

(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2021-524255

(P2021-524255A)

(43) 公表日 令和3年9月13日 (2021.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-565399 (P2020-565399)	(71) 出願人	509087759
(86) (22) 出願日	令和1年5月21日 (2019.5.21)		ヤンセン バイオテック, インコーポレー
(85) 翻訳文提出日	令和3年1月14日 (2021.1.14)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/IB2019/054184		アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0 4
(87) 国際公開番号	W02019/224713		4 ホーシヤム・リッジビュードライブ 8 0
(87) 国際公開日	令和1年11月28日 (2019.11.28)		0 / 8 5 0
(31) 優先権主張番号	62/675, 957	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成30年5月24日 (2018.5.24)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100093676
			弁理士 小林 純子
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 単一特異性及び二重特異性抗体抗-TME F F 2 抗体並びにそれらの使用

(57) 【要約】

本明細書に提供される開示は、単一特異性及び多重特異性抗 TME F F 2 抗体、並びに記載の抗体を産生及び使用する方法に関する。

FIG. 1

```

25      EVQLLESGGGLVQR-GGSLRPSCAASGFTFS
27      EVQLLESGGGLVQFPGGSLRLSCAASGFTFS
87      EVQLLESGGGLVQF-GGSLRLSCAASGFTFS
89      EVQLLESGGGLVQF-GGSLRLSCAASGFTFS
*****

25      SYSMSWVRQAPKGLEWSVISGGGFTDY
27      SYSMSWVRQAPKGLEWSVISGGGFTDY
87      SYSMSWVRQAPKGLEWSVISGGGFTDY
89      SYSMSWVRQAPKGLEWSVISGGGFTDY
*****

25      ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLHMNSLAED
27      ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLAED
87      ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLAED
89      ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLHMNSLAED
*****

25      TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGTLVTVSS
27      TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGTLVTVSS
87      TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGTLVTVSS
89      TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGTLVTVSS
*****

```

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

TMEFF2 の配列番号 110 の膜近位領域に結合する、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記抗体又は前記その抗原結合断片が、TMEFF2 の前記膜近位領域への結合に関して、

a) 配列番号 25 の重鎖可変領域 (VH) 及び配列番号 28 の軽鎖可変領域 (VL)、又は

b) 配列番号 26 の VH 及び配列番号 29 の VL、

c) 配列番号 27 の VH 及び配列番号 30 の VL、

d) 配列番号 26 の VH 及び配列番号 31 の VL、

e) 配列番号 87 の VH 及び配列番号 88 の VL、又は

f) 配列番号 89 の VH 及び配列番号 90 の VL、

を含む参照抗体と競合する、請求項 1 に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

前記抗体又は前記その抗原結合断片が、残基 H G K C E H S I N M Q E P S C (配列番号 57) 又は D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L (配列番号 58) 内で TMEFF2 の前記膜近位領域に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

a) それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 22、

b) それぞれ配列番号 11、13、16、19、21、及び 23、

c) それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24、

d) それぞれ配列番号 11、13、16、18、20、及び 22、又は

e) それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86、

の重鎖相補性決定領域 1 (HCDR1)、HCDR2、HCDR3、軽鎖相補性決定領域 1 (LCDR1)、LCDR2、及び LCDR3 を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

前記抗体又は前記その抗原結合断片が、約 0.4×10^{-9} M 以下の平衡解離定数 (K_D) で TMEFF2 の前記膜近位領域に結合し、前記 K_D が、室温で pH 4.5～5.0 の酢酸緩衝液中の表面プラズモン共鳴を使用して測定される、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

前記抗体又は前記その抗原結合断片が、約 0.1×10^{-10} M～約 0.4×10^{-9} M の前記 K_D で TMEFF2 の前記膜近位領域に結合する、請求項 5 に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 7】

VH3__3-23 (配列番号 53) 又は VH1__1-69 (配列番号 54) に由来する重鎖可変領域 (VH) フレームワークを含む、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

VKI__L11 (配列番号 55) 又は VKI I I I __A27 (配列番号 56) に由来する軽鎖可変領域 (VL) フレームワークを含む、請求項 7 に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

a) それぞれ配列番号 53 の VH3__3-23 及び配列番号 55 の VKI__L11、

b) それぞれ配列番号 54 の VH1__1-69 及び配列番号 56 の VKI I I I __A27

、又は

c) それぞれ配列番号 54 の V H 1 __ 1 - 6 9 及び配列番号 55 の V K I __ L 1 1 に由来する V H フレームワーク及び V L フレームワークを含む、請求項 8 に記載の単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 10】

- a) 配列番号 25 の V H 及び配列番号 28 の V L 、
- b) 配列番号 26 の V H 及び配列番号 29 の V L 、
- c) 配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L 、
- d) 配列番号 26 の V H 及び配列番号 31 の V L 、
- e) 配列番号 87 の V H 及び配列番号 88 の V L 、 又は
- f) 配列番号 89 の V H 及び配列番号 90 の V L 、

を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 11】

前記抗体が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 アイソタイプである、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 12】

- a) 配列番号 32 の重鎖 (H C) 及び配列番号 35 の軽鎖 (L C) 、
- b) 配列番号 33 の H C 及び配列番号 36 の L C 、
- c) 配列番号 34 の H C 及び配列番号 37 の L C 、
- d) 配列番号 33 の H C 及び配列番号 38 の L C 、
- e) 配列番号 91 の H C 及び配列番号 92 の L C 、 又は
- f) 配列番号 93 の H C 及び配列番号 94 の L C 、

を含む、請求項 11 に記載の単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 13】

a) それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 22 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、

b) 配列番号 25 の V H 及び配列番号 28 の V L、並びに／又は

c) 配列番号 32 の H C 及び配列番号 35 の L C、

を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 14】

a) それぞれ配列番号 11、13、16、19、21、及び 23 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、

b) 配列番号 26 の V H 及び配列番号 29 の V L、並びに／又は

c) 配列番号 33 の H C 及び配列番号 36 の L C、

を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 15】

a) それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、

b) 配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L、並びに／又は

c) 配列番号 34 の H C 及び配列番号 37 の L C、

を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 16】

a) それぞれ配列番号 11、13、16、18、20、及び 22 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、

b) 配列番号 26 の V H 及び配列番号 31 の V L、並びに／又は

c) 配列番号 33 の H C 及び配列番号 38 の L C、

を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 17】

50

- a) それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3、
b) 配列番号 87 の VH 及び配列番号 88 の VL、並びに／又は
c) 配列番号 91 の HC 及び配列番号 92 の LC、
を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 18】

- a) それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3、
b) 配列番号 89 の VH 及び配列番号 90 の VL、並びに／又は
c) 配列番号 93 の HC 及び配列番号 94 の LC、
を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項 19】

前記抗体が、多重特異性抗体である、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体。

【請求項 20】

前記抗体が、二重特異性抗体である、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体。

【請求項 21】

前記抗体が、CD3、所望により CD3 イプシロンに結合する、請求項 19 又は 20 に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体。

20

【請求項 22】

請求項 1～21 のいずれか一項に記載の抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片と、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項 23】

1 つ又は 2 つ以上の異種分子にコンジュゲートした、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 24】

a) 請求項 13～18 のいずれか一項に記載の抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片をコードし、

b) 配列番号 25、26、27、87、若しくは 89 の前記抗 TMEFF2 抗体 VH、及び／又は配列番号 28、29、30、31、88、若しくは 90 の VL をコードし、

c) 配列番号 39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、95、96、97、98、99、100、101、又は 102 のポリヌクレオチド配列を含む、

単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 25】

請求項 24 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 26】

請求項 25 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 27】

請求項 13～18 のいずれか一項に記載の抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、前記抗体が発現する条件下で請求項 26 に記載の宿主細胞を培養することと、前記宿主細胞によって産生された前記抗体を回収することを含む、方法。

40

【請求項 28】

TMEFF2 陽性癌の治療を必要とする対象において TMEFF2 陽性癌を治療する方法であって、治療に有効な量の請求項 1～21 のいずれか一項に記載の単離された抗 TMEFF2 抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 22 に記載の医薬組成物を、前記対象に投与して、前記 TMEFF2 陽性癌を治療することを含む、方法。

【請求項 29】

前記 TMEFF2 陽性癌が、前立腺癌である、請求項 28 に記載の方法。

50

【請求項 30】

前記前立腺癌が、再発性、難治性、悪性、若しくは去勢抵抗性前立腺癌、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片が、第 2 の治療剤と組み合わせて投与される、請求項 28～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 2 の治療剤が、手術、化学療法、アンドロゲン遮断療法、若しくは放射線、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

請求項 13～18 のいずれか一項に記載の抗体に結合する、抗イディオタイプ抗体。

【請求項 34】

請求項 13～18 のいずれか一項に記載の抗体を含む、キット。

【請求項 35】

TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 36】

前記抗体が、TMEFF2 の配列番号 110 の前記膜近位領域に結合する、請求項 35 に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 37】

前記抗体が、TMEFF2 の前記膜近位領域への結合に関して、

- a) 配列番号 25 の重鎖可変領域 (VH) 及び配列番号 28 の軽鎖可変領域 (VL)、又は
 - b) 配列番号 26 の VH 及び配列番号 29 の VL、
 - c) 配列番号 27 の VH 及び配列番号 30 の VL、
 - d) 配列番号 26 の VH 及び配列番号 31 の VL、
 - e) 配列番号 87 の VH 及び配列番号 88 の VL、又は
 - f) 配列番号 89 の VH 及び配列番号 90 の VL、
- を含む、参照抗体と競合する、請求項 35 又は 36 に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 38】

前記抗体が、残基 H G K C E H S I N M Q E P S C (配列番号 57) 又は D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L (配列番号 58) 内で TMEFF2 の前記膜近位領域に結合する、請求項 35～37 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 39】

前記抗体が、約 0.4×10^{-9} M 以下の解離定数 (K_D) で TMEFF2 の前記膜近位領域に結合し、前記 K_D が、室温で pH 4.5～5.0 の酢酸緩衝液中の表面プラズモン共鳴を使用して測定される、請求項 35～38 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 40】

前記抗体が、約 0.1×10^{-10} M～約 0.4×10^{-9} M の前記 K_D でヒト TMEFF2 の前記膜近位領域に結合する、請求項 39 に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 41】

前記第 1 のドメインが、

- a) それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 22、
- b) それぞれ配列番号 11、13、16、19、21、及び 23、
- c) それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24、
- d) それぞれ配列番号 11、13、16、18、20、及び 22、又は

e) それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86、
の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を
含む、請求項 35～40 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF2 /
抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 42】

前記第 2 のドメインが、

a) それぞれ配列番号 60、61、62、63、64、及び 65、又は
b) それぞれ配列番号 68、69、70、71、72、及び 73、
の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を
含む、請求項 41 に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその
抗原結合断片。

10

【請求項 43】

前記第 1 のドメインが、

a) 配列番号 25 の VH 及び配列番号 28 の VL、
b) 配列番号 26 の VH 及び配列番号 29 の VL、
c) 配列番号 27 の VH 及び配列番号 30 の VL、
d) 配列番号 26 の VH 及び配列番号 31 の VL、
e) 配列番号 87 の VH 及び配列番号 88 の VL、又は
f) 配列番号 89 の VH 及び配列番号 90 の VL、
を含む、請求項 35～42 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF
2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項 44】

前記第 2 のドメインが、

a) 配列番号 66 の VH 及び配列番号 67 の VL、又は
b) 配列番号 74 の VH 及び配列番号 75 の VL、
を含む、請求項 35～43 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 TMEFF
2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 45】

TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含
む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって

30

a) 前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 2
2 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を
含み、前記第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 60、61、62、63、64、及び 6
5 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を
含み、

b) 前記第 1 のドメインが、配列番号 25 の VH 及び配列番号 28 の VL を含み、前記
第 2 のドメインが、配列番号 66 の VH 及び配列番号 67 の VL を含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体若しくは前記その抗原結合断片が、
配列番号 32 の第 1 の重鎖 (HC1)、配列番号 35 の第 1 の軽鎖 (LC1)、配列番号
76 の第 2 の重鎖 (HC2)、及び配列番号 77 の第 2 の軽鎖 (LC2) を含む、
単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 46】

TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含
む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって

a) 前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 2
2 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を
含み、前記第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 68、69、70、71、72、及び 7
3 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を

50

含み、

b) 前記第1のドメインが、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号32のHC1、配列番号35のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、

単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項47】

TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって

10

a) 前記第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23のHC1、HC2、HC3、LC1、LC2、及びLC3を含み、前記第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHC1、HC2、HC3、LC1、LC2、及びLC3を含み、

b) 前記第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号36のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、

20

単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項48】

TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって

a) 前記第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23のHC1、HC2、HC3、LC1、LC2、及びLC3を含み、前記第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHC1、HC2、HC3、LC1、LC2、及びLC3を含み、

30

b) 前記第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号36のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、

単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項49】

TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって

40

a) 前記第1のドメインが、それぞれ配列番号10、14、17、18、20、及び24のHC1、HC2、HC3、LC1、LC2、及びLC3を含み、前記第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHC1、HC2、HC3、LC1、LC2、及びLC3を含み、

b) 前記第1のドメインが、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号34のHC1、配列番号37のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号7

50

7 の L C 2 を含む、

単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 0】

T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、

a) 前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 1 0、1 4、1 7、1 8、2 0、及び 2 4 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、前記第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、及び 7 3 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

b) 前記第 1 のドメインが、配列番号 2 7 の V H 及び配列番号 3 0 の V L を含み、前記第 2 のドメインが、配列番号 7 4 の V H 及び配列番号 7 5 の V L を含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号 3 4 の H C 1、配列番号 3 7 の L C 1、配列番号 7 8 の H C 2、及び配列番号 7 9 の L C 2 を含む、

単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 1】

T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、

a) 前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 1 1、1 3、1 6、1 8、2 0、及び 2 2 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、前記第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、及び 6 5 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

b) 前記第 1 のドメインが、配列番号 2 6 の V H 及び配列番号 3 1 の V L を含み、前記第 2 のドメインが、配列番号 6 6 の V H 及び配列番号 6 7 の V L を含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号 3 3 の H C 1、配列番号 3 8 の L C 1、配列番号 7 6 の H C 2、及び配列番号 7 7 の L C 2 を含む、

単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 2】

T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、

a) 前記第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 1 1、1 3、1 6、1 8、2 0、及び 2 2 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、前記第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、及び 7 3 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

b) 前記第 1 のドメインが、配列番号 2 6 の V H 及び配列番号 3 1 の V L を含み、前記第 2 のドメインが、配列番号 7 4 の V H 及び配列番号 7 5 の V L を含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号 3 3 の H C 1、配列番号 3 8 の L C 1、配列番号 7 8 の H C 2、及び配列番号 7 9 の L C 2 を含む、

単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5 3】

T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって

10

20

30

40

50

、

a) 前記第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、前記第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

b) 前記第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号91のHC1、配列番号92のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、

10

単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項54】

TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって

、

a) 前記第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、前記第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

20

b) 前記第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号91のHC1、配列番号92のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、

単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項55】

TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって

30

、

a) 前記第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、前記第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

b) 前記第1のドメインが、配列番号89のVH及び配列番号90のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号93のHC1、配列番号94のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、

40

単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項56】

TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって

、

a) 前記第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、前記第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を

50

含み、

b) 前記第1のドメインが、配列番号89のVH及び配列番号90のVLを含み、前記第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

c) 前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくは前記その抗原結合断片が、配列番号93のHC1、配列番号94のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、

単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項57】

前記抗体が、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4アイソタイプである、請求項35～56のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

10

【請求項58】

前記抗体が、HC1、HC2、又はHC1及びHC2に、位置234でアラニン、位置235でアラニン、又は位置234でアラニン及び位置235でアラニンを含み、残基の付番が、EUインデックスに従う、請求項35～57のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項59】

前記抗体が、HC1及びHC2に、位置228でプロリンを含み、残基の付番が、EUインデックスに従う、請求項35～58のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片。

20

【請求項60】

前記抗体が、HC1に位置405でフェニルアラニン及び位置409でアルギニン、並びにHC2に位置405でロイシン及び位置409でリジンを含む、請求項35～59のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗TMEFF2 x CD3抗体又はその抗原結合断片。

【請求項61】

請求項35～60のいずれか一項に記載の二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片と、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項62】

a) 請求項45～56のいずれか一項に記載の二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片をコードするか、又は

30

b) 配列番号39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、80、81、82、83、95、96、97、98、99、100、101、及び102のポリヌクレオチド配列を含む、

ポリヌクレオチド。

【請求項63】

請求項62に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項64】

請求項63に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項65】

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、前記抗体が発現する条件下で請求項64に記載の宿主細胞を培養することと、前記宿主細胞によって産生された前記二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又は前記その抗原結合断片を回収及び精製することと、を含む、方法。

40

【請求項66】

請求項45～56のいずれか一項に記載の二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、

a) 2つの同一のHC1及び2つの同一のLC1を有する単一特異性二価TMEFF2抗体、並びに2つの同一のHC2及び2つの同一のLC2を有する単一特異性二価CD3抗体を約1：1の混合物のモル比で組み合わせることと、

50

- b) 前記混合物に還元剤を導入することと、
- c) 前記混合物を約 90 分～約 6 時間インキュベートすることと、
- d) 前記還元剤を除去することと、
- e) H C 1、L C 1、H C 2、及び L C 2 を含む前記二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を精製することと、を含む、方法。

【請求項 67】

前記還元剤が、2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)である、請求項 66 に記載の方法。

【請求項 68】

前記 2-MEA が、約 2.5 mM～約 7.5 mM の濃度で存在する、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記インキュベートする工程が、約 25℃～約 37℃の温度で実施される、請求項 66～68 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

T M E F F 2 陽性癌の治療を必要とする対象において T M E F F 2 陽性癌を治療する方法であって、治療に有効な量の請求項 45～60 のいずれか一項に記載の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 61 に記載の医薬組成物を、前記対象に投与して、前記 T M E F F 2 陽性癌を治療することを含む、方法。

【請求項 71】

前記 T M E F F 2 陽性癌が、前立腺癌である、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

前記前立腺癌が、再発性、難治性、悪性、若しくは去勢抵抗性前立腺癌、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項 71 に記載の方法。

【請求項 73】

前記二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片が、第 2 の治療剤と組み合わせて投与される、請求項 70～72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 74】

前記第 2 の治療剤が、手術、化学療法、アンドロゲン遮断療法、若しくは放射線、又はそれらの任意の組み合わせである、請求項 73 に記載の方法。

【請求項 75】

請求項 45～56 のいずれか一項に記載の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片に結合する、抗イディオタイプ抗体。

【請求項 76】

請求項 45～56 のいずれか一項に記載の抗体を含む、キット。

【請求項 77】

療法に使用するための、請求項 45～56 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 78】

T M E F F 2 陽性癌の治療に使用するための、請求項 45～56 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 79】

T M E F F 2 陽性癌の治療用薬品の製造のための、請求項 45～60 のいずれか一項に記載の単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

10

20

30

40

50

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出済みであり、その全体が参照により本明細書に組み込まれている配列表を含む。当該 A S C I I のコピーは、2019 年 1 月 31 日に作成され、J B I 5 1 6 0 W O P C T 1 _ S L . t x t の名称であり、144,156 バイトのサイズである。

【0002】

(発明の分野)

本明細書に提供される開示は、単一特異性及び多重特異性抗 T M E F F 2 抗体、並びに記載の抗体を産生及び使用する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

前立腺癌は、世界中の男性において 2 番目に最も一般的な癌であり、癌関連死では 6 番目に多い原因である。世界的には、およそ 1,100,000 人の新たな症例及び 300,000 人の死亡例が毎年存在し、これは全癌死の 4 % を構成する。男性の 6 人に 1 人が生涯のうちにこの疾患を有すると診断されるであろうと推定されている。前立腺癌リスクは、年齢と強く相関している：約 4 分の 3 の症例が、65 歳を超える男性に生じ、70 ~ 74 歳の症例が最も多い。50 代の男性のうちの約半数及び 80 歳の男性のうちの 80 % が、前立腺における癌の組織学的証拠を有することが、検死データから推定される。早期のステージでは、5 年生存率はほぼ 100 % である。しかしながら、癌が転移すると、5 年生存率は 28 % まで低下し、進行したステージの前立腺癌の有効な治療に対する必要性が未だ存在する。

【0004】

精巣アンドロゲン遮断療法は、通常、(患者のうちの 80 % に) 疾患の安定化又は退行を生じる。前立腺癌の現在の治療方法としては、手術、放射線療法、及びホルモン療法が挙げられる。一般的には、癌ワクチンであるシプリュセル T (sipuleucel-T)、放射性治療剤 (塩化ラジウム 223 など)、二次ホルモン療法 (アビラテロン又はエンザルタミドなど)、及び/又は化学療法 (ドセタキセル及びカバジタキセル) が、順番にホルモン療法に加えられる。これらの治療の各々は、癌の成長を数ヶ月遅らせ、疾患により生じる症状を和らげることができるが、最終的には転移性前立腺癌の進行は進む。ホルモン療法によるテストステロンレベルの低下にもかかわらず前立腺癌が成長すると、治療選択肢が限定される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

したがって、前立腺癌を治療するための更なる療法を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、T M E F F 2 の配列番号 110 の膜近位領域に結合する、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0007】

本発明はまた、T M E F F 2 の膜近位領域に結合する、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、抗体又はその抗原結合断片が、T M E F F 2 の膜近位領域への結合に関して、配列番号 25 の重鎖可変領域 (heavy chain variable region、V H) 及び配列番号 28 の軽鎖可変領域 (light chain variable region、V L)、配列番号 26 の V H 及び配列番号 29 の V L、配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L、配列番号 26 の V H 及び配列番号 31 の V L、配列番号 87 の V H 及び配列番号 88 の V L、又は配列番号 89 の V H 及び配列番号 90 の V L、を含む参照抗体と競合する、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0008】

本発明はまた、T M E F F 2 の膜近位領域に結合する、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、抗体又はその抗原結合断片が、残基 H G K C E H S I N

10

20

30

40

50

M Q E P S C（配列番号 57）又は D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L（配列番号 58）内で T M E F F 2 の膜近位領域に結合する、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0009】

本発明はまた、本明細書に記載のある特定の重鎖及び軽鎖相補性決定領域配列を有する、単離された抗 T M E F F 2 抗体を提供する。

【0010】

本発明はまた、本明細書に記載のある特定の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域配列を有する、単離された抗 T M E F F 2 抗体を提供する。

【0011】

本発明はまた、本明細書に記載のある特定の重鎖及び軽鎖配列を有する、単離された抗 T M E F F 2 抗体を提供する。

【0012】

本発明はまた、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 22 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、配列番号 25 の V H 及び配列番号 28 の V L、並びに／又は配列番号 32 の H C 及び配列番号 35 の L C、を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0013】

本発明はまた、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ配列番号 11、13、16、19、21、及び 23 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、配列番号 26 の V H 及び配列番号 29 の V L、並びに／又は配列番号 33 の H C 及び配列番号 36 の L C、を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0014】

本発明はまた、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L、並びに／又は配列番号 34 の H C 及び配列番号 37 の L C、を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0015】

本発明はまた、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ配列番号 11、13、16、18、20、及び 22 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、配列番号 26 の V H 及び配列番号 31 の V L、並びに／又は配列番号 33 の H C 及び配列番号 38 の L C、を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0016】

本発明はまた、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3、配列番号 87 の V H 及び配列番号 88 の V L、並びに／又は配列番号 91 の H C 及び配列番号 92 の L C、を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0017】

本発明はまた、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86 の H C D R 1、H C D R 2

10

20

30

40

50

、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3、
配列番号 8 9 のV H及び配列番号 9 0 のV L、並びに／又は
配列番号 9 3 のH C及び配列番号 9 4 のL C、を含む、単離された抗T M E F F 2 抗体
又はその抗原結合断片を提供する。

【0018】

本発明はまた、本発明の抗T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片と、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物を提供する。

【0019】

本発明はまた、本発明の抗T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片をコードする単離されたポリヌクレオチドであって、配列番号 2 5、2 6、2 7、8 7、若しくは8 9 の抗T M E F F 2 抗体V H及び／若しくは配列番号 2 8、2 9、3 0、3 1、8 8、若しくは9 0 のV Lをコードするか、又は配列番号 3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、4 6、4 7、4 8、4 9、5 0、5 1、5 2、9 5、9 6、9 7、9 8、9 9、1 0 0、1 0 1、又は1 0 2 のポリヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

10

【0020】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

【0021】

本発明はまた、本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。

20

【0022】

本発明はまた、本発明の抗T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、抗体又は抗原結合断片が発現する条件下で、本発明の宿主細胞を培養することと、宿主細胞によって産生された抗体又はその抗原結合断片を回収することと、を含む、方法を提供する。

【0023】

本発明はまた、T M E F F 2 陽性癌の治療を必要とする対象においてT M E F F 2 陽性癌を治療する方法であって、治療に有効な量の本発明の単離された抗T M E F F 2 抗体若しくはその抗原結合断片、又は本発明の医薬組成物を対象に投与して、T M E F F 2 陽性癌を治療することを含む、方法を提供する。

【0024】

30

本発明はまた、本発明の抗T M E F F 2 抗体に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0025】

本発明はまた、本発明の抗T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を含む、キットを提供する。

【0026】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第1のドメインと、C D 3 に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗T M E F F 2 ／抗C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0027】

40

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第1のドメインと、C D 3 に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗T M E F F 2 ／抗C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、抗体が、T M E F F 2 の配列番号 1 1 0 の膜近位領域に結合する、単離された二重特異性抗T M E F F 2 ／抗C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0028】

本発明はまた、単離された二重特異性抗T M E F F 2 ／抗C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、抗体が、T M E F F 2 の膜近位領域への結合に関して、配列番号 2 5 の重鎖可変領域（V H）及び配列番号 2 8 の軽鎖可変領域（V L）、配列番号 2 6 のV H及び配列番号 2 9 のV L、配列番号 2 7 のV H及び配列番号 3 0 のV L、配列番号 2 6 のV H及び配列番号 3 1 のV L、配列番号 8 7 のV H及び配列番号 8 8 のV L、又は配列番号 8

50

9のVH及び配列番号90のVL、を含む参照抗体と競合する、単離された二重特異性抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0029】

本発明はまた、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、抗体が、TMEFF2上で配列番号57又は配列番号58のエピトープに結合する、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0030】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号32の第1の重鎖（first heavy chain、HC1）、配列番号35の第1の軽鎖（first light chain、LC1）、配列番号76の第2の重鎖（second heavy chain、HC2）、及び配列番号77の第2の軽鎖（second light chain、LC2）を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0031】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号32のHC1、配列番号35のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0032】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号36のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

20

30

40

50

【0033】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号36のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0034】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、14、17、18、20、及び24のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号34のHC1、配列番号37のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0035】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、14、17、18、20、及び24のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号34のHC1、配列番号37のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0036】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0037】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

10

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0038】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

30

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号91のHC1、配列番号92のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0039】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

40

第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号91のHC1、配列番号92のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0040】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のド

50

メインと、を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 1 0、1 2、1 5、1 8、2 0、及び 8 6 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、及び 6 5 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 8 9 の V H 及び配列番号 9 0 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 6 6 の V H 及び配列番号 6 7 の V L を含み、かつ／又は

二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 9 3 の H C 1、配列番号 9 4 の L C 1、配列番号 7 6 の H C 2、及び配列番号 7 7 の L C 2 を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0041】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 1 0、1 2、1 5、1 8、2 0、及び 8 6 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、及び 7 3 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

20

第 1 のドメインが、配列番号 8 9 の V H 及び配列番号 9 0 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 7 4 の V H 及び配列番号 7 5 の V L を含み、かつ／又は

二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 9 3 の H C 1、配列番号 9 4 の L C 1、配列番号 7 8 の H C 2、及び配列番号 7 9 の L C 2 を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0042】

本発明はまた、本発明の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片と、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物を提供する。

【0043】

本発明はまた、本発明の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片をコードする、ポリヌクレオチドを提供する。

30

【0044】

本発明はまた、二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を産生する方法であって、抗体が発現する条件下で本発明の宿主細胞を培養することと、宿主細胞によって産生された二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を回収及び精製することと、を含む、方法を提供する。

【0045】

本発明はまた、二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、

40

2 つの同一の H C 1 及び 2 つの同一の L C 1 を有する単一特異性二価 T M E F F 2 抗体、並びに 2 つの同一の H C 2 及び 2 つの同一の L C 2 を有する単一特異性二価 C D 3 抗体を約 1 : 1 の混合物のモル比で組み合わせることと、

混合物に還元剤を導入することと、

混合物を約 9 0 分～約 6 時間インキュベートすることと、

還元剤を除去することと、

H C 1、L C 1、H C 2、及び L C 2 を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を精製することと、を含む、方法を提供する。

【0046】

本発明はまた、T M E F F 2 陽性癌の治療を必要とする対象において T M E F F 2 陽性

50

癌を治療する方法であって、治療に有効な量の本発明の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片、又は本発明の医薬組成物を対象に投与して、T M E F F 2 陽性癌を治療することを含む、方法を提供する。

【0047】

本発明はまた、本発明の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片に結合する、抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0048】

本発明はまた、本発明の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

10

【0049】

【図1】選択抗 T M E F F 2 抗体重鎖可変領域 (V H) のアラインメントを示す。V H 領域は、各行の先頭の配列番号によって同定される。

【図2】選択抗 T M E F F 2 抗体軽鎖可変領域 (V L) のアラインメントを示す。V H 領域は、各行の先頭の配列番号によって同定される。

【図3】選択二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体によって、カスパーゼ 3 / 7 活性を増加させることによって測定した、経時的な L n C a P 細胞の殺傷を示す。

【図4】雄 N G S マウスにおけるエクスピボでの L n C a P 前立腺癌モデルにおける、選択二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体による、腫瘍移植の経時的な平均腫瘍体積の低減を示す。

20

【図5A】雄 N G S マウスにおけるエクスピボでの L n C a P 前立腺癌モデルにおける、0.5 m g / k g の T M C B 9 3 で治療した各マウスの平均腫瘍体積の低減を示す。

【図5B】雄 N G S マウスにおけるエクスピボでの L n C a P 前立腺癌モデルにおける、0.5 m g / k g の T M C B 1 3 2 で治療した各マウスの平均腫瘍体積の低減を示す。

【図6】T細胞ヒト化 N S G マウスの確立された L N C a P 異種移植片における、T M E B 7 6 2 x C D 3 B 3 7 6 の有効性を示す。

【図7】T M C B 1 3 2 の投与に応答した L n C a P 前立腺癌細胞における、T細胞活性化を示す。

【図8】T M C B 1 3 2 のT細胞媒介性細胞障害を示す。

【図9】T細胞ヒト化マウスにおける T M C B 1 3 2 の抗腫瘍有効性を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0050】

本明細書に引用されている特許及び特許出願を含む（但しそれらに限定されない）全ての刊行物は、完全に記載されているかのように参照により、本明細書に組み込まれる。

【0051】

本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的でのみ使用され、限定を意図するものではないと理解すべきである。特に断らない限り、本明細書において使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。

【0052】

本明細書に記載されているものと同様又は同等の任意の方法及び材料を、本発明の試験を実施するために使用することができるが、例示的な材料及び方法を本明細書に記載する。本発明を説明及び特許請求する上で以下の用語が使用される。

【0053】

本明細書及び添付の「特許請求の範囲」において使用されるとき、「a」、「an」、及び「the」という単数形は、その内容について別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を包含する。したがって、例えば、「細胞 (a cell)」という言葉及には、2つ又は3つ以上の細胞の組み合わせ、及びこれに類するものなどが含まれる。

【0054】

文脈上明白に他の意味に解すべき場合を除き、明細書及び特許請求の範囲を通して、単

50

語「含む (comprise)」、「含む (comprising)」などは、排他的又は排外的な意味とは対照的に、包括的な意味で、即ち、「～を含むがこれらに限定されない」という意味で解釈されるべきである。

【0055】

「特異的結合」、「特異的に結合する」、又は「特異的な結合」、又は「結合する」とは、抗体が、抗原又は抗原内のエпитープに、他の抗原に対するよりも高い親和性で結合することを指す。典型的には、抗体は、約 5×10^{-8} M 以下、例えば約 1×10^{-9} M 以下、約 1×10^{-10} M 以下、約 1×10^{-11} M 以下、又は約 1×10^{-12} M 以下の平衡解離定数 (K_D) で抗原又は抗原内のエпитープに結合し、非特異性抗原 (例えば、BSA、カゼイン) への結合に関しては、典型的には、その K_D より少なくとも 100 10 倍小さい K_D で結合する。解離定数は、本明細書に記載のプロトコルを使用して測定することができる。しかしながら、抗原又は抗原内のエпитープに結合する抗体は、他の関連抗原、例えば、ヒト又はサル、例えば、*Macaca fascicularis* (カニクイザル、cyno)、又は *Pan troglodytes* (チンパンジー、chimpan) などの他の種由来の同じ抗原 (ホモログ) に対して交差反応性を有する場合がある。単一特異性抗体は、1つの抗原又は1つのエпитープに結合するが、二重特異性抗体は、2つの異なる抗原又は2つの異なるエпитープに結合する。

【0056】

「抗体」は、広義の意味を有し、マウス、ヒト、ヒト化、及びキメラモノクローナル抗体を含むモノクローナル抗体、抗原結合断片、二重特異性、三重特異性、四重特異性などの多重特異性抗体、二量体、四量体、又は多量体抗体、一本鎖抗体、ドメイン抗体、並びに必要とされる特異性の抗原結合部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された形態を含む免疫グロブリン分子を含む。「完全長抗体」は、ジスルフィド結合により相互接続された、2本の重鎖 (HC) 及び2本の軽鎖 (LC)、並びにこれらの多量体 (例えば IgM) からなる。各重鎖は、重鎖可変領域 (VH)、並びに重鎖定常領域 (ドメイン CH1、ヒンジ、CH2、及びCH3からなる) から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域 (constant region、CL) から構成される。VH領域及びVL領域は、フレームワーク領域 (FR) が散在しており相補性決定領域 (complementarity determining regions、CDR) と呼称される超可変領域に更に分類され得る。各VH及びV 20 Lは、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって以下の順序: FR1、CDR1、FR2 30、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4で配置された、3つのCDR及び4つのFRセグメントで構成される。

【0057】

「相補性決定領域 (CDR)」は、抗原に結合する抗体の領域である。CDRは、Kabab 40 at (Wu et al. (1970) J Exp Med 132:211-50) (Kabab et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)、Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196:901-17)、IMGT (Lefranc 40 et al. (2003) Dev Comp Immunol 27:55-77)、及びAbM (Martin and Thornton (1996) J Biol 263:800-15) などの、様々な記述を使用して定義することができる。様々な記述と、可変領域の付番との対応が記載されている (例えば、Lefranc 50 et al. (2003) Dev Comp Immunol 27:55-77、Honegger and Pluckthun, (2001) J Mol Biol 309:657-70、International Immunogenetics (IMGT) データベース、ウェブリソース、www.imgt.org)。UCL Business PLCによるabYsisなどの利用可能なプログラムを使用して、CDRを描写することができる。本明細書で使用する場合、「CDR」、「HCDR1」、「HC

DR2」、「HCDR3」、「LCDR1」、「LCDR2」、及び「LCDR3」という用語は、明細書で別途明示的に記載のない限り、上述のKabat、Chothia、IMGT、又はAbMの方法のうちのいずれかによって定義されるCDRを含む。

【0058】

免疫グロブリンは、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、5つの主要なクラス、即ちIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMに割り当てられ得る。IgA及びIgGは、アイソタイプのIgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4として更に細分類される。どのような脊椎動物種の抗体軽鎖も、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、2つの明確に異なるタイプ、即ち、カッパ(κ)及びラムダ(λ)のうちの一方に割り当てることができる。

10

【0059】

「抗原結合断片」とは、抗原に結合する免疫グロブリン分子の一部を意味する。抗原結合断片は合成ポリペプチド、酵素により入手可能なポリペプチド、又は遺伝子操作されたポリペプチドであってもよく、VH、VL、VH及びVL、Fab、F(ab')₂、Fd及びFv断片、1つのVHドメイン又は1つのVLドメインからなるドメイン抗体(dAb)、サメ可変性IgNARドメイン、ラクダ化VHドメイン、FR3-CDR3-FR4部分などの、抗体のCDRを模倣したアミノ酸残基からなる最小の認識単位、HCDR1、HCDR2、及び／又はHCDR3、並びにLCDR1、LCDR2、及び／又はLCDR3が挙げられる。VH及びVLドメインは互いに、合成リンカーを介して結合し、様々なタイプの一本鎖抗体設計を形成することができ、VH及びVLドメインが、個別の一本鎖抗体構築物により発現される場合では、VH/VLドメインが分子内、又は分子間で対合し、一価の抗原結合部位、例えば一本鎖Fv(single chain Fv、scFv)又は二重特異性抗体を形成することができ、これらは、例えば国際公開第1998/44001号、同第1988/01649号、同第1994/13804号、及び同第1992/01047号に記載されている。

20

【0060】

「モノクローナル抗体」とは、抗体分子の実質的に均質な母集団(即ち、母集団を含む個別の抗体が、抗体重鎖からC末端リジンを除去する、又は、アミノ酸異性化若しくはアミド分解、メチオニン酸化若しくはアスパラギン若しくはグルタミンアミド分解などの翻訳後修飾といった、可能な周知の変更を除いて同一である)から入手される抗体を意味する。モノクローナル抗体は典型的には、1つの抗原性エピトープに結合する。二重特異性モノクローナル抗体は、2つの異なる抗原性エピトープに結合する。モノクローナル抗体は、抗体集団内で不均一なグリコシル化を有し得る。モノクローナル抗体は、単一特異性であってもよく、又は、二重特異性などの多重特異性であってもよく、一価、二価、又は多価であってもよい。

30

【0061】

「単離された」とは、組み換え細胞などの分子が産生されるシステムの他の成分から実質的に分離及び／又は精製されている、分子の均質な母集団(例えば、合成ポリヌクレオチド又は抗体などのタンパク質)に加えて、少なくとも1つの精製又は単離工程に供されたタンパク質を指す。「単離抗体」とは、他の細胞材料及び／又は化学物質を実質的に含まない抗体を意味し、より高い純度、例えば80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の純度まで単離された抗体を包含する。

40

【0062】

「ヒト化抗体」とは、少なくとも1つのCDRが非ヒト種に由来し、少なくとも1つのフレームワークがヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体を意味する。ヒト化抗体は、フレームワークに置換を含むことができるため、フレームワークは、発現したヒト免疫グロブリン又はヒト免疫グロブリン生殖系遺伝子配列の厳密なコピーではない場合がある。

【0063】

50

「ヒト抗体」とは、ヒト対象に投与されるときに、最小の免疫応答を有するように最適化された抗体を意味する。ヒト抗体の可変領域は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体が定常領域又は定常領域の一部を含む場合、定常領域もヒト免疫グロブリン配列に由来する。ヒト抗体は、ヒト抗体の可変領域がヒト生殖系列免疫グロブリン又は再編成された免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られた場合のヒト起源の配列に「由来する」重鎖及び軽鎖可変領域を含む。そのような例示的な系は、ファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリ、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座を担持するマウス又はラットなどの、非ヒトトランスジェニック動物である。「ヒト抗体」は、典型的には、ヒト抗体及びヒト免疫グロブリン座位を得るために使用する系間の違い、フレームワーク若しくはCDR、又はその両方への、体細胞変異の導入又は意図的な置換の導入に起因する、ヒトで発現する免疫グロブリンと比較したときの、アミノ酸の違いを含む。典型的には、「ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン又は再編成された免疫グロブリン遺伝子によってコードされているアミノ酸配列に対して、アミノ酸配列が少なくとも約80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一である。場合によっては、「ヒト抗体」は、例えば、Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86に記載のヒトフレームワーク配列分析により誘導される、コンセンサスフレームワーク配列、又は、例えば、Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96、及び国際公開第2009/085462号に記載の、ファージ上に提示されるヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリに組み込まれた、合成HC DR 3を含み得る。

10

20

【0064】

少なくとも1つのCDRが非ヒト種に由来する抗体は、「ヒト抗体」の定義には含まれない。

【0065】

「組み換え」は、異なる源からのセグメントを接合して組み換えDNA、抗体、又はタンパク質を産生するときに、組み換え手段によって調製、発現、作製、又は単離されたDNA、抗体、及び他のタンパク質を指す。

【0066】

「エピトープ」は、抗体が特異的に結合する抗原の部分を指す。エピトープは典型的には、アミノ酸又は多糖側鎖などの化学的に活性な（極性、非極性又は疎水性など）部分の表面集団からなり、特定の三次元構造特性並びに特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、立体配座上の空間単位を形成する連続的な及び／又は不連続なアミノ酸によって構成され得る。不連続なエピトープでは、抗原の直鎖配列の異なる部分にあるアミノ酸が、タンパク質分子の折り畳みにより三次元空間でごく近接するようになる。

30

【0067】

「二重特異性」は、2つの異なる抗原、又は同じ抗原中の2つの異なるエピトープと特異的に結合する抗体を指す。二重特異性抗体は、他の関連抗原、例えば、ヒト若しくはサル、例えば、Macaca cynomolgus（カニクイザル、cyno）、若しくはPan troglodytesなどの他の種からの、同じ抗原（ホモログ）に対する交差反応性を有し得るか、又は2つ又は3つ以上の異なる抗原間で共有されるエピトープに結合し得る。

40

【0068】

「多重特異性」とは、同じ抗原内の2つ又は3つ以上の異なる抗原、又は2つ又は3つ以上の異なるエピトープに特異的に結合する抗体を意味する。多重特異性抗体は、他の関連抗原、例えば、ヒト若しくはサル、例えば、Macaca cynomolgus（カニクイザル、cyno）、若しくはPan troglodytesなどの他の種からの、同じ抗原（ホモログ）に対する交差反応性を有し得るか、又は2つ又は3つ以上の異なる抗原間で共有されるエピトープに結合し得る。

【0069】

50

「変異体」は、1つ又は2つ以上の修飾、例えば、1つ又は2つ以上の置換、挿入、又は欠失によって参照ポリペプチド又は参照ポリヌクレオチドとは異なるポリペプチド又はポリヌクレオチドを指す。

【0070】

「ベクター」は、生物系内で複製可能な、又はそのような系間を移動することができる、ポリヌクレオチドを指す。ベクターポリヌクレオチドは、典型的には、ベクターを複製することができる生物学的要素を利用して生物系（例えば、細胞、ウイルス、動物、植物）及び再構成された生物系におけるこれらポリヌクレオチドの複製又は維持を促進する機能を有する、複製起点、ポリアデニル化シグナル、又は選択マーカーなどの要素を含む。ベクターポリヌクレオチドは、一本鎖又は二本鎖のDNA若しくはRNA分子、又はこれらのハイブリッドであり得る。

10

【0071】

「発現ベクター」は、発現ベクター中に存在するポリヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチドの翻訳を指令するために、生物系又は再構成された生物系において利用することができるベクターを指す。

【0072】

「ポリヌクレオチド」とは、糖－ホスフェート主鎖により共有結合した、又は他の等価な共有化学反応により結合した、ヌクレオチド鎖を含む合成分子を意味する。cDNAは、例示的な合成ポリヌクレオチドである。

【0073】

「ポリペプチド」又は「タンパク質」は、ペプチド結合によって連結されてポリペプチドを形成する少なくとも2つのアミノ酸残基を含む分子を指す。50個未満のアミノ酸からなる小分子ポリペプチドは、「ペプチド」と称され得る。

20

【0074】

「TM E F F 2」は、E G F様、及びトモレグリン2とも呼ばれる2つのフォリスタチン様ドメイン2を有する、ヒト膜貫通タンパク質を指す。完全長ヒトTM E F F 2のアミノ酸配列は、配列番号1に示される。TM E F F 2の細胞外ドメインは、配列番号2に示され、これは全長TM E F F 2の残基40～374に及ぶ。TM E F F 2細胞外ドメインは、3つの異なるサブドメイン、K a z a l様1（残基85～137）、K a z a l様2（残基176～229）、及びE G Fドメイン（残基261～301）を保有する。TM E F F 2 E G Fドメインは、配列番号3に示される。TM E F F 2「膜近位領域」は、E G Fドメイン及びN－C末端リンカー領域（例えば、配列番号1の全長ヒトTM E F F 2の残基230～320）を包含する、配列番号110のTM E F F 2 r e q i o nを指す。本明細書のタンパク質、ポリペプチド、及びタンパク質断片に対する全ての言及は、非ヒト種からのものとして明示的に指定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド、又はタンパク質断片のヒトバージョンを指すことが意図される。したがって、「TM E F F 2」は、非ヒト種、例えば、「マウスTM E F F 2」又は「サルTM E F F 2」などからのものとして指定されない限り、ヒトTM E F F 2を意味する。

30

【0075】

配列番号1（完全長ヒトTM E F F 2）

40

M V L W E S P R Q C S S W T L C E G F C W L L L L P V M L L I V A R P V K L A
A F P T S L S D C Q T P T G W N C S G Y D
D R E N D L F L C D T N T C K F D G E C L R I G D T V T C V C Q F K C N N D Y
V P V C G S N G E S Y Q N E C Y L R Q A A
C K Q Q S E I L V V S E G S C A T D A G S G S G D G V H E G S G E T S Q K E T
S T C D I C Q F G A E C D E D A E D V W C
V C N I D C S Q T N F N P L C A S D G K S Y D N A C Q I K E A S C Q K Q E K I
E V M S L G R C Q D N T T T T T T K S E D G
H Y A R T D Y A E N A N K L E E S A R E H H I P C P E H Y N G F C M H G K C E
H S I N M Q E P S C R C D A G Y T G Q H C

50

EKKDYSVLYVVP GPVRFQYVL IAAVIGTIQIAVICVVVL
CITRKCPRSNRIHRQKQNTGH
YSSDNTTTRASTRLI

【0076】

配列番号2 (ヒトTMEFF2の細胞外ドメイン)

FPTSLSDCQTPTGWNC SGYDDRENDLFLCDTNTCKFDGE
CLRIGDTVTCVCQFKCNNDYV
PVCGSNGESYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDA
GSGSGDGVHEGSGETSQKETS
TCDICQFGAECDEDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDG

10

KSYDNACQIKEASCQKQEKIE
VMSLGRCQDNTTTTTTKSE DGHYARTDYAENANKLEESAR
EHHIPCPEHYNGFCM HGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGG
HCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYVL IAAVIGTIQIAVICVVV
LCITRKCPRSNRIHRQKQNTGHYSSDNTTTRASTRLI

【0077】

TMEFF2 EGFドメイン 配列番号3

HHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGGH
CE

【0078】

20

TMEFF2膜近位領域 配列番号110

NTTTTTTKSE DGHYARTDYAENANKLEESAREHHIPCPEH
YNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGGHCEKKDYSVL
YVVP GPVRFQYV

【0079】

「CD3」は、多分子T細胞受容体(T cell receptor、TCR)複合体の一部として
T細胞上で発現され、2つ又は4つの受容体鎖:CD3イプシロン、CD3デルタ、CD
3ゼータ、及びCD3ガンマの会合から形成されたホモ二量体又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4のアミノ酸配列を含む。本明細書のタン
パク質、ポリペプチド、及びタンパク質断片に対する全ての言及は、非ヒト種からのもの
として明示的に指定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド、又はタンパ
ク質断片のヒトバージョンを指すことが意図される。したがって、「CD3」は、非ヒト
種、例えば、「マウスCD3」「サルCD3」などからのものとして指定されない限り、
ヒトCD3を意味する。

30

【0080】

配列番号4 (ヒトCD3イプシロン)

MQSGTHWRVLGLCLLSVG VWGQDGNEEMGGITQTPYKVS
ISGTTVILT CPQYPGSEILWQ
HNDKNIGGDEDDKNIGSDE DHLSLKEFSELEQSGYYVCY
PRGSKPEDANFYLYLRARVCE
NCMEMDVM SVATIVIVD ICITGGLLLL VYYWSKNRKAKA
KPVTRGAGAGGRQRGQNKERP
PPVPNP DYEP IRKGQRDL YSGLNQRR I

40

【0081】

配列番号5 (ヒトCD3イプシロン細胞外ドメイン)

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT CPQYPGSEILWQH
NDKNIGGDEDDKNIGSDE DHLSLKEFSELEQSGYYVCY
PRGSKPEDANFYLYLRARVCEN
CMEMD

【0082】

50

「二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体」、T M E F F 2 / C D 3 抗体、T M E F F 2 x C D 3 抗体などは、T M E F F 2 及び C D 3 に結合する抗体を指す。

【0083】

「～と組み合わせて」とは、2つ又は3つ以上の治療薬を、混合物の状態と一緒に、単剤として同時に、又は単剤として任意の順序で逐次、対象に投与することを意味する。

【0084】

「T M E F F 2 陽性癌」は、T M E F F 2 タンパク質の測定可能なレベルを示す癌組織又は癌細胞を指す。T M E F F 2 タンパク質のレベルは、生細胞又は溶解細胞で、例えば E L I S A、免疫蛍光法、フローサイトメトリー、又は放射免疫アッセイを使用する周知のアッセイを使用して、測定することができる。

10

【0085】

「サンプル」は、対象から単離された類似の流体、細胞、又は組織に加えて、対象の体内に存在する流体、細胞、又は組織の収集物を指す。例示的なサンプルは、血液、血清及び漿膜液、血漿、リンパ液、尿、唾液、囊胞液、涙液、糞便、喀痰などの体液、分泌組織及び器官の粘膜分泌液、腔分泌液、非固形腫瘍に関連するものなどの腹水、胸膜腔、心膜腔、腹膜腔、腹腔、及び他の体腔の流体、気管支洗浄によって回収された流体、対象又は生物源、例えば、細胞及び器官の培養培地（細胞又は器官の馴化培地を含む）、洗浄液などと接触した液体溶液、組織生検、穿刺吸引、又は外科的に切除された腫瘍組織のものである。

【0086】

「癌細胞」又は「腫瘍細胞」とは、インビボ、エクシボ、又は組織培養のいずれかにおいて、自然発生的な又は導入された表現型の変化を有する癌性、前癌性、又は形質転換細胞を指す。これらの変化は、必ずしも新たな遺伝物質の取り込みを伴うものではない。形質転換は、形質転換ウイルスの感染及び新たなゲノム核酸の取り込み、又は外因性の核酸の取り込みにより発生し得るが、自然に又は発癌物質に対する曝露に続いて発生し、それにより内因性の遺伝子を変異させ得る。形質転換／癌は、*in vitro*、*in vivo*、及び *ex vivo* における、形態学的変化、細胞の不死化、異常な増殖制御、病巣の形成、増殖、悪性病変、腫瘍特異的マーカーレベルの調節、浸潤性、ヌードマウスなどの好適な動物宿主における腫瘍の増殖などによって例示される（*Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (3rd ed. 1994)）。

20

30

【0087】

「約」は、当業者によって決定される特定の値について許容される誤差範囲内であることを意味し、これは、その値が測定又は決定される方法、即ち測定システムの制限事項にある程度依存する。特定のアッセイ、結果、又は実施形態の文脈において実施例又は明細書のその他の箇所に別途明示的に記載のない限り、「約」は、当該技術分野の実施に従う1つの標準偏差又は5%までの範囲のいずれかのより高い範囲内であることを意味する。

【0088】

「対象」は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」は、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳動物及び非哺乳動物などの全ての脊椎動物を包含する。記載されている場合を除き、「患者」及び「対象」という用語は、互換的に使用される。

40

【0089】

「治療する」、又は「治療」とは、治療的処置、及び予防的 (prophylactic) 若しくは予防的 (preventative) 手段の両方を意味し、対象は、望ましくない生理学的変化又は疾患を予防する、又は低減させる（少なくする）予定である。有益な又は所望の臨床結果としては、検出可能であろうと又は検出不可能であろうと、症状の緩和、疾患の程度の軽減、安定した（即ち、悪化しない）疾患状態、疾患の進行の遅延又は鈍化、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解（部分的であろうと又は全体的であろうと）が挙げられる。「治療」はまた、対象が治療を受けていない場合に予想される生存期間と比較して、生存期間を延

50

長させることを意味し得る。治療を要する者には、既に状態若しくは疾患を有している者、及び、状態若しくは疾患を有しやすい者、又は状態若しくは疾患を予防しようとする者が含まれる。

【0090】

「治療に有効な量」とは、必要な用量及び期間で所望の治療結果を得るための有効量を指す。治療に有効な量は、個体の病態、年齢、性別、及び体重などの要因、並びに個体において所望の応答を引き出す1つの治療薬又は治療薬の組み合わせの能力によって様々であってもよい。有効な1つの治療薬、又は治療薬の組み合わせの例示的な指標としては、例えば、患者の改善された健康が挙げられる。

【0091】

本明細書全体を通して、抗体の定常領域におけるアミノ酸残基の付番は、特に明示的に指定されない限り、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health (Bethesda, MD) (1991)に記載のEUインデックスに従う。

【0092】

従来の1文字及び3文字のアミノ酸コードを、表1に示すとおりに本明細書で使用する。

【0093】

【表1】

表1.

アミノ酸	3文字コード	1文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Gln	E
グルタミン	Glu	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【0094】

物質の組成

本発明は、抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片、本発明の抗TMEFF2抗体の抗原結合断片を含む多重特異性抗体、及び二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。本発明は、本発明の抗体をコードするポリペプチド及びポリヌクレオチド、又はそれらの相補的核酸、ベクター、宿主細胞、並びにそれらを作製及び使用方法を提供する。

【0095】

抗TMEFF2抗体

TMEFF2発現は、他の正常組織と比較して、前立腺組織及び前立腺腺癌に著しく豊富である。膜状TMEFF2は、疾患進行全体を通じて保持され、抗腫瘍療法の可能な標的として機能する。TMEFF2は、プロテアーゼにより切断され、抗原の可溶性形態を生じることが既知である。本発明では、TMEFF2の膜近位領域に導かれる抗体を生成して、膜TMEFF2への抗体結合を最大化し、得られた抗体の可溶性TMEFF2形態への結合を生じる可能性を最小限にした。

【0096】

本発明は、TMEFF2の配列番号110の膜近位領域に結合する、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。TMEFF2の膜近位領域に結合する本発明の抗TMEFF2抗体は、細胞によって内在化されない。いかなる特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、非内在化抗TMEFF2抗体は、内在化抗TMEFF2抗体と比較すると、TMEFF2の内在化及び分解の欠如から生じる抗体エフェクター機能によって媒介される、発癌に対して改善された効果を有することを予想することができる。

【0097】

「膜近位領域に結合する」とは、水素／重水素交換（H／D交換）を使用して同定される抗体エピトープ残基の90%が、TMEFF2の膜近位領域内に存在することを意味する。エピトープ残基は、H／D交換を通じた重水素化レベルの少なくとも5%の違いで、試験抗体によって保護されるものである。例示的なそのような抗体は、本明細書に記載のTMEB675、TMEB570、TMEB674、TMEB565、TMEB762、及びTMEB757である。

【0098】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片は、残基HGKCEHSINMQEPSC（配列番号57）又はDAGYTGHCEKKDYSVL（配列番号58）内でTMEFF2の膜近位領域に結合する。残基HGKCEHSINMQEPSC（配列番号57）内に結合する例示的な抗TMEFF2抗体は、TMEB570である。残基DAGYTGHCEKKDYSVL（配列番号58）内に結合する例示的な抗TMEFF2抗体は、TMEB675である。TMEB675変異体TMEB762及びTMEB757もまた、残基DAGYTGHCEKKDYSVL（配列番号58）内でTMEFF2の膜近位領域に結合することが予想される。

【0099】

H／D交換アッセイでは、組み換えにより発現するTMEFF2ECDを、抗体の存在又は非存在下の重水素化水中で所定の時間にわたってインキュベートし、抗体によって保護されていない交換可能な水素原子での重水素組み込みが生じ、タンパク質のプロテアーゼ消化及びLC-MSを使用するペプチド断片の分析が続く。H／D交換アッセイは、既知のプロトコルを使用して実施することができる。例示的なプロトコルを実施例5に記載する。

【0100】

本発明はまた、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片であって、抗体又はその抗原結合断片が、TMEFF2の膜近位領域への結合に関して、配列番号25の重鎖可変領域（VH）及び配列番号28の軽鎖可変領域（VL）、配列番号26のVH及び配列番号29のVL、配列番号27のVH及び配列番号30のVL、配列番号26のVH及び配列番号31のVL、配列番号87のVH及び配列番号88のVL、又は配列番号89のVH及び配列番号90のVL、を含む参照抗体と競合する、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0101】

TMEFF2の膜近位領域への試験抗体の結合に関する参照抗体との競合は、周知の方法を使用してインビトロでアッセイすることができる。例えば、非標識参照抗体の存在下

10

20

30

40

50

での、MSD SulfoTag（商標）NHSEステル標識試験抗体の、TMFF2の膜近位領域への結合は、ELISAによって評価することができるか、又はBiacore分析若しくはフローサイトメトリーを使用して競合を実証することができる。試験抗体が、TMFF2の膜近位領域への参照抗体の結合を85%以上、例えば、90%以上、又は95%以上阻害すると、試験抗体は、TMFF2への結合に関して参照抗体と競合する。

【0102】

本発明はまた、単離された抗TMFF2抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び22、
それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23、
それぞれ配列番号10、14、17、18、20、及び24、
それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22、又は
それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86、の重鎖相補性決定領域（heavy chain complementarity determining region 1、HCDR1）、HCDR2、HCDR3、軽鎖相補性決定領域（light chain complementarity determining region 1、LCDR1）、LCDR2、及びLCDR3を含む、単離された抗TMFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0103】

いくつかの実施形態では、本発明の単離された抗TMFF2抗体又はその抗原結合断片は、約 0.4×10^{-9} M以下の平衡解離定数（ K_D ）でTMFF2の膜近位領域に結合し、 K_D が、室温でpH4.5～5.0の酢酸緩衝液中の表面プラズモン共鳴を使用して測定される。

20

【0104】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMFF2抗体又はその抗原結合断片は、約 0.1×10^{-10} M～約 0.4×10^{-9} Mの K_D でTMFF2の膜近位領域に結合する。

【0105】

TMFF2の膜近位領域に対する抗体の親和性は、任意の好適な方法を使用する実験によって決定することができる。例示的な方法は、Proton XPR36、Biacore3000又はKinExA装置、ELISA、若しくは当業者に既知の競合的結合アッセイを利用する。抗体のTMFF2に対する親和性についての測定値は、異なる条件（例えば、容量オスモル浸透圧濃度、pH）下で測定した場合に変動し得る。したがって、親和性及び他の結合パラメータ（例えば、 K_D 、 K_{on} 、及び K_{off} ）の測定は、典型的には、本明細書に記載の標準的な条件及び緩衝液などの標準化緩衝液を用いて行われる。例えばBiacore3000又はProtonを使用した親和性測定での内部エラー（標準偏差（standard deviation、SD）として測定されるもの）は典型的に、典型的な検出範囲内で測定した場合、5～33%の範囲内であり得ることが当業者には分かるであろう。したがって、 K_D 値を指すとき、「約」という用語は、アッセイにおける典型的な標準偏差を反映する。例えば、 K_D が 1×10^{-9} Mの場合の典型的なSDは、 $\pm 0.33 \times 10^{-9}$ M以下である。

30

40

【0106】

本発明はまた、VH3__3-23（配列番号53）又はVH1__1-69（配列番号54）に由来する重鎖可変領域（VH）フレームワークを含む、TMFF2の膜近位領域に結合する、単離された抗TMFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0107】

本発明はまた、VKI__L11（配列番号55）又はVKIIII__A27（配列番号56）に由来する軽鎖可変領域（VL）フレームワークを含む、TMFF2の膜近位領域に結合する、単離された抗TMFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0108】

本発明はまた、配列番号53のVH3__3-23及び配列番号55のVKI__L11に

50

それぞれ由来するVHフレームワーク及びVLフレームワークを含む、TM EFF 2の膜近位領域に結合する、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0109】

本発明はまた、配列番号54のVH1__1-69及び配列番号56のVKIIIA27にそれぞれ由来するVHフレームワーク及びVLフレームワークを含む、TM EFF 2の膜近位領域に結合する、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0110】

本発明はまた、配列番号54のVH1__1-69及び配列番号55のVKIL11にそれぞれ由来するVHフレームワーク及びVLフレームワークを含む、TM EFF 2の膜近位領域に結合する、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0111】

特定のフレームワーク又は生殖系列配列「に由来する」重鎖又は軽鎖可変領域を含む抗体は、本明細書で述べるトランスジェニックマウス、ラット、若しくはニワトリから、又はファージディスプレイライブラリからなどの、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られる抗体を指す。生殖系列配列に由来する特定のフレームワークを含む抗体は、例えば自然発生する体細胞変異又は意図的な置換に起因する、その由来である配列と比較した際のアミノ酸の違いを含み得る。

【0112】

本発明はまた、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び22のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含む。

【0114】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号39のポリヌクレオチドによってコードされ、VLは、配列番号42のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0115】

いくつかの実施形態では、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号32のHC及び配列番号35のLCを含む。

30

【0116】

いくつかの実施形態では、HCは、配列番号46のポリヌクレオチドによってコードされ、VLは、配列番号49のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0117】

本発明はまた、それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0118】

いくつかの実施形態では、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含む。

40

【0119】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号40のポリヌクレオチドによってコードされ、VLは、配列番号43のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0120】

いくつかの実施形態では、単離された抗TM EFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号33のHC及び配列番号36のLCを含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、HCは、配列番号47のポリヌクレオチドによってコードされ、LCは、配列番号50のポリヌクレオチドによってコードされる。

50

【0122】

本発明はまた、それぞれ配列番号10、14、17、18、20、及び24のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0123】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含む。

【0124】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号41のポリヌクレオチドによってコードされ、VLは、配列番号44のポリヌクレオチドによってコードされる。

10

【0125】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号34のHC及び配列番号37のLCを含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、HCは、配列番号48のポリヌクレオチドによってコードされ、LCは、配列番号51のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0127】

本発明はまた、それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0128】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号40のポリヌクレオチドによってコードされ、VLは、配列番号45のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0130】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号33のHC及び配列番号38のLCを含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、HCは、配列番号47のポリヌクレオチドによってコードされ、LCは、配列番号52のポリヌクレオチドによってコードされる。

30

【0132】

本発明はまた、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHC DR 1、HC DR 2、HC DR 3、LC DR 1、LC DR 2、及びLC DR 3を含む、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0133】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含む。

【0134】

いくつかの実施形態では、VHは、配列番号95のポリヌクレオチドによってコードされ、VLは、配列番号96のポリヌクレオチドによってコードされる。

40

【0135】

いくつかの実施形態では、単離された抗TMEFF 2抗体又はその抗原結合断片は、配列番号91のHC及び配列番号92のLCを含む。

【0136】

いくつかの実施形態では、HCは、配列番号97のポリヌクレオチドによってコードされ、LCは、配列番号98のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0137】

本発明はまた、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHC DR

50

1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3を含む、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0138】

いくつかの実施形態では、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 89 の V H 及び配列番号 90 の V L を含む。

【0139】

いくつかの実施形態では、V H は、配列番号 99 のポリヌクレオチドによってコードされ、V L は、配列番号 100 のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0140】

いくつかの実施形態では、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 93 の H C 及び配列番号 94 の L C を含む。

【0141】

いくつかの実施形態では、H C は、配列番号 101 のポリヌクレオチドによってコードされ、L C は、配列番号 102 のポリヌクレオチドによってコードされる。

【0142】

いくつかの実施形態では、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、多重特異性抗体である。

【0143】

いくつかの実施形態では、単離された抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片は、二重特異性抗体である。

【0144】

いくつかの実施形態では、単離された抗 T M E F F 2 二重特異性抗体又はその抗原結合断片は、T 細胞抗原に結合する。

【0145】

いくつかの実施形態では、単離された抗 T M E F F 2 二重特異性抗体又はその抗原結合断片は、C D 3 に結合する。

【0146】

いくつかの実施形態では、単離された抗 T M E F F 2 二重特異性抗体又はその抗原結合断片は、C D 3 イプシロンに結合する。

【0147】

本発明の例示的な抗 T M E F F 2 抗体の V H、V L、H C D R、L C D R、H C、及び L C 配列は、表 5～12 に示される。

【0148】

実施例で説明する実施形態は、一方が重鎖に由来し、一方が軽鎖に由来する可変ドメインの対を含むが、当業者であれば、代替的な実施形態が単一の重鎖又は軽鎖可変ドメインを含み得ることを認識するであろう。単一可変ドメインを使用して、T M E F F 2 に結合することができる 2 ドメイン特異性抗原結合断片を形成することができる可変ドメインについて、スクリーニングすることができる。スクリーニングは、例えば、国際公開第 1992/01047 号に開示されている階層的二重コンビナトリアルアプローチ (hierarchical dual combinatorial approach) を使用したファージディスプレイスクリーニング法によって行うことができる。このアプローチでは、V H 鎖又は V L 鎖のいずれかのクローンを含む個別のコロニーを使用して、他方の鎖 (V L 又は V H) をコードしているクローンの完全なライブラリに感染させ、得られた二本鎖特異的抗原結合ドメインを既知の方法及び本明細書に記載されるものを使用してファージディスプレイ技術に従って選択する。したがって、個々の V H 及び V L ポリペプチド鎖は、国際公開第 1992/01047 号に開示の方法を使用して、加えて抗 T M E F F 2 抗体を同定するのに有用である。

【0149】

相同抗体

表 9 に示される V H 又は V L アミノ酸配列を含む本発明の抗 T M E F F 2 抗体又はその抗原結合断片の変異体は、本発明の範囲内である。例えば、変異体は、親抗体と比較する

10

20

30

40

50

と、相同抗体が、T M E F F 2 への匹敵する結合又は改善された安定性などの機能特性を保持しているか又は改善された機能特性を有する限り、V H及び／又はV Lに1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸置換を含み得る。いくつかの実施形態では、配列同一性は、本発明のV H又はV Lアミノ酸配列に対して、約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%であり得る。

【0150】

いくつかの実施形態では、本発明の相同抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片は、約 0.4×10^{-9} M以下の平衡解離定数(K_D)でT M E F F 2の膜近位領域に結合し、 K_D が、室温でp H 4.5~5.0の酢酸緩衝液中の表面プラズモン共鳴を使用して測定される。

10

【0151】

いくつかの実施形態では、本発明の相同抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片は、約 0.1×10^{-10} M~約 0.4×10^{-9} Mの K_D でT M E F F 2の膜近位領域に結合する。

【0152】

本発明はまた、配列番号25のV H及び配列番号28のV Lを含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片であって、V H、V L、又はV H及びV Lの両方が、所望により1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸置換を含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。所望により、C D R内に置換は全く存在しない。

20

【0153】

本発明はまた、配列番号26のV H及び配列番号29のV Lを含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片であって、V H、V L、又はV H及びV Lの両方が、所望により1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸置換を含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。所望により、C D R内に置換は全く存在しない。

【0154】

本発明はまた、配列番号27のV H及び配列番号30のV Lを含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片であって、V H、V L、又はV H及びV Lの両方が、所望により1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸置換を含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。所望により、C D R内に置換は全く存在しない。

30

【0155】

本発明はまた、配列番号26のV H及び配列番号31のV Lを含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片であって、V H、V L、又はV H及びV Lの両方が、所望により1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸置換を含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。所望により、C D R内に置換は全く存在しない。

【0156】

本発明はまた、配列番号87のV H及び配列番号88のV Lを含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片であって、V H、V L、又はV H及びV Lの両方が、所望により1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸置換を含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片を提供する。所望により、C D R内に置換は全く存在しない。

40

【0157】

本発明はまた、配列番号89のV H及び配列番号90のV Lを含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片であって、V H、V L、又はV H及びV Lの両方が、所望により1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個のアミノ酸置換を含む、単離された抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片を提

50

供する。所望により、CDR内に置換は全く存在しない。

【0158】

本発明はまた、配列番号25、26、27、87、又は89のVHに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列を有するVHを含む、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。所望により、CDR内に上記配列番号からの配列の変異は全く存在しない。

【0159】

本発明はまた、配列番号28、29、30、31、88、又は90のVLに少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%同一のアミノ酸配列を有するVLを含む、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。所望により、CDR内に上記配列番号からの配列の変異は全く存在しない。

【0160】

選択抗TMEFF2抗体のVHドメインのアミノ酸配列のアラインメントは図1に示され、選択抗TMEFF2抗体のVLドメインのアミノ酸配列のアラインメントは図2に示される。VH及びVL鎖は、各行の先頭の配列番号によって同定される。抗体間で異なる残基位置は、VH及び／又はVLにおいて置換可能な部位である。例えば、置換は、(配列番号25に基づく付番の)配列番号25、27、87、及び89のVHにおける残基位置14、20、54、56、59、76、82、84、93、107で行うことができる。同様に、配列番号28、30、88、及び90のVLにおける残基位置1、95、及び107で置換を行ってもよい。行われ得る例示的な置換は、保存的アミノ酸置換、又は各抗TMEFF2抗体における対応する残基位置に存在するアミノ酸残基による置換である。

【0161】

2つの配列間の同一性パーセントは、2つの配列の最適なアライメントのために導入する必要があるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮した、配列により共有される同一の位置の数の関数である(即ち、同一性% = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100)。

【0162】

2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE. Meyers及びW. Millerのアルゴリズム(Comput. Appl. Biosci. 4:11-17(1988))を使用して、PAM120重み付け残基表、ギャップ長ペナルティ12、及びギャップペナルティ4を使用して決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ(www.Gcg.comで入手可能)のGAPプログラムに組み込まれているNeedleman及びWunschのアルゴリズム(J. Mol. Biol. 48:444-453(1970))を使用して、Blossum 62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか、並びにギャップ重み(gap weight)16、14、12、10、8、6、又は4、及び長さ重み(length weight)1、2、3、4、5、又は6を使用して、決定することができる。

【0163】

保存的修飾を有する抗体

本発明はまた、HCDR1、HCDR2、及びHCDR3配列を含むVHと、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3配列を含むVLとを含む、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片であって、CDR配列のうちの1つ又は2つ以上が、本明細書に記載の抗体(例えば、表5~12に示される抗体)に基づく特定のアミノ酸配列、又はその保存的修飾を含み、抗体が、親抗体の所望の機能特性を保持している、単離された抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0164】

いくつかの実施形態では、保存的修飾を有する抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断

10

20

30

40

50

片は、約 0.4×10^{-9} M 以下の平衡解離定数 (K_D) で TMEFF2 の膜近位領域に結合し、 K_D が、室温で pH 4.5 ~ 5.0 の酢酸緩衝液中の表面プラズモン共鳴を使用して測定される。

【0165】

いくつかの実施形態では、保存的修飾を有する抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片は、約 0.1×10^{-10} M ~ 約 0.4×10^{-9} M の K_D で TMEFF2 の膜近位領域に結合する。

【0166】

本発明はまた、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 22 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0167】

本発明はまた、それぞれ配列番号配列番号 11、13、16、19、21、及び 23 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 又はその抗原結合断片を提供する。

【0168】

本発明はまた、それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0169】

本発明はまた、それぞれ配列番号 11、13、16、18、20、及び 22 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 又はその抗原結合断片を提供する。

【0170】

本発明はまた、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 又はその抗原結合断片を提供する。

【0171】

本発明はまた、配列番号 25 の VH 及び配列番号 28 の VL、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

30

【0172】

本発明はまた、配列番号 26 の VH 及び配列番号 29 の VL、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0173】

本発明はまた、配列番号 27 の VH 及び配列番号 30 の VL、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0174】

本発明はまた、配列番号 26 の VH 及び配列番号 31 の VL、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0175】

本発明はまた、配列番号 87 の VH 及び配列番号 88 の VL、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0176】

本発明はまた、配列番号 89 の VH 及び配列番号 90 の VL、並びにそれらの保存的修飾を含む、単離された抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0177】

「保存的修飾」とは、アミノ酸修飾を含む抗体の結合特性に著しく影響を与えることも変化させることもないアミノ酸修飾を指す。保存的修飾は、アミノ酸の置換、付加、及び欠失を含む。保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基

50

に置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、明確に定義されており、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン、トリプトファン）、芳香族側鎖（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、チロシン）、脂肪族側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン）、アミド（例えば、アスパラギン、グルタミン）、 β 分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び含硫黄側鎖（システイン、メチオニン）を有するアミノ酸を含む。更に、アラニンスキニング変異誘発について以前に説明されているように（Mac Lennan et al., (1988) Acta Physiol Scand Suppl 643:55-67, Sasaki et al., (1988) Adv Biophys 35:1-24）、ポリペプチド内のいずれの天然残基もアラニンで置換され得る。本発明の抗体に対するアミノ酸置換は、例えばPCR突然変異誘発（米国特許第4,683,195号）などの既知の方法によって行うことができる。あるいは、変異体のライブラリは、例えば、ランダムコドン（NNK）又は非ランダムコドン（例えば11個のアミノ酸（Ala、Cys、Asp、Glu、Gly、Lys、Asn、Arg、Ser、Tyr、Trp）をコードするDVKコドン）を使用して生成することもできる。結果として生じる抗体変異体は、それらの特性に関して、本明細書に記載のアッセイを使用して試験することができる。

10

20

【0178】

免疫コンジュゲート（Immunoconjugates）

「免疫コンジュゲート」は、1つ又は2つ以上の異種分子（複数可）とコンジュゲートさせた本発明の抗体を指す。

【0179】

本発明はまた、異種分子とコンジュゲートした本発明の単離された抗体又はその抗原結合断片を含む、免疫複合体を提供する。

【0180】

いくつかの実施形態では、異種分子は、検出可能な標識である。

【0181】

検出可能な標識にコンジュゲートした本発明の単離された抗体又はその抗原結合断片は、多様なサンプルにおけるTMEFF2の発現を評価するために使用することができる。検出可能な標識としては、本発明の単離された抗体又はその抗原結合断片にコンジュゲートすると、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、又は化学的な手段を介してその後検出可能になる組成物が挙げられる。

30

【0182】

例示的な検出可能な標識としては、放射性同位体、磁気ビーズ、金属ビーズ、コロイド粒子、蛍光染料、電子密度試薬、酵素（例えば、一般的にELISAにおいて使用される）、ビオチン、ジゴキシゲニン、ハプテン、発光分子、化学発光分子、蛍光色素、フルオロフォア、蛍光消光剤、有色分子、放射性同位体、シンシレート（scintillates）、アビジン、ストレプトアビジン、プロテインA、プロテインG、抗体又はその断片、ポリヒスチジン、 Ni^{2+} 、Flagタグ、mycタグ、重金属、酵素、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、電子供与体／受容体、アクリジニウムエステル、及び比色基質が挙げられる。

40

【0183】

検出可能な標識は、例えば、検出可能な標識が放射性同位体であるときなど、自発的にシグナルを発し得る。他の場合では、検出可能な標識は、外場によって刺激された後、シグナルを放出する。

【0184】

例示的な放射性同位体は、 γ 放出、オージェ放出、 β 放出、アルファ放出、又はポジト

50

ロン放出性の放射性同位体であり得る。例示的な放射性同位体としては、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{15}N 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{55}Co 、 ^{57}Co 、 ^{60}Co 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{72}As 、 ^{75}Br 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Sr 、 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{115}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{226}Ra 、 ^{225}Ac 、及び ^{227}Ac が挙げられる。

【0185】

例示的な金属原子は、20超の原子番号を有する金属、例えば、カルシウム原子、スカンジウム原子、チタン原子、バナジウム原子、クロム原子、マンガン原子、鉄原子、コバルト原子、ニッケル原子、銅原子、亜鉛原子、ガリウム原子、ゲルマニウム原子、ヒ素原子、セレン原子、臭素原子、クリプトン原子、ルビジウム原子、ストロンチウム原子、イットリウム原子、ジルコニウム原子、ニオブ原子、モリブデン原子、テクネチウム原子、ルテニウム原子、ロジウム原子、パラジウム原子、銀原子、カドミウム原子、インジウム原子、スズ原子、アンチモン原子、テルル原子、ヨウ素原子、キセノン原子、セシウム原子、バリウム原子、ランタン原子、ハフニウム原子、タンタル原子、タングステン原子、レニウム原子、オスミウム原子、イリジウム原子、白金原子、金原子、水銀原子、タリウム原子、鉛原子、ビスマス原子、フランシウム原子、ラジウム原子、アクチニウム原子、セリウム原子、プラセオジウム原子、ネオジウム原子、プロメチウム原子、サマリウム原子、ユウロピウム原子、ガドリニウム原子、テルビウム原子、ジスプロシウム原子、ホルミウム原子、エルビウム原子、ツリウム原子、イッテルビウム原子、ルテチウム原子、トリウム原子、プロトアクチニウム原子、ウラン原子、ネプツニウム原子、プルトニウム原子、アメリシウム原子、キュリウム原子、バーケリウム原子、カリホルニウム原子、アインスタイニウム原子、フェルミウム原子、メンデレビウム原子、ノーベリウム原子、又はローレンシウム原子である。

【0186】

好適な色素としては、例えば、5(6)-カルボキシフルオレセイン、IRDye 680RDマレイミド、又はIRDye 800CW、ルテニウムポリピリジル色素などの任意の市販の色素が挙げられる。

【0187】

好適なフルオロフォアは、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate、FITC)、フルオレセインチオセミカルバジン、ローダミン、テキサスレッド、CyDyes (例えば、Cy3、Cy5、Cy5.5)、Alexa Fluors (例えば、Alexa488、Alexa555、Alexa594、Alexa647)、近赤外 (near infrared、NIR) (700~900nm) 蛍光染料、並びにカルボシアニン及びアミノスチリル染料である。

【0188】

検出可能な標識とコンジュゲートした、本発明の単離された抗体又はその抗原結合断片は、造影剤として使用することができる。

【0189】

本発明の単離された抗体又はその抗原結合断片は、既知の方法を使用して検出可能な標識とコンジュゲートさせることができる。

【0190】

いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、キレート剤と複合体を形成している。

【0191】

いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、リンカーを介して本発明の抗体又はその抗原結合断片とコンジュゲートする。

【0192】

検出可能な標識は、既知の方法を使用して、本発明の抗体又はその抗原結合断片に、直接又は間接的に連結することができる。好適なリンカーは、当該技術分野において既知であり、例えば、補欠分子族、非フェノールリンカー (N-スクシミジル-ベンゾエートの誘

10

20

30

40

50

導体、ドデカボラート）、大環状及び非環式の両キレート剤のキレート部分、例えば、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 7, 10, 四酢酸（DOTA）の誘導体、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）の誘導体、S-2-（4-イソチオシアナトベンジル）-1, 4, 7-トリアザシクロノナン-1, 4, 7-三酢酸（NOTA）の誘導体、及び1, 4, 8, 11-テトラアザシクロドデカン-1, 4, 8, 11-四酢酸（TETA）の誘導体、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオナート（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデートHCL）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベラート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス-（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン）、ジイソシアナート（例えば、トルエン2, 6-ジイソシアナート）、及びビス-活性フッ素化合物（例えば、1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン）、並びに他のキレート部分が挙げられる。好適なペプチドリンカーは周知である。

【0193】

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0194】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、抗体が、TMEFF2の膜近位領域に結合する、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。いずれの特定の理論にも束縛されることを望むものではないが、TMEFF2の膜近位領域に結合する二重特異性抗体は、腫瘍細胞のT細胞媒介性殺傷の媒介に、より効果的であり得る。

【0195】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインとを含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、抗体が、TMEFF2の膜近位領域への結合に関して、配列番号25の重鎖可変領域（VH）及び配列番号28の軽鎖可変領域（VL）、配列番号26のVH及び配列番号29のVL、配列番号27のVH及び配列番号30のVL、配列番号26のVH及び配列番号31のVL、配列番号87のVH及び配列番号88のVL、又は配列番号89のVH及び配列番号90のVL、を含む参照抗体と競合する、単離された二重特異性抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0196】

いくつかの実施形態では、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、約 0.4×10^{-9} M以下の解離定数（ K_D ）でTMEFF2の膜近位領域に結合し、 K_D が、室温でpH 4.5～5.0の酢酸緩衝液中の表面プラズモン共鳴を使用して測定される。

【0197】

いくつかの実施形態では、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、約 0.1×10^{-10} M～約 0.4×10^{-9} Mの K_D でTMEFF2の膜近位領域に結合する。

【0198】

本発明はまた、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、第1のドメインが、

それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び22、

それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23、

それぞれ配列番号10、14、17、18、20、及び24、o

それぞれ配列番号 11、13、16、18、20、及び 22、又は
それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 86、の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0199】

本発明はまた、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、第 2 のドメインが、

それぞれ配列番号 60、61、62、63、64、及び 65、又は

それぞれ配列番号 68、69、70、71、72、及び 73、の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0200】

本発明はまた、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、第 1 のドメインが、

配列番号 25 の VH 及び配列番号 28 の VL、

配列番号 26 の VH 及び配列番号 29 の VL、

配列番号 27 の VH 及び配列番号 30 の VL、

配列番号 26 の VH 及び配列番号 31 の VL、

配列番号 87 の VH 及び配列番号 88 の VL、又は

配列番号 89 の VH 及び配列番号 90 の VL、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0201】

本発明はまた、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、第 2 のドメインが、

配列番号 66 の VH 及び配列番号 67 の VL、又は

配列番号 74 の VH 及び配列番号 75 の VL、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0202】

いくつかの実施形態では、第 2 のドメインは、配列番号 59 の VH 及び配列番号 111 の VL を含む。

【0203】

本発明はまた、TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 22 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 60、61、62、63、64、及び 65 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 25 の VH 及び配列番号 28 の VL を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の VH 及び配列番号 67 の VL を含み、かつ / 又は

二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 32 の第 1 の重鎖 (HC1)、配列番号 35 の第 1 の軽鎖 (LC1)、配列番号 76 の第 2 の重鎖 (HC2)、及び配列番号 77 の第 2 の軽鎖 (LC2) を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0204】

本発明はまた、TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 10、12、15、18、20、及び 22 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、第

10

20

30

40

50

2 のドメインが、それぞれ配列番号 68、69、70、71、72、及び 73 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 25 の VH 及び配列番号 28 の VL を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の VH 及び配列番号 75 の VL を含み、かつ／又は

二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 32 の HC1、配列番号 35 の LC1、配列番号 78 の HC2、及び配列番号 79 の LC2 を含み、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0205】

本発明はまた、TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 11、13、16、19、21、及び 23 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 60、61、62、63、64、及び 65 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 26 の VH 及び配列番号 29 の VL を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の VH 及び配列番号 67 の VL を含み、かつ／又は

二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 33 の HC1、配列番号 36 の LC1、配列番号 76 の HC2、及び配列番号 77 の LC2 を含み、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0206】

本発明はまた、TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 11、13、16、19、21、及び 23 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 68、69、70、71、72、及び 73 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 26 の VH 及び配列番号 29 の VL を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の VH 及び配列番号 75 の VL を含み、かつ／又は

二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 33 の HC1、配列番号 36 の LC1、配列番号 78 の HC2、及び配列番号 79 の LC2 を含み、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0207】

本発明はまた、TMEFF2 に結合する第 1 のドメインと、CD3 に結合する第 2 のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片であって、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 60、61、62、63、64、及び 65 の HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及び LCDR3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 27 の VH 及び配列番号 30 の VL を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の VH 及び配列番号 67 の VL を含み、かつ／又は

二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 34 の HC1、配列番号 37 の LC1、配列番号 76 の HC2、及び配列番号 77 の LC2 を含み、単離された二重特異性抗 TMEFF2 / 抗 CD3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

20

30

40

50

【0208】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、14、17、18、20、及び24のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号34のHC1、配列番号37のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0209】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0210】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0211】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号91の第1の重鎖（HC1）、配列番号92の第1の軽鎖（LC1）、配列番号76の第2の重鎖（HC2）、及び配列番号77の第2の軽鎖（LC2）を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0212】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号91のHC1、配列番号92のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0213】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号89のVH及び配列番号90のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号93の第1の重鎖（HC1）、配列番号94の第1の軽鎖（LC1）、配列番号76の第2の重鎖（HC2）、及び配列番号77の第2の軽鎖（LC2）を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0214】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号89のVH及び配列番号90のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片が、配列番号93のHC1、配列番号94のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0215】

操作及び修飾された抗体

本発明の抗体又はその抗原結合断片を更に操作して、親抗体と比較すると類似の又は変化した特性を有する修飾抗体を生成することができる。本発明の抗体では、VH、VL、VH及びVL、定常領域、重鎖フレームワーク、軽鎖フレームワーク、又は6つのCDRのうちのいずれか若しくは全てが操作されてもよい。

【0216】

本発明の抗体は、CDRグラフト化により操作されてもよい。本発明の抗体の1つ又は2つ以上のCDR配列を、異なるフレームワーク配列にグラフト化してもよい。CDRグラフト化は、既知の方法及び本明細書に記載の方法を使用して行うことができる。

【0217】

使用され得るフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開DNAデータベース又は刊行されている参照文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子に関する生殖系列DNA及びコードタンパク質配列は、IMGT（登録商標）、international Immunogenetics information system（登録商標）www.Img.t.orgに見出すことができる。本発明の抗体の既存のフレームワーク配列を置き換えるために使用することができるフレームワーク配列は、VH若しくはVLの全長、又はFR1、FR2、FR3、及びFR4の長さにわたって親可変ドメインに対して最も高い同一性パーセント（%）を示すものであってもよい。更に、好適なフレームワークは、更に、VH及びVLのCDR1及びCDR2の長さ、又は同一のLCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、及びHCDR2の標準構造に基づいて選択され得る。好適なフレームワークは、既知の方法、例えば、米国特許第8,748,356号に記載のヒトフレームワーク適応又は米国特許第7,709,226号に記載の超ヒト化を使用して選択され得る。

【0218】

親抗体及び操作を受けた抗体のフレームワーク配列を、更に、例えば米国特許第6,180,370号に記載のとおり、復帰突然変異によって更に修飾して、生成される抗体の抗原への結合を回復及び／又は改善させることができる。親抗体又は操作を受けた抗体のフレームワーク配列を、更に、フレームワーク領域内の（あるいは1つ又は2つ以上のCDR領域内の）1つ又は2つ以上の残基を変異させることによって修飾して、T細胞エピトープを除去し、それにより抗体の潜在的な免疫原性を低減することもできる。このアプローチは「脱免疫」とも呼ばれ、米国特許出願公開第20070014796号に更に詳述されている。

【0219】

本発明の抗体のCDR残基を変異させて、TMFF2及び／又はCD3に対する抗体の親和性を調節することができる。

【0220】

本発明の抗体のCDR残基を変異させて、翻訳後修飾のリスクを最小化することができる。脱アミノ化（NS）、酸触媒加水分解（DP）、異性化（DS）、又は酸化（W）についての推定モチーフのアミノ酸残基を天然のアミノ酸のいずれかで置換して、当該モチーフの突然変異を誘発することができ、得られた抗体を、本明細書に記載の方法を使用して、その機能及び安定性について試験することができる。

【0221】

安定性、選択性、交差反応性、親和性、免疫原性、又は他の望ましい生物学的若しくは生物物理学特性を改善するために修飾される本発明の抗体は、本発明の範囲内である。抗体の安定性は、分子内力及び分子間力の中でも特に、（1）固有の安定性に影響を及ぼす個々のドメインのコアパッキング、（2）HCとLCとの対合に影響するタンパク質／タンパク質界面相互作用、（3）極性残基及び帯電残基の埋没、（4）極性残基及び帯電残基の水素（H）結合ネットワーク、並びに（5）表面電荷及び極性残基の分布、を含む、多くの要因によって影響を受ける（Worn et al., (2001) J Mol Biol 305:989-1010）。構造を不安定化させる可能性のある残基は、抗体の結晶構造に基づいて、又は場合によっては分子モデリングによって同定することが

でき、また、抗体の安定性に対する残基の効果は、同定された残基において変異を保有する変異体を生成及び評価することによって試験することができる。抗体の安定性を高める方法の1つには、示差走査熱量測定法 (differential scanning calorimetry、DSC) によって測定したときの熱転移中点温度 (T_m) を高くするというものがある。一般に、タンパク質の T_m は、その安定性と相関しており、溶液中でのアンフォールディング及び変性のしやすさ、並びにそのタンパク質がアンフォールディングする傾向に応じた分解プロセスとは逆相関する (Remmelle et al., (2000) Biopharm 13:36-46)。多数の研究で、DSCによって熱安定性として測定された配合物 (formulations) の物理的安定性のランク付けと他の方法によって測定された物理的安定性との間に相関が見出されている (Gupta et al., (2003) AAPS PharmSci 5E8; Zhang et al., 2004) J Pharm Sci 93:3076-89; Maa et al., (1996) Int J Pharm 140:155-68; Bedu-Addo et al., (2004) Pharm Res 21:1353-61; Remmelle et al., (1997) Pharm Res 15:200-8)。配合物の研究により、Fabの T_m は、対応するmAbの長期物理的安定性と密接な関係があることが示唆されている。

10

【0222】

C末端リジン (C-terminal lysine、CTL) は、注入された抗体から、血流中の内因性循環カルボキシペプチダーゼによって除去され得る (Cai et al., (2011) Biotechnol Bioeng 108:404-412)。製造中、米国特許出願公開第20140273092号に記載のとおり、細胞外 Zn^{2+} 、EDTA、又はEDTA- Fe^{3+} の濃度を制御することによって、CTLの除去を最高レベル未満に制御することができる。抗体のCTL含量は、既知の方法を使用して測定することができる。

20

【0223】

本発明の抗体に対してFc置換を行って、抗体エフェクター機能及び／又は薬物動態特性を調節することができる。従来の免疫機能では、抗体-抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用の結果、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞障害、マスト細胞の脱顆粒、及び食作用から免疫調整性シグナル、例えば、リンパ球の増殖及び抗体の分泌の制御に及ぶ広範な応答が生じる。これら相互作用全てが、抗体又は免疫複合体のFcドメインの、細胞上の特殊な細胞表面受容体への結合を通して開始される。抗体及び免疫複合体によって誘発される細胞応答の多様性は、Fc受容体:Fc γ RI (CD64) の異種性から生じ、Fc γ RIIa (CD32A) 及びFc γ RIII (CD16) は、Fc γ 受容体を活性化し (即ち、免疫系の増強)、一方、Fc γ RIIb (CD32B) は、阻害性Fc γ 受容体である (即ち、免疫系の減弱)。FcRn受容体への結合は、抗体の半減期を調節する。

30

【0224】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、Fc領域に少なくとも1つの置換を含む。

【0225】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、Fc領域に1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は15個の置換を含む。

40

【0226】

抗体半減期を調節するために置換され得るFc位置。抗体の半減期を延長するために行うことができる例示的な単独又は組み合わせの置換は、置換M428L／N434S、M252Y／S254T／T256E、T250Q／M428L、N434A、及びT307A／E380A／N434Aである。抗体の半減期を短縮するために行うことができる例示的な単独又は組み合わせの置換は、置換H435A、P257I／N434H、D376V／N434H、M252Y／S254T／T256E／H433K／N434F、

50

T 3 0 8 P / N 4 3 4 A、及び H 4 3 5 R である。

【0227】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 T M E F F 2 抗体又は二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体は、M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E、T 2 5 0 Q / M 4 2 8 L、N 4 3 4 A、T 3 0 7 A / E 3 8 0 A / N 4 3 4 A、H 4 3 5 A、P 2 5 7 I / N 4 3 4 H、D 3 7 6 V / N 4 3 4 H、M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 E / H 4 3 3 K / N 4 3 4 F、T 3 0 8 P / N 4 3 4 A、及び H 4 3 5 R からなる群から選択される、少なくとも 1 つの置換を F c 領域に含む。

【0228】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 T M E F F 2 抗体又は二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体は、抗体の活性化 F c γ 受容体 (Fc receptor、F c γ R) への結合を低減する及び／又は C 1 q 結合、補体依存性細胞障害 (complement dependent cytotoxicity、C D C)、抗体依存性細胞介在性細胞障害 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity、A D C C)、若しくは貪食作用 (antibody-dependent cell-mediated phagocytosis、A D C P) などの F c エフェクター機能を低減する、少なくとも 1 つの置換を F c 領域に含む。

【0229】

F c γ R を活性化しその後エフェクター機能を低減するために、抗体の結合を低減するために置換され得る F c 位置は、I g G 1 における置換 L 2 3 4 A / L 2 3 5 A、I g G 2 における V 2 3 4 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S / H 2 6 8 A / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S、I g G 4 における F 2 3 4 A / L 2 3 5 A、I g G 4 における S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A、全ての I g アイソタイプにおける N 2 9 7 A、I g G 2 における V 2 3 4 A / G 2 3 7 A、I g G 1 における K 2 1 4 T / E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A / G 2 3 6 - 欠失 / A 3 2 7 G / P 3 3 1 A / D 3 6 5 E / L 3 5 8 M、I g G 2 における H 2 6 8 Q / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S、I g G 1 における S 2 6 7 E / L 3 2 8 F、I g G 1 における L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / D 2 6 5 A、I g G 1 における L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S / H 2 6 8 A / A 3 3 0 S / P 3 3 1 S、I g G 4 における S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S、及び I g G 4 における S 2 2 8 P / F 2 3 4 A / L 2 3 5 A / G 2 3 6 - 欠失 / G 2 3 7 A / P 2 3 8 S である。

【0230】

I g G 4 の安定性を高めるために、周知の S 2 2 8 P 置換を I g G 4 抗体に行うことができる。

【0231】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 T M E F F 2 抗体又は二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体は、S 2 2 8 P 置換を含み、残基の付番は E U インデックスに従う。

【0232】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 T M E F F 2 抗体又は二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体は、F 2 3 4 A、L 2 3 5 A、又は F 2 3 4 A / L 2 3 5 A 置換を含み、残基の付番は E U インデックスに従う。

【0233】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 T M E F F 2 抗体又は二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体は、S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、及び L 2 3 5 A 置換を含み、残基の付番は E U インデックスに従う。

【0234】

相同抗体、保存的修飾を有する抗体、並びに操作及び修飾されている抗体の生成方法

親抗体と比較してアミノ酸配列が変化している本発明の抗体は、標準的なクローニング及び発現技術を使用して生成され得る。例えば、部位特異的変異導入又は P C R を介在させることによる変異導入を実施して変異を導入することができ、抗体結合又は他の所望の特性に対する影響を、周知の方法及び本明細書において実施例に記載されている方法を使

10

20

30

40

50

用して評価することができる。

【0235】

抗体のアイソタイプ及びアロタイプ

本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4アイソタイプであり得る。

【0236】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、IgG1アイソタイプである。

【0237】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、IgG2アイソタイプである。

10

【0238】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、IgG3アイソタイプである。

【0239】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、IgG4アイソタイプのものである。

【0240】

治療用抗体の免疫原性は、注入反応のリスク増大及び治療応答の期間短縮に関連している(Baert et al., (2003) N Engl J Med 348:602-08)。宿主において治療用抗体が免疫応答を誘導する程度は、抗体のアロタイプによって部分的に決定され得る(Stickler et al., (2011) Genes and Immunity 12:213-21)。抗体のアロタイプは、抗体の定常領域配列における特定の位置のアミノ酸配列の変異に関連する。表2は、選択IgG1、IgG2、及びIgG4アロタイプを示す。

20

【0241】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、G2m(n)アロタイプである。

【0242】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、G2m(n-)アロタイプである。

30

【0243】

いくつかの実施形態では、抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体発明は、G2M(n)／(n-)アロタイプである。

【0244】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、nG4m(a)アロタイプである。

【0245】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、G1m(17)アロタイプである。

40

【0246】

いくつかの実施形態では、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、G1m(17, 1)アロタイプである。

【0247】

【表 2】

表 2

アロタイプ	多様な位置におけるアミノ酸残基(残基の付番: EUインデックス)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n-)	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17, 1)					K	D	L	A

10

【0248】

抗イディオタイプ抗体

本発明はまた、本発明の抗 T M E F F 2 抗体又は二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0249】

本発明はまた、配列番号 25 の V H 及び配列番号 28 の V L を含む、本発明の抗 T M E F F 2 抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0250】

本発明はまた、配列番号 26 の V H 及び配列番号 29 の V L を含む、本発明の抗 T M E F F 2 抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

20

【0251】

本発明はまた、配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L を含む、本発明の抗 T M E F F 2 抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0252】

本発明はまた、配列番号 26 の V H 及び配列番号 31 の V L を含む、本発明の抗 T M E F F 2 抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0253】

本発明はまた、配列番号 87 の V H 及び配列番号 88 の V L を含む、本発明の抗 T M E F F 2 抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

30

【0254】

本発明はまた、配列番号 89 の V H 及び配列番号 90 の V L を含む、本発明の抗 T M E F F 2 抗体に特異的に結合する抗イディオタイプ抗体を提供する。

【0255】

抗イディオタイプ (idiotypic、I d) 抗体は、抗体の抗原決定基 (例えば、パラトープ又は C D R) を認識する抗体である。I d 抗体は、抗原をブロックするものであっても、しないものであってもよい。抗原を遮断する I d を使用して、サンプル中の遊離抗体 (例えば、本明細書に記載の本発明の抗 T M E F F 2 抗体) を検出することができる。ブロックしない I d を使用して、サンプル中の全抗体 (遊離しているもの、抗原に一部結合しているもの、又は抗原に完全に結合しているもの) を検出することができる。I d 抗体は、抗 I d が調製されている抗体で動物を免疫することによって調製することができる。

40

【0256】

また、更に別の動物で免疫応答を誘導する免疫原として抗 I d 抗体を使用して、いわゆる抗-抗 I d 抗体を産生することもできる。抗-抗 I d は、抗 I d を誘導した元の m A b とエピトープが同一であり得る。したがって、m A b のイディオタイプ決定基に対する抗体を使用することによって、同一の特異性の抗体を発現する他のクローンを同定することが可能である。抗 I d 抗体は、本明細書の他の箇所に記載のものなどの任意の好適な技術によって変動 (それにより、抗 I d 抗体変異体を産生する)、及び/又は誘導することができる。

50

【0257】

本発明の単一特異性抗体の生成

いくつかの実施形態では、抗TMEFF2抗体は、ヒトである。

【0258】

いくつかの実施形態では、抗TMEFF2抗体は、ヒト化されている。

【0259】

本発明の単一特異性抗体は、様々な技術を使用して生成することができる。例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495, 1975のハイブリドーマ法を使用してモノクローナル抗体を生成することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、又はハムスター、ラット、若しくはサルなどの他の宿主動物を、TMEFF2の膜近位ドメインなどのTMEFF2のヒト、チンパンジー、又はマカクのTMEFF2又はTMEFF2の断片で免疫し、続いて標準的な方法を使用して、免疫した動物の脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させて、ハイブリドーマ細胞を形成する (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。1個の不活化したハイブリドーマ細胞から発生したコロニーを、結合特異性、交差反応性又はその欠如、及び抗原親和性などの所望の特性を有する抗体の産生についてスクリーニングする。

10

【0260】

様々な宿主動物を使用して、本発明の抗TMEFF2抗体を産生することができる。例えば、Balb/cマウスを使用して、マウス抗ヒトTMEFF2抗体を生成することができる。Balb/cマウス及び他の非ヒト動物において生成された抗体を、よりヒトに近い配列を生成するための様々な技術を使用してヒト化することもできる。

20

【0261】

ヒトアクセプターフレームワークの選別を含む例示的なヒト化技術は既知であり、CDRグラフト化 (米国特許第5,225,539号)、SDRグラフト化 (米国特許第6,818,749号)、リサーフェシング (Padlan (1991) Mol Immunol 28:489-499)、特異性決定残基のリサーフェシング (米国特許出願公開第2010/0261620号)、ヒトフレームワーク適応 (米国特許第8,748,356)、又は超ヒト化 (米国特許第7,709,226号)を含む。これらの方法では、CDRの長さの類似性若しくはカノニカル構造の同一性、又はこれらの組み合わせに基づいて、親フレームワークに対する全体的な相同性に基づき選択され得るヒトフレームワークに親抗体のCDRを移植する。

30

【0262】

ヒト化抗体は、国際公開第1090/007861号及び同第1992/22653号に記載されているものなどの技術によって、結合親和性を保存するように変化させたフレームワーク支持残基を組み込むことによって (復帰変異)、又は任意のCDRに変異を導入して、例えば抗体の親和性を改善することによって、所望の抗原に対するその選択性又は親和性を改善するように更に最適化させてもよい。

【0263】

自身のゲノムにヒト免疫グロブリン (immunoglobulin、Ig) 遺伝子座を担持する、マウス、ラット、又はニワトリなどのトランスジェニック動物を使用して、標的タンパク質に対するヒト抗体を生成することができ、これらは例えば、米国特許第6,150,584号、国際公開第99/45962号、国際公開第2002/066630号、同第2002/43478号、同第2002/043478号、及び同第1990/04036号、Lonberg et al (1994) Nature 368:856-9、Green et al (1994) Nature Genet. 7:13-21、Green & Jakobovits (1998) Exp. Med. 188:483-95、Lonberg and Huszar (1995) Int Rev Immunol 13:65-93、Bruggemann et al., (1991) Eur J Imm

40

50

unol 21:1323-1326、Fishwild et al., (1996) Nat Biotechnol 14:845-851、Mendez et al., (1997) Nat Genet 15:146-156、Green (1999) J Immunol Methods 231:11-23、Yang et al., (1999) Cancer Res 59:1236-1243、Bruggemann and Taussig (1997) Curr Opin Biotechnol 8:455-458に記載されている。そのような動物の内在的な免疫グロブリン遺伝子座を破壊又は欠失させてもよく、相同又は非相同組み換えを使用して、導入染色体 (transchromosome) を使用して、又はミニ遺伝子を使用して、少なくとも1つの完全な又は部分的なヒト免疫グロブリン遺伝子座を動物のゲノムに挿入してもよい。Regeneron (www.Regeneron.com)、Harbour Antibodies (www.Harbourantibodies.com)、Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (www.Omtinc.net)、Kymab (www.Kymab.com)、Trianni (www.Trianni.com)、及びAblexis (www.Ablexis.com)などの企業は、上記の技術を使用して、選択された抗原に導かれるヒト抗体を提供するべく取り組んでいる場合がある。

【0264】

ヒト抗体はファージディスプレイライブラリから選択することができ、ここでファージは、ヒト免疫グロブリン、あるいはFab、単鎖抗体 (scFv)、又は非対合若しくは対合抗体可変領域などのそれらの部分を発現するよう操作されている (Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86、Krebs et al., (2001) J Immunol Meth 254:67-84、Vaughan et al., (1996) Nature Biotechnology 14:309-314、Sheets et al., (1998) PITAS (USA) 95:6157-6162、Hoogenboom and Winter (1991) J Mol Biol 227:381、Marks et al., (1991) J Mol Biol 222:581)。本発明の抗体は、例えば、Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96及び国際公開第09/085462号)に記載のバクテリオファージpIXコートタンパク質との融合タンパク質として抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を発現するファージディスプレイライブラリから単離され得る。ライブラリを、ヒト及び／又はカニクイザルTMEFF2又はCD3のファージ結合についてスクリーニングして、得られた陽性クローンの特性評価を更に行い、Fabをクローンの溶解物から単離し、完全長のIgGとして発現させることができる。ヒト抗体を単離するためのそのようなファージディスプレイ法は、例えば、米国特許第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,580,717号、同第5,969,108号、同第6,172,197号、同第5,885,793号、同第6,521,404号、同第6,544,731号、同第6,555,313号、同第6,582,915号、及び同第6,593,081号に記載されている。

【0265】

免疫原性抗原の調製及びモノクローナル抗体の産生は、組み換えタンパク質産生などの任意の好適な技術を使用して実施することができる。免疫原性抗原は、精製タンパク質、あるいは全細胞又は細胞若しくは組織抽出物を含むタンパク質混合物の形態で動物に投与されてもよく、抗原は、当該抗原又はその一部分をコードしている核酸から動物の体内で新たに形成されてもよい。

【0266】

本発明の二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体の生成

本発明の二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体は、本明細書の単離されたTMEFF2結合VH／VLドメインを、本明細書に記載のもの及び公に入手可能なものを含む任

意のCD3結合VH/VLドメインと、組み合わせることによって生成することができる。使用され得る例示的なCD3結合VH/VLドメインは、本明細書に記載の抗体CD3B219及びCD3B376のものである。使用され得る例示的なTM EFF 2結合VH/VLドメインは、抗体TM EB 675、TM EB 570、TM EB 674、TM EB 565、TM EB 762、及びTM EB 757の抗体である。生成された二重特異性抗TM EFF 2/抗CD3抗体は、TM EFF 2及びCD3への結合について、並びにTM EFF 2発現細胞（例えば、LNCaP）のT細胞媒介性殺傷などの所望の機能特性について試験することができる。

【0267】

本発明の二重特異性抗体は、例えば、2つの単一特異性二価抗体間でのFabアーム交換（又は半分子交換）を使用して、インビトロで、無細胞環境下又は共発現使用下のいずれかで、異なる特異性を有する2つの抗体半分子の、好ましくヘテロ二量体を形成する各半分子の重鎖CH3界面に置換を導入することによって生成することができる。Fabアーム交換反応は、ジスルフィド結合異性化反応及びCH3ドメインの解離-会合の結果である。親単一特異性抗体のヒンジ領域における重鎖ジスルフィド結合は低減する。親単一特異性抗体のうちの1つの得られた遊離システインは、第2の親単一特異性抗体分子のシステイン残基と重鎖内ジスルフィド結合を形成し、同時に、親抗体のCH3ドメインは、解離-会合により解放及び再形成する。FabアームのCH3ドメインは、ホモ二量体形成よりヘテロ二量体形成を好むように操作されてもよい。得られた産物は、各々異なるエピトープ、即ち、TM EFF 2上のエピトープ及びCD3上のエピトープに結合する、2つのFabアーム又は半分子を有する二重特異性抗体である。例えば、本発明の二重特異性抗体は、国際公開第2011/131746号に記載のDuoBody（登録商標）技術を使用して生成することができる。IgG1抗体の場合、一方の重鎖における変異F405L及び他方の重鎖におけるK409Rを使用することができる。IgG2抗体では、F405L及びR409K置換を有する野生型IgG2及びIgG2抗体を使用してもよい。IgG4抗体では、F405L及びR409K置換を有する野生型IgG4及びIgG4抗体を使用してもよい。二重特異性抗体を生成するために、第1の単一特異性二価抗体及び第2の単一特異性二価抗体を、Fc領域に前述の変異を有するように操作し、ヒンジ領域でシステインがジスルフィド結合異性化を受けることができる十分な還元条件下で、抗体と一緒にインキュベートし、それにより、Fabアーム交換により二重特異性抗体が生成される。インキュベート条件は、最適には、非還元条件に戻され得る。使用され得る例示的な還元剤は、2-メルカプトエチルアミン（2-mercaptoethylamine、2-MEA）、ジチオスレイトール（dithiothreitol、DTT）、ジチオエリスリトール（dithioerythritol、DTE）、グルタチオン、トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（tris（2-carboxyethyl）phosphine、TCEP）、L-システイン、及びβ-メルカプトエタノールである。例えば、少なくとも20℃の温度で、少なくとも25mMの2-MEAの存在下又は少なくとも0.5mMのジチオスレイトールの存在下で、pH5~8、例えばpH7.0又はpH7.4で、少なくとも90分間のインキュベートを使用することができる。

【0268】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗TM EFF 2/抗CD3抗体は、IgG1アイソタイプであり、配列番号84の野生型IgG1と比較すると、第1の重鎖（HC1）にF405L置換及び第2の重鎖（HC2）にK409R置換を含む。

【0269】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗TM EFF 2/抗CD3抗体は、IgG4アイソタイプであり、配列番号85の野生型IgG4と比較すると、HC2にF405L/R409K置換を含む。

【0270】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗TM EFF 2/抗CD3抗体は、IgG4アイソタイプであり、配列番号85の野生型IgG4と比較すると、HC1にS228P、F

2 3 4 A、及び L 2 3 5 A 置換、並びに H C 2 に S 2 2 8 P、F 2 3 4 A、L 2 3 5 A、F 4 0 5 L、及び R 4 0 9 K 置換を含む。

【0 2 7 1】

配列番号 8 4 野生型 I g G 1

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E
P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W
Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

10

【0 2 7 2】

配列番号 8 5 野生型 I g G 4

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E
S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V
D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y
R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A
K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K

20

【0 2 7 3】

配列番号 1 0 3 I g G 1 F 4 0 5 L

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E
P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I
S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
V L D S D G S F L L Y S K L T V D K S R W
Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

30

40

【0 2 7 4】

配列番号 1 0 9 I g G 1 K 4 0 9 R

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E
P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N
W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N
S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I

50

S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P
V L D S D G S F F L Y S R L T V D K S R W
Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

【0275】

配列番号104 I g G 4 F 4 0 5 L / R 4 0 9 K

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E
S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V
D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y
R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A
K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T K
N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
S D G S F L L Y S K L T V D K S R W Q E G
N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L G K

【0276】

二重特異性抗体はまた、Knob-in-Hole (Genentech)、CrossMAb (Roche) 及び静電的適合 (electrostatically-matched) (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed)、LUZ-Y (Genentech)、Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono)、及びBiclonic (Merus) などのデザインを使用して生成することもできる。

【0277】

「ノブ-イン-ホール」戦略 (例えば、国際公開第2006/028936号を参照されたい) において、ヒトIgGのCH3ドメインの界面を形成する選択アミノ酸は、ヘテロ二量体形成を促進するために、CH3ドメイン相互作用に影響を及ぼす位置に変異を導入され得る。小さな側鎖を有するアミノ酸 (ホール) が、第1の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入され、大きな側鎖を有するアミノ酸 (ノブ) が、第2の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入される。2つの抗体の共発現後に、ヘテロ二量体が、「ホール」を有する重鎖と「ノブ」を有する重鎖との優先的な相互作用の結果として形成される。ノブ及びホールを形成する例示的なCH3置換対は、T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S、及びT366W/T366S__L368A__Y407Vである (第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける修飾位置/第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける修飾位置として表現)。

【0278】

Fabアーム交換のプロモータへの「ノブ-イン-ホール」戦略の利用に加えて、CrossMAb技術は、半アームのうちの1つにCH1/CLドメイン交換を利用して、得られる二重特異性抗体の正しい軽鎖の対合を保証する (例えば、米国特許第8,242,247号を参照されたい)。

【0279】

他の交差法を使用して、二重特異性抗体の重鎖と軽鎖の間又は重鎖内で、一方又は両方のアームにおいて、可変又は定常、又は両ドメインを交換することによって、本発明の完全長二重特異性抗体を生成してもよい。これらの交換としては、例えば、国際特許公開第2009/080254号、同第2009/080251号、同第2009/018386号、及び同第2009/080252号に記載されるVH-CH1とVL-CL、VHとVL、CH3とCL、及びCH3とCH1が挙げられる。

【0280】

10

20

30

40

50

米国特許出願公開第2010/0015133号、米国特許出願公開第2009/0182127号、米国特許出願公開第2010/028637号、又は米国特許出願公開第2011/0123532号に記載されるような他の戦略、例えば、あるCH3表面における正に荷電した残基及び第2のCH3表面における負に荷電した残基を置換することによる静電的相互作用を使用する重鎖ヘテロ二量体化の促進を使用されてもよい。他の手法では、ヘテロ二量体化は、米国特許出願公開第2012/0149876号又は米国特許出願公開第2013/0195849号に記載されているように、以下の置換：L351Y__F405A__Y407V/T394W、T366I__K392M__T394W/F405A__Y407V、T366L__K392M__T394W/F405A__Y407V、L351Y__Y407A/T366A__K409F、L351Y__Y407A/T366V__K409F、Y407A/T366A__K409F、又はT350V__L351Y__F405A__Y407V/T350V__T366L__K392L__T394W（第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける修飾位置/第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける修飾位置として表す）により促進することができる。

【0281】

SEEDbody技術を利用して、本発明の二重特異性抗体を生成してもよい。SEEDbodyは、それらの定常ドメインにおいて、米国特許出願第2007/0287170号に記載されるように、ヘテロ二量体化を促進するためにIgA残基で置換された選択IgG残基を有する。

【0282】

変異は、通常、標準的な方法を使用して、抗体の定常ドメインなどの分子に対してDNAレベルで行われる。

【0283】

ポリヌクレオチド、ベクター、及び宿主細胞

本発明はまた、本発明の抗TMFF2抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、本発明の二重特異性抗TMFF2/抗CD3抗体又はその抗原結合断片をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。本明細書で提供された可変ドメインセグメントをコード可能な単離されたポリヌクレオチドは、抗体又は抗原結合断片を産生する同一の又は異なるベクターに含まれてもよい。ポリヌクレオチドは、相補的デオキシ核酸（complementary deoxynucleic acid、cDNA）であってもよく、好適な宿主において発現するためにコドン最適化されていてもよい。コドン最適化は、周知の技術である。

【0284】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリヌクレオチド（及びポリヌクレオチドがコードするペプチド）は、リーダー配列を含む。当技術分野において既知の任意のリーダー配列を利用することができる。リーダー配列は、制限部位又は翻訳開始部位を含み得る。

【0285】

本発明はまた、本発明の抗体のVH、本発明の抗体のVL、本発明の抗体の重鎖、又は本発明の抗体の軽鎖をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0286】

本発明はまた、配列番号25、26、27、87、又は89のVHをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0287】

本発明はまた、配列番号28、29、30、31、88、又は90のVLをコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0288】

本発明はまた、本発明の抗TMFF2/抗CD3抗体のHC1、LC1、HC2、又はLC2をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0289】

本発明はまた、配列番号 32、33、34、91、又は 93 の HC1 をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0290】

本発明はまた、配列番号 35、36、37、38、92、又は 94 の LC1 をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0291】

本発明はまた、配列番号 76 又は 78 の HC2 をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0292】

本発明はまた、配列番号 77 又は 79 の LC2 をコードする、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0293】

本発明はまた、配列番号 39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、95、96、97、98、99、100、101、又は 102 のポリヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0294】

本発明はまた、配列番号 105、106、80、81、107、108、82、及び 83 のポリヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0295】

本発明の抗体の VH 若しくは VL 若しくはその抗原結合断片、又は本発明の抗体の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、意図される宿主細胞におけるヌクレオチド配列の発現を可能にする、プロモータ又はエンハンサーなどの 1 つ又は 2 つ以上の制御エレメントに作動可能に連結させることができる。ポリヌクレオチドは、cDNA であってもよい。

【0296】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。そのようなベクターは、プラスミドベクター、ウイルスベクター、バキュロウイルス発現用ベクター、トランスポゾンベースのベクター、又は任意の手段によって所与の生物又は遺伝子的バックグラウンドに本発明の合成ポリヌクレオチドを導入するのに好適な任意の他のベクターであってもよい。例えば、所望により定常領域に連結されている本発明の抗体の軽鎖及び／又は重鎖可変領域をコードしているポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入する。軽鎖及び／又は重鎖は、同じか又は異なる発現ベクターにクローニングされ得る。免疫グロブリン鎖をコードしている DNA セグメントは、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする発現ベクター中のコントロール配列に操作可能に連結することができる。そのようなコントロール配列としては、シグナル配列、プロモータ（例えば、天然に付随する又は異種のプロモータ）、エンハンサーエレメント、及び転写終結配列が挙げられ、抗体を発現するように選択された宿主細胞と適合するように選択される。ベクターを適切な宿主に組み込み、組み込まれたポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を高レベルで発現させるのに好適な条件下で宿主を維持する。

【0297】

本説明の範囲内の組み換え発現ベクターは、好適な調節エレメントに操作可能に連結することができる、抗体の VH、VL、HC、又は LC などの少なくとも 1 つの組み換えタンパク質をコードする合成又は cDNA 由来の核酸断片を含む。そのような調節エレメントには、転写プロモータ、好適な mRNA リボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終了を制御する配列を挙げることができる。発現ベクター、特に、哺乳類の発現ベクターはまた、1 つ又は 2 つ以上の非転写エレメント、例えば、複製の起点、発現される遺伝子に連結された好適なプロモータ及びエンハンサー、他の 5' 又は 3' フランキング非転写配列、5' 又は 3' 非翻訳配列（例えば、必須リボソーム結合部位）、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位、又は転写終了配列を含んでもよい。宿主において複製する能力を付与する複製の起点もまた包含されてもよい。

【0298】

脊椎動物細胞を形質転換するのに使用される発現ベクター中の転写及び翻訳制御配列は、ウイルス資源により提供することができる。例示的なベクターは、Okayama and Berg, 3 Mol. cell. Biol. 280 (1983)に記載のように構築することができる。

【0299】

いくつかの実施形態では、抗体又は抗原結合断片のコード配列は、強力な構成的プロモータ、例えば、下記遺伝子：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine phosphoribosyl transferase, H P R T)、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ベータアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチンなどのためのプロモータの制御下に置かれる。加えて、多くのウイルスプロモータが、真核細胞中で恒常的に機能し、記載された実施形態での使用に適している。そのようなウイルスプロモータには、サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus、C M V) 中間初期プロモータ、S V 40の初期及び後期プロモータ、マウス乳癌ウイルス (Mouse Mammary Tumor Virus、M M T V) プロモータ、モロニー白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス (Human Immunodeficiency Virus、H I V)、エプスタインバーウイルス (Epstein Barr Virus、E B V)、ラウス肉腫ウイルス (Rous Sarcoma Virus、R S V)、及び他のレトロウイルスの長端末反復配列 (long terminal repeats、L T R)、並びに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、抗T M E F F 2抗体又はその抗原結合断片のコード配列は、メタロチオネインプロモータ、テトラサイクリン誘導性プロモータ、ドキシサイクリン誘導性プロモータなどの誘導性プロモータ、プロテインキナーゼR^{2'}, 5'-オリゴアデニレート合成酵素、M X 遺伝子、A D A R 1などの1つ又は2つ以上のインターフェロン刺激応答エレメント (interferon-stimulated response elements、I S R E) を含むプロモータの制御下に置かれる。

【0300】

本明細書に記載されたベクターは、1つ又は2つ以上の配列内リボソーム進入部位 (Internal Ribosome Entry Site、I R E S) を含んでもよい。I R E S 配列の融合ベクター内への包含は、一部のタンパク質の発現を増強させるのに有益であり得る。いくつかの実施形態では、ベクター系は、1つ又は2つ以上のポリアデニル化部位 (例えば、S V 40) を含み、その部位は、前述の核酸配列のうちいずれかの上流又は下流にあってもよい。ベクターの成分は、近接して連結されてもよいが、又は遺伝子産物を発現させるのに最適な間隔を提供するように (即ち、O R F 間に「スペーサー」ヌクレオチドを導入することにより) 配置されてもよいが、又は別の方法で位置付けられてもよい。調節エレメント、例えば、I R E S モチーフはまた、発現に最適な間隔を提供するように配置されてもよい。

【0301】

ベクターは、当技術分野において周知の選択マーカーを含んでもよい。選択マーカーには、陽性及び陰性選択マーカー、例えば、抗生物質抵抗性遺伝子 (例えば、ネオマイシン抵抗性遺伝子、ヒグロマイシン抵抗性遺伝子、カナマイシン抵抗性遺伝子、テトラサイクリン抵抗性遺伝子、ペニシリン抵抗性遺伝子)、グルタミン酸合成酵素遺伝子、ガンシクロビル選択用のH S V-T K、H S V-T K 誘導体、又は6-メチルプリン選択用の細菌のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子 (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)) が挙げられる。選択マーカーをコードする核酸配列又はクローニング部位は、対象となるポリペプチドをコードする核酸配列又はクローニング部位の上流又は下流にあってもよい。

【0302】

使用され得る例示的なベクターは、細菌：p B s、p h a g e s c r i p t、P s i X 174、p B l u e s c r i p t S K、p B s K S、p N H 8 a、p N H 16 a、p N H 18 a、p N H 46 a (S t r a t a g e n e, L a J o l l a, C a l i f.,

USA) ; pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、及び pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)、真核生物：pWLneo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG (Stratagene) pSVK3、pBPV、pMSG及びpSVL (Pharmacia)、pEE6.4 (Lonza)並びにpEE12.4 (Lonza)である。

【0303】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号25のVH及び／又は配列番号28のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0304】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号39のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号42のポリヌクレオチドを含む。

10

【0305】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号26のVH、及び／又は配列番号29のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0306】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号40のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号43のポリヌクレオチドを含む。

【0307】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号27のVH及び／又は配列番号30のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

20

【0308】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号41のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号44のポリヌクレオチドを含む。

【0309】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号26のVH、及び／又は配列番号31のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0310】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号40のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号45のポリヌクレオチドを含む。

【0311】

30

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号87のVH、及び／又は配列番号88のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0312】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号95のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号96のポリヌクレオチドを含む。

【0313】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号89のVH、及び／又は配列番号90のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0314】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号99のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号100のポリヌクレオチドを含む。

40

【0315】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号66のVH、及び／又は配列番号67のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0316】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号105のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号106のポリヌクレオチドを含む。

【0317】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号74のVH、及び／又は配列番号75のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

50

【0318】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号107のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号108のポリヌクレオチドを含む。

【0319】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号32のHC、及び／又は配列番号35のLCをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0320】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号46のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号49のポリヌクレオチドを含む。

【0321】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号33のHC、及び／又は配列番号36のLCをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0322】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号47のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号50のポリヌクレオチドを含む。

【0323】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号34のHC、及び／又は配列番号37のLCをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0324】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号48のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号51のポリヌクレオチドを含む。

【0325】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号33のHC、及び／又は配列番号38のLCをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0326】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号47のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号52のポリヌクレオチドを含む。

【0327】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号91のVH、及び／又は配列番号92のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0328】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号97のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号98のポリヌクレオチドを含む。

【0329】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号93のVH、及び／又は配列番号94のVLをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0330】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号101のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号102のポリヌクレオチドを含む。

【0331】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号76のHC、及び／又は配列番号77のLCをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0332】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号80のポリヌクレオチド、及び／又は配列番号81のポリヌクレオチドを含む。

【0333】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号78のHC、及び／又は配列番号79のLCをコードするポリヌクレオチドを含む。

【0334】

いくつかの実施形態では、ベクターは、配列番号82のポリヌクレオチド、及び／又は

10

20

30

40

50

配列番号 83 のポリヌクレオチドを含む。

【0335】

本明細書に記載されたベクターを使用して、記載された抗体又は抗原結合断片をコードする遺伝子により種々の細胞を形質転換することができる。例えば、ベクターを使用して、抗 T M E F F 2 抗体又は抗原結合断片を産生する細胞を生成することができる。したがって、本発明はまた、本発明の 1 つ又は 2 つ以上のベクターを含む、宿主細胞を提供する。

【0336】

外来遺伝子を細胞に導入する技術は既知であり、本発明の組み換え細胞を構築するために使用することができる。

【0337】

「宿主細胞」は、ベクターが導入された細胞を指す。宿主細胞という用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の後代、また特定の対象細胞から生成された安定な細胞株も指すことを意図すると理解される。変異又は環境の影響のいずれかに起因して、後続世代においてある特定の修飾が生じ得るので、そのような後代は親細胞に同一ではない場合があるが、本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に依然含まれる。

【0338】

そのような宿主細胞は、真核細胞、原核細胞、植物細胞、又は古細菌細胞であってもよい。原核宿主細胞の例は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、バチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) などの桿菌、並びにサルモネラ属 (*Salmonella*)、セラチア属 (*Serratia*)、及び様々なシュードモナス属 (*Pseudomonas*) の種などの他の腸内細菌科のものである。酵母などの他の微生物も発現に有用である。好適な酵母宿主細胞の例は、サッカロミセス属 (*Saccharomyces*) (例えば、サッカロマイセス・セレビシエ (*S.cerevisiae*)) 及びピキア属 (*Pichia*) である。例示的な真核細胞は、哺乳動物、昆虫、鳥類、又は他の動物由来のものであってもよい。哺乳類真核細胞としては、不死化細胞株 (例えばハイブリドーマ) 又は骨髓腫細胞株 (例えば SP2/0 (American Type Culture Collection (ATCC)、Manassas, VA、CRL-1581)、NS0 (European Collection of Cell Cultures (ECACC)、Salisbury, Wiltshire, UK、ECACC No. 85110503)、FO (ATCC CRL-1646) 及び Ag653 (ATCC CRL-1580) マウス細胞株) が挙げられる。例示的なヒト骨髓腫細胞株は、U266 (ATTC CRL-TIB-196) である。他の有用な細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に由来するもの、例えば、CHOK1SV (Lonza Biologicals, Walkersville, MD)、Potelligent (登録商標) CHOK2SV (Lonza)、CHO-K1 (ATCC CRL-61)、又は DG44 が挙げられる。

【0339】

本明細書に記載された発現ベクターにより形質転換された細胞は、本明細書に記載された抗体又は抗原結合断片の組み換え発現について選択され、又はスクリーニングされてもよい。組み換え陽性細胞は、タンパク質修飾又は変化させた翻訳後修飾により、所望の表現型、例えば、高レベルの発現、向上した増殖特性、又は所望の生化学的特性を有するタンパク質を生成する能力を示すサブクローンについて、増殖され、スクリーニングされる。これらの表現型は、所与のサブクローンの本来の特性又は変異によるものであり得る。変異は、化学物質、UV 波長光、照射、ウイルス、挿入変異源、DNA ミスマッチ修復の阻害、又はそのような方法の組み合わせの使用を通じて影響され得る。

【0340】

本発明はまた、本発明の抗体を産生する方法であって、抗体が発現する条件下で本発明の宿主細胞を培養することと、宿主細胞によって産生された抗体を回収することと、を含む方法を提供する。抗体を作製し、それを精製する方法は、当該技術分野において周知である。合成されたら (化学的に又は組み換えによって)、抗体全体、その二量体、個々の

10

20

30

40

50

軽鎖及び／若しくは重鎖、又はVH及び／若しくはVLなどの他の抗体断片を、硫酸アンモニウム沈殿、親和性カラム、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）精製、ゲル電気泳動などの標準的な手順（概して、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N. Y., (1982)）を参照）に従って精製することができる。対象抗体は、実質的に純粋、例えば、少なくとも純度約80%～85%、少なくとも純度約85%～90%、少なくとも純度約90%～95%、又は少なくとも約98%～99%、又はそれを超える純度であり得、例えば、対象抗体以外の細胞残屑、巨大分子などの夾雑物を含まない。

【0341】

本発明のポリヌクレオチド配列は、標準的な分子生物学的方法を使用してベクターに組み込むことができる。宿主細胞の形質転換、培養、抗体発現、及び精製は、周知の方法を使用して行われる。

【0342】

本発明はまた、本発明の抗TMEFF2抗体を産生する方法であって、

当該抗体のVHをコードしている第1のポリヌクレオチド及び当該抗体のVLをコードしている第2のポリヌクレオチドを発現ベクターに組み込むことと、

宿主細胞を当該発現ベクターで形質転換することと、

当該VL及び当該VHが発現し、抗体を形成する条件下で、培養培地中で当該宿主細胞を培養することと、

当該宿主細胞又は当該培養培地から抗体を回収することと、

を含む、方法もまた提供する。

【0343】

医薬組成物／投与

本発明は、本発明の抗体及び医薬的許容される担体を含む医薬組成物もまた提供する。治療用途では、本発明の抗体は、医薬的に許容される担体中に活性成分として有効な量の抗体を含む医薬組成物として調製することができる。「担体」は、本発明の抗体と一緒に投与される希釈剤、補助剤、賦形剤、又はビヒクルを指す。そのようなビヒクルは、水、及び石油、動物、植物、又は合成物由来のものを含む油、例えば、落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などの液体であってもよい。例えば、0.4%生理食塩水及び0.3%グリシンを使用してもよい。これらの溶液は滅菌され、一般には粒子状物質を含まない。これらは、従来周知の滅菌技術（例えば、濾過）によって滅菌することができる。組成物は、生理学的条件に近づけるために必要とされる医薬的に許容される補助物質、例えば、pH調節剤及び緩衝剤、安定剤、増粘剤、潤滑剤及び着色剤などを含み得る。そのような医薬製剤中の本発明の抗体の濃度は、約0.5重量%未満から通常少なくとも約1重量%まで、最大で15又は20重量%まで変動し得、また、選択される投与方法に従って、必要とされる用量、流体体積、粘度などに主に基づいて選択され得る。好適なビヒクル及び製剤（ヒトタンパク質、例えばヒト血清アルブミンを含む）は、例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp691-1092に記載され、特にpp. 958-989を参照されたい。

【0344】

本発明の抗体の投与方法は、当該技術分野において周知であるように、非経口投与、例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、若しくは皮下、経粘膜（経口、鼻腔内、膣内、直腸）、又は当業者に理解される他の手段などの任意の好適な経路であり得る。

【0345】

本発明の抗体はまた、癌などの疾患を発症するリスクを低減するために、予防的に投与され得る。

【0346】

したがって、筋肉内注射用の本発明の医薬組成物は、1 mLの滅菌緩衝水と、約1 ng～約100 mg/kg、例えば約50 ng～約30 mg/kg、又はより好ましくは約5 mg～約25 mg/kgの本発明の抗体と、を含むように調製することができる。

【0347】

抗TMEFF2抗体及び二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体を使用する方法

本発明はまた、TMEFF2陽性癌の治療を必要とする対象においてTMEFF2陽性癌を治療する方法であって、治療に有効な量の二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を対象に投与して、TMEFF2陽性癌を治療することを含む、方法を提供する。

【0348】

本発明はまた、TMEFF2陽性癌の治療を必要とする対象においてTMEFF2陽性癌を治療する方法であって、治療に有効な量の抗TMEFF2抗体又はその抗原結合断片を対象に投与して、TMEFF2陽性癌を治療することを含む、方法を提供する。

【0349】

前立腺癌の発症には、複数の遺伝子が関与している。前立腺癌の発症及び進行に関与し、したがって新しい抗前立腺癌療法の有望な標的であるタンパク質のうちの1つは、EGF様及び2つのフォリスタチン様ドメインを有する膜タンパク質（TMEFF2）である。TMEFF2は、2つのフォリスタチン様（follistatin-like、FS）ドメイン、EGF様ドメイン、膜貫通（transmembrane、TM）ドメイン、及び短細胞質尾部で構成されているI型膜貫通タンパク質である。TMEFF2タンパク質の最も高い発現は、脳及び前立腺の2つの器官で検出された（Liang et al. 2000、Horie et al. 2000）。TMEFF2の高い発現はまた、前立腺癌細胞株及び臨床サンプルにも見出され（Glynn-Jones et al. 2001、Gery et al. 2002、Afar et al. 2004）、TMEFF2が前立腺癌の進行において重要な役割を果たすことを示している。Tmeff2遺伝子の発現は、アンドロゲン受容体の制御下にある。多数のアンドロゲン依存性癌患者は、高レベルのTMEFF2 mRNAを呈した。

【0350】

したがって、抗TMEFF2抗体は、前立腺癌の診断、予後、又は治療のための重要なツールになる可能性を有し得る。

【0351】

「癌」は、病理学的な種類又は侵襲性の段階に関係なく、全ての種類の癌性成長又は発癌プロセス、転移組織又は悪性腫瘍形質転換細胞、組織、又は器官を含むことを意味する。例示的なTMEFF陽性癌としては、前立腺癌が挙げられる。

【0352】

いくつかの実施形態では、前立腺癌は、腺癌である。

【0353】

いくつかの実施形態では、前立腺癌は、転移性前立腺癌である。いくつかの実施形態では、前立腺癌は、直腸、リンパ節、若しくは骨、又はそれらの任意の組み合わせに転移している。

【0354】

いくつかの実施形態では、前立腺癌は、再発性又は難治性前立腺癌である。

【0355】

いくつかの実施形態では、前立腺癌は、去勢抵抗性前立腺癌である。

【0356】

いくつかの実施形態では、前立腺癌は、アンドロゲン遮断療法に感応性である。

【0357】

いくつかの実施形態では、前立腺癌は、アンドロゲン遮断療法に感応性ではない。

【0358】

本発明はまた、治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3

10

20

30

40

50

抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0359】

本発明はまた、TMEFF2陽性癌の治療に使用するための、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0360】

本発明はまた、TMEFF2前立腺癌の治療に使用するための、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0361】

本発明はまた、TMEFF2陽性癌を治療するための医薬品を製造するための、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0362】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

20

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号32の第1の重鎖（HC1）、配列番号35の第1の軽鎖（LC1）、配列番号76の第2の重鎖（HC2）、及び配列番号77の第2の軽鎖（LC2）を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0363】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

30

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号32のHC1、配列番号35のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0364】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、19、21、及び23のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含み、第2のドメイ

50

ンが、配列番号 66 の V H 及び配列番号 67 の V L を含み、かつ／又は

二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 33 の H C 1、配列番号 36 の L C 1、配列番号 76 の H C 2、及び配列番号 77 の L C 2 を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0365】

本発明はまた、前立腺癌などの T M E F F 2 陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体が、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと C D 3 に結合する第 2 のドメインとを含み、

10

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 11、13、16、19、21、及び 23 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 68、69、70、71、72、及び 73 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 26 の V H 及び配列番号 29 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の V H 及び配列番号 75 の V L を含み、かつ／又は

二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 33 の H C 1、配列番号 36 の L C 1、配列番号 78 の H C 2、及び配列番号 79 の L C 2 を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

20

【0366】

本発明はまた、前立腺癌などの T M E F F 2 陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体が、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと C D 3 に結合する第 2 のドメインとを含み、

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 60、61、62、63、64、及び 65 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の V H 及び配列番号 67 の V L を含み、かつ／又は

30

二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 34 の H C 1、配列番号 37 の L C 1、配列番号 76 の H C 2、及び配列番号 77 の L C 2 を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0367】

本発明はまた、前立腺癌などの T M E F F 2 陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体が、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと C D 3 に結合する第 2 のドメインとを含み、

40

第 1 のドメインが、それぞれ配列番号 10、14、17、18、20、及び 24 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、第 2 のドメインが、それぞれ配列番号 68、69、70、71、72、及び 73 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、

第 1 のドメインが、配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の V H 及び配列番号 75 の V L を含み、かつ／又は

二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号 34 の H C 1、配列番号 37 の L C 1、配列番号 78 の H C 2、及び配列番号 79 の L C 2 を含む、単離された二重特異性抗 T M E F F 2／抗 C D 3 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

50

【0368】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0369】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

第1のドメインが、それぞれ配列番号11、13、16、18、20、及び22のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号33のHC1、配列番号38のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0370】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号91のHC1、配列番号92のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0371】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号91のHC1、配列番号92のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

10

【0372】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号60、61、62、63、64、及び65のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号89のVH及び配列番号90のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含み、かつ／又は

20

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号93のHC1、配列番号94のLC1、配列番号76のHC2、及び配列番号77のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【0373】

本発明はまた、前立腺癌などのTMEFF2陽性癌の治療に使用するための単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片であって、二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体が、TMEFF2に結合する第1のドメインとCD3に結合する第2のドメインとを含み、

30

第1のドメインが、それぞれ配列番号10、12、15、18、20、及び86のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、第2のドメインが、それぞれ配列番号68、69、70、71、72、及び73のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含み、

第1のドメインが、配列番号89のVH及び配列番号90のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含み、かつ／又は

二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体若しくはその抗原結合断片が、配列番号93のHC1、配列番号94のLC1、配列番号78のHC2、及び配列番号79のLC2を含む、単離された二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体又はその抗原結合断片を提供する。

40

【0374】

本発明の抗体は、第2の治療剤と併用して投与され得る。

【0375】

いくつかの実施形態では、第2の治療剤は、手術、化学療法、アンドロゲン遮断療法若しくは放射線、又はそれらの任意の組み合わせである。

【0376】

キット

本発明はまた、本発明の抗TMEFF2抗体又は二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体を含む、キットを提供する。キットは、治療的使用のために、又は診断キットとして使用することができる。キットを使用して、サンプル中でのTMEFF2、CD3、又は

50

T M E F F 2 及び C D 3 の存在を検出することができる。

【0377】

いくつかの実施形態では、キットは、本発明の抗体と、抗体を検出するための試薬とを含む。キットは、使用説明書と、他の試薬、例えば、標識、治療剤、又は抗体を標識若しくは治療剤、又は放射線防護組成物にキレート化する、ないしは別の方法でカップリングするのに有用な剤と、投与するために抗体を調製するためのデバイス又は他の材料と、医薬的に許容される担体と、対象に投与するためのデバイス又は他の材料とを含む、1つ又は2つ以上の他の構成要素を含み得る。

【0378】

いくつかの実施形態では、キットは、容器内の本発明の抗体と、キットの使用説明書とを含む。

【0379】

いくつかの実施形態では、キットにおける抗体は標識されている。

【0380】

本発明はまた、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含む抗TMEFF2抗体を含む、キットを提供する。

【0381】

本発明はまた、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含む抗TMEFF2抗体を含む、キットを提供する。

【0382】

本発明はまた、配列番号27のVH及び配列番号30のVLを含む抗TMEFF2抗体を含む、キットを提供する。

【0383】

本発明はまた、配列番号26のVH及び配列番号31のVLを含む抗TMEFF2抗体を含む、キットを提供する。

【0384】

本発明はまた、配列番号87のVH及び配列番号88のVLを含む抗TMEFF2抗体を含む、キットを提供する。

【0385】

本発明はまた、配列番号89のVH及び配列番号90のVLを含む抗TMEFF2抗体を含む、キットを提供する。

【0386】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体を含む、キットであって、第1のドメインが、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含む、キットを提供する。

【0387】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体を含む、キットであって、第1のドメインが、配列番号25のVH及び配列番号28のVLを含み、第2のドメインが、配列番号74のVH及び配列番号75のVLを含む、キットを提供する。

【0388】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体を含む、キットであって、第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含み、第2のドメインが、配列番号66のVH及び配列番号67のVLを含む、キットを提供する。

【0389】

本発明はまた、TMEFF2に結合する第1のドメインと、CD3に結合する第2のドメインと、を含む二重特異性抗TMEFF2／抗CD3抗体を含む、キットであって、第1のドメインが、配列番号26のVH及び配列番号29のVLを含み、第2のドメインが

10

20

30

40

50

、配列番号 74 の V H 及び配列番号 75 の V L を含む、キットを提供する。

【0390】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の V H 及び配列番号 67 の V L を含む、キットを提供する。

【0391】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 27 の V H 及び配列番号 30 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の V H 及び配列番号 75 の V L を含む、キットを提供する。

10

【0392】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 26 の V H 及び配列番号 31 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の V H 及び配列番号 67 の V L を含む、キットを提供する。

【0393】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 26 の V H 及び配列番号 31 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の V H 及び配列番号 75 の V L を含む、キットを提供する。

20

【0394】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 87 の V H 及び配列番号 88 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の V H 及び配列番号 67 の V L を含む、キットを提供する。

【0395】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 87 の V H 及び配列番号 88 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の V H 及び配列番号 75 の V L を含む、キットを提供する。

30

【0396】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 89 の V H 及び配列番号 90 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 66 の V H 及び配列番号 67 の V L を含む、キットを提供する。

【0397】

本発明はまた、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと、C D 3 に結合する第 2 のドメインと、を含む二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体を含む、キットであって、第 1 のドメインが、配列番号 89 の V H 及び配列番号 90 の V L を含み、第 2 のドメインが、配列番号 74 の V H 及び配列番号 75 の V L を含む、キットを提供する。

40

【0398】

T M E F F 2 又は C D 3 を検出する方法

本発明はまた、サンプル中の T M E F F 2 を検出する方法であって、サンプルを得ることと、サンプルを本発明の抗 T M E F F 2 抗体と接触させることと、サンプル中の T M E F F 2 に結合した抗体を検出することと、を含む、方法を提供する。

【0399】

本発明はまた、サンプル中の T M E F F 2 及び C D 3 を検出する方法であって、サンプルを得ることと、サンプルを、T M E F F 2 に結合する第 1 のドメインと C D 3 に結合する第 2 のドメインとを含む、本発明の二重特異性抗 T M E F F 2 / 抗 C D 3 抗体と接触さ

50

せることと、サンプル中の T M E F F 2 及び C D 3 に結合した抗体を検出することと、を含む、方法を提供する。

【0400】

いくつかの実施形態では、サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織に会合していない細胞（即ち、遊離細胞）、組織（例えば、外科的に切除された腫瘍組織、穿刺吸引を含む生検材料）、組織プレパラートなどに由来し得る。

【0401】

T M E F F 2、又は T M E F F 2 及び C D 3 に結合した本明細書に記載の本発明の抗体は、既知の方法を使用して検出することができる。例示的な方法としては、蛍光若しくは化学発光標識、又は放射線標識を使用して抗体を直接標識すること、あるいは本発明の抗体に、ビオチン、酵素、又はエピトープタグなどの容易に検出可能な部分を結合させることが挙げられる。例示的な標識及び部分は、ルテニウム、111In-DOTA、111In-ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びベータガラクトシダーゼ、ポリヒスチジン（HISタグ）、アクリジン染料、シアニン染料、フルオロン染料、オキサジン染料、フェナントリジン染料、ローダミン染料、及びAlexafluor（登録商標）染料である。

【0402】

本発明の抗体を多様なアッセイに使用して、サンプル中の T M E F F 2、又は T M E F F 2 及び C D 3 を検出することができる。例示的なアッセイは、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、免疫沈降、平衡透析、免疫拡散、電気化学発光（electrochemiluminescence、ECL）イムノアッセイ、免疫組織化学的検査、蛍光活性化細胞選別（fluorescence-activated cell sorting、FACS）、又はELISAアッセイである。

【0403】

次に、本発明を以下の特定の非限定的な実施例を参照して説明する。

【0404】

実施例1：抗原の生成

ヒト細胞外ドメイン（extracellular domain、ECD）T M E F F 2 は、UniProt 受諾 # Q9UIK5 配列に基づいて産生された。ECD 構築物は、C 末端に 6X His タグ及び Avi タグ配列を有するように設計した（構築物 TMEW1、配列番号6）。FS2 及び EGF ドメイン（アミノ酸 151～320 を含む構築物は、6X His - tag 及び avitag 配列を有するヒト血清アルブミン（HSA）融合体として設計した（構築物 TMEW7、配列番号7）。T M E F F 2 膜近位ドメイン（残基 230～320）を含む構築物は、6xHis タグを有する（構築物 TMEW19、配列番号8）か、又は His - tag を有するラット IgG1 Fc に融合させて（構築物 TMEW20、配列番号9）設計した。T M E F F 2 の残基 230～320 は、T M E F F 2 の残基 261～301 に及ぶ EGF ドメインを含む。ヒト T M E F F 2 ECD 発現構築物を、製造業者のプロトコルに従って Expifectamine を使用して、HEK293 由来細胞、Exp293（Gibco/Thermo Fisher Scientific）に一過的にトランスフェクトした。採取前にオービタルシェーカーで、8%のCO₂を用いて37℃で5日間細胞をインキュベートした。発現した細胞を遠心分離により除去し、his タグを有する可溶性 T M E F F 2 タンパク質を、Ni Sepharose 6 Fast Flow 樹脂（GE Healthcare）を使用する固定化金属親和性クロマトグラフィー、続いて Dubelcco のリン酸塩緩衝液 pH7.2（1xDPBS）中での Superdex 200 分取サイズ排除クロマトグラフィー（size exclusion chromatography、SEC）（GE Healthcare）を使用して、培地から精製した。生成した抗原のアミノ酸配列を、表3に示す。

【0405】

【表 3】

表 3.

タンパク質AA ID	説明	アミノ酸配列
TMEW1 (配列番号6)	TMEFF2-FL-ECD-His-Avitag	FPTSLSDCQTPTGWNCSSGYDDRENDLFLCDTNTC KFDGECLRIGDTVTCVCQFKCNNDYVPVCGSNGE SYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDAGSG SGDGVHEGSGGETSQKETSTCDICQFGAECDEDAE DVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKE ASCQKQEKIEVMSLGRCDNTTTTTKSEDGHYAR TDYAENANKLEESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKC EHSINMQEPSCRC DAGYT GQHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYVGGGSHHHHHHLNDIFEAQKIEWHE
TMEW7 (配列番号7)	FS2-EGF-Tev-HSA(C34S)-His-Avitag	SGETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDVWCVCNI DCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQKQEK IEVMSLGRCDNTTTTTKSEDGHYARTDYAENAN KLEESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQE PSCRC DAGYT GQHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYV GSGSGSENLYFQGVRRSSDAHKSEVAHRFKDLG EENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFA KTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYG EMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRP EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPE LLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDE GKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQ RFPKAEFAEVSKLVTD LTKVHTECCHGDLLECAD DRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCI AEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKD VFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEK CCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC EL FEQLGEYKFQNAL LVRYTKKVPQVSTPTLVEVSR NLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLC VLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDE TYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKE TCFAEEGKKLVAAASQAALGLGGGSHHHHHHLNDI FEAQKIEWHE
TMEW19 (配列番号8)	spTMEFF2(230-320)G3S-H6	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREHHIP CPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYT G QHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYVGGGSHHHHHH
TMEW20 (配列番号9)	spTMEFF2(230-320)-G3S-ratIgG1Fc	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREHHIP CPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYT G QHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYVGGGSPRNC GG DCKPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVTC VVVDISQDDPEVHFSWFVDDVEVHTAQTRPPEEQ FNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTFRCKVTSAAFPS PIEKTISKPEGRTQVPHVYTMSPTEKEMTQNEVSI TCMVKGFPYPPDIYVEWQMNGQPQENYKNTPTM DTDGSYFLYSKLVNKKKEKWQGGNTFTCSVLHEGL HNHHTEKSLSHSPGKGGGSHHHHHH

10

20

30

【0406】

実施例 2. 抗 TMEFF2 抗体の生成

ヒト免疫グロブリン遺伝子座を発現するトランスジェニックラット (Omni Rat (登録商標)) を使用する、抗体の生成 Omni Rat (登録商標) は、完全なヒト Ig L 座 (J κ -C κ に連結された12個のV κ 及びJ λ -C λ に連結された16個のV λ) を一緒に有する、キメラヒト/ラット Ig H 遺伝子座 (ラット C $_H$ 遺伝子座に連結した、天然形態の22個のヒト V $_H$ 、全てのヒト D 及び J $_H$ セグメントを含む) を含む。(例えば、Osborn, et al. (2013) J Immunol 190 (4): 1481-1490を参照されたい)。したがって、ラットは、ラット免疫グロブリンの低減した発現を呈し、導入されたヒト重鎖及び軽鎖の導入遺伝子は、免疫化に応答して、クラススイッチ及び体細胞変異を受けて、完全長ヒト可変領域を有する高親和性キメラヒト/ラ

40

50

ットIgGモノクローナル抗体を生成した。Omni Rat（登録商標）の調製及び使用、並びにそのようなラットによって担持されるゲノム修飾は、WO14/093908に記載されている。

【0407】

Omni RatsをヒトTMEMF2構築物FS2-EGF-Tev-HSA(C34S)-His-Avitag(TMFW7、配列番号7)で免疫し、構築物spTMEMF2(230~320)G3S-ratIgG1Fc(TMFW20、配列番号9)でブーストした。89日の免疫レジメンに続いて、ラットからリンパ節を採取し、ハイブリドーマを生成するために使用し、ELISA及び／又はSPARCL(Spatial Proximity Analyte Reagent Capture Luminescence)によって、ヒトTMEMF2-FFL ECD-HIS-Avitag(TMFW1)タンパク質への結合について、ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。TMEMF2 ECD、FS2-EGF、又はEGFドメインのみのTMEMF2への結合の、二次ELISA及びSPARCLスクリーニングのために、いくつかの上清を選択した。スクリーニング結果に基づいて、いくつかのハイブリドーマクローンを配列決定し、発現させ、機能について特性評価した。

【0408】

ファージディスプレイライブラリからの抗体生成

標準的な方法を使用して、Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010、及びWO2009/085462)に記載の2セットの新たなpIXファージディスプレイライブラリから、TMEMF2に結合するFabを選択した。簡潔に言えば、V3.0及びV5.0と呼ばれる2セットのライブラリは、ヒトスカフォールドを多様化させることによって生成されたものであり、生殖系列VH遺伝子IGHV1-69*01、IGHV3-23*01及びIGHV5-51*01を、H3ループを介してヒトIGHJ-4ミニ遺伝子で組み換え(V5.0ではIGHJ-6ミニ遺伝子も使用した)、そして、ヒト生殖系列VLカップ遺伝子O12(IGKV1-39*01)、L6(IGKV3-11*01)、A27(IGKV3-20*01)及びB3(IGKV4-1*01)をIGKJ-1ミニ遺伝子で組み換えて、完全なVH及びVLドメインを構築した。多様化のために、タンパク質及びペプチド抗原と頻繁に接触する、H1、H2、L1、L2、及びL3ループ周辺の重鎖及び軽鎖可変領域における位置を選択した。選択した位置における配列多様性は、それぞれのIGHV又はIGLV遺伝子のIGHV又はIGLV生殖系列遺伝子ファミリーにおいてそれぞれの位置に存在する残基に制限した。H3ループにおける多様性は、V3.0ライブラリについては7~14アミノ酸長、V5.0ライブラリについては6~19アミノ酸長の短鎖~中鎖の合成ループを使用して生成した。H3におけるアミノ酸分布は、ヒト抗体において観察されるアミノ酸の変動を模倣するよう設計された。ライブラリを生成するために利用したスカフォールドは、そのヒトVH及びVL生殖系列遺伝子の由来に従って命名した。V3.0及びV5.0のセットの両方では、3つの重鎖ライブラリの各々を、4つの生殖系列軽鎖又は生殖系列軽鎖ライブラリと組み合わせて、選択実験に使用されるライブラリの各セットとして、12とおりの固有のVH:VLの組み合わせを生成した。

【0409】

V領域クローニング

ファージのハイブリドーマ細胞溶解物からの全RNAを、製造業者のプロトコルに従ってRNeasy 96キット(Qiagen)を使用して精製した。得られたRNAを、Drop Senseを使用して定量化し、-80℃で保存したか、又はRT-PCRによるInvitrogen SuperScript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen)を使用してcDNA合成に使用した。第1の鎖cDNA合成は、それぞれ重鎖、カップ鎖、及びラムダ鎖の定常領域にアニーリングされた遺伝子特異的プライマーを使用して実行した。最大3µgの精製したRNA、遺伝子特異性プライマー、dNTPミックス、反応緩衝液、25mMのM

gCl₂、DTT、RNaseOUT（商標）（40U/μl、Invitrogen）、及びSuperScript（商標）III RT（200U/μl、Invitrogen）カタログ#18080-051）で構成されるRT-PCR反応混合物を50℃で50分間、及び85℃で5分間インキュベートした。得られた一本鎖cDNAを-20℃で保存するか、又はPCR増幅に直接使用した。Platinum Pfxポリメラーゼ（Invitrogen）を使用してPCR反応を実行した。v領域断片を、最適化したPCR条件を使用して、リーダー配列、並びに重鎖、カッパ及びラムダ鎖の定常領域に順方向及び逆方向のプライマーアニーリングによって増幅させた。得られたPCR断片を配列決定し、回収したv領域のアミノ酸配列をコドン最適化し、S228P、F234A、及びL235A変異を有するIgG4定常領域を担持するpUnder系発現ベクター（IgG4PAAアイソタイプ）にクローニングした。 10

【0410】

Exp i 2 9 3 小規模トランスフェクション及び精製

免疫化キャンペーン又はファージディスプレイから同定した選択抗体をクローニングし、IgG1PAAとして発現させ、小さい2mlスケールを介して精製した。Exp i 2 9 3（商標）細胞（ThermoFisher Scientific）を、Exp i 2 9 3（商標）発現培地中 $1.25 \times 10^5 \sim 2.25 \times 10^5$ 個の生存細胞/mL密度で播種し、37℃、7% CO₂の125mL～2L振盪フラスコ内で培養した。密度が $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個の生存細胞/mLで生存率が98～99%に対数増殖に達したときに、細胞を継代培養した。 20

【0411】

トランスフェクションの日に、生存細胞密度及び生存率を決定した。製造業者のトランスフェクションプロトコル（ThermoFisher Publication番号MAN0007814）に従って、 3×10^6 個の生存細胞/mLの密度で細胞をトランスフェクトした。精製前に、850xGで15分間遠心分離することにより、トランスフェクション6日後に培養物を採取した。mAb Select Sure樹脂（GE Healthcare）を使用して清澄化した上清から抗体を精製し、PBS中に透析した。タンパク質濃度は、DropSense Instrument（Trinean）を使用して、濾液のA280測定によって測定した。 30

【0412】

実施例3．抗TMEFF2抗体の特性評価

抗TMEFF2抗体は高親和性でTMEFF2に結合する

TMEFF2 ECD（TMEW1：TMEFF2-FL ECD-His-Avitag）及び／又は膜近位領域（TMEW19：spTMEFF2（230-320）G3S-H6）への選択IgG4PAA抗TMEFF2抗体の結合は、タンパク質（TMEB674、TMEB675、TMEB565、及びTMEB570）又はBiacore SPR（TMEB762及びTMEB757）を使用して評価した。選択された抗体の結合の動態パラメータを、表4に示す。抗TMEFF2抗体は、ピコモル親和性でTMEFF2 ECD及びTMEFF2膜近位領域の両方に結合することが見出された。 40

【0413】

【表 4】

表 4.

抗体	抗原	TMEFF2 ドメイン	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	KD(nM)
TMEB674	TMEW1	ECD	$2.01E+06$	$1.62E-04$	0.10
TMEB674	TMEW19	MP*	$8.37E+05$	$1.75E-04$	0.20
TMEB675	TMEW1	ECD	$2.65E+06$	$1.53E-04$	0.10
TMEB675	TMEW19	MP	$9.72E+05$	$1.58E-04$	0.20
TMEB565	TMEW1	ECD	$3.84E+05$	$9.13E-06$	0.02
TMEB565	TMEW19	MP	$7.77E+05$	$6.39E-06$	0.01
TMEB570	TMEW1	ECD	$4.64E+05$	$5.13E-05$	0.11
TMEB570	TMEW19	MP	$7.62E+05$	$4.67E-05$	0.06
TMEB762	TMEW1	ECD	$5.41E+05$	$1.74E-04$	0.32
TMEB757	TMEW1	ECD	$5.42E+05$	$1.67E-04$	0.31
*MP:膜近位領域					

10

【0414】

P r o t e O n S P R

抗TMEFF2 mAbのECD及びヒトTMEFF2の膜近位領域への結合は、P r o t e O n S P R (B i o - R a d)によって測定した。(PBST中 $1\mu g/mL$ の最終濃度まで希釈した)精製mAbをアッセイのリガンドとして使用し、Fc捕捉を通じてヤギ抗ヒト(GAH) IgG Fcに固定化した。GAH IgG Fcのアミンカップリングのために、EDC(40mM)及びNHS(10mM)の1:1混合物を注入直前に混合して、チップ表面を活性化し、垂直方向に注入した。次いで、酢酸緩衝液(pH 5.0)中のGAH-Fc($30\mu g/ml$)抗体を、 $30\mu l/分$ で300秒間表面上に垂直方向に流した。その後、1Mエタノールアミン(pH 8.5)を同じ方向に注入することによって、表面の任意の残りの反応性カルボキシル基を失活させた。固定化のために $1\mu g/ml$ の濃度で抗体を使用した。抗体は、表面上を水平方向に流した。3倍連続希釈した5つの濃度(最高濃度範囲100~600nM)のヒトTMEFF2 ECD又は膜近位領域を、検体として垂直方向に流して、捕捉された分子に結合させた。また、垂直方向の6番目のチャンネルに緩衝液サンプルを注入して、ベースラインシグナルの動向を監視した。全ての濃度での会合及び解離相を、それぞれ $100\mu L/分$ の流速で3分間及び30(又は15)分間にわたり監視した。次の相互作用サイクルのために、18秒パルスの0.8%リン酸を使用して、結合した抗原を除去するために結合表面を再生した。応答データから2つのセットの参照データ:1)抗原と空のチップ表面との間での非特異的相互作用を補正するためのスポット間シグナル、2)(チップ上にPBSTのみが流された場合)非特異的ベースラインドリフトを補正するための、空のチャンネル信号、を減算することによって未処理データを処理した。

20

30

【0415】

B i a c o r e 8 K S P R

ヒトTMEFF2 ECDへの抗TMEFF2 mAbの結合は、B i a c o r e 8 K S P Rによって測定した。アッセイのフォーマットは、高密度抗ヒトFc表面を使用してmAbを捕捉し、次いで単一サイクル動態方法を使用してヒトTMEFF2濃度滴定を注入するためのものである。ヤギ抗ヒトFc IgG(Jackson Immuno research、カタログ#109-005-098)を、10mM酢酸緩衝液中 $30\mu g/mL$ のアミンカップリング、フローセル1及び2上、CM5センサーチップ(GE)上pH 4.5、HBSP(GE)緩衝液中 $30\mu L/分$ の流量を介して直接固定化した。フローセル2上 $0.5\mu g/mL$ (約200~300RU)で、mAbを抗ヒトFc IgG表面上に捕捉した。次いで、泳動用緩衝液をHBSP+ $100\mu g/ml$ BSAに変更した。単一サイクル動態方法を使用して、3倍連続希釈した30nM濃度のTMEFF2 ECDを、低濃度から高濃度で注入した。最後又は最高濃度の注入30分後にオ

40

50

フレートを監視し、次いで0.8%リン酸(Bio-Rad)を使用して表面を再生した。緩衝液ブランク試験、同じmAbの捕捉、及び同じサンプル実験条件の使用も完了した。未処理データは、応答データから2セットの参照データ：1) サンプルフローセル2から減算した参照フローセル1、及び2) 実験的試験からの緩衝液ブランク試験、を減算することによって処理した。各mAbの全濃度での処理したデータを1:1の単純なラングミュア結合モデルに全体的に適合させて、およその動態性(kon、koff)及び親和性(KD)定数を抽出した。

【0416】

抗TMEFF2抗体の熱安定性

DSG(示差走査熱量測定)による、アンフォールディング開始 $T_m = 52^\circ\text{C}$ 、及び第1の熱転移($T_{m1} = 60.4^\circ\text{C}$)によって、TMEB675は、通常の熱安定性プロファイルよりも低いことを示した。TMEB675の配列のより詳しい検査(実施例4を参照されたい)は、重鎖及び軽鎖のフレームワーク領域内の体細胞超変異(Somatic Hypermutation、SHM)の存在を示した。いくつかの再操作された変異体をサブクローニングし、発現させ、精製し、DSGによりプロファイルした。得られたmAb TMEB762及びTMEFB757は、望ましい熱安定性プロファイル(それぞれ、 $T_{m1} = 69.4^\circ\text{C}$ 、及び $T_{m1} = 69.7^\circ\text{C}$)を示した。TMEB675と比較して、TMEB762は、重鎖にR14P、P20L、及びH81Qのアミノ酸修飾を有し、一方TMEFB757は、重鎖にR14P及びP20Lのアミノ酸修飾を有した。TMEB675と比較して、TMEB762は、軽鎖にA1D及びA91Pのアミノ酸修飾を有し、一方TMEFB757は、軽鎖にA91Pの修飾を有した。残基の付番は、Kabattに従う。TMEB675、TMEB762のTMEFF2 ECDへの結合の動態パラメータを、表4に示す。

【0417】

実施例4. TMEFF2抗体の構造的特性評価

標準的な技術を使用して、抗体のcDNA配列及びアミノ酸翻訳物を得た。ポリペプチド配列の決定後、発現をスケールアップするための標準的な方法を使用して、可変領域又は完全長抗体をコードするいくつかの抗体cDNAを、コドン最適化した。

【0418】

表5は、選択抗TMEFF2抗体のHCDR1及びHCDR2アミノ酸配列を示す。

【0419】

表6は、選択抗TMEFF2抗体のHCDR3のアミノ酸配列を示す。

【0420】

表7は、選択抗TMEFF2抗体のLCDR1及びLCDR2アミノ酸配列を示す。

【0421】

表8は、選択抗TMEFF2抗体のLCDR3のアミノ酸配列を示す。

【0422】

表9は、選択抗TMEFF2抗体のVH及びVLアミノ酸配列を示す。

【0423】

表10は、選択抗TMEFF2抗体の重鎖及び軽鎖の配列番号を示す。

【0424】

表11は、選択抗TMEFF2抗体の重鎖アミノ酸配列を示す。

【0425】

表12は、選択抗TMEFF2抗体の軽鎖アミノ酸配列を示す。

【0426】

表13は、様々な抗TMEFF2抗体鎖をコードするポリヌクレオチドの配列番号を示す。

【0427】

【表 5】

表 5.

mAb	HCDR1配列	HCDR1 配列番号	HCDR2配列	HCDR2 配列番号
TMEB675	SYSMS	10	VISGSGGFTDYADSVKG	12
TMEB570	SYYSIS	11	GIIPISGRANYAQKFQG	13
TMEB674	SYSMS	10	VISGGGSFTSYADSVKG	14
TMEB565	SYYSIS	11	GIIPISGRANYAQKFQG	13
TMEB762	SYSMS	10	VISGSGGFTDYADSVKG	12
TMEB757	SYSMS	10	VISGSGGFTDYADSVKG	12

10

【0 4 2 8】

【表 6】

表 6.

mAb	HCDR3配列	HCDR3配列番号
TMEB675	MPLNSPHDY	15
TMEB570	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB674	MPLNSPHDC	17
TMEB565	DGYSSGRSTTYAFDY	16
TMEB762	MPLNSPHDY	15
TMEB757	MPLNSPHDY	15

20

【0 4 2 9】

【表 7】

表 7.

mAb	LCDR1アミノ酸	LCDR1配列番号	LCDR2アミノ酸	LCDR2配列番号
TMEB675	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB570	RASQSVSTYYLA	19	GASYRAT	21
TMEB674	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB565	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB762	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20
TMEB757	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	20

30

【0 4 3 0】

【表 8】

表 8.

mAb	LCDR3アミノ酸	LCDR3配列番号
TMEB675	LQDYNYALT	22
TMEB570	QQYGHSPIT	23
TMEB674	LQDYNYSLT	24
TMEB565	LQDYNYALT	22
TMEB762	LQDYNYPLT	86
TMEB757	LQDYNYPLT	86

40

【0 4 3 1】

【表 9 - 1】

表 9.

抗体	VH名	VHアミノ酸配列	VHの 配列番号	VL名	VLアミノ酸配列	VLの 配列番号
TMEB675	TMEH411	EVQLLES GGGLVQ RGGSL RPSCA ASGF TFSSYS MSW VRQAP GKGL EWVSV ISGS GGFTD YADSV KGRFT ISRDN SKNTLY LHM NSLRA EDTAV YYCAR MPLN SPHDY WGQG TLVTV SS	25	TMEL127	AIQMTQ SPSS LSASV GDRV TITCR ASQGI RNDLG WYQK KPGKA PKLLI YAASS LQSG VPSRF SGSG SGSD TFTLT ISSL QPEDF ATYY C LQDYN YALTF GGG TKVEIK	28
TMEB570	TMEH396	QVQLVQ SGAEV KKPGS SEVK KVSCK ASGG TFSSY YISW V RQAPG QGGL EWMGG IPI SG RANYA QKFQ GRVTI TADES TSTAY MELSS LRSED TAVYY CARDG YSSG RSTTY AFDYW GGGTL VTVSS	26	TMEL112	EIVLTQ SPGTL SLSPG ERAT LSCRAS QSV STYYL AWYQ QKPGQ APRL LIYGAS YRAT GIPDR FSGSG SGTDFT LTIS RLEPED FAVY YCQQY GHSP ITFGQ GKVEIK	29
TMEB674	TMEH410	EVQLLES GGGLVQ PPGGS LRLSCA ASGF TFSSYS MSW VRQAP GKGL EWVSV ISGG GSFTS YADSV KGRFT ISRDN SNNTLY LQM SSLRA EDTAF YYCAR MPLN SPHDC WGQG TLVTV SS	27	TMEL126	AIQMTQ SPSS LSASV GDRV TITCR ASQGI RNDLG WYQK KPGKA PKLLI YAASS LQSG VPSRF SGSG SGSD TFTLT ISSL QPEDF ATYY C LQDYN YSLTF GGG TKVEIR	30
TMEB565	TMEH396	QVQLVQ SGAEV KKPGS SEVK KVSCK ASGG TFSSY YISW V RQAPG QGGL EWMGG IPI SG RANYA QKFQ GRVTI TADES TSTAY MELSS LRSED TAVYY CARDG YSSG RSTTY AFDYW GGGTL VTVSS	26	TMEL111	EIVLTQ SPGTL SLSPG ERAT LSCRAS QSV ATYYL AWYQ QKPGQ APRL LIYGAS SRAT GIPDR FSGSG SGTDFT LTIS RLEPED FAVY YCQQY GYNPI ITFGQ GKVEIK	31

【表 9 - 2】

(表 9 の続き)

抗体	VH名	VHアミノ酸配列	VHの 配列番号	VL名	VLアミノ酸配列	VLの 配列番号
TMEB762	TMEH459	EVQLLES GGGLVQ PGGSL RLSCA ASGFT FSSYS MSWV RQAPG KGLE WVSVI SGSG GFTDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMN SLRAE DTAVY YCARM PLNS PHDYW GQGT LTVSS	87	DL3L129	DIQMTQ SPSS LSASV GDRV TITCR ASQG IRNDL GWYQ QKPG KAPK LLIY AASS LQSG VPSR FSGS GSGS GTDFT LTIS SLQP EDFA TYCY LQDY NYPL TLTF GGGT KVEIK	88
TMEB757	TMEH460	EVQLLES GGGLVQ PGGSL RLSCA ASGFT FSSYS MSWV RQAPG KGLE WVSVI SGSG GFTDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LHMN SLRAE DTAVY YCARM PLNS PHDYW GQGT LTVSS	89	B76L85	AIQMTQ SPSS LSASV GDRV TITCR ASQG IRNDL GWYQ QKPG KAPK LLIY AASS LQSG VPSR FSGS GSGS GTDFT LTIS SLQP EDFA TYCY LQDY NYPL TLTF GGGT KVEIK	90

【 0 4 3 3 】

【表 1 0】

表 1 0 .

抗体	VH名	VL名	HCタンパク質配列番号	LCタンパク質配列番号
TMEB675	TMEH411	TMEL127	32	35
TMEB570	TMEH396	TMEL112	33	36
TMEB674	TMEH410	TMEL126	34	37
TMEB565	TMEH396	TMEL111	33	38
TMEB762	TMEH459	DL3L129	91	92
TMEB757	TMEH460	B76L85	93	94

【 0 4 3 4 】

10

20

30

【表 1 1】

表 1 1.

HCタンパク質 配列番号	HCアミノ酸配列
32 (TMEB675 HC)	EVQLLESGGGLVQRRGGSRLRPSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKG LEWVSVISGSGGFTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAE DTAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
33 (TMEB570、 TMEB565 HC)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGFTFSSYISWVRQAPGQG LEWMGGIIPISGRANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDGYSSGRSTTYAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK
34 (TMEB674 HC)	EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGK GLEWVSVISGGGSFTSYADSVKGRFTISRDN SNNTLYLQMSSLRA EDTAFYYCARMPLNSPHDCWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQ EPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
91 (TMEB762 HC)	EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKG LEWVSVISGSGGFTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
93 (TMEB757 HC)	EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMSWVRQAPGKG LEWVSVISGSGGFTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLHMNSLRAE DTAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPP CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

10

20

30

40

【表 1 2】

表 1 2.

LCタンパク質 配列番号	LCアミノ酸配列
35 (TMEB675 LC)	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYN YALTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
36 (TMEB570 LC)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSTYYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASYRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGH SPITFGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
37 (TMEB674 LC)	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYN YSLTFGGGKVEIRRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
38 (TMEB565 LC)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVATYYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGY NPITFGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
92 (TMEB762 LC)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYN YPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
94 (TMEB757 LC)	AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKL LIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYN YPLTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

【0 4 3 6】

【表 1 3】

表 1 3.

抗体	VH cDNA 配列番号	VL cDNA 配列番号	HC cDNA 配列番号	LC cDNA 配列番号
TMEB675	39	42	46	49
TMEB570	40	43	47	50
TMEB674	41	44	48	51
TMEB565	40	45	47	52
TMEB762	95	96	97	98
TMEB757	99	100	101	102

30

40

【0 4 3 7】

配列番号 3 9 (TMEB675 VH cDNA)

G A G G T G C A G C T G C T G G A A A G C G G C G G A G G C C T G G T G C A G
 A G A G G A G G A A G C C T G A G A C C C A G C T G T G C C G C C A G C G G C T
 T C A C C T T C A G C A G C T A C A G C A T G A G C T G G G T C A G G C A G G C
 C C C T G G C A A A G G A C T G G A G T G G G T G A G C G T G A T T A G C G G C
 A G C G G C G G C T T C A C C G A T T A C G C C G A C A G C G T G A A G G G C A
 G G T T C A C C A T C A G C A G G G A C A A T A G C A A G A A C A C C C T G T A
 C C T G C A C A T G A A C A G C C T G A G G G C C G A G G A C A C C G C C G T G
 T A C T A C T G C G C C A G G A T G C C C C T G A A C A G C C C T C A C G A C T

50

ACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTGACCGTGTTCCAGC

【0438】

配列番号40 (TMEB570、TMEB565 VH cDNA)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAA
CCGGGCAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAGAGCGGCG
GCACCTTTCAGCTCCTATTACATTAGCTGGGTGCGCCAGGC
GCCGGGGCCAGGGCCTGGGAATGGATGGGTGGCATTTATCCCA
ATCAGTGGGCGTGCTAATTATGCGCAGAAATTTTCAGGGCC
GCGTGACCATTTACCGCTGATGAAAGCACCAAGCACCGCGCTA
TATGGAACCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGGTG
TATTATTGCGCGCGCGACGGCTACAGTAGTGACGTAGCA
CAACATACGCATTTTGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT
GACCGTGTCGAGT

10

【0439】

配列番号41 (TMEB674 VH cDNA)

GAAGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG
CCTCCTGGCGGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCG
GCTTTCACCTTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTGAGACA
GGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGAGCGTGATCAGC
GGCGGAGGCGAGCTTTACCAAGCTACGCCGACAGCGTGAAAG
GCAGGTTTCACCATTCAGCAGGGACAACAAGCAACAACACCCCT
GTACCTGCGAGATGAGCAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
TTCTACTACTGCGCCAGGATGCCCCCTGAACAGCCCCCATG
ACTGCTGGGGGACAGGGGCACCCCTGGTGCACCGTGAGCAGC

20

【0440】

配列番号42 (TMEB675 VL cDNA)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCT
AGCGTGGGCGACAGGGGTGACCATCACCTGCAAGGGCCAGCC
AGGGCATCAGAAACGACCTGGGGCTGGTACCAGCAGAAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGC
CTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCA
GCGGCACCGACTTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAAGCC
CGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGCTGCAAGGACTACAAAC
TACGCCCTGACATTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCA
AG

30

【0441】

配列番号43 (TMEB570 VL cDNA)

GAAATTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGGCACCCCTGAGCCTG
AGCCCGGGCGAACGCGCGGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCC
AGAGCGTTTCCACATACTACCTGGCGTGTTATCAGCAGAA
ACCGGGCCAGGCGCGCGCCCTGCTGATTTACGGTGCCTCC
TATCGCGCGACCGGCATTCCGGATCGCTTTTAGCGGCGAGCG
GTTTCGGGCACCGATTTTTACCCCTGACCATTAGCCGCGCTGGA
ACCGGAAGATTTTTGCGGTGTTATTATTGCCAGCAGTACGGT
CACAGCCCGATTACTTTTGGCCAGGGGCACCAAGGTGGAAA
TCAAA

40

【0442】

配列番号44 (TMEB674 VL cDNA)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCT
AGCGTGGGCGACAGGGGTGACCATCACCTGCAAGGGCCAGCC

50

AGGGCATCAGGAACGACCTTGGGCTTGGTACCAAGCAGAAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGTCTGATCTACGCCGCCAGCAGC
CTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGCAGCGGAA
GCGGCACCGACTTTCACCCCTGACCATCTCCAGCCTGCAAGCC
CGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGTCTGCAGGACTACAAAC
TACAGCCTGACCTTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCA
GG

【0443】

配列番号45 (TMEB565 VL cDNA)

GAAATTGTGTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGGCACCCCTGAGCCTG
AGCCCGGGGCGAACGCGCGGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCC
AGAGCGTTTGCCACCTATTATCTTTGCGTGGTATCAGCAGAA
ACCGGGGCCAGGCGGCCGCGCCCTGCTGATTTACGGTGCATCC
TCCCGTGCAGCCGGGCATTTCGGGATCGCTTTTAGCGGCGAGCG
GTTTCGCGGCACCGATTTTTACCCCTGACCATTAGCCGCGCTGGA
ACCGGAAGATTTTTGCGGGTGTATTATTGCCAGCAGTACGGC
TATAACCCCAATTACCTTTTGGCCAGGGGCACCAAAGTGGAAA
TCAAA

10

【0444】

配列番号46 (TMEB675 HC cDNA)

GAGGTGCAGCTGTGTGGAAGCGGGCGGAGGGCCTGGTGCAG
AGAGGAGGAAGCCTGAGACCCAGCTGTGTGCCGCCAGCGGCT
TCACCTTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTTCAGGCAGGC
CCCTTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGTATTAGCGGC
AGCGGCGGGCTTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA
GGTTTCACCATTCAGCAGGGACAATAGCAAGAACACCCCTGTA
CCTGCAACATGAACAGCCTGAGGGGCCGAGGACACCGCCGTG
TACTACTGCGCCAGGATGCCCCCTGAACAGCCCTTCACGACT
ACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTGTACCGTGTCTCAGCGCTTC
CACCAAGGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTTGGCGGCCCTGCTCC
AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGGCTGCCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAAACCGGTGACGGTGTCTCGTGGAA
CTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT
GTCCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGGCACGAAACCTACAC
CTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCAACCAT
GCCCAGCACCTGAGGCCGCCCGGGGGACCATCAGTCTTCTCT
GTTCCCCCCCAAACCCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTCAAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTCCAGTTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCCGGGAGGAGCAG
TTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCTCACCGTCC
TGCAACCAGGACTGGCTGAACGGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTTCCAAACAAAGGCCCTCCCGTCTCTCCATCGAGAAAAC
ATCTTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGT
ACACCCCTGCCCCCATCCCAAGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCTGTGGTCAAAGGCTTCTTACCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGGAGA
ACAACTACAAAGACCAACGCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGG

20

30

40

50

CTCCTTCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACC GTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCTTGGGTAAA

【0445】

配列番号47 (TMEB570、TMEB565 HC cDNA)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCGGAAGTGAAAAAA
CCGGGCGAGCAGCGTGAAAGTGAGCTGCAAAGCGAGCGGCG
GCACCTTTCAGCTCCTATTACATTAAGCTGGGTGCGCCAGGC
GCCGGGGCCAGGGCCCTGGAATGGATGGGTGGCATTTATCCCA
ATCAGTGGGCGGTGCTAATTATGCGCAGAAAATTTTCAGGGCC
GCGTGACCATTTACCGCTGATGAAAGCACCAAGCACCGCGTA
TATGGAACCTGAGCAGCCTGCGCAGCGAAGATACCGCGGTG
TATTTATTGCGCGCGCGGACGGCTACAGTAGTGGACGTAGCA
CAACATACGCATTTTGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTGGT
GACCGTGTCGAGTGCTTCCACCAAGGGCCCCATCCGTCTTC
CCCCCTGGCGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG
CCGCCCTTGGGCTGCGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC
GGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTCTACAGTCTTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGGTGCCCTCCAGCAGCTT
GGGCACGAAAAACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAAATATG
GTCCCCCATGCCCCACCATGCCCCAGCACCTGAGGCGCGCCGG
GGGACCATCAGTCTTCTCTGTTCCCCCCCCAAAACCCAAAGGAC
ACTCTCATGATCTCCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGG
TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA
CTGGGTACGTGGATGGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGGAGGAGCAGTTTCAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCTCTCACCGTCTCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGG
CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTTCCAAACAAAGGCCCTCCCG
TCCTTCCATCGAGAAAAACCATCTTCCAAAGCCAAAGGGCAGC
CCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCCATCCCAAGGA
GGAGATGACCAAGAAACCAAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTTC
AAAGGCTTCTACCCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGGCAGCCGGGAGAACAACTACAAGACCAAGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTCTACAGCAGG
CTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCT
TCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTTGCACAACCACTA
CACACAGAAGAGGCCTCTCCCTGTCTCTTGGGTAAA

【0446】

配列番号48 (TMEB674 HC cDNA)

GAAGTGCAGCTGCTGGAGAGCGGAGGAGGACTGGTGCAG
CCTCCTTGGCGGGAAGCCTGAGACTGAGCTGCGCCGCTAGCG
GCTTTCACCTTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTGAGACA
GGCTCCTTGGCAAAGGGCCCTGGAGTGGGTGAGCGTGATCAGC
GGCGGAGGCGAGCTTTACCAAGCTACGCCGACAGCGTGAAAGG
GCAGGTTCACCATCAGCAGGGACAAACAGCAACCAACCCCT
GTACCTGCGAGATGAGCAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCC
TTCTACTACTGCGCCAGGATGCCCCCTGAACAGCCCCCATG

ACTGCTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGCGC
TTCCACCAAGGGCCCATCCGTCCTTCCCCCTGGCGGCCCTGCG
TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGGCTGCC
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTG
GAACCTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTCCCG
GCTGTCTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCTCCCTCAGCAGCG
TGGTGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGGGCACGAAAACCTA
CACCTGCAACGTTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTG
GACAAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCCAC
CATGCCCCAGCACCTGAGGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTT
CCTGTTCCCCCCCCAAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
AGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAACTGGTACGTGGATGG
CGTGGAGGTGCATAATGCCAAAGACAAAGCCGCCGGGAGGAG
CAGTTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCTACCG
TCCTGCAACCAGGACTGGCTGAACGGGCAAGGAGTACAAGTG
CAAGGTCTTCCAACAAAGGCCCTCCCGTCTCTCCATCGAGAAA
ACCATCTTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGG
TGTACACCCCTGCCCCCATCCCAAGGAGGAGATGACCAAGAA
CCAGGTTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGGCAGCCGG
AGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGA
CGGCTCTCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAAACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTTGCAACAACCACTACACACAGAAAGAGCCT
CTCCCTGTCTCTTGGGTAAA

10

20

【0447】

配列番号49 (TMEB675 LC cDNA)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCT
AGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGGCCAGCC
AGGGCATCAGAAACGACCTGGGGCTGGTACCAGCAGAAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGC
CTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCA
GCGGCACCGACTTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCC
CGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGCTGCAAGGACTACAAC
TACGCCCTGACATTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCA
AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCTCCCGCC
ATCTGATGAGCAGTTTGAATCTTGGAACTGCCCTCTGTGTGTG
TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCA
GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
TGT

30

40

【0448】

配列番号50 (TMEB570 LC cDNA)

GAAATTGTGTGCTGACCCAGAGCCCGGGCACCCCTGAGCCTG
AGCCCGGGGCGAACGCGCGACCCCTGAGCTGCCGCGCGAGCC
AGAGCGTTTCCACATACTACCTGGCGTGGTATCAGCAGAA

50

ACC GGG CCA GGC GCG CCG CCG CCT GCT GTA TTT TAC GGT GCG CTC C
TAT CGC GCG GAC CGG CAT TCC GGA TCG CTT TTA GCG GGC AGC G
GTT CCG GCA CCG GAT TTT TAC CCT GAC CAT TTA GCG GCG CTC GGA
ACCG GAA AGA TTT TGC GGT GTAT TATT TGC CAG CAG TAC GGT
CAC AGC CCG GAT TACT TTT TGG CCA GGG CAC CAA AGT GGA AAA
TCAA AAC GTAC GGT TGG CTGC ACC ATCT GTCT TCA TCT TCCC
GCC ATCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCG CTC TGT T
GTGT GCG CTG CTG AATAA CTT TCT ATC CCA GAG AGG CCAA AG
TAC AGT GGA AGGT GGA TAA CGC CCT TCCA ATCG GGT TAA CTC
CCAG GAG AGT GTCA CAG AGC AGG ACAG CAA AGG ACAG CACC
TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTGAC GCT GAG CAA AGC AGACT
ACG AGA AACAC AAA AGTCTAC GCG CTGCG AAGTCA CCCC ATCA
GGG CCTGAG CTCGCC CGTCA CAA AGAG CTTC AACAG GGGGA
GAG TGT

10

【0449】

配列番号51 (TMEB674 LC cDNA)

GCC ATCCAG ATGAC CCA GAG GCC CTAG CAG CCTGAG CGCT
AGCG TGGG CGAC AGGG TGAC CATCA CCTGCA GGGGCCAG CC
AGGG CATCA GGA AACGAC CCTGG GCTGGT ACCAGC AGAAG CC
CGGC AAGGCC CCCC AAGCTGCT GATCTAC GCGCGCCAGC AGC
CTGC AGAGCG GAGTGC CTAGC AGGTTCAG CGGCGAGCG GAA
GCGGC ACCGACTTTC ACCCTGAC CATCTCC AGCCTGCA GCGC
CGAG GACTTTCGCC ACCTACTACT GCGCTGCA GGA CTACAAC
TACAG CCTGAC CTTCGG CGCGCGGC ACCCAA AGGTGGAG ATCA
GGCG GTACGG TGCTGC ACC ATCTGTCT TCA TCTTCCC GCGC
ATCT GATGAG CAGTTG AAA TCTGGA ACTGCG CTCCTGTGTGTG
TGCT CTGCTGA ATA ACTTTCT ATC CCA GAG AGG CCAA AGTAC
AGTGG AAGGTG GATAA CGC CCTTCCA ATCG GGT TAACTCCC A
GGAG AGTGTCA CAG AGC AGG ACAG CAA AGG ACAGC ACCTAC
AGCCTCAG CAGC ACCCTGAC GCTGAG CAA AGCAGACTACG
AGAAA CACAAA AGTCTAC GCGCTGCG AAGTCA CCCC ATCAGGG
CCTGAG CTCGCC CGTCA CAA AGAG CTTC AACAG GGGGAGAG
TGT

20

30

【0450】

配列番号52 (TMEB565 LC cDNA)

GAA ATTGTGTGCTGAC CCA GAG GCC CCGGG CAC CCTGAG CCTG
AGCCC GGGCGA AACGCG CGAC CCTGAG CTGCG CGCGAG CC
AGAG CGTTTGCC ACCCTATTTATCT TTGCGTGGTATCAGC AGAA
ACCG GGGCCAG GCGCGCGCG CCTGCTGATTTTAC GGTGCA TCC
TCCC GTGCGAC CGGCAT TCCGGGATCG CTTTAGCG GGCAGCG
GTTCC CGGCAC CGGATTTT TACCTGAC CATTA GCGGCTGGA
ACCG GAAAGATTTT TGC GGTGTAT TATT TGC CAG CAGTAC GGC
TATA AACCCA ATTA CCTTTTGG CCA GGG CAC CAA AGT GGA AAA
TCAA AACGTAC GGT TGGCTGC ACC ATCTGTCT TCA TCTTCCC
GCC ATCTGATGAG CAGTTG AAA TCTGGA ACTGCG CTCCTGTGT
GTGT GCGCTGCTGA ATA ACTTTCT ATC CCA GAG AGG CCAA AG
TACAGT GGA AGGTG GATAA CGC CCTTCCA ATCG GGT TAACTC
CCAG GAGAGTGTCA CAG AGC AGG ACAG CAA AGG ACAGC ACC
TACAG CCTCAG CAGC ACCCTGAC GCTGAG CAA AGCAGACT
ACGAG AAACACAAA AGTCTAC GCGCTGCG AAGTCA CCCC ATCA

40

50

GGGCCTGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
GAGTGT

【0451】

配列番号95 (TMEB762 VH cDNA)

GAGGTGCAAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGAGGGCCTGGTGCAG
CCCGGAGGAAGCCTGAGACTCAGCTGTGCCGCCAGCGGGCT
TCACCTTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTTCAGGCAGGC
CCCTGGGCAAAGGACTGGAGTTGGGTGAGCGTGAATTAGCGGC
AGCGGGCGGCTTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA
GGTTTCACCATTCAGCAGGGACAAATAGCAAAGAACACCCCTGT
CCTGCAAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCCGTGT
TACTACTGCGCCAGGATGCCCCCTGAACAGCCCTCACGACT
ACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTGAACCGTGTCCAGC

10

【0452】

配列番号96 (TMEB762 VL cDNA)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGGCT
AGCGTGGGCGACAGGGTGACCATTCACCTGCAAGGGCCAGCC
AGGGCATTCAGAAACGACCTGGGGCTGGTACCAGCAGAAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGC
CTGCAAGAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTCAGCGGAAGCGGCA
GCGGCAACCGACTTTCACCCCTGACCATTCAGCAGCCTGCAGCC
CGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGCTGCAAGGACTACAAC
TACCCCTTGACATTTCGGCGGGCGGCAACCAAGGTGGAGATCA
AG

20

【0453】

配列番号97 (TMEB762 HC cDNA)

GAGGTGCAAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGAGGGCCTGGTGCAG
CCCGGAGGAAGCCTGAGACTCAGCTGTGCCGCCAGCGGGCT
TCACCTTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTTCAGGCAGGC
CCCTGGGCAAAGGACTGGAGTTGGGTGAGCGTGAATTAGCGGC
AGCGGGCGGCTTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA
GGTTTCACCATTCAGCAGGGACAAATAGCAAAGAACACCCCTGT
CCTGCAAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCCGTGT
TACTACTGCGCCAGGATGCCCCCTGAACAGCCCTCACGACT
ACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTGAACCGTGTCCAGCGGCTTC
CACCAAGGGGCCCATTCGCTCTTCCCCCTGGCGGCCCTGCTCC
AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGGCTGCCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAA
CTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCT
GTCCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCTTCCAGCAGCTTTGGGCACGAAAACCTACAC
TTGCAACGTAGATCACAAAGCCCAAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAGAGTTTGAGTCCAAATAATGGTCCCCCATGCCACCAT
GCCCAGCACCTGAGGCCGCCGGGGGACCATCAGTCTTCCCT
GTTCCCCCACAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTCCAGTTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCCGGGAGGAGCAG
TTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCCCTCACCGTCC
TGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAAGTGC

30

40

50

GGTCTCCAACAAGGCGCTCCCGTCTCTCCATCGAGAAAAACC
ATCTCCAAGGCCAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGT
ACACCCCTGCCCCCATCCCAAGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCTTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAAGC
GACATCGCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGGAGA
ACAACCTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCCGTGGACAAGAGC
AGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCAACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCTGGGGTAAA

10

【0454】

配列番号98 (TMEB762 LC cDNA)

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCT
AGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGGCCAGCC
AGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTACCAGCAGAAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGC
CTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCA
GCGGCACCGACTTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAAGCC
CGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGCTGCAAGGACTACAAC
TACCCCTTGACATTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCA
AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCC
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTG
TGCTTGCTGAATAACTTCTATCCCAAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCAGGGTAACCTCCA
GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
AGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGG
CCTGAGCTCGGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
TGTTAG

20

【0455】

配列番号99 (TMEB757 VH cDNA)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGGCGGAGGCCCTGGTGCAG
CCCGGAGGAAGCCTGAGACTCAGCTGTGCGCCAGCAGGCT
TCACCTTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTTCAGGCAGGC
CCCTGGCAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGC
AGCGGCGGGCTTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAGGGCA
GGTTTCACCATCAGCAGGGACAATAGCAAAGAACCCCTGT
CCTGCACATGAACAGCCTGAGGGGCCGAGGACACCGCCGTG
TACTACTGCGCCAGGATGCCCTTGAACAGCCCTCACGACT
ACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTGACCGTGTCCAGC

40

【0456】

配列番号100 (TMEB757 VL cDNA)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCT
AGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAAGGGCCAGCC
AGGGCATCAGAAACGACCTGGGCTGGTACCAGCAGAAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGC
CTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTTCAGCGGAAGCGGCA
GCGGCACCGACTTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAAGCC
CGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGCTGCAAGGACTACAAC
TACCCCTTGACATTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCA

50

A G

【0457】

配列番号101 (TMEB757 HC cDNA)

GAGGTGCAGCTGCTGGAAAGCGGCGGAGGCCCTGGTGCAG
CCCGGAGGAAGCCTGAGACTCAGCTGTGCGGCCAGCGGGCT
TCACCTTTCAGCAGCTACAGCATGAGCTGGGTTCAGGCAGGC
CCCTGGCAAAAGGACTGGAGTGGGTGAGCGTGATTAGCGGC
AGCGGCGGGCTTTCACCGATTACGCCGACAGCGTGAAAGGGCA
GGTTTCACCATTCAGCAGGGACAATAAGCAAAGAACACCCCTGTA
CCTGCAACATGAACAGCCTGAGGGGCCGAGGACACCGGCCGTG
TACTACTGCGCCAGGATGCCCCCTGAACAGCCCTCACGACT
ACTGGGGGCCAGGGAACCCCTGGTGACCGTGTCCAGCGCTTC
CACCAAGGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGGCCCTGCTCC
AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGGCTGCCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGA
CTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGGCT
GTCCTACAGTCTTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGGGCACGAAAACCTACAC
TTGCAACGTAGATCACAAAGCCCAAGCAACACCAAGGTGGAC
AAGAGAGTTGAGTCCAAATAATGGTCCCCCATGCCCAACCAT
GCCCAGCACCTGAGGCCGCCCGGGGGACCATCAGTCTTCCCT
GTTCCCCCCTCAAAACCCAAAGGACACTCTCATGATCTCCCGG
ACCCCTGAGGTTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG
AAGACCCCGAGGTTCCAGTTTCAACTGGTACGTGGATGGCGT
GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCCGGGAGGAGCAG
TTCAACAGCACGTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCTCACCGTCC
TGCAACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAAGTGC
AGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCCGTCTCTCCATCGAGAAAAAC
ATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCGAGAGCCACAGGTGT
ACACCCCTGCCCCCATCCCAAGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTTCAGCCTGACCTGCTTGGTCAAAGGCTTCTTACCCCAAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGGCAGCCGGAGA
ACAACTACAAAGACCAACGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGG
CTCCTTCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAAGAGC
AGATGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCCGTGATGC
ATGAGGCTCTGCAACAACCACTACACACAGAAAGAGCCTCTC
CCTGTCTCTGGGTTAAA

【0458】

配列番号102 (TMEB757 LC cDNA)

GCCATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCT
AGCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACCTGCAGGGGCCAGCC
AGGGCATCAGAAACGACCTGGGGCTGGTACCAAGCAGAAAGCC
CGGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAGC
CTGCAGAGCGGAGTGCCTAGCAGGTTCAGCGGAAGCGGCA
GCGGCACCGACTTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCC
CGAGGACTTTCGCCACCTACTACTGCCCTGCAGGACTACAA
TACCCCCCTGACATTTCGGCGGGCGGCACCAAGGTGGAGATCA
AGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCC
ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCCTCTGTTGTG
TGCCCTGCTGAATAAATTTCTATCCCAAGAGAGGCCAAAGTAC

AGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCCA
 GGAGAGTGTCAACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
 AGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG
 AGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCAACCCATCAGGG
 CCTGAGCTCGGCCCGTCAACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG
 TGTTAG

【0459】

選択された抗TMEFF2抗体のフレームワークを、表14に示す。

【0460】

【表14】

表14.

抗体	VH フレームワーク	VH フレームワーク配列番号	VL フレームワーク	VL フレームワーク配列番号
TMEB675	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB570	VH1_1-69	54	VKIII_A27	56
TMEB674	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB565	VH1_1-69	54	VKI_L11	55
TMEB762	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB757	VH3_3-23	53	VKI_L11	55

【0461】

配列番号53 (VH3_3-23フレームワーク)

EVQLLESGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSSYAMSWVRQ
 APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
 YLQMNSLR AEDTAVYYCAK WGQGT LVT VSS

【0462】

配列番号54 (VH1_1-69フレームワーク)

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGGTFSSY A I S W V
 RQAPGQG LEWMG G I I P I F G T A N Y A Q K F Q G R V T I T A D E S
 T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R

【0463】

配列番号55 (VKI_L11フレームワーク)

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGI RNDLGWYQQK
 PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSG TDF TLT ISSL
 QPEDFATYYC LQDYNYP

【0464】

配列番号56 (VKIII_A27フレームワーク)

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ
 KPGQA PRL LIY GASSRATGIPDRFSGSGSG TDF TLT I S R
 LEPEDFAVYYCQQYGSSP

【0465】

実施例5. 抗TMEFF2抗体のエピトープマッピング

H/D交換を使用して、TMEB570及びTMEB675のエピトープマッピングを
 行った。TMEW1 (配列番号6) を、これらのアッセイでのTMEFF2の供給源とし
 て使用した。

【0466】

130 µLの対照緩衝液 (50 mMリン酸塩、100 mM塩化ナトリウム、pH7.4)
) 中10 µgのTMEW1を、130 µLの4M塩酸グアニジン、0.85MのTCEP
 緩衝液 (最終的なpHは2.5であった) を添加し、混合物を3分間10℃でインキュベ
 ートすることによって、変性させた。次いで、社内で充填したペプシン/プロテアーゼX
 III (w/w、1:1) カラム (2.1×30 mm) を使用して、混合物にオンカラム

10

20

30

40

50

ペプシン／プロテアーゼX I I I消化を施した。Q E x a c t i v e (商標) H y b r i d Q u a d r u p o l e - O r b i t r a p M a s s S p e c t r o m e t e r (T h e r m o) に結合されたW a t e r s A c q u i t y U P L Cで構成されるU P L C - M Sシステムを使用して、得られたペプチドを分析した。ペプチドを2～34%の溶媒B (アセトニトリル中、0.2%ギ酸) から16.5分の勾配で50×1mmのC8カラム上で分離した。溶媒Aは、水中0.2%のギ酸であった。注入バルブ、及びペプシン／プロテアーゼX I I Iカラム、及びそれらに関連する接続チューブは、10℃に維持した冷却ボックス内に保持した。第2のスイッチングバルブ、C8カラム、及びそれらに関連するステンレス鋼接続チューブは、-6℃に維持した別の冷却循環ボックス内に置いた。ペプチド同定は、T M E W 1 配列に対するM S / M SデータをM a s c o tで検索することを通じて行った。前駆体及び産生物イオンの質量許容差は、それぞれ7 p p m及び0.02 D aであった。

10

【0467】

10 μ LのT M E W 1 (5 μ g) 又は10 μ LのT M E W 1 及びT M E B 5 7 0 又はT M E B 6 7 5 混合物 (5 μ g : 15 μ g) を、120 μ Lの酸化重水素標識緩衝液 (p H 7.4で、50 mMのリン酸ナトリウム、100 mMの塩化ナトリウム) と共に10℃で0秒、30秒、360秒、3600秒、及び14400秒間インキュベートした。各時点での水素／重水素 (H / D) 交換を、重複して実施した。130 μ Lの4 M塩酸グアニジン、0.85 M T C E P緩衝液 (最終的なp Hは2.5であった) を添加することによって水素／重水素交換物をクエンチした。その後、クエンチしたサンプルを、上記に記載されるようにオンカラムペプシン／プロテアーゼX I I I消化及びL C - M S分析に供した。質量スペクトルはM Sのみのモードで記録した。

20

【0468】

未処理M Sデータを、H / D交換M Sデータの分析のためのソフトウェア、H D X W o r k B e n c hを使用して処理した (P a s c a l e t a l., J. A m. S o c. M a s s S p e c t r o m. 2012, 23 (9), 1512-1521)。重水素化ペプチドとその天然形態 (t 0) との平均質量差を使用して、重水素レベルを算出した。タンパク質の約97-99%を特定のペプチドにマッピングすることができた。重水素蓄積曲線は、ペプチドの交換時間にわたって、傾斜に著しい差を示した。

【0469】

T M E B 5 7 0 エピトープ: T M E W 1 は、残基235～249 (残基付番に従った配列番号2) での重酸素取り込みにおいて緩やかな低減を示し、膜近位領域内の例えば、残基H G K C E H S I N M Q E P S C (配列番号57) は、T M E B 5 7 0 への結合時にH / D交換から保護された。

30

【0470】

T M E B 6 7 5 エピトープ: T M E W 1 は、残基252～268 (残基付番に従った配列番号2) での重酸素取り込みにおいて緩やかな低減を示し、膜近位領域内の例えば、残基D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L (配列番号58) は、T M E B 6 7 5 への結合時にH / D / 交換から保護された。

【0471】

したがって、T M E B 5 7 0 T M E F F 2 エピトープ残基は、H G K C E H S I N M Q E P S C (配列番号57) を包含し、T M E B 6 7 5 エピトープ残基は、D A G Y T G Q H C E K K D Y S V L (配列番号58) を包含した。両方の抗体は、膜近位領域内でT M E F F 2 に結合した。

40

【0472】

実施例6. 抗C D 3抗体の生成

抗C D 3抗体C D 3 B 2 1 9は、U S 9 8 5 0 3 1 0に記載されている。

【0473】

追加の抗C D 3抗体は、O m n i R a t s (O M T (商標)) を免疫することによって生成した。得られたハイブリドーマ上清を、ヒト及びカニクイザルC D 3 + Tリンパ球へ

50

の結合についてスクリーニングし、クローンを単離し、配列決定し、場合によっては更に操作した。抗CD3抗体を、S228P、F234A、及びL235A変異を有するエフェクターサイレントIgG4を含む様々なアイソタイプとして、又はL234A、L235A、G237A、P238S、H268A、A330S、及びP331S変異を有するIgG1としてクローニングした。生成した2つの抗CD3抗体を、CD3B376及びCD3B450と命名した。

【0474】

CD3B376及びCD3B450のヒトT細胞に対するインビトロ結合親和性を、抗原特異性標的アームと交差させた後、フローサイトメトリーによって決定した。抗CD3トレーサー分子の飽和結合定数 ($K_d T$) を決定するために、ヒトT細胞について予備研究を実行した。次いで、試験mAの滴定濃度を使用する競合結合アッセイに、トレーサーの固定濃度 ($[T]$) を使用した。試験分子の IC_{50} (50%阻害が達成される濃度) 値を使用する次の式: $K_d = IC_{50} / (1 + ([T] / K_d T))$ を使用して、結合親和性 (K_d) を決定した。トレーサー、市販のAlexaFluor488 SP34-2抗CD3 (BioScience#557705) (データは示さず) の飽和結合定数 ($K_d T$) を決定するために、5人のヒトドナーを使用した。

【0475】

トレーサーの飽和結合定数 ($K_d T$) の決定

方法: 使用まで、ヒトpan T細胞を窒素タンク内に低温保存した。T細胞を解凍し、PBSで洗浄し、FACS染色緩衝液に再懸濁し、計数し (生存率に留意して)、 0.5×10^6 個の細胞/mLで再懸濁した。Far Red Live/Dead染色 (Life Technologies, AKA Invitrogen#L34974) (バイアル中50 μ LのDMSOを) を 1×10^6 個の細胞当たり1 μ Lで添加し、FcRブロッカー (Miltenyi Biotec#130-059-901) (0.5×10^6 個の細胞当たり1:20希釈の1mL) を各々細胞に10分間添加した。細胞を50,000個の細胞/ウェルで播種し、洗浄した。AlexaFluor488 SP-34抗CD3の濃度を増加させて、4°Cで2時間、T細胞に添加した。細胞を洗浄して非結合抗体を除去し、15分間固定し、洗浄し、1mMのEDTAを含むFACS染色緩衝液中に再懸濁した。

【0476】

iQue Intellicyte Flow Cytometerを使用して結合を測定した。T細胞集団、続いて細胞個片、続いて生存細胞について細胞をゲーティングした (FL4)。各ウェルの染色の幾何平均 (FL1) を決定した。

【0477】

取得した平均蛍光強度値を抗体分子濃度の関数としてプロットし、一部位結合分析 (総結合) にPrismソフトウェアを使用して分析した。ソフトウェアは、質量作用の法則に従う受容体 (ヒトPan T細胞上のCD3) への抗体分子の結合を説明する、対応する K_d 値を計算する。式は以下のとおりであり、 $(B_{max} \times X) / (K_d + X)$ 、式中、 B_{max} が最大結合であり、 K_d が、半最大結合に達するのに必要な配位子の濃度である。

【0478】

結果: 各ドナーについて K_d 値を導出し、平均値を得た。ヒトT細胞の飽和結合定数 ($K_d T$) を 5.6 ± 1.0 nM ($n=4$) から導出し、前述の式に使用して、 K_d 結合親和性を決定した。

【0479】

競合アッセイによる抗CD3mAの結合親和性の決定

CD3B376及びCD3B450を使用して競合結合研究を実施した。ヒトパンT細胞を使用して、mAの結合親和性を決定した。使用したトレーサーは、市販のAlexaFluor488 SP-34抗CD3 (BioScience#557705) であり、このトレーサーの飽和結合定数は上記されている。

10

20

30

40

50

【0480】

T細胞は、使用まで、窒素タンク内に低温保存した。T細胞を解凍し、PBSで洗浄し、FACS染色緩衝液に再懸濁し、計数し生存率に留意して、 0.5×10^6 個の細胞/mLで再懸濁した。Far Red Live/Dead染色 (Life Technologies, AKA Invitrogen #L34974) (バイアル中50 μ LのDMSOを) を 1×10^6 個の細胞当たり1 μ Lで添加し、FcRブロッカー (Miltenyi Biotec #130-059-901) (0.5×10^6 個の細胞当たり1:20希釈の1 mL) を各々細胞に10分間添加した。細胞を50,000個の細胞/ウェルで播種し、洗浄した。

【0481】

mAb (及びアイソタイプ対照) を、開始濃度1000又は200 μ g/mL ($2 \times$) から1:2で連続希釈し、固定濃度 (5 μ g/mL $2 \times$) のトレーサーと一緒に混合して、 $1 \times$ 濃度を得た。したがって、トレーサーの最終濃度 ($1 \times$) は、2.5 μ g/mL = 16.6 nMであった。混合物をT細胞に4℃で2時間添加した。次いで、細胞を洗浄して非結合抗体を除去し、15分間固定し、洗浄し、1 mMのEDTAを含むFACS染色緩衝液中に再懸濁した。

【0482】

iQue Intellicyte Flow Cytometerを使用して結合を測定した。T細胞集団、続いて細胞個片、続いて生存細胞 (FL4) について細胞をゲーティングした。各ウェルの染色の幾何平均 (FL1) を決定した。取得した平均蛍光強度値を、log抗体分子濃度 (nMに変換) の関数としてプロットし、EC50/IC50値 (nM単位) が由来するシグモイド用量応答 (可変勾配) にPrismソフトウェアを使用して分析した。結合親和性 (K_d) は、以下の式: $K_d = IC50 / (1 + ([T] / K_d T))$ を使用して導出した。式中、 K_d が、競合物 (非標識分子) の親和性であり、試験化合物のnM単位でのIC50、[T] が、トレーサーの濃度 (16.6 nM) であり、 $K_d T$ が、飽和結合によって決定されるトレーサーの K_d である (ヒトについては5.6 nM)。

【0483】

CD3B376結合部位は、二価及び一価の両方の形態でCD3B450よりも緊密であった。

【0484】

【表15】

表15.

構築物	抗CD3	IC50(nM)	K_d (nM)
二価	CD3B376	29	7.3
	CD3B450	60	15
一価構築物	CD3B376	409	103
	CD3B450	1011	254

【0485】

CD3B219、CD3B376、及びCD3B450のCDR、VH、及びVLアミノ酸配列を、表16に示す。

【0486】

10

20

30

40

【表 16】

表 16.

抗体	地域	アミノ酸配列	配列番号
CD3B219	HCDR1	TYAMN	60
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYAASVKG	61
	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	62
	LICDR1	RSSTGAVTTSNYAN	63
	LCDR2	GTNKRAP	64
	LCDR3	ALWYSNLWV	65
	VH (CD3B219VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTVSS	66
	VL (CD3B219VL)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGA VTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	67
CD3B376	HCDR1	NNNAAWS	68
	HCDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS	69
	HCDR3	GYSSSFYD	70
	LICDR1	TGTSSNIGTYKFVS	71
	LCDR2	EVSKRPS	72
	LCDR3	VSAGSGTLL	73
	VH(CD3H219)	QVQLQQSGPRLVLRPSQTLSTCAISGDS VFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYY RSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFT LQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFYDWG QGTLTVTVSS	74
	VL(CD3L150)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNI GTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVS PSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAED QADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	75
CD3B450	HCDR1	NNNAAWS	68
	HCDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS	69
	HCDR3	GYSSSFYD	70
	LICDR1	TGTSSNIGTYKFVS	71
	LCDR2	EVSKRPS	72
	LCDR3	VSAGSGTLL	73
	VH (CD3H231)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDS VFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYY RSKWLYDYAVSVKSRITINPDTSKNQFS LQLNSVTPEDTAVYYCARGYSSSFYDWG QGTLTVTVSS	59
	VL (CD3L197)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNI GTYKFVSWYQQHPGKAPKVMIEVS PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED EADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL	111

【0487】

配列番号76 CD3B219 HC、(IgG4 S228P、F234A、L235A、F405L、及びR409K)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ
APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKN
SLYLLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGT
LTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPS
SLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEA

AGG P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q
 F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L
 N G K E Y K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S
 Q E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T
 P P V L D S D G S F L L Y S K L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N
 H Y T Q K S L S L S L G K

【0488】

配列番号77 CD3B219 LC

Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C R S S T G A V T T S N Y A N W V Q
 Q K P G Q A P R G L I G G T N K R A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G
 V Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N L W V F G G G T K L T V L G Q P K A A P S V T
 L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K
 A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T
 H E G S T V E K T V A P T E C S

10

【0489】

配列番号78 CD3B376 HC (IgG4 S228P、F234A、L235A、F405L、及びR409K)

Q V Q L Q Q S G P R L V R P S Q T L S L T C A I S G D S V F N N N A A W S W I
 R Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W L Y D Y A V S V K S R I T V N P D T S R
 N Q F T L Q L N S V T P E D T A L Y Y C A R G Y S S S F D Y W G Q G T L V T V S
 S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
 S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K
 T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E A A G G P S
 V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V
 D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
 K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T
 K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
 S D G S F L L Y S K L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
 S L S L S L G K

20

【0490】

配列番号79 CD3B376 LC

Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S S N I G T Y K F V S W Y Q
 Q H P D K A P K V L L Y E V S K R P S G V S S R F S G S K S G N T A S L T I S G
 L Q A E D Q A D Y H C V S Y A G S G T L L F G G G T K L T V L G Q P K A A P S V
 T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V
 K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V
 T H E G S T V E K T V A P T E C S

30

【0491】

表17は、抗CD3抗体鎖をコードするポリヌクレオチドの配列番号を示す。

【0492】

【表17】

表17

40

抗体	VH cDNA 配列番号	VL cDNA 配列番号	HC cDNA 配列番号	LC cDNA 配列番号
CD3B219	105	106	80	81
CD3B376	107	108	82	83

【0493】

配列番号105 CD3B219 VH cDNA

G A A G T G C A G C T G G T G G A A T C T G G C G G C G G A C T G G T G C A G
 C C T G G C G G A T C T C T G A G A C T G A G C T G T G C C G C C A G C G G C T

50

TCACCTTCAACACCTACGCCATGAACCTGGGTGCGCCAGGC
CCCTGGCAAAGGCCCTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGAAAGC
AAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGCGCTCCGTGA
AGGGCAGATTCAACCATCAGCCGGGACGACAGCAAAGAACAG
CCTGTACCTGCAAGATGAACCTCCCTGAAAAACCGAGGACACC
GCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGGGCAACTTCGGCAACA
GCTATGTGTCTTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
CGTGACCGGTGTCAATCT

【0494】

配列番号106 CD3B219 VL cDNA

10

CAGACCGTCGTGACCCAGGAACCTAGCCTGACCGGTGTCT
CCTGGCGGCAACCGTGAACCTGACCTGCAGATCTTCTACAG
GCGCCGTGACCAACAGCAAACCTACGCCAACTGGGTGCAAGCA
GAAGCCAGGCCAGGCTCCCAAGAGGACTGATCGGGCGGCACC
AACAAAGAGAGCCCTTGGCACCCCTGCCAGATTTCAGCGGAT
CTCTGCTGGGAGGAAGAAGGCCGCCCTGACACTGTCTGGCGT
GCAGCCTGAAGATGAGGCCGAGTACTACTGCGCCCTGTGG
TACAGCAAACCTGTGGGTGTTCGGCGGAGGCAACCAAGCTGA
CAGTGCTG

【0495】

20

配列番号80 CD3B219 HC cDNA

GAAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGGCGGACTGGTGCAG
CCTGGCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCGCCAGCGGGCT
TCACCTTCAACACCTACGCCATGAACCTGGGTGCGCCAGGC
CCCTGGCAAAGGCCCTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGAAAGC
AAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGCGCTCCGTGA
AGGGCAGATTCAACCATCAGCCGGGACGACAGCAAAGAACAG
CCTGTACCTGCAAGATGAACCTCCCTGAAAAACCGAGGACACC
GCCGTGTACTACTGCGCCAGACACGGGCAACTTCGGCAACA
GCTATGTGTCTTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCT
CGTGACCGGTGTCAATCTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTC
TTCCCCCTGGCGGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCA
CAGCCGCGCCCTGGGGCTGCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGA
ACCGGTGACGGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGGCCCTGACCAAGC
GGCGTGCACACCTTCCCGGGCTGTCTCTACAGTCCCTCAGGAC
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCTCCAGCAG
CTTGGGCAACGAAAAACCTACACCTGCAACGTTAGATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAGAGTTTGAAGTCCAAAT
ATGGTCCCCCATGCCCAACCATGCCCAGCACCTGAGGGCCGC
CGGGGGACCATCAGTCTTCCCTGTTCCCCCCAAAAACCCAAAG
GACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAACGTGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTT
CAACTGGTACGTGGATGGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGT
TGGTCAGCGTCTCTACCGTCTTGCACCAAGGACTGGCTGAA
CGGCAAGGAGTACAAGTGCAAAGGTCTCCAACAAAGGGCTC
CCGTCTCTCATCGAGAAAAACCATCTCCAAGGCCAAAGGGC
AGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCA
GGAGGAGATGACCAAGAACCAAGGTGAGCCTGACCTGCCCTG
GTCAAAGGCTTCTTACCCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG

30

40

50

AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAACAACCTACAAAGACCAACGCC
TCCCGTGCTGGACTCCGACGGGCTCCTTCTCTCTACAGC
AAGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATG
TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTTGCAACAACA
CTACACACAGAAGAGGCCTCTCTCCCTGTCTCTTGGGTAAA

【0496】

配列番号81 CD3B219 LC cDNA

CAGACCGTGCTGACCCAGGAACCTAGCCTGACCGTGTCCT
CCTGGCGGGCACCGTGACCCCTGACCTGCAAGATCTTCTACAG
GCGCCGTGACCAACCAAGCAAACTACGCCAAACTGGGTGCAAGCA
GAAGCCAGGCCAGGCTCCCAAGAGGACTGATCGGCGGGCACCC
AACAAAGAGAGGCCCTTGGCACCCCTGCCCAGATTTCAGCGGAT
CTCTGTCTGGGAGGAAAGGCCCGCCCTGACACTGTCTGGCGT
GCAGCCCTGAAGATGAGGCCCGAGTACTACTGCGGCCCTGTGG
TACAGCAACCTGTGGGTGTTTCGGCGGAGGCCACCAAGCTGA
CAGTGCTGGGTGAGCCCAAGGCTGCACCCAGTGTCACCTCT
GTTCCCGCCCTCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAACAAGGCC
ACACTTGGTGTGTCTCATAAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCG
TGACAGTGCGCCTGGAAGGCCCGATAGCAGCCCGCTCAAGGC
GGGAGTGGAAGACCAACCAACCCCTCCAAACAAGCAACAAC
AAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCCTGAGC
AGTGGAAGTCCCAACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCA
TGAAGGGAGCACCCGTGGAGAAGACAGTTGGCCCTTACAGAA
TGTTCA

10

20

【0497】

配列番号107 CD3B376 VH cDNA

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTTGGCCCTAGACTCGTGCGG
CCTTCCCAAGACCCCTGTCTCTTGACCTGTGCGCATCTCCGGCG
ACTCCGTGTTTCAACAACAACGCCCGCCTGGTCTCTGGATCCG
GCAGAGCCCTTCTAGAGGCCCTGGAATGGCTGGGGCCGGACC
TACTACCGGTCCAAGTGGCTGTACGACTACGCCGTGTCCG
TGAAGTCCCGGATCACCGGTGAACCCCTGACACCTCCCGGAA
CCAGTTTCAACCCCTGCAGCTGAACCTCCGTGACCCCTGAGGAC
ACCGCCCTGTACTACTGCGCCAGAGGCTACTCTCTCTCTCT
TCGACTATTGGGGGCCAGGGGCACCCCTCGTGACCGGTGTCTCT
T

30

【0498】

配列番号108 CD3B376 VL cDNA

AGTCTGCTCTTGACCCAGCCCTGCCCTCCGTGTCTTGGCTCTTC
CCGGCCAGTCCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCTCCTTC
CAACATCGGCAACCTACAAGTTTCGTGTCTCTGGTATCAGCAG
CACCCCGACAAGGCCCCCAAAAGTGTCTGTACGAGGTGT
CCAAGCGGGCCCTCTGGCGGTGTCTCTCAGATTCTCCGGCTC
CAAGTCTTGGCAACAACCGCCCTCCCTGACCATCAGCGGACTG
CAGGCTGAGGACCAGGCCGACTACCACTGTGTGTCTCTACG
CTGGCTCTTGGCACCCCTGCTGTTTTGGCGGAGGCCACCAAGCT
GACCGTGCTG

40

【0499】

配列番号82 CD3B376 HC cDNA

CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTTGGCCCTAGACTCGTGCGG

50

CCTTCCCAGACCCTGTCTCTGTGACCTGTGCCATCTTCGGCG
ACTCCGTGTTCAACAACAACGCCCGCCTGGTCCCTGGATCCG
GCAGAGCCCTTCTAGAGGCCCTGGAATGGCTGGGGCCGGACC
TACTACCGGTCCAAGTGGCTGTACGACTACGCCGTGTCCG
TGAAGTCCC GGATCACCGGTGAACCCCTGACACCTCCC GGAA
CCAGTTTCAACCCTGCAGCTGAACCTCCGTGACCCCTGAGGAC
ACCGCCCTGTACTACTGCGCCAGAGGGCTACTCCTCCTCCT
TCGACTATTGGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGAACCGTGTCTCT
TGCTTCCACCAAGGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGGCC
TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGGCT
GCCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCT
GTGGAACCTCAGGCGGCCCTGACCAAGCGGCGTGCACACCTTC
CCGGGCTGTCTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
GCGTGGTGAACCGTGCCTCTCAGCAGCTTGGGGCACGAAAAAC
CTACACCTGCAACGTAGATCACAAAGCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCG
CACCATGCCCAGCACCTGAGGCGGCGGGGGACCATCAGT
CTTCTCTGTTCCTCCCCCAAACCCAAAGGACACTCTCATGATC
TCCCCGGACCCCTGAGGTCAACGTGCGTGGTGGTGGACGTGA
GCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAACTGGTACGTGGA
TGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCA
CCGTCTCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAA
GTGCAAGGTCTTCCAACAAAGGCCCTCCCGTCTCTCATCGAG
AAAAACCATCTTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCAC
AGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCAAGGAGGAGATGACCAA
GAACCAAGGTCAAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATCGCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGGCAGC
CGGAGAACAACTACAAAGACCAACGCCCTCCCGTGTCTGGACTC
CGACGGGCTCCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTAAACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCG
TGATGCATGAGGCTCTTGCAACAACCACTACACACAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCTTGGGTAAA

【0500】

配列番号83 CD3B376 LC cDNA

CAGTCTGTCTCTGACCCAGCCTGCGCTCCGTGTCTGGCTCT
CCCGGCCAGTCCATCACCAATCAGCTGTACCGGCACCTCCT
CCAACATCGGCACCTACAAAGTTTCGTGTCTGGTATCAGCA
GCACCCCGACAAAGGCCCCCAAAGTGTCTGTACGAGGTG
TCCAAGCGGGCCCTCTGGCGTGTCTCTCAGATTCTCCGGCT
CCAAGTCTGGCAACACCGCCCTCCCTGACCATCAGCGGACT
GCAGGCTGAGGACCAAGGCCGACTACCACTGTGTGTCTCTAC
GCTGGCTCTTGGCACCCCTGCTGTTTTGGCGGAGGCCAACAGC
TGACCGTGTCTGGGTCAAGCCCAAAGGCTGCACCCAGTGTAC
TCTGTTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAACAAG
GCCACACTGGTGTGTCTCTATAAGTGACTTCTACCCGGGAG
CCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCCGATAGCAGCCCCGTCAA
GGCGGGAGTGGAGACCAACCAACCCCTCCAAACAAAGCAAC
AACAAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCCTG
AGCAGTGGAAAGTCCCAACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCAAC

G C A T G A A G G G A G C A C C G T G G A G A A G A C A G T G G C C C C T A C A
G A A T G T T C A

【0501】

実施例7. 二重特異性TMEFF2 x CD3抗体の生成

選択単一特異性抗TMEFF2及び抗CD3抗体をIgG4/κとして表した。抗TMEFF2抗体が野生型IgG4を有したままで、抗CD3抗体にF405L及びR409K置換（EU付番）を行った。位置405及び409置換に加えて、S228P、F234A、及びL235A置換を有するように、IgG4 mAbを操作した。

【0502】

プロテインAカラム（HiTrap MabSelect SuReカラム）を使用する標準的な方法を使用して、単一特異性抗体を発現及び精製した。溶出後、プールを、D-PBS、pH7.2の中に透析した。

【0503】

二重特異性TMEFF2 x CD3抗体を、国際公開第2011/131746号に記載のインビトロでのFabアーム交換において、単一特異性TMEFF2 mAbと単一特異性CD3 mAbとを組み合わせることにより生成した。簡潔に言えば、pH7~7.4のPBS中モル比1:1で、約1~20mg/mLの各抗体と、75mMの2-メルカプトエタノールアミン（2-MEA）とを一緒に混合し、25~37℃で2~6時間インキュベートし、続いて透析、透析濾過、クロスフロー濾過、及び/又は標準的な方法を使用する細胞濾過物のスピンを介して2-MEAを除去した。

【0504】

疎水性相互作用クロマトグラフィーを使用するインビトロFabアーム交換の後、二重特異性抗体を更に精製して、標準的な方法を使用して残留親抗TMEFF2及び抗CD3抗体を最小限にした。

【0505】

表18及び表19は、生成された二重特異性抗体を示す。

【0506】

【表18】

表18.

二重特異性抗体	親(TMEFF2アーム/ CD3アーム)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
TMCB93	TMEB675	10	12	15	18	20	22
	CD3B219	60	61	62	63	64	65
TMCB132	TMEB675	10	12	15	18	20	22
	CD3B376	68	69	70	71	72	73
TMCB101	TMEB570	11	13	16	19	21	23
	CDB219	60	61	62	63	64	65
TMCB131	TMEB570	11	13	16	19	21	23
	CD3B376	68	69	70	71	72	73
TMCB92	TMEB674	10	14	17	18	20	24
	CD3B219	60	61	62	63	64	65
TMCB102	TMEB565	11	13	16	18	20	22
	CD3B219	60	61	62	63	64	65

【0507】

【表 19】

表 19.

二重特異性抗体	親(TMEFF2 アーム/ CD3アーム)	VH	VL	HC	LC
TMCB93	TMEB675	25	28	32	35
	CD3B219	66	67	76	77
TMCB132	TMEB675	25	28	32	35
	CD3B376	74	75	78	79
TMCB101	TMEB570	26	29	33	36
	CDB219	66	67	76	77
TMCB131	TMEB570	26	29	33	36
	CD3B376	74	75	78	79
TMCB92	TMEB674	27	30	34	37
	CD3B219	66	67	76	77
TMCB102	TMEB565	26	31	33	38
	CD3B219	66	67	76	77

10

【0508】

実施例 8. 二重特異性 TMEFF2 x CD3 抗体の特性評価

分析用超遠心分離 (Analytical Ultra Centrifugation、AUC) による純度分析

20

分析用超遠心分離 (AUC) は、溶液中の巨大分子のサイズ、形状、凝集状態、及び可逆的相互作用の決定を可能にする。沈降速度 (Sedimentation velocity、SV) は、遠心分離スピンの際に、濃度勾配をサンプルホルダー (セル) の外半径に移動させる、AUC 技術である。これにより、分子のサイズ及び形状の因子である沈降係数の決定が可能になり、これは各分子に固有である。この目的に、Beckman Optima AUC 装置を使用した。サンプルを、1.2 cm の Beckman センターピース (定格 50 K rpm) 及び石英窓を装備した遠心セルに充填した。細胞をアSEMBルし、130 l b s にトルクをかける。遠心セルを、An-50 (8 穴) 又は An-60 (4 穴) ローターに置き、AUC チャンバ内に置いた。運転を開始する前に、AUC の温度を、チャンバ内のローターで少なくとも 1 時間、20.5 ° に平衡化した。スキャンカウント (250 スキャン)、スキャン収集の頻度 (90 秒)、データ解像度 (10 μM)、280 nm の波長、40 K rpm で、mAb サンプルについて実験を実施した。データは、直接境界適合ソフトウェア SEDANAL を使用して分析した。二重特異性抗体 TMCB150 及びその親 mAb の純度を測定した。TMCB150 は、97.1 % モノマー、2.8 % 二量体モノマーを示し、更なる生物物理的特性評価のために一過性に発現させた研究材料が許容可能な基準を満たす AUC によって決定される、凝集を示さなかった。TMEB762 は、95.5 % モノマー、4.5 % 二量体を示し、凝集は示さなかったが、CD3B376 は、凝集を示さずに 97.7 % モノマー及び 2.2 % 二量体を示した。最小 2 工程精製分子の > 5 % の凝集体濃度は、生物活性、溶解性、安定性、及び貯蔵寿命に著しい影響を及ぼし得る。

30

40

【0509】

DSC による抗 TMEFF2 / CD3 二重特異性の立体配座安定性

TMCB150 熱的アンフォールディングは、DSC (示差走査熱量測定) によって決定し、これは、アンフォールディング開始 Tm = 52.6 °C、61.8 °C での第 1 の熱転移 (Tm1)、67.6 °C での第 2 の熱転移 (Tm2)、及び 75.5 °C での第 3 の熱転移 (Tm3) を示した。前述の DSC によって評価した親抗体 (抗 TMEFF2、TMEB762、及び抗 CD3、CD3B376) 熱転移プロファイルに基づいて、TMCB150 の Tm1 は、CD3B376 FAb のアンフォールディングに対応し、TMCB150 の Tm3 は、TMEB762 Fab のアンフォールディング転移に対応する。

【0510】

50

血清安定性

血清安定性アッセイは、ヒト血清成分に対する非特異的又はオフ標的結合のためのリード候補の特性を評価するために開発されている。これにより、不十分な薬物動態及び生物分布特性を予測することができる。TMCB150の結合及び安定性は、蛍光系クロマトグラフィー法を使用して、緩衝液及びヒト血清の両方で評価する。二重特異性抗体は、Alexa Fluor 488コンジュゲート（製造業者の指示に従ったInvitrogenキット）で標識し、Hepes緩衝液及びヒト血清（Sigma、カタログ番号H4522）中4℃及び37℃で2日間インキュベートし、次いで蛍光検出器を備えたAgilent HPLCシステムを使用するSEC-HPLCにより分析した。凝集率は、各ピークの曲線下面積の積分から計算する。TMCB150は、時間0でHepes緩衝液中2.4%の凝集を示し、それぞれ摂氏4℃及び37℃で2日後に2.0%及び1.3%の凝集を示した。ヒト血清において、TMCB150は、摂氏4℃及び37℃の両方で、時間0で1.7%の凝集及び2日後に1.1%の凝集を示した。

【0511】

非特異的結合

無関係な表面へのリード分子の非特異的結合は、バイオセンサー技術（Biacore 8K）によって決定する。抗体を、無関係なタンパク質でコーティングしたSPR表面上に通過させる。抗体が、これらの無関係な表面への著しい結合を示す場合、不十分なインビボ特性を有し、製造上問題を呈すると予測される。最終濃度1μMでリード分子を試験する。無関係な表面としては、負に帯電したタンパク質（Soy Trypsin Inhibitor）、正に帯電したタンパク質（リゾチーム及びβ-ディフェンシン）、疎水性（Rh-integrin α4β7）、ヒトIgG粘着性タンパク質（Rh-CD19）が挙げられる。この実験では、適切な対照を使用する。一方はブランクであり、他方は直接固定化された分子を有する2つの表面上に、リードを流す。応答単位（response unit、RU）レベルは、試験表面RUからブランクRUを減算することによって決定する。TMCB150のRU及び親mAbを、以下の表に示す。製造中に問題を生じ、かつ不十分なPK特性を意味する応答単位 ≥ 100 では、帯電／疎水性／IgG表面への非特異的結合の高いリスクが予測される。抗体のうちのいずれも、無関係な表面への非特異的結合を示さない場合、製造及びインビボ挙動でのリスクが、低い全くないことが予測される。

【0512】

【表20】

表20.

	STI	B- ディフェンシン-3	ヒトIgG	リゾチーム	rh- インテグリンα4β7	rh-CD19
TMCB150	1.6	6.4	7.5	4.2	0	3.4
TMEB762	0	4.1	8.4	4.6	0	3.3
CD3B376	19.5	3.1	0.4	0.2	0	0

【0513】

高濃度安定性

注入量を低減して皮下投与を容易にするために、多くのモノクローナル抗体は、高濃度（ $\geq 100\text{ mg/ml}$ ）で配合される。加えて、全てのモノクローナル抗体は、精製プロセス中に一過的に高濃度（ $\geq 50\text{ mg/ml}$ ）に曝露される。したがって、高濃度安定性は、これらの分子の重要な品質属性である。30kDa MWCO膜を備える遠心限外濾過デバイスを使用して濃縮を実施する。5.1～5.3mgの各タンパク質を最初に同じ開始濃度に希釈し、15分間隔に4000xgで遠心分離した。各15分の遠心分離工程の終了時に、濃縮器を遠心分離器から取り出し、残りのサンプル体積の視覚的推定値を記録する。濃度は、Solvape装置によって測定する。濃縮したサンプルを4℃及び40℃で2週間インキュベートし、一定時間間隔でアリコートをして、分析SECによって一体性を確認した。TMCB150及び親mAb（CD3B376及びTMEB762

）を通常どおり濃縮した。TMCB150の最終濃度は99.4mg/mLであり、親mAbの濃度は52.2mg/mL（TMEB762）及び52.6mg/mL（CD3B376）であった。濃度は4℃及び40℃で2週間同じままであり、これは、分子が、凝集又はエッペンドルフチューブへの吸着の可能性がない、良好な固有特性を有することを示唆している。SECピーク積分から測定した種%（A：凝集、M：モノマー、F：断片）を以下の表に提供する。高濃度では、分子は、40℃で2週間保存した後、4～5%の凝集及び≤0.3%の断片で無傷であり、良好な貯蔵寿命が予測される。

【0514】

【表21】

表21.

10

	時間ゼロ			2週間、4℃			2週間、40℃		
	A	M	F	A	M	F	A	M	F
TMCB150	0.8	99.2	0	1.4	98.6	0	3.6	96.1	0.3
TMEB762	2.5	97.5	0	2.7	97.3	0	3.1	96.9	0
CD3B376	1.1	98.9	0	2.5	97.5	0	5.1	94.7	0.2

【0515】

動態排除アッセイ（kinetic exclusion assay、KinExA）による抗TMEFF2／CD3二重特異性抗体の親和性決定

KinExA3200装置（Sapidyne Instruments, Inc.）を使用して、二重特異性mAb TMCB150及びその2価TMEFF2親TMEB762mAbの、ヒトTMEFF2細胞外ドメイン（ECD）への溶液平衡親和性 K_D を測定した。ヒトTMEFF2細胞外ドメイン（ECD）の連続希釈を、10mMのHEPES、150mMのNaCl、0.05%界面活性剤P20、pH7.4、0.1%のBSA、及び0.02%のNaN3中で一定濃度の抗TMEFF2mAbを用いて調製した。結合相互作用が平衡に達するまで、反応混合物を室温でインキュベートした。インキュベーションの継続時間は、KinExAソフトウェアシミュレーションを使用して決定された。ビス-アクリルアミド／アズラクトンコポリマー（Pierce Biotechnology, Inc.）で構成される活性化前ビーズ上でのアミン結合による、TMEFF2-ECDの直接的共有結合固定によってビーズを調製した。インキュベーション後、サンプルをKinExA装置にかけて、TMEFF2修飾ビーズに混合物を通過させ、蛍光標識された二次抗体を使用して捕捉抗体を検出することによって、混合物中の遊離抗体を評価した。データは、KinExA Proソフトウェアを使用して、1：1結合モデルと適合させた。

20

30

【0516】

【表22】

表22.

mAbサンプル	K_D pM	95%CI、 K_D pM
TMCB150	63.6	55.8–71.9
TMEB762	46.1	38.0–55.1

40

【0517】

抗TMEFF2／CD3二重特異性抗体のN末端CD3εペプチドに対する結合親和性の測定

Biacore 8K（GE Healthcare）及び抗ヒトFcバイオセンサー表面を使用して実施したSPRによって、動態速度定数を測定した。抗ヒト免疫グロブリン抗体は、CM4センサーチップ（GE Healthcare）の表面に共有結合させた。対象の抗体を抗ヒト免疫グロブリンセンサーチップ上に捕捉し、続いて0.05%界面活性剤P20（Tween（商標）20）及び100ug/mLのBSAを含むHEPES緩衝生理食塩水中様々な濃度でN末端CD3εペプチドを注入した。表面を、100

50

$\mu\text{L}/\text{分}$ で $30\mu\text{L}$ の 0.8% リン酸の2パルス注入で再生した。データは、捕捉抗体を含む流動細胞と、捕捉抗体を含まない参照細胞との間のSPRシグナルの差異を報告した。基準－除算シグナル (reference-subtracted signal) からブランク注入のデータを除算することによって、シグナルに対する追加的な装置の寄与を除去した。Biaevaluationソフトウェア (Biacore, Inc.) を使用して、1:1結合モデルにおける全ての濃度 (グローバルフィット) での会合及び解離段階を適合することにより、データを分析した。データは、反復数の $95\% \text{ CI} \times \text{標準偏差}/\text{平方根}$ の t 値によって計算される平均 $+95\% \text{ CI}$ (信頼区間) として報告する。

【0518】

【表23】

表23.

mAbサンプル	平均 $k_{on}(1/\text{Ms})$	平均 $k_{off}(1/\text{s})$	平均 K_D, nM	95%CI、 K_D, pM
TMCB150	$3.57\text{E}+04$	$1.03\text{E}-03$	28.7	24.4–34.3
CD3B376	$4.33\text{E}+04$	$1.17\text{E}-03$	26.9	21.1–34.4

表23.

【0519】

実施例9. 二重特異性TMEFF2xCD3抗体は、前立腺癌細胞のT細胞媒介性殺傷に有効である。

In vitroにおける前立腺癌細胞のT細胞媒介性殺傷。

【0520】

前立腺癌細胞のT細胞媒介性殺傷を媒介する能力について、選択二重特異性TMEFF2xCD3抗体を評価した。

活性カスパーゼ3/7による蛍光基質の切断を介した細胞殺傷を間接的に測定するカスパーゼ細胞障害アッセイを使用して、TMEFF2xCD3二重特異性抗体のT細胞媒介性殺傷を測定した。基質の開裂により、蛍光DNA染色が生じ、蛍光は細胞核に制限される。同じ座標でウェル (複数可) を正確に撮像することができる電動式10X対物レンズを使用して、アッセイの過程を通して、各ウェルで複数回蛍光測定を行う。標的細胞集団は、定義されたサイズ制限に基づいて、及び/又は二次標識の使用を通じて同定する。

【0521】

正常な健康ドナーからの陰性選択によって、凍結Pan CD3⁺T細胞 (Biological Specialty Corporation, Colmar, PA) を単離した。TMEFF2 (LNCaP-AR) を発現する前立腺癌細胞を、10%のHIFBS+サプリメント (Life Technologies) を含むRPMI 1640中で培養した。T細胞及び標的細胞を、フェノールレッドを含まないRPMI+10%のFBS及びサプリメント (Life Technologies) (選択試薬なし) 中3:1のエフェクター対標的比 (E:T) で組み合わせ、0.6uLのNuViewカスパーゼ試薬 (Essen Bioscience) を、製造業者のガイドラインに従って各mLの細胞に添加した。0.1mLの細胞の総体積を、透明な96ウェル平底プレート (BD Falcon) の適切なウェルに添加した。TMEFF2xCD3二重特異性抗体を、上に示すように調製したフェノールレッドを含まないRPMI中2倍の最終濃度で調製し、0.1mLの化合物を各ウェルに添加した。ウェルの縁部での細胞凝集を最小限にするために室温で30分間インキュベートした後、37°C、5%CO₂に保持したZoom Incucyte装置 (Essen Bioscience) にプレートを移した。

【0522】

Incucyte上の処理定義は、製造業者のガイドラインに従って、試験する各細胞株に対して設計した。カスパーゼシグナルにプラトーが観察されるまで、6時間ごとに測定を行い、続いて、最高濃度の試験化合物 (複数可) を含むウェル (複数可) では最大シグナルから3回又は4回以上連続的に減少した。

10

20

30

40

50

【0523】

アッセイが完了した後、適切な処理定義を使用して各プレート进行分析した。未加工の蛍光データをIncucyte Zoomソフトウェアからエクスポートし、GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA)) に貼り付けた。カスパーゼ3/7活性は、GraphPadで、各ウェルの曲線下(AUC)を計算することによって決定した。Log10 nM化合物の関数としてAUC値をプロットした。各用量曲線のナノモル(nM)でのEC50は、非線形回帰分析(4パラメータ適合、最小二乗回帰)に従って報告した。各アッセイは、最低3つの生物学的複製物を含み、各細胞株は、5人の健康なドナーからのT細胞を使用して試験した。非線形回帰モデルを使用して、非臨床統計によってデータを更に分析した。

10

【0524】

図3は、選択二重特異性抗TMEFF2 x CD3抗体のカスパーゼ3/7活性を増加させて測定したときの、経時的なLnCaP細胞の殺傷を示す。

【0525】

二重特異性TMEFF2 x CD3抗体は、インビボ前立腺癌腫瘍モデルにおいて有効である。

選択二重特異性抗体を、雄NSGマウスにおけるエクスビボLnCaP前立腺癌モデルで試験した。研究のために、50% Cultrex中 10^6 個のLnCaP細胞を0.2 mL/動物で、0日目に右脇腹に皮下注射により投与した。腫瘍がおおよそ $100 \sim 150 \text{ mm}^3$ の体積に達したときに動物を無作為化し、15日目に 2×10^6 個のT細胞/マウスを腹腔内に注入した。各群に10匹の動物を使用した。抗体を用いる処置は、T細胞注入の1~3日後に開始した。抗体を週に2回腹腔内投与した。投与前に、全ての動物は、IVIg+Fc遮断を受けた。腫瘍が約 1200 mm^3 に達するまで、腫瘍体積及び体重を週2回評価した。治療群を表24に示す。これらのアッセイにおいてCD3B219 CD3結合アーム及びnullアーム結合HIV gp120を有する陰性対照として、CD3 x Null抗体を使用した。

20

【0526】

【表24】

表24.

群	処理	用量
1	CD3xNull	5mg/kg
2	TMCB93(TMEB675 x CD3B219)	5mg/kg
3	TMCB93(TMEB675 x CD3B219)	0.5mg/kg
4	TMCB101(TMEB570 x CD3B219)	5mg/kg
5	TMCB101(TMEB570 x CD3B219)	0.5mg/kg
6	TMCB131(TMEB570 x CD3B376)	5mg/kg
7	TMCB131(TMEB570 x CD3B376)	0.5mg/kg
8	TMCB132(TMEB675 x CD3B376)	5mg/kg
9	TMCB132(TMEB675 x CD3B376)	0.5mg/kg

30

【0527】

表25は、腫瘍移植後の各群ごとの38日目の腫瘍成長阻害率を示す。

【0528】

図4は、腫瘍移植後の経時的な平均腫瘍体積の低減を示す。図5Aは、0.5 mg/kgのTMCB93で治療した各マウスの平均腫瘍体積の低減を示す。図5Bは、0.5 mg/kgのTMCB132で治療した各マウスの平均腫瘍体積の低減を示す。

40

【0529】

【表 2 5】

表 2 5.

処理	38日目のTGI値%
CNT07008(NullxCD3)	
TMCB93(TMEB675xCD3B219)5mg/kg	83.9
TMCB93(TMEB675xCD3B219)0.5mg/kg	75.6
TMCB132(TMEB675xCD3B376)5mg/kg	48
TMCB132(TMEB675xCD3B376)0.5mg/kg	47.7
TMCB101(TMEB570xCD3B219)5mg/kg	25
TMCB101(TMEB570xCD3B219)0.5mg/kg	38.3
TMCB131(TMEB570xCD3B376)5mg/kg	23.3
TMCB131(TMEB570xCD3B376)0.5mg/kg	35

10

【0 5 3 0】

また、TMEB762xCD3B376(TMCB150)の有効性を、20e6 T細胞でヒト化した雄NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ(NSG)マウスで確立されたLNCA P異種移植片で評価した。腫瘍移植13日後に平均腫瘍体積によって、動物を、各10匹の動物群に無作為化した。0.5、0.1、及び0.05mg/kgのTMEB762xCD3B376、又は0.5mg/kgのnullxCD3B376抗体対照を、5週間の間週2回IP投与した。腫瘍移植35日後に群当たり少なくとも8匹の動物が残存した場合、腫瘍体積によって決定された腫瘍成長阻害(tumor growth inhibition、TGI%)を計算した。統計的に著しい腫瘍成長阻害は、nullxCD3対照と比較して、0.5及び0.1mg/kgのTMEB762xCD3B376で観察されたが、0.05mg/kgでは観察されなかった(図6)。nullxCD3処置対照と比較して、0.5、0.1、及び0.05mg/kgでのTMEB762xCD3B376では、それぞれ110%、88%、及び25%の腫瘍成長阻害が誘導された。TMEB762xCD3B376治療により、それぞれ0.5及び0.1mg/kgで7及び3匹に完全応答を生じた。皮下LNCA P腫瘍を、週2回キャリパで測定し、結果を平均腫瘍体積(mm³)±SEM(群当たり≥8匹のマウス)として提示した。

20

【0 5 3 1】

TMCB132の投与に応答したT細胞活性化

30

LNCA P前立腺癌細胞におけるT細胞活性化を、フローサイトメトリーによって、具体的には、TMCB132治療の72時間後に6つの別個の正常な健康ドナー(9642、9672、9762、9772、9832、9852)におけるCD3+/CD8+T細胞のCD25陽性を評価することによって測定した(図7)。3:1のエフェクター:標的比で添加したCD3+pan-T細胞の活性化は、LNCA P前立腺癌細胞におけるTMCB132の投与に応答して観察された。

【0 5 3 2】

インビトロでのTMCB132のT細胞媒介性細胞障害性

T細胞媒介性細胞障害アッセイを使用して、Incucyteプラットフォーム上でライブタイムラスプイメーシングを使用して、インビトロでのTMCB132の細胞障害性の可能性を評価した。健康なドナーから単離したpanヒトCD3+T細胞の存在下で、TMEFF2陽性細胞株LNCA PでのTMCB132を3:1の(エフェクター:標的)エフェクター:標的比(E:T比)で試験した。96時間の期間にわたって活性カスパーゼ3/7の蛍光シグナルを測定することによって、アポトーシスによる細胞死を監視した。TMCB132は、時間の増加とともに、生存LNCA P細胞の用量依存的な低減を促進した。カスパーゼ3/7活性又は蛍光シグナルの用量依存的増加は、T細胞の存在下でLNCA P細胞における細胞死を示した(図8)。データは、TMCB132が、LNCA P腫瘍細胞においてT細胞媒介性死を誘導するのに有効であることを示唆している。

40

【0 5 3 3】

T細胞ヒト化マウスで確立されたSCヒト前立腺異種移植片におけるTMCB132の

50

有効性。

TMCB132の抗腫瘍有効性を、 2×10^6 T細胞でヒト化した雄Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG, The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)) マウスで確立された皮下 (subcutaneous、SC) ヒト前立腺LNCaP異種移植片において評価した。NSG雄。腫瘍移植13日後に平均腫瘍体積によって、動物を、各10匹の動物群に無作為化した。0.5、0.1、及び0.05 mg/kgのTMCB132、又は0.5 mg/kgのnull x CD3B219抗体対照を、4週間の間週2回IP投与した。腫瘍移植45日後に群当たり少なくとも7匹の動物が残存した場合、腫瘍体積によって決定された腫瘍成長阻害 (TGI%) を計算した。統計的に著しい腫瘍成長阻害は、null x CD3対照と比較して、0.5及び0.1 mg/kg、並びに0.05 mg/kgのTMCB132で観察された (図9、 $p \leq 0.0001$)。null x CD3処置対照と比較して、0.5、0.1、及び0.05 mg/kgでのTMCB132では、それぞれ102%、109%、及び47%の腫瘍成長阻害が誘導された。TMCB132治療は、それぞれ0.5、0.1、及び0.05 mg/kgで3、2、及び1匹に完全応答を生じた。

10

【図1】

```

25 EVQLLESGGGLVQR-GGSLRPSCAASGFTFS
27 EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFS
87 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS
89 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS
*****

25 SYMSWVRQAPGKGLWVSVISGGGFTDY
27 SYMSWVRQAPGKGLWVSVISGGGFTSY
87 SYMSWVRQAPGKGLWVSVISGGGFTDY
89 SYMSWVRQAPGKGLWVSVISGGGFTDY
*****

25 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
27 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAED
87 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAED
89 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
*****

25 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSS
27 TAVYYCARMPLNSPHDCWGQGLTVTVSS
87 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSS
89 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLTVTVSS
**

```

【図2】

```

28 AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIR
30 AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIR
88 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIR
90 AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIR
*****

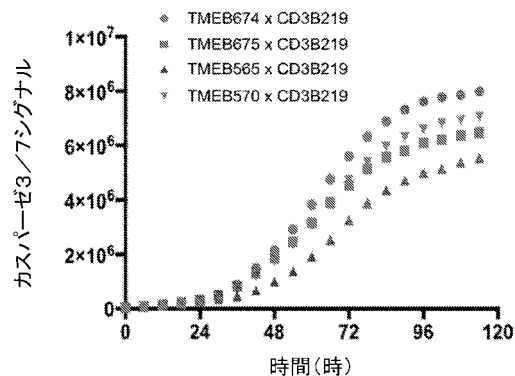
28 NDLGWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
30 NDLGWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
88 NDLGWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
90 NDLGWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
*****

28 RFGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCLQ
30 RFGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCLQ
88 RFGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCLQ
90 RFGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCLQ
*****

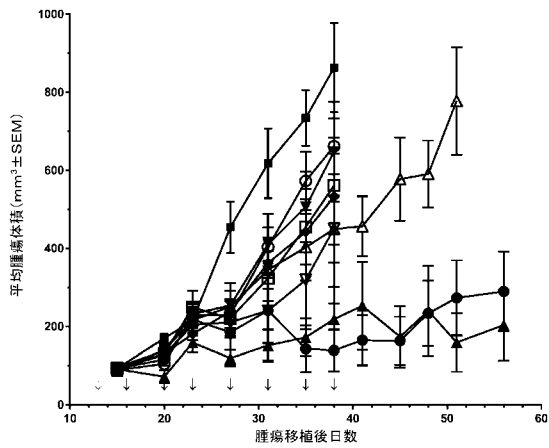
28 DYNYYLTFGGGTKVEIK
30 DYNYYLTFGGGTKVEIK
88 DYNYYLTFGGGTKVEIK
90 DYNYYLTFGGGTKVEIK
*****

```

【図3】

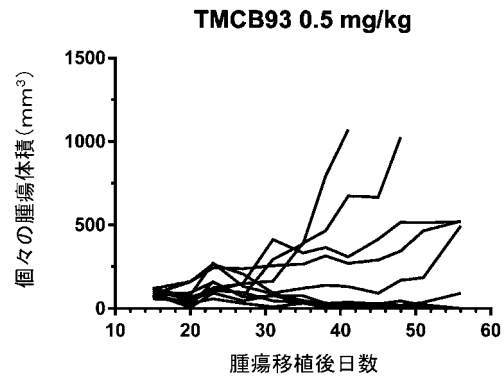


【図 4】

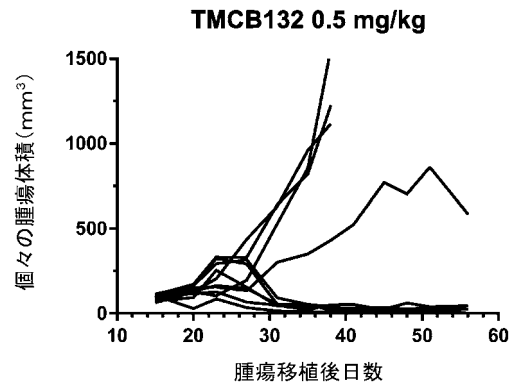


■ NulxCD3 5 mg/kg
 ● TMCB93 5 mg/kg
 ▲ TMCB93 0.5 mg/kg
 ▼ TMCB101 5 mg/kg
 ◆ TMCB101 0.5 mg/kg
 □ TMCB131 5 mg/kg
 ◇ TMCB131 0.5 mg/kg
 △ TMCB132 5 mg/kg
 ▽ TMCB132 0.5 mg/kg
 ↓ Ip 2x/週
 ○ T細胞

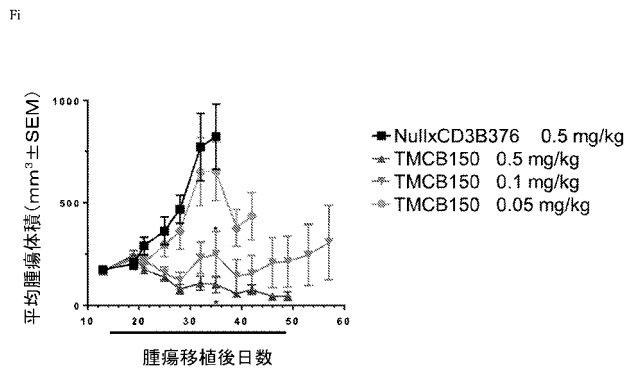
【図 5 A】



【図 5 B】

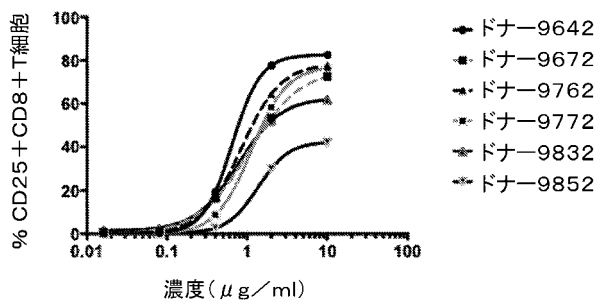


【図 6】

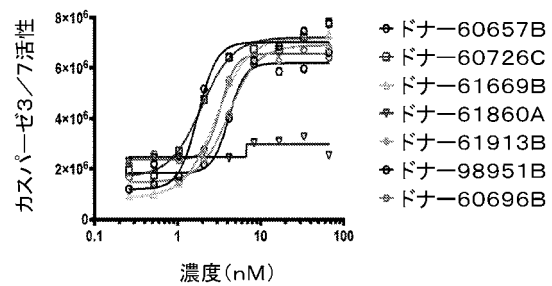


* 線形混合分析、続いて一対比較によって計算した、治療対照では $p \leq 0.0001$ 。X軸下の棒線は、投与期間を表す。

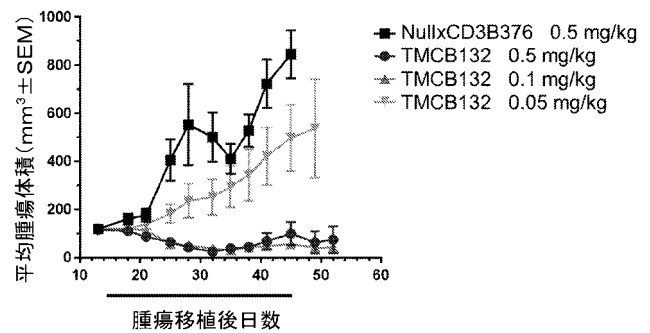
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2021524255000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/054184

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61P35/00
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)

C07K A61P A61K

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, 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 2013/093122 A2 (PHENOQUEST AG [DE]) 27 June 2013 (2013-06-27)	1-13, 22-32, 34-46, 57-74, 76-79
Y	The whole document, in particular, Example 2, mAb 1D12; Example 3, mAb PQ01	19-21, 28-32, 34-46, 57-74, 76-79
	----- -/--	

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 September 2019

Date of mailing of the international search report

02/12/2019

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chapman, Rob

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2019/054184

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AFAR DANIEL E H ET AL: "Preclinical validation of anti-TMEFF2-auristatin E-conjugated antibodies in the treatment of prostate cancer", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 3, no. 8, 1 August 2004 (2004-08-01), pages 921-932, XP002396164, ISSN: 1535-7163	28-32, 70-74, 76-79
Y	The whole document, in particular anti-TMEFF2 ADC	28-32, 70-74, 76-79
Y	----- R. BARGOU ET AL: "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody", SCIENCE, NIH AUTHOR MANUSCRIPT, vol. 321, no. 5891, 15 August 2008 (2008-08-15), pages 974-977, XP055626096, US ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/science.1158545 The whole document, in particular, CD3 BiTEs	19-21, 28-32, 34-46, 57-74, 76-79
A	----- KUI LIN ET AL: "TMEFF2 Is a PDGF-AA Binding Protein with Methylation-Associated Gene Silencing in Multiple Cancer Types Including Glioma", PLOS ONE, vol. 6, no. 4, 29 April 2011 (2011-04-29), page e18608, XP055625701, DOI: 10.1371/journal.pone.0018608 The whole document, in particular Fig.1	1
A	----- PENNING LOUIS C ET AL: "Induction of apoptosis in hematopoietic cells with an antibody against tomoregulin-1", ANTICANCER RESEARCH - INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND TREATMENT, INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH, GR, vol. 26, no. 1A, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 339-346, XP009132606, ISSN: 0250-7005 The whole document, in particular, the similarities between Tomoregulin 1 and 2 i.e. TMEFF 1 and 2 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2019/054184

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013093122 A2	27-06-2013	EP 2794660 A2	29-10-2014
		US 2015030602 A1	29-01-2015
		WO 2013093122 A2	27-06-2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/054184**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.: 2, 37(all partially)
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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.:
13, 45, 46(completely); 1-12, 19-32, 34-44, 57-74, 76-79(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/ IB2019/ 054184

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 13, 45, 46(completely); 1-12, 19-32, 34-44, 57-74, 76-79(partially)

An isolated anti-TMEFF2 antibody or an antigen binding fragment thereof that binds to a membrane proximal region of SEQ ID NO: 110 of TMEFF2, comprising a heavy chain complementarity determining region 1 (HCDR1), a HCDR2, a HCDR3, a light chain complementarity determining region 1 (LCDR1), a LCDR2 and a LCDR3 of SEQ ID NOs: 10, 12, 15, 18, 20 and 22, respectively, and related subject-matter, only in so far as it relates to binding molecules comprising the above-stated CDRs.

- 2-5. claims: 1-12, 14-32, 34-44, 47-74, 76-79(all partially)

An isolated anti-TMEFF2 antibody or an antigen binding fragment thereof that binds to a membrane proximal region of SEQ ID NO: 110 of TMEFF2, comprising a heavy chain complementarity determining region 1 (HCDR1), a HCDR2, a HCDR3, a light chain complementarity determining region 1 (LCDR1), a LCDR2 and a LCDR3 of
 Invention 2: SEQ ID NOs: 11, 13, 16, 19, 21, and 23, respectively;
 Invention 3: SEQ ID NOs: 10, 14, 17, 18, 20 and 24, respectively;
 Invention 4: SEQ ID NOs: 11, 13, 16, 18, 20 and 22, respectively; or
 Invention 5: SEQ ID NOs: 10, 12, 15, 18, 20 and 86, respectively,
 and related subject-matter, only in so far as it relates to binding molecules comprising the above-stated, invention-specific CDRs.

6. claims: 33, 75

An anti-idiotypic antibody binding to anti-TMEFF2/anti-CD3 antibody or the antigen binding fragment thereof of any one of claims 13-18 or 45-56.

International Application No. PCT/ IB2019/ 054184

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2, 37(all partially)

Claims 2 and 37 encompass compounds defined only by their desired function, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description, see Examples. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly, and the technical effects of such compounds may not even be equivalent, since competition may occur without actually binding the same epitope (steric hindrance), or this translating in to a particular, technical effect. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search for claims 2 and 37.

The search of claims 2 and 37 was consequently restricted to agents capable of binding the membrane proximal region of TMEFF2.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H 0 4 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 47/55 (2017.01)	A 6 1 K 47/55	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	D
	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 K 45/00	

(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

- (74)代理人 100149010
弁理士 星川 亮
- (74)代理人 100104282
弁理士 鈴木 康仁
- (72)発明者 クーパー, フィリップ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72)発明者 アーンスト, ロビン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72)発明者 ガネサン, ラジクマール
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72)発明者 ケイン, コリーン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72)発明者 ラッセル, マイケル
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72)発明者 シンハ, サンジャヤ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72)発明者 ヴェンカタラマニ, サチャデヴィ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 1 9 4 7 7, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
4 0 0
- (72)発明者 ウ, シェンージウン

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
400

F ターム(参考) 4B064 AG26 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA83X AA87X AA87Y AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02
CA25 CA44
4C076 AA95 CC27 CC41 EE59
4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZC751
4C085 AA13 AA14 BB11 BB12 BB50 CC05 CC31 DD58 EE01 EE03
GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20
FA74