0002】

T 細胞二重特異性抗体 (B s A b) は、腫瘍の治療に使用されている。このような抗体は、細胞傷害性 T リンパ球と腫瘍細胞との間にシナプスを形成し、腫瘍細胞の破壊を誘導することができる。B s A b は通常、腫瘍関連抗原 (T A A) と T 細胞表面抗原 (T 細胞エンゲージ抗原、T E A と呼ばれる) に対する二重標的に関する。しかし、B s A b に基づいた治療計画は、典型的に、治療される腫瘍細胞における腫瘍関連抗原の分布に依存する。これは、患者集団に対する治療の選択性および治療の限界性につながっている。さらに、研究によると、単一の T A A 部位を標的とする治療形式は、腫瘍の回避機構により疾患の再発を引き起こすため、治療の有効性を制限する可能性があることも示されている。

30

【0003】

三重特異性および／または四重特異性抗体を開発して、免疫細胞を腫瘍部位に効率的に動員し、治療効果を改善するために提案されている。このため、近年、さまざまな多価、多重特異性抗体形式 (f o r m a t) が報告されている。しかし、治療の機能性および治療の行動に関するさまざまな治療製品の多様な要件により、大部分の異なる望ましい分子の組み合わせに適用できる「最適な形態」が存在しないことが決められている。したがって、多重特異性を達成する場合、異なる標的抗原の空間分布またはサイズ、および腫瘍細胞表面の腫瘍関連抗原の発現密度など、さまざまな要因を考慮する必要がある。多くの場合、特定の標的抗原を組み合わせる有効な抗体形式は、異なる抗体形式の機能性を産生および比較することによって、同定する必要がある。

40

【発明の概要】

50

【0004】

腫瘍におけるGPRC5DとBCMAの発現には相関がないため、本発明者らは、GPRC5DとBCMAを標的とする多重特異性抗体を組み合わせることで、GPRC5D陽性腫瘍患者とBCMA陽性腫瘍患者の両方をカバーすることができると同時に、単一抗原の喪失による再発を回避することができ、それにより患者のカバー率の増加および治療効果の改善の目的を達成する。

【0005】

この目的を達成するために、本発明者らは、GPRC5D／BCMA／CD3を標的とする三重特異性抗体を提案し、複数のGPRC5D×BCMA×CD3 formatを詳細に研究している。2種類のTAA抗原（GPRC5DおよびBCMA）とT細胞表面抗原（CD3）との間の組み合わせの方法および距離を調節し、T細胞活性化および殺傷効果を媒介する際のT細胞エンゲージャー（T cell engager）抗体の作用を調節することにより、本発明者らは、多標的の組み合わせをうまく達成し、複数の薬剤併用のニーズを減少させる。これに基づいて、FcセグメントによってKnob-in-Hole技術がさらに使用され、重鎖のミスマッチを減少させるとともに、細胞外酸化還元的手段によって軽鎖のミスマッチの問題が解決される。本発明の抗体は良好な調製可能性および良好な創薬可能性も有する。

【0006】

したがって、一態様において、本発明は、GPRC5D、BCMAおよびCD3に特異的に結合する抗原結合部位を含み、かつ2つの抗体アーム、抗体アームのC末端に位置するステム、および抗体アームおよび／またはステムのC末端に複合した複合成分を含む、前記の優位性を有する三重特異性Y型抗体分子を提供する。

【0007】

さらなる態様において、本発明は、HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3の順による配列番号1～6、7～12、13～18もしくは19～24から選択されるCDR配列の組み合わせを含む、GPRC5Dに特異的に結合する抗体分子を提供する。本発明の抗体分子は、高親和性でGPRC5Dに結合し、細胞におけるGPRC5D介在性シグナル伝達を遮断する。

【0008】

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体分子をコードする核酸、ベクターおよび宿主細胞、ならびに本発明の抗体分子の使用、特に、GPRC5D陽性および／またはBCMA陽性腫瘍、例えば多発性骨髄腫を治療する方法および使用も提供する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

以下の図面と合わせて読めば、次に詳細に記載される本発明の好ましい実施形態がより良く理解される。本発明を説明するために、図面には現在の好ましい実施形態が示されている。しかしながら、本発明は、図面に示される実施形態の精確な配置と手段に限定されないとして理解すべきである。

【図1A】Format__1、2、6および7により設計された三重特異性抗体分子の構造を模式的に示す。

【図1B】Format__1、2、6および7により設計された三重特異性抗体分子の構造を模式的に示す。

【図1C】Format__1、2、6および7により設計された三重特異性抗体分子の構造を模式的に示す。

【図1D】Format__1、2、6および7により設計された三重特異性抗体分子の構造を模式的に示す。

【図2A】実施例に使用される対照二重特異性抗体分子の構造を模式的に示す。

【図2B】実施例に使用される対照二重特異性抗体分子の構造を模式的に示す。

【図2C】実施例に使用される対照二重特異性抗体分子の構造を模式的に示す。

【図3A】Jurkat-NFAT-Lucレポートシステムによる例示的な抗体TS-

10

20

30

40

50

F 2 - 1 および - 2 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 3 B】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 1 および - 2 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 4 A】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 3 および T S - F 6 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 4 B】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 3 および T S - F 6 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 4 C】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 3 および T S - F 6 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 4 D】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 3 および T S - F 6 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。 10

【図 5 A】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 4 および 5 介在性 T 細胞活性化 (A - D) の検出、

【図 5 B】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 4 および 5 介在性 T 細胞活性化 (A - D) の検出、

【図 5 C】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 4 および 5 介在性 T 細胞活性化 (A - D) の検出、

【図 5 D】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 4 および 5 介在性 T 細胞活性化 (A - D) の検出、

【図 5 E】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 4 、 5 および 6 介在性 T 細胞活性化 (E - F) の検出を示す。 20

【図 5 F】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 2 - 4 、 5 および 6 介在性 T 細胞活性化 (E - F) の検出を示す。

【図 6 A】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 7 - 1 および 7 - 2 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 6 B】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 7 - 1 および 7 - 2 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 6 C】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 7 - 1 および 7 - 2 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 6 D】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 7 - 1 および 7 - 2 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。 30

【図 7】 Jurkat - NFAT - Luc レポートシステムによる例示的な抗体 T S - F 7 - 3 および 7 - 4 介在性 T 細胞活性化の検出を示す。

【図 8】 例示的な抗体介在性 P B M C における C D 4 + T 細胞の活性化を示す。

【図 9】 例示的な抗体介在性 P B M C における C D 8 + T 細胞の活性化 (B) を示す。

【図 1 0】 H 9 2 9 細胞に対する例示的な抗体介在性 P B M C の殺傷効果を示す。

【図 1 1 A】 N C l - H 9 2 9 細胞の殺傷プロセスに伴う例示的な抗体誘導性 P B M C のサイトカインの放出量を示す。

【図 1 1 B】 N C l - H 9 2 9 細胞の殺傷プロセスに伴う例示的な抗体誘導性 P B M C のサイトカインの放出量を示す。 40

【図 1 1 C】 N C l - H 9 2 9 細胞の殺傷プロセスに伴う例示的な抗体誘導性 P B M C のサイトカインの放出量を示す。

【図 1 1 D】 N C l - H 9 2 9 細胞の殺傷プロセスに伴う例示的な抗体誘導性 P B M C のサイトカインの放出量を示す。

【図 1 2】 H 9 2 9 担腫瘍ヒト化マウスモデルにおける例示的な抗体の腫瘍抑制作用を示す。

【図 1 3】 異なる多発性骨髄腫細胞表面における G P R C 5 D と B C M A の発現レベルを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

特に断らない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明の当業者が理解している通常の意味を有する。本明細書に言及される全ての刊行物、特許出願、特許または他の参照文献は引用によりその全体が組み込まれる。また、本明細書に記載の材料、方法および例は、説明用のものであり、制限することが意図されない。本発明の他の特徴、目的および利点は、本明細書と図面、添付された特許請求の範囲から明らかになる。

【0011】

1. 定義

用語「約」は、数字または数値とともに使用される場合、下限として指定された数字または数値より5%小さく、上限として指定された数字または数値より5%大きい範囲内の数字または数値をカバーすることを意味する。

10

【0012】

本明細書に使用されるように、用語「包含する」または「含む」は、記載される要素、整数またはステップを含むが、任意の他の要素、整数またはステップを排除しないことを意味する。

【0013】

用語「抗体」は、本明細書において最も広い意味で使用されており、抗原結合部位を含むタンパク質を意味し、さまざまな構造の天然抗体および人工抗体を含み、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、一本鎖抗体、完全な抗体および抗体断片を含むが、これらに限定されない。

20

【0014】

用語「全抗体」、「全長抗体」、「完全な抗体」および「無傷抗体」は、ジスルフィド結合を介して互いに接続された少なくとも2本の重鎖（H）と2本の軽鎖（L）とを含む天然に存在する糖タンパク質を指す。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではVHと略す）と重鎖定常領域とからなる。重鎖定常領域は、CH1、CH2およびCH3の3つのドメインからなる。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLと略す）と軽鎖定常領域とからなる。軽鎖定常領域は、1つのドメインCLからなる。VH領域およびVL領域は、さらに、その間に保存的な領域（フレームワーク領域（FR））が介在している超可変領域（相補性決定領域（CDR））に分けることができる。それぞれのVHとVLは、3つのCDRと4つのFRとからなり、アミノ末端からカルボキシル末端まで、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に配列されている。定常領域は、抗体と抗原の結合に直接関与しないが、種々のエフェクター機能を示している。

30

【0015】

用語「抗原結合断片」は、無傷抗体または完全な抗体のアミノ酸残基の数よりも少ない無傷抗体または完全な抗体の一部または1つの断片であり、抗原に結合しまたは完全な抗体（すなわち、抗原結合断片が由来する無傷抗体）と競争的に抗原と結合できる。抗原結合断片は、組換えDNA技術、または酵素もしくは化学的手段により無傷抗体を切断することによって調製することができる。抗原結合断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、単鎖Fv、ダイアボディー（diabody）、単ドメイン抗体（sdAb）を含むが、これらに限定されない。前記Fab断片は、VL、VH、CLおよびCH1ドメインとからなる一価の断片であり、例えば、Fab断片はパパインで完全抗体を消化することによって得られる。また、ペプシンを用いてヒンジ領域のジスルフィド結合の下方で完全抗体を消化して産生されたF(ab')₂は、Fab'の二量体であり、二価の抗体断片である。F(ab')₂は、中性条件でヒンジ領域におけるジスルフィド結合を破壊することによって還元でき、これによってF(ab')₂二量体はFab'単量体に変換される。Fab'単量体は、基本的にはヒンジ領域を有するFab断片である（他の抗体断片に関する詳細な説明は、基礎免疫学（Fundamental Immunology）、W. E. Paul編集、Raven Press, N. Y.（1993）が参照される）。前記Fv断片は、抗体のシングルアームVLおよびVHドメインからなる。また、

40

50

Fv断片の2つのドメインVLおよびVHは独立した遺伝子によってコードされるものの、組換え法により、この2つのドメインを1本のタンパク質鎖として産生できる合成接続ペプチドによってこれらを接続することができ、前記1本のタンパク質鎖においてVL領域とVH領域がペアリングして単鎖Fvを形成する。前記抗体断片は化学的方法、DNA組換え法またはタンパク質酵素消化法により得られる。

【0016】

本明細書で使用される用語「抗原結合部位」および「抗原結合ドメイン」は、互換的に使用可能であり、実際に抗原に結合する抗体分子の領域を表す。好ましくは、本発明に使用される抗体分子の抗原結合部位は、抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体重鎖可変ドメイン(VH)からなるVH/VL対を含み、前記VH/VL対は、単一のポリペプチド鎖に含まれてもよく、単離した2本のポリペプチド鎖に含まれてもよい。好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、GPCR5Dに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位、BCMAに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位、およびCD3に特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位を含む。一実施形態において、本発明の抗体は、三価三重特異性抗体、4価三重特異性抗体、または6価三重特異性抗体である。

【0017】

本明細書で使用される用語「単一特異性」抗体は、1つまたは複数の結合部位を有する抗体を指し、前記部位のそれぞれは、同じ抗原の同じエピトープと結合する。本明細書で使用される用語「多重特異性」抗体は、少なくとも2つの抗原結合部位を有する抗体を指し、前記少なくとも2つの抗原結合部位の各抗原結合部位は、同じ抗原の異なるエピトープまたは異なる抗原の異なるエピトープと結合する。本明細書により提供される抗体は、GPCR5D、BCMAおよびCD3に対する三重特異性抗体である。

【0018】

用語「免疫グロブリン分子」は、天然に存在する抗体の構造を有するタンパク質を指す。例えば、IgGクラスの免疫グロブリンは、ジスルフィド結合した2本の軽鎖および2本の重鎖からなる約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各本の免疫グロブリン重鎖は、重鎖可変ドメインとも呼ばれる1つの重鎖可変領域(VH)を有し、それに続くのは3つの重鎖定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3)である。同様に、N末端からC末端まで、各本の免疫グロブリン軽鎖は、軽鎖可変ドメインとも呼ばれる1つの軽鎖可変領域(VL)を有し、それに続くのは1つの軽鎖定常ドメイン(CL)である。免疫グロブリンの重鎖は、α(IgA)、δ(IgD)、ε(IgE)、γ(IgG)またはμ(IgM)と呼ばれる5つのクラスのいずれかに分類することができ、ここで、一部のクラスは、例えばγ1(IgG1)、γ2(IgG2)、γ3(IgG3)、γ4(IgG4)、α1(IgA1)およびα2(IgA2)というサブクラスにさらに分けることができる。免疫グロブリンの軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列によって、κおよびλと呼ばれる2つのタイプのいずれかに分類できる。IgG免疫グロブリンは基本的に、免疫グロブリンヒンジ領域を介して接続された2つのFab分子および2つの二量体化のFc領域で構成される。

【0019】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体と抗原の結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖と軽鎖の可変ドメインは、通常、類似の構造を有し、ここで、各ドメインは、4つの保存的なフレームワーク領域(FR)と3つの相補性決定領域とを含む。一部の状況において、単独のVHまたはVLドメインは抗原結合特異性を十分に与えることができる。

【0020】

「相補性決定領域」または「CDR領域」または「CDR」または「超可変領域」は、抗体可変ドメインにおける、配列において超可変であるとともに構造上に形成されて決定されたループ(「超可変ループ」)であり、および/または抗原接触残基(「抗原接触点」)を含む領域である。CDRは、主に抗原エピトープに結合する役割を果たす。重鎖お

10

20

30

40

50

よび軽鎖のCDRは、N末端から順に番号付けられ、通常CDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれる。抗体の重鎖可変ドメイン内に位置するCDRはHCDR1、HCDR2およびHCDR3とも呼ばれ、抗体の軽鎖可変ドメイン内に位置するCDRはLCDR1、LCDR2およびLCDR3と呼ばれる。1つの所定の軽鎖可変領域または重鎖可変領域のアミノ酸配列において、抗体の3次元構造およびCDRループのトポロジーに基づくChothia、抗体配列の可変性に基づくKabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th edition, U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987))、AbM (University of Bath)、Contact (University College London)、国際ImmunoGenetics database (IMGT) (国際免疫遺伝学情報システム、ワールドワイドウェブines.fr/)、および大量の結晶構造が利用されるアフィニティ伝播クラスタリング (affinity propagation clustering) に基づくNorth CDR定義 (North et al., 「A New Clustering of Antibody CDR Loop Conformations」, Journal of Molecular Biology, 406, 228~256 (2011)) など、当該分野で公知のさまざまな方案によってそのCDR配列を決定することができる。

10

20

【0021】

例えば、KabatおよびChothiaによって番号付けられるCDR領域の異なる定義範囲を使用する。

30

40

50

【表 1】

CDR	K a b a t 方案	A b M方 案	C h o t h i a 方案	C o n t a c t 方案	I M G T 案
L C D R 1 (K a b a t と C h o t h i a 番 号付けシステム)	L 2 4 - L 3 4	L 2 4 - L 3 4	L 2 6 - L 3 2	L 3 0 - L 3 6	L 2 7 - L 3 2
L C D R 2 (K a b a t と C h o t h i a 番 号付けシステム)	L 5 0 - L 5 6	L 5 0 - L 5 6	L 5 0 - L 5 2	L 4 6 - L 5 5	L 5 0 - L 5 2
L C D R 3 (K a b a t と C h o t h i a 番 号付けシステム)	L 8 9 - L 9 7	L 8 9 - L 9 7	L 9 1 - L 9 6	L 8 9 - L 9 6	L 8 9 - L 9 6
H C D R 1 (K a b a t 番号付けシステム)	H 3 1 - H 3 5 B	H 2 6 - H 3 5 B	H 2 6 - H 3 2	H 3 0 - H 3 5 B	H 2 6 - H 3 5 B
H C D R 1 (C h o t h i a 番号付けシステ ム)	H 3 1 - H 3 5	H 2 6 - H 3 5	H 2 6 - H 3 2	H 3 0 - H 3 5	H 2 6 - H 3 5
H C D R 2 (K a b a t と C h o t h i a 番 号付けシステム)	H 5 0 - H 6 5	H 5 0 - H 5 8	H 5 3 - H 5 5	H 4 7 - H 5 8	H 5 1 - H 5 7
H C D R 3 (K a b a t と C h o t h i a 番 号付けシステム)	H 9 5 - H 1 0 2	H 9 5 - H 1 0 2	H 9 6 - H 1 0 1	H 9 3 - H 1 0 1	H 9 3 - H 1 0 2

【0022】

特に断りのない限り、本発明において、用語「CDR」または「CDR配列」は、前記いずれか1つの方法で決定されるCDR配列を含む。

【0023】

CDRは、参照CDR配列と同じK a b a t 番号付け位置を有することに基づいて決定することもできる。特に断りのない限り、本発明において、抗体可変領域における残基位置（重鎖可変領域残基と軽鎖可変領域残基を含む）に言及する場合、K a b a t 番号付けシステム（K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5th E d . P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M d . (1 9 9 1) ）に基づく番号付け位置を指す。

【0024】

用語「Fcドメイン」または「Fc領域」は、本明細書において、少なくとも一部の定

常領域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するように使用される。当該用語は、天然配列Fc領域および変異体Fc領域を含む。天然の免疫グロブリン「Fcドメイン」は、2つまたは3つの定常ドメイン、すなわちCH2ドメイン、CH3ドメインおよび選択可能なCH4ドメインを含む。例えば、天然抗体において、免疫グロブリンFcドメインは、IgG、IgAおよびIgD類抗体の2本の重鎖に由来する第2および第3定常ドメイン（CH2ドメインおよびCH3ドメイン）を含み、またはIgMおよびIgE類抗体の2本の重鎖に由来する第2、第3および第4定常ドメイン（CH2ドメイン、CH3ドメインおよびCH4ドメイン）を含む。本明細書において、特に断らない限り、Fc領域または重鎖定常領域におけるアミノ酸残基の番号は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載のEU番号付けシステム（EUインデックスとも呼ばれる）に基づいて番号が付けられる。

10

【0025】

用語「エフェクター機能」は、免疫グロブリンアイソタイプによって変化する免疫グロブリンFc領域に直結する生物学的活性を指す。免疫グロブリンのエフェクター機能の例は、C1q結合および補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合作用、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞貪食作用（ADCP）、サイトカイン分泌、免疫複合体介在性抗原提示細胞による抗原の取り込み、細胞表面受容体（例えばB細胞受容体）のダウンレギュレートおよびB細胞活性化を含む。

20

【0026】

用語「キメラ抗体」は、（a）定常領域またはその一部を変化、置換または交換することによって、抗原結合部位が異なるまたは変化したタイプ、エフェクター機能および／または生物種の定常領域またはキメラ抗体に新しい性能を付与する完全に異なる分子（例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、医薬品）などに接続され、または（b）可変領域またはその一部を、異なるまたは変化した抗原特異性を有する可変領域によって変化、置換または交換させた抗体分子を指す。例えば、マウス抗体は、その定常領域をヒト免疫グロブリンに由来する定常領域に変更することによって修飾できる。ヒト定常領域に変更したため、当該キメラ抗体は、抗原認識についてのその特異性を保持するとともに、元のマウス抗体と比べて、ヒトにおいて低下した抗原性を有する。

30

【0027】

「ヒト化抗体」は、非ヒト抗体（例えばマウスモノクローナル抗体）の抗原特異性反応性を保留するとともに、治療剤としてヒトに投与する場合に免疫原性が低い抗体である。これは、例えば、非ヒト抗原結合部位を保留するとともに、抗体の残りの部分をこれらに対応するヒト由来の部分（すなわち、定常領域および可変領域における結合に関与しない部分はヒト抗体の対応する部分である）に変更することによって実現できる。例えばPaldan, Anatomy of the antibody molecule, Mol. Immun., 1994, 31: 169~217が参照される。ヒト抗体工学技術の他の例は、US 5,766,886に開示されているXoma技術を含むが、これに限定されない。

40

【0028】

本明細書に使用されるように、用語「結合」または「特異的に結合」は、結合作用が抗原に対して選択的であり、かつ好ましくないまたは非特異的な相互作用と区別できることを意味する。特定の抗原に対する抗原結合部位の結合能力は、酵素結合免疫吸着測定（ELISA）または本分野で公知の通常の結合測定法により測定できる。

【0029】

「親和性」または「結合親和性」は、結合対のメンバー同士の相互作用を反映する固有結合の親和性を指す。分子XのパートナーYに対する親和性は通常、解離速度定数と結合速度定数（それぞれ k_{dis} と k_{on} ）の比である解離定数（KD）で表すことができ

50

る。親和性は、本分野で公知の通常の方法により測定できる。親和性を測定するための具体的な方法の1つは、本明細書に記載の F o r t e B i o 動力学的結合測定法である。

【0030】

アミノ酸配列の「同一性百分率(%)」とは、候補配列と本明細書に示される具体的なアミノ酸配列を比較し、かつ必要に応じて最大の配列同一性百分率を実現するためにギャップを導入し、いずれの保存的置換も配列同一性の一部と考慮されない場合、本明細書に示される具体的なアミノ酸配列のアミノ酸残基と一致するアミノ酸残基の候補配列における百分率を指す。いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の抗体分子の変異体を考慮しており、前記変異体は、本明細書に具体的に開示された抗体分子およびその配列に対して相当な程度の同一性、例えば少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有する。前記変異体は、保存的修飾を含んでもよい。

10

ポリペプチド配列の場合、「保存的修飾」は、ポリペプチド配列に対する置換、欠失または添加を含み、それによって特定のアミノ酸は化学的に類似するアミノ酸に置換される。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、この分野でよく知られているものである。このような保存的に修飾された変異体は、本発明の多型変異体、種間ホモログおよび対立遺伝子に対しては、付加的なものであり、それらが排除されない。以下は、互いに保存的置換となる8組のアミノ酸である。1) アラニン(A)、グリシン(G)、2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、4) アルギニン(R)、リジン(K)、5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)、6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、7) セリン(S)、トレオニン(T)、および8) システイン(C)、メチオニン(M) (例えば、C r e i g h t o n , P r o t e i n s (1 9 8 4) を参照)。いくつかの実施形態において、用語「保存的配列修飾」は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特徴に明らかな影響がないまたは結合特徴を変えないアミノ酸修飾を指す。

20

【0031】

用語「宿主細胞」は、既に外因性ポリヌクレオチドが導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞は、「形質転換体」および「形質転換された細胞」を含み、「形質転換体」と「形質転換された細胞」は、初代より形質転換された細胞およびこれらより誘導された子孫を含む。宿主細胞は、本発明の抗体分子を産生するために用いられる任意のタイプの細胞株であってもよく、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞などの真核細胞と、大腸菌細胞などの原核細胞とを含む。宿主細胞は、培養された細胞を含み、遺伝子組換え動物、遺伝子組換え植物または培養された植物組織もしくは動物組織の内部の細胞を含む。

30

【0032】

用語「発現ベクター」は、組換えポリヌクレオチドを含むベクターを指し、発現されるヌクレオチド配列に有効に接続された発現制御配列を含む。発現ベクターは、発現するのに十分なシス作用エレメントを含み、発現用の別のエレメントは、宿主細胞により提供されるか、またはインビトロ発現系にあるものであってもよい。発現ベクターは、本分野で公知の全てのものを含み、これらは、組換えポリヌクレオチドが組み込まれたコスミド、プラスミド (例えば、ヌードなるものまたはリボソームに含まれるもの)、ウイルス (例えば、レンチウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス) を含む。

40

【0033】

哺乳動物は、家畜 (例えば、乳牛、綿羊、ネコ、イヌおよびウマ)、霊長類 (例えば、ヒト、およびサルなどの非ヒト霊長類)、ウサギおよびげっ歯類 (例えば、マウスとラット) を含むが、これらに限定されない。特に、対象はヒトを指す。

【0034】

用語「治療」は、治療を受けている対象における疾患の自然的過程を変えるための臨床的介入を指す。所望の治療効果は、疾病の発生または再発の防止、症状の軽減、疾病の如

50

何なる直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の防止、病状進展速度の低減、疾病の状態の改善または緩和、および予後の緩和または改善を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子は、疾患の発展または疾患の進行を遅延させるために用いられる。

【0035】

用語「腫瘍」および「癌」は、本明細書において交換して使用され、固形腫瘍と液性腫瘍を含む。

【0036】

用語「GPCR5D」は、腫瘍関連抗原Gタンパク質共役受容体ファミリーCグループ5メンバーD（例えば、受託番号UniProt Q9NZD1のヒトGPCR5Dタンパク質）を指す。本明細書において、「GPCR5Dに対する抗原結合特異性」とは、GPCR5Dに特異的に結合する抗体または抗体断片、例えばscFvまたはFabを指す。一実施形態において、フローサイトメトリーにより検出されるように、GPCR5Dに結合する本発明の抗体分子の抗原結合部位は、GPCR5Dを発現する細胞に対して高親和性結合活性、例えば、1nM~100nM、例えば20nM~60nMのEC50値を有してもよい。一実施形態において、前記抗原結合特異性は、ヒトおよびサルGPCR5Dに対して交差反応性を有する。

10

【0037】

用語「BCMA」は、BCMA、TR17__ヒト、TNFRSF17とも呼ばれる腫瘍関連抗原B細胞成熟抗原（例えば、受託番号UniProt Q02223のヒトBCMAタンパク質）を指す。本明細書において、「BCMAに対する抗原結合特異性」とは、BCMAに特異的に結合する抗体または抗体断片、例えばscFvまたはFabを指す。一実施形態において、バイオフィルム層光干渉技術により検出されるように、BCMAに結合する本発明の抗体分子の抗原結合部位は、BCMAに対して高親和性結合活性、例えば、0.1nM~10nM、例えば0.1nM~5nMのKD値を有してもよい。一実施形態において、前記抗原結合特異性は、ヒトおよびサルBCMAに対して交差反応性を有する。

20

【0038】

用語「CD3」は、T細胞エンゲージ抗原T細胞表面の糖タンパク質CD3（例えば、受託番号UniProt P07766のヒトCD3タンパク質）を指す。本明細書において、「CD3に対する抗原結合特異性」とは、CD3に特異的に結合する抗体または抗体断片、例えばscFvまたはFabを指す。一実施形態において、バイオフィルム層光干渉技術により検出されるように、CD3に結合する本発明の抗体分子の抗原結合部位は、CD3 epsilon鎖に対して高親和性結合活性、例えば、1nM~50nM、例えば0.1nM~5nMのKD値を有してもよい。好ましくは、本発明の三重特異性抗体分子において、50nM未満のKD値を有する高親和性CD3抗原結合部位を使用する。一実施形態において、前記抗原結合特異性は、ヒトおよびサルCD3に対して交差反応性を有する。

30

【0039】

本発明の抗体構造を説明する場合、用語「N末端」は、N末端の最後のアミノ酸を指し、用語「C末端」は、C末端の最後のアミノ酸を指す。

40

【0040】

「knob-in-hole」変異または「ノブインホール」変異は、本明細書において、「ノブインホール」技術により、第1のFcポリペプチドおよび第2のFcポリペプチドに変異をそれぞれ導入して、第1のFcポリペプチドのインターフェースおよび第2のFcポリペプチドのインターフェースに突起（「ノブ（knob）」）および相補な空洞（「ホール（hole）」）を形成することを意味する。当該分野で知られているように、「ノブインホール」技術は、抗体分子の異なる鎖同士の間インターフェースを改変させることによって、抗体分子の各本の鎖の正確な結合を促進することができる。一般に、当該技術は突起が空洞に配置できるように、一方の鎖のインターフェースに「突起」を

50

導入し、それとペアリングする他方の鎖のインターフェースに対応する「空洞」を導入することに関する。1つの好ましいインターフェースは、一方の鎖の重鎖定常ドメインのCH3ドメインおよびそれとペアリングする他方の鎖の重鎖定常ドメインのCH3ドメインを含む。一方の鎖に由来する重鎖定常ドメインのCH3ドメインのインターフェースの小さなアミノ酸側鎖を比較的大きな側鎖（例えばチロシンまたはトリプトファン）に置き換えることで突起を構築することができる。大きなアミノ酸側鎖を比較的小さな側鎖（例えばアラニンまたはトレオニン）に置き換えることによって、ペアリングされる他方の鎖の重鎖定常ドメインのCH3ドメインのインターフェースで、大きさが突起と同じまたは類似する補償用空洞が構築される。もう1つの選択可能なインターフェースは、前記Fab断片のように軽鎖のCLドメインと重鎖のCH1ドメインとを含み、突起-空洞の相互作用を構築することによってFab断片の2本の鎖同士の間には正確なヘテロ二量体化が行われるように促進する。

10

【0041】

「一本鎖可変断片」または「scFv」は、本明細書において、リンカーによって連結された重鎖可変ドメインVHおよび軽鎖可変ドメインVLを含む一本鎖抗体断片を指すために使用され、ここで、VHとVLがペアリングして抗原結合部位を形成する。「ジスルフィド結合安定化一本鎖可変断片」または「dsScFv」は、本明細書において、ジスルフィド結合により安定化された一本鎖可変断片を指すために使用され、ここで、システム変異をVHドメインおよびVLドメインに人為的に導入することによって、前記scFv断片は、VHとVLドメインとの間にジスルフィド結合連結を形成する。

20

【0042】

「Fv断片」は、本明細書において、重鎖可変ドメインVHおよび軽鎖可変ドメインVLを含む抗体断片を指すために使用される。「ジスルフィド結合安定化可変断片」または「dsFv」は、本明細書において、VHとVLドメインの間に人為的に導入したジスルフィド結合によって安定化されたFv断片を指すために使用される。

【0043】

「単一ドメイン抗体」または「sdAb」は、本明細書において、単一の可変抗体ドメイン、例えばVHまたはVLからなる抗体断片を指すために使用され、例えばラクダ科重鎖抗体に由来する重鎖可変ドメイン、魚類IgNARに由来するVH様単一ドメイン（v-NAR）である。単一ドメイン抗体の単一可変ドメインは、標的抗原を認識するために別の可変ドメインと相互作用する必要がない。単一ドメイン抗体の例は、ラクダ科（ラマおよびラクダ）および軟骨魚類（例えばコモリザメ）に由来する単一ドメイン抗体を含む。

30

【0044】

「Fab断片」または「Fab」は、本明細書において、2本のポリペプチド鎖からなる、免疫グロブリンの重鎖可変ドメインVH、重鎖定常ドメインCH1、軽鎖可変ドメインVLおよび軽鎖定常ドメインCLを含む免疫グロブリン断片を指すために使用され、ここで、一方のポリペプチド鎖は、N末端からC末端まで、VHと、CH1およびCLから選択される一方の定常領域とを含み、他方のポリペプチド鎖は、N末端からC末端まで、VLと、CLおよびCH1から選択される他方の定常領域とを含み、ここで、前記VHドメインとVLドメインがペアリングして抗原結合部位を形成する。本明細書において、Fabの一方のポリペプチド鎖には、CLに連結されるVHが含まれるとともに、他方のポリペプチド鎖には、CH1に連結されるVLが含まれる場合、当該Fabは、cross Fabとも呼ばれる。

40

【0045】

本明細書において、「一本鎖Fab」または「scFab」は、Fab断片の2本の鎖をリンカーによって連結して形成する一本鎖ポリペプチドを指すために使用される。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明の抗体は、(i) VH-CH1を含む一本の鎖およびVL-CLを含む一本の鎖からなるFab、ならびに(ii) VH-CLを

50

含む一本の鎖および V L - C H 1 を含む一本の鎖からなる c r o s s F a b から選択される F a b 断片を含んでもよい。本発明の別のいくつかの実施形態において、本発明の抗体は、(i) V H - C H 1 - リンカー - V L - C L を含む一本鎖 F a b 、ならびに (i i) V H - C L - リンカー - V L - C H 1 を含む一本鎖 F a b から選択される一本鎖 F a b 断片を含んでもよい。

【 0 0 4 7 】

本明細書において、免疫グロブリン定常ドメインは、抗体分子の予期される機能に基づいて選択することができる。例えば、定常ドメインは、I g A 、I g D 、I g E 、I g G もしくはI g M ドメイン、特にヒトI g G 1 、I g G 2 、I g G 3 もしくはI g G 4 の定常ドメインなどのヒトI g G の免疫グロブリン定常ドメインであってもよく、好ましくはヒトI g G 1 の定常ドメインである。一例として、抗体のF a b 断片は、I g G 1 に由来するC H およびC L 定常ドメインを含んでもよい。さらなる例として、抗体のF c 領域は、I g G 1 に由来するC H 2 およびC H 3 ドメインを含んでもよい。

【 0 0 4 8 】

本明細書において、用語「フレキシブル連結ペプチド」、「連結ペプチド」または「リンカー」は、アミノ酸からなる短いアミノ酸配列、例えば単独でまたは組み合わせて使用するグリシン (G) および／またはセリン (S) および／またはスレオニン残基 (T) 、あるいは免疫グロブリンに由来するヒンジ領域を指す。一実施形態において、連結ペプチドは、5 個～5 0 個のアミノ酸長さ、例えば、1 0 、1 5 、2 0 、2 5 もしくは3 0 個のアミノ酸長さを有する。一実施形態において、連結ペプチドはアミノ酸配列 (G 4 S) n を含み、ここで、n は1 以上の整数であり、例えば、n は2 、3 、4 、5 、6 もしくは7 の整数である。一実施形態において、連結ペプチドはアミノ酸配列 T S (G 4 S) n を含み、ここで、n は1 以上の整数であり、例えば、n は2 、3 、4 、5 、6 もしくは7 の整数である。さらなる実施形態において、連結ペプチドは、免疫グロブリンに由来するヒンジ領域であり、例えば、「C P P C 」を含むヒンジ領域のアミノ酸配列であり、例えば、アミノ酸配列「E P K S C D K T H T C P P C P 」 (配列番号1 1 4) または「E P K S S D K T H T C P P C P 」 (配列番号1 1 5) である。本発明に適用できる抗体分子の各ドメインを連結する連結ペプチドは、例えば、G G G (配列番号1 1 6) 、D G G G S (配列番号1 1 7) 、T G E K P (配列番号1 1 8) 、G G R R (配列番号1 1 9) 、E G K S S G S G S E S K V D (配列番号1 2 0) 、K E S G S V S S E Q L A Q F R S L D (配列番号1 2 1) 、G G R R G G G S (配列番号1 2 2) 、L R Q R D G E R P (配列番号1 2 3) 、L R Q K D G G G S E R P (配列番号1 2 4) およびG S T S G S G K P G S G E G S T K G (配列番号1 2 5) であってもよいが、これらに限定されない。あるいは、コンピュータプログラムを使用してタンパク質およびペプチドの三次元構造を模擬するか、またはファージディスプレイ法によって適切なフレキシブル連結ペプチドを合理的に設計することができる。

【 0 0 4 9 】

1. 本発明の三重特異性抗体分子

本発明の三重特異性抗体分子はY 型抗体分子である。本明細書において、用語「Y 型抗体分子」は、2 つの抗体アームおよび1 つのステム部を含むY 型構造の抗体分子を指し、ここで、2 つの抗体アームはY 型構造の2 つの分岐が形成され、かつ2 つの抗体F c ドメインによりペアリングされて形成されたY 型構造のステム部にそれぞれ連結される。1 つの典型的なY 型抗体分子は免疫グロブリンI g G 分子である。免疫グロブリンI g G 分子のY 型構造は、2 つの抗体アーム (F a b) および1 つのステム部 (F c) という3 つの領域で構成され、ここで、フレキシブルなヒンジ領域 (H i n g e) は抗体のステム部 (F c) と抗体アーム (F a b) を連結する。I g G 分子において、2 つのアームは抗原の特異的結合に使用されるが、ステム部は抗体の種類および機能特性を決定する。本明細書において、Y 型抗体分子は、I g G 分子と同じまたは類似するY 型構造を有する分子、例えば抗体の抗体アームおよび／またはステムに複合成分を有するY 型分子もカバーする。好ましくは、本発明の抗体分子は複合成分を有する三重特異性抗体分子である。

【0050】

本発明のY型抗体分子において、抗体アームは、F a b、s c F v、s d A Bなどの抗原結合ドメインで構成することができ、かつ2つの抗体アームを構成する抗原結合ドメインは、相同または相異の抗原および／またはエピトープを標的し、相同または相異の結合特異性を有することができる。本発明のY型抗体分子において、抗体分子のステムは、ペアリングした2つの免疫グロブリンF cドメインで構成することができ、ここで、前記F cドメインは、それぞれ独立して変異を含んでもよく、含まなくてもよい。抗体分子が非対称I g G様分子である場合、好ましくは、ステム部の2つのF cドメインは、そのペアリングおよび二量体化を促進する変異、例えば、相補的な「ノブインホール」変異を含む。さらに、ステム部のF cドメインは、他の変異、例えばシステイン変異（第1のF cと第2のF cとの間でのジスルフィド結合連結の形成を促進する）、電荷ペアリング変異、および／またはエフェクター機能が低減または排除された変異（例えば、A D C C活性が低減または排除された変異、例えばL 2 3 4 A／L 2 3 5 A変異の組み合わせ）を含んでもよい。本発明のY型抗体分子の2つの抗体アームは、ステムのそれぞれのF cドメインに直接または連結ペプチドを介してそれぞれ共有結合されてもよく、好ましくは、アームは免疫グロブリンのヒンジ領域を介してステムのF cドメインに連結される。

10

【0051】

アームおよびステムに加えて、本発明のY型抗体分子は、好ましくは、アームおよび／またはステムに複合した複合成分をさらに含み、前記複合成分は、F a b、s c F vおよびs d A Bなどの追加する抗原結合ドメイン、好ましくはs c F vを含む。複合成分における抗原結合ドメインは、抗体アームと異なる抗原結合特異性を付与することができる。例えば、Y型分子の2つの抗体アームは、第1と第2抗原結合特異性をそれぞれ提供する抗原結合ドメインを含んでもよく、Y型分子の複合成分は、第3抗原結合特異性を提供する抗原結合ドメインを含み、かつ第1、第2および第3抗原結合特異性はそれぞれ異なる。あるいは、Y型分子の2つの抗体アームは、第1抗原結合特異性を提供する抗原結合ドメインを含んでもよく、Y型分子の複合成分は、第2と第3抗原結合特異性を提供する抗原結合ドメインを含み、かつ第1、第2および第3抗原結合特異性はそれぞれ異なる。

20

【0052】

本発明のY型抗体分子において、第1、第2および第3抗原結合特異性は、それぞれC D 3、B C M AおよびG P R C 5 Dから選択される異なる抗原に対する結合特異性である。例えば、第1と第2抗原結合特異性は、それぞれG P R C 5 DとB C M Aから選択される異なる腫瘍関連抗原（T A A）に対するものであってもよく、第3抗原結合特異性は、T細胞表面抗原（T E A）C D 3に対するものであってもよい。あるいは、第1（または第2）と第3抗原結合特異性は、それぞれG P R C 5 DとB C M Aから選択される異なる腫瘍関連抗原（T A A）に対するものであってもよく、第2（または第1）抗原結合特異性は、T細胞表面抗原（T E A）に対するものであってもよい。

30

【0053】

アーム、ステムおよび複合成分の構造によって、本発明のY型抗体分子は、少なくとも2本のポリペプチド鎖、例えば2本もしくは4本のポリペプチド鎖を含んでもよい。本明細書において、ステムF cドメインを含むポリペプチド鎖は重鎖と呼ばれ、それに対してF cドメインを含まないポリペプチド鎖は軽鎖と呼ばれる。したがって、いくつかの実施形態において、本発明のY型分子は第1重鎖ポリペプチド鎖と第2重鎖ポリペプチド鎖を含む二本鎖分子であり、他のいくつかの実施形態において、本発明のY型分子は2本の重鎖ポリペプチド鎖と2本の軽鎖ポリペプチド鎖を含む四本鎖分子である。複合成分を含む本発明のY型分子において、複合成分は、抗体分子の重鎖ポリペプチド鎖（例えば、ステム部のF cドメインのC末端）に複合されてもよく、または抗体分子の軽鎖ポリペプチド鎖（例えば、F a b抗原結合部位を含む抗体アームのF a b軽鎖のC末端）に複合されてもよい。したがって、例えば、本発明の抗体は、2本の重鎖ポリペプチド鎖と2本の軽鎖ポリペプチド鎖を含んでもよく、ここで第1重鎖と第1軽鎖がペアリングして抗体の1つの抗体アームを形成し、第2重鎖と第2軽鎖がペアリングして抗体のもう1つの抗体アーム

40

50

ムを形成し、かつ第1重鎖のFcドメインと第2重鎖のFcドメインがペアリングして抗体ステムを形成し、ここで第1重鎖または第2重鎖のC末端には抗体複合成分を形成する一本鎖抗体断片（scFvなど）がさらに含まれ、あるいは第1軽鎖と第2軽鎖のC末端には抗体複合成分を形成する一本鎖抗体断片（scFvなど）がさらに含まれる。

【0054】

一態様において、したがって、本発明は、三重特異性Y型抗体分子を提供する。本発明のY型抗体分子は、下記の式：

$$(M1 : M2 - (X1)_p) - Fc :: Fc - (X2)_q \quad (\text{式I})$$

の構造の構造を有し、式中、

M1とM2は、抗原結合部位を含むY型抗体分子の第1抗体アームと第2抗体アームをそれぞれ表し、ここで、第1抗体アームと第2抗体アームの抗原結合部位は相同または相異であってもよく、

Fc :: Fcは、第1と第2抗体アームのC末端に位置するY型抗体分子のステムを表し、ペアリングおよび二量化された第1のFcドメインと第2のFcドメインで構成され、

X1は抗体アームのC末端に複合した複合成分を表し、X2はステムのC末端に複合した複合成分を表し、ここで前記複合成分は抗原結合部位を含み、ここで複合成分は直接または連結ペプチドを介して抗体分子に複合され、かつ

式中、pとqは、0、1もしくは2の整数をそれぞれ表し、かつpとqは同時に0ではなく、

ここで、前記抗体は抗体アームおよび複合成分を介してGPRC5D、BCMAおよびCD3に特異的に結合され、

好ましくは、第1抗体アームおよび第2抗体アームが異なる抗原に結合する場合、pとqのいずれか1つは0であり、ここで抗体アームM1およびM2は第1と第2抗原結合特異性を提供し、複合成分は第3抗原結合特異性を提供し、あるいは

好ましくは、第1抗体アームおよび第2抗体アームが同じ抗原に結合する場合、pとqはいずれも0ではなく、ここで抗体アームM1およびM2は第1抗原結合特異性を提供し、複合成分X1およびX2は第2と第3抗原結合特異性をそれぞれ提供する。

【0055】

いくつかの実施形態において、抗体分子の抗体アーム（M1およびM2）は、FabまたはscFab（好ましくはFab）から選択される抗原結合部位を含み、かつpとqのいずれか1つは0であり、ここで抗体アームM1およびM2は第1と第2抗原にそれぞれ結合され、複合成分（X1またはX2）は第3抗原に結合され、ここで第1、第2および第3抗原は互いに異なり、互いに独立してGPRC5D、BCMAおよびCD3から選択され、

好ましくは、p=0の場合、q=1であり、複合成分X2は抗体分子のステムの2つのFcドメインのいずれか1つに複合され、あるいは

好ましくは、q=0の場合、p=2であり、複合成分X1は抗体分子の抗体アームM1およびM2の両方のFab軽鎖に複合される。

【0056】

いくつかの実施形態において、抗体分子の抗体アーム（M1およびM2）は、FabまたはscFab（好ましくはFab）から選択される抗原結合部位を含み、かつpとqはいずれも0ではなく、ここで抗体アームM1およびM2は同じ第1抗原に結合され、複合成分X1およびX2は第2抗原および第3抗原にそれぞれ結合され、ここで第1、第2および第3抗原は互いに異なり、互いに独立してGPRC5D、BCMAおよびCD3から選択され、

好ましくは、p=2かつq=2であり、ここで複合成分X1は抗体分子の抗体アームM1およびM2両方のFab軽鎖に複合され、かつ複合成分X2は抗体分子のステムの2つのFcドメインに複合される。

さらなる実施形態において、抗体分子の抗体アーム（M1およびM2）は、scFv（

好ましくは $d s s c F v$ から選択される抗原結合部位を含み、かつ $p = 0$ 、 $q = 1$ もしくは 2 であり、ここで抗体アーム M1 および M2 は第 1 と第 2 抗原にそれぞれ結合され、複合成分 X2 は第 3 抗原に結合され、ここで第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択され、

好ましくは、 $p = 0$ の場合、 $q = 1$ であり、複合成分 X2 は抗体分子のステムの 2 つの F c ドメインのいずれか 1 つの C 末端に複合される。

【0057】

前記いずれか 1 つの実施形態において、好ましくは、複合成分は、 $s c F v$ 、 $d s F v$ および $d s A b$ 、好ましくは $s c F v$ 、より好ましくは $d s s c F v$ から選択される抗原結合部位を含む。

10

前記いずれか 1 つの実施形態において、好ましくは、第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインは、「C P P C」アミノ酸残基を有するヒンジ領域を含み、これにより、本発明の抗体分子は、第 1 と第 2 の F c ドメインの間に鎖間ジスルフィド結合を形成して、本発明の抗体分子のポリペプチド鎖が正しくペアリングすることを促進する。好ましくは、本発明の抗体分子において、抗体アームは F c 領域のヒンジ領域により F c 領域の N 末端に融合される。

前記いずれか 1 つの実施形態において、好ましくは、複合成分は、フレキシブル連結ペプチドにより抗体分子のステムおよび／またはアームに複合される。好ましくは、前記連結ペプチドの長さは、5 個～15 個のアミノ酸長さ、例えば 10、12、15 個のアミノ酸長さである。好ましくは、前記連結ペプチドは、アミノ酸配列 T S (G 4 S) n または (G 4 S) n を含み、式中、 $n = 1$ 、2 もしくは 3、好ましくは $n = 2$ である。

20

【0058】

したがって、いくつかの好ましい実施形態において、式 I の p と q のいずれか 1 つが 0 である場合、本発明は、下記の式：

$$(M1 : M2 - (X1)^p) - Fc :: Fc - (X2)^q \quad (\text{式 I})$$

の構造の構造を有する I g G 様抗体分子を提供し、式中、

M1 および M2 は、第 1 と第 2 抗原に結合する F a b または $s c F a b$ 、好ましくは F a b をそれぞれ含み、

式中、 $p = 0$ の場合、X2 は第 3 抗原に結合する $s c F v$ を含み、あるいは

$q = 0$ の場合、X1 は第 3 抗原に結合する $s c F v$ を含み、

30

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

さらなるいくつかの好ましい実施形態において、式 I の $p = 0$ の場合、本発明は、下記の式：

$$(M1 : M2) - Fc :: Fc - (X2)^q, \quad (\text{Format}_2)$$

の構造の構造を有する I g G 様抗体分子を提供し、式中、

$q = 1$ 、

M1 および M2 は、第 1 と第 2 抗原に結合する F a b または $s c F a b$ 、好ましくは F a b をそれぞれ含み、かつ

X2 は、第 3 抗原に結合する $s c F v$ を含み、

40

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0059】

さらなるいくつかの好ましい実施形態において、式 I の $q = 0$ の場合、本発明は、下記の式：

$$(M1 : M2 - (X1)^p) - Fc :: Fc, \quad (\text{Format}_7)$$

の構造の構造を有する I g G 様抗体分子を提供し、式中、

$p = 2$ 、

M1 および M2 は、第 1 と第 2 抗原に結合する F a b をそれぞれ含み、かつ

X2 は、第 3 抗原に結合する $s c F v$ を含み、

50

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0060】

さらなるいくつかの実施形態において、式 I の $p = 2$ かつ $q = 2$ の場合、本発明は、下記の式：

$(M1 : M2 - (X1)_p) - Fc :: Fc - (X2)_q,$ (Format__6)

の構造の構造を有する I g G 様抗体分子を提供し、式中、

M1 および M2 は、同じ第 1 抗原に結合する F a b または s c F a b、好ましくは F a b を含み、かつ

X1 および X2 は、第 2 抗原および第 3 抗原に結合する s c F v をそれぞれ含み、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0061】

さらなるいくつかの実施形態において、式 I の $p = 0$ かつ $q = 1$ の場合、本発明は、下記の式：

$(M1 : M2) - Fc :: Fc - X2,$ (Format__1)

の構造の構造を有する I g G 様抗体分子を提供し、式中、

M1、M2 および X2 は、第 1、第 2、および第 3 抗原に結合する s c F v をそれぞれ含み、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0062】

以下、本発明の三重特異性抗体分子を構成する抗体アーム、複合成分およびシステムについて、それぞれ詳細にさらに説明する。当業者にとって明らかのように、これらの説明は、前記の本発明にかかる任意の三重特異性抗体分子、例えば式 I の分子、および F o r m a t__1、2、6 および 7 の構造を有する分子に適用される。

【0063】

本発明の抗体分子の抗体アームおよび複合成分

本発明の抗体分子は、抗体アームおよび複合成分の抗原結合部位により、第 1、第 2 および第 3 抗原に特異的に結合する抗原結合部位を提供し、ここで第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して腫瘍関連抗原 G P R C 5 D、腫瘍関連抗原 B C M A および T 細胞エンゲージ抗原 C D 3 から選択される。

【0064】

一実施形態において、本発明は式 I の抗体分子を提供し、式中、 $p = 0$ または $q = 0$ の場合、抗体の第 1 抗体アームおよび第 2 抗体アームは、第 1 と第 2 抗原結合部位をそれぞれ提供し、複合成分は第 3 抗原結合部位を提供する。

【0065】

他の実施形態において、本発明は式 I の抗体分子を提供し、式中、 p と q がいずれも 0 ではない場合、抗体の第 1 抗体アームおよび第 2 抗体アームは第 1 抗原結合部位を提供し、かつ抗体アームの C 末端に複合された複合成分は第 2 抗原結合部位を提供し、抗体システムに複合された複合成分は第 3 抗原結合部位を提供する。

【0066】

本発明に適用できる三重特異性抗体分子の抗原結合部位 (G P R C 5 D、B C M A および C D 3 に特異的に結合する抗原結合部位を含む) は、標的抗原に結合できる任意の抗体または抗体断片を含んでもよい。例えば、本発明の式 I の抗体分子において、抗体アームおよび複合成分における抗原結合部位は、独立して s c F v、d s F v、F a b、s c F a b または s d A b であってもよい。好ましくは、いくつかの実施形態において、抗体アームの抗原結合部位は、F a b および s c F a b、好ましくは F a b から選択される。好ましくは、他のいくつかの実施形態において、複合成分の抗原結合部位は、s c F v、d

s F v および d s A b、好ましくは s c F v、より好ましくはジスルフィド結合が安定した s c F v（すなわち、d s s c F v）から選択される。いくつかのより好ましい実施形態において、抗体アームの抗原結合部位は F a b、かつ複合成分の抗原結合部位は s c F v、特に d s s c F v である。

【0067】

本明細書において、F a b __ G P R C 5 D、F a b __ B C M A および F a b __ C D 3 は、G P R C 5 D、B C M A および C D 3 に結合する F a b 形式の抗原結合部位をそれぞれ表すために使用される。本明細書において、S c F v __ G P R C 5 D、S c F v __ B C M A および S c F v __ C D 3 は、G P R C 5 D、B C M A および C D 3 に結合する s c F v 形式の抗原結合部位をそれぞれ表すために使用される。

10

【0068】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子に含まれる F a b 抗原結合部位は、免疫グロブリン V H、C H 1、V L および C L ドメインを含む 2 本のポリペプチド鎖で構成され、ここで前記 V H と V L がペアリングし、かつ前記 C H 1 と C L がペアリングして、抗原結合部位を形成する。いくつかの実施形態において、F a b において、1 本の鎖は N 末端から C 末端まで、V H と C H 1（すなわち、V H - C H 1）を含み、もう 1 本の鎖は N 末端から C 末端まで、V L と C L（すなわち、V L - C L）を含む。他のいくつかの実施形態において、F a b において、1 本の鎖は N 末端から C 末端まで、V H と C L（すなわち、V H - C L）を含み、もう 1 本の鎖は N 末端から C 末端まで、V L と C H 1（すなわち、V L - C H 1）を含む。いくつかの実施形態において、F a b は、本発明の抗体分子の抗体アームの抗原結合部位を構成する。前記実施形態において、前記 F a b は、V H を含む鎖の C 末端により抗体ステムの F c ドメインの N 末端に融合することができ、あるいは、ここで前記 F a b は、V L を含む鎖の C 末端により抗体ステムの F c ドメインの N 末端に融合される。好ましくは、前記 F a b は、V H - C H 1 鎖および V L - C L 鎖を含み、V H - C H 1 鎖の C 末端により抗体ステムの F c 領域に結合する。好ましくは、本発明の抗体分子には、抗体アームに複合された複合成分が含まれる場合、前記複合成分は抗体ステムに連結していない F a b 鎖の C 末端に複合される。本明細書において、抗体ステムに連結していない F a b 鎖は F a b の軽鎖とも呼ばれる。したがって、いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子は、抗体アームの F a b 軽鎖に複合された複合成分を有する。

20

30

【0069】

他のいくつかの実施形態において、本発明の抗体分子に含まれる s c F a b 抗原結合部位は、免疫グロブリン V H、C H 1、V L および C L ドメインを含む 1 本のポリペプチド鎖で構成され、ここで前記 V H と V L がペアリングし、かつ前記 C H 1 と C L がペアリングして、抗原結合部位を形成する。いくつかの実施形態において、前記 s c F a b は N 末端から C 末端まで、V H - C H 1、リンカー、および V L - C L を含む。他のいくつかの実施形態において、前記 s c F a b は N 末端から C 末端まで、V L - C L、リンカー、および V H - C H 1 を含む。さらなるいくつかの実施形態において、前記 s c F a b は N 末端から C 末端まで、V H - C L、リンカー、および V L - C H 1 を含む。他のいくつかの実施形態において、前記 s c F a b は N 末端から C 末端まで、V L - C H 1、リンカー、および V H - C L を含む。いくつかの実施形態において、s c F a b は、本発明の抗体分子の抗体アームの抗原結合部位を構成する。いくつかの実施形態において、前記 s c F a b は、そのポリペプチド鎖の C 末端により抗体ステムの F c ドメインの N 末端に融合される。好ましくは、前記 s c F a b は N 末端から C 末端まで、V L - C L、リンカー、および V H - C H 1 を含み、かつ C H 1 ドメインの C 末端により抗体ステムの F c 領域に結合する。好ましくは、本発明の抗体分子には s c F a b 抗体アームが含まれる場合、抗体分子の複合成分は、抗体ステムの F c ドメインの C 末端にのみ複合される。

40

【0070】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子に含まれる F a b または s c F a b は、I g G 免疫グロブリンに由来する C H 1 ドメイン、例えば、I g G 1 の C H 1 ドメイン

50

、好ましくはヒトIgG1のCH1ドメインを含む。いくつかの好ましい実施形態において、前記CH1ドメインは、配列番号104のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子に含まれるFabまたはscFabは、IgG免疫グロブリンに由来するkappa軽鎖定常ドメイン、例えばIgG1のCL_kドメイン、好ましくはヒトIgG1のCL_kドメインを含む。例えば、前記FabまたはscFabは、配列番号105のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するkappa軽鎖定常ドメインを含む。他のいくつかの実施形態において、本発明の抗体分子に含まれるFabまたはscFabは、IgG免疫グロブリンに由来するlambda軽鎖定常領域、例えばIgG1のCL_λドメイン、好ましくはヒトIgG1のCL_λドメインを含む。例えば、前記Fabは、配列番号106のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するlambda軽鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子の抗体アームM1およびM2には、異なる抗原に結合するFabまたはscFab（好ましくはFab）が含まれる場合、抗体アームM1および抗体アームM2のFabまたはscFabの軽鎖定常ドメインは互いに異なる。例えば、いくつかの実施形態において、抗体アームM1のFabはkappa軽鎖定常ドメインを含み、抗体アームM2のFabはlambda軽鎖可変ドメインを含み、または抗体アームM1のFabはlambda軽鎖定常ドメインを含み、抗体アームM2のFabはkappa軽鎖可変ドメインを含む。

10

20

【0071】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子に含まれるscFv抗原結合部位は、免疫グロブリンVHとVLドメインを含む1本のポリペプチド鎖で構成され、ここで前記VHとVLはリンカーにより連結されてペアリングして抗原結合部位を形成する。いくつかの実施形態において、前記scFvはトランス構成であり、N末端からC末端まで、VH、リンカー、およびVL（VH-リンカー-VL）を含む。他のいくつかの実施形態において、前記scFvはシス構成であり、N末端からC末端まで、VL、リンカー、およびVH（VH-リンカー-VL）を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、アミノ酸残基で構成されるペプチドリンカーである。好適なペプチドリンカーは当業者によく知られている。一実施形態において、リンカーは、10個～50個のアミノ酸長さ、例えば5個～30個のアミノ酸長さ、例えば15個のアミノ酸もしくは20個のアミノ酸長さである。一実施形態において、リンカーはアミノ酸配列（G4S）_nを含み、式中、_n=1、2、3、4もしくは5、好ましくは、_n=3もしくは4、より好ましくは、_n=4である。

30

いくつかの実施形態において、scFvは、本発明の抗体分子の抗体アームの抗原結合部位を構成し、そのポリペプチド鎖のC末端により抗体ステムのFcドメインのN末端に融合される。

【0072】

他のいくつかの実施形態において、scFvは、本発明の抗体分子の複合成分の抗原結合部位を構成する。いくつかの実施形態において、前記scFvは、そのポリペプチド鎖のN末端により抗体ステムのC末端および／または抗体アームのC末端に融合される。好ましくは、本発明の抗体分子において、抗体アームはFabを含み、複合成分はscFvを含み、ここで、前記scFvは、そのポリペプチド鎖のN末端により抗体ステムFcのC末端および／または抗体アームFab軽鎖のC末端に融合される。

40

いくつかの好ましい実施形態において、本発明の抗体分子に含まれるscFv抗原結合部位は、ジスルフィド結合が安定したscFv、すなわちds-scFvである。抗原結合部位がds-scFvである場合、scFvに変異するVHとVL可変ドメインの間に導入するジスルフィド結合により、下記の残基対（以下の位置はKabab番号によって決定される）：

VHの37位残基+VLの95位残基、VHの44位残基+VLの100位残基、VH

50

の 4 4 位残基 + V L の 1 0 5 位残基、V H の 4 5 位残基 + V L の 8 7 位残基、V H の 5 5 位残基 + V L の 1 0 1 位残基、V H の 1 0 0 位残基 + V L の 5 0 位残基、V H の 1 0 0 b 位残基 + V L の 4 9 位残基、V H の 9 8 位残基 + V L の 4 6 位残基、V H の 1 0 5 位残基 + V L の 4 3 位残基、および V H の 1 0 6 位残基 + V L の 5 7 位残基、の間に位置することができる。好ましくは、d s s c F v を形成するために、システイン置換に V H の 4 4 位と V L の 1 0 0 位残基を導入することで、前記 V H と V L がペアリングする時に 2 つの残基の間にジスルフィド結合による連結を形成することができる。

【 0 0 7 3 】

G P R C 5 D に結合する抗原結合部位

本発明に適用できる抗体分子の G P R C 5 D 抗原結合部位は、G P R C 5 D に結合できる任意の抗体または抗体断片であってもよい。例えば、本発明の抗体分子において、抗体アームまたは複合成分に含まれる G P R C 5 D 抗原結合部位は、独立して s c F v、d s F v、F a b、s c F a b または s d A b であってもよく、かつ好ましくは上述した s c F v または F a b 構造を有する抗原結合部位である。好ましくは、抗体アームの G P R C 5 D 抗原結合部位は、F a b および s c F a b、好ましくは F a b から選択される。好ましくは、複合成分の G P R C 5 D 抗原結合部位は、s c F v、d s F v および d s A b、好ましくは s c F v、より好ましくはジスルフィド結合が安定した s c F v（すなわち、d s s c F v）から選択される。1 つのより好ましい実施形態において、抗体は G P R C 5 D に結合する抗体アームを含み、かつ抗体アームの G P R C 5 D 抗原結合部位は F a b であり、もう 1 つのより好ましい実施形態において、抗体は G P R C 5 D に結合する複合成分を含み、かつ複合成分の G P R C 5 D 抗原結合部位は s c F v、特に d s s c F v である。

【 0 0 7 4 】

いくつかの好ましい実施形態において、G P R C 5 D に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する G P R C 5 D 抗原結合部位は、

(i) 配列番号 2 5 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 2 6 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(i i) 配列番号 2 7 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 2 8 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(i i i) 配列番号 2 9 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 3 0 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(i v) 配列番号 3 1 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 3 2 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(v) 配列番号 9 8 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 9 9 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(v i) 配列番号 1 0 0 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 1 0 1 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列、を含む。

【 0 0 7 5 】

いくつかの好ましい実施形態において、G P R C 5 D に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する G P R C 5 D 抗原結合部位は、以下：

(i) それぞれ配列番号 1 ～ 6 に示される重鎖可変ドメイン H C D R 1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(i i) それぞれ配列番号 7 ～ 1 2 に示される重鎖可変ドメイン H C D R 1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(i i i) それぞれ配列番号 13～18 に示される重鎖可変ドメイン H C D R 1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(i v) それぞれ配列番号 19～24 に示される重鎖可変ドメイン H C D R 1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン L C D R 1、2 および 3 の配列、または

(v) それぞれ配列番号 13、110 および 15～18 に示される重鎖可変ドメイン H C D R 1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン L C D R 1、2 および 3 の配列、から選択される C D R 配列の組み合わせを含む。

【0076】

あるいは、G P R C 5 D に結合する前記抗原結合部位、例えば、s c F v または F a b は、前記 C D R 配列の組み合わせの 1 つの変異体を含み、ここで前記変異体は、1、2、3、4、5 もしくは好ましくは 6 個の C D R 領域において合計で少なくとも 1 個かつ 5、4、3、2 もしくは 1 個以下のアミノ酸変異（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を含み、好ましくは、重鎖 C D R 3 は変化しないままである。

【0077】

いくつかの好ましい実施形態において、G P R C 5 D に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する G P R C 5 D 抗原結合部位は、以下：

(a) 配列番号 25 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

(b) 配列番号 27 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

(c) 配列番号 29 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

(d) 配列番号 31 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、

(e) 配列番号 98 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、および

(f) 配列番号 100 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、から選択される重鎖可変ドメイン V H を含む。

【0078】

いくつかの好ましい実施形態において、G P R C 5 D に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する G P R C 5 D 抗原結合部位は、以下：

(a) 配列番号 26 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(b) 配列番号 28 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(c) 配列番号 30 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(d) 配列番号 32 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(e) 配列番号 99 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80%、85%、

10

20

30

40

50

90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、および

(f) 配列番号101に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、から選択される軽鎖可変ドメインVLを含む。

【0079】

いくつかの好ましい実施形態において、GPRC5Dに結合する抗原結合部位、例えば、上述したscFvまたはFab構造を有するGPRC5D抗原結合部位は、以下：

(a) 配列番号25に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号26に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(b) 配列番号27に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号28に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) 配列番号29に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号30に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(d) 配列番号31に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号32に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(e) 配列番号98に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号99に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(f) 配列番号100に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号101に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、から選択されるVHとVLアミノ酸配列の組み合わせを含む。

【0080】

いくつかの好ましい実施形態において、GPRC5Dに結合する抗原結合部位、例えば、上述したscFvまたはFab構造を有するGPRC5D抗原結合部位は、以下：

(i) 配列番号25に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号26に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(i i) 配列番号27に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(i i i) 配列番号29に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号30に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(i v) 配列番号31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号32に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(v) 配列番号 98 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 99 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(vi) 配列番号 100 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 101 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、から選択される V H と V L 配列の組み合わせを含む。

いくつかの好ましい実施形態において、G P R C 5 D に結合する抗原結合部位はジスルフィド結合が安定した s c F v である場合、前記 s c F v はさらに、V H ドメインの 44 位にシステイン置換が含まれ、V L ドメインの 100 位にシステイン置換が含まれる。

【0081】

B C M A に結合する抗原結合部位

本発明に適用できる抗体分子の B C M A 抗原結合部位は、B C M A に結合できる任意の抗体または抗体断片であってもよい。例えば、本発明の抗体分子において、抗体アームまたは複合成分に含まれる B C M A 抗原結合部位は、独立して s c F v、d s F v、F a b、s c F a b または s d A b であってもよく、かつ好ましくは上述した s c F v または F a b 構造を有する抗原結合部位である。好ましくは、抗体アームの B C M A 抗原結合部位は、F a b および s c F a b、好ましくは F a b から選択される。好ましくは、複合成分の B C M A 抗原結合部位は、s c F v、d s F v および d s A b、好ましくは s c F v、より好ましくはジスルフィド結合が安定した s c F v (すなわち、d s s c F v) から選択される。1つのより好ましい実施形態において、抗体は B C M A に結合する抗体アームを含み、かつ抗体アームの B C M A 抗原結合部位は F a b であり、もう1つのより好ましい実施形態において、抗体は B C M A に結合する複合成分を含み、かつ複合成分の B C M A 抗原結合部位は s c F v、特に d s s c F v である。

【0082】

いくつかの好ましい実施形態において、B C M A に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する B C M A 抗原結合部位は、配列番号 39 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 40 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列を含む。

【0083】

いくつかの好ましい実施形態において、B C M A に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する B C M A 抗原結合部位は、以下：

- 配列番号 33 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる H C D R 1、
- 配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる H C D R 2、
- 配列番号 35 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる H C D R 3、
- 配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる L C D R 1、
- 配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる L C D R 2、
- 配列番号 38 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる L C D R 3、と

いう C D R 配列の組み合わせを含み、

あるいは、B C M A に結合する前記抗原結合部位は、前記 C D R 配列の組み合わせの1つの変異体を含み、ここで前記変異体は、1、2、3、4、5 もしくは好ましくは6個の C D R 領域において合計で少なくとも1個かつ5、4、3、2 もしくは1個以下のアミノ酸変異 (好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換) を含み、好ましくは、重鎖 C D R 3 は変化しないままである。

【0084】

いくつかの好ましい実施形態において、B C M A に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する B C M A 抗原結合部位は、配列番号 39 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98% もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン V H を含む。

【0085】

いくつかの好ましい実施形態において、B C M A に結合する抗原結合部位、例えば、上

10

20

30

40

50

述した s c F v または F a b 構造を有する B C M A 抗原結合部位は、配列番号 40 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン V L を含む。

【0086】

いくつかの好ましい実施形態において、B C M A に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する B C M A 抗原結合部位は、配列番号 39 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメイン V H を含み、かつ配列番号 40 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン V L を含む。

10

【0087】

好ましくは、B C M A に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する B C M A 抗原結合部位は、配列番号 39 に示されるアミノ酸配列を有する V H ドメインおよび配列番号 40 に示されるアミノ酸配列を有する V L ドメインを含む。いくつかの好ましい実施形態において、B C M A に結合する抗原結合部位はジスルフィド結合が安定した s c F v である場合、前記 s c F v はさらに、V H ドメインの 44 位にシステイン置換が含まれ、V L ドメインの 100 位にシステイン置換が含まれる。

20

【0088】

C D 3 に結合する抗原結合部位

本発明に適用できる抗体分子の C D 3 抗原結合部位は、C D 3 に結合できる任意の抗体または抗体断片であってもよい。例えば、本発明の抗体分子において、抗体アームまたは複合成分に含まれる C D 3 抗原結合部位は、独立して s c F v、d s F v、F a b、s c F a b または s d A b であってもよく、かつ好ましくは上述した s c F v または F a b 構造を有する抗原結合部位である。好ましくは、抗体アームの C D 3 抗原結合部位は、F a b および s c F a b、好ましくは F a b から選択される。好ましくは、複合成分の C D 3 抗原結合部位は、s c F v、d s F v および d s A b、好ましくは s c F v、より好ましくはジスルフィド結合が安定した s c F v（すなわち、d s s c F v）から選択される。1つのより好ましい実施形態において、抗体は C D 3 に結合する抗体アームを含み、かつ抗体アームの C D 3 抗原結合部位は F a b であり、もう1つのより好ましい実施形態において、抗体は C D 3 に結合する複合成分を含み、かつ複合成分の C D 3 抗原結合部位は s c F v、特に d s s c F v である。

30

【0089】

いくつかの好ましい実施形態において、C D 3 に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する C D 3 抗原結合部位は、配列番号 48 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 49 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列を含む。

別のいくつかの好ましい実施形態において、C D 3 に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する C D 3 抗原結合部位は、配列番号 50 に示される重鎖可変ドメインの H C D R 1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 49 に示される軽鎖可変ドメインの L C D R 1、2 および 3 の配列を含む。

40

【0090】

いくつかの好ましい実施形態において、C D 3 に結合する抗原結合部位、例えば、上述した s c F v または F a b 構造を有する C D 3 抗原結合部位は、以下：

- 配列番号 41 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる H C D R 1、
- 配列番号 42 もしくは 47 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる H C D R 2、
- 配列番号 43 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる H C D R 3、
- 配列番号 44 に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなる L C D R 1、

50

ー配列番号45に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるLCDR2、
ー配列番号46に示されるアミノ酸配列を含むか、またはそれからなるLCDR3、と
いうCDR配列の組み合わせを含み、

あるいは、CD3に結合する前記抗原結合部位は、前記CDR配列の組み合わせの1つの変異体を含み、ここで前記変異体は、1、2、3、4、5もしくは好ましくは6個のCDR領域において合計で少なくとも1個かつ5、4、3、2もしくは1個以下のアミノ酸変異（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を含み、好ましくは、重鎖CDR3は変化しないままである。

【0091】

いくつかの好ましい実施形態において、CD3に結合する抗原結合部位、例えば、上述したscFvまたはFab構造を有するCD3抗原結合部位は、配列番号48もしくは50に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインVHを含む。

10

【0092】

いくつかの好ましい実施形態において、CD3に結合する抗原結合部位、例えば、上述したscFvまたはFab構造を有するCD3抗原結合部位は、配列番号49に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインVLを含む。

20

いくつかの好ましい実施形態において、CD3に結合する抗原結合部位、例えば、上述したscFvまたはFab構造を有するCD3抗原結合部位は、配列番号48もしくは50に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインVHを含み、かつ配列番号49に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%もしくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインVLを含む。

【0093】

好ましくは、CD3に結合する抗原結合部位、例えば、上述したscFvまたはFab構造を有するCD3抗原結合部位は、配列番号48もしくは50に示されるアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号49に示されるアミノ酸配列を有するVLドメインを含む。より好ましくは、CD3に結合する抗原結合部位、例えば、上述したscFvまたはFab構造を有するCD3抗原結合部位は、配列番号48に示されるアミノ酸配列を有するVHドメインおよび配列番号49に示されるアミノ酸配列を有するVLドメインを含む。いくつかの好ましい実施形態において、CD3に結合する抗原結合部位はジスルフィド結合が安定したscFvである場合、前記scFvはさらに、VHドメインの44位にシステイン置換が含まれ、VLドメインの100位にシステイン置換が含まれる。

30

【0094】

本発明の抗体分子のステム

本発明の抗体分子は、抗体アームのC末端に位置し、第1のFcドメインと第2のFcドメインにより形成されたステムを含む。いくつかの実施形態において、第1と第2のFcドメインは同じである。他のいくつかの実施形態において、第1のFcドメインと第2のFcドメインが異なり、両者がペアリングしてヘテロ二量体化されている。

40

【0095】

本発明に適用される抗体分子のFcドメイン断片は、任意の抗体Fcドメインであってもよい。例えば、本発明の抗体のFcドメインは、2つもしくは3つの定常ドメイン、すなわちCH2ドメイン、CH3ドメインおよび選択可能なCH4ドメインを含んでもよい。好ましくは、本発明の抗体のFcドメインはN末端からC末端まで、CH2-CH3を含み、より好ましくはN末端からC末端まで、ヒンジ領域-CH2-CH3を含む。

本発明の抗体分子において、Fcドメインは、IgG、IgAおよびIgD類抗体に由

50

来する第2および第3定常ドメイン（CH2ドメインおよびCH3ドメイン）を含んでもよく、またはIgMおよびIgE類抗体に由来する第2、第3および第4定常ドメイン（CH2ドメイン、CH3ドメインおよびCH4ドメイン）を含む。いくつかの実施形態において、抗体分子のFcドメインは、IgGからのFcドメイン、例えば、IgG1、IgG2またはIgG4からのFcドメイン、好ましくはヒトIgG1からのFcドメインである。

【0096】

当業者には理解されるように、本発明の抗体分子の予期される使用に応じて、本発明の抗体分子は、Fcドメインにエフェクター機能を変更する修飾を含んでもよい。一実施形態において、本発明のFcドメインの1種または複数種のエフェクター機能は、同じアイソタイプの野生型Fcドメインと比較して、低減または排除されている。Fcドメインのグリコシル化の改変、天然に低減または排除されたエフェクター機能を有するFcアイソタイプの使用、およびFcドメインのアミノ酸配列の修飾から選ばれる任意の方法により、Fcドメインのエフェクター機能を低減または排除することができる。

【0097】

一実施形態において、Fcドメインのグリコシル化を低減することによってエフェクター機能を低減または排除する。当該分野で公知であるFcドメインのグリコシル化を低減するための様々な方法は、野生型グリコシル化が許容されない環境での本発明の抗体分子の製造、Fcドメインにすでに存在した炭水化物基の除去、および野生型グリコシル化が起こらないようにFcドメインの修飾を含むが、これらに限定されない。一実施形態において、Fcドメインを修飾することによってFcドメインのグリコシル化を低減する。例えば、Fcドメインの位置297に変異を導入することによって、当該位置での野生型アスパラギン残基が当該位置のグリコシル化を妨げる別のアミノ酸で置換される、例えばN297A変異である。

【0098】

別の実施形態において、少なくとも1つのFcドメインのアミノ酸配列を修飾することによって、エフェクター機能を低減または排除する。前記Fcドメイン修飾は、238、239、248、249、252、254、265、268、269、270、272、278、289、292、293、294、295、296、297、298、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438および439から選択される1つもしくは複数の位置に、Fcドメインの1つもしくは複数のFc受容体への結合を損なう点変異を導入するか、または、270、322、329および321から選択される位置にC1q結合を損なう点変異を導入する。

【0099】

当業者には理解されるように、本発明の抗体分子の予期される使用に応じて、本発明の抗体分子は、Fcドメインに1種または複数種のFc受容体への結合親和性を変更する修飾を含んでもよい。一実施形態において、前記Fc受容体は、Fcγ受容体であり、特にヒトFcγ受容体である。一実施形態において、前記修飾は、本発明の抗体分子のエフェクター機能を低減する。一具体的な実施形態において、前記エフェクター機能は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）である。一実施形態において、本発明の抗体分子のFcドメインは、第234と235位（EU番号）にアミノ酸置換を含む。一具体的な実施形態において、前記アミノ酸置換は、L234AとL235A（LALA変異）である。別の実施形態において、本発明の抗体分子のFcドメインは、第329位（EU番号）にアミノ酸置換を含む。一具体的な実施形態において、前記アミノ酸置換はP329Gである。

【0100】

当業者には理解されるように、本発明の抗体分子が非対称抗体分子（例えばFormat__2とFormat__7の抗体分子）である場合、非対称抗体分子が正しく形成されるように促進するために、本発明の抗体分子は、第1と第2のFcドメインに、第1のFc

10

20

30

40

50

ドメインと第2のFcドメインのヘテロ二量体化を容易にする変異を含んでもよい。例えば、Knob-in-Hole技術により、第1のFcドメインと第2のFcドメインに相補的なKnob変異とHole変異を導入することができる。

【0101】

したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、第1のFcドメインと第2のFcドメインには、第1と第2のFcドメインのペアリングおよびヘテロ二量体化を促進する第1と第2ヘテロ二量体化変異がそれぞれ含まれる、三重特異性抗体分子を提供する。いくつかの好ましい実施形態において、第1のFcドメインの第1ヘテロ二量体化変異はKnob変異を含み、第2のFcドメインの第2ヘテロ二量体化変異は前記knob変異と相補的なHole変異を含み、または、第1のFcドメインの第1ヘテロ二量体化変異はHole変異を含み、第2のFcドメインの第2ヘテロ二量体化変異は前記hole変異と相補的なKnob変異を含む。いくつかの好ましい実施形態において、前記Knob変異はT366W、かつ前記相補的なhole変異はT366S/L368A/Y407Vである。

10

【0102】

一実施形態において、本発明は、

i) 場合により、変異L234AおよびL235Aを有する、ヒトIgG1サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

ii) 場合により、変異P329G、S228PおよびL235Eを有する、ヒトIgG4サブクラスのホモ二量体Fc領域、または

20

iii) ヘテロ二量体Fc領域であって、そのうち

a) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366Wを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368AおよびY407Vを含み、または

b) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366WおよびY349Cを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368A、Y407VおよびS354Cを含み、または

c) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366WおよびS354Cを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368A、Y407VおよびY349Cを含む、ヘテロ二量体Fc領域、

または

30

iv) ヒトIgG1サブクラスのヘテロ二量体Fc領域であって、そのうち、2つのFc領域ポリペプチドはいずれも、変異L234AおよびL235Aを含み、かつ

a) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366Wを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368AおよびY407Vを含み、または

b) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366WおよびY349Cを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368A、Y407VおよびS354Cを含み、または

c) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366WおよびS354Cを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368A、Y407VおよびY349Cを含む、ヒトIgG1サブクラスのヘテロ二量体Fc領域、

40

または

v) ヒトIgG4サブクラスのヘテロ二量体Fc領域であって、そのうち、2つのFc領域ポリペプチドはいずれも、変異P329G、S228PおよびL235Eを含み、かつ

a) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366Wを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368AおよびY407Vを含み、または

b) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366WおよびY349Cを含み、別のFc領域ポリペプチドは変異T366S、L368A、Y407VおよびS354Cを含み、または

c) 1つのFc領域ポリペプチドは変異T366WおよびS354Cを含み、別のF

50

c-領域ポリペプチドは変異 T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V および Y 3 4 9 C を含む、ヒト I g G 4 サブクラスのヘテロ二量体 F c-領域、
を含む三重特異性抗体分子を提供する。

【0103】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子の F c ドメインは、ヘテロポリマー抗体の精製を促進する他の変異をさらに含んでもよい。例えば、H 4 3 5 R 変異を第 1 と第 2 の F c ドメインの一方（例えば、H o l e 変異を有する F c ドメイン）に導入して、タンパク質 A を使用した標的ヘテロポリマー抗体の精製を促進する。

【0104】

本発明の抗体分子において、抗体ステムは F c ドメインの N 末端で抗体アームに連結される。当業者に明らかなように、本発明に適用される抗体分子において、抗体アームとステム部 F c ドメイン断片とを連結する連結ペプチドは、当該分野で既知の任意のフレキシブル連結ペプチドであってもよい。いくつかの実施形態において、連結ペプチドは、I g G 1 に由来するヒンジ領域のアミノ酸配列を含んでもよく、または、(G S) n、(G S G G S) n、(G G G G S) n および (G G G S) n から選択されるアミノ酸配列を含んでもよく、式中、n は少なくとも 1 の整数である。好ましくは、抗体ステムは、I g G に由来するヒンジ領域（特にヒト I g G 1 に由来するヒンジ領域）を介して抗体アームに連結することができる。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域を含む本発明のヘテロポリマー抗体については、標的ヘテロポリマー抗体の形成を促進するために、ヒンジ領域に変異、例えば C 2 2 0 S を導入することができる。

【0105】

例示的な三重特異性抗体分子

F o r m a t _ 2

いくつかの実施形態において、 $p = 0$ かつ $q = 1$ の場合、本発明の抗体分子は、 $(M 1 : M 2) - F c : : F c - (X 2)_q$ の構造の構造を有する。このようにして、前記抗体分子において、ステムに複合された複合成分 X 2 のみがある。前記抗体分子において、好ましくは、抗体アーム M 1 および M 2 は、第 1 抗原および第 2 抗原にそれぞれ結合する F a b 抗原結合部位を含み、かつ複合成分 X 2 は第 3 抗原に結合する s c F v 抗原結合部位を含み、ここで第 1、第 2、第 3 抗原はそれぞれ異なり、かつ互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0106】

したがって、いくつかの好ましい実施形態において、本発明は三重特異性 Y 型抗体分子を提供し、前記抗体分子は、以下：

$(M 1 : M 2) - F c : : F c - (X 2)_q$, (F o r m a t _ 2)

の構造の構造を有し、式中、 $q = 1$ であり、

M 1 および M 2 は、抗体分子の第 1 抗体アームおよび第 2 抗体アームをそれぞれ表し、かつ M 1 および M 2 は第 1 と第 2 抗原に結合する F a b または s c F a b、好ましくは F a b をそれぞれ含み、

F c : : F c は抗体分子のステムを表し、ペアリングして二量体化された第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインで構成され、ここで第 1 と第 2 抗体アームは、直接または連結ペプチド（好ましくはヒンジ領域）を介して第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインの N 末端にそれぞれ連結され、

X 2 はステムの C 末端に複合された複合成分を表し、ここで前記複合成分は第 3 抗原に結合する s c F v を含み、ここで X 2 は、直接または連結ペプチドを介して第 1 の F c ドメインの C 末端に複合され、あるいは第 2 の F c ドメインの C 末端に複合され、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原は互いに異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0107】

いくつかの実施形態において、本発明は、F o r m a t _ 2 構造を有する三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

(a) : 前記分子の抗体アーム M 1 および抗体アーム M 2 は、G P R C 5 D に結合する F a b および C D 3 に結合する F a b をそれぞれ含み、かつ複合成分 X 2 は B C M A に結合する s c F v を含み、前記分子は、(F a b _ G P R C 5 D : F a b _ C D 3) - F c : : F c - (s c F v _ B C M A) の構造の構造を有する (例えば実施例の T S - F 2 - 1、3 - 6 分子)、あるいは

(b) : 前記分子の抗体アーム M 1 および抗体アーム M 2 は、B C M A に結合する F a b および C D 3 に結合する F a b をそれぞれ含み、かつ複合成分 X 2 は G P R C 5 D に結合する s c F v を含み、前記分子は、(F a b _ B C M A : F a b _ C D 3) - F c : : F c - (s c F v _ G P R C 5 D) の構造の構造を有する (例えば実施例の T S - F 2 - 2 分子)、あるいは

(c) : 前記分子の抗体アーム M 1 および抗体アーム M 2 は、G P R C 5 D に結合する F a b および B C M A に結合する F a b をそれぞれ含み、かつ複合成分 X 2 は C D 3 に結合する s c F v を含み、前記分子は、(F a b _ G P R C 5 D : F a b _ B C M A) - F c : : F c - (s c F v _ C D 3) の構造の構造を有する。

【0108】

前述した本発明の F o r m a t _ 2 抗体分子の任意の実施形態において、G P R C 5 D に結合する F a b または s c F v は、G P R C 5 D に特異的に結合する任意の適切な F a b または s c F v、例えば上述した s c F v または F a b 構造を有する本発明の G P R C 5 D 抗原結合部位であってもよく、特に上述した V H と V L アミノ酸配列を有する s c F v または F a b である。

【0109】

前述した本発明の F o r m a t _ 2 抗体分子の任意の実施形態において、B C M A に結合する F a b または s c F v は、B C M A に特異的に結合する任意の適切な F a b または s c F v、例えば上述した s c F v または F a b 構造を有する本発明の B C M A 抗原結合部位であってもよく、特に上述した V H と V L アミノ酸配列を有する s c F v または F a b である。

【0110】

前述した本発明の F o r m a t _ 2 抗体分子の任意の実施形態において、C D 3 に結合する抗原結合部位は、特異性 C D 3 に結合する任意の適切な s c F v または F a b、例えば上述した s c F v または F a b 構造を有する本発明の C D 3 抗原結合部位であってもよく、特に上述した V H と V L アミノ酸配列を有する s c F v または F a b である。

【0111】

前述した本発明の F o r m a t _ 2 抗体分子の任意の実施形態において、抗体分子は、上述した F o r m a t _ 2 に適用される任意の本発明の抗体ステム構造を含んでもよい。例えば、本発明の F o r m a t _ 2 非対称三重特異性抗体分子において、好ましくは、抗体分子ポリペプチド鎖が正しくペアリングされるように促進するために、ステムの第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインに第 1 と第 2 の F c ドメインのヘテロ二量体化を促進できる変異、特に相補的な「ノブインホール」変異を導入することができる。例えば第 1 の F c ドメインに k n o b 変異を導入するとともに、第 2 の F c ドメインに相補的な h o l e 変異を導入し、または逆である。このようにして、前記抗体分子の 2 つの F c ドメインは、ペアリングして「ノブインホール」の安定した結合を形成することができる。予期される使用に応じて、本発明の F o r m a t _ 2 抗体分子の第 1 および／または第 2 の F c ドメインは好ましくは、A D C C 活性を低減する変異など、抗体エフェクター機能に影響を与える変異、例えば L A L A 変異をさらに含んでもよい。

【0112】

いくつかの実施形態において、本発明の F o r m a t _ 2 三重特異性抗体分子は、第 1 重鎖ポリペプチド鎖、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖、第 2 重鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなり、ここで、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン V H、免疫グロブリン C H 1 ドメインおよび F c ドメインを含み、

10

20

30

40

50

第1軽鎖ポリペプチド鎖はN末端からC末端まで、軽鎖可変ドメインVL、免疫グロブリンCLドメインを含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖はN末端からC末端まで、重鎖可変ドメインVH、免疫グロブリンCH1ドメインおよびFcドメインを含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖はN末端からC末端まで、軽鎖可変ドメインVL、免疫グロブリンCLドメインを含み、

かつ、ここで、第1重鎖ポリペプチド鎖または第2重鎖ポリペプチド鎖は、直接または好ましくは連結ペプチド（例えば（G4S）2またはTS（G4S）2）を介してそのFcドメインのC末端に複合されたscFvドメインをさらに含み、

ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖のVH-CH1と第1軽鎖ポリペプチド鎖のVL-CLがペアリングして第1抗原に結合する第1抗体アーム（M1）を形成し、

第2重鎖ポリペプチド鎖のVH-CH1と第2軽鎖ポリペプチド鎖のVL-CLがペアリングして第2抗原に結合する第2抗体アーム（M2）を形成し、

第1重鎖ポリペプチド鎖のFcドメインと第2重鎖ポリペプチド鎖のFcドメインがペアリングおよび二量体化されて抗体ステム（Fc::Fc）を形成し、かつ

第1重鎖ポリペプチド鎖または第2重鎖ポリペプチド鎖のC末端に複合されたscFvドメインは、第3抗原に結合する複合成分（X2）を形成し、

ここで、第1、第2および第3抗原はそれぞれ異なり、互いに独立してGPCR5D、BCMAおよびCD3から選択される。

【0113】

一実施形態において、抗体アームM1はGPCR5Dに結合され、第2抗体アームM2はCD3に結合され、複合成分X2はBCMAに結合され、このようにして、

一第1重鎖ポリペプチド鎖と第1軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはGPCR5Dに特異的に結合するFab抗原結合部位のVHとVLアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

一第2重鎖ポリペプチド鎖と第2軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはCD3に特異的に結合するFab抗原結合部位のVHとVLアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

ここで、複合成分X2が第1重鎖ポリペプチド鎖に複合される場合、第1重鎖ポリペプチド鎖は、C末端にはBCMAに特異的に結合するscFvのアミノ酸配列がさらに含まれ、または、好ましくは、複合成分X2が第2重鎖ポリペプチド鎖に複合される場合、第2重鎖ポリペプチド鎖は、C末端にはBCMAに特異的に結合するscFvのアミノ酸配列がさらに含まれる。

【0114】

他の実施形態において、抗体アームM1はBCMAに結合され、第2抗体アームM2はCD3に結合され、複合成分X2はGPCR5Dに結合され、このようにして、

一第1重鎖ポリペプチド鎖と第1軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはBCMAに特異的に結合するFab抗原結合部位のVHとVLアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

一第2重鎖ポリペプチド鎖と第2軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはCD3に特異的に結合するFab抗原結合部位のVHとVLアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

ここで、複合成分X2が第1重鎖ポリペプチド鎖に複合される場合、第1重鎖ポリペプチド鎖は、C末端にはGPCR5Dに特異的に結合するscFvのアミノ酸配列がさらに含まれ、または、好ましくは、複合成分X2が第2重鎖ポリペプチド鎖に複合される場合、第2重鎖ポリペプチド鎖は、C末端にはGPCR5Dに特異的に結合するscFvのアミノ酸配列がさらに含まれる。

【0115】

さらなる一実施形態において、抗体アームM1はGPCR5Dに結合され、第2抗体アームM2はBCMAに結合され、複合成分X2はCD3に結合され、このようにして、

一第1重鎖ポリペプチド鎖と第1軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはGPCR5Dに特異的に結合するFab抗原結合部位のVHとVLアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

一第2重鎖ポリペプチド鎖と第2軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはBCMAに特異的

10

20

30

40

50

に結合する F a b 抗原結合部位の V H と V L アミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

ここで、複合成分 X 2 が第 1 重鎖ポリペプチド鎖に複合される場合、第 1 重鎖ポリペプチド鎖は、C 末端には C D 3 に特異的に結合する s c F v のアミノ酸配列がさらに含まれ、または、複合成分 X 2 が第 2 重鎖ポリペプチド鎖に複合される場合、第 2 重鎖ポリペプチド鎖は、C 末端には C D 3 に特異的に結合する s c F v のアミノ酸配列がさらに含まれる。

【0116】

好ましい一実施形態において、G P R C 5 D に特異的に結合する F a b または s c F v は、以下の群：

(a) 配列番号 1 ～ 3 の H C D R 1 ～ 3 配列を含む V H および配列番号 4 ～ 6 の L C D R 1 ～ 3 配列を含む V L 、

(b) 配列番号 7 ～ 8 の H C D R 1 ～ 3 配列を含む V H および配列番号 10 ～ 12 の L C D R 1 ～ 3 配列を含む V L 、

(c) 配列番号 13 ～ 15 の H C D R 1 ～ 3 配列を含む V H および配列番号 16 ～ 18 の L C D R 1 ～ 3 配列を含む V L 、または

(d) 配列番号 19 ～ 21 の H C D R 1 ～ 3 配列を含む V H および配列番号 22 ～ 24 の L C D R 1 ～ 3 配列を含む V L 、

から選択される V H と V L を含み、

好ましくは、前記 F a b および前記 s c F v は、以下の群：配列番号 25 / 26、配列番号 27 / 28、配列番号 29 / 30 および配列番号 31 / 32 から選択される V H と V L アミノ酸配列対を含み、

かつ好ましくは、s c F v が d s s c F v である場合、前記 V H と V L 配列に導入されたシステイン置換、例えば、V H 配列の 44 位と V L 配列の 100 位でのシステイン置換をさらに含む。

好ましい一実施形態において、前記 C D 3 に特異的に結合する F a b または s c F v は、以下の群：

(a) 配列番号 41 ～ 43 の H C D R 1 ～ 3 配列を含む V H および配列番号 44 ～ 46 の L C D R 1 ～ 3 配列を含む V L 、または

(b) 配列番号 41、47、43 の H C D R 1 ～ 3 配列を含む V H および配列番号 44 ～ 46 の L C D R 1 ～ 3 配列を含む V L 、

から選択される V H と V L を含み、

好ましくは、前記 F a b および s c F v は、以下の群：配列番号 48 / 49、配列番号 50 / 49、かつより好ましくは配列番号 48 / 49 から選択される V H と V L アミノ酸配列対を含み、

かつ好ましくは、s c F v が d s s c F v である場合、前記 V H と V L 配列に導入されたシステイン置換、例えば、V H 配列の 44 位と V L 配列の 100 位でのシステイン置換をさらに含む。

【0117】

好ましい一実施形態において、前記 B C M A に特異的に結合する F a b または s c F v は、以下：

配列番号 33 ～ 35 の H C D R 1 ～ 3 配列を含む V H および配列番号 36 ～ 38 の L C D R 1 ～ 3 配列を含む V L 、という V H と V L を含み、

好ましくは、前記 F a b および s c F v は、配列番号 39 / 40 という V H と V L アミノ酸配列対を含み、

かつ好ましくは、s c F v が d s s c F v である場合、前記 V H と V L 配列に導入されたシステイン置換、例えば、V H 配列の 44 位と V L 配列の 100 位でのシステイン置換をさらに含む。

【0118】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖と第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は、k a p p a 軽鎖定常ドメイン C L _κ と l a m d a 軽鎖定常ドメイン C L _λ をそれ

それ含む。一具体的な実施形態において、軽鎖定常ドメイン CL_{κ} は、配列番号 105 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、軽鎖定常ドメイン CL_{λ} は、配列番号 106 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0119】

いくつかの好ましい実施形態において、第1重鎖ポリペプチド鎖と第2重鎖ポリペプチド鎖は、ヒト IgG1 に由来する重鎖定常領域 CH1 を含み、好ましくは、配列番号 104 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0120】

いくつかの好ましい実施形態において、第1重鎖ポリペプチド鎖と第2重鎖ポリペプチド鎖は、knob または相補的な hole 変異を含む Fc ドメインをそれぞれ含む。一具体的な実施形態において、knob 変異を含む Fc ドメインは T366W を含み、相補的な hole 変異を含む Fc ドメインは T366S、L368A および Y407V 変異を含む。一具体的な実施形態において、hole 変異を含む Fc ドメインは、配列番号 102 および 107 から選択されるアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、相補的な knob 変異を含む Fc ドメインは、配列番号 103 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0121】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれらなる Format__2 構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 65 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 66 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 67 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 68 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0122】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれらなる Format__2 構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 69 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 70 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 71 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

10

20

30

40

50

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号68のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0123】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれらなるFormat__2構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号72のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号73のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号74のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号68のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0124】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれらなるFormat__2構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号75のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号76のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号77もしくは78のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号68のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0125】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれらなるFormat__2構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号79のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号80のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号77のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号68のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

ノ酸配列を含む。

【0126】

Format__7

いくつかの実施形態において、 $q = 0$ かつ $p = 2$ の場合、本発明の抗体分子は、 $(M1 : M2 - (X1)_p) - Fc : : Fc$ の構造を有する。このようにして、前記抗体分子において、抗体アームに複合された複合成分 $X1$ のみがある。前記抗体分子において、抗体アーム $M1$ および $M2$ は、第1抗原および第2抗原にそれぞれ結合するFab抗原結合部位を含み、かつ複合成分 $X1$ は第3抗原に結合するscFv抗原結合部位を含み、ここで第1、第2、第3抗原はそれぞれ異なり、かつ互いに独立してGPCR5D、BCMAおよびCD3から選択される。

10

【0127】

したがって、いくつかの好ましい実施形態において、本発明は三重特異性Y型抗体分子を提供し、前記抗体分子は、以下：

$(M1 : M2 - (X1)_p) - Fc : : Fc$,

(Format__7)

の構造を有し、式中、 $p = 2$ であり、

$M1$ および $M2$ は、抗体分子の第1抗体アームおよび第2抗体アームをそれぞれ表し、かつ $M1$ および $M2$ は第1と第2抗原に結合するFabをそれぞれ含み、

$Fc : : Fc$ は抗体分子のステムを表し、ペアリングして二量体化された第1のFcドメインおよび第2のFcドメインで構成され、ここで第1と第2抗体アームは、直接または連結ペプチド（好ましくはヒンジ領域）を介して第1のFcドメインおよび第2のFcドメインのN末端にそれぞれ連結され、

20

$X1$ は抗体アームのC末端に複合された複合成分を表し、ここで前記複合成分は第3抗原に結合するscFvを含み、ここで $X1$ は、直接または連結ペプチドを介して第1と第2抗体アームのFab軽鎖のC末端に複合され、

ここで、第1、第2および第3抗原は互いに異なり、互いに独立してGPCR5D、BCMAおよびCD3から選択される。

【0128】

いくつかの実施形態において、本発明は、Format__7構造を有する三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

(a)：前記分子の抗体アーム $M1$ および抗体アーム $M2$ は、GPCR5Dに結合するFabおよびCD3に結合するFabをそれぞれ含み、かつ複合成分 $X1$ はBCMAに結合するscFvを含み、前記分子は、 $(Fab_GPCR5D : Fab_CD3 - (scFv_BCMA)_2) - Fc : : Fc$ の構造を有する（例えば、実施例TS-F7-1，2，5の分子）、あるいは

30

(b)：前記分子の抗体アーム $M1$ および抗体アーム $M2$ は、GPCR5Dに結合するFabおよびBCMAに結合するFabをそれぞれ含み、かつ複合成分 $X1$ はCD3に結合するscFvを含み、前記分子は、 $(Fab_GPCR5D : Fab_BCMA - (scFv_CD3)_2) - Fc : : Fc$ の構造を有する（例えば、実施例TS-F7-3，4の分子）、あるいは

(c) 前記分子の抗体アーム $M1$ および抗体アーム $M2$ は、BCMAに結合するFabおよびCD3に結合するFabをそれぞれ含み、かつ複合成分 $X1$ はGPCR5Dに結合するscFvを含み、前記分子は、 $(Fab_BCMA : Fab_CD3 - (scFv_GPCR5D)_2) - Fc : : Fc$ の構造を有する。

40

【0129】

前述した本発明のFormat__7抗体分子の任意の実施形態において、GPCR5Dに結合するFabまたはscFvは、GPCR5Dに特異的に結合する任意の適切なFabまたはscFv、例えば上述したscFvまたはFab構造を有する本発明のGPCR5D抗原結合部位であってもよく、特に上述したVHとVLアミノ酸配列を有するscFvまたはFabである。

前述した本発明のFormat__7抗体分子の任意の実施形態において、BCMAに結

50

合する F a b または s c F v は、B C M A に特異的に結合する任意の適切な F a b または s c F v、例えば上述した s c F v または F a b 構造を有する本発明の B C M A 抗原結合部位であってもよく、特に上述した V H と V L アミノ酸配列を有する s c F v または F a b である。

前述した本発明の F o r m a t __ 7 抗体分子の任意の実施形態において、C D 3 に結合する抗原結合部位は、C D 3 に特異的に結合する任意の適切な s c F v または F a b、例えば上述した s c F v または F a b 構造を有する本発明の C D 3 抗原結合部位であってもよく、特に上述した V H と V L アミノ酸配列を有する s c F v または F a b である。

【0130】

前述した本発明の F o r m a t __ 7 抗体分子の任意の実施形態において、抗体分子は、上述した F o r m a t __ 7 に適用される任意の本発明の抗体ステム構造を含んでもよい。例えば、本発明の F o r m a t __ 7 非対称三重特異性抗体分子において、好ましくは、抗体分子ポリペプチド鎖が正しくペアリングされるように促進するために、ステムの第 1 の F c ドメインおよび第 2 の F c ドメインに第 1 と第 2 の F c ドメインのヘテロ二量体化を促進できる変異、特に相補的な「ノブインホール」変異を導入することができる。例えば第 1 の F c ドメインに k n o b 変異を導入するとともに、第 2 の F c ドメインに相補的な h o l e 変異を導入し、または逆である。このようにして、前記抗体分子の 2 つの F c ドメインは、ペアリングして「ノブインホール」の安定した結合を形成することができる。予期される使用に応じて、本発明の F o r m a t __ 7 抗体分子の第 1 および／または第 2 の F c ドメインは好ましくは、A D C C 活性を低減する変異など、抗体エフェクター機能に影響を与える変異、例えば L A L A 変異をさらに含んでもよい。

【0131】

いくつかの実施形態において、本発明の F o r m a t __ 7 三重特異性抗体分子は、第 1 重鎖ポリペプチド鎖、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖、第 2 重鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなり、ここで、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン V H、免疫グロブリン C H 1 ドメインおよび F c ドメインを含み、

第 1 軽鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、軽鎖可変ドメイン V L、免疫グロブリン C L ドメインを含み、

第 2 重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン V H、免疫グロブリン C H 1 ドメインおよび F c ドメインを含み、

第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、軽鎖可変ドメイン V L、免疫グロブリン C L ドメインを含み、

かつ、ここで、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は、直接または好ましくは連結ペプチド（例えば（G 4 S）₂または T S（G 4 S）₂）を介してその C L ドメインの C 末端に複合された s c F v ドメインをさらに含み、

ここで、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖の V H - C H 1 と第 1 軽鎖ポリペプチド鎖の V L - C L がペアリングして第 1 抗原に結合する第 1 抗体アーム（M 1）を形成し、

第 2 重鎖ポリペプチド鎖の V H - C H 1 と第 2 軽鎖ポリペプチド鎖の V L - C L がペアリングして第 2 抗原に結合する第 2 抗体アーム（M 1）を形成し、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖の F c ドメインと第 2 重鎖ポリペプチド鎖の F c ドメインがペアリングおよび二量体化されて抗体ステム（F c : : F c）を形成し、かつ

第 1 軽鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖の C 末端に複合された s c F v ドメインは、第 3 抗原に結合する複合成分（X 1）を形成し、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原はそれぞれ異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0132】

一実施形態において、抗体アーム M 1 は G P C R 5 D に結合され、第 2 抗体アーム M 2 は C D 3 に結合され、複合成分 X 1 は B C M A に結合され、このようにして、

ー第1重鎖ポリペプチド鎖と第1軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはG P R C 5 Dに特異的に結合するF a b抗原結合部位のV HとV Lアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

ー第2重鎖ポリペプチド鎖と第2軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはC D 3に特異的に結合するF a b抗原結合部位のV HとV Lアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

かつ、第1軽鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖は、C末端にはB C M Aに特異的に結合するs c F vのアミノ酸配列がさらに含まれる。

【0133】

ー実施形態において、抗体アームM1はB C M Aに結合され、第2抗体アームM2はC D 3に結合され、複合成分X1はG P C R 5 Dに結合され、このようにして、

ー第1重鎖ポリペプチド鎖と第1軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはB C M Aに特異的に結合するF a b抗原結合部位のV HとV Lアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

ー第2重鎖ポリペプチド鎖と第2軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはC D 3に特異的に結合するF a b抗原結合部位のV HとV Lアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

かつ、第1軽鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖は、C末端にはG P R C 5 Dに特異的に結合するs c F vのアミノ酸配列がさらに含まれる。

【0134】

ー実施形態において、抗体アームM1はG P C R 5 Dに結合され、第2抗体アームM2はB C M Aに結合され、複合成分X1はC D 3に結合され、このようにして、

ー第1重鎖ポリペプチド鎖と第1軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはG P R C 5 Dに特異的に結合するF a b抗原結合部位のV HとV Lアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

ー第2重鎖ポリペプチド鎖と第2軽鎖ポリペプチド鎖は、N末端にはB C M Aに特異的に結合するF a b抗原結合部位のV HとV Lアミノ酸配列がそれぞれ含まれ、

かつ、第1軽鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖は、C末端にはC D 3に特異的に結合するs c F vのアミノ酸配列がさらに含まれる。

【0135】

好ましいー実施形態において、G P R C 5 Dに特異的に結合するF a bまたはs c F vは、以下の群：

(a) 配列番号1～3のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号4～6のL C D R 1～3配列を含むV L、

(b) 配列番号7～8のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号10～12のL C D R 1～3配列を含むV L、

(c) 配列番号13～15のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号16～18のL C D R 1～3配列を含むV L、または

(d) 配列番号19～21のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号22～24のL C D R 1～3配列を含むV L、

から選択されるV HとV Lを含み、

好ましくは、前記F a bおよび前記s c F vは、以下の群：配列番号25／26、配列番号27／28、配列番号29／30および配列番号31／32から選択されるV HとV Lアミノ酸配列対を含み、

かつ好ましくは、s c F vがd s s c F vである場合、前記V HとV L配列に導入されたシステイン置換、例えば、V H配列の44位とV L配列の100位でのシステイン置換をさらに含む。

【0136】

好ましいー実施形態において、前記C D 3に特異的に結合するF a bまたはs c F vは、以下の群：

(a) 配列番号41～43のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号44～46のL C D R 1～3配列を含むV L、または

(b) 配列番号41、47、43のH C D R 1～3配列を含むV Hおよび配列番号44～46のL C D R 1～3配列を含むV L、

から選択されるV HとV Lを含み、

好ましくは、前記 F a b および s c F v は、以下の群：配列番号 48 / 49、配列番号 50 / 49、かつより好ましくは配列番号 48 / 49 から選択される V H と V L アミノ酸配列対を含み、

かつ好ましくは、s c F v が d s s c F v である場合、前記 V H と V L 配列に導入されたシステイン置換、例えば、V H 配列の 44 位と V L 配列の 100 位でのシステイン置換をさらに含む。

【0137】

好ましい一実施形態において、前記 B C M A に特異的に結合する F a b または s c F v は、以下：

配列番号 33 ~ 35 の H C D R 1 ~ 3 配列を含む V H および配列番号 36 ~ 38 の L C D R 1 ~ 3 配列を含む V L、という V H と V L を含み、

好ましくは、前記 F a b および s c F v は、配列番号 39 / 40 という V H と V L アミノ酸配列対を含み、

かつ好ましくは、s c F v が d s s c F v である場合、前記 V H と V L 配列に導入されたシステイン置換、例えば、V H 配列の 44 位と V L 配列の 100 位でのシステイン置換をさらに含む。

【0138】

いくつかの実施形態において、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖と第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は、k a p p a 軽鎖定常ドメイン C L_κ を含む。いくつかの実施形態において、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖と第 2 軽鎖ポリペプチド鎖は、l a m d a 軽鎖定常ドメイン C L_λ を含む。一具体的な実施形態において、軽鎖定常ドメイン C L_κ は、配列番号 105 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。一具体的な実施形態において、軽鎖定常ドメイン C L_λ は、配列番号 106 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0139】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 重鎖ポリペプチド鎖と第 2 重鎖ポリペプチド鎖は、ヒト I g G 1 に由来する重鎖定常領域 C H 1 を含み、好ましくは、配列番号 104 のアミノ酸配列またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0140】

いくつかの好ましい実施形態において、第 1 重鎖ポリペプチド鎖と第 2 重鎖ポリペプチド鎖は、k n o b または相補的な h o l e 変異を含む F c ドメインをそれぞれ含む。一具体的な実施形態において、k n o b 変異を含む F c ドメインは T 366 W を含み、相補的な h o l e 変異を含む F c ドメインは T 366 S、L 368 A および Y 407 V 変異を含む。一具体的な実施形態において、k n o b 変異を含む F c ドメインは、配列番号 102 および 107 から選択されるアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、相補的な h o l e 変異を含む F c ドメインは、配列番号 103 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0141】

いくつかの実施形態において、本発明は、第 1 重鎖ポリペプチド鎖、第 1 軽鎖ポリペプチド鎖、第 2 重鎖ポリペプチド鎖および第 2 軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれらなる F o r m a t _ 7 構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第 1 重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 87 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第 1 軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 88 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 9

10

20

30

40

50

0%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号77もしくは78のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号89のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0142】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなるFormat_7構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号90のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号91のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号77のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号89のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0143】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖、第1軽鎖ポリペプチド鎖、第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなるFormat_7構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号92のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第1軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号93もしくは96のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号94のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号95または97のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0144】

Format_1

いくつかの実施形態において、 $p = 0$ かつ $q = 1$ の場合、本発明の抗体分子は、 $(M1 : M2) - Fc : : Fc - (X2)_q$ の構造を有し、ここで抗体アームM1、M2および複合成分X2は、第1抗原、第2抗原および第3抗原に結合するscFv抗原結合部位をそれぞれ含み、ここで第1、第2、第3抗原はそれぞれ異なり、かつ互いに独立してGPRC5D、BCMAおよびCD3から選択される。

【0145】

したがって、いくつかの好ましい実施形態において、本発明は三重特異性Y型抗体分子を提供し、前記抗体分子は、以下：

(M1:M2)-Fc::Fc-(X2)q, (Format_1)

の構造を有し、式中、 $q=1$ であり、

M1およびM2は、抗体分子の第1抗体アームおよび第2抗体アームをそれぞれ表し、かつM1およびM2は第1と第2抗原に結合するscFvをそれぞれ含み、

Fc::Fcは抗体分子のステムを表し、ペアリングして二量体化された第1のFcドメインおよび第2のFcドメインで構成され、ここで第1と第2抗体アームは、直接または連結ペプチド（好ましくはヒンジ領域）を介して第1のFcドメインおよび第2のFcドメインのN末端にそれぞれ連結され、

X2はステムのC末端に複合された複合成分を表し、ここで前記複合成分は第3抗原に結合するscFvを含み、ここでX2は、直接または連結ペプチドを介して第1のFcドメインのC末端に複合され、あるいは第2のFcドメインのC末端に複合され、

ここで、第1、第2および第3抗原は互いに異なり、互いに独立してGPCR5D、BCMAおよびCD3から選択される。

【0146】

いくつかの実施形態において、本発明は、Format_1構造を有する三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

(a)：前記分子の抗体アームM1および抗体アームM2は、GPCR5Dに結合するscFvおよびCD3に結合するscFvをそれぞれ含み、かつ複合成分X2はBCMAに結合するscFvを含み、前記分子は、(scFv__GPCR5D:scFv__CD3)-Fc::Fc-(scFv__BCMA)の構造を有する（例えば、実施例TS-F1-1の分子）、あるいは

(b)：前記分子の抗体アームM1および抗体アームM2は、BCMAに結合するscFvおよびCD3に結合するscFvをそれぞれ含み、かつ複合成分X2はGPCR5Dに結合するscFvを含み、前記分子は、(scFv__BCMA:scFv__CD3)-Fc::Fc-(scFv__GPCR5D)の構造を有する（例えば、実施例TS-F1-2の分子）。

【0147】

いくつかの実施形態において、本発明のFormat_1三重特異性抗体分子は、第1重鎖ポリペプチド鎖および第2重鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなり、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖はN末端からC末端まで、第1scFvおよびFcドメインを含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖はN末端からC末端まで、第2scFvおよびFcドメインを含み、

かつ、ここで、第1重鎖ポリペプチド鎖または第2重鎖ポリペプチド鎖は、直接または好ましくは連結ペプチド（例えば(G4S)₂またはTS(G4S)₂）を介してそのFcドメインのC末端に複合された第3のscFvドメインをさらに含み、

ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖の第1のscFvは、第1抗原に結合する第1抗体アーム(M1)を形成し、

第2重鎖ポリペプチド鎖の第2のscFvは、第2抗原に結合する第2抗体アーム(M1)を形成し、

第1重鎖ポリペプチド鎖のFcドメインと第2重鎖ポリペプチド鎖のFcドメインがペアリングおよび二量体化されて抗体ステム(Fc::Fc)を形成し、かつ

第1重鎖ポリペプチド鎖または第2重鎖ポリペプチド鎖のC末端に複合された第3のscFvドメインは、第3抗原に結合する複合成分(X2)を形成し、

ここで、第1、第2および第3抗原はそれぞれ異なり、互いに独立してGPCR5D、BCMAおよびCD3から選択される。

【0148】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖および第2重鎖ポリ

10

20

30

40

50

ペプチド鎖を含むか、またはそれからなる **Format__1** 構造を有する三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号61のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号62のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0149】

いくつかの実施形態において、本発明は、第1重鎖ポリペプチド鎖および第2重鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなる **Format__1** 構造を有する三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

第1重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号63のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

第2重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号64のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、99%もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0150】

Format__6

いくつかの実施形態において、 $p = 2$ かつ $q = 2$ の場合、本発明の抗体分子は、 $(M1 : M2 - (X2)_p) - Fc : : Fc - (X2)_q$ の構造を有し、ここで抗体アームM1およびM2は、第1抗原に結合するFab抗原結合部位を含み、かつ複合成分X1およびX2は、第2抗原と第3抗原に結合するscFv抗原結合部位をそれぞれ含み、ここで第1、第2および第3抗原はそれぞれ異なり、かつ互いに独立してGPRC5D、BCMAおよびCD3から選択される。

【0151】

したがって、いくつかの好ましい実施形態において、本発明は三重特異性対称Y型抗体分子を提供し、前記抗体分子は、以下：

$(M1 : M2 - (X2)_p) - Fc : : Fc - (X2)_q$,

(**Format__6**)

の構造を有し、式中、 $p = 2$ かつ $q = 2$ であり、

M1およびM2は、抗体分子の第1抗体アームおよび第2抗体アームをそれぞれ表し、かつM1およびM2はいずれも、第1抗原に結合するFabを含み、

Fc : : Fcは抗体分子のステムを表し、ペアリングして二量化された第1のFcドメインおよび第2のFcドメインで構成され、ここで第1と第2抗体アームは、直接または連結ペプチド（好ましくはヒンジ領域）を介して第1のFcドメインおよび第2のFcドメインのN末端にそれぞれ連結され、

X1およびX2は、抗体アームFab軽鎖のC末端またはステムFcドメインのC末端に複合された複合成分をそれぞれ表し、ここで前記複合成分X1は第2抗原に結合するscFvを含み、前記複合成分X2は第3抗原に結合するscFvを含み、ここでX1およびX2は、直接または連結ペプチドを介してアームまたはステムに複合され、

ここで、第1、第2および第3抗原は互いに異なり、互いに独立してGPRC5D、BCMAおよびCD3から選択される。

【0152】

いくつかの実施形態において、本発明は、**Format__6** 構造を有する三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

(a) 前記分子の抗体アームM1および抗体アームM2はGPRC5Dに結合するFabを含み、複合成分X1はCD3のscFvを含み、かつ複合成分X2はBCMAに結合するscFvを含み、前記分子は、 $(Fab_GPRC5D : Fab_GPRC5D - ($

10

20

30

40

50

$s c F v_C D 3)_2) - F c : : F c - (s c F v_B C M A)_2$ の構造を有する（例えば、実施例 T S - F 6 - 1, 2 の分子）、あるいは

(b) : 前記分子の抗体アーム M 1 および抗体アーム M 2 は B C M A に結合する F a b を含み、複合成分 X 1 は C D 3 の $s c F v$ を含み、かつ複合成分 X 2 は G P R C 5 D に結合する $s c F v$ を含み、前記分子は、 $(F a b_B C M A : F a b_B C M A - (s c F v_C D 3)_2) - F c : : F c - (s c F v_G P R C 5 D)_2$ の構造を有する（例えば、実施例 T S - F 6 - 3, 4 の分子）。

【0153】

いくつかの実施形態において、本発明の F o r m a t _ 6 三重特異性抗体分子は、2本の同じ重鎖ポリペプチド鎖および2本の同じ軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなり、ここで、

前記重鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、重鎖可変ドメイン V H、免疫グロブリン C H 1 ドメイン、F c ドメイン、および第 1 の $s c F v$ ドメインを含み、

前記軽鎖ポリペプチド鎖は N 末端から C 末端まで、軽鎖可変ドメイン V L、免疫グロブリン C L ドメインおよび第 2 の $s c F v$ ドメインを含み、

ここで、前記重鎖ポリペプチド鎖と軽鎖ポリペプチド鎖の第 1 と第 2 の $s c F v$ ドメインは、直接または好ましく連結ペプチド（例えば (G 4 S) 2 または T S (G 4 S) 2）を介してその C 末端にそれぞれ複合され、

ここで、

1 本の重鎖ポリペプチド鎖の N 末端の V H - C H 1 ドメインと 1 本の軽鎖ポリペプチド鎖の N 末端の V L - C H 1 ドメインがペアリングして第 1 抗原に結合する第 1 抗体アーム (M 1) を形成し、

もう 1 本の重鎖ポリペプチド鎖の N 末端の V H - C H 1 ドメインと 1 本の軽鎖ポリペプチド鎖の N 末端の V L - C H 1 ドメインがペアリングして第 1 抗原に結合する第 2 抗体アーム (M 2) を形成し、

2 本の重鎖ポリペプチド鎖の F c ドメインがペアリングして形成し、二量体化されて抗体ステム (F c : : F c) を形成し、かつ

2 本の軽鎖ポリペプチド鎖の C 末端に複合された $s c F v$ ドメインは、第 2 抗原に結合する複合成分 (X 1) を形成し、

2 本の重鎖ポリペプチド鎖の C 末端に複合された $s c F v$ ドメインは、第 3 抗原に結合する複合成分 (X 2) を形成し、

ここで、第 1、第 2 および第 3 抗原はそれぞれ異なり、互いに独立して G P R C 5 D、B C M A および C D 3 から選択される。

【0154】

いくつかの実施形態において、本発明は、2本の同じ重鎖ポリペプチド鎖および2本の同じ軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなる F o r m a t _ 6 構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

前記重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 8 1 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 8 2 もしくは 8 3 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0155】

いくつかの実施形態において、本発明は、2本の同じ重鎖ポリペプチド鎖および2本の同じ軽鎖ポリペプチド鎖を含むか、またはそれからなる F o r m a t _ 6 構造の三重特異性抗体分子を提供し、ここで、

前記重鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 8 4 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、99% もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含み、

10

20

30

40

50

前記軽鎖ポリペプチド鎖は、配列番号 85 もしくは 86 のアミノ酸配列、またはそれと少なくとも 90 %、92 %、95 %、97 %、98 %、99 % もしくはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0156】

III. 本発明の GPRC5D 抗体分子

一態様において、本発明は、GPRC5D に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。いくつかの好ましい実施形態において、本発明の GPRC5D 抗体またはその抗原結合断片は、

(i) 配列番号 25 に示される重鎖可変ドメインの HCDR1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 26 に示される軽鎖可変ドメインの LCDR1、2 および 3 の配列、または

10

(ii) 配列番号 27 に示される重鎖可変ドメインの HCDR1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 28 に示される軽鎖可変ドメインの LCDR1、2 および 3 の配列、または

(iii) 配列番号 29 に示される重鎖可変ドメインの HCDR1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 30 に示される軽鎖可変ドメインの LCDR1、2 および 3 の配列、または

(iv) 配列番号 31 に示される重鎖可変ドメインの HCDR1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 32 に示される軽鎖可変ドメインの LCDR1、2 および 3 の配列、または

20

(v) 配列番号 98 に示される重鎖可変ドメインの HCDR1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 99 に示される軽鎖可変ドメインの LCDR1、2 および 3 の配列、または

(vi) 配列番号 100 に示される重鎖可変ドメインの HCDR1、2 および 3 の配列、ならびに配列番号 101 に示される軽鎖可変ドメインの LCDR1、2 および 3 の配列、を含む。

【0157】

他のいくつかの実施形態において、本発明の GPRC5D 抗体またはその抗原結合断片は、

(i) それぞれ配列番号 1～6 に示される重鎖可変ドメイン HCDR1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン LCDR1、2 および 3 の配列、または

30

(ii) それぞれ配列番号 7～12 に示される重鎖可変ドメイン HCDR1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン LCDR1、2 および 3 の配列、または

(iii) それぞれ配列番号 13～18 に示される重鎖可変ドメイン HCDR1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン LCDR1、2 および 3 の配列、または

(iv) それぞれ配列番号 19～24 に示される重鎖可変ドメイン HCDR1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン LCDR1、2 および 3 の配列、または

(v) それぞれ配列番号 13、110 および 18 に示される重鎖可変ドメイン HCDR1、2 および 3 の配列ならびに軽鎖可変ドメイン LCDR1、2 および 3 の配列、から選択される CDR 配列の組み合わせを含む。

40

【0158】

さらなるいくつかの実施形態において、本発明の GPRC5D 抗体分子またはその抗原結合断片は、

(a) 配列番号 25 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 26 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(b) 配列番号 27 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む

50

む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 28 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) 配列番号 29 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 30 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(d) 配列番号 31 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 32 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(e) 配列番号 98 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 99 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(f) 配列番号 100 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 101 に示されるアミノ酸配列またはそれと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 % もしくは 99 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、から選択される V H と V L アミノ酸配列の組み合わせを含む。

【0159】

好ましくは、本発明の G P R C 5 D 抗体分子またはその抗原結合断片は、

(i) 配列番号 25 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(i i) 配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(i i i) 配列番号 29 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 30 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(i v) 配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(v) 配列番号 98 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 99 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(v i) 配列番号 100 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号 101 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、から選択される V H と V L アミノ酸配列の組み合わせを含む。

【0160】

いくつかの実施形態において、本発明の G P R C 5 D 抗体は、単一特異性抗体、二重特異性抗体または三重特異性抗体である。いくつかの好ましい実施形態において、本発明の G P R C 5 D 抗体は、C D 3 に結合する抗原結合部位、例えば上述した本発明の C D 3 抗原結合部位をさらに含む二重特異性抗体である。別のいくつかの好ましい実施形態において、本発明の G P R C 5 D 抗体は、B C M A に結合する抗原結合部位（例えば上述した本発明の B C M A 抗原結合部位）および C D 3 に結合する抗原結合部位（例えば、上述した本発明の C D 3 抗原結合部位）をさらに含む三重特異性抗体である。

【0161】

いくつかの実施形態において、本発明の G P R C 5 D 抗体は、G P R C 5 D および C D 3 に結合する二重特異性抗体であり、

好ましくは、ここで、前記抗体は、CD3に結合する以下の群：

(a) 配列番号41～43のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号44～46のLCDR1～3配列を含むVL、または

(b) 配列番号47、42、43のHCDR1～3配列を含むVHおよび配列番号44～46のLCDR1～3配列を含むVL、

から選択されるVHとVLアミノ酸配列対を含み、

好ましくは、以下の群：配列番号48／49および配列番号50／49から選択されるVHとVLアミノ酸配列対を含み、

場合により、前記VHとVL配列には、導入したシステイン置換、例えば、VH配列の44位およびVL配列の100位でのシステイン置換が含まれ、このようにして前記VHとVLとの間にジスルフィド結合を形成する。

【0162】

したがって、好ましい一実施形態において、本発明は、GPCR5DおよびCD3に結合する二重特異性抗体を提供しており、ここで前記抗体は、以下の群から選択されるGPCR5Dに結合するVHとVLアミノ酸配列対およびCD3に結合するVHとVLアミノ酸配列対の組み合わせを含む。

【表2】

組み合わせ	GPCR5Dに結合するVHとVLアミノ酸配列対	CD3に結合するVHとVLアミノ酸配列対
1	配列番号25と配列番号26	配列番号48と配列番号49
2	配列番号27と配列番号28	配列番号48と配列番号49
3	配列番号29と配列番号30	配列番号48と配列番号49
4	配列番号31と配列番号32	配列番号48と配列番号49
5	配列番号25と配列番号26	配列番号50と配列番号49
6	配列番号27と配列番号28	配列番号50と配列番号49
7	配列番号29と配列番号30	配列番号50と配列番号49
8	配列番号31と配列番号32	配列番号50と配列番号49

【0163】

本発明は、前記二重特異性抗体の変異体をさらに提供し、ここで前記変異体は、前記GPCR5Dに結合するVHとVLアミノ酸配列対、および／または、前記CD3に結合するVHとVLアミノ酸配列対にはアミノ酸の置換、欠失および／または挿入などのアミノ酸変異が含まれ、ここで前記アミノ酸変異は、二重特異性抗体のGPCR5DおよびCD3への結合に影響を与えない。いくつかの実施形態において、前記変異体は、以下から選択されるアミノ酸配列の組み合わせを含む。

【表 3 - 1】

組み合わせ	GPRC5Dに結合するVHとVLアミノ酸配列対	CD3に結合するVHとVLアミノ酸配列対
1	配列番号25と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号26と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列	配列番号48と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号49と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列
2	配列番号27と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号28と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列	配列番号48と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号49と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列
3	配列番号29と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号30と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列	配列番号48と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号49と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列
4	配列番号31と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号32と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列	配列番号48と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列、および 配列番号49と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVLアミノ酸配列
5	配列番号25と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列	配列番号50と少なくとも90%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するVHアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	、および 配列番号 26 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	酸配列、および 配列番号 49 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	
6	配列番号 27 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VH アミノ酸配列、および 配列番号 28 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	配列番号 50 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VH アミノ酸配列、および 配列番号 49 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	10
7	配列番号 29 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VH アミノ酸配列、および 配列番号 30 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	配列番号 50 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VH アミノ酸配列、および 配列番号 49 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	20
8	配列番号 31 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VH アミノ酸配列、および 配列番号 32 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	配列番号 50 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VH アミノ酸配列、および 配列番号 49 と少なくとも 90%、95%、96%、97%、98% もしくは 99% の同一性を有する VL アミノ酸配列	30

【0164】

好ましい一実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、前記 GPRC5D に結合する VH と VL アミノ酸配列対、および／または、前記 CD3 に結合する VH と VL アミノ酸配列対に導入したシステイン置換、例えば、VH 配列の 44 位および VL 配列の 100 位でのシステイン置換を含み、このようにして前記 VH と VL との間にジスルフィド結合を形成する。

【0165】

本発明は、本発明の GPRC5D 抗体を含む融合タンパク質と免疫複合体（例えば毒素または化学小分子との複合）、および医薬組成物ならびに薬物組合せをさらに提供する。医薬組成物または薬物組合せにおいて、本発明の抗体は、本発明の抗体の予期される使用に適用できる他の治療剤などの他の治療剤、例えば、化学療法剤、放射線療法剤、腫瘍抑

10

20

30

40

50

制分子を含んでもよい。

【0166】

IV．本発明の抗体分子の製造および精製

さらなる態様において、本発明は、本発明の抗体分子を製造するための方法を提供し、前記方法は、前記抗体を発現するのに適するポリペプチド鎖の条件で前記ポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することと、前記ポリペプチド鎖を前記抗体分子に組み立てるのに適する条件でポリペプチド鎖を組み立てて前記抗体を生成することと、を含む。

【0167】

本発明の抗体分子が、第1重鎖ポリペプチド鎖および第1軽鎖ポリペプチド鎖ならびに第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖を含む三重特異性抗体分子などの非対称抗体分子、例えばFormat__2およびFormat__7の抗体分子である場合、好ましくは、本発明の抗体分子の製造方法は、前記抗体分子を発現するのに適する第1重鎖ポリペプチド鎖および第1軽鎖ポリペプチド鎖の条件で、前記第1重鎖および第1軽鎖をコードするものを含む宿主細胞を培養し、第1親タンパク質を生成するステップ(i)と、前記抗体分子を発現するのに適する第2重鎖ポリペプチド鎖および第2軽鎖ポリペプチド鎖の条件で、前記第2重鎖および第2軽鎖をコードするものを含む宿主細胞を培養し、第2親タンパク質を生成するステップ(ii)と、第1親タンパク質と第2親タンパク質とを等モル比率で混合し、インビトロで適切な酸化還元条件に置いて組み立てて前記抗体を形成するステップ(iii)と、を含む。一具体的な実施形態において、ステップ(iii)は、精製した第1と第2親タンパク質の混合溶液にグルタチオン(GSH)を加えることを含み、ここで、好ましくは、GSH／タンパク質のモル比率を500倍～700倍に制御する。一具体的な実施形態において、ステップ(iii)は、GSHを除去した後、一定の時間(例えば2時間～3時間)の自然酸化を行うことをさらに含む。

【0168】

本発明の抗体分子のポリペプチド鎖は、例えば、固相ペプチド合成(例えば、Merrifield固相合成)または組換えにより製造できる。組換え製造において、宿主細胞でクローニングおよび／または発現するために、前記抗体分子のいずれか1本のポリペプチド鎖および／または複数本のポリペプチド鎖をコードするポリヌクレオチドを単離し、1つまたは複数のベクターに挿入する。通常の方法を用いて、前記ポリヌクレオチドを簡易に単離してシーケンシングすることができる。一実施形態において、本発明の1種または複数種のポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくは発現ベクターを提供する。

【0169】

当業者が公知する方法を用いて発現ベクターを構築することができる。発現ベクターは、ウイルス、プラスミド、コスミド、λファージまたは酵母人工染色体(YAC)を含むが、これらに限定されない。

本発明の1種または複数種のポリヌクレオチドを含む発現用の発現ベクターを調製できたら、発現ベクターを適切な宿主細胞にトランスフェクションまたは導入できる。この目的を達成させるためには、例えば、プロトプラスト融合、リン酸カルシウム共沈殿、エレクトロポレーション、レトロウイルス形質導入、ウイルストランスフェクション、パーティクルガン、リポソームに基づくトランスフェクションまたは他の一般的な技術など、さまざまな技術を利用できる。

【0170】

一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドを含む1種または複数種の宿主細胞を提供する。いくつかの実施形態において、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。本明細書で使用される用語「宿主細胞」は、工学的手法により本発明の抗体分子を産生できる任意の種類の細胞系を指す。複製および本発明の抗体分子の発現をサポートするのに適する宿主細胞は、本分野で公知する事項である。必要に応じて、このような細胞は特定の発現ベクターを用いてトランスフェクションまたは形質導入することができ、しかもベクターを含む多くの細胞を培養して大型の発酵槽に接種して、臨床用として十分な量

の本発明の抗体分子を得ることができる。適切な宿主細胞は、大腸菌などの原核微生物、糸状真菌もしくは酵母などの真核微生物、または、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、昆虫細胞などのさまざまな真核細胞を含む。懸濁培養に適する哺乳動物細胞系を用いることができる。使用可能な哺乳動物宿主細胞系の例としては、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）、ヒト胎児腎臓株（HEK 293または293F細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリサル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸癌細胞（HELA）、犬腎臓細胞（MDCK）、パッファローラット肝細胞（BRL 3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝臓細胞（Hep G2）、CHO細胞、NSO細胞、骨髄腫細胞株、例えばYO、NSO、P3X63およびSp2／0などが挙げられる。タンパク質の産生に適する哺乳動物宿主細胞株に関する概要は、例えば、Yazaki & Wu, Methods in Molecular Biology, 第248巻（B. K. C. Lo編集, Human a Press, Totowa, NJ）, p255～268（2003）が参照される。好ましい一実施形態において、前記宿主細胞はCHO、HEK293またはNSO細胞である。

10

本明細書に記載の通り調製された抗体分子は、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの既知の従来技術により精製することができる。特定のタンパク質を精製するための実際の条件は、正味電荷、疎水性、親水性などの要素にも依存し、これは当業者にとって公知する内容である。

20

本発明の抗体分子の純度は、さまざまな公知する分析方法のいずれかにより決定でき、前記公知する分析方法は、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィーなどを含む。本明細書に係る抗体分子の物理的／化学的特性および／または生物学的活性は、本分野の公知するさまざまな測定法により、同定し、選別しまたはその特性評価を行うことができる。

【0171】

V．医薬組成物、薬物組合せおよび試薬キット

一態様において、本発明は、組成物、例えば、医薬組成物を提供し、前記組成物は、薬学的に許容可能なベクターと配合される本明細書に記載の抗体分子を含む。本明細書で使用される「薬学的に許容可能なベクター」は、生理学的に適合性がある溶剤、分散媒体、等張剤、吸収遅延剤などのいずれかまたはその全てを含む。本発明の医薬組成物は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、直腸投与、脊髄投与または表皮投与（例えば、注射または輸注）に適する。いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子は、医薬組成物中の唯一の活性成分である。他のいくつかの実施形態において、医薬組成物は、本明細書に記載の抗体分子および1つ以上の治療剤を含んでもよい。

30

【0172】

別の態様において、本発明は、本明細書に記載の抗体分子および1つ以上の治療剤を含む薬物組合せをさらに提供する。

【0173】

本発明の医薬組成物および薬物組合せに適用される治療剤は、以下のカテゴリ（i）～（iii）：（i）抗原提示（例えば、腫瘍抗原提示）を増強する薬物、（ii）エフェクター細胞応答（例えば、B細胞および／またはT細胞活性化および／または動員）を増強する薬物、（iii）免疫抑制を軽減する薬物、（iv）腫瘍抑制効果を有する薬物、から選択されるいずれか1つの治療剤であってもよい。

40

【0174】

本発明の組成物は、さまざまな形態で存在することができる。これらの形態は、液体、半固体および固体の剤型、例えば、液体溶液剤（例えば、注射用溶液剤、輸注用溶液剤）、分散体剤もしくは懸濁剤、リポソーム剤および坐剤を含む。好ましい形態は、所望の投与モードと治療的使用によって決定する。一般的に好ましくは、組成物が注射用溶液剤または輸注用溶液剤の形態である。好ましい投与モードは、非経口（例えば、静脈内、皮下

50

、腹腔内（i. p.）、筋肉内）注射である。好ましい一実施形態において、抗体分子は静脈内注入または注射により投与される。別の好ましい実施形態において、抗体分子は筋肉内、腹腔内または皮下注射により投与される。

【0175】

本明細書で使用される用語「非経口投与」および「非経口方式投与」は、経腸投与および局所投与以外の投与モードを指し、一般には注射して投与されるが、静脈内、筋肉内、動脈内、皮内、腹腔内、経気管、皮下注射、輸注を含むが、これらに限定されない。

【0176】

治療用組成物は一般に、滅菌されたものであり、しかもその製造・保管条件において安定している。組成物は溶液、マイクロエマルジョン、分散体、リポソームまたは凍結乾燥物の形態として調製することができる。活性化合物（すなわち抗体分子）を所定の量で適切な溶剤に加え、次にろ過・消毒することによって、滅菌された注射用溶液剤を調製することができる。一般には、前記活性化合物を滅菌溶媒に混入することによって分散体を調製し、前記滅菌溶媒は基礎となる分散媒体と他の成分を含む。レシチンなどのコーティング剤を用いることができる。分散体である場合は、界面活性剤を用いて溶液剤に適切な流動性を維持できる。吸収を遅延させる物質、例えばモノステアレート、ゼラチンを組成物に含有させることによって注射用組成物の吸収を引き伸ばすことができる。

【0177】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子は経口投与され、例えば、不活性希釈剤または食用可能ベクターとともに経口投与される。本発明の抗体分子は、ハードゼラチンカプセルまたはソフトゼラチンカプセルに封入されるか、錠剤に圧縮されてもよいし、またはそのまま対象の食事に混入されてもよい。経口投与して治療に使用される場合は、前記化合物は、賦形剤とともに混入され、摂取される錠剤、頬錠、トローチ剤（troche）、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハ剤（wafer）などの形態で使用されてもよい。本発明の抗体分子を非経口経路で投与するためには、前記抗体分子をその不活性化を防ぐ材料でコーティングするか、または当該材料とともに投与する場合がある。さらに治療用組成物は、本分野で公知する医療機器を用いて投与できる。

【0178】

本発明の医薬組成物は、「治療有効量」または「予防有効量」の本発明に記載の抗体分子を含んでもよい。「治療有効量」とは、必要な期間にわたって必要な用量で所望の治療結果を効果的に実現するための量を指す。治療有効量は、病状、個体の年齢、性別、体重などの多くの要因によって異なる。治療有効量は、毒性または害が治療による有益な効果に及ばないような任意の量である。治療を受けていない対象と比べ、「治療有効量」は、測定可能なパラメータ（例えば、腫瘍増殖率）を好ましくは少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらに好ましくは少なくとも約60%、一層好ましくは少なくとも約80%抑制する。前記測定可能なパラメータ（例えば、腫瘍体積）に対する本発明の抗体分子の抑制能力は、ヒト腫瘍における効果を示すための動物モデルシステムにおいて評価できる。

【0179】

「予防有効量」とは、必要な期間にわたって必要な用量で所望の予防結果を効果的に実現するための量を指す。一般には、予防的用量は疾患の早期より前にまたは比較的初期の段階で対象に使用されるため、予防有効量は治療有効量を下回る。

【0180】

本明細書に記載の抗体分子を含む試薬キットも本発明の範囲内である。キットは、1つまたは複数の他の要素を含んでもよく、例えば、取扱説明書、マーカーまたはカップリングのための試薬などの他の試薬、薬学的に許容可能なベクター、対象への投与のための装置もしくは他の材料を含む。

【0181】

V. 本発明の分子の使用および方法

一態様において、本発明は、本発明の抗体分子のインビボ、インビトロでの使用および

10

20

30

40

50

適用方法を提供する。

【0182】

いくつかの実施形態において、本発明の使用および方法は、本発明の抗体分子のインビボおよび／またはインビトロでの以下の適用に関する。

－細胞の表面にGPRC5D抗原を発現することを含む、10nM未満のKDなどの高親和性で、GPRC5D抗原に結合すること、

－T細胞（例えば、CD4＋および／またはCD8＋T細胞）を、その表面にGPRC5Dを発現する細胞、特にGPRC5D陽性腫瘍細胞を標的とすること、

－T細胞（例えば、CD4＋および／またはCD8＋T細胞）を、その表面にBCMAを発現する細胞、特にBCMA陽性腫瘍細胞を標的とすること、

－T細胞のCD3下流シグナル伝達経路を活性化すること、

－GPRC5D陽性腫瘍細胞および／またはBCMA陽性腫瘍細胞に対するT細胞の殺傷効果を介在すること、

－T細胞がTNF- α 、IFN- γ 、およびIL-2などのサイトカインを放出するように誘導すること、

－GPRC5D陽性および／またはBCMA陽性腫瘍細胞を抑制または殺傷すること、または

－BCMA陽性患者集団、GPRC5D陽性患者集団、抗BCMA分子に結合した後のBCMA喪失を伴うGPRC5D陽性患者集団を治療するなど、GPRC5D陽性および／またはBCMA陽性多発性骨髄腫を治療すること、

－多発性骨髄腫の再発など、BCMAエスケープ介在性腫瘍の再発を回避すること。

【0183】

いくつかの実施形態において、本発明の抗体分子または本発明の抗体分子を含む医薬組成物は、個体において疾患を治療および／または予防するための薬物として使用され、あるいは疾患の診断ツールとして使用され、好ましくは、前記個体は哺乳動物、より好ましくはヒトである。

【0184】

いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の抗体分子、特に三重特異性抗体分子を使用した癌の治療方法および使用を提供し、ここで、前記癌は、多発性骨髄腫、黒色腫、B細胞リンパ腫から選択されてもよい。好ましくは、前記癌は多発性骨髄腫である。BCMAおよびGPRC5Dに対する抗原結合特異性を有するため、本発明の三重特異性抗体分子は、BCMAおよびCD3を標的とする二重特異性抗体ならびにGPRC5DおよびCD3を標的とする二重特異性抗体よりも、さらに広範な癌治療の患者集団を有することができる。いくつかの実施形態において、本発明は、本発明の三重特異性抗体分子を使用したBCMA陰性癌またはBCMA低発現癌の治療方法を提供する。さらなるいくつかの実施形態において、本発明は、本発明の三重特異性抗体分子を使用したGPRC5DおよびCD3二重陽性癌の治療を提供する。

【0185】

一態様において、本発明は、血清、精液、尿または組織生検試料（例えば、過剰増殖性または癌性の病巣に由来する）などの生体試料中の関連抗原の存在をインビトロまたはインビボで検出する診断方法を提供する。当該診断方法は、（i）相互作用が生じることが認められる条件において、試料（および場合により、対照試料）を本明細書に記載の抗体分子と接触させ、または対象に前記抗体を投与することと、（ii）前記抗体と試料（および場合により、対照試料）による複合物の形成を検出することと、を含む。複合物が形成される場合、関連抗原が存在することを示し、本明細書に記載の治療および／または予防の適合性またはその必要性も示唆される。

【0186】

いくつかの実施形態において、治療前、例えば、治療を開始する前、または治療間隔がある場合は、治療を再開する前に関連抗原を検出する。利用可能な検出方法は、免疫組織化学、免疫細胞化学、FACS、ELISAアッセイ、PCR技術（例えば、RT-PCR

10

20

30

40

50

R) またはインビボイメージング技術を含む。一般には、インビボおよびインビトロ検出方法に使用される抗体分子は、結合されたまたは未結合のコンジュゲートを検出しやすくするために、検出可能な物質で直接的または間接的に標識される。適切な検出可能な物質は、さまざまな生物活性酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、常磁性（例えば、核磁気共鳴活性）物質、および放射性物質を含む。

【0187】

いくつかの実施形態において、関連抗原のレベルおよび／または分布をインビボで決定し、例えば、検出可能な物質で標識された本発明の抗体分子を、非侵襲的方式（例えば、適切なイメージング技術（例えば、ポジトロン断層法（PET）による走査）により検出する。一実施形態において、例えば、PET試薬（例えば、 ^{18}F -フルオロデオキシグルコース（FDG））を用いて検出可能な方式で標識された本発明の抗体分子を検出することによって、関連抗原のレベルおよび／または分布をインビボで測定する。

一実施形態において、本発明は、本明細書に記載の抗体分子と、取扱説明書とを含む診断キットを提供する。

【0188】

本発明の理解を補助するために、以下の実施例を説明する。如何なる方法によって、実施例を、本発明の請求範囲を制限するものと解釈する意図もなく、そうすべきでもない。

【実施例1】

【0189】

実施例

実施例1、ハイブリドーマ細胞の製造

過剰発現細胞株の構築

ヒト、サルおよびマウスのGPRC5D全長配列をPEE17.4プラスミド（Lonza、GS Xceed Expression System）にそれぞれ挿入し、エレクトロポレーションの方法によってプラスミドを宿主細胞GS-CHOに導入し、加圧スクリーニングによってGPRC5Dタンパク質を過剰発現する安定的な細胞株を構築した。同時にヒトGPRC5D全長配列をpCHO1.0ベクターに挿入し、宿主細胞293Fに導入し、過剰発現細胞株293F-huGPRC5Dを構築した。

【0190】

免疫

ヒトGPRC5D全長配列をpcDNA3.1ベクターに構築し、当該プラスミドをBALB/cおよびHarbourマウス（北京維通利華実験動物技術有限公司から購入）に免疫するために使用し、2週間に1回筋肉内注射し（各マウスに $50\mu\text{g}$ のプラスミド）、合計3回免疫した。続いて、ヒトGPRC5Dを過剰発現するGS-CHO細胞株を追加免疫に使用し、2週間に1回腹腔内注射し（各マウスに 1×10^7 ）、合計2回免疫した。

【0191】

細胞の融合

血清力価が要件を満たした後、マウスの脾臓を摘出してBリンパ球懸濁液を調製し、SP2/0骨髓腫細胞（ATCC）と1:2～1:1の比率で混合した後に電気融合を行った。融合後の細胞を電極皿から50mLの遠心分離管に移入し、HAT培地で 1×10^4 個の細胞/mL～ 2×10^4 個の細胞/mLになるまで細胞を希釈し、96ウェルプレートの各ウェルに $100\mu\text{L}$ の細胞懸濁液を加えた。融合後の7日目にスクリーニング培地を交換し、10日目（または細胞増殖状態によって、それ以上である）培養した後にフローサイトメトリー（FACS）検出を行い、陽性クローニングをスクリーニングした。

【0192】

ハイブリドーマ細胞によるハイスループットスクリーニング

フローサイトメトリー（FACS）によって抗GPRC5D抗体を特異的に発現するハイブリドーマ細胞をスクリーニングした。検出される細胞（293F-huGPRC5D/GS-CHO-huGPRC5D）をカウントし、 1×10^6 個の細胞/mLになるま

10

20

30

40

50

で希釈し、U型底の96ウェルプレートに100 μ L／ウェル加えた。500 gで5 min遠心分離し、細胞培地を除去した。ハイブリドーマの96ウェルプレートで培養した上清および陽性対照抗体をU字形プレートに加えて細胞を再懸濁し、1ウェル当たり100 μ L加え、氷上で30 min静置した。500 gで5 min遠心分離し、上清を除去し、PBSで細胞を1回洗浄した。500 gで5 min、PBS除去した。ハイブリドーマ上清が加えられたウェルの各ウェルにgoat anti-mouse IgGのFITCで標識された二次抗体（Jackson ImmunoResearch、Cat # 115-545-006を1：500でPBSに希釈したもの）100 μ Lを加え、陽性対照抗体（Roche-5E11）を含むウェルに抗ヒトFcのPEで標識された二次抗体（BioLegend、Cat # 409304）100 μ Lを加えた。氷上で30 min遮光してインキュベートした。500 gで5 min、上清を除去し、PBSで細胞を1回洗浄した。50 μ Lの1×PBSで細胞を再懸濁し、FACS機上検出を行った。

10

【0193】

スクリーニングされた陽性クローニングに対して前記と同じ方法によりGS-cyno GPRC5D／GS-huGPRC5A細胞の再スクリーニングを行い、ヒトGPRC5DおよびサルGPRC5Dの両方と結合し、かつヒトGPRC5Aと結合しないハイブリドーマ細胞を合計82株得た。

【0194】

陽性ハイブリドーマ細胞のサブクローニング

細胞結合実験の結果に基づいて、従来の方法により候補クローンに対してサブクローニングを行った。その後、前記のハイスループットのスクリーニング方法によって検出し、標的陽性ウェルを取り出し、細胞を凍結保存した。

20

【0195】

実施例2、キメラ抗体の製造

実施例1で得られたハイブリドーマ候補クローンから抗体の軽鎖と重鎖の遺伝子配列を取り出し、ヒトマウスキメラ抗体を構築した。

【0196】

新たに培養した細胞を各株から約 5×10^6 個採取し、RNA（Macherey-Nagel、Cat # 740984.250）を抽出した。PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit（Takara）逆転写によりcDNAが得られた。5'末端のFR1領域に位置する塩基配列で上流プライマーを設計し、抗体定常領域またはFR4領域に位置する塩基で下流プライマーを設計し、抗体の軽鎖と重鎖の可変領域遺伝子断片を増幅した。それをTベクター（Mighty T A-cloning Kit試薬キット、Takara）に連結し、モノクローナルを選び出して配列決定を行い、MEGA7ソフトウェアを用いて配列決定の結果に対して分析およびアラインメントを行った。

30

【0197】

アラインメントにより、抗体の軽鎖と重鎖の可変領域配列が正しく、かつペアリングされたクローニングを選び出し、南京諾維質公司の相同組換え酵素（Exnase（登録商標）II、カタログ番号：C112-01）によってその軽鎖と重鎖可変領域遺伝子断片をpcDNA3.1ベクターにそれぞれ連結し、ここで、定常領域はIgG1サブタイプを選択し、軽鎖と重鎖抗体の発現プラスミドを得た。

40

【0198】

次に、同一抗体の軽鎖プラスミドと重鎖プラスミドを1：1のモル比で混合し、ポリエチレンイミン（PEI）（Polysciences、Cat # 23966）を用いて293F細胞をトランスフェクションし、5日～7日培養した後、細胞活性が60%未満になると、細胞培養上清を収集し、Protein Aアフィニティーカラムでモノクローナル抗体を精製した。

【0199】

実施例3、キメラ抗体のインビトロスクリーニング

50

抗GPRC5D抗体の親和性はフローサイトメトリーにより検出された。異なる濃度の抗体と、ヒトGPRC5Dを過剰発現するGS-CHO細胞(huGPRC5D-GS-CHO)、多発性骨髄腫細胞MM1.R、H929およびAMO-1を含むヒトGPRC5Dを発現する細胞とともに30分間共インキュベートした。次に、蛍光標識二次抗体(APC-マウス抗ヒトIgG Fc抗体、Biolegend、製品番号:409306)を加え、Live/Dead yellow死細胞染色剤(Thermo Fisher、製品番号:L34967)を使用し、フローサイトメトリーにより細胞蛍光強度を検出し、GraphPad Prism 8.0を用いて曲線をフィッティングし、抗体のヒトGPRC5Dに結合する親和性を示すために、EC50値を計算した。

【0200】

検出された抗体において、HB15H1G1(重鎖可変領域の配列番号25、軽鎖可変領域の配列番号26)は完全ヒト化抗体であり、ch5E12C4(重鎖可変領域の配列番号98、軽鎖可変領域の配列番号99)、ch11B7(重鎖可変領域の配列番号100、軽鎖可変領域の配列番号101)およびch7F5D4抗体(重鎖可変領域の配列番号27、軽鎖可変領域の配列番号28)はキメラ抗体である。結果は下記の表1に示される。

【表4】

表1. 例示的な抗体のヒトGPRC5Dに対する親和性の検出

例示的な抗体	EC ₅₀ (nM)			
	H929	MM1.R	AMO-1	huGPRC5D-GS-CHO
HB15H1G1	3.70	0.70	9.40	1.89
ch5E12C4*	21.70	3.70	10	9.18
ch11B7*	5.99	—	—	1.14
ch7F5D4	7.30	0.50	6.30	2.59

*ch5E12C4はhz5E12.1.P1をヒト化する前の配列であり、ch11B7はhz11B7.5をヒト化する前の配列である。

【0201】

スクリーニングされたch5E12C4およびキメラch11B7抗体をヒト化し、抗体hz5E12.1.P1およびhz11B7.5を形成した。

【0202】

実施例4、三重特異性抗体(TS)の分子構造の設計および構築

同時にGPRC5D、BCMAおよびCD3を標的とするT細胞エンゲージャー(T-cell engager)類の多重特異性抗体は、多発性骨髄腫細胞(Multiple Myeloma、MM)表面の2種類の腫瘍関連抗原GPRC5DとBCMAおよびT細胞表面のCD3受容体に同時に結合することができる。4つの抗GPRC5D抗体(HB15H1B1、ch7F5D4、hz5E12.1.P1、hz11B7.5)、1つの抗BCMA抗体(ADI-38456)および親和性が異なる2つの抗CD3抗体(親和性が比較的低いCD3抗体hzsp34.87と親和性が比較的高いCD3抗体hzsp34.24)に基づいて、同時にGPRC5D、BCMAおよびCD3を標的とする多重特異性抗体を設計した。

【0203】

図1に示すように、1+1+1 format 1(TS-F1)の2つの例示的な抗体、1+1+1 format 2(TS-F2)の6つの例示的な抗体、2+2+2

format 6 (TS-F6) の4つの例示的な抗体および1+1+2 format 7 (TS-F7) の5つの例示的な抗体 (下記の表4を参照) を含むformatの異なる4種類の多重特異性抗体分子を設計した。Fc「ノブインホール」(knob-in-hole) 技術により非対称IgG様二重特異性抗体の重鎖のミスペアリングを解決し、ここで、FcはIgG1の重鎖定常領域であり、同時にエフェクター機能(effector function)を弱化するL234A、L235A (Kabataの「EU」によって番号付けられた) アミノ酸変異を導入して、例示的な抗体を設計した。

【0204】

TS-F2とTS-F7は、4本のポリペプチド鎖から左右非対称のIgG様四量体で構成され、TS-F6は、2本のポリペプチド鎖から左右対称のIgG様四量体で構成された。

10

【0205】

TS-F2は、重鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCH1ドメインおよびFcドメインを含む1本のペプチド鎖#1、軽鎖可変ドメインおよび免疫グロブリンCLドメインを含む1本のペプチド鎖#2、重鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCH1ドメイン、Fcドメインおよび人工合成された連結ペプチドによって連結されてなる一本鎖抗体scFvを含む1本のペプチド鎖#3、ならびに軽鎖可変ドメインおよび免疫グロブリンCLドメインを含む1本のペプチド鎖#4で構成された。ペプチド鎖#1の重鎖可変ドメインとペプチド鎖#2の軽鎖可変ドメインがペアリングして第1抗原認識部位を形成し、ペプチド鎖#3の重鎖可変ドメインとペプチド鎖#4の軽鎖可変ドメインがペアリングして第2抗原認識部位を形成し、scFvは第3抗原認識部位を形成した。

20

【0206】

TS-F7は、重鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCH1ドメインおよびFcドメインを含む1本のペプチド鎖#1、軽鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCLドメインおよび人工合成された連結ペプチドにより連結されてなる一本鎖抗体scFvを含む1本のペプチド鎖#2、重鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCH1ドメインおよびFcドメインを含む1本のペプチド鎖#3、ならびに軽鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCLドメインおよび人工合成された連結ペプチドにより連結されてなる一本鎖抗体scFvを含む1本のペプチド鎖#4で構成された。ペプチド鎖#1の重鎖可変ドメインとペプチド鎖#2の軽鎖可変ドメインがペアリングして第1抗原認識部位を形成し、ペプチド鎖#3の重鎖可変ドメインとペプチド鎖#4の軽鎖可変ドメインがペアリングして第2抗原認識部位を形成し、ペプチド鎖#2とペプチド鎖#4における2つのscFvは、2つの同じ第3抗原認識部位である。

30

【0207】

TS-F2とTS-F7において、ペプチド鎖#1とペプチド鎖#3のそれぞれのFcドメインには、「ノブインホール」の対応する安定結合変異がそれぞれ含まれた。

【0208】

TS-F6は、重鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCH1ドメイン、Fcドメインおよび人工合成された連結ペプチドにより連結されてなる一本鎖抗体scFvを含む2本の同じペプチド鎖#1、ならびに、軽鎖可変ドメイン、免疫グロブリンCLドメインおよび人工合成された連結ペプチドにより連結されてなる一本鎖抗体scFvを含む2本の同じペプチド鎖#2で構成された。ペプチド鎖#1の重鎖可変ドメインとペプチド鎖#2の軽鎖可変ドメインがペアリングして第1抗原認識部位を形成し、ペプチド鎖#1におけるscFvは第2抗原認識部位であり、ペプチド鎖#2におけるscFvは第3抗原認識部位である。

40

【0209】

TS-F1は、第1の一本鎖抗体scFvおよびFcドメインを含むペプチド鎖#1、ならびに、第2の一本鎖抗体scFvおよびFcドメインを含むペプチド鎖#2で構成された。ペプチド鎖#1における第1のscFvは第1抗原認識部位を形成し、ペプチド鎖#2におけるscFvは第2抗原認識部位を形成した。

50

【 0 2 1 0 】

実施例 5、T S 抗体の発現および精製

4つの抗GPRC5D抗体（HB15H1B1、ch7F5D4、hz5E12.1.P1、hz11B7.5）において、HB15H1B1は完全ヒト化抗体、ch7F5D4はキメラ抗体、hz5E12.1.P1とhz11B7.5はヒト化抗体であり、1つの抗BCMA抗体（ADI-38456）および親和性が異なる2つの抗CD3抗体（hzsp34.87とhzsp34.24）のCDR領域、軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列は、本願の「配列表」の部分にリストされ、前記抗体のCDR領域、軽鎖可変領域および重鎖可変領域のアミノ酸配列の配列番号は表2に示される。

【表5】

表2. 抗GPRC5D抗体、抗BCMA抗体および抗CD3抗体のCDR領域、軽鎖可変領域ならびに重鎖可変領域のアミノ酸配列番号

標的	GPRC5D				BCMA	CD3	
ID	HB15H1B1	ch7F5D4	hz5E12.1.P1	hz11B7.5	38456	hzsp34.24	hzsp34.87
HC DR 1	配列番号 1	配列番号 7	配列番号 13	配列番号 19	配列番号 33	配列番号 41	配列番号 47
HC DR 2	配列番号 2	配列番号 8	配列番号 14	配列番号 20	配列番号 34	配列番号 42	配列番号 42
HC DR 3	配列番号 3	配列番号 9	配列番号 15	配列番号 21	配列番号 35	配列番号 43	配列番号 43
LC DR 1	配列番号 4	配列番号 10	配列番号 16	配列番号 22	配列番号 36	配列番号 44	配列番号 44
LC DR 2	配列番号 5	配列番号 11	配列番号 17	配列番号 23	配列番号 37	配列番号 45	配列番号 45
LC DR 3	配列番号 6	配列番号 12	配列番号 18	配列番号 24	配列番号 38	配列番号 46	配列番号 46
VH	配列番号 25	配列番号 27	配列番号 29	配列番号 31	配列番号 39	配列番号 48	配列番号 50
VL	配列番号 26	配列番号 28	配列番号 30	配列番号 32	配列番号 40	配列番号 49	配列番号 49

【表 6】

表 3 A. 例示的な抗体のリンカーのアミノ酸配列番号および配列説明

名称	配列番号	配列説明
l i n k e r 1	配列番号 5 1	(G 4 S) 4
l i n k e r 2	配列番号 5 2	(G 4 S) 2
l i n k e r 3	配列番号 5 3	(G 4 S) 3
l i n k e r 4	配列番号 5 4	T S (G 4 S) 3

10

【表 7】

表 3 B. 例示的な抗体の一本鎖抗体断片のアミノ酸配列番号および配列説明

名称	配列	説明
H B 1 5 H 1 B 1 - s c F v _ l i n k e r 1	配列番号 5 5	G P R C 5 D 抗体 H B 1 5 H 1 B 1 の s c F v 形式であり、N 末端から C 末 端まで、V L 配列 - l i n k e r 1 - V H 配列を含む
c h 7 F 5 D 4 - s c F v	配列番号 6 0	G P R C 5 D 抗体 c h 7 F 5 D 4 の s c F v 形式であり、N 末端から C 末端 まで、V L 配列 - l i n k e r 1 - V H 配列を含む
3 8 4 5 6 - s c F v _ l i n k e r 1	配列番号 5 6	B C M A 抗体 3 8 4 5 6 の s c F v 形 式であり、N 末端から C 末端まで、V L 配列 - l i n k e r 1 - V H 配列 を含む
3 8 4 5 6 - s c F v _ l i n k e r 3	配列番号 5 7	B C M A 抗体 3 8 4 5 6 の s c F v 形 式であり、N 末端から C 末端まで、V L 配列 - l i n k e r 3 - V H 配列 を含む
H z s p 3 4 . 2 4 - s c F v - V L - V H	配列番号 5 8	高親和性 C D 3 抗体 H z s p 3 4 . 2 4 の s c F v 形式であり、N 末端から C 末端まで、V L 配列 - l i n k e r 1 - V H 配列を含む
H z s p 3 4 . 2 4 - s c F v - V H - V L	配列番号 5 9	高親和性 C D 3 抗体 H z s p 3 4 . 2 4 の s c F v 形式であり、N 末端から C 末端まで、V H 配列 - l i n k e r 1 - V L 配列を含む

20

30

40

50

【表 8】

表 4. 例示的な T S 抗体のアミノ酸配列番号

例示的な抗体	ペプチド鎖 # 1	ペプチド鎖 # 2	ペプチド鎖 # 3	ペプチド鎖 # 4
T S - F 1 - 1	配列番号 6 1	配列番号 6 2	—	—
T S - F 1 - 2	配列番号 6 3	配列番号 6 4	—	—
T S - F 2 - 1	配列番号 6 5	配列番号 6 6	配列番号 6 7	配列番号 6 8
T S - F 2 - 2	配列番号 6 9	配列番号 7 0	配列番号 7 1	配列番号 6 8
T S - F 2 - 3	配列番号 7 2	配列番号 7 3	配列番号 7 4	配列番号 6 8
T S - F 2 - 4	配列番号 7 5	配列番号 7 6	配列番号 7 7	配列番号 6 8
T S - F 2 - 5	配列番号 7 5	配列番号 7 6	配列番号 7 8	配列番号 6 8
T S - F 2 - 6	配列番号 7 9	配列番号 8 0	配列番号 7 7	配列番号 6 8
T S - F 6 - 1	配列番号 8 1	配列番号 8 2	—	—
T S - F 6 - 2	配列番号 8 1	配列番号 8 3	—	—
T S - F 6 - 3	配列番号 8 4	配列番号 8 5	—	—
T S - F 6 - 4	配列番号 8 4	配列番号 8 6	—	—
T S - F 7 - 1	配列番号 8 7	配列番号 8 8	配列番号 7 7	配列番号 8 9
T S - F 7 - 2	配列番号 9 0	配列番号 9 1	配列番号 7 7	配列番号 8 9
T S - F 7 - 3	配列番号 9 2	配列番号 9 3	配列番号 9 4	配列番号 9 5
T S - F 7 - 4	配列番号 9 2	配列番号 9 6	配列番号 9 4	配列番号 9 7
T S - F 7 - 5	配列番号 8 7	配列番号 8 8	配列番号 7 8	配列番号 8 9

【0 2 1 1】

G P R C 5 D x C D 3 および B C M A x C D 3 二重特異性抗体を同時に設計した。図 2 A に示すように、合理的な設計として、二重特異性抗体の両端はいずれも F a b 形式であり、1 + 1 format の非対称 I g 様構造を形成した。F c 「ノブインホール」 (k n o b - i n - h o l e) 技術により当該非対称 I g G - 様二重特異性抗体の重鎖のミスペアリングを解決し、ここで、F c は I g G 1 の重鎖定常領域であり、同時にエフェクター機能 (e f f e c t o r f u n c t i o n) を弱化する L 2 3 4 A、L 2 3 5 A (K a b a t の「E U」によって番号付けられた) アミノ酸変異を導入した。

【0 2 1 2】

同時に、B C M A x C D 3 二重特異性抗体 4 6 7 5 8 をさらに発現した。図 2 B に示すように、当該二重特異性抗体の 1 つの抗体アームは B C M A に結合する F a b であり、も

う1つの抗体アームはCD3に結合するscFvであり、ここで前記Fabは抗BCMA親抗体38456に由来し、前記scFvは前と異なる抗CD3親抗体に由来した。当該二重特異性抗体を構成した3本のポリペプチド鎖は配列番号111～113に示された。

【0213】

同時に、Roche-5E11二重特異性抗体（GPRC5D×CD3、2：1 format、特許WO 2019/154890 A1から）をさらに発現して精製した。図2Cに示される通りである。二重特異性抗体Roche-5E11は、WO 2019/154890 A1の配列番号17、18、19および20の配列で構成され、2つのGPRC5D結合部位および1つのCD3結合部位を含む。

【0214】

組換え製造のために、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび／または発現のために、重鎖と軽鎖をコードするヌクレオチド配列を合成し、ベクターpcDNA3.1にそれぞれ挿入するように、蘇州金唯智生物科技有限公司に委託した。

【0215】

HEK293細胞における発現および精製：

Exp i 293 F細胞（Thermo Fisher scientific社から購入）をExp i 293 F細胞培地（Thermo Fisher scientific社から購入）に継代培養した。トランスフェクションの前日に細胞密度を検出し、新鮮なExp i 293細胞培地を 2×10^6 個の細胞/mLに調整して培養を継続し、トランスフェクションの当日に細胞密度を 3×10^6 個の細胞/mLに調整した。

【0216】

トランスフェクションされたExp i 293 F細胞の最終体積が1/10のOpti-MEM培地（Gibco社から購入）をトランスフェクション緩衝液として取り、1mL当たりのトランスフェクション緩衝液に1：1のモル比率で前記に製造された、ペアリングされた重鎖と軽鎖をそれぞれ含むヌクレオチド配列の組換えプラスミド10μgを加え、均一に混合し、1mL当たりのトランスフェクション緩衝液にポリエチレンイミン（polyethylenimine、PEI）（Polysciences）30μgをさらに加え、均一に混合し、室温で20分間インキュベートし、次にPEI/DNA混合物をExp i 293 F細胞懸濁液に軽く注入して均一に混合し、シェーカーにおいて、8%のCO₂、36.5℃、120rpmの培養条件で培養した。

【0217】

16時間～18時間培養した後、培養フラスコにトランスフェクション後の培養物体積1/50の濃度が200g/LのFEED（100g/LのPhytone Peptone+100g/LのDifco Select Phytone）、最終濃度が4g/Lのグルコース溶液および最終濃度が2mM/LのVPA（Gibco）を追加し、軽く均一に混合し、8%のCO₂、36.5℃、120rpmのシェーカーにおいて培養を継続した。連続的に6日培養し、培養物を収集し、4000回転/分間で30分間遠心分離し、細胞上清を取って0.45μMのろ過膜でろ過し、アフィニティークロマトグラフィーとイオン交換クロマトグラフィーにより親タンパク質を精製した。対称構造のIgG様抗体に関しては、最終分子を精製した。

【0218】

以下、前記の異なるFormatのTS抗体および二重特異性抗体に対して組換えによって生成された親タンパク質が示される。

10

20

30

40

50

【表 9】

	親タンパク質 1		親タンパク質 2	
F o r m a t	重鎖H 1	軽鎖L 1	重鎖H 2	軽鎖L 2
T S − F o r m a t _ 1	ペプチド鎖 # 1	−	ペプチド鎖 # 2	−
T S − F o r m a t _ 2	ペプチド鎖 # 1	ペプチド鎖 # 2	ペプチド鎖 # 3	ペプチド鎖 # 4
T S − F o r m a t _ 6	ペプチド鎖 # 1	ペプチド鎖 # 2	−	−
T S − F o r m a t _ 7	ペプチド鎖 # 1	ペプチド鎖 # 2	ペプチド鎖 # 3	ペプチド鎖 # 4
B s _ 1 + 1 _ f o r m a t	ペプチド鎖 # 1	ペプチド鎖 # 2	ペプチド鎖 # 3	ペプチド鎖 # 4

【 0 2 1 9 】

非対称 I g G 様抗体の場合、精製された 2 つの親タンパク質が液を交換する必要はなく、タンパク質濃度はそれぞれ > 1 m g / m L であり、1 : 1 のモル比および混合液中のタンパク質濃度 1 m g / m L ~ 1 0 m g / m L に従って混合した。次に、G S H / タンパク質のモル比を 5 0 0 倍 ~ 7 0 0 倍に制御し、G S H 最終濃度 > 5 m M である適量の G S H を加えた。最後に、p H が 1 0 . 0 の A r g 1 M で前記混合液の p H を 8 . 0 ~ 8 . 5 に調節した。A r g 最終濃度 > = 5 0 m M である。前記反応液を、2 4 h を超えないように、室温で一晩置いた。翌日、一晩反応させた反応液を交換して G S H を除去し、液交換用 b u f f e r は、G S H を含まない前記組換え反応 0 . 2 M の P B 溶液 (P h 6 . 0) であってもよい。2 h ~ 3 h 自然酸化した後、m o n o S (G E C a t . 1 7 5 1 6 8 0 1) により精製されてよい。

【 0 2 2 0 】

R o c h e − 5 E 1 1 二重特異性抗体は、W O 2 0 1 9 / 1 5 4 8 9 0 A 1 に開示された方法により製造された。

【 0 2 2 1 】

前記方法により製造された対称性抗体および非対称抗体を回収し、アフィニティークロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーにより精製された。

サイズ排除クロマトグラフィー (s i z e e x c l u s i o n c h r o m a t o g r a p h y 、 S E C) を利用して、クロマトグラフィーにより収集された各レベルのサブチューブ中の試料の純度を検出した。S E C 結果に基づいて純度が 9 5 % より大きいレベルのサブチューブ中の試料を合わせた。

精製された二重特異性抗体溶液を 1 5 m L の限外ろ過遠心分離管で、4 5 0 0 回転 / 分間で 3 0 分間遠心分離し、P B S でタンパク質を希釈した後に遠心分離を継続し、緩衝液を交換するために、4 5 0 0 回転 / 分間で 3 0 分間遠心分離し、当該操作を数回繰り返した。緩衝液が交換された抗体を合わせて、抗体濃度を測定した。さらに、キャピラリー電気泳動 (C E − S D S) および液体クロマトグラフィーー質量分析技術 (L C − M S) を組み合わせて多重特異性抗体の成分および含有量に対して定性および定量を行った。

【 0 2 2 2 】

実施例 6 、三重特異性抗体親和性の測定

例示的な三重特異性抗体において、ヒト化抗体 h z 5 E 1 2 . 1 . P 1 および h z 1 1

B 7 . 5 に由来する抗原結合部位の G P R C 5 D への結合親和性を調べた。実施例 3 と同じ方法により、異なる濃度の三重特異性抗体と h u G P R C 5 D G S - C H O 細胞とともに 3 0 分間共インキュベートし、次に蛍光標識二次抗体を加え、フローサイトメトリー (B D) により細胞蛍光強度を検出し、 G r a p h P a d P r i s m 8 . 0 を用いて曲線をフィッティングし、抗体のヒト G P R C 5 D に結合する親和性を示すために、 E C 5 0 値を計算した。結果は下記の表 5 に示される。

【表 1 0】

表 5 . 例示的な抗体のヒト G P R C 5 D に対する親和性

例示的な抗体			
TS-F 2-4 (h z 5 E 1 2 . 1 . P 1 / S P 3 4 . 2 4 / 3 8 4 5 6)	TS-F 2-5 (h z 5 E 1 2 . 1 . P 1 / S P 3 4 . 8 7 / 3 8 4 5 6)	TS-F 7-1 (h z 5 E 1 2 . 1 . P 1 / S P 3 4 . 2 4 / 3 8 4 5 6)	TS-F 7-2 (h z 1 1 B 7 . 5 / S P 3 4 . 2 4 / 3 8 4 5 6)
E C ₅			
o (n	4 0 . 0 4	4 5 . 0 4	5 3 . 2 4
M)			4 9 . 1 5

【 0 2 2 3】

例示的な三重特異性抗体において、抗 B C M A 末端と抗 C D 3 末端の親和性は、バイオフィルム層光学干渉技術 (B L I) により検出された。例示的な抗体のヒト B C M A 、サル B C M A 、ヒト C D 3 E 及びサル C D 3 E への結合動態を測定した。

【 0 2 2 4】

結合型ストレプトアビジンタンパク質 (s t r e p t a v i d i n p r o t e i n 、 S A) または抗 h u m a n - F c (A H C) のプローブ s e n s o r s (F o r t e b i o 、製品番号 1 8 - 5 0 1 9) を 2 0 0 μ L の S D b u f f e r (1 × P B S 、 0 . 1 % の B S A 、 0 . 0 5 % の t w e e n - 2 0) に浸漬して予め湿らせた。例示的な抗体およびビオチンで標識されたまたは F c - t a g 付きの B C M A と C D 3 D & E ヘテロ二量体抗原を S D b u f f e r でそれぞれ希釈した。 2 0 0 μ L の S D b u f f e r 、各希釈試料 (1 0 0 n M) を 9 6 ウェルブラックプレート (G r e i n e r 、製品番号 6 5 5 2 0 9) にそれぞれ加えた。プローブおよび試料を O c t e t (F o r t e b i o 、 R e d 9 6 e) に置いた。 D a t a A c q u i s i t i o n 1 0 . 0 を起動し、「 N e w K i n e t i c E x p e r i m e n t 」を選択し、試料の位置に従って播種し、 s e n s o r s の位置を選択し、実行ステップおよび時間 : B a s e l i n e 6 0 s 、 L o a d i n g 2 5 0 s 、 B a s e l i n e 1 0 0 s 、 A s s o c i a t i o n 6 0 0 s および D i s s o c i a t i o n 6 0 0 s を設定した。実験の回転速度は 1 0 0 0 r p m 、温度は 3 0 ° C であった。

【 0 2 2 5】

「 D a t a A n a l y s i s 1 0 . 0 」ソフトウェアで結果を分析し、 b u f f e r 参照チャネルを差し引いて、 1 : 1 の b i n d i n g を選択してデータをフィッティングし、例示的な抗体の k o n 、 k o f f 、 K D 値を計算した。

【 0 2 2 6】

前記の測定法に記載される実験において、ヒト B C M A 抗原 (A C R O B i o s y s t e m s) およびサル B C M A 抗原 (A C R O B i o s y s t e m s) を用いて例示的な抗体を検出した。ヒト B C M A に対する親和性の検出結果は表 6 に示され、サル B C M A に対する親和性の検出結果は表 7 に示される。

【表 1 1】

表 6. 例示的な抗体のヒト BCMA に対する親和性の検出

名称	抗原	K _a (1/ M s)	k _d (1/ s)	KD (M)
TS-F 2-4	Human BCMA -Bio	1.31E +05	2.97E -04	2.27E- 09
TS-F 2-5		1.33E +05	2.79E -04	2.10E- 09
TS-F 7-2		2.70E +05	2.00E -04	7.41E- 10

10

前記の図と表の結果から分かるように、本発明の前記 3 つの例示的な抗体は、いずれも BCMA に対する極めて高い親和性が示された。

【表 1 2】

表 7. 例示的な抗体のサル BCMA に対する親和性の検出

名称	抗原	K _a (1/ M s)	k _d (1/ s)	KD (M)
TS-F 2-4	Cyno BCM A-Fc	9.80E +05	2.00E -04	2.04E -10
TS-F 2-5		9.50E +05	2.00E -04	2.10E -10
TS-F 7-2		6.77E +05	3.73E -04	5.52E -10

20

【0 2 2 7】

前記の測定法に記載される実験において、ヒト CD3D & E ヘテロ二量体抗原 (ACRO Biosystems) およびサル CD3D & E ヘテロ二量体抗原 (ACRO Biosystems) を用いて例示的な抗体の親和性を検出し、結果は表 8、表 9 に示される。同時に、GPRC5D × CD3 二重特異性抗体、hz5E12.1-P1/SP34.24 および hz5E12.1-P1/SP34.87 の、ヒト/サル CD3D & E に対する結合親和性を調べた。

30

【表 1 3】

表 8 例示的な抗体のヒト CD3D & E に対する親和性の検出

名称	抗原	K _a (1/M s)	k _d (1/s)	KD (M)
TS-F 2-4	Human CD3D & E-Bio	1.47E+ 05	3.26E- 03	2.21E -08
TS-F 2-5		7.75E+ 04	1.88E- 02	2.43E -07
hz5E12.1-P1/SP34.24		1.56E+ 05	3.35E- 03	2.14E -08
hz5E12.1-P1/SP34.87		6.19E+ 04	1.76E- 02	2.85E -07

40

50

【表 1 4】

表 9 例示的な抗体のサルCD3D&Eに対する親和性の検出

名称	抗原	K _a (1/ M s)	k _d (1/ s)	KD (M)
TS-F2-4	C y n o CD3D& E-B i o	1. 3 2 E + 0 5	3. 0 1 E - 0 3	2. 2 7 E-0 8
TS-F2-5		7. 8 6 E + 0 4	1. 7 3 E - 0 2	2. 2 0 E-0 7
h z 5 E 1 2. 1- P 1 / S P 3 4. 2 4		1. 2 3 E + 0 5	3. 1 9 E - 0 3	2. 6 0 E-0 8
h z 5 E 1 2. 1- P 1 / S P 3 4. 8 7		5. 8 3 E + 0 4	1. 6 9 E - 0 2	2. 9 0 E-0 7

10

【0 2 2 8】

実施例 7、抗 G P R C 5 D x B C M A x C D 3 抗体介在性 J u r k a t 細胞活性化実験
J u r k a t - N F A T - L u c レポートシステムによって抗 G P R C 5 D x B C M A
x C D 3 抗体の C D 3 E 下流シグナル伝達経路を活性化する活性を検出した。抗 G P R C
5 D x B C M A x C D 3 多重抗体が多発性骨髄腫 (M M) 細胞株表面の G P R C 5 D およ
び / または B C M A に結合すると同時に、J u r k a t - N F A T - L u c 細胞 (J u r
k a t) 表面の C D 3 E に結合する場合、腫瘍関連抗原 (G P R C 5 D および / または B
C M A) 依存性 C D 3 と架橋することにより、J u r k a t - N F A T - L u c 細胞中の
C D 3 E 下流シグナルを刺激することができる。したがって、L u c i f e r a s e レポ
ートシステムによって例示的な抗体介在性 T 細胞活性化レベルを評価した。

20

【0 2 2 9】

J u r k a t N F A T l u c i f e r a s e 細胞および M M 腫瘍細胞において、異
なる濃度の例示的な抗体を加え、J u r k a t 細胞ルシフェラーゼの発現を観察した。

【表 1 5】

30

試薬および材料

名称	製品番号	メーカー
RPMI medium 16 40 (1x)	11835-0 30	G i b c o
FBS	SH30406 . 05	H y c l o n e
Bio-Glo™ Lucif er a s e A s s a y s y s t e m	G7940	P r o m e g a

40

【0 2 3 0】

簡単に言えば、まず試料の希釈：RPMI medium 1640 (5%のFBS)
を用いて抗体を100nMの濃度に希釈した後に、5倍勾配希釈した。次に細胞の準備：
J u r k a t 細胞および腫瘍細胞を300gで5min遠心分離し、上清を捨て、RPM
I medium 1640 (5%のFBS) に再懸濁させ、カウント (C o u n t s t
a r) 後に細胞の密度を J u r k a t N F A T 2 x 10⁶ c e l l / m L に調整し、
腫瘍細胞はエフェクター細胞と標的細胞との比率に応じて調整した。96ウェル白色細胞
培養プレートの各ウェルに45μLの腫瘍細胞を加え、30μLの勾配希釈した試料を加
え、45μLの J u r k a t N F A T 細胞を加えた。次に、96ウェルプレートを37

50

℃、5%のCO₂インキュベーターに置いて培養を継続した。一定時間培養した後、培養プレートおよび細胞培養プレートを取り出し、室温で5min置き、各ウェルに80μLのBio-Glo (Promega、G7940)を加え、10min遮光してインキュベートし、SpectraMax i3 (MOLECULAR DEVICES)で蛍光値を読取った。GraphPad Prism 8.0を用いて曲線をフィッティングし、例示的な抗体のT細胞を活性化する活性を比較するために、EC50値を計算した。結果は、対照hIgG1群の読取値に対する実験群の読取値の倍数の比として示される。

【0231】

結果：

TS-F2-1とTS-F2-2

H929細胞とJurkat細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が5：1）を16時間共培養する条件で、およびL363細胞とJurkat細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が5：1）を16時間共培養する条件で、TS-F2-1とTS-F2-2は、いずれも抗体濃度の増加に伴い、Jurkat細胞ルシフェラーゼの発現を顕著に向上させることができ（図3Aおよび図3B）、かつそのアゴニスト活性がTS-F1、対照群GPRC5D×CD3二重抗体およびBCMA×CD3二重抗体よりも高い。検出された抗体の具体的なEC50は表10に示される。ここで、例示的な抗体TS-F2-1とTS-F2-2は、いずれもHB15H1G1（GPRC5D抗体）、hzsp34.24（CD3抗体）および38456（BCMA抗体）に由来する3つの結合特異性で構成されるが、HB15H1G1および38456の結合特異性の位置が異なっている。

【表16】

表10 例示的な抗体介在性T細胞活性化

例示的な抗体	EC ₅₀ (nM)	
	H929	L363
TS-F1-1 (HB15H1G1/SP34.24/38456)	0.80	3.55
TS-F1-2 (38456/SP34.24/HB15H1G1)	0.21	1.92
TS-F2-1 (HB15H1G1/SP34.24/38456)	0.00	0.24
TS-F2-2 (38456/SP34.24/HB15H1G1)	0.01	0.13
GPRC5D×CD3 (HB15H/hzsp34.24)	0.01	0.28
BCMA×CD3 (46758)	0.07	0.43

【0232】

TS-F2-3

H929細胞とJurkat細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が5：1）を16時間共培養する条件で、L363細胞とJurkat細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が5：1）を16時間共培養する条件で、およびU266細胞とJurkat細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が5：1）を16時間共培養する条件で、

T S - F 2 - 3 は、いずれも抗体濃度の増加に伴い、J u r k a t 細胞ルシフェラーゼの発現を顕著に向上させることができ（図 4 A、図 4 B および 図 4 C）、かつそのアゴニスト活性が T S - F 6 抗体よりも顕著に高く、対照群 G P R C 5 D x C D 3 二重抗体（c h 7 F 5 D 4 / h z s p 3 4 . 2 4）および B C M A x C D 3（4 6 7 5 8）二重抗体よりも高い。検出された抗体の具体的な E C 5 0 は表 1 1 に示される。例示的な抗体 T S - F 2 - 3 と T S - F 6（T S - F 6 - 1 ~ T S - F 6 - 4）は、c h 7 F 5 D 4（G P R C 5 D 抗体）、h z s p 3 4 . 2 4（C D 3 抗体）および 3 8 4 5 6（B C M A 抗体）に由来する 3 つの結合特異性で構成される。

【 0 2 3 3 】

構築した h u G P R C 5 D を過剰発現する G S - C H O（h u G P R C 5 D - G S - C H O）細胞と J u r k a t 細胞を 1 6 時間共培養し、G P R C 5 D のみを発現する多発性骨髄腫細胞介在性 T 細胞活性化をシミュレーションするために、例示的な抗体を共培養した。ここで、エフェクター細胞（J u r k a t 細胞）と標的細胞（h u G P R C 5 D - G S - C H O 細胞）との比率は 5 0 : 1 であった。実験結果により、T S - F 2 - 3 は、抗体濃度の増加に伴い、J u r k a t 細胞ルシフェラーゼの発現を顕著に向上させることができ（図 4 D）、かつそのアゴニスト活性が T S - F 6 抗体、対照群 G P R C 5 D x C D 3 二重抗体および B C M A x C D 3 二重抗体（4 6 7 5 8）よりも高いことが示された。具体的な E C 5 0 は表 1 1 に示される。

10

20

30

40

50

【表 1 7】

表 1 1 例示的な抗体介在性T細胞活性化

例示的な抗体	E C ₅₀ (p M)		U 2 6 6	h u G P R C 5 D - G S - C H O
	H 9 2 9	L 3 6 3		
T S - F 2 - 3 (c h 7 F 5 D 4 / S P 3 4 . 2 4 / 3 8 4 5 6)	5 . 4 7 3	2 . 8 5 6	4 1 6 . 4 9 4 5 7 3 9	10
T S - F 6 - 1	3 7 8 8	7 7 . 1 4	6 . 6 6 6	
T S - F 6 - 2	2 2 0 3	6 1 . 7 1	- - 6 2 3 5	
T S - F 6 - 3	1 0 7 . 7	2 2 0 . 6	3 . 4 6 6	
T S - F 6 - 4	7 7 . 0 9	2 4 7 . 1	- - 3 5 6 .	
c h 7 F 5 D 4 / h z s p 3 4 . 2 4	7 . 7 1 6	5 . 6 2 4	. 6 1 6 4 2	
R o c h e - 5 E 1 1	3 0 . 1 5	2 0 . 8 2	- - 3 5 1 .	
4 6 7 5 8	3 4 3 . 8	1 9 2 . 4	. 9 1 0 3 2	

10

20

30

40

【 0 2 3 4】

T S - F 2 - 4 と T S - F 2 - 5

H 9 2 9 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5：1）を 5 時間共培養する条件で、

L 3 6 3 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5：1）を 5 時間共培養する条件で、

8 2 2 6 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5：1）を 5 時間共培養する条件で、および

U 2 6 6 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5：1）を

50

5 時間共培養する条件で、

T S - F 2 - 4 と T S - F 2 - 5 は、いずれも抗体濃度の増加に伴い、J u r k a t 細胞ルシフェラーゼの発現を顕著に向上させることができ（図 5 A、図 5 B、図 5 C）、かつそのアゴニスト活性が対照群 G P R C 5 D x C D 3、B C M A x C D 3 二重抗体（3 8 4 5 6 / h z s p 3 4 . 2 4）および 4 6 7 5 8 二重抗体よりも高い。具体的な E C 5 0 は表 1 2 に示される。ここで、例示的な抗体 T S - F 2 - 4 は、h z 5 E 1 2 . 1 . P 1（G P R C 5 D 抗体）、h z s p 3 4 . 2 4（高親和性 C D 3 抗体）および 3 8 4 5 6（B C M A 抗体）で構成され、例示的な抗体 T S - F 2 - 5 は、h z 5 E 1 2 . 1 . P 1（G P R C 5 D 抗体）、h z s p 3 4 . 8 7（低親和性 C D 3 抗体）および 3 8 4 5 6（B C M A 抗体）で構成された。

10

20

30

40

50

【表 1 8】

表 1 2 例示的な抗体介在性T細胞活性化

	E C ₅₀ (pM)		U
	H 9 2 9	L 3 6 3	
例示的な抗体			8 2 2 6 6
			5 7 0
T S - F 2 - 4			. .
(h z 5 E 1 2 . 1 . P 1 / S P 3 4 . 2 4 / 3 8 4 5 6)			8 3
	7 . 3 8	6 . 2 9	8 3
			8 2 5 1 8
T S - F 2 - 5			. .
(h z 5 E 1 2 . 1 . P 1 / S P 3 4 . 8 7 / 3 8 4 5 6)	1 7 . 8	2 1 . 2	0 4
	0	6	9 0
			3 5
			. .
			1 7
h z 5 E 1 2 . 1 - P 1 / S P 3 4 . 2 4	6 . 5 6	5 . 5 9	8 0
			1 2 4 0 5
			. .
	4 5 . 3	3 8 . 8	1 2
h z 5 E 1 2 . 1 - P 1 / S P 3 4 . 8 7	3	6	0 0
			6 7 0 9 3
			. .
	8 3 . 4	9 0 . 0	7 3
4 6 7 5 8	9	9	8 0
			1 4 0
			. .
	5 9 . 6	3 6 . 5	8 9
3 8 4 5 6 / S P 3 4 . 2 4	2	9	2 7

10

20

30

40

【 0 2 3 5 】

MM 1 . S細胞とJ u r k a t細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が1 0 : 1）を5時間共培養する条件で、およびA R D細胞とJ u r k a t細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が1 0 : 1）を5時間共培養する条件で、T S - F 2 - 4とT S - F 2 - 5は、抗体濃度の増加に伴い、J u r k a t細胞ルシフェラーゼの発現を顕著に向上させることができ（図5 E）、かつそのアゴニスト活性が対照群G P R C 5 D x C D 3二重抗体およびB C M A x C D 3二重抗体4 6 7 5 8よりも高い。具体的なE C 5 0は表1 3に示される。

【表 1 9】

表 1 3 例示的な抗体介在性 T 細胞活性化

例示的な抗体	E C ₅₀ (pM)	
	MM. 1 S	A R D
TS-F 2-4		
(h z 5 E 1 2. 1. P 1 / S P 3 4. 2 4 / 3 8 4 5 6)	1. 7 9	2. 3 8
TS-F 2-5		
(h z 5 E 1 2. 1. P 1 / S P 3 4. 8 7 / 3 8 4 5 6)	7. 3 4	6. 9 6
TS-F 2-6		
(h z 1 1 B 7. 5 / S P 3 4. 2 4 / 3 8 4 5 6)	2. 0 2	2. 7 8
h z 5 E 1 2. 1 - P 1 / S P 3 4. 2 4	2. 2 5	2. 7 3
h z 5 E 1 2. 1 - P 1 / S P 3 4. 8 7	1 8. 2 7	1 4. 8 8
h z 1 1 B 7. 5 / S P 3 4. 2 4	1. 9 8	2. 0 4
R o c h e - 5 E 1 1	2 0. 0 6	2 0. 7 9
4 6 7 5 8	1 5 8. 9 0	1 3 2. 9 0

10

20

【 0 2 3 6 】

TS-F 7-1 と TS-F 7-2

H 9 2 9 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5 : 1）を 5 時間共培養する条件で、

L 3 6 3 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5 : 1）を 5 時間共培養する条件で、

8 2 2 6 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5 : 1）を 5 時間共培養する条件で、および

U 2 6 6 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5 : 1）を 5 時間共培養する条件で、

30

TS-F 7-1 と TS-F 7-2 は、抗体濃度の増加に伴い、J u r k a t 細胞ルシフェラーゼの発現を顕著に向上させることができ（図 6 A、図 6 B、図 6 C、図 6 D）、かつそのアゴニスト活性が対照群 G P R C 5 D x C D 3 二重抗体および B C M A x C D 3 二重抗体 4 6 7 5 8 よりも高い。具体的な E C₅₀ は表 1 4 に示される。ここで、例示的な抗体 TS-F 7-1 は、h z 5 E 1 2. 1. P 1（G P R C 5 D 抗体）、h z s p 3 4. 2 4（C D 3 抗体）および 3 8 4 5 6（B C M A 抗体）で構成され、例示的な抗体 TS-F 7-2 は、h z 1 1 B 7. 5（G P R C 5 D 抗体）、h z s p 3 4. 8 7（C D 3 抗体）および 3 8 4 5 6（B C M A 抗体）で構成された。

40

【表 2 0】

表 1 4 例示的な抗体介在性 T 細胞活性化

例示的な抗体	E C ₅₀ (p M)		8 U 2 2 2 6 6 6
	H 9 2 9	L 3 6 3	
T S - F 7 - 1 (h z 5 E 1 2 . 1 . P 1 / S P 3 4 . 2 4 / 3 8 4 5 6)	1 1 . 9 1	1 2 . 1 0	1 2
			4 6
			. .
			0 8
			4 3
T S - F 7 - 2 (h z 1 1 B 7 . 5 / S P 3 4 . 2 4 / 3 8 4 5 6)	4 . 9 1	2 4 . 7 7	1
			9 5
			. .
			7 6
			9 8
h z 5 E 1 2 . 1 - P 1 / S P 3 4 . 2 4	6 . 5 6	5 . 5 9	3 5
			. .
			1 7
			8 0
			5 4
h z 1 1 B 7 . 5 / S P 3 4 . 2 4	2 . 7 2	2 . 7 9	3 0
			. .
			9 9
			5 6
			. .
R o c h e - 5 E 1 1	1 6 . 4 6	2 1 . 9 2	1 3
			3 7
			6
			7 0
			9 3
4 6 7 5 8	8 3 . 4 9	9 0 . 0 9	. .
			7 3
			8 0

【 0 2 3 7 】

T S - F 7 - 3 と T S - F 7 - 4

L 3 6 3 細胞と J u r k a t 細胞（エフェクター細胞と腫瘍細胞との比率が 5 : 1）を 1 6 時間共培養する条件で、T S - F 7 - 3 と T S - F 7 - 4 は、抗体濃度の増加に伴い、J u r k a t 細胞ルシフェラーゼの発現を顕著に向上させることができるが（図 7）、そのアゴニスト活性が T S - F 2 - 3 よりも低い。ここで、例示的な抗体 T S - F 7 - 3 と T S - F 7 - 4 は、c h 7 F 5 D 4（G P R C 5 D 抗体）、h z s p 3 4 . 2 4（C D 3 抗体）および 3 8 4 5 6（B C M A 抗体）で構成され、h z s p 3 4 . 2 4 抗体が一本鎖抗体を形成する場合、T S - F 7 - 3 は V L が前、V H が後に位置し、T S - F 7 - 4

はV Hが前、V Lが後に位置する。

【0238】

実施例8、ヒト多発性骨髄種細胞に対する抗G P R C 5 D x B C M A x C D 3抗体の殺傷実験

乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）法によって、P B M CとG P R C 5 Dおよび／またはB C M A陽性のMM細胞を共培養する条件での、ヒト多発性骨髄腫細胞に対する例示的な抗体介在性T細胞の殺傷能力を検出した。抗G P R C 5 D x B C M A x C D 3多重抗体がMM細胞表面のG P R C 5 Dおよび／またはB C M Aに結合すると同時に、p r i m a r y T細胞表面のC D 3 Eに結合する場合、腫瘍関連抗原（G P R C 5 Dおよび／またはB C M A）依存性T細胞と架橋することにより、T細胞の活性化を刺激し、腫瘍細胞の殺傷を介在することができる。多因子検出試薬キット（H u m a n T h 1 / T h 2 / T h 1 7、B D）を用いて複数のサイトカインのレベルを同時に検出するとともに、フローサイトメトリー（B D）によりT細胞中のC D 6 9陽性細胞の百分率を検出した。

【0239】

下記の試薬および材料を使用した。

【表21】

名称	製品番号	メーカー
R P M I m e d i u m 1 6 4 0 (1 x)	1 1 8 3 5 - 0 3 0	G i b c o
F B S	S H 3 0 4 0 6 . 0 5	H y c l o n e
H u m a n T h 1 / T h 2 / T h 1 7 K i t	5 6 0 4 8 4	B D B i o s c i e n c e s
C y t o T o x 9 6 N o n - R a d i o . C y t o t o x i c i t y A s s a y	G 1 7 8 1 / G 1 7 8 2	P r o m e g a

【0240】

実験ステップ：

P B M C細胞を液体窒素から取り出し、37℃のウォーターバスで急速に溶解し、9mLの無血清培地に加え、300gで4min遠心分離し、上清を捨て、10%のF B Sフェノールレッドフリー1640培地に再懸濁させ、細胞密度を 4×10^6 c e l l / m Lに調整した。一定量の対数期H929細胞を収集し、遠心分離し、10%のF B Sフェノールレッドフリー1640培地で腫瘍細胞密度を 2×10^5 c e l l / m Lに調整した。前記の表に従って、抗体を10%のF B Sフェノールレッドフリー1640培地で、5μMから5倍勾配希釈するように、100nMに希釈した。96ウェル細胞培養プレート（U字形）に、100μLの腫瘍細胞、50μLの勾配希釈した試料および50μLのP B M C細胞を加えた。同時に、対照ウェルを設定し、培地で200μL／ウェルまで補充した。37℃、CO₂インキュベーターに入れて16h培養した。16h培養した後、細胞培養プレートを取り出し、室温で5min放置し、T Mウェルの各ウェルに10%のL y s i s S o l u t i o nを加え、15min遮光して溶解させた。細胞培養プレートを400gで5min遠心分離し、50μLの上清を取って新しい平底96ウェルプレートに移した。LDH発色試薬50μLを加え、室温で30min遮光して発色させ、停止液50μLを加えた。プレートリーダーで吸光度を読み取り、吸光度により殺傷を計算した。後続のサイトカイン検出のために、さらに90μLの上清を新しい96ウェルプレート（

V字形) に取った。細胞培養プレートの各ウェルに200 μ LのFACS bufferを加えて1回洗浄し、遠心分離後に液体を除去し、各ウェルに45 μ Lの染色溶液(FACS bufferで調製)を加え、4℃で、20 min遮光してインキュベートし、200 μ LのFACS bufferで1回洗浄し、150 μ LのFACS bufferで再懸濁させた後に機上検出を行った。

【0241】

CBAによるサイトカインの検出：

standard 0 (std 0) となるように、2 mLのassay diluentで標準品を溶解し、次に8ウェルstd 1~8を2倍勾配希釈し、std 9はassay diluentブランク対照であった。各beadsを5 s~10 sボルテックスし、それぞれ322 μ L吸い出し、次に2254 μ Lのassay diluentを加え、ボルテックスして均一に混合し、96ウェルのV字形プレートを準備し、各ウェルに50 μ Lの均一に混合したbeadsを加え、各ウェルに30 μ Lのassay diluentを加え、次に各ウェルに30 μ Lの試料を加え、すなわち、すべての試料を2倍希釈した。PE detection reagent: assay diluent 1:1で希釈した後に使用された。ウェルに50 μ LのstdまたはsampleおよびPE detection reagentを加え、プレートをパラフィルムで密封し、アルミホイルで覆った。プレートシェーカーにおいて、1100 rpmの回転速度で室温で5 min振とうした。次に、室温で3 hインキュベートした。インキュベート終了後、各ウェルに120 μ Lのwash bufferを加え、300 gで5 minを遠心分離し、上清を吸い取った。120 μ LのWash Bufferを加えて再懸濁させ、フローサイトメトリーにより検出された。

【0242】

実験結果：

フローサイトメトリーにより検出されると、例示的な抗体は、用量依存的にprimary T細胞を活性化することができ(図8Aおよび図8B)、かつT細胞の活性化程度とCD3の親和性には一定の相関関係：抗CD3の親和性が高いほど、T細胞を活性化する能力が強くなり、それによりH929細胞に対するPBMCの殺傷作用を介在する(図9)ことが見出され、殺傷過程に伴うさまざまなサイトカインの放出レベルは図11A~図11Dに示される。

【0243】

実施例9、H929担腫瘍ヒト化マウスモデルインビボにおける例示的な抗体の抗腫瘍薬効

雌のNOGマウス(35日~41日)は、北京維通達実験動物技術有限公司から購入した。グレードは、SPFグレードである。マウスを受け入れた後、研究開始前に7日間馴化と隔離した。

H929細胞は、後続のインビボ実験のために、日常的に継代培養し、遠心分離して細胞を収集し、PBSでH929細胞を分散させた。5 $\times$ 10⁶細胞/匹、接種体積200 μ L/匹で、毛を剃ったH929細胞をNOGマウスの右側背腹部に接種した。H929細胞接種後の5日目に、5 $\times$ 10⁶細胞/匹、接種体積200 μ L/匹で、マウスにPBMC細胞を静脈内注射した。

【0244】

投与：PBMC細胞接種後の3日目、腫瘍体積に従ってマウスを群分け(各群7匹)して投与した。7日ごとに1回、合計3回投与した。マウスの腫瘍体積と体重を週に2回監視した。腫瘍体積の測定：ノギスで腫瘍の最大長軸(L)と最大短軸(W)を測定し、腫瘍体積を下記の式 $V = L \times W^2 / 2$ により算出した。電子天びんを用いて体重を測定した。研究期間全体を通じて、腫瘍がエンドポイントに達した時またはマウスの体重減少>20%である時、マウスを安楽死させた。腫瘍のサイズを統計した。

【0245】

実験結果

腫瘍増殖曲線は、図 1 2 に示され、例示的な抗体は、H 9 2 9 細胞の成長を顕著に抑制することができる。同時に投与されたマウス群において、いずれも体重減少は見られなかった。

【 0 2 4 6 】

実施例 1 0、異なる多発性骨髄腫表面における G P R C 5 D と B C M A の発現レベル q i f i k i t 試薬キットにより、飽和濃度の B C M A 抗体と G P R C 5 D 抗体を使用して M M 細胞を染色し、フローサイトメトリーで異なる多発性骨髄腫細胞株表面における B C M A と G P R C 5 D 分子を定量した。

【 表 2 2 】

実験試薬

名称	メーカーまたは供給元	製品番号
BCMA (CD 2 6 9)	B i o l e g e n d	3 5 7 5 0 2
Mg p r c 5 d - 1 7 G 1 B 8	I n n o v e n t b i o	NA
Q i f i k i t 試薬キット	D a k o	K 0 0 7 8

10

【 0 2 4 7 】

1 × 1 0 ⁵ 個の異なる M M 細胞を 9 6 - w e l l プレートに加え、G S - C H O - h u G P R C 5 D と G S - C H O - h u B C M A 細胞は陽性対照とし、かつ互いに陰性対照とした。4 0 0 g で 5 m i n 遠心分離し、上清を除去した。1 0 μ L のマウス由来の一次抗体 (B C M A および M g p r c 5 d - 1 7 G 1 B 8) を加えて 4 ° C の条件で 1 h インキュベートした。陰性対照 I g G 1 。 Q I F I K I T / B e a d s 準備：1 0 0 μ L の均一に混合した b e a d s (V i a l 1 および V i a l 2) をそれぞれ加えた。2 0 0 μ L の F A C S b u f f e r を加え、3 回洗浄した後に上清を除去し、1 0 0 μ L の二次抗体 (F I T C C o n j u g a t e 、 V i a l 3 (合計 2 0 0 μ L) 、 1 : 5 0 で 0 . 0 1 m o l / L の P B S に希釈した) を加えて均一に混合し、4 ° C の遮光条件で 4 5 分間 インキュベートした。2 0 0 μ L の F A C S 緩衝液を加え、3 回洗浄した後、1 0 0 μ L の P B S を加え、均一に混合し、フローサイトメトリーにより検出された。

20

【 0 2 4 8 】

実験結果：図 1 3 に示すように、試験した異なる M M 細胞には、異なる表面 G P R C 5 D と B C M A の発現レベルがあった。図 5 A ~ 図 5 F、図 6 A ~ 図 6 D および図 7 に示すように、対照 G P R C 5 D / C D 3 二重抗体および B C M A / C D 3 二重抗体と比較して、評価された F o r m a t 2 および F o r m a t 7 の三重特異性抗体は、異なる G P R C 5 D と B C M A 発現レベルを有するさまざまな M M 細胞 (H 9 2 9、L 3 6 3、8 2 2 6、U 2 6 6、M M 1 . S および A R D) において、いずれも有利な生物学的活性を誘導した。これは、G P R C 5 D と B C M A を組み合わせることで標的とすることにより、本発明の三重特異性抗体は、G P R C 5 D 陽性腫瘍患者と B C M A 陽性腫瘍患者の両方をカバーし、多発性腫瘍患者に対するカバー率を向上させることができると同時に、B C M A などの単一抗原の喪失による腫瘍の再発を回避し、治療効果を改善することができることが示唆された。

30

40

50

【図面】
【図 1 A】

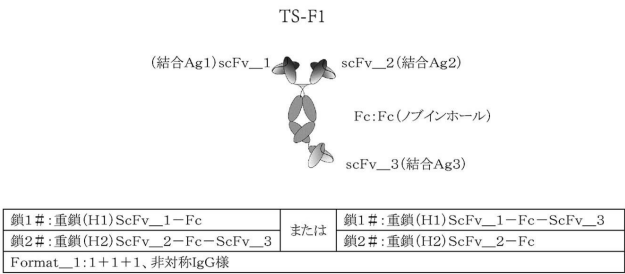


図1A

【図 1 B】

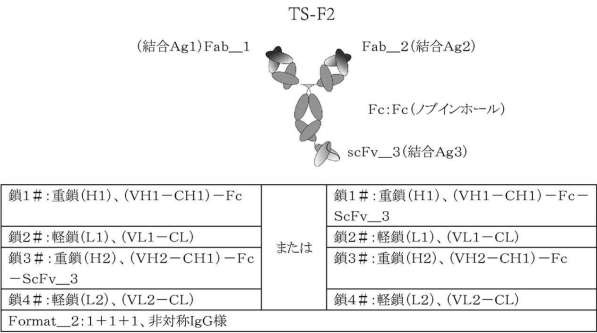


図1B

【図 1 C】

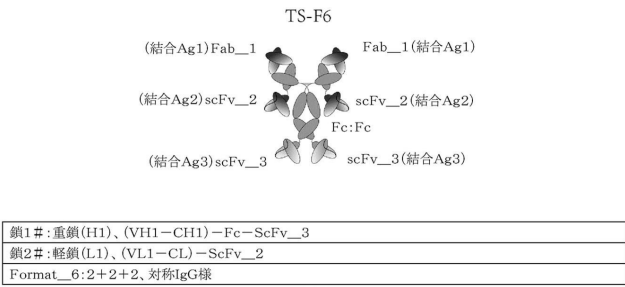


図1C

【図 1 D】

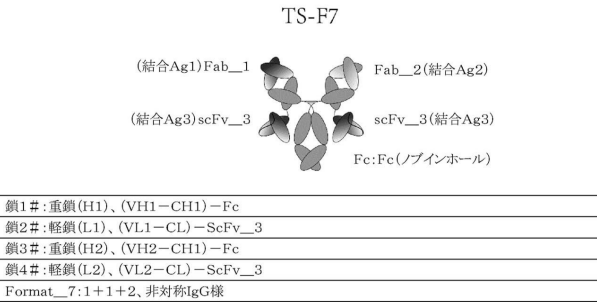


図1D

10

20

30

40

50

【図 2 A】

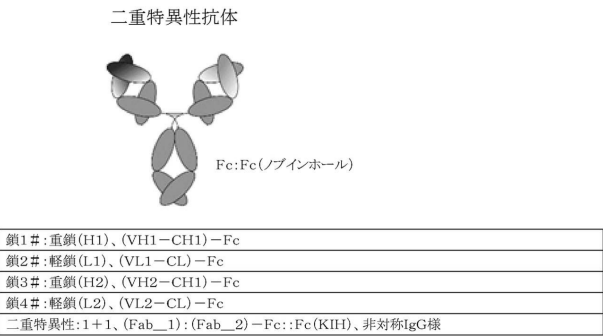


図2A

【図 2 B】

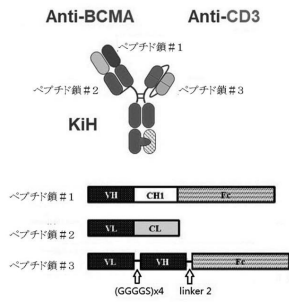


図2B

【図 2 C】

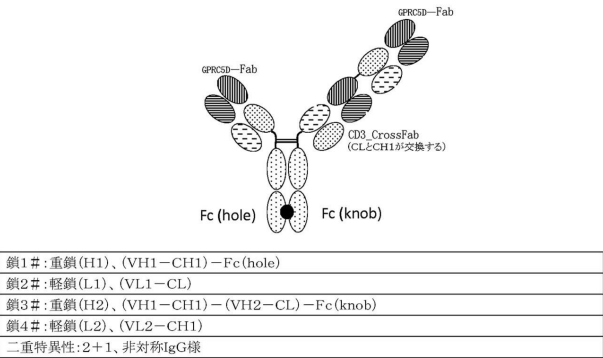


図2C

【図 3 A】

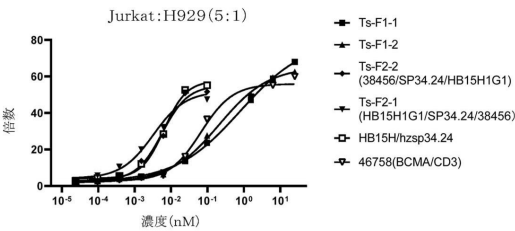


図3A

【図 3 B】

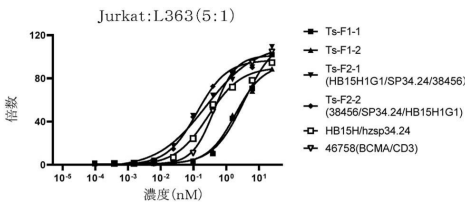


図3B

【図 4 A】

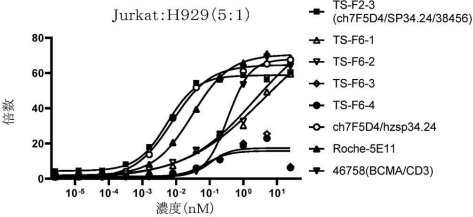


図4A

10

20

30

40

50

【図 4 B】

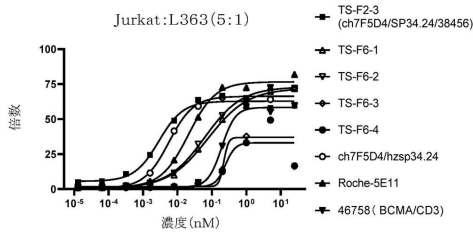


図4B

【図 4 C】

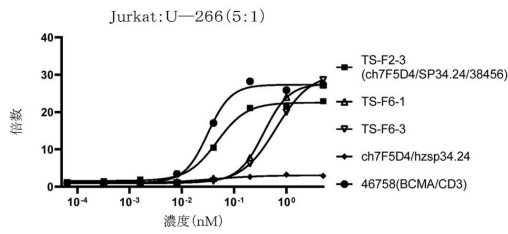


図4C

【図 4 D】

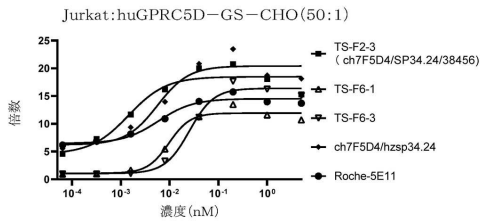


図4D

【図 5 A】

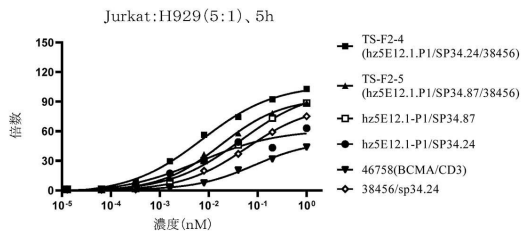


図5A

【図 5 B】

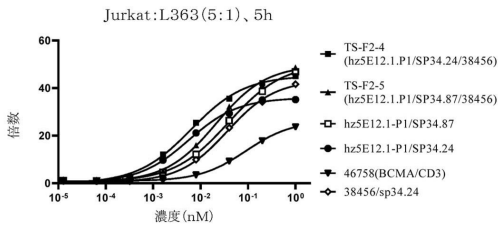


図5B

【図 5 C】

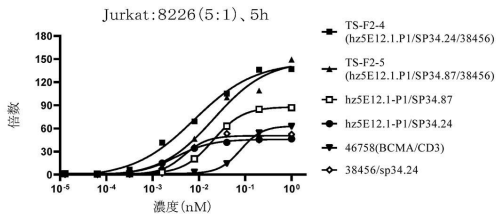


図5C

10

20

30

40

50

【図 5 D】

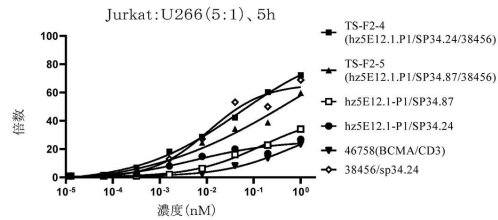


図5D

【図 5 E】

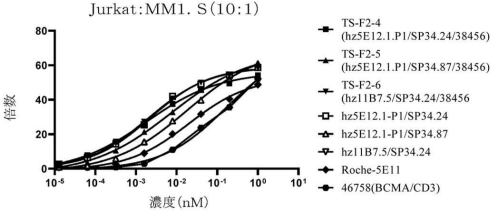


図5E

10

【図 5 F】

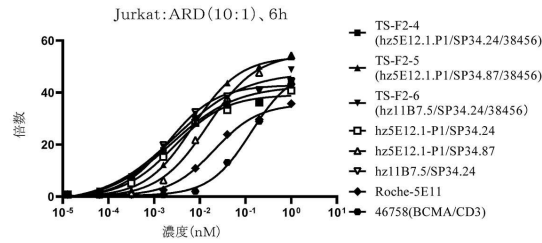


図5F

【図 6 A】

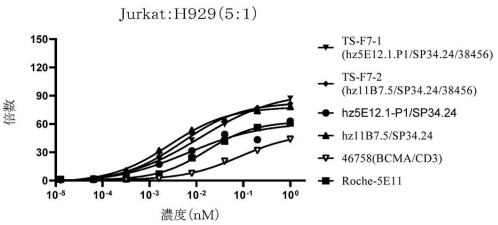


図6A

20

【図 6 B】

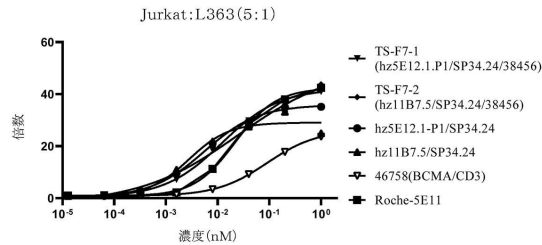


図6B

【図 6 C】

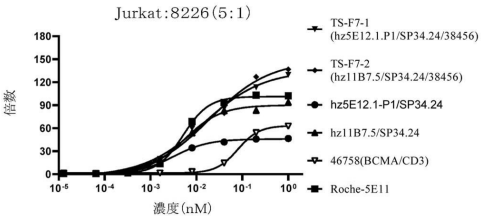


図6C

30

40

50

【図 6 D】

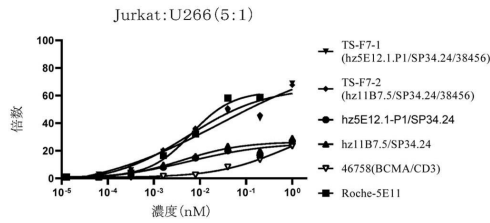


図6D

【図 7】

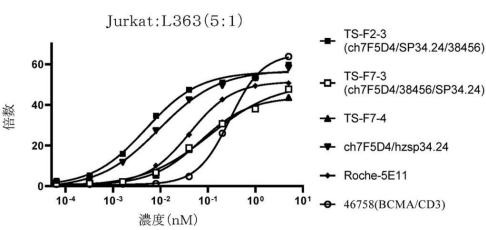


図7

【図 8】

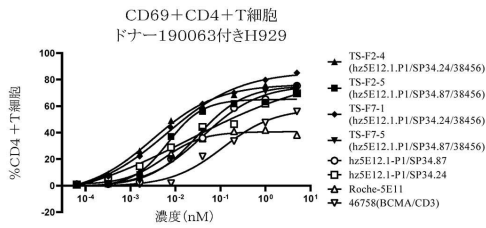


図8

【図 9】

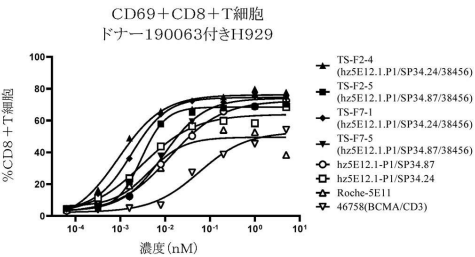


図9

【図 1 0】

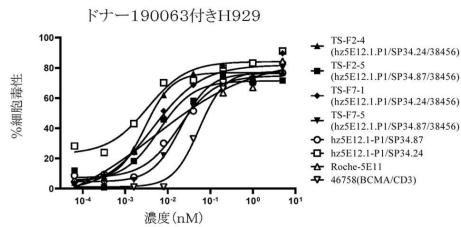


図10

【図 1 1 A】

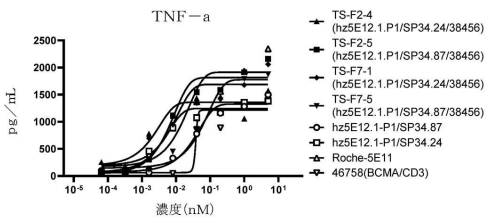


図11A

【図 1 1 B】

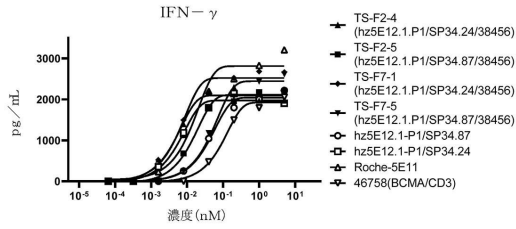


図11B

【図 1 1 C】

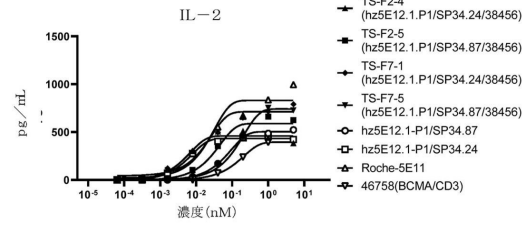


図11C

10

【図 1 1 D】

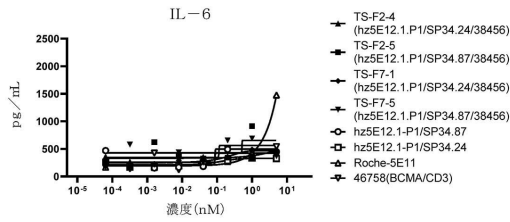


図11D

【図 1 2】

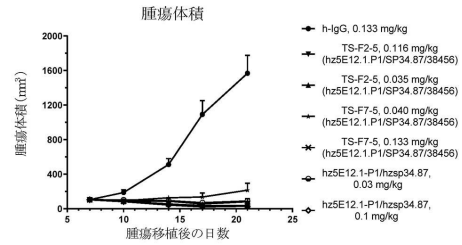


図12

20

【図 1 3】

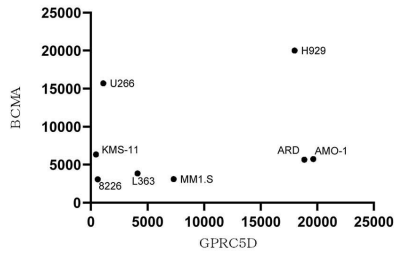


図13

30

【配列表】

2024510098000001.app

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/076832

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, NCBI, CNKI, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System, baidu, patents: 三特异性抗体, 信达生物制药, 徐伟, 沈鸿涛, 李莉, 王旋, trispecific, antibody, GPRC5D, BCMA, CD3, scFv, dsscFv, SEQ ID NO: 1-101.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LANCMAN, G. et al. "Bispecifics, trispecifics, and other novel immune treatments in myeloma." <i>Hematology</i> , 31 December 2020 (2020-12-31), pp. 264-271	1-7, 11-13, 20-26
Y	CASTOLDI, R. et al. "Molecular characterization of novel trispecific ErbB-cMet-IGF1R antibodies and their antigen-binding properties." <i>Protein Engineering, Design & Selection</i> , Vol. 25, No. 10, 31 December 2012 (2012-12-31), pp. 551-559	1-7, 11-13, 20-26
A	CN 112368019 A (JANSSEN BIOTECHNOLOGY, INC. et al.) 12 February 2021 (2021-02-12) claims 1-9	1-26
A	CN 112062851 A (NANJING IASO BIOTHERAPEUTICS TECHNOLOGY CO., LTD.) 11 December 2020 (2020-12-11) description, and abstract	1-26
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 March 2022		Date of mailing of the international search report 28 April 2022
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/076832

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU, Lan et al. "Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation." <i>Nature Cancer</i> , 18 November 2019 (2019-11-18), pp. 86-98	1-26
A	CN 109641953 A (BIOCAD JOINT STOCK CO.) 16 April 2019 (2019-04-16) entire document	1-26
A	CN 108473568 A (UCB BIOPHARMA SPRL) 31 August 2018 (2018-08-31) entire document	1-26
A	CN 109153728 A (ELSTAR THERAPEUTICS INC.) 04 January 2019 (2019-01-04) entire document	1-26
A	CN 102448985 A (HOFFMANN LA ROCHE) 09 May 2012 (2012-05-09) entire document	1-26
A	CN 109069638 A (GENSUN BIOPHARMA INC.) 21 December 2018 (2018-12-21) entire document	1-26
A	CN 111148761 A (SYSTIMMUNE INC. et al.) 12 May 2020 (2020-05-12) entire document	1-26
A	CN 108473577 A (AFFIMED GMBH) 31 August 2018 (2018-08-31) entire document	1-26
A	CN 107849148 A (HARPOON THERAPEUTICS, INC.) 27 March 2018 (2018-03-27) entire document	1-26
A	CN 106459216 A (UCB BIOPHARMA SPRL) 22 February 2017 (2017-02-22) entire document	1-26
A	WO 2020225805 A2 (IMMUNORIZON LTD.) 12 November 2020 (2020-11-12) entire document	1-26
A	CHO, S. F. et al. "BCMA-Targeting Therapy: Driving a New Era of Immunotherapy in Multiple Myeloma." <i>Cancers</i> , Vol. 12, No. 6, 05 June 2020 (2020-06-05), article no. 1473, pp. 1-29	1-26
A	SHAH, U. A. et al. "Emerging immunotherapies in multiple myeloma." <i>BMJ</i> , Vol. 370, 21 September 2020 (2020-09-21), article no. m3176, pp. 1-19	1-26
A	KODAMA, T. et al. "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell-Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." <i>Molecular Cancer Therapeutics</i> , Vol. 18, No. 9, 30 September 2019 (2019-09-30), pp. 1555-1564	1-26
A	VERKLEIJ, C. P. M. et al. "T-cell redirecting bispecific antibodies targeting BCMA for the treatment of multiple myeloma." <i>Oncotarget</i> , Vol. 11, No. 45, 10 November 2020 (2020-11-10), pp. 4076-4081	1-26
A	ZHOU, Xiang et al. "Bispecific Antibodies: A New Era of Treatment for Multiple Myeloma." <i>Journal of Clinical Medicine</i> , Vol. 9, No. 7, 09 July 2020 (2020-07-09), article no. 2166	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/076832
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		10
		20
		30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/076832

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: 1. ☒ Claims Nos.: 25-26 (部分) because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: [1] Claims 25-26 (in part) relate to "a disease treatment method", which belongs to the subject matter set out in PCT Rule 39(iv); however, the written opinion is provided on the basis of a "use in the preparation of a drug". 2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically: 3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/076832

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	112368019	A	12 February 2021	CL	2020002945	A1	26 March 2021
				PH	12020551908	A1	14 June 2021
				WO	2019220368	A1	21 November 2019
				JO	P20200292	A1	16 November 2019
				WO	2019220369	A2	21 November 2019
				JP	2021526512	A	07 October 2021
				AU	2019270624	A1	26 November 2020
				EP	3793606	A2	24 March 2021
				CA	3100157	A1	21 November 2019
				TW	202012442	A	01 April 2020
				UY	38235	A	29 November 2019
				BR	112020023264	A2	23 February 2021
				PH	12020551932	A1	21 June 2021
				KR	20210011002	A	29 January 2021
				JP	2021526136	A	30 September 2021
				MA	52640	A	24 March 2021
				US	2020190205	A1	18 June 2020
				AU	2019270623	A1	03 December 2020
				CN	113164588	A	23 July 2021
				SG	11202011306T	A	30 December 2020
				US	2019352421	A1	21 November 2019
				DO	P2020000209	A	30 September 2021
				MA	52632	A	24 March 2021
				BR	112020023187	A2	20 April 2021
				SG	11202010977Q	A	30 December 2020
				UY	38236	A	29 November 2019
				TW	202016132	A	01 May 2020
				EP	3793599	A1	24 March 2021
				CA	3100118	A1	21 November 2019
CN	112062851	A	11 December 2020	None			
CN	109641953	A	16 April 2019	MX	2018013262	A	22 April 2019
				RU	2016117140	A	01 November 2017
				EP	3450456	A1	06 March 2019
				NI	201800110	A	29 March 2019
				ZA	201807924	B	28 August 2019
				PH	12018550180	A1	25 March 2019
				CR	20180557	A	08 May 2019
				CA	3022648	A1	02 November 2017
				US	2021332120	A1	28 October 2021
				AU	2016404449	A1	06 December 2018
				EC	SP18088274	A	31 July 2019
				JP	2019518473	A	04 July 2019
				CL	2018003086	A1	26 April 2019
				BR	112018072294	A2	12 February 2019
				MA	43600	A1	29 March 2019
				KR	20190046716	A	07 May 2019
				WO	2017188850	A1	02 November 2017
CN	108473568	A	31 August 2018	UY	37035	A	31 July 2017
				EC	SP18054047	A	31 July 2018
				CA	3007493	A1	22 June 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/076832

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				WO	2017102830	A1		22 June 2017	
				RU	2018126318	A		20 January 2020	
				TW	201726731	A		01 August 2017	
				US	2020277366	A1		03 September 2020	
				SG	11201804803W	A		30 July 2018	
				MX	2018007289	A		28 September 2018	
				AU	2016369307	A1		12 July 2018	
				EA	201891446	A1		30 November 2018	
				AR	107735	A1		30 May 2018	
				MA	44061	A		24 October 2018	
				PH	12018501141	A1		28 January 2019	
				TN	2018000200	A1		04 October 2019	
				ZA	201803681	B		25 September 2019	
				EP	3390445	A1		24 October 2018	
				JP	2019502380	A		31 January 2019	
				KR	20180089514	A		08 August 2018	
				IL	259645	D0		31 July 2018	
				MA	42743	A1		31 July 2019	
				CL	2018001660	A1		19 October 2018	
				CO	2018006667	A2		10 July 2018	
				BR	112018011860	A2		04 December 2018	
				GB	201522391	D0		03 February 2016	
CN	109153728	A	04 January 2019	CA	3016563	A1		28 September 2017	
				WO	2017165464	A1		28 September 2017	
				US	2017368169	A1		28 December 2017	
				EP	3433281	A1		30 January 2019	
				AU	2017238172	A1		13 September 2018	
				JP	2019512272	A		16 May 2019	
CN	102448985	A	09 May 2012	PE	20120540	A1		09 May 2012	
				SG	176219	A1		29 December 2011	
				CL	2011002943	A1		15 June 2012	
				EP	2435473	A1		04 April 2012	
				US	2015030598	A1		29 January 2015	
				MX	2011011925	A		06 December 2011	
				US	2010322935	A1		23 December 2010	
				JP	2012528092	A		12 November 2012	
				RU	2011153016	A		10 July 2013	
				TW	201100543	A		01 January 2011	
				AU	2010252284	A1		17 November 2011	
				ES	2439802	T3		24 January 2014	
				KR	20120012838	A		10 February 2012	
				AR	076797	A1		06 July 2011	
				CA	2761233	A1		02 December 2010	
				WO	2010136172	A1		02 December 2010	
				ZA	201107920	B		26 March 2014	
				IL	215771	D0		31 January 2012	
				BR	PI1007602	A2		16 February 2016	
CN	109069638	A	21 December 2018	US	2017275353	A1		28 September 2017	
				US	2021115123	A1		22 April 2021	
				EP	3432927	A1		30 January 2019	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/076832

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
						WO	2017165681	A1	28 September 2017
CN	111148761	A	12 May 2020			EP	3645050	A2	06 May 2020
						WO	2019005637	A2	03 January 2019
						US	2020157213	A1	21 May 2020
						JP	2020529864	A	15 October 2020
CN	108473577	A	31 August 2018			IL	258638	D0	28 June 2018
						MX	2018004547	A	09 November 2018
						AU	2016336866	A1	10 May 2018
						SG	11201803083X	A	30 May 2018
						BR	112018007445	A2	10 December 2019
						WO	2017064221	A1	20 April 2017
						SG	10202004094V	A	28 May 2020
						KR	20180057720	A	30 May 2018
						EP	3362478	A1	22 August 2018
						JP	2018537415	A	20 December 2018
						ZA	201802543	B	29 January 2020
						RU	2018126966	A	10 February 2020
						CA	3001765	A1	20 April 2017
						EP	3156417	A1	19 April 2017
						US	2019040155	A1	07 February 2019
CN	107849148	A	27 March 2018			BR	112017024899	A2	13 November 2018
						EP	3932428	A1	05 January 2022
						HK	1252925	A1	06 June 2019
						CN	111234027	A	05 June 2020
						JP	2021168661	A	28 October 2021
						WO	2016187594	A1	24 November 2016
						AU	2016263808	A1	18 January 2018
						US	2017298149	A1	19 October 2017
						US	2021179735	A1	17 June 2021
						ES	2889906	T3	14 January 2022
						KR	20190080992	A	08 July 2019
						JP	2018517431	A	05 July 2018
						JP	2020125301	A	20 August 2020
						EP	3297672	A1	28 March 2018
						MX	2017014908	A	15 August 2018
						IL	255762	D0	31 January 2018
						AU	2019202283	A1	18 April 2019
						CA	2986575	A1	24 November 2016
						US	2016340444	A1	24 November 2016
						AU	2021201003	A1	11 March 2021
						EA	201792573	A1	30 April 2018
						SG	10202002131 P	A	28 May 2020
						KR	20180030477	A	23 March 2018
						IL	274151	D0	30 June 2020
CN	106459216	A	22 February 2017			PL	3556777	T3	12 July 2021
						GB	201411320	D0	06 August 2014
						HR	P20210389	T1	16 April 2021
						DK	3556777	T3	12 April 2021
						SG	11201609678Y	A	29 December 2016
						CL	2016003324	A1	18 August 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/076832

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		RS 61493 B1	31 March 2021
		EP 3556777 A1	23 October 2019
		SI 3161007 T1	30 October 2019
		HR P20191775 T1	27 December 2019
		ES 2866398 T3	19 October 2021
		JP 2017520253 A	27 July 2017
		KR 20170020367 A	22 February 2017
		RU 2017102193 A	25 July 2018
		LT 3161007 T	10 October 2019
		EP 3161007 A1	03 May 2017
		HU E053457 T2	28 June 2021
		CA 2951609 A1	30 December 2015
		AU 2015279128 A1	01 December 2016
		MY 176332 A	29 July 2020
		LT 3556777 T	12 April 2021
		MX 2016015952 A	05 April 2017
		ES 2750649 T3	26 March 2020
		HU E046027 T2	28 January 2020
		RS 59416 B1	29 November 2019
		PT 3556777 T	19 March 2021
		SG 10201911670Q A	27 February 2020
		US 2017204200 A1	20 July 2017
		IL 249003 D0	31 January 2017
		BR 112016027585 A2	30 January 2018
		WO 2015197772 A1	30 December 2015
		ME 03539 B	20 July 2020
		RU 2020115720 A	22 July 2020
		PT 3161007 T	25 October 2019
		PL 3161007 T3	28 February 2020
		DK 3161007 T3	14 October 2019
		AU 2019205981 A1	01 August 2019
		SI 3556777 T1	31 March 2021
WO 2020225805 A2	12 November 2020	None	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/076832
A. 主题的分类 C07K 19/00(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, VEN, NCBI, CNKI, 中国专利生物序列检索系统, baidu, patentics, 三特异性抗体, 信达生物制药, 徐伟, 沈湾湾, 李莉, 王旋, trispecific, antibody, GPRC5D, BCMA, CD3, scFv, dsscFv, SEQ ID NO:1-101.		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	LANCMAN, G. 等. "Bispecifics, trispecifics, and other novel immune treatments in myeloma." Hematology., 2020年12月31日 (2020 - 12 - 31), 第264-271页	1-7、11-13、20-26
Y	CASTOLDI, R. 等. "Molecular characterization of novel trispecific ErbB-cMet-IGF1R antibodies and their antigen-binding properties." Protein Engineering, Design & Selection., 第25卷, 第10期, 2012年12月31日 (2012 - 12 - 31), 第551-559页	1-7、11-13、20-26
A	CN 112368019 A (詹森生物科技公司等) 2021年2月12日 (2021 - 02 - 12) 权利要求1-9	1-26
A	CN 112062851 A (南京驯鹿医疗技术有限公司) 2020年12月11日 (2020 - 12 - 11) 说明书摘要	1-26
A	WU, L. 等. "Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor co-stimulation." Nature Cancer., 2019年11月18日 (2019 - 11 - 18), 第86-98页	1-26
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2022年3月28日		国际检索报告邮寄日期 2022年4月28日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		受权官员 朱宁 电话号码 86-(10)-53961956

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号
		PCT/CN2022/076832
C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 109641953 A (BIOCAD股份有限公司) 2019年4月16日 (2019 - 04 - 16) 全文	1-26
A	CN 108473568 A (UCB生物制药私人有限公司) 2018年8月31日 (2018 - 08 - 31) 全文	1-26
A	CN 109153728 A (埃尔斯塔治疗公司) 2019年1月4日 (2019 - 01 - 04) 全文	1-26
A	CN 102448985 A (霍夫曼-拉罗奇有限公司) 2012年5月9日 (2012 - 05 - 09) 全文	1-26
A	CN 109069638 A (源晨生物制药股份有限公司) 2018年12月21日 (2018 - 12 - 21) 全文	1-26
A	CN 111148761 A (西雅图免疫公司等) 2020年5月12日 (2020 - 05 - 12) 全文	1-26
A	CN 108473577 A (阿菲姆德股份有限公司) 2018年8月31日 (2018 - 08 - 31) 全文	1-26
A	CN 107849148 A (哈普恩治疗公司) 2018年3月27日 (2018 - 03 - 27) 全文	1-26
A	CN 106459216 A (UCB生物制药私人有限公司) 2017年2月22日 (2017 - 02 - 22) 全文	1-26
A	WO 2020225805 A2 (IMMUNORIZON LTD.) 2020年11月12日 (2020 - 11 - 12) 全文	1-26
A	CHO, S.F. 等. "BCMA-Targeting Therapy: Driving a New Era of Immunotherapy in Multiple Myeloma." Cancers., 第12卷, 第6期, 2020年6月5日 (2020 - 06 - 05), 第1473篇, 第1-29页	1-26
A	SHAH, U.A. 等. "Emerging immunotherapies in multiple myeloma." BMJ., 第370卷, 2020年9月21日 (2020 - 09 - 21), 第m3176篇, 第1-19页	1-26
A	KODAMA, T. 等. "Anti-GPRC5D/CD3 Bispecific T-Cell - Redirecting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma." Mol. Cancer Ther., 第18卷, 第9期, 2019年9月30日 (2019 - 09 - 30), 第1555-1564页	1-26
A	VERKLEIJ, C.P.M. 等. "T-cell redirecting bispecific antibodies targeting BCMA for the treatment of multiple myeloma." Oncotarget., 第11卷, 第45期, 2020年11月10日 (2020 - 11 - 10), 第4076-4081页	1-26
A	ZHOU, X. 等. "Bispecific Antibodies: A New Era of Treatment for Multiple Myeloma." J. Clin. Med., 第9卷, 第7期, 2020年7月9日 (2020 - 07 - 09), 第2166篇	1-26

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/076832
第I栏	核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)	
1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的: a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的: ☒ 附件C/ST. 25文本文件形式 ☐ 纸件或图形文件形式 b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的: c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的: ☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a)) ☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段) 2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。 3. 补充意见:		

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2022/076832
第II栏	某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)	
根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：		
1.	☒ 权利要求： 25-26（部分） 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： [1] 虽然权利要求25-26（部分）涉及“一种疾病的治疗方法”属于细则第39条（iv）规定的主题，但是基于“制备药物的用途”出具书面意见。	10
2.	☐ 权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：	
3.	☐ 权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。	20
		30
		40
		50

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2022/076832			
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	
CN	112368019	A	2021年2月12日	CL	2020002945	A1	2021年3月26日
				PH	12020551908	A1	2021年6月14日
				WO	2019220368	A1	2019年11月21日
				JO	P20200292	A1	2019年11月16日
				WO	2019220369	A2	2019年11月21日
				JP	2021526512	A	2021年10月7日
				AU	2019270624	A1	2020年11月26日
				EP	3793606	A2	2021年3月24日
				CA	3100157	A1	2019年11月21日
				TW	202012442	A	2020年4月1日
				UY	38235	A	2019年11月29日
				BR	112020023264	A2	2021年2月23日
				PH	12020551932	A1	2021年6月21日
				KR	20210011002	A	2021年1月29日
				JP	2021526136	A	2021年9月30日
				MA	52640	A	2021年3月24日
				US	2020190205	A1	2020年6月18日
				AU	2019270623	A1	2020年12月3日
				CN	113164588	A	2021年7月23日
				SG	11202011306T	A	2020年12月30日
				US	2019352421	A1	2019年11月21日
				DO	P2020000209	A	2021年9月30日
				MA	52632	A	2021年3月24日
				BR	112020023187	A2	2021年4月20日
				SG	11202010977Q	A	2020年12月30日
				UY	38236	A	2019年11月29日
				TW	202016132	A	2020年5月1日
				EP	3793599	A1	2021年3月24日
				CA	3100118	A1	2019年11月21日
CN	112062851	A	2020年12月11日	无			
CN	109641953	A	2019年4月16日	MX	2018013262	A	2019年4月22日
				RU	2016117140	A	2017年11月1日
				EP	3450456	A1	2019年3月6日
				NI	201800110	A	2019年3月29日
				ZA	201807924	B	2019年8月28日
				PH	12018550180	A1	2019年3月25日
				CR	20180557	A	2019年5月8日
				CA	3022648	A1	2017年11月2日
				US	2021332120	A1	2021年10月28日
				AU	2016404449	A1	2018年12月6日
				EC	SP18088274	A	2019年7月31日
				JP	2019518473	A	2019年7月4日
				CL	2018003086	A1	2019年4月26日
				BR	112018072294	A2	2019年2月12日
				MA	43600	A1	2019年3月29日
CN	108473568	A	2018年8月31日	KR	20190046716	A	2019年5月7日
				WO	2017188850	A1	2017年11月2日
				UY	37035	A	2017年7月31日
				EC	SP18054047	A	2018年7月31日
				CA	3007493	A1	2017年6月22日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告 关于同族专利的信息					国际申请号 PCT/CN2022/076832						
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)					
				WO	2017102830	A1	2017年6月22日				
				RU	2018126318	A	2020年1月20日				
				TW	201726731	A	2017年8月1日				
				US	2020277366	A1	2020年9月3日				
				SG	11201804803W	A	2018年7月30日				
				MX	2018007289	A	2018年9月28日				
				AU	2016369307	A1	2018年7月12日				
				EA	201891446	A1	2018年11月30日				
				AR	107735	A1	2018年5月30日				
				MA	44061	A	2018年10月24日				
				PH	12018501141	A1	2019年1月28日				
				TN	2018000200	A1	2019年10月4日				
				ZA	201803681	B	2019年9月25日				
				EP	3390445	A1	2018年10月24日				
				JP	2019502380	A	2019年1月31日				
				KR	20180089514	A	2018年8月8日				
				IL	259645	DO	2018年7月31日				
				MA	42743	A1	2019年7月31日				
				CL	2018001660	A1	2018年10月19日				
				CO	2018006667	A2	2018年7月10日				
				BR	112018011860	A2	2018年12月4日				
				GB	201522391	DO	2016年2月3日				
CN	109153728	A	2019年1月4日	CA	3016563	A1	2017年9月28日				
				WO	2017165464	A1	2017年9月28日				
				US	2017368169	A1	2017年12月28日				
				EP	3433281	A1	2019年1月30日				
				AU	2017238172	A1	2018年9月13日				
				JP	2019512272	A	2019年5月16日				
CN	102448985	A	2012年5月9日	PE	20120540	A1	2012年5月9日				
				SG	176219	A1	2011年12月29日				
				CL	2011002943	A1	2012年6月15日				
				EP	2435473	A1	2012年4月4日				
				US	2015030598	A1	2015年1月29日				
				MX	2011011925	A	2011年12月6日				
				US	2010322935	A1	2010年12月23日				
				JP	2012528092	A	2012年11月12日				
				RU	2011153016	A	2013年7月10日				
				TW	201100543	A	2011年1月1日				
				AU	2010252284	A1	2011年11月17日				
				ES	2439802	T3	2014年1月24日				
				KR	20120012838	A	2012年2月10日				
				AR	076797	A1	2011年7月6日				
				CA	2761233	A1	2010年12月2日				
				WO	2010136172	A1	2010年12月2日				
				ZA	201107920	B	2014年3月26日				
				IL	215771	DO	2012年1月31日				
				BR	PI1007602	A2	2016年2月16日				
				CN	109069638	A	2018年12月21日	US	2017275353	A1	2017年9月28日
								US	2021115123	A1	2021年4月22日
								EP	3432927	A1	2019年1月30日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/076832

检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利		公布日 (年/月/日)	
CN	111148761	A	2020年5月12日	WO	2017165681	A1		2017年9月28日	10
				EP	3645050	A2		2020年5月6日	
				WO	2019005637	A2		2019年1月3日	
				US	2020157213	A1		2020年5月21日	
				JP	2020529864	A		2020年10月15日	
CN	108473577	A	2018年8月31日	IL	258638	D0		2018年6月28日	20
				MX	2018004547	A		2018年11月9日	
				AU	2016336866	A1		2018年5月10日	
				SG	11201803083X	A		2018年5月30日	
				BR	112018007445	A2		2019年12月10日	
				WO	2017064221	A1		2017年4月20日	
				SG	10202004094V	A		2020年5月28日	
				KR	20180057720	A		2018年5月30日	
				EP	3362478	A1		2018年8月22日	
				JP	2018537415	A		2018年12月20日	
				ZA	201802543	B		2020年1月29日	
				RU	2018126966	A		2020年2月10日	
				CA	3001765	A1		2017年4月20日	
				EP	3156417	A1		2017年4月19日	
				US	2019040155	A1		2019年2月7日	
CN	107849148	A	2018年3月27日	BR	112017024899	A2		2018年11月13日	30
				EP	3932428	A1		2022年1月5日	
				HK	1252925	A1		2019年6月6日	
				CN	111234027	A		2020年6月5日	
				JP	2021168661	A		2021年10月28日	
				WO	2016187594	A1		2016年11月24日	
				AU	2016263808	A1		2018年1月18日	
				US	2017298149	A1		2017年10月19日	
				US	2021179735	A1		2021年6月17日	
				ES	2889906	T3		2022年1月14日	
				KR	20190080992	A		2019年7月8日	
				JP	2018517431	A		2018年7月5日	
				JP	2020125301	A		2020年8月20日	
				EP	3297672	A1		2018年3月28日	
				MX	2017014908	A		2018年8月15日	
				IL	255762	D0		2018年1月31日	
				AU	2019202283	A1		2019年4月18日	
				CA	2986575	A1		2016年11月24日	
				US	2016340444	A1		2016年11月24日	
				AU	2021201003	A1		2021年3月11日	
				EA	201792573	A1		2018年4月30日	
CN	106459216	A	2017年2月22日	SG	10202002131P	A		2020年5月28日	40
				KR	20180030477	A		2018年3月23日	
				IL	274151	D0		2020年6月30日	
				PL	3556777	T3		2021年7月12日	
				GB	201411320	D0		2014年8月6日	
				HR	P20210389	T1		2021年4月16日	
				DK	3556777	T3		2021年4月12日	
				SG	11201609678Y	A		2016年12月29日	

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2022/076832	
检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
		CL	2016003324	A1	2017年8月18日
		RS	61493	B1	2021年3月31日
		EP	3556777	A1	2019年10月23日
		SI	3161007	T1	2019年10月30日
		HR	P20191775	T1	2019年12月27日
		ES	2866398	T3	2021年10月19日
		JP	2017520253	A	2017年7月27日
		KR	20170020367	A	2017年2月22日
		RU	2017102193	A	2018年7月25日
		LT	3161007	T	2019年10月10日
		EP	3161007	A1	2017年5月3日
		HU	E053457	T2	2021年6月28日
		CA	2951609	A1	2015年12月30日
		AU	2015279128	A1	2016年12月1日
		MY	176332	A	2020年7月29日
		LT	3556777	T	2021年4月12日
		MX	2016015952	A	2017年4月5日
		ES	2750649	T3	2020年3月26日
		HU	E046027	T2	2020年1月28日
		RS	59416	B1	2019年11月29日
		PT	3556777	T	2021年3月19日
		SG	10201911670Q	A	2020年2月27日
		US	2017204200	A1	2017年7月20日
		IL	249003	D0	2017年1月31日
		BR	112016027585	A2	2018年1月30日
		WO	2015197772	A1	2015年12月30日
		ME	03539	B	2020年7月20日
		RU	2020115720	A	2020年7月22日
		PT	3161007	T	2019年10月25日
		PL	3161007	T3	2020年2月28日
		DK	3161007	T3	2019年10月14日
		AU	2019205981	A1	2019年8月1日
		SI	3556777	T1	2021年3月31日
WO	2020225805	A2	2020年11月12日	无	

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 35/17	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	C 0 7 K 16/28	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,J
P,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,N
A,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,
TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (74)代理人 100138210
弁理士 池田 達則
- (72)発明者 シュイ ウェイ
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8
- (72)発明者 シェン ワンワン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8
- (72)発明者 リー リー
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8
- (72)発明者 ワン シュアン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8
- (72)発明者 チュー チェンチュアン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3, スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8

F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA43 CA44
4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59
4C085 AA13 AA14 AA21 BB36 BB41 BB42 BB44 CC01 CC08 DD62
EE01 EE03
4C087 AA01 AA02 BB37 BC83 MA02 NA05 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 BA10 BA41 DA76 EA20 FA74 GA26