

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7462011号
(P7462011)

(45)発行日 令和6年4月4日(2024.4.4)

(24)登録日 令和6年3月27日(2024.3.27)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
請求項の数 28 外国語出願 (全81頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-174143(P2022-174143)	(73)特許権者	519451898	
(22)出願日	令和4年10月31日(2022.10.31)		テネオワン, インコーポレイテッド	
(62)分割の表示	特願2022-564820(P2022-564820)の分割		アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 4 、ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン ・ロード・1	
原出願日	令和3年4月29日(2021.4.29)	(74)代理人	110002077	
(65)公開番号	特開2023-81303(P2023-81303A)		園田・小林弁理士法人	
(43)公開日	令和5年6月9日(2023.6.9)	(72)発明者	ハリス, キャサリン	
審査請求日	令和5年6月7日(2023.6.7)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ ブールバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0	
(31)優先権主張番号	63/017,589	(72)発明者	シェレンベルガー, ウテ	
(32)優先日	令和2年4月29日(2020.4.29)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		最終頁に続く	
(31)優先権主張番号	63/108,796			
(32)優先日	令和2年11月2日(2020.11.2)			
(33)優先権主張国・地域又は機関				
最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 重鎖定常領域が修飾された多重特異性重鎖抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドサブユニット；
(i i) 配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドサブユニット；及び
(i i i) 配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む、ヒト B C M A に結合する第 3 のポリペ
プチドサブユニット
を含み、第 1 のポリペプチドサブユニットと第 2 のポリペプチドサブユニットとが一緒にな
って、ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合部分を形成する、ヒト C D 3 及びヒト B C M A
に結合する、二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項2】

第 1 のポリペプチドサブユニットが軽鎖を含む、請求項 1 に記載の二重特異性モノクロー
ナル抗体。

【請求項3】

第 2 のポリペプチドサブユニットが重鎖を含む、請求項 1 に記載の二重特異性モノクロー
ナル抗体。

【請求項4】

第 3 のポリペプチドサブユニットが 2 価の重鎖を含む、請求項 1 に記載の二重特異性モノ
クローナル抗体。

【請求項5】

2 価の重鎖が、2 価の構成において重鎖のみの可変領域を含む、請求項 4 に記載の二重

特異性モノクローナル抗体。

【請求項 6】

2 価の重鎖が C H 1 ドメインを欠く、請求項 4 に記載の二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項 7】

(i) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドサブユニット；

(i i) 配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む第 2 のポリペプチドサブユニット；及び

(i i i) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む、ヒト B C M A に結合する第 3 のポリペプチドサブユニット

を含み、第 1 のポリペプチドサブユニットと第 2 のポリペプチドサブユニットとが一緒になって、ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合部分を形成する、ヒト C D 3 及びヒト B C M A に結合する、二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項 8】

第 1 のポリペプチドサブユニットが軽鎖を含む、請求項 7 に記載の二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項 9】

第 2 のポリペプチドサブユニットが重鎖を含む、請求項 7 に記載の二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項 1 0】

第 3 のポリペプチドサブユニットが 2 価の重鎖を含む、請求項 7 に記載の二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項 1 1】

2 価の重鎖が、2 価の構成において重鎖のみの可変領域を含む、請求項 1 0 に記載の二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項 1 2】

2 価の重鎖が C H 1 ドメインを欠く、請求項 1 0 に記載の二重特異性モノクローナル抗体。

【請求項 1 3】

(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム；及び

(i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アーム

を含み、

第 1 の結合アームが配列番号 5 6 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、且つ

第 2 の結合アームが配列番号 5 8 のアミノ酸配列を含む 2 価の第 2 の重鎖を含む、ヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 1 4】

第 2 の結合アームが軽鎖を含まない、請求項 1 3 に記載のヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 1 5】

2 価の第 2 の重鎖が 2 価の構成において重鎖のみの可変領域を含む、請求項 1 3 に記載のヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 1 6】

2 価の第 2 の重鎖が C H 1 ドメインを欠く、請求項 1 3 に記載のヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 1 7】

(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム；及び

(i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アーム

を含み、

第 1 の結合アームが配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、且つ

第 2 の結合アームが配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含む 2 価の第 2 の重鎖を含む、

10

20

30

40

50

ヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 1 8】

第 2 の結合アームが軽鎖を含まない、請求項 1 7 に記載のヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 1 9】

2 価の第 2 の重鎖が 2 価の構成において重鎖のみの可変領域を含む、請求項 1 7 に記載のヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 2 0】

2 価の第 2 の重鎖が C H 1 ドメインを欠く、請求項 1 7 に記載のヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体。

【請求項 2 1】

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体及び薬学的に許容可能な担体を含む、医薬組成物。

【請求項 2 2】

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載のベクターを含む細胞。

【請求項 2 5】

二重特異性抗体の発現を許容する条件下で請求項 2 4 に記載の細胞を増殖させること、及び細胞から二重特異性抗体を単離することを含む、二重特異性抗体を製造するための方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体及び使用説明書を含むキット。

【請求項 2 7】

治療を必要とするヒト対象における B C M A 発現がんの治療のための、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の治療有効量を含む、医薬。

【請求項 2 8】

治療を必要とするヒト対象における B C M A 発現がんの治療のための医薬の製造における、請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 0 年 4 月 2 9 日に提出された米国仮特許出願第 6 3 / 0 1 7 , 5 8 9 号、及び 2 0 2 0 年 1 1 月 2 日に提出された米国仮特許出願第 6 3 / 1 0 8 , 7 9 6 号の出願日の優先権を主張し、その出願の開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

本発明は、有利な特性を付与する修飾された重鎖定常領域を有する多重特異性ヒト重鎖抗体（例えば、U n i A b s（商標））に関する。本発明はさらに、そのような抗体の作製方法、そのような抗体を含む医薬組成物などの組成物、及び本明細書に記載の結合標的の 1 つ以上の発現を特徴とする障害を治療するためのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

修飾された F c 領域

タンパク質工学の進歩により、2 つ以上の標的に対して結合親和性を有する多重特異性抗体の製造及び臨床利用は成功を収めている。しかしながら、それらのヘテロ二量体の性質により、多重特異性抗体において、所望の組み合わせの結合配列、したがってポリペプ

10

20

30

40

50

チドサブユニットの適切な対形成を容易にするために、適切な手段を利用しなければならない。Wang et al., mAbs 10:8, 1226-1235 (2018)。
【0004】

不対合ポリペプチドサブユニットの問題を回避する1つのアプローチは、「ノブイントゥホール」(KiH)として知られており、これは、CH2及び／またはCH3ドメインに変異を導入して接触界面を改変することによって2つの異なる抗体重鎖の対形成を強制することを目的としている。一方の鎖では、かさばるアミノ酸を短い側鎖を有するアミノ酸に置き換えて「ホール」を創出する。逆に、大きな側鎖を有するアミノ酸をもう一方の重鎖に導入して「ノブ」を創出する。これらの2つの重鎖を共発現させることにより、ノブ-ホール対合のより好ましい安定性により、ヘテロ二量体形成(「ノブ-ホール」)が、ホモ二量体形成(「ホール-ホール」または「ノブ-ノブ」)に対してより高い収率で観察される(Ridgway, J. B., et al, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; 及びWO96/027011)。

10

【0005】

この戦略は、所望のヘテロ二量体を達成するのに魅力的であるように思われるが、得られる多重特異性抗体の他の特性は、Fc領域の特定のアミノ酸配列、すなわち、例えば補体依存性細胞傷害(CDC)及び抗体依存性細胞傷害(ADCC)などのエフェクター機能に大きく依存する。さらに、エフェクター機能活性はサイトカインの産生を誘発する可能性があり、これは望ましくない炎症反応の「サイトカインストーム」をもたらし得る。Gupta et al., Journal of Interferon & Cytokine Research 40:1, 19-23 (2019)。したがって、特定の状況では、例えば、多重特異性抗体が結合する免疫細胞(例えば、T細胞)の損傷または死滅を回避するために、及び／または望ましくないサイトカイン産生とその結果生じる望ましくない炎症反応を回避するために、エフェクター機能を低減または完全に排除する必要がある。

20

【0006】

さらに、タンパク質へのアミノ酸改変の導入は、重大な欠点を有する可能性があり、すなわち、非天然配列の存在に基づいて、タンパク質に対する患者による免疫応答を誘発する可能性がある。そのため、多重特異性抗体の開発には、天然の抗体(IgA、IgD、IgE、IgG、IgMなど)と一般的な構造が非常に類似しており、天然の配列からの逸脱が最小限であるが、同時に、所望のヘテロ二量体化を促進するという目標を達成する一方で、1つ以上のエフェクター機能の低減または排除も達成することができる改変を成功裏に組み込む配列を同定することが必要とされる。

30

【0007】

これらの競合する要件のバランスを取るために、本発明者らは、天然配列が比較的低レベルのエフェクター機能活性を有することが知られているIgG4 Fcに注目した。Crescioli et al., Curr Allergy Asthma Rep 16:7 (2016)。しかしながら、このような表面的な利点にもかかわらず、IgG4は、その特定のヒンジ領域配列に起因して、in vivoで鎖交換反応を起こすことが知られており、所望のヘテロ二量体化を達成するうえで、さらなる複雑さを呈している。Labrijn et al., Nature Biotechnology 27, 767-771 (2009)。したがって、所望のヘテロ二量体化を達成し、エフェクター機能を低減または排除する修飾を組み込み、同時にIgG4の鎖交換反応を低減または排除する修飾を組み込む、修飾された重鎖定常領域配列が必要とされている。本明細書に記載の分子は、これら及び他の課題に対処する。

40

【0008】

重鎖抗体

従来のIgG抗体では、重鎖と軽鎖の会合は、軽鎖定常領域と重鎖のCH1定常ドメインとの間の疎水性相互作用に部分的に起因している。重鎖フレームワーク2(FR2)及びフレームワーク4(FR4)領域にも、重鎖と軽鎖の間のこの疎水性相互作用に寄与す

50

る追加の残基が存在する。

【0009】

しかしながら、ラクダ科の動物（ラクダ、ヒトコブラクダ、及びラマを含む *Tylopoda* 亜目）の血清には、対になったH鎖のみからなる主要なタイプの抗体（重鎖のみ抗体またはUniAbs（商標））が含まれていることが知られている。ラクダ科（*Camelus dromedarius*、*Camelus bactrianus*、*Lama glama*、*Lama guanaco*、*Lama alpaca*及び*Lama vicugna*）のUniAbs（商標）は、単一の可変ドメイン（VHH）、ヒンジ領域及び2個の定常ドメイン（CH2及びCH3）からなる固有の構造を有し、これら定常ドメインは、古典的な抗体のCH2及びCH3ドメインと高度に相同性がある。これらUniAbs（商標）は、ゲノム中に存在するが、mRNAプロセッシング中にスプライシング除去される定常領域（CH1）の第1のドメインを欠損している。CH1ドメインがないということが、UniAbs（商標）に軽鎖がないことを説明しており、なぜなら、このドメインが軽鎖の定常ドメインの固定場所であるからである。そのようなUniAbs（商標）は、従来の抗体またはその断片に由来する3つのCDRによって、その抗原結合特異性及び高親和性を付与するように自然進化した（Muyldermans, 2001; J. Biotechnol. 74:277-302, Revets et al., 2005; Expert Opin Biol Ther 5:111-124）。サメなどの軟骨魚も、IgNARと呼ばれる独特のタイプの免疫グロブリンを進化させており、これは、軽鎖ポリペプチドを欠損し、完全に重鎖からなる。IgNAR分子を、分子工学によって操作し、単一の重鎖ポリペプチド（vNAR）の可変ドメインを生成することができる（Nuttall et al. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003)、Nuttall et al. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004)、Dooley et al., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003)）。

【0010】

軽鎖を欠く重鎖のみの抗体が抗原に結合する能力は、1960年代に確立された（Jatton et al. (1968) Biochemistry, 7, 4185-4195）。軽鎖から物理的に分離された重鎖免疫グロブリンは、四量体抗体と比較して抗原結合活性の80%を保持していた。Sitia et al. (1990) Cell, 60, 781-790は、再構成したマウス μ 遺伝子由来のCH1ドメインを除去することにより、哺乳類細胞培養物中において、軽鎖を欠損した重鎖のみの抗体が産生されることを示した。産生された抗体は、VH結合特異性を保持するとともに、エフェクター機能を有していた。

【0011】

免疫化によって、高い特異性と親和性を備えた重鎖抗体を、様々な抗原に対して生成することができ（van der Linden, R. H., et al. Biochim. Biophys. Acta. 1431, 37-46 (1999)）、VHH部分は、容易に酵母中でクローニングし、発現させることができる（Frenken, L. G. J., et al. J. Biotechnol. 78, 11-21 (2000)）。それらの発現、溶解度及び安定性のレベルは、古典的なF(ab)またはFvフラグメントに比べて有意に高い（Ghahroudi, M. A. et al. FEBS Lett. 414, 521-526 (1997)）。

【0012】

λ （ラムダ）軽（L）鎖遺伝子座及び／または λ 及び κ （カッパ）L鎖遺伝子座が機能的にサイレンシングされているマウス、ならびにそのようなマウスによって産生される抗体は、米国特許第7,541,513号及び第8,367,888号に記載されている。マウス及びラットにおける重鎖のみの抗体の組換え産生は、例えば、WO2006008548、米国出願公開第20100122358号、Nguyen et al., 2003, Immunology; 109(1), 93-101、Bruggemann et

al., Crit. Rev. Immunol.; 2006, 26 (5): 377-90、及び Zou et al., 2007, J Exp Med; 204 (13): 3271-3283 に報告されている。ジンクフィンガーヌクレアーゼの胚マイクロインジェクションによるノックアウトラットの作製は、Geurts et al., 2009, Science, 325 (5939): 433 に記載されている。可溶性重鎖のみ抗体及びそのような抗体を産生する異種重鎖遺伝子座を有するトランスジェニック齧歯動物は、米国特許第 8,883,150 号及び第 9,365,655 号に記載されている。結合（ターゲティング）ドメインとして単一ドメイン抗体を含む CAR-T 構造は、例えば、Iri-Sofla et al., 2011, Experimental Cell Research 317: 2630-2641 及び Jamnani et al., 2014, Biochim Biophys Acta, 1840: 378-386 に記載されている。

10

【0013】

B 細胞成熟抗原 (BCMA)

腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー 17 (TNFRSF17) (UniProt Q02223) としても知られる BCMA は、形質細胞及び形質芽細胞上に排他的に発現する細胞表面受容体である。BCMA は、腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーの 2 つのリガンド: APRIL (TNFSF13; TALL-2 及び TRDL-1 としても知られる増殖誘導リガンド; BCMA の高親和性リガンド) ならびに B 細胞活性化因子 (BAFF) (BLyS; TALL-1; THANK; zTNF4; TNFSF20; 及び D8Ertd387e としても知られる; BCMA の低親和性リガンド) の受容体である。APRIL と BAFF は、BCMA に結合して形質細胞の生存を促進する成長因子である。BCMA は、ヒト多発性骨髄腫 (MM) の悪性形質細胞にも高度に発現している。BCMA に結合する抗体は、例えば、Gras et al., 1995, Int. Immunol. 7: 1093-1106, WO200124811 及び WO200124812 に記載されている。TACI と交差反応する抗 BCMA 抗体は、WO2002/066516 に記載されている。BCMA 及び CD3 に対する二重特異性抗体は、例えば、US2013/0156769 A1 及び US2015/0376287 A1 に記載されている。抗 BCMA 抗体-MMAE または抗 BCMA 抗体-MMAF 複合体は、多発性骨髄腫細胞の死滅を選択的に誘導することが報告されている (Tai et al., Blood 2014, 123 (20): 3128-38)。Ali et al., Blood 2016, 128 (13): 1688-700 は、臨床試験 (#NCT02215967) で、BCMA を標的とするキメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞が、ヒト患者において多発性骨髄腫の寛解をもたらしたことを報告した。

20

30

【0014】

PSMA

PSMA は、前立腺特異的膜抗原及びグルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II (UniProt Q04609) とも呼ばれ、N-アセチル化- α 結合-酸性ジペプチダーゼ、葉酸ヒドロラーゼ、及びジペプチジルペプチダーゼ活性を有する II 型膜貫通タンパク質である。これは、ヒトの FOLH1 遺伝子によってコードされており、19 アミノ酸の細胞質ドメイン、24 アミノ酸の膜貫通部分、及び 707 アミノ酸の細胞外部分からなる。このタンパク質は、非共有結合ホモダイマーとして酵素的に活性である。PSMA は、前立腺上皮組織に発現し、前立腺癌及び固形腫瘍の新生血管系で上方制御される。また、脳、腎臓、唾液腺などの健康な組織でも低レベルで発現するが、悪性前立腺組織での過剰発現は、前立腺癌の治療的処置の魅力的な標的となる。また、悪性新生血管系での発現が高いことから、固形腫瘍の治療または画像診断にも適し得る。PSMA を標的とするモノクローナル抗体、抗体薬物複合体、及びキメラ抗原受容体 T 細胞は、転移性前立腺癌の治療に関して記載されている (Hernandez-Hoyos et al 2016, PMID: 27406985、DiPippo et al 2014, PMID: 25327986、Serganova et al 2016, PMID: 28345023)。さらに、PSMA に特異的な放射性核種複合体が、前立腺癌の画像化及び治療のために調

40

50

査されているところである（例えば、Hofman et al., 2018 PMID: 29752180）。

【0015】

CD19

Bリンパ球表面抗原B4（UniProt P15391）としても知られるCD19は、すべてのヒトB細胞で発現するが、形質細胞には認められない細胞表面受容体である。CD19は、細胞質シグナル伝達タンパク質を膜に動員する膜貫通タンパク質であり、CD19／CD21複体内で作用して、B細胞受容体シグナル伝達経路の閾値を低下させる。CD19は、比較的大きな240アミノ酸の細胞質尾部を有する。細胞外Ig様ドメインは、潜在的なジスルフィド結合非Ig様ドメインと、N結合炭水化物付加部位に分けられる。細胞質尾部は、C末端付近に少なくとも9つのチロシン残基を含み、その一部はリン酸化されていることが示されている。CD20及びCD22に加えて、CD19の発現がB細胞系統に限定されていることから、CD19は、B細胞悪性腫瘍の治療処置に関して魅力的な標的となる。CD19に特異的な多くのモノクローナル抗体及び抗体薬物複合体が記載されている（例えば、Naddafi et al., 2015, PMC4644525）。さらに、抗CD19キメラ抗原受容体T細胞は、白血病の治療に承認されている（例えば、Sadelain et al., 2017, PMID: 29245005）。

10

【発明の概要】

【0016】

本発明の態様は、変異S228P、F234A、L235A、及びT366Wを含む変異ヒトIgG4定常領域を含む第1の重鎖ポリペプチドサブユニット；変異S228P、F234A、L235A、T366S、L368A、及びY407Vを含む変異ヒトIgG4定常領域を含む第2の重鎖ポリペプチドサブユニットを含む、単離された多重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、第1の重鎖ポリペプチドサブユニットの変異ヒトIgG4定常領域または第2の重鎖ポリペプチドサブユニットの変異ヒトIgG4定常領域は、CH1ドメインを欠いている。いくつかの実施形態では、第1の重鎖ポリペプチドサブユニットの変異ヒトIgG4定常領域は、配列番号73または55の配列を含み、第2の重鎖ポリペプチドサブユニットの変異ヒトIgG4定常領域は、配列番号72または54の配列を含む。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、本発明の実施形態による多重特異性抗体は、配列番号36の配列を含むCDR1配列、配列番号37の配列を含むCDR2配列、及び配列番号38の配列を含むCDR3配列を含む重鎖可変ドメイン；ならびに配列番号39の配列を含むCDR1配列、配列番号40の配列を含むCDR2配列、及び配列番号41の配列を含むCDR3配列を含む軽鎖可変ドメインを含み、CD3に対する結合特異性を有する第1の結合部分をさらに含む。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、第1の結合部分の重鎖可変ドメイン内のCDR1、CDR2及びCDR3配列は、ヒトVHフレームワークに存在し；第1の結合部分の軽鎖可変ドメイン内のCDR1、CDR2及びCDR3配列は、ヒトVKフレームワークに存在する。いくつかの実施形態では、第1の結合部分の重鎖可変ドメインは、配列番号42と少なくとも95%の同一性を有する配列を含み、第1の結合部分の軽鎖可変ドメインは、配列番号43と少なくとも95%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の結合部分の重鎖可変ドメインは、配列番号42の配列を含み；第1の結合部分の軽鎖可変ドメインは、配列番号43の配列を含む。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、本発明の実施形態による多重特異性抗体は、CD3以外のタンパク質に対する結合特異性を有する第2の結合部分をさらに含む。いくつかの実施形態では、第2の結合部分は、一価または二価の構成で、単一の重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態では、第1の結合部分は、軽鎖ポリペプチドサブユニット及び重鎖ポリペプ

50

チドサブユニットを含み、第2の結合部分は、重鎖ポリペプチドサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、第1の結合部分の軽鎖ポリペプチドサブユニットは、軽鎖定常ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CD3以外のタンパク質は、腫瘍関連抗原（TAA）または腫瘍特異抗原（TSA）である。いくつかの実施形態では、TAAはB細胞成熟抗原（BCMA）である。いくつかの実施形態では、TAAはCD19である。いくつかの実施形態では、TAAは前立腺特異的膜抗原（PSMA）である。

【0020】

本発明の態様は、本明細書に記載の多重特異性抗体、本明細書に記載の多重特異性抗体をコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドを含むベクター、及びそのようなベクターを含む細胞を含む医薬組成物を含む。

10

【0021】

本発明の態様は、多重特異性抗体の発現を許容する条件下で本明細書に記載の細胞を増殖させ、細胞から多重特異性抗体を単離することを含む、本明細書に記載の多重特異性抗体の産生方法を含む。

【0022】

本発明の態様は、本明細書に記載の有効用量の多重特異性抗体、または医薬組成物を、必要とする個体に投与することを含む、治療方法を含む。

【0023】

本発明の態様は、必要とする個体における疾患または障害の治療のための薬剤の調製における、本明細書に記載の多重特異性抗体の使用を含む。

20

【0024】

本発明の態様は、本明細書に記載の有効用量の多重特異性抗体または医薬組成物を、必要とする個体に投与することを含む、BCMAの発現を特徴とする疾患または病態の治療方法を含む。いくつかの実施形態では、疾患は自己免疫疾患である。いくつかの実施形態では、疾患はがんである。いくつかの実施形態では、がんは骨髄腫である。いくつかの実施形態では、骨髄腫は多発性骨髄腫である。

【0025】

本発明の態様は、本明細書に記載の有効用量の多重特異性抗体または医薬組成物を、必要とする個体に投与することを含む、PSMAの発現を特徴とする疾患または病態の治療方法を含む。いくつかの実施形態では、疾患はがんである。いくつかの実施形態では、がんは前立腺癌である。

30

【0026】

本発明の態様は、本明細書に記載の有効用量の多重特異性抗体または医薬組成物を、必要とする個体に投与することを含む、CD19の発現を特徴とする疾患または病態の治療方法を含む。いくつかの実施形態では、障害はびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）である。いくつかの実施形態では、障害は急性リンパ芽球性白血病（ALL）である。いくつかの実施形態では、障害は非ホジキンリンパ腫（NHL）である。いくつかの実施形態では、障害は全身性エリテマトーデス（SLE）である。いくつかの実施形態では、障害は関節リウマチ（RA）である。いくつかの実施形態では、障害は多発性硬化症（MS）である。

40

【0027】

本発明の態様は、本明細書に記載の多重特異性抗体または医薬組成物、及び使用説明書を含む、必要とする個体の疾患または障害を治療するためのキットを含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも1つの追加の試薬をさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加の試薬は、化学療法薬を含む。

【0028】

本発明の態様は、配列番号43の配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）；及び軽鎖定常ドメイン（CL）を含む第1のポリペプチドサブユニット；配列番号42の配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）；及び配列番号72または73の配列を含む重鎖定常ドメイン（CH）を含む第2のポリペプチドサブユニットを含み；その場合、軽鎖可変ドメインと重

50

鎖可変ドメインは、一緒になって、C D 3 に対する結合特異性を有する第 1 の結合部分を形成し；さらに C D 3 以外のタンパク質に対する結合特異性を有する一価または二価構成の重鎖のみの可変領域、及び配列番号 5 4 または 5 5 の配列を含む重鎖定常ドメイン（C H）を含む第 3 のポリペプチドサブユニットを含む、二重特異性三本鎖抗体様分子を含む。いくつかの実施形態では、第 3 のポリペプチドサブユニットは、B C M A に対する結合特異性を有する二価構成の重鎖のみの可変領域を含む。

【0029】

本発明の態様は、配列番号 4 9 の配列を含む第 1 のポリペプチドサブユニット；配列番号 5 6 の配列を含む第 2 のポリペプチドサブユニット；及び配列番号 5 8 の配列を含む第 3 のポリペプチドサブユニットを含む、二重特異性三本鎖抗体様分子を含む。

10

【0030】

本発明の態様は、本明細書に記載の二重特異性三本鎖抗体様分子、本明細書に記載の二重特異性三本鎖抗体様分子をコードするポリヌクレオチド、そのようなポリヌクレオチドを含むベクター、及びそのようなベクターを含む細胞を含む医薬組成物を含む。

【0031】

本発明の態様は、二重特異性三本鎖抗体様分子の発現を許容する条件下で本明細書に記載の細胞を増殖させ、細胞から二重特異性三本鎖抗体様分子を単離することを含む、本明細書に記載の二重特異性三本鎖抗体様分子の産生方法を含む。

【0032】

本発明の態様は、本明細書に記載の有効用量の二重特異性三本鎖抗体様分子または医薬組成物を、必要とする個体に投与することを含む治療方法を含む。

20

【0033】

本発明の態様は、必要とする個体における疾患または障害の治療のための薬剤の調製における、本明細書に記載の二重特異性三本鎖抗体様分子の使用を含む。

【0034】

本発明の態様は、本明細書に記載の有効用量の二重特異性三本鎖抗体様分子または医薬組成物を、必要とする個体に投与することを含む、B C M A の発現を特徴とする疾患または病態の治療方法を含む。いくつかの実施形態では、疾患は自己免疫疾患である。いくつかの実施形態では、疾患はがんである。いくつかの実施形態では、がんは骨髄腫である。いくつかの実施形態では、骨髄腫は多発性骨髄腫である。

30

【0035】

本発明の態様は、本明細書に記載の二重特異性三本鎖抗体様分子または医薬組成物、及び使用説明書を含む、必要とする個体の疾患または障害を治療するためのキットを含む。いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも 1 つの追加の試薬をさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの追加の試薬は、化学療法薬を含む。

【0036】

これらの態様、及びさらなる態様は、実施例を含む本開示の残りの部分において、さらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0037】

40

【図 1】 パネル A ～ C は、本発明の実施形態による様々な多重特異性抗体の図を示す。

【図 2】 パネル A ～ B は、プロテイン A クロマトグラフィーによって精製された様々な抗体種の非還元 S D S - P A G E 分析の画像を示す。

【図 3】 パネル A は、プロテイン A クロマトグラフィーによって精製された様々な抗体種の非還元 S D S - P A G E 分析の画像を示す。パネル B は、パネル A と同じ抗体種の還元 S D S - P A G E 分析の画像を示す。

【図 4】 パネル A ～ D は、本発明の実施形態による、様々な I g G 1 抗体種についての F c γ 受容体 - 抗体相互作用を示すグラフである。

【図 5】 パネル A ～ E は、本発明の実施形態による、様々な I g G 4 抗体種についての F c γ 受容体 - 抗体相互作用を示すグラフである。

50

【図6】パネルA～Dは、本発明の実施形態による、様々なIgG1抗体種についてのFcγ受容体-抗体相互作用を示すグラフである。

【図7】パネルA～Eは、本発明の実施形態による、様々なIgG4抗体種についてのFcγ受容体-抗体相互作用を示すグラフである。

【図8】パネルAは、ヒトPSMAへの細胞結合を示すグラフである。パネルBは、カニクイザルPSMAへの細胞結合を示すグラフである。

【図9】非刺激T細胞を用いたPSMA陽性細胞のT細胞媒介性溶解を示すグラフである。

【図10】事前活性化されたT細胞を用いたPSMA陽性細胞のT細胞媒介性溶解を示すグラフである。

【図11】事前活性化されたT細胞の存在下での多重特異性抗体濃度の関数としてのPSMA陰性DU145細胞のパーセント特異的溶解を示すグラフである。

10

【図12】PSMA陽性及び陰性細胞へのPSMA×CD3二重特異性抗体の結合を示すグラフである。

【図13】PSMA陽性細胞のT細胞媒介性溶解を示すグラフである。

【図14】パネルAは、抗体濃度の関数としてのPSMA陽性細胞のT細胞媒介溶解を示すグラフである。パネルBは、抗体濃度の関数としてのサイトカイン（IFNγ）放出を示すグラフである。パネルCは、抗体濃度の関数としてのサイトカイン（IL-2）放出を示すグラフである。

【図15】パネルAは、抗体濃度の関数としてのT細胞増殖を示すグラフである。パネルBは、抗体濃度の関数としてのT細胞増殖を示すグラフである。パネルCは、増殖したT細胞のCD8対CD4の比を示すグラフである。パネルDは、増殖したT細胞のCD8対CD4の比を示すグラフである。

20

【図16】腫瘍異種移植モデルにおける22Rv1腫瘍増殖の阻害を示すグラフである。

【図17】凡例に示される二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD4+CD69+T細胞（%）を示すグラフである。

【図18】凡例に示される二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞（%）を示すグラフである。

【図19】凡例に示される二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞（%）を示すグラフである。

【図20】凡例に示される二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞（%）を示すグラフである。

30

【図21】パネルA～Dは、二重特異性抗体媒介腫瘍細胞溶解を示すいくつかのグラフを示す。抗CD3×抗BCMA二重特異性抗体を、活性化された初代T細胞のリダイレクションを通じて3つの異なるBCMA+腫瘍細胞と1つのBCMA陰性細胞株を殺傷する能力についてアッセイした。この実験では、二重特異性抗体の添加とともに、腫瘍細胞を活性化汎T細胞と10：1のE：T比で混合した。パネルAは、RPMI-8226細胞の殺傷を示し、パネルBは、NCI-H929細胞の殺傷を示し、パネルCは、U-266細胞の殺傷を示し、パネルDは、陰性対照であるK562細胞の殺傷を示す。x軸は使用した抗体の濃度を示し、y軸は抗体添加6時間後の腫瘍細胞の溶解（%）を示す。

【図22】パネルA～Dは、二重特異性抗体媒介性IL-2放出を示すいくつかのグラフを示す。休止ヒトT細胞を、様々な腫瘍細胞株及び漸増用量の抗CD3×抗BCMA二重特異性抗体と共に培養した後、IL-2サイトカイン放出のレベルを測定した。パネルAは、RPMI-8226細胞によって刺激したIL-2放出を示し、パネルBは、NCI-H929細胞によって刺激したIL-2放出を示し、パネルCは、U-266細胞によって刺激したIL-2放出を示し、パネルDは、陰性対照であるK562細胞によって刺激したIL-2放出を示す。

40

【図23】パネルA～Dは、二重特異性抗体媒介性IFN-γ放出を示すいくつかのグラフを示す。休止ヒトT細胞を、様々な腫瘍細胞株及び漸増用量の抗CD3×抗BCMA二重特異性抗体と共に培養した後、IFN-γサイトカイン放出のレベルを測定した。パネルAは、RPMI-8226細胞によって刺激したIFN-γ放出を示し、パネルBは、

50

N C I - H 9 2 9 細胞によって刺激した I F N - γ 放出を示し、パネル C は、U - 2 6 6 細胞によって刺激した I F N - γ 放出を示し、パネル D は、陰性対照である K 5 6 2 細胞によって刺激した I F N - γ 放出を示す。

【図 2 4】プロテイン A クロマトグラフィーによって精製した様々な抗体種の非還元 S D S - P A G E 分析の画像である。

【図 2 5】精製後の示された構築物の試料に由来する H M W 種 (%)、単量体 (%)、及び L M W 種 (%) を示す表である。

【図 2 6】パネル A ~ D は、本発明の実施形態による、様々な I g G 4 抗体種についての F c γ 受容体-抗体相互作用を示すグラフである。

【図 2 7】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ B C M A 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

10

【図 2 8】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ B C M A 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

【図 2 9】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ B C M A 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

【図 3 0】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ P S M A 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

20

【図 3 1】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ P S M A 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

【図 3 2】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ P S M A 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

【図 3 3】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ C D 1 9 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

30

【図 3 4】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ C D 1 9 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

【図 3 5】パネル A 及び B は、凡例に示される C D 3 $\times$ C D 1 9 二重特異性抗体について、二重特異性抗体濃度の関数として、C D 4 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル A) 及び C D 8 + C D 6 9 + T 細胞 (%) (パネル B) を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0038】

本発明の実施は、特に明記しない限り、当技術分野の技術の範囲内である分子生物学 (組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の従来技術を使用する。そのような技術は、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, second edition (Sambrook et al., 1989)、“Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, ed., 1984)、“Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, ed., 1987)、“Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.)、“Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates)、“PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis et al., ed., 1994)、“A Practical Guide to Molecular Clonin

40

50

g” (Perbal Bernard V., 1988)、“Phage Display: A Laboratory Manual” (Barbas et al., 2001)、Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998)、及び Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988)などの文献において完全に説明されている。

【0039】

値の範囲が提供される場合、文脈が別途明確に指示しない限り、下限値の単位の10分の1までの、その範囲の上限値から下限値の間の各介在値、ならびにその表示範囲の任意の他の表示値または介在値が、本発明に包含されることが理解される。これらのより小さい範囲の上限値及び下限値は、より小さい範囲内に独立して含まれてもよく、また、表示範囲内の任意の具体的な除外限度に従って、本明細書にも包含される。表示範囲がそれらの上限値及び下限値のうち的一方または両方を含む場合、それらの包含される上限値及び下限値のいずれかまたは両方を除外する範囲も本発明に包含される。

【0040】

特に明記しない限り、本明細書の抗体残基は、Kabatナンバリング方式に従って番号付けされる（例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。

【0041】

以下の説明では、本発明のより完全な理解を提供するために、多くの具体的な詳細が述べられている。しかしながら、本発明がこれらの具体的な詳細の1つ以上を伴わずに実施され得ることは、当業者には明らかであろう。他の例では、本発明を曖昧にすることを回避するために、周知の特徴及び当業者に周知の手順は記載されていない。

【0042】

特許出願及び公報を含む、本開示を通じて引用されるすべての参考文献は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0043】

I. 定義

「含む」とは、記載する要素が組成物／方法／キットに必要であることを意味するが、特許請求の範囲内で他の要素が組成物／方法／キットなどを形成するために含まれ得る。

【0044】

「～から本質的になる」とは、記載する組成物または方法の範囲を、本発明の基本的及び新規の特性（複数可）に実質的に影響を及ぼさない特定の物質またはステップに限定することを意味する。

【0045】

「～からなる」とは、特許請求の範囲で指定されていない任意の要素、ステップ、または成分が、組成物、方法、またはキットから除外されることを意味する。

【0046】

本明細書の抗体残基は、Kabatナンバリング方式及びEUナンバリング方式に従って番号付けされている。Kabatナンバリング方式は、一般的に、可変ドメイン内の残基（およそ、重鎖の1～113残基）に言及する際に使用される（例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。

「EUナンバリング方式」または「EUインデックス」は、一般的に、免疫グロブリン重鎖定常領域内の残基に言及する際に使用される（例えば、Kabat et al. (上記

10

20

30

40

50

）で報告されているE Uインデックス）。「K a b a tに記載のE Uインデックス」は、ヒトI g G 1 E U抗体の残基ナンバリングを指す。本明細書中で特に明記しない限り、抗体の可変ドメインにおける残基番号への言及は、K a b a tナンバリング方式による残基ナンバリングを意味する。本明細書中で特に明記しない限り、抗体の定常ドメインにおける残基番号への言及は、E Uナンバリング方式による残基ナンバリングを意味する。

【0047】

「抗体」または「免疫グロブリン」とは、少なくとも1つの重鎖及び1つの軽鎖を含む分子を指し、重鎖及び軽鎖のアミノ末端ドメインは配列が可変であるため、一般的に可変領域ドメインまたは可変重鎖（V H）ドメインもしくは可変軽鎖（V L）ドメインと呼ばれる。2つのドメインは従来、会合して特異的結合領域を形成するが、本明細書で論じるように、特異的結合はまた、重鎖のみの可変配列で得ることができ、抗体の様々な非天然構成が知られており、当技術分野で使用されている。

【0048】

「機能的」または「生物学的に活性な」抗体または抗原結合分子（重鎖のみ抗体及び多重特異性（例えば、二重特異性）三本鎖抗体様分子（本明細書に記載のT C A）を含む）は、構造的、調節的、生化学的または生物物理学的事象において、その天然の活性の1つ以上を発揮することができる分子である。例えば、機能的抗体または他の結合分子、例えば、T C Aは、抗原に特異的に結合する能力を有し得、その結合は、次に、シグナル伝達または酵素活性などの細胞事象または分子事象を誘発または変化させ得る。機能的抗体または他の結合分子、例えば、T C Aはまた、受容体のリガンド活性化を遮断するか、またはアゴニストもしくはアンタゴニストとして作用し得る。抗体または他の結合分子、例えば、T C Aがその天然の活性の1つ以上を発揮する能力は、ポリペプチド鎖の適切なフォールディング及び集合を含むいくつかの要因に依存する。

【0049】

抗体という用語は、全長の重鎖、全長の軽鎖、インタクトな免疫グロブリン分子、またはこれらのポリペプチドのいずれかの免疫学的に活性な部分、すなわち、目的の標的またはその一部の抗原に免疫特異的に結合する抗原結合部位を含むポリペプチドを指すものであり得、そのような標的には、がん細胞または自己免疫疾患に関連する自己免疫抗体を産生する細胞が含まれるが、これらに限定されない。本明細書に開示する免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子の任意の種類（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、及びI g A）、クラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1及びI g A 2）、またはサブクラス（エフェクター細胞活性を減弱させるまたは増強する改変F c部分により操作されたサブクラスを含む）のものであり得る。対象の抗体の軽鎖は、κ軽鎖（V κ）またはλ軽鎖（V λ）であり得る。免疫グロブリンは、任意の種に由来し得る。一態様では、免疫グロブリンは、主にヒト起源である。

【0050】

本明細書中で使用する用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に同種の抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る天然に存在する変異の可能性を除いて同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位を指向し、高度に特異的である。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を含む従来の（ポリクローナル）抗体製剤とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。本発明によるモノクローナル抗体は、K o h l e r e t a l .（1975）N a t u r e 256：495によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製することができ、例えば、組換えタンパク質産生法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）を介して作製することもできる。

【0051】

抗体に関連して使用する用語「可変」とは、抗体可変ドメインの特定の部分の配列が抗体間で大きく異なっており、その配列が各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性に使用されているという事実を指す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイ

10

20

30

40

50

ン全体にわたって均等には分布していない。これは、軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインのいずれにおいても超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々、4つのFRを含み、これらは主にβシート構成を採用し、3つの超可変領域により連結され、これら超可変領域は、βシート構造に連結するループを形成し、ある場合にはその一部を形成するループを形成する。各鎖における超可変領域は、FRによって、他方の鎖の超可変領域と近接して保持されており、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) を参照のこと）。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与していないが、抗体の抗体依存性細胞傷害性（ADCC）への関与などの様々なエフェクター機能を呈する。

【0052】

本明細書中で使用する場合、用語「超可変領域」とは、抗原結合を担う抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般的に、「相補性決定領域」または「CDR」由来のアミノ酸残基（例えば、重鎖可変ドメインの残基31～35（H1）、50～65（H2）及び95～102（H3）、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）及び／または重鎖可変ドメインの「超可変ループ」残基26～32（H1）、53～55（H2）及び96～101（H3）由来の残基、Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）を含む。いくつかの実施形態では、「CDR」とは、Lefranc, MP et al., IMGT, the international IMmunoGeneTics database, Nucleic Acids Res., 27:209-212 (1999) において定義されるような抗体の相補性決定領域を意味する。「フレームワーク領域」または「FR」残基は、本明細書に定義される超可変領域／CDR残基以外の可変ドメイン残基である。

【0053】

例示的なCDRの呼称を本明細書に示すが、当業者であれば、配列の変動性に基づき、最も一般的に使用されているKabat定義（“Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions.” Mol Immunol. 2010; 47: 694-700 を参照のこと）を含む、CDRのいくつかの定義が一般的に使用されていることを理解するであろう。Chothia定義は、構造ループ領域の位置に基づいている（Chothia et al. “Conformations of immunoglobulin hypervariable regions.” Nature. 1989; 342: 877-883）。目的の代替のCDR定義には、限定されないが、Honegger, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool.” J Mol Biol. 2001; 309: 657-670、Ofran et al. “Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B-cell epitopes.” J Immunol. 2008; 181: 6230-6235、Almagro “Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recog

nize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires.” J Mol Recognit. 2004;17:132-143、及び Padlan et al. “Identification of specificity-determining residues in antibodies.” Faseb J. 1995;9:133-139. によって開示された定義が含まれ、これらのそれぞれは、参照により本明細書に具体的に援用される。

【0054】

用語「重鎖のみ抗体」及び「重鎖抗体」とは、本明細書では同じ意味で用いられ、最も広い意味で、抗体、または抗体の1つ以上の部分、例えば、従来の抗体の軽鎖を欠損した抗体の1つ以上のアームを指す。これらの用語には、具体的には、限定されないが、VH抗原結合ドメインならびにCH2及びCH3定常ドメインを含むがCH1ドメインがないホモ二量体抗体、そのような抗体の機能的（抗原結合）バリエーション、可溶性VHバリエーション、1つの可変ドメイン（V-NAR）と5つのC様定常ドメイン（C-NAR）のホモ二量体を含むIg-NAR及びその機能的断片、ならびに可溶性単一ドメイン抗体（UniDabs（商標））が含まれる。一実施形態では、重鎖のみ抗体は、フレームワーク1、CDR1、フレームワーク2、CDR2、フレームワーク3、CDR3、及びフレームワーク4からなる可変領域抗原結合ドメインからなる。別の実施形態では、重鎖のみ抗体は、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域の少なくとも一部、ならびにCH2及びCH3ドメインからなる。別の実施形態では、重鎖のみ抗体は、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域の少なくとも一部、及びCH2ドメインからなる。さらなる実施形態では、重鎖のみ抗体は、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域の少なくとも一部、及びCH3ドメインからなる。CH2及び／またはCH3ドメインが短縮された重鎖のみ抗体もまた、本明細書に含まれる。さらなる実施形態では、重鎖は、抗原結合ドメイン、及び少なくとも1つのCH（CH1、CH2、CH3、またはCH4）ドメインからなるが、ヒンジ領域は含まない。重鎖のみ抗体は、2つの重鎖がジスルフィド結合しているか、そうでなければ、共有結合または非共有結合で互いに結合している二量体の形態であり得る。重鎖のみ抗体は、IgGサブクラスに属していてもよいが、IgM、IgA、IgD及びIgEサブクラスなどの他のサブクラスに属する抗体もまた、本明細書に含まれる。特定の実施形態では、重鎖抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブタイプ、特にIgG1サブタイプのものである。一実施形態では、本明細書における重鎖のみ抗体を、キメラ抗原受容体（CAR）の結合（標的化）ドメインとして使用する。この定義には、具体的には、UniAbs（商標）と呼ばれるヒト免疫グロブリントランスジェニックラット（UniRat（商標））によって産生されるヒト重鎖のみ抗体が含まれる。UniAbs（商標）の可変領域（VH）は、UniDabs（商標）と呼ばれ、また、多重特異性を有し、効力が増加し、半減期が延長された新規治療薬を開発するために、Fc領域または血清アルブミンに結合することができる可変性ビルディングブロックである。ホモ二量体型のUniAbs（商標）は、軽鎖を欠損しており、したがってVLドメインを欠いているため、抗原は、単一のドメイン、すなわち、重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン（VHまたはVHH）によって認識される。

【0055】

本明細書中で使用する「インタクトな抗体鎖」とは、全長の可変領域及び全長の定常領域（Fc）を含む抗体鎖である。インタクトな「従来の」抗体は、インタクトな軽鎖及びインタクトな重鎖、ならびに分泌型IgG用の軽鎖定常ドメイン（CL）及び重鎖定常ドメイン、CH1、ヒンジ、CH2及びCH3を含む。IgMまたはIgAなどの他のアイソタイプは、異なるCHドメインを有している場合がある。定常ドメインは、天然配列の定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列の定常ドメイン）またはそのアミノ酸配列バリエーションであり得る。インタクトな抗体は、1つ以上の「エフェクター機能」を有し得、これは、抗体のFc定常領域（天然配列のFc領域またはアミノ酸配列バリエーションのFc領域）に起因する生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例として、C1q結合、補体依存性

10

20

30

40

50

細胞傷害性、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)、食作用、及び細胞表面受容体の下方調節が挙げられる。定常領域バリエーションには、エフェクター特性、Fc受容体への結合などを変化させるバリエーションが含まれる。

【0056】

重鎖のFc(定常ドメイン)のアミノ酸配列に応じて、抗体及び様々な抗原結合タンパク質は、異なるクラスとして提供され得る。5つの主要な重鎖Fc領域のクラス:IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2にさらに分類され得る。異なるクラスの抗体に対応するFc定常ドメインは、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれ得る。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構成は、周知である。Igの形態には、ヒンジ修飾またはヒンジなしの形態が含まれる(Roux et al (1998) J. Immunol. 161: 4083-4090、Lund et al (2000) Eur. J. Biochem. 267: 7246-7256、US2005/0048572、US2004/0229310)。任意の脊椎動物種由来の抗体の軽鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、 κ (カッパ)及び λ (ラムダ)と呼ばれる2つのタイプのうちの1つに割り当てられ得る。本発明の実施形態による抗体は、 κ 軽鎖配列または λ 軽鎖配列を含み得る。

10

【0057】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を保有する。エフェクター機能の非限定的な例として、C1q結合、CDC、Fc受容体結合、ADCC、ADCP、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御などが挙げられる。そのようなエフェクター機能は、一般的に、Fc領域が受容体、例えば、Fc γ RI、Fc γ RIIA、Fc γ RIIB1、Fc γ RIIB2、Fc γ RIIIA、Fc γ RIIIB受容体、及び低親和性FcRn受容体と相互作用することを必要とし、そして、当技術分野で公知の様々なアッセイを使用して評価することができる。「死んだ」または「サイレンシングされた」Fcとは、例えば、血清半減期の延長に関して活性を保持するように変異導入されているが、高親和性Fc受容体を活性化しないか、またはFc受容体に対する親和性が低下しているFcである。

20

【0058】

「天然配列Fc領域」は、天然で見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然配列ヒトFc領域には、例えば、天然配列ヒトIgG1 Fc領域(非A及びAアロタイプ)、天然配列ヒトIgG2 Fc領域、天然配列ヒトIgG3 Fc領域、及び天然配列ヒトIgG4 Fc領域、ならびにそれらの天然のバリエーションが含まれる。

30

【0059】

「バリエーションFc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは1つ以上のアミノ酸置換(複数可)によって天然配列Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、バリエーションFc領域は、天然配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列Fc領域中または親ポリペプチドのFc領域中に約1~約10個のアミノ酸置換、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個のアミノ酸置換、及び好ましくは約1~約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書におけるバリエーションFc領域は、好ましくは、天然配列Fc領域及び/または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の相同性、ならびに最も好ましくは、それらと少なくとも約90%の相同性、より好ましくは、それらと少なくとも約95%の相同性を保有する。

40

【0060】

ヒトIgG4 Fcアミノ酸配列(UniProtKB番号P01861)は、本明細書において配列番号45として示される。サイレンシングされたIgG1は、例えば、Boesch, A. W., et al., "Highly parallel characterization of IgG Fc binding interactions

50

．” M A b s ， 2 0 1 4 ． 6 （ 4 ） ： p ． 9 1 5 － 2 7 に記載されており、その開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【 0 0 6 1 】

他の F c バリエントが可能であり、これには、限定されないが、ジスルフィド結合を形成することができる領域が欠失しているバリエント、または天然 F c の N 末端において特定のアミノ酸残基が除去されているバリエント、またはメチオニン残基が付加されているバリエントが含まれる。したがって、いくつかの実施形態では、抗体の 1 つ以上の F c 部分は、ジスルフィド結合を排除するために、ヒンジ領域に 1 つ以上の変異を含み得る。さらに別の実施形態では、F c のヒンジ領域を完全に除去することができる。さらに別の実施形態では、抗体は、F c バリエントを含み得る。

10

【 0 0 6 2 】

さらに、F c バリエントは、補体結合または F c 受容体結合をもたらすために、アミノ酸残基を置換（変異）、欠失、または付加することによってエフェクター機能を除去または実質的に低減するように構築することができる。例えば、限定されないが、欠失を、C 1 q 結合部位などの補体結合部位で行ってもよい。免疫グロブリン F c フラグメントのそのような配列誘導体を調製するための技術は、国際特許公開第 W O 9 7 / 3 4 6 3 1 及び W O 9 6 / 3 2 4 7 8 に開示されている。さらに、F c ドメインは、リン酸化、硫酸化、アシル化、グリコシル化、メチル化、ファルネシル化、アセチル化、アミド化などによって修飾され得る。

【 0 0 6 3 】

20

いくつかの実施形態では、抗体は、T 3 6 6 W 変異を含むバリエントヒト I g G 4 C H 3 ドメイン配列を含み、これは、本明細書において、任意選択で I g G 4 C H 3 ノブ配列と呼ばれ得る。いくつかの実施形態では、抗体は、T 3 6 6 S 変異、L 3 6 8 A 変異、及び Y 4 0 7 V 変異を含むバリエントヒト I g G 4 C H 3 ドメイン配列を含み、これは、本明細書において、任意選択で I g G 4 C H 3 ホール配列と呼ばれ得る。抗体二量体の第 1 の単量体の第 1 の重鎖定常領域に「ノブ」を配置し、抗体二量体の第 2 の単量体の第 2 の重鎖定常領域に「ホール」を配置し、それにより、抗体中の重鎖ポリペプチドサブユニットの所望のペアの適切な対形成（ヘテロ二量体化）を促進するために、本明細書に記載の I g G 4 C H 3 変異を任意の適切な方法で利用することができる。

【 0 0 6 4 】

30

いくつかの実施形態では、抗体は、S 2 2 8 P 変異、F 2 3 4 A 変異、L 2 3 5 A 変異、及び T 3 6 6 W 変異（ノブ）を含むバリエントヒト I g G 4 F c 領域を含む重鎖ポリペプチドサブユニットを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、S 2 2 8 P 変異、F 2 3 4 A 変異、L 2 3 5 A 変異、及び T 3 6 6 S 変異、L 3 6 8 A 変異、及び Y 4 0 7 V 変異（ホール）を含むバリエントヒト I g G 4 F c 領域を含む重鎖ポリペプチドサブユニットを含む。

【 0 0 6 5 】

用語「F c 領域を含む抗体」とは、F c 領域を含む抗体を指す。F c 領域の C 末端リジン（E U ナンバリング方式による残基 4 4 7）を、例えば、抗体の精製中に、または抗体をコードする核酸の組換え操作により除去してもよい。したがって、本発明による F c 領域を有する抗体は、K 4 4 7 を含むか、または含まない抗体を含み得る。

40

【 0 0 6 6 】

本発明の態様は、一価または二価構成の重鎖のみの可変領域を含む抗体を含む。本明細書中で使用する場合、重鎖のみの可変領域ドメインに関して使用する用語「一価構成」とは、単一の結合部位を有する、重鎖のみの可変領域ドメインが 1 つだけ存在することを意味する（図 1、パネル A、抗体の右アームを参照のこと）。対照的に、重鎖のみの可変領域ドメインに関して使用する用語「二価構成」とは、2 つの重鎖のみの可変領域ドメインが存在し（それぞれが単一の結合部位を有する）、リンカー配列によって接続されていることを意味する（図 1、パネル B 及び C、抗体の右アームを参照のこと）。リンカー配列の非限定的な例を、本明細書でさらに議論し、これには、限定されないが、様々な長さの

50

G S リンカー配列が含まれる。重鎖のみの可変領域が二価構成にある場合、2つの重鎖のみの可変領域ドメインのそれぞれは、同じ抗原または異なる抗原（例えば、同じタンパク質上の異なるエピトープに対して、2つの異なるタンパク質に対して、など）に対する結合親和性を有する。しかしながら、特に明記しない限り、「二価構成」にあると示される重鎖のみの可変領域は、リンカー配列によって接続された2つの同一の重鎖のみの可変領域ドメインを含むと理解され、その場合、2つの同一の重鎖のみの可変領域ドメインのそれぞれは、同じ標的抗原に対して結合親和性を有する。

【0067】

本発明の態様は、限定されないが、二重特異性、三重特異性などを含む多重特異性構成を有する抗体を含む。二重特異性モノクローナル抗体（B s M A B）、三重特異性抗体などにおいて多種多様な方法及びタンパク質構成が知られており、使用されている。

【0068】

多価人工抗体を産生するための様々な方法が、2つ以上の抗体の可変ドメインを組換え的に融合することによって開発されてきた。いくつかの実施形態では、ポリペプチド上の第1及び第2の抗原結合ドメインを、ポリペプチドリンカーによって接続する。そのようなポリペプチドリンカーの1つの非限定的な例は、4つのグリシン残基とそれに続く1つのセリン残基のアミノ酸配列を有するG S リンカーであり、G S リンカー中でこの配列はn回繰り返され、nは、1～約10の範囲の整数、例えば、2、3、4、5、6、7、8、または9である。そのようなリンカーの非限定的な例として、G G G G S（配列番号70）（n=1）及びG G G G S G G G G S（配列番号71（n=2））が挙げられる。他の適切なリンカーも使用することができ、例えば、Chen et al., Adv Drug Deliv Rev. 2013 October 15; 65(10): 1357-69に記載されており、その開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0069】

用語「三本鎖抗体様分子」または「T C A」は、本明細書中では、3つのポリペプチドサブユニットを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる抗体様分子を指すために用いられ、そのうちの2つは、抗原結合領域及び少なくとも1つのC H ドメインを含む、モノクローナル抗体の1つの重鎖及び1つの軽鎖、またはそのような抗体鎖の機能的抗原結合断片を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。この重鎖／軽鎖ペアは、第1の抗原に対して結合特異性を有する。第3のポリペプチドサブユニットは、C H 1 ドメインを含まず、C H 2 及び／またはC H 3 及び／またはC H 4 ドメインを含むF c 部分、及び第2の抗原のエピトープまたは第1の抗原の異なるエピトープに結合する1つ以上の抗原結合ドメイン（例えば、2つの抗原結合ドメイン）を含む重鎖のみ抗体を含むか、本質的にそれからなるか、またはそれからなり、そのような結合ドメインは、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域に由来するか、またはそれに対して配列同一性を有する。そのような可変領域の部分は、V_H及び／またはV_L遺伝子セグメント、D及びJ_H遺伝子セグメント、またはJ_L遺伝子セグメントによってコードされ得る。可変領域は、再配置されたV_HD J_H、V_LD J_H、V_HJ_L、またはV_LJ_L遺伝子セグメントによってコードされ得る。

【0070】

T C A 結合化合物は、「重鎖のみ抗体」または「重鎖抗体」または「重鎖ポリペプチド」を利用し、これは、本明細書中で使用する場合、重鎖定常領域C H 2 及び／またはC H 3 及び／またはC H 4 を含むが、C H 1 ドメインは含まない単鎖抗体を意味する。一実施形態では、重鎖抗体は、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域の少なくとも一部、ならびにC H 2 及びC H 3 ドメインからなる。別の実施形態では、重鎖抗体は、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域の少なくとも一部、及びC H 2 ドメインからなる。さらなる実施形態では、重鎖抗体は、抗原結合ドメイン、ヒンジ領域の少なくとも一部、及びC H 3 ドメインからなる。C H 2 及び／またはC H 3 ドメインが短縮された重鎖抗体もまた、本明細書に含まれる。さらなる実施形態では、重鎖は、抗原結合ドメイン、及び少なくとも1つのC H（C H 1、C H 2、C H 3、またはC H 4）ドメインからなるが、ヒンジ領域は含まない。重鎖

のみ抗体は、2つの重鎖がジスルフィド結合しているか、または互いに共有結合もしくは非共有結合している二量体の形態であり得、任意選択で、ポリペプチド鎖間の適切なペアリリングを促進するために、1つ以上のCHドメイン間に非対称界面を含み得る。重鎖抗体は、IgGサブクラスに属していてもよいが、IgM、IgA、IgD及びIgEサブクラスなどの他のサブクラスに属する抗体もまた、本明細書に含まれる。特定の実施形態では、重鎖抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブタイプ、特にIgG1サブタイプまたはIgG4サブタイプのものである。TCA結合化合物の非限定的な例は、例えば、WO2017/223111及びWO2018/052503に記載されており、その開示は、その全体が参照により本明細書に援用される。

【0071】

重鎖抗体は、ラクダ類、例えばラクダ及びラマによって産生されるIgG抗体の約4分の1を構成する(Hamers-Casterman C., et al. Nature. 363, 446-448 (1993))。これらの抗体は、2本の重鎖によって形成されるが、軽鎖を有さない。結果として、可変抗原結合部分はVHHドメインと呼ばれ、それは、長さがわずかに約120アミノ酸の、最小の天然のインタクトな抗原結合部位を表す(Desmyter, A., et al. J. Biol. Chem. 276, 26285-26290 (2001))。免疫化によって、高い特異性と親和性を備えた重鎖抗体を、様々な抗原に対して生成することができ(van der Linden, R. H., et al. Biochim. Biophys. Acta. 1431, 37-46 (1999))、VHH部分は、容易に酵母中でクローニングし、発現させることができる(Frenken, L. G. J., et al. J. Biotechnol. 78, 11-21 (2000))。それらの発現、溶解度及び安定性のレベルは、古典的なF(ab)またはFvフラグメントに比べて有意に高い(Ghahroudi, M. A. et al. FEBS Lett. 414, 521-526 (1997))。サメはまた、VNARと呼ばれる抗体に単一のVH様ドメインを有することが示されている。(Nuttall et al. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003)、Nuttall et al. Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004)、Doolley et al., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003))。

【0072】

用語「CD3」とは、ヒトCD3タンパク質多重サブユニット複合体を指す。CD3タンパク質の多重サブユニット複合体は、6つの特徴的なポリペプチド鎖で構成される。これらには、CD3γ鎖(SwissProt P09693)、CD3δ鎖(SwissProt P04234)、2つのCD3ε鎖(SwissProt P07766)、及び1つのCD3ζ鎖ホモ二量体(SwissProt 20963)が含まれ、これはT細胞受容体α鎖及びβ鎖と会合している。用語「CD3」には、特記されない限り、細胞(T細胞を含む)が天然に発現するか、またはそれらのポリペプチドをコードする遺伝子もしくはcDNAでトランスフェクトされた細胞上で発現可能な任意のCD3バリエーション、アイソフォーム、及び種ホモログが含まれる。

【0073】

「BCMA×CD3抗体」は、多重特異性重鎖のみ抗体、例えば、2つの異なる抗原結合領域を含む二重特異性重鎖のみ抗体であり、そのうちの一方が抗原BCMAに特異的に結合し、一方がCD3に特異的に結合する。「PSMA×CD3抗体」は、多重特異性重鎖のみ抗体、例えば、2つの異なる抗原結合領域を含む二重特異性重鎖のみ抗体であり、そのうちの一方が抗原PSMAに特異的に結合し、一方がCD3に特異的に結合する。「CD19×CD3抗体」は、多重特異性重鎖のみ抗体、例えば、2つの異なる抗原結合領域を含む二重特異性重鎖のみ抗体であり、そのうちの一方が抗原CD19に特異的に結合し、一方がCD3に特異的に結合する。

【0074】

本明細書中で使用する用語「BCMA」は、BCMA、CD269、及びTNFRSF

10

20

30

40

50

17 (UniProt Q02223) としても知られるヒトB細胞成熟抗原に関し、これは、分化した形質細胞において優先的に発現する腫瘍壊死受容体スーパーファミリーのメンバーである。ヒトBCMAの細胞外ドメインは、UniProtによると、アミノ酸1～54 (または5～51) からなる。

【0075】

用語「抗BCMA重鎖のみ抗体」及び「BCMA重鎖のみ抗体」は、BCMAに免疫特異的に結合する上記定義の重鎖のみ抗体を指すために本明細書中で使用される。

【0076】

本明細書中で使用する用語「PSMA」とは、N-アセチル化- α 結合酸性デペプチダーゼ、葉酸ヒドロラーゼ及びジペプチジルペプチダーゼ活性を有するII型膜貫通タンパク質を指す。用語「PSMA」には、任意のヒト及び非ヒト動物種のPSMAタンパク質が含まれ、具体的には、ヒトPSMAならびに非ヒト哺乳類のPSMAが含まれる。

【0077】

本明細書中で使用する用語「ヒトPSMA」には、その供給源または調製様式に関係なく、ヒトPSMA (UniProt Q04609) の任意のバリエーション、アイソフォーム及び種相同体が含まれる。したがって、「ヒトPSMA」には、細胞が天然に発現するヒトPSMAと、ヒトPSMA遺伝子を形質移入した細胞上で発現するPSMAが含まれる。

【0078】

上記で定義されたように、用語「抗PSMA重鎖のみ抗体」、「PSMA重鎖のみ抗体」、「抗PSMA重鎖抗体」及び「PSMA重鎖抗体」は、本明細書中では、上記で定義されたようにヒトPSMAを含むPSMAに免疫特異的に結合する重鎖のみ抗体を指すために同じ意味で用いられる。この定義には、限定されないが、上記で定義されたようにヒト抗PSMA UniAb (商標) 抗体を産生するUniRats (商標) を含む、ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニックラットまたはトランスジェニックマウスなどのトランスジェニック動物によって産生されるヒト重鎖抗体が含まれる。

【0079】

本明細書中で使用する用語「CD19」及び「分化クラスター19」とは、形質細胞への最終分化までのB細胞発生のすべての段階で発現する分子を指す。用語「CD19」には、任意のヒト及び非ヒト動物種のCD19タンパク質が含まれ、具体的には、ヒトCD19及び非ヒト哺乳動物のCD19が含まれる。

【0080】

本明細書中で使用する用語「ヒトCD19」には、その供給源または調製様式に関係なく、ヒトCD19 (UniProt P15391) の任意のバリエーション、アイソフォーム及び種ホモログが含まれる。したがって、「ヒトCD19」には、細胞が天然に発現するヒトCD19、及びヒトCD19遺伝子でトランスフェクトされた細胞上で発現するCD19が含まれる。

【0081】

用語「抗CD19重鎖のみ抗体」、「CD19重鎖のみ抗体」、「抗CD19重鎖抗体」及び「CD19重鎖抗体」は、本明細書中では同じ意味で用いられ、上記で定義されたヒトCD19を含むCD19に免疫特異的に結合する、上記で定義された重鎖のみ抗体を指す。この定義には、限定されないが、上記で定義されたようにヒト抗CD19 UniAb (商標) 抗体を産生するUniRats (商標) を含む、ヒト免疫グロブリンを発現するトランスジェニックラットまたはトランスジェニックマウスなどのトランスジェニック動物によって産生されるヒト重鎖抗体が含まれる。

【0082】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント」とは、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して、最大の配列同一性パーセントを達成した後の、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される (いずれの保存的置換も配列同一性の一部としてみなさない

10

20

30

40

50

）。アミノ酸配列同一性パーセントを決定することを目的としたアラインメントは、当技術分野における技術の範囲内である様々な方式で、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、達成することができる。当業者であれば、比較している配列の全長にわたる最大のアラインメントを得るために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用してアミノ酸配列同一性の値（％）を生成する。

【0083】

「単離された」抗体とは、その天然の環境の成分から同定され、分離され、及び／または回収された抗体である。その天然の環境の混入成分は、抗体の診断上または治療上の使用を妨げる物質であり、これらには、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が含まれ得る。好ましい実施形態では、抗体を、（１）ローリー法により判定した場合に抗体の９５重量％超、最も好ましくは９９重量％超になるまで、（２）スピニングカップシーケネータ（spinning cup sequenator）を使用して少なくとも１５残基のＮ末端配列もしくは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、または（３）クーマシーブルー、もしくは好ましくは銀染色を用いて還元条件もしくは非還元条件下でのSDS-PAGEによって、均質になるまで精製する。単離された抗体には、抗体の天然の環境の少なくとも１つの成分が存在しないため、組換え細胞内でのin situ抗体が含まれる。しかしながら、通常、単離された抗体は、少なくとも１つの精製ステップにより調製されるであろう。

【0084】

本発明の抗体には、多重特異性抗体が含まれる。多重特異性抗体は、複数の結合特異性を有する。用語「多重特異性」には、具体的には、「二重特異性」及び「三重特異性」、ならびに高次のポリエピトープ特異性などの高次の独立した特異的結合親和性、ならびに四価抗体及び抗体断片が含まれる。用語「多重特異性抗体」、「多重特異性重鎖のみ抗体」、「多重特異性重鎖抗体」、及び「多重特異性UniAb（商標）」は、本明細書中では最も広い意味で用いられ、複数の結合特異性を有するすべての抗体を包含する。

【0085】

本発明の多重特異性抗体には、具体的には、ヒトBCMAタンパク質、ヒトPSMAタンパク質、またはヒトCD19タンパク質などのBCMAタンパク質、PSMAタンパク質、またはCD19タンパク質上の２つ以上の重複しないエピトープに免疫特異的に結合する抗体が含まれる（すなわち、二価及びバイパラトピック）。本発明の多重特異性重鎖抗体にはまた、具体的には、ヒトBCMAタンパク質、ヒトPSMAタンパク質、またはヒトCD19タンパク質などのBCMAタンパク質、PSMAタンパク質、またはCD19タンパク質上のエピトープ、及び例えば、CD3タンパク質、例えば、ヒトCD3などの異なるタンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合する抗体が含まれる（すなわち、二価及びバイパラトピック）。本発明の多重特異性重鎖抗体にはまた、具体的には、ヒトBCMAタンパク質、ヒトPSMAタンパク質、またはヒトCD19タンパク質などのBCMAタンパク質、PSMAタンパク質、またはCD19タンパク質上の２つ以上の重複しないまたは部分的に重複するエピトープ、及び例えば、CD3タンパク質、例えば、ヒトCD3タンパク質などの異なるタンパク質上のエピトープに免疫特異的に結合する抗体が含まれる（すなわち、二価及びバイパラトピック）。

【0086】

「エピトープ」とは、単一の抗体分子が結合する抗原分子の表面上の部位である。一般的に、抗原はいくつかまたは多くの異なるエピトープを有し、多くの異なる抗体と反応する。この用語には、具体的には、直鎖状エピトープ及び立体構造エピトープが含まれる。

【0087】

「エピトープマッピング」とは、標的抗原上の抗体の結合部位またはエピトープを同定するプロセスである。抗体エピトープは、直鎖状エピトープまたは立体構造エピトープで

あり得る。直鎖状エピトープは、タンパク質中のアミノ酸の連続配列によって形成される。立体構造エピトープは、タンパク質配列が不連続であるが、タンパク質がその三次元構造に折りたたまれると一緒になるアミノ酸により形成される。

【0088】

「ポリエピトープ特異性」とは、同じまたは異なる標的（複数可）上の2つ以上の異なるエピトープに特異的に結合する能力を指す。上記のように、本発明には、具体的には、ポリエピトープ特異性を有する重鎖抗体、すなわち、ヒトBCMAタンパク質、ヒトPSMAタンパク質、またはヒトCD19タンパク質などのBCMAタンパク質、PSMAタンパク質、またはCD19タンパク質上の1つ以上の重複しないエピトープに結合する重鎖抗体、ならびにBCMAタンパク質、PSMAタンパク質、またはCD19タンパク質上の1つ以上のエピトープ、及び例えば、CD3タンパク質などの異なるタンパク質上のエピトープに結合する重鎖抗体が含まれる。抗原の「重複しないエピトープ（複数可）」または「非競合的エピトープ（複数可）」という用語は、本明細書中では、抗原特異的抗体のペアの一方のメンバーによって認識されるが、他方のメンバーには認識されないエピトープ（複数可）を意味するものとして定義される。重複しないエピトープを認識する抗体のペア、または多重特異性抗体上の同じ抗原を標的とする抗原結合領域は、その抗原への結合をめぐる競合せず、同時にその抗原に結合することができる。

【0089】

2つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープを認識する場合、抗体は参照抗体と「本質的に同じエピトープ」に結合する。2つのエピトープが同一または立体的に重複するエピトープに結合するかどうかを決定するために最も広く使用されている迅速な方法は競合アッセイであり、標識抗原または標識抗体のいずれかを使用して、様々な形式で構成することができる。通常、抗原を96ウェルプレートに固定化し、非標識抗体が標識抗体の結合を遮断する能力を、放射性標識または酵素標識を使用して測定する。

【0090】

本明細書中で使用する用語「価」とは、抗体分子内の特定の数の結合部位を指す。

【0091】

「一価」抗体は、1つの結合部位を有する。したがって、一価抗体は、単一特異性でもある。

【0092】

「多価」抗体は、2つ以上の結合部位を有する。したがって、用語「二価」、「三価」、及び「四価」とは、それぞれ、2つの結合部位、3つの結合部位、及び4つの結合部位が存在することを指す。したがって、本発明による二重特異性抗体は、少なくとも二価であり、三価、四価、または多価であり得る。本発明の実施形態による二価抗体は、同じエピトープ（すなわち、二価、モノパラトピック）、または2つの異なるエピトープ（すなわち、二価、バイパラトピック）に対する2つの結合部位を有し得る。

【0093】

二重特異性モノクローナル抗体（BsMAB）、三重特異性抗体などを調製するための多種多様な方法及びタンパク質構成が知られており、使用されている。

【0094】

用語「三本鎖抗体様分子」または「TCA」は、本明細書中では、3つのポリペプチドサブユニットを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる抗体様分子を指すために用いられ、そのうちの2つは、抗原結合領域及び少なくとも1つのCHドメインを含む、モノクローナル抗体の1つの重鎖及び1つの軽鎖、またはそのような抗体鎖の機能的抗原結合断片を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。この重鎖／軽鎖ペアは、第1の抗原に対して結合特異性を有する。第3のポリペプチドサブユニットは、CH1ドメインを含まず、CH2及び／またはCH3及び／またはCH4ドメインを含むFc部分、及び第2の抗原のエピトープまたは第1の抗原の異なるエピトープに結合する抗原結合ドメインを含む重鎖のみ抗体を含むか、本質的にそれらからなるか、またはそれらからなり、そのような結合ドメインは、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域に由来

するか、またはそれに対して配列同一性を有する。そのような可変領域の部分は、 V_H 及び／または V_L 遺伝子セグメント、 D 及び J_H 遺伝子セグメント、または J_L 遺伝子セグメントによってコードされ得る。可変領域は、再配置された $V_H D J_H$ 、 $V_L D J_H$ 、 $V_H J_L$ 、または $V_L J_L$ 遺伝子セグメントによってコードされ得る。 TCA タンパク質は、上記で定義されたような重鎖のみ抗体を利用する。

【0095】

用語「キメラ抗原受容体」または「CAR」は、本明細書中では最も広い意味で用いられ、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナル伝達ドメインに所望の結合特異性（例えば、モノクローナル抗体または他のリガンドの抗原結合領域）を移植する改変型受容体を指す。通常、受容体は、モノクローナル抗体の特異性をT細胞に移植して、キメラ抗原受容体（CAR）を作成するために用いられる。（*J Natl Cancer Inst*, 2015; 108 (7): dvj439、及びJackson et al., *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2016; 13: 370-383）。CAR-T細胞は、免疫療法で使用するための人工T細胞受容体を産生するように遺伝子改変されたT細胞である。一実施形態では、「CAR-T細胞」とは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、及び少なくとも1つの細胞質ゾルドメインから最小限に構成される1つ以上のキメラ抗原受容体をコードする導入遺伝子を発現する治療用T細胞を意味する。

【0096】

用語「ヒト抗体」は、本明細書中では、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むように使用される。本明細書のヒト抗体には、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基、例えば、*in vitro*でのランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、または*in vivo*での体細胞変異によって導入される変異が含まれ得る。用語「ヒト抗体」には、具体的には、上記で定義されたように、トランスジェニックラットまたはマウスなどのトランスジェニック動物によって産生されるヒト重鎖可変領域配列を有する重鎖のみ抗体、特にUniRats（商標）によって生成されるUniAbs（商標）が含まれる。

【0097】

「キメラ抗体」または「キメラ免疫グロブリン」とは、少なくとも2つの異なるIg遺伝子座由来のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン分子、例えば、ヒトIg遺伝子座によってコードされる部分とラットIg遺伝子座によってコードされる部分を含むトランスジェニック抗体を意味する。キメラ抗体には、非ヒトFc領域または人工Fc領域を有するトランスジェニック抗体、及びヒトイディオタイプが含まれる。そのような免疫グロブリンは、そのようなキメラ抗体を産生するように改変された本発明の動物から単離することができる。

【0098】

本明細書中で使用する場合、用語「エフェクター細胞」とは、免疫応答の認知及び活性化段階とは対照的に、免疫応答のエフェクター段階に関与する免疫細胞を指す。いくつかのエフェクター細胞は、特定のFc受容体を発現し、特定の免疫機能を果たす。いくつかの実施形態では、ナチュラルキラー細胞などのエフェクター細胞は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を誘導することができる。例えば、FcRを発現する単球とマクロファージは、標的細胞の特異的な死滅と免疫系の他の成分への抗原の提示、または抗原を提示する細胞への結合に関与する。いくつかの実施形態では、エフェクター細胞は、標的抗原または標的細胞を貪食し得る。

【0099】

「ヒトエフェクター細胞」とは、T細胞受容体やFcRなどの受容体を発現し、エフェクター機能を果たす白血球のことである。好ましくは、これらの細胞は、少なくともFcγRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球が挙げられ、NK細胞が好ましい。エフェクター細胞は、本明細書に記載するように、その天然の供給源から、例えば、血液またはPBMCから単離され得る。

【0100】

用語「免疫細胞」は、本明細書では最も広い意味で用いられ、限定されないが、骨髄またはリンパ球起源の細胞、例えばリンパ球（例えば、B細胞及び細胞溶解性T細胞（CTL）を含むT細胞）、キラー細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、単球、好酸球、多形核細胞、例えば、好中球、顆粒球、マスト細胞、及び好塩基球が挙げられる。

【0101】

抗体の「エフェクター機能」は、抗体のFc領域（天然配列のFc領域またはアミノ酸配列バリエーションFc領域）に帰属する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例として、C1q結合、補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体、BCR）の下方制御などが挙げられる。

【0102】

「抗体依存性細胞傷害」及び「ADCC」とは、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を指す。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、一方で単球は、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Ann. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991) の464ページの表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されているような*in vitro* ADCCアッセイを行ってもよい。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞として、末梢血単核球（PBMC）及びナチュラルキラー細胞が挙げられる。あるいは、またはさらに、目的とする分子のADCC活性を、動物モデル、例えば、Clynes et al. PNAS (USA) 95: 652-656 (1998) に開示されているモデルにおいて*in vivo*で評価してもよい。

【0103】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」とは、補体の存在下で標的を溶解させる分子の能力を指す。補体活性化経路は、補体系の第1の成分（C1q）が、同種抗原と複合体化した分子（例えば、抗体）に結合することにより開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996) に記載されているようなCDCアッセイを行ってもよい。

【0104】

「結合親和性」とは、分子の単一の結合部位（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有相互作用の合計の強度を指す。特に明記しない限り、本明細書中で使用する場合、「結合親和性」とは、結合ペアのメンバー（例えば、抗体と抗原）間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般的に、解離定数（Kd）によって表すことができる。親和性は、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は、通常、抗原にゆっくり結合し、容易に解離する傾向があり、一方、高親和性抗体は、通常、抗原により早く結合し、結合したままである傾向がある。

【0105】

本明細書中で使用する場合、「Kd」または「Kd値」とは、Octet QK384機器（Fortebio Inc., Menlo Park, CA）を反応速度モードで使用して、バイオレイヤー干渉法によって測定される解離定数を指す。例えば、抗マウスFcセンサーに、マウスFc融合抗原をロードし、抗体を含有するウェルに浸して、濃度依存性の会合速度（kon）を測定する。緩衝液のみを含有するウェルにセンサーを浸す最終ステップにおいて、抗体の解離速度（koff）を測定する。Kdは、koff/kon

10

20

30

40

50

nの比率である。(詳細については、Concepcion, J, et al., Comb Chem High Throughput Screen, 12(8), 791-800, 2009を参照のこと)。

【0106】

用語「治療」、「治療する」などは、一般的に、所望の薬理学的及び／または生理学的効果を得ることを意味するものとして本明細書中で使用される。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び／または疾患及び／またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治療という観点において治療的であり得る。本明細書中で使用する「治療」は、哺乳類における疾患の任意の治療を包含し、(a) その疾患にかかりやすい可能性があるが、まだそれを有すると診断されていない対象における発症を予防するか、(b) その疾患を阻害する、すなわち、その発現を阻止するか、または(c) その疾患を軽減する、すなわち、その疾患の退行を引き起こすことを含む。治療薬は、疾患または傷害の発症前、発症中、または発症後に投与してもよい。進行中の疾患の治療で、その治療が患者の望ましくない臨床症状を安定化するか、または軽減するものは、特に興味深い。そのような治療は、影響を受けた組織の機能が完全に失われる前に実施することが望ましい。対象の治療薬は、疾患の症候期の間、及びいくつかの場合では疾患の症候期の後に投与してもよい。

10

【0107】

「治療有効量」は、対象に治療効果を与えるために必要な活性薬剤の量を意図している。例えば、「治療有効量」とは、疾患に関連する病理学的症状、疾患の進行または生理学的状態の改善を誘発、寛解、または引き起こすか、または障害に対する耐性を改善する量である。

20

【0108】

本明細書中で使用する用語「前立腺癌」とは、前立腺にある腺起源の悪性腫瘍を指す。

【0109】

用語「PSMAの発現を特徴とする」とは、PSMA発現が、疾患または障害に特徴的な1つ以上の病理学的プロセスに関連するか、または関与する任意の疾患または障害を広く指す。そのような障害として、前立腺癌が挙げられるが、これに限定されない。

【0110】

本発明に関して、用語「B細胞新生物」または「成熟B細胞新生物」には、すべてのリンパ性白血病及びリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、前リンパ球性白血病、前駆B細胞リンパ芽球性白血病、有毛細胞白血病、小リンパ球性リンパ腫、B細胞性前リンパ球性リンパ腫、B細胞慢性リンパ性白血病、マントル細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、多発性骨髄腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫などの形質細胞腫瘍、形質細胞腫、モノクローナル免疫グロブリン沈着症、重鎖疾患、MALTリンパ腫、リンパ節辺縁B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性浸出性リンパ腫、リンパ腫様肉芽腫症、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、有毛細胞白血病、原発性胸水リンパ腫及びエイズ関連非ホジキンリンパ腫が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0111】

用語「CD19の発現によって特徴付けられる」とは、疾患または障害の特徴である1つ以上の病理学的プロセスにCD19発現が関連または関与する任意の疾患または障害を広く指す。そのような障害には、B細胞新生物が含まれるが、これに限定されない。

【0112】

用語「BCMAの発現によって特徴付けられる」とは、疾患または障害の特徴である1つ以上の病理学的プロセスにBCMA発現が関連または関与する任意の疾患または障害を広く指す。そのような障害には、B細胞新生物が含まれるが、これに限定されない。

40

【0113】

用語「対象」、「個体」、及び「患者」は、本明細書中では同じ意味で用いられ、治療

50

について評価されている、及び／または治療されている哺乳類を指す。一実施形態では、哺乳類は、ヒトである。用語「対象」、「個体」、及び「患者」は、限定されないが、がんを有する個体、自己免疫疾患を有する個体、病原体感染症を有する個体などを包含する。対象はヒトであり得るが、他の哺乳類、特にヒトの疾患の実験室モデルとして有用な哺乳類、例えば、マウス、ラットなども含まれる。

【0114】

用語「医薬製剤」とは、活性成分の生物学的活性が有効になるような形態であり、及び製剤を投与する対象にとって許容できない程度に毒性である追加の成分を含有しない製剤を指す。そのような製剤は、無菌である。「薬学的に許容される」賦形剤（ビヒクル、添加剤）とは、対象哺乳類に適度に投与して、用いる有効用量の活性成分を提供することができる賦形剤である。

10

【0115】

「無菌」製剤は、無菌であるか、またはすべての生存微生物及びそれらの胞子を含まないか、もしくはそれらを本質的に含まない。「凍結」製剤は、温度が0℃未満の製剤である。

【0116】

「安定」製剤とは、内部のタンパク質が保管時にその物理的安定性及び／または化学的安定性及び／または生物学的活性を本質的に保持する製剤である。好ましくは、製剤は、保管時に、その物理的及び化学的安定性、ならびにその生物学的活性を本質的に保持する。保管期間は、一般的に、製剤の意図される貯蔵寿命に基づいて選択される。タンパク質安定性を測定するための様々な分析技術が当技術分野で利用可能であり、例えば、Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) 及び Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993) に概説されている。安定性は、選択された温度で選択された期間にわたって測定され得る。安定性は、凝集体形成の評価（例えば、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、濁度を測定することによって、及び／または目視検査によって）、カチオン交換クロマトグラフィー、イメージキャピラリー等電点電気泳動 (icIEF) またはキャピラリーゾーン電気泳動を使用して電荷不均一性を評定することによって、アミノ末端またはカルボキシ末端配列分析、質量分光分析、還元されたインタクトな抗体を比較する SDS-PAGE 分析、ペプチドマッピング（例えば、トリプシンまたは LYS-C）分析、抗体の生物学的活性または抗原結合機能の評価などを含む様々な異なる方法で、質的及び／または量的に評価され得る。不安定性には、凝集、脱アミド化（例えば、Asn 脱アミド化）、酸化（例えば、Met 酸化）、異性化（例えば、Asp 異性化）、クリッピング／加水分解／断片化（例えば、ヒンジ領域の断片化）、スクシンイミド形成、対形成していないシステイン（複数可）、N 末端伸長、C 末端プロセッシング、グリコシル化の差異などのうちのいずれか1つ以上が含まれ得る。

20

30

【0117】

II. 詳細な説明

【0118】

抗BCMA抗体

本発明は、ヒトBCMAに結合する、近縁の抗体のいくつかのファミリーに関する。これらのファミリーの抗体の可変領域は、米国特許公開第US20190352412号、第US20200157232号及び第US20200048348号、ならびにPCT公開第WO2018237037号及び第WO2019006072号に記載されており、その出願の開示は参照によりその全体が本明細書に援用される。代表的な抗BCMA重鎖抗体可変ドメイン配列の非限定的な選択を以下の表1に示す。

40

50

【表 1】

表 1：抗 B C M A 重鎖抗体可変ドメインアミノ酸配列

クローンID番号	FR1_FR4アミノ酸配列	配列番号
308635	EVQLLES GGGLVQAGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGK GPEWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYHCAKQGENDGPF DYRGQGTLVTVSS	92
308636	EVQVLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQPPGK GMEWVSGIRGSDGSTFYADSVKGRFTISRDNATNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKQGGNDGPF DYRGQGTLVTVSS	87
308806	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSYGMSWVRQAPGKG VEWVSGIRGSDGTTYADSVKGRFTISRDS SRNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKQGGNDGPF DHRGQGTLVTVSS	88
308837	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGK GPEWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNATNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKQGGNDGPF DYRGQGTLVTVSS	89
308902	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGK GPEWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKQGENDGPF DHRGQGTLVTVSS	90
308912	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQPPGKG MEWVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN AKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKQGGNDGPF DYRGQGTLVTVSS	91

【0119】

抗 B C M A 抗体配列は、開発及び治療法または、多重特異性、例えば二重特異性抗体としての使用を含むがこれに限定されない、他の使用のために本明細書に提供される抗体から選択され得る。いくつかの実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体を提供し、これは、T C A を含むがこれに限定されない、本明細書で述べる構成のいずれかを有し得る。二重特異性抗体は、B C M A 以外のタンパク質に特異的な抗体の重鎖可変領域を少なくとも含む。

【0120】

本発明のタンパク質が二重特異性抗体である場合、一方の結合部分はヒト B C M A に特異的であり、他方のアームは、標的細胞、腫瘍関連抗原、標的抗原、例えばインテグリンなど、病原体抗原、チェックポイントタンパク質などに特異的であり得る。標的細胞には、以下で述べるように、血液腫瘍、例えば B 細胞腫瘍などのがん細胞が具体的に含まれる。

【0121】

単一鎖ポリペプチド、二本鎖ポリペプチド、三本鎖ポリペプチド、四本鎖ポリペプチド、及びそれらの倍数を含むがこれらに限定されない、二重特異性抗体の様々な形式が本発明の範囲内にある。本明細書における二重特異性抗体は、具体的には、形質細胞（P C）及び多発性骨髄腫（M M）上で選択的に発現する B C M A、及び C D 3 に結合する T 細胞二重特異性抗体（抗 B C M A × 抗 C D 3 抗体）を含む。そのような抗体は、B C M A を保有する細胞の強力な T 細胞媒介性細胞死を誘導し、本明細書でさらに述べるように、腫瘍、特に B 細胞腫瘍などの血液腫瘍を治療するために使用することができる。

【0122】

好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、軽鎖可変ドメイン（V L）と対になった抗 C D 3 V H ドメイン（V H ドメイン及び V L ドメインは、合わせて C D 3 に対する結合

親和性を有する) ; 一価または二価の構成で、BCMAに対する結合親和性を有する重鎖のみ抗体の重鎖可変ドメイン ; ならびにS228P変異、F234A変異、L235A変異、及びT366W変異(ノブ)を含む第1の重鎖定常領域配列と、S228P変異、F234A変異、L235A変異、T366S変異、L368A変異、及びY407V変異(ホール)を含む第2の重鎖定常領域配列とを含むバリエーションヒトIgG4Fcドメインを含むTCAである。このバリエーション、すなわち修飾IgG4Fcドメインは、不要なFab交換を防ぎ、抗体のエフェクター機能を低下させ、さらにはまた、重鎖ポリペプチドサブユニットのヘテロ二量体化を促進して二重特異性抗体を形成させる。

【0123】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性抗体を含む。

10

【0124】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号59を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性抗体を含む。

【0125】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗BCMA軽鎖を含まない。

20

【0126】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号59を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗BCMA軽鎖を含まない。

【0127】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号56を含む抗CD3重鎖、配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及び配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号59を含む抗BCMA重鎖を含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含む。

30

【0129】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及び配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗BCMA軽鎖を含まない。

【0130】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号59を含む抗BCMA重鎖を含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗BCMA軽鎖を含まない。

40

【0131】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒトCD3に結合する第1の結合アーム及び(ii) ヒトBCMAに結合する第2の結合アームを含む、ヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含み、当該第1の結合アームは、第1の重鎖及び軽鎖を含み、当該第2の結合アームは、二価の第2の重鎖を含み、当該第1の重鎖は、配列番号56のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号49のアミノ酸配列を含み、当該二価の第二の重鎖は、配列番号58のアミノ酸配列を含む。

【0132】

50

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒトCD3に結合する第1の結合アーム及び(ii) ヒトBCMAに結合する第2の結合アームを含む、ヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含み、当該第1の結合アームは、第1の重鎖及び軽鎖を含み、当該第2の結合アームは、二価の第2の重鎖を含み、当該第1の重鎖は、配列番号56のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号49のアミノ酸配列を含み、当該二価の第2の重鎖は、配列番号59のアミノ酸配列を含む。

【0133】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒトCD3に結合する第1の結合アーム及び(ii) ヒトBCMAに結合する第2の結合アームを含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含み、当該第1の結合アームは、第1の重鎖及び軽鎖を含み、当該第2の結合アームは、二価の第2の重鎖を含み、当該第1の重鎖は、配列番号56のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号49のアミノ酸配列を含み、当該二価の第2の重鎖は、配列番号58のアミノ酸配列を含み、当該第2の結合アームは、軽鎖を含まない。

10

【0134】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒトCD3に結合する第1の結合アーム及び(ii) ヒトBCMAに結合する第2の結合アームを含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性抗体を含み、当該第1の結合アームは、第1の重鎖及び軽鎖を含み、当該第2の結合アームは、二価の第2の重鎖を含み、当該第1の重鎖は、配列番号56のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号49のアミノ酸配列を含み、当該二価の第2の重鎖は、配列番号59のアミノ酸配列を含み、当該第2の結合アームは、軽鎖を含まない。

20

【0135】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子(TCA)を含む。

【0136】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号59を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子(TCA)を含む。

【0137】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子(TCA)を含み、二重特異性抗体は、抗BCMA軽鎖を含まない。

30

【0138】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号59を含む抗BCMA重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子(TCA)を含み、二重特異性抗体は、抗BCMA軽鎖を含まない。

【0139】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号56を含む抗CD3重鎖、配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及び配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性三本鎖抗体様分子(TCA)を含む。

40

【0140】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及びiii) 配列番号59を含む抗BCMA重鎖を含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性三本鎖抗体様分子(TCA)を含む。

【0141】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号56を含む抗CD3重鎖、ii) 配列番号49を含む抗CD3軽鎖、及び配列番号58を含む抗BCMA重鎖を含むヒトモノクローナルIgG4二重特異性三本鎖抗体様分子(TCA)を含み、二重特異性抗体は、

50

抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【0142】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 56 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 59 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【0143】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 56 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 58 のアミノ酸配列を含む。

【0144】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 56 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 59 のアミノ酸配列を含む。

【0145】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 56 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 58 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 の結合アームは、軽鎖を含まない。

【0146】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 56 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 59 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 の結合アームは、軽鎖を含まない。

【0147】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性抗体を含む。

【0148】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性抗体を含む。

【0149】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【0150】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配

列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【0151】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含む。

【0152】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含む。

10

【0153】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【0154】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

20

【0155】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含む、ヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 76 のアミノ酸配列を含む。

【0156】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含む、ヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 77 のアミノ酸配列を含む。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含む、ヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 76 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 の結合アームは、軽鎖を含まない。

40

【0158】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含む、ヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性抗体を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 77 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 の結合アームは、軽鎖を含まない。

【0159】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配

50

列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含む。

【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含む。

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

10

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含む二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態では、本発明は、配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含む。

20

【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含む。

【 0 1 6 5 】

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び配列番号 76 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【 0 1 6 6 】

30

いくつかの実施形態では、本発明は、i) 配列番号 75 を含む抗 C D 3 重鎖、i i) 配列番号 49 を含む抗 C D 3 軽鎖、及び i i i) 配列番号 77 を含む抗 B C M A 重鎖を含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、二重特異性抗体は、抗 B C M A 軽鎖を含まない。

【 0 1 6 7 】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 76 のアミノ酸配列を含む。

40

【 0 1 6 8 】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 75 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 77 のアミノ酸配列を含む。

【 0 1 6 9 】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及

50

び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 7 6 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 の結合アームは、軽鎖を含まない。

【0170】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) ヒト C D 3 に結合する第 1 の結合アーム及び (i i) ヒト B C M A に結合する第 2 の結合アームを含むヒトモノクローナル I g G 4 二重特異性三本鎖抗体様分子 (T C A) を含み、当該第 1 の結合アームは、第 1 の重鎖及び軽鎖を含み、当該第 2 の結合アームは、二価の第 2 の重鎖を含み、当該第 1 の重鎖は、配列番号 7 5 のアミノ酸配列を含み、当該軽鎖は、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含み、当該二価の第 2 の重鎖は、配列番号 7 7 のアミノ酸配列を含み、当該第 2 の結合アームは、軽鎖を含まない。

【0171】

抗 C D 1 9 抗体

本発明は、ヒト C D 1 9 に結合する近縁の抗体のファミリーを提供する。このファミリーの抗体の可変領域は、P C T 公開第 W O 2 0 2 0 0 1 8 9 2 2 号に記載されており、その開示はその全体が参照により本明細書に援用される。抗 C D 1 9 抗体配列は、多重特異性、例えば二重特異性抗体としての使用を含むがこれに限定されない、開発及び治療法または他の使用のために本明細書中で提供される配列から選択され得る。いくつかの実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体を提供し、これは、T C A を含むがこれに限定されない、本明細書中で述べる構成のいずれかを有し得る。二重特異性抗体は、C D 1 9 以外のタンパク質に特異的な抗体の少なくとも重鎖可変領域を含む。

【0172】

本発明のタンパク質が二重特異性抗体である場合、一方の結合部分は、ヒト C D 1 9 に特異的であるが、他方のアームは、標的細胞、腫瘍関連抗原、標的抗原、例えばインテグリンなど、病原体抗原、チェックポイントタンパク質などに特異的であり得る。標的細胞には、具体的には、以下で述べるように、がん細胞、例えば、血液腫瘍、例えば B 細胞腫瘍が含まれる。

【0173】

単一鎖ポリペプチド、二本鎖ポリペプチド、三本鎖ポリペプチド、四本鎖ポリペプチド、及びそれらの倍数を含むがこれらに限定されない、二重特異性抗体の様々な形式が本発明の範囲内にある。本明細書における二重特異性抗体には、具体的には、成熟 B 細胞上で選択的に発現する C D 1 9 、及び C D 3 に結合する T 細胞二重特異性抗体 (抗 C D 1 9 × 抗 C D 3 抗体) が含まれる。そのような抗体は、本明細書でさらに述べるように、C D 1 9 を発現する細胞の強力な T 細胞媒介性細胞死を誘導し、腫瘍、特に B 細胞腫瘍などの血液腫瘍を治療するために使用することができる。

【0174】

好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、軽鎖可変ドメイン (V L) と対になった抗 C D 3 V H ドメイン (V H ドメイン及び V L ドメインは、合わせて C D 3 に対する結合親和性を有する) ; 一価または二価の構成で、C D 1 9 に対する結合親和性を有する重鎖のみ抗体の重鎖可変ドメイン ; ならびに S 2 2 8 P 変異、F 2 3 4 A 変異、L 2 3 5 A 変異、及び T 3 6 6 W 変異 (ノブ) を含む第 1 の重鎖定常領域配列と、S 2 2 8 P 変異、F 2 3 4 A 変異、L 2 3 5 A 変異、T 3 6 6 S 変異、L 3 6 8 A 変異、及び Y 4 0 7 V 変異 (ホール) を含む第 2 の重鎖定常領域配列とを含むバリエーションヒト I g G 4 F c ドメインを含む T C A である。このバリエーション、すなわち修飾 I g G 4 F c ドメインは、不要な F a b 交換を防ぎ、抗体のエフェクター機能を低下させ、さらにはまた、重鎖ポリペプチドサブユニットのヘテロ二量体化を促進して二重特異性抗体を形成させる。

【0175】

抗 P S M A 抗体

本発明は、ヒト P S M A に結合する、近縁の抗体ファミリーを提供する。このファミリーの抗体は、表 2 に示す配列番号 2 4 ～ 5 4 の提供される重鎖可変領域（V H）配列によって例示される。この抗体のファミリーは、臨床治療薬（複数可）としての有用性に寄与する多くの利点を提供する。抗体には、様々な結合親和性を有するメンバーが含まれているため、所望の結合親和性を有する特定の配列が選択され得る。

【表 2 - 1】

表 2. 抗 P S M A 重鎖抗体可変ドメインアミノ酸配列

クローンID番号	FR1_FR4アミノ酸配列	配列番号
325920	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPG KGLEWIGSIDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYNCARHKAATADFDYRGQGTLVTVSS	1
346181	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNFYWGWRQSPG KGLEWIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYNCARHKAATADFDYRGQGTLVTVSS	2
346165	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPG KGLEWIGSVDYSGYTYYNPSLQSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYNCARHKAATADFDYRGQGTLVTVSS	3
346172	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPG KGLEWIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYNCARHKAATADFDYRGQGTLVTVSS	4
326109	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSNSYYWGWRQSPG KGLEWLGSIDYSGSTHYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT ADTAVYYCARHKAATADFDYRGQGTLVTVSS	5
325867	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNYSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYDSLDRGQGTLVTVSS	6
325742	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNYSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYDSLDRGQGTLVTVSS	7
325748	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KLEGVAVIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDNYSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDRGQGTLVTVSS	8
325940	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPG KGPEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNYSKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDRGQGTLVTVSS	9

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

クローンID番号	FR1_FR4アミノ酸配列	配列番号
325836	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYYDSSGYDSLDRGQGTLTVSS	10
326027	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYYDSSGYDSLDRGQGTLTVSS	11
326087	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPG KGPEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYYDSSGYDSLDRGQGTLTVSS	12
326084	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYYDSSGYSLDRGQGTLTVSS	13
326028	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFRSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYYDSSGYDSLDRGQGTLTVSS	14
345497	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDRGQGTLTVSS	15
326029	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRVGYYYETSGYYSLDRGQGTLTVSS	16
345461	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFTSYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDRGQGTLTVSS	17
345493	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYSLDRGQGTLTVSS	18

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

クローンID番号	FR1_FR4アミノ酸配列	配列番号
345436	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	19
345443	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	20
345490	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	21
345482	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDS SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	22
345485	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTMYLQM NSLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVS S	23
345463	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFIFRSYGMHWVRQAPG KGPEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	24
325932	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	25
345505	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFISYGMHWVRQAPG KGLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	26
345508	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGPEWVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYISLDYRGQGTLTVSS	27

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

クローンID番号	FR1_FR4アミノ酸配列	配列番号
345480	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYYS LDYRGQGTLVTVSS	28
326116	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSRYGMHWVRQAPG KLEGVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR DY SKNTLYLQMN S LRAEDTAVYYCAREPRIGYYYDSSGYDSL DYRGQGTLVTVSS	29
345509	QVQLVESGGGLVQP GGSRLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KLEGVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISR DN SKNTMYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYYS LDYRGQGTLVTVSS	30
345444	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYYS LDYRGQGTLVTVSS	31
345421	QVQLVESVGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KLEGVAVIWYDGSNRYYADSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYYS LDYRGQGTLVTVSS	32
345447	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KLEGVAVISYDGSNRYYADSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMN S LRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYYS LDYRGQGTLVTVSS	33
345510	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISR DN SKNTMYLQM NSLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYESSGYYS LDYRGQGTLVTVS S	34
345438	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPG KGPEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAREPRIGYYYE SSGYYS LDYRGQGTLVTVSS	35

【0176】

好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、軽鎖可変ドメイン（VL）と対になった抗CD3 VHドメイン（VHドメイン及びVLドメインは、合わせてCD3に対する結合親和性を有する）；一価または二価の構成で、PSMAへの結合親和性を有する重鎖のみ抗体の重鎖可変ドメイン；ならびにS228P変異、F234A変異、L235A変異、及びT366W変異（ノブ）を含む第1の重鎖定常領域配列と、S228P変異、F234A変異、L235A変異、T366S変異、L368A変異、及びY407V変異（ホール）を含む第2の重鎖定常領域配列とを含むバリエーションヒトIgG4 Fcドメインを含むTCAである。このバリエーション、すなわち修飾IgG4 Fcドメインは、不要なFab交換を防ぎ、抗体のエフェクター機能を低下させ、さらにはまた、重鎖ポリペプチドサブユニットのヘテロ二量体化を促進して二重特異性抗体を形成させる。

【0177】

CD3×標的タンパク質三本鎖抗体様分子（TCA）

いくつかの実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体を提供し、これは、限定されないが、二重特異性三本鎖抗体様分子を含む、本明細書中で述べる構成のいずれかを有し得る。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、第1の抗原（例えば、CD3）に

対する結合特異性を有する重鎖／軽鎖ペア、及び重鎖のみ抗体由来の重鎖を含み得る。特定の実施形態では、重鎖のみ抗体由来の重鎖は、C H 1ドメインを含まず、C H 2及び／またはC H 3及び／またはC H 4ドメインを含むF c部分を含む。特定の一実施形態では、二重特異性抗体は、エフェクター細胞上の抗原（例えば、T細胞上のC D 3タンパク質）に対する結合特異性を有する重鎖／軽鎖ペア、及びB C M A、P S M A、またはC D 1 9に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む重鎖のみ抗体由来の重鎖を含む。

【0178】

好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、軽鎖可変ドメイン（V L）と対になった抗C D 3 V Hドメイン（V Hドメイン及びV Lドメインは、合わせてC D 3に対する結合親和性を有する）；B C M A、P S M A、またはC D 1 9に対する結合親和性を有する重鎖のみ抗体の重鎖可変ドメイン；S 2 2 8 P変異、F 2 3 4 A変異、L 2 3 5 A変異、及びT 3 6 6 W変異（ノブ）を含む第1の重鎖定常領域配列と、S 2 2 8 P変異、F 2 3 4 A変異、L 2 3 5 A変異、T 3 6 6 S変異、L 3 6 8 A変異、及びY 4 0 7 V変異（ホール）を含む第2の重鎖定常領域配列とを含むバリエーションヒトI g G 4 F cドメインを含むT C Aである。このバリエーション、すなわち修飾I g G 4 F cドメインは、不要なF a b交換を防ぎ、抗体のエフェクター機能を低下させ、さらにはまた、重鎖ポリペプチドサブユニットのヘテロ二量体化を促進して二重特異性抗体を形成させる。

【0179】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、軽鎖可変ドメインと対になったC D 3結合V Hドメインを含む。特定の実施形態では、軽鎖は、固定軽鎖である。いくつかの実施形態では、C D 3結合V Hドメインは、ヒトV Hフレームワークにおいて、配列番号36のC D R 1配列、配列番号37のC D R 2配列、及び配列番号38のC D R 3配列を含む。いくつかの実施形態では、固定軽鎖は、ヒトV Lフレームワークにおいて、配列番号39のC D R 1配列、配列番号40のC D R 2配列、及び配列番号41のC D R 3配列を含む。合わせて、C D 3結合V Hドメインと軽鎖可変ドメインはC D 3に対して結合親和性を有する。いくつかの実施形態では、C D 3結合V Hドメインは、配列番号42の重鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、C D 3結合V Hドメインは、配列番号42の重鎖可変領域配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、固定軽鎖は、配列番号43の軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、固定軽鎖は、配列番号43の重鎖可変領域配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、または少なくとも約99%の同一性を有する配列を含む。

【0180】

上記のC D 3結合V Hドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む多重特異性抗体は、例えば、P C T公開第W O 2 0 1 8 / 0 5 2 5 0 3号（その開示は、その全体が参照により本明細書に援用される）に記載されているように、有利な特性を有する。B C M A、P S M A、またはC D 1 9への結合親和性を有する、本明細書に記載の多重特異性抗体及び抗原結合ドメインのいずれも、本明細書に記載のC D 3結合ドメイン及び固定軽鎖ドメインと組み合わせて、1つ以上のB C M Aエピトープ、P S M Aエピトープ、またはC D 1 9エピトープ及びC D 3に結合親和性を有する多重特異性抗体を生成することができる。

【表3】

表3. 抗C D 3重鎖及び軽鎖のC D R 1、C D R 2、C D R 3アミノ酸配列

	CDR1アミノ酸配列	CDR2アミノ酸配列	CDR3アミノ酸配列
重鎖	GFTFDDYA (配列番号36)	ISWNSGSI (配列番号37)	AKDSRGYGDYRLGGAY (配列番号38)
軽鎖	QSVSSN (配列番号39)	GAS (配列番号40)	QQYNNWPWT (配列番号41)

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 抗 C D 3 重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸配列

VH	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNS GSIGYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTALYYC AKDSRGYGDYRLGGAYWGQGTLLTVSS (配列番号42)
VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYCQQYNWPWTFGQGTKVEIK(配列番号43)

10

【表 5】

表 5 : ヒト I g G 1 及び I g G 4 F c 領域配列

ヒトIgG1 (UniProt番号 P01857)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK (配列番号44)
ヒトIgG4 (UniProt番号 P01861)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG K (配列番号45)
サイレンシング 変異を有するヒト IgG1 (Fc領域)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK (配列番号46)
サイレンシング 変異を有するヒト IgG4 (Fc領域)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG K (配列番号47)

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6 : 抗 C D 3 抗体の配列

抗CD3軽鎖 定常領域配列 (κ 軽鎖)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNREGC (配列番号 48)
抗CD3全長 軽鎖(VL + κ CL)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLI YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPW TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC (配列番号 49)
抗CD3重鎖配列 (VH (F2B) + 野生型IgG1 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 50)
抗CD3重鎖配列 (VH F2B + サイレンシング されたIgG1 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 51)
抗CD3重鎖 VH F2B (+ 野生型IgG4 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 52)
抗CD3重鎖 VH F2B (+ サイレンシング されたIgG4 Fc)	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS SSVTVTPSSSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPSCAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 53)

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

サイレンシング されたIgG4 (CH1- ヒンジ-CH2- CH3;ホール(S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSL S C A VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFL V SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号72)
サイレンシング されたIgG4 (CH1- ヒンジ-CH2- CH3;ノブ (S228P, F234A, L235A; T366W))	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号73)
サイレンシング されたIgG4 (ヒンジ-CH2- CH3;ホール(S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSL S C A VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFL V SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列 番号54)
サイレンシング されたIgG4 (ヒンジ-CH2- CH3;ノブ (S228P, F234A, L235A; T366W))	ESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列 番号55)
抗CD3全長重鎖 (VH F2B + サイレンシング されたIgG4 Fc + ノブ(S228P, F234A, L235A ; T366W)), C末端 リジン(K)を有 する	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSR TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL W CLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号56)

10

20

30

40

50

【表 6 - 3】

抗CD3全長重鎖 (VH F2B + サイレンシング されたIgG4 Fc + ノブ(S228P, F234A, L235A; T366W)), C末端 リジン(K)を有 さない	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL W CLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号75)
抗CD3全長重鎖 (VH F2B + サイレンシング されたIgG4 Fc + ホール(S228P, F234A, L235A ; T366S, L368A, Y407V))	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLE WVSGISWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKSLYLQMNSLRAEDTAL YYCAKDSRGYGDYRLGGAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL ScA VKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号57)

10

20

【表 7 - 1】

表 7 : 抗T A A抗体の配列

サイレンシング されたIgG4 (ヒンジ - CH2 - CH3; ホール(S228P, F234A, L235A; T366S, L368A, Y407V))	ESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSL ScA VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列 番号54)
サイレンシング されたIgG4 (ヒンジ - CH2 - CH3; ノブ (S228P, F234A, L235A; T366W))	ESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSL W CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG (配列 番号55)

30

40

【表 7 - 2】

BCMA 二価重鎖 (TNB-383B w GS1)+ サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有する	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGTLLTVSSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPEWVSGIRGSDGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGENDGPFDR GQGTLLTVSSSESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SCA</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL LSLGLK (配列番号 58)	10
BCMA 二価重鎖 (TNB-383B w GS1) + サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有さない	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGTLLTVSSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPEWVSGIRGSDGSTYYAD SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGENDGPFDR GQGTLLTVSSSESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SCA</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP PVLDSGDSFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL LSLGLK (配列番号 76)	20
BCMA 二価重鎖 (TNB-383B w GS2) + サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有する	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSEVQLLESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPEWVSGIRGSDGS TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGEND GPFDRGQGTLLTVSSSESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SCA</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTPPVLDSGDSFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNH YTQKSLSLGLK (配列番号 59)	30

40

50

【表 7 - 3】

BCMA 二価重鎖 (TNB-383B w GS2) + サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有さない	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGT LVTSSGGGGSGGGGSEVQLLES GGG LVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPEWVSGIRGSDGS TYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKQGEND GPFDRGQGT LVTSSSESKYGPPCP <u>P</u>CPAPE <u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFL <u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSLG (配列番号 77)
BCMA 一価重鎖 (TNB-383B) + サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3,ホール(S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSYGMSWVRQAPGKGPE WVSGIRGSDGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKQGENDGPFDRGQGT LVTSSSESKYGPPCP <u>P</u>CPAPE <u>AA</u>GGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SCA</u>VKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL <u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNH YTQKSLSLSLGK (配列番号 60)
PSMA 一価重鎖 (クローン ID 346181)+ サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール(S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有する	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGT LVTSSSESKYGPPCP <u>P</u>CPAPE <u>AA</u>GGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL <u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL <u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSV M HEALHNH YTQKSLSLSLGK (配列番号 61)

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

PSMA 一価重鎖 (クローン ID 346181) + サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有さない	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGTLLTVSSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>ScA</u>VKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 81)
PSMA 二価重鎖 (クローン ID 346181) + サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有する	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGGLV KPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIGSIDYSGYTY NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFD YRGQGTLLTVSSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>ScA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLGLG (配列番号 62)
PSMA 二価重鎖 (クローン ID 346181) + サイレンシング された IgG4 Fc ヒンジ CH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端リジン(K) を有さない	QLQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGGLV KPSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIGSIDYSGYTY NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFD YRGQGTLLTVSSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>ScA</u>VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLGLG (配列番号 82)

10

20

30

40

50

【表 7 - 5】

PSMA一価重鎖 (クローンID 345497)+ サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有する	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAIVWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYESSGYISLDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP P CP APE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL ScA VK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 63)
PSMA一価重鎖 (クローンID 345497)+ サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH2 CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有さない	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAIVWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYESSGYISLDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP P CP APE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL ScA VK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 83)
PSMA二価重鎖 (クローンID 345497)+ サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有する	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAIVWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYESSGYISLDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQV QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGV AVIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAREPRIGYYESSGYISLDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP P CPAPE AA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL ScA VKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL V SRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 64)

10

20

30

40

50

【表 7 - 6】

PSMA二価重鎖 (クローンID 345497)+ サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を有 さない	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSQV QLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGV AVIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAREPRIGYYYESSGYSLDYRGQGT LVTVSSSESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSL SLG (配列番号 84)	10
PSMA二価重鎖 (クローンID 346181 x クローンID 345497)+ サイレンシング されたIgG4 Fc, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有する	QLQLQESGPGLVKPS ETL SLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVAVIWYDGSNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGYY YESSGYSLDYRGQGT LVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSL SLGK (配列番号 65)	20
PSMA二価重鎖 (クローンID 346181 x クローンID 345497)+ サイレンシング されたIgG4 Fc, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を有 さない	QLQLQESGPGLVKPS ETL SLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLE WIGSIDYSGYTYYNPSL KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYN CARHKAATADFDYRGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLEGVAVIWYDGSNR YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREPRIGYY YESSGYSLDYRGQGT LVTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSL SLG (配列番号 85)	30

40

50

【表 7 - 7】

PSMA二価重鎖 (クローンID 345497 x クローンID 346181)+ サイレンシング されたIgG4 Fc, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有する	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYEYESSGYISLDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQL QLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIG SIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCAR HKAATADFDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 66)
PSMA二価重鎖 (クローンID 345497 x クローンID 346181)+ サイレンシング されたIgG4 Fc, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を有 さない	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSRYGMHWVRQAPGKGLE GVAVIWYDGSNRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAREPRIGYYEYESSGYISLDYRGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSQL QLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSNYFWGWIRQSPGKGLEWIG SIDYSGYTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYNCAR HKAATADFDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 86)
CD19一価重鎖 + サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を有 する	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLE WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDN AKKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCASGVYSFDYRGQGTLVTVSSESKYGPPCP<u>P</u>CPAPE<u>AA</u>GGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL<u>SCA</u>VKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL<u>V</u>SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLG (配列番号 67)

10

20

30

40

50

【表 7 - 8】

CD19一価重鎖 + サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を有 さない	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLE WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCASGVYSFDYRGQGTLLTVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLG (配列番号 78)
CD19二価GS1 重鎖 + サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有する	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLE WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCASGVYSFDYRGQGTLLTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDYVDSVK GRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGVYSFDYRGQGTLL TVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG DSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号 68)
CD19二価GS1 重鎖 + サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を有 さない	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLE WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCASGVYSFDYRGQGTLLTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDYVDSVK GRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGVYSFDYRGQGTLL TVSSSESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG DSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG (配列番号 79)

10

20

30

40

50

【表 7 - 9】

CD19二価GS2 重鎖+ サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有する	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLE WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCASGVYSFDYRGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDY VDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGVYSFDYR GQGTLLTVSSSESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL <u>S</u> <u>CA</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSDGSEFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL SLSLGK (配列番号 69)
CD19二価GS2 重鎖+ サイレンシング されたIgG4 Fc ヒンジCH CH3, ホール (S228P, F234A, L235A, T366S, L368A, Y407V, C末端 リジン(K)を 有さない	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLE WVATISQAGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAV YYCASGVYSFDYRGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSFSDFWMSWVRQAPGKGLEWVATISQAGSEKDY VDSVKGRFTISRDNAAKSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGVYSFDYR GQGTLLTVSSSESKYGPPCP <u>P</u> CPAPE <u>AA</u> GGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSL <u>S</u> <u>CA</u> VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSDGSEFFL <u>V</u> SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSL SLSLG (配列番号 80)

10

20

【0181】

いくつかの実施形態では、二重特異性または多重特異性抗体を提供し、これは、限定されないが、二重特異性三本鎖抗体様分子を含む、本明細書中で述べる構成のいずれかを有し得る。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、BCMA、PSMA、またはCD19に対する結合特異性を有する少なくとも1つの重鎖可変領域、及び異なるタンパク質、例えば、CD3に対する結合特異性を有する少なくとも1つの重鎖可変領域を含み得る。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、一価または二価の構成で、第1の抗原に対する結合特異性を有する重鎖／軽鎖ペア、及びCH1ドメインを含まず、CH2及び／またはCH3及び／またはCH4ドメインを含むFc部分を含む重鎖のみ抗体由来の重鎖、ならびに第2の抗原のエピトープまたは第1の抗原の異なるエピトープに結合する抗原結合ドメインを含み得る。特定の一実施形態では、二重特異性抗体は、一価または二価の構成で、エフェクター細胞上の抗原（例えば、T細胞上のCD3タンパク質）に対する結合特異性を有する重鎖／軽鎖ペア、及びBCMA、PSMA、またはCD19に対する結合特異性を有する抗原結合ドメインを含む重鎖のみ抗体由来の重鎖を含む。

30

【0182】

本発明の抗体が二重特異性抗体であるいくつかの実施形態では、抗体の一方のアーム（1つの結合部分または1つの結合ユニット）は、ヒトBCMA、ヒトPSMA、またはヒトCD19に特異的であり、他方のアームは、標的細胞、腫瘍関連抗原、標的化抗原、例えば、インテグリンなど、病原体抗原、チェックポイントタンパク質などに特異的であり得る。標的細胞には、具体的には、以下に述べるように、限定されないが、固形腫瘍、例えば、前立腺腫瘍由来の細胞を含むがん細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、抗体の一方のアーム（1つの結合部分、または1つの結合ユニット）は、ヒトBCMA、ヒトPSMA、またはヒトCD19に特異的であり、他方のアームは、CD3に特異的である。

40

【0183】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号48の配列に連結された配列番号43の配

50

列を含む抗CD3軽鎖ポリペプチド、配列番号44、45、46、47、50、51、52、53、56または57のいずれか1つの配列を含む抗CD3重鎖ポリペプチド、及び配列番号75、76、77、78、84または85のいずれか1つの配列に連結された一価または二価の構成の配列番号58、59または60のいずれか1つの配列を含む抗BCMA重鎖ポリペプチドを含む。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号58、59または60を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号58を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号58からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号59を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号59からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号60を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号60からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。

【0184】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号48の配列に連結された配列番号43の配列を含む抗CD3軽鎖ポリペプチド、配列番号44、45、46、47、50、51、52、53、56または57のいずれか1つの配列を含む抗CD3重鎖ポリペプチド、及び配列番号61、62、63、64、65または66のいずれか1つの配列を含む抗PSMA重鎖ポリペプチドを含む。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号61を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号61からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号62を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号62からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号63を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号64を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号64からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号65を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号65からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号66を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56か

10

20

30

40

50

らなる第2のポリペプチド、及び配列番号66からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。

【0185】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号48の配列に連結された配列番号43の配列を含む抗CD3軽鎖ポリペプチド、配列番号44、45、46、47、50、51、52、53、56または57のいずれか1つの配列を含む抗CD3重鎖ポリペプチド、及び配列番号67、68または69のいずれか1つの配列を含む抗CD19重鎖ポリペプチドを含む。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号67を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号67からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号68を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号68からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49を含む第1のポリペプチド、配列番号56を含む第2のポリペプチド、及び配列番号69を含む第3のポリペプチドを含むTCAである。好ましい一実施形態では、抗体は、配列番号49からなる第1のポリペプチド、配列番号56からなる第2のポリペプチド、及び配列番号69からなる第3のポリペプチドからなるTCAである。

【0186】

限定されないが、一本鎖ポリペプチド、二本鎖ポリペプチド、三本鎖ポリペプチド、四本鎖ポリペプチド、及びそれらの倍数を含む、様々な形態の多重特異性抗体が本発明の範囲内にある。本明細書の多重特異性抗体には、具体的には、BCMA、PSMA、または19、及びCD3に結合するT細胞多重特異性（例えば、二重特異性）抗体（抗BCMA×抗CD3抗体、抗PSMA×抗CD3抗体、抗CD19×抗CD3抗体）が含まれ、S228P変異、F234A変異、L235A変異、及びT366W変異（ノブ）を含む第1の重鎖定常領域配列、ならびにS228P変異、F234A変異、L235A変異、T366S変異、L368A変異、及びY407V変異（ホール）を含む第2の重鎖定常領域配列を含むバリエーションヒトIgG4Fcドメインを含む。このバリエーション、すなわち修飾IgG4Fcドメインは、不要なFab交換を防ぎ、抗体のエフェクター機能を低下させ、重鎖ポリペプチドサブユニットのヘテロ二量体化を促進して二重特異性抗体を形成させる。そのような抗体は、それぞれ、BCMA、PSMA、またはCD19を発現する細胞の強力なT細胞媒介性細胞死を誘導する。

【0187】

抗体の調製

本発明の多重特異性抗体は、当技術分野で公知の方法によって調製することができる。好ましい実施形態では、本明細書の重鎖抗体は、内在性免疫グロブリン遺伝子がノックアウトまたは無効化されているトランスジェニックマウス及びラットを含むトランスジェニック動物、好ましくはラットによって産生される。好ましい実施形態では、本明細書の重鎖抗体は、UniRat（商標）で産生される。UniRat（商標）は、内在性免疫グロブリン遺伝子がサイレンシングされており、ヒト免疫グロブリン重鎖導入遺伝子座を使用して、完全ヒトHCAbの多様で天然に最適化されたレパートリーを発現する。ラットの内在性免疫グロブリン遺伝子座は、様々な技術を使用してノックアウトまたはサイレンシングすることができるが、UniRat（商標）では、ジンクフィンガー（エンド）ヌクレアーゼ（ZNF）技術を使用して、内在性ラット重鎖J遺伝子座、軽鎖Cκ遺伝子座及び軽鎖Cλ遺伝子座を不活性化した。卵母細胞へのマイクロインジェクション用のZNF構築物は、IgH及びIgLNockアウト（KO）システムを生成することができる。詳細については、例えば、Geurts et al., 2009, Science 325: 433を参照のこと。Ig重鎖ノックアウトラットの特徴決定は、Menoret et

al., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941)によって報告されている。ZNF技術の利点は、最大、数kbの欠失を介して遺伝子または遺伝子座をサイレンシングするための非相同末端結合もまた、相同組込みの標的部位を提供することができる点である(Cui et al., 2011, Nat Biotechnol 29:64-67)。UniRat (商標)で産生されたヒト重鎖抗体は、UniAbs (商標)と呼ばれ、従来の抗体で攻撃することができないエピトープに結合することができる。それらの高い特異性、親和性、及びサイズの小ささは、単一及び多特異的な応用に理想的である。

【0188】

UniAbs (商標)に加えて、具体的には、ラクダ類のVHHフレームワーク及び変異、ならびにそれらの機能的なVH領域を欠く重鎖のみ抗体が本明細書に含まれる。そのような重鎖のみ抗体は、例えば、WO2006/008548に記載されているように、完全にヒトの重鎖のみの遺伝子座を含むトランスジェニックラットまたはマウスで産生することができるが、ウサギ、モルモット、ラットなどの他のトランスジェニック哺乳類も使用することができ、ラット及びマウスが好ましい。VHHまたはVH機能断片を含む重鎖のみ抗体はまた、組換えDNA技術によって、例えば哺乳類細胞(例えば、CHO細胞)、E. coliまたは酵母を含む適切な真核生物または原核生物宿主内でコード化核酸を発現させることによって産生することができる。

【0189】

重鎖のみ抗体のドメインは、抗体と小分子薬の利点を兼ね備えており、一価または多価で有り得、毒性が低く、製造に対して費用効果がある。サイズが小さいため、これらのドメインは経口投与または局所投与を含めて投与が容易であり、胃腸の安定性を含む高い安定性を特徴とし、そして、それらの半減期は、所望の用途または効能に合わせて調整することができる。さらに、HCAbのVH及びVHHドメインは、費用効果の高い方法で製造することができる。

【0190】

特定の実施形態では、UniAbs (商標)を含む本発明の重鎖抗体は、FR4領域の第1の位置(Kabatナンバリング方式によるアミノ酸位置101)の天然アミノ酸残基が別のアミノ酸残基に置換されており、これにより、その位置の天然アミノ酸残基を含むか、またはそれに関連する表面に露出した疎水性パッチが破壊され得る。そのような疎水性パッチは、通常、抗体の軽鎖定常領域との界面に埋もれるが、HCAbでは表面に露出し、少なくとも部分的に、HCAbの望ましくない凝集と軽鎖の会合に用いられる。置換アミノ酸残基は、好ましくは荷電しており、より好ましくは、リジン(Lys, K)、アルギニン(Arg, R)またはヒスチジン(His, H)、好ましくはアルギニン(R)など、正に荷電している。好ましい実施形態では、トランスジェニック動物に由来する重鎖のみ抗体は、位置101にTrpからArgへの変異を含む。得られるHCAbは、好ましくは、凝集のない生理学的条件下で高い抗原結合親和性及び溶解性を有する。

【0191】

本発明の一部として、ELISAタンパク質及び細胞結合アッセイにおいてヒトCD3、BCMA、PSMA、またはCD19に結合する、UniRat (商標)動物由来の固有の配列を有するヒト重鎖抗体(UniAb (商標))を同定した。同定した重鎖可変領域(VH)配列(例えば、表1及び表2を参照のこと)は、タンパク質結合及び/または標的タンパク質(例えば、CD3、BCMA、PSMA、またはCD19)を発現する細胞への結合について陽性であり、標的タンパク質を発現しない細胞への結合についてはすべて陰性である。

【0192】

標的タンパク質上の重複しないエピトープに結合する重鎖抗体、例えば、UniAbs (商標)は、酵素結合免疫測定法(ELISAアッセイ)またはフローサイトメトリー競合結合アッセイなどの競合結合アッセイによって同定することができる。例えば、標的抗原に結合する既知の抗体と目的の抗体との間の競合を使用することができる。このアプロ

10

20

30

40

50

ーチを使用することにより、抗体のセットを、参照抗体と競合するものと競合しないものに分類することができる。非競合抗体は、参照抗体が結合するエピトープと重複しない別個のエピトープに結合するものとして同定される。多くの場合、1つの抗体を固定化し、抗原を結合させ、第2の標識された（例えば、ビオチン化された）抗体を、捕捉された抗原への結合能力についてELISAアッセイで試験する。これは、Protein XPR36（BioRad, Inc）、Biacore 2000及びBiacore T200（GE Healthcare Life Sciences）、及びMX96 SPRイメージャー（Ibis Technologies B.V.）などの表面プラズモン共鳴（SPR）プラットフォーム、ならびにOctet Red384及びOctet HTX（ForteBio, Pall Inc）などのバイオレイヤー干渉法プラットフォームを使用して実行することもできる。詳細については、本明細書の実施例を参照されたい。

10

【0193】

一般的には、抗体が、上記の競合結合アッセイなどの標準的な技術によって測定される、標的抗原への参照抗体の結合において約15～100%の減少を引き起こす場合、その抗体は参照抗体と「競合」する。様々な実施形態において、相対的阻害は、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%またはそれ以上である。

20

【0194】

医薬組成物、使用及び治療方法

適切な薬学的に許容される担体と混合させた本発明の1つ以上の多重特異性結合化合物を含む医薬組成物を提供することは、本発明の別の態様である。本明細書中で使用する薬学的に許容される担体は、アジュバント、固体担体、水、緩衝液、もしくは治療成分を保持するために当技術分野で使用される他の担体、またはそれらの組み合わせが例示されるが、これらに限定されない。

【0195】

一実施形態では、医薬組成物は、標的タンパク質（例えば、CD3、BCMA、PSMA、またはCD19）に結合する重鎖抗体（例えば、UniAb（商標））を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、標的タンパク質（例えば、CD3、BCMA、PSMA、またはCD19）上の2つ以上の重複しないエピトープに対する結合特異性を有する多重特異性（二重特異性を含む）重鎖抗体（例えば、UniAb（商標））を含む。好ましい実施形態では、医薬組成物は、標的タンパク質（例えば、CD3、BCMA、PSMA、またはCD19）への結合特異性及びエフェクター細胞上の結合標的（例えば、T細胞上の結合標的、例えば、T細胞上のCD3タンパク質）への結合特異性を有する多重特異性（二重特異性を含む）重鎖抗体（例えば、UniAb（商標））を含む。

30

【0196】

本発明に従って使用される抗体の医薬組成物は、所望の純度を有するタンパク質を任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することによって、例えば、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、貯蔵用に調製される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)を参照のこと）。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用する用量及び濃度においてレシピエントに対して非毒性であり、これには、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤、防腐剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール、メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾールなど）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロ

40

50

ブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなどのアミノ酸、単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、ショ糖、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）、及び／またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が含まれる。

【0197】

経口投与用の医薬組成物は、好ましくは無菌であり、実質的に等張であり、優良医薬品製造基準（GMP）条件下で製造される。医薬組成物は、単位剤形（すなわち、単回投与の用量）で提供することができる。製剤化は、選択した投与経路に依存する。本明細書の抗体は、静脈内への注射もしくは注入によって投与するか、または皮下投与することができる。注射による投与の場合、本明細書の抗体を、水溶液中に、好ましくは生理学的に適合性のある緩衝液中に製剤化して、注射部位の不快感を軽減することができる。溶液は、上記のように、担体、賦形剤、または安定剤を含有し得る。あるいは、抗体を、使用前に、適切なビヒクル、例えば、無菌のピロジェンフリー水を用いて構成するために、凍結乾燥形態とすることができる。

10

【0198】

抗体製剤は、例えば、米国特許第9,034,324号に開示されている。同様の製剤を、本発明のUniaBs（商標）を含む重鎖抗体に使用することができる。皮下抗体製剤は、例えば、US20160355591及びUS20160166689に記載されている。

20

【0199】

使用方法

本明細書に記載の重鎖のみ抗体、多重特異性抗体、及び医薬組成物は、限定されないが、本明細書にさらに記載する病態及び疾患を含む、標的タンパク質（例えば、CD3、BCMA、PSMA、またはCD19）の発現を特徴とする疾患及び病態の治療に使用することができる。

【0200】

抗BCMA抗体を含む本明細書の医薬組成物は、B細胞及び形質細胞悪性腫瘍ならびにBCMAの発現または過剰発現を特徴とする自己免疫疾患を含むB細胞関連疾患の治療に使用することができる。

30

【0201】

そのようなB細胞関連障害として、限定されないが、形質細胞腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、小型非分割細胞リンパ腫、地域性バーキットリンパ腫、散発性バーキットリンパ腫、辺縁帯リンパ腫、結節外粘膜関連リンパ組織リンパ腫、結節性単球様B細胞リンパ腫、脾臓リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、大細胞リンパ腫、びまん性混合細胞型リンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫、肺B細胞血管中心性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、悪性の可能性のあるB細胞増殖、リンパ腫様肉芽腫症、移植後リンパ増殖性障害、免疫調節障害、関節リウマチ、重症筋無力症、特発性血小板減少性紫斑病、抗リン脂質症候群、シャーガス病、グレーブ病、ウェゲナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、シェーグレン症候群、尋常性天疱瘡、強皮症、多発性硬化症、抗リン脂質症候群、ANCA関連血管炎、グッドパスチャー病、川崎病、自己免疫性溶血性貧血、及び急速進行性糸球体腎炎、重鎖疾患、原発性もしくは免疫細胞関連アミロイドーシス、または単クローン性免疫グロブリン血症を含むB細胞及び形質細胞悪性腫瘍ならびに自己免疫疾患が挙げられる。

40

【0202】

BCMAの発現を特徴とする形質細胞障害として、多発性骨髄腫（MM）が挙げられる。MMは、骨髄コンパートメントにおける異常な形質細胞の単クローン性の増殖及び蓄積を特徴とするB細胞性悪性腫瘍である。MMの現在の治療法は、多くの場合、寛解を引き

50

起こすが、ほぼすべての患者が最終的に再発して死亡する。同種造血幹細胞移植の設定では、骨髄腫細胞が免疫を介して除去されるという実質的なエビデンスが存在するが；ただし、このアプローチの毒性は高く、治癒する患者はほとんどいない。一部のモノクローナル抗体は、前臨床研究及び初期の臨床試験でMMの治療に有望であることが示されているが、MMに対するモノクローナル抗体療法の一貫した臨床的有効性は最終的に証明されていない。したがって、MMの免疫療法を含む新規療法が大いに必要とされている（例えば、Carpenter et al., Clin Cancer Res 2013, 19 (8) : 2048-2060を参照のこと）。

【0203】

増殖誘導リガンドであるAPRILによるBCMAの過剰発現または活性化は、in vivoでヒト多発性骨髄腫（MM）の進行を促進することが知られている。BCMAはまた、マウスでp53変異を有する異種移植MM細胞のin vivo増殖を促進することも示されている。APRIL／BCMA経路の活性は、腫瘍細胞とそれらをサポートする骨髄微小環境との間の双方向の相互作用を介してMMの病因と薬剤耐性において中心的な役割を果たしているため、BCMAは、MMの治療標的として同定されている。さらなる詳細については、例えば、Yu-Tsu Tai et al., Blood 2016 ; 127 (25) : 3225-3236を参照のこと。

【0204】

形質細胞、すなわちBCMAを発現していることが関与する別のB細胞障害は、狼瘡としても知られる全身性エリテマトーデス（SLE）である。SLEは、全身性の自己免疫疾患で、身体のある部分に影響を与える可能性があり、典型的には、免疫系が身体自身の細胞や組織を攻撃し、慢性的な炎症や組織損傷を引き起こす。これは、抗体－免疫複合体が沈殿し、さらなる免疫応答を引き起こすIII型過敏反応である（Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010 ; 6 : 326-337）。

【0205】

本発明の抗BCMA重鎖のみ抗体（UniAb）は、上記で挙げたものなど、BCMAの発現を特徴とするMM、SLE、及び他のB細胞障害または形質細胞障害の治療のための治療薬を開発するために使用することができる。特に、本発明の抗BCMA重鎖のみ抗体（UniAb）は、単独で、または他のMM治療と併用してMMを治療するための候補である。

【0206】

PSMAは、前立腺上皮組織に発現し、前立腺癌及び固形腫瘍の新生血管系で上方制御されるII型膜貫通タンパク質である。また、脳、腎臓、唾液腺などの健康な組織でも低レベルで発現するが、悪性前立腺組織での過剰発現は、前立腺癌の治療的処置の魅力的な標的となる。また、悪性新生血管系での発現が高いことから、固形腫瘍の治療または画像診断にも適し得る。PSMAを標的とするモノクローナル抗体、抗体薬物複合体、及びキメラ抗原受容体T細胞は、転移性前立腺癌の治療に関して記載されている（Hernandez-Hoyos et al 2016, PMID: 27406985、DiPippo et al 2014, PMID: 25327986、Serganova et al 2016, PMID: 28345023）。さらに、PSMAに特異的な放射性核種複合体が、前立腺癌の画像化及び治療のために調査されているところである（例えば、Hofman et al., 2018 PMID: 29752180）。

【0207】

一態様では、本明細書のPSMA重鎖抗体（例えば、UniAbs（商標））及び医薬組成物を使用して、限定されないが、前立腺癌及び固形腫瘍を含む、PSMAの発現を特徴とする障害を治療することができる。

【0208】

CD19は、すべてのヒトB細胞に発現する細胞表面受容体であるが、形質細胞には認められない。CD19は、比較的大きな240アミノ酸の細胞質尾部を有する。細胞外Ig様ドメインは、潜在的なジスルフィド結合非Ig様ドメイン及びN結合炭水化物付加部

10

20

30

40

50

位によって分けられる。細胞質尾部は、C末端付近に少なくとも9つのチロシン残基を含み、その一部はリン酸化されていることが示されている。CD20及びCD22に加えて、CD19の発現がB細胞系統に限定されていることから、CD19は、B細胞悪性腫瘍の治療処置に関して魅力的な標的となる。CD19は、多くの血液悪性腫瘍で発現が観察されているため、抗体ベースの治療法の有望な標的である。

【0209】

一態様では、本明細書のCD19重鎖抗体（例えば、UniAbs（商標））及び医薬組成物を使用して、限定されないが、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、非ホジキンリンパ腫、B細胞慢性リンパ性白血病（CLL）、及びB細胞急性リンパ芽球性白血病（ALL）を含む、CD19の発現を特徴とする血液悪性腫瘍を治療することができる。

10

【0210】

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCLまたはDLBL）は、成人における非ホジキンリンパ腫の最も一般的な形態であり（Blood 1997 89（11）：3909－18）、推定年間発症率は、米国と英国において年間100,000人あたり7～8例である。それは、実質的に体のあらゆる部分に発生する可能性がある進行性のがんとして特徴付けられる。DLBCLの原因は十分に解明されておらず、正常なB細胞だけでなく、他のタイプのリンパ腫または白血病細胞の悪性形質転換からも発生し得る。治療アプローチには、一般に化学療法と放射線療法が含まれ、成人の全体的な5年生存率の平均は約58%である。一部のモノクローナル抗体は、DLBCLの治療に有望であることが示されているが、一貫した臨床的有効性はまだ最終的に証明されていない。したがって、免疫療法を含むDLBCLの新規治療法が大いに必要とされている。

20

【0211】

別の態様では、本明細書のCD19重鎖抗体（例えば、UniAbs（商標））及び医薬組成物を使用して、限定されないが、全身性エリテマトーデス（SLE）、関節リウマチ（RA）、及び多発性硬化症（MS）を含む、CD19を発現する病原性B細胞によって特徴付けられる自己免疫障害を治療することができる。

【0212】

疾患を治療するための本発明の組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状态、患者がヒトであるか動物であるか、投与する他の薬剤、及び処置が予防的なものであるか治療的なものであるかを含む多くの異なる要因によって様々に異なる。通常、患者は、ヒトであるが、非ヒト哺乳類、例えば、イヌ、ネコ、ウマなどの伴侶動物や、例えば、ウサギ、マウス、ラットなどの実験用哺乳類などもまた、処置され得る。処置用量を漸増させて、安全性及び有効性を最適化することができる。

30

【0213】

用量レベルは、当業者によって容易に決定され得るが、必要に応じて、例えば、治療への対象の応答を変化させる必要に応じて、変化させることができる。単一剤形を製造するために担体物質と組み合わせることができる活性成分の量は、治療する宿主及び特定の投与様式に応じて異なる。一般的に、単位剤形は、約1mg～約500mgの活性成分を含む。

40

【0214】

いくつかの実施形態では、薬剤の治療用量は、宿主の体重の約0.0001～100mg/kg、より一般的には、0.01～5mg/kgの範囲であり得る。例えば、用量は、1mg/kg体重もしくは10mg/kg体重または1～10mg/kgの範囲内で有り得る。例示的な治療計画は、2週間に1回もしくは1か月に1回または3～6か月に1回の投与を伴う。本発明の治療物質は、通常、複数回投与される。単回投与の間隔は、毎週、毎月または毎年とすることができる。間隔はまた、患者における治療物質の血中レベルを測定することによって指定されるように、不定期とすることもできる。あるいは、本発明の治療物質を徐放性製剤として投与することができ、その場合、あまり頻繁な投与を必要としない。用量と頻度は、患者におけるポリペプチドの半減期に依存して様々に異な

50

る。

【0215】

一般的に、組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかの注射剤として調製され、注射前に液体ビヒクル中に溶解または懸濁するのに適した固体形態もまた、調製することができる。本明細書の医薬組成物は、直接の、または固体（例えば、凍結乾燥）組成物の再構成後の静脈内または皮下投与に適している。製剤はまた、上記のように、アジュバント効果を増強するために、リポソーム、またはポリラクチド、ポリグリコリド、もしくはコポリマーなどの微粒子に乳化またはカプセル化することができる。Langer, Science 249:1527, 1990及びHanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119, 1997。本発明の薬剤は、活性成分の徐放またはパルス放出を可能にするような方法で製剤化することが可能な、デポー注射またはインプラント製剤の形態で投与することができる。医薬組成物は、一般的に、無菌で、実質的に等張であり、米国食品医薬品局のすべての優良医薬品製造基準（GMP）の規制に完全に準拠して製剤化される。

【0216】

本明細書に記載の抗体及び抗体構造の毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって、例えば、LD50（集団の50%に対する致死用量）またはLD100（集団の100%に対する致死用量）を測定することによって決定することができる。毒性と治療効果との間の用量比が、治療指数である。これらの細胞培養アッセイ及び動物実験から得られるデータは、ヒトでの使用に毒性のない用量範囲を策定する際に用いることができる。本明細書に記載の抗体の用量は、好ましくは、毒性がほとんどまたは全くない有効用量を含む循環濃度の範囲内にある。用量は、用いる剤形及び利用する投与経路に応じて、この範囲内で様々に異なり得る。正確な製剤化、投与経路、及び用量は、患者の状態を考慮して個々の医師が選択することができる。

【0217】

投与用の組成物は、一般的に、薬学的に許容される担体、好ましくは水性担体に溶解した抗体または他の薬剤（例えば、別の削磨剤）を含むであろう。様々な水性担体、例えば、緩衝生理食塩水などを使用することができる。これらの溶液は無菌であり、一般的に望ましくない物質を含まない。これらの組成物を、従来の周知の滅菌技法によって無菌化してもよい。組成物は、生理的条件に近づけるために必要とされるような薬学的に許容される補助物質（pH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなど）を含有し得る。これらの製剤中の活性薬剤の濃度は大きく変動し得、選択された特定の投与様式及び患者のニーズに従って、主に液量、粘度、体重などに基づいて選択される（例えば、Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) 及び Goodman & Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)）。

【0218】

本発明の活性薬剤及びその製剤ならびに使用のための指示書を含むキットもまた、本発明の範囲内である。キットはさらに、少なくとも1つの追加の試薬、例えば化学療法薬などを含み得る。キットは通常、キットの内容物の使用目的を示すラベルを含む。本明細書中で使用する用語「ラベル」には、キット上にもしくはキットと共に供給されるか、または他の方法でキットに付随する、あらゆる書面または記録物が含まれる。

【0219】

ここで十分に説明されている本発明は、本発明の趣旨または範囲から逸脱することなく、様々な変更及び修正を行い得ることが当業者に明らかとなるであろう。

【実施例】

【0220】

実施例1：ヘテロ二量体の形成

非還元及び還元 SDS-PAGE 分析によってヘテロ二量体形成を分析し、ヒンジ及び Fc 領域における様々な変異、及びノブインホール変異を含む本発明の実施形態による抗体が、首尾よく発現し、所望のヘテロ二量体の組み合わせに組み立てられ得るかどうかを判定した。これを試験するために、抗体構築物を組換え CHO 細胞培養で発現させた。次いで、回収した細胞培養液をプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーで精製し、産生された様々な抗体断片を分析した。次いで、プロテイン A 溶出プールを還元及び非還元ゲルで分析して、異なる種を可視化した。

【0221】

これらの分析の結果を、図 2 のパネル A 及び B、図 3 のパネル A 及び B、ならびに図 24 に示し、ノブインホール変異を含む抗体種のヘテロ二量体形成のパーセンテージが、これに加えて重鎖配列にエフェクター機能サイレンシング変異 (F234A、L235A) 及び Fab アーム交換防止変異 (S228P) が存在する場合であっても、優れていることを示している。図 25 に示すように、精製された CD19 構築物を評価して、高分子量 (HMW) 及び低分子量 (LMW) 種のパーセンテージ、ならびに単量体のパーセンテージを分析した。

【0222】

実施例 2：バイオレイヤー干渉法 (BLI) による Fcγ 受容体結合

Fcγ 受容体-IgG 相互作用を、Ni-NTA バイオセンサー (FortéBio) を使用して Octet プラットフォームで分析した。Ni-NTA バイオセンサーには、ニッケル (Ni²⁺) を充填した QIAGEN の Tris-NTA が先端に固定化されている。Ni-NTA は、組換えタンパク質に結合させた HIS タグに結合する。このフォーマットでは、Fcγ 受容体タンパク質をリガンドとしてバイオセンサーにロードし、続いて IgG と結合させる。本発明の実施形態による抗体を調査して、それらの Fc 領域と、バイオセンサー上に固定化された Fcγ 受容体タンパク質との間の相互作用の程度を分析した。

【0223】

ここで、Fcγ 受容体は、ヒト Fcγ 受容体 I / CD64 (Acro Biosystems) であった。試験した抗体濃度には、100 nM から 1.6 nM までの 2 倍連続希釈系列が含まれていた。これらの研究の結果を、図 4 のパネル A ~ D、図 5 のパネル A ~ E、図 6 のパネル A ~ D、図 7 のパネル A ~ E、及び図 26 のパネル A ~ D に示し、結果は、ノブインホール変異及び Fab アーム交換変異が Fc 領域に存在する場合であっても、サイレンシングされた Fc 受容体抗体のヒト FcγR1 への結合が有意に抑制されることを示している。

【0224】

具体的には、図 4 のパネル A は、KiH 変異またはサイレンシング変異を含まない二重特異性 CD3 × BCMA (一価) IgG1 抗体の結果を示す。データは、抗体が、バイオセンサーに固定化された Fcγ 受容体と相互作用することを示している。図 4 のパネル B は、パネル A で使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、CH2 ドメインにサイレンシング変異が含まれる。これらの結果は、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上の Fcγ 受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。図 4 のパネル C は、KiH 変異を含むがサイレンシング変異を含まない二重特異性 CD3 × BCMA (一価) IgG1 抗体の結果を示す。これらのデータは、パネル A の抗体で観察されたものと非常に類似した方法で、抗体が、バイオセンサー上に固定化された Fcγ 受容体と相互作用することを示している。図 4 のパネル D は、パネル C で使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、CH2 ドメインにサイレンシング変異が含まれる。これらの結果は、KiH 変異が含まれている場合でも、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上の Fcγ 受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。

【0225】

図 5 のパネル A は、KiH 変異またはサイレンシング変異を含まないが、Fab アーム

交換を防ぐためのS 2 2 8 P変異を含む、二重特異性C D 3 × B C M A（一価）I g G 4抗体の結果を示す。データは、抗体が、バイオセンサーに固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図5のパネルBは、パネルAで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、C H 2ドメインにサイレンシング変異（F 2 3 4 A、L 2 3 5 A）が含まれる。これらの結果は、S 2 2 8 P変異が存在する場合であっても、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。図5のパネルCは、K i H変異及びS 2 2 8 P変異を含むがサイレンシング変異を含まない、二重特異性C D 3 × B C M A（一価）I g G 4抗体の結果を示す。これらのデータは、パネルAの抗体で観察されたものと非常に類似した方法で、抗体がバイオセンサー上に固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図5のパネルDは、パネルCで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、S 2 2 8 P及びK i H変異に加えて、C H 2ドメインにサイレンシング変異（F 2 3 4 A、L 2 3 5 A）を含む。これらの結果は、S 2 2 8 P及びK i H変異が含まれている場合であっても、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。パネルEは、S 2 2 8 P変異、サイレンシング変異F 2 3 4 A及びL 2 3 5 A、ならびにC H 3ドメインのK i H変異を含む二重特異性C D 3 × B C M A（二価）I g G 4抗体の結果を示している。これらのデータは、S 2 2 8 P及びK i H変異が存在する場合であっても、この抗体とバイオセンサーに固定化したF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少したことを示している。

【0 2 2 6】

図6のパネルAは、K i H変異またはサイレンシング変異を含まない二重特異性C D 3 × P S M A（一価）I g G 1抗体の結果を示す。データは、抗体がバイオセンサーに固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図6のパネルBは、パネルAで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、C H 2ドメインにサイレンシング変異が含まれる。これらの結果は、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。図6のパネルCは、K i H変異を含むがサイレンシング変異を含まない二重特異性C D 3 × P S M A（一価）I g G 1抗体の結果を示す。これらのデータは、パネルAの抗体で観察されたものと非常に類似した方法で、抗体が、バイオセンサー上に固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図6のパネルDは、パネルCで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、C H 2ドメインにサイレンシング変異が含まれる。これらの結果は、K i H変異が含まれている場合であっても、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。

【0 2 2 7】

図7のパネルAは、K i H変異またはサイレンシング変異を含まないが、F a bアーム交換を防ぐためのS 2 2 8 P変異を含む、二重特異性C D 3 × P S M A（一価）I g G 4抗体の結果を示す。データは、抗体がバイオセンサーに固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図7のパネルBは、パネルAで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、C H 2ドメインにサイレンシング変異（F 2 3 4 A、L 2 3 5 A）が含まれる。これらの結果は、S 2 2 8 P変異が存在する場合であっても、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。図7のパネルCは、K i H変異及びS 2 2 8 P変異を含むがサイレンシング変異を含まない、二重特異性C D 3 × P S M A（一価）I g G 4抗体の結果を示す。これらのデータは、パネルAの抗体で観察されたものと非常に類似した方法で、抗体がバイオセンサー上に固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図7のパネルDは、パネルCで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、S 2 2 8 P及びK i H変異に加えて、C H 2ドメインにサイレンシング変異（F 2 3 4 A、L 2 3 5 A）が含まれる。これらの結果は、S 2 2 8 P及び

K i H変異が含まれている場合であっても、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。パネルEは、S 2 2 8 P変異、サイレンシング変異F 2 3 4 A及びL 2 3 5 A、ならびにC H 3ドメインにK i H変異を含む二重特異性C D 3 × P S M A（二価）I g G 4抗体の結果を示す。これらのデータは、S 2 2 8 P及びK i H変異が存在する場合であっても、この抗体とバイオセンサーに固定化されたF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少したことを示している。

【0228】

図26のパネルAは、K i H変異またはサイレンシング変異を含まないが、F a bアーム交換を防ぐためのS 2 2 8 P変異を含む、二重特異性C D 3 × C D 1 9（一価）I g G 4抗体の結果を示す。データは、抗体がバイオセンサーに固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図26のパネルBは、パネルAで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、C H 2ドメインにサイレンシング変異（F 2 3 4 A、L 2 3 5 A）が含まれる。これらの結果は、S 2 2 8 P変異が存在する場合であっても、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。図26のパネルCは、K i H変異及びS 2 2 8 P変異を含むがサイレンシング変異を含まない、二重特異性C D 3 × C D 1 9（一価）I g G 4抗体の結果を示す。これらのデータは、パネルAの抗体で観察されたものと非常に類似した方法で、抗体がバイオセンサー上に固定化されたF c γ受容体と相互作用することを示している。図26のパネルDは、パネルCで使用した抗体と同じ二重特異性抗体の結果を示すが、こちらでは、S 2 2 8 P及びK i H変異に加えて、C H 2ドメインにサイレンシング変異（F 2 3 4 A、L 2 3 5 A）が含まれる。これらの結果は、S 2 2 8 P及びK i H変異が含まれている場合であっても、サイレンシング変異の存在により、抗体とバイオセンサー上のF c γ受容体との間の相互作用が有意に減少することを示している。

【0229】

まとめると、図4、5、6、7、及び26に示すデータは、二重特異性抗体のV H領域配列が、本明細書に記載のI g G 4 F c変異の機能特性に影響を及ぼさないことを示している。したがって、本明細書に記載のI g G 4 F c修飾（S 2 2 8 P；F 2 3 4 A、L 2 3 5 A；T 3 6 6 W、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及びY 4 0 7 V）を、異なるV H配列（すなわち、異なる結合標的）を有する抗体において実施し、F a bアーム交換の減少（S 2 2 8 P）、エフェクター機能活性の低下（F 2 3 4 A、L 2 3 5 A）、及び適切なヘテロ二量体化（T 3 6 6 W；T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及びY 4 0 7 V）を達成することができる。

【0230】

実施例3：抗P S M A U n i A b s（商標）によるP S M A陽性及び陰性細胞への結合のフローサイトメトリー分析

ヒトP S M AまたはD U - 1 4 5細胞株（A T C C H T B - 8 1）を発現するように安定的に形質移入されたL N C a P細胞株（A T C C : C R L - 1 7 4 0）、2 2 R v 1細胞株（A T C C C R L - 2 5 0 5）、P C 3細胞株（A T C C C R L - 1 4 3 5）を使用したフローサイトメトリー（G u a v a e a s y C y t e 8 H T, E M D M i l l i p o r e）によって、P S M A陽性細胞への結合を評価した。簡潔に述べると、5 0, 0 0 0個の標的細胞を、精製U n i A b s（商標）の希釈系列で、4℃にて3 0分間染色した。インキュベーション後、細胞をフローサイトメトリー緩衝液（1×P B S、1% B S A、0. 1% N a N 3）で2回洗浄し、R - フィコエリトリン（P E）と複合体化したヤギF（a b'）₂抗ヒトI g Gで染色して（S o u t h e r n B i o t e c h、カタログ番号2 0 4 2 - 0 9）、細胞に結合した抗体を検出した。4℃で2 0分間インキュベートした後、細胞をフローサイトメトリー緩衝液で2回洗浄し、平均蛍光強度（M F I）をフローサイトメトリーで測定した。二次抗体のみで染色された細胞のM F Iをバックグラウンドシグナルの測定に使用し、各抗体の結合をバックグラウンドの倍数に変換した。

カニクイザル P S M A 陽性細胞への結合を、以下の変更を加えた同じプロトコルを使用して測定した：標的細胞は、カニクイザル P S M A の細胞外ドメインを発現するように一過性に形質移入した F r e e s t y l e 2 9 3 - F 細胞 (T h e r m o F i s h e r R 7 9 0 0 7) 由来の細胞であった。いくつかの実験では、E C 5 0 値を、G r a p h P a d P r i s m 7 を使用して計算した。

【 0 2 3 1 】

表 8 は、本明細書に記載の抗 P S M A 重鎖抗体 (H C A b) の標的結合活性をまとめたものである。列 1 は、H C A b のクローン I D を示す。列 2 は、バックグラウンド M F I シグナルの倍数として測定された L N C a P 細胞への結合を示す。

【表 8】

表 8 : P S M A 発現細胞株への結合

列1: クローンID	列2: LNCaP
325920	282
346181	264
346165	243
346172	216
326109	25
325867	210
325742	200
325748	193
325940	169
325836	163
326027	138
326087	129
326084	125
326028	117
345497	112
326029	109
345461	102
345493	101
345436	87
345443	84
345490	80
345482	80
345485	71
345463	68
325932	64
345505	59
345508	55
345480	47
326116	38
345509	37
345444	23
345421	22
345447	14
345510	13
345438	13

【 0 2 3 2 】

図 8 のパネル A 及び B に示すように、カニクイザル P S M A への結合の差異は、H C A b 3 4 6 1 8 1 及び 3 4 5 4 9 7 によって認識されるヒト P S M A エピトープの違いを裏

10

20

30

40

50

付けている。

【0233】

実施例4：バイパルトピック及び二価抗PSMA抗体の組成

表9に示すように、抗PSMAクローンID350123は、架橋配列GGGGSGGGGGG（配列番号71）でクローンID345497配列に連結されたクローンID346181配列からなる。クローンID350122は、同じリンカー配列によって連結されたクローンID346181の2つの繰り返しからなる。クローンID350123は、PSMA上の異なるエピトープを認識する2つの抗PSMAドメインからなるため、バイパルトピックである。クローンID350122は二価であるが、同じ抗PSMAドメインのタンデムからなるため、バイパルトピックではない。様々な三本鎖抗体様分子（TCA）の模式図を図1のパネルA～Cに示す。

【表9】

表9：バイパルトピック及び二価抗PSMA抗体のアミノ酸配列の概要

クローンID	配列1	リンカー配列	配列2
350123	346181	GGGGSGGGGS (配列番号71)	345497
350122	346181	GGGGSGGGGS (配列番号71)	346181

【0234】

実施例5：

T細胞リダイレクトによるPSMA陽性前立腺腫瘍細胞の多重特異性抗体媒介性細胞死滅休止T細胞を使用したアッセイ

標的細胞を96ウェルプレートにウェルあたり15,000細胞で播種し、37℃で一晩増殖させた。インキュベーション後、休止状態のヒトT細胞と一緒に、多量の多重特異性抗体を、エフェクター細胞と標的細胞の比率10：1で添加し、37℃でさらに48時間または72時間インキュベートした（LNCaP、MDA-PCa-2b及びPC3-PSMA細胞でのアッセイでは48時間、22Rv1細胞でのアッセイでは72時間）。細胞増殖試薬WST-1（Sigmaカタログ番号：11644807001）またはフローサイトメトリーのいずれかを使用して細胞死を測定した。いくつかの実験では、インキュベーション後、ただし標的細胞の生存率の分析より前に、各上清の少量の試料を回収し、サイトカイン産生の分析用に保存した。細胞生存率をWST-1試薬で分析した場合、試薬ストックを各ウェルに1：10希釈で添加し、37℃で90分間インキュベートした。次いで、450nm（参照690nm）で吸光度を測定し、特異的溶解率（%）を計算した。

【0235】

標的細胞の生存率をフローサイトメトリーで分析した場合は、次いで、標的細胞を標識した後、膜色素DiR（ThermoFisher D12731）でアッセイを開始した。T細胞及び抗体とのインキュベーション後、上清をサイトカイン分析のために保存するか、または廃棄した。次いで、ウェルを1回洗浄して、死んだ腫瘍細胞とT細胞を回収し、フローサイトメトリープレートに移した。残りの付着した腫瘍細胞をトリプシン処理し、次いでフローサイトメトリープレートの対応するウェルに加えた。アネキシンV試薬を使用して死細胞を染色し、フローサイトメトリーを実施して（BD FACSCelesta）、DiR染色によってゲーティングした各試料中の死んだ腫瘍細胞のパーセントを定量化した。未処理の標的細胞を含有するウェルを使用して、自発的な細胞死に対して正規化した。いくつかの実験では、PSMA×CD3多重特異性分子と同じCD3ターゲティングアームからなるが、腫瘍ターゲティングアームがHIVタンパク質gp120に特異的なVHに置換された陰性対照抗体を使用した。

【0236】

図9は、非刺激のT細胞を使用したPSMA陽性細胞のT細胞媒介性溶解を示す。非刺激のヒトT細胞を、PSMA発現細胞(LNCaP)及び様々な濃度の多重特異性抗体と共にインキュベートした。バイパラトピック抗PSMA×CD3抗体(350123×CD3)は、モノパラトピックPSMA×CD3抗体(346181×CD3)より優れていた。

【0237】

事前に活性化されたT細胞を使用したアッセイ

ヒト汎T細胞をプレート結合OKT3及びIL-2で3日間、事前活性化した後、新鮮なIL-2中でさらに1日インキュベートした。標的細胞をトリプシン処理し、Calcein-AM(ThermoFisher C3100MP)をロードし、活性化T細胞とE:T比率20:1で混合し、96ウェルプレートのウェルに添加した。異なる多重特異性抗体の希釈系列を加えた後、37℃で4時間インキュベートした。次いで、上清を黒色の96ウェルプレートに移し、吸光度を480nm/520nm ex/emで測定し、カルセインの放出を定量化した。T細胞の非存在下でインキュベートした標的細胞を使用して、インタクトな腫瘍細胞の自発的なカルセインの放出を正規化した。標的細胞を含有する対照ウェルへ2%Triton-Xを添加することにより、最大の細胞溶解に対応するカルセインシグナルを計算することができた。この値を使用して、各実験ウェルを、最大の細胞溶解に対するパーセントとして報告した。GraphPad prism 7を使用してデータ分析を実施した。

【0238】

図10は、事前に活性化されたT細胞を使用したPSMA陽性細胞のT細胞媒介性溶解を示す。事前に活性化されたヒトT細胞を、ヒトPSMA発現細胞(LNCaP)及び様々な濃度の多重特異性抗体と共にインキュベートした。腫瘍細胞死をカルセイン放出によって測定し、T細胞の非存在下での腫瘍細胞の自発的な放出に対して正規化した。バイパラトピック抗PSMA×CD3抗体(350123×CD3)は、両方のモノパラトピックPSMA×CD3抗体より優れていた。

【0239】

図11は、多重特異性抗体がPSMA陰性細胞を溶解しないことを示す。事前に活性化されたヒトT細胞を、PSMA陰性前立腺癌細胞(DU145)及び様々な濃度の多重特異性抗体と共にインキュベートした。試験した抗体のいずれによっても、これらの細胞の溶解は起こらなかった。

【0240】

図12は、PSMA陽性細胞及び陰性細胞へのPSMA×CD3多重特異性抗体の結合を示す。多重特異性抗PSMA×抗CD3抗体は、PSMA陽性前立腺腫瘍細胞(22Rv1)への結合を示すが、PSMA陰性前立腺腫瘍細胞(DU145)への結合は示さない。バイパラトピック分子(350123)は、最も強いオンターゲット細胞結合を示した。

【0241】

図13は、PSMA陽性細胞のT細胞媒介性溶解を示す。図13のデータは、2つの異なるエピトープを介したPSMAへの結合が、二価であるが単一特異性であるバージョンの抗体と比較して、細胞死滅を増加させることを示している。

【0242】

実施例6：モノパラトピックPSMA×CD3二重特異性抗体は、バイパラトピックPSMA×CD3多重特異性抗体に比べてサイトカイン産生を誘導しない

休止T細胞を用いた腫瘍細胞傷害性アッセイにおいて、サイトカイン産生を分析した。これらのアッセイの設計については、他の場所で詳しく説明されている。アッセイの完了時に上清を回収した(22Rv1細胞を使用したアッセイでは72時間のインキュベーション後、他のすべての細胞株では48時間後)。IL-2(Biolegend 431804)及びIFNγ(Biolegend 430104)を検出するために、ELI

10

20

30

40

50

S Aキットを製造元のプロトコルに従って使用した。サイトカインのレベルが各キットに付属の標準曲線の直線部分内に収まるように、E L I S A分析の前に試験上清を希釈した。いくつかの場合では、試験ウェル中でサイトカインを検出することができず、値がアッセイの定量下限以下であると報告された。

【0243】

図14（パネルA、B、及びC）は、P S M A陽性細胞のT細胞媒介性溶解、及びサイトカイン産生との比較を示す。多重特異性P S M A×C D 3抗体は、P S M A陽性前立腺癌細胞株L N C a PのT細胞媒介性溶解を誘導する。バイパラトピック分子（350123）は、モノパラトピック分子（346181）と比較して、腫瘍細胞の死滅をより強力に刺激したが、図14のパネルB及びCに示すように、サイトカインであるインターフェロンγ（I F N γ）及びインターロイキン2（I L - 2）のより高レベルの産生も引き起こした。

【0244】

表10は、4種のP S M A陽性前立腺腫瘍細胞株に対するT細胞媒介性溶解及びサイトカイン産生を示す。P S M A×C D 3多重特異性抗体を、非刺激のT細胞及び4種のP S M A陽性腫瘍細胞株パネルに対する一連の用量の抗体を使用したi n v i t r oでの腫瘍細胞の細胞傷害性アッセイで試験した。72時間（22Rv1）または48時間（M D A - P C a - 2 b、L N C A P、P C 3 - P S M A）後、腫瘍細胞死のパーセントを計算し、E C 5 0で記載し、達成された最高の死滅率も記載した。これらの試験ウェルから上清を回収し、サイトカインであるインターフェロンγ（I F N γ）またはインターロイキン-2（I L - 2）について、E L I S Aにより分析した。モノパラトピック分子（3461881）は、バイパラトピック分子と比較して、試験した4種の細胞株すべてに対してほぼ同等レベルの腫瘍細胞傷害性を誘発したが、サイトカイン産生のE C 5 0がより高く、ほとんどの場合で最大サイトカイン産生の刺激レベルは低かった。

【表10】

表10：4種のP S M A陽性前立腺腫瘍細胞株に対するT細胞媒介性溶解及びサイトカイン産生

細胞株	抗体	細胞結合 EC50 (nM)	最大細胞傷害性 (溶解(%))	細胞死滅 EC50 (nM)	最大IFNγ (pg/mL)	IFNγ EC50 (nM)	最大 IL-2 (pg/ml)	IL-2 EC50 (nM)
22Rv1	346181×CD3	58	45	52.8	21,150	173.8	≦LLOQ	該当せず
	350123×CD3	3	53	0.42	73,031	380.2	≦LLOQ	該当せず
MDA-PCa-2b	346181×CD3	28	26	23.6	14,309	116.5	524	38.5
	350123×CD3	2	29	0.41	12,026	0.90	1111	1.11
LNCAP	346181×CD3	17	79	14.6	32,237	63.0	183	575
	350123×CD3	2	75	0.84	60,397	3.29	1057	3.73
PC3-PSMA	346181×CD3	30	42	3.7	7,340	10.1	1569	4.1
	350123×CD3	6	51	0.40	10,136	1.01	3480	1.1

【0245】

実施例7：P S M A×C D 3多重特異性抗体はT細胞の増殖を誘導する

P S M A陽性腫瘍細胞を96ウェルプレートにウェルあたり25,000細胞で播種し、37℃で一晩増殖させた。休止P B M Cから分離されたヒト汎T細胞（M i l t e n y

i 130-096-535) を、製造元の説明書 (ThermoFisher C34554) に従って系統追跡色素 CFSE で標識した。次いで、100,000 個の標識された汎 T 細胞を、腫瘍細胞を含有するウェルに加え、続いて一連の抗体を希釈し、37℃、8% CO₂ でインキュベートした。5 日間のインキュベーション後、細胞を穏やかに混合し、フローサイトメトリープレートに移した。細胞をペレット化し、上清を除去した後、APC と複合体化した抗 CD8 (Biolegend 301049) 及び PE と複合体化した抗 CD4 (Biolegend 317410) により、氷上で 20 分間染色した。次いで、細胞を洗浄し、分析のためにフローサイトメトリー緩衝液 (BD FACSCelesta) に再懸濁した。細胞を、前方散乱及び側方散乱、ならびに CD4 発現または CD8 発現でゲーティングした。CD4 または CD8 陽性染色及び低または陰性 CFSE シグナルによって示されるように、増殖した T 細胞のパーセントを、T 細胞集団全体ならびに CD4 及び CD8 サブセットについて計算した。FlowJo を使用してフローサイトメトリーデータを分析し、GraphPad Prism 7 においてプロットした。【0246】

図 15 (パネル A、B、C、及び D) は、PSMA × CD3 多重特異性抗体が PSMA 陽性腫瘍細胞の存在下で T 細胞増殖を刺激し、モノパラトピック PSMA 二重特異性抗体が CD3 T 細胞を優先的に活性化することを示す。多重特異性抗体を、PSMA 発現腫瘍細胞及び系統追跡色素 CFSE で標識された T 細胞と一緒にインキュベートした。5 日間のインキュベーション後、T 細胞増殖及び増殖した T 細胞の組成 (CD8 + 対 CD4 +) をフローサイトメトリーによって分析した。パネル A 及び B は、T 細胞の総増殖を示しており、一方、パネル C 及び D は、増殖したウェルにおける CD8 + と CD4 + の T 細胞の比率を示している。水平の破線は、非刺激の T 細胞の CD8 : CD4 の比率を示しており、およそ 1 : 2 (実際の値 = 0.64) である。モノパラトピック PSMA × CD3 二重特異性抗体 (346181) は、CD8 T 細胞を優先的に活性化し (増殖後の CD8 : CD4 の比率はおよそ 2 : 1)、一方、バイパラトピック PSMA × CD3 多重特異性抗体 (350123) は、CD8 + T 細胞をあまり優先的に活性化しない (CD8 : CD4 の比率は約 1 : 1)。

【0247】

実施例 8 : 多重特異性抗体は、異種移植モデルにおいて前立腺腫瘍の成長を抑制する

5 ~ 6 週齢の雄免疫不全 CIEA-NOG マウス (Taconic) に対し、右下側腹部に 1,000 万個の 22Rv1 細胞を皮下移植し、腫瘍移植の 1 日後に尾静脈注射により 1,000 万個のヒト PBMC を加えた。この動物に対し、腫瘍移植の 1 日後に尾静脈注射により開始して、1、5、9、及び 13 日目に 100 µg の多重特異性抗体またはビヒクルを処置した。キャリパーを使用して腫瘍体積を定量化し、25 日間記録した。

【0248】

図 16 は、22Rv1 腫瘍異種移植モデルの結果を示す。バイパラトピック PSMA × CD3 分子 (350123) は、腫瘍異種移植モデルにおいて 22Rv1 腫瘍増殖の阻害を示した。各処置群について 3 匹のマウスを試験し、各動物の腫瘍体積の変化を、立法ミリメートルでプロットした。動物に腫瘍移植後 1 日目に PBMC を投与し、1、5、9、及び 13 日目に抗体で処置した。多重特異性抗体を処置した 3 匹の動物のうちの 2 匹が腫瘍進行の遅延を示した。

【0249】

実施例 9 : T 細胞活性化の分析

CD69 は、刺激により上方制御される T 細胞上の細胞表面マーカーであり、それによって T 細胞活性化の指標として機能する。本実験では、CD69 の活性化を 3 つの異なる条件下で評価した : 1) BCMA コーティングなしの全末梢血単核球 (PBMC) ; 2) BCMA コーティングした汎 T 細胞 ; 及び 3) BCMA コーティングなしの汎 T 細胞。Ficoll (密度 1.077 g/mL) を使用してバフィーコートから PBMC を分離し、凍結保存した PBMC を解凍し、10% FBS を添加した RPMI 1640 中、 2×10^6 細胞/mL で 37℃ にて 24 時間静置した。2 日目に、Miltenyi ネガティブ

セレクションキットを使用して休止P B M Cから汎T細胞を分離し、分離した細胞を、第2及び第3のアッセイ条件で使用した。第1のアッセイ条件では、P B M Cをカウントし、アッセイプレートに播種した。

【0250】

抗原コーティング条件下で評価した細胞について、96ウェルプレートを、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の組換えBCMAタンパク質（ヒトBCMAタンパク質、Fcタグ、Acro Biosystems、カタログ番号BC7-H5254）、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の組換えPSMAタンパク質（組換えヒトPSMA/FOLH1タンパク質、RND systems製、カタログ番号-4234-ZN-0101）、または $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度の組換えCD19タンパク質（ヒトCD19タンパク質、Hisタグ、Acro Biosystems、カタログ番号-CD9-H52H2）でコーティングした。最高用量を300nMとした、3倍希釈系列の12点用量曲線を用いて二重特異性抗体を分析した。二重特異性抗体とT細胞を、10%FBSを添加したRPMI1640に再懸濁し、18時間インキュベートした。汎T細胞はエフェクター細胞であり、これを100,000個の細胞/ウェルでプレーティングした。

10

【0251】

抗原コーティングなしの条件で評価した細胞について、二重特異性抗体を、3倍希釈系列による12点用量曲線を使用して細胞と共にインキュベートした。300nMの二重特異性抗体は、このアッセイで試験した最高濃度であった。試料を、10%FBSを添加したRPMI1640中、37℃にて18時間インキュベートした。P B M Cから分離した汎T細胞はエフェクター細胞であり、これを100,000個の細胞/ウェルでプレーティングした。

20

【0252】

すべての実験条件について、細胞を洗浄し、細胞表面T細胞抗体で標識した。以下の抗体（1）CD4陽性T細胞（FITC 抗ヒトCD4抗体）、（2）CD8陽性T細胞（PE 抗ヒトCD8a抗体）、（3）CD69活性化（Alexa Fluor 647 抗ヒトCD69抗体）（Biolegend）を使用して標識した。次いで、適切なテンプレートを使用してBD Celestaで細胞を分析し、CD69活性化を測定した。

【0253】

T細胞活性化研究の結果を以下の図：図17～18、図27のパネルA～B（BCMA抗原コーティングなし、P B M Cを使用）；図30のパネルA～B（PSMAコーティングなし）；及び図33のパネルA～B（CD19コーティングなし）に示す。

30

【0254】

図17は、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数としてCD4+CD69+T細胞（%）を示すグラフである。一般に、IgG1 Fc配列を含有する二重特異性抗体は、より低い濃度の二重特異性抗体でCD4+T細胞活性化を示した。IgG4 Fc配列を含む二重特異性抗体は、より高い濃度の二重特異性抗体でCD4+T細胞の活性化を示した。特に、PAA及びKiH変異を含むIgG4 Fc二重特異性抗体によって達成されるCD4+T細胞の活性化は低く、PAA及びKiH変異の導入により、これらの二重特異性抗体によるT細胞のBCMA非依存的活性化が減少することが示された。

40

【0255】

図18は、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数としてCD8+CD69+T細胞（%）を示すグラフである。CD4+T細胞の場合と同様に、IgG1 Fc配列を含む二重特異性抗体は、より低濃度の二重特異性抗体でCD8+T細胞の活性化を示した。IgG4 Fc配列を含む二重特異性抗体は、より高濃度の二重特異性抗体でCD8+T細胞の活性化を示した。特に、PAA及びKiH変異を含むIgG4 Fc二重特異性抗体によって達成されるCD8+T細胞の活性化は低く、PAA及びKiH変異の導入により、これらの二重特異性抗体によるT細胞のBCMA非依存的活性化が減少することが示された。

50

【0256】

図27のパネルAは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD4+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成されるCD4+T細胞活性化は、陰性対照(gp120、CD3(F2B))と同様であり、PAA及びKiH変異の導入により、これらの二重特異性抗体によるT細胞のBCMA非依存的活性化が減少することを示している。図27のパネルBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。CD4+T細胞の場合と同様に、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成されるCD8+T細胞の活性化は、陰性対照と同様であり、PAA及びKiH変異の導入により、これらの二重特異性抗体によるT細胞のBCMA非依存的活性化が減少することを示している。

10

【0257】

図30のパネルAは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD4+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成されるCD4+T細胞の活性化は、陰性対照(gp120、CD3(F2B))と同様であり、PAA及びKiH変異の導入が、これらの二重特異性抗体によるT細胞のPSMA非依存的活性化を減少させることを示している。図30のパネルBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。CD4+T細胞の場合と同様に、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成されるCD8+T細胞の活性化は、陰性対照と同様であり、PAA及びKiH変異の導入により、これらの二重特異性抗体によるT細胞のPSMA非依存的活性化が減少することを示している。

20

【0258】

図33のパネルAは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD4+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成されるCD4+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含まない他の抗体構築物から観察されたものよりもはるかに低く、PAA及びKiH変異の導入により、これらの二重特異性抗体によるT細胞のCD19非依存的活性化が減少することを示している。図33のパネルBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。CD4+T細胞の場合と同様に、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成されるCD8+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含まない他の抗体構築物から観察されたものよりもはるかに低く、PAA及びKiH変異の導入により、これらの二重特異性抗体によるT細胞のCD19非依存的活性化が減少することを示している。

30

【0259】

休止中のPBMCから分離した汎T細胞を用いた抗原コーティングありのCD8+T細胞活性化の結果を、図19、図28のパネルB、図31のパネルB、及び図34のパネルBに示す。休止PBMCから分離した汎T細胞を用いた抗原コーティングありのCD4+T細胞活性化の結果を、図28のパネルA、図31のパネルA、及び図34のパネルAに示す。BCMA及びPSMAの抗原コーティング濃度は1µg/mLであったが、CD19の抗原コーティング濃度は10µg/mLであった。

40

【0260】

図19は、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。BCMAコーティングなしの実験の場合とは異なり、すべての二重特異性抗体は、抗原コーティング細胞に対する二重特異性抗体と同様の濃度でCD8+T細胞の活性化を示した。特に、CD8+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成さ

50

れ、PAA及びKiH変異の導入が、これらの分子のCD8+T細胞活性化活性を排除しなかったことを示している。

【0261】

図28のパネルBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。BCMAコーティングなしの実験の場合とは異なり、すべての二重特異性抗体は、抗原コーティング細胞に対する二重特異性抗体と同様の濃度でCD8+T細胞の活性化を示した。特に、CD8+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成され、PAA及びKiH変異の導入がこれらの分子のCD8+T細胞活性化の活性を排除しなかったことを示している。

10

【0262】

図31のパネルBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。PSMAコーティングなしの実験の場合とは異なり、すべての二重特異性抗体は、抗原コーティング細胞に対する二重特異性抗体と同様の濃度でCD8+T細胞活性化を示した。特に、CD8+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成され、PAA及びKiH変異の導入がこれらの分子のCD8+T細胞活性化の活性を排除しなかったことを示している。

【0263】

図34のパネルBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。CD19コーティングなしの実験の場合とは異なり、すべての二重特異性抗体は、抗原コーティング細胞に対する二重特異性抗体と同様の濃度でCD8+T細胞活性化を示した。特に、CD8+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成され、PAA及びKiH変異の導入がこれらの分子のCD8+T細胞活性化の活性を排除しなかったことを示している。

20

【0264】

図28のパネルAは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD4+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。BCMAコーティングなしの実験の場合とは異なり、すべての二重特異性抗体は、抗原コーティング細胞に対する二重特異性抗体と同様の濃度でCD4+T細胞の活性化を示した。特に、CD4+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成され、PAA及びKiH変異の導入がこれらの分子のCD4+T細胞活性化の活性を排除しなかったことを示している。

30

【0265】

図31のパネルAは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD4+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。PSMAコーティングなしの実験の場合とは異なり、すべての二重特異性抗体は、抗原コーティング細胞に対する二重特異性抗体と同様の濃度でCD4+T細胞活性化を示した。特に、CD4+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成され、PAA及びKiH変異の導入がこれらの分子のCD4+T細胞活性化の活性を排除しなかったことを示している。

40

【0266】

図34のパネルAは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD4+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。CD19コーティングなしの実験の場合とは異なり、すべての二重特異性抗体は、抗原コーティング細胞に対する二重特異性抗体と同様の濃度でCD4+T細胞活性化を示した。特に、CD4+T細胞の活性化は、PAA及びKiH変異を含むIgG4Fc二重特異性抗体によって達成され、PAA及びKiH変異の導入がこれらの分子のCD4+T細胞活性化の活性を排除しなかったことを示している。

50

【0267】

休止PBM Cから分離した汎T細胞を用いた、抗原コーティングなしのCD8+T細胞活性化の結果を、図20、図29のパネルB、図32のパネルB、及び図35のパネルBに示す。休止PBM Cから分離した汎T細胞を用いた、抗原コーティングなしのCD4+T細胞活性化の結果を、図29のパネルA、図32のパネルA、及び図35のパネルAに示す。

【0268】

図20は、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、CD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。これらの結果は、CD8+T細胞におけるCD69活性化が、試験したすべての二重特異性抗体分子でBCMA依存性であることを示している。

10

【0269】

図29のパネルA及びBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、それぞれ、CD4+CD69+T細胞(%)及びCD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。これらの結果は、CD4+T細胞及びCD8+T細胞におけるCD69活性化が、試験したすべての二重特異性抗体分子でBCMA依存性であることを示している。CD69活性化は、サイレンシング変異を含まないより高濃度の二重特異性抗体構築物において、CD4+T細胞とCD8+T細胞の両方でわずかに増加していた。

20

【0270】

図32のパネルA及びBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、それぞれ、CD4+CD69+T細胞(%)及びCD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。これらの結果は、CD4+T細胞及びCD8+T細胞におけるCD69活性化が、試験したすべての二重特異性抗体分子でPSMA依存性であることを示している。

【0271】

図35のパネルA及びBは、凡例に示される二重特異性抗体構築物について、二重特異性抗体濃度の関数として、それぞれ、CD4+CD69+T細胞(%)及びCD8+CD69+T細胞(%)を示すグラフである。これらの結果は、CD4+T細胞及びCD8+T細胞におけるCD69活性化が、試験したすべての二重特異性抗体分子でCD19依存性であることを示している。CD69活性化は、サイレンシング変異を含まないより高濃度の二重特異性抗体構築物において、CD4+T細胞とCD8+T細胞の両方でわずかに増加していた。

30

【0272】

実施例10：腫瘍細胞の溶解

活性化された初代T細胞のリダイレクションを通じて、3つの異なるBCMA+腫瘍細胞及び1つのBCMA陰性細胞株を殺傷する能力について、抗CD3×抗BCMA二重特異性抗体をアッセイした。本実験では、二重特異性抗体の添加と共に、腫瘍細胞と活性化汎T細胞を10:1のE:T比で混合した。結果を図21のパネルA～Dに示す。パネルAは、RPMI-8226細胞の殺傷を示し、パネルBは、NCI-H929細胞の殺傷を示し、パネルCは、U-266細胞の殺傷を示し、パネルDは、陰性対照であるK562細胞の殺傷を示す。x軸は、使用した抗体の濃度を示し、y軸は、抗体添加6時間後の腫瘍細胞の溶解率(%)を示す。

40

【0273】

休止ヒトT細胞を様々な腫瘍細胞株及び漸増用量の抗CD3×抗BCMA二重特異性抗体と共に培養後、IL-2サイトカイン放出のレベルを測定した。図22のパネルAは、RPMI-8226細胞によって刺激したIL-2放出を示す。図22のパネルBは、NCI-H929細胞によって刺激したIL-2放出を示す。図22のパネルCは、U-266細胞によって刺激したIL-2放出を示す。図22のパネルDは、陰性対照であるK562細胞によって刺激したIL-2放出を示す。

50

【0274】

休止ヒトT細胞を様々な腫瘍細胞株及び漸増用量の抗CD3×抗BCMA二重特異性抗体と共に培養後、IFN-γサイトカイン放出のレベルを測定した。図23のパネルAは、RPMI-8226細胞によって刺激したIFN-γ放出を示す。図23のパネルBは、NCI-H929細胞によって刺激したIFN-γ放出を示す。図23のパネルCは、U-266細胞によって刺激したIFN-γ放出を示す。図23のパネルDは、陰性対照であるK562細胞によって刺激したIFN-γ放出を示す。

【0275】

本発明の好適な実施形態を、本明細書中に示し、記載してきたが、そのような実施形態が単に例示として示すものに過ぎないことは、当業者には自明であろう。当業者であれば、本発明から逸脱することなく、数多くの変形、変更、及び置換を見出すであろう。本明細書に記載する本発明の実施形態に対する様々な代替手段が、本発明の実施において採用され得ることを理解すべきである。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲に含まれる方法及び構造、ならびにそれらの均等物が、それにより包含されることが意図される。

10

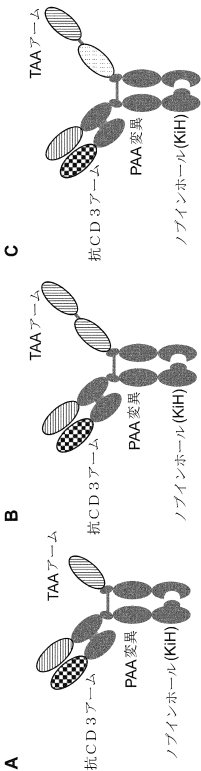
20

30

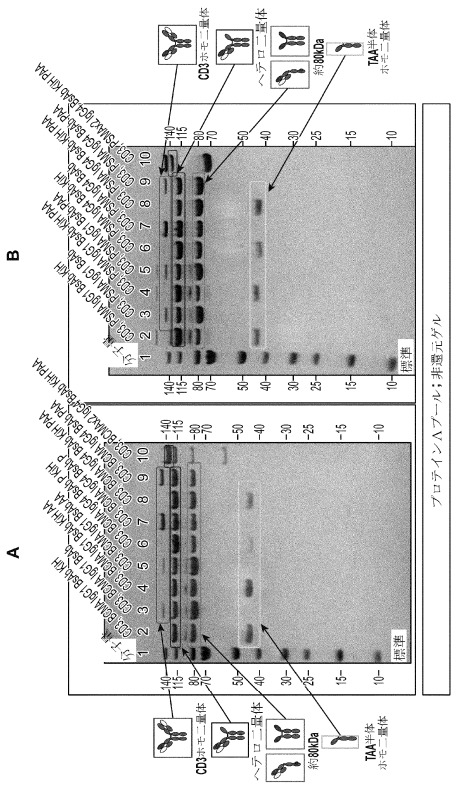
40

50

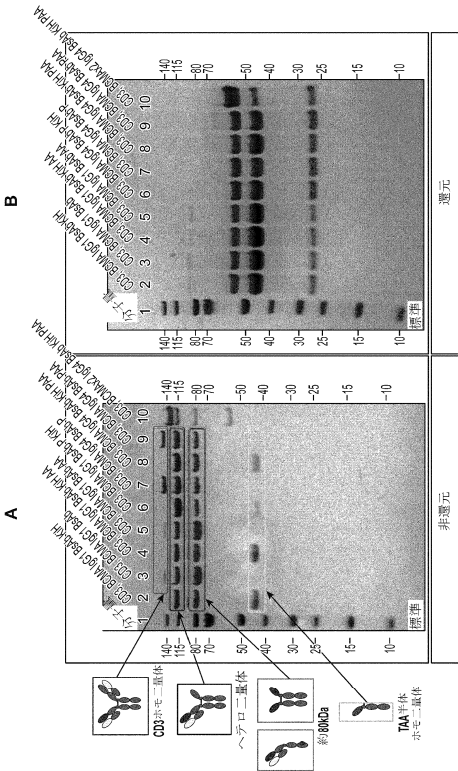
【図面】
【図 1】



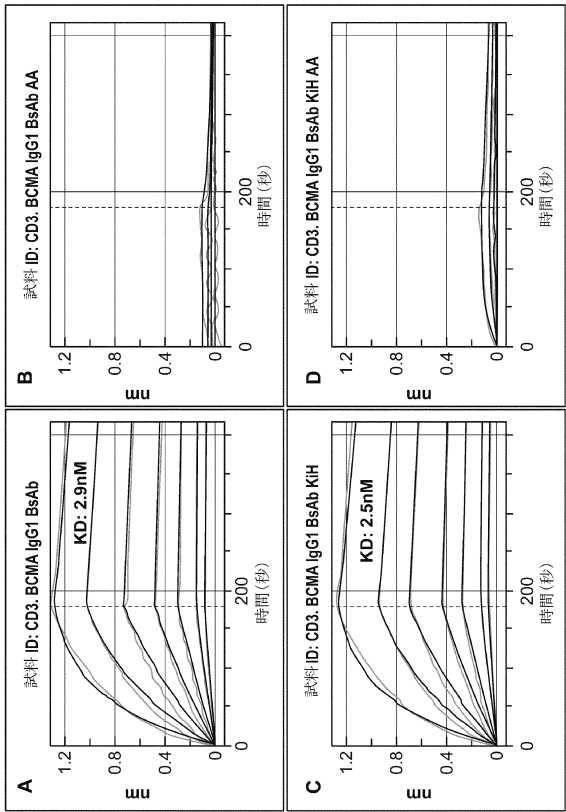
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

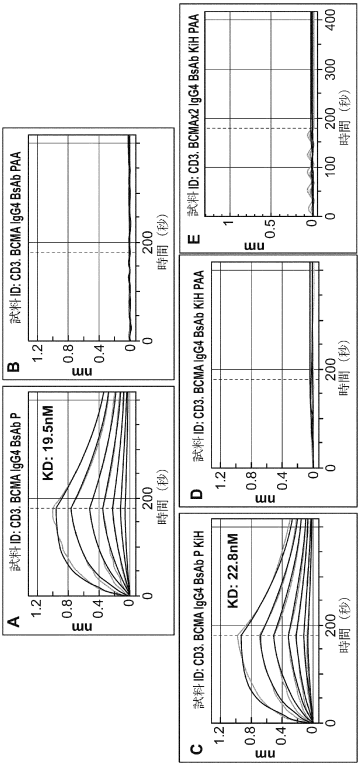
20

30

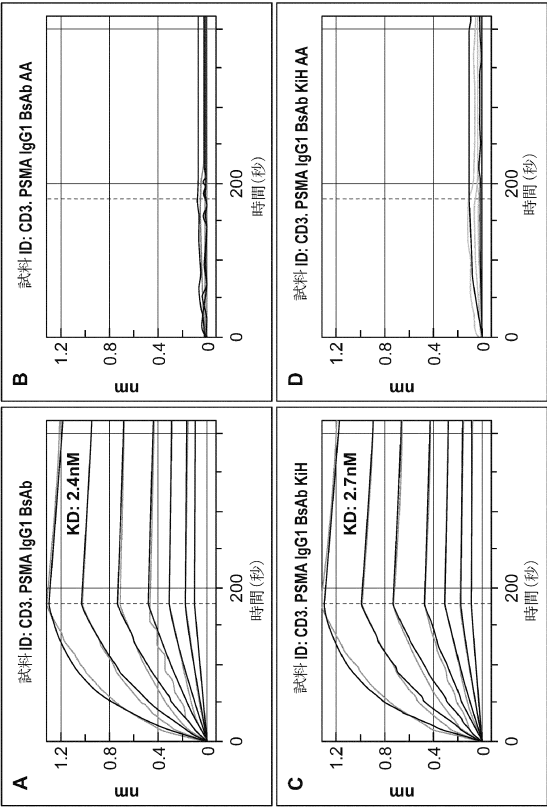
40

50

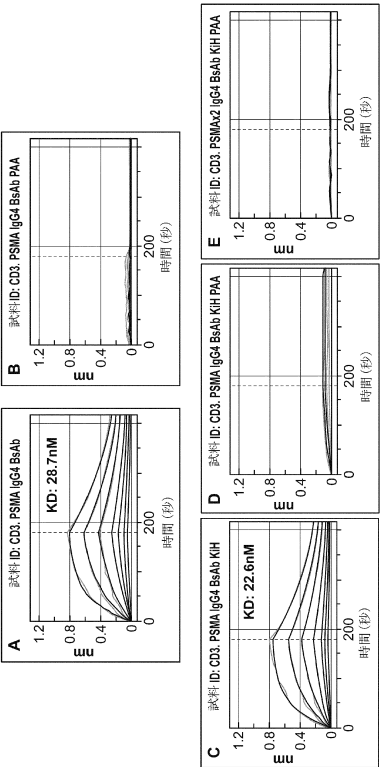
【図 5】



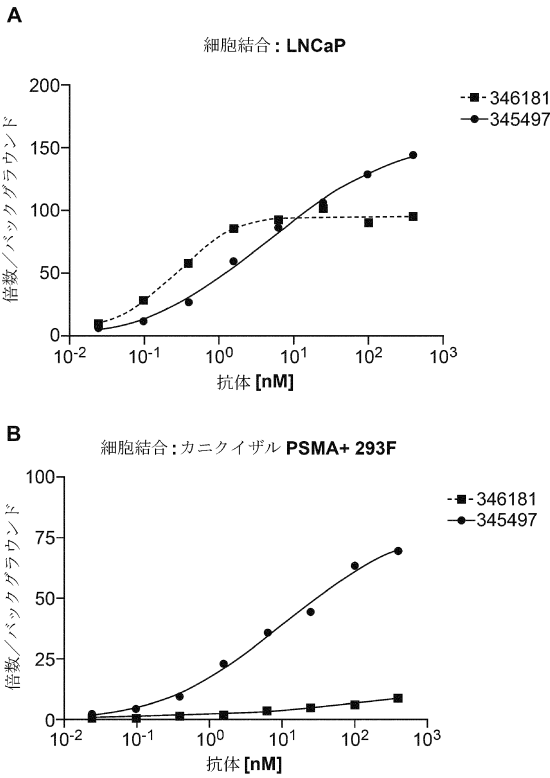
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

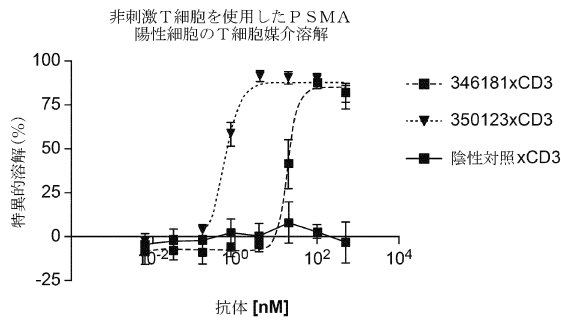
20

30

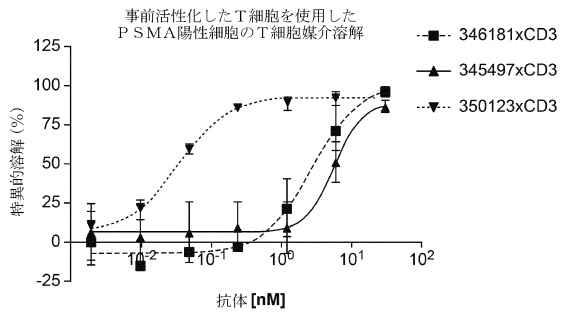
40

50

【図 9】

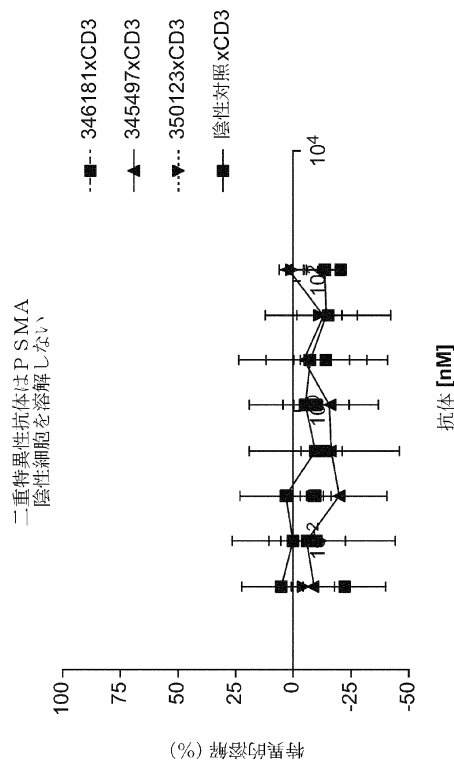


【図 1 0】

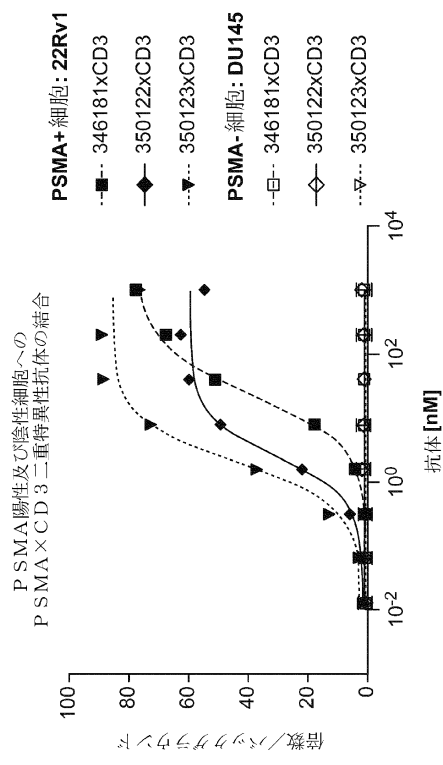


10

【図 1 1】



【図 1 2】



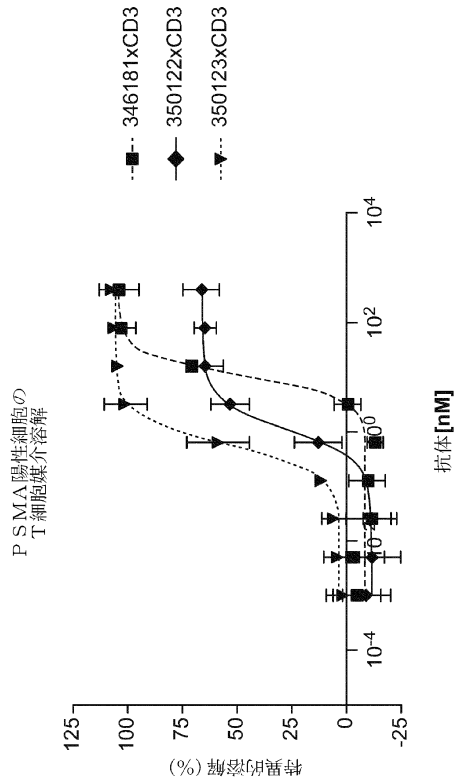
20

30

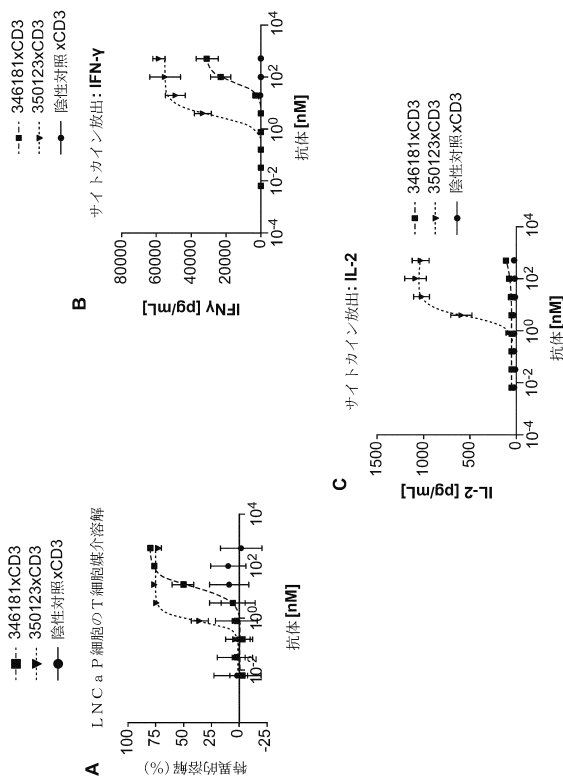
40

50

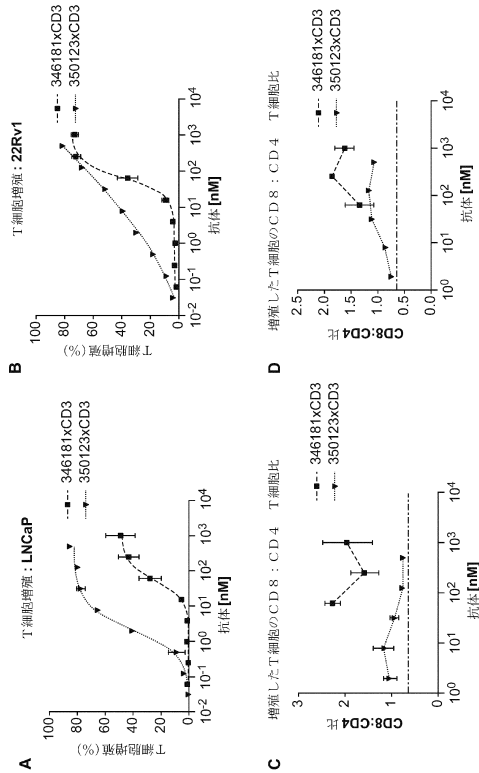
【図 1 3】



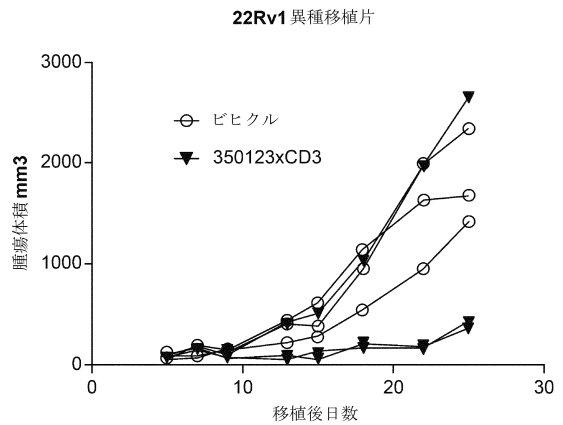
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

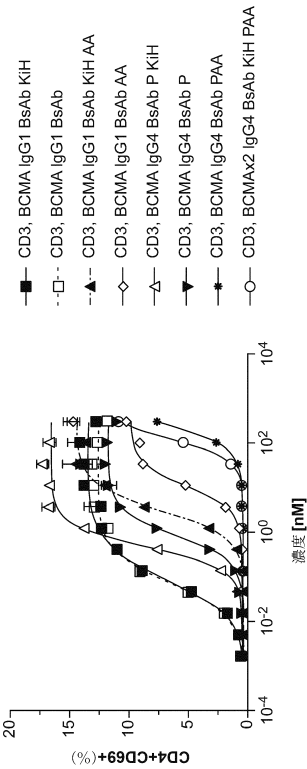
20

30

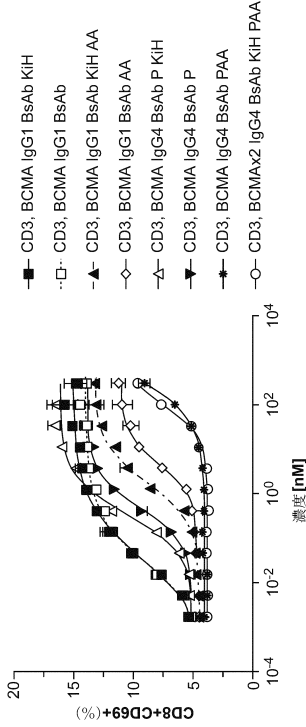
40

50

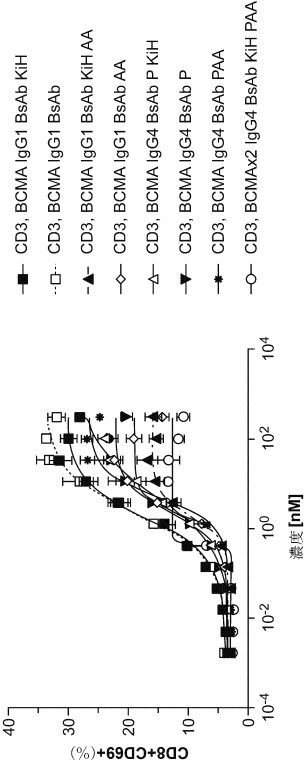
【図 17】



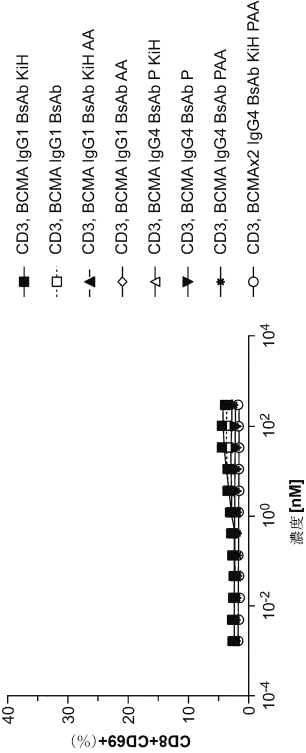
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

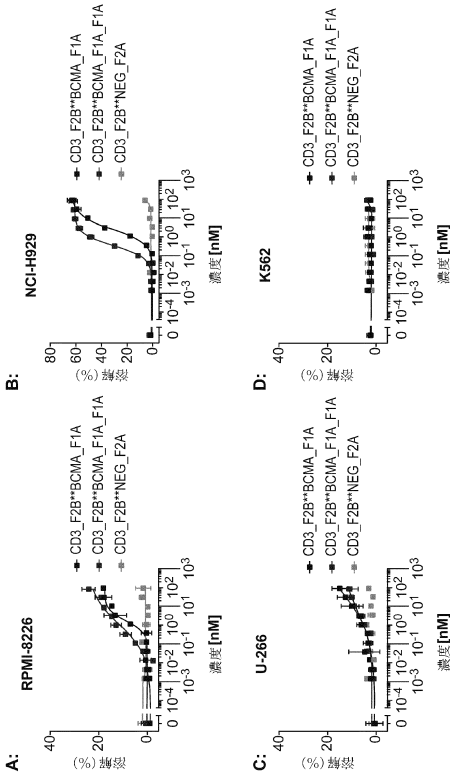
20

30

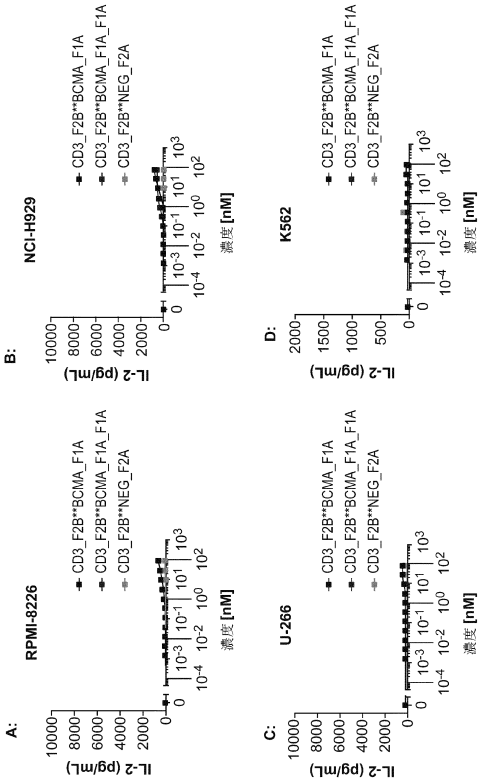
40

50

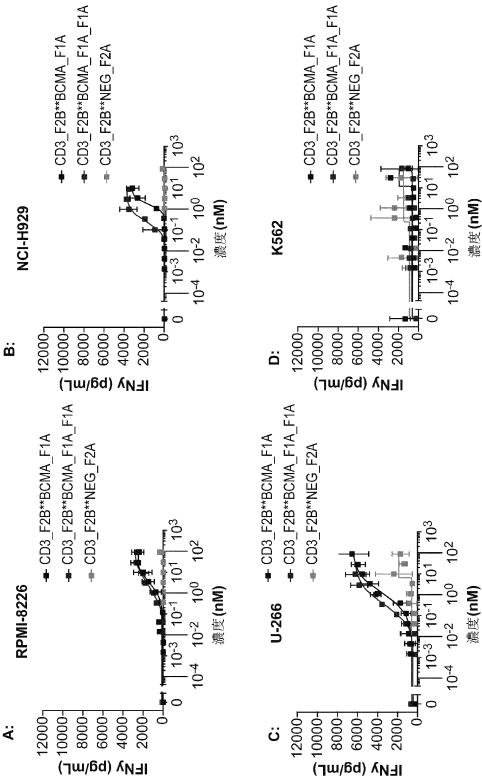
【図 2 1】



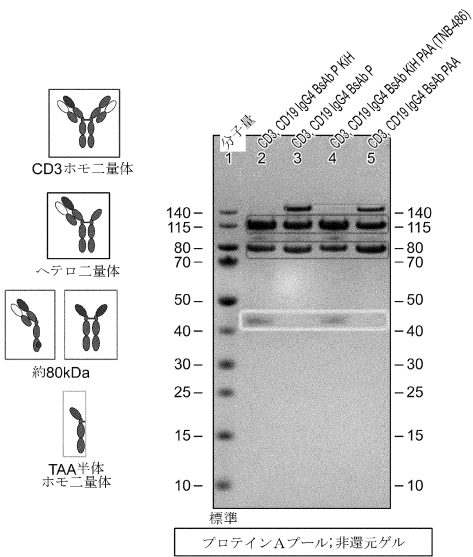
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

20

30

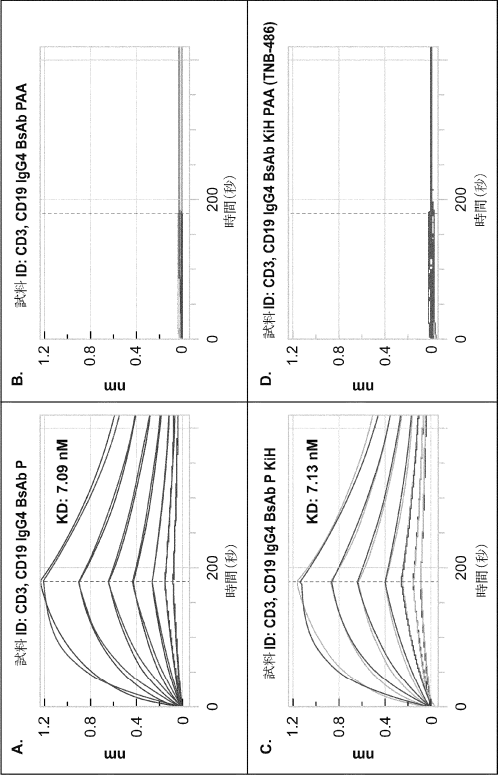
40

50

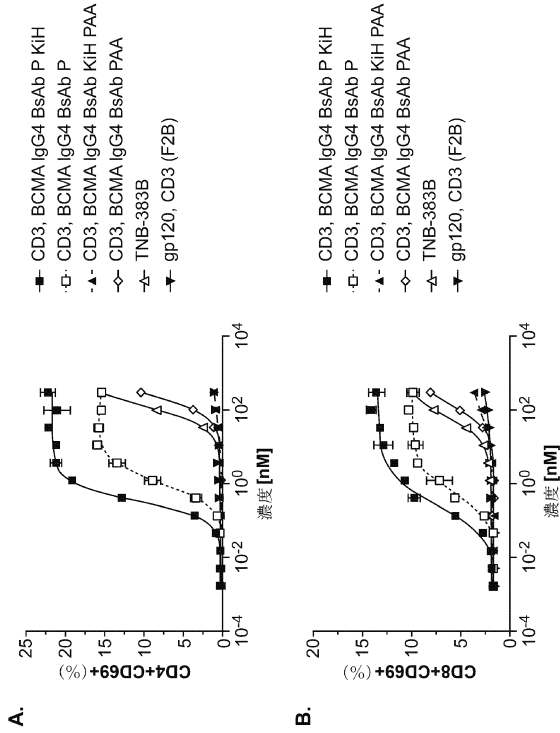
【図 2 5】

発現 ID	フォーマット	HMM (%)	単量体 (%)	LMW (%)
385171_394399_312325	CD3, CD19 IgG4 BsAb P KIH	0.10	99.9	0.0
385173_394256_312325	CD3, CD19 IgG4 BsAb P	2.33	97.7	0.0
318390_338663_312325	CD3, CD19 IgG4 BsAb KIH PAA (TNB-486)	0.05	99.9	0.07
316220_394259_312325	CD3, CD19 IgG4 BsAb PAA	2.09	97.9	0.0

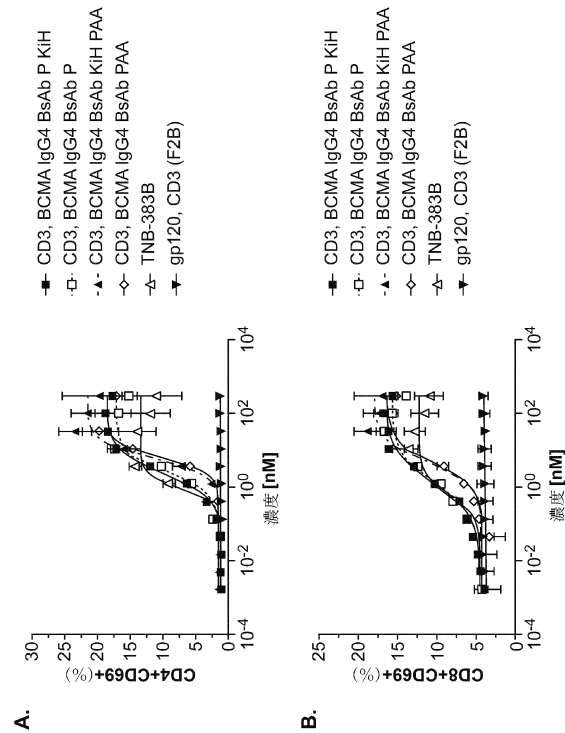
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

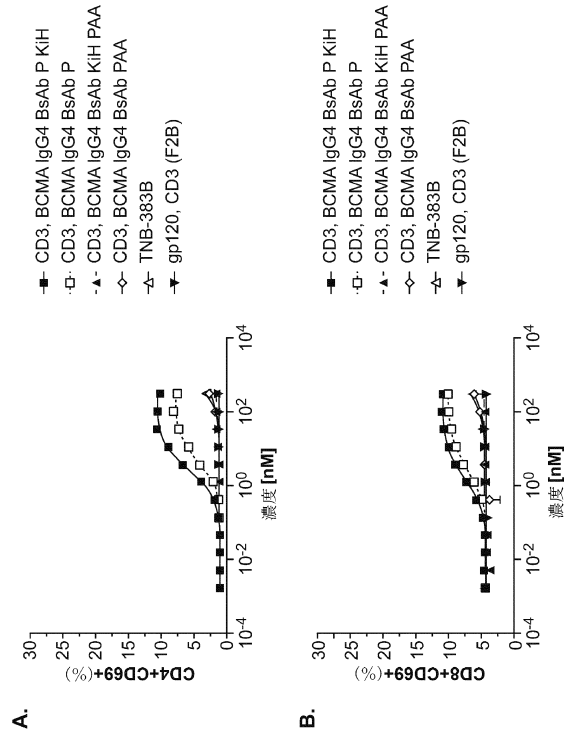
20

30

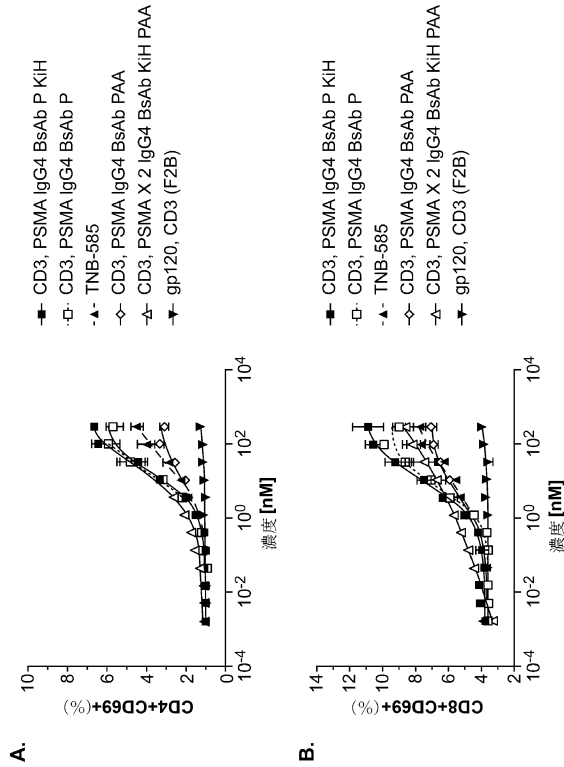
40

50

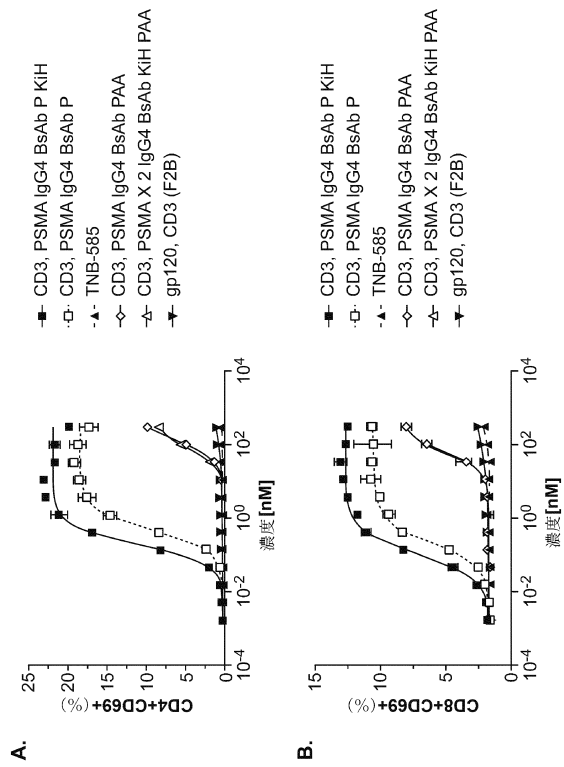
【図 29】



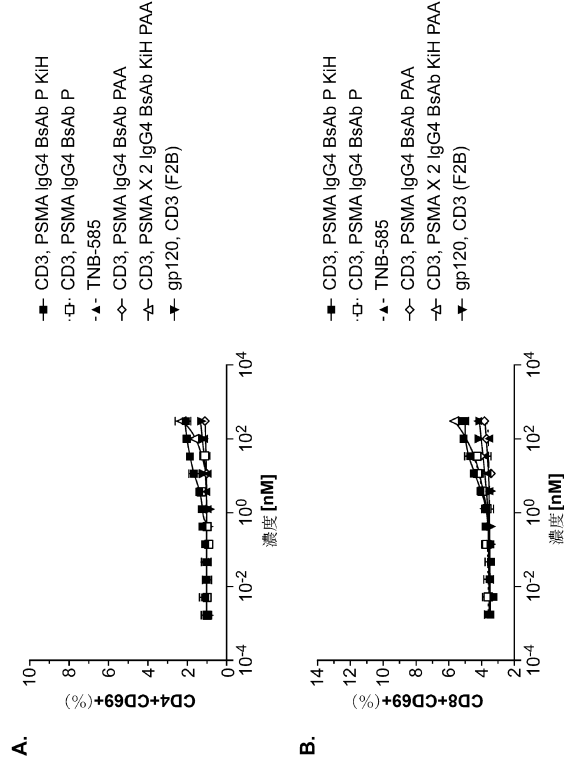
【図 31】



【図 30】



【図 32】



10

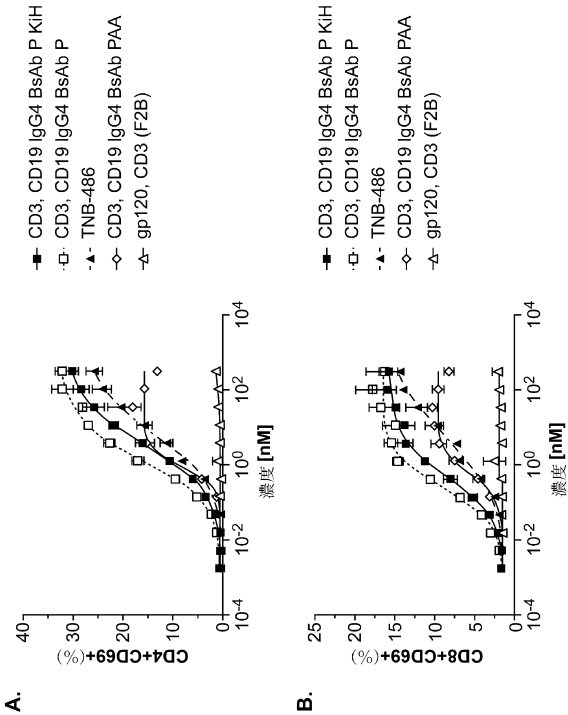
20

30

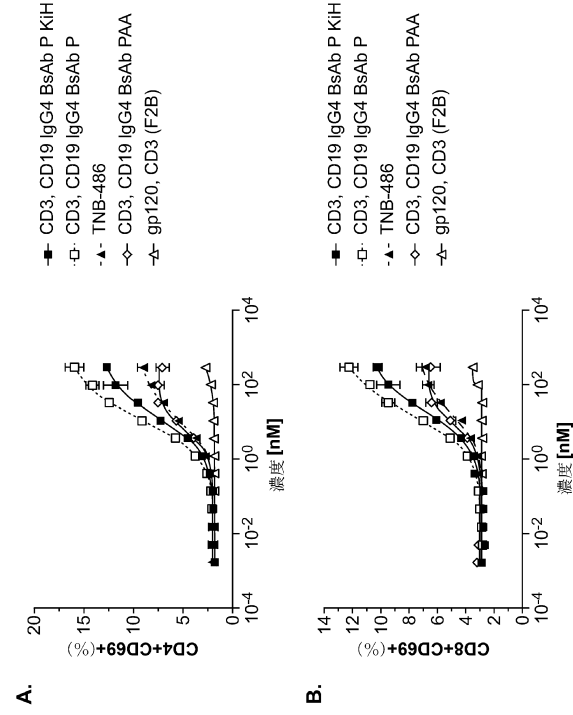
40

50

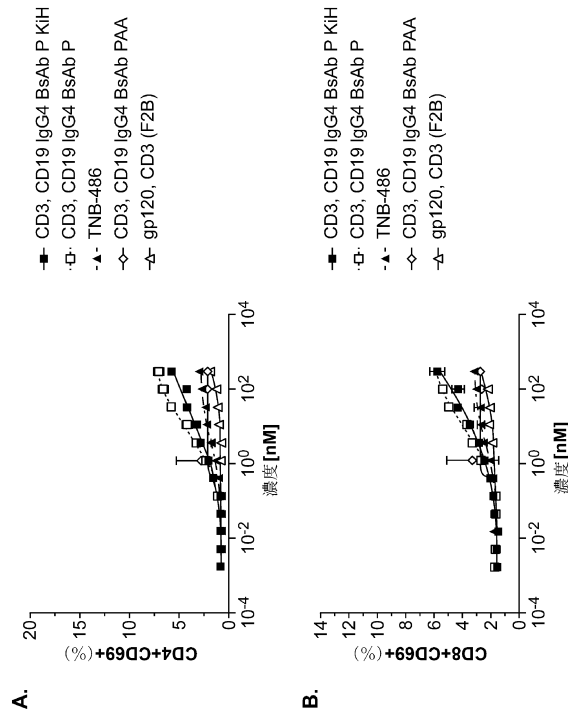
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



【配列表】

0007462011000001.xml

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N

米国(US)

早期審査対象出願

ブルバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0

- (72)発明者 バファ, オミド
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ ブールバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0
- (72)発明者 トリンクライン, ネイサン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ ブールバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0
- (72)発明者 ヴァン ショーテン, ウィム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ ブールバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0
- (72)発明者 フォース アルドレッド, シェリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ ブールバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0
- (72)発明者 ファム, デュイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ ブールバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0
- (72)発明者 クラーク, スターリン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 5 6 0, ニューアーク, ゲートウェイ ブールバード 7 9 9 9, スイート 3 2 0

審査官 北村 悠美子

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 2 0 / 0 6 1 4 7 8 (WO, A 2)
国際公開第 2 0 2 0 / 0 6 2 1 5 5 (WO, A 1)

- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)
U n i P r o t / G e n e S e q