(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-536740
(P2019-536740A)
(43)公表日　令和1年12月19日(2019.12.19)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	4B064
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C076
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	T	4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	39/395	L	4C085
A61K 47/68	(2017.01)	A61P	35/00		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 135 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2019-515905 (P2019-515905)
(86)(22)出願日　平成29年9月22日 (2017.9.22)
(85)翻訳文提出日　令和1年5月16日 (2019.5.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/053113
(87)国際公開番号　WO2018/067331
(87)国際公開日　平成30年4月12日 (2018.4.12)
(31)優先権主張番号　62/399,249
(32)優先日　平成28年9月23日 (2016.9.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/558,711
(32)優先日　平成29年9月14日 (2017.9.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　597160510
リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
アメリカ合衆国１０５９１－６７０７ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード７７７番
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100140132
弁理士　竹林　則幸

最終頁に続く

(54)【発明の名称】二重特異性抗ＭＵＣ１６－ＣＤ３抗体および抗ＭＵＣ１６薬物複合体

(57)【要約】
本開示は、抗ムチン１６抗体、すなわちＭＵＣ１６およびＣＤ３の両方に結合し、ＭＵＣ１６発現腫瘍の存在下でＣＤ３複合体を介してＴ細胞を活性化する二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）、ヒトおよびＭＵＣ１６（単一特異性抗体）に結合するヒトＩｇＧ抗体、インビボで腫瘍増殖を阻害する抗ＭＵＣ１６抗体薬物複合体を提供する。本抗体は、卵巣癌を含む様々な癌の治療に有用である。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子。
【請求項２】
ヒトＣＤ３に結合する第１の結合アームと、ヒトＭＵＣ１６に結合する第２の結合アームと、を含む、二重特異性抗体であって、前記第１の結合アームが、配列番号１９６１のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記第２の結合アームが、配列番号１９５９のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、二重特異性抗体。
【請求項３】
ヒトＣＤ３に結合する第１の結合アームと、ヒトＭＵＣ１６に結合する第２の結合アームと、を含む、二重特異性抗体であって、前記第１の結合アームが、配列番号１９６２のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含み、前記第２の結合アームが、配列番号１９５９のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、二重特異性抗体。
【請求項４】
２５℃の表面プラズモン共鳴アッセイで測定される、約５３ｎＭ未満の結合解離平衡定数（K_D）値でヒトムチン１６（ＭＵＣ１６）に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。
【請求項５】
２５℃の表面プラズモン共鳴アッセイで測定される、約１５分超の解離半減期（ｔ１／２）でヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。
【請求項６】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ヒトＭＵＣ１６への結合について、表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と競合する、請求項４または５に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項７】
前記参照抗体が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む、請求項６に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項８】
前記抗体またはその抗原結合断片が、表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と同じヒトＭＵＣ１６上のエピトープに結合する、請求項４～７のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項９】
前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と同じ、ヒトＭＵＣ１６上のエピトープに結合する、請求項８に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項１０】
ヒトＭＵＣ１６に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体

または抗原結合断片が、（ａ）表１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）の相補性決定領域（ＣＤＲ）と、（ｂ）表１に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）のＣＤＲと、を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項１１】

前記抗体または抗原結合断片が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む、請求項１０に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【請求項１２】

前記抗体または抗原結合断片が、配列番号４－６－８－１２－１４－１６、２０－２２－２４－２８－３０－３２、３６－３８－４０－４４－４６－４８、５２－５４－５６－６０－６２－６４、６８－７０－７２－７６－７８－８０、８４－８６－８８－９２－９４－９６、１００－１０２－１０４－１０８－１１０－１１２、１１６－１１８－１２０－１２４－１２６－１２８、１３２－１３４－１３６－１４０－１４２－１４４、１４８－１５０－１５２－１５６－１５８－１６０、１６４－１６６－１６８－１７２－１７４－１７６、１８０－１８２－１８４－１８８－１９０－１９２、１９６－１９８－２００－３９６－３９８－４００、２０４－２０６－２０８－２１２－２１４－２１６、２２０－２２２－２２４－２２８－２３０－２３２、２３６－２３８－２４０－２４４－２４６－２４８、２５２－２５４－２５６－１９３８－１９４０－１９４２、２６０－２６２－２６４－２６８－２７０－２７２、２７６－２７８－２８０－１９３８－１９４０－１９４２、２８４－２８６－２８８－２９２－２９４－２９６、３００－３０２－３０４－３０８－３１０－３１２、３１６－３１８－３２０－３２４－３２６－３２８、３３２－３３４－３３６－３４０－３４２－３４４、３４８－３５０－３５２－３５６－３５８－３６０、３６４－３６６－３６８－３７２－３７４－３７６、および３８０－３８２－３８４－３８８－３９０－３９２からなる群から選択されるＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３ドメインをそれぞれ含む、請求項１１に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【請求項１３】

ヒトＭＵＣ１６に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体または抗原結合断片が、（ａ）配列番号２、１８、３４、５０、６６、８２、９８、１１４、１３０、１４６、１６２、１７８、１９４、２０２、２１８、２３４、２５０、２５８、２７４、２８２、２９８、３１４、３３０、３４６、３６２、および３７８からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）と、（ｂ）配列番号１０、２６、４２、５８、７４、９０、１０６、１２２、１３８、１５４、１７０、１８６、２１０、２２６、２４２、２６６、２９０、３０６、３２２、３３８、３５４、３７０、３８６、１９３６、および３９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）と、を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項１４】

前記抗体または抗原結合断片が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む、請求項１３に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【請求項１５】

配列番号１９０２の残基４２８～残基４８１の範囲のエピトープ内のヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項１６】

配列番号１９０２のアミノ酸残基４２８～４３４、４２９～４３４、４５３～４６７、４５９～４６７、４６０～４６７、および／または４７４～４８１と相互作用する、請求項１５に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【請求項１７】

ヒトＣＤ３に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＭＵＣ１６に結合する第２の抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子であって、前記第２の抗原結合ドメインが、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片に由来する、二重特異性抗原結合分子。

【請求項１８】

前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３を発現するヒト細胞およびカニクイザルＣＤ３を発現するカニクイザル細胞に結合する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項１９】

前記抗原結合分子が、ヒトＣＤ３およびヒトＭＵＣ１６の両方に結合し、ＭＵＣ１６発現細胞のＴ細胞媒介性細胞死滅を誘導する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２０】

前記抗原結合分子が、ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける腫瘍増殖を阻害する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２１】

前記抗原結合分子が、ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける既存腫瘍の腫瘍増殖を抑制する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２２】

前記抗原結合分子が、インビトロＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅アッセイで測定される、約３１ｐＭ未満のＥＣ$_{50}$値でＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅を誘導する、請求項１または１７～２１のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２３】

前記第２の抗原結合ドメインが、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定される、約７ｎＭ未満のK_D値でヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する、請求項１または１７～２２のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２４】

前記第２の抗原結合ドメインが、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定される、約５ｎＭ未満、約２ｎＭ未満、約１ｎＭ未満、約８００ｐＭ未満、または約６００ｐＭ未満のK_D値で各ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する、請求項１または１７～２３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２５】

二重特異性抗体またはその二重特異性抗原結合断片である、請求項１または１７～２４のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２６】

ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、配列番号２、１８、３４、５０、６６、８２、９８、１１４、１３０、１４６、１６２、１７８、１９４、２０２、２１８、２３４、２５０、２５８、２７４、２８２、２９８、３１４、３３０、３４６、３６２、および３７８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、配列番号１０、２６、４２、５８、７４、９０、１０６、１２２、１３８、１５４、１７０、１８６、２１０、２２６、２４２、２６６、２９０、３０６、３２２、３３８

、３５４、３７０、３８６、１９３６、および３９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）と、を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２７】

ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ３）を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ１が、配列番号４、２０、３６、５２、６８、８４、１００、１１６、１３２、１４８、１６４、１８０、１９６、２０４、２２０、２３６、２５２、２６０、２７６、２８４、３００、３１６、３３２、３４８、３６４、および３８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２が、配列番号６、２２、３８、５４、７０、８６、１０２、１１８、１３４、１５０、１６６、１８２、１９８、２０６、２２２、２３８、２５４、２６２、２７８、２８６、３０２、３１８、３３４、３５０、３６６、および３８２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３が、配列番号８、２４、４０、５６、７２、８８、１０４、１２０、１３６、１５２、１６８、１８４、２００、２０８、２２４、２４０、２５６、２６４、２８０、３０４、３２０、３３６、３５２、３６８、および３８４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１が、配列番号１２、２８、４４、６０、７６、９２、１０８、１２４、１４０、１５６、１７２、１８８、３９６、２１２、２２８、２４４、３９６、２６８、３９６、２９２、３０８、３２４、３４０、３５６、３７２、１９３８、および３８８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２が、配列番号１４、３０、４６、６２、７８、９４、１１０、１２６、１４２、１５８、１７４、１９０、３９８、２１４、２３０、２４６、３９８、２７０、３９８、２９４、３１０、３２６、３４２、３５８、３７４、１９４０、および３９０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３が、配列番号１６、３２、４８、６４、８０、９６、１１２、１２８、１４４、１６０、１７６、１９２、４００、２１６、２３２、２４８、４００、２７２、４００、２９６、３１２、３２８、３４４、３６０、３７６、１９４２、および３９２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２８】

ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、配列番号１８／２６を含むＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２９】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、表１６、表１８、または表２２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、表１、表１６、表１９、または表２４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）とを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３０】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択される重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）とを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３１】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定

領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ１は配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３２】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、配列番号１７３０／２６、１７６２／２６、１７７８／２６、１７８６／２６、および１８６６／２６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３３】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含み、ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ３）を含み、

Ａ１－ＨＣＤＲ１は配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含み、

Ａ２－ＨＣＤＲ１は配列番号２０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２は配列番号２２のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３は配列番号２４のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３４】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、ＦＲ１（配列番号１９０３）、ＦＲ２（配列番号１９０４）、ＦＲ３（配列番号１９０５）、およびＦＲ４（配列番号１９０６）から選択されるアミノ酸配列を有する可変ドメインフレームワーク領域を含む重鎖を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３５】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、配列番号１９０７－１９０８－１９０９のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３を含むＨＣＶＲを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３６】

前記第２の抗原結合ドメインが、ヒトＭＵＣ１６への結合について、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ

３）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、Ａ２－ＨＣＤＲ１は配列番号２０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２は配列番号２２のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３は配列番号２４のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３７】

前記第２の抗原結合ドメインが、ヒトＭＵＣ１６への結合について、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、および配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合する、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３８】

前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３への結合について、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、Ａ１－ＨＣＤＲ１は配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３９】

前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３への結合について、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、ならびに配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合する、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項４０】

前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３への結合について、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、ならびに配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、前記第２の抗原結合ドメインが、ヒトＭＵＣ１６への結合について、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、および配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合する、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項４１】

ＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号１８９９の残基１３７９１～１４４５１に対応するヒトＭＵＣ１６の５つの膜近位ＳＥＡドメインのうちの１つ以上のヒトＭＵＣ１６に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項４２】

ＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号１８９９の残基１３８１０～１４４５１のヒトＭＵＣ１６に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項４３】

ＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、ヒトＭＵＣ１６のＳＥＡ１、ＳＥＡ２、ＳＥＡ３、ＳＥＡ４、ＳＥＡ５、ＳＥＡ６、ＳＥＡ７、ＳＥＡ８、ＳＥＡ

９、ＳＥＡ１０、ＳＥＡ１１、ＳＥＡ１２、ＳＥＡ１３、ＳＥＡ１４、ＳＥＡ１５、またはＳＥＡ１６のうちのいずれか１つ以上に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項４４】

請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項４５】

請求項１または１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項４６】

対象における癌を治療する方法であって、請求項４４または４５に記載の薬学的組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

【請求項４７】

前記癌が、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管細胞癌腫瘤形成型、子宮頸部の腺癌、および胃腸管の腺癌からなる群から選択される、請求項４６に記載の方法。

【請求項４８】

前記癌が卵巣癌である、請求項４７に記載の方法。

【請求項４９】

抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片および細胞傷害性薬剤を含む、抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）であって、前記抗体または抗原結合断片および前記細胞傷害性薬剤がリンカーを介して共有結合する、抗体－薬物複合体。

【請求項５０】

前記抗ＭＵＣ１６抗体または抗原結合断片が、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片である、請求項４９に記載のＡＤＣ。

【請求項５１】

前記細胞傷害性薬剤が、アウリスタチン、メイタンシノイド、ツブリシン、トマイマイシン誘導体、またはドラスタチン誘導体から選択される、請求項４９または５０に記載のＡＤＣ。

【請求項５２】

前記細胞傷害性薬剤が、ＭＭＡＥもしくはＭＭＡＦから選択されるアウリスタチン、またはＤＭ１もしくはＤＭ４から選択されるメイタンシノイドである、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

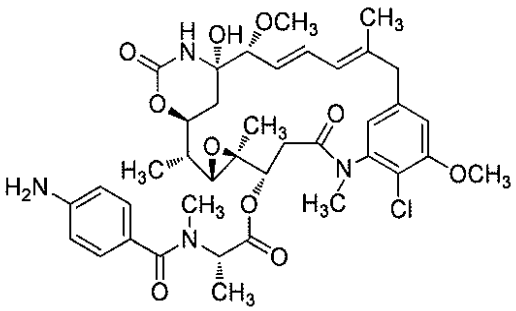
【請求項５３】

前記細胞傷害性薬剤が、式（Ｉ）または式（ＩＩ）の構造を有するメイタンシノイドである、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

【請求項５４】

前記メイタンシノイドが次式である、請求項５３に記載のＡＤＣ。

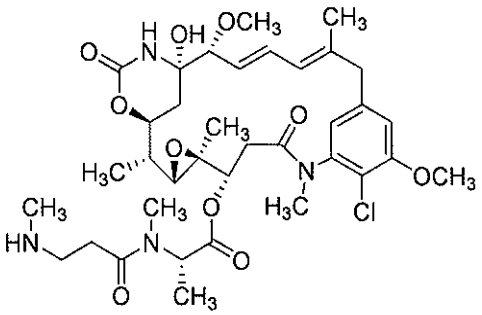
【化１】



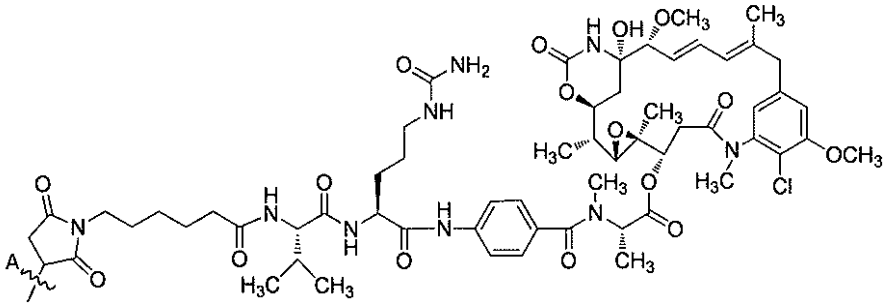
【請求項５５】

前記メイタンシノイドが次式である、請求項５３に記載のＡＤＣ。

【化２】



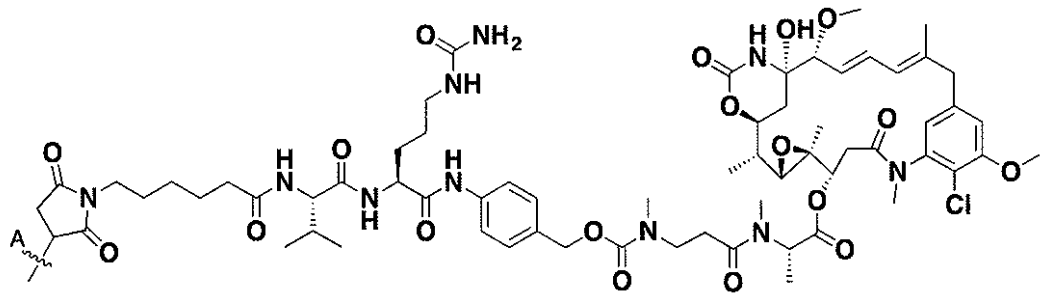
【請求項５６】
抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式とを含み、
【化３】



式中、
【化４】



は前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。
【請求項５７】
抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式とを含み、
【化５】

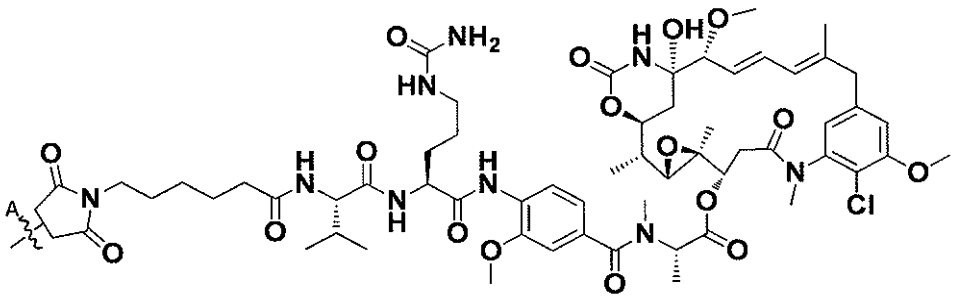


式中、
【化６】



は前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一

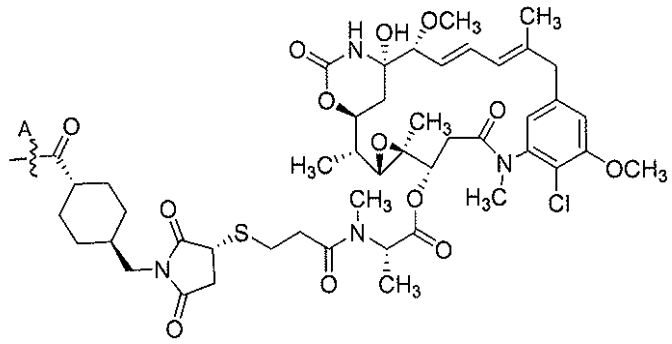
項に記載のＡＤＣ。
【請求項５８】
抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式とを含み、
【化７】



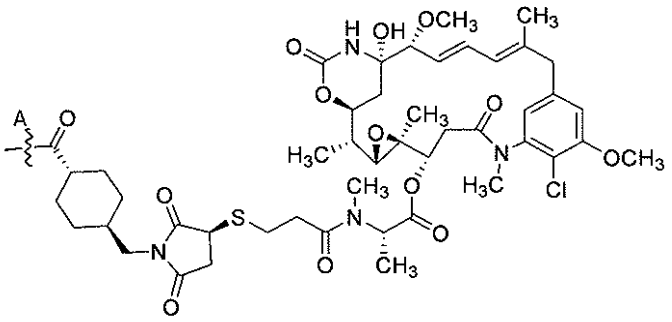
式中、
【化８】



は前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。
【請求項５９】
結合がシステイン残基の硫黄成分を介して前記抗体またはその断片に接触する、請求項５６～５８のいずれか一項に記載のＡＤＣ。
【請求項６０】
抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式
【化９】



、または



、または

それらの混合物とを含み、
式中、

【化１０】



は、前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

【請求項６１】

前記結合が、リジン残基の窒素成分を介して前記抗体またはその断片に接触する、請求項６０に記載のＡＤＣ。

【請求項６２】

前記ＡＤＣが、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片あたり１～４つの細胞傷害性薬剤を含む、請求項４９～６１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

【請求項６３】

請求項４９～６２のいずれか一項に記載の抗体－薬物複合体および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項６４】

ＭＵＣ１６の発現に関連する疾患または障害の治療における、請求項４４、４５または６３のいずれか一項に記載の薬学的組成物の使用。

【請求項６５】

前記疾患または障害が癌である、請求項６４に記載の使用。

【請求項６６】

医薬に使用するための、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または請求項１もしくは１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子を含む、化合物。

【請求項６７】

任意に、前記癌が卵巣癌であり、前記化合物が、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または請求項１もしくは１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子を含む、癌の治療における使用のための化合物。

【請求項６８】

癌の治療に使用するための薬剤の製造のための、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または請求項１もしくは１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子の使用であって、任意に前記癌が卵巣癌である、使用。

【請求項６９】

医薬に使用するための請求項４９～６２のいずれか一項に記載のＡＤＣを含む、化合物。

【請求項７０】

任意に前記癌が卵巣癌であり、前記化合物が、請求項４９～６２のいずれか一項に記載のＡＤＣを含む、癌の治療における使用のための化合物。

【請求項７１】

癌の治療で使用するための薬剤を製造するための請求項４９～６２のいずれか一項に記載のＡＤＣの使用であって、任意に前記癌が卵巣癌である、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

配列表の参照

本出願は、２０１７年９月２２日に作成され、８９３，９８３バイトを含むファイル１０２９５ＷＯ０１－Ｓｅｑｕｅｎｃｅ．ｔｘｔとしてコンピュータ可読形式で提出された配列表を参照により組み入れる。

【０００２】

本発明は、ムチン１６（ＭＵＣ１６）に特異的である、抗体、およびその抗原結合断片

、ならびにその使用方法に関する。本発明はまた、ＭＵＣ１６およびＣＤ３に結合する二重特異性抗原結合分子、ならびにそれらの使用方法に関する。本発明はさらに、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片および治療薬（例えば細胞傷害性薬剤）を含む抗体－薬物複合体に関する。

【背景技術】

【０００３】

癌抗原１２５、細胞癌抗原１２５、炭水化物抗原１２５、またはＣＡ－１２５としても知られるムチン１６（ＭＵＣ１６）は、卵巣癌において高発現する内在性膜糖タンパク質が高度にグリコシル化された単一の膜貫通ドメインである。ＭＵＣ１６は、３つの主要ドメイン、すなわち細胞外Ｎ末端ドメイン、ウニ精子、エンテロキナーゼ、およびアグリン（ＳＥＡ）ドメインが点在する大きな縦列反復ドメイン、ならびに膜貫通領域のセグメントおよび短い細胞質テールを含むカルボキシル末端ドメイン、からなる。タンパク質分解の切断は、ＭＵＣ１６の細胞外部分の多くの血流への流出をもたらす。ＭＵＣ１６は、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管癌－腫瘤形成型、子宮頸部腺癌、および胃腸腺癌を含む癌、ならびに炎症性大腸疾患、肝硬変、心不全、腹膜感染症を含む疾患および病態、ならびに腹部手術において過剰発現する。（非特許文献１）。癌細胞上での発現は腫瘍細胞を免疫系から保護することが示されている。（非特許文献２）ＭＵＣ１６に対する抗体を使用して卵巣癌を治療するための方法が研究されている。オレゴボマブおよびアブゴボマブは、限られた成果を収めた抗ＭＵＣ１６抗体である。（Ｆｅｌｄｅｒ，上記、非特許文献３）

【０００４】

ＣＤ３は、Ｔ細胞受容体複合体（ＴＣＲ）と共にＴ細胞上に発現されるホモ二量体またはヘテロ二量体抗原であり、Ｔ細胞活性化に必要とされる。機能的ＣＤ３は、４つの異なる鎖：イプシロン、ゼータ、デルタ、およびガンマのうちの２つの二量体会合から形成される。ＣＤ３の二量体配置は、ガンマ／イプシロン、デルタ／イプシロン、およびゼータ／ゼータを含む。ＣＤ３に対する抗体はＴ細胞上でＣＤ３をクラスター化し、それによってペプチド負荷ＭＨＣ分子によるＴＣＲの関与と同様の方法でＴ細胞活性化を引き起こすことが示されている。したがって、抗ＣＤ３抗体はＴ細胞の活性化を含む治療目的のために提案されている。さらに、ＣＤ３および標的抗原に結合することができる二重特異性抗体は、標的抗原を発現する組織および細胞に対するＴ細胞免疫応答を標的とすることを含む治療的使用のために提案されている。

【０００５】

抗体－薬物複合体を含むＭＵＣ１６を標的とする抗原結合分子、ならびにＭＵＣ１６およびＣＤ３の両方に結合する二重特異性抗原結合分子は、ＭＵＣ１６を発現する細胞を特異的に標的化しＴ細胞媒介的に殺滅することが望まれる治療設定において有用である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｈａｒｉｄａｓ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，２０１４，ＦＡＳＥＢ　Ｊ．，２８：４１８３－４１９９

【非特許文献２】Ｆｅｌｄｅｒ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，２０１４，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃａｎｃｅｒ，１３：１２９

【非特許文献３】Ｄａｓ，Ｓ．ａｎｄ　Ｂａｔｒａ，Ｓ．Ｋ．２０１５，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．７５：４６６０－４６７４。

【発明の概要】

【０００７】

第１の態様において、本発明は、ヒトＭＵＣ１６に結合する抗体およびその抗原結合断片を提供する。本発明のこの態様による抗体は、とりわけ、ＭＵＣ１６を発現する細胞を標的とするのに有用である。本発明はまた、ヒトＭＵＣ１６およびヒトＣＤ３に結合する二重特異性抗体およびその抗原結合断片を提供する。本発明のこの態様による二重特異性

抗体は、例えばＭＵＣ１６を発現する細胞のＴ細胞媒介性死滅が有益または望ましい状況下で、とりわけ、ＣＤ３を発現するＴ細胞を標的とし、Ｔ細胞活性化を刺激するのに有用である。例えば、二重特異性抗体はＣＤ３媒介性Ｔ細胞活性化を卵巣腫瘍細胞のような特異的ＭＵＣ１６発現細胞に誘導することができる。

【０００８】

本発明の例示的な抗ＭＵＣ１６抗体を本明細書の表１および表２に列挙する。表１は、例示的な抗ＭＵＣ１６抗体の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）および軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）、ならびに重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２およびＨＣＤＲ３）、および軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２およびＬＣＤＲ３）のアミノ酸配列識別子を示す。表２は、例示的な抗ＭＵＣ１６抗体のＨＣＶＲ、ＬＣＶＲ、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３をコードする核酸分子の配列識別子を示す。

【０００９】

本発明は、表１に列挙されたＨＣＶＲアミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００１０】

本発明はまた、表１に列挙されたＬＣＶＲアミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００１１】

本発明はまた、表１に列挙されたＬＣＶＲアミノ酸配列のいずれかと対形成した、表１に列挙されたＨＣＶＲアミノ酸配列のいずれかを含む、ＨＣＶＲおよびＬＣＶＲのアミノ酸配列対（ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態によると、本発明は、表１に列挙された例示的な抗ＭＵＣ１６抗体のいずれかに含有されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態において、ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対は、配列番号１８／２６（例えば、Ｈ１Ｈ８７６７Ｐ）のものである。

【００１２】

本発明はまた、表１に列挙されたＨＣＤＲ１アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む重鎖ＣＤＲ１（ＨＣＤＲ１）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００１３】

本発明はまた、表１に列挙されたＨＣＤＲ２アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む重鎖ＣＤＲ２（ＨＣＤＲ２）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００１４】

本発明はまた、表１に列挙されたＨＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む重鎖ＣＤＲ３（ＨＣＤＲ３）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００１５】

本発明はまた、表１に列挙されたＬＣＤＲ１アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む軽鎖ＣＤＲ１（ＬＣＤＲ１）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００１６】
本発明はまた、表１に列挙されたＬＣＤＲ２アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む軽鎖ＣＤＲ２（ＬＣＤＲ２）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。
【００１７】
本発明はまた、表１に列挙されたＬＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む軽鎖ＣＤＲ３（ＬＣＤＲ３）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。
【００１８】
本発明はまた、表１に列挙されたＬＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかと対形成した表１に列挙されたＨＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかを含むＨＣＤＲ３およびＬＣＤＲ３のアミノ酸配列対（ＨＣＤＲ３／ＬＣＤＲ３）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態によると、本発明は、表１に列挙された例示的な抗ＭＵＣ１６抗体のいずれかに含有されるＨＣＤＲ３／ＬＣＤＲ３アミノ酸配列対を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態において、ＨＣＤＲ３／ＬＣＤＲ３アミノ酸配列対は、配列番号２４／３２（例えば、Ｈ１Ｈ８７６７Ｐ）のものである。
【００１９】
本発明はまた、表１に列挙された例示的な抗ＭＵＣ１６抗体のいずれかに含有される６つのＣＤＲのセット（すなわち、ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態において、ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３アミノ酸配列セットは、配列番号２０－２２－２４－２８－３０－３２（例えば、Ｈ１Ｈ８７６７Ｐ）からなる群から選択される。
【００２０】
関連する実施形態において、本発明は、表１に列挙された例示的な抗ＭＵＣ１６抗体のいずれかによって定義されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対に含有される６つのＣＤＲのセット（すなわち、ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３）を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。例えば、本発明は、配列番号１８／２６（例えば、Ｈ１Ｈ８７６７Ｐ）からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対に含有されるＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３アミノ酸配列セットを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。ＨＣＶＲアミノ酸配列およびＬＣＶＲアミノ酸配列内のＣＤＲを同定するための方法および技術は、当技術分野において周知であり、それらを使用して、本明細書に開示される特定のＨＣＶＲアミノ酸配列および／またはＬＣＶＲアミノ酸配列内のＣＤＲを同定することができる。ＣＤＲの境界を同定するために使用可能な例示的な規則には、例えば、Ｋａｂａｔ定義、Ｃｈｏｔｈｉａ定義、およびＡｂＭ定義が含まれる。一般的には、Ｋａｂａｔ定義は配列の可変性に基づいており、Ｃｈｏｔｈｉａ定義は構造ループ領域の位置に基づいており、ＡｂＭ定義はＫａｂａｔのアプローチとＣｈｏｔｈｉａのアプローチの間の折衷案である。例えば、Ｋａｂａｔ，“Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，”Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（１９９１）、Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２７３：９２７－９４８（１９９７）、およびＭａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：９２６８－９２７２（１９８９）を参照されたい。抗体内のＣＤＲ配列を同定するために、公開データベースも利用可能である。
【００２１】
本発明はまた、抗ＭＵＣ１６抗体またはその部分をコードする核酸分子を提供する。例えば、本発明は、表１に列挙されたＨＣＶＲアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分

子を提供し、特定の実施形態において、核酸分子は、表２に列挙されたＨＣＶＲ核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００２２】

本発明は、表１に列挙されたＬＣＶＲアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表２に列挙されたＬＣＶＲ核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００２３】

本発明は、表１に列挙されたＨＣＤＲ１アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表２に列挙されたＨＣＤＲ１核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列も含む。

【００２４】

本発明は、表１に列挙されたＨＣＤＲ２アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表２に列挙されたＨＣＤＲ２核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００２５】

本発明は、表１に列挙されたＨＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表２に列挙されたＨＣＤＲ３核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００２６】

本発明は、表１に列挙されたＬＣＤＲ１アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態では、この核酸分子は、表２に列挙されたＬＣＤＲ１核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００２７】

本発明は、表１に列挙されたＬＣＤＲ２アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表２に列挙されたＬＣＤＲ２核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００２８】

本発明は、表１に列挙されたＬＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表２に列挙されたＬＣＤＲ３核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはその少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００２９】

本発明はまた、ＨＣＶＲが３つのＣＤＲのセット（すなわち、ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３）を含み、ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３アミノ酸配列セットが、表１に列挙された例示的な抗ＭＵＣ１６抗体のいずれかによって定義されるとおりである、

ＨＣＶＲをコードする核酸分子を提供する。
【００３０】
本発明はまた、ＬＣＶＲが、３つのＣＤＲのセット（すなわち、ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３）を含み、ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３アミノ酸配列セットが、表１に列挙された例示的な抗ＭＵＣ１６抗体のいずれかによって定義されるとおりである、ＬＣＶＲをコードする核酸分子を提供する。
【００３１】
本発明は、ＨＣＶＲが、表１に列挙されたＨＣＶＲアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含み、ＬＣＶＲが、表１に列挙されたＬＣＶＲアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む、ＨＣＶＲおよびＬＣＶＲの両方をコードする核酸分子も提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表２に列挙されたＨＣＶＲ核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、表２に列挙されたＬＣＶＲ核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、を含む。本発明のこの態様によるある特定の実施形態において、この核酸分子は、ＨＣＶＲおよびＬＣＶＲが両方とも、表１に列挙された同じ抗ＭＵＣ１６抗体に由来する、ＨＣＶＲおよびＬＣＶＲをコードする。
【００３２】
本発明はまた、抗ＭＵＣ１６抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現できる組換え発現ベクターを提供する。例えば、本発明は、上述の核酸分子、すなわち表１に記載のＨＣＶＲ配列、ＬＣＶＲ配列、および／またはＣＤＲ配列のいずれかをコードする核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを含む。本発明の範囲内にはまた、このようなベクターが導入された宿主細胞、ならびに抗体または抗体断片の産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することによって抗体またはその一部を産生する方法と、そのように産生された抗体および抗体断片を回収する方法とが含まれる。
【００３３】
本発明は、修飾されたグリコシル化パターンを有する抗ＭＵＣ１６抗体を含む。いくつかの実施形態において、望ましくないグリコシル化部位を除去するための修飾、または例えば抗体依存性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）機能を増大させるためのフコース部分を欠失している抗体は有用であり得る（Ｓｈｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）ＪＢＣ　２７７：２６７３３を参照）。他の応用において、ガラクトシル化の修飾は、補体依存性細胞障害作用（ＣＤＣ）を修飾するために行うことができる。
【００３４】
別の態様において、本発明は、ＭＵＣ１６に特異的に結合する組換えヒト抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。別の関連する態様において、本発明は、抗ＭＵＣ１６抗体と第２の治療薬との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施形態において、第２の治療薬は、抗ＭＵＣ１６抗体と有利に組み合わされる任意の薬剤である。本発明の抗ＭＵＣ１６抗体を包含する追加の併用療法および併用製剤は、本明細書の他の箇所に開示されている。
【００３５】
別の態様において、本発明は、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体を用いてＭＵＣ１６を発現する腫瘍細胞を標的化し／死滅させるための治療方法を提供し、その治療方法は本発明の抗ＭＵＣ１６抗体を含む治療有効量の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。場合によっては、抗ＭＵＣ１６抗体（またはその抗原結合断片）は、癌（例えば、卵巣癌）を治療するために使用することができ、またはＡＤＣＣを増強する修飾Ｆｃドメイン（ｓｅｅ　ｅ．ｇ．Ｓｈｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）ＪＢＣ　２７７：２６７３３）、放射免疫療法、抗体－薬物複合体、もしくは腫瘍切除の効率を増大させるための他の方法を含むがこれらに限定されない方法によって、より細胞傷害性を高めるよ

うに修飾され得る。

【００３６】

本発明はまた、ＭＵＣ１６発現細胞に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患または障害（例えば、癌）の治療のための薬剤の製造における、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体の使用を含む。一態様において、本発明は、医薬に使用するための、本明細書に開示されている抗ＭＵＣ１６抗体もしくは抗原結合断片、またはＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体を含む化合物に関する。一態様において、本発明は、医薬に使用するための、本明細書に開示されている抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）を含む化合物に関する。

【００３７】

さらに別の態様において、本発明は、例えば、イメージング試薬などの診断用途のために単一特異性抗ＭＵＣ１６抗体を提供する。

【００３８】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の抗ＣＤ３抗体または抗体の抗原結合部分を使用してＴ細胞活性化を刺激するための治療方法を提供し、その治療方法は抗体を含む治療有効量の薬学的組成物を投与することを含む。

【００３９】

別の態様において、本発明は、２５℃の表面プラズモン共鳴アッセイで測定した場合に、約５３ｎＭ未満の結合解離平衡定数（K_D）でヒトムチン１６（ＭＵＣ１６）に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。さらに別の態様において、本発明は、２５℃の表面プラズモン共鳴アッセイで測定した場合に、約１５分超の解離半減期（ｔ１／２）でヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【００４０】

本発明はさらに、ヒトＭＵＣ１６への結合について、表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と競合する抗体または抗原結合断片を提供する。別の態様において、本発明は、ヒトＭＵＣ１６への結合について、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と競合する単離された抗体または抗原結合断片を提供する。

【００４１】

本発明はさらに、表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体としてヒトＭＵＣ１６上の同じエピトープに結合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。別の態様において、抗体または抗原結合断片は、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体としてヒトＭＵＣ１６上の同じエピトープに結合する。

【００４２】

本発明はさらに、ヒトＭＵＣ１６に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供し、抗体または抗原結合断片は、表１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）の相補性決定領域（ＣＤＲ）、および表１に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）のＣＤＲを含む。別の態様において、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２

／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む。さらに別の態様において、単離された抗体または抗原結合断片が、配列番号４－６－８－１２－１４－１６、２０－２２－２４－２８－３０－３２、３６－３８－４０－４４－４６－４８、５２－５４－５６－６０－６２－６４、６８－７０－７２－７６－７８－８０、８４－８６－８８－９２－９４－９６、１００－１０２－１０４－１０８－１１０－１１２、１１６－１１８－１２０－１２４－１２６－１２８、１３２－１３４－１３６－１４０－１４２－１４４、１４８－１５０－１５２－１５６－１５８－１６０、１６４－１６６－１６８－１７２－１７４－１７６、１８０－１８２－１８４－１８８－１９０－１９２、１９６－１９８－２００－３９６－３９８－４００、２０４－２０６－２０８－２１２－２１４－２１６、２２０－２２２－２２４－２２８－２３０－２３２、２３６－２３８－２４０－２４４－２４６－２４８、２５２－２５４－２５６－１９３８－１９４０－１９４２、２６０－２６２－２６４－２６８－２７０－２７２、２７６－２７８－２８０－１９３８－１９４０－１９４２、２８４－２８６－２８８－２９２－２９４－２９６、３００－３０２－３０４－３０８－３１０－３１２、３１６－３１８－３２０－３２４－３２６－３２８、３３２－３３４－３３６－３４０－３４２－３４４、３４８－３５０－３５２－３５６－３５８－３６０、３６４－３６６－３６８－３７２－３７４－３７６、および３８０－３８２－３８４－３８８－３９０－３９２からなる群から選択されるＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３ドメインをそれぞれ含む。

【００４３】

別の態様において、本発明は、ヒトＭＵＣ１６に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供し、抗体または抗原結合断片が、（ａ）配列番号２、１８、３４、５０、６６、８２、９８、１１４、１３０、１４６、１６２、１７８、１９４、２０２、２１８、２３４、２５０、２５８、２７４、２８２、２９８、３１４、３３０、３４６、３６２、および３７８からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、ならびに（ｂ）配列番号１０、２６、４２、５８、７４、９０、１０６、１２２、１３８、１５４、１７０、１８６、２１０、２２６、２４２、２６６、２９０、３０６、３２２、３３８、３５４、３７０、３８６、１９３６、および３９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）、を含む。さらなる態様において、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む、請求項１０に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【００４４】

本発明はさらに、配列番号１９０２の残基４２８～残基４８１の範囲のエピトープ内のヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。場合によっては、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号１９０２のアミノ酸残基４２８～４３４、４２９～４３４、４５３～４６７、４５９～４６７、４６０～４６７、および／または４７４～４８１と相互作用する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１９０２のアミノ酸残基４２８～４３４、４２９～４３４、４５３～４６７、４５９～４６７、４６０～４６７、および４７４～４８１と相互作用する。本発明はさらに、配列番号１９０２の残基１２６～残基１３８の範囲のエピトープ内のヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。場合によ

っては、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号１９０２のアミノ酸残基１２６～１３１、１２７～１３１、および／または１３２～１３８と相互作用する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１９０２のアミノ酸残基１２６～１３１、１２７～１３１、および１３２～１３８と相互作用する。本発明はさらに、配列番号１９０２の残基３５７～残基３６９の範囲のエピトープ内のヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体または抗原結合断片を提供する。場合によっては、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号１９０２のアミノ酸残基３５７～３６９、３５８～３６６、３５８～３６９、および／または３６１～３６９と相互作用する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１９０２のアミノ酸残基３５７～３６９、３５８～３６６、３５８～３６９、および３６１～３６９と相互作用する。本発明はさらに、ヒトＭＵＣ１６（配列番号１８９９）の５つの膜近位ＳＥＡドメインのうちの１つ以上に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。５つの膜近位のＳＥＡドメインは、配列番号１８９９の残基１３７９１～１４４５１に対応する。場合によっては、抗体または抗原結合断片は、２５℃での表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定した場合に、約６０ｎＭ未満のK_Dで結合する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１８９９の残基１４２３７～１４２９０に結合する。一実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１８／２６のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ対のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１８９９の残基１３９３５～１３９４７に結合する。一実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号８２／８５８のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ対のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１８９９の残基１４１６５～１４１７８に結合する。一実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号９８／１７０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ対のＣＤＲを含む。

【００４５】

一態様において、本発明は、ＭＵＣ１６のＳＥＡドメインの１つ以上に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。様々な実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または抗体結合断片は、ＳＥＡ１、ＳＥＡ２、ＳＥＡ３、ＳＥＡ４、ＳＥＡ５、ＳＥＡ６、ＳＥＡ７、ＳＥＡ８、ＳＥＡ９、ＳＥＡ１０、ＳＥＡ１１、ＳＥＡ１２、ＳＥＡ１３、ＳＥＡ１４、ＳＥＡ１５、またはＳＥＡ１６のうちのいずれか１つ以上に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ１（配列番号１８９９の残基１２０７４～１２２２９）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ２（配列番号１８９９の残基１２２３０から１２３８７）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片は、ＳＥＡ３（配列番号１８９９の残基１２３８８～１２５４３）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ４（配列番号１８９９の残基１２５４４～１２６９８）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ５（配列番号１８９９の残基１２６９９～１２８５４）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ６（配列番号１８９９の残基１２８５５～１３０１０）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ７（配列番号１８９９の残基１３０１１～１３１６６）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ８（配列番号１８９９の残基１３１６７～１３３２３）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ９（配列番号１８９９の残基１３３２４～１３４７８）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ１０（配列番号１８９９の残基１３４７９～１３６３４）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ１１（配列番号１８９９の残基１３６３５～１３７９０）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片は、ＳＥＡ１２（配列番号１８９９の残基１３７９１～１３９２３）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ１３（配列番号１８９９の残基１３９２４～１４０７４）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ１４（配列番号１８９９の残基１４０７

５～１４２２７）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ１５（配列番号１８９９の残基１４２２８～１４３２０）に結合する。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または断片はＳＥＡ１６（配列番号１８９９の残基１４３２１～１４４６４）に結合する。

【００４６】

別の態様によると、本発明は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片および治療薬（例えば細胞傷害性薬剤）を含む抗体－薬物複合体を提供する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片および細胞傷害性薬剤は、本明細書で論じるように、リンカーを介して共有結合している。様々な実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または抗原結合断片は、本明細書に記載の抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片のいずれかであり得る。

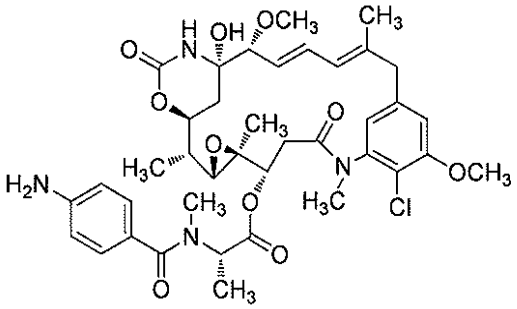
【００４７】

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、アウリスタチン、メイタンシノイド、ツブリシン、トマイマイシン誘導体、またはドラスタチン誘導体から選択される。場合によっては、細胞傷害性薬剤は、ＭＭＡＥもしくはＭＭＡＦから選択されるアウリスタチン、またはＤＭ１もしくはＤＭ４から選択されるメイタンシノイドである。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、本明細書で論じるように、式（Ｉ）または式（ＩＩ）の構造を有するメイタンシノイドである。

【００４８】

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、以下の構造

【化１】

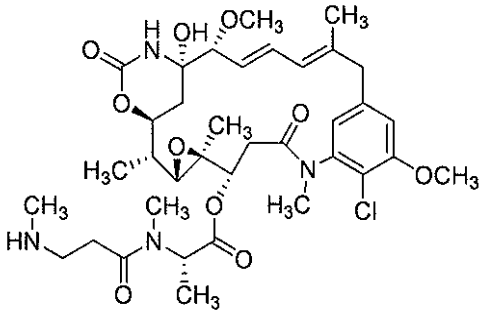


を有するメイタンシノイドである。

【００４９】

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、以下の構造

【化２】

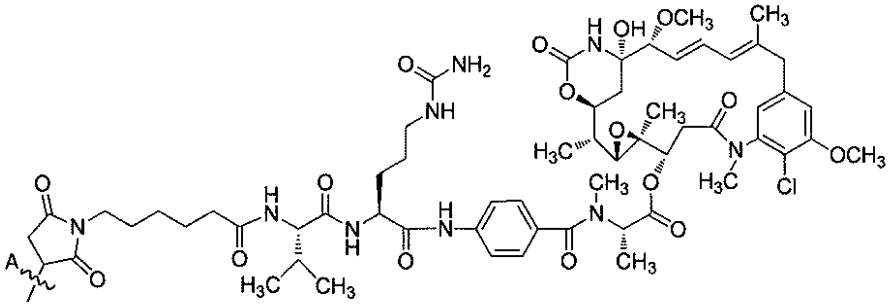


を有するメイタンシノイドである。

【００５０】

いくつかの実施形態において、抗体－薬物複合体は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片、および次式を含み、

【化３】



式中、

【化４】

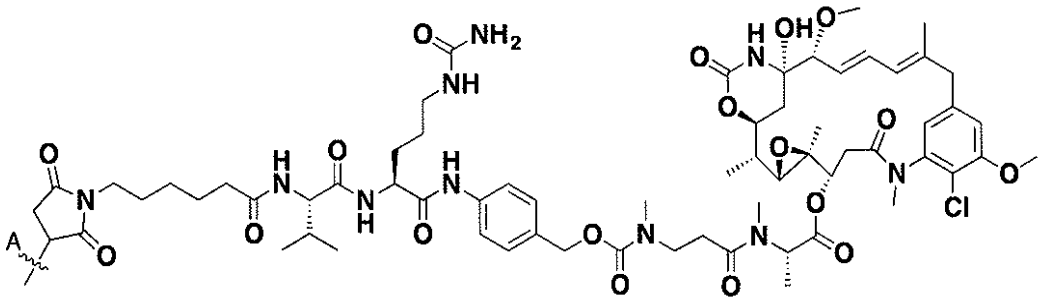


は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。

【００５１】

いくつかの実施形態において、抗体－薬物複合体は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片、および次式を含み、

【化５】



式中、

【化６】

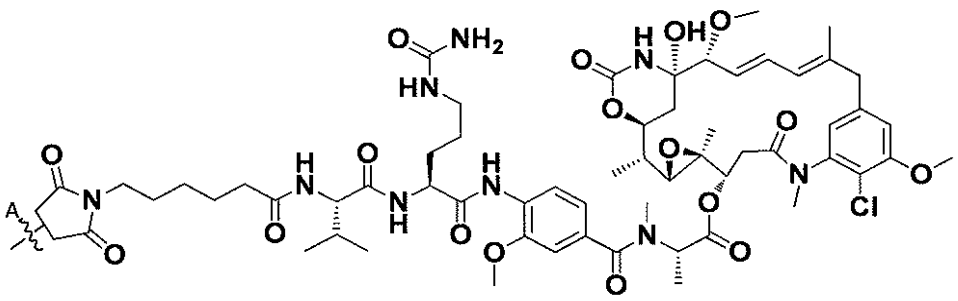


は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。

【００５２】

いくつかの実施形態において、抗体－薬物複合体は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片、および次式を含み、

【化７】



式中、

【化８】



は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。

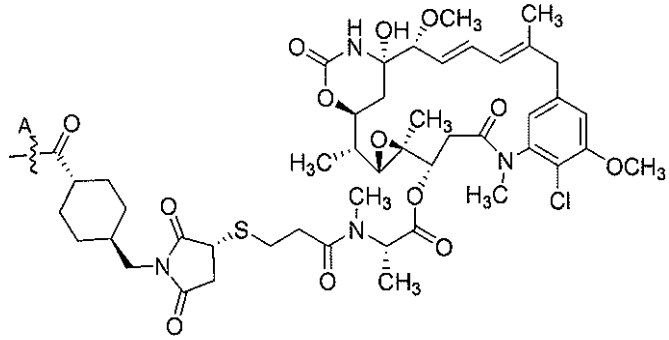
【００５３】

いくつかの実施形態において、結合は、システイン残基の硫黄成分を介して抗体またはその断片と接触する。

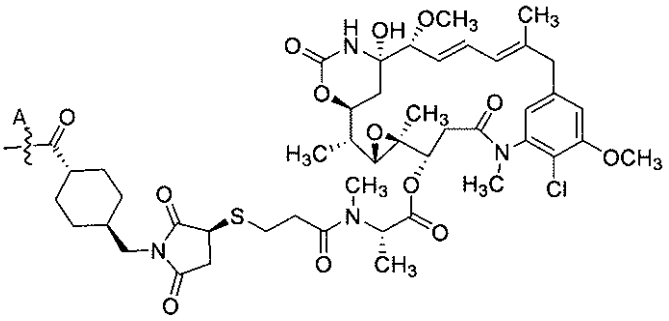
【００５４】

いくつかの実施形態において、抗体－薬物複合体は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片、および次式

【化９】



、または



、または

それらの混合物を含み、

式中、

【化１０】



は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。

【００５５】

いくつかの実施形態において、結合は、リジン残基の窒素成分を介して抗体またはその断片と接触する。

【００５６】

上記または本明細書で論じられる抗体－薬物複合体の様々な実施形態のいずれかにおいて、抗体－薬物複合体は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片あたり１～４つの細胞傷害性薬剤を含むことができる。

【００５７】

別の態様によると、本発明は、ＭＵＣ１６およびＣＤ３に結合する二重特異性抗原結合

分子（例えば抗体）を提供する。そのような二重特異性抗原結合分子はまた、本明細書において「抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性分子」、「抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子」、または「ＭＵＣ１６×ＣＤ３　ｂｓＡｂ」とも呼ばれる。抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性分子の抗ＭＵＣ１６部分は、ＭＵＣ１６（例えば卵巣腫瘍）を発現する細胞（例えば腫瘍細胞）を標的化するのに有用であり、二重特異性分子の抗ＣＤ３部分はＴ細胞を活性化するのに有用である。腫瘍細胞上のＭＵＣ１６およびＴ細胞上のＣＤ３の同時結合は、活性化Ｔ細胞によって標的腫瘍細胞を直接死滅させる（細胞溶解）を促進する。したがって、本発明の抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性分子は、とりわけ、ＭＵＣ１６発現腫瘍（例えば、卵巣癌）に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患および障害を治療するために有用である。

【００５８】

本発明のこの態様による二重特異性抗原結合分子は、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメイン、およびＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインを含む。本発明は、各抗原結合ドメインが軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）と対をなす重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）を含む抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性分子（例えば、二重特異性抗体）を含む。本発明の特定の例示的実施形態において、抗ＣＤ３抗原結合ドメインおよび抗ＭＵＣ１６抗原結合ドメインがそれぞれ共通のＬＣＶＲと対をなす異なる別個のＨＣＶＲを含む。例えば、本明細書の実施例３に示すように、第１の抗原結合ドメインが抗ＭＵＣ１６抗体（例えば、抗ＭＵＣ１６抗原結合ドメインに含まれるものと同じＬＣＶＲ）に由来するＬＣＶＲと対をなす抗ＣＤ３抗体に由来するＨＣＶＲを含む、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、第２の抗原結合ドメインが抗ＭＵＣ１６抗体に由来するＨＣＶＲ／ＬＣＶＲを含む、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗体が構築された。言い換えれば、本明細書に開示される例示的な分子において、抗ＣＤ３抗体由来のＨＣＶＲと抗ＭＵＣ１６抗体由来のＬＣＶＲとの対合は、ＣＤ３に特異的に結合する（しかしＭＵＣ１６には結合しない）抗原結合ドメインを生成する。このような実施形態において、第１および第２の抗原結合ドメインは、異なる抗ＣＤ３および抗ＭＵＣ１６のＨＣＶＲを含むが、共通の抗ＭＵＣ１６のＬＣＶＲを共有する。他の実施形態において、二重特異性抗原結合分子は異なる抗ＣＤ３および抗ＭＵＣ１６のＨＣＶＲを含むが、共通のＬＣＶＲを共有する。このＬＣＶＲのアミノ酸配列は、例えば配列番号１８９０に示されており、対応するＣＤＲのアミノ酸配列（すなわちＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３）は配列番号１８９２、１８９４、および１８９６にそれぞれ示される。遺伝子改変マウスを使用して、２つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの１つに由来する可変ドメインを含む同一の軽鎖と会合する２つの異なる重鎖を含む完全ヒト型二重特異性抗原結合分子を産生することができる。あるいは、可変重鎖を１つの共通の軽鎖と対にし、宿主細胞中で組換えにより発現させてもよい。このように、本発明の抗体は、単一の再編成された軽鎖と会合した免疫グロブリン重鎖を含み得る。いくつかの実施形態において、軽鎖は、ヒトＶκ１－３９遺伝子セグメントまたはＶκ３－２０遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含む。他の実施形態において、軽鎖は、ヒトＪκ５またはヒトＪκ１遺伝子セグメントと再編成されたヒトＶκ１－３９遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含む。

【００５９】

本発明は、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、２０１４年３月２７日公開の米国特許公開第２０１４／００８８２９５号および２０１６年７月２９日出願のＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４４７３２に記載のとおり、ＨＣＶＲアミノ酸配列のいずれか、ＬＣＶＲアミノ酸配列のいずれか、ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対のいずれか、重鎖ＣＤＲ１－ＣＤＲ２－ＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれか、または軽鎖ＣＤＲ１－ＣＤＲ２－ＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかを含む。

【００６０】

さらに、本発明は、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＣＤ３に特異的

に結合する第１の抗原結合ドメインは本明細書の表１６、１８、および２２に記載のＨＣＶＲアミノ酸配列のいずれかを含む。ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインはまた、本明細書の表１、１６、１９、および２３に記載のＬＣＶＲアミノ酸配列のいずれかを含んでもよい。特定の実施形態によると、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１６、１８、１９、２２、および２３に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対のいずれかを含む。本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１６、１８、および２２に記載の重鎖ＣＤＲ１－ＣＤＲ２－ＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれか、および／または本明細書の表１、１６、１９、および２３に記載の軽鎖ＣＤＲ１－ＣＤＲ２－ＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかを含む。

【００６１】

特定の実施形態によると、本発明は、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１６、１８、および２２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００６２】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１、６、１９、および２３に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００６３】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１６、１８、１９、２２、および２３に記載のＨＣＶＲおよびＬＣＶＲ（ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ）アミノ酸配列対を含む。

【００６４】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１６、１８、および２２に記載のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３（ＨＣＤＲ３）ドメイン、またはそれと少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表１、１６、１９、および２３に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３（ＬＣＤＲ３）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、を含む。

【００６５】

特定の実施形態において、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１６、１８、１９、２２、および２３に記載のＨＣＤＲ３／ＬＣＤＲ３アミノ酸配列対を含む。

【００６６】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を提供し、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、本明細書の表１６、１８、および２２に記載のアミノ酸を有する重鎖ＣＤＲ１（ＨＣＤＲ１）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、表１６、１８、および２２に記載のアミノ酸を有する重鎖ＣＤＲ２（ＨＣＤＲ２）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、表１６、１８、および２２に記載のアミノ酸を有する重鎖ＣＤＲ３（ＨＣＤＲ３）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表１、１６、１９、

および２３に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１（ＬＣＤＲ１）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表１、１６、１９、および２３に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２（ＬＣＤＲ２）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表１、１６、１９、および２３に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３（ＬＣＤＲ３）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、を含む。

【００６７】

本発明の特定の非限定的で例示的な抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子は、本明細書の表１６、１８、１９、２２、および２３に記載のアミノ酸配列をそれぞれ有する、ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３ドメインを含む、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインを含む。

【００６８】

本発明はさらに、二重特異性抗原結合分子を提供し、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、表１６、表１８、または表２２に記載のアミノ酸を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、表１、表１６、表１９、または表２３に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）とを含む。

【００６９】

別の態様において、本発明は、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインが、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択される重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）とを含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【００７０】

本発明は二重特異性抗原結合分子提供し、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ１は配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む。

【００７１】

さらなる態様において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインは、配列番号１７３０／２６、１７６２／２６、１７７８／２６、および１８６６／２６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む。

【００７２】

別の態様において、本発明は抗原結合分子を提供し、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）と３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）とを含み、ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する

第２の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）と３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ３）とを含み、Ａ１－ＨＣＤＲ１は、配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は、配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は、配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ１は配列番号２０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２は配列番号２２のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３は配列番号２４のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む。

【００７３】

本発明の特定の非限定的で例示的な抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子は、ＦＲ１（配列番号１９０３）、ＦＲ２（配列番号１９０４）、ＦＲ３（配列番号１９０５）、およびＦＲ４（配列番号１９０６）から選択されるアミノ酸配列を有する可変ドメインフレームワーク領域を含む重鎖を含むＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインを含む。

【００７４】

さらなる実施形態において、本発明の例示的な抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子は、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインが配列番号１９０７－１９０８－１９０９のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３を含むＨＣＶＲを含む、二重特異性抗原結合分子を含む。

【００７５】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインは、配列番号２、１８、３４、５０、６６、８２、９８、１１４、１３０、１４６、１６２、１７８、１９４、２０２、２１８、２３４、２５０、２５８、２７４、２８２、２９８、３１４、３３０、３４６、３６２、および３７８からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００７６】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインは、配列番号１０、２６、４２、５８、７４、９０、１０６、１２２、１３８、１５４、１７０、１８６、２１０、２２６、２４２、２６６、２９０、３０６、３２２、３３８、３５４、３７０、３８６、１９３６、および３９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００７７】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインは、配列番号１８／２６からなる群から選択されるＨＣＶＲおよびＬＣＶＲ（ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ）のアミノ酸配列対を含む。

【００７８】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性分子を提供し、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインは、配列番号８、２４、４０、５６、７２、８８、１０４、１２０、１３６、１５２、１６８、１８４、２００、２０８、２２４、２４０、２５６、２６４、２８０、２８８、３０４、３２０、３３６、３５２、３６８、および３８

４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３（ＨＣＤＲ３）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号１６、３２、４８、６４、８０、９６、１１２、１２８、１４４、１６０、１７６、１９２、２１６、２３２、２４８、２７２、２９６、３１２、３２８、３４４、３６０、３７６、３９２、４００、および１９４２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３（ＬＣＤＲ３）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

【００７９】

特定の実施形態において、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインは、配列番号２４／３２からなる群から選択されるＨＣＤＲ３／ＬＣＤＲ３アミノ酸配列対を含む。

【００８０】

本発明はまた、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を提供し、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインは、配列番号４、２０、３６、５２、６８、８４、１００、１１６、１３２、１４８、１６４、１８０、１９６、２０４、２２０、２３６、２５２、２６０、２７６、２８４、３００、３１６、３３２、３４８、３６４、および３８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１（ＨＣＤＲ１）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号６、２２、３８、５４、７０、８６、１０２、１１８、１３４、１５０、１６６、１８２、１９８、２０６、２２２、２３８、２５４、２６２、２７８、２８６、３０２、３１８、３３４、３５０、３６６、および３８２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２（ＨＣＤＲ２）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号８、２４、４０、５６、７２、８８、１０４、１２０、１３６、１５２、１６８、１８４、２００、２０８、２２４、２４０、２５６、２６４、２８０、３０４、３２０、３３６、３５２、３６８、および３８４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３（ＨＣＤＲ３）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号１２、２８、４４、６０、７６、９２、１０８、１２４、１４０、１５６、１７２、１８８、３９６、２１２、２２８、２４４、３９６、２６８、３９６、２９２、３０８、３２４、３４０、３５６、３７２、１９３８、および３８８からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１（ＬＣＤＲ１）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号１４、３０、４６、６２、７８、９４、１１０、１２６、１４２、１５８、１７４、１９０、３９８、２１４、２３０、２４６、３９８、２７０、３９８、２９４、３１０、３２６、３４２、３５８、３７４、１９４０、および３９０からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２（ＬＣＤＲ２）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号１６、３２、４８、６４、８０、９６、１１２、１２８、１４４、１６０、１７６、１９２、４００、２１６、２３２、２４８、４００、２７２、４００、２９６、３１２、３２８、３４４、３６０、３７６、１９４２、および３９２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３（ＬＣＤＲ３）ドメイン、または少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、を含む。

【００８１】

本発明の特定の非限定的で例示的な抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子は、配列番号２０－２２－２４－２８－３０－３２からなる群から選択されるアミノ酸配列

をそれぞれ有する、ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３を含む、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインを含む。

【００８２】

関連する実施形態において、本発明は、ＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインが、配列番号１８／２６からなる群から選択される重鎖および軽鎖可変領域（ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ）配列内に含有される重鎖および軽鎖ＣＤＲドメインを含む、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む。

【００８３】

一実施形態において、本発明は、配列番号１９５９のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ＭＵＣ１６結合アーム、配列番号１９６１のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ＣＤ３結合アームを含む、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗体を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号１９５９のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ＭＵＣ１６結合アーム、配列番号１９６２のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗ＣＤ３結合アームを含む、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗体を提供する。

【００８４】

別の態様において、本発明は、ヒトＣＤ３に結合する第１の抗原結合ドメインおよびヒトＭＵＣ１６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原結合分子を提供し、第２の抗原結合ドメインは、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体のいずれか１つの抗体または抗原結合断片に由来する。さらなる態様において、本発明は、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメイン、およびヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子を提供する。

【００８５】

本発明はさらに、ヒトＣＤ３を発現するヒト細胞およびカニクイザルＣＤ３を発現するカニクイザル細胞に結合する二重特異性抗原結合分子を提供する。別の態様において、二重特異性抗原結合分子は、ヒトＭＵＣ１６を発現しているヒト細胞に結合する。

【００８６】

別の態様において、本発明は、ヒト卵巣癌異種移植を保有する免疫無防備状態のマウスにおける腫瘍増殖を阻害する二重特異性抗原結合分子を提供する。本発明はさらに、ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける既存腫瘍の腫瘍増殖を抑制する、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【００８７】

別の態様において、本発明は、ｉ）約４ｎＭを超えるＥＣ$_{50}$値でエフェクター細胞と特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、ｉｉ）３ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$値で標的ヒト卵巣腫瘍細胞に特異的に結合する第２の抗原結合分子ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供し、このようなＥＣ$_{50}$結合値はインビトロＦＡＣＳ結合アッセイで測定される。

【００８８】

一実施形態において、二重特異性抗原結合分子は、約２ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$値で、標的とする卵巣腫瘍細胞に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインを含む。場合によっては、第１の抗原結合ドメインは、約４０ｎＭ超、約１００ｎＭ超、約２００ｎＭ超、約３００ｎＭ超、約４００ｎＭ超、約５００ｎＭ超、または約１μＭ超のＥＣ$_{50}$値で、ヒトＣＤ３およびカニクイザルＣＤ３のそれぞれに結合する。場合によっては、第１の抗原結合ドメインは、弱いもしくは測定不可能な結合もしくは結合親和性で、ヒトＣＤ３およびカニクイザルＣＤ３のそれぞれに特異的に結合する。

【００８９】

いくつかの実施形態において、抗原結合分子は、インビトロＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅アッセイで測定した場合に、約３１ｐＭ未満のＥＣ$_{50}$値でＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅を誘導し、例えば、腫瘍細胞はＯＶＣＡＲ３細胞である。

【００９０】
場合によっては、第１の抗原結合ドメインは、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、約１１ｎＭ超のK_D値で、ヒトＣＤ３に結合する。場合によっては、第１の抗原結合ドメインは、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、約１５ｎＭ超、約３０ｎＭ超、約６０ｎＭ超、約１２０ｎＭ超、約３００ｎＭ超、または約５００ｎＭ超のK_D値で、ヒトＣＤ３およびカニクイザルＣＤ３のそれぞれに結合する。
【００９１】
特定の実施形態において、本発明の抗ＣＤ３抗体、その抗体結合断片および二重特異性抗体は、生殖系列配列と親抗体配列との間の相違に基づいて段階的に親のアミノ酸残基を置き換えることによって作製された。
【００９２】
いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、第２の抗原結合ドメインは、ヒトＭＵＣ１６への結合について、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ３）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、Ａ２－ＨＣＤＲ１は配列番号２０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２は配列番号２２のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３は配列番号２４のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、第２の抗原結合ドメインは、ヒトＭＵＣ１６への結合について、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合する。
【００９３】
いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３への結合について、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、Ａ１－ＨＣＤＲ１は配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本発明は二重特異性抗原結合分子を提供し、第１の抗原結合ドメインは、ヒトＣＤ３への結合について、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合する。
【００９４】
いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３への結合について、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、第２の抗原結合ドメインは、ヒトＭＵＣ１６への結合について、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合する。

【００９５】
一態様において、本発明は、抗ＭＵＣ１６抗原結合分子または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む薬学的組成物を提供する。本発明はさらに、抗ＭＵＣ１６抗原結合分子または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む薬学的組成物を対象に投与することを含む、対象における癌の治療方法を提供する。いくつかの実施形態において、癌は、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管細胞癌腫瘤形成型、子宮頸部の腺癌、および胃腸管の腺癌を含む癌からなる群から選択される。場合によっては、癌は卵巣癌である。

【００９６】
別の態様において、本発明は、本明細書に開示の抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子のＨＣＶＲ、ＬＣＶＲまたはＣＤＲ配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、本明細書の表２、１７、２０、２１、２３、および２５に記載のポリヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびに表２、１７、２０、２１、２３、および２５に記載のポリヌクレオチド配列のうちの２つ以上をその機能的組み合わせまたは配置のいずれかで含む核酸分子を包含する。本発明の核酸を保有する組換え発現ベクター、およびそのようなベクターが導入された宿主細胞もまた、抗体の産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することによって、および産生された抗体を回収することによって、抗体を産生する方法と同様に本発明に含まれる。

【００９７】
本発明は、ＣＤ３とＭＵＣ１６に結合する二重特異性抗原結合分子を形成するために、ＣＤ３に特異的に結合する前述の抗原結合ドメインのいずれかが、ＭＵＣ１６に特異的に結合する前述の抗原結合ドメインのいずれかと組み合わされ、連結され、あるいは関連付けられる、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む。

【００９８】
本発明は、改変グリコシル化パターンを有する抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む。いくつかの用途において、望ましくないグリコシル化部位を除去するための修飾、または例えば抗体依存性細胞傷害作用（ＡＤＣＣ）機能を増大させるためのフコース部分を欠失している抗体は有用であり得る（Ｓｈｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）ＪＢＣ　２７７：２６７３３を参照）。他の応用において、ガラクトシル化の修飾は、補体依存性細胞障害作用（ＣＤＣ）を修飾するために行うことができる。

【００９９】
別の態様において、本発明は、本明細書に開示の抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。関連する態様において、本発明は、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子と第２の治療薬との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施形態において、第２の治療薬は、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子と有利に組み合わされる任意の薬剤である。抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子と有利に組み合わせることができる例示的な薬剤は、本明細書の他所に詳細に論じられている。

【０１００】
さらに別の態様において、本発明は、本発明の抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を用いてＭＵＣ１６を発現する腫瘍細胞を標的化し／死滅させるための治療方法を提供し、その治療方法は、本発明の抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む治療有効量の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【０１０１】
本発明はまた、ＭＵＣ１６発現細胞に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患または障害の治療のための薬剤の製造における本発明の抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子の使用を含む。

【０１０２】
別の態様において、本発明は、対象から生物学的サンプルを得ることと、生物学的サン

プルを抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片に接触させて、ＭＵＣ１６と抗ＭＵＣ１６抗体または抗原結合断片との結合を検出することによって、生物学的サンプル中にＭＵＣ１６が存在するかどうかを検出することと、を含む、生物学的サンプル中のＭＵＣ１６を検出する方法を提供する。場合によっては、生物学的サンプルは、血漿、血清、腹水、卵巣、子宮、子宮頸管、肝臓、膀胱、膵臓、胃、小腸もしくは大腸、胆嚢、乳房、肺、腎臓、唾液、および涙腺、または任意のそれらの類上皮悪性腫瘍から選択される組織または体液サンプルである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１８９９の残基１３７９１～１４４５１に対応するヒトＭＵＣ１６の５つの膜近位ＳＥＡドメインのうちの１つ以上にヒトＭＵＣ１６に結合する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号１８９９の残基１３８１０～１４４５１のヒトＭＵＣ１６と結合する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、ヒトＭＵＣ１６のＳＥＡ１、ＳＥＡ２、ＳＥＡ３、ＳＥＡ４、ＳＥＡ５、ＳＥＡ６、ＳＥＡ７、ＳＥＡ８、ＳＥＡ９、ＳＥＡ１０、ＳＥＡ１１、ＳＥＡ１２、ＳＥＡ１３、ＳＥＡ１４、ＳＥＡ１５、またはＳＥＡ１６のうちのいずれか１つ以上に結合する。

【０１０３】

別の態様において、本発明は、患者から組織サンプルを得ることと、組織サンプルを抗ＭＵＣ１６抗体と接触させて、ＭＵＣ１６と抗ＭＵＣ１６抗体との結合を検出することによって、ＭＵＣ１６が組織サンプル中に存在するかどうかを検出することと、を含む、患者におけるＭＵＣ１６を検出する方法を提供する。場合によっては、この方法は、組織サンプル中のＭＵＣ１６の存在が検出された場合に、癌を有する患者を診断することをさらに含む。一実施形態において、組織サンプルは卵巣組織である。場合によっては、抗ＭＵＣ１６抗体は、配列番号１８９９の残基１２７８３～１３４６７のエピトープに特異的である。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体は、配列番号２０２／２１０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ対のＣＤＲを含む。場合によっては、抗ＭＵＣ１６抗体は、配列番号１８９９の残基１３８１０～１４４５１のエピトープに特異的である。一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体は、配列番号２５０／１９３６、２５８／２６６、３１４／３２２、および１９４４／１９５２からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対のＣＤＲを含む。

【０１０４】

別の態様において、本発明は、患者から血漿サンプルを得ることと、血漿サンプルを配列番号２０２／２１０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ対のＣＤＲを含む抗ＭＵＣ１６抗体と接触させて、ＭＵＣ１６と抗ＭＵＣ１６抗体との結合を検出することによって、ＭＵＣ１６が血漿サンプル中に存在するかどうかを検出することと、を含む、患者におけるＭＵＣ１６を検出する方法を提供する。場合によっては、この方法は、血漿サンプル中のＭＵＣ１６の存在が検出された場合に、癌を有する患者を診断することをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、有効量の抗ＣＤ３ｘＭＵＣ１６二重特異性抗体を診断した患者に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、抗ＭＵＣ１６抗体もしくはその抗原結合断片および細胞傷害性薬剤を含む有効量のＡＤＣを診断した患者に投与することをさらに含む。

【０１０５】

別の態様において、本発明は、ＭＵＣ１６に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供し、抗体または抗原結合断片が、配列番号２０２／２１０、２５０／１９３６、２５８／２６６、３１４／３２２、８２／８５８、９８／１７０、および１９４４／１９５２からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対のＣＤＲを含む。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号２０４－２０６－２０８－２１２－２１４－２１６、２５２－２５４－２５６－１９３８－１９４０－１９４２、２６０－２６２－２６４－２６８－２７０－２７２、３１６－３１８－３２０－３２４－３２６－３２８、８４－８６－８８－１８９２－１８９４－１８９６、１００－１０２－１０４－１７２－１７４－１７６、および１９４６－１９４８－１９５０－１９５４－１９５６－１９５８からなる群から選択されるＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ

３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３ドメインをそれぞれ含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片が、２０２／２１０、２５０／１９３６、２５８／２６６、３１４／３２２、８２／８５８、９８／１７０、および１９４４／１９５２からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む。

【０１０６】

他の実施形態において、後述の詳細な説明の総説から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【０１０７】

【図１】野生型マウス（図１）における抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の薬物動態プロファイルを示す。

【図２】ヒト化ＣＤ３マウス（図２）における抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の薬物動態プロファイルを示す。

【図３】ヒト化ＭＵＣ１６×ＣＤ３マウス（図３）における抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の薬物動態プロファイルを示す。

【図４】ＯＶＣＡＲ－３モデル試験１（６日目の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ^2／ｓｒ］）の結果を示す。全ての群は、投与開始前にＢＬＩによって評価されたものと同様の腫瘍量を有していた。示したデータは、腫瘍移植後６日目にＢＬＩによって評価された腫瘍量である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。群間の腫瘍量に有意差はなかった。

【図５】ＯＶＣＡＲ－３モデル試験１（２０日目の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２^2／ｓｒ］）の結果を示す。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１は、０．１および０．５ｍｇ／ｋｇで腫瘍量を有意に減少させる。ヒトＴ細胞を移植したＮＳＧマウスにヒトＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞を移植した。腫瘍移植の６日後に処置を開始した。マウスを６、１０、１３、１６、および２１日目に、０．０１、０．１、または０．５ｍｇ／ｋｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１を腹腔内投与して、またはＣＤ３結合対照もしくは非結合対照（０．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内）で処置した。示したデータは、腫瘍移植後２０日目にＢＬＩによって評価された腫瘍量である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１による処置を非結合対照と比較した（ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１　０．５ｍｇ／ｋｇについて＊＊ｐ＜０．０１、０．１ｍｇ／ｋｇについて＃ｐ＜０．０５）。

【図６】は、ＯＶＣＡＲ－３モデル試験１（Ｄ６とＤ２０との間のＢＬＩ顕性腫瘍における倍率変化）の結果を示す。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１は、０．１および０．５ｍｇ／ｋｇで腫瘍量における倍率変化を有意に減少させる。ヒトＴ細胞を移植したＮＳＧマウスにヒトＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞を移植した。マウスを６、１０、１３、１６、および２１日目に、０．０１、０．１、または０．５ｍｇ／ｋｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１を腹腔内投与して、またはＣＤ３結合対照もしくは非結合対照（０．５ｍｇ／ｋｇ腹腔内）で処置した。示されたデータは、最初の測定値（処置開始前に実施）および試験終了時の２０日目の腫瘍量の倍率変化である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１による処置を非結合対照と比較した（ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１　０．５ｍｇ／ｋｇについて＊＊ｐ＜０．０１、０．１ｍｇ／ｋｇについて＃ｐ＜０．０５、０．０１ｍｇ／ｋｇについて＄ｐ＜０．０５）。

【図７】ＯＶＣＡＲ－３モデル試験２（４日目の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ^2／ｓｒ］）の結果を示す。全ての群は、投与開始前にＢＬＩによって評価されたものと同様の腫瘍量を有していた。示したデータは、腫瘍移植後４日目にＢＬＩによって評価された腫瘍量である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。群間で４日目の腫瘍量に有意差はなかった。

【図８】ＯＶＣＡＲ－３モデル試験２（２５日目の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２^2／ｓｒ］）の結果を示す。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５は、０．５、１および５ｍｇ／ｋｇで腫瘍量を有意に減少させる。ヒトＴ細胞を移植したＮＳＧマウスにヒトＯＶＣＡＲ－

３／Ｌｕｃ細胞を移植した。腫瘍移植の５日後に処置を開始した。マウスを５、８、１２、１５、１９、および２２日目に、０．１、０．５、１、または５ｍｇ／ｋｇのＲＥＧＮ４０１９を静脈内投与、またはＣＤ３結合対照もしくは非結合対照（５ｍｇ／ｋｇ静脈内）を投与した。示したデータは、腫瘍移植後２５日目にＢＬＩによって評価された腫瘍量である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５による処置を非結合対照と比較した（ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５　５ｍｇ／ｋｇについて＊＊ｐ＜０．０１、１ｍｇ／ｋｇについて＃＃ｐ＜０．０１、０．５ｍｇ／ｋｇについて＄＄ｐ＜０．０１）。

【図９】ＯＶＣＡＲ－３モデル試験２（Ｄ４とＤ２５との間のＢＬＩ顕性腫瘍における倍率変化）の結果を示す。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５は、０．５、１および５ｍｇ／ｋｇで腫瘍増殖を有意に減少させる。ヒトＴ細胞を移植したＮＳＧマウスにヒトＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞を移植した。マウスを５、８、１２、１５、１９、および２２日目に、０．１、０．５、１、または５ｍｇ／ｋｇのＲＥＧＮ４０１９を静脈内投与、またはＣＤ３結合対照もしくは非結合対照（５ｍｇ／ｋｇ静脈内）で処置した。示されたデータは、最初の測定値（処置開始の前日に実施）および試験終了時の２５日目の腫瘍量の倍率変化である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５による処置を非結合対照と比較した（ＲＥＧＮ４０１９　５ｍｇ／ｋｇについて＊＊ｐ＜０．０１、１ｍｇ／ｋｇについて＃＃ｐ＜０．０１、０．５ｍｇ／ｋｇについて＄＄ｐ＜０．０１）。

【図１０】ＩＤ８－ＶＥＧＦ／ｈｕＭＵＣ１６モデルの結果を示す。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１移植後４７日目の腫瘍サイズは、移植日または腫瘍移植後１０日のいずれかに処置を開始する場合、同系モデルにおいて腫瘍増殖を有意に減少させる。マウスＣＤ３およびキメラＭＵＣ１６分子の代わりにヒトＣＤ３を発現するマウスに、ヒトＭＵＣ１６の一部を発現するマウス卵巣腫瘍株を移植した。移植日または移植後１０日に、マウスにＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（１００μg腹腔内）を投与するか、または移植日にＣＤ３結合対照（１００μg腹腔内）を投与した。即時処置群については０、４、７、１０、１３、１７、２０、または２４日目にマウスを処置し、Ｄ１０に投与を開始した群については１０、１３、１７、２０、および２４日目にマウスを処置した。示したデータは移植後４７日目の腫瘍体積である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１による処置をＣＤ３結合対照と比較した（＊＊ｐ＜０．０１、Ｄ０から開始、＊ｐ＜０．０５、Ｄ１０から開始）。

【図１１Ａ】ＰＥＯ－１、ＯＶＣＡＲ３－Ｌｕｃ、ジャーカット細胞、およびカニクイザルＴ細胞に選択二重特異性抗体の結合のフローサイトメトリー分析（またはＦＡＣＳ）の結果を示す。滴定分析は、各抗体の一連の段階希釈物、すなわちＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００２、もしくはＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００３、または第１もしくは第２のアイソタイプ対照抗体（ＣＤ３またはＭＵＣ１６に対する交差反応性を有さない）を試験することによって行った。

【図１１Ｂ】ＰＥＯ－１、ＯＶＣＡＲ３－Ｌｕｃ、ジャーカット細胞、およびカニクイザルＴ細胞に選択二重特異性抗体の結合のフローサイトメトリー分析（またはＦＡＣＳ）の結果を示す。滴定分析は、各抗体の一連の段階希釈物、すなわちＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００２、もしくはＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００３、または第１もしくは第２のアイソタイプ対照抗体（ＣＤ３またはＭＵＣ１６に対する交差反応性を有さない）を試験することによって行った。

【図１１Ｃ】ＰＥＯ－１、ＯＶＣＡＲ３－Ｌｕｃ、ジャーカット細胞、およびカニクイザルＴ細胞に選択二重特異性抗体の結合のフローサイトメトリー分析（またはＦＡＣＳ）の結果を示す。滴定分析は、各抗体の一連の段階希釈物、すなわちＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００２、もしく

はＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００３、または第１もしくは第２のアイソタイプ対照抗体（ＣＤ３またはＭＵＣ１６に対する交差反応性を有さない）を試験することによって行った。

【図１２Ａ】ヒトＰＢＭＣ存在下で抗ＭＵＣ１６×抗ＣＤ３処置後に、４８時間細胞傷害性アッセイにおけるＰＥＯ－１（図１２Ａ）細胞死滅の例を示す。

【図１２Ｂ】ヒトＰＢＭＣ存在下で抗ＭＵＣ１６×抗ＣＤ３処置後に、４８時間細胞傷害性アッセイにおけるＯＶＣＡＲ３－Ｌｕｃ（図１２Ｂ）細胞死滅の例を示す。

【発明を実施するための形態】

【０１０８】

本発明を説明する前に、本発明は、特定の方法および説明される実験条件が変わり得るので、このような方法および条件に制限されないことは理解されるべきである。本明細書で使用する用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲によってのみ制限されるので、制限することを企図するものではないことも理解されることになっている。

【０１０９】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は全て、本発明の属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で使用される場合、用語「約」は、特定の列挙された数値に関して使用されるとき、その値が列挙された値から１％以下だけ変動し得ることを意味する。例えば、本発明で使用する場合、表現「約１００」は、９９および１０１、ならびにその間の全値（例えば、９９．１、９９．２、９９．３、９９．４など）を含む。

【０１１０】

本明細書に説明されるものと類似のまたは等価の任意の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料をこれから説明する。本明細書で言及される特許、出願、および非特許刊行物は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１１１】

定義

本明細書で用いられる「ＣＤ３」という表現は、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、４つの受容体鎖すなわちＣＤ３－イプシロン、ＣＤ３－デルタ、ＣＤ３－ゼータ、ＣＤ３－ガンマのうち２つの会合から形成されるホモ二量体またはヘテロ二量体からなる抗原を指す。ヒトＣＤ３－イプシロンは、配列番号１８９７に記載のアミノ酸配列を含み、ヒトＣＤ３－デルタは、配列番号１８９８に記載のアミノ酸配列を含む。本明細書におけるタンパク質、ポリペプチド、およびタンパク質断片への全ての言及は、非ヒト種由来であると明確に特定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド、またはタンパク質断片のヒト型を指すことを意図している。したがって、表現「ＣＤ３」は、非ヒト種、例えば「マウスＣＤ３」、「サルＣＤ３」などに由来するものとして特定されない限り、ヒトＣＤ３を意味する。

【０１１２】

本明細書で使用される場合、「ＣＤ３に結合する抗体」または「抗ＣＤ３抗体」は、単一のＣＤ３サブユニット（例えば、イプシロン、デルタ、ガンマ、またはゼータ）を特異的に認識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を特異的に認識する抗体およびその抗原結合断片（例えば、ガンマ／イプシロン、デルタ／イプシロン、およびゼータ／ゼータＣＤ３二量体）を含む。本発明の抗体および抗原結合断片は、可溶性ＣＤ３および／または細胞表面発現ＣＤ３に結合することができる。可溶性ＣＤ３には、天然ＣＤ３タンパク質、ならびに膜貫通ドメインを欠くかまたは細胞膜と会合していない、例えば単量体および二量体ＣＤ３構築物などの組換えＣＤ３タンパク質変異体が含まれる。

【０１１３】

本明細書で使用される場合、表現「細胞表面発現ＣＤ３」は、インビトロまたはインビ

ボで細胞表面上に発現される１つ以上のＣＤ３タンパク質（複数可）を意味し、ＣＤ３タンパク質の少なくとも一部は細胞膜の細胞外側に曝され、抗体の抗原結合部分に接近可能である。「細胞表面発現ＣＤ３」としては、細胞膜内の機能的Ｔ細胞受容体の中に含まれるＣＤ３タンパク質が挙げられる。「細胞表面発現ＣＤ３」という表現は、細胞の表面上の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（例えば、ガンマ／イプシロン、デルタ／イプシロン、およびゼータ／ゼータＣＤ３二量体）を含む。「細胞表面発現ＣＤ３」という表現はまた、他のＣＤ３鎖型なしで、細胞の表面上にそれ自体で発現するＣＤ３鎖（例えば、ＣＤ３－イプシロン、ＣＤ３－デルタ、またはＣＤ３－ガンマ）も含む。「細胞表面発現ＣＤ３」は、通常その表面にヒトＣＤ３を発現しないがその表面にＣＤ３を発現するように人工的に操作されている細胞の表面上に発現されるＣＤ３タンパク質を含むかまたはそれからなることができる。あるいは、「細胞表面発現ＣＤ３」は、通常その表面にヒトＣＤ３を発現しないがその表面にＣＤ３を発現するように人工的に操作されている細胞の表面上に発現されるＣＤ３タンパク質を含むかまたはそれからなることができる。

【０１１４】

本発明で使用する場合、「ＭＵＣ１６」という表現は、ムチン１６を指す。ＭＵＣ１６は、卵巣癌において高度に発現される単一の膜貫通ドメインの高度にグリコシル化された内在性膜糖タンパク質である。ヒトＭＵＣ１６のアミノ酸配列を配列番号１８９９に示す。

【０１１５】

本明細書で使用される場合、「ＭＵＣ１６に結合する抗体」または「抗ＭＵＣ１６抗体」は、ＭＵＣ１６を特異的に認識する抗体およびその抗原結合断片を含む。

【０１１６】

用語「抗原結合分子」は、抗体および抗体の抗原結合断片を含み、例えば二重特異性抗体を含む。

【０１１７】

本発明で使用する場合、「抗体」という用語は、特定の抗原（例えばＭＵＣ１６またはＣＤ３）に特異的に結合するかまたはそれと相互作用する少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む、任意の抗原結合分子または分子複合体を意味する。用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互連結された４本のポリペプチド鎖、２本の重（Ｈ）鎖および２本の軽（Ｌ）鎖を含む免疫グロブリン分子、ならびにそれらの多量体（例えば、ＩｇＭ）を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではＨＣＶＲまたはV_Hと略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、３つのドメイン、C_H1、C_H2、およびC_H3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではＬＣＶＲまたはV_Lと略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は１つのドメイン（C_L1）を含む。V_H領域およびV_L領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる、より保存された領域が点在する相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変領域へとさらに細分することができる。各V_HおよびV_Lは、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４の順でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置された３つのＣＤＲおよび４つのＦＲからなる。本発明の異なる実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体または抗ＣＤ３抗体（またはその抗原結合部分）のＦＲは、ヒト生殖系列配列と同一であってもよく、または天然にもしくは人工的に修飾されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、２つ以上のＣＤＲの並列分析に基づいて定義され得る。

【０１１８】

本発明で使用する場合、「抗体」という用語は、完全抗体分子の抗原結合断片も含む。抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」という用語、およびこれらに類するものは、本明細書で使用する場合、天然の、酵素処理で入手可能な、合成の、または遺伝子操作された、抗原を特異的に結合して複合体を形成するポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の抗体結合断片は、例えば、抗体可変ドメインおよび場合により定常ドメインをコードするＤＮＡの操作および発現に関連するタンパク質消化技術または組換え遺伝

子操作技術などの任意の適切な標準的技術を用いて、完全抗体分子から誘導され得る。このようなＤＮＡは既知であり、および／または例えば市販の供給源、ＤＮＡライブラリー（例えばファージ－抗体ライブラリーを含む）から容易に入手可能であるか、または合成することができる。ＤＮＡは、例えば、１つ以上の可変ドメインおよび／もしくは定常ドメインを適切な配置変更と配置し、またはコドンを導入し、システイン残基を生成し、アミノ酸を修飾、付加もしくは欠失などするために、化学的にまたは分子生物学技術を用いて配列決定および操作され得る。

【０１１９】

抗体結合断片の非限定例としては、（ｉ）Ｆａｂ断片、（ｉｉ）Ｆ（ａｂ’）２断片、（ｉｉｉ）Ｆｄ断片、（ｉｖ）Ｆｖ断片、（ｖ）一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子、（ｖｉ）ｄＡｂ断片、および（ｖｉｉ）抗体の超可変領域（例えば、ＣＤＲ３ペプチドなどの単離された相補性決定領域（ＣＤＲ））を模倣するアミノ酸残基、または拘束ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４ペプチドからなる最小認識単位が挙げられる。ドメイン特異的抗体、単一ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど）、小型モジュール型免疫医薬品（ＳＭＩＰ）、およびサメ可変ＩｇＮＡＲドメインなどの他の操作された分子も、本明細書で使用する「抗原結合断片」という表現に包含される。

【０１２０】

抗体の抗原結合断片は、典型的には、少なくとも１つの可変ドメインを含むことになっている。可変ドメインは、任意のサイズまたはアミノ酸組成物であり得、概して、１つ以上のフレームワーク配列に隣接しているかまたは１つ以上のフレームワーク配列と共にインフレームである少なくとも１つのＣＤＲを含む。V_Lドメインと結合したV_Hドメインを有する抗体結合断片において、V_HドメインおよびV_Lドメインは、任意の適切な配置で互いに対して配置され得る。例えば、可変領域は二量体であり、V_H-V_H、V_H-V_LまたはV_L-V_L二量体を含んでもよい。あるいは、抗体の抗原結合断片は、単量体のV_HドメインまたはV_Lドメインを含有し得る。

【０１２１】

ある特定の実施形態において、抗体の抗原結合断片は、少なくとも１つの定常ドメインへ共有結合した少なくとも１つの可変ドメインを含有し得る。本発明の抗体の抗原結合断片に見出すことができる可変および定常ドメインの非限定的で例示的な構成としては、（ｉ）V_H-C_H1、（ｉｉ）V_H-C_H2、（ｉｉｉ）V_H-C_H3、（ｉｖ）$V_H-C_H1-C_H2$、（ｖ）$V_H-C_H1-C_H2-C_H3$、（ｖｉ）$V_H-C_H2-C_H3$、（ｖｉｉ）V_H-C_L、（ｖｉｉｉ）V_L-C_H1、（ｉｘ）V_L-C_H2、（ｘ）V_L-C_H3、（ｘｉ）$V_L-C_H1-C_H2$、（ｘｉｉ）$V_L-C_H1-C_H2-C_H3$、（ｘｉｉｉ）$V_L-C_H2-C_H3$、および（ｘｉｖ）V_L-C_Lが挙げられる。先に列挙した例示的な立体配置のいずれかを含む、可変ドメインおよび定常ドメインの任意の立体配置において、可変ドメインおよび定常ドメインは、互いに直接連結されていてもよく、または完全もしくは部分的ヒンジ領域もしくはリンカー領域によって連結されていてもよい。ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子において隣接する可変ドメインおよび／または定常ドメイン間の可撓性または半可撓性の結合をもたらす少なくとも２つの（例えば、５、１０、１５、２０、４０、６０またはそれより多数の）アミノ酸からなり得る。そのうえ、本発明の抗体の抗原結合断片は、互いとのおよび／または１つ以上の単量体V_HドメインもしくはV_Lドメインとの非共有結合において、先に列挙した可変ドメイン立体配置および定常ドメイン立体配置のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体（または他の多量体）を含み得る。

【０１２２】

完全抗体分子と同様に、抗体結合断片は、単一特異性または多重特異性（例えば、二重特異性）であり得る。抗体の多重特異性抗原結合断片は、典型的には、少なくとも２つの異なる可変ドメインを含むことになっており、各可変ドメインは、別個の抗原へまたは同

じ抗原上の異なるエピトープへ特異的に結合することができる。本明細書に開示される例示的な二重特異性抗体フォーマットを含む任意の多重特異性抗体フォーマットは、当該技術分野で利用可能な通例の技術を使用して、本発明の抗体の抗原結合断片との関連で使用に適合し得る。

【０１２３】

本発明の抗体は、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）または抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ＡＤＣＣ）を介して機能し得る。「補体依存性細胞傷害」（ＣＤＣ）は、補体の存在下における本発明の抗体による抗原発現細胞の溶解を指す。「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」（ＡＤＣＣ）は、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し、それによって標的細胞の溶解をもたらす、細胞媒介性反応を指す。ＣＤＣおよびＡＤＣＣは、当技術分野において周知であり利用可能なアッセイを用いて測定することができる。（例えば、米国特許第５，５００，３６２号および第５，８２１，３３７号、ならびにＣｌｙｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９５：６５２－６５６を参照されたい）。抗体の定常領域は、補体を固定して細胞依存性細胞傷害性を媒介する抗体の能力において重要である。したがって、抗体のアイソタイプは、その抗体が細胞毒性を媒介することが望ましいかどうかに基づいて選択されてよい。

【０１２４】

本発明の特定の実施形態において、本発明の抗ＭＵＣ１６単一特異性抗体または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体はヒト抗体である。「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むよう企図される。本発明のヒト抗体は、例えば、ＣＤＲ、特にＣＤＲ３における、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発によってまたはインビボでの体細胞突変異によって導入された変異）によってコードされないアミノ酸残基を含み得る。しかしながら、「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用する場合、別の哺乳類種（例えば、マウス）の生殖系列に由来するＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列へと移植された抗体を含むことを意図するものではない。

【０１２５】

本発明の抗体は、いくつかの実施形態において、組換えヒト抗体であり得る。本明細書で使用される用語「組換えヒト抗体」は、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現される抗体など組換え手段によって調製、発現、作成または単離される全てのヒト抗体（後述）、組換え型コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体（後述）、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックである動物（例えばマウス）から単離された抗体（例えば、Ｔａｙｌｏｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｎｕｃｌ．Ｒｅｓ．２０：６２８７－６２９５）、またはヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のＤＮＡ配列へのスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、生成、または単離された抗体を含むことを意図する。そのような組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。特定の実施形態において、しかしながら、そのような組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（または、ヒトＩｇ配列についてトランスジェニック動物が使用される場合は、インビボ体細胞突然変異誘発）を受け、したがって、組換え抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列に由来し関連してはいるが、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリーに天然には存在し得ない配列である。

【０１２６】

ヒト抗体は、ヒンジの不均一性に関連する２つの形態で存在することができる。一形態において、免疫グロブリン分子は、二量体が鎖間重鎖ジスルフィド結合によって一緒に保持されている約１５０～１６０ｋＤａの安定な四本鎖構築物を含む。第２の形態において、二量体は鎖間ジスルフィド結合を介して連結されておらず、共有結合した軽鎖と重鎖か

らなる約７５～８０ｋＤａの分子が形成される（半抗体）。これらの形態は、親和性精製後でさえも分離することが極めて困難であった。

【０１２７】

様々な無傷のＩｇＧアイソタイプにおける第２の形態の出現頻度は、抗体のヒンジ領域アイソタイプに関連する構造上の相違によるが、それに限定されない。ヒトＩｇＧ４ヒンジのヒンジ領域における単一アミノ酸置換は、ヒトＩｇＧ１ヒンジを用いて典型的に観察されるレベルまで第２の形態の出現を有意に減少させることができる（Ａｎｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　３０：１０５）。本発明は、ヒンジ、C_H2またはC_H3領域に１つ以上の変異を有する抗体を包含し、例えば産生において、所望の抗体形態の収率を改善するのに望ましい場合がある。

【０１２８】

本発明の抗体は単離された抗体であり得る。本明細書で使用される「単離された抗体」は、同定された抗体、およびその天然環境の少なくとも１つの成分から分離および／または回収された抗体を意味する。例えば、生物の少なくとも１つの成分から、または抗体が天然に存在するかもしくは天然に産生される組織または細胞から分離または除去された抗体は、本発明の目的のための「単離された抗体」である。単離された抗体はまた、組換え細胞内の原位置の抗体を含む。単離された抗体は、少なくとも１つの精製または単離工程を受けた抗体である。特定の実施形態によると、単離された抗体は他の細胞性物質および／または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

【０１２９】

本発明はまた、ＭＵＣ１６に結合するワンアーム抗体も含む。本明細書中で使用される場合、「ワンアーム抗体」とは、単一の抗体重鎖および単一の抗体軽鎖を含む抗原結合分子を意味する。本発明のワンアーム抗体は、表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲまたはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかを含み得る。

【０１３０】

本明細書に開示する抗ＭＵＣ１６または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３抗体は、対応する生殖系列配列と比較して、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域および／またはＣＤＲ領域に１つ以上のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含み得る。このような変異は、本明細書中に開示するアミノ酸配列を、例えば公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明は、本明細書に開示するアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体およびその抗原結合断片を含み、１つ以上のフレームワークおよび／またはＣＤＲ領域内の１つ以上のアミノ酸は、抗体が由来した生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ、または対応する生殖系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換へ変異する（このような配列変化はまとめて、「生殖系列変異」と本明細書で呼ばれる）。当業者は、本明細書に開示する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列から出発して、１つ以上の個々の生殖系列変異またはこれらの組み合わせを含む多数の抗体および抗体結合断片を容易に産生することができる。ある特定の実施形態において、V_Hドメインおよび／またはV_Lドメイン内のフレームワークおよび／またはＣＤＲ残基は全て、抗体が由来した元の生殖系列配列において認められる残基へと変異し戻される。他の実施形態において、ある特定の残基のみが元の生殖系列配列へと変異し戻され、例えば、変異した残基はＦＲ１の最初の８個のアミノ酸内に、もしくは変異した残基はＦＲ４の最後の８個のアミノ酸内に認められ、または変異した残基は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３内にのみ認められる。他の実施形態において、フレームワークおよび／またはＣＤＲ残基（複数可）の１つ以上は、異なる生殖系列配列（すなわち、抗体が本来由来した生殖系列配列とは異なる生殖系列配列）の対応する残基（複数可）へ変異する。さらに、本発明の抗体は、フレームワークおよび／またはＣＤＲ領域内に２つ以上の生殖系列変異の任意の組み合わせを含有してもよく、例えば、ある特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ変異するのに対し、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持され、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ変異する。いった

ん得られれば、１つ以上の生殖系列変異を含有する抗体および抗体結合断片は、結合特異性の改善、結合（例えば、細胞結合滴定またはＦＡＣＳ結合により測定した場合）または結合親和性（例えば、K_D）の増大、アンタゴニストまたはアゴニストの生物学的特性の改善または増強（場合によって）、免疫原性の低下などの１つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。この一般的な方法で得られた抗体および抗体結合断片は、本発明の範囲内に包含される。

【０１３１】

本発明はまた、１つ以上の保存的置換を有する本明細書に開示のＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかの変異体を含む抗ＭＵＣ１６抗体または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３抗体を含む。例えば、本発明は、本明細書の表１に記載のまたは本明細書の表１６、１８、１９、２２、および２３に記載のＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかに対して、例えば、１０個以下、８個以下、６個以下、または４個以下などの保存的アミノ酸置換を有する、ＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列を有する抗ＭＵＣ１６または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３抗体を含む。

【０１３２】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして既知の抗体分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は２つ以上のエピトープを有してもよい。したがって、異なる抗体は、抗原上の異なる領域へ結合し得、異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、立体配座または線状のいずれでもよい。立体配座エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸によって産生される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド鎖中の隣接するアミノ酸残基によって産生されるものである。特定の状況において、エピトープは、抗原上の糖類、ホスホリル基、またはスルホニル基の部分を含み得る。

【０１３３】

「実質的な同一性」または「実質的に同一である」という用語は、核酸またはその断片を指す場合、別の核酸（またはその相補鎖）との適切なヌクレオチド挿入または欠失と最適に整列した場合、以下に考察するように、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴまたはＧａｐなど、配列同一性の任意の周知のアルゴリズムによって測定される場合に、ヌクレオチド塩基の少なくとも約９５％、より好ましくは少なくとも約９６％、９７％、９８％、または９９％においてヌクレオチド配列同一性があることを示す。参照核酸分子と実質的な同一性を有する核酸分子は、ある特定の場合において、参照核酸分子によってコードされるポリペプチドと同じまたは実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。

【０１３４】

ポリペプチドへ適用される場合、「実質的な類似性」または「実質的に類似の」という用語は、２つのペプチド配列が、既定のギャップ重みを用いてプログラムＧＡＰまたはＢＥＳＴＦＩＴなどによって最適に整列した場合、少なくとも９５％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９８％または９９％の配列同一性を共有する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を備えた側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。概して、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないことになっている。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換だけ互いに異なる場合、配列同一性の割合または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整してもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれるＰｅａｒｓｏｎ（１９９４）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：３０７－３３１を参照されたい。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、（１）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、（２）脂肪族－ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン、（３）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミ

ン、（４）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、（５）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン、（６）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（７）含硫側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、グルタミン酸－アスパラギン酸およびアスパラギン－グルタミンである。あるいは、保存的置換とは、参照により本明細書に組み込まれるＧｏｎｎｅｔ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：１４４３－１４４５に開示されるＰＡＭ２５０対数尤度行列において正値を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、ＰＡＭ２５０対数尤度マトリックスにおいて負以外の値を有する任意の変化である。

【０１３５】

ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼ばれ、典型的には配列分析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失および他の修飾へ割り当てられた類似の測定値を用いて類似の配列と一致させる。例えば、ＧＣＧソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドのような密接に関連するポリペプチド間の、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータと共に使用することができるＧａｐおよびＢｅｓｔｆｉｔなどのプログラムを含有する。例えば、ＧＣＧ第６．１版を参照されたい。ポリペプチド配列は、ＧＣＧ第６．１版におけるプログラムである、既定パラメータまたは推奨パラメータを備えたＦＡＳＴＡを使用して比較することもできる。ＦＡＳＴＡ（例えば、ＦＡＳＴＡ２およびＦＡＳＴＡ３）は、問い合わせ配列と検索配列の間の最良重複の領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する（Ｐｅａｒｓｏｎ（２０００）上述）。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを用いるコンピュータプログラムＢＬＡＳＴ、特にＢＬＡＳＴＰまたはＴＢＬＡＳＴＮである。例えば、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０およびＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－４０２を参照されたい。

【０１３６】

生殖系列変異

本明細書に開示する抗ＣＤ３抗体は、対応する生殖系列配列と比較して、重鎖可変ドメインのフレームワーク領域および／またはＣＤＲ領域に１つ以上のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含む。

【０１３７】

本発明はまた、本明細書に開示するアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体およびその抗原結合断片を含み、１つ以上のフレームワークおよび／またはＣＤＲ領域内の１つ以上のアミノ酸は、抗体が由来した生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ、または対応する生殖系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換へ変異し（このような配列変化はまとめて、「生殖系列変異」と本明細書で呼ばれる）、ＣＤ３抗原への検出可能な結合が弱いまたはない。ＣＤ３を認識するいくつかのそのような例示的抗体は、本明細書の表１６、１８、１９、２２、および２３に記載されている。

【０１３８】

さらに、本発明の抗体は、フレームワークおよび／またはＣＤＲ領域内に２つ以上の生殖系列変異の任意の組み合わせを含有してもよく、例えば、ある特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ変異するのに対し、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持され、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ変異する。いったん得られれば、１つ以上の生殖系列変異を含む抗体および抗体結合断片を、結合特異性の向上、結合または結合親和性の弱さまたは低下、薬物動態学的特性の向上または増強

、免疫原性の低下などの１つ以上の所望の特性に関して試験することができる。本開示の指針を考慮してこの一般的な方法で得られた抗体および抗原結合断片は、本発明の範囲内に包含される。

【０１３９】

本発明はまた、１つ以上の保存的置換を有する本明細書に開示するＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかの変異体を含む抗ＣＤ３抗体を含む。例えば、本発明は、本明細書の表１６、１８、１９、２２、および２３に記載のＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかに対して、例えば１０個以下、８個以下、６個以下または４個以下などの保存的アミノ酸置換を有するＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列を有する抗ＣＤ３抗体を含む。本発明の抗体および二重特異性抗原結合分子は、個々の抗原結合ドメインが由来した対応する生殖系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび／またはＣＤＲ領域に１つ以上のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含むが、ＣＤ３抗原への所望の弱い結合から検出不可能な結合を維持または改善する。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を備えた側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。一般に、保存的アミノ酸置換はタンパク質の機能的特性を実質的に変化させない、すなわち、アミノ酸置換が、抗ＣＤ３結合分子の場合における所望の弱から検出不可能な結合または結合親和性を維持または改善する。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、（１）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、（２）脂肪族－ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン、（３）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン、（４）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、（５）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン、（６）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（７）含硫側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、グルタミン酸－アスパラギン酸およびアスパラギン－グルタミンである。あるいは、保存的置換とは、参照により本明細書に組み込まれるＧｏｎｎｅｔ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：１４４３－１４４５に開示されるＰＡＭ２５０対数尤度行列において正値を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、ＰＡＭ２５０対数尤度マトリックスにおいて負以外の値を有する任意の変化である。

【０１４０】

本発明はまた、本明細書に開示されるＨＣＶＲおよび／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかと実質的に同一であるＨＣＶＲおよび／またはＣＤＲアミノ酸配列を有する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を含むが、ＣＤ３抗原への所望の弱い親和性を維持または改善する。アミノ酸配列意味する場合、「実質的な同一性」または「実質的に同一の」という用語は、２つのアミノ酸配列が、既定のギャップ重みを用いてプログラムＧＡＰまたはＢＥＳＴＦＩＴなどによって最適に整列した場合、少なくとも９５％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９８％、または９９％の配列同一性を共有する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換だけ互いに異なる場合、配列同一性の割合または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整してもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Ｐｅａｒｓｏｎ（１９９４）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：３０７－３３１を参照されたい。

【０１４１】

ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼ばれ、典型的には配列分析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失および他の修飾へ割り当てられた類似の測定値を用いて類似の配列と一致させる。例えば、ＧＣＧソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドの

ような密接に関連するポリペプチド間の、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータと共に使用することができるＧａｐおよびＢｅｓｔｆｉｔなどのプログラムを含有する。例えば、ＧＣＧ第６．１版を参照されたい。ポリペプチド配列は、ＧＣＧ第６．１版におけるプログラムである、既定パラメータまたは推奨パラメータを備えたＦＡＳＴＡを使用して比較することもできる。ＦＡＳＴＡ（例えば、ＦＡＳＴＡ２およびＦＡＳＴＡ３）は、問い合わせ配列と検索配列の間の最良重複の領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する（Ｐｅａｒｓｏｎ（２０００）上述）。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを用いるコンピュータプログラムＢＬＡＳＴ、特にＢＬＡＳＴＰまたはＴＢＬＡＳＴＮである。例えば、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０およびＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－４０２を参照されたい。

【０１４２】

いったん得られれば、１つ以上の生殖系列変異を含む抗原結合ドメインを、１つ以上のインビトロアッセイを利用して結合または結合親和性の低下について試験した。特定の抗原を認識する抗体は、典型的には、抗原に対する高い（すなわち強い）結合または結合親和性について試験することによってそれらの目的がスクリーニングされるが、本発明の抗体は弱い結合または検出不可能な結合を示す。この一般的な方法で得られた１つ以上の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子もまた本発明の範囲内に含まれ、結合活性駆動腫瘍療法として有利であることが見出された。

【０１４３】

予想外の利益、例えば、改善された薬物動態特性および患者に対する低毒性が、本明細書に記載の方法から実現され得る。

【０１４４】

抗体の結合特性

本明細書で使用される場合、抗体、免疫グロブリン、抗体結合断片、またはＦｃ含有タンパク質のいずれかが、例えば、細胞表面タンパク質またはその断片などの所定の抗原へ結合する文脈における用語「結合」は、典型的には、最低２つの実体または抗体－抗原相互作用などの分子構造間の相互作用または会合を指す。

【０１４５】

例えば、結合親和性は、リガンドとして抗原を、分析物（または抗リガンド）として抗体、Ｉｇ、抗体結合断片、またはＦｃ含有タンパク質を使用して、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ ３０００機器における表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）技術により決定される場合、典型的には約10^{-7}Ｍ以下、例えば約10^{-8}Ｍ以下、例えば約10^{-9}Ｍ以下のK_D値に対応する。蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）結合アッセイなどの細胞ベースの結合戦略もまた日常的に使用されており、ＦＡＣＳデータは放射性リガンド競合結合およびＳＰＲ（Ｂｅｎｅｄｉｃｔ、ＣＡ、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．１９９７，２０１（２）：２２３－３１；Ｇｅｕｉｊｅｎ，ＣＡ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２００５，３０２（１－２）：６８－７７）などの他の方法とよく相関する。

【０１４６】

したがって、本発明の抗体または抗原結合タンパク質は、非特異的抗原（例：ＢＳＡ、カゼイン）へ結合するその親和性よりも少なくとも１０倍低いK_D値に対応する親和性を有する所定の抗原または細胞表面分子に結合する。本発明によると、非特異的抗原よりも１０倍以下の低いK_D値に対応する抗体の親和性は、検出不可能な結合とみなすことができるが、そのような抗体は、本発明の二重特異性抗体を産生するための第２の抗原結合アームと対をなすことができる。

【０１４７】

用語「K_D」（Ｍ）は、特定の抗体－抗原相互作用の解離平衡定数、または抗原に結合する抗体もしくは抗体結合断片の解離平衡定数を指す。K_Dと結合親和性との間には逆の

関係があり、したがって、K_D値が小さいほど、親和性は高い、すなわちより強い。したがって、「より高い親和性」または「より強い親和性」という用語は、相互作用を形成するより高い能力、つまりより小さいK_D値に関し、逆に「より低い親和性」または「より弱い親和性」という用語は、相互作用を形成するより低い能力、つまりより大きなK_D値に関する。状況によっては、他の相互作用パートナー分子（例えば抗原Ｙ）に対する分子（例えば抗体）の結合親和性と比較して、その相互作用パートナー分子（例えば抗原Ｘ）に対する特定の分子（例えば抗体）のより高い結合親和性（またはK_D）は、より大きなK_D値（より低い、またはより弱い、親和性）をより小さなK_D（より高い、またはより強い、親和性）で割ることによって決定される結合比として表され、例えば、場合によって５倍または１０倍高い結合親和性として表される。

【０１４８】

用語「k_d」（ｓｅｃ－１または１／ｓ）は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度定数、または抗体もしくは抗体結合断片の解離速度定数を指す。その値はk_{off}値とも呼ばれる。

【０１４９】

用語「k_a」（Ｍ－１×ｓｅｃ－１または１／Ｍ）は、特定の抗体－抗原相互作用の会合速度定数、または抗体もしくは抗体結合断片の会合速度定数を指す。

【０１５０】

用語「K_A」（Ｍ－１または１／Ｍ）は、特定の抗体－抗原相互作用の会合平衡定数、または抗体もしくは抗体結合断片の会合平衡定数を指す。会合平衡定数は、k_aをk_dで割ることによって得られる。

【０１５１】

「ＥＣ５０」または「EC_{50}」という用語は、最大半量の有効濃度を指し、特定の曝露時間後にベースラインと最大値との間の中間で応答を誘導する抗体の濃度を含む。EC_{50}は本質的に、その最大効果の５０％が観察される抗体の濃度を表す。特定の実施形態において、EC_{50}値は、例えばＦＡＣＳ結合アッセイによって決定されるように、ＣＤ３または腫瘍関連抗原を発現する細胞に最大半量の結合を与える本発明の抗体の濃度に等しい。したがって、低下したまたは弱い結合は、EC_{50}の増加、または最大半量の有効濃度値で観察される。

【０１５２】

一実施形態において、結合の低下は、最大半量の標的細胞への結合を可能にするEC_{50}抗体濃度の増加として定義することができる。

【０１５３】

別の実施形態において、EC_{50}値は、Ｔ細胞細胞傷害活性による標的細胞の最大半量の枯渇を誘発する本発明の抗体の濃度を表す。したがって、細胞傷害活性の増加（例えば、Ｔ細胞媒介性腫瘍細胞死滅）は、EC_{50}の低下、または最大有効濃度値の半分で観察される。

【０１５４】

二重特異性抗原結合分子

本発明の抗体は、単一特異性、二重特異性または多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、１つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、または２つ以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有し得る。例えば、Ｔｕｔｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０－６９、Ｋｕｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２２：２３８－２４４を参照されたい。本発明の抗ＭＵＣ１６単一特異性抗体または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体は、別の機能性分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質に連結するか、またはそれと同時発現させることができる。例えば、抗体またはその断片は、別の抗体または抗体断片などの１つ以上の他の分子実体に（例えば、化学結合、遺伝的融合、非共有結合性会合などにより）機能的に連結されて、第２のまたは追加の結合特異性を有する二重特異性または多重特異性抗体を生成することができる。

【０１５５】
本明細書での表現「抗ＣＤ３抗体」または「抗ＭＵＣ１６抗体」の使用は、単一特異性の抗ＣＤ３抗体または抗ＭＵＣ１６抗体、ならびにＣＤ３結合アームおよびＭＵＣ１６結合アームを含む二重特異性抗体の両方を含むことを意図する。したがって、本発明は、免疫グロブリンの一方のアームがヒトＣＤ３に結合し、免疫グロブリンの他方のアームがヒトＭＵＣ１６に特異的である二重特異性抗体を含む。ＣＤ３結合アームは、本明細書の表１、１６、１８、１９、２２、および２３に記載の、ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲまたはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかを含み得る。
【０１５６】
特定の実施形態において、ＣＤ３結合アームはヒトＣＤ３に結合し、ヒトＴ細胞活性化を誘導する。特定の実施形態において、ＣＤ３結合アームはヒトＣＤ３に弱く結合し、ヒトＴ細胞活性化を誘導する。他の実施形態において、ＣＤ３結合アームはヒトＣＤ３に弱く結合し、二重特異性抗体または多重特異性抗体との関連で腫瘍関連抗原発現細胞死滅を誘導する。他の実施形態において、ＣＤ３結合アームはヒトおよびカニクイザル（サル）ＣＤ３と弱く結合または会合するが、それでも結合相互作用は当技術分野で既知のインビトロアッセイでは検出できない。ＭＵＣ１６結合アームは、本明細書の表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲまたはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかを含み得る。
【０１５７】
特定の例示的な実施形態によると、本発明はＣＤ３およびＭＵＣ１６に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子を含む。そのような分子は、本明細書において、例えば、「抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６」、または「抗ＣＤ３×ＭＵＣ１６」もしくは「ＣＤ３×ＭＵＣ１６」二重特異性分子、または他の同様の用語（例えば、抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３）と称することができる。本発明は、ＭＵＣ１６に結合する第１の抗原結合アームおよびＣＤ３に結合する第２の抗原結合アームを用いて構築された二重特異性抗原結合分子を提供する。いくつかの実施形態において、抗ＣＤ３アームは、ＩＧＨＶ３－９＊０１、ＩＧＨＪ６＊０２、ＩＧＨＤ５－１２＊０１由来の重鎖を含む。他の実施形態において、二重特異性抗原結合分子はヒトＰＢＭＣ細胞を活性化し、および／または腫瘍抗原発現細胞株に対する細胞傷害活性を誘導する。
【０１５８】
本発明で使用する場合、「ＭＵＣ１６」という用語は、非ヒト種由来であると特定されない限り、ヒトＭＵＣ１６タンパク質を指す（例えば、「マウスＭＵＣ１６」、「サルＭＵＣ１６」など）。ヒトＭＵＣ１６タンパク質は、配列番号１８９９に示されるアミノ酸配列を有する。
【０１５９】
ＣＤ３およびＭＵＣ１６に特異的に結合する前述の二重特異性抗原結合分子は、インビトロ親和性結合アッセイで測定した場合に、約４０ｎＭ超のK_Dを示す弱い結合親和性でＣＤ３に結合する、抗ＣＤ３抗原結合分子を含むことができる。前述の二重特異性抗原結合分子は、ＦＡＣＳ滴定アッセイで測定した場合に、ＣＤ３に結合して約１００ｎＭ超のＥＣ５０を示す、抗ＣＤ３抗原結合分子を含むことができる。前述の二重特異性抗原結合分子は、インビトロ親和性結合アッセイまたはＦＡＣＳ滴定アッセイによって測定されるように、ＣＤ３への測定可能なまたは観察可能な結合を示さないが、ヒトＰＢＭＣ細胞を活性化する能力を保持し、および／または腫瘍抗原発現細胞株に対して細胞傷害活性を誘導する、抗ＣＤ３抗原結合分子を含み得る。
【０１６０】
本明細書で使用される場合、表現「抗原結合分子」は、単独で、または特定の抗原に特異的に結合する、１つ以上のさらなるＣＤＲおよび／またはフレームワーク領域（ＦＲ）と組み合わせて少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むまたはそれからなるタンパク質、ポリペプチド、または分子複合体を意味する。特定の実施形態において、抗原結合分子は、それらの用語が本明細書の他所で定義されているように、抗体または抗体の断片である。

【０１６１】
本明細書で使用される場合、表現「二重特異性抗原結合分子」は、少なくとも第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインを含むタンパク質、ポリペプチドまたは分子複合体を意味する。二重特異性抗原結合分子内の各抗原結合ドメインは、単独で、または１つ以上の追加のＣＤＲおよび／またはＦＲと組み合わせて、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも１つのＣＤＲを含む。本発明の文脈において、第１の抗原結合ドメインは第１の抗原（例えばＣＤ３）に特異的に結合し、第２の抗原結合ドメインは第２の異なる抗原（例えばＭＵＣ１６）に特異的に結合する。
【０１６２】
本発明の特定の例示的実施形態において、二重特異性抗原結合分子は二重特異性抗体である。二重特異性抗体の各抗原結合ドメインは、重鎖可変ドメイン（ＨＣＶＲ）および軽鎖可変ドメイン（ＬＣＶＲ）を含む。第１および第２の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）の文脈において、第１の抗原結合ドメインのＣＤＲは接頭辞「Ａ１」を付けて指定され、第２の抗原結合ドメインのＣＤＲは接頭辞「Ａ２」を付けて指定され得る。したがって、第１の抗原結合ドメインのＣＤＲは、本明細書においてＡ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３と呼ばれてもよく、第２の抗原結合ドメインのＣＤＲは、本明細書においてＡ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３と呼ばれてもよい。
【０１６３】
第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインは、互いに直接的または間接的に結合して、本発明の二重特異性抗原結合分子を形成し得る。あるいは、第１の抗原結合ドメインおよび第２の抗原結合ドメインは、それぞれ別々の多量体化ドメインに連結されていてもよい。１つの多量体化ドメインと別の多量体化ドメインとの会合は、２つの抗原結合ドメイン間の会合を促進し、それによって二重特異性抗原結合分子を形成する。本明細書で使用される場合、「多量体化ドメイン」は、同一または類似の構造または構成の第２の多量体化ドメインと会合する能力を有する任意の高分子、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはアミノ酸である。例えば、多量体化ドメインは、免疫グロブリンC_H３ドメインを含むポリペプチドであってもよい。多量体化成分の非限定的な例は、免疫グロブリンのＦｃ部分（C_H２－C_H３ドメインを含む）、例えばアイソタイプＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、およびＩｇＧ４から選択されるＩｇＧのＦｃドメイン、ならびに各アイソタイプ群内のアロタイプである。
【０１６４】
本発明の二重特異性抗原結合分子は、典型的には２つの多量体化ドメイン、例えば、それぞれ別々の抗体重鎖の一部である２つのＦｃドメインを含む。第１および第２の多量体化ドメインは、例えば、ＩｇＧ１／ＩｇＧ１、ＩｇＧ２／ＩｇＧ２、ＩｇＧ４／ＩｇＧ４などの同じＩｇＧアイソタイプであり得る。あるいは、第１および第２の多量体化ドメインは、例えば、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、ＩｇＧ１／ＩｇＧ４、ＩｇＧ２／ＩｇＧ４などの異なるＩｇＧアイソタイプのものであり得る。
【０１６５】
特定の実施形態において、多量体化ドメインは、Ｆｃ断片または少なくとも１つのシステイン残基を含有する長さが１～約２００アミノ酸のアミノ酸配列である。他の実施形態において、多量体化ドメインはシステイン残基、または短いシステイン含有ペプチドである。他の多量体化ドメインには、ロイシンジッパー、ヘリックスループヘリックス、またはコイルドコイルモチーフを含むかまたはそれらからなるペプチドまたはポリペプチドが含まれる。
【０１６６】
任意の二重特異性抗体フォーマットまたは技術を使用して、本発明の二重特異性抗原結合分子を作製することができる。例えば、第１の抗原結合特異性を有する抗体またはその断片は、第２の抗原結合性を有する他の抗体または抗体断片などの１つ以上の他の分子実体に（例えば、化学結合、遺伝的融合、非共有結合などにより）機能的に連結されて、二

重特異性抗原結合分子を生成することができる。本発明の文脈において使用できる特定の例示的な二重特異性フォーマットには、例えば、ｓｃＦｖ系フォーマットまたはダイアボディ二重特異性フォーマット、ＩｇＧ－ｓｃＦｖ融合、二重可変ドメイン（ＤＶＤ）－Ｉｇ、Ｑｕａｄｒｏｍａ、ノブズ－イントゥ－ホールズ（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ）、共通の軽鎖（例えば、ノブズ－イントゥ－ホールズを備えた共通の軽鎖など）、ＣｒｏｓｓＭａｂ、ＣｒｏｓｓＦａｂ、（ＳＥＥＤ）ボディ、ロイシンジッパー、Ｄｕｏｂｏｄｙ、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、二重作用型Ｆａｂ（ＤＡＦ）－ＩｇＧ、およびＭａｂ^{2}二重特異性フォーマットが含まれるが、これらに限定されない（上述のフォーマットの総説については、例えば、Ｋｌｅｉｎ ｅｔ ａｌ．２０１２，ｍＡｂｓ ４：６，１－１１、およびそこに引用されている参考文献を参照されたい）。

【０１６７】

本発明の二重特異性抗原結合分子との関連で、多量体化ドメイン、例えば、Ｆｃドメインは、野生型の、天然に存在するＦｃドメインと比較して、１つ以上のアミノ酸変化（例えば、挿入、欠失または置換）を含んでもよい。例えば、本発明は、ＦｃとＦｃＲｎとの間の修飾された結合相互作用（例えば、増強または減少）を有する改変Ｆｃドメインをもたらす、Ｆｃドメイン中の１つ以上の修飾を含む二重特異性抗原結合分子を含む。一実施形態において、二重特異性抗原結合分子は、C_H2またはC_H3領域に修飾を含み、この修飾は酸性環境（例えば、ｐＨ範囲約５．５～約６．０のエンドソーム内）において、ＦｃＲｎに対するＦｃドメインの親和性を高める。そのようなＦｃ修飾の非限定的な例には、例えば、２５０位（例えば、ＥまたはＱ）、２５０位および４２８位（例えば、ＬまたはＦ）、２５２位（例えば、Ｌ／Ｙ／Ｆ／ＷまたはＴ）、２５４位（例えば、ＳまたはＴ）、および２５６位（例えば、Ｓ／Ｒ／Ｑ／Ｅ／ＤまたはＴ）での修飾、または４２８位および／または４３３位（例えばＬ／Ｒ／Ｓ／Ｐ／ＱまたはＫ）および／または４３４位（例えばＨ／ＦまたはＹ）での修飾、あるいは２５０位および／または４２８位の修飾、あるいは３０７位もしくは３０８位（例えば、３０８Ｆ、Ｖ３０８Ｆ）、および４３４位での修飾が含まれる。一実施形態において、修飾は４２８Ｌ（例えばＭ４２８Ｌ）および４３４Ｓ（例えばＮ４３４Ｓ）の修飾、４２８Ｌ、２５９Ｉ（例えば、Ｖ２５９Ｉ）、および３０８Ｆ（例えば、Ｖ３０８Ｆ）の修飾、４３３Ｋ（例えば、Ｈ４３３Ｋ）および４３４（例えば、４３４Ｙ）の修飾、２５２、２５４、および２５６（例えば、２５２Ｙ、２５４Ｔ、および２５６Ｅ）の修飾、２５０Ｑおよび４２８Ｌの修飾（例えば、Ｔ２５０ＱおよびＭ４２８Ｌ）、３０７および／または３０８の修飾（例えば、３０８Ｆまたは３０８Ｐ）を含む。

【０１６８】

本発明はまた、第１のC_H3ドメインおよび第２のＩｇ C_H3ドメインを含む二重特異性抗原結合分子を含み、第１および第２のＩｇ C_H3ドメインは、少なくとも１つのアミノ酸ほど互いに異なっており、少なくとも１つのアミノ酸の相違は、アミノ酸の相違を欠失する二重特異性抗体と比較して、プロテインＡへの二重特異性抗体の結合を低減させる。一実施形態において、第１のＩｇ C_H3ドメインはプロテインＡを結合し、第２のＩｇ C_H3ドメインはＨ９５Ｒ修飾（ＩＭＧＴエクソン番号付けによる、ＥＵ番号付けではＨ４３５Ｒ）などのプロテインＡ結合を低減または消失させる変異を含有する。第２のC_H3は、Ｙ９６Ｆ修飾（ＩＭＧＴによるものであり、ＥＵではＹ４３６Ｆ）をさらに含み得る。例えば、米国特許第８，５８６，７１３号を参照されたい。第２のC_H3内に認められ得るさらなる修飾には、ＩｇＧ１抗体の場合、Ｄ１６Ｅ、Ｌ１８Ｍ、Ｎ４４Ｓ、Ｋ５２Ｎ、Ｖ５７Ｍ、およびＶ８２Ｉ（ＩＭＧＴによるものであり、ＥＵによるＤ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７Ｍ、およびＶ４２２Ｉ）、ＩｇＧ２抗体の場合、Ｎ４４Ｓ、Ｋ５２Ｎ、およびＶ８２Ｉ（ＩＭＧＴであって、ＥＵによるＮ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、およびＶ４２２Ｉ）、ならびにＩｇＧ４抗体の場合、Ｑ１５Ｒ、Ｎ４４Ｓ、Ｋ５２Ｎ、Ｖ５７Ｍ、Ｒ６９Ｋ、Ｅ７９Ｑ、およびＶ８２Ｉ（ＩＭＧＴによるものであり、ＥＵによるＱ３５５Ｒ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７Ｍ、Ｒ４０９Ｋ、Ｅ４１９Ｑ、およびＶ４２２Ｉ）が含まれる。

【０１６９】
特定の実施形態において、Ｆｃドメインは、２つ以上の免疫グロブリンアイソタイプに由来するＦｃ配列を組み合わせたキメラであり得る。例えば、キメラＦｃドメインは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、またはヒトＩｇＧ４のＣ$_{H}$２領域に由来するＣ$_{H}$２配列の一部または全部、およびヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、またはヒトＩｇＧ４に由来するＣ$_{H}$３配列の一部または全部を含むことができる。キメラＦｃドメインはまた、キメラヒンジ領域を含み得る。例えば、キメラヒンジは、ヒトＩｇＧ１ヒンジ領域、ヒトＩｇＧ２ヒンジ領域、またはヒトＩｇＧ４ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列と組み合わせた、ヒトＩｇＧ１ヒンジ領域、ヒトＩｇＧ２ヒンジ領域、またはヒトＩｇＧ４ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」配列を含むことができる。本明細書に記載の抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラＦｃドメインの特定の例は、Ｎ末端からＣ末端に、［ＩｇＧ４　Ｃ$_{H}$１］－［ＩｇＧ４上方ヒンジ］－［ＩｇＧ２下方ヒンジ］－［ＩｇＧ４　ＣＨ２］－［ＩｇＧ４　ＣＨ３］を含む。本明細書に記載の抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラＦｃドメインの別の例は、Ｎ末端からＣ末端に、［ＩｇＧ１　Ｃ$_{H}$１］－［ＩｇＧ１上方ヒンジ］－［ＩｇＧ２下方ヒンジ］－［ＩｇＧ４　ＣＨ２］－［ＩｇＧ１　ＣＨ３］を含む。本発明の抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラＦｃドメインのこれらおよび他の例は、２０１４年８月２８日に公開された米国特許公開第２０１４／０２４３５０４号に記載されており、その全体が本明細書に組み込まれる。これらの一般的な構造配置を有するキメラＦｃドメイン、およびその変異体は、Ｆｃ受容体結合を変えてしまうことができ、そのことがＦｃエフェクター機能に影響を及ぼす。

【０１７０】
特定の実施形態において、本発明は、重鎖定常領域（ＣＨ）領域が、配列番号１９１１、配列番号１９１２、配列番号１９１３、配列番号１９１４、配列番号１９１５、配列番号１９１６、配列番号１９１７、配列番号１９１８、配列番号１９１９、または配列番号１９２０のいずれか１つと少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列を含む抗体重鎖を提供する。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域（ＣＨ）領域は、配列番号１９１１、配列番号１９１２、配列番号１９１３、配列番号１９１４、配列番号１９１５、配列番号１９１６、配列番号１９１７、配列番号１９１８、配列番号１９１９および配列番号１９２０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１７１】
他の実施形態において、本発明は、Ｆｃドメインが、配列番号１９２１、配列番号１９２２、配列番号１９２３、配列番号１９２４、配列番号１９２５、配列番号１９２６、配列番号１９２７、配列番号１９２８、配列番号１９２９、または配列番号１９３０のいずれか１つと少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、少なくとも９９％同一のアミノ酸配列を含む、抗体重鎖を提供する。いくつかの実施形態において、Ｆｃドメインは、配列番号１９２１、配列番号１９２２、配列番号１９２３、配列番号１９２４、配列番号１９２５、配列番号１９２６、配列番号１９２７、配列番号１９２８、配列番号１９２９、および配列番号１９３０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【０１７２】
配列変異体
本明細書の抗体および二重特異性抗原結合分子は、個々の抗原結合ドメインが由来した対応する生殖系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび／またはＣＤＲ領域に１つ以上のアミノ酸置換、挿入および／または欠失を含み得る。このような変異は、本明細書中に開示するアミノ酸配列を、例えば公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明の抗原結合分子は、本明細書に開示する例示的なアミノ酸配列のいずれかに由来する抗原結合ドメインを含んでもよく、１つ以上のフレームワークおよび／またはＣＤＲ領域内の１つ以上のアミノ酸は、抗体が由来した生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ

、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ、または対応する生殖系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換へ変異する（このような配列変化はまとめて、「生殖系列変異」と本明細書で呼ばれる）。当業者は、本明細書に開示する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列から出発して、１つ以上の個々の生殖系列変異またはこれらの組み合わせを含む多数の抗体および抗体結合断片を容易に産生することができる。特定の実施形態において、V_Hドメインおよび／またはV_Lドメイン内のフレームワークおよび／またはＣＤＲ残基は全て、抗原結合ドメインが由来した元の生殖系列配列において認められる残基へと戻り変異する。他の実施形態において、ある特定の残基のみが元の生殖系列配列へと変異し戻され、例えば、変異した残基はＦＲ１の最初の８個のアミノ酸内に、もしくは変異した残基はＦＲ４の最後の８個のアミノ酸内に認められ、または変異した残基は、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２もしくはＣＤＲ３内にのみ認められる。他の実施形態において、フレームワークおよび／またはＣＤＲ残基（複数可）の１つ以上は、異なる生殖系列配列（すなわち、抗原結合ドメインが本来由来した生殖系列配列とは異なる生殖系列配列）の対応する残基（複数可）へ変異する。さらに、抗原結合ドメインは、フレームワークおよび／またはＣＤＲ領域内に２つ以上の生殖系列変異のいずれかの組み合わせを含有してもよく、例えば、特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ変異するのに対し、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は維持され、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ変異する。いったん得られれば、１つ以上の生殖系列変異を含有する抗原結合ドメインは、結合特異性の改善、結合または結合親和性の増大、アンタゴニストまたはアゴニストの生物学的特性の改善または増強（場合によって）、免疫原性の低下などの１つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。この一般的な方法で得られた１つ以上の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子は、本発明の範囲内に包含される。

【０１７３】

本発明はまた、一方または両方の抗原結合ドメインが、１つ以上の保存的置換を有する本明細書に開示するＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかの変異体を含む、抗原結合分子を含む。例えば、本発明は、本明細書に開示するＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかに対して、例えば１０個以下、８個以下、６個以下、または４個以下などの保存的アミノ酸置換を有するＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列を有する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を含む。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を備えた側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。概して、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないことになっている。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、（１）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、（２）脂肪族－ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン、（３）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン、（４）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、（５）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン、（６）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（７）含硫側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リジン－アルギニン、アラニン－バリン、グルタミン酸－アスパラギン酸およびアスパラギン－グルタミンである。あるいは、保存的置換とは、参照により本明細書に組み込まれるＧｏｎｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５６：１４４３－１４４５に開示されるＰＡＭ２５０対数尤度行列において正値を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、ＰＡＭ２５０対数尤度マトリックスにおいて負以外の値を有する任意の変化である。

【０１７４】

本発明はまた、本明細書に開示するＨＣＶＲアミノ酸配列、ＬＣＶＲアミノ酸配列、および／またはＣＤＲアミノ酸配列のいずれかと実質的に同一であるＨＣＶＲ、ＬＣＶＲ、

および／またはＣＤＲアミノ酸配列を有する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を含む。アミノ酸配列意味する場合、「実質的な同一性」または「実質的に同一の」という用語は、２つのアミノ酸配列が、既定のギャップ重みを用いてプログラムＧＡＰまたはＢＥＳＴＦＩＴなどによって最適に整列した場合、少なくとも９５％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９８％、または９９％の配列同一性を共有する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換だけ互いに異なる場合、配列同一性の割合または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整してもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれるＰｅａｒｓｏｎ（１９９４）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：３０７－３３１を参照されたい。

【０１７５】

ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼ばれ、典型的には配列分析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失および他の修飾へ割り当てられた類似の測定値を用いて類似の配列と一致させる。例えば、ＧＣＧソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドのような密接に関連するポリペプチド間の、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータと共に使用することができるＧａｐおよびＢｅｓｔｆｉｔなどのプログラムを含有する。例えば、ＧＣＧ第６．１版を参照されたい。ポリペプチド配列は、ＧＣＧ第６．１版におけるプログラムである、既定パラメータまたは推奨パラメータを備えたＦＡＳＴＡを使用して比較することもできる。ＦＡＳＴＡ（例えば、ＦＡＳＴＡ２およびＦＡＳＴＡ３）は、問い合わせ配列と検索配列の間の最良重複の領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する（Ｐｅａｒｓｏｎ（２０００）上述）。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを用いるコンピュータプログラムＢＬＡＳＴ、特にＢＬＡＳＴＰまたはＴＢＬＡＳＴＮである。例えば、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０およびＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－４０２を参照されたい。

【０１７６】

ｐＨ依存性の結合

本発明は、ｐＨ依存的な結合特性を有する、抗ＭＵＣ１６抗体、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む。例えば、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体は、中性ｐＨと比較して酸性ｐＨでＭＵＣ１６への結合の低下を示し得る。あるいは、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体は、中性ｐＨと比較して酸性ｐＨでＭＵＣ１６への増強された結合を示し得る。「酸性ｐＨ」という表現は、約６．２未満、例えば、約６．０、５．９５、５、９、５．８５、５．８、５．７５、５．７、５．６５、５．６、５．５５、５．５、５．４５、５．４、５．３５、５．３、５．２５、５．２、５．１５、５．１、５．０５、５．０以下のｐＨ値を含む。本明細書で使用される場合、表現「中性ｐＨ」は、約７．０～約７．４のｐＨを意味する。「中性ｐＨ」という表現は、約７．０、７．０５、７．１、７．１５、７．２、７．２５、７．３、７．３５、および７．４のｐＨ値を含む。

【０１７７】

場合によっては、「中性ｐＨと比較して、酸性ｐＨで．．．結合の低下」は、中性ｐＨでその抗原に結合する抗体のK_D値に対する酸性ｐＨでその抗原に結合する抗体のK_D値の比に関して、表される。（またはその逆）。例えば、抗体またはその抗原結合断片が約３．０以上の酸性／中性K_D比を示す場合、本発明の目的のために、抗体またはその抗原結合断片は「中性ｐＨと比較して酸性ｐＨではＭＵＣ１６への結合の低下」を示すとみなされ得る。特定の例示的実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片の酸性／中性K_D比は、約３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、８．５、９．０、９．５、１０．０、１０．５、１１．０、１１

．５、１２．０、１２．５、１３．０、１３．５、１４．０、１４．５、１５．０、２０．０、２５．０、３０．０、４０．０、５０．０、６０．０、７０．０、１００．０以上であり得る。

【０１７８】

ｐＨ依存性結合特性を有する抗体は、例えば、中性ｐＨと比較して酸性ｐＨで特定の抗原への結合の低下（または増強）について抗体の集団をスクリーニングすることによって得ることができる。さらに、アミノ酸レベルでの抗原結合ドメインの修飾は、ｐＨ依存的特徴を有する抗体を産生し得る。例えば、抗原結合ドメイン（例えばＣＤＲ内）の１つ以上のアミノ酸をヒスチジン残基で置換することにより、中性ｐＨに対して酸性ｐＨで抗原結合が低下した抗体を得ることができる。

【０１７９】

Ｆｃ変異体を含む抗体

本発明の特定の実施形態によると、例えば中性ｐＨと比較した酸性ｐＨで、ＦｃＲｎ受容体へ結合する抗体を増強または低下させる、１つ以上の突然変異を含むＦｃドメインを含む、抗ＭＵＣ１６抗体、および抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を提供する。例えば、本発明は、ＦｃドメインのC_H2またはC_H3領域に変異を含む抗体を含み、変異（複数可）は、酸性環境においてＦｃＲｎに対するＦｃドメインの親和性を増加させる（例えば、ｐＨが約５．５～約６．０の範囲のエンドソームにおいて）。そのような突然変異は、動物に投与したときに抗体の血清半減期の増加をもたらし得る。そのようなＦｃ修飾の非限定的な例には、例えば、２５０位（例えば、ＥまたはＱ）、２５０位および４２８位（例えば、ＬまたはＦ）、２５２位（例えば、Ｌ／Ｙ／Ｆ／ＷまたはＴ）、２５４位（例えば、ＳまたはＴ）、および２５６位（例えば、Ｓ／Ｒ／Ｑ／Ｅ／ＤまたはＴ）での修飾、または４２８位および／または４３３位（例えばＨ／Ｌ／Ｒ／Ｓ／Ｐ／ＱまたはＫ）および／または４３４位（例えばＨ／ＦまたはＹ）での修飾、あるいは２５０位および／または４２８位の修飾、あるいは３０７位もしくは３０８位（例えば、３０８Ｆ、Ｖ３０８Ｆ）、および４３４位での修飾が含まれる。一実施形態において、修飾は４２８Ｌ（例えばＭ４２８Ｌ）および４３４Ｓ（例えばＮ４３４Ｓ）の修飾、４２８Ｌ、２５９Ｉ（例えば、Ｖ２５９Ｉ）、および３０８Ｆ（例えば、Ｖ３０８Ｆ）の修飾、４３３Ｋ（例えば、Ｈ４３３Ｋ）および４３４（例えば、４３４Ｙ）の修飾、２５２、２５４、および２５６（例えば、２５２Ｙ、２５４Ｔ、および２５６Ｅ）の修飾、２５０Ｑおよび４２８Ｌの修飾（例えば、Ｔ２５０ＱおよびＭ４２８Ｌ）、３０７および／または３０８の修飾（例えば、３０８Ｆまたは３０８Ｐ）を含む。

【０１８０】

例えば、本発明は、抗ＭＵＣ１６抗体、および抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含み、それらは、２５０Ｑおよび２４８Ｌ（例えば、Ｔ２５０ＱおよびＭ２４８Ｌ）、２５２Ｙ、２５４Ｔ、および２５６Ｅ（例えば、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ、およびＴ２５６Ｅ）、４２８Ｌおよび４３４Ｓ（例えば、Ｍ４２８ＬおよびＮ４３４Ｓ）、ならびに４３３Ｋおよび４３４Ｆ（例えば、Ｈ４３３ＫおよびＮ４３４Ｆ）からなる群から選択される１つ以上の対または群の変異を含むＦｃドメインを含む。前述のＦｃドメイン変異、および本明細書に開示される抗体可変ドメイン内の他の変異の全ての可能な組み合わせは、本発明の範囲内で企図される。

【０１８１】

抗体および二重特異性抗原結合分子の生物学的特性

本発明は、ヒトＭＵＣ１６に高い親和性（例えば、ナノモル以下のK_D値）で結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。

【０１８２】

特定の実施形態によると、本発明は、例えば、本明細書の実施例４に記載のように、表面プラズモン共鳴による測定で約６０ｎＭ未満のK_DでヒトＭＵＣ１６に結合する（例えば２５℃で）抗体および抗体の抗原結合断片を含む。特定の実施形態において、表面プラズモン共鳴、例えば本明細書の実施例４で定義するアッセイフォーマット（例えば、ｍＡ

ｂ捕捉または抗原捕捉フォーマット）を用いて、または実質的に類似のアッセイによって測定した場合に、本発明の抗体または抗原結合断片は、約６０ｎＭ未満、約４０ｎＭ未満、約２０ｎＭ未満、約１０ｎＭ未満、約８ｎＭ未満、約７ｎＭ未満、約６ｎＭ未満、約５ｎＭ未満、約４ｎＭ未満、約３ｎＭ未満、約２ｎＭ未満、約１ｎＭ未満、約８００ｐＭ未満、約７００ｐＭ未満、約５００ｐＭ未満、約４００ｐＭ未満、または約３００ｐＭ未満のK_DでＭＵＣ１６に結合する。本発明は、二重特異性抗原結合分子（例えば、表面プラズモン共鳴、例えば本明細書の実施例４に定義されているアッセイフォーマット（例えばｍＡｂ捕捉または抗原捕捉フォーマット）を用いて、または実質的に同様のアッセイによって測定した場合に、約７ｎＭ未満のK_DでＭＵＣ１６に結合する二重特異性抗体を含む。

【０１８３】

本発明はまた、２５℃での表面プラズモン共鳴、例えば、本明細書の実施例４に定義されるアッセイフォーマットを用いて、または実質的に類似のアッセイによって測定した場合に、約１０分超または約１２５分超の解離半減期（ｔ１／２）でＭＵＣ１６に結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。ある特定の実施形態において、２５℃での表面プラズモン共鳴、例えば本明細書の実施例４で定義するアッセイフォーマット（例えば、ｍＡｂ捕捉または抗原捕捉フォーマット）を用いて、または実質的に類似のアッセイによって測定した場合に、本発明の抗体または抗原結合断片は、約１０分超、約２０分超、約３０分超、約４０分超、約５０分超、約６０分超、約７０分超、約８０分超、約９０分超、約１００分超、約１１０分超、または約１２０分超のｔ１／２で、ＭＵＣ１６に結合する。本発明は、二重特異性抗原結合分子（例えば、２５℃の表面プラズモン共鳴、例えば、本明細書の実施例４において定義されたアッセイフォーマットを用いて、または実質的に類似のアッセイにより測定した場合に、約１０分超または約２０分超でＭＵＣ１６に結合する二重特異性抗体を含む。

【０１８４】

実施例２に記載の電気化学発光ベースの検出アッセイまたは実質的に類似のアッセイによって決定されるように、本発明はまた、内因性ＭＵＣ１６（例えば、ＯＶＣＡＲ－３）を発現するヒト細胞株に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片も含む。

【０１８５】

本発明はまた、（ａ）ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける腫瘍増殖を阻害すること、および（ｂ）ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける既存腫瘍の腫瘍増殖を抑制すること（例えば、実施例８参照）からなる群から選択される１つ以上の特性を示す、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む。

【０１８６】

本発明は、ヒトＣＤ３に高い親和性で結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。本発明はまた、治療状況および所望される特定の標的化特性に応じて、中程度または低い親和性でヒトＣＤ３に結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。場合によっては、低親和性には、３００ｎＭ超、５００ｎＭ超、または１μＭ超のK_DまたはEC_{50}（例えば、表面プラズモン共鳴アッセイで測定した場合）でＣＤ３と結合する抗体が含まれる。本発明はまた、ヒトＣＤ３に検出不可能な親和性で結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。例えば、一方のアームがＣＤ３と結合し、別のアームが標的抗原（例えば、ＭＵＣ１６）と結合する二重特異性抗原結合分子の状況下では、標的抗原結合アームが標的抗原に高い親和性で結合することが望ましいが、抗ＣＤ３アームは中程度または低い親和性でまたは親和性なしでＣＤ３に結合する。このようにして、標的抗原を発現する細胞への抗原結合分子の優先的標的化は、一般的／非標的化ＣＤ３結合およびそれに付随する結果として生じる有害な副作用を回避しながら達成され得る。

【０１８７】

本発明は、ヒトＣＤ３およびヒトＭＵＣ１６に同時に結合することができる二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）を含む。ＣＤ３を発現する細胞と相互作用する

結合アームは、適切なインビトロ結合アッセイで測定した場合に、弱い結合から検出不可能な結合を有し得る。二重特異性抗原結合分子がＣＤ３および／またはＭＵＣ１６を発現する細胞と結合する程度は、本明細書の実施例５に示すように、蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）によって評価することができる。

【０１８８】

例えば、本発明は、ＣＤ３を発現するヒト細胞株に特異的に結合するが、ＭＵＣ１６（例えば、ジャーカット）、霊長類Ｔ細胞（例えば、カニクイザル末梢血単核球［ＰＢＭＣ］）、および／またはＭＵＣ１６発現細胞を発現しない抗体、抗体結合断片、およびその二重特異性抗体を含む。

【０１８９】

本発明は、弱い（すなわち低い）親和性またはさらに検出不可能な結合もしくは結合親和性でヒトＣＤ３に結合する抗体、その抗体結合断片、およびその二重特異性抗体を含む。

【０１９０】

本発明は、弱い（すなわち低い）親和性またはさらに検出不可能な結合もしくは結合親和性でサル（すなわちカニクイザル）ＣＤ３に結合する抗体、その抗体結合断片、およびその二重特異性抗体を含む。

【０１９１】

本発明は、ヒトＣＤ３に結合してＴ細胞活性化を誘導する抗体、その抗体結合断片、およびその二重特異性抗体を含む。

【０１９２】

本発明は、対象において腫瘍抗原発現細胞を枯渇させることができる、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む（例えば、実施例８、生物発光イメージングアッセイ、または実質的に類似のアッセイを参照されたい）。例えば、特定の実施形態によると、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子が提供され、対象への１０μｇの二重特異性抗原結合分子の単回投与が対象におけるＭＵＣ１６発現細胞数の減少を引き起こす。（例えば、対象における腫瘍増殖が抑制または阻害される）。特に明記しない限り、生物発光放射輝度は、［ｐ／ｓ／ｃｍ２／ｓｒ］を指す。

【０１９３】

本発明はまた、ＭＵＣ１６陽性卵巣癌異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する、抗ＭＵＣ１６抗体薬物複合体を含む（例えば、実施例１０、生物発光イメージングアッセイ、または実質的に類似のアッセイを参照されたい）。特定の実施形態において、８５μｇ／ｋｇの用量で投与される４回分の週１回の用量が、インビボでの腹腔内ＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腫瘍増殖を阻害する、化合物７との抗ＭＵＣ１６抗体薬物結合体が提供される。特定の実施形態において、８５μｇ／ｋｇの用量で投与される４回分の週１回の用量が、インビボでの皮下ＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腫瘍増殖を阻害する、化合物７との抗ＭＵＣ１６抗体薬物複合体が提供される。特定の実施形態において、８５μｇ／ｋｇ、１７０μｇ／ｋｇ、または３４０μｇ／ｋｇの用量の単回用量が、インビボでの腹腔内ＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腫瘍増殖を阻害する、化合物１０との抗ＭＵＣ１６抗体薬物複合体が提供される。特に明記しない限り、生物発光放射輝度は、［ｐ／ｓ／ｃｍ２／ｓｒ］を指す。

【０１９４】

本発明はまた、実施例７に記載し、図１、２、および３に示すように、ヒト化ＭＵＣ１６×ＣＤ３マウス（ヒトＭＵＣ１６およびＣＤ３発現に対してホモ接合性のマウス、ＭＵＣ１６$^{hu/hu}$×ＣＤ３$^{hu/hu}$）、ＣＤ３ヒト化マウス（ヒトＣＤ３発現に対してホモ接合性のマウス、ＣＤ３$^{hu/hu}$）、および系統適合（７５％Ｃ５７ＢＬ、２５％１２９Ｓｖ）野生型（ＷＴ）マウスにおける薬物動態プロファイルを示す、抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む。

【０１９５】

エピトープマッピングおよび関連技術

本発明の抗原結合分子が結合するＣＤ３および／またはＭＵＣ１６上のエピトープは、

３つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０またはそれより多数）のＣＤ３またはＭＵＣ１６タンパク質のアミノ酸の単一連続配列からなってもよい。あるいは、エピトープは、ＣＤ３またはＭＵＣ１６の複数の非連続アミノ酸（またはアミノ酸配列）からなっていてもよい。本発明の抗体は、単一のＣＤ３鎖内に含まれるアミノ酸（例えば、ＣＤ３－イプシロン、ＣＤ３－デルタ、またはＣＤ３－ガンマ）と相互作用し得るか、または２つ以上の異なるＣＤ３鎖上のアミノ酸と相互作用し得る。本発明で使用する場合、「エピトープ」という用語は、パラトープとして既知の抗体分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は２つ以上のエピトープを有してもよい。したがって、異なる抗体は、抗原上の異なる領域へ結合し得、異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、立体配座または線状のいずれでもよい。立体配座エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸によって産生される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド鎖中の隣接するアミノ酸残基によって産生されるものである。特定の状況において、エピトープは、抗原上の糖類、ホスホリル基、またはスルホニル基の部分を含み得る。

【０１９６】

当業者に既知の種々の技術を用いて、抗体の抗原結合ドメインがポリペプチドまたはタンパク質内にある「１つ以上のアミノ酸と相互作用する」かどうかを判定することができる。例示的な技術としては、例えば、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ．，ＮＹ）に記載されている日常的なクロスブロッキングアッセイ、アラニンスキャニング突然変異分析、ペプチドブロット分析（Ｒｅｉｎｅｋｅ，２００４，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ２４８：４４３－４６３）、およびペプチド切断分析が挙げられる。加えて、エピトープ切除、エピトープ抽出、および抗原の化学修飾などの方法を採用することができる（Ｔｏｍｅｒ，２０００，Ｐｒｏｔｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ９：４８７－４９６）。抗体の抗原結合ドメインが相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために用いることができる別の方法は、質量分析によって検出される水素／重水素交換である。一般的にいえば、水素／重水素交換法は、関心対象のタンパク質を重水素標識した後、抗体を重水素標識タンパク質へ結合させることを包含する。次に、タンパク質／抗体複合体を水に移して、抗体によって保護されている残基（重水素標識されたままである）を除く全ての残基で水素－重水素交換を生じさせる。抗体の解離後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断および質量分析へ供し、それにより、抗体が相互作用する特異的アミノ酸に対応する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ｅｈｒｉｎｇ（１９９９）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２６７（２）：２５２－２５９、Ｅｎｇｅｎ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ（２００１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．７３：２５６Ａ－２６５Ａを参照されたい。抗原／抗体複合体のＸ線結晶解析もまた、エピトープマッピング目的に使用してもよい。

【０１９７】

本発明はさらに、本明細書に記載の特定の例示的な抗体のいずれかと同じエピトープ（例えば、本明細書の表１に記載のアミノ酸配列のいずれかを含む抗体）に結合した抗ＭＵＣ１６抗体を含む。同様に、本発明はまた、ＭＵＣ１６への結合について、本明細書に記載の特定の例示的な抗体のいずれかと競合する抗ＭＵＣ１６抗体（例えば、本明細書の表１に記載のアミノ酸配列のいずれかを含む抗体）も含む。

【０１９８】

本発明はまた、低いまたは検出不可能な結合または結合親和性でヒトＣＤ３および／またはカニクイザルＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗原結合分子を含み、第１の抗原結合ドメインは、本明細書に記載の特定の例示的なＣＤ３特異的抗原結合ドメインのいずれかと同じＣＤ３上のエピトープに結合し、および／または第２の抗原結合ドメインは、本明細書に記載の特定の例示的なＭＵＣ１６特異的抗原結合ドメインのいずれか

と同じＭＵＣ１６上の同じエピトープに結合する。

【０１９９】

同様に、本発明はまた、ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメイン、およびヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子を含み、第１の抗原結合ドメインは、ＣＤ３への結合について、本明細書に記載の特定の例示的なＣＤ３特異的抗原結合ドメインのいずれかと競合し、および／または第２の抗原結合ドメインは、ＭＵＣ１６への結合について、本明細書に記載の特定の例示的なＭＵＣ１６特異的抗原結合ドメインのいずれかと競合する。

【０２００】

特定の抗原結合分子（例えば、抗体）またはその抗原結合ドメインが、本発明の参照抗原結合分子と同じエピトープに結合するか、または結合するために本発明の参照抗原結合分子と競合するかどうかは、当技術分野で既知の常法を用いて容易に判定できる。例えば、試験抗体が本発明の参照二重特異性抗原結合分子と同じＭＵＣ１６（またはＣＤ３）上のエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照二重特異性分子は最初にＭＵＣ１６タンパク質（またはＣＤ３タンパク質）に結合させた。次に、ＭＵＣ１６（またはＣＤ３）分子へ結合する試験抗体の能力を評価する。試験抗体が参照二重特異性抗原結合分子と飽和結合後にＭＵＣ１６（またはＣＤ３）に結合することができる場合、試験抗体は参照二重特異性抗原とは異なるＭＵＣ１６（またはＣＤ３）のエピトープに結合すると結論付けることができる。その一方で、試験抗体が、参照二重特異性抗原結合分子に飽和結合後にＭＵＣ１６（またはＣＤ３）分子へ結合できない場合、試験抗体は、本発明の参照二重特異性抗原結合分子によって結合したエピトープと同じＭＵＣ１６（またはＣＤ３）のエピトープへ結合してもよい。次に、試験抗体の結合の観察された欠失が、実際に、参照二重特異性抗原結合分子と同じエピトープへの結合によるものであるか、それとも立体遮断（または別の現象）が、観察された結合の欠失の原因であるのかを確認するために、さらなる通例の実験（例えば、ペプチド変異および結合分析）を実施することができる。この種の実験は、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、Ｂｉａｃｏｒｅ、フローサイトメトリー、または当該技術分野で利用可能な任意の他の定量的っもしくは定性的な抗体結合アッセイを用いて行うことができる。本発明の特定の実施形態によると、例えば、１倍、５倍、１０倍、２０倍、または１００倍過剰量の一方の抗原結合タンパク質が、競合結合アッセイでの測定で少なくとも５０％、しかし、好ましくは７５％、９０％、またはさらに９９％他方の結合を阻害する場合、２つの抗原結合タンパク質は、同一（または重複）エピトープに結合する。（例えば、Ｊｕｎｇｈａｎｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１９９０：５０：１４９５－１５０２を参照されたい）あるいは、一方の抗原結合タンパク質の結合を低減または排除する抗原における本質的に全てのアミノ酸変異が、もう一方の結合を低減または排除する場合、２つの抗原結合タンパク質は同じエピトープと結合するとみなされる。一方の抗原結合タンパク質の結合を減少または排除するアミノ酸変異のサブセットのみが他方の結合を減少または排除する場合、２つの抗原結合タンパク質は「重複エピトープ」を有するとみなされる。

【０２０１】

抗体またはその抗原結合ドメインが、結合について、参照抗原結合分子と競合するかどうかを決定するために、上述の結合方法を２つの方向性で実施する。第１の方向性おいて、参照抗原結合分子を飽和条件下でＭＵＣ１６タンパク質（またはＣＤ３タンパク質）へ結合させた後、ＭＵＣ１６（またはＣＤ３）分子への試験抗体の結合を評価する。第２の方向性において、試験抗体を飽和条件下でＭＵＣ１６（またはＣＤ３）分子に結合させた後、参照抗原結合分子のＭＵＣ１６（またはＣＤ３）分子への結合を評価する。両方向において、第１の（飽和）抗原結合分子のみがＭＵＣ１６（またはＣＤ３）分子に結合することができる場合、試験抗体および参照抗原結合分子は、ＭＵＣ１６（またはＣＤ３）への結合について、競合すると結論される。当業者によって認識されるように、参照抗原結合分子との結合について競合する抗体は、必ずしも参照抗体と同一のエピトープへ結合するわけではないが、重複しているまたは隣接しているエピトープに結合することによって

、参照抗体の結合を立体的に遮断し得る。
【０２０２】
抗原結合ドメインの調製と二重特異性分子の構築
特定の抗原に特異的な抗原結合ドメインは、当技術分野で既知の任意の抗体産生技術によって調製することができる。いったん得られれば、２つの異なる抗原（例えばＣＤ３およびＭＵＣ１６）に特異的な２つの異なる抗原結合ドメインを互いに適切に配置して、常法を用いて本発明の二重特異性抗原結合分子を産生することができる。（本発明の二重特異性抗原結合分子を構築するために使用できる例示的な二重特異性抗体フォーマットの考察は、本明細書の他所に提供される）。特定の実施形態において、本発明の多重特異性抗原結合分子の１つ以上の個々の構成要素（例えば、重鎖および軽鎖）は、キメラ抗体、ヒト化抗体または完全ヒト型抗体に由来する。そのような抗体を作製するための方法は当技術分野において周知である。例えば、本発明の二重特異性抗原結合分子の１つ以上の重鎖および／または軽鎖は、ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（商標）技術を用いて調製することができる。ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（商標）技術（または任意の他のヒト抗体産生技術）を使用して、特定の抗原（例えば、ＣＤ３またはＭＵＣ１６）に対する高親和性キメラ抗体が、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有して最初に単離される。抗体を、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特徴付けし選択する。マウス定常領域は、所望のヒト定常領域と置換されて、本発明の二重特異性抗原結合分子に組み込まれ得る完全ヒト型重鎖および／または軽鎖を産生する。
【０２０３】
遺伝子操作された動物は、ヒト二重特異性抗原結合分子を作製するために使用し得る。例えば、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変配列を再編成および発現することができない、遺伝子改変マウスを使うことができ、マウスは、内在性マウスカッパ遺伝子座のマウスカッパ定常遺伝子に作動可能に連結されているヒト免疫グロブリン配列によってコードされる１つまたは２つのヒト軽鎖可変ドメインのみを発現する。そのような遺伝子改変マウスを使用して、２つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの１つに由来する可変ドメインを含む同一の軽鎖と会合する２つの異なる重鎖を含む完全ヒト型二重特異性抗原結合分子を産生することできる。（例えば、ＵＳ２０１１／０１９５４５４を参照されたい）。完全ヒト型とは、抗体またはその抗原結合断片もしくは免疫グロブリンドメインの各ポリペプチドの全長にわたるヒト配列に由来するＤＮＡによってコードされるアミノ酸配列を含む、抗体、またはその抗原結合断片もしくは免疫グロブリンドメインを指す。いくつかの例において、完全ヒト型配列は、ヒトに対して内因性のタンパク質に由来する。他の例において、完全ヒト型タンパク質またはタンパク質配列は、各成分配列がヒト配列に由来するキメラ配列を含む。いずれの理論にも縛られないが、キメラタンパク質またはキメラ配列は、一般に、例えば任意の野生型ヒト免疫グロブリン領域またはドメインと比較して、成分配列の接合部における免疫原性エピトープの生成を最小にするように設計される。
【０２０４】
生物学的等価物
本発明は、本明細書に開示の例示的な分子のものとは異なるが、ＣＤ３および／またはＭＵＣ１６に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有する抗原結合分子を包含する。このような変異体抗体は、親配列と比較してアミノ酸の１つ以上の付加、欠失、または置換を含むが、説明された二重特異性抗原結合分子の生物学的活性とは本質的に等価である生物学的活性を呈する。
【０２０５】
本発明は、本明細書に記載の例示的な抗原結合分子のいずれかと生物学的に等価な抗原結合分子を含む。２つの抗原結合タンパク質または抗体は、例えば、それらが類似の実験条件下で単回用量または複数回用量のいずれかで同じモル用量で投与された場合に、吸収速度および吸収の程度が有意差を示さない医薬的等価物または医薬的選択肢である場合、生物学的等価物とみなされる。これらの吸収の程度は等価であるが吸収速度は等価ではな

く、吸収速度におけるこのような差が意図的、かつ標識に反映されているので生物学的に等価とみなされ得る場合、いくつかの抗原結合タンパク質は、等価物または薬学的選択肢とみなされることになっており、例えば長期使用に及ぼす有効な身体薬剤濃度の達成に必須ではなく、試験した特定の薬剤製品にとって医学的に有意ではないとみなされる。

【０２０６】

一実施形態において、２つの抗原結合タンパク質は、これらの安全性、純度、または効力において臨床的に有意性のある差がない場合、生物学的に等価である。

【０２０７】

一実施形態において、免疫原性の臨床的に有意な変化、または有効性の減退を含む有害作用のリスクにおいて予想される上昇を伴わずに、患者が参照製品と生物製品の間で１回以上切り替えることができる場合、２つの抗原結合タンパク質は、そのような切り替えなしで継続される療法と比較して、生物学的に等価である。

【０２０８】

一実施形態において、２つの抗原結合タンパク質は、これらが両方とも、条件または使用条件についての共通の機序または作用機序によって、このような機序が既知である程度まで作用する場合、生物学的に等価である。

【０２０９】

生物学的等価性は、インビボおよびインビトロの方法によって実証され得る。生物学的等価性測定法には、例えば、（ａ）抗体またはその代謝産物の濃度が血液、血漿、血清または他の生物学的流体中で時間の関数として測定される、ヒトまたは他の哺乳類におけるインビボでの試験、（ｂ）ヒト生物学的利用能データと相関した、このデータを合理的に予測しているインビトロ試験、（ｃ）抗体（またはその標的）の適切な急性薬理学的効果が時間の関数として測定されるヒトまたは他の哺乳類におけるインビボ試験、および（ｄ）抗原結合タンパク質の安全性、効能、または生物学的利用能もしくは生物学的等価性を確立する、十分に管理された臨床試験が含まれる。

【０２１０】

本明細書に示す例示的な二重特異性抗原結合分子の生物学的に等価な変異体は、例えば、残基もしくは配列の種々の置換を生じること、または生物活性に必要とされない末端もしくは内部の残基もしくは配列を欠失することによって構築され得る。例えば、生物学的活性にとって必須ではないシステイン残基は、再生の際の不必要または不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するために、欠失または他のアミノ酸で置換することができる。他の文脈において、生物学的等価な抗原結合タンパク質は、分子のグリコシル化特性を修飾するアミノ酸変化、例えばグリコシル化を排除または除去する変異を含む、本明細書に記載の例示的な二重特異性抗原結合分子の変異体を含み得る。

【０２１１】

種の選択性および種の交差反応性

本発明の特定の実施形態によると、ヒトＣＤ３に結合するが他の種由来のＣＤ３には結合しない抗原結合分子が提供される。ヒトＭＵＣ１６に結合する抗原結合分子もまた提供される。本発明はまた、ヒトＣＤ３および１つ以上の非ヒト種由来のＣＤ３に結合する抗原結合分子、および／またはヒトＭＵＣ１６に結合する抗原結合分子を含む。

【０２１２】

本発明の特定の例示的な実施形態によると、ヒトＣＤ３および／またはヒトＭＵＣ１６に結合し、場合によってはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、スナネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザルまたはチンパンジーＣＤ３および／またはＭＵＣ１６のうちの１つ以上に結合または結合しない抗原結合分子が提供される。例えば、本発明の特定の例示的な実施形態において、ヒトＣＤ３およびカニクイザルＣＤ３に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインとを含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【０２１３】

抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）

本発明は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、免疫抑制剤または放射性同位元素などの治療用部分にコンジュゲートした抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片を含む抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）を提供する。一般論として、ＡＤＣは、Ａ－［Ｌ－Ｐ］$_{y}$を含み、式中、Ａは抗原結合分子、例えば抗ＭＵＣ１６抗体、またはその断片（例えば、表１に列挙されたＨＣＤＲ３アミノ酸配列のいずれかから選択される少なくとも１つのＨＣＤＲ３を含む断片）であり、Ｌはリンカーであり、Ｐはペイロードまたは治療部分（例えば、細胞傷害性薬剤）であり、ｙは１～３０の整数である。様々な実施形態において、ＡＤＣは、表１に記載の配列番号（例えば、配列番号２および１０）のアミノ酸配列を有するＨＣＶＲおよびＬＣＶＲのＣＤＲ、または特異的ＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ対（例えば、配列番号２／１０）を含む抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片を含む。場合によっては、抗ＭＵＣ１６抗体または断片は、表１に記載の配列番号（例えば、配列番号４－６－８－１２－１４－１６）のアミノ酸配列を有するＣＤＲを含む。場合によっては、抗ＭＵＣ１６抗体または断片は、表１に記載の配列番号（例えば、配列番号２および１０）のアミノ酸配列、または特異的なアミノ酸配列対（例えば、配列番号２／１０）を有するＨＣＶＲおよびＬＣＶＲを含む。場合によっては、抗ＭＵＣ１６抗体は、配列番号１８９９の残基１３７９１～１４４５１に対応するヒトＭＵＣ１６の５つの膜近位ＳＥＡドメインのうちの１つ以上のヒトＭＵＣ１６に結合する、抗体または抗原結合断片である。場合によっては、抗ＭＵＣ１６抗体は、配列番号１８９９の残基１３８１０～１４４５１のヒトＭＵＣ１６に結合する抗体または抗原結合断片である。場合によっては、抗ＭＵＣ１６は、ヒトＭＵＣ１６のＳＥＡ１、ＳＥＡ２、ＳＥＡ３、ＳＥＡ４、ＳＥＡ５、ＳＥＡ６、ＳＥＡ７、ＳＥＡ８、ＳＥＡ９、ＳＥＡ１０、ＳＥＡ１１、ＳＥＡ１２、ＳＥＡ１３、ＳＥＡ１４、ＳＥＡ１５、またはＳＥＡ１６のうちのいずれか１つ以上に結合する、抗体または抗原結合断片である。

【０２１４】

細胞傷害性薬剤は、細胞の増殖、生存能力、または伝播に有害な任意の薬剤を含む。本発明の抗原結合分子または抗体は、本明細書で「ペイロード」と呼ばれるこれらの細胞傷害性薬剤を標的細胞に送達する。ＡＤＣを形成するための適切な細胞傷害剤および化学療法剤の例は当該分野で公知である。

【０２１５】

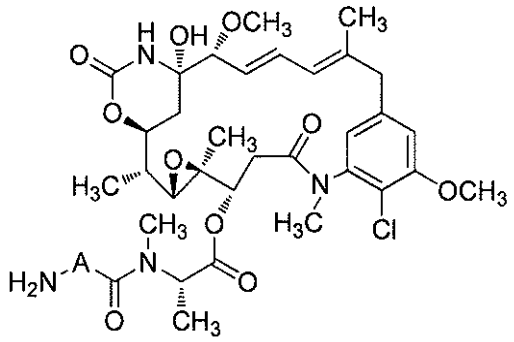
本発明のこの態様に従って抗ＭＵＣ１６抗体にコンジュゲートすることができる好適な細胞障害性薬剤および化学療法剤の例としては、例えば、１－（２－クロロエチル）－１，２－ジメタンスルホニルジヒドラジド、１，８－ジヒドロキシ－ビシクロ［７．３．１］トリデカ－４，９－ジエン－２，６－ジイン－１３－オン、１－デヒドロテストステロン、５－フルオロウラシル、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、９－アミノカンプトテシン、アクチノマイシンＤ、アマニチン、アミノプテリン、アングイジン、アンスラサイクリン、アントラマイシン（ＡＭＣ）、アウリスタチン（モノメチルアウリスタチンＥまたはモノメチルアウリスタチンＦ）、ブレオマイシン、ブスルファン、酪酸、カリケアマイシン、カンプトセシン、カルミノマイシン、カルムスチン、セマドチン、シスプラチン、コルチシン、コンブレタスタチン、シクロホスファミド、シタラビン、サイトカラシンＢ、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デカルバジン、ジアセトキシペンチルドキソルビシン、ジブロモマンニトール、ジヒドロキシアントラシンジオン、ジソラゾール、ドラスタチン、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、エキノマイシン、エリューテロビン、エメチン、エポチロン、エスペラミシン、エストラムスチン、臭化エチジウム、エトポシド、フルオロウラシル、ゲルダナマイシン、グラミシジンＤ、グルココルチコイド、イリノテカン、レプトマイシン、ロイロシン、リドカイン、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、メイタンシノイド、メクロレタミン、メルファラン、ｍｅｒｃａｔｏｐｕｒｉｎｅｓ、メトプテリン、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、Ｎ８－アセチルスペルミジン、ポドフィロトキシン、プロカイン、プロプラノロール、プテリジン、ピューロマイシン、リゾキシン、ストレプトゾトシン、タルトソマイシン、タ

キソール、テノポシド、テトラカイン、チオエパクロラムブシル、トマイマイシン、トポテカン、ツブリシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン、および前述のいずれかの誘導体が挙げられる。

【０２１６】

特定の実施形態によると、抗ＭＵＣ１６抗体にコンジュゲートする細胞傷害性薬剤は、モノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）またはモノメチルアウリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）などのアウリスタチン、ＴＵＢ－ＯＨまたはＴＵＢ－ＯＭＯＭなどのツブリシン、トマイマイシン誘導体、ドラスタチン誘導体、またはＤＭ１もしくはＤＭ４のようなメイタンシノイドである。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、式（Ｉ）の化合物の立体異性体を含む、式（Ｉ）の構造を有するメイタンシノイドである。

【化１１】



(式Ｉ)

式中、Ａはアリーレンまたはヘテロアリーレンである。

【０２１７】

いくつかの実施形態において、Ａは、置換されていてもよいベンゼン、ピリジン、ナフタレン、またはキノロンの二価の基である。

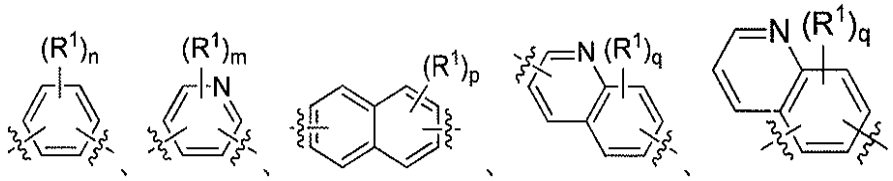
【０２１８】

いくつかの実施形態において、Ａはアリーレンである。

【０２１９】

いくつかの実施形態において、Ａは、

【化１２】

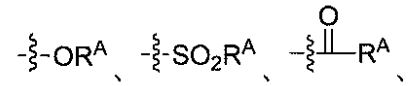


であり、

式中、

Ｒ^{1}は、各出現時に独立して、アルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、アルカリール、アラルキル、ハロ、ヘテロアリール、ヘテロシクロアルキル、ヒドロキシル、シアノ、ニトロ、

【化１３】



またはアジドであり、

式中、Ｒ^{A}はアルキルまたはヘテロアルキルであり、

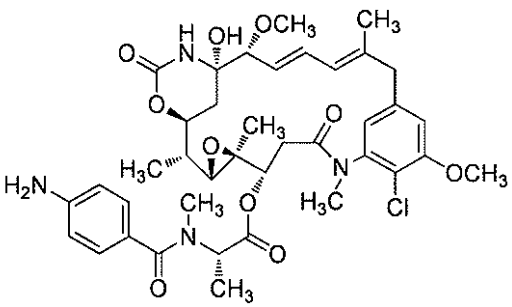
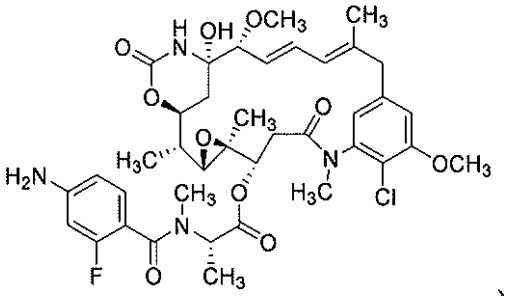
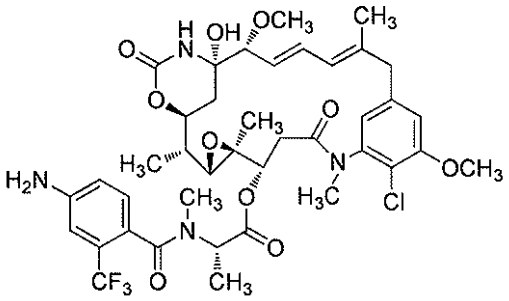
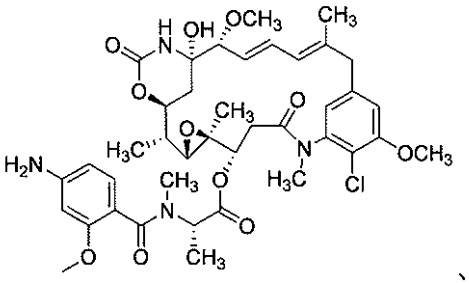
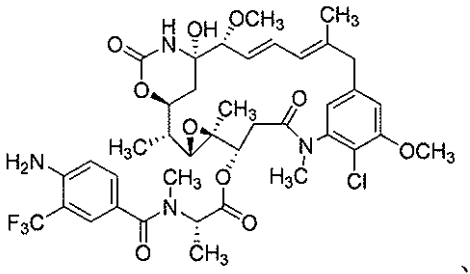
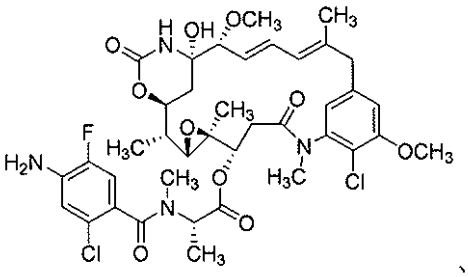
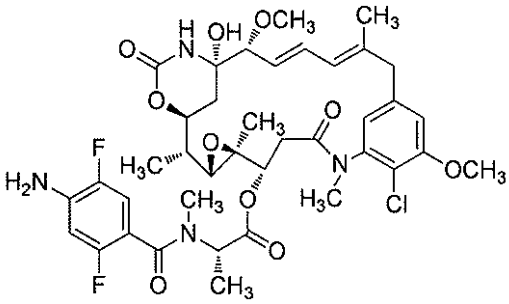
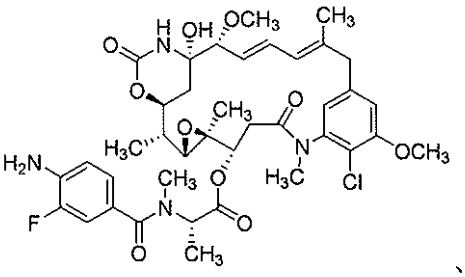
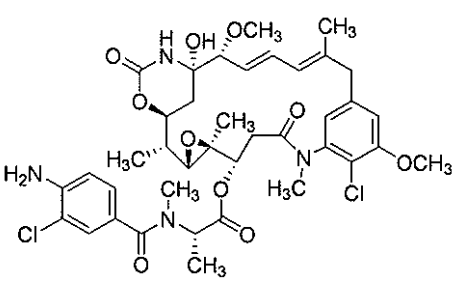
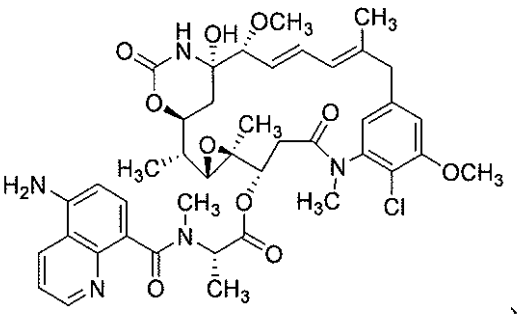
ｎは０～４の整数であり、

ｍは０～３の整数であり、
ｐは０～６の整数であり、
ｑは０～５の整数である。

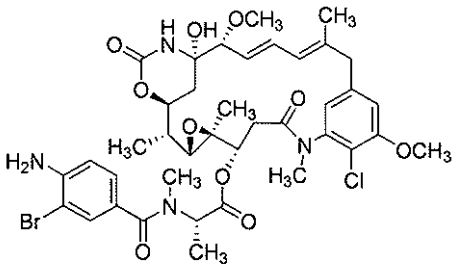
【０２２０】

いくつかの実施形態において、式Ｉの化合物は、

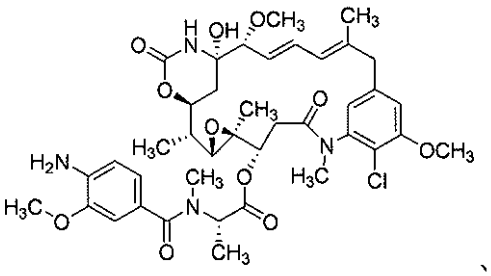
【化１４】


、

、

、

、

、

、

、

、

、

、

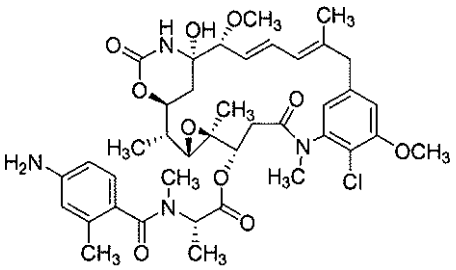
【化１５】



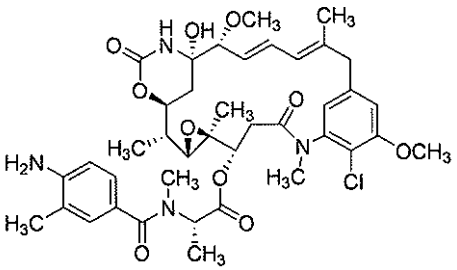
、



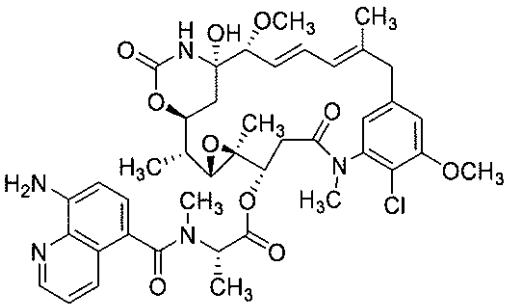
、



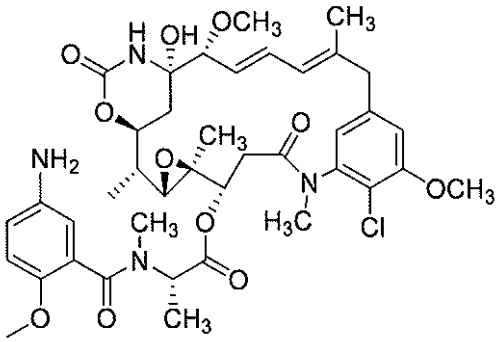
、



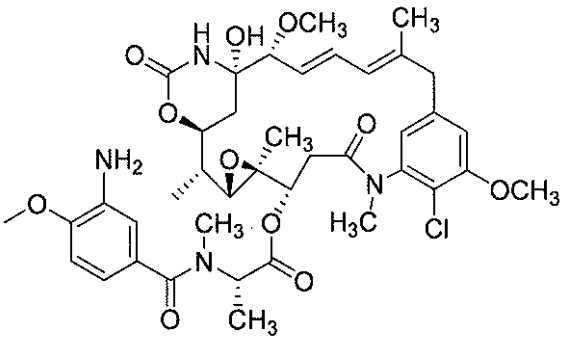
、



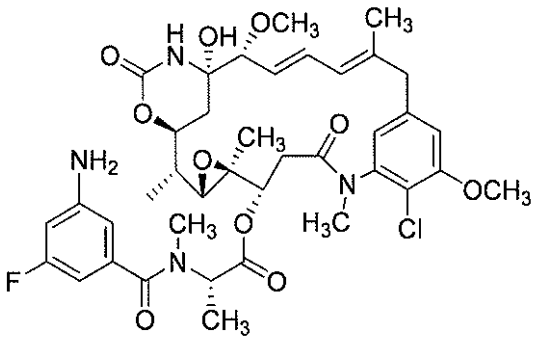
、



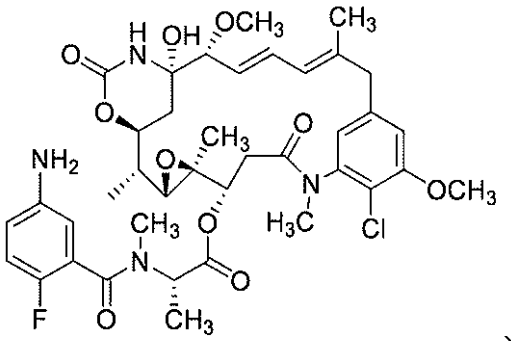
、



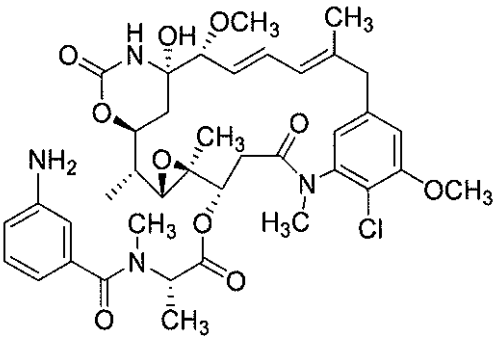
、



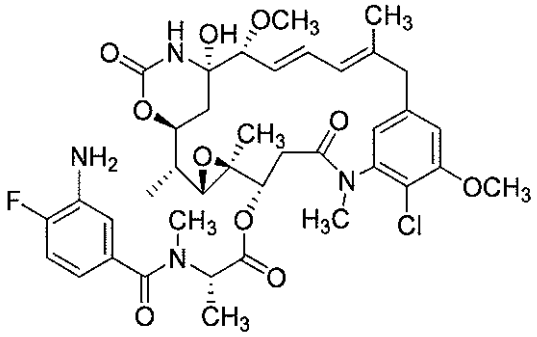
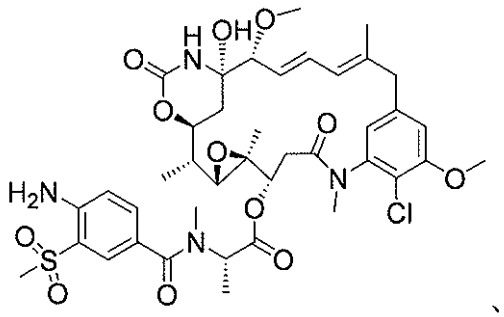
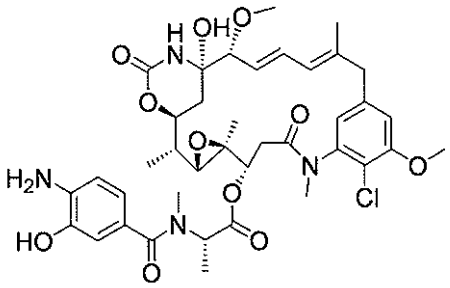
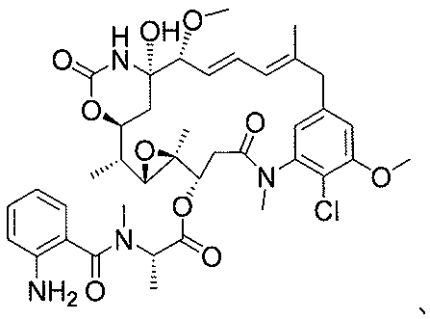
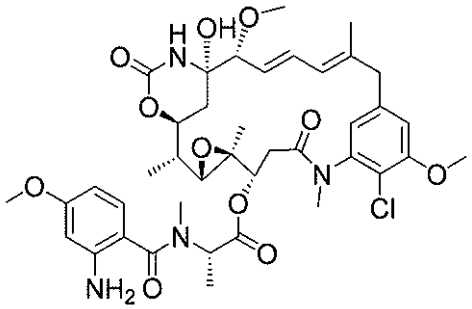
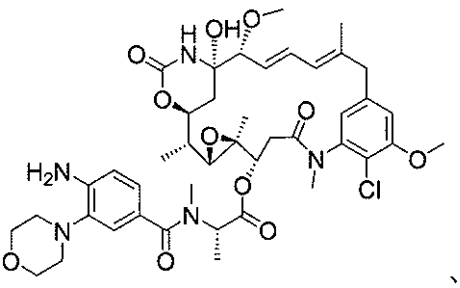
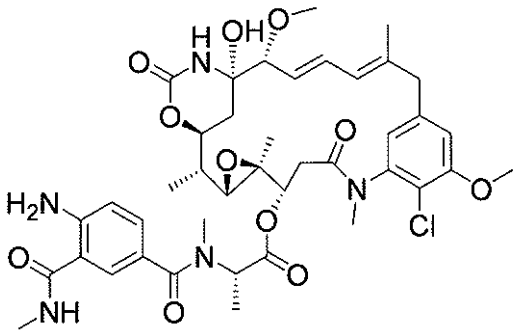
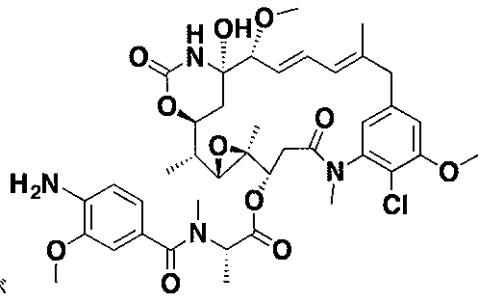
、



、



【化１６】

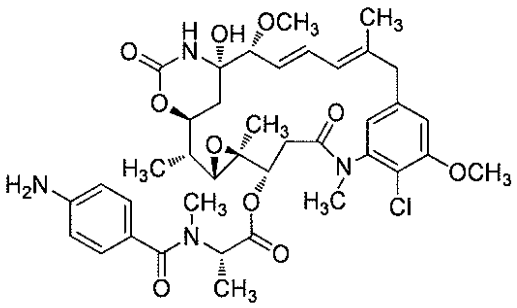

、

、

、

、

、

、

、

、および

からなる群から選択される。

【０２２１】

一実施形態において、式（Ｉ）の化合物は、

【化１７】

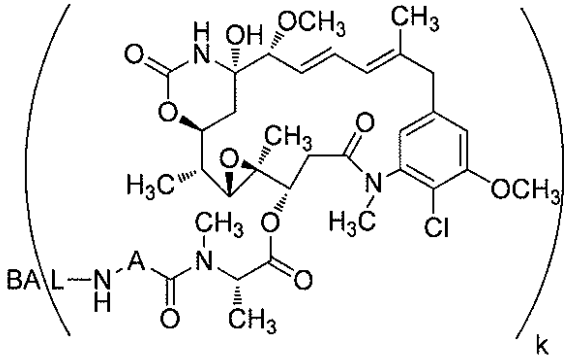


である。

【０２２２】

いくつかの実施形態において、式（Ｉ）のメイタンシノイドは、以下の式（ＩＡ）に示すように、リンカーを介して抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートする。

【化１８】



(式ＩＡ)

式中、

Ａは、式（Ｉ）に関連して上述したように、アリーレンまたはヘテロアリーレンであり、

Ｌはリンカーであり、

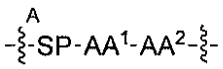
ＢＡは抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片であり、

ｋは１～３０の整数である。

【０２２３】

様々な実施形態において、Ｌは次式であり、

【化１９】



式中、

ＳＰはスペーサーであり、

【化２０】



は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への１つ以上の結合であり、

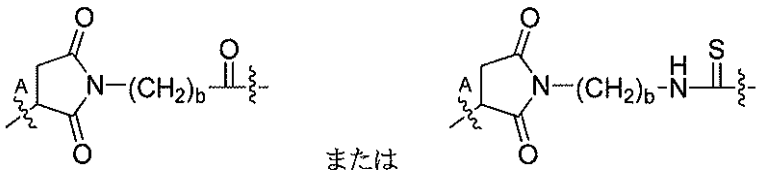
AA^1はアミノ酸であり、

AA^2はアミノ酸である。

【０２２４】

いくつかの実施形態において、AA^1－AA^2は、バリン－シトルリン、シトルリン－バリン、リジン－フェニルアラニン、フェニルアラニン－リジン、バリン－アスパラギン、アスパラギン－バリン、スレオニン－アスパラギン、アスパラギン－スレオニン、セリン－アスパラギン、アスパラギン－セリン、フェニルアラニン－アスパラギン、アスパラギン－フェニルアラニン、ロイシン－アスパラギン、アスパラギン－ロイシン、イソロイシン－アスパラギン、アスパラギン－イソロイシン、グリシン－アスパラギン、アスパラギン－グリシン、グルタミン酸－アスパラギン、アスパラギン－グルタミン酸、シトルリン－アスパラギン、アスパラギン－シトルリン、アラニン－アスパラギン、またはアスパラギン－アラニンである。

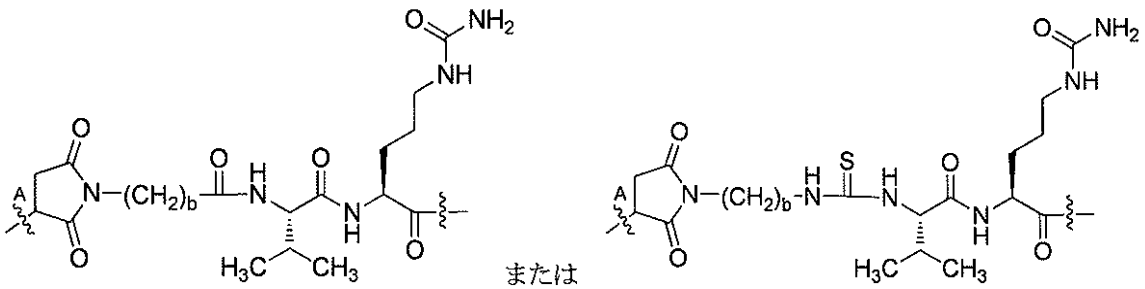
【０２２５】
いくつかの実施形態において、ＳＰは、
【化２１】



であり、
式中、
【化２２】



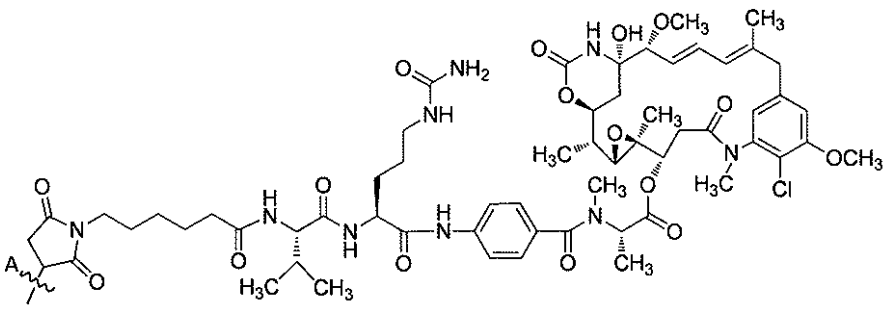
は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合であり、
ｂは２～８の整数である。
他の実施形態では、Ｌは、
【化２３】



であり、
式中、
【化２４】



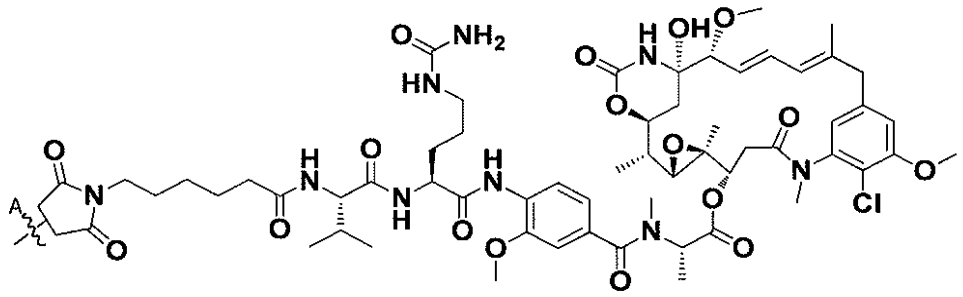
は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合であり、
ｂは２～８の整数である。
【０２２６】
一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片に結合するリンカーを含む式（ＩＡ）の化合物は、次式であり、
【化２５】



式中、
【化２６】



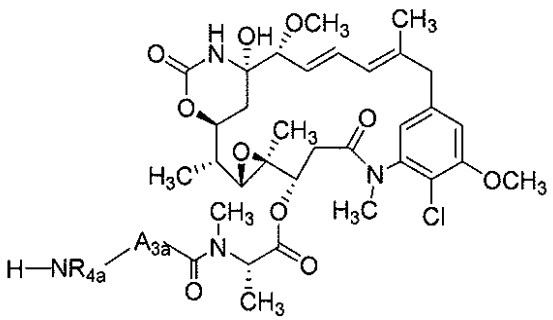
は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。場合によっては、この部分は「化合物１０」と呼ばれる。
【０２２７】
一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片に結合するリンカーを含む式（ＩＡ）の化合物は、次式であり、
【化２７】



式中、
【化２８】



は抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。場合によっては、この部分は「化合物６０」と呼ばれる。
【０２２８】
いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、式（ＩＩ）の化合物の立体異性体を含む、式（ＩＩ）の構造を有するメイタンシノイドであり、
【化２９】



(式ＩＩ)

式中、
A_{3a}は、アミノ酸、２－２０個のアミノ酸を有するペプチド、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、－CR_5R_6－、－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－（$CH_x)_{p1}$－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－（$CH_x)_{p1}$－、－（$CH_x)_{p1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、－（$CH_x)_{p1}$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｏ－（$CH_2)_{p2}$－）$_{p3}$－、－（（$CH_2)_{p2}$－Ｏ－）$_{p3}$－、－Ｃ（＝Ｓ）－、－Ｃ

（＝Ｓ）－Ｓ－、－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－、－Ｓ－Ｃ（＝Ｓ）－、－Ｓ－Ｃ（＝Ｓ）－Ｓ－、－Ｓ－、－ＳＯ－、－ＳＯ$_2$－、－ＮＲ$_4$－、－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_8$）－、－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_4$）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）－、または－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ$_4$－であり、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルは置換されていてもよく、

ｐ１、ｐ２、およびｐ３は、それぞれ独立して０、または１～１００の整数であり、

ｘは０、１または２であり、

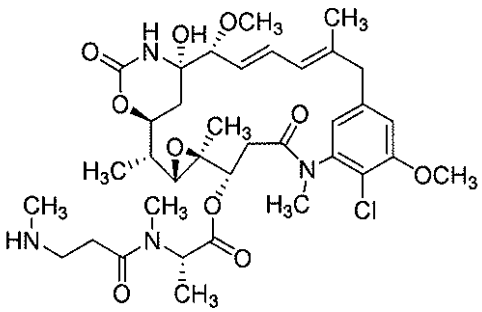
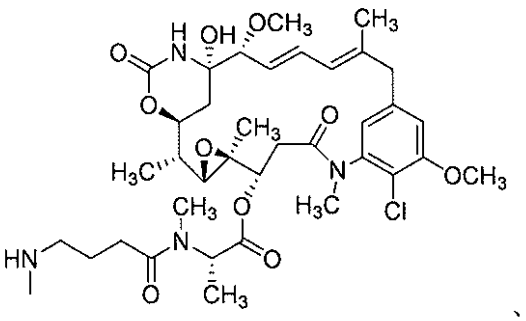
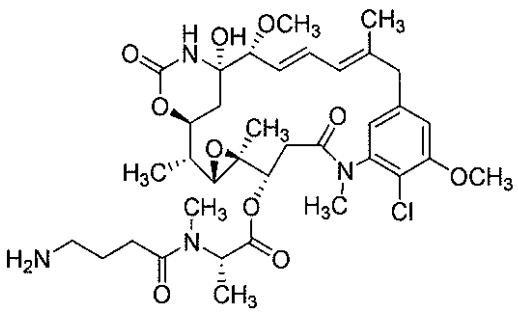
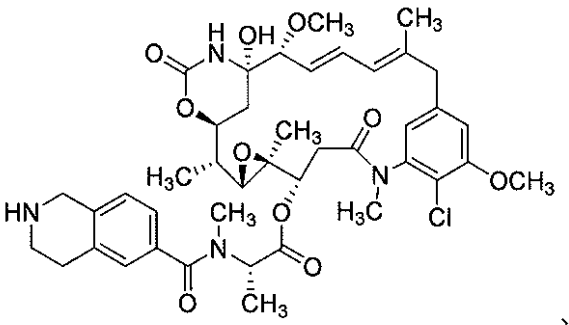
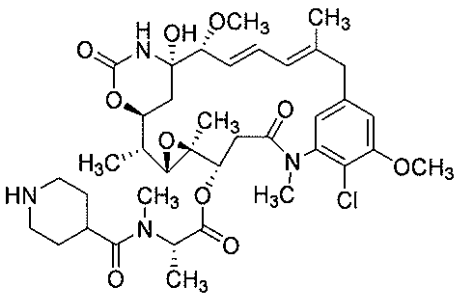
Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、およびＲ$_8$は、それぞれ独立してＨ、または置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであり、

Ｒ$_{4a}$は、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルである。

【０２２９】

いくつかの実施形態において、式（ＩＩ）の化合物は、

【化３０】

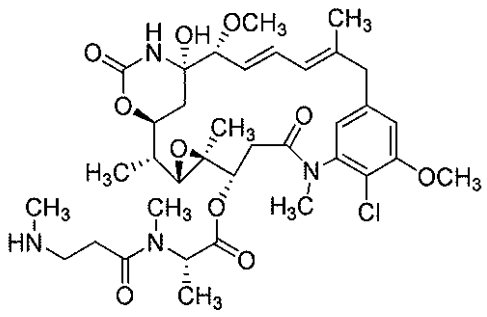

、

、

、

、および


からなる群から選択される。

【０２３０】

一実施形態において、式（ＩＩ）の化合物は、

【化３１】

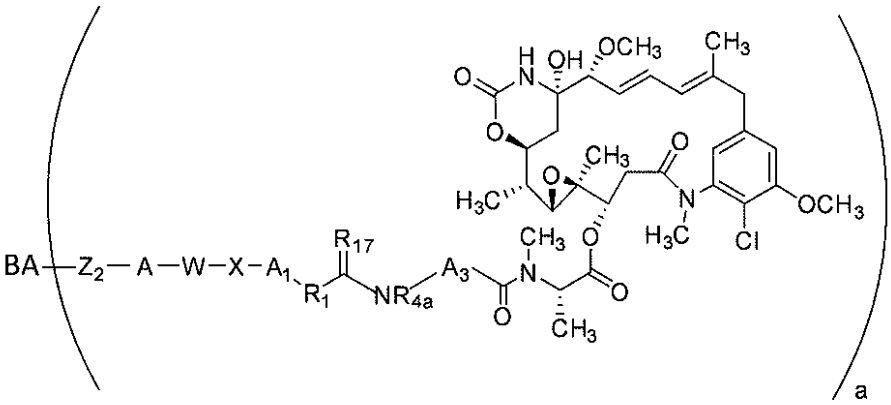


である。

【０２３１】

いくつかの実施形態において、式（ＩＩ）のメイタンシノイドは、以下の式（ＩＩＡ）に示すように、リンカーを介して抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片にコンジュゲートする。

【化３２】



(式ＩＩＡ)

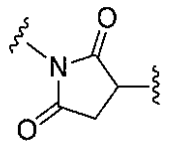
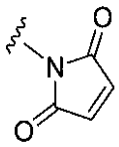
式中、

ＢＡは抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片であり、

ａは１～３０の整数であり、

Z_2は、以下の構造式$-Z_{2A}-Z_{2B}-Z_{2C}-Z_{2D}$によって表され、式中、$Z_{2A}$、$Z_{2B}$、$Z_{2C}$、および$Z_{2D}$は、それぞれ独立して不在であるか、アミノ酸、２～２０個のアミノ酸を有するペプチド、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、$-CR_5R_6-$、$-O-$、$-C(=O)-$、$-O-C(=O)-$、$-C(=O)-O-$、$-O-C(=O)-O-$、$-C(=O)-(CH_x)_{p1}$、$-C(=O)-O-(CH_x)_{p1}$、$-(CH_x)_{p1}-C(=O)-$、$-(CH_x)_{p1}-C(=O)-O-$、$-(O-(CH_2)_{p2}-)_{p3}-$、$-((CH_2)_{p2}-O-)_{p3}-$、$-C(=S)-$、$-C(=S)-S-$、$-C(=S)-NH-$、$-S-C(=S)-$、$-S-C(=S)-S-$、$-S-$、$-SO-$、$-SO_2-$、$-NR_4-$、$-N(R_4)-C(=O)-N(R_8)-$、$-N(R_4)-C(=O)O-$、$-N(R_4)-C(=O)-$、$-C(=O)-N(R_4)-$、$-C(=O)-N(R_4)-C(=O)-$、$-O-C(=O)-N(R_4)$、$-O-C(=S)-N(R_4)-$、$-C(=S)-N(R_4)-$、$-N=C=S$、$-N=C=O$、

【化３３】


または


であり、

Ａは天然もしくは非天然アミノ酸、または２～２０個のアミノ酸を含むペプチドであり、

Ｗは、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＣＲ$_5$Ｒ$_6$－、－ＮＲ$_4$－であり、

Ｘはアリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはヘテロシクリルであり、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、およびヘテロシクリルは置換されていてもよく、

式中、Ａ$_1$、Ａ$_3$、およびＲ$_1$は、それぞれ独立して、アミノ酸、２－２０個のアミノ酸を有するペプチド、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、－ＣＲ$_5$Ｒ$_6$－、－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－（ＣＨ$_x$）$_{p1}$－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－（ＣＨ$_x$）$_{p1}$－、－（ＣＨ$_x$）$_{p1}$－Ｃ（＝Ｏ）－、－（ＣＨ$_x$）$_{p1}$－Ｃ（＝Ｏ）－Ｏ－、－（Ｏ－（ＣＨ$_2$）$_{p2}$－）$_{p3}$－、－（（ＣＨ$_2$）$_{p2}$－Ｏ－）$_{p3}$－、－Ｃ（＝Ｓ）－、－Ｃ（＝Ｓ）－Ｓ－、－Ｓ－Ｃ（＝Ｓ）－、－Ｃ（＝Ｓ）－ＮＨ－、－Ｓ－Ｃ（＝Ｓ）－Ｓ－、－Ｓ－、－ＳＯ－、－ＳＯ$_2$－、－ＮＲ$_4$－、－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_8$）－、－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_4$）－、－Ｃ（＝Ｏ）－Ｎ（Ｒ$_4$）－Ｃ（＝Ｏ）－、または－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－ＮＲ$_4$－であり、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルは置換されていてもよく、

Ｒ$_{17}$は、Ｏ、Ｓ、ＮＲ$_{18}$、およびＣＲ$_5$Ｒ$_6$からなる群から選択され、

Ｒ$_{18}$は、Ｈ、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、およびアシルからなる群から選択され、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、およびアシルは置換されていてもよく、

Ｒ$_4$、Ｒ$_5$、Ｒ$_6$、およびＲ$_8$は、それぞれ独立してＨ、または置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであり、

Ｒ$_{4a}$は、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであり、

ｐ１、ｐ２、およびｐ３は、それぞれ独立して０、または１～１００の整数であり、

ｘは０、１または２である。

【０２３２】

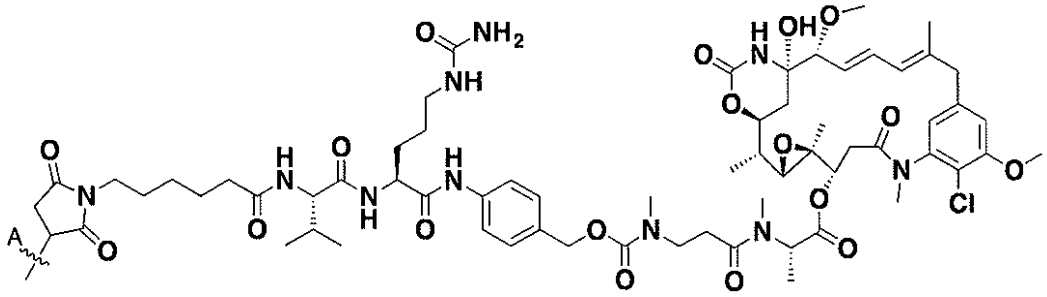
式（ＩＩＡ）のいくつかの実施形態において、Ａは、バリン－シトルリン、シトルリン－バリン、リジン－フェニルアラニン、フェニルアラニン－リジン、バリン－アスパラギン、アスパラギン－バリン、スレオニン－アスパラギン、アスパラギン－スレオニン、セリン－アスパラギン、アスパラギン－セリン、フェニルアラニン－アスパラギン、アスパラギン－フェニルアラニン、ロイシン－アスパラギン、アスパラギン－ロイシン、イソロイシン－アスパラギン、アスパラギン－イソロイシン、グリシン－アスパラギン、アスパラギン－グリシン、グルタミン酸－アスパラギン、アスパラギン－グルタミン酸、シトルリン－アスパラギン、アスパラギン－シトルリン、アラニン－アスパラギン、およびアスパラギン－アラニンからなる群から選択されるペプチドである。

【０２３３】

一実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片に結合する式（ＩＩＡ

）の化合物は、次式であり、

【化３４】



式中、

【化３５】

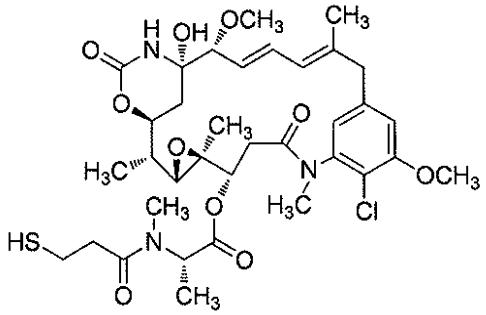


は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。場合によっては、この部分は「化合物７」と呼ばれる。

【０２３４】

いくつかの実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片にコンジュゲートする細胞傷害性薬剤は、ＤＭ１の純粋な、または実質的に純粋なジアステレオマーであり、

【化３６】



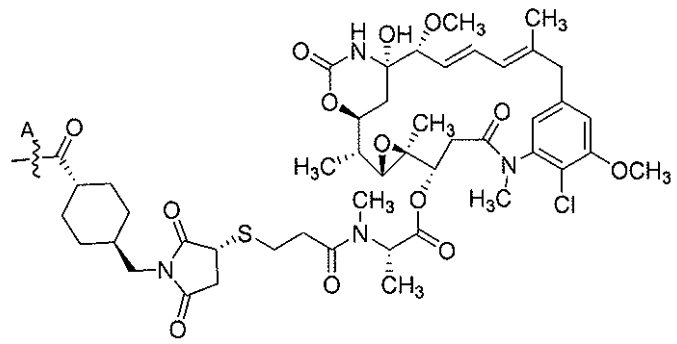
(DM1)

ｙは１～０の整数である。

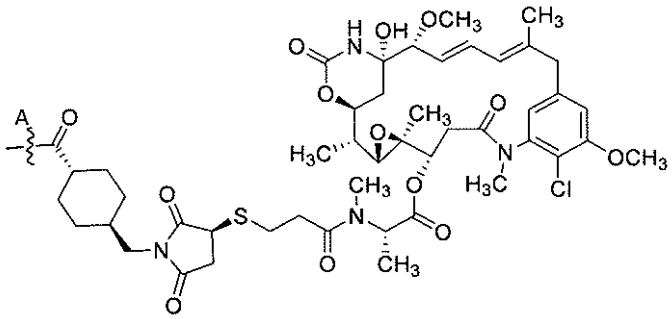
【０２３５】

別の実施形態において、ＡＤＣは「Ａ－［Ｌ－Ｐ］$_{y}$」構造を含み、式中、Ａは抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片であり、［Ｌ－Ｐ］は、

【化３７】



、または



、または

それらの混合物であり、

式中、ｙは１～３０の整数であり、

【化３８】



は、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である。

【０２３６】

他のメイタンシノイド誘導体は、ＷＯ２０１４／１４５０９０、ＷＯ２０１６／１６０６１５、およびＷＯ２０１５／０３１３９６に論じられており、それぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【０２３７】

いくつかの実施形態において、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片にコンジュゲートする細胞傷害性薬剤は、ＭＭＡＥまたはＭＭＡＦである。

【０２３８】

当技術分野において既知の他の細胞傷害性薬剤が本発明の範囲内で企図され、例えば、リシン、Ｃ．ディフィシル毒素、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、ブリオジン、サポリン、ヤマゴボウ毒素（すなわち、フィトラカトキシンおよびフィトラクゲゲニン）、ならびにＳａｐｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．＆Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，２０１３，１３８：４５２－４６９に記載のものなどのタンパク質毒素を含む。

【０２３９】

細胞傷害性薬剤（「ペイロード」）は、ペイロード化合物をタンパク質分子（すなわち抗体）に共有結合する化学リンカーを介して、本発明の抗ＭＵＣ１６抗原結合分子または抗体につながれ得る。特異的リンカーの例示的な実施形態は上述した。より一般的には、本明細書で使用される場合、用語「リンカー」は、結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）を本明細書に記載のペイロード化合物と連結、接続、または結合する任意の二価基または部分を指す。一般に、本明細書に記載の抗体複合体に適した結合剤リンカーは

、抗体の循環半減期を利用するのに十分安定であり、同時に、抗原媒介による複合体の内在化後にそのペイロードを放出することができるものである。リンカーは切断可能または切断不可能であり得る。切断可能なリンカーは、内在化に続く細胞内代謝、例えば加水分解、還元、または酵素反応による切断によって切断されるリンカーである。切断不可能なリンカーは、内在化後の抗体のリソソーム分解を介して結合ペイロードを放出するリンカーである。適切なリンカーとしては、酸不安定リンカー、加水分解不安定リンカー、酵素的に切断可能なリンカー、還元不安定的リンカー、自己犠牲的リンカー、および非切断可能リンカーが挙げられるが、これらに限定されない。適切なリンカーとしては、ペプチド、グルクロニド、スクシンイミド－チオエーテル、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）単位、ヒドラゾン、ｍａｌ－カプロイル単位、ジペプチド単位、バリン－シトルリン単位、およびパラ－アミノベンジル（ＰＡＢ）単位であるかまたはそれらを含むものも挙げられるが、それらに限定されない。場合によっては、リンカーは、リジン残基もしくはシステイン残基を介して（例えば、抗体もしくは断片のジスルフィド基の開裂を介して、または抗体もしくは断片に組み込まれたシステイン残基を介して）、抗体または抗原結合断片に結合することができる。場合によっては、リンカーは、トランスグルタミナーゼ媒介結合を介して誘導されるものを含む、グルタミン残基を介して抗体または断片に結合することができる。

【０２４０】

本発明の文脈において使用できる例示的なリンカーとしては、例えば、ＭＣ（６－マレイミドカプロイル）、ＭＣＣ（マレイミドメチルシクロヘキサン－１－カルボキシレート）、ＭＰ（マレイミドプロパノイル）、ｖａｌ－ｃｉｔ（バリン－シトルリン）、ｖａｌ－ａｌａ（バリン－アラニン）、ａｌａ－ｐｈｅ（アラニン－フェニルアラニン）、ｐｈｅ－ｌｙｓ（フェニルアラニン－リジン）、プロテアーゼ切断可能なリンカーのジペプチド部位、ＰＡＢ（ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル）、ＳＰＰ（Ｎ－スクシンイミジル４－（２－ピリジルチオ）ペンタノエート）、ＳＭＣＣ（Ｎ－スクシンイミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート）、ＳＩＡＢ（Ｎ－スクシンイミジル（４－ヨード－アセチル）アミノベンゾエート）、ならびにそれらの変異体および組み合わせを含むまたはからなるリンカーが挙げられる。本発明の文脈において使用できるリンカーのさらなる例は、例えば、米国特許第７，７５４，６８１号およびＤｕｃｒｙ，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ．Ｃｈｅｍ．，２０１０，２１：５－１３、およびそこに引用される参考文献に開示され、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。場合によっては、リンカーは、Ｊｉｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ＆Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１２，２０：３４６５－３４６９、およびＷｕ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｏｒｇａｎｉｃ＆Ｍｅｄｉｃｉｎａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２０１６，２４：２６９７－２７０６に記載されているような自己犠牲スペーサーであるかまたはそれを含む。

【０２４１】

ペイロードは、抗体または抗原結合分子内の特定のアミノ酸での結合を介して抗ＭＵＣ１６抗体または抗原結合断片に連結され得る。本発明のこの態様の文脈において使用できる例示的なアミノ酸結合としては、例えば、リジン（例えば、米国特許第５，２０８，０２０号、ＵＳ２０１０／０１２９３１４、Ｈｏｌｌａｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．，２００８，１９：３５８－３６１、ＷＯ２００５／０８９８０８、米国特許第５，７１４，５８６号、ＵＳ２０１３／０１０１５４６、およびＵＳ２０１２／０５８５５９２参照）、システイン（例えば、ＵＳ２００７／０２５８９８７、ＷＯ２０１３／０５５９９３、ＷＯ２０１３／０５５９９０、ＷＯ２０１３／０５３８７３、ＷＯ２０１３／０５３８７２、ＷＯ２０１１／１３０５９８、ＵＳ２０１３／０１０１５４６、および米国特許第７，７５０，１１６号参照）、セレノシステイン（例えば、ＷＯ２００８／１２２０３９、およびＨｏｆｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，２００８，１０５：１２４５１－１２４５６参照）、ホルミルグリシン（例えば、Ｃａｒｒｉｃｏ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏ

ｌ．，２００７，３：３２１－３２２；Ａｇａｒｗａｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，２０１３，１１０：４６－５１，およびＲａｂｕｋａ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，２０１２，１０：１０５２－１０６７参照）、非天然アミノ酸（例えば、ＷＯ２０１３／０６８８７４、およびＷＯ２０１２／１６６５５９）、ならびに酸性アミノ酸（例えば、ＷＯ２０１２／０５９８２参照）が挙げられる。リンカーはまた、炭水化物への結合（例えば、ＵＳ２００８／０３０５４９７、およびＲｙａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｆｏｏｄ　＆　Ａｇｒｉｃｕｌｔｕｒｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００１，１３：１２７－１３０を参照されたい）およびジスルフィドリンカーを介して抗原結合タンパク質にコンジュゲートされることもできる。（例えば、ＷＯ２０１３／０８５９２５、ＷＯ２０１０／０１０３２４、ＷＯ２０１１／０１８６１１、およびＳｈａｕｎａｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．，２００６，２：３１２－３１３を参照されたい）。

【０２４２】

薬物対抗体比（ＤＡＲ）は、抗体または抗原結合断片にコンジュゲートした薬物の平均数であり、ＡＤＣの有効性、効力、および薬物動態に重要な影響を及ぼす。様々な実施形態において、ＤＡＲは、抗体１個あたり１、２、３、４、５、６、７、または８個の薬物分子である。いくつかの実施形態において、ＤＡＲは１～４である。特定の実施形態において、ＤＡＲは２～４である。場合によっては、ＤＡＲは２～３である。場合によっては、ＤＡＲは３～４である。いくつかの実施形態において、ＤＡＲは１～１０、１～２０、または１～３０（すなわち、抗体またはその抗原結合断片あたり１～３０の薬物分子）である。

【０２４３】

治療用製剤および投与

本発明は、本発明の抗原結合分子を含む薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、適切な担体、賦形剤、および改善された移動、送達、耐性などをもたらす他の薬剤と共に製剤化される。多くの適切な製剤は、製薬化学者全員に既知の処方集：Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡにおいて認めることができる。これらの製剤には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、ベシクル（ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（商標）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡなど）を含有する脂質（カチオン性またはアニオン性）、ＤＮＡ複合体、無水吸収ペースト、水中油エマルションおよび油中水エマルション、エマルションカーボワックス（種々の分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、ならびにカーボワックスを含有する半固体混合物が含まれる。Ｐｏｗｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．”Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ　ｏｆ　ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ　ｆｏｒ　ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ　ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ”ＰＤＡ（１９９８）Ｊ　Ｐｈａｒｍ　Ｓｃｉ　Ｔｅｃｈｎｏｌ　５２：２３８－３１１も参照されたい。

【０２４４】

患者に投与される抗原結合分子の用量は、患者の年齢および大きさ、標的疾患、病態、投与経路などに応じて変わり得る。好ましい用量は、典型的には体重または体表面積に従って計算される。本発明の二重特異性抗原結合分子が成人患者の治療目的に使用される場合、本発明の二重特異性抗原結合分子を通常約０．０１～約２０ｍｇ／ｋｇ体重の単回投与で、より好ましくは約０．０２～約７、約０．０３～約５、または約０．０５～約３ｍｇ／ｋｇ体重の単回投与で静脈内投与することが有利であり得る。容態の重症度に応じて、治療の頻度および期間を調整することができる。二重特異性抗原結合分子を投与するための有効投与量およびスケジュールは経験的に決定され、例えば、患者の経過を定期的な評価によってモニターし、それに応じて用量を調整することができる。さらに、投与量の種間スケーリングは、当技術分野において周知の方法を用いて実施することができる（例えば、Ｍｏｒｄｅｎｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔ．Ｒｅｓ．８：１３５１）。

【０２４５】
種々の送達系が既知であり、本発明の薬学的組成物を投与するために使用することができ、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルにおける封入、変異ウイルスを発現することのできる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシスである（例えば、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．１９８７）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２を参照されたい）。導入方法には、皮内経路、経皮経路、筋肉内経路、腹腔内経路、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、硬膜外経路および経口経路が含まれるが、これらに限定されない。組成物は、例えば、注入もしくはボーラス注射による、上皮もしくは粘膜皮膚の裏打ち（例えば、口腔粘膜、直腸および腸の粘膜など）を通じての吸収による任意の簡便な経路によって投与され得、他の生物学的に活性のある薬剤と共に投与され得る。投与は全身または局所であり得る。

【０２４６】
本発明の薬学的組成物は、標準的な針および注射器を用いて皮下にまたは静脈内に送達することができる。加えて、皮下送達に関して、ペン送達装置は、本発明の薬学的組成物を送達する上での適用を容易に有する。このようなペン送達装置は、再利用可能または使い捨て可能であり得る。再利用可能なペン送達装置は、概して、薬学的組成物を含有する交換可能なカートリッジを使用する。いったん、カートリッジ内の薬学的組成物が全て投与され、カートリッジが空になると、この空のカートリッジは容易に廃棄することができ、薬学的組成物を含有する新しいカートリッジと容易に交換することができる。次に、ペン送達装置は再利用することができる。使い捨てのペン送達装置において、交換可能なカートリッジはない。むしろ、使い捨てペン送達装置は、この装置内の貯蔵器の中に保持された薬学的組成物が事前に充填されている。いったん、貯蔵器が薬学的組成物に関して空になると、装置全体が廃棄される。

【０２４７】
多数の再利用可能なペン送達装置および自動注射送達装置は、本発明の薬学的組成物の皮下送達における応用を有する。例としては、ＡＵＴＯＰＥＮ（商標）（Ｏｗｅｎ　Ｍｕｍｆｏｒｄ，Ｉｎｃ．，Ｗｏｏｄｓｔｏｃｋ，ＵＫ）、ＤＩＳＥＴＲＯＮＩＣ（商標）ｐｅｎ（Ｄｉｓｅｔｒｏｎｉｃ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｂｅｒｇｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、ＨＵＭＡＬＯＧ　ＭＩＸ　７５／２５（商標）ｐｅｎ、ＨＵＭＡＬＯＧ（商標）ｐｅｎ、ＨＵＭＡＬＩＮ　７０／３０（商標）ｐｅｎ（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ　ａｎｄ　Ｃｏ．，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）、ＮＯＶＯＰＥＮ（商標）Ｉ，ＩＩおよびＩＩＩ（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ，Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＮＯＶＯＰＥＮ　ＪＵＮＩＯＲ（商標）（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ，Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＢＤ（商標）ｐｅｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）、ＯＰＴＩＰＥＮ（商標）、ＯＰＴＩＰＥＮ　ＰＲＯ（商標）、ＯＰＴＩＰＥＮ　ＳＴＡＲＬＥＴ（商標）、およびＯＰＴＩＣＬＩＫ（商標）（ｓａｎｏｆｉ－ａｖｅｎｔｉｓ，Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）が挙げられるが、ほんの数種類のみ挙げており、これらに限定されない。本発明の薬学的組成物の皮下送達での用途を有する使い捨てペン送達装置の例としては、ＳＯＬＯＳＴＡＲ（商標）ｐｅｎ（Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）、ＦＬＥＸＰＥＮ（商標）（Ｎｏｖｏ　Ｎｏｒｄｉｓｋ）、およびＫＷＩＫＰＥＮ（商標）（Ｅｌｉ　Ｌｉｌｌｙ）、ＳＵＲＥＣＬＩＣＫ（商標）自動注射器（Ａｍｇｅｎ，Ｔｈｏｕｓａｎｄ　Ｏａｋｓ，ＣＡ）、ＰＥＮＬＥＴ（商標）（Ｈａｓｅｌｍｅｉｅｒ，Ｓｔｕｔｔｇａｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、ＥＰＩＰＥＮ（Ｄｅｙ，Ｌ．Ｐ．）およびＨＵＭＩＲＡ（商標）ｐｅｎ（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｓ，Ａｂｂｏｔｔ　Ｐａｒｋ　ＩＬ）が挙げられるが、ほんの数種類のみ挙げており、これらに限定されない。

【０２４８】
特定の状況において、薬学的組成物は徐放系で送達することができる。一実施形態において、ポンプを使用することができる（Ｌａｎｇｅｒ，ｓｕｐｒａ；Ｓｅｆｔｏｎ，１９８７，ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１を参照されたい

。）他の実施形態において、ポリマー材料を使用することができる。Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，Ｌａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｗｉｓｅ（ｅｄｓ．），１９７４，ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａを参照されたい。さらに別の実施形態において、徐放系を組成物の標的の近傍に配置することができ、それによって全身用量のほんの一部のみが必要となる。（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，１９８４，ｉｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，ｓｕｐｒａ，ｖｏｌ．２，ｐｐ．１１５－１３８を参照されたい）。他の徐放系は、Ｌａｎｇｅｒ，１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ２４９：１５２７－１５３３による総説で論じられている。

【０２４９】

注射可能な調製物には、静脈内注射、皮下注射、皮内注射および筋肉内注射、点滴注入などのための剤形が含まれ得る。これらの注射可能な調製物は、公的に既知の方法によって調製され得る。例えば、注射可能な調製物は、例えば、注射用に従来どおり使用される滅菌水性媒体または油性媒体中に上述の抗体またはその塩を溶解、懸濁または乳化させることによって調製され得る。注射用水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコース含有等張液、および他の補助剤などがあり、これらは、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤［例えば、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（水素化ヒマシ油のポリオキシエチレン（５０モル）付加物）］などの適切な可溶化剤と組み合わせて使用してよい。油性媒体として、例えば、ゴマ油、ダイズ油などが使用され、ベンジルベンゾエート、ベンジルアルコールなどの可溶化剤と組み合わせて使用してよい。このように調製された注射は、好ましくは適切なアンプルに充填される。

【０２５０】

有利なことに、先に説明した経口または非経口での使用のための薬学的組成物は、有効成分の用量に適合するのに適した単位用量の剤形へと調製される。このような単位用量の剤形には、例えば、錠剤、ピル、カプセル、注射（アンプル）、坐薬などが含まれる。前述の含有される抗体の量は概して、単位用量の剤形あたり約５～約５００ｍｇであり、特に注射の形態では、前述の抗体は、約５～約１００ｍｇで、他の剤形については約１０～約２５０ｍｇで含有されることが好ましい。

【０２５１】

抗原結合分子の治療的使用

本発明は、抗ＭＵＣ１６抗体もしくはその抗原結合断片、またはＣＤ３およびＭＵＣ１６に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子を含む治療用組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法を含む。治療用組成物は、本明細書に開示される抗体または二重特異性抗原結合分子のいずれかと薬学的に許容される担体または希釈剤とを含み得る。本明細書で使用される場合、「それを必要とする対象」という表現は、癌の１つ以上の症状または徴候を示すヒトまたは非ヒト動物（例えば、腫瘍を発現する対象または本明細書で後述される癌のいずれかを患う対象）、あるいは、そうでなければＭＵＣ１６活性の阻害もしくは減少またはＭＵＣ１６＋細胞（例えば、卵巣癌細胞）の枯渇から利益を得る者を意味する。

【０２５２】

本発明の抗体および二重特異性抗原結合分子（およびそれを含む治療用組成物）は、とりわけ、免疫応答の刺激、活性化および／または標的化が有益である任意の疾患または障害の治療に有用である。特に、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体または抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子は、ＭＵＣ１６発現またはＭＵＣ１６＋細胞の活性もしくは増殖に関連するかまたはそれによって媒介される任意の疾患または障害の治療、予防および／または改善のために使用され得る。本発明の治療方法が達成される作用機序は、エフェクター細胞の存在下で、例えばＣＤＣ、アポトーシス、ＡＤＣＣ、食作用、またはこれらメカニズムの２つ以上の組み合わせによるＭＵＣ１６を発現する細胞の死滅を含む。本発明の二重特異性抗原結合分子を用いて阻害または死滅させることができるＭＵＣ１６を発現

する細胞には、例えば卵巣癌細胞が含まれる。

【０２５３】

本発明の抗原結合分子を使用して、例えば、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管癌－腫瘤形成型、子宮頸部腺癌、および胃腸腺癌などの癌を含む、ＭＵＣ１６発現と関連する疾患または障害を治療することができる。本発明の特定の実施形態によると、抗ＭＵＣ１６抗体または抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体は、卵巣癌に罹患している患者を治療するのに有用である。本発明の他の関連実施形態によると、本明細書に開示の抗ＭＵＣ１６抗体または抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を、卵巣癌に罹患している患者に投与することを含む方法が提供される。腫瘍スキャニングなどの当技術分野において公知の分析的／診断的方法を使用して、患者が卵巣腫瘍を抱えているかどうかを確認することができる。

【０２５４】

本発明はまた、対象における残存癌を治療するための方法も含む。本明細書で使用される場合、用語「残存癌」は、抗癌療法による治療後の対象における１つ以上の癌性細胞の存在または持続を意味する。

【０２５５】

特定の態様によると、本発明は、対象が前立腺癌であると判定された後、本明細書の他所に記載の抗ＭＵＣ１６または二重特異性抗原結合分子のうちの１つ以上を対象に投与することを含む、ＭＵＣ１６発現に関連する疾患または障害（例えば卵巣癌）の治療方法を提供する。例えば、本発明は、対象がホルモン療法（例えば、抗アンドロゲン療法）を受けた１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、または４週間、２ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、８ヶ月、１年、またはそれ以上後に、抗ＭＵＣ１６抗体または抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を患者に投与することを含む卵巣癌の治療方法を含む。

【０２５６】

併用療法と製剤

本発明は、本明細書に記載の例示的な抗体および二重特異性抗原結合分子のいずれかを含む薬学的組成物を１つ以上の追加の治療薬と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。本発明の抗原結合分子と組み合わせてまたは併用投与することができる例示的な追加の治療薬には、例えば、ＥＧＦＲアンタゴニスト（例えば、抗ＥＧＦＲ抗体［例えば、セツキシマブまたはパニツムマブ］またはＥＧＦＲの小分子阻害剤［例えば、ゲフィチニブまたはエルロチニブ］）、Ｈｅｒ２／ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、またはＥｒｂＢ４などの他のＥＧＦＲファミリーメンバーのアンタゴニスト（例えば抗ＥｒｂＢ２、抗ＥｒｂＢ３、もしくは抗ＥｒｂＢ４抗体、またはＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、またはＥｒｂＢ４活性の小分子阻害剤）、ＥＧＦＲｖＩＩＩのアンタゴニスト（例えば、ＥＧＦＲｖＩＩＩに特異的に結合する抗体）、ｃＭＥＴアンタゴニスト（例えば、抗ｃＭＥＴ抗体）、ＩＧＦ１Ｒアンタゴニスト（例えば、抗ＩＧＦ１Ｒ抗体）、Ｂ－ｒａｆ阻害剤（例えば、ベムラフェニブ、ソラフェニブ、ＧＤＣ－０８７９、ＰＬＸ－４７２０）、ＰＤＧＦＲ－α阻害剤（例えば、抗ＰＤＧＦＲ－α抗体）、ＰＤＧＦＲ－β阻害剤（例えば、抗ＰＤＧＦＲ－β抗体）、ＶＥＧＦアンタゴニスト（例えばＶＥＧＦトラップ、例えばＵＳ７，０８７，４１１（本明細書では「ＶＥＧＦ阻害融合タンパク質」とも呼ばれる）を参照されたい）、抗ＶＥＧＦ抗体（例えば、ベバシズマブ）、ＶＥＧＦ受容体の小分子キナーゼ阻害剤（例えば、スニチニブ、ソラフェニブ、またはパゾパニブ））、ＤＬＬ４アンタゴニスト（例えば、ＵＳ２００９／０１４２３５４に開示されている抗ＤＬＬ４抗体、例えばＲＥＧＮ４２１）、Ａｎｇ２アンタゴニスト（例えば、ＵＳ２０１１／００２７２８６に開示されている抗Ａｎｇ２抗体、例えばＨ１Ｈ６８５Ｐ）、ＦＯＬＨ１（ＰＳＭＡ）アンタゴニスト、ＰＲＬＲアンタゴニスト（例えば抗ＰＲＬＲ抗体）、ＳＴＥＡＰ１またはＳＴＥＡＰ２アンタゴニスト（例えば抗ＳＴＥＡＰ１抗体または抗ＳＴＥＡＰ２抗体）、ＴＭＰＲＳＳ２アンタゴニスト（例えば、抗ＴＭＰＲＳＳ２抗体）、ＭＳＬＮアンタゴニスト（例えば、抗ＭＳＬＮ抗体）、ＣＡ９アンタゴニスト（例えば、抗ＣＡ９抗体）、ウロプラキ

ンアンタゴニスト（例えば、抗ウロプラキン抗体）など、が含まれる。本発明の抗原結合分子と組み合わせて有益に投与され得る他の薬剤は、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８などのサイトカイン、またはそれらの受容体それぞれに結合する、低分子サイトカイン阻害剤および抗体を含む、サイトカイン阻害剤を含む。本発明の薬学的組成物（例えば、本明細書に開示の抗ＣＤ３／抗ＭＵＣ１６二重特異性抗原結合分子を含む薬学的組成物）はまた、「ＩＣＥ」：イホスファミド（例えば、Ｉｆｅｘ（登録商標））、カルボプラチン（例えば、Ｐａｒａｐｌａｔｉｎ（登録商標））、エトポシド（例えば、Ｅｔｏｐｏｐｈｏｓ（登録商標）、Ｔｏｐｏｓａｒ（登録商標）、ＶｅＰｅｓｉｄ（登録商標）、ＶＰ－１６）、「ＤＨＡＰ」：デキサメタゾン（例えば、Ｄｅｃａｄｒｏｎ（登録商標））、シタラビン（例えば、Ｃｙｔｏｓａｒ－Ｕ（登録商標）、シトシンアラビノシド、ａｒａ－Ｃ）、シスプラチン（例えば、Ｐｌａｔｉｎｏｌ（登録商標）－ＡＱ）、および「ＥＳＨＡＰ」：エトポシド（例えば、Ｅｔｏｐｏｆｏｓ（登録商標）、Ｔｏｐｏｓａｒ（登録商標）、ＶｅＰｅｓｉｄ（登録商標）、ＶＰ－１６）、メチルプレドニゾロン（例えば、Ｍｅｄｒｏｌ（登録商標））、高用量シタラビン、シスプラチン（例えば、Ｐｌａｔｉｎｏｌ（登録商標）－ＡＱ）から選択される１つ以上の治療用組み合わせを含む治療計画の一部として投与され得る。

【０２５７】

本発明はまた、本明細書に記載の抗原結合分子のいずれか、およびＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＤＬＬ４、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ｃＭｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、Ｂ－ｒａｆ、ＰＤＧＦＲ－α、ＰＤＧＦＲ－β、ＦＯＬＨ１（ＰＳＭＡ）、ＰＲＬＲ、ＳＴＥＡＰ１、ＳＴＥＡＰ２、ＴＭＰＲＳＳ２、ＭＳＬＮ、ＣＡ９、ウロプラキンのうちの１つ以上の阻害剤、または前述のサイトカインのいずれかを含む治療組み合わせを含み、その阻害剤は、アプタマー、アンチセンス分子、リボザイム、ｓｉＲＮＡ、ペプチボディ、ナノボディもしくは抗体断片（例えば、Ｆａｂ断片、Ｆ（ａｂ'）$_2$断片、Ｆｄ断片、Ｆｖ断片、ｓｃＦｖ、ｄＡｂ断片、またはダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、および最小認識ユニット）である。本発明の抗原結合分子は、抗ウイルス薬、抗生物質、鎮痛薬、コルチコステロイドおよび／またはＮＳＡＩＤと組み合わせて投与および／または同時製剤することもできる。本発明の抗原結合分子はまた、放射線治療および／または従来の化学療法も含む治療計画の一部として投与してもよい。

【０２５８】

追加の治療活性成分は（複数可）、本発明の抗原結合分子の投与の直前、同時に、または直後に投与してもよい。（本開示の目的のために、このような投与計画は、追加の治療活性成分と「組み合わせて」抗原結合分子を投与することとみなされる。

【０２５９】

本発明には、本発明の抗原結合分子が、本明細書の他所に記載の追加の治療活性成分（複数可）の１つ以上と同時製剤された薬学的組成物が含まれる。

【０２６０】

投与様式

本発明の特定の実施形態によると、複数用量の抗原結合分子（例えば、ＭＵＣ１６およびＣＤ３に特異的に結合する抗ＭＵＣ１６抗体または二重特異性抗原結合分子）を所定の期間にわたって対象に投与することができる。本発明のこの態様による方法は、本発明の抗原結合分子の複数回用量を対象へ連続的に投与することを含む。本明細書で使用する場合、「連続的に投与すること」は、抗原結合分子の各用量が、異なる時点、例えば、所定の間隔（例えば、数時間、数日間、数週間または数か月間）によって分けられた異なる日に対象へ投与されることを意味する。本発明には、抗原結合分子の単回の初回用量と、それに続く抗原結合分子の１回以上の２次用量、次いで場合により抗原結合分子の１回以上の３次用量を患者へ連続的に投与することを含む方法が含まれる。

【０２６１】

「１次用量」、「２次用量」、および「３次用量」という用語は、本発明の抗原結合分子の投与の時系列を指す。したがって、「１次用量」とは、治療様式の開始時に投与される用量（「ベースライン用量」とも呼ばれる）であり、「２次用量」とは、１次用量後に投与される用量であり、「３次用量」とは、２次用量後に投与される用量である。１次用量、２次用量、および３次用量は全て、同じ量の抗原結合分子を含有し得るが、概して、投与頻度に関して互いに異なり得る。しかし、特定の実施形態において、１次用量、２次用量および／または３次用量に含有される抗原結合分子の量は、治療経過の間、互いに異なる（例えば、適宜上下に調整される）。ある特定の実施形態において、２回以上（例えば、２回、３回、４回、または５回）の用量が、「負荷用量」として治療様式の開始時に投与された後、その後の用量が、それより低い頻度ベースで投与される（例えば、維持用量」）。

【０２６２】

本発明のある例示的な実施形態において、各２次用量および／または３次用量は、直前の用量の１～２６（例えば、１、１と１／２、２、２と１／２、３、３と１／２、４、４と１／２、５、５と１／２、６、６と１／２、７、７と１／２、８、８と１／２、９、９と１／２、１０、１０と１／２、１１、１１と１／２、１２、１２と１／２、１３、１３と１／２、１４、１４と１／２、１５、１５と１／２、１６、１６と１／２、１７、１７と１／２、１８、１８と１／２、１９、１９と１／２、２０、２０と１／２、２１、２１と１／２、２２、２２と１／２、２３、２３と１／２、２４、２４と１／２、２５、２５と１／２、２６、２６と１／２、またはそれ以上）週間後に投与される。「直前の用量」という句は、本明細書で使用する場合、一連の複数回投与において、抗原結合分子の用量を意味し、これは、介入用量のない直後の用量の投与の前に患者へ投与される。

【０２６３】

本発明のこの態様による方法は、抗原結合分子（例えば、ＭＵＣ１６およびＣＤ３に特異的に結合する抗ＭＵＣ１６抗体または二重特異性抗原結合分子）の２次用量および／または３次用量の任意の回数を患者へ投与することを含んでよい。例えば、ある特定の実施形態において、単回の２次用量のみが患者へ投与される。他の実施形態において、２回以上（例えば、２，３、４、５、６、７、８回またはそれ以上）の２次用量が患者へ投与される。同様に、ある特定の実施形態において、単回の３次用量のみが患者へ投与される。他の実施形態において、２回以上（例えば、２，３、４、５、６、７、８またはそれより多数）の３次用量が患者へ投与される。

【０２６４】

複数の２次用量を含む実施形態において、各２次用量は他の２次用量と同じ頻度で投与されてもよい。例えば、各２次用量は、直前の用量の１～２週間後に患者に投与されてもよい。同様に、複数の３次用量を含む実施形態において、各３次用量は他の３次用量と同じ頻度で投与されてもよい。例えば、各３次用量は、直前の用量の２～４週間後に患者に投与されてもよい。あるいは、２次用量および／または３次用量が患者へ投与される頻度は、治療計画の経過にわたって変動し得る。投与頻度はまた、臨床検査後の個々の患者の必要性に応じて、医師によって治療過程の間に調整され得る。

【０２６５】

抗体の診断上の使用

本発明の抗ＭＵＣ１６抗体を使用して、例えば、診断目的のための生物学的サンプルなどの、ＭＵＣ１６またはサンプル中のＭＵＣ１６発現細胞を検出および／または測定してもよい。例えば、抗ＭＵＣ１６抗体、またはその断片を使用して、ＭＵＣ１６の異常な発現（例えば、過剰発現、過少発現、発現欠如など）を特徴とする病態または疾患を診断してよい。ＭＵＣ１６についての例示的な診断アッセイは、例えば、患者から得られたサンプルを本発明の抗ＭＵＣ１６抗体と接触させることを含んでよく、抗ＭＵＣ１６抗体は検出可能な標識またはレポーター分子で標識されている。あるいは、標識されていない抗ＭＵＣ１６抗体は、それ自体が検出可能に標識された２次抗体との組み合わせで診断用途に使用することができる。検出可能な標識またはレポーター分子は、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ

、^{35}Ｓもしくは^{125}Ｉなどの放射性同位体、フルオレセインイソチオシアナートもしくはローダミンなどの蛍光部分もしくは化学発光部分、またはアルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、もしくはルシフェラーゼなどの酵素であり得る。本発明の抗ＭＵＣ１６抗体の別の例示的な診断用途は、^{89}Ｚｒ－デスフェリオキサミン標識などの、対象において腫瘍細胞の非侵襲的識別および追跡の目的のための^{89}Ｚｒ－標識抗体（例えば、ポジトロン放出断層撮影（ＰＥＴ）イメージング）を含む。（例えば、Ｔａｖａｒｅ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１６ Ｊａｎ １；７６（１）：７３－８２、およびＡｚａｄ，ＢＢ．ｅｔ ａｌ．Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ．２０１６ Ｍａｒ １５；７（１１）：１２３４４－５８）サンプル中のＭＵＣ１６を検出または測定するために使用することのできる特定の例示的アッセイには、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、および蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）が含まれる。

【０２６６】

本発明によるＭＵＣ１６診断アッセイにおいて使用することのできるサンプルには、正常条件または病理学的条件下で、検出可能な量のＭＵＣ１６タンパク質またはその断片を含有する、患者から得ることのできる任意の組織または体液サンプルが含まれる。一般に、健常な患者（例えば、異常なＭＵＣ１６レベルまたは活性と関連した疾患または病態に罹患していない患者）から得られた特定のサンプル中のＭＵＣ１６のレベルを測定し、ＭＵＣ１６のベースラインレベルまたは標準レベルをまず確立する。次いで、このＭＵＣ１６のベースラインレベルを、ＭＵＣ１６に関連する疾患（例えば、ＭＵＣ１６発現細胞を含む腫瘍）または病態を有することが疑われる個体から得られたサンプルにおいて測定されたＭＵＣ１６のレベルと比較することができる。

組織または体液サンプルの例としては、血漿、血清、腹水、卵巣、子宮、子宮頸管、肝臓、膀胱、膵臓、胃、小腸もしくは大腸、胆嚢、乳房、肺、腎臓、唾液、および涙腺、またはその任意の類上皮悪性腫瘍が挙げられるが、これに限定されるものではない。組織または体液サンプルのさらなる例には、子宮頸部の漿液性乳癌、子宮内膜の腺癌、膀胱の明細胞腺癌、精嚢癌、胃癌、結腸直腸腺癌および類上皮中皮腫が挙げられるが、これに限定されるものではない。検出可能な量のＭＵＣ１６タンパク質またはその断片を含有する任意の体液または組織サンプルが、本明細書に記載の検出方法に供され得ることが想定される。記載された方法を使用して、悪性疾患の発症および進行をモニターし、あるいは正常状態と疾患状態とを区別してもよい。したがって、記載された方法を使用して、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管細胞癌腫瘤形成型、子宮頸部の腺癌、および胃腸管の腺癌を含む癌を検出またはモニターしてもよい。

【実施例】

【０２６７】

以下の実施例は、本発明の方法および組成物をどのように作製および使用するかに関する完全な開示および説明を当業者に提供するために提示されており、本発明者らが本発明とみなすことの範囲を制限するよう企図するものではない。使用される数値（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力はしたが、いくつかの実験上の誤差および偏差が考慮されるべきである。別段の記載がない限り、部分は重量部分であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧またはそれに近い圧力である。

【０２６８】

実施例１：抗ＭＵＣ１６抗体の産生

抗ＭＵＣ１６抗体は、遺伝子改変マウスをヒトＭＵＣ１６抗原で免疫することによって、またはヒト免疫グロブリン重鎖およびカッパ軽鎖可変領域をコードするＤＮＡを含む遺伝子操作マウスをヒトＭＵＣ１６抗原で免疫することによって得た。

【０２６９】

遺伝子改変マウスをｈＭＵＣ１６．ｎｕｂ（ムチン１６（配列番号１９０２）の最後の５つのＳＥＡドメイン包含する切断型形態）で免疫し、またはＯＶＣＡＲ－３細胞などの

ｈＭＵＣ１６発現細胞株で免疫した。配列番号１９０２は、配列番号１８９９の残基１３８１０～１４４５１、ならびにＣ末端タグを含む。免疫後、各マウスから脾細胞を採取して、（１）マウス骨髄腫細胞と融合してそれらの生存率を維持し、ハイブリドーマ細胞を形成してＭＵＣ１６特異性についてスクリーニングし、または（２）反応性抗体（抗原陽性Ｂ細胞）に結合して同定する選別試薬としてヒトＭＵＣ１６断片を用いて、Ｂ細胞を選別した（ＵＳ２００７／０２８０９４５Ａ１に記載のとおり）。

【０２７０】

ヒト可変領域およびマウス定常領域を有するＭＵＣ１６に対するキメラ抗体が最初に単離された。抗体を、親和性、選択性などを含む望ましい特徴について特徴付けし選択する。必要ならば、マウス定常領域を所望のヒト定常領域、例えば野生型または改変ＩｇＧ１またはＩｇＧ４定常領域と置き換えて、完全ヒト型抗ＭＵＣ１６抗体を産生した。選択した定常領域は特異的用途に応じて変化し得るが、高親和性抗原結合特徴および標的特異性特徴は可変領域に存在する。Ｈ１Ｈ８７５５ＰおよびＨ１Ｍ７１２９Ｎなどの抗体名表記は、完全ヒト抗体「Ｈ１Ｈ」またはキメラヒト可変領域／マウス定常領域抗体「Ｈ１Ｍ」を表す。ハイブリドーマ法によって同定された抗体は、「Ｎ」または「Ｎ２」で終わる抗体ＩＤ番号で示される。Ｂ細胞選別法によって同定された抗体は、「Ｐ」または「Ｐ２」で終わる抗体ＩＤ番号で示される。

【０２７１】

本実施例の方法に従って産生された例示的な抗ＭＵＣ１６抗体の特定の生物学的特性を、以下に示す実施例において詳細に説明する。

【０２７２】

抗ＭＵＣ１６抗体の重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列および核酸配列

表１は、選択された本発明の抗ＭＵＣ１６抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域ならびにＣＤＲのアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表２に示す。

【表１】

表１：アミノ酸配列識別子

	配列番号：							
抗体名	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H8755P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H8767P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H8770P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H8783P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H8790P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H8794P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H8794P2	82	84	86	88	858	860	862	864
H1H8799P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H8799P2	98	100	102	104	170	172	174	176
H1H8804P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H8808P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H8810P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H8813P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1M7129N	178	180	182	184	186	188	190	192
H1M7137N	194	196	198	200	394	396	398	400
H1M9519N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M9521N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M9528N	234	236	238	240	242	244	246	248
H2M7128N	250	252	254	256	1936	1938	1940	1942
H1M7130N	1944	1946	1948	1950	1952	1954	1956	1958
H2M7131N	258	260	262	264	266	268	270	272
H2M7133N	274	276	278	280	1936	1938	1940	1942
H2M7134N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M7135N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M7138N	314	316	318	320	322	324	326	328
H2M9538N	330	332	334	336	338	340	342	344
H3M9524N	346	348	350	352	354	356	358	360
H3M9525N	362	364	366	368	370	372	374	376
H3M9529N	378	380	382	384	386	388	390	392

【表２】

表２：核酸配列識別子

	配列番号：							
抗体名	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H8755P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H8767P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H8770P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H8783P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H8790P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H8794P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H8794P2	81	83	85	87	857	859	861	863
H1H8799P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H8799P2	97	99	101	103	169	171	173	175
H1H8804P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H8808P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H8810P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H8813P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1M7129N	177	179	181	183	185	187	189	191
H1M7137N	193	195	197	199	393	395	397	399
H1M9519N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M9521N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M9528N	233	235	237	239	241	243	245	247
H2M7128N	249	251	253	255	1935	1937	1939	1941
H1M7130N	1943	1945	1947	1949	1951	1953	1955	1957
H2M7131N	257	259	261	263	265	267	269	271
H2M7133N	273	275	277	279	1935	1937	1939	1941
H2M7134N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M7135N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M7138N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M9538N	329	331	333	335	337	339	341	343
H3M9524N	345	347	349	351	353	355	357	359
H3M9525N	361	363	365	367	369	371	373	375
H3M9529N	377	379	381	383	385	387	389	391

【０２７３】

実施例２：抗ＭＵＣ１６抗体はＯＶＣＡＲ－３細胞株上で内因的に発現されたｈＭＵＣ１６に特異的に結合する

ヒト卵巣癌細胞株（ＯＶＣＡＲ－３）上に内因的に発現するＭＵＣ１６に特異的に結合する抗ＭＵＣ１６抗体の能力を、電気化学発光ベースの検出アッセイ（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ　（ＭＳＤ），Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）によって評価した。

簡潔に説明すると、ＯＶＣＡＲ－３、および検出可能なｈＭＵＣ１６発現を有さない対照卵巣腺癌細胞株、ＳＫ－ＯＶ－３を、Ca^{2+}／Mg^{2+}を補充した１×ＰＢＳで（Ｉｒｖｉｎｅ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｓａｎｔａ　Ａｎａ，ＣＡ）洗浄した後、無酵素細胞解離緩衝液（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，Ｂｉｌｌｅｒｉｃａ，ＭＡ）中、３７℃で１０分間インキュベートした。次いで、剥離した細胞を、Ca^{2+}／Mg^{2+}を補充した１×ＰＢＳ中で１回洗浄し、計数した（（Ｃｅｌｌｏｍｅｔｅｒ　Ａｕｔｏ　Ｔ４細胞計数器，Ｎｅ

ｘｃｅｌｏｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｌａｗｒｅｎｃｅ，ＭＡ）。約１．０x１０^{4}個の細胞をＭＵＬＴＩ－ＡＲＲＡＹ９６穴カーボン電極プレート（ＭＳＤ）に播種し、３７℃で１時間インキュベートした。非特異的結合部位を、ＰＢＳ中の２％ＢＳＡ（ｗ／ｖ）により室温で１時間遮断した。次に、抗ＭＵＣ１６または対照抗体（０．８５ｐＭ～５０ｎＭ）および無抗体緩衝液対照の段階希釈物をプレート結合細胞に添加し、室温（ＲＴ）で１時間インキュベートした。次に、ＡｑｕａＭａｘ２０００プレート洗浄機（ＭＤＳ Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）を用いて、プレートを洗浄し、未結合抗体を除去した。プレート結合抗体を、ＳＵＬＦＯ－ＴＡＧ（商標）結合型抗ヒトκ軽鎖抗体（Ｒｅｇｅｎｅｒｏｎ）またはＳＵＬＦＯ－ＴＡＧ（商標）結合型抗マウスＩｇＧ抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）を用いて室温で１時間検出した。洗浄後、プレートを製造元のプロトコルに従ってＲｅａｄ Ｂｕｆｆｅｒ（ＭＳＤ）で発色させ、ＳＥＣＴＯＲ Ｉｍａｇｅｒ ６０００（ＭＳＤ）装置で発光シグナルを記録した。

【０２７４】

２つの細胞株について、相対発光量（ＲＬＵ）で測定した発光強度を、各抗体の結合強度を示すために記録した。抗ＭＵＣ１６抗体結合ＯＶＣＡＲ－３対ＳＫ－ＯＶ－３の１．９ｎＭまたは１６．７ｎＭで検出されたシグナルの比を、特異性および結合の効力の指標として報告した（表３）。

【表３】

表３：内因的に発現するｈＭＵＣ１６　ＯＶＣＡＲ－３細胞株対ｈＭＵＣ１６陰性ＳＫ－ＯＶ－３細胞株に対する抗Ｍｕｃ１６抗体の細胞結合比

	比率：抗MUC１６結合ＯＶＣＡＲ－３／ＳＫ－ＯＶ－３	
抗体ＩＤ	［Ａｂ］１．９ｎＭ	［Ａｂ］１６．７ｎＭ
ハイブリドーマ抗MUC１６抗体（Ｈ１Ｍ、Ｈ２Ｍ、Ｈ３Ｍ）		
Ｈ２Ｍ７１２８Ｎ	５９	３１
Ｈ１Ｍ７１２９Ｎ	６８	１９
Ｈ２Ｍ７１３１Ｎ	８６	３７
Ｈ２Ｍ７１３３Ｎ	６９	３３
Ｈ２Ｍ７１３４Ｎ	６８	２９
Ｈ２Ｍ７１３５Ｎ	３０	５
Ｈ１Ｍ７１３７Ｎ	７７	２９
Ｈ２Ｍ７１３８Ｎ	８２	５０
Ｈ３Ｍ７１３２Ｎ	８９	３８
Ｈ１Ｍ９５１９Ｎ	１０９	７８
Ｈ１Ｍ９５２１Ｎ	１３２	１０７
Ｈ３Ｍ９５２４Ｎ	８１	５７
Ｈ３Ｍ９５２５Ｎ	１３７	５１
Ｈ１Ｍ９５２８Ｎ	１５３	１２０
Ｈ３Ｍ９５２９Ｎ	１４３	９９
Ｈ２Ｍ９５３８Ｎ	８９	２６
ヒトＦｃ抗MUC１６抗体（Ｈ１Ｈ）		
Ｈ１Ｈ８７５５Ｐ	１３	５
Ｈ１Ｈ８７６７Ｐ	４	ＮＳ
Ｈ１Ｈ８７７０Ｐ	９	３
Ｈ１Ｈ８７８３Ｐ	１１	４
Ｈ１Ｈ８７９０Ｐ	８	３
Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ	８	３
Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２	５	ＮＳ
Ｈ１Ｈ８７９９Ｐ	１０	４
Ｈ１Ｈ８７９９Ｐ２	１０	４
Ｈ１Ｈ８８０４Ｐ	８	３
Ｈ１Ｈ８８０８Ｐ	４	ＮＳ
Ｈ１Ｈ８８１０Ｐ	８	３
Ｈ１Ｈ８８１３Ｐ	１１	５
Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ	４１	３０
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ	３０	２８
Ｈ１Ｈ９５２４Ｎ	２０	４８
Ｈ１Ｈ９５２５Ｎ	４	２１
Ｈ１Ｈ９５２８Ｎ	４１	１８
Ｈ１Ｈ９５２９Ｎ	１０９	７４
Ｈ１Ｈ９５３８Ｎ	１２	１３
対照		
ｍＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体	ＮＳ	ＮＳ
ｍＩｇＧ２ａアイソタイプ対照抗体	ＮＳ	ＮＳ
ｈｉｇＧ１アイソタイプ対照抗体	ＮＳ	ＮＳ

ＮＳ＝非特異的－１．９ｎＭまたは１６．７ｎＭの＜２．５倍の比

アイソタイプ：Ｈ１Ｈ：ｈＩｇＧ１、Ｈ１Ｍ：ｍＩｇＧ１、Ｈ２Ｍ：ｍＩｇＧ２、Ｈ３Ｍ：ｍＩｇＧ３

注：マウスＦｃとヒトＦｃで発現させた同じ抗体の結合強度比の違いは、異なるＳＵＬＦＯ－ＴＡＧ二次検出試薬の使用によるものである。

【０２７５】

表３の結果が示すように、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体の大部分は、高い（１６．７ｎＭ）および低い（１．９ｎＭ）抗体濃度の両方でＯＶＣＡＲ－３に特異的に結合した。ｍＩ

ｇＧ１、ｍＩｇＧ２ａ、およびｈＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体は、ＯＶＣＡＲ－３またはＳＫ－ＯＶ－３細胞株のいずれに対しても特異的結合を示さなかった。さらに、表面プラズモン共鳴結合アッセイ（以下の実施例４を参照）で可溶性単量体ヒトＭＵＣ１６タンパク質への結合を示さなかったいくつかの抗体が、この細胞ベースの結合アッセイで、ＯＶＣＡＲ－３細胞上で発現される内在性ヒトＭＵＣ１６への特異的結合を示したので、方法は不安定であるという証拠が存在する。

【０２７６】

実施例３：卵巣細胞特異的（ＭＵＣ１６）およびＣＤ３に結合する二重特異性抗体の産生

本発明は、ＣＤ３およびＭＵＣ１６に結合する二重特異性抗原結合分子を提供し、このような二重特異性抗原結合分子はまた、本明細書において「抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３または抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性分子」とも呼ばれる。抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性分子の抗ＭＵＣ１６部分は、ＭＵＣ１６（ＣＡ－１２５としても知られる）を発現する腫瘍細胞を標的化するのに有用であり、二重特異性分子の抗ＣＤ３部分は、Ｔ細胞を活性化するのに有用である。腫瘍細胞上のＭＵＣ１６およびＴ細胞上のＣＤ３の同時結合は、活性化Ｔ細胞によって標的腫瘍細胞を直接死滅させる（細胞溶解）を促進する。

【０２７７】

抗ＭＵＣ１６特異的結合ドメインおよび抗ＣＤ３特異的結合ドメインを含む二重特異性抗体を、標準的な方法を用いて構築し、抗ＭＵＣ１６特異的結合ドメインおよび抗ＣＤ３抗原結合ドメインがそれぞれ共通のＬＣＶＲと対をなす異なる別個のＨＣＶＲを含む。例示された二重特異性抗体では、抗ＣＤ３抗体由来の重鎖、抗ＭＵＣ１６抗体由来の重鎖、および抗ＭＵＣ１６抗体由来の共通軽鎖を利用して分子を構築した。他の例では、二重特異性抗体は、抗ＣＤ３抗体由来の重鎖、抗ＭＵＣ１６抗体由来の重鎖、および抗ＣＤ３抗体由来の軽鎖、または乱雑であって、あるいは様々な重鎖アームと効果的に対をなすことが知られている抗体軽鎖を利用して構築され得る。

以下の実施例に記載の二重特異性抗体は、ヒト可溶性ヘテロ二量体ｈＣＤ３３ε/δタンパク質（本明細書の実施例１５に記載）およびヒトＭＵＣ１６（上記実施例１～２参照）への様々な結合親和性を有する抗ＣＤ３結合アームからなる。２０１４年８月２８日に公開された米国特許出願公開ＵＳ２０１４０２４３５０４Ａ１に記載の、Ｆｃドメイン（ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１、－００２、－００３、および－００４）または改変（キメラ）ＩｇＧ４　Ｆｃドメイン（ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５）を有する例示的な二重特異性抗体を製造した。

【０２７８】

構築した様々な抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の抗原結合ドメインの構成部分の要約を表４に示す。

【表４】

表４：選択された抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の構成部分のまとめ

二重特異性抗体識別子	抗ＭＵＣ１６ 抗原結合ドメイン 重鎖可変領域	抗ＣＤ３ 抗原結合ドメイン 重鎖可変領域	共通軽鎖可変領域
BSMUC16/CD3-001	H1H8767P (配列番号18)	CD3-VH-G (配列番号1730)	H1H8767P (配列番号26)
BSMUC16/CD3-002	H1H8767P (配列番号18)	CD3-VH-G5 (配列番号1762)	H1H8767P (配列番号26)
BSMUC16/CD3-003	H1H8767P (配列番号18)	CD3-VH-G9 (配列番号1778)	H1H8767P (配列番号26)
BSMUC16/CD3-004	H1H8767P (配列番号18)	CD3-VH-G10 (配列番号1786)	H1H8767P (配列番号26)
BSMUC16/CD3-005	H1H8767P (配列番号18)	CD3-VH-G20 (配列番号1866)	H1H8767P (配列番号26)

【０２７９】

表４に挙げた軽鎖は、二重特異性抗体のＣＤ３およびＭＵＣ１６標的化アームの両方に共通していた。表１および２は、本実施例の二重特異性抗体の抗ＭＵＣ１６アームの様々な重鎖可変領域、およびそれらの対応するＣＤＲについて、アミノ酸識別子および核酸配列識別子をそれぞれ示す。表２２および２３は、本実施例の二重特異性抗体の抗ＣＤ３アームの様々な重鎖可変領域、およびそれらの対応するＣＤＲについて、アミノ酸識別子および核酸配列識別子をそれぞれ示す。

【０２８０】

実施例４：ヒトモノクローナル抗ＭＵＣ１６単一特異性抗体および抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の表面プラズモン共鳴由来の結合親和性および速度定数

ヒト抗ＭＵＣ１６抗体の結合親和性および速度定数をリアルタイム表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ；Ｂｉａｃｏｒｅ ４０００ ｏｒ Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ－２００，ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，ＰＡ）によって２５°Cで測定した。本実施例において試験された抗ＭＵＣ１６抗体は、ＭＵＣ１６に対する二価の単一特異的結合（ｈＩｇＧ１（Ｈ１Ｈ）、ｍＩｇＧ１（Ｈ１Ｍ）、ｍＩｇＧ２（Ｈ２Ｍ）、またはｍＩｇＧ３（Ｈ３Ｍ）定常領域）、または抗ＭＵＣ１６結合ドメインおよび抗CD3結合ドメインからなる二重特異性抗体であった。モノクローナル抗ヒトＦｃ抗体（ＧＥ，＃ＢＲ－１００８－３９）またはモノクローナルヤギ抗マウスＦｃ抗体（ＧＥ，＃ＢＲ－１００８－３８）とのアミンカップリングによって誘導体化された、ＣＭ４またはＣＭ５ Ｂｉａｃｏｒｅセンサー表面（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）上に抗体を捕捉した。ムチン－１６（ｈＭＵＣ１６．ｍｍｈ、またはＭＵＣ１６「ｎｕｂ」、配列番号１９０２）の最後の５つのＳＥＡドメインを包含する切断型形態の可溶性単量体ヒトＭＵＣ１６の様々な濃度を、流速５０μＬ／分（Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ－２００）または３０μＬ／分（Ｂｉａｃｏｒｅ ４０００）で、抗ＭＵＣ１６抗体補足表面上に注入した。抗体－試薬会合を４分間モニターし、解離を６～１０分間モニターした。全ての結合試験はＨＢＳ－ＥＴ緩衝液（０．０１Ｍ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．４、０．１５Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％ｖ／ｖ界面活性剤Ｐ２０）中で実施した。

【０２８１】

Ｓｃｒｕｂｂｅｒ ２．０ｃ曲線適合ソフトウェアを用いてリアルタイムセンサーグラムを１：１結合モデルへあてはめることによって、動的結合（k_a）速度定数および動的解離（k_d）速度定数を測定した。結合解離平衡定数（K_D）および解離半減期（ｔ１／２）を、動的速度定数から以下のように計算した：

【数１】

$$K_D\,(M) = \frac{kd}{ka}、および t1/2\ (分) = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

【０２８２】

単一特異性抗ＭＵＣ１６抗体の単量体ヒトＭＵＣ１６タンパク質断片への結合動態パラメータを以下の表５Ａおよび５Ｂに示す。単量体ヒトＭＵＣ１６タンパク質に対する抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体の結合動態パラメータを以下の表６に示す。

【表５】

表５Ａ：２５℃でのｈＭＵＣ１６断片に対するハイブリドーマ抗ＭＵＣ１６抗体（Ｈ１Ｍ、Ｈ２ＭおよびＨ３Ｍ）のＢｉａｃｏｒｅ結合親和性

抗体ＩＤ	ｋａ（１／ミリ秒）	ｋｄ（１／秒）	ＫＤ（Ｍ）	ｔ１／２（分）
H2M7128N	1.89E+05	6.40E-04	3.39E-09	18
H1M7129N	5.31E+04	1.04E-04	1.97E-09	111
H2M7131N	6.47E+04	1.62E-04	2.51E-09	71
H3M7132N	2.57E+04	1.96E-04	7.62E-09	59
H2M7133N	1.67E+05	3.77E-04	2.26E-09	31
H2M7134N	6.55E+04	1.62E-04	2.47E-09	71
H2M7135N	5.10E+04	2.18E-04	4.27E-09	53
H1M7137N	5.30E+04	9.09E-05	1.72E-09	127
H2M7138N	7.41E+04	9.25E-05	1.25E-09	125
H1M9519N	NB	NB	NB	NB
H1M9521N	NB	NB	NB	NB
H3M9524N	NB	NB	NB	NB
H3M9525N	NB	NB	NB	NB
H1M9528N	NB	NB	NB	NB
H3M9529N	NB	NB	NB	NB

ＮＢ：結合なし

【表６】

表５Ｂ：２５℃でのｈＭＵＣ１６断片に対するヒトＦｃ抗ＭＵＣ１６抗体（Ｈ１Ｈ）のＢｉａｃｏｒｅ結合親和性

抗体ＩＤ	ｋａ（１／ミリ秒）	ｋｄ（１／秒）	ＫＤ（Ｍ）	$t_{1/2}$（分）
H1H8755P	5.22E+05	1.49E-04	2.86E-10	77
H1H8767P	1.17E+05	4.18E-04	3.58E-09	28
H1H8770P	2.47E+05	3.08E-04	1.25E-09	38
H1H8783P	1.74E+05	1.07E-04	6.14E-10	108
H1H8790P	1.01E+05	7.61E-04	7.53E-09	15
H1H8794P	3.62E+05	2.79E-04	7.71E-10	41
H1H8799P	7.90E+04	3.66E-04	4.63E-09	32
H1H8799P2	7.58E+04	3.73E-04	4.92E-09	31
H1H8804P	4.94E+04	6.07E-04	1.23E-08	19
H1H8808P	4.12E+03	2.16E-04	5.24E-08	54
H1H8810P	5.77E+04	3.16E-04	5.48E-09	37
H1H8813P	5.32E+04	2.32E-04	4.35E-09	50

【表７】

表６：２５℃でｈＭＵＣ１６断片に対する抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体のＢｉａｃｏｒｅ結合親和性

二重特異性抗体識別子	ｋａ（１／ミリ秒）	ｋｄ（１／秒）	ＫＤ（Ｍ）	ｔ１／２（分）
BSMUC16/CD3-001	9.48E+04	5.86E-04	6.18E-09	20
BSMUC16/CD3-005	9.41E+04	5.64E-04	6.00E-09	21

【０２８３】

結果が示すように、本発明の抗ＭＵＣ１６抗体の大部分は可溶性ヒトＭＵＣ１６タンパク質に結合し、いくつかはナノモル以下の親和性を示した。いくつかの抗体（Ｈ１Ｍ９５１９Ｎ、Ｈ１Ｍ９５２１Ｎ、Ｈ３Ｍ９５２４Ｎ、Ｈ３Ｍ９５２５Ｎ、Ｈ１Ｍ９５２８Ｎ、Ｈ３Ｍ９５２９Ｎ）は、表面プラズモン共鳴によって最後の５つのＳＥＡドメインを含む切断型形態に結合を示さなかったが、細胞ベースの結合アッセイにおいて、ＯＶＣＡＲ－３細胞に発現した内在性ヒトＭＵＣ１６に特異的結合を示した。本発明の抗ＭＵＣ１６ｘＣＤ３二重特異性抗体はまた、このアッセイにおいてナノモルの親和性を示す可溶性の切断型ヒトＭＵＣ１６タンパク質に結合した。

【０２８４】

実施例５：例示的な二重特異性抗体の追加の結合、Ｔ細胞活性化、および細胞傷害性特性

この例では、ＭＵＣ１６ｘＣＤ３二重特異性抗体がヒトＣＤ３発現（ヒトＴ細胞）細胞株に結合する能力を、標的特異的（ＭＵＣ１６特異的）細胞株への結合と比較して、ＦＡＣＳによって決定した。さらに、これらの二重特異性抗体が標的特異的（ＭＵＣ１６特異的）細胞株に対して活性化する能力も同様のアッセイで比較した。

【０２８５】

ＦＡＣＳ分析により測定した例示的二重特異性抗体の結合滴定

Ａ．簡単に説明すると、フローサイトメトリー分析（すなわち、蛍光標示式細胞分取、またはＦＡＣＳ）を使用して、ヒトＭＵＣ１６を発現するジャーカット細胞または細胞に対する二重特異性抗体の結合を決定し、続いてフィコエリトリン（ＰＥ）標識またはＡＰＣ標識の抗ヒトＩｇＧ抗体で検出した。簡潔に説明すると、２×１０^{5}細胞／ウェルを１．３３Ｅ－０７Ｍ～８．０３Ｅ－１２Ｍの範囲の各試験抗体またはアイソタイプ対照（Ｍ

ＵＣ１６またはＣＤ３に対する交差反応性を示さない、異なる抗原に結合する同じアイソタイプの抗体）の段階希釈物と共に４℃で３０分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、１％濾過ＦＢＳを含有する冷ＰＢＳで２回洗浄し、ＰＥ結合型またはＡＰＣ結合型抗ヒト２次抗体を細胞に添加して、さらに３０分間インキュベートした。抗体または２次抗体のみを含有しないウェルを対照として使用した。インキュベーション後、細胞を洗浄し、１％濾過したＦＢＳを含有する２００μＬの冷ＰＢＳに再懸濁し、ＢＤ　ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩでフローサイトメトリーにより分析した。表７Ａを参照されたい。

【０２８６】

Ｂ．上述したものと類似の条件による別の実験において、フローサイトメトリー分析（またはＦＡＣＳ）を使用して、ジャーカット細胞、ＰＥＯ－１、ＯＶＣＡＲ３－Ｌｕｃ、およびカニクイザルＴ細胞に対して選択された二重特異性抗体の結合を決定した。滴定分析のために、６６．６ｎＭ～０．００１ｎＭの範囲の、選択されたＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体、第１のアイソタイプ対照抗体（ヒトまたはカニクイザルＣＤ３に対して交差反応性を示さずに無関係のヒト抗原に結合するヒトキメラＩｇＧ４抗体）、および第２のアイソタイプ対照抗体（ヒトＭＵＣ１６とは交差反応性を示さずに無関係のヒト抗原に結合するヒトキメラＩｇＧ４抗体）の段階希釈物表７Ｂおよび図１１Ａ～図１１Ｃを参照されたい。

【０２８７】

ＦＡＣＳ分析について、単一イベント選択のために、前方散乱高さ対前方散乱領域で細胞をゲートした後、側面散乱および前方散乱でゲートした。細胞結合滴定のＥＣ５０は、ＰＲＩＳＭ（商標）ソフトウェア（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｌａ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を用いて決定した。値は、４パラメータ非線形回帰分析を用いて計算した。（Ｌｉｕ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．２００５，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　Ｌｅｔｔｅｒｓ　２７：１８２１－１８２７）。ＥＣ５０値は、その最大結合の５０％が観察される試験抗体の濃度を表す。

【表８】

表７Ａ：ＣＤ３およびＭＵＣ１６特異的細胞株に対するＦＡＣＳ結合

二重特異性抗体識別子	抗ＣＤ３結合アーム	ＦＡＣＳ結合滴定EC_{50}［M］	
		ジャーカット	OVCAR3（MUC16＋）
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	3.21E-09	1.20E-09
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	非常に弱い	2.69E-09

【表９】

表７Ｂ：ＣＤ３およびＭＵＣ１６特異的細胞株に対するＦＡＣＳ結合

二重特異性抗体識別子	抗ＣＤ３結合アーム	ＦＡＣＳ結合滴定EC_{50}［M］			
		PEO－1（MUC16＋）	OVCAR3－Luc（MUC16＋）	ジャーカット	カニクイザルＴ細胞
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	3.02E-09	1.32E-09	6.44E-09	1.56E-08
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	3.13E-09	未試験	3.01E-07	非結合
BSMUC16/CD3-005	CD3-VH-G20	2.63E-09	1.47E-09	6.26E-08	1.17E-06

【０２８８】

表７Ａおよび７Ｂに示すように、各ＭＵＣ１６二重特異性抗体のＣＤ３結合アームは、Ｔ細胞を発現するヒトおよびサルＣＤ３に結合する細胞の範囲を示した（例えば、３．２ｎＭのEC_{50}から非常に弱い結合）。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１二重特異性抗体は、ＣＤ３発現細胞への結合の高い測定値を示した（すなわち、＜７ｎＭ）が、ＢＳＭＵ

Ｃ１６／ＣＤ３－００２二重特異性抗体は、ヒトおよびサルのＣＤ３発現細胞に対して、弱い結合から非結合を示した。ＦＡＣＳアッセイまたは同等のアッセイにおける測定不可能な結合、または測定不可能な結合は、アッセイの検出限界（例えば、１μＭ以上）を超える、抗体とその標的抗原との間の結合相互作用を指す。試験した二重特異性抗体は、ＭＵＣ１６発現細胞株に対して同様の細胞結合を示し、ＣＤ３との高いまたは弱い（もしくは測定可能でない）相互作用を示す個々のＣＤ３アームとの二重特異性対合は、腫瘍標的特異的結合に影響を及ぼさない、またはそれを減少させることを確認した。（これらの実施例では、ＭＵＣ１６特異的結合は３ｎＭ以下（高結合）であった。第１の対照抗体はＣＤ３＋細胞に結合せず、第２の対照抗体はＭＵＣ１６＋細胞に結合しなかった。図１１Ａ～図１１Ｃも参照されたい。

【０２８９】

ヒトＣＤ３への弱い結合から検出不可能な結合を示す抗体は、結合活性駆動型二重特異性対合のためになお有利であると考えられ、インビトロ（下記参照）およびインビボアッセイ（実施例８）で、細胞障害性についてさらに試験した。

【０２９０】

インビトロ測定した二重特異性抗体により示されるＴ細胞活性化および腫瘍特異的細胞毒性

Ａ．ＭＵＣ１６を発現する腫瘍標的細胞の特異的死滅を、ＣＤ３ベースの二重特異性抗体の存在下で、フローサイトメトリーによってモニターした。先に報告したように、二重特異性抗体はＣＤ３タンパク質およびＣＤ３発現細胞株に対して特異的結合能力（すなわち非常に弱いまたは強い結合）を示した。これらの同じ二重特異性抗体を、ナイーブヒトＴ細胞が標的発現細胞に対して殺滅するのを再誘導する能力について試験した。

【０２９１】

簡潔に説明すると、ＭＵＣ１６を発現する（ＯＶＣＡＲ３）細胞株を蛍光追跡用色素バイオレット細胞トラッカーの１μＭで標識した。標識後、細胞を３７℃で一晩播種した。別に、ヒトＰＢＭＣを1×10^{6}細胞／ｍＬで補充ＲＰＭＩ培地に播種し、付着マクロファージ、樹状細胞、およびいくつかの単球を枯渇させることによってリンパ球を濃縮するために３７℃で一晩インキュベートした。翌日、標的細胞を、接着性細胞除去非刺激ＰＢＭＣ（エフェクター／標的細胞４：１の比率）、および関連二重特異性抗体またはアイソタイプ対照（濃度範囲：６６．７ｎＭ～０．２５ｐＭ）の段階希釈物と共に３７℃で４８時間インキュベートした。無酵素胞解離緩衝液を用いて細胞を細胞培養プレートから取り出し、ＦＡＣＳにより分析した。表８Ａに表される結果を参照されたい。

【０２９２】

Ｂ．類似の試験において、記載されているように、ＭＵＣ１６を発現する（ＰＥＯ－１またはＯＶＣＡＲ３－Ｌｕｃ）細胞株を一晩、標識播種し、インキュベートした。ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体またはアイソタイプ対照の段階希釈物を同時インキュベートした。表８Ｂおよび８Ｃ、ならびに図１２Ａ～１２Ｂに示される結果を参照されたい。

【０２９３】

ＦＡＣＳ分析のために、細胞を死／生の遠赤細胞トラッカー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で染色した。ＦＡＣＳ分析の直前に、5×10^{5}個の計数ビーズを各ウェルに加えた。各サンプルにつき1×10^{4}個のビーズを集めた。殺傷の特異性を評価するために、細胞を生きたバイオレット標識集団にゲートした。生きている集団の割合を記録し、正規化された生存率の計算に使用した。

【０２９４】

Ｔ細胞活性化は、細胞をＣＤ２、ＣＤ６９および／またはＣＤ２５に直接コンジュゲートした抗体と共にインキュベートし、全Ｔ細胞（ＣＤ２＋）のうち初期に活性化された（ＣＤ６９＋）Ｔ細胞および／または後期に活性化された（ＣＤ２５＋）Ｔ細胞の割合を報告することによって評価された。

表８Ａ～８Ｃの結果が示すように、ＭＵＣ１６発現細胞の枯渇は抗ＭＵＣ１６ｘＣＤ３二重特異性抗体で観察された。試験した二重特異性抗体は全て、ヒトＴ細胞を活性化して、

標的細胞をピコモル範囲のＥＣ５０で枯渇するようにヒトＴ細胞を誘導した。さらに、観察された標的細胞溶解（枯渇）は、同じくピコモル（ｐＭ）ＥＣ５０で、ＣＤ２＋Ｔ細胞上のＣＤ６９（またはＣＤ２５）の上方制御と関連していた。

【０２９５】

重要なことに、この実施例の結果はまた、ＣＤ３タンパク質またはＣＤ３発現細胞（すなわち、ＣＤ３－ＶＨ－Ｇ５）への弱い結合から測定不可能な結合を示したＣＤ３結合アームで構築された二重特異性抗体が、Ｔ細胞を活性化する能力をまだ保持し、腫瘍抗原発現細胞の強力な細胞傷害性を示した。

【表１０】

表８Ａ：選択されたＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の細胞傷害性およびＴ細胞活性化の特性

二重特異性抗体識別子	抗CD3 結合アーム	OVCAR3 細胞枯渇 EC_{50} [M]	Ｔ細胞活性化 (CD69 上方制御) EC_{50} [M]
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	2.24E-11	5.88E-12
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	3.06E-11	1.01E-11

【表１１】

表８Ｂ：選択されたＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の細胞傷害性およびＴ細胞活性化の特性

二重特異性抗体識別子	PEO－1 細胞枯渇 EC50 [M]	Ｔ細胞活性化 (CD69 上方制御) EC50 [M]	Ｔ細胞活性化 (CD25 上方制御) EC50 [M]
BSMUC16/CD3-001	2.56E-11	8.34E-12	3.90E-11
BSMUC16/CD3-002	6.75E-11	1.34E-11	8.89E-11
BSMUC16/CD3-005	7.74E-11	1.72E-11	1.06E-10

【表１２】

表８Ｃ：選択されたＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の細胞傷害性およびＴ細胞活性化の特性

二重特異性抗体識別子	OVCAR3－Luc 細胞枯渇 EC50 [M]	Ｔ細胞活性化 (CD69 上方制御) EC50 [M]	Ｔ細胞活性化 (CD25 上方制御) EC50 [M]
BSMUC16/CD3-001	1.54E-11	2.98E-12	3.06E-11
BSMUC16/CD3-005	5.16E-11	1.54E-11	1.17E-10

【０２９６】

実施例６：ｈＭＵＣ１６のＣ末端ドメインの一部に結合する抗Ｍｕｃ１６抗体Ｈ４ｓＨ８７６７Ｐ、Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２、およびＨ１Ｈ８７９９Ｐ２の水素／重水素（Ｈ／Ｄ）交換ベースのエピトープマッピング

実験は、抗ＭＵＣ１６抗体のＨ４ｓＨ８７６７Ｐ、Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２、およびＨ１Ｈ８７９９Ｐ２と相互作用する、Ｃ末端の５つのＳＥＡドメイン内ＭＵＣ１６アミノ酸残基（配列番号１９０２、以後ｈＭＵＣ１６．ｎｕｂと称する）を決定するために実施した。この目的のために、質量分析による水素／重水素（Ｈ／Ｄ）交換エピトープマッピング（ＨＤＸ－ＭＳ）を利用した。Ｈ／Ｄ交換法の一般的な説明は、Ｅｈｒｉｎｇ（１９９９）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２６７（２）：２５２－２５９、およびＥｎｇｅｎ ａｎｄ Ｓｍｉｔｈ（２００１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．７３：２５６Ａ－２６５Ａに記載されている。

【０２９７】

重水素標識のためのＬｅａｐｔｅｃ ＨＤＸ ＰＡＬシステム、サンプルの消化およびローディングのためのＷａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ Ｍ－Ｃｌａｓｓ（Ａｕｘｉｌｉａ

ｒｙ ｓｏｌｖｅｎｔ ｍａｎａｇｅｒ）、分析カラム勾配のためのＷａｔｅｒｓ Ａｃｑｕｉｔｙ Ｍ－Ｃｌａｓｓ（μＢｉｎａｒｙ ｓｏｌｖｅｎｔ ｍａｎａｇｅｒ）、およびペプシンペプチド質量測定のためのＳｙｎａｐｔ Ｇ２－Ｓｉ質量分析計で構成されるＷａｔｅｒｓ ＨＤＸ／ＭＳ統合プラットフォーム上で、ＨＤＸ－ＭＳ実験を実行した。

【０２９８】

ｐＤ７．０でD_2Oの１０ｍＭのＰＢＳ緩衝液中で標識溶液を調製した。重水素標識のために、３．８μＬのｈＭＵＣ１６．ｎｕｂ（１２ｐｍｏｌ／μＬ）または抗ＭＵＣ１６抗体Ｈ４ｓＨ８７６７Ｐ、Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２、またはＨ１Ｈ８７９９Ｐ２と２：１のモル比で混合したｈＭＵＣ１６．ｎｕｂを５６．２μＬでインキュベートした。様々な時点でのD_2O標識溶液（例：非重水素化対照＝０秒、重水素化標識：１分と２０分）５０μＬのサンプルを５０μＬの予め冷却したクエンチ緩衝液（１００ｍＭのリン酸緩衝液中の０．２ＭのＴＣＥＰ、６Ｍの塩化グアニジン、ｐＨ２．５）に移すことによって重水素化をクエンチし、混合サンプルを１．０℃で２分間インキュベートした。次に、クエンチしたサンプルをオンラインペプシン／プロテアーゼＸＩＩＩ消化のためにＷａｔｅｒｓ ＨＤＸ Ｍａｎａｇｅｒに注入した。消化したペプチドをＡＣＱＵＩＴＹ ＵＰＬＣ ＢＥＨ Ｃ１８ １．７－μｍ、２．１×５ｍｍ ＶａｎＧｕａｒｄプレカラムに、０℃でトラップし、９分間の５％～４０％Ｂ勾配分離（移動相Ａ：水中０．１％ギ酸、移動相Ｂ：アセトニトリル中０．１％ギ酸）で分析カラムＡＣＱＵＩＴＹ ＵＰＬＣ ＢＥＨ Ｃ１８（１．７－μｍ、１．０ｘ５０ｍｍ）に溶出した。質量分析計は、３７Ｖのコーン電圧、０．５秒のスキャン時間、および５０～１７００Ｔｈの質量／電荷範囲を使用した。

【０２９９】

Ｈ４ｓＨ８７６７Ｐ、Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２、およびＨ１Ｈ８７９９Ｐ２と相互作用する、ｈＭＵＣ１６．ｎｕｂのペプチド残基の同定については、非重水素化サンプルからのＬＣ－MS^Eデータを処理し、Ｗａｔｅｒｓ ＰｒｏｔｅｉｎＬｙｎｘ Ｇｌｏｂａｌ Ｓｅｒｖｅｒ（ＰＬＧＳ）ソフトウェアを用いて、ｈＭＵＣ１６．ｎｕｂ、ペプシンの配列および無作為化配列を含むデータベースに対して検索した。同定されたペプチドをＤｙｎａｍＸソフトウェアにインポートし、２つの基準１）アミノ酸あたりの最小産物：０．２５、および２）複製ファイル閾値：２でフィルタリングした。その後、ＤｙｎａｍＸソフトウェアは、各時点で３回反復して、複数時点にわたる保持時間および高い質量精度（＜１０ｐｐｍ）に基づいて、各ペプチドの重水素取り込みを自動的に決定した。

【０３００】

MS^Eデータ取得と結合したオンラインペプシン／プロテアーゼＸＩＩＩカラムを用いて、ｈＭＵＣ１６．ｎｕｂからの１０９個のペプチドの総数が、Ｈ４ｓＨ８７６７Ｐの非存在下または存在下で同定され、６４％の配列範囲を表した。Ｈ４ｓＨ８７６７Ｐに結合した場合、６つのペプチドは重水素の取り込みを有意に減少させ（ｐ値＜０．０５の少なくとも１つの時点から重心デルタ値＞０．５ダルトン）、それは表９Ａに示される。記録されたペプチド質量は、３つの複製からの重心MH^+質量の平均値に対応する。ｈＭｕｃ１６．ｎｕｂのアミノ酸４２８～４３４、４５３～４６７、および４７４～４８１に対応するこれらのペプチドは、Ｈ４ｓＨ８７６７Ｐに結合したとき、重水素化速度はより遅かった。これらの同定された残基はまた、ＵｎｉｐｒｏｔエントリーＱ８ＷＸＩ７（ＭＵＣ１６＿ＨＵＭＡＮ）、配列番号１８９９によって定義される、ｈＭＵＣ１６の残基１４２３７～１４２４３、１４２６２～１４２７６、および１４２８３～１４２９０に対応する。

【表１３】

表９Ａ．Ｈ４ｓＨ８７６７Ｐ結合時に重水素化速度が変化したｈＭＵＣ１６．ｎｕｂペプチド

配列番号1902の残基	アミノ酸配列	１分の重水素化			20分の重水素化		
		hMUC16.nub	hMUC16.nub+H4sH8767P	△	hMUC16.nub	hMUC16.nub+H4sH8767P	△
428～434	LYKGSQL	809.97 ±0.03	809.07±0.06	-0.26	811.05 ±0.16	810.17±0.01	-0.88
429～434	YKGSQL	697.10 ±0.00	696.74±0.00	-0.35	698.13 ±0.02	697.60±0.03	-0.52
453～467	VTVKALFSSNLDPSL	1595.35 ±0.08	1593.97±0.2	-1.38	1596.01 ±0.08	1595.33±0.03	-0.68
459～467	FSSNLDPSL	983.19 ±0.01	981.57±0.08	-1.62	983.51 ±0.03	982.76±0.07	-0.75
460～467	SSNLDPSL	835.44 ±0.01	834.01±0.00	-1.43	835.89 ±0.01	835.12±0.15	-0.74
474～481	DKTLNASF	899.76 ±0.00	899.25±0.06	-0.51	900.63 ±0.00	900.10±0.03	-0.54

【０３０１】

ＭＳ^{E}データ取得と結合したオンラインペプシン／プロテアーゼＸＩＩＩカラムを用いて、ｈＭＵＣ１６．ｎｕｂからの１０９個のペプチドの総数が、Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２の非存在下または存在下で同定され、６４％の配列範囲を表した。Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２に結合したとき、３つのペプチドは重水素の取り込みを有意に減少させ（ｐ値＜０．０５の少なくとも１つの時点から重心デルタ値＞０．５ダルトン）、それは表９Ｂに示される。記録されたペプチド質量は、３つの複製からの重心ＭＨ$^{+}$質量の平均値に対応する。ｈＭｕｃ１６．ｎｕｂのアミノ酸１２６～１３１、１２７～１３１、および１３２～１３８に対応するこれらのペプチドは、Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２に結合したとき、重水素化速度はより遅かった。これらの同定された残基はまた、ＵｎｉｐｒｏｔエントリーＱ８ＷＸＩ７（ＭＵＣ１６＿ＨＵＭＡＮ）、配列番号１８９９によって定義される、ｈＭＵＣ１６の残基１３９３５～１３９４０、１３９３６～１３９４０、および１３９４１～１３９４７に対応する。

【表１４】

表９Ｂ．Ｈ１Ｈ８７９４Ｐ２結合時に重水素化速度が変化したｈＭＵＣ１６．ｎｕｂペプチド

配列番号1902の残基	アミノ酸配列	１分の重水素化			２０分の重水素化		
		hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8794P2	△	hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8794P2	△
126～131	LRYMAD	771.41 ±0.01	770.60±0.04	-0.81	771.91 ±0.04	770.76±0.02	-1.15
127～131	RYMAD	658.03 ±0.02	657.32±0.01	-0.71	657.89 ±0.01	657.27±0.01	-0.6
132～138	MGQPGSL	692.55 ±0.02	691.42±0.15	-1.13	692.61 ±0.01	691.58±0.02	-1.03

【０３０２】

ＭＳ^{E}データ取得と結合したオンラインペプシン／プロテアーゼＸＩＩＩカラムを用い

て、ｈＭＵＣ１６．ｎｕｂからの１０９個のペプチドの総数が、Ｈ１Ｈ８７９９Ｐ２の非存在下または存在下で同定され、６４％の配列範囲を表した。Ｈ１Ｈ８７９９Ｐ２に結合したとき、４つのペプチドは重水素の取り込みを有意に減少させ（ｐ値＜０．０５の少なくとも１つの時点から重心デルタ値＞０．５ダルトン）、それは表９Ｃに示される。記録されたペプチド質量は、３つの複製からの重心MH^+質量の平均値に対応する。ｈＭｕｃ１６．ｎｕｂのアミノ酸３５７～３６９、３５８～３６６、３５８～３６９、および３６１～３６９に対応するこれらのペプチドは、Ｈ１Ｈ８７９９Ｐ２に結合したとき、重水素化速度はより遅かった。これらの同定された残基はまた、ＵｎｉｐｒｏｔエントリーＱ８ＷＸＩ７（ＭＵＣ１６＿ＨＵＭＡＮ）、配列番号１８９９によって定義される、ｈＭＵＣ１６の残基１４１６５～１４１７８、１４１６６～１４１７６、１４１６６～１４１７８、および１４１７０～１４１７８に対応する。

【表１５】

表９Ｃ．Ｈ１Ｈ８７９９Ｐ２の結合時に重水素化速度が変化したｈＭＵＣ１６．ｎｕｂペプチド

配列番号1902の残基		１分の重水素化			２０分の重水素化		
	アミノ酸配列	hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8799P2	△	hMUC16.nub	hMUC16.nub +H1H8799P2	△
357～369	LSQLTHGVTQLGF	1404.15 ±0.03	1403.41 ±0.09	-0.74	1406.14 ±0.15	1404.26 ±0.02	-2.11
358～366	SQLTHGVTQL	972.37 ±0.10	972.04 ±0.10	-0.33	973.94±0.03	972.56 ±0.00	-1.38
358～369	SQLTHGVTQLGF	1291.23 ±0.02	1290.20 ±0.00	-1.03	1291.34 ±0.02	1291.05 ±0.06	-2.27
361～369	THGVTQLGF	1404.15 ±0.03	1403.42 ±0.05	-0.73	1406.14 ±0.14	1404.03 ±0.02	-2.11

【０３０３】

実施例７：抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の薬物動態学的評価

ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１およびＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５およびアイソタイプ対照の抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体の薬物動態の評価を、ヒト化ＭＵＣ１６×ＣＤ３マウス（ヒトＭＵＣ１６およびＣＤ３発現についてホモ接合性のマウス、ＭＵＣ１６$^{hu/hu}$×ＣＤ３$^{hu/hu}$）、ＣＤ３ヒト化マウス（ヒトＣＤ３発現についてホモ接合性のマウス、ＣＤ３$^{hu/hu}$）、および系統適合（７５％Ｃ５７ＢＬ、２５％１２９Ｓｖ）野生型（ＷＴ）マウスで実施した。コホートは、試験抗体あたりおよびマウス系統あたり４～５匹のマウスを含んだ。全てのマウスに単一の腹腔内（ｉ．ｐ．）を投与した。０．４ｍｇ／ｋｇ用量投与後３および６時間後、１、３、７、１４および２８日後に血液サンプルを採取した。血液を血清に処理し、分析するまで－８０℃で凍結した。

【０３０４】

抗体濃度の循環は、ＧｙｒｏＬａｂｘＰｌｏｒｅ（商標）（Ｇｙｒｏｓ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を用いて、全ヒトＩｇＧ抗体の分析により決定した。簡潔に説明すると、血清中に存在するヒトＩｇＧを捕捉するために、ビオチン化ヤギ抗ヒトＩｇＧポリクローナル抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）を、Ｇｙｒｏｌａｂ Ｂｉｏａｆｆ ２００ ＣＤ（Ｇｙｒｏｓ）上のストレプトアビジン被覆ビーズ上に捕捉した。アフィニティーカラム捕捉後、サンプル中の結合ヒトＩｇＧ抗体をＡｌｅｘａ－６４７標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ）で検出した。カラム上の蛍光シグナルは、結合ＩｇＧの検出を可能にし、応答単位（ＲＵ）を機器で読み取った。サンプル濃度は、Ｇｙｒｏｌａｂ Ｅｖａｌｕａｔｏｒ Ｓｏｆｔｗａｒｅを使用して５パラメータロジスティック曲線フィットを使用してフィットした標準曲線からの内挿によって決定した。

ＰＫパラメータは、フェニックス（登録商標）ウィンノンリン（登録商標）ソフトウェアバージョン６．３（Ｃｅｒｔａｒａ，Ｌ．Ｐ．，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，ＮＪ）、および血管外投与モデルを用いた非コンパートメント解析（ＮＣＡ）によって決定した。各抗体のそれぞれの平均濃度値を用いて、血清中で観察された最大濃度（C_{max}）、推定半減期（$t_{1/2}$）、および最後の測定可能な濃度までの時間に対する濃度曲線下面積（AUC_{last}）を含む全てのＰＫパラメータを線形補間および均一の重み付けによる線形台形法則を用いて決定した。

【０３０５】

ＷＴマウスにおける抗体の腹腔内投与後、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５およびアイソタイプ対照の総ＩｇＧ濃度－時間プロファイルは全て同様で、まず短時間の薬物分布で、続いて残りの試験の間の単一薬物消失段階で特徴付けられた。３つの抗体の最大血清濃度（C_{max}）および計算された薬物曝露（AUC_{last}）は同程度であった（互いに１．３倍以内）。

【０３０６】

ＣＤ３$^{hu/hu}$マウスにおける抗体の腹腔内投与後、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５およびアイソタイプ対照は同等のC_{max}濃度だった。（それぞれ４．６、３．６、および4.1 / mlの４．１μｇ／ｍＬ）ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５およびアイソタイプ対照は類似の薬物消失曲線を示したが、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１は両者より急勾配の薬物排除を示し、ヒトＣＤ３標的結合がクリアランスを促進することを示唆している。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１の末端抗体濃度は０．０３μｇ／ｍＬであり、これはアイソタイプ対照について決定された末端抗体濃度（０．８５μｇ／ｍＬ）より約２８倍低く、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（０．６６μｇ／ｍｌ）血清濃度より２２倍低い。

【０３０７】

ＭＵＣ１６$^{hu/hu}$×ＣＤ３$^{hu/hu}$二重ヒト化マウスで、ＭＵＣ１６xＣＤ３二重特異性抗体およびアイソタイプ対照抗体は、同等のC_{max}濃度（C_{max}範囲：４．５～６．９μｇ／ｍＬ）だった。両方の二重特異性抗体は、アイソタイプ対照よりも急勾配の薬物消失を示し、これは標的媒介性効果を示唆している。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１およびＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５の末端抗体濃度は、アイソタイプ対照について決定された末端抗体濃度（０．８６μｇ／ｍＬ）よりもそれぞれ約２９倍および２．９倍低かった。

【０３０８】

全抗ＭＵＣ１６xＣＤ３二重特異性抗体のデータの要約およびアイソタイプ対照抗体濃度は、表１０にまとめられている。平均ＰＫパラメータは表１１Ａおよび１１Ｂに記載されている。時間に対する平均総抗体濃度を図１、２、および３に示す。結論として、ＭＵＣ１６xＣＤ３二重特異性抗体はＷＴマウスにおいて同様のC_{max}および薬物消失曲線を示したが、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１は、ＣＤ３単一ヒト化マウスおよびＭＵＣ１６／ＣＤ３二重ヒト化マウスのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５およびアイソタイプ対照よりも急勾配の消失速度を示す。このＰＫ試験において投与された二重特異性抗体は同じ抗ＭＵＣ１６結合アームからなるので、結果は、ＣＤ３標的化アームの結合強度が薬物曝露レベル（AUC_{last}）および薬物消失速度において役割を果たし得ることを示唆する。ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１もＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５もマウスＭＵＣ１６またはマウスＣＤ３には結合しない。

【表１６】

表１０：WTマウス、ヒト化ＣＤ３マウスおよびヒト化ＭＵＣ１６×ＣＤ３マウスにおいて
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５およびアイソタイプ
対照抗体の０．４ｍｇ／ｋｇ腹腔内注射を単回投与した後の血清中の総ＩｇＧの平均濃度。

抗体	時間（日）	マウス血清中の総ｍＡｂ濃度					
		WT		$CD3^{hu/hu}$		$MUC16^{hu/hu}$x $CD3^{hu/hu}$	
		平均値（μg/mL）	+/-SD	平均値（μg/mL）	+/-SD	平均値（μg/mL）	+/-SD
BSMUC16/CD3-001	0.13	5.39	0.34	4.30	0.29	6.77	1.52
	0.25	5.80	0.36	4.26	1.07	6.63	1.06
	1.00	4.13	0.43	2.87	0.71	4.89	0.53
	3.00	3.19	0.53	1.44	0.27	2.50	0.22
	7.00	2.61	0.73	0.72	0.13	1.20	0.22
	14.00	1.44	0.69	0.18	0.05	0.28	0.08
	21.00	0.93	ND	0.07	0.02	0.06	0.05
	28.00	0.60	ND	0.04	0.01	0.03	0.02
BSMUC16/CD3-005	0.13	4.23	0.62	3.35	1.15	4.35	0.24
	0.25	4.53	0.55	3.40	0.96	4.45	0.49
	1.00	3.47	0.32	2.72	0.42	3.00	0.61
	3.00	2.51	0.13	1.95	0.37	1.98	0.41
	7.00	2.02	0.24	2.31	0.67	1.58	0.36
	14.00	1.19	0.17	1.01	0.23	0.78	0.26
	21.00	1.19	0.29	1.19	0.11	0.66	0.29
	28.00	0.71	0.20	0.66	0.28	0.30	0.22
ｱｲｿﾀｲﾌﾟ 対照	0.13	5.07	1.16	5.43	1.30	6.56	0.70
	0.25	5.91	1.10	5.67	1.91	6.48	0.90
	1.00	2.64	0.24	2.98	1.14	2.82	0.30
	3.00	2.05	0.06	2.29	0.83	1.57	0.37
	7.00	1.80	0.25	2.14	0.85	1.96	0.37
	14.00	1.22	0.28	1.48	0.66	1.34	0.37
	21.00	1.20	0.58	1.43	0.72	1.24	0.44
	28.00	0.73	0.24	0.85	0.29	0.86	0.41

時間：（記載表記は、時間）＝単回投与注射後の時間、Ｄ＝試験日、ＳＤ＝標準偏差、ＮＤ＝薬物クリアランス抗薬物力価を有するマウスを除外したため決定されない

【表１７】

表１１Ａ：薬物動態学的パラメータの要約：ＣＤ３$^{hu/hu}$ヒト化マウス

パラメータ	単位	WTマウス			ＣＤ３$^{hu/hu}$マウス		
		アイソタイプ対照	BSMUC16/CD3-001	BSMUC16/CD3-005	アイソタイプ対照	BSMUC16/CD3-001	BSMUC16/CD3-005
C_{max}	μg/mL	5±3	6±0.4	5±0.5	4.1±3	4.6±0.8	3.5±1
$T_{1/2}$	d	11±4	7±3	12±2	14±0.5	3.9±0.6	11±5
AUC_{last}	d･μg/mL	35±18	40±11	45±5	49±20	16±3	36±13

C_{max}＝ピーク濃度、ＡＵＣ＝濃度－時間曲線下面積、AUC_{last}＝時間０から最後の陽性濃度の時間までに計算されたＡＵＣ、$T_{1/2}$＝観察された推定半減期

【表１８】

表１１Ｂ：薬物動態学的パラメータのまとめ：ＭＵＣ１６$^{hu/hu}$×ＣＤ３$^{hu/hu}$二重ヒト化マウス

パラメータ	単位	WTマウス			ＭＵＣ１６$^{hu/hu}$×ＣＤ３$^{hu/hu}$マウス		
		アイソタイプ対照	BSMUC16/CD3-001	BSMUC16/CD3-005	アイソタイプ対照	BSMUC16/CD3-001	BSMUC16/CD3-005
C_{max}	μg/mL	5±3	6±0.4	5±0.5	6.7±0.7	6.9±1	4.5±4
$T_{1/2}$	d	11±4	7±3	12±2	12.9±4	3.3±0.8	8.2±4
AUC_{last}	d･μg/mL	35±18	40±11	45±5	46±10	27±3	34±11

C_{max}＝ピーク濃度、ＡＵＣ＝濃度－時間曲線下面積、AUC_{last}＝時間０から最後の陽性濃度の時間までに計算されたＡＵＣ、$T_{1/2}$＝観察された推定半減期

【０３０９】

実施例８：抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体はインビボで強力な抗腫瘍効果を示す。

ヒトおよびカニクイザルＣＤ３への弱い結合または検出不可能な結合を有すると同定される、例示的な抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体のインビボでの有効性を決定するために、ヒト前立腺癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおいて試験を行った。選択された二重特異性抗体の有効性を、即時処置投薬モデルおよび治療用処置投薬モデルの両方において試験した。

【０３１０】

ヒト腫瘍異種移植片モデルにおける抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体の有効性

ヒト腫瘍異種移植片試験における抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性のインビボでの有効性を評価するために、ＮＯＤ　ｓｃｉｄガンマ（ＮＳＧ）マウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｂａｒ　Ｈａｒｂｏｒ，Ｍａｉｎｅ）に、ヒト末梢血単核球（ＰＢＭＣ、ＲｅａｃｈＢｉｏ　ＬＬＣ．，Ｓｅａｔｔｌｅ，ＷＡ）を予め移植し、次いでルシフェラーゼを形質導入したヒト卵巣癌細胞株ＯＶＣＡＲ－３（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）（ＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ）の腹水細胞を与えた。ＯＶＣＡＲ－３細胞は内因的にＭＵＣ－１６を発現する。

【０３１１】

簡潔に説明すると、ＮＳＧマウスに５．０×１０^{6}個のヒトＰＢＭＣを腹腔内（ｉ．ｐ．）注射した。８日後、予めインビボで継代培養した、ＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞株からの１．５×１０^{6}腹水細胞を、ＰＢＭＣを移植したＮＳＧマウスに腹腔内投与した。即時処置群では、ＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞移植の日に、マウスをＭＵＣ１６／ＣＤ３二重特異性抗体ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１またはＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５、またはアイソタイプ対照を１０μｇ用量／マウスで腹腔内処置した。（Ｎ＝５マウス／処

置群）。治療用量モデルでは、マウスを腹腔内処置した。腫瘍移植後７日目に、上記のＭＵＣ１６／ＣＤ３二重特異性抗体または対照抗体を１０μｇ／マウスの用量で投与した（Ｎ＝５／処置群）。

【０３１２】

全ての試験において、腫瘍増殖は生物発光イメージング（ＢＬＩ）によってモニターした。マウスにＰＢＳに懸濁したルシフェラーゼ基質Ｄ－ルシフェリン（１５０ｍｇ／ｋｇ）を腹腔内注射し、１０分後にイソフルラン麻酔下で画像化した。ＢＬＩはＸｅｎｏｇｅｎ　ＩＶＩＳシステム（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ，Ｈｏｐｋｉｎｔｏｎ，ＭＡ）を用いて行い、ＢＬＩシグナルはＬｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅソフトウェア（Ｘｅｎｏｇｅｎ／Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を用いて抽出した。目的の領域を各細胞量の周囲に描き、光子強度を光子（ｐ）／秒（ｓ）／ｃｍ^2／ステラジアン（ｓｒ）として記録した。即時処置群については、データは腫瘍移植後２６日目のＢＬＩレベルとして示される（表１２Ａ）。治療処置群については、データは、６日目（処置１日前）と試験終点（腫瘍移植後２６日、表１２Ｂ）との間のＢＬＩの倍率変化として示されている。

【０３１３】

結果が示すように、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１とＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５の両方が、ＢＬＩを即時投与モデルにおいて２６日目に測定した場合、アイソタイプ対照と比較して腫瘍増殖を抑制することで同様の効力を示した。両方の抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体はまた、対照と比較して、腫瘍移植の７日後に投与された場合に、既存腫瘍の増殖を抑制した。要約すると、本発明の二重特異性抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３抗体はいくつかのモデルにおいて強力な抗腫瘍効果を示す。

【表１９】

表１２Ａ：免疫不全異種移植モデルにおける抗MUC１６／抗CD３二重特異性抗体の有効性：即時投与

腫瘍モデル／マウス系統／用量	二重特異性抗体識別子	N	平均生物発光放射輝度（光子／秒／ｃｍ^2／ステラジアン）２６日目（平均±ＳＤ）
OVCAR－3／Luc／NSG／10μg／マウス	BSMUC16／CD3－001	5	$1.4\times10^3\pm3.5\times10^2$
	BSMUC16／CD3－005	5	$1.5\times10^3\pm9.7\times10^2$
	アイソタイプ対照	5	$2.0\times10^7\pm1.0\times10^6$

【表２０】

表１２Ｂ：免疫不全異種移植モデルにおける抗MUC１６／抗CD３二重特異性抗体の有効性：治療用処置

腫瘍モデル／マウス系統／用量	二重特異性抗体識別子	N	６日目に対する２６日目の平均生物発光放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ^2／ｓｒ］の倍率変化（平均±ＳＤ）
OVCAR－3／Luc／NSG／10μg／マウス	BSMUC16／CD3－001	5	２．０±５．０
	BSMUC16／CD3－005	5	０．０１±０．０２
	アイソタイプ対照	5	２１．０±８．０

【０３１４】

さらなる実験において、抗ＭＵＣ１６／抗ＣＤ３二重特異性抗体のインビボでの有効性を、異種および同系腫瘍モデルで評価した。第１の異種モデルについては、ＮＳＧマウスに、ヒトＰＢＭＣを移植した１１日後に予めインビボで継代培養した（０日目）ＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞を腹腔内（ＩＰ）注射した。マウスを０．０１、０．１または０．５

ｍｇ／ｋｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１で腹腔内処置、または６、１０、１３、１６、および２１日目に０．５ｍｇ／ｋｇの非結合対照またはＣＤ３結合対照を投与した。腫瘍量は、腫瘍移植後６、１４、および２０日目にＢＬＩによって評価された。０．１または０．５ｍｇ／ｋｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１による処置は、表１３Ａ～Ｃおよび図４～６に示されるように、２０日目のＢＬＩ測定によって決定されるように有意な抗腫瘍効果をもたらした。第２の異種モデルについては、ＮＳＧマウスに、ヒトＰＢＭＣを移植した１３日後に予めインビボで継代培養した（０日目）ＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞を注射し、４日目にＰＢＭＣの第２のバッチを移した。マウスを０．１、０．５、１または５ｍｇ／ｋｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５で静脈内（ＩＶ）処置、または５、８、１２、１５、１９、および２２日目に、５ｍｇ／ｋｇの非結合対照またはＣＤ３結合対照を投与した。４、１１、１８および２５日目に、腫瘍量をＢＬＩによって評価した。０．５、１、または５ｍｇ／ｋｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５による処置は、ＢＬＩ測定および倍率変化によって示されるように、有意な抗腫瘍効果をもたらした（表１３Ｄ～Ｆおよび図７～９）。免疫適格モデルにおける有効性を調べるために、マウスＣＤ３遺伝子をヒトＣＤ３と置き換え、マウスＭＵＣ１６遺伝子の一部をヒト配列と置き換えた。置換により、そのＴ細胞がヒトＣＤ３を発現し、ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１二重特異性抗体が結合するヒトＭＵＣ１６の一部を含むキメラＭＵＣ１６分子を発現するマウスが得られた。同系腫瘍モデルについては、ヒトＭＵＣ１６の一部を発現するように操作されたＩＤ８－ＶＥＧＦ細胞株を使用した。マウスにＩＤ８－ＶＥＧＦ／ｈｕＭＵＣ１６細胞を皮下に移植し、移植日または腫瘍形成時の移植後１０日目のいずれかに１００μｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１で処置した。表１３Ｇおよび図１０に示されるように、１００μｇのＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１による処置は、有意な抗腫瘍効果をもたらした。

【０３１５】

移植および異種移植腫瘍の測定：予めインビボで継代培養したＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ細胞株由来の腹水細胞を、予めヒトＰＢＭＣを移植したＮＳＧマウスに腹腔内投与した。ＢＬＩを、ＯＶＣＡＲ－３／Ｌｕｃ移植の数日後および試験中の複数回の腫瘍増殖についての読み出しとして測定した。コホート化のための最初のＢＬＩ測定の後、マウスをそれぞれ４～６匹の動物の群に分け、試験を通して週に２回ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体または対照抗体を投与した。

【０３１６】

異種移植腫瘍増殖および阻害の計算：生物発光イメージングを使用して腫瘍量を測定した。マウスに、ＰＢＳ中に懸濁したルシフェラーゼ基質のＤ－ルシフェリン１５０ｍｇ／ｋｇ（実験開始時の体重により決定）を腹腔内注射した。投与の１０分後、マウスのＢＬＩイメージングを、Ｘｅｎｏｇｅｎ　ＩＶＩＳシステムを用いてイソフルラン麻酔下で行った。Ｄでの視野、１．５ｃｍの被写体の高さ、および０．５分間の露光時間の中程度のビニングレベルで、画像取得を行った。ＢＬＩシグナルはＬｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅソフトウェアを用いて抽出した。目的の領域を各腫瘍量の周囲に描き、光子強度をｐ／ｓ／ｃｍ^2／ｓｒとして記録した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア（バージョン６）を用いて統計分析を行った。ＢＬＩ結果の統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。倍率変化は、式１：試験１では（２０日目～６日目）／６日目、試験２では（２５日目～４日目）／４日目で計算した。

【０３１７】

移植および同系腫瘍の測定：対応するマウス遺伝子座においてヒトＣＤ３およびＭＵＣ１６のヒト－マウスキメラを発現するマウスに１０ｅ６　ＩＤ８－ＶＥＧＦ／ｈｕＭＵＣ１６細胞を皮下（ＳＣ）移植した。試験を通して、マウスにＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１またはＣＤ３結合対照ＩＰを１週間に２回投与した。移植後０日目または１０日目に処置を開始した。腫瘍増殖を、キャリパーを用いて週２回測定した。腫瘍移植後４７日目にマウスを屠殺した。

【０３１８】

同系腫瘍増殖および阻害の計算：外部キャリパーで腫瘍体積を測定するために、最大長径（長さ）および最大横径（幅）を測定した。キャリパー測定値に基づいて、腫瘍体積を式：体積＝（長さ×幅^2）／２により計算した。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーｔ検定を用いて決定した。

【０３１９】

異種および同系のインビボ腫瘍モデルにおけるＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１二重特異性抗体の抗腫瘍効果を、以下の表１３Ａ～Ｄに示す。

【表２１】

表１３Ａ：ＯＶＣＡＲ－３モデル試験１腫瘍移植後６日目の生物発光レベル

抗体（ｍｇ／ｋｇ）	移植後６日の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２^2／ｓｒ］（中央値±ＳＥＭ）
非結合対照（０．５）	８．１５ｅ＋０５±７．８８ｅ＋０４
ＣＤ３結合対照（０．５）	６．３９ｅ＋０５±８．６７ｅ＋０４
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．５）	７．６４ｅ＋０５±１．１９ｅ＋０５
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．１）	６．３１ｅ＋０５±１．１０ｅ＋０５
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．０１）	８．７７ｅ＋０５±７．９１ｅ＋０４

【表２２】

表１３Ｂ：ＯＶＣＡＲ－３モデル試験１腫瘍移植後２０日目の生物発光レベル

抗体（ｍｇ／ｋｇ）	移植後２０日の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２^2／ｓｒ］（中央値±ＳＥＭ）
非結合対照（０．５）	８．６３ｅ＋０６±１．４５ｅ＋０６
ＣＤ３結合対照（０．５）	９．９４ｅ＋０６±１．０８ｅ＋０６
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．５）	９．３７ｅ＋０２±９．６２ｅ＋０２
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．１）	２．３６ｅ＋０４±１．２８ｅ＋０６
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．０１）	６．５１ｅ＋０６±１．６０ｅ＋０６

【表２３】

表１３Ｃ：ＯＶＣＡＲ－３モデル試験１腫瘍移植後６日目から２０日目の間のＢＬＩの倍率変化

抗体（ｍｇ／ｋｇ）	移植後６日目からＤ２０までの平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２^2／ｓｒ］の倍率変化
非結合対照（０．５）	９．５±１．９
ＣＤ３結合対照（０．５）	１５．６±６．７
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．５）	－１．００±０．００
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．１）	１．２±４．７
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（０．０１）	５．６±４．２

【表２４】

表１３Ｄ：ＯＶＣＡＲ－３モデル試験２腫瘍移植後４日目の生物発光レベル

抗体（ｍｇ／ｋｇ）	移植後４日の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２／ｓｒ］(中央値±ＳＥＭ)
非結合対照（5）	１．５４ｅ＋０５±９．９３ｅ＋０３
ＣＤ３結合対照（5）	１．３４ｅ＋０５±１．５５ｅ＋０４
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（5）	１．５４ｅ＋０５±１．０３ｅ＋０４
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（1）	１．３８ｅ＋０５±４．６５ｅ＋０３
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（０．５）	１．３１ｅ＋０５±４．０３ｅ＋０３
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（０．１）	１．５３ｅ＋０５±１．９３ｅ＋０４

【表２５】

表１３Ｅ：ＯＶＣＡＲ－３モデル試験２腫瘍移植後２５日目の生物発光レベル

抗体（ｍｇ／ｋｇ）	移植後２５日の平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２／ｓｒ］(中央値±ＳＥＭ)
非結合対照（5）	７．２０ｅ＋０６±８．９１ｅ＋０５
ＣＤ３結合対照（5）	６．１５ｅ＋０６±７．２６ｅ＋０５
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（5）	１．５２ｅ＋０３±４．８６ｅ＋０５
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（1）	６．９９ｅ＋０３±６．２３ｅ＋０３
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（０．５）	２．２３ｅ＋０３±２．３５ｅ＋０５
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（０．１）	７．６３ｅ＋０６±１．８３ｅ＋０６

【表２６】

表１３Ｆ：ＯＶＣＡＲ－３モデル試験２腫瘍移植後４日目から２５日目の間のＢＬＩの倍率変化

抗体（ｍｇ／ｋｇ）	移植後４日目からＤ２５までの平均放射輝度［ｐ／ｓ／ｃｍ２／ｓｒ］の倍率変化（平均±ＳＤ）
非結合対照（5）	４６．８±２０．６
ＣＤ３結合対照（5）	５５．０±１４．７
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（5）	２．５±８．５
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（1）	－０．９±０．１
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（０．５）	０．７±３．６
ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００５（０．１）	４５．４±３５．７

【表２７】

表１３Ｇ：ＩＤ８－ＶＥＧＦ／ｈｕＭＵＣ１６モデル４７日目の腫瘍サイズ（ｍｍ３）

治療開始	抗体（μｇ）	４７日目の腫瘍サイズ（ｍｍ３）(平均±ＳＥＭ)
０日目	ＣＤ３結合対照（１００）	８２７．５±２２３．５
０日目	ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（１００）	５１．２±５１．２
１０日目	ＢＳＭＵＣ１６／ＣＤ３－００１（１００）	２７３．８±９２．３６

【０３２０】

実施例９：複合体の調製および特徴付け

全てのモノクローナル抗体をＣＨＯ細胞中で発現させ、プロテインＡにより精製した。アイソタイプ対照もまた同様にして調整した。非結合アイソタイプ対照抗体は、腫瘍学とは無関係の免疫学的抗原に由来した。

【０３２１】
５０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．５中の抗体（１０ｍｇ／ｍｌ）を１ｍＭジチオトレイトールで、３７℃で３０分間処理した。ゲル濾過（Ｇ－２５、ｐＨ４．５酢酸ナトリウム）後、ＤＭＳＯ（１０ｍｇ／ｍｌ）中のマレイミドリンカーペイロード誘導体化合物７または化合物１０（表１４参照）（１．２当量／ＳＨ基）の１つを還元抗体に加え、混合物を１Ｍ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）でｐＨ７．０に調整した。化合物７および化合物１０、ならびにこれらの化合物の製造方法は、それぞれ、２０１４年９月１８日に公開されたＰＣＴ公開番号ＷＯ２０１４／１４５０９０および２０１６年１０月６日に公開されたＰＣＴ公開番号ＷＯ２０１６／１６０６１５に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。１時間後、反応を過剰のＮ－エチルマレイミドでクエンチした。複合体をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、滅菌濾過した。タンパク質およびリンカーのペイロード濃度は、ＵＶスペクトル分析によって決定した。サイズ排除ＨＰＬＣは、使用された全ての複合体が＞９５％の単量体であることを立証した。収量は、タンパク質測定に基づいて表１４に報告されている。Ｈａｍｂｌｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２００４　１０　７０６３に従って、リンカーペイロード負荷値について、全ての複合化抗体をＵＶによって分析した。結果を表１４に要約する。

【０３２２】
化合物６０を含む複合体は、同様の方法を用いて調製することができる。化合物６０、およびその化合物の製造方法は、２０１６年１０月６日に公開されたＰＣＴ公開番号ＷＯ２０１６／１６０６１５（実施例２０）に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。化合物６０は、メイタンシン－Ｎ－メチル－Ｌ－アラニン－（３－メトキシ－４－アミノ）ベンズアミド－Ｃｉｔ－Ｖａｌ－Ｃａｐ－Ｍａｌである。

【表２８】

表１４：ペイロード（化学毒性薬）および抗体－薬物－複合体パラメータの要約

化合物	ε２５２ｎｍ（$cm^{-1}M^{-1}$）	ε２８０ｎｍ（$cm^{-1}M^{-1}$）
７［メイタンシン－３－Ｎ－メチル－Ｌ－（Ｓ）－アラニン－プロパンアミジル－３－Ｎ－メチル－Ｎ－［４－（アミノ－シトルリン－バリン－ヘキサンアミド－６－マレイミド／）ベンジル］カルバメート］	５０６００	８１００
１０［メイタンシン－Ｎ－メチル－Ｌ－アラニン－４－アミノベンズアミド－シトルリン－バリン－カプロリル－６－マレイミジル］	４５９９０	２０６００
抗体	ε２５２ｎｍ（$cm^{-1}M^{-1}$）	ε２８０ｎｍ（$cm^{-1}M^{-1}$）
Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ	８３９９５	２３５２８０
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ	８５５６４	２３２０５０
アイソタイプ対照	７５１１３	２１８３６０
抗体複合体	ペイロード：抗体（ＵＶ）	収量％
Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－７	３．５	４０
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ－７	３．６	４０
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ－１０	３．０	４０
アイソタイプ対照－７	３．０	６０
アイソタイプ対照－１０	３．４	６０

【０３２３】

実施例１０：抗ＭＵＣ１６抗体薬物複合体は、インビボＭＵＣ１６陽性前立腺癌異種移植モデルにおける腫瘍増殖の強力な阻害剤である。

化合物７および化合物１０にコンジュゲートした抗ＭＵＣ１６抗体のインビボ有効性を決定するために、ＭＵＣ１６陽性卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態のマウスにおいて研究を行った。

【０３２４】

これらの試験のために、雌性ＳＣＩＤマウス（Ｔａｃｏｎｉｃ，Ｈｕｄｓｏｎ　ＮＹ）に、内因的にＭＵＣ１６を発現するルシフェラーゼ（ＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ）でトランスフェクトされた、ＯＶＣＡＲ３［ＮＩＨ：ＯＶＣＡＲ－３（ＯＶＣＡＲ３、ＡＴＣＣ　ＨＴＢ－１６１）］細胞を移植した。腹腔内（ＩＰ）腫瘍については、マウスを処置群に無作為化し、腫瘍発光シグナルの検出後に、抗ＭＵＣ１６薬物複合化抗体（実施例９参照）、非結合複合化抗体、またはビヒクルのいずれかを投与した。皮下（ＳＣ）異種移植片については、腫瘍が平均体積２００mm^3に達したら（約１６日目）、マウスを処置群に無作為に分け、抗ＭＵＣ１６薬物複合化抗体、非結合複合化抗体、またはビヒクルのいずれかを投与した。これらのインビボ試験では、抗体を投与し、次いでビヒクルのみを投与したコホートにおいて腹水症が発症するか平均腫瘍サイズが約１２００mm^3に達するまで腫瘍をモニターした。この時点で腫瘍増殖阻害を計算した。

【０３２５】

初期腹腔内（ＩＰ）の試験において、化合物７にコンジュゲートされた例示的な抗ＭＵＣ１６抗体は、ＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ発光シグナルを減少させる効果について調べた。マウスに、週１回４回の抗ＭＵＣ１６および対照ＡＤＣを、ＡＤＣ薬物：抗体比に基づいて、８５μｇ／ｋｇの薬物当量で投与した。表１５Ａに要約されるように、Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－化合物７およびＨ１Ｈ９５２１Ｎ－化合物７は腹水腫瘍増殖を強力に阻害した。これらの抗ＭＵＣ１６　ＡＤＣは、ビヒクル対照に対する腫瘍発光を１００％減少させながら、腫瘍サイズを効率的に減少させた。対照ＡＤＣは、ＯＶＣＡＲ／ｌｕｃ腹水癌細胞増殖のいかなる阻害も媒介しなかった。

【０３２６】

皮下（ＳＣ）ＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腫瘍に対して抗ＭＵＣ１６ＡＤＣの有効性を評価するさらなる試験を表１５Ｂに要約する。マウスに、週１回４回の抗ＭＵＣ１６および対照ＡＤＣを、ＡＤＣ薬物：抗体比に基づいて、８５μｇ／ｋｇの薬物当量で投与した。化合物７にコンジュゲートした場合、ＭＵＣ１６　ＡＤＣ　Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－化合物７およびＨ１Ｈ９５２１Ｎ－化合物７は、今回、皮下のＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腫瘍に対して、再び有意な抗腫瘍効果を生じた。したがって、これらのＡＤＣはそれぞれ腫瘍増殖の１００％および１０９％の阻害を媒介した。対照ＡＤＣは、ＯＶＣＡＲ／ｌｕｃ皮下腫瘍増殖のいかなる阻害も媒介しなかった。

【０３２７】

第３の試験において、リンカー薬剤化合物１０にコンジュゲートされた抗ＭＵＣ１６抗体Ｈ１Ｈ９５２１Ｎの有効性を腹腔内ＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腫瘍モデルで評価した。マウスに、ＡＤＣ薬物：抗体比に基づいて８５μｇ／ｋｇ、１７０μｇ／ｋｇ、および３４０μｇ／ｋｇの薬物当量で単回用量の抗ＭＵＣ１６および対照ＡＤＣを投与した。表１５Ｃに要約されるように、Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－１０は腹水腫瘍増殖を強力に阻害した。Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－化合物１０の用量は、ビヒクルコントロールに対する腫瘍発光の９９～１００％の阻害をもたらした。化合物１０を使用した対照ＡＤＣではいくらかの阻害が観察されたが、これは抗ＭＵＣ１６Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－化合物１０の後に観察されたものよりも穏やかであった。

【表２９】

表１５Ａ：化合物７にコンジュゲートした抗ＭＵＣ１６抗体で処置したＳＣＩＤマウスにおける４９日目のＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腹腔内腫瘍増殖の阻害

処置群	最終腫瘍の平均放射輝度（平均±ＳＥＭ）	平均腫瘍増殖阻害率（％）
ビヒクル	16469750±10679335	0
対照－化合物７　85μg／kg	16813750±4026065	-2
Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－化合物７ 85μg／kg	111254±187288	100
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ－化合物７ 85μg／kg	110413±161353	100

【表３０】

表１５Ｂ：化合物７にコンジュゲートした抗ＭＵＣ１６抗体で処置したＳＣＩＤマウスにおける３７日目のＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ皮下内腫瘍増殖の阻害

処置群	最終腫瘍体積（平均±ＳＥＭ）	平均腫瘍増殖阻害率（％）
ビヒクル	1210±426	0
対照－化合物７　85μg／kg	1737±391	-51
Ｈ１Ｈ９５１９Ｎ－化合物７ 85μg／kg	187±269	100
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ－化合物７ 85μg／kg	89±97	109

【表３１】

表１５Ｃ：化合物１０にコンジュゲートした抗ＭＵＣ１６抗体で処置したＳＣＩＤマウスにおける４９日目のＯＶＣＡＲ３／ｌｕｃ腹腔内腫瘍増殖の阻害

処置群	最終腫瘍放射輝度（平均±ＳＥＭ）	平均腫瘍増殖阻害率（％）
ビヒクル	29211000±23504780	0
対照－化合物１０　85μg／kg	17332625±14346694	41
対照－化合物１０　170μｇ／kg	32075000±15623403	-10
対照－化合物１０　340μｇ／kg	22882350±18771913	22
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ－化合物１０ 85μｇ／kg	574285±306844	99
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ－化合物１０ 170μｇ／kg	236037±226948	100
Ｈ１Ｈ９５２１Ｎ－化合物１０ 340μg／kg	26472±25079	101

【０３２８】

実施例１１：抗ＣＤ３抗体の産生

抗ＣＤ３抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖およびカッパ軽鎖可変領域をコードするＤＮＡを含む遺伝子操作マウスを、ＣＤ３を発現する細胞またはＣＤ３をコードするＤＮＡで免疫することによって得た。抗体の免疫応答を、ＣＤ３特異的イムノアッセイによってモニターした。所望の免疫応答が達成されたとき、脾細胞を収集し、マウス骨髄腫細胞と融合させて、それらの生存率を維持し、ハイブリドーマ細胞株を形成した。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングおよび選択して、ＣＤ３特異的抗体を産生する細胞株を同定した。この技術を用いて、いくつかの抗ＣＤ３キメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインとマウス定常ドメインとを有する抗体）を得た。さらに、ＵＳ２００７／０２８０９４５Ａ１に記載されるように、いくつかの完全ヒト型抗ＣＤ３抗体を骨髄腫細胞に融合させることなく抗原陽性Ｂ細胞から直接単離した。

【０３２９】

本実施例の方法に従って産生された例示的な抗ＣＤ３抗体の特定の生物学的特性を、本明細書の実施例において詳細に説明する。

【０３３０】

実施例１２：重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列および核酸配列

表１６は、本発明の選択された抗ＣＤ３抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域ならび

にＣＤＲのアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表１７に示す。本明細書に開示の抗ＣＤ３抗体を作製する方法はまた、米国特許公開第２０１４／００８８２９５号に見出すことができる。

【表３２】

表１６：アミノ酸配列識別子

	配列番号：							
抗体名	HCVR	HCDR1		HCDR3	LCVR	LCDR11	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	402	404	406	408	410	412	414	416
H1M2692N	418	420	422	424	426	428	430	432
H1M3542N	434	436	438	440	442	444	446	448
H1M3544N	450	452	454	456	458	460	462	464
H1M3549N	466	468	470	472	474	476	478	480
H1M3613N	482	484	486	488	490	492	494	496
H2M2689N	498	500	502	504	506	508	510	512
H2M2690N	514	516	518	520	522	524	526	528
H2M2691N	530	532	534	536	538	540	542	544
H2M2704N	546	548	550	552	554	556	558	560
H2M2705N	562	564	566	568	570	572	574	576
H2M2706N	578	580	582	584	586	588	590	592
H2M2707N	594	596	598	600	602	604	606	608
H2M2708N	610	612	614	616	618	620	622	624
H2M2709N	626	628	630	632	634	636	638	640
H2M2710N	642	644	646	648	650	652	654	656
H2M2711N	658	660	662	664	666	668	670	672
H2M2774N	674	676	678	680	682	684	686	688
H2M2775N	690	692	694	696	698	700	702	704
H2M2776N	706	708	710	712	714	716	718	720
H2M2777N	722	724	726	728	730	732	734	736
H2M2778N	738	740	742	744	746	748	750	752
H2M2779N	754	756	758	760	762	764	766	768
H2M2789N	770	772	774	776	778	780	782	784
H2M2862N	786	788	790	792	794	796	798	800
H2M2885N	802	804	806	808	810	812	814	816
H2M2886N	818	820	822	824	826	828	830	832
H2M3540N	834	836	838	840	842	844	846	848
H2M3541N	850	852	854	856	858	860	862	864
H2M3543N	866	868	870	872	874	876	878	880
H2M3547N	882	884	886	888	890	892	894	896
H2M3548N	898	900	902	904	906	908	910	912
H2M3563N	914	916	918	920	922	924	926	928
H1H5751P	930	932	934	936	938	940	942	944
H1H5752P	946	948	950	952	954	956	958	960
H1H5753B	962	964	966	968	970	972	974	976
H1H5754B	978	980	982	984	986	988	990	992
H1H5755B	994	996	998	1000	1002	1004	1006	1008

【表３３】

H1H5756B	1010	1012	1014	1016	1018	1020	1022	1024
H1H5757B	1026	1028	1030	1032	1034	1036	1038	1040
H1H5758B	1042	1044	1046	1048	1050	1052	1054	1056
H1H5761P	1058	1060	1062	1064	1066	1068	1070	1072
H1H5763P	1074	1076	1078	1080	1082	1084	1086	1088
H1H5764P	1090	1092	1094	1096	1098	1100	1102	1104
H1H5769P	1106	1108	1110	1112	1114	1116	1118	1120
H1H5771P	1122	1124	1126	1128	1130	1132	1134	1136
H1H5772P	1138	1140	1142	1144	1146	1148	1150	1152
H1H5777P	1154	1156	1158	1160	1162	1164	1166	1168
H1H5778P	1170	1172	1174	1176	1178	1180	1182	1184
H1H5780P	1186	1188	1190	1192	1194	1196	1198	1200
H1H5781P	1202	1204	1206	1208	1210	1212	1214	1216
H1H5782P	1218	1220	1222	1224	1226	1228	1230	1232
H1H5785B	1234	1236	1238	1240	1242	1244	1246	1248
H1H5786B	1250	1252	1254	1256	1258	1260	1262	1264
H1H5788P	1266	1268	1270	1272	1274	1276	1278	1280
H1H5790B	1282	1284	1286	1288	1290	1292	1294	1296
H1H5791B	1298	1300	1302	1304	1306	1308	1310	1312
H1H5792B	1314	1316	1318	1320	1322	1324	1326	1328
H1H5793B	1330	1332	1334	1336	1338	1340	1342	1344
H1H5795B	1346	1348	1350	1352	1354	1356	1358	1360
H1H5796B	1362	1364	1366	1368	1370	1372	1374	1376
H1H5797B	1378	1380	1382	1384	1386	1388	1390	1392
H1H5798B	1394	1396	1398	1400	1402	1404	1406	1408
H1H5799P	1410	1412	1414	1416	1418	1420	1422	1424
H1H5801B	1426	1428	1430	1432	1434	1436	1438	1440
H1H7194B	1442	1444	1446	1448	1634	1636	1638	1640
H1H7195B	1450	1452	1454	1456	1634	1636	1638	1640
H1H7196B	1458	1460	1462	1464	1634	1636	1638	1640
H1H7198B	1466	1468	1470	1472	1634	1636	1638	1640
H1H7203B	1474	1476	1478	1480	1634	1636	1638	1640
H1H7204B	1482	1484	1486	1488	1634	1636	1638	1640
H1H7208B	1490	1492	1494	1496	1634	1636	1638	1640
H1H7211B	1498	1500	1502	1504	1634	1636	1638	1640
H1H7221B	1506	1508	1510	1512	1634	1636	1638	1640
H1H7223B	1514	1516	1518	1520	1634	1636	1638	1640
H1H7226B	1522	1524	1526	1528	1634	1636	1638	1640
H1H7232B	1530	1532	1534	1536	1634	1636	1638	1640
H1H7233B	1538	1540	1542	1544	1634	1636	1638	1640
H1H7241B	1546	1548	1550	1552	1634	1636	1638	1640
H1H7242B	1554	1556	1558	1560	1634	1636	1638	1640
H1H7250B	1562	1564	1566	1568	1634	1636	1638	1640
H1H7251B	1570	1572	1574	1576	1634	1636	1638	1640

【表３４】

H1H7254B	1578	1580	1582	1584	1634	1636	1638	1640
H1H7258B	1586	1588	1590	1592	1634	1636	1638	1640
H1H7269B	1594	1596	1598	1600	1634	1636	1638	1640
H1H7279B	1602	1604	1606	1608	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G	1610	1612	1614	1616	1634	1636	1638	1640
H1×H7221G3	1618	1620	1622	1624	1634	1636	1638	1640
H1×H7221G5	1626	1628	1630	1632	1634	1636	1638	1640

【表３５】

表１７：核酸配列識別子

	配列番号：							
抗体名	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H2712N	401	403	405	407	409	411	413	415
H1M2692N	417	419	421	423	425	427	429	431
H1M3542N	433	435	437	439	441	443	445	447
H1M3544N	449	451	453	455	457	459	461	463
H1M3549N	465	467	469	471	473	475	477	479
H1M3613N	481	483	485	487	489	491	493	495
H2M2689N	497	499	501	503	505	507	509	511
H2M2690N	513	515	517	519	521	523	525	527
H2M2691N	529	531	533	535	537	539	541	543
H2M2704N	545	547	549	551	553	555	557	559
H2M2705N	561	563	565	567	569	571	573	575
H2M2706N	577	579	581	583	585	587	589	591
H2M2707N	593	595	597	599	601	603	605	607
H2M2708N	609	611	613	615	617	619	621	623
H2M2709N	625	627	629	631	633	635	637	639
H2M2710N	641	643	645	647	649	651	653	655
H2M2711N	657	659	661	663	665	667	669	671
H2M2774N	673	675	677	679	681	683	685	687
H2M2775N	689	691	693	695	697	699	701	703
H2M2776N	705	707	709	711	713	715	717	719
H2M2777N	721	723	725	727	729	731	733	735
H2M2778N	737	739	741	743	745	747	749	751
H2M2779N	753	755	757	759	761	763	765	767
H2M2789N	769	771	773	775	777	779	781	783
H2M2862N	785	787	789	791	793	795	797	799
H2M2885N	801	803	805	807	809	811	813	815
H2M2886N	817	819	821	823	825	827	829	831
H2M3540N	833	835	837	839	841	843	845	847
H2M3541N	849	851	853	855	857	859	861	863
H2M3543N	865	867	869	871	873	875	877	879
H2M3547N	881	883	885	887	889	891	893	895
H2M3548N	897	899	901	903	905	907	909	911
H2M3563N	913	915	917	919	921	923	925	927
H1H5751P	929	931	933	935	937	939	941	943
H1H5752P	945	947	949	951	953	955	957	959
H1H5753B	961	963	965	967	969	971	973	975
H1H5754B	977	979	981	983	985	987	989	991
H1H5755B	993	995	997	999	1001	1003	1005	1007

【表３６】

H1H5756B	1009	1011	1013	1015	1017	1019	1021	1023
H1H5757B	1025	1027	1029	1031	1033	1035	1037	1039
H1H5758B	1041	1043	1045	1047	1049	1051	1053	1055
H1H5761P	1057	1059	1061	1063	1065	1067	1069	1071
H1H5763P	1073	1075	1077	1079	1081	1083	1085	1087
H1H5764P	1089	1091	1093	1095	1097	1099	1101	1103
H1H5769P	1105	1107	1109	1111	1113	1115	1117	1119
H1H5771P	1121	1123	1125	1127	1129	1131	1133	1135
H1H5772P	1137	1139	1141	1143	1145	1147	1149	1151
H1H5777P	1153	1155	1157	1159	1161	1163	1165	1167
H1H5778P	1169	1171	1173	1175	1177	1179	1181	1183
H1H5780P	1185	1187	1189	1191	1193	1195	1197	1199
H1H5781P	1201	1203	1205	1207	1209	1211	1213	1215
H1H5782P	1217	1219	1221	1223	1225	1227	1229	1231
H1H5785B	1233	1235	1237	1239	1241	1243	1245	1247
H1H5786B	1249	1251	1253	1255	1257	1259	1261	1263
H1H5788P	1265	1267	1269	1271	1273	1275	1277	1279
H1H5790B	1281	1283	1285	1287	1289	1291	1293	1295
H1H5791B	1297	1299	1301	1303	1305	1307	1309	1311
H1H5792B	1313	1315	1317	1319	1321	1323	1325	1327
H1H5793B	1329	1331	1333	1335	1337	1339	1341	1343
H1H5795B	1345	1347	1349	1351	1353	1355	1357	1359
H1H5796B	1361	1363	1365	1367	1369	1371	1373	1375
H1H5797B	1377	1379	1381	1383	1385	1387	1389	1391
H1H5798B	1393	1395	1397	1399	1401	1403	1405	1407
H1H5799P	1409	1411	1413	1415	1417	1419	1421	1423
H1H5801B	1425	1427	1429	1431	1433	1435	1437	1439
H1H7194B	1441	1443	1445	1447	1633	1635	1637	1639
H1H7195B	1449	1451	1453	1455	1633	1635	1637	1639
H1H7196B	1457	1459	1461	1463	1633	1635	1637	1639
H1H7198B	1465	1467	1469	1471	1633	1635	1637	1639
H1H7203B	1473	1475	1477	1479	1633	1635	1637	1639
H1H7204B	1481	1483	1485	1487	1633	1635	1637	1639
H1H7208B	1489	1491	1493	1495	1633	1635	1637	1639
H1H7211B	1497	1499	1501	1503	1633	1635	1637	1639
H1H7221B	1505	1507	1509	1511	1633	1635	1637	1639
H1H7223B	1513	1515	1517	1519	1633	1635	1637	1639
H1H7226B	1521	1523	1525	1527	1633	1635	1637	1639
H1H7232B	1529	1531	1533	1535	1633	1635	1637	1639
H1H7233B	1537	1539	1541	1543	1633	1635	1637	1639
H1H7241B	1545	1547	1549	1551	1633	1635	1637	1639
H1H7242B	1553	1555	1557	1559	1633	1635	1637	1639
H1H7250B	1561	1563	1565	1567	1633	1635	1637	1639
H1H7251B	1569	1571	1573	1575	1633	1635	1637	1639

【表３７】

H1H7254B	1577	1579	1581	1583	1633	1635	1637	1639
H1H7258B	1585	1587	1589	1591	1633	1635	1637	1639
H1H7269B	1593	1595	1597	1599	1633	1635	1637	1639
H1H7279B	1601	1603	1605	1607	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G	1609	1611	1613	1615	1633	1635	1637	1639
H1×H7221G3	1617	1619	1621	1623	1633	1635	1637	1639
H1×H7221G5	1625	1627	1629	1631	1633	1635	1637	1639

【０３３１】

抗体は、以下の命名法：Ｆｃ接頭辞（例えば、「Ｈ１Ｈ」、「Ｈ１Ｍ」、「Ｈ２Ｍ」など）、続いて数値識別子（例えば、表１に示すように、「２７１２」、「２６９２」など）、続いて「Ｐ」、「Ｎ」、または「Ｂ」の接尾辞により、本明細書で典型的に参照される。したがって、この命名法によれば、抗体は、本明細書では、例えば、「Ｈ１Ｈ２７１２Ｎ」、「Ｈ１Ｍ２６９２Ｎ」、「Ｈ２Ｍ２６８９Ｎ」などと言及され得る。本明細書に使用される抗体名のＨ１Ｈ、Ｈ１Ｍ、およびＨ２Ｍの接頭辞は、抗体の特定のＦｃ領域アイソタイプを示す。例えば、「Ｈ１Ｈ」抗体はヒトＩｇＧ１　Ｆｃを有し、「Ｈ１Ｍ」抗体はマウスＩｇＧ１　Ｆｃを有し、「Ｈ２Ｍ」抗体はマウスＩｇＧ２　Ｆｃを有する（抗体名の最初の「Ｈ」によって示されるように全ての可変領域は完全ヒト型である）。当業者によって理解されているように、特定のＦｃアイソタイプを有する抗体は、異なるＦｃアイソタイプを有する抗体へ変換することができる（例えば、マウスＩｇＧ１　Ｆｃを有する抗体は、ヒトＩｇＧ４を有する抗体へ変換することができる、など）が、いずれの事象においても、表１に示す数値識別子によって示される可変ドメイン（ＣＤＲを含む）は同じままであることになっており、結合特性はＦｃドメインの性質にかかわらず、同一または実質的に類似であると期待される。

【０３３２】

表１８および１９は、本発明の抗ＭＵＣ１６×ＣＤ３二重特異性抗体に有用な追加の抗ＣＤ３　ＨＣＶＲおよびＬＣＶＲの重鎖可変領域（表１８）および軽鎖可変領域（表１９）のアミノ酸配列識別子、ならびにそれらの対応するＣＤＲを示す。

【表３８】

表１８（重鎖可変領域アミノ酸配列）

	配列番号：			
重鎖識別子	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3
CD3－VH－AA	１６４２	１６４４	１６４６	１６４８
CD3－VH－B	１６５８	１６６０	１６６２	１６６４
CD3－VH－C	１６７４	１６７６	１６７８	１６８０
CD3－VH－D	１６９０	１６９２	１６９４	１６９６
CD3－VH－E	１７０６	１７０８	１７１０	１７１２
CD3－VH－F#	１７２１	１７２２	１７２３	１７２４

【表３９】

表１９（軽鎖可変領域アミノ酸配列）

	配列番号：			
軽鎖識別子	ＬＣＶＲ	ＬＣＤＲ１	ＬＣＤＲ２	ＬＣＤＲ３
ＣＤ３－ＶＬ－ＡＡ	１６５０	１６５２	１６５４	１６５６
ＣＤ３－ＶＬ－Ｂ	１６６６	１６６８	１６７０	１６７２
ＣＤ３－ＶＬ－Ｃ	１６８２	１６８４	１６８６	１６８８
ＣＤ３－ＶＬ－Ｄ	１６９８	１７００	１７０２	１７０４
ＣＤ３－ＶＬ－Ｅ	１７１４	１７１６	１７１８	１７２０
ＣＤ３－ＶＬ－Ｆ#	１７２５	１７２６	１７２７	１７２８

【０３３３】

ＣＤ３－ＶＨ－ＦおよびＣＤ３－ＶＬ－Ｆの重鎖および軽鎖可変領域は、ＷＯ２００４／１０６３８０に記載の「Ｌ２Ｋ」と命名された抗ＣＤ３抗体に由来した。

【０３３４】

さらに、表２０および２１は、本発明の抗ＭＵＣ１６×抗ＣＤ３二重特異性抗体に有用な追加の抗ＣＤ３　ＨＣＶＲおよびＬＣＶＲの重鎖可変領域（表２０）および軽鎖可変領域（表２１）をコードするヌクレオチド配列の配列識別子、ならびにそれらの対応するＣＤＲを示す。

【表４０】

表２０（重鎖可変領域配列をコードするヌクレオチド配列）

	配列番号：			
重鎖識別子	ＨＣＶＲ	ＨＣＤＲ１	ＨＣＤＲ２	ＨＣＤＲ３
ＣＤ３－ＶＨ－ＡＡ	１６４１	１６４３	１６４５	１６４７
ＣＤ３－ＶＨ－Ｂ	１６５７	１６５９	１６６１	１６６３
ＣＤ３－ＶＨ－Ｃ	１６７３	１６７５	１６７７	１６７９
ＣＤ３－ＶＨ－Ｄ	１６８９	１６９１	１６９３	１６９５
ＣＤ３－ＶＨ－Ｅ	１７０５	１７０７	１７０９	１７１１

【表４１】

表２１（軽鎖可変領域配列をコードするヌクレオチド配列）

	配列番号：			
軽鎖識別子	ＬＣＶＲ	ＬＣＤＲ１	ＬＣＤＲ２	ＬＣＤＲ３
ＣＤ３－ＶＬ－ＡＡ	１６４９	１６５１	１６５３	１６５５
ＣＤ３－ＶＬ－Ｂ	１６６５	１６６７	１６６９	１６７１
ＣＤ３－ＶＬ－Ｃ	１６８１	１６８３	１６８５	１６８７
ＣＤ３－ＶＬ－Ｄ	１６９７	１６９９	１７０１	１７０３
ＣＤ３－ＶＬ－Ｅ	１７１３	１７１５	１７１７	１７１９

【０３３５】

以下の実施例にて使用される対照構築物

比較の目的で、種々の対照構築物（抗ＣＤ３抗体）を以下の実験に含めた。すなわち、カタログ番号ＣＲＬ－８００１でＡｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）から入手可能なヒトＴ細胞表面抗原に対するマウスモノクローナル抗体「ＯＫＴ－３」、およびヒトＴリンパ球細胞上のＴ３複合体のイプシロン鎖に対して反応性である、例えば、Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ（Ｃａｔ．Ｎｏ．３０２９１４）またはＢＤ　Ｐｈａｒｍａｇｅｎ，Ｃａｔ．５５０５２から入手

可能な市販のマウスモノクローナル抗体「ＳＰ３４」。

【０３３６】

実施例１３：さらなる抗ＣＤ３抗体の産生

以下の手順は、抗原としてＣＤ３（Ｔ細胞コレセプター）を特異的に認識する抗体を同定することを目的とした。

【０３３７】

抗ＣＤ３抗体のプールは、遺伝子改変マウスに由来した。簡潔に説明すると、マウスをＣＤ３抗原で免疫し、多様なレパートリーの高親和性抗原特異的抗体を発現させるために多様なヒトＶＨ再編成を含むＢ細胞を産生した。表２２～２５に記載の抗体は、ＶＫ１－３９ＪＫ５の同じ軽鎖配列（配列番号１８９０に記載のＬＣＶＲ）を有する。

【０３３８】

産生された抗体を、インビトロ結合アッセイにおいてヒトおよびカニクイザルＣＤ３抗原に対する結合について試験し、他のいくつかの中でも特に、例えば、ＣＤ３－ＶＨ－Ｐ（配列番号１８８２に記載のＨＣＶＲ）と命名された１つのＣＤ３抗体が同定され、ジャーカット細胞およびカニクイザルＴ細胞のＦＡＣＳ滴定において決定されるように、１～４０ｎＭの結合（または細胞結合滴定）のEC_{50}を有するヒトおよびカニクイザルＣＤ３の両方にそれぞれ結合することが見出された。例えば、実施例１５および２０１６年７月２９日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４４７３２に概説されているＦＡＣＳ結合実験も参照されたい。

【０３３９】

続いてＣＤ３－ＶＨ－Ｐの生殖系列アミノ酸残基を同定し（ＣＤ３－ＶＨ－ＰのＶ－Ｄ－Ｊ再編成は、ＩＧＨＶ３－９＊０１、ＩＧＨＪ６＊０２、ＩＧＨＤ５－１２＊０１である）、「ＣＤ３－ＶＨ－Ｇ」と命名された抗体を生殖系列フレームワークのみを含むように操作した。生殖系列配列とＣＤ３－ＶＨ－Ｐ配列との間の相違に基づいて段階的な方法でアミノ酸残基を置換するために、他の抗体誘導体を周知の分子クローニング技術によって操作した。各抗体誘導体は、「ＣＤ３－ＶＨ－Ｇ」番号表示を与えられる。表１８を参照されたい。

【０３４０】

ＦＡＣＳアッセイで見られるように、ＣＤ３－ＶＨ－Ｇおよびいくつかの他の操作された抗体はそれらの結合を保持したが、いくつかの抗ＣＤ３抗体は、４０ｎＭのＥＣ５０などの弱い結合から測定不可能な結合で、ヒトまたはカニクイザルＣＤ３にインビトロで結合する。続いて、例示的な抗ＣＤ３抗体を含む二重特異性抗体について、結合親和性、結合動態、ならびに毒性および薬物動態（ｐＫ）プロファイルを解明する他の生物学的特性を調べ、本実施例の方法に従って産生し、本明細書の実施例に詳細に記述する。

【０３４１】

実施例１４：重鎖および軽鎖可変領域（ＣＤＲのアミノ酸配列および核酸配列）

表２２は、選択された本発明の抗ＣＤ３抗体の重鎖可変領域およびＣＤＲのアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表２３に示す。

【０３４２】

アミノ酸配列および核酸配列は、各抗体重鎖配列について決定された。生殖系列配列（配列番号１９１０）に由来する各抗体重鎖には、一貫した命名法のために「Ｇ」番号表示を割り当てた。表２２は、操作された本発明の抗ＣＤ３抗体の重鎖可変領域およびＣＤＲのアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表２３に示す。軽鎖可変領域およびＣＤＲのアミノ酸識別子および核酸配列識別子もまた、それぞれ下記の表２４および２５に同定されている。

【表４２】

表２２：重鎖アミノ酸配列識別子

抗体CD３－VH名	配列番号：			
	HCVR	CDR１	CDR２	CDR３
CD３－VH－G	１７３０	１７３２	１７３４	１７３６
CD３－VH－G２	１７３８	１７４０	１７４２	１７４４
CD３－VH－G３	１７４６	１７４８	１７５０	１７５２
CD３－VH－G４	１７５４	１７５６	１７５８	１７６０
CD３－VH－G５	１７６２	１７６４	１７６６	１７６８
CD３－VH－G８	１７７０	１７７２	１７７４	１７７６
CD３－VH－G９	１７７８	１７８０	１７８２	１７８４
CD３－VH－G１０	１７８６	１７８８	１７９０	１７９２
CD３－VH－G１１	１７９４	１７９６	１７９８	１８００
CD３－VH－G１２	１８０２	１８０４	１８０６	１８０８
CD３－VH－G１３	１８１０	１８１２	１８１４	１８１６
CD３－VH－G１４	１８１８	１８２０	１８２２	１８２４
CD３－VH－G１５	１８２６	１８２８	１８３０	１８３２
CD３－VH－G１６	１８３４	１８３６	１８３８	１８４０
CD３－VH－G１７	１８４２	１８４４	１８４６	１８４８
CD３－VH－G１８	１８５０	１８５２	１８５４	１８５６
CD３－VH－G１９	１８５８	１８６０	１８６２	１８６４
CD３－VH－G２０	１８６６	１８６８	１８７０	１８７２
CD３－VH－G２１	１８７４	１８７６	１８７８	１８８０
CD３－VH－P	１８８２	１８８４	１８８６	１８８８

【表４３】

表２３：重鎖核酸配列識別子

抗体CD３－VH名	配列番号：			
	HCVR	CDR1	CDR2	CDR3
CD3－VH－G	1729	1731	1733	1735
CD3－VH－G2	1737	1739	1741	1743
CD3－VH－G3	1745	1747	1749	1751
CD3－VH－G4	1753	1755	1757	1759
CD3－VH－G5	1761	1763	1765	1767
CD3－VH－G8	1769	1771	1773	1775
CD3－VH－G9	1777	1779	1781	1783
CD3－VH－G10	1785	1787	1789	1791
CD3－VH－G11	1793	1795	1797	1799
CD3－VH－G12	1801	1803	1805	1807
CD3－VH－G13	1809	1811	1813	1815
CD3－VH－G14	1817	1819	1821	1823
CD3－VH－G15	1825	1827	1829	1831
CD3－VH－G16	1833	1835	1837	1839
CD3－VH－G17	1841	1843	1845	1847
CD3－VH－G18	1849	1851	1853	1855
CD3－VH－G19	1857	1859	1861	1863
CD3－VH－G20	1865	1867	1869	1871
CD3－VH－G21	1873	1875	1877	1879
CD3－VH－P	1881	1883	1885	1887

【表４４】

表２４：軽鎖アミノ酸配列識別子

抗体名	配列番号：			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1－39JK5	1890	1892	1894	1896

【表４５】

表２５：軽鎖核酸配列識別子

抗体名	配列番号：			
	LCVR	CDR1	CDR2	CDR3
VK1－39JK5	1889	1891	1893	1895

【０３４３】

「ＣＤ３－Ｌ２Ｋ」と命名された対照１抗体は、既知の抗ＣＤ３抗体（すなわち、ＷＯ２００４／１０６３８０に記載の抗ＣＤ３抗体「Ｌ２Ｋ」）に基づいて構築された。

【０３４４】

本明細書の実施例において言及されるアイソタイプ対照抗体は、無関係の抗原、すなわちＦｅｌＤ１抗原と相互作用するアイソタイプ適合（改変ＩｇＧ４）抗体である。

【０３４５】

実施例１５：ヒトモノクローナル抗ＣＤ３抗体に関するインビトロおよびインビボ試験

ヒトモノクローナル抗ＣＤ３抗体に関するインビボおよびインビトロ試験を、２０１４年３月２７日に公開された米国特許公開第２０１４／００８８２９５号および２０１６年７月２９日に出願されたＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０４４７３２に記載のとおり実施した。

【０３４６】

本発明のいくつかのヒトモノクローナル抗ＣＤ３抗体は、抗体捕捉フォーマットまたは抗原捕捉フォーマットのいずれかで、高い親和性で可溶性ヘテロ二量体ＣＤ３タンパク質に結合する。可溶性ヘテロ二量体ＣＤ３タンパク質（ｈＣＤ３－イプシロン／ｈＣＤ３－デルタ；配列番号１９００／１９０１）は、ヒトＦｃタグ（ｈＦｃΔＡｄｐ／ｈＦｃ；配列番号１９３１／１９３２）またはマウスＦｃタグ（ｍＦｃΔＡｄｐ／ｍＦｃ；配列番号１９３３／１９３４）のいずれかを用いて調製した。ヘテロ二量体ＣＤ３タンパク質は、Ｄａｖｉｓら（ＵＳ２０１０／０３３１５２７）に記載の方法を用いて精製した。

【０３４７】

本発明のいくつかのヒトモノクローナル抗ＣＤ３抗体は、ヒトＴ細胞に結合し、Ｔ細胞増殖を誘導した。本発明のいくつかのヒトモノクローナル抗ＣＤ３抗体はＣＤ２＋ＣＤ４＋サルＴ細胞に結合し、それらの増殖を誘導した。いくつかのヒトモノクローナル抗ＣＤ３抗体は、カルセインベースのＵ９３７死滅アッセイにおいて、Ｆｃ／ＦｃＲ相互作用を介した再指向性のＴ細胞媒介性死滅を支持した。観察された死滅は、隣接するＴ細胞上のＣＤ３のクラスター化をもたらすＵ９３７細胞上のＦｃ受容体との抗体のＦｃ結合に依存すると考えられ、非特異的ヒトＩｇＧの添加によってスケルチされた（データは示さず）。本明細書に記載の抗ＣＤ３アーム変異体（特にＩＧＨＶ３－９＊０１、ＩＧＨＪ６＊０２、ＩＧＨＤ５－１２＊０１由来のＣＤ３－ＶＨ－Ｐ重鎖に基づく抗ＣＤ３アーム）を用いて構築された広範囲の二重特異性抗体は、ヒトＰＢＭＣ細胞およびサルＰＢＭＣを活性化し、腫瘍抗原発現細胞株に対して細胞傷害活性を示す。

【０３４８】

実施例１６：ホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）サンプル上の免疫組織化学（ＩＨＣ）に適した抗ＭＵＣ１６モノクローナル抗体のスクリーニングおよび同定

ＭＵＣ１６発現の既知レベルでのヒト腫瘍細胞株が識別され、１０％中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。これらの系統を用いて種々の抗ＭＵＣ１６抗体をスクリーニングしてＩＨＣ試験の候補を同定した。

【０３４９】

細胞株は、以下のＭＵＣ１６陰性細胞株を含んでいた。

ＨＴ２９（結腸）、およびＰＣ３／ＡＴＣＣ親（前立腺）、低レベルから無レベルのＭＵＣ１６を有する膵臓細胞株、Ｃａｐａｎ１（膵臓腺癌）、ＨＰＡＣ（膵臓腺癌）。

内因的にＭＵＣ１６を発現する細胞株は、ＯＶＣＡＲ３（卵巣）およびＰＥＯ－１（漿液性卵巣癌）を含む。

【０３５０】

次のようにトランスフェクトされた細胞株を操作した：ＰＣ３／ＡＴＣＣ（親前立腺癌株）細胞をＰＣ３／ＭＵＣ１６「ｓｈｏｒｔ」およびＰＣ３／ＭＵＣ１６「ｈｉｇｈ」細胞株を生成するようにトランスフェクトした。両構築物は、アミノ酸１３，８１０～１４，５０７（配列番号１８９９）由来のＭＵＣ１６のＣ末端ドメインを含み、これはＳＥＡ１２ドメインの一部、ＳＥＡ１３、ＳＥＡ１４、ＳＥＡ１５、ＳＥＡ１６、Ｃ末端の非ＳＥＡ領域、膜貫通領域および細胞質ドメインを含む。さらに、ＰＣ３／ＭＵＣ　ｈｉｇｈ細胞は、ＳＥＡ５（部分）からＳＥＡ９まで、およびＳＥＡ９ドメインとＭＵＣ１６　ｓｈｏｒｔ構築物の開始との間の短いリンカーを含む、追加のＮ末端アミノ酸１２７８３～１３４６７（配列番号１８９９）を有する。これにより、反復領域に結合する抗ＭＵＣ１６抗体と、酵素的切断および反復領域の放出後に膜に隣接するＭＵＣ１６の「ｎｕｂ」部分（ＭＵＣ１６のＣＡ１２５部分に類似）に結合する抗ＭＵＣ１６抗体との区別が可能になる。

【０３５１】

全ての染色は、標準的なプロトコルを使用してＶｅｎｔａｎａ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ

ＸＴ自動染色上で行った。細胞ペレットを脱パラフィンし、熱誘発性エピトープ検索を最適化し、内因性ビオチンをブロックし、タンパク質ブロッキングを行った。抗体を初期濃度１０μｇ／ｍｌで手動で適用し、またシグナルの特異性を確実にするために滴定した。ＣＡ－１２５の反復領域に特異的な市販の抗ＭＵＣ１６抗体（ＯＣ－１２５）（Ｒｏｃｈｅ，Ｖｅｎｔａｎａ　カタログ番号７６０－２６１０）、および陰性対照（一次抗体の非存在）に対して比較を行った。検出は、ロバ抗マウスビオチン、続いてストレプトアビジン－西洋ワサビペルオキシダーゼを用いた。基質であるジアミノベンジジン（ＤＡＢ）の変換は褐色染色として観察された。核を可視化するために、サンプルをヘマトキシリンで対比染色した。染色実験の結果を以下の表２６に示す。

【表４６】

表２６：ＭＵＣ１６陰性細胞、およびＭＵＣ１６またはＭＵＣ１６の膜近位部分を発現する細胞に対する抗ＭＵＣ１６抗体の結合

細胞株：	HT29	Capan1	HPAC	OVCAR3	PEO-1	PC3/ATCC親	PC3/MUC16 Short	PC3/MUC16 High
H1M7130N	－	－	－	＋＋＋	＋＋	－	＋＋＋	＋＋＋
H2aM7128N	－	－	＋	＋＋＋	＋＋	－	＋＋＋	＋＋＋
H2aM7131N	－	－	－	＋＋＋	＋＋	－	＋＋＋	＋＋＋
H2aM7133N	－	－	－	＋＋＋	＋＋	－	－	－
H2aM7138N	－	－	＋	＋＋＋	＋＋	－	＋＋＋	＋＋＋
H1M9519N	－	ＮＴ	ＮＴ	＋＋＋	＋＋＋	ＮＴ	－	＋＋＋
H3M9525N	－	ＮＴ	ＮＴ	－	－	ＮＴ	－	－
OC-125	－	－	＋	＋＋＋	＋＋	－	－	＋＋＋
陰性対照	－	－	－	－	－	－	－	－

ＮＴ－未テスト

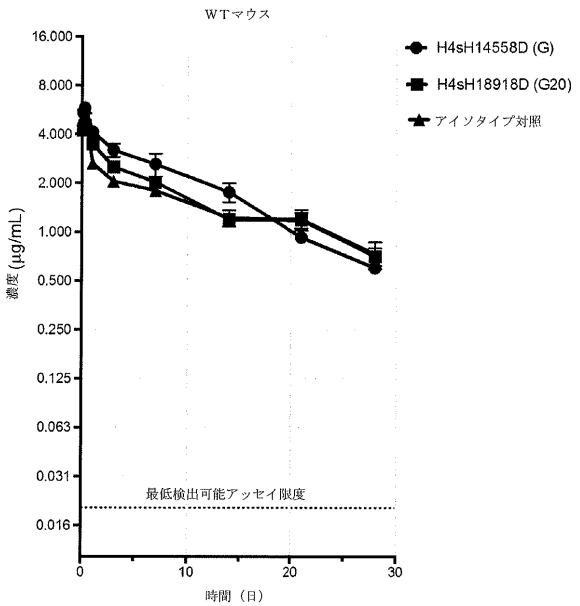
【０３５２】

試験した抗体（Ｈ１Ｍ７１３０Ｎ、Ｈ２ａＭ７１２８Ｎ、Ｈ２ａＭ７１３１Ｎ、およびＨ２ａＭ７１３８Ｎ）の４つは、反復領域（ＰＣ３／ＭＵＣ１６　ｓｈｏｒｔ）を伴わないＭＵＣ１６の「ｎｕｂ」部分を発現する細胞に陽性結合を示した。これらの抗体は「ｎｕｂ結合剤」として同定された。試験した抗体の１つ（Ｈ１Ｍ９５１９Ｎ）は、ＭＵＣ１６の反復領域を発現する細胞（ＰＣ３／ＭＵＣ１６　ｈｉｇｈ）に陽性結合を示したが、ＭＵＣ１６の「ｎｕｂ」部分のみを発現する細胞（ＰＣ３／ＭＵＣ１６　ｓｈｏｒｔ）には陰性結合を示した。この抗体は、市販のＯＣ－１２５抗体と同様に、「反復結合剤」として同定されている。試験した抗体は、本明細書に記載の発現タンパク質および／またはタンパク質断片を有する異なる起源の組織または細胞に結合すると予想される。

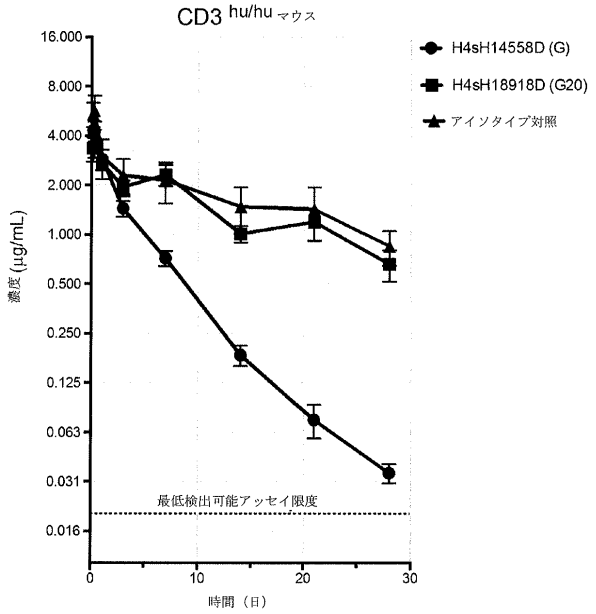
【０３５３】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態によって範囲が限定されるべきではない。実際、本明細書に記載されたものに加えて本発明の様々な修飾は、前述の記載から当業者には明らかである。そのような修正は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

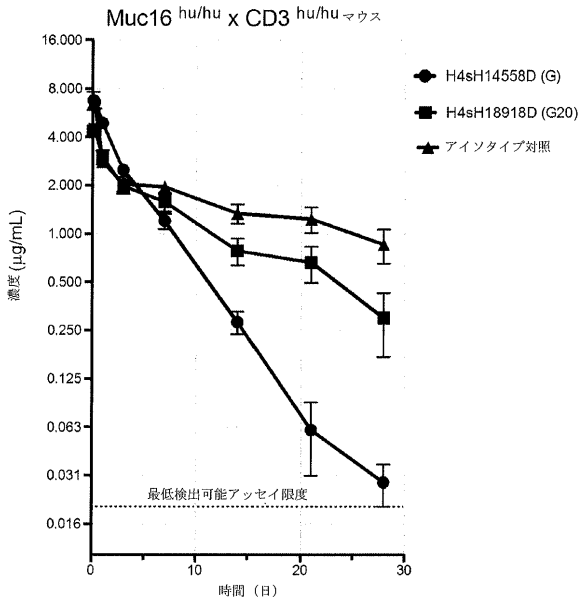
【図１】


WTマウス
16.000
8.000
4.000
2.000
1.000
0.500
0.250
0.125
0.063
0.031
0.016
濃度 (μg/mL)
最低検出可能アッセイ限度
0
10
20
30
時間（日）
H4sH14558D (G)
H4sH18918D (G20)
アイソタイプ対照

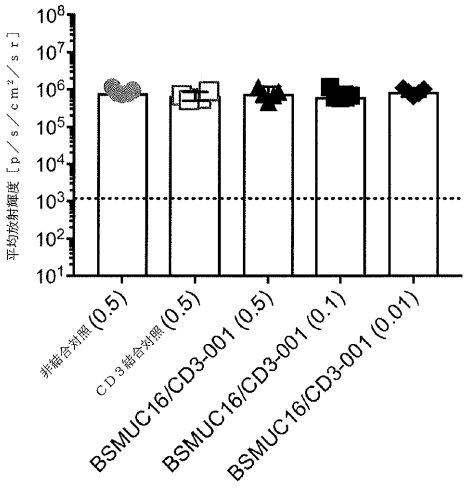
【図２】


CD3 hu/hu マウス
16.000
8.000
4.000
2.000
1.000
0.500
0.250
0.125
0.063
0.031
0.016
濃度 (μg/mL)
最低検出可能アッセイ限度
0
10
20
30
時間（日）
H4sH14558D (G)
H4sH18918D (G20)
アイソタイプ対照

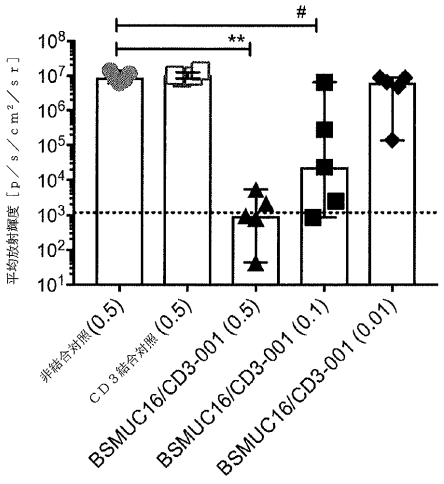
【図３】


Muc16 hu/hu x CD3 hu/hu マウス
16.000
8.000
4.000
2.000
1.000
0.500
0.250
0.125
0.063
0.031
0.016
濃度 (μg/mL)
最低検出可能アッセイ限度
0
10
20
30
時間（日）
H4sH14558D (G)
H4sH18918D (G20)
アイソタイプ対照

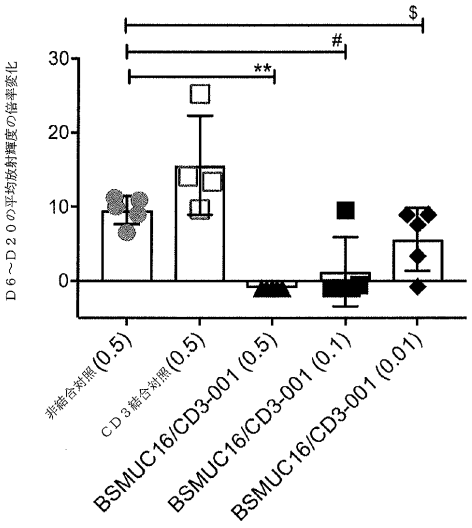
【図４】


平均放射輝度［p／s／cm²／sr］
10⁸
10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
10³
10²
10¹
非結合対照 (0.5)
CD3結合対照 (0.5)
BSMUC16/CD3-001 (0.5)
BSMUC16/CD3-001 (0.1)
BSMUC16/CD3-001 (0.01)

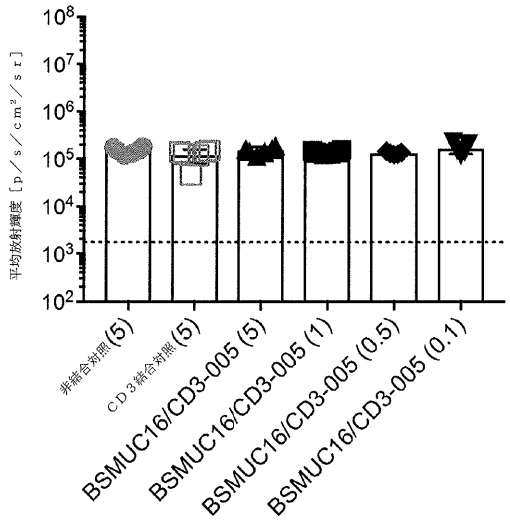
【図５】


平均放射輝度［p／s／cm²／sr］
非結合対照(0.5)
CD3結合対照(0.5)
BSMUC16/CD3-001 (0.5)
BSMUC16/CD3-001 (0.1)
BSMUC16/CD3-001 (0.01)

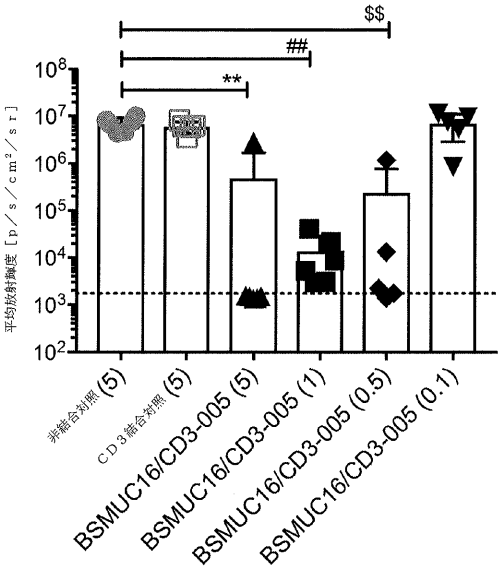
【図６】


D6～D20の平均放射輝度の倍率変化
非結合対照(0.5)
CD3結合対照(0.5)
BSMUC16/CD3-001 (0.5)
BSMUC16/CD3-001 (0.1)
BSMUC16/CD3-001 (0.01)

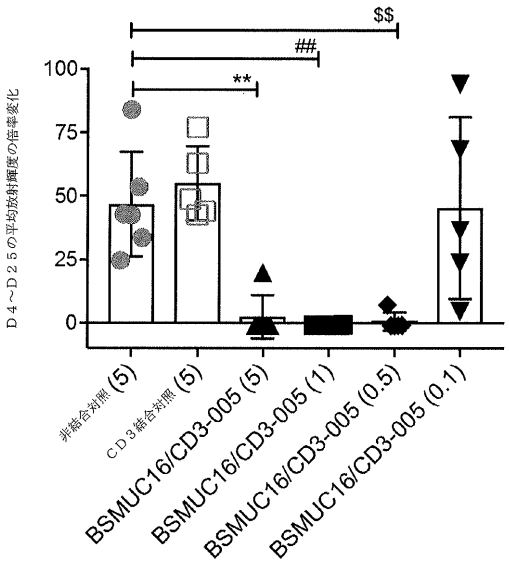
【図７】


平均放射輝度［p／s／cm²／sr］
非結合対照(5)
CD3結合対照(5)
BSMUC16/CD3-005 (5)
BSMUC16/CD3-005 (1)
BSMUC16/CD3-005 (0.5)
BSMUC16/CD3-005 (0.1)

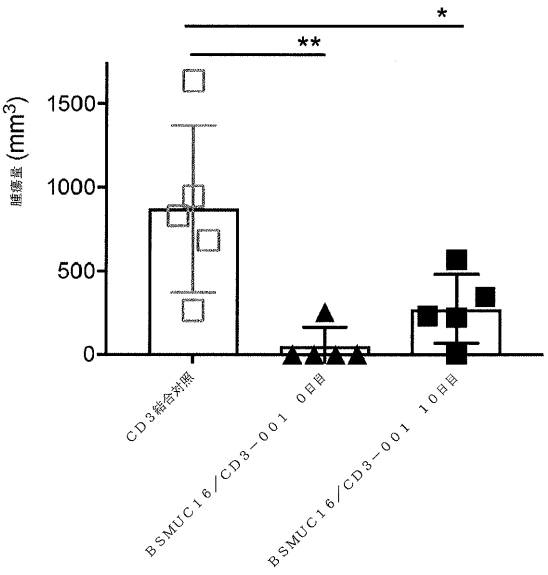
【図８】


平均放射輝度［p／s／cm²／sr］
非結合対照(5)
CD3結合対照(5)
BSMUC16/CD3-005 (5)
BSMUC16/CD3-005 (1)
BSMUC16/CD3-005 (0.5)
BSMUC16/CD3-005 (0.1)

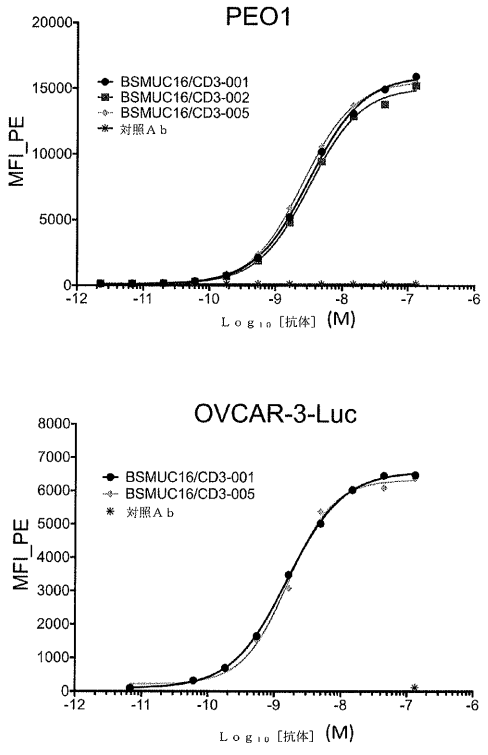
【図９】



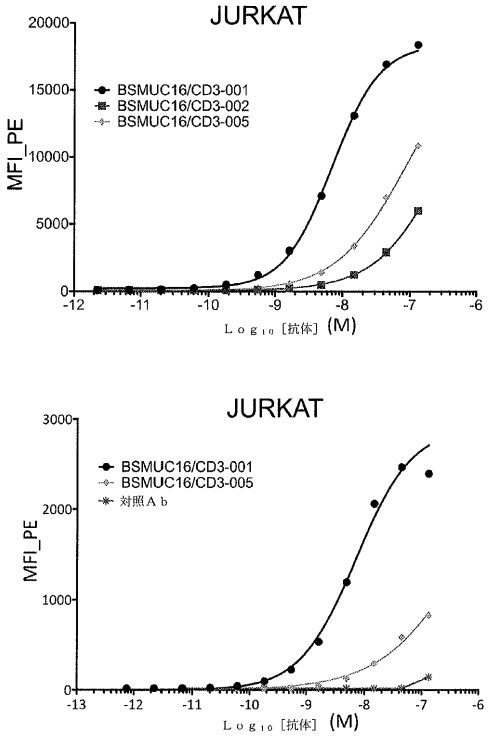
【図１０】



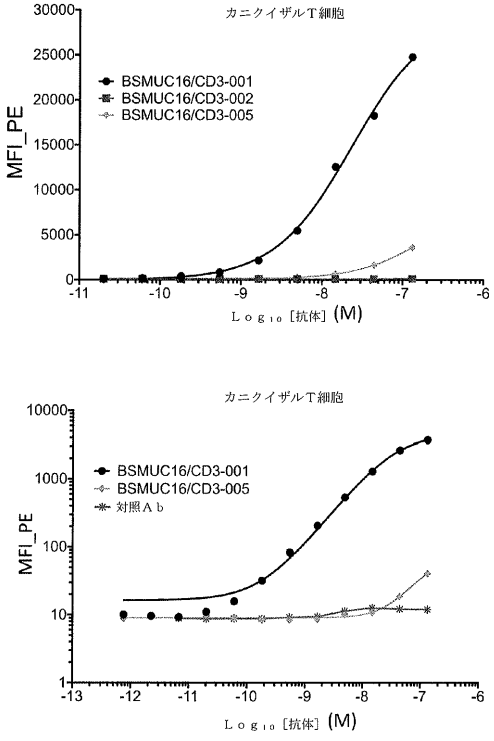
【図１１Ａ】



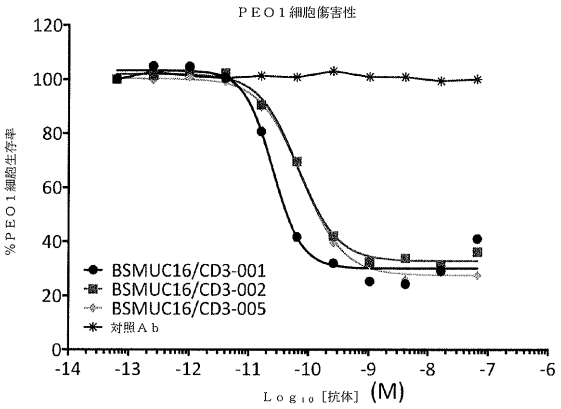
【図１１Ｂ】



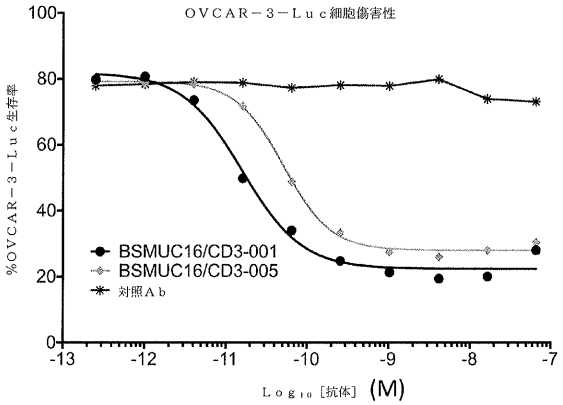
【図１１Ｃ】



【図１２Ａ】



【図１２Ｂ】



【配列表】
2019536740000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成30年3月26日(2018.3.26)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヒトＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する第２の抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子であって、前記第２の抗原結合ドメインは、配列番号１９０２の残基４２８～残基４８１の範囲のエピトープ内のヒトＭＵＣ１６に結合する、二重特異性抗原結合分子。
【請求項２】
ヒトＣＤ３に結合する第１の結合アームと、ヒトＭＵＣ１６に結合する第２の結合アームと、を含む、二重特異性抗体であって、前記第１の結合アームが、配列番号１９６１のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含み、前記第２の結合アームが、配列番号１９５９のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む、二重特異性抗体。
【請求項３】
ヒトＣＤ３に結合する第１の結合アームと、ヒトＭＵＣ１６に結合する第２の結合アームと、を含む、二重特異性抗体であって、前記第１の結合アームが、配列番号１９６２のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含み、前記第２の結合アームが、配列番号１９５９のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号１９６０のアミノ酸配列を含む軽鎖と、を含む、二重特異性抗体。
【請求項４】
２５℃の表面プラズモン共鳴アッセイで測定される、約５３ｎＭ未満の結合解離平衡定数（K_D）値でヒトムチン１６（ＭＵＣ１６）に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体または抗原結合断片が、ＳＥＡ１３、ＳＥＡ１４、またはＳＥＡ１５内のヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。
【請求項５】
２５℃の表面プラズモン共鳴アッセイで測定される、約１５分超の解離半減期（ｔ１／２）でヒトＭＵＣ１６に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片。
【請求項６】
前記抗体またはその抗原結合断片が、ヒトＭＵＣ１６との結合について、表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と競合する、請求項４または５に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項７】
前記参照抗体が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む、請求項６に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項８】
前記抗体またはその抗原結合断片が、表１に記載のＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と同じヒトＭＵＣ１６上のエピトープに結合する、請求項４～７のいずれ

か一項に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項９】
前記抗体またはその抗原結合断片が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む参照抗体と同じヒトＭＵＣ１６上のエピトープに結合する、請求項８に記載の抗体または抗原結合断片。
【請求項１０】
ヒトＭＵＣ１６に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体または抗原結合断片が、（ａ）表１に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）の相補性決定領域（ＣＤＲ）と、（ｂ）表１に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）のＣＤＲと、を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。
【請求項１１】
前記抗体または抗原結合断片が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む、請求項１０に記載の単離された抗体または抗原結合断片。
【請求項１２】
前記抗体または抗原結合断片が、配列番号４－６－８－１２－１４－１６、２０－２２－２４－２８－３０－３２、３６－３８－４０－４４－４６－４８、５２－５４－５６－６０－６２－６４、６８－７０－７２－７６－７８－８０、８４－８６－８８－９２－９４－９６、１００－１０２－１０４－１０８－１１０－１１２、１１６－１１８－１２０－１２４－１２６－１２８、１３２－１３４－１３６－１４０－１４２－１４４、１４８－１５０－１５２－１５６－１５８－１６０、１６４－１６６－１６８－１７２－１７４－１７６、１８０－１８２－１８４－１８８－１９０－１９２、１９６－１９８－２００－３９６－３９８－４００、２０４－２０６－２０８－２１２－２１４－２１６、２２０－２２２－２２４－２２８－２３０－２３２、２３６－２３８－２４０－２４４－２４６－２４８、２５２－２５４－２５６－１９３８－１９４０－１９４２、２６０－２６２－２６４－２６８－２７０－２７２、２７６－２７８－２８０－１９３８－１９４０－１９４２、２８４－２８６－２８８－２９２－２９４－２９６、３００－３０２－３０４－３０８－３１０－３１２、３１６－３１８－３２０－３２４－３２６－３２８、３３２－３３４－３３６－３４０－３４２－３４４、３４８－３５０－３５２－３５６－３５８－３６０、３６４－３６６－３６８－３７２－３７４－３７６、および３８０－３８２－３８４－３８８－３９０－３９２からなる群から選択されるＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３ドメインをそれぞれ含む、請求項１１に記載の単離された抗体または抗原結合断片。
【請求項１３】
ヒトＭＵＣ１６に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体または抗原結合断片が、（ａ）配列番号２、１８、３４、５０、６６、８２、９８、１１４、１３０、１４６、１６２、１７８、１９４、２０２、２１８、２３４、２５０、２５８、２７４、２８２、２９８、３１４、３３０、３４６、３６２、および３７８からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）と、（ｂ）配列番号１０、２６、４２、５８、７４、９０、１０６、１２２、１３８、１５４、１７０、１８６

、２１０、２２６、２４２、２６６、２９０、３０６、３２２、３３８、３５４、３７０、３８６、１９３６、および３９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）と、を含む、単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項１４】

前記抗体または抗原結合断片が、配列番号２／１０、１８／２６、３４／４２、５０／５８、６６／７４、８２／９０、９８／１０６、１１４／１２２、１３０／１３８、１４６／１５４、１６２／１７０、１７８／１８６、１９４／３９４、２０２／２１０、２１８／２２６、２３４／２４２、２５０／１９３６、２５８／２６６、２７４／１９３６、２８２／２９０、２９８／３０６、３１４／３２２、３３０／３３８、３４６／３５４、３６２／３７０、および３７８／３８６からなる群から選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対を含む、請求項１３に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【請求項１５】

配列番号１９０２の残基４２８～残基４８１の範囲のエピトープ内のヒトＭＵＣ１６に結合する、請求項４に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【請求項１６】

配列番号１９０２のアミノ酸残基４２８～４３４、４２９～４３４、４５３～４６７、４５９～４６７、４６０～４６７、および／または４７４～４８１と相互作用する、請求項１５に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

【請求項１７】

ヒトＣＤ３に結合する第１の抗原結合ドメインと、ヒトＭＵＣ１６に結合する第２の抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子であって、前記第２の抗原結合ドメインが、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片に由来する、二重特異性抗原結合分子。

【請求項１８】

前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３を発現するヒト細胞およびカニクイザルＣＤ３を発現するカニクイザル細胞に結合する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項１９】

前記抗原結合分子が、ヒトＣＤ３およびヒトＭＵＣ１６の両方に結合し、ＭＵＣ１６発現細胞のＴ細胞媒介性細胞死滅を誘導する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２０】

前記抗原結合分子が、ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける腫瘍増殖を阻害する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２１】

前記抗原結合分子が、ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける既存腫瘍の腫瘍増殖を抑制する、請求項１または請求項１７に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２２】

前記抗原結合分子が、インビトロＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅アッセイで測定される、約３１ｐＭ未満のEC_{50}値でＴ細胞媒介性腫瘍細胞死滅を誘導する、請求項１または１７～２１のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２３】

前記第２の抗原結合ドメインが、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定される、約７ｎＭ未満のK_D値でヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する、請求項１または１７～２２のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項２４】

前記第２の抗原結合ドメインが、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定される、約５ｎＭ未満、約２ｎＭ未満、約１ｎＭ未満、約８００ｐＭ未満、または約６００ｐＭ未満のK_D値で各ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する、請求項１または１７～２３の

いずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２５】
二重特異性抗体またはその二重特異性抗原結合断片である、請求項１または１７～２４のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２６】
ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、配列番号２、１８、３４、５０、６６、８２、９８、１１４、１３０、１４６、１６２、１７８、１９４、２０２、２１８、２３４、２５０、２５８、２７４、２８２、２９８、３１４、３３０、３４６、３６２、および３７８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、配列番号１０、２６、４２、５８、７４、９０、１０６、１２２、１３８、１５４、１７０、１８６、２１０、２２６、２４２、２６６、２９０、３０６、３２２、３３８、３５４、３７０、３８６、１９３６、および３９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）と、を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２７】
ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ３）を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ１が、配列番号４、２０、３６、５２、６８、８４、１００、１１６、１３２、１４８、１６４、１８０、１９６、２０４、２２０、２３６、２５２、２６０、２７６、２８４、３００、３１６、３３２、３４８、３６４、および３８０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２が、配列番号６、２２、３８、５４、７０、８６、１０２、１１８、１３４、１５０、１６６、１８２、１９８、２０６、２２２、２３８、２５４、２６２、２７８、２８６、３０２、３１８、３３４、３５０、３６６、および３８２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３が、配列番号８、２４、４０、５６、７２、８８、１０４、１２０、１３６、１５２、１６８、１８４、２００、２０８、２２４、２４０、２５６、２６４、２８０、３０４、３２０、３３６、３５２、３６８、および３８４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１が、配列番号１２、２８、４４、６０、７６、９２、１０８、１２４、１４０、１５６、１７２、１８８、３９６、２１２、２２８、２４４、３９６、２６８、３９６、２９２、３０８、３２４、３４０、３５６、３７２、１９３８、および３８８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２が、配列番号１４、３０、４６、６２、７８、９４、１１０、１２６、１４２、１５８、１７４、１９０、３９８、２１４、２３０、２４６、３９８、２７０、３９８、２９４、３１０、３２６、３４２、３５８、３７４、１９４０、および３９０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３が、配列番号１６、３２、４８、６４、８０、９６、１１２、１２８、１４４、１６０、１７６、１９２、４００、２１６、２３２、２４８、４００、２７２、４００、２９６、３１２、３２８、３４４、３６０、３７６、１９４２、および３９２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２８】
ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、配列番号１８／２６を含むＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２９】
ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、表１６、表１８、または表２２に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、表１、表１６、表１９、または表

２４に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）と、を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３０】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択される重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）由来の重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、およびＨＣＤＲ３）と、配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）由来の軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、およびＬＣＤＲ３）と、を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３１】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ１は配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３２】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、配列番号１７３０／２６、１７６２／２６、１７７８／２６、１７８６／２６、および１８６６／２６からなる群より選択されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲアミノ酸配列対の重鎖ＣＤＲおよび軽鎖ＣＤＲを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項３３】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含み、ヒトＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合ドメインが、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ３）を含み、

Ａ１－ＨＣＤＲ１は、配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は、配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は、配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含み、

Ａ２－ＨＣＤＲ１は配列番号２０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２は配列番号２２のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３は配列番号２４のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

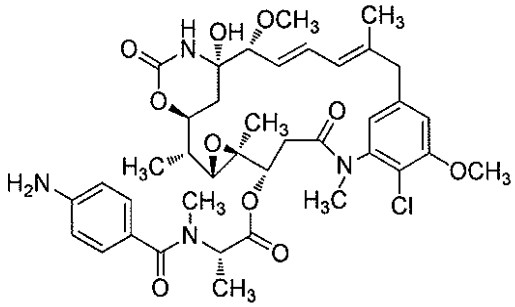
【請求項３４】

ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、ＦＲ１（配列番号１９０３）、ＦＲ２（配列番号１９０４）、ＦＲ３（配列番号１９０５）、およびＦＲ４（配

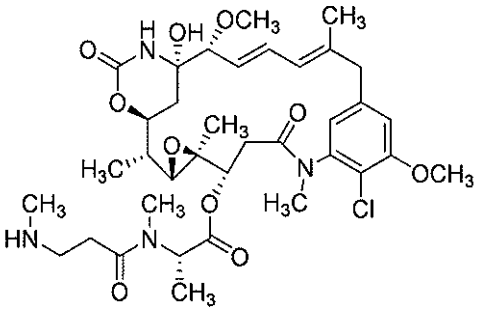
列番号１９０６）から選択されるアミノ酸配列を有する可変ドメインフレームワーク領域を含む重鎖を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３５】
ヒトＣＤ３に特異的に結合する前記第１の抗原結合ドメインが、配列番号１９０７－１９０８－１９０９のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３を含むＨＣＶＲを含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３６】
前記第２の抗原結合ドメインが、ヒトＭＵＣ１６との結合について、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ２－ＨＣＤＲ１、Ａ２－ＨＣＤＲ２、およびＡ２－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ２－ＬＣＤＲ１、Ａ２－ＬＣＤＲ２、およびＡ２－ＬＣＤＲ３）を含む参照抗原結合タンパク質と競合し、Ａ２－ＨＣＤＲ１は配列番号２０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ２は配列番号２２のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＨＣＤＲ３は配列番号２４のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ２－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３７】
前記第２の抗原結合ドメインが、ヒトＭＵＣ１６との結合について、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、および配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む参照抗原結合タンパク質と競合する、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３８】
前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３との結合について、３つの重鎖相補性決定領域（Ａ１－ＨＣＤＲ１、Ａ１－ＨＣＤＲ２、およびＡ１－ＨＣＤＲ３）ならびに３つの軽鎖相補性決定領域（Ａ１－ＬＣＤＲ１、Ａ１－ＬＣＤＲ２、およびＡ１－ＬＣＤＲ３）を含む参照抗原結合タンパク質と競合し、Ａ１－ＨＣＤＲ１は配列番号１７３２、１７６４、１７８０、１７８８、および１８６８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ２は、配列番号１７３４、１７６６、１７８２、１７９０、および１８７０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＨＣＤＲ３は、配列番号１７３６、１７６８、１７８４、１７９２、および１８７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ１は配列番号２８のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ２は配列番号３０のアミノ酸配列を含み、Ａ１－ＬＣＤＲ３は配列番号３２のアミノ酸配列を含む、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３９】
前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３との結合について、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、および配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合する、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４０】
前記第１の抗原結合ドメインが、ヒトＣＤ３との結合について、配列番号１７３０、１７６２、１７７８、１７８６、および１８６６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、および配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む参照抗原結合タンパク質と競合し、前記第２の抗原結合ドメインが、ヒトＭＵＣ１６との結合について、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）および配列番号２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）を含む参照抗原結合タンパク質と競合する、請求項１または１７～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項４１】
ＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号１８９９の残基１３７９１～１４４５１に対応するヒトＭＵＣ１６の５つの膜近位ＳＥＡドメインのうちの１つ以上のヒトＭＵＣ１６に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４２】
ＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号１８９９の残基１３８１０～１４４５１のヒトＭＵＣ１６に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４３】
ＭＵＣ１６に特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、ヒトＭＵＣ１６のＳＥＡ１、ＳＥＡ２、ＳＥＡ３、ＳＥＡ４、ＳＥＡ５、ＳＥＡ６、ＳＥＡ７、ＳＥＡ８、ＳＥＡ９、ＳＥＡ１０、ＳＥＡ１１、ＳＥＡ１２、ＳＥＡ１３、ＳＥＡ１４、ＳＥＡ１５、またはＳＥＡ１６のうちのいずれか１つ以上に結合する抗原結合ドメインを含む、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４４】
請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、医薬組成物。
【請求項４５】
請求項１または１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、医薬組成物。
【請求項４６】
対象における癌を治療する方法であって、請求項４４または４５に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項４７】
前記癌が、卵巣癌、乳癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、肝内胆管細胞癌腫瘤形成型、子宮頸部の腺癌、および胃腸管の腺癌からなる群から選択される、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】
前記癌が卵巣癌である、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
抗ＭＵＣ１６抗体またはその抗原結合断片および細胞傷害性薬剤を含む、抗体－薬物複合体（ＡＤＣ）であって、前記抗体または抗原結合断片および前記細胞傷害性薬剤がリンカーを介して共有結合的に付着する、抗体－薬物複合体。
【請求項５０】
前記抗ＭＵＣ１６抗体または抗原結合断片が、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合断片である、請求項４９に記載のＡＤＣ。
【請求項５１】
前記細胞傷害性薬剤が、アウリスタチン、メイタンシノイド、ツブリシン、トマイマイシン誘導体、またはドラスタチン誘導体から選択される、請求項４９または５０に記載のＡＤＣ。
【請求項５２】
前記細胞傷害性薬剤が、ＭＭＡＥもしくはＭＭＡＦから選択されるアウリスタチン、またはＤＭ１もしくはＤＭ４から選択されるメイタンシノイドである、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。
【請求項５３】
前記細胞傷害性薬剤が、式（Ｉ）または式（ＩＩ）の構造を有するメイタンシノイドである、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。
【請求項５４】
前記メイタンシノイドが次式である、請求項５３に記載のＡＤＣ。

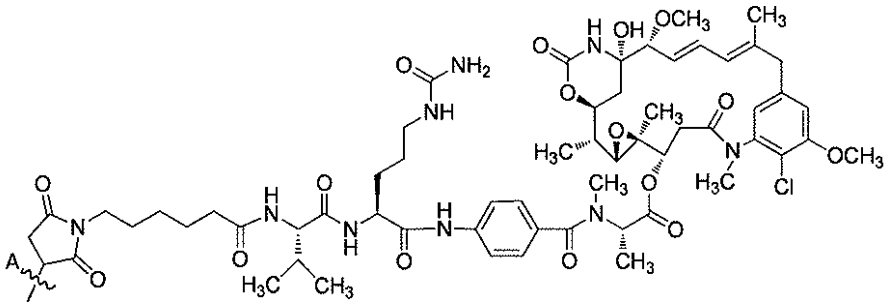
【化１】



【請求項５５】
前記メイタンシノイドが次式である、請求項５３に記載のＡＤＣ。
【化２】



【請求項５６】
抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式を含み、
【化３】

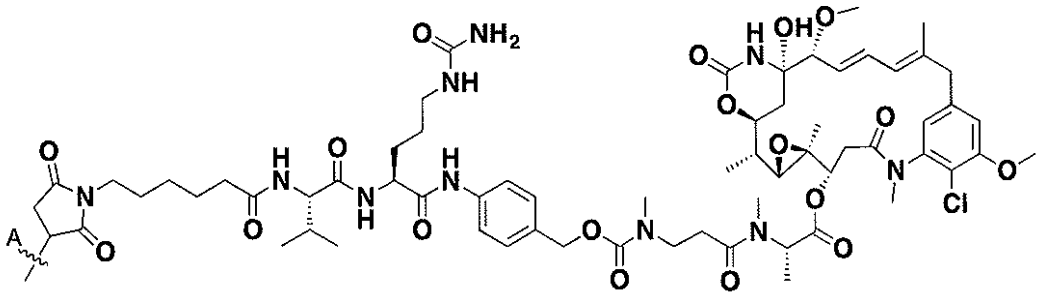


式中、
【化４】



が前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。
【請求項５７】
抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式を含み、

【化５】



式中、

【化６】

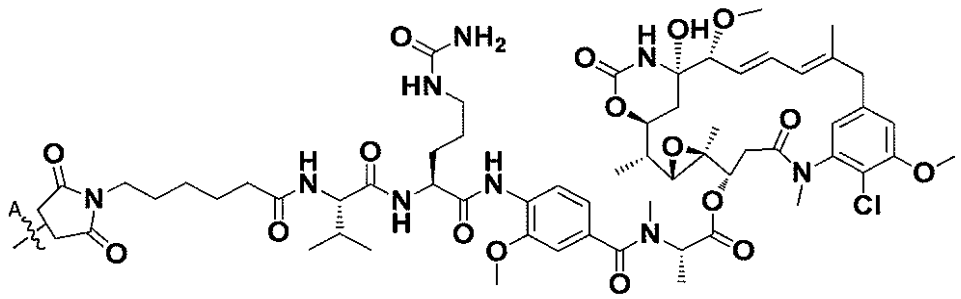


が前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

【請求項５８】

抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式を含み、

【化７】



式中、

【化８】



が前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

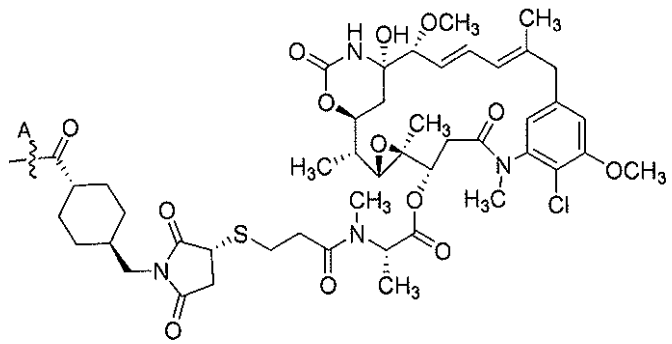
【請求項５９】

結合がシステイン残基の硫黄成分を介して前記抗体またはその断片に接触する、請求項５６～５８のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

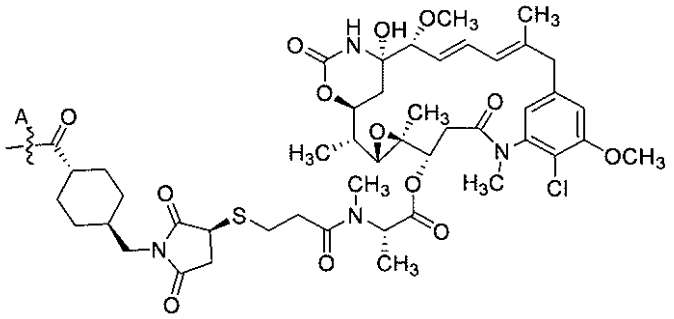
【請求項６０】

抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片と、次式

【化９】



、または



、または

それらの混合物と、を含み、

式中、

【化１０】



が前記抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片への結合である、請求項４９～５１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

【請求項６１】

前記結合が、リジン残基の窒素成分を介して前記抗体またはその断片に接触する、請求項６０に記載のＡＤＣ。

【請求項６２】

前記ＡＤＣが、抗ＭＵＣ１６抗体またはその断片あたり１～４つの細胞傷害性薬剤を含む、請求項４９～６１のいずれか一項に記載のＡＤＣ。

【請求項６３】

請求項４９～６２のいずれか一項に記載の抗体－薬物複合体および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む、薬学的組成物。

【請求項６４】

ＭＵＣ１６の発現に関連する疾患または障害の治療における、請求項４４、４５または６３のいずれか一項に記載の薬学的組成物の使用。

【請求項６５】

前記疾患または障害が癌である、請求項６４に記載の使用。

【請求項６６】

医薬に使用するための、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または請求項１もしくは１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子を含む、化合物。

【請求項６７】

任意に前記癌が卵巣癌であり、前記化合物が、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または請求項１もしくは１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子を含む、癌の治療における使用のための化合物。

【請求項６８】

癌の治療に使用するための薬剤を製造するための、請求項４～１６のいずれか一項に記載の抗体もしくは抗原結合断片、または請求項１もしくは１７～４３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子の使用であって、任意選択に前記癌が卵巣癌である、使用。

【請求項６９】

薬剤に使用するための請求項４９～６２のいずれか一項に記載のＡＤＣを含む、化合物。

【請求項７０】

任意選択に前記癌が卵巣癌であり、前記化合物が、請求項４９～６２のいずれか一項に記載のＡＤＣを含む、癌の治療における使用のための化合物。

【請求項７１】

癌の治療で使用するための薬剤を製造するための請求項４９～６２のいずれか一項に記載のＡＤＣの使用であって、任意選択に前記癌が卵巣癌である、使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/053113

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/44 C07K16/46
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/149368 A1 (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER [US]) 22 September 2016 (2016-09-22) See 369, claims -----	1-3, 17-43, 45-48, 64-68
X,P	WO 2017/053856 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 30 March 2017 (2017-03-30) the whole document -----	1-3, 17-43, 45-48, 64-68

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 November 2017	26/01/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Nauche, Stéphane

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

International application No.
PCT/US2017/053113

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
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).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3, 17-43(completely); 45-48, 64-68(partially)

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2017/053113

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-3, 17-43(completely); 45-48, 64-68(partially)

   Bispecific antibodies (bsAbs) that bind to both MUC16 and CD3 and activate T cells via the CD3 complex in the presence of MUC16-expressing tumors. Pharmaceutical compositions containing the antibodies and their applications in cancer therapy.

   ---

2. claims: 4-16, 44(completely); 45-48, 64-68(partially)

   Anti MUC16-antibodies. Pharmaceutical compositions containing the antibodies and their applications in cancer therapy.

   ---

3. claims: 49-63, 69-71(completely); 45-48, 64, 65(partially)

   Anti-MUC16 antibody drug conjugates. Pharmaceutical compositions containing the antibodies and their applications in cancer therapy.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/053113

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016149368 A1	22-09-2016	AU 2016233309 A1	12-10-2017
		CA 2979976 A1	22-09-2016
		EP 3271398 A1	24-01-2018
		KR 20170128525 A	22-11-2017
		SG 11201707538X A	30-10-2017
		WO 2016149368 A1	22-09-2016
WO 2017053856 A1	30-03-2017	TW 201726713 A	01-08-2017
		WO 2017053856 A1	30-03-2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		テーマコード（参考）
A61K	***38/07***	***(2006.01)***	A61K	47/68	4H045
A61K	***31/537***	***(2006.01)***	A61K	38/07	
A61K	***38/05***	***(2006.01)***	A61K	31/537	
A61K	***31/551***	***(2006.01)***	A61K	38/05	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	A61K	31/551	
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12N	15/13	
			C12P	21/08	

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

(72)発明者 ラウリック・ハーバー
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 エリック・スミス
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 マーカス・ケリー
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 ジェシカ・アール・カーシュナー
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 サンドラ・クッツェー
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 アリソン・クロフォード
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 トーマス・ニトリ
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
(72)発明者 ヤシュ・リウ
アメリカ合衆国ニューヨーク州１０５９１．タリータウン．オールドソーミルリバーロード７７７．リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

Ｆターム(参考) 4B064 AG27 BJ12 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01
4C076 AA95 BB11 CC27 EE41 FF70 GG50
4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 BA08 BA14 BA16 BA23 BA32 CA59
DA27 NA13 NA14 ZB261 ZB262
4C085 AA14 AA21 BB01 CC23 DD62 EE01 EE03
4C086 AA01 AA02 AA03 CB11 CB22 MA02 MA04 NA13 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26