

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-543826

(P2023-543826A)

(43)公表日 令和5年10月18日(2023.10.18)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	Z N A 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全84頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-519496(P2023-519496)	(71)出願人	523353465
(86)(22)出願日	令和3年9月28日(2021.9.28)		イノベント バイオロジクス(シンガポール) プライベート リミティド
(85)翻訳文提出日	令和5年5月23日(2023.5.23)		シンガポール国, 1 8 9 7 6 7, ビーチ
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/121285		ロード 3 8, サウス ビーチ タワー #
(87)国際公開番号	WO2022/068809		2 9 - 1 1
(87)国際公開日	令和4年4月7日(2022.4.7)	(74)代理人	100099759
(31)優先権主張番号	202011054187.5		弁理士 青木 篤
(32)優先日	令和2年9月29日(2020.9.29)	(74)代理人	100123582
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		弁理士 三橋 真二
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74)代理人	100141977
			弁理士 中島 勝
		(74)代理人	100138210
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗CD3抗体およびその使用

(57)【要約】

CD3に特異的に結合する新規な抗体および抗体断片、およびその抗体または抗体断片を含む組成物を提供する。抗体またはその抗体断片をコードする核酸、その核酸を含む宿主細胞、関連する使用、ならびに抗体および抗体断片の治療的使用および診断的使用を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、ヒト化抗CD3抗体またはその抗原結合断片：

- (i) 配列番号 50 に示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVH、および配列番号 80 に示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVL；
- (ii) 配列番号 48 に示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVH、および配列番号 77 ~ 84 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVL；
- (iii) 配列番号 49 に示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVH、および配列番号 77 ~ 84 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVL；
- (iv) 配列番号 50 に示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVH、および配列番号 77 ~ 84 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVL；または
- (v) 配列番号 51 に示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVH、および配列番号 77 ~ 84 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むかその配列からなるVL。

【請求項 2】

以下を含む、ヒト化抗CD3抗体またはその抗原結合断片：

- (i) 配列番号 50 のいずれかのアミノ酸配列に、Kabatの付番によるH31、H32、H33、H52、H52A、H52C、H53、H54、H95、H96、H97、H98、H99、H100、H100A、H100B、H100C (Kabat番号)のうち1箇所、2箇所または3箇所に、以下の変異、すなわち、
アミノ酸Y、WもしくはFからアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸R、KもしくはHからアミノ酸G、AもしくはSへの変異、アミノ酸Gからアミノ酸Yへの変異、アミノ酸NもしくはQからアミノ酸G、S、DもしくはEへの変異、および/またはアミノ酸TもしくはSからG、L、Rへの変異
から選択される変異を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる重鎖可変領域VH；ならびに
- (ii) 配列番号 80 のいずれかのアミノ酸配列に、Kabatの付番によるL24、L28、L29、L30、L31、L53、L91、L92、L93、L94 (Kabat番号)のうち1箇所、2箇所または3箇所に、以下の変異、すなわち、
アミノ酸Y、WもしくはFからアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸R、KもしくはHからアミノ酸G、AもしくはSへの変異、アミノ酸Gからアミノ酸Yへの変異、アミノ酸NもしくはQからアミノ酸G、S、DもしくはEへの変異、および/またはアミノ酸TもしくはSからG、L、Rへの変異
から選択される変異を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる軽鎖可変領域VL。

【請求項 3】

以下を含む、請求項 2 に記載のヒト化抗CD3抗体またはその抗原結合断片：

- (i) 配列番号 52 ~ 75 のいずれかに示されるVHに含まれる3つの相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3、ならびに配列番号 80 に示されるVLに含まれる3つの相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3；または
- (ii) 配列番号 50 に示されるVHに含まれる3つの相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3、ならびに配列番号 85 ~ 99 のいずれかに示されるVLに含まれる3つの相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3。

【請求項 4】

以下を含む、請求項 3 に記載のヒト化抗CD3抗体またはその抗原結合断片：

- (1) 配列番号 1 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 8 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 29 に示されるLCDR1、配列番号 30 に示されるLCDR2、および配列番号 31 に示されるLCDR3；
- (2) 配列番号 6 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 8 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 29 に示されるLCDR1、配列番号 30 に示されるLCDR2、および配列番号 31 に示されるLCDR3；
- (3) 配列番号 1 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 1

(19)配列番号 1 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 1 0 5 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 に示されるLCDR2、および配列番号 3 1 に示されるLCDR3；

(20)配列番号 1 0 3 に示されるHCDR1、配列番号 1 0 4 に示されるHCDR2、および配列番号 8 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 に示されるLCDR2、および配列番号 3 1 に示されるLCDR3；

(21)配列番号 1 0 3 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 1 0 5 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 に示されるLCDR2、および配列番号 3 1 に示されるLCDR3；

(22)配列番号 1 に示されるHCDR1、配列番号 1 0 4 に示されるHCDR2、および配列番号 1 0 5 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 に示されるLCDR2、および配列番号 3 1 に示されるLCDR3；

(23)配列番号 1 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 8 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 1 0 6 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 もしくは 4 5 に示されるLCDR2、および配列番号 1 0 7 に示されるLCDR3；

(24)配列番号 1 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 8 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 1 0 6 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 もしくは 4 5 に示されるLCDR2、および配列番号 3 1 に示されるLCDR3；

(25)配列番号 1 に示されるHCDR1、配列番号 2 に示されるHCDR2、および配列番号 8 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 もしくは 4 5 に示されるLCDR2、および配列番号 1 0 7 に示されるLCDR3；または

(26)配列番号 1 0 3 に示されるHCDR1、配列番号 1 0 4 に示されるHCDR2、および配列番号 1 0 5 に示されるHCDR3、ならびに配列番号 1 0 6 に示されるLCDR1、配列番号 3 0 もしくは 4 5 に示されるLCDR2、および配列番号 1 0 7 に示されるLCDR3。

【請求項 5】

以下を含む、請求項 3 または 4 に記載のヒト化抗体：

(i)配列番号 5 0 のアミノ酸配列または配列番号 5 0 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号 8 0 のアミノ酸配列または配列番号 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL；

(ii)配列番号 5 4 のアミノ酸配列または配列番号 5 4 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号 8 0 のアミノ酸配列または配列番号 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL；

(iii)配列番号 6 1 のアミノ酸配列または配列番号 6 1 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号 8 0 のアミノ酸配列または配列番号 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL；

(iv)配列番号 7 1 のアミノ酸配列または配列番号 7 1 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号 8 0 のアミノ酸配列または配列番号 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL；

(v)配列番号 7 3 のアミノ酸配列または配列番号 7 3 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号 8 0 のアミノ酸配列または配列番号 8 0 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL；

(vi)配列番号 5 0 のアミノ酸配列または配列番号 5 0 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号 9 9 のアミノ酸配列または配列番号 9 9 のアミノ酸配列と少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL；

10

20

30

40

50

(vii)配列番号52～75のいずれかのアミノ酸配列または配列番号52～75のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号80のアミノ酸配列または配列番号80のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL；あるいは

(viii)配列番号50のアミノ酸配列または配列番号50のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号85～99のいずれかのアミノ酸配列または配列番号85～99のいずれかのアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL。

【請求項6】

重鎖定常領域および/または軽鎖定常領域をさらに含む、請求項1～5に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項7】

前記重鎖定常領域HCは、

(i)配列番号100のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、

(ii)配列番号100のアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(iii)配列番号100のアミノ酸配列と比較して、1つ以上（好ましくは20以下または10以下、より好ましくは5つ、4つ、3つ、2つ、1つ以下）のアミノ酸変化（好ましくはアミノ酸置換、より好ましくは保存的アミノ酸置換）を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなり、かつ/あるいは、

前記軽鎖定常領域LCは、

(i)配列番号101または102から選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、

(ii)配列番号101または102から選択されるアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(iii)配列番号101または102から選択されるアミノ酸配列と比較して、1つ以上（好ましくは20以下または10以下、より好ましくは5つ、4つ、3つ、2つ、1つ以下）のアミノ酸変化（好ましくはアミノ酸置換、より好ましくは保存的アミノ酸置換）を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる。

請求項6に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項8】

前記抗体はIgG1形態またはIgG2形態またはIgG3形態またはIgG4形態の抗体または抗原結合断片であり、好ましくはIgG1形態の抗体または抗原結合断片由来である、請求項1～7のいずれか一項に記載の抗CD3抗体またはその抗原結合断片抗体。

【請求項9】

前記抗体はモノクローナル抗体である、請求項1～8のいずれか一項に記載CD3結合抗体またはその抗原結合断片。

【請求項10】

前記抗原結合断片は、以下の抗体断片、すなわちFab、Fab'、Fab'-SH、Fv、単鎖抗体（scFvなど）、(Fab')₂、単ドメイン抗体、たとえばVHH、dAb、および線状抗体から選択される、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項11】

前記抗体は、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域および腫瘍関連抗原に結合する第2の抗原結合領域を含む多重特異性抗体、たとえば二重特異性抗体であり、好ましくは、前記腫瘍関連抗原はHER2またはCD70またはクローディン18.2である、請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項12】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の抗 CD3 結合抗体またはその抗原結合断片の軽鎖可変領域もしくは重鎖可変領域または軽鎖もしくは重鎖をコードする単離された核酸。

【請求項 1 3】

発現ベクターである、請求項 1 2 の核酸を含むベクター。

【請求項 1 4】

請求項 1 2 に記載の核酸または請求項 1 3 に記載のベクターを含む宿主細胞であって、好ましくは、前記宿主細胞は原核細胞または真核細胞であり、より好ましくは、酵母細胞、哺乳動物細胞（293細胞またはCHO細胞、たとえばCHO-S細胞またはHEK293細胞など）、および抗体またはその抗原結合断片の調製に適した他の細胞から選択される、宿主細胞。

10

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の CD3 結合抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸を発現させるのに適した条件で請求項 1 4 に記載の宿主細胞を培養すること、必要に応じて前記抗体またはその抗原結合断片を単離すること、さらには必要に応じて前記宿主細胞から前記 CD3 結合抗体またはその抗原結合断片を回収することを含む、CD3 に結合する抗体またはその抗原結合断片を調製する方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の抗 CD3 抗体またはその抗原結合断片、および標識などの他の物質を含む、免疫複合体。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の CD3 結合抗体またはその抗原結合断片または請求項 1 6 に記載の免疫複合体、および必要に応じて化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、他の抗体、小分子薬、または免疫調節剤などの 1 種以上のその他の治療剤、および必要に応じて薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

20

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の CD3 結合抗体またはその抗原結合断片または請求項 1 6 に記載の免疫複合体、および化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、他の抗体、小分子薬、または免疫調節剤などの 1 種以上のその他の治療剤を含む、薬学的組合せ。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の CD3 結合抗体、またはその抗原結合断片、または請求項 1 6 に記載の免疫複合体、または請求項 1 7 に記載の医薬組成物、または請求項 1 8 に記載の薬学的組合せの有効量を対象に投与することを含む、前記対象の腫瘍を予防あるいは治療する方法。

30

【請求項 2 0】

治療様式および/または他の治療剤などの 1 つ以上の治療を前記患者に投与することをさらに含み、好ましくは、前記治療様式は放射線療法または手術を含み、あるいは前記治療剤は化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、他の抗体、小分子薬、または免疫調節剤を含む、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

(a) 請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片または請求項 1 6 に記載の免疫複合体と試料を接触させること、および
(b) 前記抗体またはその抗原結合断片と CD3 との間の複合体の形成を検出することを含み、必要に応じて前記抗体は検出可能に標識される、
試料中の CD3 を検出する方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD3 に特異的に結合する新規なヒト化抗体および抗体断片、ならびにこの抗体または抗体断片を含む組成物に関する。また、本発明は、CD3 および他の抗原に対

50

する二重特異性抗体にも関する。さらに、本発明は、この抗体またはその抗体断片をコードする核酸、この核酸を含む宿主細胞、および関連する使用に関する。さらに、本発明は、これらの抗体および抗体断片の治療的使用および診断的使用に関する。

【背景技術】

【0002】

CD3（分化抗原群3）はタンパク質複合体であり、T細胞抗原受容体、T細胞抗原受容体および2本の鎖と共にT細胞受容体複合体を構成し、細胞傷害性T細胞（CD8+ナイーブT細胞）およびTヘルパー細胞（CD4+ナイーブT細胞）の活性化に関与する。

【0003】

CD3タンパク質複合体はT細胞系統の決定的なマーカーであるため、抗CD3抗体をT細胞マーカーとして有効に使用できる。

【0004】

CD3抗体はすべてのT細胞を認識し、ヒト末梢血リンパ球の70%~80%、および胸腺細胞の65%~85%と反応する。CD3抗体により活性化されたT細胞は腫瘍細胞の周辺に向かい、2つの細胞は接触してシナプスを形成し、T細胞受容体（TCR）シグナル経路の活性化とグランザイムの発現および放出を誘発して、腫瘍細胞膜の穿孔を引き起こし、その細胞溶解およびアポトーシスを誘導する。TCRシグナル経路の活性化により、一連のサイトカインの発現と放出が同時に起こり（IL-2の放出フィードバックなど）、T細胞の増殖が刺激され、免疫による死滅効果が増幅される。前臨床研究のデータから、腫瘍関連抗原を標的とするCD3二重特異性抗体分子がT細胞を有効に活性化し、その増殖を刺激し、標的細胞が存在すれば標的細胞の死を引き起こすことがわかった。

【0005】

多くの種類のCD3結合抗体分子が知られており、特にCD3結合特異性を含む二重特異性抗体分子が知られている。現在、一般的に使用されている公共のCD3抗体は、1980年代のハイブリドーマ構築基盤にあるマウス抗体（OKT3、TR66、UCHT1、L2K、SP34などが挙げられる）に由来している。CD3モノクローナル抗体の種交差反応性はCD3二重特異性抗体の開発に重要である。

【0006】

CD3複合体に対するCD3抗体の親和性は、CD3関連二重特異性抗体の成功にとって第1の重要な要素である。親和性が高すぎるCD3抗体は、一方ではT細胞の非特異的活性化を起し、不要なサイトカイン放出症候群につながり、他方では、インビボで末梢T細胞を優先的に標的とし、腫瘍細胞にあまり作用せず、効果の低下につながる。しかし、親和性が低すぎるCD3抗体はT細胞を活性化させ死滅の役割を果たさせるには十分ではない。異なる腫瘍関連抗原の分子量、発現レベル、抗体エピトープおよび組織分布特性に基づいてCD3関連二重特異性抗体のCD3親和性を調整する必要がある。

【0007】

したがって、当技術分野では、異なる結合親和性、ひいては異なるT細胞活性化能力を有し、異なる腫瘍関連抗原に適合する二重特異性抗体または三重特異性抗体などの多重特異性抗体の開発に使用できる抗CD3モノクローナル抗体を開発する必要がある。

【発明の概要】

【0008】

側面によっては、本発明は、本発明に記載の3つの重鎖可変領域CDRおよび3つの軽鎖可変領域CDRを含む、CD3に結合する抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0009】

側面によっては、本発明のCD3結合抗体またはその抗原結合断片は、本発明に記載の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域を含む。

【0010】

側面によっては、本発明のCD3結合抗体またはその抗原結合断片は、本発明に記載の重鎖定常領域および/または軽鎖定常領域をさらに含む。

【0011】

10

20

30

40

50

実施態様によっては、本発明のCD3結合抗体またはその抗原結合断片は、ヒトまたはカニクイザルCD3などのCD3抗原に様々な結合親和性、たとえば検出不能な結合親和性などの低結合親和性で結合する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1-1】図1A~1Cは、細胞レベルでのヒトCD3に対するsp34ヒト化抗体の結合親和性を示し、図1Dは、細胞レベルでの異なるCD3親和性をもつヒト化抗体の結合を示す。

【図1-2】図1A~1Cは、細胞レベルでのヒトCD3に対するsp34ヒト化抗体の結合親和性を示し、図1Dは、細胞レベルでの異なるCD3親和性をもつヒト化抗体の結合を示す。

10

【図2】Sp34ヒト化抗体のT細胞活性化試験を示す。

【0013】

【図3】図3Aおよび図3Bは、細胞レベルでのヒトCD3に対するsp34ヒト化抗体のCDR領域変異体の結合親和性を示し、図3Cは、細胞レベルでのCD3に対するいくつかのCDR変異体の親和性をさらに示す。

【0014】

【図4】Sp34ヒト化抗体CDR変異体のT細胞活性化試験を示す。

【0015】

【図5】図5Aは、Her2/CD3二重特異性抗体分子の模式図である。図5Bは、この二重特異性抗体分子のT細胞活性化能力を示す。

20

【0016】

【図6】図6Aは、CD70/CD3二重特異性抗体分子の模式図である。図6Bは、この二重特異性抗体分子のT細胞活性化能力を示す。

【0017】

【図7】図7は、CD3/クローニン18.2二重特異性抗体の構造図を示す。

【0018】

【図8】本発明の二重特異性抗体がCLDN18.2陽性胃癌細胞NUGC-4を特異的に死滅させることを示す。

【0019】

【図9】本発明の二重特異性抗体がCLDN18.2陽性膵臓がん細胞DAN-GCLDN18.2を特異的に死滅させることを示す。

30

【0020】

【図10】二重特異性抗体がCLDN18.2陰性細胞に対して非特異的な死滅効果をもたないことを示す。

【0021】

【図11】NUGC-4中で二重特異性抗体が依存するT細胞により媒介されるサイトカイン放出を示す。

【0022】

【図12】DAN-G-CLDN18.2中で二重特異性抗体が依存するT細胞により媒介されるサイトカイン放出を示す。

40

【0023】

【図13】CLDN18.2発現が依存する二重特異性抗体により媒介されるT細胞活性化を示す。

【0024】

【図14】インビボでのNUGC-4胃癌のヒト化モデルにおける二重特異性抗体の効力結果を示す。

【0025】

【図15】インビボでのDAN-G-CLDN18.2膵臓がんのヒト化モデルにおける二重特異性抗体の効力結果を示す。

50

【0026】

【図16】マウスにおける二重特異性抗体の薬物動態（PK）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

I. 定義

【0028】

以下に本発明を詳細に説明する前に、当然ながら、本発明は本明細書に記載の特定の方法、実験計画および試薬に限定されず、それらは変更してもよい。また、当然ながら、本明細書で使用される用語は、特定の実施態様を説明することのみを目的とし、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によつてのみ限定される。他に定義しない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味をもつ。

10

【0029】

本明細書を説明する目的で以下の定義を使用するが、適切な場合、単数形で使用される用語は複数形を含む場合もあり、逆も同様である。なお、本明細書で使用される用語は特定の実施態様を説明することのみを目的とし、限定を意図するものではない。

【0030】

数値と組み合わせて使用される「約」という用語は、指定の数値より5%小さい下限から指定の数値より5%大きい上限までの範囲の数値を包含することを意図する。

【0031】

本明細書で使用される「および/または」という用語は、複数の選択肢のうちのいずれか、または選択肢のうちの2つ以上を意味する。

20

【0032】

本明細書で使用される「含む（comprise、include）」という用語は、記載された要素、整数または工程を含むことを意味するが、他のいかなる要素、整数または工程も排除しない。その用語は、「含む」という用語が使用される場合、他に指定がない限り、本明細書に記載の要素、整数または工程の組合せも包含する。たとえば、抗体可変領域が特定の配列を「含む」という場合、その特定の配列で構成される抗体可変領域も包含するものとする。

【0033】

本明細書で使用される「CD3」という用語は、多分子T細胞受容体（TCR）の一部としてT細胞上に発現される抗原を指し、以下の4つの受容体鎖すなわちCD3-_α、CD3-_β、CD3-_ε およびCD3-_ζ のうちの2つにより形成されるホモ二量体またはヘテロ二量体で構成される。ヒトCD3-_α（hCD3-_α）は、UniProtKB/Swiss-Prot: P07766.2に記載のアミノ酸配列を含む。ヒトCD3-_β（hCD3-_β）は、UniProtKB/Swiss-Prot: P04234.1に記載のアミノ酸配列を含む。実施態様によっては、本発明に記載のCD3はヒトまたはカニクイザル由来のCD3を指す。

30

【0034】

本明細書で使用される「CD3に結合する抗体」または「抗CD3抗体」という用語は、単一のCD3サブユニット（たとえば、 α 、 β 、 ϵ 、 ζ または δ ）に対して特異的に認識あるいは結合する抗体およびその抗原結合断片、ならびに2つのCD3サブユニットの二量体複合体（たとえば、 $\alpha\beta$ 、 $\alpha\epsilon$ 、 $\beta\zeta$ および $\delta\epsilon$ のCD3二量体）に対して特異的に認識かつ結合する抗体およびその抗原結合断片を包含する。本発明の抗体および抗原結合断片は、可溶性CD3、結合性CD3および/または細胞表面に発現したCD3に結合できる。可溶性CD3は、天然CD3タンパク質および組換えCD3タンパク質多様体（膜貫通領域を欠くかそれ以外で細胞膜に結合しない単量体および二量体CD3構造など）を包含する。本発明は、低いか検出不可能な結合親和性でヒトおよびカニクイザルCD3に結合してヒトおよびカニクイザルのT細胞を活性化する抗体を提供する。実施態様によっては、結合は、たとえば放射免疫アッセイ（RIA）、生体膜薄層干渉法（BLI）、MSDアッセイまたは表面プラズモン共鳴（SPR）またはフローサイトメトリーにより測定される。

40

50

【0035】

「細胞表面に発現されるCD3」という用語は、CD3タンパク質の少なくとも一部が細胞膜の外側に露出し抗体の抗原結合部分に接近しやすいようにインビボまたはインビトロで細胞表面に発現される1種以上のCD3タンパク質を指す。「細胞表面に発現されるCD3」は、細胞膜の機能的T細胞受容体環境に含まれるCD3タンパク質を包含する。「細胞表面に発現されるCD3」という用語は、細胞表面にホモ二量体またはヘテロ二量体の一部として発現されるCD3タンパク質（たとえば / 、 / および / のCD3二量体）を包含する。

【0036】

エフェクター細胞は、CD4+T細胞、CD8+T細胞、Th1、Th2および制御性T細胞（Treg）などのエフェクターT細胞（Tリンパ球）を包含する。エフェクター細胞は、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、顆粒球、形質細胞またはB細胞（リンパ球）をさらに包含する。

10

【0037】

「抗CD3抗体」または「CD3に結合する抗体」は、単一の特異性を有する一価抗体、CD3に結合する第1の抗原結合ドメインおよび第2の（標的）抗原に結合する第2の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体、ならびにCD3および他の1種以上（たとえば2種）の標的に結合する多重特異性抗体を包含する。

【0038】

「多重特異性抗体」という用語は、少なくとも二重特異性である抗体を指し、すなわち、抗体は少なくとも第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインを含み、第1の結合ドメインは1つの標的または抗原に結合し、第2の結合ドメインは別の抗原または標的に結合する。したがって、本発明による抗体は、少なくとも2つの異なる抗原または標的に対する特異性を含む。本発明による抗体は、複数の結合ドメイン/結合部位を含む多重特異性抗体、たとえば抗体が3つの結合ドメインを含む三重特異性抗体も包含する。

20

【0039】

本明細書で使用される「リンカー」という用語は、二重特異性抗体の異なる部分を直接結合できる任意の分子を指す。異なる抗体部分間の共有結合を確立するリンカーとしてはペプチドリンカーおよび非タンパク質ライナーが挙げられ、その例としてはポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリエチレンオキシド、またはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの共重合体が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0040】

本発明による「ペプチドリンカー」という用語は、抗体の第1の部分のアミノ酸配列を抗体の第2の部分に結合するアミノ酸配列を指す。たとえば、ペプチドリンカーは、抗体の第1の（可変および/または結合）ドメインを第2の（可変および/または結合）ドメインに結合できる。たとえば、ペプチドリンカーは、抗体の一部を抗体の別の部分に結合する（抗原結合ドメインをFcドメインまたはその断片に結合するなど）こともできる。好ましくは、ペプチドライナーは、所望の活性を妨げないように、2つの実体が互いに対する立体構造を維持するように結合するのに十分な長さを有する。

40

【0041】

本発明による「原子価」という用語は、抗体分子中に指定数の結合部位があることを意味する。したがって、二価、三価および四価という用語はそれぞれ、抗体構築物に2つ、3つまたは4つの結合部位があることを示す。本発明による二重特異性抗体は少なくとも二価であり、二価、三価、四価または六価などの多価であり得る。

【0042】

本明細書で使用される「結合領域」という用語は、特定の標的または抗原に結合する二重特異性抗体の任意の部分の部分を指す。結合領域は抗原結合部位である。結合領域は、たとえば、抗体すなわち免疫グロブリン自体または抗体断片であり得る。このような結合領域は、BsABの残りの部分とは独立した三次構造を有していても有していなくてもよく、その

50

標的に結合するあるいは結合しない別個の実体として使用されてもよい。

【0043】

「抗体断片」という用語は、完全な抗体の一部を含む。好ましい実施態様では、抗体断片は抗原結合断片である。

【0044】

「抗原結合断片」は、インタクト抗体の一部を含み、かつインタクト抗体が結合する抗原に結合する、インタクト抗体とは異なる分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、dAb（ドメイン抗体）、線状抗体、単鎖可変断片（たとえばscFv）、単ドメイン抗体（たとえばVHH）、二価抗体またはその断片、ラクダ科抗体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

「抗原」という用語は、免疫応答を引き起こす分子を指す。このような免疫応答は、抗体の産生もしくは特定の免疫細胞の活性化、またはその両方を含み得る。技術者は理解していることだが、基本的にすべてのタンパク質またはペプチドを含むあらゆる高分子を抗原として使用できる。さらに、抗原は、組換えまたはゲノムDNAに由来し得る。本明細書で使用される「エピトープ」という用語は、抗体分子と特異的に相互作用する抗原（たとえばCD3）の一部を指す。

【0046】

参照抗体としての「同じまたは重複するエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイで参照抗体のその抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%またはそれ以上を遮断する抗体を指す。反対に、参照抗体は、競合アッセイで抗体のその抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%またはそれ以上を遮断する

【0047】

参照抗体とその抗原への結合について競合する抗体は、競合アッセイで参照抗体のその抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%またはそれ以上を遮断する抗体を指す。反対に、参照抗体は、競合アッセイでその抗体のその抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%またはそれ以上を遮断する。直接または間接固相放射免疫アッセイ（RIA）、直接または間接固相酵素免疫アッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイなどの多種の競合結合アッセイを用いて、抗体が別の抗体と競合するかを判断できる。

【0048】

参照抗体のその抗原への結合を阻害する（たとえば、競合的に阻害する）抗体は、参照抗体のその抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%またはそれ以上を阻害する抗体を指す。反対に、参照抗体は、その抗体のその抗原への結合の50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%またはそれ以上を阻害する。抗体のその抗原への結合を親和性（たとえば、平衡解離定数）により測定できる。親和性を決定する方法は当技術分野で知られている。

【0049】

参照抗体と同じまたは似た結合親和性および/または特異性を示す抗体は、参照抗体の結合親和性および/または特異性の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%もしくは95%またはそれ以上を有することができる抗体を指す。これは、当技術分野で知られている任意の結合親和性および/または特異性決定方法で決定できる。

【0050】

「相補性決定領域」または「CDR領域」または「CDR」は、配列が高度に可変であり、構造が定義されたループ（「超可変ループ」）を形成し、かつ/または抗原接触残基（「抗原接触点」）を含む抗体可変ドメイン内の領域である。CDRは主にエピトープとの結合に関与する。重鎖および軽鎖のCDRは、一般にCDR1、CDR2およびCDR3と呼ばれ、N末端から順に番号が付けられている。抗体重鎖の可変ドメインに位置するCDRはHCDR1、HCDR2およびHCDR3と呼ばれ、抗体軽鎖の可変ドメインに位置するCDRはLCDR1、LCDR2およびLCDR3と呼ばれる。軽鎖可変領域または重鎖可変領域の所定のア

10

20

30

40

50

ミノ酸配列において、各CDRの正確なアミノ酸配列境界は、多くのよく知られた抗体CDR指定システム（たとえば、抗体の三次元構造およびCDRループの形態に基づくChothia (Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883; Al-Lazikani et al., "Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))、抗体配列可変性に基づくKabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th edition, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987))、AbM (バース大学)、Contact (ロンドン大学)、International ImmunoGeneTicsデータベース (IMGT) (ワールド・ワイド・ウェブ上の imgt.cines.fr/)、多数の結晶構造を用いる親和性伝播クラスタリングに基づくNorth CDR定義)のいずれか1つまたはその組合せを用いて決定できる。

10

【0051】

たとえば、様々なCDR決定方式によれば、各CDRの残基は以下の通りである。

【表1】

CDR	Kabat方式	AbM方式	Chothia方式	Contact方式
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat付番系)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia付番系)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat付番系)				

20

【0052】

CDRは、参照CDR配列（たとえば本発明の例示的CDRのいずれか）と同じKabat付番位置を有することに基づいて決定することもできる。

30

【0053】

「CDR」または「CDR配列」という用語は、他に記載がない限り、本発明において上記の方法のいずれかによって決定されるCDR配列を包含する。

【0054】

特に記載のない限り、本発明では、抗体可変領域（重鎖可変領域の残基および軽鎖可変領域の残基を含む）の残基の位置を指す場合、Kabat付番系による付番位置を指す(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

【0055】

一実施態様では、本発明の抗体の重鎖可変領域CDRは以下の規則に従い決定される。

40

【0056】

VH CDR1はAbMの規定に従い決定され、VH CDR2および3はKabatの規定に従い決定される。

【0057】

一実施態様では、本発明の抗体の軽鎖可変領域CDRはKabatの規定に従い決定される。

【0058】

一実施態様では、本発明の抗体の重鎖可変領域CDRは以下の規定に従い決定される。すなわち、VH CDR1はAbMの規定に従い決定され、VH CDR2および3はKabatの規定

50

に従い決定され、軽鎖可変領域のCDRはKabatの規定に従い決定される。

【0059】

なお、異なる割当システムにより得られる抗体の可変領域のCDRの境界は異なり得る。すなわち、異なる割当システムにより定義される抗体の可変領域のCDR配列は異なる。したがって、本発明で定義される特定のCDR配列を有する抗体を定義するとすると、抗体の範囲は、可変領域配列は特定のCDR配列を含むが異なる方式（たとえば異なる割当システムの規則またはその組合せ）が適用された、本発明により定義される特定のCDR境界とは異なる特許請求の範囲に記載のCDR境界を有する抗体も包含する。

【0060】

異なる特異性（すなわち、異なる抗原に対する異なる結合部位）をもつ抗体は、（同じ割当システムで）異なるCDRを有する。しかし、CDRは抗体ごとに異なるが、CDR内の限られた数のアミノ酸位置のみが抗原結合に直接関与する。Kabat、Chothia、AbM、ContactおよびNorthの方法のうち少なくとも2つを用いて最小重複領域を決定して抗原結合に関する「最小結合単位」を得ることができる。最小結合単位はCDRの小部分であってもよい。当業者には明らかであるが、残りのCDR配列の残基は抗体構造およびタンパク質折畳みにより決定できる。したがって、本明細書に示されるCDRの任意の多様体も本発明で考慮される。たとえば、1つのCDR多様体では、最小結合単位中のアミノ酸残基は未変化のままであってもよく、KabatまたはChothiaにより定義される他のCDR残基は保存的アミノ酸残基で置換されていてもよい。

10

【0061】

「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のCH2およびCH3の定常領域を定義するために本明細書で使用され、この用語は、天然配列Fc領域および多様体Fc領域を包含する。天然のFc領域は、免疫細胞の表面の様々なFc受容体に結合でき、これはCDC\ADCC\ADCPエフェクター機能を引き起こすことができる。このようなエフェクター機能は一般に、Fc領域と結合ドメイン（抗体可変ドメインなど）の組合せを必要とする。実施態様によっては、Fc領域はそのCDC\ADCC\ADCPエフェクター機能を高めるよう変異される。実施態様によっては、Fc領域はそのCDC\ADCC\ADCPエフェクター機能を弱めるか欠失させるよう変異される。

20

【0062】

「IgG形態の抗体」は、抗体の重鎖定常領域が属するIgG形態を指す。同じ種類のすべての抗体の重鎖定常領域は同一であり、異なる種類の抗体の重鎖定常領域は異なる。たとえば、IgG4の形態の抗体は、IgG4由来のその重鎖定常領域のIgドメインを指す、あるいはIgG1の形態の抗体は、IgG1由来のその重鎖定常領域を指す。

30

【0063】

「ヒト化」抗体は、非ヒトCDRおよびヒトFR由来のアミノ酸残基を含む抗体を指す。実施態様によっては、ヒト化抗体は基本的に少なくとも1つ、通常は2つの可変ドメインのすべてを含み、CDRのすべてまたはほぼすべて（たとえば、CDR）は非ヒト抗体のものに対応し、FRのすべてまたはほぼすべてはヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、必要に応じてヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体（非ヒト抗体など）の「ヒト化形態」は、ヒト化された抗体を指す。

40

【0064】

「Knobs-into-holes」技術は、US 5731168、US 7695936などに記載されている。一般に、この方法は、第1のポリペプチドの界面には「ノブ」、第2のポリペプチドの界面には対応する「ホール」を導入することを含み、ノブをホール内に配置してヘテロ二量体の形成を促進し、ホモ二量体の形成を阻止できる。ノブは、第1のポリペプチドの界面から短いアミノ酸側鎖をより長い側鎖（チロシンまたはトリプトファンなど）に置き換えることで構築される。長いアミノ酸側鎖をより短い側鎖（アラニンまたはスレオニンなど）に置き換えることで、ノブと同じまたは似た大きさの埋合せ用のホールが第2のポリペプチドの界面に作成される。ノブおよびホールは、ポリペプチドをコードする核酸の変更（たとえば部位特異的変異誘発）またはペプチド合成により生成されてもよい。

50

【0065】

本明細書で使用される「結合」または「特異的結合」という用語は、抗原への結合相互作用が選択的であり、望ましくないあるいは非特異的な相互作用とは区別できることを意味する。抗原結合部位による特定の抗原に結合する能力は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）または当技術分野で知られている従来の結合アッセイ、たとえば放射免疫アッセイ（RIA）、薄層生体膜干渉アッセイ、MSDアッセイもしくは表面プラズモン共鳴（SPR）により決定できる。

【0066】

「免疫複合体」は、1種以上の他の物質（細胞傷害剤または標識が挙げられるが、これらに限定されない）と結合した抗体である。

10

【0067】

本明細書に記載の「治療剤」という用語は、腫瘍（がんなど）を予防あるいは治療するのに有効な任意の物質、たとえば化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、他の抗体、小分子薬または免疫調節剤（免疫抑制剤など）を包含する。

【0068】

本発明で使用される「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を阻害あるいは防止し、かつ/あるいは細胞死または破壊を引き起こす物質を指す。

「化学療法剤」は、免疫系疾患の治療に有用な化合物を包含する。

【0069】

「小分子薬」という用語は、生物学的過程を調節できる低分子量の有機化合物を指す。「小分子」は、分子量が10 kD未満、一般に2 kD未満、好ましくは1 kD未満の分子と定義される。小分子としては、無機分子、有機分子、無機成分を含む有機分子、放射性原子を含む分子、合成分子、ペプチド模倣物、および抗体模倣物が挙げられるが、これらに限定されない。治療剤としての小分子は、大分子よりも容易に細胞に浸透でき、分解を受けにくく、免疫応答を誘発しにくい。

20

【0070】

本明細書で使用される「免疫調節剤」という用語は、免疫応答を阻害あるいは調節する天然または合成の活性剤または薬物を指す。免疫応答は、体液性であっても細胞性であってもよい。免疫調節剤は免疫抑制剤を包含する。

【0071】

本明細書で使用される「免疫抑制剤」、「免疫抑制薬」、または「免疫抑制物質」は、免疫抑制療法において免疫系活性を抑制または遮断するのに用いられる治療剤である。

30

【0072】

「有効量」という用語は、単回または複数回の投与で患者に投与された後に、そのような治療または予防を必要とする患者に期待の効果を起こす、本発明の抗体または断片もしくは複合体もしくは組成物もしくは組合せの量または用量を指す。

【0073】

「治療有効量」は、必要な投与および必要な期間で所望の結果を有効に達成できる量を指す。治療有効量はまた、抗体または抗体断片もしくは組成物もしくは組合せの任意の毒性または有害作用が治療上有益な作用よりも少ない量である。「治療有効量」は、好ましくは、測定可能なパラメータ（腫瘍体積など）を未治療の対象と比較して少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、あるいはさらに好ましくは少なくとも約50%、60%または70%阻害する。

40

【0074】

「予防有効量」は、必要な投与で必要な期間、所望の予防結果を有効に達成できる量を指す。一般に、予防用量は対象における疾患の前または初期段階で用いられるため、予防有効量は治療有効量よりも少ない。

【0075】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、外来核酸が導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）を指す。宿主細胞は「形

50

質転換体」および「形質転換細胞」を包含し、これらは継代数に関係なく、一次形質転換細胞およびそれらに由来の子孫を包含する。子孫の核酸含有量は親細胞のものと厳密に同じでなくてもよく、変異を含んでもよい。本明細書では、最初に形質転換された細胞から選別あるいは選択された同じ機能または生物学的活性をもつ変異子孫が包含される。

【0076】

本明細書で使用される「標識」という用語は、試薬（ポリヌクレオチドプローブまたは抗体など）に直接的あるいは間接的に結合あるいは融合され、結合あるいは融合された試薬を検出しやすくする化合物または組成物を指す。標識自体は検出可能（たとえば、放射性同位体標識または蛍光標識）であってもよいし、酵素標識の場合、検出可能な基質化合物または組成物の化学変化を触媒してもよい。この用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリング（すなわち物理的に接続）することによるプローブまたは抗体の直接標識、および別の直接標識試薬と反応させることによるプローブまたは抗体の間接標識を包含するよう意図される。

10

【0077】

「個体」または「対象」は哺乳動物を包含する。哺乳動物としては、家畜（ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマなど）、霊長類（ヒト、およびサルなどの非ヒト霊長類など）、ウサギ、およびげっ歯類（マウス、ラットなど）が挙げられるが、これらに限定されない。実施態様によっては、個体または対象はヒトである。

【0078】

「単離」抗体は、その自然な環境の成分から分離された抗体である。実施態様によっては、抗体は電気泳動（たとえば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（たとえば、イオン交換または逆相HPLC）により95%または99%を超える純度に精製される。

20

【0079】

「抗CD3抗体またはその断片をコードする単離核酸」は、抗体の重鎖または軽鎖（またはその断片、たとえば重鎖可変領域または軽鎖可変領域）をコードする1つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター内のそのような核酸分子、および宿主細胞内の1箇所以上の位置に存在するそのような核酸分子を含む。

配列間の配列同一性の計算は以下のように行われる。

【0080】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一性百分率を決定するため、最適な比較を行う目的で配列を整列する（たとえば、最適な整列のために、ギャップを第1および第2のアミノ酸配列または核酸配列の一方または両方に導入してもよく、あるいは非相同配列を比較のため切り捨ててもよい）。好ましい実施態様では、比較のため、整列済み参照配列の長さは参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、60%、さらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列中の位置が第2の配列中の対応する位置で同じアミノ酸残基またはヌクレオチドに占められる場合、両方の分子はこの位置では同一である。

40

【0081】

数学的アルゴリズムを用いて2つの配列間の配列比較および同一性百分率の計算を行うことができる。好ましい実施態様では、2つのアミノ酸配列間の同一性百分率はNeedlemanおよびWunsch ((1970) J. Mol. Biol., 48:444-453)のアルゴリズム (<http://www.gcg.com>から利用可能)を用いて決定される。これは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムに組み込まれ、Blossom 62マトリクスまたはPAM250マトリクスと16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを用いる。さらに別の好ましい実施態様では、2つのヌクレオチド配列間の同一性百分率はGCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム (<http://www.gcg.com>から利用可能)でNWSgapdna.CMPマトリクスと40、50、60、70、または8

50

0のギャップ重みおよび1、2、3、4、5、または6の長さ重みを用いて決定される。特に好ましい(かつ他に記載のない限り用いられるべき)パラメータの組は、ギャップペナルティ12、ギャップ伸長ペナルティ4、フレームシフトギャップペナルティ5のBlossom 62点数化マトリクスである。ALIGNプログラムに組み込まれているE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム(2.0版)((1989) CABIOS, 4:11-17)で、PAM120重み付き剰余表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を用いて2つのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列間の同一性百分率を決定してもよい。それに加えて、あるいはそれに代えて、本明細書に記載の核酸配列およびタンパク質配列は、公開データベースに対して(たとえば、他のファミリーメンバー配列または関連配列を特定するために)検索を行うための「問合せ配列」としてもさらに使用できる。

10

【0082】

本明細書で使用される「低緊縮性、中緊縮性、高緊縮性、または極限緊縮性などの緊縮条件下でのハイブリダイゼーション」は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を表す。ハイブリダイゼーション反応を実行するための説明はCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に記載されている。同文献は参照により組み込まれる。水性および非水性の方法が参考文献に記載されており、いずれの方法を使用してもよい。本明細書に記載の具体的なハイブリダイゼーション条件は次のとおりである: 1) 低緊縮性のハイブリダイゼーション条件は、6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45、続いて0.2×SSC、0.1% SDS中少なくとも50で2回の洗浄(低緊縮性条件では、洗浄温度を55まで上げることができる); 2) 中緊縮性のハイブリダイゼーション条件は、6×SSC中約45、続いて0.2×SSC、0.1% SDS中約60で1回以上の洗浄; 3) 高緊縮性のハイブリダイゼーション条件は、6×SSC中約45、続いて0.2×SSC、0.1% SDS中65で1回以上の洗浄; 好ましくは4) 極限緊縮性のハイブリダイゼーション条件は、0.5 Mのリン酸ナトリウム、7% SDS中65、続いて0.2×SSC、0.1% SDS中65で1回以上の洗浄である。極限緊縮性条件(4)が好ましい条件であり、他に記載しない限り使用されるべき条件である。

20

【0083】

「抗腫瘍効果」という用語は、様々な手段(たとえば腫瘍体積、腫瘍細胞数、腫瘍細胞の増殖、または腫瘍細胞の生存などが挙げられるがこれらに限定されない)により実証できる生物学的効果を指す。

30

【0084】

「腫瘍」および「がん」という用語は、本明細書では互換的に使用され、固形腫瘍および液性腫瘍を包含する。

【0085】

「がん」および「がん性」という用語は、非制御の細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理学的疾患を指す、あるいは説明する。実施態様によっては、本発明の抗体による治療に適したがんとしては、胃がん、または膵臓がん(これらのがんの転移形態を含む)が挙げられる。

【0086】

「腫瘍」という用語は、悪性または良性にかかわらず、すべての新生細胞、またすべての前がんおよびがんの細胞および組織の成長および増殖を指す。「がん」、「がん性」および「腫瘍」という用語は、本明細書に記載の場合、相互に排他的ではない。

40

【0087】

本明細書で使用される場合、「腫瘍関連抗原」は、標的細胞の表面に示される抗原決定基を指し、標的細胞は腫瘍内の細胞、たとえばがん細胞および腫瘍基質細胞である。側面によっては、腫瘍関連抗原はHER2またはCD70またはクローディン18.2である。

【0088】

「薬学的補助物質」という用語は、活性物質と同時に投与される希釈剤、免疫賦活剤(たとえば、フロイントの(完全および不完全)アジュバント)、賦形剤、担体、または安

50

定剤などを指す。

【0089】

「医薬組成物」という用語は、その中に含まれる活性成分の生物学的活性を有効にする形態で存在し、かつ組成物の投与対象に対して許容できない毒性をもつさらなる成分を含まない組成物を指す。

【0090】

「薬学的組合せ」という用語は、固定されていない組合せ製品または固定された組合せ製品を指し、その例としては薬物キットおよび薬物組成物が挙げられるが、これらに限定されない。「固定されていない組合せ」という用語は、活性成分（たとえば、(i)本発明の抗CD3抗体またはその断片および(ii)他の治療剤）が特定の時間制限なく同時に、あるいは同じまたは異なる時間間隔で順に、別個の実体として患者に投与されることを意味する。ここで、これらの2種以上の活性物質は、患者に有効なレベルの予防または治療を提供するために投与される。実施態様によっては、薬学的組合せに用いられる本発明の抗CD3抗体またはその断片および他の治療剤は、それらが単独で使用される場合のレベルを超えないレベルで投与される。「固定された組合せ」という用語は、2種以上の活性剤が単一の実体の形態で患者に同時に投与されることを意味する。疾患または障害の治療で各成分の併用がいずれか1種の成分の単独使用よりも大きな効果を生み出すことができるように、2種以上の活性剤の用量および/または時間間隔を選択することが好ましい。各成分は独自の調製形態をとってもよく、それは同じでも異なってもよい。

10

【0091】

「併用療法」という用語は、本明細書に記載の疾患の治療に2つ以上の治療剤または治療様式（放射線療法または手術など）を適用することを指す。このような投与としては、これらの治療剤をほぼ同時に投与すること、たとえば一定比率の活性成分を含む単一のカプセルで同時投与することが挙げられる。あるいは、そのような投与としては、複数すなわち別個の容器（錠剤、カプセル、散剤および液体など）で各活性成分を併用投与することが挙げられる。散剤および/または液体を投与前に再構成あるいは希釈して必要な用量にしてもよい。さらに、本出願はまた、各種類の治療剤をほぼ同時に、あるいは異なる時点で連続して使用することを包含する。いずれの場合も、治療計画は、本明細書に記載の疾患または状態の治療において、薬学的組合せの有益な効果を提供する。

20

【0092】

本明細書で使用される場合、「治療」（または「治療する」もしくは「治療すること」）は、既存の症状、障害、状態または疾患の進行または重症度を遅らせる、妨げる、抑止する、軽減する、止める、低減する、または逆転させることを指す。

30

【0093】

本明細書で使用される「予防」（または「予防する」もしくは「予防すること」）は、疾患もしくは障害または特定の疾患もしくは障害の症状の発症または進行の阻害を包含する。実施態様によっては、がんの家族歴をもつ対象は予防投与計画の候補である。一般に、がんに関して「予防」という用語は、特にがんのリスクのある対象のがんの徴候または症状の発症前に薬物を投与することを指す。

【0094】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を増殖させられる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造として機能するベクター、およびそれらが導入された宿主細胞のゲノムに結合するベクターを包含する。ベクターによっては、作動可能に連結された核酸の発現を指示できる。このようなベクターを本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。

40

【0095】

「対象/患者/個体試料」は、患者または対象から得られた細胞または流体の集合を指す。組織または細胞試料の由来源は、たとえば新鮮、凍結、および/または保存の器官もしくは組織試料、生検試料、または穿刺試料から得られた固形組織；血液または任意の血液成分；脳脊髄液、羊水、腹水、または間質液などの体液；妊娠中または発生中の任意の

50

時点の対象から得られた細胞であってもよい。組織試料は、本来は組織と混ざらない化合物、たとえば保存剤、抗凝固剤、緩衝剤、固定剤、栄養剤、抗生物質を含んでもよい。

II. 抗体

【0096】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片はCD3（ヒトCD3またはカニクイザルCD3など）と必要な親和性で結合する。実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、ヒトCD3およびカニクイザルCD3の両方に結合できる。実施態様によっては、抗体の親和性は薄層干渉法または表面プラズモン共鳴により決定される。

【0097】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体は、0.5 nMから200 nMまでの間、好ましくは1 nM、5 nM、10 nM、15 nM、20 nM、25 nM、30 nM、35 nM、40 nM、45 nMまたは50 nMから180 nM、190 nMまたは200 nMまでの間、たとえば100 nM~200 nMの平衡解離定数 (K_D) で、ヒトCD3またはカニクイザルCD3に結合する。実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体は、10 nMから150 nMまでの間、すなわち10 nM~120 nMまたは10 nM~100 nMの K_D で、ヒトCD3E&G複合体またはヒトCD3E&D複合体に結合する。実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体は、検出不可可能な親和性でヒトCD3またはカニクイザルCD3に結合する。

【0098】

実施態様によっては、本発明の抗体またはその抗原結合断片はエフェクター細胞表面のCD3に結合する。実施態様によっては、本発明の抗体またはその抗原結合断片はエフェクター細胞を活性化できる。実施態様によっては、エフェクター細胞はT細胞、たとえばTリンパ球またはCD4+T細胞もしくはCD8+T細胞である。実施態様によっては、前記結合はフローサイトメトリーにより検出される。

【0099】

実施態様によっては、本発明の抗体またはその抗原結合断片は、エフェクター細胞を活性化して腫瘍細胞の死滅を誘導できる。

【0100】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、重鎖可変領域 (HCDR) 由来の3つの相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。

【0101】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、軽鎖可変領域 (LCDR) 由来の3つの相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む。

【0102】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、重鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域 (HCDR) および軽鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域 (LCDR) を含む。

【0103】

側面によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、重鎖可変領域 (VH) を含む。側面によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、軽鎖可変領域 (VL) を含む。側面によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、重鎖可変領域 (VH) および軽鎖可変領域 (VL) を含む。実施態様によっては、前記重鎖可変領域は、重鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域 (CDR) HCDR1、HCDR2およびHCDR3を含む。実施態様によっては、軽鎖可変領域は、軽鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域 (CDR) LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む。

【0104】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、抗体の重鎖の定常領域HCをさらに含む。実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、抗体の軽鎖の定常領域LCをさらに含む。実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、重鎖定常領域HCおよび軽鎖定常領域LCをさらに含む

10

20

30

40

50

【0105】

実施態様によっては、本発明の重鎖可変領域は、

(i) 配列番号47～75から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(ii) 配列番号47～75から選択されるアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(iii) 配列番号47～75から選択されるアミノ酸配列と比較して、1つ以上（好ましくは10以下、より好ましくは5つ、4つ、3つ、2つ、1つ以下）のアミノ酸変化（好ましくはアミノ酸置換、より好ましくは保存的アミノ酸置換）を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなり、好ましくは、前記アミノ酸変化はCDR領域で生じない。 10

【0106】

実施態様によっては、本発明の軽鎖可変領域は、

(i) 配列番号76～99から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(ii) 配列番号76～99から選択されるアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(iii) 配列番号76～99から選択されるアミノ酸配列と比較して、1つ以上（好ましくは10以下、より好ましくは5つ、4つ、3つ、2つ、1つ以下）のアミノ酸変化（好ましくはアミノ酸置換、より好ましくは保存的アミノ酸置換）を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなり、好ましくは、前記アミノ酸変化はCDR領域で生じない。 20

【0107】

実施態様によっては、本発明の重鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域(HCDR)であるHCDR1、HCDR2およびHCDR3は、

(i) 配列番号50～75のいずれかに示されるVHに含まれる3つの相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3、および

(ii)(i)のいずれかの配列と比較して少なくとも1つ、かつ5つ、4つ、3つ、2つまたは1つ以下のアミノ酸変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有する配列から選択される。 30

【0108】

実施態様によっては、本発明の軽鎖可変領域由来の3つの相補性決定領域(LCDR)であるLCDR1、LCDR2およびLCDR3は、

(i) 配列番号85～99のいずれかに示されるVLに含まれる3つの相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3、および

(ii)(i)のいずれかの配列と比較して少なくとも1つ、かつ5つ、4つ、3つ、2つまたは1つ以下のアミノ酸変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有する配列から選択される。 40

【0109】

実施態様によっては、HCDR1は配列番号1、4、5、6または22のアミノ酸配列を含むかその配列からなる、あるいはHCDR1は配列番号1、4、5、6または22のアミノ酸配列と比較して、1つ、2つ、または3つの変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0110】

実施態様によっては、本発明のHCDR1は、配列番号103のアミノ酸配列を含むかその配列からなり、

配列番号103のアミノ酸配列はGFTFX₁X₂X₃AMN（配列番号103）であり、 50

X₁はN、G、S、DまたはE、好ましくはN、GまたはSから選択され、
 X₂はT、G、LまたはR、好ましくはTまたはGから選択され、
 X₃はY、G、AまたはS、好ましくはY、AまたはSから選択され、かつ
 配列番号103は配列番号1と1つ、2つ、または3つのアミノ酸が異なる。

【0111】

実施態様によっては、HCDR2は配列番号2、7、9、10、11、12、23または24のアミノ酸配列を含むかその配列からなる、あるいはHCDR2は配列番号2、7、9、10、11、12、23または24のアミノ酸配列と比較して、1つ、2つ、または3つの変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0112】

実施態様によっては、本発明のHCDR2は、配列番号104のアミノ酸配列を含むかその配列からなり、

配列番号104のアミノ酸配列はRIX₁X₂KX₃X₄X₅YATYYADSVKD（配列番号104）であり、

X₁はR、G、AまたはS、好ましくはRまたはSから選択され、

X₂はS、G、LまたはR、好ましくはSまたはLから選択され、

X₃はY、G、AまたはS、好ましくはYまたはAから選択され、

X₄はN、G、S、DまたはE、好ましくはNまたはGから選択され、

X₅はN、G、S、DまたはE、好ましくはNまたはGから選択され、かつ

20

配列番号104は配列番号2と1つ、2つ、または3つのアミノ酸が異なる。

【0113】

実施態様によっては、HCDR3は配列番号3、8、13~21、25~28のいずれかのアミノ酸配列を含むかその配列からなる、あるいはHCDR3は配列番号3、8、13~21、25~28のいずれかのアミノ酸配列と比較して、1つ、2つ、または3つの変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0114】

実施態様によっては、本発明のHCDR3は、配列番号105のアミノ酸配列を含むかその配列からなり、

配列番号105のアミノ酸配列はX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉SWFAY（配列番号105）であり、

30

X₁はH、G、AまたはS、好ましくはHまたはAから選択され、

X₂はGまたはYであり、

X₃はN、G、S、DまたはE、好ましくはNまたはGから選択され、

X₄はF、G、AまたはS、好ましくはFまたはAから選択され、

X₅はGまたはYであり、

X₆はN、G、S、DまたはE、好ましくはN、QまたはGから選択され、

X₇はS、G、LまたはR、好ましくはSまたはRから選択され、

X₈はY、G、AまたはS、好ましくはYまたはAから選択され、

X₉はVまたはAから選択され、かつ

40

配列番号105は配列番号3と1つ、2つ、または3つのアミノ酸が異なる。

【0115】

実施態様によっては、LCDR1は配列番号29、32~36、41および42のいずれかのアミノ酸配列を含むかその配列からなる、あるいはLCDR1は配列番号29、32~36、41および42のいずれかのアミノ酸配列と比較して、1つ、2つ、または3つの変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0116】

実施態様によっては、本発明のLCDR1は、配列番号106のアミノ酸配列を含むかその配列からなり、

配列番号106のアミノ酸配列はX₁SSTGAV X₂X₃X₄YAN（配列番号106）で

50

あり、

X_1 は R、G、A または S、好ましくは R または G から選択され、
 X_2 は T、G、L または R、好ましくは T または G から選択され、
 X_3 は T、G、L または R、好ましくは T または G から選択され、
 X_4 は S、G、L または R、好ましくは S または R から選択され、かつ

配列番号 106 は配列番号 29 と 1 つ、2 つ、または 3 つのアミノ酸が異なる。

【0117】

実施態様によっては、LCDR2 は配列番号 30 または 45 のいずれかのアミノ酸配列を含むかその配列からなる、あるいは LCDR2 は配列番号 30 または 45 のいずれかのアミノ酸配列と比較して、1 つ、2 つ、または 3 つの変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。 10

【0118】

実施態様によっては、LCDR3 は配列番号 31、37、38、39、40、43、44 または 46 のいずれかのアミノ酸配列を含むかその配列からなる、あるいは LCDR3 は配列番号 31、37、38、39、40、43、44 または 46 のいずれかのアミノ酸配列と比較して、1 つ、2 つ、または 3 つの変化（好ましくはアミノ酸置換、好ましくは保存的置換）を有するアミノ酸配列を含む。

【0119】

実施態様によっては、本発明の LCDR3 は、配列番号 107 のアミノ酸配列を含むかその配列からなり、 20

配列番号 107 のアミノ酸配列は $ALX_1 X_2 X_3 X_4 LWV$ （配列番号 107）であり、

X_1 は W、G、A または S、好ましくは W または A から選択され、

X_2 は Y、G、A または S、好ましくは Y または A から選択され、

X_3 は S、G、L または R、好ましくは S または R から選択され、

X_4 は N、G、S、D または E、好ましくは N、G または D から選択され、かつ

配列番号 107 は配列番号 31 と 1 つ、2 つ、または 3 つのアミノ酸が異なる。

【0120】

実施態様によっては、本発明の抗体の重鎖定常領域 HC は、IgG1 または IgG2 または IgG3 または IgG4、好ましくは IgG1 の重鎖定常領域、たとえば LALA 変異を有する IgG1 定常領域である。実施態様によっては、本発明の抗体の軽鎖定常領域 LC は または 軽鎖定常領域、好ましくは 軽鎖定常領域である。 30

【0121】

実施態様によっては、本発明の抗体の重鎖定常領域 HC は、

(i) 配列番号 100 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、

(ii) 配列番号 100 から選択されるアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(iii) 配列番号 100 から選択されるアミノ酸配列と比較して、1 つ以上（好ましくは 20 以下または 10 以下、より好ましくは 5 つ、4 つ、3 つ、2 つ、1 つ以下）のアミノ酸変化（好ましくはアミノ酸置換、より好ましくは保存的アミノ酸置換）を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる。 40

【0122】

実施態様によっては、本発明の抗体の軽鎖定常領域 LC は、

(i) 配列番号 101 および 102 から選択されるアミノ酸配列と少なくとも 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、

(ii) 配列番号 101 および 102 から選択されるアミノ酸配列を含むか、その配列からなる、あるいは

(iii) 配列番号 101 および 102 から選択されるアミノ酸配列と比較して、1 つ以上（ 50

好ましくは20以下または10以下、より好ましくは5つ、4つ、3つ、2つ、1つ以下)の
アミノ酸変化(好ましくはアミノ酸置換、より好ましくは保存的アミノ酸置換)を有する
アミノ酸配列を含むか、その配列からなる。

【0123】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、
(i)配列番号47~51のいずれかのアミノ酸配列を含むかその配列からなる重鎖可変
領域VH、および

(ii)配列番号76~84のいずれかの項目のアミノ酸配列を含むかその配列からなる軽
鎖可変領域VL
を含む。

10

【0124】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、
(i)配列番号47に示されるアミノ酸配列または配列番号47と少なくとも90%、91%
、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミ
ノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号76に示されるアミノ酸配列
または配列番号76と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%
、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL

(ii)配列番号48に示されるアミノ酸配列または配列番号48と少なくとも90%、91
%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するア
ミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号77~84のいずれかに示
されるアミノ酸配列または配列番号77~84のいずれかと少なくとも90%、91%、92
%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配
列を含むか、その配列からなるVL、

20

(iii)配列番号49に示されるアミノ酸配列または配列番号49と少なくとも90%、91
%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するア
ミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号77~84のいずれかに示
されるアミノ酸配列または配列番号77~84のいずれかと少なくとも90%、91%、92
%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配
列を含むか、その配列からなるVL、

(iv)配列番号50に示されるアミノ酸配列または配列番号50と少なくとも90%の同
一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号77~84
のいずれかに示されるアミノ酸配列または配列番号77~84のいずれかと少なくとも9
0%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有
するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL、あるいは

30

(iv)配列番号51に示されるアミノ酸配列または配列番号51と少なくとも90%の同
一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号77~84
のいずれかに示されるアミノ酸配列または配列番号77~84のいずれかと少なくとも9
0%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有
するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL
を含む。

40

【0125】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、
(i)配列番号47~51のいずれかのアミノ酸配列と比較して、Kabatの付番によるH3
1、H32、H33、H52、H52A、H52C、H53、H54、H95、H96、H97、H98、H9
9、H100、H100A、H100B、H100C(Kabat番号)のうち1箇所、2箇所または3箇
所に、以下の変異、すなわち、

アミノ酸Y、WもしくはFからアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸R、KもしくはH
からアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸Gからアミノ酸Yへの変異、アミノ酸Nもしく
はQからアミノ酸G、S、DもしくはEへの変異、および/またはアミノ酸TもしくはSから
G、L、Rへの変異

50

から選択される変異を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる重鎖可変領域VH ; ならびに

(ii) 配列番号76~84のいずれかのアミノ酸配列と比較して、Kabatの付番によるL24、L28、L29、L30、L31、L53、L91、L92、L93、L94(Kabat番号)のうち1箇所、2箇所または3箇所に、以下の変異、すなわち、

アミノ酸Y、WもしくはFからアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸R、KもしくはHからアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸Gからアミノ酸Yへの変異、アミノ酸NもしくはQからアミノ酸G、S、DもしくはEへの変異、および/またはアミノ酸TもしくはSからG、L、Rへの変異

から選択される変異を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる軽鎖可変領域VLを含む。

10

【0126】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、

(i) 配列番号50のアミノ酸配列に、Kabatの付番によるH31、H32、H33、H52、H52A、H52C、H53、H54、H95、H96、H97、H98、H99、H100、H100A、H100B、H100C(Kabat番号)のうち1箇所、2箇所または3箇所に、以下の変異、すなわち、

アミノ酸Y、WもしくはFからアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸R、KもしくはHからアミノ酸G、AもしくはSへの変異、アミノ酸Gからアミノ酸Yへの変異、アミノ酸NもしくはQからアミノ酸G、S、DもしくはEへの変異、および/またはアミノ酸TもしくはSからG、L、Rへの変異

20

から選択される変異を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる重鎖可変領域VH ; ならびに

(ii) 配列番号80のアミノ酸配列に、Kabatの付番によるL24、L28、L29、L30、L31、L53、L91、L92、L93、L94(Kabat番号)のうち1箇所、2箇所または3箇所に、以下の変異、すなわち、

アミノ酸Y、WもしくはFからアミノ酸G、A、Sへの変異、アミノ酸R、KもしくはHからアミノ酸G、AもしくはSへの変異、アミノ酸Gからアミノ酸Yへの変異、アミノ酸NもしくはQからアミノ酸G、S、DもしくはEへの変異、および/またはアミノ酸TもしくはSからG、L、Rへの変異

30

から選択される変異を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる軽鎖可変領域VLを含む。

【0127】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、

(i) 配列番号52~75のいずれかに示されるVHに含まれる3つの相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3、ならびに配列番号80に示されるVLに含まれる3つの相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3、または

(ii) 配列番号50に示されるVHに含まれる3つの相補性決定領域HCDR1、HCDR2およびHCDR3、ならびに配列番号85~99のいずれかに示されるVLに含まれる3つの相補性決定領域LCDR1、LCDR2およびLCDR3

40

を含む。

【0128】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、

(1) 配列番号4~6のいずれかに示されるHCDR1、配列番号2に示されるHCDR2、および配列番号8に示されるHCDR3、ならびに配列番号29に示されるLCDR1、配列番号30に示されるLCDR2、および配列番号31に示されるLCDR3、

(2) 配列番号1に示されるHCDR1、配列番号7、9、10、11または12のいずれかに示されるHCDR2、および配列番号8に示されるHCDR3、ならびに配列番号29に示されるLCDR1、配列番号30に示されるLCDR2、および配列番号31に示されるLCDR3、

50

(3) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 1 3 ~ 2 1 のいずれかに示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(4) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 3 または 2 4 に示される HCDR2、および配列番号 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(5) 配列番号 2 2 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(6) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 2 5 ~ 2 8 のいずれかに示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(7) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 3 2 ~ 3 6、4 1、4 2 のいずれかに示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(8) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 7 ~ 4 0、4 3、4 4 のいずれかに示される LCDR3、または

(9) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 4 5 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 もしくは 4 6 に示される LCDR3 を含む。

【0129】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗 CD3 抗体またはその抗原結合断片は、

(1) 配列番号 1 0 3 に示される HCDR1、配列番号 1 0 4 に示される HCDR2、および配列番号 1 0 5 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(2) 配列番号 1 0 3 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 3 もしくは 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(3) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 1 0 4 に示される HCDR2、および配列番号 3 もしくは 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(4) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 1 0 5 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(5) 配列番号 1 0 3 に示される HCDR1、配列番号 1 0 4 に示される HCDR2、および配列番号 3 もしくは 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(6) 配列番号 1 0 3 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 1 0 5 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(7) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 1 0 4 に示される HCDR2、および配列番号 1 0 5 に示される HCDR3、ならびに配列番号 2 9 に示される LCDR1、配列番号 3 0 に示される LCDR2、および配列番号 3 1 に示される LCDR3、

(8) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 3 もしくは 8 に示される HCDR3、ならびに配列番号 1 0 6 に示される LCDR1、配列番号 3 0 もしくは 4 5 に示される LCDR2、および配列番号 1 0 7 に示される LCDR3、

(9) 配列番号 1 に示される HCDR1、配列番号 2 に示される HCDR2、および配列番号 3

もしくは8に示されるHCDR3、ならびに配列番号106に示されるLCDR1、配列番号30もしくは45に示されるLCDR2、および配列番号31に示されるLCDR3、

(10)配列番号1に示されるHCDR1、配列番号2に示されるHCDR2、および配列番号3もしくは8に示されるHCDR3、ならびに配列番号29に示されるLCDR1、配列番号30もしくは45に示されるLCDR2、および配列番号107に示されるLCDR3、または

(11)配列番号103に示されるHCDR1、配列番号104に示されるHCDR2、および配列番号105に示されるHCDR3、ならびに配列番号106に示されるLCDR1、配列番号30もしくは45に示されるLCDR2、および配列番号107に示されるLCDR3を含む。

【0130】

本発明の特定の実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、

(i)配列番号52～75のいずれかに示されるアミノ酸配列または配列番号52～75のいずれかと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号80に示されるアミノ酸配列または配列番号80と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVL、あるいは

(vii)配列番号50に示されるアミノ酸配列または配列番号50と少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVH、および配列番号85～99のいずれかに示されるアミノ酸配列または配列番号85～99のいずれかと少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなるVLを含む。

【0131】

本発明の一実施態様では、本明細書に記載のアミノ酸変化はアミノ酸の置換、挿入または欠失を含む。

【0132】

好ましい実施態様では、本発明に記載のアミノ酸変化はCDR領域で起こり、CDR領域内のこのアミノ酸変化により本発明の抗体のCD3との親和性を必要な程度、特に多重特異性抗体の構築に必要な程度に調整できる。実施態様によっては、各CDRのアミノ酸変化の数は、3つ、2つまたは1つ以下である。実施態様によっては、重鎖HCDRの組合せにおけるアミノ酸変化の数は、3つ、2つまたは1つ以下である。実施態様によっては、軽鎖HCDRの組合せにおけるアミノ酸変化の数は、3つ、2つまたは1つ以下である。実施態様によっては、上記のアミノ酸変化のアミノ酸位置は、重鎖のH31、H32、H33、H52、H52A、H52C、H53、H54、H95、H96、H97、H98、H99、H100、H100A、H100B、H100C (Kabatの付番) および軽鎖のL24、L28、L29、L30、L31、L53、L91、L92、L93、L94 (Kabatの付番) のうち1つ以上 (好ましくは重鎖CDRの組合せにおいて6つ以下、より好ましくは3つ以下、かつ/あるいは軽鎖CDRの組合せにおいて3つ以下) から選択される。好ましい実施態様では、アミノ酸変化はアミノ酸置換であり、芳香族アミノ酸Y、Wおよび/またはFが相対的に短い側鎖を持つアミノ酸G、Aおよび/またはSに変異する、正に荷電したアミノ酸R、Kおよび/またはHが相対的に短い側鎖を持つアミノ酸G、Aおよび/またはSに変異する、側鎖に水素原子を持つアミノ酸Gが芳香族アミノ酸Yに変異する、側鎖にアミド基を含むアミノ酸Nおよび/またはQがアミノ酸G、S、Dおよび/またはEに変異する、あるいは側鎖にヒドロキシルを含む非芳香族アミノ酸Tおよび/またはSがG、L、およびRに変異する。

【0133】

好ましい実施態様では、本発明に記載のアミノ酸変化はCDRの外の領域 (たとえばFR) で起こる。より好ましくは、本発明に記載のアミノ酸変化は重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域の外の領域で起こる。好ましくは、本明細書に記載のアミノ酸変化はアミノ酸置換、好ましくは保存的置換である。

【0134】

10

20

30

40

50

実施態様によっては、置換は保存的置換である。保存的置換は、アミノ酸を同じ分類の別のアミノ酸に置き換えることを指す。たとえば、1つの酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸に置き換える、1つの塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸に置き換える、あるいは1つの中性アミノ酸を別の中性アミノ酸に置き換える。置換の例を下の表に示す。

【表2】

元の残基	置換例	好ましい保存的アミノ酸置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, N-ロイシン	Leu
Leu (L)	N-ロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, N-ロイシン	Leu

10

20

【0135】

30

実施態様によっては、置換は抗体のCDR領域で起こる。一般に、得られた多様体は、親抗体と比較して、いくつかの生物学的特性に関して修飾（たとえば改善）を有し（たとえば、親和性の増加）、かつ/あるいは親抗体が基本的に保持するいくつかの生物学的活性を有する。置換多様体の例は、親和性成熟抗体である。

【0136】

実施態様によっては、本明細書で提供される抗体を修飾して抗体のグリコシル化度を増加あるいは減少させる。アミノ酸配列を変更して1つ以上のグリコシル化部位を作製あるいは除去することで、抗体のグリコシル化部位の付加または欠失を容易に実現できる。抗体がFc領域を含む場合、それに結合した糖質を修飾できる。用途によっては、不要なグリコシル化部位を除去する修飾（たとえばフコースモチーフを除去して抗体依存性細胞傷害（ADCC）の機能を改善すること）が有用な場合がある（Shield et al. (2002) JBC 277:26733を参照のこと）。他の用途では、ガラクトシル化の修飾を用いて補体依存性細胞傷害（CDC）を修飾できる。

40

【0137】

実施態様によっては、抗体の1つ以上の機能的特性、たとえば血清半減期、補体結合、補体依存性細胞傷害、Fc受容体結合、および/または抗体依存性細胞傷害を変化させるために、本明細書で提供される抗体のFc領域に1つ以上のアミノ酸修飾を導入してFc領域多様体を作製してもよい。Fc領域多様体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸変化（置換など）を含むヒトFc領域配列（ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFc領域など）を包含し得る。

50

【0138】

本発明の一実施態様では、本明細書に記載の抗体は、Fc領域に変更を導入して抗体のA DCC活性またはCDC活性を改善する。

【0139】

実施態様によっては、システイン操作により修飾された抗体、たとえば抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換された「thioMAb」などを作製することが必要であってもよい。

【0140】

実施態様によっては、本明細書で提供される抗体は、当技術分野で知られており容易に入手できる他の非タンパク質成分を含むようにさらに修飾されてもよい。抗体誘導体化に適した部分としては水溶性重合体が挙げられるが、これに限定されない。水溶性重合体の非限定的な例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコール共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジアン、ポリ-1,3,6-トリアン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダム共重合体)、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリエチレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(グリセリンなど)、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片は、以下の特徴のうち1つ以上を有する：

- (i) CD3に対して本発明の抗体と同じまたは似た結合親和性および/または特異性を示すこと；
- (ii) CD3に対する本発明の抗体の結合を阻害(たとえば、競合的に阻害)すること；
- (iii) 本発明の抗体と同じまたは重複するエピトープに結合すること；
- (iv) 本発明の抗体に競合してCD3に結合すること；
- (v) 本発明の抗体の1つ以上の生物学的特徴を有すること。

【0142】

実施態様によっては、本発明の抗CD3抗体はIgG1形態の抗体またはIgG2形態の抗体、またはIgG3形態の抗体、またはIgG4形態の抗体であり、好ましくはIgG1形態の抗体である。

【0143】

実施態様によっては、抗CD3抗体はモノクローナル抗体である。

【0144】

実施態様によっては、抗CD3抗体はヒト化型である。

【0145】

実施態様によっては、抗CD3抗体のフレーム配列の少なくとも一部はヒト共通フレーム配列である。

【0146】

一実施態様では、本発明の抗CD3抗体は、その抗体断片(抗原結合断片など)も包含し、好ましくは以下の抗体断片、すなわちFab、Fab'、Fab'-SH、Fv、単鎖抗体(scFvなど)、(Fab')₂、単ドメイン抗体、たとえばVHH、dAb(ドメイン抗体)、および線状抗体から選択される抗体断片である。

【0147】

一実施態様では、本発明の抗体断片は本明細書に記載のVHおよびVLならびにリンカー配列を含むscFvであり、リンカーは(GGGGS)_nであり、n=1、2、3、4または5であり、たとえばn=4である。

III. 多重特異性抗体

【0148】

10

20

30

40

50

本発明に記載のCD3抗体は、CD3および1種以上の他の抗原または標的に結合する多重特異性抗体、たとえば二重特異性抗体または三重特異性抗体を包含する。一実施態様では、多重特異性抗体は、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン、別の抗原に特異的に結合する第2の抗原結合ドメイン、および必要に応じて、他の抗原に特異的に結合する第3またはそれより多くの抗原結合ドメインを含む。

【0149】

実施態様によっては、他の抗原は腫瘍関連抗原である。実施態様によっては、腫瘍関連抗原は、HER2、CD70およびクローディン18.2から選択される。

【0150】

一実施態様では、本発明の抗体は、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域および第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体である。実施態様によっては、第2の抗原結合領域は腫瘍関連抗原に結合する。実施態様によっては、腫瘍関連抗原は、HER2またはCD70またはクローディン18.2である。

10

【0151】

実施態様によっては、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域は、上記のVHおよび/またはVLを含む。実施態様によっては、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域は、上述のHCDR1、HCDR2およびHCDR3、ならびに/またはLCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む。

【0152】

実施態様によっては、本発明の多重特異性抗体は、重鎖定常領域をさらに含む。実施態様によっては、本発明の多重特異性抗体は、軽鎖定常領域をさらに含む。実施態様によっては、本発明の多重特異性抗体は、重鎖定常領域および軽鎖定常領域をさらに含む。実施態様によっては、重鎖定常領域は、上記の重鎖定常領域から選択される。実施態様によっては、軽鎖定常領域は、上記の軽鎖定常領域から選択される。実施態様によっては、本発明の多重特異性抗体における軽鎖定常領域は、配列番号116のアミノ酸配列、または配列番号116と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる。実施態様によっては、本発明の多重特異性抗体の重鎖定常領域は、配列番号117、配列番号118、配列番号119または配列番号120のアミノ酸配列、またはそれらと少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、その配列からなる。実施態様によっては、異なる抗原結合領域に結合する重鎖定常領域は、同じであっても異なってもよい。実施態様によっては、異なる抗原結合領域に結合する軽鎖定常領域は、同じであっても異なってもよい。

20

30

【0153】

多重特異性抗体の任意の型または技術を用いて本発明の多重特異性抗体を調製できる。たとえば、第1の抗原結合特異性を有する抗体またはその断片を、1つ以上の他の分子実体、たとえば別の抗原結合特異性または他の抗原結合特異性を有する別の抗体もしくは抗体断片または他の抗体もしくは抗体断片と機能的に(たとえば、化学結合、遺伝子融合、非共有結合または他の方法で)連結して多重特異性抗原結合分子を作製できる。

【0154】

実施態様によっては、本発明の二重特異性抗体の形態は、IgG様および非IgG様抗体(Fan et al. (2015) Journal of Hematology & Oncology 8: 130)を包含する。最も一般的なIgG様抗体の形態は、2つのFab領域および1つのFc領域を含む。各Fabの重鎖および軽鎖は、別々のモノクローナル抗体に由来してもよい。非IgG様二重特異性抗体にはFc領域がなく、その各抗原または標的結合ドメインは、Fab、または単鎖可変断片(scFv)、または2つの抗体の可変ドメインを模倣する融合タンパク質であってもよい。異なる結合ドメインは、連結用ペプチド(peptide connector)、化学結合、非共有結合接続、または他の方法で連結される。

40

【0155】

本発明に関して使用できる二重特異性形態の具体例としては、TrioMab、CrossMab

50

/KiH、KiH、DVD-Ig、IgG-scFv、FIT-Ig、mAb-Trap、BiTE、DART、TandAb、ImmTAC、TriKEなどの構築基盤に基づく二重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0156】

実施態様によっては、本発明の二重特異性抗体は、KiHの形態の二重特異性抗体である。実施態様によっては、本発明の二重特異性抗体は、2つのFabおよび1つのFcを含み、第1のFabは、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域を含み、第2のFabは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する第2の抗原結合領域を含む（たとえば図5Aに示される形態）。

【0157】

別の実施態様では、本発明の二重特異性抗体は、1つのFab、1つのFc、および1つのscFvを含み、FabまたはscFvは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する第2の抗原結合領域を含み、scFvまたはFabは、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域を含む（たとえば、図6Aに示される形態）。実施態様によっては、Fabは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する第2の抗原結合領域を含み、scFvは、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域を含む。実施態様によっては、scFvは、腫瘍関連抗原に特異的に結合する第2の抗原結合領域を含み、Fabは、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合領域を含む。実施態様によっては、scFvは、VH-リンカー-VLまたはVL-リンカー-VHを含み得る。実施態様によっては、scFvは、VHを介してFcと接続されて二重特異性抗体を形成する。実施態様によっては、scFvは、VLを介してFcと接続されて二重特異性抗体を形成する。

【0158】

実施態様によっては、リンカーはペプチドリinkerである。ペプチドリinkerは、たとえば、(GS)_n、(GSGGS)_n、(GGGGS)_n、(GGGS)_n、および(GGGGS)_nGなどのグリシン-セリン重合体を包含する。nは1以上の整数（好ましくは2、3、4、5、6、7、8、9、10）である。有用なペプチドリinkerとしては、グリシン-アラニン重合体、アラニン-セリン重合体および他の柔軟なコネクターがさらに挙げられる。実施態様によっては、リンカーは(GGGGS)₄である。

【0159】

実施態様によっては、FcはIgG1 LALA配列由来である。実施態様によっては、CLは配列番号116のアミノ酸配列を含むかその配列からなる。

【0160】

実施態様によっては、腫瘍関連抗原はHER2である。実施態様によっては、HER2に特異的に結合する第2の抗原結合領域はトラスツズマブ由来である。

【0161】

実施態様によっては、腫瘍関連抗原はCD70である。実施態様によっては、CD70に特異的に結合する第2の抗原結合領域はWO2004073656のSGN70由来である。

【0162】

実施態様によっては、腫瘍関連抗原はクローディン18.2である。実施態様によっては、クローディン18.2に特異的に結合する第2の抗原結合領域はCN202010570517.X由来である。

IV. 本発明の核酸およびそれを含む宿主細胞

【0163】

一側面では、本発明は、上記の抗CD3抗体またはその断片のいずれかをコードする核酸を提供する。一実施態様では、この核酸を含むベクターが提供される。一実施態様では、このベクターはpcDNA3.1などの発現ベクターである。一実施態様では、核酸またはベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施態様では、この宿主細胞は真核細胞である。別の実施態様では、この宿主細胞は、酵母細胞、哺乳動物細胞（CHO細胞（CHO-Sなど）または293細胞（293F、たとえばExpi293Fなど）など）、および抗体またはその断片の調製に適した他の細胞から選択される。別の実施態様では、宿主細胞は原核細胞で

10

20

30

40

50

ある。

【0164】

一側面では、本発明は、本明細書に記載の抗CD3抗体またはその断片のいずれかをコードする核酸を提供する。本発明の前記核酸は、抗体の軽鎖可変領域および/もしくは重鎖可変領域のアミノ酸配列をコードする核酸、または抗体の軽鎖および/または重鎖のアミノ酸配列をコードする核酸を包含し得る。

【0165】

たとえば、本発明の核酸は、配列番号48~75および77~99のいずれかから選択されるアミノ酸配列をコードする、あるいは配列番号48~75および77~99のいずれかから選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸を包含する。

10

【0166】

本発明は、緊縮条件下で以下の核酸、すなわち配列番号48~75および77~99のいずれかに示されるものから選択されるアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む核酸、または配列番号48~75および77~99のいずれかに示されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%もしくは99%の同一性を有するアミノ酸配列をコードする核酸配列を含む核酸とハイブリダイズする、あるいはそれらの核酸と比較して1つ以上の置換(保存的置換など)、欠失または挿入を有する核酸を包含する。

20

【0167】

一実施態様では、核酸を含む1つ以上のベクターが提供される。一実施態様では、ベクターは真核発現ベクターなどの発現ベクターである。ベクターとしては、ウイルス、プラスミド、コスミド、ファージまたは酵母人工染色体(YAC)が挙げられるが、これらに限定されない。一実施態様では、ベクターはpcDNA3.1である。

【0168】

一実施態様では、ベクターを含む宿主細胞が提供される。抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適した宿主細胞としては、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞が挙げられる。たとえば、抗体を細菌で産生できる。

【0169】

一実施態様では、宿主細胞は真核細胞である。別の実施態様では、宿主細胞は、酵母細胞、哺乳動物細胞、および抗体またはその断片を調製するのに適した他の細胞から選択される。たとえば、糸状菌または酵母などの真核微生物は、抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現の適切な宿主である。たとえば、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌および酵母菌株は、部分的または完全なヒトグリコシル化パターンをもつ抗体の産生に導く。グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物(無脊椎動物および脊椎動物)にも由来する。脊椎動物細胞も宿主として使用できる。たとえば、懸濁増殖に適した哺乳動物細胞株を使用できる。有用な哺乳動物宿主細胞株のその他の例は、SV40で形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7)、ヒト胎児腎臓系(HEK293、293Fまたは293T細胞、たとえばExpi293Fなど)などである。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR-CHO細胞、CHO-S細胞、ExpiCHOなどを含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、およびY0、NS0、Sp2/0などの骨髓腫細胞株が挙げられる。抗体の産生に適した哺乳動物宿主細胞株は、当技術分野で知られている。

30

40

V. 本発明の抗体分子の産生および精製

【0170】

一側面では、本発明は、抗体分子の重鎖可変領域CDRおよび/または軽鎖可変領域CDRにアミノ酸変化を導入することを含む、抗CD3抗体またはその断片の結合親和性を調節する方法を提供する。

【0171】

一実施態様では、本発明は、本発明の抗体分子またはその断片(好ましくは抗原結合断

50

片)を調製する方法を提供し、この方法は、本発明の抗体分子またはその断片(好ましくは、抗原結合断片)をコードする核酸の発現に適した条件下で宿主細胞を培養すること、および必要に応じて、抗体またはその断片(たとえば抗原結合断片)を単離することを含む。特定の実施態様では、この方法は、宿主細胞から本発明の抗体分子またはその断片(抗原結合断片など)を回収することをさらに含む。

【0172】

一実施態様では、本発明の抗体分子を調製する方法が提供され、この方法は、抗体(1つのポリペプチド鎖および/もしくは複数のポリペプチド鎖のいずれかなど)をコードする核酸またはその核酸を含む発現ベクターを含む宿主細胞を上記のような抗体発現に適した条件で培養すること、ならびに必要に応じて宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から抗体を回収することを含む。

10

【0173】

本発明の抗体分子を組み換えて産生するために、抗体(上記の抗体、たとえば1つのポリペプチド鎖および/または複数のポリペプチド鎖のいずれかなど)をコードする核酸を分離し、宿主細胞でのさらなるクローニングおよび/または発現のために1つ以上のベクターに挿入する。従来の手順を用いて(たとえば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)このような核酸を容易に分離かつ配列決定できる。

【0174】

一実施態様では、本発明の抗体分子は、二重特異性抗体分子などの多重特異性抗体分子である。したがって、本発明は、CD3および他のがん関連抗原に結合する多重特異性抗体分子(二重特異性抗体分子など)を調製する方法も提供し、この方法は、抗体(1つのポリペプチド鎖および/またはそれ以上のポリペプチド鎖のいずれかなど)をコードする核酸またはこの核酸を含む発現ベクターを含む宿主細胞を上記の多重特異性抗体の発現に適した条件で培養すること、ならびに必要に応じて、宿主細胞(または宿主細胞培養培地)から抗体を回収することを含む。

20

【0175】

知られている既存の技術、たとえば高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどにより、本明細書に記載のとおり調製された抗体分子を精製できる。特定のタンパク質を精製するのに用いられる実際の条件は、当業者には自明な正味の電荷、疎水性、親水性などの要因にも依存する。本発明の抗体分子の純度は、サイズ排除クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィーなどを含む様々な周知の分析方法のいずれかにより決定できる。

30

VI. アッセイ

【0176】

本明細書で提供される抗CD3抗体は、当技術分野で知られる様々なアッセイを通じて、その物理的/化学的特性および/または生物学的活性により特定、選別あるいは特性評価できる。一方では、本発明の抗体の抗原結合活性は、たとえば、ELISA、ウェスタンブロッティングなどの知られた方法で試験される。当技術分野で知られた方法を用いてCD3への結合を決定でき、例示的な方法が本明細書に開示される。実施態様によっては、放射免疫アッセイ(RIA)または生体膜薄層干渉法またはMSDまたは表面プラズモン共鳴(SPR)またはフローサイトメトリーが使用される。

40

【0177】

他方では、競合アッセイを使用して、CD3への結合について、本明細書に開示の任意の抗CD3抗体と競合する抗体を特定できる。実施態様によっては、このような競合抗体は本明細書に開示の任意の抗CD3抗体と同じまたは重複するエピトープ(直鎖状または立体配座エピトープなど)に結合する。

【0178】

本発明は、生物学的活性を有する抗CD3抗体を特定するアッセイも提供する。生物学

50

的活性としては、たとえば、CD3への結合（たとえば、ヒトCD3またはカニクイザルCD3への結合）、CD3を発現する細胞への結合（T細胞、たとえばヒトTリンパ球（ジャーカット細胞など）など）、T細胞の活性化などを挙げることができる。インビボおよび/またはインビトロでこのような生物学的活性を有する抗体も提供される。

【0179】

実施態様によっては、本発明の抗体をこのような生物学的活性について試験する。

【0180】

上記のインビトロアッセイのいずれかに用いられる細胞としては、CD3を自然に発現するか、修飾によりCD3を発現あるいは過剰発現する細胞株が挙げられる。このような細胞は、CD3を発現する細胞株、ならびに通常はCD3を発現せず、CD3をコードするDNAを遺伝子導入された細胞株も包含する。実施態様によっては、このような細胞は、T細胞、たとえばジャーカット細胞などのヒトTリンパ球である。

【0181】

上記の決定方法のいずれにも、抗CD3抗体の代わりに、あるいは抗CD3抗体に追加して本発明の免疫複合体を使用できることが理解できる。

VII. 免疫複合体

【0182】

実施態様によっては、本発明は、本明細書に記載の任意の抗CD3抗体および他の物質、たとえば化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、他の抗体、小分子薬または免疫調節剤（抗炎症剤または免疫抑制剤）などの治療剤を含む免疫複合体を提供する。一実施態様では、細胞傷害性薬剤などの前記他の物質は、細胞に有害な任意の薬剤を包含する。

【0183】

実施態様によっては、前記免疫複合体は、がんの予防または治療に用いられる。

VIII. 医薬組成物および医薬製剤

【0184】

実施態様によっては、本発明は、本明細書に記載の任意の抗CD3抗体またはその抗体（好ましくはその抗原結合断片）またはその免疫複合体を含む組成物を提供し、好ましくは、この組成物は医薬組成物である。一実施態様では、この組成物は薬学的に許容される補助物質をさらに含む。一実施態様では、組成物、たとえば医薬組成物は、本発明の抗CD3抗体またはその断片またはその免疫複合体と1種以上の他の治療剤との組合せを含む。

【0185】

本発明はさらに、抗CD3抗体またはその免疫複合体を含む組成物（医薬組成物または医薬製剤を含む）、または抗CD3抗体をコードするポリヌクレオチドを含む組成物（医薬組成物または医薬製剤を含む）を包含する。実施態様によっては、この組成物は、1種以上のCD3結合抗体もしくはその断片、または1種以上の抗CD3抗体もしくはその断片をコードする1種以上のポリヌクレオチドを含む。これらの組成物は、薬学的に許容される適切な補助物質、たとえば薬学的に許容される担体および薬学的に許容される賦形剤（当技術分野で知られる緩衝剤を含む）をさらに含む。

【0186】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合するあらゆる溶媒、分散媒、等張剤および吸収遅延剤を包含する。

【0187】

薬学的に許容される補助物質の使用および用途については、"Handbook of Pharmaceutical Excipients", 8th edition, R.C. Rowe, P.J. Seskey and S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicagoも参照のこと。

【0188】

本発明の組成物は、様々な形態をとり得る。これらの形態としては、たとえば、液体、半固体および固体の剤形、たとえば溶液（たとえば、注射溶液および輸液）、粉剤または懸濁液、リポソームおよび坐剤が挙げられる。好ましい形態は、意図される投与方式および

び治療用途に依存する。

【0189】

本明細書に記載の抗体を含む医薬製剤は、必要な純度の本発明の抗体を、好ましくは凍結乾燥調剤または水溶液の形態で、1種以上の任意の薬学的に許容される補助材料と混合することにより調製できる。

【0190】

本発明の医薬組成物または製剤は、治療対象である特定の徴候に必要な2種以上の活性成分（好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない補完的な活性を有する活性成分）をさらに含むことができる。たとえば、化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、ワクチン、他の抗体、小分子薬または免疫調節剤などの他の治療剤も提供することが理想的である。前記活性成分は、意図される用途に有効な量で適切に組み合わせられる。

10

【0191】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の適切な例としては、抗体を含む固体疎水性重合体を含む半透性の基材が挙げられ、前記基材はフィルムまたはマイクロカプセルなどの成形品の形態である。

IX. 薬学的組合せおよびキット

【0192】

実施態様によっては、本発明はさらに、本発明の抗CD3抗体またはその断片（好ましくは抗原結合断片）またはその免疫複合体、および1種以上の他の治療剤（化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、他の抗体、小分子薬または免疫調節剤など）を含む薬学的組合せまたは薬学的組合せ製品を提供する。

20

【0193】

本発明の別の目的は、好ましくは薬物の投与単位の形態で、本発明の薬学的組合せを含むキットを提供することである。したがって、投薬計画または投薬間隔に従ってこの投薬単位を提供できる。

【0194】

一実施態様では、本発明のキットは、本発明の抗CD3抗体またはその断片を含む医薬組成物が入った第1の容器、および他の治療剤を含む医薬組成物が入った第2の容器を含む。

X. 使用および方法

30

【0195】

一方では、本発明は、治療上有効な本発明の抗CD3抗体もしくはその断片、免疫複合体、医薬組成物、薬学的組合せまたはキットを対象に投与することを含む、対象の腫瘍（がんなど）を予防あるいは治療する方法を提供する。

【0196】

実施態様によっては、がんなどの腫瘍は、固形腫瘍、血液腫瘍および転移病変を包含する。一実施態様では、固形腫瘍の例としては悪性腫瘍が挙げられる。がんは、初期、中期、後期、または転移性がんであり得る。実施態様によっては、腫瘍は、腫瘍の免疫回避状態にある。

【0197】

特定の実施態様では、本発明の抗CD3抗体は、T細胞を活性化できる。特定の実施態様では、本発明の抗体は、腫瘍細胞を死滅させ、かつ/あるいは腫瘍細胞の増殖を阻害できる。

40

【0198】

したがって、本発明の抗CD3抗体は、細胞障害性T細胞のエフェクター機構が必要とされる任意の腫瘍もしくはがん、またはT細胞動員を必要とする任意の腫瘍もしくはがんの予防または治療に適用できる。実施態様によっては、腫瘍またはがんの治療は、T細胞活性化、すなわち細胞傷害性T細胞のエフェクター機構またはT細胞動員により利益を得る。

【0199】

特定の側面では、本発明の抗CD3抗体は、CD3および1種以上の他のがん関連抗原（

50

がん特異的抗原／標的、がんで過剰発現する抗原／標的、またはがん関連抗原／標的)、たとえばHER2またはCD70またはクローニン18.2に特異的に結合する多重特異性抗体(二重特異性抗体など)である。

【0200】

対象は哺乳動物、たとえば霊長類、好ましくはヒトなどの高等霊長類(たとえば、本明細書に記載の疾患に罹患しているか、本明細書に記載の疾患を罹患するリスクのある個体)であり得る。一実施態様では、対象は、本明細書に記載の疾患(たとえば、がん)に罹患しているか、本明細書に記載の疾患に罹患するリスクがある。実施態様によっては、対象は他の治療、たとえば化学療法および／または放射線療法を受けているか受けたことがある。実施態様によっては、対象は、以前に免疫療法を受けたことがあるか、免疫療法を受けている。

10

【0201】

他の側面では、本発明は、本明細書に記載の目的、たとえば本明細書に記載の関連疾患または障害の予防または治療のために使用される、医薬品の製造または調製における抗体分子またはその断片またはその免疫複合体または医薬組成物または薬学的組合せまたはキットの使用を提供する。

【0202】

実施態様によっては、本発明の抗体分子またはその断片またはその免疫複合体または医薬組成物または薬学的組合せまたはキットは、疾患および／または疾患に関連する症状の発症を遅らせてもよい。

20

【0203】

実施態様によっては、本明細書に記載の用途、たとえば本明細書に記載の関連疾患または障害の予防および／または治療のために、本発明の抗体分子またはその断片またはその免疫複合体または医薬組成物または薬学的組合せまたはキットを1つ以上の他の治療、たとえば治療様式および／または他の治療薬と併用してもよい。実施態様によっては、治療様式としては、手術、放射線療法、局所照射または集束照射などが挙げられる。実施態様によっては、治療剤は、化学療法剤、サイトカイン、細胞傷害性薬剤、ワクチン、他の抗体、小分子薬および免疫調節剤から選択される。免疫調節剤の例としては、免疫抑制剤または抗炎症剤が挙げられる。

【0204】

実施態様によっては、本明細書に記載の抗体の組合せをたとえば別個の抗体として別個に投与することができる。

30

【0205】

このような併用療法は、併用投与(たとえば、2種以上の治療剤が同じまたは別個の製剤に含まれる)および異時投与を包含する。この場合、本発明の抗体の投与は、他の治療剤および／または薬物の投与の前、同時、および／または後に行われてもよい。

【0206】

医薬組成物の投与経路は既知の方法、たとえば経口、静脈内注射、腹腔内、脳内(実質)、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内または局所的経路、連続放出システムまたは留置型装置による方法に基づく。実施態様によっては、大量瞬時投与または持続注入または留置型装置により組成物を投与してもよい。

40

【0207】

組成物はまた、必要な分子を吸収あるいは被包させた留置型の膜、スポンジまたは別の適切な材料により局所投与されてもよい。実施態様によっては、留置型装置を用いる場合、装置は任意の適切な組織または器官に留置されてもよく、拡散、大量瞬時投与の時限放出、または継続投与により必要な分子を送達できる。

XI. 診断および検出のための方法および組成物

【0208】

実施態様によっては、本明細書で提供される抗CD3抗体またはその断片(好ましくは抗原結合断片)を生体試料中のCD3またはがん特異的標的の存在の検出に使用できる。

50

【0209】

本明細書で使用される「検出」という用語は、定量的または定性的検出を包含し、例示的な検出としては、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー（たとえばFACS）、抗体分子と複合体化された磁気ビーズ、ELISA、およびPCR技術（たとえばRT-PCR）が含まれ得る。実施態様によっては、生体試料は、生体供給源の血液、血清または他の流体試料である。特定の実施態様では、生体試料は細胞または組織を含む。実施態様によっては、生体試料は増殖性のあるいはがん性病変に関連する病変に由来する。

【0210】

一実施態様では、本発明の抗体は、がんなどの腫瘍を診断してたとえば対象における本明細書に記載の疾患の治療または進行、診断および/または病期分類を評価（たとえば監視）するために使用されてもよい。特定の実施態様では、標識された抗CD3抗体またはその断片が提供される。標識としては、直接検出される標識または部分（たとえば、蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識および放射性標識）、さらにはたとえば酵素反応または分子相互作用により間接的に検出される部分、たとえば酵素またはリガンドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0211】

実施態様によっては、試料はホルマリン固定後パラフィン被覆（FFPE）されている。実施態様によっては、試料は生検（コア生検など）、外科標本（外科的切除からの標本など）、または細針吸引物である。

【0212】

本発明のこれらのおよび他の側面ならびに実施態様について、図面（図面の簡単な説明が伴う）および以下の発明の詳細な説明に記載し、以下の実施例に示す。上記および本出願全体に記載の特徴のいずれかまたはすべてを本発明の様々な実施態様で組み合わせてもよい。以下の実施例は本発明をさらに例示する。なお、しかし、実施例は限定ではなく例示として記載されており、様々な変更が当業者によってなされてもよい。

【実施例】

【0213】

実施例1. マウスCD3抗体sp34のヒト化配列の設計

【0214】

マウスCD3抗体sp34（米国特許第8236308号；J. Immunol. Methods., 1994, 178:195）はT細胞を活性化する機能を持ち、腫瘍細胞特異的抗原分子とCD3アダプターを形成して、T細胞に腫瘍細胞を標的にし死滅させるよう促す。その免疫原性を低下させるために、本発明はまずその配列をヒト化する。

【0215】

sp34抗体のCDR領域を、重鎖CDR1にはAbM方式を包括的に用い、それ以外のCDRにはKabat方式を用いて定義する。配列類似性比較により、sp34と最も高い類似性を有する抗体生殖系を抗体鋳型として選択する。鋳型のCDR領域を軽鎖および重鎖のCDR領域で置き換えた後、シミュレーションされた三次元構造に従って重要なアミノ酸を逆変異させる。具体的なヒト化工程は以下のとおりである。

(1) sp34の重鎖可変領域抗体鋳型としてIGHV3-73*01およびIGHJ6*01（配列については下表を参照のこと）を選択し、sp34の軽鎖可変領域抗体鋳型として のIGKV3-7*02およびIGKJ1*01（配列については下表を参照のこと）、 のIGLV7-46*02およびIGLJ3*02（配列については下表を参照のこと）をそれぞれ選択し、抗体鋳型の重鎖または軽鎖のCDR領域をsp34のCDR領域で置き換え、可変領域配列husp34h.g0（配列番号48）、husp34k.g0（配列番号81）およびhusp34l.g0（配列番号77）をそれぞれ得る。

10

20

30

40

50

【表 3】

配列名	配列番号	配列
IGHV3-73*01	108	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWV RQASGKGLEWVGRIRSKANSYATAYAASVKGRFTISR DSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR [♯]
IGKV3-7*02	109	EIVMTQSPPTLSLSPGERVTLS CRASQSVSSSYLSWYQQ KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTDFLTISL QPEDFAVYYCQQDYNLP [♯]
IGLV7-46*02	110	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGHYPYWF QQKPGQAPRTLIYDTSNKHSWTPARFSGSLLGGKAAL TLLGAQPEDEAEYYCLLSYSGAR [♯]
IGHJ6*01	111	WGQGTITVTVSS
IGKJ1*01	112	FGGGTKVEIK
IGLJ3*02	113	FGGGTKLTVL

10

(2) Discovery Studioソフトウェアを用いて、sp34抗体の可変領域の相同モデル化を行い、sp34の可変領域の三次元構造モデルを得る。

(3) sp34抗体の可変領域構造から、重鎖と軽鎖の相互作用やCDRとの相互作用に影響する重要なアミノ酸を決定し、逆変異のアミノ酸部位を決定し、husp34h.g1(配列番号49)を得る。同時に、重鎖CDR3の潜在的脱アミド部位NSのアミノ酸NをQに変異させて、3つの重鎖可変領域配列husp34h.g2(配列番号50)およびhusp34h.g3(配列番号51)、ならびに6つの軽鎖可変領域配列husp34k.g1(配列番号82)、husp34k.g2(配列番号83)、husp34k.g3(配列番号84)、husp34l.g1(配列番号78)、husp34l.g2(配列番号79)およびhusp34l.g3(配列番号80)をそれぞれ得る。

20

実施例2. ヒト化抗体の調製

【0216】

実施例1の抗体可変領域配列の軽鎖と重鎖を組み合わせる。具体的な組合せについては表1を参照のこと。ヒトIgG1 L234A L235A配列(配列番号100)を重鎖定常領域として選択し、対応する定常領域CL- (配列番号102)およびCL- (配列番号101)を可変領域が または のいずれであるかに応じて軽鎖定常領域として選択する。次いで、抗体の重鎖配列および軽鎖配列をそれぞれ発現ベクター-pcDNA3.1(Invitrogen、V790-20)に構築し、各プラスミドを得た。Expi293細胞(Invitrogen、A14527)を用いて一過性に遺伝子導入し、対応するヒト化抗体を得た。具体的な遺伝子導入および精製工程は以下のとおりである。

30

【0217】

Expi293細胞を必要な遺伝子導入量に従って継代し、遺伝子導入の前日に細胞密度を 1.5×10^6 細胞/mlに調整した。遺伝子導入当日の細胞密度は約 3×10^6 細胞/mlであった。Opti-MEM培地(Gibco、31985-070)の最終容量の10分の1を遺伝子導入緩衝液として取り、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ の適切なプラスミドを遺伝子導入細胞に加えた。適切なポリエチレンイミン(PEI)(23966)をプラスミドに加え(293F細胞中のプラスミドとPEIの比1:3)、よく混ぜ合わせ、室温で20分間恒温放置してDNA/PEI混合物を得た。このDNA/PEI混合物をゆっくりと細胞に加えながらフラスコを静かに振り、次いで細胞を36.5%、8% CO²の恒温槽で培養した。7日後に細胞培養液が得られ、精製のために細胞上清を回収した。

40

【0218】

精製用タンパク質Aカラム(Hitrap Mabselect Sure、GE、11-0034-95)を0.1MのNaOHで2時間処理し、ガラス瓶を蒸留水で洗浄し、180℃で4時間乾燥させた。回収した細胞培養液を精製前に4500 rpmで30分間遠心分離した後、 $0.22 \mu\text{M}$ フィルタ

50

ーを用いて細胞を廃棄・濾過した。10カラム容量の結合緩衝液（リン酸ナトリウム20 mM、NaCl 150 M、PH7.0）を用いてタンパク質Aカラムを平衡化した。濾過した上清を精製カラムに加え、10カラム容量の結合緩衝液で平衡化した。5 mlの溶出緩衝液（クエン酸＋クエン酸ナトリウム0.1 M、pH3.5）を加えて溶出液を回収し、溶出液1 mlあたり80 μLの2Mの濃度のTris-HClを加えた。回収した抗体を濾過および濃縮によりPBS（Gibco、70011-044）に交換し、濃度を検出した。

【表4】

表1. sp34ヒト化抗体の軽鎖と重鎖の組合せ一覧

タンパク質ID	VH	配列番号	VL	配列番号
sp34	SP34_H	47	SP34_L	76
hzsp34.7	husp34h.g0	48	husp34l.g0	77
hzsp34.8	husp34h.g1	49	husp34l.g0	77
hzsp34.9	husp34h.g2	50	husp34l.g0	77
hzsp34.10	husp34h.g3	51	husp34l.g0	77
hzsp34.12	husp34h.g0	48	husp34l.g1	78
hzsp34.13	husp34h.g1	49	husp34l.g1	78
hzsp34.14	husp34h.g2	50	husp34l.g1	78
hzsp34.15	husp34h.g3	51	husp34l.g1	78
hzsp34.17	husp34h.g0	48	husp34l.g2	79
hzsp34.18	husp34h.g1	49	husp34l.g2	79
hzsp34.19	husp34h.g2	50	husp34l.g2	79
hzsp34.20	husp34h.g3	51	husp34l.g2	79
hzsp34.22	husp34h.g0	48	husp34l.g3	80
hzsp34.23	husp34h.g1	49	husp34l.g3	80
hzsp34.24	husp34h.g2	50	husp34l.g3	80
hzsp34.25	husp34h.g3	51	husp34l.g3	80
hzsp34.27	husp34h.g0	48	husp34k.g0	81
hzsp34.28	husp34h.g1	49	husp34k.g0	81
hzsp34.29	husp34h.g2	50	husp34k.g0	81
hzsp34.30	husp34h.g3	51	husp34k.g0	81
hzsp34.32	husp34h.g0	48	husp34k.g1	82
hzsp34.33	husp34h.g1	49	husp34k.g1	82
hzsp34.34	husp34h.g2	50	husp34k.g1	82
hzsp34.35	husp34h.g3	51	husp34k.g1	82
hzsp34.37	husp34h.g0	48	husp34k.g2	83
hzsp34.38	husp34h.g1	49	husp34k.g2	83
hzsp34.39	husp34h.g2	50	husp34k.g2	83
hzsp34.40	husp34h.g3	51	husp34k.g2	83
hzsp34.42	husp34h.g0	48	husp34k.g3	84
hzsp34.43	husp34h.g1	49	husp34k.g3	84
hzsp34.44	husp34h.g2	50	husp34k.g3	84
hzsp34.45	husp34h.g3	51	husp34k.g3	84

【0219】

表1に記載のhusp34h.g0またはhusp34h.g1のVHを有する抗体の重鎖HCDR1の配列は配列番号1、HCDR2の配列は配列番号2、HCDR3の配列は配列番号3、軽鎖LCDR1の配列は配列番号29、LCDR2の配列は配列番号30、軽鎖LCDR3の配列は配列番号31に示されている。表1に記載のhusp34h.g2またはhusp34h.g3のVHを有する

抗体の重鎖HCDR1の配列は配列番号1、HCDR2の配列は配列番号2、HCDR3の配列は配列番号8、軽鎖LCDR1の配列は配列番号29、LCDR2の配列は配列番号30、軽鎖LCDR3の配列は配列番号31に示されている。

実施例3．ヒト化抗体の親和性試験

3．1．生体層干渉法によるヒトCD3タンパク質およびカニクイザルCD3タンパク質との本発明の抗体の結合動態の決定

【0220】

ヒトCD3タンパク質およびカニクイザルCD3タンパク質に結合する本発明の抗体の平衡解離定数(KD)を生体層干渉法(BLI)で決定した。既存の方法(Estep, P et al., High throughput solution based measurement of antibody-antigen affinity and affinity binding (高処理量の溶液に基づく抗体-抗原親和性および親和性結合測定). MAbs, 2013.5 (2): 270-8)に従い、BLI法の親和性決定を行った。 10

【0221】

実験の30分前に、試料数に応じて適切な数のAHC(18-5060、Fortebio)センサを採用し、SD緩衝液(1×PBS、BSA 0.1%、Tween(登録商標)-20 0.05%)に浸漬した。

【0222】

100 μlのSD緩衝液、様々な抗体、ヒトCD3E&D複合体タンパク質(Sino Biological Inc., CT026H0323H)およびカニクイザルCD3E&D複合体タンパク質(Sino Biological Inc., CT032-C0323H)を黒色の96ウェルポリスチレン半定量マイクロウェルプレート(Greiner、675076)にそれぞれ加えた。検出にはFortebio Octet Red96を用い、試料の位置に応じてセンサの位置を選択した。機器の設定パラメータは次のとおりである。操作工程：ベースライン、固相化(約1 nm)、ベースライン、結合および解離；各工程の操作時間は試料の結合および解離の速度に依存する。回転速度は1000 rpm、温度は30 °Cであった。ForteBio Octet解析ソフトウェアを用いてKD値を解析した。 20

【0223】

上記の決定方法に記載の実験で、抗体の親和性を表2に示す。ここで、「N.B」は「結合なし」を表し、hzsp34.12~hzsp34.15、hzsp34.17~hzsp34.20、hzsp34.22~hzsp34.25の親和性はマウスsp34(10^{-10} ~ 10^{-9} M)と同等だが、hzsp34.37~hzsp34.40、hzsp34.42~hzsp34.45の親和性は低下している(10^{-9} ~ 10^{-8} M)。 30

【表 5】

表2. sp34ヒト化抗体の結合動態定数

	ヒトCD3E&Dとの親和性			カニクイザルCD3E&Dとの親和性		
	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
sp34	9.319E-10	2.04E+06	1.90E-03	6.46E-10	1.23E+06	7.95E-04
hzsp34.7	結合なし			1.655E-09	2.79E+05	4.63E-04
hzsp34.8	結合なし			結合なし		
hzsp34.9	結合なし			結合なし		
hzsp34.10	結合なし			結合なし		
hzsp34.12	6.192E-09	6.40E+05	3.96E-03	4.732E-09	4.79E+05	2.26E-03
hzsp34.13	4.329E-09	1.08E+06	4.66E-03	1.75E-09	9.37E+05	1.64E-03
hzsp34.14	2.41E-09	6.61E+05	1.59E-03	1.946E-10	4.88E+05	9.49E-05
hzsp34.15	3.128E-09	6.44E+05	2.02E-03	1.75E-09	6.58E+05	1.15E-03
hzsp34.17	5.105E-10	4.04E+06	2.06E-03	5.145E-10	1.78E+06	9.15E-04
hzsp34.18	6.286E-10	3.31E+06	2.08E-03	6.7E-10	1.31E+06	8.80E-04
hzsp34.19	6.132E-10	3.80E+06	2.33E-03	6.023E-10	1.64E+06	9.90E-04
hzsp34.20	8.473E-10	3.25E+06	2.75E-03	7.556E-10	1.46E+06	1.10E-03
hzsp34.22	6.049E-10	3.54E+06	2.14E-03	5.845E-10	1.52E+06	8.86E-04
hzsp34.23	5.538E-10	3.57E+06	1.98E-03	6.045E-10	1.31E+06	7.91E-04
hzsp34.24	7.175E-10	3.44E+06	2.47E-03	7.38E-10	1.28E+06	9.41E-04
hzsp34.25	1.165E-09	2.35E+06	2.73E-03	8.569E-10	1.07E+06	9.13E-04
hzsp34.27	結合なし			結合なし		
hzsp34.28	結合なし			2.824E-09	4.15E+05	1.17E-03
hzsp34.29	結合なし			結合なし		
hzsp34.30	結合なし			結合なし		
hzsp34.32	結合なし			結合なし		
hzsp34.33	結合なし			結合なし		
hzsp34.34	結合なし			結合なし		
hzsp34.35	結合なし			結合なし		
hzsp34.37	9.157E-09	4.36E+05	3.99E-03	6.238E-09	3.21E+05	2.00E-03
hzsp34.38	1.271E-08	3.97E+05	5.05E-03	6.36E-09	2.88E+05	1.83E-03
hzsp34.39	7.847E-09	4.51E+05	3.54E-03	7.098E-09	2.86E+05	2.03E-03
hzsp34.40	1.679E-08	3.07E+05	5.15E-03	1.529E-08	1.96E+05	3.00E-03
hzsp34.42	1.472E-08	3.57E+05	5.26E-03	1.021E-08	2.43E+05	2.48E-03
hzsp34.43	1.264E-08	3.59E+05	4.53E-03	7.916E-09	2.53E+05	2.01E-03
hzsp34.44	1.646E-08	3.53E+05	5.81E-03	1.212E-08	2.41E+05	2.93E-03
hzsp34.45	1.842E-08	3.53E+05	6.50E-03	2.687E-08	1.94E+05	5.21E-03

10

20

30

40

3.2. ジャーカット細胞株を用いるヒトCD3との本発明の抗体の結合の検出

【0224】

ジャーカット細胞は、ヒトCD3複合体を発現する不死化ヒトTリンパ球である。この細胞株を用いて、細胞との抗体の結合を検出する。詳細な操作は以下のとおりである。ジャーカット細胞 (Promega、J1621) をU字96ウェルプレートにウェルあたり 2×10^5 で接種した。一連の濃度勾配 (抗体分子の初期濃度は500 nM、3倍段階希釈) の検出対象抗体を対応する細胞ウェルに加え、4 で30分間恒温放置した後、PBSを用いて未結合部分を洗浄した。ヒツジ抗ヒトFcのPE蛍光二次抗体 (Southern Biotech、J2815-5H87B) を加えた後、4 で15分間恒温放置し、フローサイトメトリー (FACSCELIS

50

TA、BD)で検出した。結果から、ヒト化抗体hzsp34.17~hzsp34.20、hzsp34.22~hzsp34.25は細胞レベルでキメラ抗体sp34と同等の親和性を示したが、hzsp34.37~hzsp34.40、hzsp34.42~hzsp34.45の1対1の対応するタンパク質レベルでの親和性は低下したことがわかった(図1A、BおよびC)。これらの抗体のいくつかを選択して、細胞レベルの結合曲線をさらに作成した。結果を図1Dに示したが、これは、細胞レベルで異なるCD3親和性をもつヒト化抗体の結合をより良く示し、hzsp34.24およびキメラ抗体sp34のT細胞との結合は最も近かった。

実施例4. ヒト化抗体のT細胞活性化機能の検出

【0225】

本発明は、ジャーカットNFAT(活性化T細胞核因子)レポーター細胞(Promega、J 1621)を用いてsp34ヒト化抗体のT細胞活性化機能を検出する。細胞は改変ジャーカットT細胞である。この細胞は、TCR-CD3経路を介して活性化されると下流のシグナルNFATを介してルシフェラーゼ基質を実験系内に放出するため、T細胞の活性化の程度を検出できる。

10

【0226】

この例の詳細な操作は以下のとおりである。白色の平坦な96ウェルプレートに、ウェルあたり 4×10^4 個のジャーカットNFAT細胞を各ウェル内の対応する濃度の各抗体分子と混合し(抗体分子の初期濃度は500 nM、3倍段階希釈)、37°Cの恒温槽に6~8時間恒温放置した。その後、100 μ LのBio-Glo(Promega、G7940)を各ウェルに加えた。マイクロプレートリーダー(Spectra、Molecular Devices)を用いて波長検出を行った。結果を図2AおよびBに示した。sp34ヒト化抗体のT細胞活性化能力はその親和性と対応関係をもつことがわかる。

20

実施例5. ヒト化抗体のCDR変異体

5.1. 変異体の設計および調製

【0227】

同時に、CD3とのその親和性を低下させる目的で本発明でヒト化sp34抗体のCDR領域のアミノ酸変異を行い、異なる腫瘍特異的抗原に対するCD3アダプターの要求を満たす異なるT細胞活性化能力を有する分子を得た。

【0228】

具体的な操作は以下のとおりである。hzsp34.24を初期配列に採用し、重鎖H31、H32、H33、H52、H52A、H52C、H53、H54、H95、H96、H97、H98、H99、H100、H100A、H100B、H100C(Kabatによる付番)および軽鎖L24、L28、L29、L30、L31、L53、L91、L92、L93、L94(Kabatによる付番)の部位のアミノ酸を標的アミノ酸として選択し、次いで点変異および組合せ変異をそれぞれ行った。重鎖可変領域配列husp34h.g2.1~husp34h.g2.24(配列については配列表を参照のこと)および軽鎖可変領域配列husp34lg3.1~husp34lg3.15(配列については配列表を参照のこと)をそれぞれ得た。点変異の基本原理表3に示す。芳香族アミノ酸Y、WおよびFを相対的に短い側鎖を持つアミノ酸G、AおよびSに変異させる、正に荷電したアミノ酸R、KおよびHを相対的に短い側鎖を持つアミノ酸G、AおよびSに変異させる、側鎖に水素原子を持つアミノ酸Gを芳香族アミノ酸Yに変異させる、側鎖にアミド基を含むアミノ酸NおよびQをアミノ酸G、S、DおよびEに変異させる、あるいは側鎖にヒドロキシル基を持つ非芳香族アミノ酸TおよびSをG、LおよびRに変異させる。芳香族アミノ酸Y、WおよびFを相対的に短い側鎖を持つアミノ酸G、AおよびSに変異させる理由は、芳香族アミノ酸は側鎖の疎水性ベンゼン環の構造を介して分子間の疎水性相互作用に参与することが多く、側鎖は大きな空間を占めることから、それらを相対的に短い側鎖を持つアミノ酸に変異させると、抗体と抗原の間の相互作用が変化する可能性があるからである。

30

40

【0229】

正に帯電したアミノ酸R、KおよびHを相対的に短い側鎖を持つアミノ酸G、AおよびSに変異させる理由は、正に帯電したアミノ酸は側鎖の正電荷を介して分子間の電荷相互作用に参与することが多く、R、Kの側鎖は大きな空間を占めることから、相対的に短い側

50

鎖を持つアミノ酸に変異させると、抗体と抗原の間の相互作用が変化する可能性があるからである。

【0230】

水素原子の側鎖を持つアミノ酸Gを芳香族アミノ酸Yに変異させる理由は、アミノ酸Gの側鎖はすべてのアミノ酸の中で最も小さな空間を占めるからである。より大きな側鎖を持つアミノ酸Yに変異させると、立体障害の増加により、抗体と抗原の間の相互作用が変化する可能性がある。

【0231】

側鎖にアミド基を持つアミノ酸NおよびQをアミノ酸G、S、D、Eに変異させる理由は、側鎖にアミド基を持つアミノ酸N\Qの構造がD\Eの構造に似ているからである。N\QをD\Eに変異させると、抗体と抗原の間の相互作用を完全に破壊することなくわずかに弱める可能性がある。GおよびSへの変異の目的は、側鎖を直接減らすことであり、それによって抗体と抗原の間の相互作用が変化する可能性がある。

【0232】

側鎖にヒドロキシル基を含む非芳香族アミノ酸TおよびSをG、LおよびRに変異させる理由は、アミノ酸T\Sの側鎖はヒドロキシル基を含んでいたからである。最小の側鎖を持つG、中央の側鎖を持つ疎水性アミノ酸L、ならびにより大きな側鎖および正電荷を有するアミノ酸Rにそれぞれ変異させることは、抗体と抗原の間の相互作用を様々な程度で変化させることである。

【表6】

表3. アミノ酸変異の表

標的アミノ酸	変異アミノ酸
Y, W, F	G, A, S
R, K, H	G, A, S
G	Y
N, Q	G, S, D, E
T, S	G, L, R

【0233】

上記のように得た抗体の軽鎖および重鎖可変領域配列を組み合わせる。具体的な組合せについては表4を参照のこと。ヒトIgG1 L234A L235A配列(配列番号100)を重鎖定常領域として選択し、対応する定常領域CL- (配列番号102)およびCL- (配列番号101)を可変領域が または のいずれであるかに応じて軽鎖定常領域として選択する。次いで、抗体の重鎖配列および軽鎖配列をそれぞれ発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen、V790-20)に構築し、Expi293細胞 (Invitrogen、A14527)に一過性に遺伝子導入し、対応するヒト化抗体を得た。具体的な遺伝子導入工程は実施例2と同じである。

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表4. sp34ヒト化CDR変異抗体の軽鎖と重鎖の組合せの表

タンパク質ID	VH	配列番号	HCDR1配列番号	HCDR2配列番号	HCDR3配列番号	VL	配列番号	LCDR1配列番号	LCDR2配列番号	LCDR3配列番号
hzsp34.78	husp34h.g 2.1	52	4	2	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.79	husp34h.g 2.2	53	5	2	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.80	husp34h.g 2.3	54	6	2	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.81	husp34h.g 2.4	55	1	7	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.82	husp34h.g 2.5	56	1	9	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.83	husp34h.g 2.6	57	1	10	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.84	husp34h.g 2.7	58	1	11	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.85	husp34h.g 2.8	59	1	12	8	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.86	husp34h.g 2.9	60	1	2	13	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.87	husp34h.g 2.10	61	1	2	14	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.88	husp34h.g 2.11	62	1	2	15	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.89	husp34h.g 2.12	63	1	2	16	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.90	husp34h.g 2.13	64	1	2	17	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.91	husp34h.g 2.14	65	1	2	18	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.92	husp34h.g 2.15	66	1	2	19	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.93	husp34h.g 2.16	67	1	2	20	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.94	husp34h.g 2.17	68	1	2	21	husp34l .g3	80	29	30	31
hzsp34.95	husp34h.g 2.18	69	22	2	8	husp34l .g3	80	29	30	31

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

hzsp34. 96	husp34h. g 2. 19	70	1	23	8	husp341 . g3	80	29	30	31
hzsp34. 97	husp34h. g 2. 20	71	1	24	8	husp341 . g3	80	29	30	31
hzsp34. 98	husp34h. g 2. 21	72	1	2	25	husp341 . g3	80	29	30	31
hzsp34. 99	husp34h. g 2. 22	73	1	2	26	husp341 . g3	80	29	30	31
hzsp34. 10 0	husp34h. g 2. 23	74	1	2	27	husp341 . g3	80	29	30	31
hzsp34. 10 1	husp34h. g 2. 24	75	1	2	28	husp341 . g3	80	29	30	31
hzsp34. 10 2	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 1	85	32	30	31
hzsp34. 10 3	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 2	86	33	30	31
hzsp34. 10 4	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 3	87	34	30	31
hzsp34. 10 5	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 4	88	35	30	31
hzsp34. 10 6	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 5	89	36	30	31
hzsp34. 10 7	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 6	90	29	30	37
hzsp34. 10 8	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 7	91	29	30	38
hzsp34. 10 9	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 8	92	29	30	39
hzsp34. 11 0	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 9	93	29	30	40
hzsp34. 11 1	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 10	94	41	30	31
hzsp34. 11 2	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 11	95	42	30	31
hzsp34. 11 3	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 12	96	29	30	43
hzsp34. 11 4	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 13	97	29	30	44
hzsp34. 11 5	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 14	98	29	45	31
hzsp34. 11 6	husp34h. g 2	50	1	2	8	husp341 g3. 15	99	29	45	46

10

20

30

40

5 . 2 . 変異体の親和性試験およびT細胞活性化機能試験

【 0 2 3 4 】

Sp34のヒト化CDR変異体とヒトCD3のタンパク質レベルの親和性試験を生体層干渉法（BLI）を用いて行った。具体的な方法は実施例3.1と同じである。結果を表5に示す。ヒトCD3E&G複合体（Sino Biological Inc.、CT041-H0305H）に対する抗体の親和性レベルは $1.11 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 9.50 \times 10^{-9} \text{ M}$ であり、ヒトCD3E&D複合体（Sino Biological Inc.、CT026H0323H）に対する親和性レベルは $1.03 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 9.77 \times 10^{-10} \text{ M}$ である。

50

【表 8】

表5. sp34ヒト化CDR変異抗体のヒトCD3との親和性

タンパク質I D	ヒトCD3E&G親和性			ヒトCD3E&D親和性		
	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
sp34	6.22E-09	2.40E+05	1.49E-03	6.38E-10	2.46E+05	1.57E-04
hzsp34.24	8.00E-09	2.24E+05	1.79E-03	9.75E-10	2.40E+05	2.34E-04
hzsp34.78	8.97E-09	2.50E+05	2.24E-03	1.35E-09	2.23E+05	3.00E-04
hzsp34.79	6.36E-09	2.42E+05	1.54E-03	5.07E-10	2.33E+05	1.18E-04
hzsp34.80	1.54E-08	1.38E+05	2.13E-03	6.55E-09	2.25E+05	1.47E-03
hzsp34.81	1.11E-08	1.42E+05	1.57E-03	7.69E-09	1.86E+05	1.43E-03
hzsp34.82	1.20E-08	1.59E+05	1.91E-03	1.03E-08	1.63E+05	1.68E-03
hzsp34.83	3.60E-09	2.20E+05	7.91E-04	9.28E-10	2.16E+05	2.00E-04
hzsp34.84	4.89E-09	2.33E+05	1.14E-03	8.12E-10	2.46E+05	2.00E-04
hzsp34.85	8.08E-09	2.49E+05	2.01E-03	1.32E-09	2.30E+05	3.04E-04
hzsp34.86	6.61E-09	2.19E+05	1.44E-03	1.39E-09	2.55E+05	3.54E-04
hzsp34.87	6.06E-09	1.65E+05	9.97E-04	8.80E-10	1.73E+05	1.52E-04
hzsp34.88	1.58E-08	1.30E+05	2.05E-03	4.55E-09	1.75E+05	7.97E-04
hzsp34.89	1.38E-08	2.05E+05	2.82E-03	6.62E-09	1.42E+05	9.40E-04
hzsp34.91	8.53E-09	2.28E+05	1.95E-03	1.88E-09	2.80E+05	5.28E-04
hzsp34.92	4.82E-09	2.10E+05	1.01E-03	7.72E-10	2.59E+05	2.00E-04
hzsp34.93	3.42E-09	2.45E+05	8.36E-04	9.76E-10	2.66E+05	2.60E-04
hzsp34.94	4.63E-09	1.77E+05	8.21E-04	9.77E-10	2.05E+05	2.00E-04
hzsp34.95	結合なし			結合なし		
hzsp34.96	結合なし			結合なし		
hzsp34.97	1.10E-08	1.35E+05	1.48E-03	5.62E-09	2.78E+05	1.56E-03
hzsp34.98	結合なし			9.15E-09	2.01E+05	1.84E-03
hzsp34.99	結合なし			9.63E-09	1.14E+05	1.10E-03
hzsp34.100	8.33E-09	2.05E+05	1.71E-03	1.13E-09	2.43E+05	2.76E-04
hzsp34.101	4.30E-09	1.48E+05	6.36E-04	3.77E-09	2.17E+05	8.20E-04
hzsp34.102	8.52E-09	2.22E+05	1.90E-03	1.69E-09	2.50E+05	4.23E-04
hzsp34.103	7.57E-09	2.53E+05	1.91E-03	1.34E-09	2.43E+05	3.25E-04
hzsp34.104	8.54E-09	2.31E+05	1.98E-03	1.93E-09	2.81E+05	5.42E-04
hzsp34.105	1.06E-08	1.99E+05	2.10E-03	1.30E-09	2.35E+05	3.07E-04
hzsp34.106	1.03E-08	2.30E+05	2.37E-03	1.54E-09	2.36E+05	3.65E-04
hzsp34.107	5.98E-08	7.46E+04	4.46E-03	8.44E-09	1.67E+05	1.41E-03
hzsp34.108	7.19E-09	2.03E+05	1.46E-03	9.65E-10	2.07E+05	2.00E-04
hzsp34.109	9.02E-09	2.33E+05	2.10E-03	1.15E-09	2.25E+05	2.58E-04
hzsp34.110	8.49E-09	2.22E+05	1.88E-03	9.51E-10	2.10E+05	2.00E-04
hzsp34.111	9.50E-09	2.01E+05	1.91E-03	1.94E-09	2.35E+05	4.54E-04
hzsp34.112	6.60E-09	2.35E+05	1.55E-03	7.22E-10	2.82E+05	2.04E-04
hzsp34.113	3.71E-09	2.19E+05	8.11E-04	1.02E-09	1.96E+05	2.00E-04
hzsp34.114	6.69E-09	2.00E+05	1.34E-03	1.08E-09	2.62E+05	2.82E-04
hzsp34.115	7.70E-09	2.38E+05	1.84E-03	1.26E-09	2.64E+05	3.31E-04
hzsp34.116	1.60E-08	1.79E+05	2.86E-03	4.11E-09	2.23E+05	9.14E-04

10

20

30

40

【 0 2 3 5 】

Sp34のヒト化CDR変異体の細胞レベルでのCD3に対する親和性試験方法は実施例3.2と同じである。結果を図3Aおよび図3Bに示す。Sp34の抗体と比較して、hzsp34.40、hzsp34.42、hzsp34.45を除き、hzsp34.80、hzsp34.81、hzsp34.82、hzsp34.87、hzsp34.88、hzsp34.89、hzsp34.91、hzsp34.97、hzsp34.99、hzsp34.101、hzsp34.107およびhzsp34.116の親和性は様々に減少した。いくつかのクローンを選択し、より多くの抗体濃度勾配でのジャーカット細胞レベルでの結合を調べた。結果を図3Cに示す。結果は、様々なCDR変異体のCD3に対する異なる親和性を示す。

50

【 0 2 3 6 】

ジャーカットNFAT細胞を用いてsp34ヒト化CDR変異体のT細胞活性化機能を検出した。検出方法は実施例4と同じであった。結果を図4に示す。Sp34ヒト化抗体のCDR変異体は、いずれもT細胞の下流シグナル経路を活性化できるが、活性化の程度は異なる。実施例6．インビトロのHer2×CD3二重特異性抗体の活性試験

【 0 2 3 7 】

sp34ヒト化抗体の一価親和性および腫瘍関連抗原依存的なT細胞の活性化能力を試験するために、Her2×CD3を標的とする「1+1」型の二重特異性抗体分子を構築し、発現させた。ここで、抗Her2の可変領域配列は、市販薬トラスツズマブ由来であり、重鎖可変領域配列は

【 化 1 】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY
WGQGTLLVTV

10

(配列番号114)であり、軽鎖可変領域配列は

【 化 2 】

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS
GVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK

20

(配列番号115)である。抗CD3の可変領域配列はsp34ヒト化抗体(hzsp34.24、hzsp34.80、hzsp34.87、hzsp34.97、hzsp34.99、hzsp34.101)の可変領域配列を用いる。knob-into-holeのIgG1LALA配列(A. Margaret Merchant et al., Nature Biotechnology, 1998)を抗体のFcセグメントとして選択する(各ドメインの配列は以下のとおりである)。抗体の模式図を図5Aに示す。

CL:

【 0 2 3 8 】

【 化 3 】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

30

(配列番号116)

CH1+CH2+CH3 (ノブ):

【 0 2 3 9 】

【 化 4 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

40

(配列番号117)

CH1+CH2+CH3 (ホール):

【 0 2 4 0 】

50

【化5】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

(配列番号118)

10

【0241】

Biacore (GE Healthcare、T200) を用いて Her2 × CD3 二重特異性抗体の CD3 平衡解離定数 (KD) を決定した。具体的な方法は以下のとおりである。

【0242】

ヒトCD3E&G抗原 (Sino Biological Inc.、CT041-H0305H) およびカニクイザルCD3E&D抗原タンパク質 (Sino Biological Inc.、CT032-C0323H) をチップ表面に結合させた。その後、チップ表面抗原と移動相中の抗体との結合および解離を検出して、親和性および動態的定数を得た。この方法は、チップの調製および親和性検出を含む。10倍希釈した10 × HBS-EP+(BR-1006-69、GE Healthcare)を測定時の実験緩衝液として用いた。アミノカップリングキット (BR-1006-33、GE Healthcare) をチップ調製工程に使用し、ヒトCD3E&G抗原およびカニクイザルCD3E&G抗原をCM5チップ (29-1496-03、GE Healthcare) の表面に結合させ、高すぎる結合密度により起こる強すぎる親和性を避けるため、結合レベルは100 RU以下であった。カップリング後、1 Mのエタノールアミンを注入して残りの活性化部位を塞いだ。抗体の各濃度について、親和性検出サイクルを実行する。各サイクルは、この濃度の抗体への結合およびチップ再生を含む。段階希釈後の抗体 (Her2-sp34.24: 初期濃度32 nM、2倍段階希釈; Her2-sp34.87: 初期濃度200 nM、2倍段階希釈; Her2-sp34.80、Her2-sp34.97、Her2-sp34.99、Her2-sp34.101: 初期濃度800 nM、2倍段階希釈; すべて5つの濃度点になるよう希釈した) を流速30 μl/分、結合時間180秒、解離時間600秒で低濃度から高濃度の順にチップ表面に流した。最後に、10 mMのグリシンpH1.5 (BR-1003-54、GE Healthcare) を用いてチップを再生した。データ結果をBiacore T200分析ソフトウェア (3.1版) を用いて分析した。動力学的分析について使用した分析モデルは1:1の組合せモデルであった。試験結果を表6に示す。Her2 × CD3 二重特異性抗体における一価sp34ヒト化抗体およびそのCDR変異体は、ヒトおよびカニクイザルCD3に対して異なる親和性勾配を示した。

20

30

40

50

【表 9】

表6. Her2×CD3二重特異性抗体におけるsp34ヒト化抗体とCD3の親和性

抗体名	ヒトCD3E&Gとの親和性			カニクイザルCD3E&Dとの親和性		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
Her2-hzsp34.24	1.60E+06	7.79E-03	4.88E-09	1.11E+06	8.00E-03	7.20E-09
Her2-hzsp34.80	4.97E+05	4.91E-01	9.87E-07	5.96E+05	7.80E-03	1.31E-06
Her2-hzsp34.87	3.27E+05	4.62E-02	1.41E-07	1.45E+05	3.50E-02	2.42E-07
Her2-hzsp34.97	5.28E+05	1.91E-01	3.61E-07	5.43E+05	1.77E-01	3.27E-07
Her2-hzsp34.99	1.30E+05	8.17E-02	6.27E-07	8.34E+04	1.00E-01	1.20E-06
Her2-hzsp34.101	6.37E+05	1.01E-01	1.59E-07	5.51E+05	9.87E-02	1.79E-07

10

【0243】

Her2×CD3二重特異性抗体のT細胞活性化能力を検証するために、ジャーカットNFAT（活性化T細胞核因子）細胞（J1621、Promega）のルシフェラーゼレポート系を用いて二重特異性抗体分子のT細胞活性化機能を検出した。この細胞株は、TCR/CD3細胞内下流シグナルのNFATシグナル経路を介してルシフェラーゼの発現を活性化し、これによりT細胞の活性化を検出する。

20

【0244】

具体的な方法は以下のとおりである。96ウェル白色平底の細胞培養プレートで、各ウェルに 8×10^5 個の標的細胞SK-BR-3（JCRB0834、JCRB細胞バンク）および 4×10^6 個のエフェクター細胞ジャーカットNFAT細胞を加え、次いで対応する濃度のHer2×CD3二重特異性抗体分子（Her2-sp34.24、Her2-sp34.87およびHer2-sp34.101は初期濃度10 nMであり、4倍希釈；Her2-sp34.80は初期濃度200 nMであり、4倍希釈；Her2-sp34.97およびHer2-sp34.99は初期濃度100 nMであり、4倍希釈）を加えた後、37℃の恒温槽で16時間培養した。次いで、培養プレートを取り出し、Bio-Glo（G7940、Promega）を加えた。マイクロプレートリーダー（Spectra、Molecular Devices）を用いて波長検出を行った。結果を図5Bに示す。Her2-sp34.24、Her2-sp34.87、Her2-sp34.101、Her2-sp34.97、Her2-sp34.99、Her2-sp34.80はT細胞の活性化能力（高い順に）を有する。

30

実施例7．インビトロのCD70/CD3二重特異性抗体活性試験

【0245】

本発明では、CD70×CD3を標的とする「1+1」型の二重特異性抗体分子も構築し、発現させた。ここで、抗CD70の変領域配列は、SGN70（WO2004073656の配列番号14および配列番号24）由来であり、抗CD3の変領域配列はsp34ヒト化抗体可変領域配列に由来し、scFv形態（図6A）を採用する。sp34の各タイプの配列は、それぞれ「重鎖-軽鎖(HL)」および「軽鎖-重鎖(LH)」の配列を採用し（sp34.24LHは軽鎖-重鎖、の配列を表し、sp34.24HLは重鎖-軽鎖の配列を表す。他の分子についても同じ）、(GGGGG)₄で接続されている。knob-into-holeのIgG1 LALA配列（A. Margaret Merchant et al., Nature Biotechnology, 1998）をFcセグメントとして用いた。抗体の構造の概略を図6Aに示す。ここで、ノブのCH3は点変異Y349C（EU付番系）を有し、ホールのCH3は点変異S354C（EU付番系）を有する。配列は以下のとおりである。

40

CL：配列番号116

CH1+CH2+CH3（ノブ）：

50

【 0 2 4 6 】

【 化 6 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
 TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

10

(配列番号119)

CH1+CH2+CH3 (ホール):

【 0 2 4 7 】

【 化 7 】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC
 PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
 HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
 KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

20

(配列番号120)

【 0 2 4 8 】

各二重特異性抗体のCD3平衡解離定数(KD)をBiacore(GE Healthcare、T200)を用いて決定した。方法は実施例6と同様であり、測定結果を表7に示す。いくつかの二重特異性抗体SGN70-sp34.80HLおよびSGN70-sp34.99HLは、構造変化のためより低い親和性を有する。

【 表 1 0 】

表7. SGN70×CD3二重特異性抗体中のscFvの形態のsp34ヒト化抗体のCD3との親和性

30

抗体名	ヒトCD3E&Gとの親和性			カニクイザルCD3E&Dとの親和性		
	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
SGN70-sp34.24LH	1.50E+05	1.46E-02	9.80E-08	1.13E+05	1.58E-02	1.41E-07
SGN70-sp34.24HL	2.65E+05	2.90E-02	1.10E-07	1.69E+05	3.02E-02	1.79E-07
SGN70-sp34.80LH	4.97E+04	2.01E-01	4.06E-06	1.15E+05	7.49E-01	6.49E-06
SGN70-sp34.80HL	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし
SGN70-sp34.87LH	3.21E+05	1.07E-01	3.35E-07	8.57E+04	4.66E-02	5.44E-07
SGN70-sp34.87HL	5.04E+05	2.53E-01	5.01E-07	3.08E+05	1.95E-01	6.33E-07
SGN70-sp34.97LH	8.13E+04	2.53E-01	3.11E-06	6.38E+04	3.33E-01	5.22E-06
SGN70-sp34.97HL	7.99E+04	4.16E-01	5.20E-06	1.28E+05	7.05E-01	5.50E-06
SGN70-sp34.99LH	1.23E+05	9.93E-01	8.06E-06	1.49E+04	2.17E-01	1.46E-05
SGN70-sp34.99HL	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし	結合なし
SGN70-sp34.101LH	2.90E+05	1.19E-01	4.09E-07	2.35E+05	1.44E-01	6.14E-07
SGN70-sp34.101HL	3.47E+05	1.67E-01	4.80E-07	2.69E+05	1.77E-01	6.58E-07

40

【 0 2 4 9 】

ジャーカットNFAT細胞のレポート系を検出に用いた。具体的な方法は以下のとおりである。白色の平底の96ウェル細胞培養プレートで、各ウェルに 8×10^5 個の標的細胞NOMO-1(CBP60515、Nanjing Cobiaer Biosciences co., LTD)および 4×10^6 個

50

のエフェクター細胞ジャーカットNFAT細胞を加え、次いで対応する濃度のCD70×CD3二重特異性抗体分子（初期濃度100 mM、5倍希釈）を加えた後、37 °Cの恒温槽で16時間培養した。次いで、培養プレートを取り出し、Bio-Glo（G7940、Promega）を加えた。マイクロプレートリーダー（Spectra、Molecular Devices）を用いて波長検出を行った。結果を図6Bに示す。いくつかの二重特異性抗体SGN70-sp34.24LH、SGN70-sp34.24HL、SGN70-sp34.87LH、SGN70-sp34.87HL、SGN70-sp34.101HLおよびSGN70-sp34.101LHは強いT細胞活性化能力を有するが、いくつかの二重特異性抗体、たとえばSGN70-sp34.80HL、SGN70-sp34.80LH、SGN70-sp34.97HL、SGN70-sp34.97LH、SGN70-sp34.99HLおよびSGN70-sp34.99LHは相対的に弱いT細胞活性化を有する。このことは、CD70の末端のSGN70抗体の低い親和性およびNOMO-1細胞表面の低いCD70存在量と関連する可能性がある。

10

実施例 8 . CD3/クローディン18.2二重特異性抗体の構築および調製

【0250】

表8の組合せに従い、抗クローディン18.2（CLDN18.2）モノクローナル抗体HB37A6（CN202010570517.Xを参照のこと；配列情報を表9に示す）と3種の異なる抗ヒトCD3モノクローナル抗体HzSP34.24、HzSP34.87およびHzSP34.97の抗原結合領域の配列をそれぞれ用いて、CLDN18.2×CD3を標的とする「1+1」型の二重特異性抗体030、032および033を構築した。それらの抗体構造の概略を図7に示す。具体的には、knob-into-hole構造のIgG1 LALA配列を抗体のFcセグメントとして選択した（A. Margaret Merchant et al., Nature Biotechnology, 1998）。したがって、二重特異性抗体のCLDN18.2末端の重鎖は配列番号121、軽鎖は配列番号122である。二重特異性抗体のCD3末端の重鎖は配列番号123、125および126、軽鎖は配列番号124である。

20

【0251】

二重特異性抗体のプラスミド構築の工程は以下のとおりである。CLDN18.2の重鎖配列（配列番号：121）、CLDN18.2の軽鎖配列（配列番号：122）、CD3の重鎖配列（配列番号123、125および126）、およびCD3の軽鎖配列（配列番号124）をベクターpcDNA3.1（Invitrogen、V790-20）に挿入して、CLDN18.2末端の重鎖プラスミドおよびCLDN18.2末端の軽鎖プラスミド、ならびにCD3末端の重鎖プラスミドおよびCD3末端の軽鎖プラスミドを得た。次いで、PEI（Polysciences、23966）を用いて、CLDN18.2末端の重鎖プラスミド、CLDN18.2末端のCLDN18.2末端の軽鎖プラスミド、ならびにCD3末端の重鎖プラスミドおよびCD3末端の軽鎖プラスミドについて、プラスミドをExpi293細胞（Invitrogen、A14527）に一過性に遺伝子導入し、CLDN18.2の半抗体分子および3つのCD3末端の半抗体を得た。7日後、細胞発酵ブロスを得て濾過し、清澄化し、Hitrap Mabsselect Sureのタンパク質Aカラム（GE Healthcare、11-0034-95）でそれぞれ捕捉して、CLDN18.2およびCD3末端の半抗体を得た。A280法で半抗体の濃度を検出した後、両末端の半抗体を1:1の比で混合した。次いで適量の還元剤GSHを加えて室温で一晩反応させた。限外濾過により還元剤を除去して反応を終了させた。その後、MonoS陽イオン交換クロマトグラフィー（GE Healthcare、17-5168-01）を用いて高純度精製を行った。A液は20 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.6）、B液は1 Mの塩化ナトリウムを含む20 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.6）であった。溶出勾配は0~50%（30カラム容量）であった。溶出したタンパク質溶液を限外濾過し、PBS（Gibco、70011-044）に移した。質量分析法で分子量を決定し、SEC-HPLCで純度を確認した。得られた030、032および033二重特異性抗体を以下の実施態様で使用する。

30

40

50

【表 1 1】

表8. CD3/CLDN18. 2二重特異性抗体の一覧

	抗CLDN18. 2末端	抗CD3末端
030	HB37A6	HzSP34. 24
032	HB37A6	HzSP34. 87
033	HB37A6	HzSP34. 97

【表 1 2 - 1】

表9: 二重特異性抗体の情報

配列番号		ノブ (CH1+CH2+CH3)
117		ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGGPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号		ホール (CH1+CH2+CH3)
118		ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLSDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
配列番号		二重特異性抗体のCLDN18. 2末端HB37A6
121	重鎖	EVQLLDSDGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSSYVMSWVRQAPGKGLNWVSTISH SGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAIDAPYYDILT GYRYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
122	軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGRVITTCRAQSISWLAWYQQKPKAPKLLIYKASSLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDFFATYYCQYNSYSYTFGGGTKLEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNFPYPREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVT EQDQKDSYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号		二重特異性抗体のCD3末端HzSP34. 24
123	重鎖	EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSAAAGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRS KYNRYATYYADSVKDRFTISRDDSSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGGQ SYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLSDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

124	軽鎖	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
配列 番号		二重特異性抗体のCD3末端HzSP34. 87	
125	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRS KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHYNFGQ SYVSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
124	軽鎖	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
配列 番号		二重特異性抗体のCD3末端HzSP34. 97	20
126	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRS KAGGYATYYADSVKDRFTISRDDSKSTLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGQ SYVSWFAYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
124	軽鎖	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTN KRAPGVPARFSGSLLGDKAALTLLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGQGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	

実施例 9 . 二重特異性抗体の親和性の決定

【0252】

ヒトCD3タンパク質に結合する本発明の二重特異性抗体の平衡解離定数 (KD) を生体層干渉法 (BLI) で決定した。既存の方法 (Estep, P et al., High throughput solution based measurement of antibody-antigen affinity and affinity binding (高処理量の溶液に基づく抗体-抗原親和性および親和性結合測定). MAbs, 2013.5 (2): 270-8) に従い、BLI法の親和性決定を行った。

【0253】

実験の30分前に、試料数に応じて適切な数のAHC (18-5060、Fortebio) センサを採用し、SD緩衝液 (1×PBS、BSA 0.1%、Tween (登録商標) -20 0.05%) に浸漬した。100 μlのSD緩衝液、各二重特異性抗体およびヒトCD3タンパク質 (CT026H0323H、Sino Biological Inc.) を黒色の96ウェルポリスチレン半定量マイクロウェルプレート (Greiner、675076) に加えた。検出にはFortebio Octet Red96を用い、試料の位置に応じてセンサの位置を選択した。機器の設定パラメータは次のとおりである。操作工程: ベースライン、固相化 (約1 nm)、ベースライン、結合および解離; 各工程の

10

20

30

40

50

操作時間は試料の結合および解離の速度に依存した。回転速度は1000 rpm、温度は30であった。ForteBio Octet 解析ソフトウェアを用いてKD値を解析した。

【0254】

二重特異性抗体の親和性を表10に示した。030分子のCD3部分の親和性が最も高く、7.4 nMであった。次に、032および033分子のCD3部分の親和性は、それぞれ89 nMおよび440 nMで減少した。

【表13】

表10. 二重特異性抗体のCD3部分の親和性

	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
030	6.927E+5	0.005164	7.455E-9
032	8.066E+5	0.07183	8.906E-8
033	3.788E+5	0.1689	4.459E-7

10

【0255】

ヒトCLDN18.2への結合の平衡解離定数(K_D)を表面プラズモン共鳴(SPR)で決定した。アミノカップリングキット(GE Healthcare、BR-1006-33)を製造元の指示に従って使用し、抗原ヒトクロードイン18.2(GenScrip、P50251802)をCM5チップ(GE Healthcare、29-1496-03)の表面に結合させた。カップリング後、1 Mのエタノールアミンを注入して残りの活性化部位を塞いだ。チップ表面抗原と移動相中の様々な二重特異性抗体との結合および解離をBiacore(GE Healthcare、T200)で製造業者の指示に従って検出して、親和性および動態的定数を得た。段階希釈後の抗体(0~100 nM、2倍希釈)を結合時間180秒、解離時間600秒で低濃度から高濃度の順にチップ表面に流した。最後に、10 mMのグリシンpH1.5(GE Healthcare、BR-1003-54)を用いてチップを再生した。得られたデータをBiacore T200分析ソフトウェアおよび1:1の組合せモデルを用いて分析した。結果を表11に示した。同じクローンHB37A6を030、032および033二重特異性抗体のCLDN18.2部分に用いたところ、CLDN18.2部分の親和性は0.57 nMの非常に強い親和性で一貫していた。

20

【表14】

Table 11. 二重特異性抗体のCLDN18.2部分の親和性

	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
030	3.47E+05	2.00E-04	5.76E-10
032			
033			

30

実施例10. インビトロのT細胞死滅試験

【0256】

実施例9で得られた030、032および033二重特異性抗体をインビトロのT細胞死滅試験に用いた。ヒト末梢血単核細胞(PBMC、AllcellsまたはSaily)を完全培地RPMI-1640(Hyclone、SH30809.01)+10%ウシ胎児血清(FBS、Hyclone、SH30084.03)で再懸濁し、PBMCを 2×10^6 /mlに調整した。

40

【0257】

NUGC-4(JCRB細胞バンク、JCRB0834)または以下のとおり調製したクロードイン18.2過剰発現DAN-G腫瘍標的細胞DAN-G-hCLDN18.2、非標的細胞L363(DSMZ、ACC49)をFar-Red(Invitrogen)で10分間かけて標識し、2回洗浄した後、完全培地で再懸濁し、次いで細胞濃度を 2×10^5 /mlに調整した。

DAN-G-HclDn18.2の構築は以下のとおりであった。

【0258】

50

ヒトCLDN18.2の全長遺伝子 (UniProt ID: P56856-2) をベクターpWPT-GFP (Addgene、12255) に構築し、GFP配列を置き換えた。ウイルス格納のために、前記ベクター、レンチウイルスパッケージングベクターpsPAX2 (Addgene、12260) およびpMD2.G (Addgene、12259) をHEK293T (ATCC、CRL-3216) 細胞に同時遺伝子導入した。培養の48時間後、72時間後に培養上清をそれぞれ回収し、PEG8000を用いてレンチウイルスを濃縮した。濃縮ウイルスを用いて膵臓がんDAN-G細胞を遺伝子導入し、次いでフローサイトメトリー (MoFlo XDP、Beckman Coulter) でCLDN18.2発現細胞を選別し、CLDN18.2が安定に遺伝子導入された腫瘍細胞株DAN-G-hCLDN18.2を得た。

【0259】

PBMCを二重特異性抗体030、032および033とそれぞれ混合し (030および032の初期濃度は1 nM、033の初期濃度は400 nM。すべての抗体を合計10の濃度点になるよう5倍希釈した)、37 °Cで30分間恒温放置した後、50 μLの腫瘍標的細胞 (1×10^4) を50 μLのPBMCエフェクター細胞にエフェクター細胞：標的細胞の比10:1で加え、続いて37 °Cで24時間恒温放置し、遠心分離して細胞をヨウ化プロピジウム (PI、Invitrogen) 1 mlあたり10 μgの最終濃度になるよう再懸濁し、次いでフローサイトメトリー (BD、FACSCelesta) を用いてFar-Red陽性細胞およびPI陽性細胞の両方を検出した。腫瘍標的細胞の死滅率をFACSDivaソフトウェア (BD、Celesta) で計算した。

【0260】

図8の結果は、030および032分子が胃がん細胞NUGC-4に対して非常に強い死滅活性を有し、EC50値が1 pM未満であることを示した。図9の結果は、両細胞のEC50値がCLDN18.2高発現膵臓がん細胞DAN-G-hCLDN18.2についてはさらに0.1 pM未満であることを示した。2つの腫瘍細胞株に対する033分子の死滅活性はより弱く、030および032よりも約1000倍低かったが、それでも最大の死滅 (ほぼ100%の溶解細胞) に達した。しかし、CLDN18.2の負の発現の場合、030、032および033分子はいずれも非特異的な死滅効果を有していなかった (図10)。このことは、030、032および033分子はいずれもCLDN18.2の発現に依存して腫瘍細胞の特異的な死滅を示すことを示している。さらに、本発明の二重特異性抗体の死滅効果は、細胞表面のCLDN18.2の存在量に関連する。特定の発現量範囲では、細胞表面のCLDN18.2の発現が高いほど死滅効果は

実施例11. インビトロのサイトカイン放出試験

【0261】

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC、AllcellsまたはSaily) を完全培地RPMI-1640 (Hyclone、SH30809.01) +10%ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone、SH30084.03) で再懸濁し、PBMCを 2×10^6 /mlに調整した。NUGC-4またはクローディン18.2過剰発現DAN-G腫瘍標的細胞DAN-G-hCLDN18.2の濃度を 2×10^5 /mlに調整した。

【0262】

PBMCを二重特異性抗体030、032および033とそれぞれ混合し、37 °Cで30分間恒温放置した後、50 μLの腫瘍標的細胞 (1×10^4) を50 μLのPBMCエフェクター細胞にエフェクター細胞：標的細胞の比10:1で加え、続いて37 °Cで24時間恒温放置し、遠心分離して細胞上清を得た。ヒトTh1/Th2/Th17キット (BD、製品番号560484) を用いてサイトカインを検出した後、室温で3時間恒温放置し、フローサイトメトリー (BD、FACSCelesta) で検出し、上清中のサイトカインの放出をFCAP Arrayソフトウェア (BD) で分析した。

【0263】

図11および図12の結果は、030、032および033分子がCD3部分の親和性と正に相関する胃がん細胞NUGC-4および膵臓がん細胞DAN-G-hCLDN18.2のIL-2、TNF およびIFN γ サイトカインの高放出を媒介できることを示した。

実施例12. インビトロのT細胞活性化試験

【0264】

ヒト末梢血単核細胞 (PBMC、AllcellsまたはSaily) を完全培地RPMI-1640 (Hyclone、SH30809.01) +10%ウシ胎児血清 (FBS、Hyclone、SH30084.03) で再懸濁し、PBMCを 2×10^6 /mlに調整した。

【0265】

NUGC-4またはクローディン18.2過剰発現DAN-G腫瘍標的細胞DAN-G-CLDN18.2の濃度を 2×10^5 /mlに調整した。PBMCを二重特異性抗体030、032および033とそれぞれ混合し、37℃で30分間恒温放置した後、50 μ Lの腫瘍標的細胞 (1×10^4) を50 μ LのPBMCエフェクター細胞にエフェクター細胞：標的細胞の比10:1で加え、続いて37℃で24時間恒温放置し、遠心分離して細胞上清を取り出し、次いで細胞をBV421抗ヒトCD3 (Biolegend、317344)、PerCP/Cy5.5マウス抗ヒトCD4 (BD、552838)、APC/Cy7抗ヒトCD8a (Biolegend、300926)、PE抗ヒトCD25 (Biolegend、302606)、FITC抗ヒトCD69 (Biolegend、310904) と共に4℃で1時間恒温放置し、次いで1×PBSで3回洗浄し、CD4+およびCD8+T細胞中のCD25およびCD69陽性細胞の両方の比率をフローサイトメトリー (BD、FACSCelesta) で検出した。CD4+およびCD8+T細胞中のCD25およびCD69陽性細胞の両方の比率をFACSDivaソフトウェア (BD、Celesta) で計算した。これは、活性化中のCD4およびCD8+T細胞の比率である。

10

【0266】

図13に示すように、030、032および033分子は胃がん細胞NUGC-4の共培養でT細胞を特異的に活性化でき、活性化能力はCD3部分の親和性と正に相関していた。

20

実施例13．インビトロの薬力学的実験 - 胃がんモデル

【0267】

本実験では、NUGC-4腫瘍に対する二重特異性抗体の抗腫瘍効果を雌のNOGマウスで調べた。49匹の雌NOGマウス (Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Ltd.) を選択した。

【0268】

PBMC細胞 (Allcells) を蘇生させ、遠心分離した。PBS (1×) を用いてPBMC細胞を分散させ、細胞密度 2×10^7 /mlの細胞懸濁液を得た。200 μ Lの細胞懸濁液を採取し、マウスの眼窩静脈にPBMC細胞を 4×10^6 /マウスで注入した。

30

【0269】

NUGC-4細胞を後のインビボ実験のために定期的に蘇生させて継代培養した。細胞を遠心分離して回収し、NUGC-4細胞をPBS (1×) に分散させ、 6×10^7 /mlの細胞密度の細胞をマトリゲルゲルと1:1で混合し、 3×10^7 /mlの細胞密度の細胞懸濁液を調製した。3日目に、0.2 mlの細胞懸濁液をNOGヒト化マウスの右腹部に皮下接種し、担NUGC-4腫瘍マウスモデルを確立した。

【0270】

細胞接種後7日目に、マウスの腫瘍の最大幅軸および最大長軸をノギスで測定し、腫瘍体積を計算した。 $53.35 \text{ mm}^3 \sim 168.07 \text{ mm}^3$ の腫瘍体積を有するマウスを選び、腫瘍体積に従ってマウスを蛇行群に分けた (各群6匹のマウス)。各マウスに、本発明の二重特異性抗体030、032および033ならびに陰性対照h-IgG (Equitech-Bio、バッチ番号160308-02) を週に1回、合計4回、0.3 mg/kgおよび1 mg/kgの用量で静脈注射した。腫瘍体積を測定する頻度は週に2回であった。その間、腫瘍抑制率 (TGI%) を以下のように計算した。

40

$$\text{TGI}\% = 100\% \times (\text{対照群の腫瘍体積} - \text{治療群の腫瘍体積}) / (\text{対照群の腫瘍体積} - \text{投与前の対照群の腫瘍体積})$$

【0271】

図14に示すように、担ヒト胃がんNUGC-4腫瘍マウスモデルでは、030および032は0.3 mg/kgの低用量で100%のTGIに達し、1 mg/kgの高用量で50%のCR (完全寛解) に達することができる (6匹のマウスのうち3匹が完全な腫瘍消失を達成した)。しか

50

し、033分子は低用量ではほとんど効果がない一方、TGIは1 mg/kgの用量で20%に達することができる。実験全体を通して、実験群および対照群のマウスの体重は減少しなかった。

実施例14．インビボの薬力学的実験 - 膵臓がんモデル

【0272】

本実験では、DAN-G-クローディン18.2腫瘍に対する二重特異性抗体の抗腫瘍効果を雌のNOGマウスで調べた。49匹のNOGマウス（Beijing Weitong Lihua Experimental Animal Technology Co., Ltd.）の眼窩静脈にPBMC細胞をマウスあたり 4×10^6 で注射した。接種量はマウスあたり200 μ lであった（実施例13に示すとおり）。これを0日目として記録した。

【0273】

実施例10で構築されたヒト膵臓がん細胞DAN-G-CLDN18.2を後のインビボ実験のために定期的に継代培養した。細胞を遠心分離して回収した。DAN-G-CLDN18.2をPBS（1x）に分散させて 10×10^6 /mlの細胞密度の懸濁液を得た。この細胞懸濁液をマトリゲルゲルと1:1で混合し、 5×10^6 細胞/mlの濃度の細胞懸濁液を調製した。0日目に、0.2 mlの細胞懸濁液を採取してNOD-SCIDマウスの右腹部に皮下注射し、CLDN18.2過剰発現DNA-G膵臓がんのヒト化モデルを確立した。

【0274】

腫瘍細胞の接種後7日目に、腫瘍の最大幅軸および最大長軸をノギスで測定し、腫瘍体積を計算した。 $46.42 \text{ mm}^3 \sim 120.64 \text{ mm}^3$ の範囲の腫瘍体積を有するマウスを腫瘍の大きさに従って蛇行群に分けた（各群6匹のマウス）。

【0275】

各マウスに、本発明の二重特異性抗体030、032および033ならびに陰性対照h-IgG（Equitech-Bio、バッチ番号160308-02）を週に1回、合計4回、0.3 mg/kgおよび1 mg/kgの腹腔内用量で静脈注射した。腫瘍体積を測定する頻度は週に2回であった。その間、腫瘍抑制率（TGI%）を以下のように計算した。

$$\text{TGI}\% = 100\% \times (\text{対照群の腫瘍体積} - \text{治療群の腫瘍体積}) / (\text{対照群の腫瘍体積} - \text{投与前の対照群の腫瘍体積})$$

【0276】

図15に示すように、CLDN18.2過剰発現DNA-G膵臓がんのヒト化モデルでは、030および032分子はいずれの用量でも100%のTGIに達することができる。033分子も0.3 mg/kgで42%のTGI、1 mg/kgで76%のTGIにそれぞれ達し、このことはDAN-G-CLDN18.2膵臓がん細胞におけるCLDN18.2の高発現に関連している可能性がある。実験全体を通して、実験群および対照群のマウスの体重は減少しなかった。

実施例15．マウスの薬物動態（PK）実験

【0277】

本試験では、雌のBalb/Cマウス（Vitoliva）に10 mg/kgの030、032および033を尾静脈から注射し、マウス体内の薬物動態を研究した。投与の0.086時間後、0.5時間後、2時間後、6時間後、24時間後、48時間後、4日後、7日後、14日後および21日後にそれぞれマウスの眼から採血し、血液を4、3000 rpmで10分間遠心分離して血清を回収した。血清中の抗体含有量をELISAで決定し、マウス体内の030、032および033の半減期を計算した。

【0278】

実験結果を図16に示した。マウス体内の030、032および033の半減期は、通常のモノクローナル抗体のPKと似ていた。このことは、本発明により構築された二重特異性抗体が抗体の半減期に影響しないことをさらに示した。

【0279】

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 1】

可変領域 配列名	HCDR1/LCD R1	HCDR2/LCD R2	HCDR3/LCD R3	VH/VL	HC/LC
SP34_H	GFTFTYAM N(配列番号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNFGNSYV SWFAY(配 列番号3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFTYAMNWWVRQAPGKGLWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSQSILYLQMNLSKTEDTAMYY CVRHGFNGNSYVSWFAYWGGQTLV TVSS ⁺ (配列番号47)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTKHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLIVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYIT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK ⁺ (配列番号100)
husp34h. g0	GFTFTYAM N(配列番号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNFGNSYV SWFAY(配 列番号3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFTYAMNWWVRQASGKGLWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNITLYLQMNLSKTEDTAVYY CARHGFNGNSYVSWFAYWGGQTT VTVSS ⁺ (配列番号48)	配列番号100

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 2】

husp34h. g1	GFTFNTYAM N (配列番号 1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 2)	HGNFGNSYV SWFAY (配 列番号3)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWRQASGKGLVWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTT VTVSS+ (配列番号49)	配列番号100
husp34h. g2	GFTFNTYAM N (配列番号 1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 2)	HGNFGQSYV SWFAY (配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWRQASGKGLVWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS+ (配列番号50)	配列番号100
husp34h. g3	GFTFNTYAM N (配列番号 1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 2)	HGNFGQSYV SWFAY (配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWRQASGKGLVWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS+ (配列番号51)	配列番号100
husp34h. g2.1	GFTFGTYAM N (配列番号 4)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 2)	HGNFGQSYV SWFAY (配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFGTYAMNWRQASGKGLVWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS+ (配列番号52)	配列番号100

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 3】

husp34h. g2. 2	GFTFNGYAM N(配列番号5)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNFGQSYV SWFAY(配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNGYAMNWVRQASGKGLWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS (配列番号53)	配列番号100
husp34h. g2. 3	GFTFNTAAM N(配列番号6)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNFGQSYV SWFAY(配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTAAMNWVRQASGKGLWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS+ (配列番号54)	配列番号100
husp34h. g2. 4	GFTFNTYAM N(配列番号1)	RIRSSKYNKY ATYYADSVK D(配列番号7)	HGNFGQSYV SWFAY(配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLWV GRIRSSKYNKYATYYADSVKDRFTISR DDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYYC ARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTTVT VSS+ (配列番号55)	配列番号100
husp34h. g2. 5	GFTFNTYAM N(配列番号1)	RIRLKYNNY ATYYADSVK D(配列番号9)	HGNFGQSYV SWFAY(配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLWV GRIRLKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS+ (配列番号56)	配列番号100

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 4】

husp34h. g2. 6	GFTFNTYAM N (配列番号 1)	RIRSKANNY ATYYADSVK D (配列番号 10)	HGNFGQSYV SWFAY (配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLVWV GRIRSKANNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS ⁺ (配列番号57)	配列番号100
husp34h. g2. 7	GFTFNTYAM N (配列番号 1)	RIRSKYNGY ATYYADSVK D (配列番号 11)	HGNFGQSYV SWFAY (配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLVWV GRIRSKYNGYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS ⁺ (配列番号58)	配列番号100
husp34h. g2. 8	GFTFNTYAM N (配列番号 1)	RIRSKYNGY ATYYADSVK D (配列番号 12)	HGNFGQSYV SWFAY (配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLVWV GRIRSKYNGYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGTT VTVSS ⁺ (配列番号59)	配列番号100
husp34h. g2. 9	GFTFNTYAM N (配列番号 1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 2)	AGNFGQSYV SWFAY (配 列番号13)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLVWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARAGNFGQSYVSWFAYWGQGTT TVSS ⁺ (配列番号60)	配列番号100

10

20

30

40

50

【表 15 - 5】

husp34h. g2. 10	GFTFNTYAM N(配列番号1) 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2) 号2)	HYNFGQSYV SWFAY(配 列番号14)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHYNFGQSYVSWFAYWGQGTIV TVSS ⁺ (配列番号61)	配列番号100
husp34h. g2. 11	GFTFNTYAM N(配列番号1) 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2) 号2)	HGGFGQSYV SWFAY(配 列番号15)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGGFGQSYVSWFAYWGQGTIV TVSS ⁺ (配列番号62)	配列番号100
husp34h. g2. 12	GFTFNTYAM N(配列番号1) 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2) 号2)	HGNAGQSYV SWFAY(配 列番号16)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNAGQSYVSWFAYWGQGTIV TVSS ⁺ (配列番号63)	配列番号100
husp34h. g2. 13	GFTFNTYAM N(配列番号1) 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2) 号2)	HGNFYQSYV SWFAY(配 列番号17)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAAS GFTFNTYAMNWVRQASGKGLWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFYQSYVSWFAYWGQGTIV TVSS ⁺ (配列番号64)	配列番号100

10

20

30

40

50

【表 15 - 6】

husp34h. g2. 14	GFTFNTYAM N (配列番号 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 号2)	HGNFGGSYV SWFAY (配 列番号18)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNTYAMNWRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGGSYVSWFAYWGQGT TVSS+	(配列番号65)	配列番号100
husp34h. g2. 15	GFTFNTYAM N (配列番号 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 号2)	HGNFGQRYV SWFAY (配 列番号19)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNTYAMNWRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQRYVSWFAYWGQGT TVSS+	(配列番号66)	配列番号100
husp34h. g2. 16	GFTFNTYAM N (配列番号 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 号2)	HGNFGQSAV SWFAY (配 列番号20)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNTYAMNWRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSAVSWFAYWGQGT TVSS+	(配列番号67)	配列番号100
husp34h. g2. 17	GFTFNTYAM N (配列番号 号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D (配列番号 号2)	HGNFGQSYA SWFAY (配 列番号21)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNTYAMNWRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYASWFAYWGQGT TVSS+	(配列番号68)	配列番号100

10

20

30

40

50

【表 15 - 7】

husp34h. g2. 18	GFTFGSAM N(配列番号22)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNFGQSYV SWFAY(配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFGSAMNWRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGT VIVSS+ (配列番号69)	配列番号100
husp34h. g2. 19	GFTENTYAM N(配列番号1)	RISLKYNNY ATYYADSVK D(配列番号23)	HGNFGQSYV SWFAY(配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTENTYAMNWRQASGKGLEWV GRISLKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGT VIVSS+ (配列番号70)	配列番号100
husp34h. g2. 20	GFTENTYAM N(配列番号1)	RIRSKAGGY ATYYADSVK D(配列番号24)	HGNFGQSYV SWFAY(配 列番号8)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTENTYAMNWRQASGKGLEWV GRIRSKAGGYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHGNFGQSYVSWFAYWGQGT VIVSS+ (配列番号71)	配列番号100
husp34h. g2. 21	GFTENTYAM N(配列番号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HYGFGQSYV SWFAY(配 列番号25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTENTYAMNWRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKSTLYLQMNLSLKTEDTAVYY CARHYGFGQSYVSWFAYWGQGT TVSS+ (配列番号72)	配列番号100

10

20

30

40

50

【表 15 - 8】

husp34h. g2. 22	GFTENTYAM N(配列番号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNAVQSYV SWFAY(配 列番号26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTENTYAMNWRVQRASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSKTEDTAVYY CARHGNAYQSYVSWFAYWGQGTIVTSS ⁺ (配列番号73)	配列番号100
husp34h. g2. 23	GFTENTYAM N(配列番号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNFGGRYV SWFAY(配 列番号27)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTENTYAMNWRVQRASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSKTEDTAVYY CARHGNFGGRYVSWFAYWGQGTIVTSS ⁺ (配列番号74)	配列番号100
husp34h. g2. 24	GFTENTYAM N(配列番号1)	RIRSKYNNY ATYYADSVK D(配列番号2)	HGNFGQSAA SWFAY(配 列番号28)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTENTYAMNWRVQRASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSSTLYLQMNLSKTEDTAVYY CARHGNFGQSAAWVSWFAYWGQGTIVTSS ⁺ (配列番号75)	配列番号100
SP34_L	RSSTGAVTT SNYAN(配 列番号29)	GTNKRAP(配 列番号30)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTTTGAQTEDEAIYFCALWYSNLWV FVGGGTKLITVL ⁺ (配列番号76)	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWVKADSSP VKAGVETTPSKQSNKKNKYAASSY LSLTPEQWKSIRSYSCQVTHIEGS TVEKTVAPTECS ⁺ (配列番号101)
husp34l. g0	RSSTGAVTT SNYAN(配 列番号29)	GTNKRAP(配 列番号30)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPKGQAPRTL YGTNKRAPWTPARFSGSLIGDKAA LTLGGAQPEDEAEYFCALWYSNLW VFGGQTKLITVL ⁺	配列番号101

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 9】

husp34l. g1	RSSTGAVTT SNYAN (配 列番号29)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	(配列番号77) QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRTL IGGTNKRAPGVPARFSGSLGGKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLITVL ⁺ (配列番号78)	配列番号101
husp34l. g2	RSSTGAVTT SNYAN (配 列番号29)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLGGKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLITVL ⁺ (配列番号79)	配列番号101
husp34l. g3	RSSTGAVTT SNYAN (配 列番号29)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLGGKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLITVL ⁺ (配列番号80)	配列番号101
husp34k. g0	RSSTGAVTT SNYAN (配 列番号29)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRLL IYGTNKRAPGIPARFSGSGTEFTL TISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWV GQGTKLITVL ⁺ (配列番号81)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKHVVACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC ⁺ (配列番号102)
husp34k. g1	RSSTGAVTT SNYAN (配 列番号29)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRLL IGGTNKRAPGVPARFSGSGTEFT LTISSLQSEDFAVYYCALWYSNLWV FGQGTKLITVL ⁺ (配列番号82)	配列番号102

10

20

30

40

50

【表 15 - 10】

husp34k. g2	RSSTGAVTT SNYAN (配 列番号29)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSGTEFT LTISSLQSEDEFAVYICALWYSNLWV FGQGTKLTVL ⁺ (配列番号83)	配列番号102
husp34k. g3	RSSTGAVTT SNYAN (配 列番号29)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSGTEFT LTISSLQSEDEFAVYICALWYSNLWV FGQGTKLTVL ⁺ (配列番号84)	配列番号102
husp34lg 3.1	GSSTGAVTT SNYAN (配 列番号32)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYICALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁺ (配列番号85)	配列番号101
husp34lg 3.2	RSSTGAVGT SNYAN (配 列番号33)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVGTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYICALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁺ (配列番号86)	配列番号101
husp34lg 3.3	RSSTGAVTG SNYAN (配 列番号34)	GTNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTGSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYICALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁺ (配列番号87)	配列番号101

10

20

30

40

50

【表 15 - 11】

husp341g 3.4	RSSTGAVTT RNYAN(配 列番号35)	GTNKRAP(配列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTIVLTCRSS TGAVTTRNYANWVQKPGQAPRGL IGGINKRAPGVVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁴ (配列番号88)	配列番号101
husp341g 3.5	RSSTGAVTT SGYAN(配 列番号36)	GTNKRAP(配列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTIVLTCRSS TGAVTTSYANWVQKPGQAPRGL IGGINKRAPGVVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁴ (配列番号89)	配列番号101
husp341g 3.6	RSSTGAVTT SNYAN(配 列番号29)	GTNKRAP(配列番号3 0)	ALAYSNLWV (配列番号 37)	QAVVTQEPSLTVSPGGTIVLTCRSS TGAVTTSYANWVQKPGQAPRGL IGGINKRAPGVVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALAYSNLW VFGQGTKLTVL ⁴ (配列番号90)	配列番号101
husp341g 3.7	RSSTGAVTT SNYAN(配 列番号29)	GTNKRAP(配列番号3 0)	ALWASNLWV (配列番号 38)	QAVVTQEPSLTVSPGGTIVLTCRSS TGAVTTSYANWVQKPGQAPRGL IGGINKRAPGVVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWASNLW VFGQGTKLTVL ⁴ (配列番号91)	配列番号101
husp341g 3.8	RSSTGAVTT SNYAN(配 列番号29)	GTNKRAP(配列番号3 0)	ALWYRNLWV (配列番号 39)	QAVVTQEPSLTVSPGGTIVLTCRSS TGAVTTSYANWVQKPGQAPRGL IGGINKRAPGVVPARFSGSLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYRNLW VFGQGTKLTVL ⁴ (配列番号92)	配列番号101

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 1 2】

husp341g 3. 9	RSSTCAVTT SNYAN (配 列番号29)	G TNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSGLWV (配列番号 40)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGG TNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTL LGAQPEDEAEYYCALWYSGLV VFGQGTKLTVL ⁴⁾ (配列番号93)	配列番号101
husp341g 3. 10	RSSTCAVGG SNYAN (配 列番号41)	G TNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVGGSNYANWVQKPGQAPRGL IGG TNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTL LGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁴⁾ (配列番号94)	配列番号101
husp341g 3. 11	RSSTCAVTT RGYAN (配 列番号42)	G TNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYSNLWV (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTRGYANWVQKPGQAPRGL IGG TNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTL LGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁴⁾ (配列番号95)	配列番号101
husp341g 3. 12	RSSTCAVTT SNYAN (配 列番号29)	G TNKRAP (配 列番号3 0)	ALAASNLWV (配列番号 43)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGG TNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTL LGAQPEDEAEYYCALAASNLW VFGQGTKLTVL ⁴⁾ (配列番号96)	配列番号101
husp341g 3. 13	RSSTCAVTT SNYAN (配 列番号29)	G TNKRAP (配 列番号3 0)	ALWYRGLWV (配列番号 44)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGG TNKRAPGVPARFSGSLGDKAA LTL LGAQPEDEAEYYCALWYRGLW VFGQGTKLTVL ⁴⁾ (配列番号97)	配列番号101

10

20

30

40

50

【表 1 5 - 1 3】

husp341g 3. 14	RSSTGAVTT SNYAN(配 列番号29)	GTNSRAP (配 列番号4 5)	ALWYSNLW (配列番号 31)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNSRAPGVFARFSGSLLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGQGTKLTVL ⁺ (配列番号98)	配列番号101
husp341g 3. 15	RSSTGAVTT SNYAN(配 列番号29)	GTNSRAP (配 列番号4 5)	ALWYSDLW (配列番号 46)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGL IGGTNSRAPGVFARFSGSLLGDKAA LTLGGAQPEDEAEYYCALWYSDLW VFGQGTKLTVL ⁺ (配列番号99)	配列番号101

10

20

30

40

50

【 図面 】

【 図 1 - 1 】

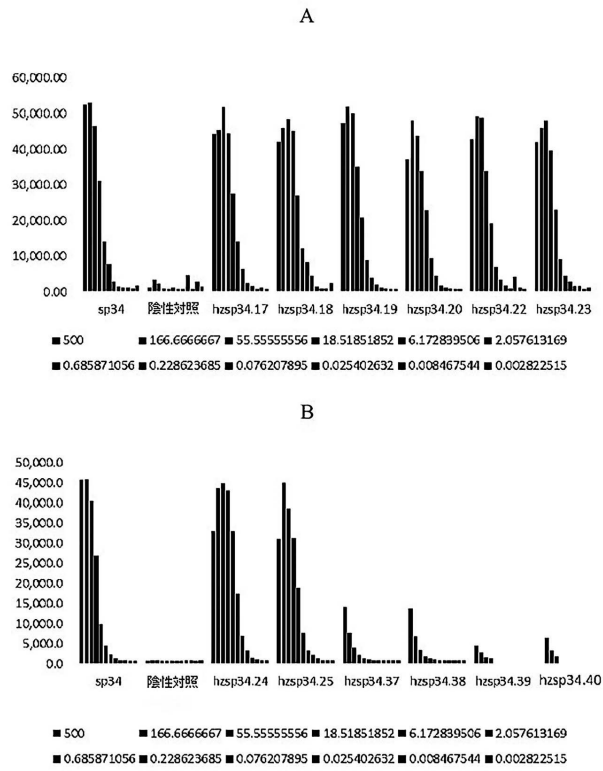


Figure 1

【 図 1 - 2 】

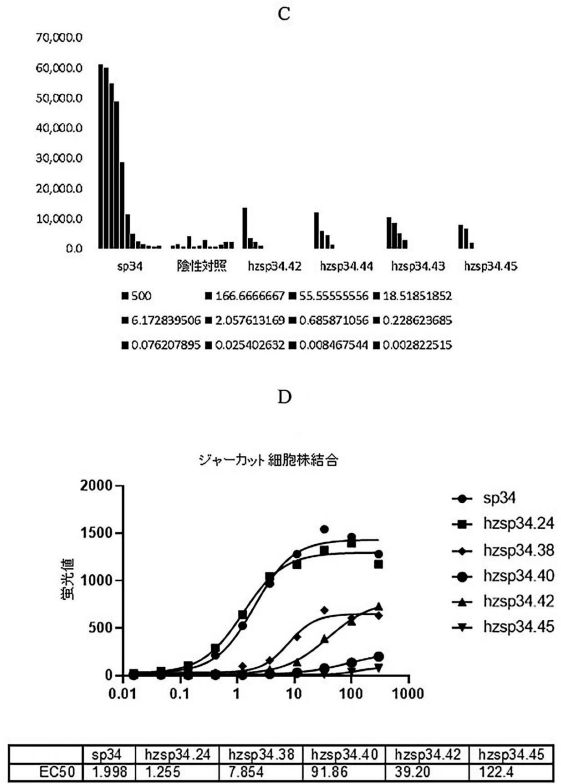


Figure 1(cont)

10

20

【 図 2 】

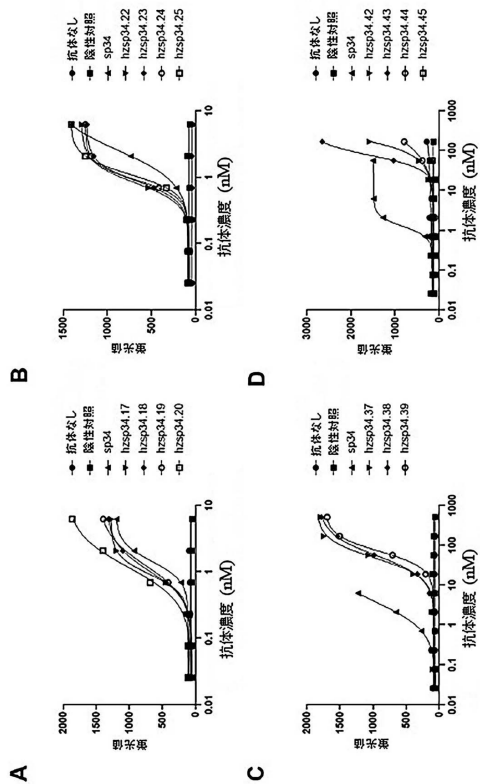


Figure 2

【 図 3 】

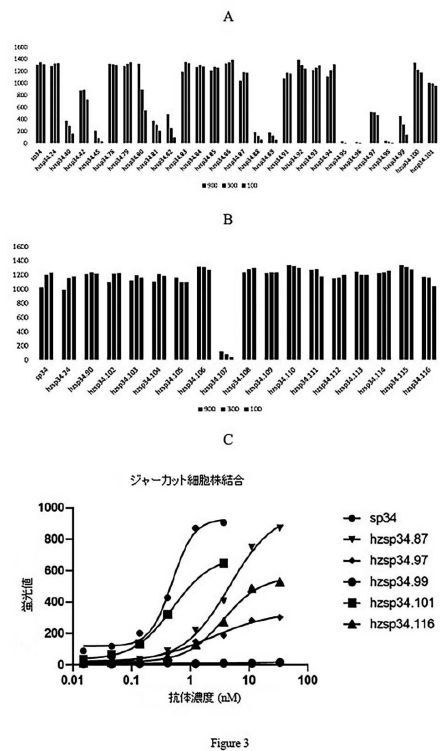


Figure 3

30

40

50

【 図 4 】

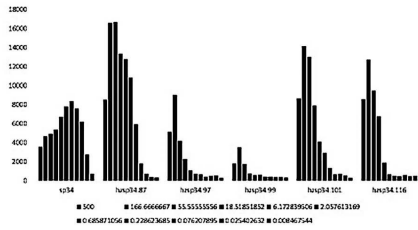


Figure 4

【 図 5 】

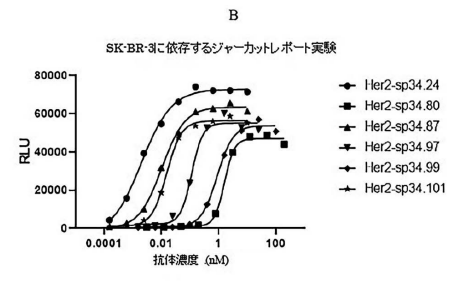
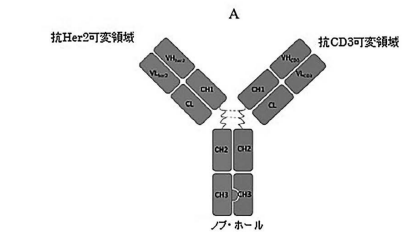


Figure 5

10

20

【 図 6 】

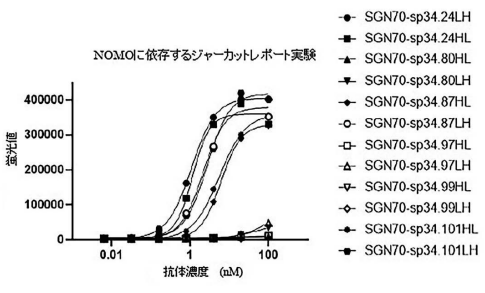
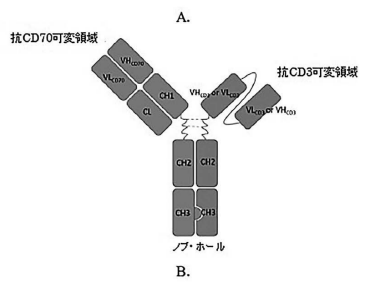


Figure 6

【 図 7 】

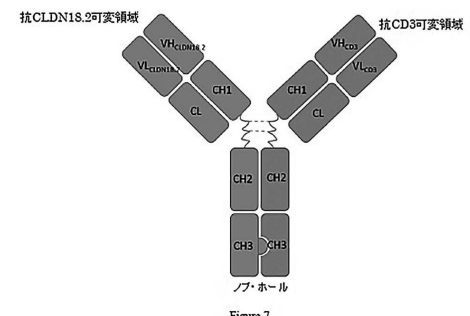


Figure 7

30

40

50

【 8 】

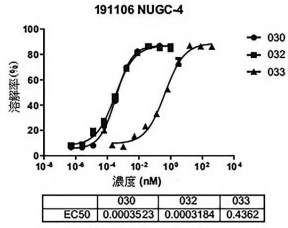


Figure 8

【 9 】

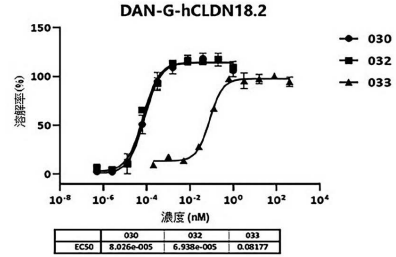


Figure 9

10

【 10 】

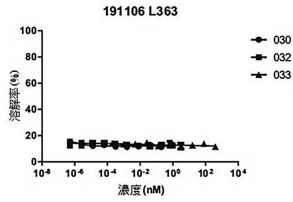


Figure 10

【 11 】

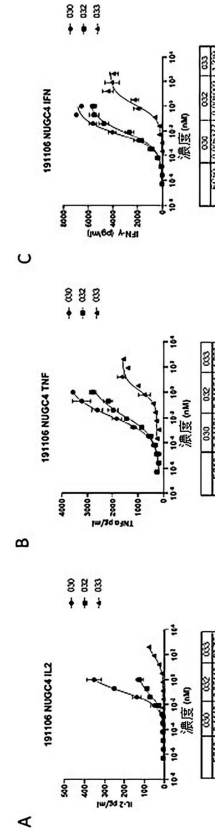


Figure 11

20

30

40

50

【 図 1 2 】

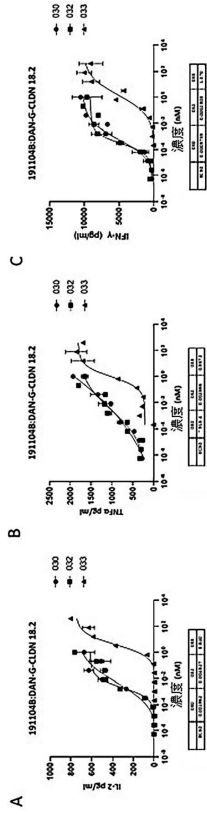


Figure 12

【 図 1 3 】

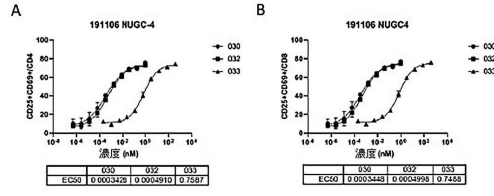


Figure 13

10

20

【 図 1 4 】

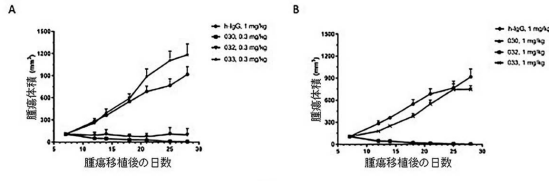


Figure 14

【 図 1 5 】

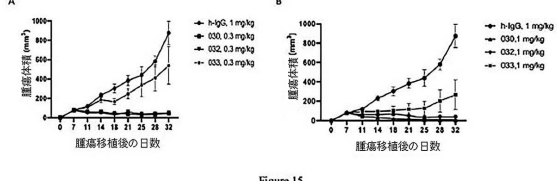


Figure 15

30

40

50

【 図 16 】

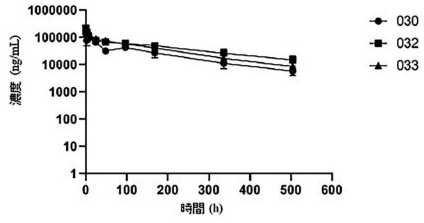


Figure 16

【 配列表 】

2023543826000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121285

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		10
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K; C07K; C12N; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN, USTXT, WOTXT, STN, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Wiley InterScience, Embase, NCBI, EBI, Unipro, PUBMED, CNKI, 万方, 中国专利生物序列检索系统, SEQ1-51, SEQ 77-99, CD3抗体, 人源化, 双特异性抗体, bispecific, antibody, variable, mutat.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	WO 2021063330 A1 (HARBOUR BIOMED SUZHOU CO., LTD.) 08 April 2021 (2021-04-08) claims 1-15, and embodiment 4	1-21
Y	CN 111315779 A (GREEN CROSS CORP et al.) 19 June 2020 (2020-06-19) embodiments 1-4, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19	1-21
Y	CN 105051069 A (XENCOR INC.) 11 November 2015 (2015-11-11) claims 7, 12, 22, 28, description paragraphs 165-166, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98	1-21
Y	CN 111518214 A (L&L BIOPHARMA, CO., LTD.) 11 August 2020 (2020-08-11) claims 1-17	1-21
Y	CN 111662382 A (REYOUNG (SUZHOU) BIOPHARMACEUTICALS., LTD.) 15 September 2020 (2020-09-15) claims 1-10, and embodiment 1	1-21
Y	CN 110914296 A (WUHAN YZY BIOPHARMA CO., LTD.) 24 March 2020 (2020-03-24) claims 1-12, 17, table 3	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family	
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 December 2021	30 December 2021	
Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer	
China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China		
Facsimile No. (86-10)62019451	Telephone No.	

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121285

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121285

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.: **19-20**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Claims 19-20 relate to a method for preventing or treating tumors in a patient, and therefore do not comply with PCT Rule 39.1(iv), but a search has still been carried out on the basis of a corresponding pharmaceutical use.
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/121285

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021063330	A1	08 April 2021	CN	113015749	A	22 June 2021
CN	111315779	A	19 June 2020	SG	11202003273 P	A	28 May 2020
				JP	2021501571	A	21 January 2021
				IL	274007	D0	31 May 2020
				WO	2019078697	A3	04 July 2019
				WO	2019078697	A2	25 April 2019
				BR	112020007770	A2	20 October 2020
				EP	3699192	A2	26 August 2020
				EA	202090944	A1	16 July 2020
				WO	2019078697	A8	09 April 2020
				CA	3077007	A1	25 April 2019
				KR	101973060	B1	26 April 2019
				AU	2018353787	A1	21 May 2020
				US	2020317779	A1	08 October 2020
CN	105051069	A	11 November 2015	EP	3620473	A1	11 March 2020
				JP	2020018318	A	06 February 2020
				AU	2014205086	B2	18 April 2019
				CN	105051069	B	10 December 2019
				KR	20150105472	A	16 September 2015
				US	2014370013	A1	18 December 2014
				AU	2019204841	A1	25 July 2019
				EP	2943511	A4	31 August 2016
				JP	6618362	B2	11 December 2019
				KR	20200065110	A	08 June 2020
				IL	239941	A	30 April 2020
				US	2021163627	A1	03 June 2021
				EP	2943511	A1	18 November 2015
				AU	2014205086	A1	23 July 2015
				KR	102211837	B1	03 February 2021
				JP	2016504418	A	12 February 2016
				IL	281703	D0	31 May 2021
				SI	2943511	T1	31 January 2020
				IL	239941	D0	31 August 2015
				LT	2943511	T	11 November 2019
				DK	2943511	T3	21 October 2019
				WO	2014110601	A1	17 July 2014
				US	2018142040	A1	24 May 2018
				US	9650446	B2	16 May 2017
				IL	273320	A	25 March 2021
				HR	P20191865	T1	10 January 2020
				EP	2943511	B1	07 August 2019
				IL	273320	D0	30 April 2020
				US	10738133	B2	11 August 2020
				CA	2898100	A1	17 July 2014
				US	10738132	B2	11 August 2020
				CN	110981964	A	10 April 2020
				US	2014288275	A1	25 September 2014
CN	111518214	A	11 August 2020	None			
CN	110914296	A	24 March 2020	CN	110914296	B	19 February 2021
				CN	112142847	A	29 December 2020

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2021/121285

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
<hr/> <p style="text-align: center;">WO 2020168554 A1 27 August 2020</p>			

10

20

30

40

50

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2021/121285
A. 主题的分类		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
A61K; C07K; C12N; A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
VEN, USTXT, WOTXT, STN, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Wiley InterScience, Embase, NCBI, EBI, Unipro, PUBMED, CNKI, 万方, 中国专利生物序列检索系统, SEQ1-51, SEQ 77-99, CD3抗体, 人源化, 双特异性抗体, bispecific, antibody, variable, mutat.		
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	WO 2021063330 A1 (HARBOUR BIOMED SUZHOU CO., LTD.) 2021年4月8日 (2021-04-08) 权利要求1-15, 实施例4	1-21
Y	CN 111315779 A (株式会社绿十字等) 2020年6月19日 (2020-06-19) 实施例1-4, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:19	1-21
Y	CN 105051069 A (XENCOR股份有限公司) 2015年11月11日 (2015-11-11) 权利要求7、12、22、28, 说明书第165-166段, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:98	1-21
Y	CN 111518214 A (上海健信生物医药科技有限公司) 2020年8月11日 (2020-08-11) 权利要求1-17	1-21
Y	CN 111662382 A (瑞阳苏州生物科技有限公司) 2020年9月15日 (2020-09-15) 权利要求1-10、实施例1	1-21
Y	CN 110914296 A (武汉友友友生物制药有限公司) 2020年3月24日 (2020-03-24) 权利要求1-12、17、表3	1-21
<input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期 2021年12月16日		国际检索报告邮寄日期 2021年12月30日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 张丽玮 电话号码 86-(10)-53962036

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/121285

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的:

a. 作为国际申请的一部分提交的:

附件C/ST.25文本文件形式

纸件或图形文件形式

b. 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

附件C/ST.25文本文件形式(细则13之三.1(a))

纸件或图形文件形式(细则13之三.1(b)和行政规程第713段)

2. 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

10

20

30

40

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/121285

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

- 1. 权利要求: 19-20
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] 权利要求19-20涉及预防或治疗受试者中肿瘤的方法, 因此不符合PCT细则39.1(iv)的规定, 仍然基于其相应的制药用途进行检索。
- 2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
- 3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/121285

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021063330	A1	2021年4月8日	CN	113015749	A	2021年6月22日
CN	111315779	A	2020年6月19日	SG	11202003273P	A	2020年5月28日
				JP	2021501571	A	2021年1月21日
				IL	274007	DO	2020年5月31日
				WO	2019078697	A3	2019年7月4日
				WO	2019078697	A2	2019年4月25日
				BR	112020007770	A2	2020年10月20日
				EP	3699192	A2	2020年8月26日
				EA	202090944	A1	2020年7月16日
				WO	2019078697	A8	2020年4月9日
				CA	3077007	A1	2019年4月25日
				KR	101973060	B1	2019年4月26日
				AU	2018353787	A1	2020年5月21日
				US	2020317779	A1	2020年10月8日
CN	105051069	A	2015年11月11日	EP	3620473	A1	2020年3月11日
				JP	2020018318	A	2020年2月6日
				AU	2014205086	B2	2019年4月18日
				CN	105051069	B	2019年12月10日
				KR	20150105472	A	2015年9月16日
				US	2014370013	A1	2014年12月18日
				AU	2019204841	A1	2019年7月25日
				EP	2943511	A4	2016年8月31日
				JP	6618362	B2	2019年12月11日
				KR	20200065110	A	2020年6月8日
				IL	239941	A	2020年4月30日
				US	2021163627	A1	2021年6月3日
				EP	2943511	A1	2015年11月18日
				AU	2014205086	A1	2015年7月23日
				KR	102211837	B1	2021年2月3日
				JP	2016504418	A	2016年2月12日
				IL	281703	DO	2021年5月31日
				SI	2943511	T1	2020年1月31日
				IL	239941	DO	2015年8月31日
				LT	2943511	T	2019年11月11日
				DK	2943511	T3	2019年10月21日
				WO	2014110601	A1	2014年7月17日
				US	2018142040	A1	2018年5月24日
				US	9650446	B2	2017年5月16日
				IL	273320	A	2021年3月25日
				HR	P20191865	T1	2020年1月10日
				EP	2943511	B1	2019年8月7日
				IL	273320	DO	2020年4月30日
				US	10738133	B2	2020年8月11日
				CA	2898100	A1	2014年7月17日
				US	10738132	B2	2020年8月11日
				CN	110981964	A	2020年4月10日
				US	2014288275	A1	2014年9月25日
CN	111518214	A	2020年8月11日	无			
CN	110914296	A	2020年3月24日	CN	110914296	B	2021年2月19日

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2021/121285

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CN 112142847 A	2020年12月29日
		WO 2020168554 A1	2020年8月27日

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 48/00	

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

弁理士 池田 達則

- (72)発明者 チョウ ショアイシアン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3 , スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8
- (72)発明者 コアン チョー
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3 , スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8
- (72)発明者 フー フォンケン
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3 , スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8
- (72)発明者 フー スーイー
中華人民共和国, チアンスー 2 1 5 1 2 3 , スーチョウ インダストリアル パーク スーチョウ
, トンピン ストリート 1 6 8

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA72X AA90X AB01 BA02 CA44 CA45
4C084 AA13 AA19 BA44 DA01 MA02 MA16 MA17 MA23 MA24 MA27
MA31 MA34 MA43 MA52 MA56 MA58 MA66 NA05 NA14 ZB072 ZB261
ZB262 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB31 BB43 CC22 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01
GG02 GG06 GG08 GG10
4H045 AA11 AA30 BA09 DA76 EA20 EA31 FA74