

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-530166
(P2024-530166A)

(43)公表日 令和6年8月16日(2024.8.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 8 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全87頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-506663(P2024-506663)	(71)出願人	523039477
(86)(22)出願日	令和4年8月3日(2022.8.3)		アブプロ コーポレーション
(85)翻訳文提出日	令和6年2月29日(2024.2.29)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1
(86)国際出願番号	PCT/US2022/039301		8 0 1, ウォーバン, カミングス パ
(87)国際公開番号	WO2023/014809		ーク ドライブ 6 8
(87)国際公開日	令和5年2月9日(2023.2.9)	(74)代理人	100078282
(31)優先権主張番号	63/229,125		弁理士 山本 秀策
(32)優先日	令和3年8月4日(2021.8.4)	(74)代理人	100113413
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 森下 夏樹
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
			弁護士 山本 健策
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 3 標的化抗体及びそれらの使用

(57)【要約】

本開示は、一般に、C D 3 タンパク質に結合することができる免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗体又はその抗原結合断片）に関する。本技術の抗体は、C D 3 の検出及びがんの治療を必要とする対象においてそれを行うための方法に有用である。

【選択図】 図 5 A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、

（a）前記 V_H が、GFTFNTYAMN（配列番号 1）の V_H -CDR1 配列、RIRSKYNNYATYYADSVKG（配列番号 2）、RIRSKYNNYATYKADSVKD（配列番号 7）、RIRSKYNNYATYYADKVKD（配列番号 8）、若しくは RIRSKYNNYATYYWDSVKD（配列番号 9）の V_H -CDR2 配列、及び HGNFGNSYVSWFAY（配列番号 3）、HGNFGNSYVSWFGY（配列番号 10）、若しくは HGNFGNSYVSWFMY（配列番号 11）の V_H -CDR3 配列を含み、かつ／又は

10

（b）前記 V_L が、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号 4）の V_L -CDR1 配列、GTNKRAP（配列番号 5）、GTNKKAS（配列番号 51）、若しくは GTNKRAS（配列番号 52）の V_L -CDR2 配列、及び ALWYSNLWV（配列番号 6）、MLWYSNLWV（配列番号 12）、若しくは ALYYSNLWV（配列番号 48）の V_L -CDR3 配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、

（a）前記 V_H が、GFTFNTYAMN（配列番号 1）の V_H -CDR1 配列、RIRSKYNNYATYYADSVKG（配列番号 2）、RIRSKYNNYATYKADSVKD（配列番号 7）、RIRSKYNNYATYYADKVKD（配列番号 8）、若しくは RIRSKYNNYATYYWDSVKD（配列番号 9）の V_H -CDR2 配列、及び HGNFGNSYVSWFAY（配列番号 3）、HGNFGNSYVSWFGY（配列番号 10）、若しくは HGNFGNSYVSWFMY（配列番号 11）の V_H -CDR3 配列を含み、かつ／又は

20

（b）前記 V_L が、RSSTGAVTTSNYAN（配列番号 50）の V_L -CDR1 配列、GTNKKAS（配列番号 51）、若しくは GTNKRAS（配列番号 52）の V_L -CDR2 配列、及び ALWYSNLWV（配列番号 6）、MLWYSNLWV（配列番号 12）、若しくは ALYYSNLWV（配列番号 48）の V_L -CDR3 配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 3】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、

（a）前記 V_H が、GFTFNTYAMN（配列番号 1）の V_H -CDR1 配列、RIRSKYNNYATYYADSVKG（配列番号 2）、RIRSKYNNYATYKADSVKD（配列番号 7）、RIRSKYNNYATYYADKVKD（配列番号 8）、若しくは RIRSKYNNYATYYWDSVKD（配列番号 9）の V_H -CDR2 配列、及び HGNFGNSYVSWFAY（配列番号 3）、HGNFGNSYVSWFGY（配列番号 10）、若しくは HGNFGNSYVSWFMY（配列番号 11）の V_H -CDR3 配列を含み、かつ／又は

40

（b）前記 V_L が、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号 4）若しくは RSSTGAVTTSNYAN（配列番号 50）の V_L -CDR1 配列、GTNKRAP（配列番号 5）、GTNKKAS（配列番号 51）、若しくは GTNKRAS（配列番号 52）の V_L -CDR2 配列及び MLWYSNLWV（配列番号 12）若しくは ALYYSNLWV（配列番号 48）の V_L -CDR3 配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_H ）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（ V_L ）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、

（a）前記 V_H が、GFTFNTYAMN（配列番号 1）の V_H -CDR1 配列、R I

50

RSKYNNYATYYADSVKD（配列番号49）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は

（b）前記V_Lが、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）のV_L-CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項5】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、

（a）前記V_Hが、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RSKYNNYATYYADSVKD（配列番号49）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は

（b）前記V_Lが、RSSTGAVTTSNYAN（配列番号50）のV_L-CDR1配列、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項6】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、

（a）前記V_Hが、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RSKYNNYATYYADSVKD（配列番号49）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は

（b）前記V_Lが、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）若しくはRSSTGAVTTSNYAN（配列番号50）のV_L-CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列及びMLWYSNLWV（配列番号12）若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項7】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む抗体又はその抗原結合断片であって、

（a）前記V_Hが、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43のアミノ酸配列を含み、かつ／又は

（b）前記V_Lが、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47のアミノ酸配列を含む、抗体又はその抗原結合断片。

【請求項8】

重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）アミノ酸配列を含む抗体又はその抗原結合断片であって、それぞれ、

配列番号18及び配列番号20、

配列番号21及び配列番号19、

配列番号22及び配列番号23、

配列番号24及び配列番号25、

配列番号 18 及び配列番号 26、
配列番号 18 及び配列番号 27、
配列番号 22 及び配列番号 28、
配列番号 29 及び配列番号 28、
配列番号 30 及び配列番号 28、
配列番号 31 及び配列番号 28、
配列番号 32 及び配列番号 28、
配列番号 33 及び配列番号 28、
配列番号 22 及び配列番号 34、
配列番号 35 及び配列番号 36、
配列番号 37 及び配列番号 38、
配列番号 39 及び配列番号 27、
配列番号 40 及び配列番号 27、
配列番号 41 及び配列番号 27、
配列番号 42 及び配列番号 27、
配列番号 43 及び配列番号 27、
配列番号 18 及び配列番号 44、
配列番号 13 及び配列番号 45、
配列番号 15 及び配列番号 45、
配列番号 16 及び配列番号 45、
配列番号 17 及び配列番号 45、
配列番号 13 及び配列番号 46、
配列番号 15 及び配列番号 46、
配列番号 16 及び配列番号 46、
配列番号 17 及び配列番号 46、
配列番号 13 及び配列番号 47、
配列番号 15 及び配列番号 47、
配列番号 16 及び配列番号 47、並びに

10

20

配列番号 17 及び配列番号 47、からなる群から選択される、抗体又はその抗原結合断片。

30

【請求項 9】

I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g M、I g D、及び I g E からなる群から選択されるアイソタイプの F c ドメインを更に含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 10】

N 2 9 7 A、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び K 3 2 2 A からなる群から選択される 1 つ以上のアミノ酸置換を含む I g G 1 定常領域を含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

S 2 2 8 P 変異を含む I g G 4 定常領域を含む、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記抗原結合断片が、F a b、F (a b ')₂、F a b '、s c F_v、及び F_v からなる群から選択される、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗原結合断片。

40

【請求項 13】

前記抗体又は抗原結合断片が、アミノ酸配列 Q D G N E (配列番号 63) を含む C D 3 ε サブユニットに結合する、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 14】

前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、又は多重特異性抗体である、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 15】

50

前記抗体が、 $\alpha-1$ 、6-フコース修飾を欠く、請求項1～14のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項16】

第1のポリペプチド鎖、第2のポリペプチド鎖、第3のポリペプチド鎖、及び第4のポリペプチド鎖を含む多重特異性抗体であって、前記第1及び第2のポリペプチド鎖が、互いに共有結合しており、前記第2及び第3のポリペプチド鎖が、互いに共有結合しており、前記第3及び第4のポリペプチド鎖が、互いに共有結合しており、

(a) 前記第1のポリペプチド鎖及び前記第4のポリペプチド鎖の各々が、N末端からC末端方向に、

(i) 第1のエピトープに特異的に結合することができる第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインと、

(ii) 前記第1の免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインと、

(iii) アミノ酸配列(GGGGS)₃を含むフレキシブルペプチドリンカーと、

(iv) 第2の免疫グロブリンの相補的重鎖可変ドメインに連結されている前記第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン、又は第2の免疫グロブリンの相補的軽鎖可変ドメインに連結されている前記第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインであって、前記第2の免疫グロブリンの前記軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインが、第2のエピトープに特異的に結合することができ、アミノ酸配列(GGGGS)₆を含むフレキシブルペプチドリンカーを介して一緒に連結して、単鎖可変断片を形成する、軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインと、を含み、

(b) 前記第2のポリペプチド鎖及び前記第3のポリペプチド鎖の各々が、N末端からC末端方向に、

(i) 前記第1のエピトープに特異的に結合することができる前記第1の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインと、

(ii) 前記第1の免疫グロブリンの重鎖定常ドメインと、を含み、

前記第1の免疫グロブリンの前記重鎖可変ドメイン若しくは前記第2の免疫グロブリンの前記重鎖可変ドメインが、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43を含み、かつ／又は前記第1の免疫グロブリンの前記軽鎖可変ドメイン若しくは前記第2の免疫グロブリンの前記軽鎖可変ドメインが、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47を含む、多重特異性抗体。

【請求項17】

前記多重特異性抗体又は抗原結合断片が、T細胞、B細胞、骨髄細胞、形質細胞、又は肥満細胞に結合する、請求項14～16のいずれか一項に記載の多重特異性抗体。

【請求項18】

前記多重特異性抗体又は抗原結合断片が、CD3、GPA33、HER2/neu、GD2、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、MUM-1、CDK4、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、p15、gp75、ペーターカテニン、ErbB2、がん抗原125(CA-125)、がん胎児性抗原(CEA)、RAGE、MART(メラノーマ抗原)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、チロシナーゼ、Pmel17(gp100)、GnT-VイントロンV配列(N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼVイントロンV配列)、前立腺がんpsm、PRAME(メラノーマ抗原)、 β -カテニン、EBNA(エプスタイン・バーウイルス核抗原)1～6、LMP2、p53、肺抵抗性タンパク質(LRP)、Bcl-2、前立腺特異性抗原(PSA)、Ki-67、CEACAM6、結腸特異的抗原-p(CSAP)、HLA-DR、CD40、CD74、CD138、EGFR、EGP-1、EGP-2、VEGF、PLGF、イン

スリン様成長因子（ILGF）、テネイシン、血小板由来成長因子、IL-6、CD20、CD19、PSMA、CD33、CD123、MET、DLL4、Ang-2、HER3、IGF-1R、CD30、TAG-72、SPEAP、CD45、L1-CAM、ルイスY（LeY）抗原、E-カドヘリン、V-カドヘリン、GPC3、EpCAM、CD4、CD8、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74、CD22、CD14、CD15、CD16、CD123、TCRガンマ／デルタ、Nkp46、KIR、CD56、DLL3、PD-1、PD-L1、CD28、CD137、CD99、GloboH、CD24、STEAP1、B7H3、ポリシアル酸、OX40、OX40-リガンド、ペプチドMHC複合体（TP53、KRAS、MYC、EBNA1～6、PRAME、MART、チロンシナーゼ、MAGEA1～A6、pme117、LMP2、又はWT1に由来するペプチドを有する）、又は小分子DOTAハプテンに結合する、請求項14～17のいずれか一項に記載の多重特異性抗体又は抗原結合断片。

10

【請求項19】

請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片をコードする、組換え核酸配列。

【請求項20】

請求項19に記載の組換え核酸配列を含む、宿主細胞又はベクター。

【請求項21】

請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片と、薬学的に許容される担体と、を含む組成物であって、前記抗体又は抗原結合断片が、任意選択的に、同位体、色素、クロマゲン、造影剤、薬物、毒素、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、成長因子、放射性核種、金属、リポソーム、ナノ粒子、RNA、DNA、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される薬剤にコンジュゲートされている、組成物。

20

【請求項22】

がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療するための方法であって、前記対象に、有効量の請求項14～18のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片又は請求項21に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項23】

前記がんが、副腎がん、膀胱がん、血液がん、骨がん、脳がん、乳がん、がん腫、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮体（corpus uterine）がん、耳、鼻、及び喉の（ENT）がん、子宮内膜がん、食道がん、胃腸がん、頭頸部がん、ホジキン病、腸がん、腎臓がん、喉頭がん、急性及び慢性の白血病、肝臓がん、リンパ節がん、リンパ腫、肺がん、黒色腫、中皮腫、骨髄腫、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔がん、卵巣がん、膵臓がん、陰茎がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、肉腫、セミノーマ、皮膚がん、胃がん、奇形腫、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、膣がん、血管腫瘍、及びそれらの転移からなる群から選択される、請求項22に記載の方法。

30

【請求項24】

前記抗体又は抗原結合断片が、前記対象に、追加の治療剤と、別々に、連続して、又は同時に投与される、請求項22又は23に記載の方法。

40

【請求項25】

前記追加の治療剤が、アルキル化剤、白金剤、タキサン、ビンカ剤、抗エストロゲン薬、アロマターゼ阻害剤、卵巣抑制剤、VEGF／VEGFR阻害剤、EGF／EGFR阻害剤、PARP阻害剤、細胞増殖抑制アルカロイド、細胞傷害性抗生物質、抗代謝剤、内分泌／ホルモン剤、T細胞、及びビスホスホネート療法剤のうちの1つ以上である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

対象におけるがんをインビボで検出するための方法であって、

（a）前記対象に、有効量の請求項1～18のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片を投与することであって、前記抗体又は抗原結合断片が、CD3を発現するがん細胞

50

に局在化するように構成されており、放射性同位体で標識されている、投与することと、
(b) 参照値よりも高い前記抗体又は抗原結合断片によって放出された放射性レベルを検出することによって、前記対象における腫瘍の存在を検出することと、を含む、方法。

【請求項 27】

前記対象が、がんと診断されているか、又はがんを有することが疑われる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗体又は抗原結合断片によって放出された前記放射性レベルが、陽電子放射断層撮影又は単一光子放射コンピュータ断層撮影を使用して検出される、請求項 26 又は 27 に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記対象に、放射性核種にコンジュゲートされた請求項 1～18 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片を含む、有効量の免疫コンジュゲートを投与することを更に含む、請求項 26～28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記放射性核種が、アルファ粒子放出同位体、ベータ粒子放出同位体、オージェ放出体、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 β 粒子放出同位体が、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{165}Dy 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{177}Lu 、及び ^{67}Cu からなる群から選択される、請求項 30 に記載の方法。

20

【請求項 32】

請求項 1～18 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片と、使用説明書と、を含む、キット。

【請求項 33】

前記抗体又は抗原カップリング断片が、放射性標識、蛍光標識、及び発色性標識からなる群から選択される少なくとも 1 つの検出可能な標識にカップリングされている、請求項 32 に記載のキット。

【請求項 34】

請求項 1～18 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片に特異的に結合する二次抗体を更に含む、請求項 32 又は 33 に記載のキット。

30

【請求項 35】

生体試料における CD3 タンパク質発現レベルを検出するための方法であって、前記生体試料を、請求項 1～18 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合断片と接触させることと、前記生体試料における CD3 タンパク質との結合を検出することと、を含む、方法。

【請求項 36】

前記多重特異性抗体又は抗原結合断片が、T 細胞及び腫瘍抗原に結合する、請求項 14～18 のいずれか一項に記載の多重特異性抗体又は抗原結合断片。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の多重特異性抗体又は抗原結合断片によってエキスピボで武装化されている、T 細胞。

40

【請求項 38】

治療用 T 細胞を作製するエキスピボ方法であって、請求項 36 に記載の多重特異性抗体又は抗原結合断片を T 細胞に結合することを含む、エキスピボ方法。

【請求項 39】

前記 T 細胞がヒト T 細胞であり、かつ／又は前記結合が非共有結合である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療するための方法であって、前記対象に、有効量の請求項 37 に記載の T 細胞を投与することを含む、方法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年8月4日に出願された、米国仮特許出願第63／229,125号の利益及び優先権を主張するものであり、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

本技術の背景の以下の説明は、単に本技術を理解する際の補助として提供され、本技術の先行技術を説明又は構成するとは認められない。

【0003】

現在の標的療法に対する耐性を克服するための1つの潜在的な戦略は、二重特異性抗体(BsAb)を用いることによって、T細胞の殺傷活性を利用してがんに打ち勝つことである。これらのT細胞結合抗体は、腫瘍細胞上の抗原及び共受容体CD3などのT細胞活性化物質に同時に結合するように設計されている。T細胞のBsAb結合は、CD3の結合を介してT細胞を活性化し、細胞溶解性シナプスを形成することによって腫瘍細胞の殺傷を媒介し、主要組織適合性複合体(MHC)非依存の様式で抗原発現性腫瘍細胞に向かって殺傷活性を再指向する。初期の二重特異性T細胞エンゲージャー(TCE)の取り組みは、患者におけるサイトカイン放出及びT細胞の消耗又は枯渇に対する高い効力の生物学的結果を予測することなく、インビトロ細胞ベースのアッセイに基づいて細胞傷害性活性を最大化することに主に焦点を当ててきた(Vafa et al., Front. Oncol., 10:446(2020))。これらの安全性の懸念は、CD3 TCEの安全性評価に焦点を当てた最近のFDA主催のワークショップでまとめられた(Cris Kamperschroer et al., J Immunotoxicol 17(1):67-85(2020))。TCEの後の世代には、半減期を延長する目的でFc又は他の同様のドメインが含まれるが、有害事象及び臨床試験中断(clinical hold)は、高い効力のTCEで半減期を延長すると、神経毒性及びCRSに関連する重篤な有害事象が悪化する可能性があることを示唆している(Vafa et al., Front. Oncol., 10:446(2020))。

したがって、サイトカイン放出症候群及びT細胞の消耗又は枯渇などの有害作用を緩和する一方で、腫瘍の阻害に有効である二重特異性T細胞結合抗体の緊急の必要性が存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Vafa et al., Front. Oncol., 10:446(2020)

【非特許文献2】Cris Kamperschroer et al., J Immunotoxicol 17(1):67-85(2020)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

一態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_H)及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン(V_L)を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、(a) V_Hは、GFTFNTYAMN(配列番号1)のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKG(配列番号2)、RIRSKYNNYATYKADSVKD(配列番号7)、RIRSKYNNYATYYADKVKD(配列番号8)、若しくはRIRSKYNNYATYYWDSVKD(配列番号9)のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFAY(配列番号3)、HGNFGNSYVSWFGY(配列番号10)、若

しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は（b）V_Lは、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）のV_L-CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む。

【0006】

一態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、（a）V_Hは、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKG（配列番号2）、RIRSKYNNYATYKADSVKD（配列番号7）、RIRSKYNNYATYYADKVKD（配列番号8）、若しくはRIRSKYNNYATYYWDSVKD（配列番号9）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFAY（配列番号3）、HGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）、若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は（b）V_Lは、RSSTGAVTTSNYAN（配列番号50）のV_L-CDR1配列、GTNKKAS（配列番号51）若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む。

10

20

【0007】

一態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、（a）V_Hは、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKG（配列番号2）、RIRSKYNNYATYKADSVKD（配列番号7）、RIRSKYNNYATYYADKVKD（配列番号8）、若しくはRIRSKYNNYATYYWDSVKD（配列番号9）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFAY（配列番号3）、HGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）、若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は（b）V_Lは、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）若しくはRSSTGAVTTSNYAN（配列番号：50）のV_L-CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びMLWYSNLWV（配列番号12）若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む。

30

【0008】

別の態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、（a）V_Hは、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKD（配列番号49）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は（b）V_Lは、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）のV_L-CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む。

40

【0009】

別の態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、（a）V_Hは、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKD（配列番号49）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYV

50

SWFGY（配列番号10）若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は（b）V_Lは、RSSTGAVTTSNYAN（配列番号50）のV_L-CDR1配列、GTNKKAS（配列番号51）若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む。

【0010】

一態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、（a）V_Hは、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKD（配列番号49）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／又は（b）V_Lは、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）若しくはRSSTGAVTTSNYAN（配列番号50）のV_L-CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びMLWYSNLWV（配列番号12）若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含む。

10

【0011】

別の態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、（a）V_Hは、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43のアミノ酸配列を含み、かつ／又は（b）V_Lは、配列番号14、配列番号19、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47のアミノ酸配列を含む。

20

【0012】

いくつかの実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、それぞれ、配列番号18及び配列番号20、配列番号21及び配列番号19、配列番号22及び配列番号23、配列番号24及び配列番号25、配列番号18及び配列番号26、配列番号18及び配列番号27、配列番号22及び配列番号28、配列番号29及び配列番号28、配列番号30及び配列番号28、配列番号31及び配列番号28、配列番号32及び配列番号28、配列番号33及び配列番号28、配列番号22及び配列番号34、配列番号35及び配列番号36、配列番号37及び配列番号38、配列番号39及び配列番号27、配列番号40及び配列番号27、配列番号41及び配列番号27、配列番号42及び配列番号27、配列番号43及び配列番号27、配列番号18及び配列番号44、配列番号13及び配列番号45、配列番号15及び配列番号45、配列番号16及び配列番号45、配列番号17及び配列番号45、配列番号13及び配列番号46、配列番号15及び配列番号46、配列番号16及び配列番号46、配列番号17及び配列番号46、配列番号13及び配列番号47、配列番号15及び配列番号47、配列番号16及び配列番号47、並びに配列番号17及び配列番号47からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）アミノ酸配列を含む。

30

40

【0013】

一態様において、本開示は、（a）配列番号14、配列番号19、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47のうちのいずれか1つの軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも

50

99%同一である軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列、及び／又は（b）配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43のうちのいずれか1つの重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも99%同一である重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列、を含む抗体を提供する。

【0014】

上記の実施形態のいずれかにおいて、抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgD、及びIgEからなる群から選択されるアイソタイプのFcドメインを更に含み得る。いくつかの実施形態において、抗体は、N297A、L234A、L235A、及びK322Aからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸置換を含むIgG1定常領域を含む。追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、抗体は、S228P変異を含むIgG4定常領域を含む。特定の実施形態において、抗原結合断片は、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、及びFvからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、又は多重特異性抗体である。特定の実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、CD3ポリペプチドの細胞外ドメインに結合する。特定の実施形態において、細胞外ドメインは、アミノ酸配列QDENE（配列番号63）を含む。

【0015】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、本技術の抗体は、α-1, 6-フコース修飾を欠く。

【0016】

一態様において、本開示は、第1のポリペプチド鎖、第2のポリペプチド鎖、第3のポリペプチド鎖、及び第4のポリペプチド鎖を含む多重特異性抗体を提供し、第1及び第2のポリペプチド鎖は、互いに共有結合しており、第2及び第3のポリペプチド鎖は、互いに共有結合しており、第3及び第4のポリペプチド鎖は、互いに共有結合しており、（a）第1のポリペプチド鎖及び第4のポリペプチド鎖の各々は、N末端からC末端方向に、（i）第1のエピトープに特異的に結合することができる第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインと、（ii）第1の免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインと、（iii）アミノ酸配列（GGGGS）₃を含むフレキシブルペプチドリinkerと、（iv）第2の免疫グロブリンの相補的重鎖可変ドメインに連結されている第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン、又は第2の免疫グロブリンの相補的軽鎖可変ドメインに連結されている第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインであって、第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインが、第2のエピトープに特異的に結合することができ、アミノ酸配列（GGGGS）₆を含むフレキシブルペプチドリinkerを介して一緒に連結して、単鎖可変断片を形成する、軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインと、を含み、（b）第2のポリペプチド鎖及び第3のポリペプチド鎖の各々が、N末端からC末端方向に、（i）第1のエピトープに特異的に結合することができる第1の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインと、（ii）第1の免疫グロブリンの重鎖定常ドメインと、を含み、第1の免疫グロブリンの重鎖可変ドメイン若しくは第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインが、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43を含み、かつ／又は第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン若しくは第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインが、配列番号14、配列番号19、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47を含む。

【0017】

一態様において、本開示は、本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片のうちのいずれかをコードする組換え核酸配列を提供する。

【0018】

別の態様において、本開示は、本明細書に開示の組換え核酸配列のうちのいずれかを含む、宿主細胞又はベクターを提供する。

【0019】

一態様において、本開示は、本技術の抗体又は抗原結合断片と、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物を提供し、抗体又は抗原結合断片は、任意選択的に、同位体、色素、クロマゲン (chromagen)、造影剤、薬物、毒素、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、成長因子、放射性核種、金属、リポソーム、ナノ粒子、RNA、DNA、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される薬剤にコンジュゲートされている。

【0020】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、本技術の多重特異性抗体又は抗原結合断片は、T細胞、B細胞、骨髄細胞、形質細胞、又は肥満細胞に結合する。追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、多重特異性抗体又は抗原結合断片は、CD3、GPA33、HER2/neu、GD2、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、MUM-1、CDK4、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、p15、gp75、ベータ-カテニン、ErbB2、がん抗原125 (CA-125)、がん胎児性抗原 (CEA)、RAGE、MART (メラノーマ抗原)、MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、チロシナーゼ、Pmel17 (gp100)、GnT-VイントロンV配列 (N-アセチルグルコアミニルトランスフェラーゼVイントロンV配列)、前立腺がんpssm、PRAME (メラノーマ抗原)、β-カテニン、EBNA (エプスタイン・バーウイルス核抗原) 1~6、LMP2、p53、肺抵抗性タンパク質 (LRP)、Bcl-2、前立腺特異性抗原 (PSA)、Ki-67、CEACAM6、結腸特異的抗原-p (CSAp)、HLA-DR、CD40、CD74、CD138、EGFR、EGP-1、EGP-2、VEGF、PLGF、インスリン様成長因子 (ILGF)、テネニン、血小板由来成長因子、IL-6、CD20、CD19、PSMA、CD33、CD123、MET、DLL4、Ang-2、HER3、IGF-1R、CD30、TAG-72、SPAP、CD45、L1-CAM、ルイスY (LeY) 抗原、E-カドヘリン、V-カドヘリン、GPC3、EpCAM、CD4、CD8、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74、CD22、CD14、CD15、CD16、CD123、TCRガンマ/デルタ、NKp46、KIR、CD56、DLL3、PD-1、PD-L1、CD28、CD137、CD99、GloboH、CD24、STEAP1、B7H3、ポリシアル酸、OX40、OX40-リガンド、ペプチドMHC複合体 (TP53、KRAS、MYC、EBNA1~6、PRAME、MART、チロシナーゼ、MAGEA1~A6、pmel17、LMP2、又はWT1に由来するペプチドを有する)、又は小分子DOTAハプテンに結合する。小分子DOTAハプテンは、DOTA、DOTA-Bn、DOTA-デスフェリオキサミン、DOTA-Phe-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-NH₂、Ac-Lys (HSG)-D-Tyr-Lys (HSG)-Lys (Tscg-Cys)-NH₂、DOTA-D-Asp-D-Lys (HSG)-D-Asp-D-Lys (HSG)-NH₂、DOTA-D-Glu-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂、DOTA-D-Tyr-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂、DOTA-D-Ala-D-Lys (HSG)-D-Glu-D-Lys (HSG)-NH₂、DOTA-D-Phe-D-Lys (HSG)-D-Tyr-D-Lys (HSG)-NH₂、Ac-D-Phe-D-Lys (DOTA)-D-Tyr-D-Lys (DOTA)-NH₂、Ac-D-Phe-D-Lys (DTPA)-D-Tyr-D-Lys (DTPA)-NH

10

20

30

40

50

$2、Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH_2、Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、(Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH_2、Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、(Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH_2、Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH_2、Ac-D-Cys-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH_2、Ac-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2、及びAc-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH_2$

10

20

30

40

50

【0021】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3多重特異性抗体又は抗原結合断片はまた、T細胞に結合する。一態様において、本開示は、本技術の抗CD3多重特異性抗体又は抗原結合断片によってエキスピボで武装化されているT細胞を提供する。別の態様において、本開示は、治療用T細胞を作製するエキスピボ方法を提供し、本技術の抗CD3多重特異性抗体又は抗原結合断片によってT細胞をエキスピボで武装化することを含み、T細胞は、任意選択的にヒトT細胞であり、結合は非共有結合である。別の態様において、本開示は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療するための方法を提供し、対象に、本技術の抗CD3多重特異性抗体又は抗原結合断片によってエキスピボで武装化されている、有効量のT細胞を投与することを含む。

【0022】

また別の態様において、本開示は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療するための方法を提供し、対象に、有効量の本明細書に記載の多重特異性若しくは二重特異性抗体又は抗原結合断片を投与することを含み、多重特異性若しくは二重特異性抗体又は抗原結合断片は、CD3に特異的に結合する。

【0023】

がんの例には、前駆体T急性リンパ芽球性白血病／リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫、リンパ腫様丘疹症A型、菌状息肉腫、パジェット様細網症、肉芽腫様弛緩皮膚、セザリ一病、成人T細胞白血病／リンパ腫、皮膚大細胞型T細胞リンパ腫、多形性T細胞リンパ腫、リンパ腫様丘疹症B型、続発性皮膚CD30+大細胞型リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、腸症関連T細胞リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫（特記されない限り）、皮下T細胞リンパ腫、大顆粒リンパ球性白血病、及び急性混合性白血病が含まれるが、これらに限定されない。がんの他の例としては、副腎がん、膀胱がん、血液がん、骨がん、脳がん、乳がん、がん腫、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮体（corpus uterine）がん、耳、鼻、及び喉の（ENT）がん、子宮内膜がん、食道がん、胃腸がん、頭頸部がん、ホジキン病、腸がん、腎臓がん、喉頭がん、急性及び慢性の白血病、肝臓がん、リンパ節がん、リンパ腫、肺がん、黒色腫、中皮腫、骨髄腫、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔がん、卵巣がん、脾臓がん、陰茎がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、肉腫、セミノーマ、皮膚がん、胃がん、奇形腫、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、膣がん、血管腫瘍、及びそれらの転移が挙げられるが、これらに限定されない。

【0024】

追加的又は代替的に、方法のいくつかの実施形態において、多重特異性若しくは二重特異性抗体又は抗原結合断片は、対象に、追加の治療剤と、別々に、連続して、又は同時に投与される。追加の治療剤の例としては、アルキル化剤、白金剤、タキサン、ビンカ剤、抗エストロゲン薬、アロマターゼ阻害剤、卵巣抑制剤、VEGF／VEGFR阻害剤、E

G F / E G F R 阻害剤、P A R P 阻害剤、細胞増殖抑制アルカロイド、細胞傷害性抗生物質、抗代謝剤、内分泌／ホルモン剤、T 細胞、ビスホスホネート療法剤のうちの1つ以上が挙げられる。追加の治療剤の他の例としては、非ステロイド性抗炎症薬（N S A I D）、選択的 C O X - 2 阻害剤、グルココルチコイド、及び従来の疾患修飾抗リウマチ薬（c D M A R D）が挙げられる。

【0025】

本明細書においてまた、本技術の少なくとも1つの免疫グロブリン関連組成物（例えば、本明細書に記載の任意の抗体又は抗原結合断片）、又はその機能的バリエーション（例えば、置換バリエーション）と、使用説明書と、を含む、C D 3 の検出及び／又はがんの治療のためのキットが開示される。特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、1つ以上の検出可能な標識にカップリングされる。一実施形態において、1つ以上の検出可能な標識は、放射性標識、蛍光標識、又は発色性標識を含む。

10

【0026】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、キットは、本明細書に記載の抗 C D 3 免疫グロブリン関連組成物に特異的に結合する二次抗体を更に含む。いくつかの実施形態において、二次抗体は、放射性標識、蛍光標識、又は発色性標識からなる群から選択される少なくとも1つの検出可能な標識にカップリングされる。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1-1】ヒト化 S P 3 4 重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）バリエーションのアミノ酸配列を示す。V_H C D R 1 ~ 3 及び V_L C D R 1 ~ 3 配列には下線が引かれている。選択置換には二重下線が引かれている。

20

【図1-2】同上。

【図1-3】同上。

【図1-4】同上。

【図1-5】同上。

【図1-6】同上。

【図1-7】同上。

【図2-1】本技術の例示的な抗 C D 3 クローンの結合親和性を示す。

【図2-2】同上。

30

【図2-3】同上。

【図2-4】同上。

【図2-5】同上。

【図3A】本技術の抗 C D 3 二重特異性抗体を用いた C D 3 / T C R N F A T T 細胞活性化レポーターアッセイの結果を示す。J u r k a t C D 3 / T C R N F A T T 細胞活性化レポーターアッセイ（P r o m e g a）を使用して、H e r 2 - 高（図3A：S K - B R - 3、図3B：H C C 1 9 5 4）及びH e r 2 - 低（図3C：M C F - 7、図3D：H T 5 5）標的細胞株又は標的細胞なし（図3E）とのインキュベーション後の C D 3 / T C R 複合体の H E R 2（トラスツズマブ）× C D 3 二重特異性抗体（0.00004 ~ 40 nM）活性化を評価した。レポーター活性の発現を、検出し、相対発光単位（R L U）として定量化し、7時間のインキュベーション期間後にプロットした。A B P 1 0 0 s. 1 0. 0 クローンの抗 C D 3 V_H 及び V_L 配列（それぞれ、配列番号 2 2 及び配列番号 2 8）は、S P 3 4 親を表す。抗 H E R 2 抗原結合ドメイン（トラスツズマブ）の V_H 及び V_L アミノ酸配列は、以下である：

40

【化 1】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG^{FN}IKDTYIH^{WVR}QAPGKGLEWVARIYPTNGYT
RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR^{WGGDGFY}AMDYWGQGT
LVTVSS (配列番号 6 4)及び

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP
SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ^{QH}YTTPTFGQGTKVEIKR (配列番号 6 5)。

抗HER2 V_H及びV_L CDR 配列には下線が引かれている。

【図 3 B】 同上。

【図 3 C】 同上。

【図 3 D】 同上。

【図 3 E】 同上。

【図 4 A】 ヒトCD3+T細胞を有するHer2-高及びHer2-低の標的細胞株における、本技術の抗CD3二重特異性抗体のT細胞依存性細胞傷害性(TDCC)の結果を示す。本技術の抗CD3配列を含む二重特異性抗体を、CD3+T細胞及び標的細胞(エフェクター：標的比5：1)と37℃で40時間インキュベートした。高感度ATP定量法(Cell Titer Glo 2.0)を使用して、Her2-高の標的細胞(図4A：SKBR-3、図4B：HCC1954)及びHer2-低の細胞株(図4C：MCF-7、図4D HT55)についての「エフェクター+標的」のみのウェルと比較して、細胞傷害性%を定量化した。

【図 4 B】 同上。

【図 4 C】 同上。

【図 4 D】 同上。

【図 5 A】 ヒトPBMCを有するHer2-高及びHer2-低の標的細胞株における、本技術の抗CD3二重特異性抗体のインビトロマルチプレックスサイトカイン検出アッセイの結果を示す。二重特異性抗体(範囲：30、0.3、0.003、0.00003 nM)を、ヒトPBMC及び標的細胞(エフェクター(100,000細胞)：標的(10,000個の細胞)、E：T比10：1)と37℃で24時間インキュベートした。SKBR-3(Her2-高)標的細胞(図5A～5D)及びMCF-7(Her2-低)標的細胞(図5E～5H)におけるサイトカイン放出を、TNF-α(図5A、図5E)、IL-6(図5B、図5F)、IL-2(図5C、図5G)、IFN-γ(図5D、図5H)のマルチプレックスビーズベースアッセイで使用するために上清を1：4希釈することによって定量化し、ここではLuminex xMAPソフトウェアによって定量化されたピコグラム/mLで提示する。

【図 5 B】 同上。

【図 5 C】 同上。

【図 5 D】 同上。

【図 5 E】 同上。

【図 5 F】 同上。

【図 5 G】 同上。

【図 5 H】 同上。

【図 6 A】 活性化T細胞及びHer-2発現標的細胞に結合する二重特異性抗体のフローサイトメトリ分析の結果を示す。二重特異性抗体を、Her2-高(図6A：SKBR-3、図6B SKOV-3)又はHer2-低(図6C：MCF-7、図6D：HT55)標的細胞又は活性化T細胞(図6E)とインキュベートした。100,000個の細胞/ウェルを、一次二重特異性抗体とインキュベートし、続いて抗ヒトIgG PE二次抗体とインキュベートした。結果を、FlowJoソフトウェアにおいて単一生細胞の中央蛍光強度(MFI)として定量化した。

【図 6 B】 同上。

【図 6 C】 同上。

【図 6 D】 同上。

【図 6 E】 同上。

【発明を実施するための形態】

【0028】

本技術の実質的な理解を提供するために、本方法の特定の態様、モード、実施形態、変形、及び特徴が、様々なレベルの詳細で以下に記載されることを理解されたい。

【0029】

本開示は、一般に、CD3ポリペプチドに特異的に結合することができる、免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗体又はその抗原結合断片）を提供する。本技術の免疫グロブリン関連組成物は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療するための方法に有用である。したがって、本方法の様々な態様は、抗CD3抗体の調製、特性評価、及び操作に関する。本技術の免疫グロブリン関連組成物は、がんを治療するために単独又は追加の治療剤と組み合わせて有用である。いくつかの実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、又は多重特異性抗体である。

【0030】

本方法を実施する際に、分子生物学、タンパク質生化学、細胞生物学、免疫学、微生物学、及び組換えDNAにおける多くの従来の技術が使用される。例えば、Sambrook and Russell eds. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition、シリーズ Ausubel et al. eds. (2007) *Current Protocols in Molecular Biology*、シリーズ *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc., N. Y.)、MacPherson et al. (1991) *PCR 1: A Practical Approach* (IRL Press at Oxford University Press)、MacPherson et al. (1995) *PCR 2: A Practical Approach*、Harlow and Lane eds. (1999) *Antibodies, A Laboratory Manual*；Freshney (2005) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 5th edition、Gait ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*、米国特許第4,683,195号、Hames and Higgins eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*、Anderson (1999) *Nucleic Acid Hybridization*、Hames and Higgins eds. (1984) *Transcription and Translation, Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press (1986))、Perbal (1984) *A Practical Guide to Molecular Cloning*、Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (Cold Spring Harbor Laboratory)、Makrides ed. (2003) *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*、Mayer and Walker eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology* (Academic Press, London)、及び Herzenberg et al. eds (1996) *Weir's Handbook of Experimental Immunology*を参照されたい。ポリペプチド遺伝子発現産物のレベル（すなわち、遺伝子翻訳レベル）を検出及び測定する方法は、当該技術分野で周知であり、抗体検出及び定量技術などのポリペプチド検出方法の

10

20

30

40

50

使用を含む。(Strachan & Read, Human Molecular Genetics, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999) も参照されたい)。

【0031】

本開示は、親和性 (a v i d i t y) 相互作用を利用して、高密度の腫瘍抗原 (例えば、HER2のがん組織の細胞など) の細胞に選択的に結合し、それを殺傷し、低密度の腫瘍抗原を有する細胞には結合せず、それを温存する、低減された親和性 (a f f i n i t y) を有する抗CD3二重特異性抗体を提供する。理論に拘束されることを望まないが、抗CD3二重特異性抗体におけるCD3親和性を低下させることは、T細胞活性化及びサイトカイン産生を低減し、臨床におけるサイトカイン放出症候群などの有害事象を低下させると考えられる。

10

【0032】

定義

別途定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術用語及び科学用語は、一般に、本技術が属する技術分野の当業者によって通例理解される意味と同じ意味を有する。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容が明示的に別様に示さない限り、複数の指示物を含む。例えば、「細胞 (a c e l l)」に対する言及は、2つ以上の細胞の組み合わせなどを含む。一般に、本明細書に使用される命名法、並びに細胞培養、分子遺伝学、有機化学、分析化学、及び核酸化学における実験手順、並びに以下に記載されるハイブリダイゼーションは、当該技術分野で周知のものであり、通例用いられる。

20

【0033】

本明細書に使用される場合、数に関して「約」という用語は、別段の言明がない限り、又は文脈から明らかでない限り、数のいずれかの方向 (より大きいか、又はより小さい) で1%、5%、又は10%の範囲内に入る数を含むと一般に解釈される (かかる数が考えられる値の0%未満であるか、又は100%を超える場合を除く)。

【0034】

本明細書に使用される場合、対象への薬剤又は薬物の「投与」は、その意図された機能を行うために、対象に化合物を導入又は送達する任意の経路を含む。投与は、経口、鼻腔内、非経口 (静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下)、直腸、髄腔内、腫瘍内、又は局所を含むが、これらに限定されない任意の好適な経路によって実行することができる。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。

30

【0035】

本明細書に使用される場合、「抗体」という用語は、例として、限定されずに、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、それらの組み合わせ、並びに任意の脊椎動物、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ、及びマウスなどの哺乳動物、並びにサメ免疫グロブリンなどの非哺乳類種における免疫応答中に産生される同様の分子を含む、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様分子を総称して指す。本明細書に使用される場合、「抗体」 (インタクト免疫グロブリンを含む) 及び「抗原結合断片」は、目的の分子 (又は非常に類似性の高い目的の分子の群) に、他の分子との結合を実質的に除外して特異的に結合する (例えば、生体試料中の他の分子に対する結合定数よりも、少なくとも 10^3 M^{-1} 大きい、少なくとも 10^4 M^{-1} 大きい、又は少なくとも 10^5 M^{-1} 大きい、目的の分子に対する結合定数を有する抗体及び抗体断片)。「抗体」という用語はまた、キメラ抗体 (例えば、ヒト化ネズミ抗体)、ヘテロコンジュゲート抗体 (二重特異性抗体など) などの遺伝子操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.)、Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

40

【0036】

より特定のには、抗体は、抗原のエピトープを特異的に認識して結合する、少なくとも

50

軽鎖免疫グロブリン可変領域又は重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンドを指す。抗体は、重鎖及び軽鎖からなり、それらの各々は、可変重 (V_H) 領域及び可変軽 (V_L) 領域と称される可変領域を有する。一緒に、 V_H 領域及び V_L 領域が、抗体によって認識される抗原に対する結合に関与する。典型的には、免疫グロブリンは、ジスルフィド結合により相互接続された重 (H) 鎖及び軽 (L) 鎖を有する。軽鎖には、ラムダ (λ) 及びカッパ (κ) の2つのタイプがある。抗体分子の機能的活性を決定する5つの主要な重鎖クラス (又はアイソタイプ) : IgM 、 IgD 、 IgG 、 IgA 、及び IgE が存在する。各重鎖及び軽鎖は、定常領域及び可変領域 (領域は、「ドメイン」としても知られている) を含む。組み合わせで、重鎖及び軽鎖可変領域は、抗原に特異的に結合する。軽鎖及び重鎖可変領域は、「相補性決定領域」又は「 CDR 」とも呼ばれる3つの超可変領域によって中断される「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域及び CDR の範囲が定義されている (参照により本明細書に組み込まれる、*Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, 1991* を参照されたい)。Kabat データベースは、現在、オンラインで維持されている。異なる軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域は、構成する軽鎖及び重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域であり、主に β シート立体構造をとり、 CDR が、 β シート構造に接続し、場合によってその一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合相互作用によって、 CDR を正しい方向で配置することを提供する足場を形成するよう機能する。

10

20

【0037】

CDR は主に、抗原のエピトープとの結合に関与する。各鎖の CDR は通常、 N 末端から開始して順次付番されて $CDR1$ 、 $CDR2$ 、及び $CDR3$ と称され、また通常は、特定の CDR が位置する鎖によって特定される。したがって、 V_H $CDR3$ は、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、一方で、 V_L $CDR1$ は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインからの $CDR1$ である。 $CD3$ タンパク質に結合する抗体は、特異的な V_H 領域及び V_L 領域配列、したがって、特異的な CDR 配列を有する。異なる特異性 (すなわち、異なる抗原に対する異なる組み合わせ部位) を有する抗体は、異なる CDR を有する。抗体間で異なるのは CDR であるが、 CDR 内の限定された数のアミノ酸位置のみが、抗原結合に直接関与する。 CDR 内のこれらの位置は、特異性決定残基 (SDR) と呼ばれる。「免疫グロブリン関連組成物」は、本明細書に使用される場合、抗体 (モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、組換え抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体などを含む) 並びに抗体断片を指す。抗体又はその抗原結合断片は、抗原に特異的に結合する。

30

【0038】

本明細書に使用される場合、「抗体関連ポリペプチド」という用語は、単鎖抗体を含む抗原結合抗体断片を意味し、可変領域を単独で、又は抗体分子のポリペプチド要素: ヒンジ領域、 CH_1 、 CH_2 、及び CH_3 ドメインの全て又は一部と組み合わせ、含むことができる。本技術にはまた、可変領域と、ヒンジ領域、 CH_1 、 CH_2 、及び CH_3 ドメインとの任意の組み合わせが含まれる。本方法において有用な抗体関連分子、例えば、 Fab 、 Fab' 及び $F(ab')_2$ 、 Fd 、単鎖 Fv ($scFv$)、単鎖抗体、ジスルフィド結合 Fv ($sdFv$)、並びに V_L 又は V_H ドメインのいずれかを含む断片に限定されない。例には、(i) V_L 、 V_H 、 CL 、及び CH_1 ドメインからなる一価断片である、 Fab 断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つの Fab 断片を含む二価断片である、 $F(ab')_2$ 断片、(iii) V_H 及び CH_1 ドメインからなる Fd 断片、(iv) 抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインからなる Fv 断片、(v) V_H ドメインからなる、 dAb 断片 (*Ward et al., Nature 341: 544-546, 1989*)、並びに (vi) 単離された相補性決定領域 (CDR)、が含まれる。かかる「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、全長抗体の一部、一般に、

40

50

その抗原結合領域又は可変領域を含むことができる。抗体断片又は抗原結合断片の例には、F a b、F a b'、F (a b')₂、及びF v断片、ダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子、並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。

【0039】

「二重特異性抗体」又は「B s A b」は、本明細書に使用される場合、異なる構造を有する2つの標的、例えば、2つの異なる標的抗原、同じ標的抗原上の2つの異なるエピトープ、又は標的抗原上のハプテン及び標的抗原若しくはエピトープに同時に結合することができる抗体を指す。様々な異なる二重特異性抗体構造が、当該技術分野で知られている。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体における各抗原結合部分は、V_H及び／又はV_L領域を含み、いくつかのかかる実施形態において、V_H及び／又はV_L領域は、特定のモノクローナル抗体に見出されるものである。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2つの抗原結合部分を含み、各々が、異なるモノクローナル抗体からのV_H及び／又はV_L領域を含む。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2つの抗原結合部分を含み、2つの抗原結合部分のうちの一方は、第1のモノクローナル抗体からのCDRを含有するV_H及び／又はV_L領域を有する免疫グロブリン分子を含み、他方の抗原結合部分は、第2のモノクローナル抗体からのCDRを含有するV_H及び／又はV_L領域を有する抗体断片（例えば、F a b、F (a b')、F (a b')₂、F d、F v、d A B、s c F vなど）を含む。

10

【0040】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲートされた」という用語は、当業者に既知の任意の方法による2つの分子の会合を指す。好適なタイプの会合としては、化学結合及び物理結合が挙げられる。化学結合としては、例えば、共有結合及び配位結合が挙げられる。物理結合としては、例えば、水素結合、双極子相互作用、ファンデルワールス力、静電相互作用、疎水性相互作用、及び芳香族スタッキングが挙げられる。

20

【0041】

本明細書に使用される場合、「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体断片を指し、この断片は、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む（V_HV_L）。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインを別の鎖の相補的ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作製させる。ダイアボディは、例えば、E P 4 0 4 , 0 9 7、W O 9 3 / 1 1 1 6 1、及びH o l l i n g e r e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 (1 9 9 3) に、より完全に記載されている。

30

【0042】

本明細書に使用される場合、「単鎖抗体」又は「単鎖F v (s c F v)」という用語は、F v断片の2つのドメインであるV_L及びV_Hの抗体融合分子を指す。単鎖抗体分子は、いくつかの個々の分子、例えば、二量体、三量体、又は他のポリマーを有するポリマーを含み得る。更に、F v断片の2つのドメインであるV_L及びV_Hは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、V_L及びV_H領域が対合して一価分子を形成する単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって結合することができる（単鎖F v (s c F v)として知られる）。B i r d e t a l . (1 9 8 8) S c i e n c e 2 4 2 : 4 2 3 - 4 2 6及びH u s t o n e t a l . (1 9 8 8) P r o c . N a t l . A c a d S c i . U S A 8 5 : 5 8 7 9 - 5 8 8 3。かかる単鎖抗体は、組換え技法又はインタクト抗体の酵素若しくは化学的切断によって調製することができる。

40

【0043】

上記の抗体断片のうちのいずれかが、当業者に既知の従来の技術を使用して得られ、断片が、インタクト抗体と同様な手段で、結合特異性及び中和活性についてスクリーニングされる。

【0044】

50

本明細書に使用される場合、「抗原」は、抗体（又はその抗原結合断片）が選択的に結合することができる分子を指す。標的抗原は、タンパク質、炭水化物、核酸、脂質、ハプテン、又は他の天然に存在するか若しくは合成による化合物であり得る。いくつかの実施形態において、標的抗原は、ポリペプチド（例えば、CD3ポリペプチド）であり得る。また抗原を動物に投与して、動物における免疫応答を生じ得る。

【0045】

「抗原結合断片」という用語は、抗原との結合に関与するポリペプチドの一部を有する免疫グロブリン構造全体の断片を指す。本技術に有用な抗原結合断片の例には、scFv、(scFv)₂、scFvFc、Fab、Fab'、及びF(ab')₂が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0046】

「結合親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原又は抗原性ペプチド）との間の全非共有結合相互作用の強度を意味する。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般に、解離定数(K_D)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載されるものを含む、当該技術分野で既知の標準的な方法によって測定することができる。低親和性複合体は、一般に、抗原から容易に解離する傾向がある抗体を含むが、高親和性複合体は、一般に、より長期間、抗原に結合し続ける傾向がある抗体を含む。

【0047】

本明細書に使用される場合、「生体試料」という用語は、生細胞に由来する試料材料を意味する。生体試料は、対象から単離された組織、細胞、細胞のタンパク質又は膜抽出物、及び生物学的液体（例えば、腹水又は脳脊髄液(CSF)）、並びに対象内に存在する組織、細胞、及び液体を含み得る。本技術の生体試料には、乳房組織、腎臓組織、子宮頸部、子宮内膜、頭部又は頸部、胆嚢、耳下腺組織、前立腺、脳、下垂体、腎臓組織、筋肉、食道、胃、小腸、結腸、肝臓、脾臓、膵臓、甲状腺組織、心臓組織、肺組織、膀胱、脂肪組織、リンパ節組織、子宮、卵巢組織、副腎組織、精巣組織、扁桃腺、胸腺、血液、毛髪、頬、皮膚、血清、血漿、CSF、精液、前立腺液、精漿、尿、糞便、汗、唾液、痰、粘膜、骨髄、リンパ、及び涙から採取される試料が含まれるが、これらに限定されない。生体試料はまた、内臓の生検又はがんから得ることができる。生体試料は、診断又は研究のために対象から得ることができるか、又は対照として若しくは基礎研究のために、非疾患個体から得ることができる。試料は、例えば、静脈穿刺及び外科的生検を含む標準的な方法によって得ることができる。特定の実施形態において、生体試料は、針生検によって得られる組織試料である。

20

30

【0048】

本明細書に使用される場合、「CDR移植抗体」という用語は、「アクセプター」抗体の少なくとも1つのCDRが、所望の抗原特異性を有する「ドナー」抗体からのCDR「移植片」によって置き換えられている抗体を意味する。

【0049】

本明細書に使用される場合、「キメラ抗体」という用語は、1つの種からのモノクローナル抗体のFc定常領域（例えば、マウスFc定常領域）が、組換えDNA技術を使用して、別の種の抗体からのFc定常領域（例えば、ヒトFc定常領域）で置き換えられている抗体を意味する。一般に、Robinson et al., PCT/US86/02269、Akira et al., 欧州特許出願第184,187号、Taniguchi, 欧州特許出願第171,496号、Morrison et al., 欧州特許出願第173,494号、Neuberger et al., WO86/01533、Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号、Cabilly et al., 欧州特許出願第0125,023号、Better et al., Science 240:1041-1043, 1988、Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443, 1987、Liu et al., J. Immunol 139:3521-3526, 1987、Sun et

40

50

al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218, 1987、Nishimura et al. Cancer Res 47:999-1005, 1987、Wood et al., Nature 314:446-449, 1985、及び Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559, 1988を参照されたい。

【0050】

本明細書に使用される場合、「コンセンサスFR」という用語は、コンセンサス免疫グロブリン配列におけるフレームワーク（FR）抗体領域を意味する。抗体のFR領域は、抗原に接触しない。

【0051】

本明細書に使用される場合、「対照」は、比較目的のために実験で使用する代替試料である。対照は、「陽性」又は「陰性」であることができる。例えば、実験の目的が特定のタイプの疾患に対する治療における治療剤の有効性の相関を決定することである場合、陽性対照（所望の治療効果を示すことが知られている化合物又は組成物）及び陰性対照（治療を受けないか、又はプラセボを受ける対象若しくは試料）が典型的に用いられる。

【0052】

本明細書に使用される場合、「有効量」という用語は、所望の治療的及び／又は予防的効果を達成するのに十分な量、例えば、本明細書に記載される疾患若しくは状態、又は本明細書に記載される疾患若しくは状態に関連する1つ以上の徴候若しくは症状の予防又は減少をもたらす量を指す。治療的又は予防的適用の文脈において、対象に投与される組成物の量は、組成物、疾患の程度、タイプ、及び重症度、並びに全般的な健康、年齢、性別、体重、及び薬物に対する耐性などの個体の特性に応じて異なる。当業者は、これら及び他の要因に応じて適切な投与量を決定することができるであろう。組成物はまた、1つ以上の追加の治療用化合物と組み合わせて投与することができる。本明細書に記載の方法において、治療用組成物は、本明細書に記載される疾患又は状態の1つ以上の徴候又は症状を有する対象に投与され得る。本明細書に使用される場合、「治療有効量」の組成物は、疾患又は状態の生理学的影響が改善又は排除される組成物レベルを指す。治療有効量は、1回以上の投与で与えることができる。

【0053】

本明細書に使用される場合、「エフェクター細胞」という用語は、免疫応答の認識及び活性化段階とは対照的に、免疫応答のエフェクター段階に含まれる免疫細胞を意味する。例示的な免疫細胞には、骨髄又はリンパ起源の細胞、例えば、リンパ球（例えば、B細胞及び細胞溶解性T細胞（CTL）を含むT細胞）、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多形核細胞、顆粒球、肥満細胞、及び好塩基球が含まれる。エフェクター細胞は、特異的なFc受容体を発現し、特異的免疫機能を実行する。エフェクター細胞は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、例えば、ADCCを誘導することができる好中球を誘導することができる。例えば、FcαRを発現する単球、マクロファージ、好中球、好酸球、及びリンパ球は、標的細胞の特異的殺傷に関与し、免疫系の他の構成成分に抗原を提示するか、又は抗原を提示する細胞に結合する。

【0054】

本明細書に使用される場合、「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定因子を意味する。エピトープは通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面群からなり、通常、特異的な三次元構造特徴、並びに特異的な電荷特徴を有する。立体構造エピトープ及び非立体構造エピトープは、変性化溶媒の存在下で前者との結合は失われるが、後者とは失われないことで、区別される。いくつかの実施形態において、CD3タンパク質の「エピトープ」は、本技術の抗CD3抗体が特異的に結合するタンパク質の領域である。いくつかの実施形態において、エピトープは、立体構造エピトープ又は非立体構造エピトープである。エピトープに結合する抗CD3抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Ha

10

20

30

40

50

r l o w a n d D a v i d L a n e (1 9 8 8) に記載されるものなど定型的な交差遮断アッセイを行うことができる。このアッセイは、抗CD3抗体が、本技術の抗CD3抗体と同じ部位又はエピトープに結合するかを決定するために使用することができる。代替的に、又は追加的に、エピトープマッピングは、当技術分野で既知の方法によって行うことができる。例えば、抗体配列は、アラニンスキャニングなどによって変異誘発して、接触残基を特定することができる。異なる方法において、CD3タンパク質の異なる領域に対応するペプチドは、試験抗体との競合アッセイ、又は試験抗体と、特徴付けられたか若しくは既知のエピトープを有する抗体との競合アッセイに使用することができる。

【0055】

本明細書に使用される場合、「発現」は、遺伝子の前駆体mRNAへの転写と、成熟mRNAを産生する前駆体mRNAのスプライシング及び他のプロセッシングと、mRNA安定性と、成熟mRNAのタンパク質への翻訳（コドンの使用及びtRNAの利用能を含む）と、適切な発現及び機能が必要とされる場合、翻訳産物のグリコシル化及び／又は他の修飾と、のうちの1つ以上を含む。

【0056】

本明細書に使用される場合、「遺伝子」という用語は、プロモーター、エクソン、イントロン、及び発現を制御する他の非翻訳領域を含む、RNA産物の調節された生合成のための全ての情報を含む、DNAのセグメントを意味する。

【0057】

「相同性」又は「同一性」又は「類似性」は、2つのペプチド間又は2つの核酸分子間の配列類似性を指す。相同性は、比較の目的のためにアラインメントさせ得る、各配列の位置を比較することによって決定することができる。比較される配列における位置が同じ塩基又はアミノ酸で占められている場合、その分子はその位置において相同的である。配列間の相同性の程度は、配列によって共有される、一致するか又は相同な位置の数の関数である。ポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド領域（又はポリペプチド又はポリペプチド領域）が、別の配列に対する特定のパーセンテージ（例えば、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%）の「配列同一性」を有することは、アラインメントしたときに、塩基（又はアミノ酸）のそのパーセンテージが、2つの配列を比較する際に同じであることを意味する。このアラインメント及び相同性又は配列同一性パーセントは、当該技術分野で既知のソフトウェアプログラムを使用して決定することができる。いくつかの実施形態において、デフォルトパラメータが、アラインメントのために使用される。1つのアラインメントプログラムはBLASTであり、デフォルトパラメータを使用する。特に、プログラムはBLASTN及びBLASTPであり、以下のデフォルトパラメータ：Genetic code=standard、filter=none、strand=both、cutoff=60、expect=10、Matrix=BLOSUM62、Descriptions=50 sequences、sort by=HIGH SCORE、Databases=non-redundant、GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS translations+SwissProtein+SPupdate+PIRを使用する。これらのプログラムの詳細は、National Center for Biotechnology Informationで見出すことができる。生物学的に等価なポリヌクレオチドは、指定された相同性パーセントを有し、同じか又は類似の生物学的活性を有するポリペプチドをコードするものである。2つの配列は、それらが互いに40%未満の同一性、又は25%未満の同一性を共有する場合、「無関連」又は「非相同的」とみなされる。

【0058】

本明細書に使用される場合、非ヒト（例えば、ネズミ）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、又は非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）からの超可変領

10

20

30

40

50

域残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリンである。いくつかの実施形態において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体に認められない残基を含み得る。これらの修飾は、結合親和性などの抗体性能を更に洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメイン（例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、又はFv）の実質的に全てを含み、そこにおける超可変ループの全て又は実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサスFR配列のものであるが、FR領域は、結合親和性を改善する1つ以上のアミノ酸置換を含み得る。FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は、典型的には、H鎖では6個以下、L鎖では3個以下である。ヒト化抗体はまた、任意選択的に、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものの少なくとも一部を含み得る。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986)、Reichmann et al., Nature 332: 323-329 (1988)、及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照されたい。例えば、Ahmed & Cheung, FEBS Letters 588 (2): 288-297 (2014)を参照されたい。

10

【0059】

本明細書に使用される場合、「超可変領域」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」又は「CDR」からのアミノ酸残基（例えば、V_Lにおける残基約24～34（L1）、50～56（L2）、及び89～97（L3）の周囲、並びにV_Hにおける約31～35B（H1）、50～65（H2）、及び95～102（H3）の周囲（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）、及び／又は「超可変ループ」からのこれらの残基（例えば、V_Lにおける残基26～32（L1）、50～52（L2）、及び91～96（L3）、並びにV_Hにおける26～32（H1）、52A～55（H2）、及び96～101（H3）（Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)）を含む。

20

30

【0060】

本明細書に使用される場合、「同一の」又は「同一性」パーセントという用語は、2つ以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈で使用される場合、以下に記載のデフォルトパラメータを用いたBLAST若しくはBLAST2.0配列比較アルゴリズム、又はマニュアルアラインメント及び目視検査（例えば、NCBIウェブサイト）を使用して測定された、比較幅又は指定された領域にわたる最大の対応について比較及びアラインメントされる場合、同じであるか、又は同じであるアミノ酸残基若しくはヌクレオチドの指定されたパーセント（すなわち、指定された領域（例えば、本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列又は本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列）にわたる約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれより高い同一性）を有する2つ以上の配列又はサブ配列を指す。次いで、かかる配列は、「実質的に同一」とであると言われる。この用語はまた、試験配列の相補体を指すか、又はそれに適用することができる。この用語はまた、欠失及び／又は付加を有する配列、並びに置換を有する配列も含む。いくつかの実施形態において、同一性は、長さが少なくとも約25個のアミノ酸若しくはヌクレオチド、又は長さが50～100個のアミノ酸若しくはヌクレオチドである領域にわたって存在する。

40

【0061】

本明細書に使用される場合、「インタクト抗体」又は「インタクト免疫グロブリン」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重（H）鎖ポリ

50

ペプチド及び2つの軽(L)鎖ポリペプチドを有する抗体を意味する。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではH C V R又はV_Hと略される)及び重鎖定常領域からなる。重鎖定常領域は、3つのドメインであるC H₁、C H₂、及びC H₃からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではL C V R又はV_Lと略される)及び軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lからなる。V_H領域及びV_L領域は、フレームワーク領域(F R)と呼ばれる、より保存された領域が散在する、相補性決定領域(C D R)と呼ばれる超可変性の領域に更に細分化することができる。各V_H及びV_Lは、3つのC D R及び4つのF Rからなり、アミノ末端からカルボキシル末端に、以下の順序:F R₁、C D R₁、F R₂、C D R₂、F R₃、C D R₃、F R₄で配置される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的な補体系の第1の構成成分(C₁q)を含む、宿主組織又は因子との免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

10

【0062】

本明細書に使用される場合、「個体」、「患者」、又は「対象」という用語は、個々の生物、脊椎動物、哺乳動物、又はヒトであることができる。いくつかの実施形態において、個体、患者、又は対象は、ヒトである。

【0063】

本明細書に使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る自然に発生する可能性がある変異以外は同一である。例えば、モノクローナル抗体は、任意の真核生物、原核生物、又はファージクローンを含む、それが産生される方法ではない、単一クローンに由来する抗体であることができる。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対して指向される。更に、異なる決定基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を典型的に含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。「モノクローナル」という修飾語句は、抗体の実質的に均一な集団から得られるときの抗体の特徴を示すが、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするとは解釈されない。モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ、組換え、及びファージディスプレイ技術を含むがこれらに限定されない、当技術分野で既知の多種多様な技術を使用して調製することができる。例えば、本方法に従って使用されるモノクローナル抗体は、K o h l e r e t a l. , N a t u r e 256:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製され得るか、又は組換えDNA法によって作製され得る(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」はまた、例えば、C l a c k s o n e t a l. , N a t u r e 352:624-628(1991)及びM a r k s e t a l. , J. M o l. B i o l. 222:581-597(1991)で記載されている技術を使用して、ファージ抗体ライブラリから単離され得る。

20

30

【0064】

本明細書に使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、薬学的投与と適合性のある、任意及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌及び抗真菌化合物、等張性及び吸収遅延化化合物などを含むことが意図される。薬学的に許容される担体及びその製剤は、当業者に既知であり、例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s (20th edition, ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.)に記載されている。

40

【0065】

本明細書に使用される場合、「ポリクローナル抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる抗体産生細胞株に由来する抗体の調製を意味する。本用語の使用は、抗原の異なるエピトープ又は領域に特異的に結合する抗体を含有する、少なくとも2つの抗体の調製物

50

を含む。

【0066】

本明細書に使用される場合、「ポリヌクレオチド」又は「核酸」という用語は、任意のRNA又はDNAを意味し、非修飾又は修飾されたRNA又はDNAであり得る。ポリヌクレオチドには、限定されないが、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、一本鎖及び二本鎖領域の混合物であるRNA、並びに一本鎖若しくはより典型的には二本鎖、又は一本鎖及び二本鎖領域の混合物であり得るDNA及びRNAを含むハイブリッド分子が含まれる。加えて、ポリヌクレオチドは、RNA若しくはDNA、又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。「ポリヌクレオチド」という用語はまた、1つ以上の修飾塩基を含むDNA又はRNA、及び安定性又は他の理由のために修飾された骨格を有するDNA又はRNAを含む。

10

【0067】

本明細書に使用される場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書において互換的に使用され、ペプチド結合又は修飾ペプチド結合によって互いに結合された2つ以上のアミノ酸、すなわち、ペプチドアイソスター、を含むポリマーを意味する。ポリペプチドは、一般にペプチド、グリコペプチド、又はオリゴマーと称される短鎖、及び一般にタンパク質と称される長鎖の両方を指す。ポリペプチドは、20個の遺伝子コードされたアミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。ポリペプチドには、翻訳後プロセッシングなどの天然プロセス、又は当該技術分野において周知である化学修飾技術のいずれかによって修飾されたアミノ酸配列が含まれる。かかる修飾は、基本的なテ

20

【0068】

本明細書に使用される場合、「組換え」という用語は、例えば、細胞、又は核酸、タンパク質、若しくはベクターに関連して使用される場合、細胞、核酸、タンパク質、又はベクターが、異種核酸若しくはタンパク質の導入、又は天然核酸若しくはタンパク質の変更によって修飾されているか、あるいは材料がそのように修飾された細胞に由来することを示す。よって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態内には見られない遺伝子を発現するか、又はそうでなければ異常に発現されるか、過小発現されるか、若しくは全く発現されない天然遺伝子を発現する。

【0069】

本明細書に使用される場合、「別個の」治療的使用という用語は、異なる経路による、同時又は実質的に同時の、少なくとも2つの活性成分の投与を指す。

30

【0070】

本明細書に使用される場合、「連続的な」治療的使用という用語は、異なる時点での少なくとも2つの活性成分の投与を指し、投与経路は同一であるか、又は異なる。より特定的には、連続的使用は、一方の活性成分の後に他方（複数可）の投与を開始する投与全体を指す。したがって、一方の活性成分を数分、数時間、又は数日にわたって投与して、その後他の活性成分（複数可）を投与することが可能である。この例では同時治療はない。

【0071】

本明細書に使用される場合、「特異的に結合する」とは、別の分子（例えば、抗原）を認識して結合するが、他の分子を実質的に認識及び結合しない分子（例えば、抗体又はその抗原結合断片）を指す。「特異的結合」、「に特異的に結合する」、又は特定の分子（例えば、ポリペプチド、又はポリペプチド上のエピトープ）に「対して特異的である」という用語は、本明細書に使用される場合、例えば、それが結合する分子に対して、約 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、又は 10^{-12} Mの K_D を有する分子によって示すことができる。「特異的に結合する」という用語は、分子（例えば、抗体又はその抗原結合断片）が特定のポリペプチド（例えば、CD3ポリペプチド）、又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合し、いずれの他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープにも実質的に結合すること

40

50

がない結合を指し得る。

【0072】

本明細書に使用される場合、「同時の」治療的使用という用語は、同じ経路による、同時、又は実質的に同時の少なくとも2つの活性成分の投与を指す。

【0073】

本明細書に使用される場合、「治療剤」という用語は、有効量で存在する場合、それを必要とする対象に対して所望の治療効果を生じる化合物を意味することが意図される。

【0074】

本明細書で使用される「治療すること」又は「治療」は、ヒトなどの対象における、本明細書に記載される疾患又は障害の治療を包含し、(i) 疾患若しくは障害を阻害すること、すなわち、その発症を阻害すること、(ii) 疾患若しくは障害を緩和すること、すなわち、障害の退行を引き起こすこと、(iii) 障害の進行を遅らせること、及び／又は(iv) 疾患若しくは障害の1つ以上の症状の進行を阻害、緩和、若しくは遅延することを含む。いくつかの実施形態において、治療は、疾患に関連する症状が、例えば、緩和されるか、低減されるか、治癒されるか、又は寛解状態になることを意味する。

【0075】

本明細書に記載される障害の様々な治療モードは、全治療を含むが、全治療よりも少ない「実質的な」ことを意味することが意図され、いくつかの生物学的又は医学的に関連する結果が達成されることも理解されたい。治療は、慢性疾患のための継続的な長期治療、又は急性状態の治療のための単回、若しくは数回の投与であり得る。

【0076】

本明細書に記載される抗CD3抗体のアミノ酸配列修飾が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗CD3抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体核酸に適切なヌクレオチド変更を導入することによって、又はペプチド合成によって調製される。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失及び／又はそれへの挿入及び／又はその置換が含まれる。得られた抗体が所望の特性を有する限り、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせが目的の抗体を得るためになされる。修飾はまた、タンパク質のグリコシル化のパターンの変化を含む。置換変異誘発について最も関心が高い部位には、超可変領域が含まれるが、FR変更もまた企図される。「保存的置換」を以下の表に示す。

【表1-1】

表 1.アミノ酸置換		
元の残基	例示的な置換	保存的置換
Ala(A)	val、leu、ile	val
Arg(R)	lys、gln、asn	lys
Asn(N)	gln、his、asp、lys、arg	gln
Asp(D)	glu、asn	glu
Cys(C)	ser、ala	ser

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

表 1. アミノ酸置換		
元の残基	例示的な置換	保存的置換
Gln(Q)	asn、glu	asn
Glu(E)	asp、gln	asp
Gly(G)	ala	ala
His(H)	asn、gln、lys、arg	arg
Ile(I)	leu、val、met、ala、phe、ノルロイシン	leu
Leu(L)	ノルロイシン、ile、val、met、ala、phe	ile
Lys(K)	arg、gln、asn	arg
Met(M)	leu、phe、ile	leu
Phe(F)	leu、val、ile、ala、tyr	tyr
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr、phe	tyr
Tyr(Y)	trp、phe、thr、ser	phe
Val(V)	ile、leu、met、phe、ala、ノルロイシン	leu

10

20

30

40

50

【0077】

置換バリエーションのタイプは、親抗体の1つ以上の超可変領域残基を置換することを伴う。かかる置換バリエーションを生成するために好都合な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性成熟を含む。具体的には、いくつかの超可変領域部位（例えば、6～7部位）を変異させて、全ての可能なアミノ酸置換を各部位で生じさせる。このように生成された抗体バリエーションは、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III生成物との融合として、繊維状ファージ粒子からの一価形式でディスプレイされる。次いで、ファージディスプレイされたバリエーションを、本明細書に開示されるように、それらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾について超可変領域部位候補を特定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行い、抗原結合に著しく寄与する超可変領域残基を特定することができる。代替的に、又は追加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と抗原との間の接触点を特定することが有益であり得る。かかる接触残基及び隣接する残基は、本明細書に詳述される技術による置換のための候補である。かかるバリエーションが生成されると、バリエーションのパネルは、本明細書に記載されるようにスクリーニングに供され、1つ以上の関連アッセイにおいて類似するか又は優れた特性を有する抗体が、更なる開発のために選択され得る。

【0078】

本技術の免疫グロブリン関連組成物

本技術は、抗CD3免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗CD3抗体又はその抗原結合断片）の生成及び使用のための方法及び組成物を記載する。本開示の抗CD3免疫グロブリン関連組成物は、がんの治療に有用であり得る。本技術の範囲内の抗CD3免疫グロブリン関連組成物には、例えば、標的ポリペプチド、ホモログ、誘導体、又はその断片に

特異的に結合するモノクローナル、キメラ、ヒト化、二重特異性抗体、及びダイアボディが挙げられるが、これらに限定されない。本開示はまた、本明細書に開示される抗CD3抗体のうちのいずれかの抗原結合断片を提供し、抗原結合断片は、Fab、F(ab)'₂、Fab'、scFv、及びFvからなる群から選択される。一態様において、本技術は、多重特異性免疫グロブリン関連組成物（例えば、二重特異性抗体剤）を含む、SP34のキメラ及びヒト化バリエーションを提供する。Kabataアノテーションシステムに基づく本技術のヒト化CD3抗体のV_H及びV_LのCDRを以下に要約する。

【表A】

領域	配列断片
CDR-H1	GFTFNTYAMN(配列番号 1)
CDR-H2	RIRSKYNNYATYYADSVKG (配列番号 2) RIRSKYNNYATYKADSVKD (配列番号 7) RIRSKYNNYATYYADKVKD (配列番号 8) RIRSKYNNYATYYWDSVKD (配列番号 9) RIRSKYNNYATYYADSVKD (配列番号 49)
CDR-H3	HGNFGNSYVSWFAY (配列番号 3) HGNFGNSYVSWFGY (配列番号 10) HGNFGNSYVSWFMY (配列番号 11)
CDR-L1	GSSTGAVTTSNYAN (配列番号 4) RSSTGAVTTSNYAN (配列番号 50)
CDR-L2	GTNKRAP (配列番号 5) GTNKKAS (配列番号 51) GTNKRAS (配列番号 52)
CDR-L3	ALWYSNLWV (配列番号 6) MLWYSNLWV (配列番号 12) ALYYSNLWV (配列番号 48)

10

20

30

40

50

【0079】

本技術のヒト化SP34バリエーションの例示的な重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）アミノ酸配列が、図1に記載される。

【0080】

一態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_H）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（V_L）を含む抗体又はその抗原結合断片を提供し、(a) (i) V_Hは、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKG（配列番号2）、RIRSKYNNYATYKADSVKD（配列番号7）、RIRSKYNNYATYYADKVKD（配列番号8）、若しくはRIRSKYNNYATYYWDSVKD（配列番号9）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFAY（配列番号3）、HGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）、若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含むか、又は(ii) V_Hは、GFTFNTYAMN（配列番号1）のV_H-CDR1配列、RIRSKYNNYATYYADSVKD（配列番号49）のV_H-CDR2配列、及びHGNFGNSYVSWFGY（配列番号10）若しくはHGNFGNSYVSWFMY（配列番号11）のV_H-CDR3配列を含み、かつ／あるいは(b) (i) V_Lは、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）のV_L-CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のV_L-CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のV_L-CDR3配列を含むか、又は(ii) V_Lは、RSSTGAVTTSNYAN（配列番号50）のV_L

－CDR1配列、GTNKKAS（配列番号51）若しくはGTNKRAS（配列番号52）のVL－CDR2配列、及びALWYSNLWV（配列番号6）、MLWYSNLWV（配列番号12）、若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のVL－CDR3配列を含むか、又は（iii）VLは、GSSTGAVTTSNYAN（配列番号4）若しくはRSSTGAVTTSNYAN（配列番号50）のVL－CDR1配列、GTNKRAP（配列番号5）、GTNKKAS（配列番号51）、若しくはGTNKRAS（配列番号52）のVL－CDR2配列、及びMLWYSNLWV（配列番号12）若しくはALYYSNLWV（配列番号48）のVL－CDR3配列を含む。

【0081】

一態様において、本開示は、重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（VH）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（VL）を含む、抗体又はその抗原結合断片を提供し、（a）VHは、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43のアミノ酸配列を含み、かつ／又はVLは、配列番号14、配列番号19、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47のアミノ酸配列を含む。

【0082】

いくつかの実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、それぞれ、配列番号18及び配列番号20、配列番号21及び配列番号19、配列番号22及び配列番号23、配列番号24及び配列番号25、配列番号18及び配列番号26、配列番号18及び配列番号27、配列番号22及び配列番号28、配列番号29及び配列番号28、配列番号30及び配列番号28、配列番号31及び配列番号28、配列番号32及び配列番号28、配列番号33及び配列番号28、配列番号22及び配列番号34、配列番号35及び配列番号36、配列番号37及び配列番号38、配列番号39及び配列番号27、配列番号40及び配列番号27、配列番号41及び配列番号27、配列番号42及び配列番号27、配列番号43及び配列番号27、配列番号18及び配列番号44、配列番号13及び配列番号45、配列番号15及び配列番号45、配列番号16及び配列番号45、配列番号17及び配列番号45、配列番号13及び配列番号46、配列番号15及び配列番号46、配列番号16及び配列番号46、配列番号17及び配列番号46、配列番号13及び配列番号47、配列番号15及び配列番号47、配列番号16及び配列番号47、並びに配列番号17及び配列番号47からなる群から選択される重鎖免疫グロブリン可変ドメイン（VH）及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン（VL）アミノ酸配列を含む。

【0083】

上記の実施形態のうちのいずれかにおいて、抗体は、任意のアイソタイプ、例えば、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む）、IgA（IgA1及びIgA2を含む）、IgD、IgE、又はIgM、及びIgYに限定されない、Fcドメインを更に含む。定常領域配列の非限定的な例には、以下が含まれる。

【0084】

ヒトIgD定常領域、Uniprot：P01880（配列番号53）
A P T K A P D V F P I I S G C R H P K D N S P V V L A C L I T G Y H P T S V T V
T W Y M G T Q S Q P Q R T F P E I Q R R D S Y Y M T S S Q L S T P L Q Q W R Q G
E Y K C V V Q H T A S K S K K E I F R W P E S P K A Q A S S V P T A Q P Q A E G
S L A K A T T A P A T T R N T G R G G E E K K K E K E K E E Q E E R E T K T P E
C P S H T Q P L G V Y L L T P A V Q D L W L R D K A T F T C F V V G S D L K D A
H L T W E V A G K V P T G G V E E G L L E R H S N G S Q S Q H S R L T L P R S L
W N A G T S V T C T L N H P S L P P Q R L M A L R E P A A Q A P V K L S L N L L
A S S D P P E A A S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q R E V N T S G F

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

【0085】

ヒトIgG1定常領域、Uniprot:P01857 (配列番号54)

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

【0086】

ヒトIgG2定常領域、Uniprot:P01859 (配列番号55)

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

20

【0087】

ヒトIgG3定常領域、Uniprot:P01860 (配列番号56)

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

30

【0088】

ヒトIgM定常領域、Uniprot:P01871 (配列番号57)

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

40

50

【0089】

ヒトIgG4定常領域、Uniprot:P01861 (配列番号58)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTKT
YTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYGPSPCPAPEFLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
DGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGK

10

【0090】

ヒトIgA1定常領域、Uniprot:P01876 (配列番号59)

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFFPQEPLSVT
WSESGQGVTARNFPSPSQDASGDLTYTTS SQLTLPATQCLAG
KSVTCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPSTPTPSPSTPTPSP
SCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTF
TWTPSSSGKSAVQGP PERDLCGCYSVSSVLP GCAEPWNHGK
TFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL
ALNELVTLTCLARGFSPKDV LVRWLQGSQELPREKYLTWA
SRQEPSQGT TTF AVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEAL
PLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

20

【0091】

ヒトIgA2定常領域、Uniprot:P01877 (配列番号60)

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFFPQEPLSVT
WSESGQNV TARNFPSPSQDASGDLTYTTS SQLTLPATQCPDG
KSVTCHVKHYTNPSQDVTVP CPVPPPPPCCHPRLSLHRPA
LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSSGKSAVQG
PPERDLCGCYSVSSVLP GCAQPWNHGETFTCTAAHPELKT
PLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLAR
GFSPKDV LVRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGT TTF A
VTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEAL PLAFTQKTIDRMA
GKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

30

【0092】

ヒトIg kappa定常領域、Uniprot:P01834 (配列番号61)

TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0093】

いくつかの実施形態において、本技術の免疫グロブリン関連組成物は、配列番号53～60と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%同一であるか、又は100%同一である重鎖定常領域を含む。追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、本技術の免疫グロブリン関連組成物は、配列番号61と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%同一であるか、又は100%同一である軽鎖定常領域を含む。

40

【0094】

いくつかの実施形態において、本技術の免疫グロブリン関連組成物は、CD3ポリペプチドの細胞外ドメインに結合する。特定の実施形態において、エピトープは、立体構造エピトープ又は非立体構造エピトープである。いくつかの実施形態において、CD3ポリペプチドは、配列番号62のアミノ酸配列を有する。

50

【0095】

NCBI Ref: NP_000724.1 Homo sapiens T細胞表面糖タンパク質CD3イプシロン鎖前駆体（配列番号62）

【0096】

MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEMGGITQTPTYKVS
ISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDE
DHLSSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVC
ENCMEMDVM SVATIVIVDICTGGLLLLVYYWSKNRKAKA
KPVTRGAGAGGRQGRGQNKERP PVPNP DYEP IRKGQRDL
Y SGLNQRR I

10

【0097】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、抗体又は抗原結合断片は、CD3ポリペプチドの細胞外ドメインに結合する。特定の実施形態において、細胞外ドメインは、アミノ酸配列QDGN E（配列番号63）を含む。

【0098】

いくつかの実施形態において、重鎖（HC）及び軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成成分である。他の実施形態において、HC及びLC免疫グロブリン可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成成分である。特定の実施形態において、抗体は、全長抗体である。

【0099】

いくつかの実施形態において、本技術の免疫グロブリン関連組成物は、少なくとも1つのCD3ポリペプチドに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、本技術の免疫グロブリン関連組成物は、少なくとも1つのCD3ポリペプチドに、約 10^{-3} M、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、又は 10^{-12} Mの解離定数（ K_D ）で結合する。特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、又は多重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト抗体フレームワーク領域を含む。

20

【0100】

特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、以下の特徴：（a）配列番号14、配列番号19、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47の軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも99%同一である軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列、及び／又は（b）配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43のうちのいずれか1つの重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも99%同一である重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列のうちの1つ以上を含む。別の態様において、本明細書に提供される免疫グロブリン関連組成物中の1つ以上のアミノ酸残基は、別のアミノ酸で置換される。置換は、本明細書で定義される「保存的置換」であり得る。

30

40

【0101】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、本開示の多重特異性抗体は、CD3、GPA33、HER2/neu、GD2、MAGE-1、MAGE-3、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、MUM-1、CDK4、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ、p15、gp75、ベターカテニン、Erbb2、がん抗原125（CA-125）、がん胎児性抗原（CEA）、RAGE、MART（メラノーマ抗原）、

50

MUC-1、MUC-2、MUC-3、MUC-4、MUC-5ac、MUC-16、MUC-17、チロシナーゼ、Pmel 17 (gp100)、GnT-VイントロンV配列 (N-アセチルグルコアミニルトランスフェラーゼVイントロンV配列)、前立腺がん psm、PRAME (メラノーマ抗原)、 β -カテニン、EBNA (エプスタイン・バーウイルス核抗原) 1~6、LMP2、p53、肺抵抗性タンパク質 (LRP)、Bcl-2、前立腺特異性抗原 (PSA)、Ki-67、CEACAM6、結腸特異的抗原-p (CSAp)、HLA-DR、CD40、CD74、CD138、EGFR、EGP-1、EGP-2、VEGF、PLGF、インスリン様成長因子 (ILGF)、テネイシン、血小板由来成長因子、IL-6、CD20、CD19、PSMA、CD33、CD123、MET、DLL4、Ang-2、HER3、IGF-1R、CD30、TAG-72、SPEAP、CD45、L1-CAM、ルイスY (LeY) 抗原、E-カドヘリン、V-カドヘリン、GPC3、EpCAM、CD4、CD8、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74、CD22、CD14、CD15、CD16、CD123、TCRガンマ/デルタ、NKp46、KIR、CD56、DLL3、PD-1、PD-L1、CD28、CD137、CD99、GloboH、CD24、STEAP1、B7H3、ポリシアル酸、OX40、OX40-リガンド、ペプチドMHC複合体 (TP53、KRAS、MYC、EBNA1~6、PRAME、MART、チロシナーゼ、MAGEA1~A6、pmel17、LMP2、又はWT1に由来するペプチドを有する)、又は小分子DOTAハブテンに結合する。

10

20

【0102】

一態様において、本開示は、第1のポリペプチド鎖、第2のポリペプチド鎖、第3のポリペプチド鎖、及び第4のポリペプチド鎖を含む多重特異性抗体を提供し、第1及び第2のポリペプチド鎖は、互いに共有結合しており、第2及び第3のポリペプチド鎖は、互いに共有結合しており、第3及び第4のポリペプチド鎖は、互いに共有結合しており、(a) 第1のポリペプチド鎖及び第4のポリペプチド鎖の各々は、N末端からC末端方向に、(i) 第1のエピトープに特異的に結合することができる第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインと、(ii) 第1の免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインと、(iii) アミノ酸配列 (GGGS)₃を含むフレキシブルペプチドリンカーと、(iv) 第2の免疫グロブリンの相補的重鎖可変ドメインに連結されている第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン、又は第2の免疫グロブリンの相補的軽鎖可変ドメインに連結されている第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインであって、第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインが、第2のエピトープに特異的に結合することができ、アミノ酸配列 (GGGS)₆を含むフレキシブルペプチドリンカーを介して一緒に連結して、単鎖可変断片を形成する、軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインと、を含み、(b) 第2のポリペプチド鎖及び第3のポリペプチド鎖の各々が、N末端からC末端方向に、(i) 第1のエピトープに特異的に結合することができる第1の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインと、(ii) 第1の免疫グロブリンの重鎖定常ドメインと、を含み、第1の免疫グロブリンの重鎖可変ドメイン若しくは第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメインが、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号21、配列番号22、配列番号24、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、若しくは配列番号43を含み、かつ/又は第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン若しくは第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメインが、配列番号14、配列番号19、配列番号20、配列番号23、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号34、配列番号36、配列番号38、配列番号44、配列番号45、配列番号46、若しくは配列番号47を含む。

30

40

【0103】

特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、N297A、L234A、L235A、及びK322Aからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸置換を含むIgG1定常領域を含有する。追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、免疫グロ

50

ブリン関連組成物は、S 2 2 8 P 変異を含む I g G 4 定常領域を含有する。

【0104】

いくつかの態様において、本明細書に記載の抗 C D 3 免疫グロブリン関連組成物は、迅速な結合並びに細胞取り込み及び／又は緩慢な放出を促進するための構造的修飾を含有する。いくつかの態様において、本技術の抗 C D 3 免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗体）は、C H 2 定常重鎖領域に欠失を含んで、迅速な結合並びに細胞取り込み及び／又は緩慢な放出を促進し得る。いくつかの態様において、F a b 断片を使用して、迅速な結合並びに細胞取り込み及び／又は緩慢な放出を促進する。いくつかの態様において、F (a b) ' 2 断片を使用して、迅速な結合並びに細胞取り込み及び／又は緩慢な放出を促進する。

10

【0105】

一態様において、本技術は、本明細書に記載の免疫グロブリン関連組成物のうちのいずれかをコードする核酸配列を提供する。

【0106】

別の態様において、本技術は、本明細書に記載の免疫グロブリン関連組成物のうちのいずれかをコードする任意の核酸配列を発現する宿主細胞を提供する。

【0107】

本技術の免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗 C D 3 抗体）は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、又はより多い多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、1つ以上の C D 3 ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であることができるか、又は C D 3 ポリペプチド並びに異種ポリペプチド又は固体支持材などの異種組成物の両方に特異的であることができる。例えば、W O 9 3 / 1 7 7 1 5、W O 9 2 / 0 8 8 0 2、W O 9 1 / 0 0 3 6 0、W O 9 2 / 0 5 7 9 3、T u t t e t a l., J. I m m u n o l. 1 4 7 : 6 0 - 6 9 (1 9 9 1)、米国特許第 5, 5 7 3, 9 2 0 号、同第 4, 4 7 4, 8 9 3 号、同第 5, 6 0 1, 8 1 9 号、同第 4, 7 1 4, 6 8 1 号、同第 4, 9 2 5, 6 4 8 号、同第 6, 1 0 6, 8 3 5 号、K o s t e l n y e t a l., J. I m m u n o l. 1 4 8 : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 (1 9 9 2) を参照されたい。いくつかの実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、キメラである。特定の実施形態において、免疫グロブリン関連組成物は、ヒト化されている。

20

【0108】

本技術の免疫グロブリン関連組成物は更に、異種ポリペプチドに N 末端若しくは C 末端で組換え的に融合することができるか、又はポリペプチド若しくは他の組成物に化学的にコンジュゲートすることができる（共有結合的及び非共有結合的コンジュゲーションを含む）。例えば、本技術の免疫グロブリン関連組成物は、検出アッセイの標識として有用な分子、及び異種ポリペプチド、薬物、又は毒素などのエフェクター分子に組換え的に融合又はコンジュゲートすることができる。例えば、W O 9 2 / 0 8 4 9 5、W O 9 1 / 1 4 4 3 8、W O 8 9 / 1 2 6 2 4、米国特許第 5, 3 1 4, 9 9 5 号、及び E P 0 3 9 6 3 8 7 を参照されたい。

30

【0109】

本技術の免疫グロブリン関連組成物の上記実施形態のいずれかにおいて、抗体又は抗原結合断片は、任意選択的に、同位体、色素、クロマゲン、造影剤、薬物、毒素、サイトカイン、酵素、酵素阻害剤、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、成長因子、放射性核種、金属、リポソーム、ナノ粒子、RNA、DNA、又はそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される薬剤にコンジュゲートされ得る。化学結合又は物理結合について、免疫グロブリン関連組成物上の官能基は、典型的には、薬剤上の官能基と会合する。あるいは、薬剤上の官能基は、免疫グロブリン関連組成物上の官能基と会合する。

40

【0110】

薬剤及び免疫グロブリン関連組成物上の官能基は、直接会合することができる。例えば、薬剤上の官能基（例えば、スルフヒドリル基）は、免疫グロブリン関連組成物上の官能基（例えば、スルフヒドリル基）と会合して、ジスルフィドを形成することができる。あ

50

るいは、官能基は、架橋剤（すなわち、リンカー）を通して会合することができる。架橋剤のいくつかの例を以下に記載する。架橋剤は、薬剤又は免疫グロブリン関連組成物のいずれかに結合することができる。コンジュゲート中の薬剤又は免疫グロブリン関連組成物の数は、他方に存在する官能基の数によっても限定される。例えば、コンジュゲートに会合した薬剤の最大数は、免疫グロブリン関連組成物に存在する官能基の数に依存する。あるいは、薬剤と会合した免疫グロブリン関連組成物の最大数は、薬剤に存在する官能基の数に依存する。

【0111】

更に別の実施形態において、コンジュゲートは、1つの薬剤に会合した1つの免疫グロブリン関連組成物を含む。一実施形態において、コンジュゲートは、少なくとも1つの免疫グロブリン関連組成物に化学的に結合した（例えば、コンジュゲートした）少なくとも1つの薬剤を含む。薬剤は、当業者に既知の任意の方法によって免疫グロブリン関連組成物に化学的に結合することができる。例えば、薬剤上の官能基は、免疫グロブリン関連組成物上の官能基に直接結合し得る。好適な官能基のいくつかの例としては、例えば、アミノ、カルボキシル、スルフヒドリル、マレイミド、イソシアネート、イソチオシアネート、及びヒドロキシルが挙げられる。

10

【0112】

薬剤はまた、ジアルデヒド、カルボジイミド、ジマレイミドなどのような、架橋剤によって免疫グロブリン関連組成物に化学的に結合し得る。架橋剤は、例えば、Pierce Biotechnology, Inc.、Rockford, Illから得ることができる。Pierce Biotechnology, Inc. のウェブサイトは援助を提供することができる。追加の架橋剤としては、Kreatech Biotechnology, B. V.、Amsterdam, The Netherlandsの米国特許第5,580,990号、同第5,985,566号、及び同第6,133,038号に記載される白金架橋剤が挙げられる。

20

【0113】

あるいは、薬剤上の官能基及び免疫グロブリン関連組成物は、同じであり得る。ホモ二官能性架橋剤は、典型的には、同一の官能基を架橋するために使用される。ホモ二官能性架橋剤の例としては、EGS（すなわち、ビス[スクシンイミジルコハク酸]エチレングリコール）、DSS（すなわち、スベリン酸ジスクシンイミジル）、DMA（すなわち、アジブイミド酸ジメチル・2HCl）、DTSSP（すなわち、3,3'-ジチオビス[スルホスクシンイミジルプロピオンナート]）、DPDPB（すなわち、1,4-ジ[3'-(2'-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ブタン）、及びBMH（すなわち、ビス-マレイミドヘキサン）が挙げられる。かかるホモ二官能性架橋剤はまた、Pierce Biotechnology, Inc. から入手可能である。

30

【0114】

他の場合において、薬剤を免疫グロブリン関連組成物から切断することが有益であり得る。上記のPierce Biotechnology, Inc. のウェブサイトはまた、例えば、細胞における酵素によって切断することができる好適な架橋剤を選択することにおいて、当業者に援助を提供することができる。よって、薬剤は、免疫グロブリン関連組成物から分離することができる。切断可能なリンカーの例としては、SMP T（すなわち、4-スクシンイミジルオキシカルボニル-メチル-a-[2-ピリジルジチオ]トルエン）、スルホ-LC-SPDP（すなわち、スルホスクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート）、LC-SPDP（すなわち、スクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート）、スルホ-LC-SPDP（すなわち、スルホスクシンイミジル6-(3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミド)ヘキサノエート）、SPDP（すなわち、N-スクシンイミジル3-[2-ピリジルジチオ]-プロピオンアミドヘキサノエート）、及びAEDP（すなわち、3-[(2-アミノエチル)ジチオ]プロピオン酸HCl）が挙げられる。

40

50

【0115】

別の実施形態において、コンジュゲートは、少なくとも1つの免疫グロブリン関連組成物と物理的に結合した少なくとも1つの薬剤を含む。当業者に既知の任意の方法は、薬剤を免疫グロブリン関連組成物と物理的に結合させるために用いることができる。例えば、免疫グロブリン関連組成物及び薬剤は、当業者に既知の任意の方法によって一緒に混合することができる。混合の順序は、重要ではない。例えば、薬剤は、当業者に既知の任意の方法によって免疫グロブリン関連組成物と物理的に混合することができる。例えば、免疫グロブリン関連組成物及び薬剤は、容器に入れ、例えば、容器を振盪することによって攪拌して、免疫グロブリン関連組成物及び薬剤を混合することができる。

【0116】

免疫グロブリン関連組成物は、当業者に既知の任意の方法によって修飾することができる。例えば、免疫グロブリン関連組成物は、上記のように、架橋剤又は官能基によって修飾され得る。

【0117】

本技術は、一般に、CD3タンパク質に特異的に結合する免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗体又はその抗原結合断片）の調製及びその使用に関する。特に、本技術は、CD3結合抗体の調製及びCD3の検出及びがんの治療におけるそれらの使用に関する。

【0118】

A. 本技術の抗CD3抗体を調製する方法

一般的な概要。最初に、標的ポリペプチドが選択され、それに対して本技術の抗体を上昇させる（raise）ことができる。例えば、抗体は、全長CD3タンパク質、又はCD3タンパク質の細胞外ドメインの一部に対して上昇され得る。かかる標的ポリペプチドに向けられる抗体を生成するための技術は、当業者に周知である。かかる技術の例には、例えば、ディスプレイライブラリ、xeno又はヒトマウス、ハイブリドーマなどを伴うものが含まれるが、これらに限定されない。本技術の範囲内の標的ポリペプチドには、免疫応答を誘発することができる細胞外ドメインを含有するCD3タンパク質に由来する任意のポリペプチドが含まれる。特定の実施形態において、細胞外ドメインは、アミノ酸配列Q D G N E（配列番号63）を含む。

【0119】

CD3タンパク質及びその断片に向けられる、組換え操作された抗体及び抗体断片、例えば、抗体関連ポリペプチドは、本開示による使用に好適であることを理解されたい。

【0120】

本明細書に示される技術に供することができる抗CD3抗体には、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体、並びにFab、Fab'、F(ab')₂、Fd、scFv、ダイアボディ、抗体軽鎖、抗体重鎖、及び／又は抗体断片などの抗体断片が含まれる。抗体Fv含有ポリペプチド、例えば、Fab'及びF(ab')₂抗体断片の高収率産生に有用な方法が記載されている。米国特許第5,648,237号を参照されたい。

【0121】

一般に、抗体は、発端となる種から得られる。より具体的には、標的ポリペプチド抗原に対して特異性を有する発端となる種の抗体の軽鎖、重鎖、又はその両方の可変部分の核酸又はアミノ酸配列が得られる。発端となる種は、本技術の抗体又は抗体のライブラリ（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、サル、ヒトなど）を生成するのに有用であった任意の種である。

【0122】

ファージ又はファージミドディスプレイ技術は、本技術の抗体を誘導するのに有用な技術である。モノクローナル抗体を生成及びクローニングするための技術は、当業者に周知である。本技術の抗体をコードする配列の発現は、E. coliで実行することができる。

【0123】

核酸コード配列の縮重性により、天然に存在するタンパク質のものと実質的に同じアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列をコードする他の配列が、本技術の実施において使用され得る。これらには、限定されないが、上記のポリペプチドをコードする核酸配列の全部又は一部を含む核酸配列が含まれ、これらは、配列内の機能的に等価なアミノ酸残基をコードする異なるコドンの置換によって変更され、したがって、サイレント変化を生じる。本技術による免疫グロブリンのヌクレオチド配列は、標準的な方法（“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis,” Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.）によって計算されるときに、かかるバリエーションがCD3タンパク質を認識する操作的な抗体を形成する限り、最大25%の配列相同性変動を許容することが理解されよう。例えば、ポリペプチド配列内の1つ以上のアミノ酸残基は、機能的等価物として機能する類似の極性の別のアミノ酸によって置換され、サイレント変化をもたらすことができる。配列内のアミノ酸における置換は、アミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、及びメチオニンが含まれる。極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンが含まれる。正に荷電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、及びヒスチジンが含まれる。負に荷電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸及びグルタミン酸が含まれる。また、本技術の範囲内には、例えば、グリコシル化、タンパク質分解切断、抗体分子又は他の細胞リガンドとの結合などによって、翻訳中又は翻訳後に差次的に修飾されるタンパク質、又はその断片若しくは誘導体が含まれる。追加的に、免疫グロブリンコード核酸配列を、インビトロ若しくはインビボで変異させて、翻訳、開始、及び／若しくは終結配列を作製及び／若しくは破壊するか、あるいはコード領域に変異を作製し、かつ／若しくは新たな制限エンドヌクレアーゼ部位を形成するか、又は既存のものを破壊して、インビトロ修飾を更に促進することができる。当該技術分野で既知の変異誘発のための任意の技術を使用することができ、インビトロ部位特異的変異誘発、J. Biol. Chem. 253: 6551、Tablinker (Pharmacia)の使用などが含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0124】

ポリクローナル抗血清及び免疫原の調製。本技術の抗体又は抗体断片を生成する方法は、典型的には、対象（一般に、マウス又はウサギなどの非ヒト対象）を、精製されたCD3タンパク質若しくはその断片で、又はCD3タンパク質若しくはその断片を発現する細胞で免疫化することを含む。適切な免疫原性調製物は、例えば、組換え発現されたCD3タンパク質又は化学的合成されたCD3ペプチドを含むことができる。CD3タンパク質の細胞外ドメイン、又はその一部若しくは断片を免疫原として使用して、CD3タンパク質、又はその一部若しくは断片に結合する抗CD3抗体を、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の調製のための標準技術を使用して生成することができる。特定の実施形態において、細胞外ドメインは、アミノ酸配列QDGN E（配列番号63）を含む。

【0125】

全長CD3タンパク質又はその断片は、免疫原として断片として有用である。いくつかの実施形態において、CD3断片は、CD3タンパク質の細胞外ドメイン、又はその一部若しくは断片（例えば、アミノ酸配列QDGN E（配列番号63）を含むCD3ポリペプチド）を含み、その結果、ペプチドに対して上昇された抗体は、CD3タンパク質との特異的免疫複合体を形成する。いくつかの実施形態において、抗原性CD3ペプチドは、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、又は少なくとも100個のアミノ酸残基を含む。より長い抗原性ペプチドが、使用に応じ、当業者に周知の方法に従い、より短い抗原性ペプチドよりも時には望ましい。所与のエピトープの多量体が、時には単量体よりも効果的である。

【0126】

必要に応じて、CD3タンパク質（又はその断片）の免疫原性は、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）又はオバルブミン（OVA）などの担体タンパク質との融合又はコンジュゲーションによって増加させることができる。多くのかかる担体タンパク質が、当技術分野で知られている。また、CD3タンパク質をフロイント完全又は不完全アジュバントなどの従来のアジュバントと組み合わせて、ポリペプチドに対する対象の免疫反応を増加させることができる。免疫学的応答を増加させるために使用される様々なアジュバントには、フロイント（完全及び不完全）、ミネラルゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えば、リゾレシチン、プルロニック（登録商標）ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、オイルエマルジョン、ジニトロフェノールなど）、*Bacille Calmette-Guérin*及び*Corynebacterium parvum*などのヒトアジュバント、又は同様の免疫刺激化合物が含まれるが、これらに限定されない。これらの技法は、当該技術分野において標準的である。

10

【0127】

本技術を記載する際に、免疫応答は、「一次」又は「二次」免疫応答のいずれかとして記載され得る。「保護的」免疫応答としても記載される一次免疫応答は、特定の抗原、例えば、CD3タンパク質へのいくつかの初期曝露（例えば、初期「免疫化」）の結果として、個体で生じる免疫応答を指す。いくつかの実施形態において、免疫は、個体に抗原を含有するワクチンを接種する結果として生じることができる。例えば、ワクチンは、1つ以上のCD3タンパク質由来抗原を含むCD3ワクチンであることができる。一次免疫応答は、時間の経過とともに弱化又は減少し、消失又は少なくともそれが検出できないほど減少さえし得る。したがって、本技術はまた、「二次」免疫応答に関するものであり、「記憶免疫応答」としても本明細書に記載される。二次免疫応答という用語は、一次免疫応答が既に生じている個体に誘発される免疫応答を指す。

20

【0128】

したがって、二次免疫応答を誘発して、例えば、弱化若しくは減少してきている既存の免疫応答を増強するか、又は消失しているか、若しくはもはや検出できないかのいずれかの以前の免疫応答を再構築することができる。二次又は記憶免疫応答は、体液性（抗体）応答又は細胞性応答のいずれかであることができる。二次又は記憶体液性応答は、抗原の最初の提示時に生成された記憶B細胞の刺激で生じる。遅延型過敏症（DTH）反応は、CD4⁺T細胞によって媒介される細胞二次又は記憶免疫応答のタイプである。抗原に対する最初の曝露は、免疫系をプライミングし、追加の曝露が、DTHをもたらす。

30

【0129】

適切な免疫後、抗CD3抗体は、対象の血清から調製することができる。所望の場合、CD3タンパク質に対して向けられた抗体分子は、哺乳動物から（例えば、血液から）単離することができ、ポリペプチドAクロマトグラフィーなどの周知の技法によって更に精製して、IgG画分を得ることができる。

【0130】

モノクローナル抗体。本技術の一実施形態において、抗体は、抗CD3モノクローナル抗体である。例えば、いくつかの実施形態において、抗CD3モノクローナル抗体は、ヒト又はマウス抗CD3モノクローナル抗体であり得る。CD3タンパク質、又はその誘導体、断片、類似体、若しくはホモログに対して向けられるモノクローナル抗体の調製のために、連続細胞株培養によって抗体分子の産生を提供する任意の技法を利用することができる。かかる技法には、ハイブリドーマ技法（例えば、Kohler & Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497を参照されたい）、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（例えば、Kozbor, et al., 1983. *Immunol. Today* 4: 72を参照されたい）、及びヒトモノクローナル抗体を産生するEBVハイブリドーマ技法（例えば、Cole, et al., 1985. *In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照されたい）が含まれるが、これらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体は、本技術の実施において利用

40

50

することができ、ヒトハイブリドーマを使用することによって（例えば、Cote, et al., 1983. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030を参照されたい）、又はインビトロでヒトB細胞をエプスタイン・バーウイルスで形質転換することによって（例えば、Cole, et al., 1985. In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96を参照されたい）産生することができる。例えば、抗体の領域をコードする核酸の集団を単離することができる。抗体の保存された領域をコードする配列に由来するプライマーを利用したPCRを使用して、抗体の部分をコードする配列を集団から増幅させ、次いで、抗体又は可変ドメインなどのその断片をコードするDNAを、増幅させた配列から再構築する。かかる増幅させた配列はまた、ファージ又は細菌での融合ポリペプチドの発現及び提示のために、他のタンパク質—例えば、バクテリオファージコート、又は細菌細胞表面タンパク質—をコードするDNAに融合することができる。増幅させた配列を発現させ、更に、例えば、CD3タンパク質に存在する抗原又はエピトープに対して発現された抗体又はその断片の親和性に基づいて、選択又は単離することができる。代替的に、抗CD3モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、対象を免疫し、次いで、定型的方法を使用して、対象の脾臓からハイブリドーマを単離することによって調製することができる。例えば、Milstein et al., (Galfre and Milstein, Methods Enzymol (1981) 73:3-46)を参照されたい。標準的な方法を使用してハイブリドーマをスクリーニングすると、様々な特異性（すなわち、異なるエピトープに対する）及び親和性のモノクローナル抗体が生成される。所望の特性、例えば、CD3結合を有する選択されたモノクローナル抗体は、ハイブリドーマによって発現されるように使用することができ、それは、ポリエチレングリコール（PEG）などの分子に結合させてその特性を変更することができるか、又はそれをコードするcDNAを、様々な方法で単離、配列決定、及び操作することができる。合成デンドロマーツリーを反応性アミノ酸側鎖、例えばリジンに付加して、CD3タンパク質の免疫原性特性を増強することができる。また、CPG-ジヌクレオチド技法を使用して、CD3タンパク質の免疫原性特性を増強することができる。他の操作には、保存中又は対象への投与後の抗体の不安定性に關与する特定のアミノアシル残基の置換又は欠失、及びCD3タンパク質の抗体の親和性を改善する親和性成熟技法が含まれる。

10

20

30

【0131】

ハイブリドーマ技法。いくつかの実施形態において、本技術の抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られたB細胞を含む、ハイブリドーマによって産生された抗CD3モノクローナル抗体である。ハイブリドーマ技法は、当該技術分野で既知であり、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988)、Hammerling et al., Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas, 563-681 (1981)に教示されている。ハイブリドーマ及びモノクローナル抗体を生成するための他の方法は、当業者に周知である。

40

【0132】

ファージディスプレイ技法。上述したように、本技術の抗体は、組換えDNA及びファージディスプレイ技術の適用によって産生することができる。例えば、抗CD3抗体は、当該技術分野で既知の様々なファージディスプレイ方法を使用して調製することができる。ファージディスプレイ方法では、機能的抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を担持するファージ粒子の表面上に提示される。所望の結合特性を有するファージは、典型的には、固体表面又はビーズに結合又は捕捉された抗原を用いて直接的に選択することによって、レパートリー又は組み合わせ抗体ライブラリ（例えば、ヒト又はネ

50

ズミ)から選択される。これらの方法に使用されるファージは、典型的には、ファージ遺伝子ⅠⅠⅠ又は遺伝子ⅤⅠⅠⅠタンパク質のいずれかに組換えによって融合されたFab、Fv、又はジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するfd及びM13を含む繊維状ファージである。加えて、方法は、Fab発現ライブラリの構築のために適合させて(例えば、Huse, et al., Science 246:1275-1281, 1989を参照されたい)、CD3ポリペプチド、例えば、ポリペプチド、又はその誘導体、断片、類似体、若しくはホモログに対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速で効果的な特定を可能にする。本技術の抗体を作製するために使用することができるファージディスプレイ方法の他の例には、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85:5879-5883, 1988、Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87:1066-1070, 1990、Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50, 1995、Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186, 1995、Kettlborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958, 1994、Persic et al., Gene 187:9-18, 1997、Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280, 1994、PCT/GB91/01134、WO90/02809、WO91/10737、WO92/01047、WO92/18619、WO93/11236、WO95/15982、WO95/20401、WO96/06213、WO92/01047 (Medical Research Council et al.)、WO97/08320 (Morphosys)、WO92/01047 (CAT/MRC)、WO91/17271 (Affymax)、並びに米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,047号、同第5,571,698号、同第5,427,908号、同第5,516,637号、同第5,780,225号、同第5,658,727号、及び同第5,733,743号に開示されるものが含まれる。ジスルフィド結合を介してポリペプチドに結合することによって、バクテリオファージ粒子の表面にポリペプチドを提示するのに有用な方法は、Lohning, 米国特許第6,753,136号によって記載されている。上記の参考文献に記載されるように、ファージ選択後、ファージからの抗体コード領域を単離し、使用してヒト抗体を含む全抗体、又は任意の他の所望の抗原結合断片を生成し、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含む任意の所望の宿主で発現させることができる。例えば、Fab、Fab'、及びF(ab')₂断片を組換えによって産生する技法はまた、WO92/22324、Mullinax et al., BioTechniques 12:864-869, 1992、及びSawai et al., AJRI 34:26-34, 1995、及びBetter et al., Science 240:1041-1043, 1988に開示されるものなどの当技術分野に既知の方法を使用して用いることができる。

【0133】

一般に、抗体又は抗体断片は、ファージ又はファージミド粒子の表面上に存在するため、ディスプレイベクターにクローニングされるハイブリッド抗体又はハイブリッド抗体断片を適切な抗原に対して選択して、優れた結合活性を維持するバリエーションを特定することができる。例えば、Barbas III et al., Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 2001)を参照されたい。しかしながら、選択及び／又はスクリーニングのために、抗体断片ライブラリを溶解性ファージベクター(修飾T7又はラムダZap系)にクローニングするなどの、他のベクター方式をこのプロセスに使用することができる。

【0134】

組換え抗CD3抗体の発現。上述したように、本技術の抗体は、組換えDNA技術の適用によって産生することができる。本技術の抗CD3抗体をコードする組換えポリヌクレオチド構築物は、典型的には、抗CD3抗体鎖のコード配列に操作可能に連結された発現制御配列を含み、天然に関連するか又は異種のプロモーター領域が含まれる。したがって、本技術の別の態様は、本技術の抗CD3抗体をコードする1つ以上の核酸配列を含有するベクターを含む。本技術のポリペプチドのうちの1つ以上の組換え発現のために、抗CD3抗体をコードするヌクレオチド配列の全て又は一部を含む核酸は、適切なクローニングベクター、又は発現ベクター（すなわち、挿入されたポリペプチドコード配列の転写及び翻訳に必要な要素を含有するベクター）に、当技術分野で周知であり、以下に詳細される組換えDNA技法によって挿入される。多様な集団のベクターを生成するための方法は、Lerner et al., 米国特許第6,291,160号及び同第6,680,192号に記載されている。

10

【0135】

一般に、組換えDNA技法で有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態にある。本開示において、「プラスミド」及び「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般に使用されている形態であるため、互換的に使用され得る。しかしながら、本技術は、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス）などの、技術的にプラスミドではない他の形態の発現ベクターを含むことが意図される。かかるウイルスベクターは、対象の感染及びその対象における構築物の発現を可能にする。いくつかの実施形態において、発現制御配列は、真核生物宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトすることができるベクターにおける真核生物プロモーター系である。ベクターが適切な宿主に組み込まれていると、宿主は、抗CD3抗体をコードするヌクレオチド配列の高レベル発現、並びに抗CD3抗体、例えば、交差反応性抗CD3抗体の収集及び精製に好適な条件下で維持される。一般に、U.S. 2002/0199213を参照されたい。これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、又は宿主染色体DNAの組み込み部分としてのいずれかで、宿主生物において複製可能である。一般に、発現ベクターは、選択マーカー、例えば、アンピシリン耐性又はヒグロマイシン耐性を含有し、所望のDNA配列で形質転換されたこれらの細胞の検出を可能にする。ベクターはまた、細胞外抗体断片の分泌を指示するのに有用なシグナルペプチド、例えばペクチン酸リアーゼをコードすることができる。米国特許第5,576,195号を参照されたい。

20

30

【0136】

本技術の組換え発現ベクターは、CD3結合特性を有するタンパク質をコードする核酸を、宿主細胞における核酸の発現に好適な形態で含み、これは、組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に操作可能に連結される、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択される1つ以上の調節配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「操作可能に連結された」とは、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロ転写／翻訳系で、又はベクターが宿主細胞に導入される場合に宿主細胞で）ヌクレオチド配列の発現を可能にする手段で調節配列に連結されることを意味することが意図される。「調節配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御要素（例えば、ポリアダニル化シグナル）を含むことが意図される。かかる調節配列は、例えば、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)に記載されている。調節配列には、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を指示するもの、及び特定の宿主細胞でのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的調節配列）が含まれる。当業者であれば、発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望されるポリペプチドの発現レベルなどの因子に依存し得ることが理解されるであろう。組換えポリペプチド発現（例えば、抗CD3抗体）のプロモーターとして有用な典型的な調節配列には、例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ及び他の糖酵解酵素のプロモーターが含まれるが、こ

40

50

れらに限定されない。誘導性酵母プロモーターには、とりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソシトロムCからのプロモーター、並びにマルトース及びガラクトース利用に関与する酵素が含まれる。一実施形態において、本技術の抗CD3抗体をコードするポリヌクレオチドは、araBプロモーターに操作可能に連結され、宿主細胞において発現可能である。米国特許第5,028,530号を参照されたい。本技術の発現ベクターを宿主細胞に導入し、それによって、本明細書に記載されるような核酸（例えば、抗CD3抗体など）によってコードされる融合ポリペプチドを含む、ポリペプチド又はペプチドを産生することができる。

【0137】

本技術の別の態様は、1つ以上の抗CD3抗体をコードする核酸を含有する、抗CD3抗体発現宿主細胞に関する。本技術の組換え発現ベクターは、原核生物細胞又は真核生物細胞における抗CD3抗体の発現のために設計することができる。例えば、抗CD3抗体は、*Escherichia coli*などの細菌細胞、昆虫細胞（バキュロウイルス発現ベクターを使用）、真菌細胞、例えば、酵母、酵母細胞、又は哺乳類細胞などで発現させることができる。好適な宿主細胞は、Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)で更に考察されている。代替的に、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター調節配列及びT7ポリメラーゼを使用して、インビトロで転写及び翻訳することができる。確率的に生成されたポリヌクレオチド配列の発現を介して、所定の特性を有するポリペプチド、例えば、抗CD3抗体の調製及びスクリーニングに有用な方法が、既に記載されている。米国特許第5,763,192号、同第5,723,323号、同第5,814,476号、同第5,817,483号、同第5,824,514号、同第5,976,862号、同第6,492,107号、同第6,569,641号を参照されたい。

【0138】

原核生物におけるポリペプチドの発現は、多くの場合、融合ポリペプチド又は非融合ポリペプチドのいずれかの発現を指示する構成的又は誘導性プロモーターを含むベクターを用いて*E. coli*で実行される。融合ベクターは、それにコードされるポリペプチドに、通常、組換えポリペプチドのアミノ末端に、いくつかのアミノ酸を付加する。かかる融合ベクターは、典型的には、(i)組換えポリペプチドの発現を増加させ、(ii)組換えポリペプチドの溶解性を増加させ、(iii)アフィニティー精製においてリガンドとして作用することによって組換えポリペプチドの精製を補助するという3つの目的を果たす。多くの場合、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解切断部位が融合部分と組換えポリペプチドとの接合部に導入され、融合ポリペプチドの精製に続いて、融合部分からの組換えポリペプチドの分離を可能にする。かかる酵素、及びそれらの同族認識配列には、第Xa因子、トロンピン、及びエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合ポリペプチド、又はポリペプチドAをそれぞれ標的組換えポリペプチドに融合させる、pGEX (Pharmacia Biotech Inc, Smith and Johnson, 1988. Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.)、及びpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N. J.)が含まれる。

【0139】

好適な誘導性非融合*E. coli*発現ベクターの例には、pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69:301-315)及びpET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89)が含まれる。ポリペプチド融合を介して多官能性ポリペプチドを得る、異なる活性ペプチド又はタンパク質ドメインの標的化組み立てのための方法は、Pack et al., 米国特許第6,294,

353号、同第6, 692, 935号に記載されている。E. coliにおける組換えポリペプチド発現、例えば、抗CD3抗体を最大化する1つの戦略は、組換えポリペプチドをタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌でポリペプチドを発現することである。例えば、Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128を参照されたい。別の戦略は、各アミノ酸における個々のコドンが発現宿主、例えばE. coliで優先的に利用されるものであるように、発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を変更することである（例えば、Wada, et al., 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118を参照されたい）。本技術の核酸配列のかかる変更は、標準的なDNA合成技法によって実行することができる。

10

【0140】

別の実施形態において、抗CD3抗体発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における発現のためのベクターの例には、pYepSec1 (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234)、pMFa (Kurjan and Herskowitz, Cell 30: 933-943, 1982)、pJRY88 (Schultz et al., Gene 54: 113-123, 1987)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.)、及びpicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.) が含まれる。代替的に、抗CD3抗体は、バキュロウイルス発現ベクターを使用して昆虫細胞で発現させることができる。培養した昆虫細胞（例えば、SF9細胞）におけるポリペプチド、例えば、抗CD3抗体の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ (Smith, et al., Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165, 1983) 及びpVLシリーズ (Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39) が含まれる。

20

【0141】

更に別の実施形態において、本技術の抗CD3抗体をコードする核酸は、哺乳類発現ベクターを使用して哺乳類細胞で発現させる。哺乳類発現ベクターの例には、例えば、pCDM8 (Seed, Nature 329: 840, 1987) 及びpMT2PC (Kauffman, et al., EMBO J. 6: 187-195, 1987) が含まれるが、これらに限定されない。哺乳類細胞で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、多くの場合、ウイルス調節要素によって提供される。例えば、一般に使用されているプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、及びシミアンウイルス40に由来する。本技術の抗CD3抗体の発現に有用な原核生物細胞及び真核生物細胞の両方に好適な他の発現系について、例えば、Chapters 16 and 17 of Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989を参照されたい。

30

40

【0142】

別の実施形態において、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞タイプで核酸の発現を指示することができる（例えば、組織特異的調節要素）。組織特異的調節要素は、当該技術分野で既知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的、Pinkert, et al., Genes Dev. 1: 268-277, 1987）、リンパ特異的プロモーター (Calame and Eaton, Adv. Immunol. 43: 235-275, 1988)、T細胞受容体 (Winoto and Baltimore, EMBO J. 8: 729-733, 1989) 及び免疫グロブリンのプロモーター (Banerji, et al., 1983.

50

Cell 33:729-740, Queen and Baltimore, Cell 33:741-748, 1983.)、ニューロン特異的プロモーター (例えば、神経線維プロモーター、Byrne and Ruddie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477, 1989)、膵臓特異的プロモーター (Edlund, et al., 1985. Science 230:912-916)、並びに乳腺特異的プロモーター (例えば、ミルクホエープロモーター、米国特許第4,873,316号及び欧州出願公開第264,166号)が含まれる。発生的に調節されたプロモーター、例えば、ネズミhoxプロモーター (Kessel and Gruss, Science 249:374-379, 1990) 及び α -フェトプロテインプロモーター (Campes and Tilghman, Genes Dev. 3:537-546, 1989) も包含される。

10

【0143】

本方法の別の態様は、本技術の組換え発現ベクターが導入されている宿主細胞に関する。「宿主細胞」及び「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書で互換的に使用される。かかる用語は、特定の対象細胞だけでなく、かかる細胞の子孫又は潜在的子孫も指すことを理解されたい。変異又は環境影響のいずれかにより、特定の修飾が後世代で生じ得るため、かかる子孫は実際には親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で使用される本用語の範囲内に含まれる。

【0144】

宿主細胞は、任意の原核生物細胞又は真核生物細胞であることができる。例えば、抗CD3抗体は、E. coliなどの細菌細胞、昆虫細胞、酵母、又は哺乳類細胞で発現させることができる。哺乳類細胞は、免疫グロブリン又はその断片をコードするヌクレオチドセグメントを発現するのに好適な宿主である。Winnacker, From Genes To Clones, (VCH Publishers, NY, 1987)を参照されたい。インタクト異種タンパク質を分泌することができるいくつかの好適な宿主細胞株が当該技術分野で開発されてきており、チャイニーズハムスター卵巢 (CHO) 細胞株、様々なCOS細胞株、HeLa細胞、L細胞、及び骨髓腫細胞株が含まれる。いくつかの実施形態において、細胞は、非ヒトである。これらの細胞のための発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーなどの発現制御配列、及びリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列などの必要なプロセシング情報部位を含むことができる。Queen et al., Immunol. Rev. 89:49, 1986。例示的な発現制御配列は、内因性遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルスなどに由来するプロモーターである。Co et al., J Immunol. 148:1149, 1992。他の好適な宿主細胞が、当業者に既知である。

20

30

【0145】

ベクターDNAは、従来の形質転換又はトランスフェクション技法によって原核生物細胞又は真核生物細胞に導入することができる。本明細書に使用される場合、「形質転換」及び「トランスフェクション」という用語は、外来核酸 (例えば、DNA) を宿主細胞に導入するための様々な当該技術分野で認識されている技法を指すことが意図され、リン酸カルシウム若しくは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーション、遺伝子銃、又はウイルスベースのトランスフェクションが含まれる。哺乳類細胞を形質転換するために使用される他の方法には、ポリブレン、プロトプラスト融合、リボソーム、エレクトロポレーション、及びマイクロインジェクションの使用が含まれる (一般に、Sambrook et al., Molecular Cloningを参照されたい)。宿主細胞を形質転換又はトランスフェクトするために好適な方法は、Sambrook, et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harb

40

50

or, N. Y., 1989)、及び他の検査室マニュアルに見出すことができる。目的のDNAセグメントを含有するベクターは、細胞宿主のタイプに応じて、周知の方法によって宿主細胞に移入することができる。

【0146】

哺乳類細胞の安定的なトランスフェクションでは、使用される発現ベクター及びトランスフェクション技法に応じて、わずかな割合の細胞のみが、外来DNAをそれらのゲノムに組み込み得ることは既知である。これらの組み込み体を特定及び選択するために、一般に、選択可能なマーカー（例えば、抗生物質に対する抵抗性）をコードする遺伝子が、目的とする遺伝子とともに宿主細胞に導入される。様々な選択可能なマーカーには、G418、ハイグロマイシン、及びメトトレキサートなどの薬物に対する抵抗性を付与するものが含まれる。選択可能なマーカーをコードする核酸は、抗CD3抗体をコードするものと同じベクターで宿主細胞に導入するか、又は別個のベクターで導入することができる。導入された核酸で安定的にトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって特定することができる（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞は生存するが、他の細胞は死滅する）。

10

【0147】

培養における原核生物又は真核生物の宿主細胞などの本技術の抗CD3抗体を含む宿主細胞を使用して、組換え抗CD3抗体を産生（すなわち、発現）することができる。一実施形態において、方法は、宿主細胞（抗CD3抗体をコードする組換え発現ベクターが導入されている）を、抗CD3抗体が産生されるような、好適な培地中で培養することを含む。別の実施形態において、方法は、培地又は宿主細胞から抗CD3抗体を単離するステップを更に含む。発現されると、抗CD3抗体、例えば、抗CD3抗体又は抗CD3抗体関連ポリペプチドの集合体を、培養培地及び宿主細胞から精製する。抗CD3抗体は、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む、当該技術分野の標準的手順に従って精製することができる。一実施形態において、抗CD3抗体は、Boss et al., 米国特許第4,816,397号の方法によって宿主生物で産生される。通常、抗CD3抗体鎖は、シグナル配列で発現され、したがって、培養培地に放出される。しかしながら、抗CD3抗体鎖が宿主細胞によって自然に分泌されない場合、抗CD3抗体鎖は、穏やかな界面活性剤を用いた処理によって放出させることができる。組換えポリペプチドの精製は、当該技術分野で周知であり、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークロマトグラフィー精製技法、カラムクロマトグラフィー、イオン交換精製技法、ゲル電気泳動などが含まれる（一般に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N. Y., 1982を参照されたい)）。

20

30

【0148】

抗CD3抗体をコードするポリヌクレオチド、例えば、抗CD3抗体コード配列は、トランスジェニック動物のゲノムへの導入及びトランスジェニック動物の乳中におけるその後の発現のために導入遺伝子に組み込むことができる。例えば、米国特許第5,741,957号、同第5,304,489号、及び同第5,849,992号を参照されたい。好適な導入遺伝子には、カゼイン又はβ-ラクトグロブリンなどの乳腺特異的遺伝子からのプロモーター及びエンハンサーと操作可能な連結にある軽鎖及び／又は重鎖のコード配列が含まれる。トランスジェニック動物の生成のために、導入遺伝子は、受精した卵母細胞にマイクロインジェクションすることができるか、又は胚性幹細胞のゲノムに組み込み、かかる細胞の核を、除核された卵母細胞に移すことができる。

40

【0149】

単鎖抗体。一実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、単鎖抗CD3抗体である。本技術に従い、技法は、CD3タンパク質に特異的な単鎖抗体の産生に適合させることができる（例えば、米国特許第4,946,778号を参照されたい）。本技術の単鎖Fv及び抗体を産生するために使用することができる技法の例には、米国特許第4,946,778号及び同第5,258,498号、Houston et al., Methods in Enzymology, 203:46-88, 1991、Shu, L. et al

50

., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7995-7999, 1993、並びにSkerra et al., Science 240:1038-1040, 1988に記載されるものが含まれる。

【0150】

キメラ及びヒト化抗体。一実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、キメラ抗CD3抗体である。一実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、ヒト化抗CD3抗体である。本技術の一実施形態において、ドナー抗体及びアクセプター抗体は、異なる種からのモノクローナル抗体である。例えば、アクセプター抗体は、ヒト抗体（ヒトにおいてその抗原性を最小限に抑えるため）であり、その場合、得られるCDR移植抗体は、「ヒト化」抗体と称される。

10

【0151】

ヒト部分及び非ヒト部分の両方を含む、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体などの組換え抗CD3抗体は、標準的な組換えDNA技法を使用して作製することができ、本技術の範囲内である。ヒトにおける本技術の抗CD3抗体のインビボ使用、並びにインビトロ検出アッセイにおけるこれらの薬剤の使用を含むいくつかの使用では、キメラ又はヒト化抗CD3抗体を使用することが可能である。かかるキメラ及びヒト化モノクローナル抗体は、当技術分野で知られている組換えDNA技法によって産生することができる。かかる有用な方法には、例えば、国際出願第PCT/US86/02269号、米国特許第5,225,539号、欧州特許第184187号、欧州特許第171496号、欧州特許第173494号、PCT国際公開第86/01533号、米国特許第4,816,567号、同第5,225,539号、欧州特許第125023号、Better, et al., 1988. Science 240:1041-1043、Liu, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443、Liu, et al., 1987. J. Immunol. 139:3521-3526、Sun, et al., 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218、Nishimura, et al., 1987. Cancer Res. 47:999-1005、Wood, et al., 1985. Nature 314:446-449、Shaw, et al., 1988. J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559、Morrison (1985) Science 229:1202-1207、Oi, et al. (1986) BioTechniques 4:214、Jones, et al., 1986. Nature 321:552-525、Verhoeyan, et al., 1988. Science 239:1534、Morrison, Science 229:1202, 1985、Oi et al., BioTechniques 4:214, 1986、Gillies et al., J. Immunol. Methods, 125:191-202, 1989、米国特許第5,807,715号、及びBeidler, et al., 1988. J. Immunol. 141:4053-4060に記載される方法が含まれるが、これらに限定されない。例えば、抗体は、CDR移植（EP0239400、WO91/09967、米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,859,205号、同第6,248,516号、EP460167号）、ベニヤリング又はリサーフェイシング（EP0592106、EP0519596、Padlan E. A., Molecular Immunology, 28:489-498, 1991、Studnicka et al., Protein Engineering 7:805-814, 1994、Roguska et al., PNAS 91:969-973, 1994）、及びチェーンシャフリング（米国特許第5,565,332号）が含まれる様々な技法を使用してヒト化され得る。一実施形態において、ネズミ抗CD3モノクローナル抗体をコードするcDNAは、特異的に選択された制限酵素で消化して、Fc定常領域をコードする配列を取り除き、ヒトFc定常領域をコードするcDNAの等価部分に置換される（Robinson et al., PCT/US86/02269、Akira et al., 欧州特許出願第184,187号、Taniguchi, 欧州特

20

30

40

50

許出願第171,496号、Morrison et al., 欧州特許出願第173,494号、Neuberger et al., WO86/01533、Cabilly et al. 米国特許第4,816,567号、Cabilly et al., 欧州特許出願第125,023号、Better et al. (1988) Science 240:1041-1043、Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443、Liu et al. (1987) J Immunol 139:3521-3526、Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218、Nishimura et al. (1987) Cancer Res 47:999-1005、Wood et al. (1985) Nature 314:446-449、及びShaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559、米国特許第6,180,370号、米国特許第6,300,064号、同第6,696,248号、同第6,706,484号、同第6,828,422号を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0152】

一実施形態において、本技術は、ヒト抗マウス抗体（以下、「HAMA」と称される）応答を誘導する可能性が低いものの、依然として有効な抗体エフェクター機能を有する、ヒト化抗CD3抗体の構築を提供する。本明細書に使用される場合、抗体に関して、「ヒト」及び「ヒト化」という用語は、ヒト対象において治療的に耐えられる弱い免疫原性応答を誘発することが予想される任意の抗体に関する。一実施形態において、本技術は、ヒト化抗CD3抗体、重鎖及び軽鎖免疫グロブリンを提供する。

【0153】

CDR抗体。いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、抗CD3 CDR抗体である。一般に、抗CD3 CDR抗体を生成するために使用されるドナー抗体及びアクセプター抗体は、異なる種からのモノクローナル抗体であり、典型的には、アクセプター抗体は、ヒト抗体であり（ヒトにおけるその抗原性を最小限に抑えるため）、この場合、得られるCDR移植抗体は、「ヒト化」抗体と称される。移植片は、アクセプター抗体の単一のV_H若しくはV_L内の単一のCDR（又は単一のCDRの一部でさえ）のものであり得るか、又はV_H及びV_Lの一方若しくは両方内の複数のCDR（又はその一部）のものであることができる。多くの場合、アクセプター抗体の全ての可変ドメインにおける3つの全てのCDRが、対応するドナーCDRで置き換えられるが、CD3タンパク質に対する得られるCDR移植抗体の十分な結合を可能にするために必要な数のみ置き換える必要がある。CDR移植及びヒト化抗体を生成するための方法は、Queen et al. 米国特許第5,585,089号、米国特許第5,693,761号、米国特許第5,693,762号、及びWinter U.S. 5,225,539、並びにEP0682040によって教示される。V_H及びV_Lポリペプチドを調製するのに有用な方法は、Winter et al., 米国特許第4,816,397号、同第6,291,158号、同第6,291,159号、同第6,291,161号、同第6,545,142号、EP0368684、EP0451216、及びEP0120694によって教示される。

【0154】

同じファミリー及び／又は同じファミリーメンバーから好適なフレームワーク領域候補を選択した後、発端となる種からのCDRをハイブリッドフレームワーク領域に移植することによって、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のいずれか又は両方が生成される。上記の態様のいずれかに関して、ハイブリッド可変鎖領域を有するハイブリッド抗体又はハイブリッド抗体断片の組み立ては、当業者に既知の従来の方法を使用して達成することができる。例えば、本明細書に記載のハイブリッド可変ドメインをコードするDNA配列（すなわち、標的種に基づくフレームワーク及び発端となる種からのCDR）は、オリゴヌクレオチド合成及び／又はPCRによって生成することができる。CDR領域をコードする核酸は、好適な制限酵素を使用して発端となる種の抗体から単離し、好適なライゲーション

酵素で連結することによって標的種フレームワークに連結することもできる。代替的に、発端となる種の抗体の可変鎖のフレームワーク領域は、部位特異的変異誘発によって変更することができる。

【0155】

ハイブリッドは、各フレームワーク領域に対応する複数の候補の中の選択から構築されるため、本明細書に記載される原理に従う構築に適した、配列の多くの組み合わせが存在する。したがって、個々のフレームワーク領域の異なる組み合わせによるメンバーを有して、ハイブリッドのライブラリを組み立てることができる。かかるライブラリは、配列の電子データベースコレクション又はハイブリッドの物理的コレクションであることができる。

10

【0156】

このプロセスは、典型的には、移植されたCDRに隣接するアクセプター抗体のFRを変更しない。しかしながら、当業者であれば、所与のFRの特定の残基を置き換えて、FRをドナー抗体の対応するFRに、より類似させることによって、時には、得られる抗CD3 CDR移植抗体の抗原結合親和性を改善することができる。置換の好適な位置には、CDRに隣接するか、又はCDRと相互作用することができるアミノ酸残基が含まれる（例えば、US5,585,089、特にカラム12～16を参照されたい）。又は、当業者であれば、ドナーFRから始めて、それを修飾して、アクセプターFR又はヒトコンセンサスFRにより類似させることができる。これらの修飾を行うための技法は、当該技術分野で既知である。特に、得られるFRがその位置でヒトコンセンサスFRに適合する場合、又はかかるコンセンサスFRに少なくとも90%以上同一である場合、それを行うことは、完全なヒトFRを有する同じ抗体と比較して、得られる修飾抗CD3 CDR移植抗体の抗原性を有意に増加させ得ない。

20

【0157】

二重特異性抗体(BsAb)。二重特異性抗体は、異なる構造を有する2つの標的、例えば、2つの異なる標的抗原、同じ標的抗原上の2つの異なるエピトープ、又は標的抗原上のハプテン及び標的抗原若しくはエピトープに同時に結合することができる抗体である。BsAbは、例えば、同じか又は異なる抗原の異なるエピトープを認識する重鎖及び／又は軽鎖を組み合わせることによって作製することができる。いくつかの実施形態において、分子機能によって、二重特異性結合剤は、その2つの結合アームのうちの1つ(1つのVH/VL対)で1つの抗原(又はエピトープ)に結合し、その第2のアーム(異なるVH/VL対)で異なる抗原(又はエピトープ)に結合する。この定義によれば、二重特異性結合剤は、2つの異なる抗原結合アーム(特異性及びCDR配列の両方において)を有し、それが結合する各抗原に対して一価である。

30

【0158】

二重特異性抗体(BsAb)及び二重特異性抗体断片(BsFab)などの多重特異性抗体は、例えば、腫瘍抗原に特異的に結合する少なくとも1つのアームと、第2の標的抗原に特異的に結合する少なくとも1つの他のアームと、を有する。いくつかの実施形態において、第2の標的抗原は、B細胞、T細胞、骨髄細胞、形質細胞、又は肥満細胞の抗原若しくはエピトープである。追加的又は代替的に、特定の実施形態において、第2の標的抗原は、CD4、CD8、CD20、CD19、CD21、CD23、CD46、CD80、HLA-DR、CD74、CD22、CD14、CD15、CD16、CD123、TCRガンマ/デルタ、NKp46、及びKIRからなる群から選択される。特定の実施形態において、BsAbは、細胞表面に標的抗原を発現する腫瘍細胞に結合することができる。いくつかの実施形態において、BsAbは、細胞傷害性T細胞を腫瘍部位に向ける(又は動員する)ことによって腫瘍細胞の殺傷を促進するように操作されている。他の例示的なBsAbには、CD3に対して特異的な第1の抗原結合部位と、小分子ハプテン(例えば、DTPA、IMP288、DOTA、DOTA-Bn、DOTA-デスフェリオキサミン、本明細書に記載される他のDOTA-キレート、ビオチン、フルオレセイン、又はGoodwin, D. A. et al., 1994, Cancer Res. 54 (

40

50

22) : 5937-5946に開示されるもの) に対して特異的な第2の抗原結合部位と、を有するものが含まれる。

【0159】

様々な二重特異性融合タンパク質は、分子工学を使用して産生することができる。例えば、BsAbは、全免疫グロブリンフレームワーク（例えば、IgG）、単鎖可変断片（scFv）、又はそれらの組み合わせのいずれかを利用するように構築されている。いくつかの実施形態において、二重特異性融合タンパク質は二価であり、例えば、1つの抗原に対する単一結合部位を有するscFvと、第2の抗原に対する単一結合部位を有するFab断片と、を含む。いくつかの実施形態において、二重特異性融合タンパク質は、例えば、1つの抗原に対する単一結合部位を有するscFvと、第2の抗原に対する単一結合部位を有する別のscFv断片と、を含む、二価である。他の実施形態において、二重特異性融合タンパク質は、例えば、1つの抗原に対する2つの結合部位と、第2の抗原に対する2つの同一のscFvと、を有する免疫グロブリン（例えば、IgG）を含む、四価である。2つのscFvユニットから構成されるBsAbは、臨床的に成功した二重特異性抗体形式であることが示されている。いくつかの実施形態において、BsAbは、腫瘍抗原に結合するscFvが、T細胞に結合する（例えば、CD3に結合することによる）scFvと連結されるように設計されている、2つの単鎖可変断片（scFv）をタンデムで含む。この方法では、T細胞は、それらが腫瘍細胞の細胞傷害性殺傷を媒介することができるように、腫瘍部位に動員される。例えば、Dreier et al., J. Immunol. 170: 4397-4402 (2003)、Bargou et al., Science 321: 974-977 (2008)を参照されたい。いくつかの実施形態において、本技術のBsAbは、CD3に結合するscFvが、小分子DOTAハプテンに結合するscFvと連結されるように設計されている、2つの単鎖可変断片（scFv）をタンデムで含む。

10

20

30

40

50

【0160】

BsAbを産生するための最近の方法には、より一般的な免疫グロブリンアイソタイプよりも強く架橋するように、追加のシステイン残基を有する操作された組換えモノクローナル抗体が含まれる。例えば、FitzGerald et al., Protein Eng. 10(10): 1221-1225 (1997)を参照されたい。別のアプローチは、組換え融合タンパク質を操作して、必要とされる二重特異性を有する2つ以上の異なる単鎖抗体又は抗体断片セグメントを連結することである。例えば、Coloma et al., Nature Biotech. 15: 159-163 (1997)を参照されたい。様々な二重特異性融合タンパク質は、分子工学を使用して産生することができる。

【0161】

2つ以上の異なる単鎖抗体又は抗体断片を連結する二重特異性融合タンパク質は、同様の方法で産生される。組換え方法を使用して、様々な融合タンパク質を産生することができる。いくつかの特定の実施形態において、本技術によるBsAbは、免疫グロブリンを含み、免疫グロブリンは、重鎖及び軽鎖、並びにscFvを含む。いくつかの特定の実施形態において、scFvは、本明細書に開示される任意のCD3免疫グロブリンの重鎖のC末端に連結される。いくつかの特定の実施形態において、scFvは、本明細書に開示される任意のCD3免疫グロブリンの軽鎖のC末端に連結される。様々な実施形態において、scFvは、リンカー配列を介して重鎖又は軽鎖に連結される。重鎖FdのscFvとのフレーム内接続に必要な適切なリンカー配列は、PCR反応によってVL及びVキャパドメインに導入される。次に、scFvをコードするDNA断片を、CH1ドメインをコードするDNA配列を含有するステージングベクターに連結させる。得られたscFv-CH1構築物を切除し、CD3抗体のVH領域をコードするDNA配列を含有するベクターに連結させる。得られたベクターを使用して、二重特異性融合タンパク質の発現のための哺乳類細胞などの適切な宿主細胞をトランスフェクトすることができる。

【0162】

いくつかの実施形態において、リンカーは、長さが少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100個、又はそれ以上のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、リンカーは、強固な三次元構造を採用しない傾向があり、むしろポリペプチド（例えば、第1及び／又は第2の抗原結合部位）に可撓性を提供することを特徴とする。いくつかの実施形態において、リンカーは、例えば、安定性の増加などのBsAbに付与される特定の特性に基づいて、本明細書に記載のBsAbに用いられる。いくつかの実施形態において、本技術のBsAbは、G₄Sリンカーを含む。いくつかの特定の実施形態において、本技術のBsAbは、(G₄S)_nリンカーを含み、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、又はそれ以上である。

10

【0163】

Fc修飾。いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、バリエーションFc領域を含み、当該バリエーションFc領域は、野生型Fc領域（又は親Fc領域）に対して少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、それによって、当該分子は、Fc受容体（例えば、FcγR）に対する変化した親和性を有するが、ただし、当該バリエーションFc領域は、Sondermann et al., Nature, 406:267-273 (2000) によって開示されるものなどのFc-Fc受容体相互作用の結晶学的及び構造的分析に基づいて、Fc受容体と直接的な接触をする位置で置換を有さない。FcγRなどのFc受容体と直接的な接触をするFc領域内の位置の例としては、アミノ酸234～239（ヒンジ領域）、アミノ酸265～269（B/Cループ）、アミノ酸297～299（C7Eループ）、及びアミノ酸327～332（F/G）ループが挙げられる。

20

【0164】

いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、活性化及び／又は阻害性受容体に対する変化した親和性を有し、1つ以上のアミノ酸修飾を有するバリエーションFc領域を有して、当該1つ以上のアミノ酸修飾は、アラニンによるN297置換、又はアラニンによるK322置換である。

【0165】

グリコシル化修飾。いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、親Fc領域と比較して、バリエーショングリコシル化を伴うFc領域を有する。いくつかの実施形態において、バリエーショングリコシル化は、フコースの不存在を含み、いくつかの実施形態において、バリエーショングリコシル化は、GnT1欠損CHO細胞における発現から生じる。

30

【0166】

いくつかの実施形態において、本技術の抗体は、抗体の機能性、例えば、抗原との結合活性を変更することなく、目的の抗原（例えば、CD3）に結合する適切な参照抗体と比較して、修飾されたグリコシル化部位を有し得る。本明細書に使用される場合、「グリコシル化部位」は、オリゴ糖（すなわち、一緒に連結された2つ以上の単純な糖を含有する炭水化物）が特異的及び共有結合的に結合する抗体における任意の特定のアミノ酸配列を含む。

40

【0167】

オリゴ糖側鎖は、典型的には、N結合又はO結合のいずれかを介して抗体の骨格に連結されている。N結合型グリコシル化とは、オリゴ糖部分とアスパラギン残基の側鎖との結合を指す。O結合型グリコシル化とは、オリゴ糖部分とヒドロキシアミノ酸、例えば、セリン、スレオニンとの結合を指す。例えば、フコース及び末端N-アセチルグルコサミンを含む特定のオリゴ糖を欠くFc-グリコフォーム（hCD3-IgGln）は、特別なCHO細胞で産生され得、増強されたADCCエフェクター機能を示す。

【0168】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される免疫グロブリン関連組成物の炭水化物含有量は、グリコシル化部位を付加又は欠失させることによって修飾される。抗体の

50

炭水化物含有量を修飾するための方法は、当該技術分野で周知であり、本技術内に含まれ、例えば、米国特許第 6, 218, 149 号、EP 0359096 B1、米国特許公開第 2002/0028486 号、国際特許出願公開第 03/035835 号、米国特許公開第 2003/0115614 号、米国特許第 6, 218, 149 号、米国特許第 6, 472, 511 号を参照されたく、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態において、抗体（又はその関連部分若しくは構成成分）の炭水化物含有量は、抗体の 1 つ以上の内因性炭水化物部分を欠失させることによって修飾される。いくつかの特定の実施形態において、本技術は、297 位をアスパラギンからアラニンに修飾することによって、抗体の Fc 領域のグリコシル化部位を欠失させることを含む。

【0169】

操作されたグリコフォームは、エフェクター機能を増強させるか、又は低下させることを含むがこれらに限定されない、様々な目的のために有用であり得る。操作されたグリコフォームは、当業者に既知の任意の方法によって、例えば、操作されたか若しくはバリアント発現株を使用することによって、1 つ以上の酵素、例えば、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnTIII) との共発現によって、様々な生物若しくは様々な生物からの細胞株に Fc 領域を含む分子を発現させることによって、又は Fc 領域を含む分子が発現された後に炭水化物を修飾することによって、生成され得る。操作されたグリコフォームを生成するための方法は、当該技術分野において既知であり、Uma et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180、Davies et al., 2001, Biotechnol. Bioeng. 74:288-294、Shields et al., 2002, J. Biol. Chem. 277:26733-26740、Shinkawa et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:3466-3473、米国特許第 6, 602, 684 号、米国特許出願第 10/277, 370 号、米国特許出願第 10/113, 929 号、国際特許出願公開第 00/61739 A1 号、同第 01/292246 A1 号、同第 02/311140 A1 号、同第 02/30954 A1 号、POTILLEGENT (商標) 技術 (Biowa, Inc. Princeton, N. J.)、GLYCOMAB (商標) グリコシル化操作技術 (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland) に記載されるものが含まれるがそれらに限定されず、それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、国際特許出願公開第 00/061739 号、米国特許出願公開第 2003/0115614 号、Okazaki et al., 2004, JMB, 336:1239-49 を参照されたい。

【0170】

融合タンパク質。一実施形態において、本技術の抗 CD3 抗体は、融合タンパク質である。本技術の抗 CD3 抗体は、第 2 のタンパク質に融合されたとき、抗原タグとして使用することができる。ポリペプチドに融合させることができるドメインの例には、異種シグナル配列だけでなく、他の異種機能性領域も含まれる。融合は必ずしも直接的である必要はなく、リンカー配列を介して生じることができる。更に、本技術の融合タンパク質は、抗 CD3 抗体の特徴を改善するように操作することもできる。例えば、追加のアミノ酸、特に荷電アミノ酸の領域を抗 CD3 抗体の N 末端に付加して、宿主細胞からの精製中又はその後の取り扱い及び保存の安定性及び持続性を改善することができる。また、ペプチド部分を抗 CD3 抗体に付加して精製を容易にすることもできる。かかる領域は、抗 CD3 抗体の最終調製前に除去することができる。ポリペプチドの取り扱いを容易にするペプチド部分の付加は、当該技術分野ではよく知られており、定型的な技術である。本技術の抗 CD3 抗体は、融合したポリペプチドの精製を容易にするペプチドなどのマーカー配列に融合することができる。選択された実施形態において、マーカーアミノ酸配列は、その多くは、市販されており、とりわけ、pQE ベクター (QIAGEN, Inc., Chatsworth, Calif) に提供されるタグなどのヘキサ-ヒスチジンペプチドである。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, 1989 に記載されるように、例えば、ヘキサ-ヒスチジンは、融合タン

10

20

30

40

50

パク質の都合のよい精製を提供する。精製に有用な別のペプチドタグである「HA」タグは、インフルエンザ赤血球凝集素タンパク質に由来するエピトープに対応する。Wilson et al., Cell 37:767, 1984。

【0171】

したがって、これら上記の融合タンパク質のうちのいずれかは、本技術のポリヌクレオチド又はポリペプチドを使用して操作することができる。また、いくつかの実施形態において、本明細書に記載の融合タンパク質は、インビボで増加した半減期を示す。

【0172】

ジスルフィド結合二量体構造 (IgGに起因する) を有する融合タンパク質は、単量体分泌タンパク質又はタンパク質断片単独と比較して、他の分子との結合及び中和においてより効率的であり得る。Fountoulakis et al., J. Biochem. 270:3958-3964, 1995。

【0173】

同様に、EP-A-0464533 (カナダの対応する2045869) は、免疫グロブリン分子の定常領域の様々な部分を、別のヒトタンパク質又はその断片と一緒に含む融合タンパク質を開示する。多くの場合、融合タンパク質におけるFc部分は、治療及び診断に有益であり、したがって、例えば、改善された薬物動態特性をもたらすことができる。EP-A-0232262を参照されたい。代替的に、融合タンパク質が発現、検出、及び精製された後に、Fc部分を欠失又は修飾することが望ましいことがある。例えば、Fc部分は、融合タンパク質が免疫のための抗原として使用される場合、治療及び診断を妨げ得る。創薬において、例えば、hIL-5などのヒトタンパク質は、hIL-5のアンタゴニストを特定するハイスループットスクリーニングアッセイの目的のためにFc部分と融合されている。Bennett et al., J. Molecular Recognition 8:52-58, 1995、Johanson et al., J. Biol. Chem., 270:9459-9471, 1995。

【0174】

標識された抗CD3抗体。一実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、標識部分、すなわち、検出可能な基とカップリングされる。抗CD3抗体にコンジュゲートされた特定の標識又は検出可能な基は、本技術の抗CD3抗体とCD3タンパク質との特異的結合を著しく干渉しない限り、本技術の重大な態様ではない。検出可能な基は、検出可能な物理的又は化学的特性を有する任意の材料であることができる。かかる検出可能な標識は、イムノアッセイ及びイメージングの分野で十分に開発されてきている。一般に、かかる方法に有用なほとんどいずれの標識も、本技術に適用することができる。したがって、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、又は化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。本技術の実施において有用な標識には、磁性ビーズ (例えば、Dynabeads (商標))、蛍光色素 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミンなど)、放射性標識 (例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、マイクロバブル (超音波イメージング用) などの他のイメージング剤、 ^{18}F 、 ^{11}C 、 ^{15}O 、 ^{89}Zr (陽電子放射断層撮影用)、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{111}In (単一光子放射断層撮影用)、酵素 (例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びELISAで一般的に使用される他のもの)、及び金コロイド又は着色ガラス若しくはプラスチック (例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど) ビーズなどのカロリメトリック標識が含まれる。かかる標識の使用を記載する特許には、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号、及び同第4,366,241号が含まれ、各々は、参照によりそれらの全体が全ての目的のために本明細書に組み込まれる。Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.) も参照されたい。

【0175】

標識は、当技術分野で周知の方法に従って、アッセイの所望の構成成分に直接的又は間接的にカップリングさせることができる。上述のように、必要とされる感度、化合物とのコンジュゲーションの容易さ、安定性要件、利用可能な装置、及び廃棄規定などの要因に応じた標識の選択によって、多種多様な標識を使用することができる。

【0176】

非放射性標識は、しばしば間接的な手段によって結合される。一般に、リガンド分子（例えば、ビオチン）は、分子に共有結合される。次に、リガンドは、検出可能な酵素、蛍光化合物、又は化学発光化合物などのシグナルシステムに固有に検出可能又は共有結合された抗リガンド（例えば、ストレプトアビジン）分子に結合する。多くのリガンド及び抗リガンドを使用することができる。リガンドが天然の抗リガンド、例えば、ビオチン、チロキシン、及びコルチゾールを有する場合、それは、標識された、天然に存在する抗リガンドと併せて使用することができる。代替的に、任意のハプテン性又は抗原性化合物は、抗体、例えば、抗CD3抗体と組み合わせて使用することができる。

【0177】

分子はまた、例えば、酵素又はフルオロフォアとのコンジュゲーションによって、直接的にシグナル発生化合物にコンジュゲートすることもできる。標識としての目的の酵素は、主に、ヒドロラーゼ、特にホスファターゼ、エステラーゼ、及びグリコシダーゼ、又はオキシドレダクターゼ、特にペルオキシダーゼである。標識部分として有用な蛍光化合物には、例えば、フルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどが含まれるが、これらに限定されない。標識部分として有用な化学発光化合物には、例えば、ルシフェリン、及び2,3-ジヒドロフタラジンジオン、例えば、ルミノールが含まれるが、これらに限定されない。使用することができる様々な標識又はシグナル発生システムのレビューについて、米国特許第4,391,904号を参照されたい。

【0178】

標識を検出する手段は、当業者に周知である。したがって、例えば、標識が放射性標識である場合、検出手段には、シンチレーションカウンター又はオートラジオグラフィーにおけるような写真フィルムが含まれる。標識が蛍光標識である場合、適切な波長の光で蛍光色素を励起し、得られる蛍光を検出することによって検出することができる。蛍光は、写真フィルムによって、電荷カップリング素子（CCD）又は光増倍管などの電子検出器の使用によって、視覚的に検出することができる。同様に、酵素に適切な基質を提供し、得られる反応生成物を検出することによって、酵素標識を検出することができる。最後に、単純な比色標識は、標識に関連付けられた色調を単に観察することによって検出することができる。したがって、様々なディップスティックアッセイでは、コンジュゲート化金は、しばしばピンク色を出現させるが、様々なコンジュゲート化ビーズは、ビーズの色調を出現させる。

【0179】

いくつかのアッセイ形式は、標識構成成分の使用を必要としない。例えば、凝集アッセイを使用して、標的抗体、例えば、抗CD3抗体の存在を検出することができる。この場合、抗原コーティング粒子は、標的抗体を含む試料によって凝集される。この方式では、構成成分のいずれも標識する必要はなく、標的抗体の存在は、単純な目視検査によって検出される。

【0180】

B. 本技術の抗CD3抗体の特定及び特性評価

本技術の抗CD3抗体を特定及び／又はスクリーニングするための方法。CD3タンパク質に対する所望の特異性を有するもの（例えば、CD3タンパク質の細胞外ドメインに結合するもの、特にアミノ酸配列QDGN E（配列番号63）を含むCD3細胞外ドメイン）について、CD3ポリペプチドに対する抗体を特定及びスクリーニングするのに有用な方法には、当該技術分野内で既知の任意の免疫学的に媒介される技法が含まれる。免疫

応答の構成成分は、当業者に周知の様々な方法によって検出することができる。例えば、
(1) 細胞傷害性Tリンパ球を放射性標識標的細胞とインキュベートして、これらの標的細胞の溶解を放射能の放出によって検出することができる、(2) ヘルパーTリンパ球を抗原及び抗原提示細胞とインキュベートして、サイトカインの合成及び分泌を標準的な方法によって測定することができる (Windhagen A et al., Immunity, 2:373-80, 1995)、(3) 抗原提示細胞を全タンパク質抗原とインキュベートして、MHC上のその抗原の提示をTリンパ球活性化アッセイ又は生物物理学的方法のいずれかによって検出することができる (Harding et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86:4230-4, 1989)、(4) 肥満細胞をそれらのFc-γR3受容体を架橋する試薬とインキュベートして、ヒスタミン放出を酵素イムノアッセイによって測定することができる (Siraganian et al., TIPS, 4:432-437, 1983)、及び(5) 酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)。

10

20

30

40

50

【0181】

同様に、モデル生物 (例えば、マウス) 又はヒト対象のいずれかにおける免疫応答の産物も、当業者に周知の様々な方法によって検出することができる。例えば、(1) ワクチン接種に応答する抗体の産生は、臨床検査室で現在使用されている標準的な方法、例えば、ELISAによって容易に検出することができ、(2) 炎症部位への免疫細胞の移動は、皮膚の表面をスクラッチングし、無菌容器を配置して、移動細胞をスクラッチング部位にわたって捕捉することによって検出することができ (Peters et al., Blood, 72:1310-5, 1988)、(3) マイトジェン又は混合リンパ球反応に応答する末梢血単核細胞 (PBMC) の増殖は、³H-チミジンを使用して測定することができ、(4) PBMC中の顆粒球、マクロファージ、及び他の貪食細胞の貪食能力は、標識粒子とともにウェルにPBMCを配置することによって測定することができ (Peters et al., Blood, 72:1310-5, 1988)、(5) 免疫系細胞の分化は、CD4及びCD8などのCD分子に対する抗体でPBMCを標識し、これらのマーカーを発現するPBMCの画分を測定することによって測定することができる。

【0182】

一実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、複製可能な遺伝子パッケージの表面上のCD3ペプチドの提示を使用して選択される。例えば、米国特許第5,514,548号、同第5,837,500号、同第5,871,907号、同第5,885,793号、同第5,969,108号、同第6,225,447号、同第6,291,650号、同第6,492,160号、EP585287、EP605522、EP616640、EP1024191、EP589877、EP774511、EP844306を参照されたい。所望の特異性を有する結合分子をコードするファージミドゲノムを含有する繊維状バクテリオファージ粒子を生成/選択するのに有用な方法が記載されている。例えば、EP774511、US5871907、US5969108、US6225447、US6291650、US6492160を参照されたい。

【0183】

いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、酵母宿主細胞の表面上のCD3ペプチドのディスプレイを使用して選択される。酵母表面ディスプレイによるscFvポリペプチドの単離に有用な方法は、Kieck et al., Protein Eng. 1997 Nov; 10(11):1303-10によって記載されている。

【0184】

いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、リボソームディスプレイを使用して選択される。リボソームディスプレイを使用してペプチドライブラリ中のリガンドを特定するのに有用な方法は、Mattheakis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-26, 1994、及びHanes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937-42, 1997によって記載されている。

【0185】

特定の実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、CD3ペプチドのtRNAディスプレイを使用して選択される。tRNAディスプレイを使用したリガンドのインビトロ選択に有用な方法は、Merryman et al., Chem. Biol., 9:741-46, 2002によって記載されている。

【0186】

一実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、RNAディスプレイを使用して選択される。RNAディスプレイライブラリを使用してペプチド及びタンパク質を選択するのに有用な方法は、Roberts et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-302, 1997、及びNemoto et al., FEB S Lett., 414:405-8, 1997によって記載されている。非天然RNAディスプレイライブラリを使用してペプチド及びタンパク質を選択するのに有用な方法は、Frankel et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 13:506-12, 2003によって記載されている。

【0187】

いくつかの実施形態において、本技術の抗CD3抗体は、グラム陰性細菌の周辺質中で発現され、標識されたCD3タンパク質と混合される。WO02/34886を参照されたい。CD3タンパク質に対する親和性を有する組換えポリペプチドを発現するクローンでは、抗CD3抗体に結合した標識CD3タンパク質の濃度が増加し、Harvey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 22:9193-98 2004及び米国特許公開第2004/0058403号に記載されるように、細胞がライブラリの残りから単離されることが可能である。

【0188】

所望の抗CD3抗体の選択後、当該抗体は、当業者に既知の任意の技術、例えば、原核生物細胞又は真核生物細胞の発現などによって、大量に産生できることが企図される。例えば、限定されないが、抗CD3ハイブリッド抗体又は断片である、抗CD3抗体は、CDRと、必要に応じて、元の種の抗体結合特異性を保持するために必要とされる可変領域フレームワークの最小部分（本明細書に記載される技術に従って操作される）とが発端となる種の抗体に由来し、抗体の残分が本明細書に記載されるように操作することができる標的種免疫グロブリンに由来する、抗体重鎖をコードする発現ベクターを構築し、それによってハイブリッド抗体重鎖の発現のためのベクターを産生する、従来の技法を使用して産生することができる。

【0189】

CD3結合の測定。いくつかの実施形態において、CD3結合アッセイは、CD3タンパク質及び抗CD3抗体を、CD3タンパク質と抗CD3抗体との間を結合し、CD3タンパク質と抗CD3抗体との間の結合量を評価するのに好適な条件下で混合するアッセイ形式を指す。結合の量は、CD3タンパク質の不存在下での結合の量、非特異的免疫グロブリン組成物の存在下での結合の量、又はその両方であることができる好適な対照と比較される。結合の量は、任意の好適な方法によって評価することができる。結合アッセイ方法には、例えば、ELISA、ラジオイムノアッセイ、シンチレーション近接アッセイ、蛍光エネルギー移動アッセイ、液体クロマトグラフィー、膜濾過アッセイなどが含まれる。抗CD3抗体に結合するCD3タンパク質の直接的な測定のための生物物理学的アッセイは、例えば、核磁気共鳴、蛍光、蛍光偏光、表面プラズモン共鳴（BIACOREチップ）などである。特異的結合は、当技術分野で知られている標準的なアッセイ、例えば、放射性リガンド結合アッセイ、ELISA、FRET、免疫沈降、SPR、NMR（2D-NMR）、質量分析法などによって決定される。候補抗CD3抗体の特異的結合が、候補抗CD3抗体の不存在下で観察される結合よりも少なくとも1%大きい場合、候補抗CD3抗体は、本技術の抗CD3抗体として有用である。

【0190】

本技術の抗CD3抗体の使用

一般。本技術の抗CD3抗体は、CD3タンパク質の局在化及び／又は定量化に関連する当技術分野で既知の方法（例えば、適切な生理学的試料内のCD3タンパク質のレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、ポリペプチドのイメージングにおける使用のためなど）において有用である。本技術の抗体は、アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降などの標準的な技法によってCD3タンパク質を単離するのに有用である。本技術の抗CD3抗体は、生体試料、例えば、哺乳類血清又は細胞からの天然免疫反応性CD3タンパク質、並びに宿主系において発現される組換え産生免疫反応性CD3タンパク質の精製を容易にすることができる。更に、抗CD3抗体を使用して、免疫反応性CD3タンパク質（例えば、血漿、細胞溶解物、又は細胞上清における）を検出し、免疫反応性ポリペプチドの発現の量及びパターンを評価することができる。本技術の抗CD3抗体を診断的に使用して、臨床試験手順の一部として組織中の免疫反応性CD3タンパク質レベルを監視し、例えば、所与の治療レジメンの有効性を決定することができる。上述したように、検出は、本技術の抗CD3抗体を検出可能な物質にカップリング（すなわち、物理的に連結）することによって促進することができる。

10

20

30

40

50

【0191】

CD3タンパク質の検出。生体試料中の免疫反応性CD3タンパク質の存在又は不存在を検出するための例示的な方法は、試験対象から生体試料を得ることと、生体試料を、免疫反応性CD3タンパク質を検出することができる本技術の抗CD3抗体と接触させることと、を含み、それによって免疫反応性CD3タンパク質の存在が、生体試料中に検出される。検出は、抗体に結合した検出可能な標識の手段によって達成され得る。

【0192】

抗CD3抗体に関して「標識された」という用語は、検出可能な物質を抗体にカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことによる抗体の直接的標識、並びに二次抗体などの直接的に標識される別の化合物との反応性による抗体の間接的標識を包含するよう意図される。間接的標識の例には、蛍光標識二次抗体を使用した一次抗体の検出、及び蛍光標識されたストレプトアビジンで検出することができるようビオチンでDNAプローブを末端標識することが含まれる。

【0193】

いくつかの実施形態において、本明細書に開示される抗CD3抗体は、1つ以上の検出可能な標識にコンジュゲートされる。かかる使用のために、抗CD3抗体は、発色性、酵素、放射性同位体、同位体、蛍光、毒素、化学発光、核磁気共鳴造影剤、又は他の標識の共有結合又は非共有結合の付着によって検出可能に標識され得る。

【0194】

好適な発色性標識の例には、ジアミノベンジジン及び4-ヒドロキシアゾーベンゼン-2-カルボン酸が含まれる。好適な酵素標識の例には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、 Δ -5-ステロイドイソメラーゼ、酵母-アルコールデヒドロゲナーゼ、 α -グリセロールリン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼが含まれる。

【0195】

好適な放射性同位体標識の例は、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{75}Se 、 ^{152}Eu 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{217}Bi 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd などが含まれる。 ^{111}In は、インビボイメージングが使用される例示的な同位体であり、それは肝臓による ^{125}I 又は ^{131}I 標識CD3結合抗体の脱ハロゲン化の問題を回避するためである。加えて、この同位体は、イメージングのために、より好ましいガンマ放出エネルギーを有する（Perkins et al., Eur. J. Nucl. Med. 70:296-301 (1985)、Carasquillo et al., J. Nucl. Med. 2

5 : 2 8 1 - 2 8 7 (1 9 8 7)) 。 例 えば、 1 - (P - イソチオシアナトベンジル) - D P T A に よ っ て モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 と カ ッ プ リ ン グ さ れ た ^{111}In は、 非 腫 瘍 性 組 織、 特 に 肝 臓 に お け る 取 り 込 み を ほ と ん ど 示 さ ず、 腫 瘍 局 在 化 の 特 異 性 を 高 め る (E s t e b a n e t a l . , J . N u c l . M e d . 2 8 : 8 6 1 - 8 7 0 (1 9 8 7)) 。 好 適 な 非 放 射 性 同 位 体 標 識 の 例 に は、 ^{157}Gd 、 ^{55}Mn 、 ^{162}Dy 、 ^{52}Tr 、 及 び ^{56}Fe が 含 ま れ る。

【 0 1 9 6 】

好 適 な 蛍 光 標 識 の 例 に は、 ^{152}Eu 標 識、 フ ル オ レ セ イ ン 標 識、 イ ソ チ オ シ ア ネ ー ト 標 識、 ロ ー ダ ミ ン 標 識、 フ ィ コ エ リ ト リ ン 標 識、 フ ィ コ シ ア ニ ン 標 識、 ア ロ フ ィ コ シ ア ニ ン 標 識、 緑 色 蛍 光 タ ン パ ク 質 (G F P) 標 識、 o - フ タ ル デ ヒ ド 標 識、 及 び フ ル オ レ ス カ ミ ン 標 識 が 含 ま れ る。 好 適 な 毒 素 標 識 の 例 に は、 ジ フ テ リ ア 毒 素、 リ シ ン、 及 び コ レ ラ 毒 素 が 含 ま れ る。

10

【 0 1 9 7 】

化 学 発 光 標 識 の 例 に は、 ル ミ ノ ール 標 識、 イ ソ ル ミ ノ ール 標 識、 芳 香 族 ア ク リ ジ ニ ウ ム エ ス テ ル 標 識、 イ ミ ダ ゾ ール 標 識、 ア ク リ ジ ニ ウ ム 塩 標 識、 シ ユ ウ 酸 エ ス テ ル 標 識、 ル シ フ ェ リ ン 標 識、 ル シ フ ェ ラ ー ゼ 標 識、 及 び エ ク オ リ ン 標 識 が 含 ま れ る。 核 磁 気 共 鳴 造 影 剤 の 例 に は、 G d、 M n、 及 び 鉄 な の 重 金 属 核 が 含 ま れ る。

【 0 1 9 8 】

本 技 術 の 検 出 方 法 を 使 用 し て、 生 体 試 料 中 の 免 疫 反 応 性 C D 3 タ ン パ ク 質 を イ ン ビ ト ロ 並 び に イ ン ビ ボ で 検 出 す る こ と が で き る。 免 疫 反 応 性 C D 3 タ ン パ ク 質 の 検 出 の た め の イ ン ビ ト ロ 技 法 に は、 酵 素 結 合 免 疫 吸 着 ア ッ セ イ (E L I S A)、 ウ エ ス タ ン プ ロ ッ ト、 免 疫 沈 降、 ラ ジ オ イ ム ノ ア ッ セ イ、 及 び 免 疫 蛍 光 が 含 ま れ る。 更 に、 免 疫 反 応 性 C D 3 タ ン パ ク 質 の 検 出 の た め の イ ン ビ ボ 技 法 に は、 対 象 に 標 識 さ れ た 抗 C D 3 抗 体 を 導 入 す る こ と が 含 ま れ る。 例 えば、 抗 C D 3 抗 体 は、 放 射 性 マ ー カ ー で 標 識 す る こ と が で き、 対 象 に お け る そ の 存 在 及 び 位 置 を 標 準 的 な イ メ ー ジ ン グ 技 法 に よ っ て 検 出 す る こ と が で き る。 一 実 施 形 態 に お い て、 生 体 試 料 は、 試 験 対 象 か ら の C D 3 タ ン パ ク 質 分 子 を 含 有 す る。

20

【 0 1 9 9 】

イ ム ノ ア ッ セ イ 及 び イ メ ー ジ ン グ。 本 技 術 の 抗 C D 3 抗 体 は、 抗 体 ベ ー ス の 技 法 を 使 用 し て、 生 体 試 料 (例 えば、 ヒ ト 血 漿) 中 の 免 疫 反 応 性 C D 3 タ ン パ ク 質 レ ベ ル を ア ッ セ イ す る た め に 使 用 す る こ と が で き る。 例 えば、 組 織 に お け る タ ン パ ク 質 の 発 現 は、 古 典 的 な 免 疫 組 織 学 的 方 法 で 試 験 す る こ と が で き る。 J a l k a n e n , M . e t a l . , J . C e l l . B i o l . 1 0 1 : 9 7 6 - 9 8 5 , 1 9 8 5、 J a l k a n e n , M . e t a l . , J . C e l l . B i o l . 1 0 5 : 3 0 8 7 - 3 0 9 6 , 1 9 8 7。 タ ン パ ク 質 遺 伝 子 発 現 を 検 出 す る の に 有 用 な 他 の 抗 体 ベ ー ス の 方 法 に は、 酵 素 結 合 免 疫 吸 着 ア ッ セ イ (E L I S A) 及 び ラ ジ オ イ ム ノ ア ッ セ イ (R I A) な の イ ム ノ ア ッ セ イ が 含 ま れ る。 好 適 な 抗 体 ア ッ セ イ 標 識 は、 当 技 術 分 野 で 既 知 で あり、 グ ル コ ー ス オ キ シ ダ ー な の 酵 素 標 識、 及 び 放 射 性 同 位 体、 又 は 他 の 放 射 性 剤、 例 えば、 ヨ ウ 素 (^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{131}I)、 炭 素 (^{14}C)、 硫 黄 (^{35}S)、 ト リ チ ウ ム (^3H)、 イ ン ジ ウ ム (^{112}In)、 及 び テ ク ネ チ ウ ム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、 並 び に 蛍 光 標 識、 例 えば、 フ ル オ レ セ イ ン、 ロ ー ダ ミ ン、 及 び 緑 色 蛍 光 タ ン パ ク 質 (G F P)、 並 び に ビ オ チ ン が 含 ま れ る。

30

40

【 0 2 0 0 】

生 体 試 料 に お け る 免 疫 反 応 性 C D 3 タ ン パ ク 質 レ ベ ル を ア ッ セ イ す る こ と に 加 え て、 本 技 術 の 抗 C D 3 抗 体 は、 C D 3 の イ ン ビ ボ イ メ ー ジ ン グ に 使 用 さ れ 得 る。 こ の 方 法 に 有 用 な 抗 体 に は、 X 線 ラ ジ オ グ ラ フ ィ ー、 N M R、 又 は E S R に よ っ て 検 出 可 能 な も の が 含 ま れ る。 X 線 ラ ジ オ グ ラ フ ィ ー で は、 好 適 な 標 識 に は、 検 出 可 能 な 放 射 線 を 放 出 す る が、 対 象 に 明 ら か に 有 害 で は な い、 バ リ ウ ム 又 は セ シ ウ ム な の 放 射 性 同 位 体 が 含 ま れ る。 N M R 及 び E S R に 好 適 な マ ー カ ー に は、 重 水 素 な の 検 出 可 能 な 特 徴 的 ス ピ ン を 有 す る も の が 含 ま れ、 関 連 す る s c F v ク ロ ー ン に お け る 栄 養 素 の 標 識 に よ っ て 抗 C D 3 抗 体 に 組 み 込 む こ と が で き る。

【 0 2 0 1 】

50

放射性同位体（例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過物質、又は核磁気共鳴によって検出可能な材料などの適切な検出可能なイメージング部分で標識されている抗CD3抗体が、対象に導入される（例えば、非経口的に、皮下に、又は腹腔内に）。対象のサイズ及び使用されるイメージングシステムが、診断画像を生じるのに必要なイメージング部分の量を決定することが当該技術分野で理解されるであろう。放射性同位体部分の場合、ヒト対象について、注入される放射能の量は、通常、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の約5～20ミリキュリーの範囲である。その後、標識された抗CD3抗体は、特定の標的ポリペプチドを含有する細胞の部位に蓄積する。例えば、本技術の標識された抗CD3抗体は、CD3タンパク質が局在している細胞及び組織で対象内に蓄積する。

【0202】

したがって、本技術は、医学的状態の診断方法を提供し、（a）個体の細胞又は体液における本技術の抗CD3抗体の結合を測定することによって、免疫反応性CD3タンパク質の発現をアッセイすることと、（b）試料に存在する免疫反応性CD3タンパク質の量を標準参照と比較することと、を含み、標準と比較した免疫反応性CD3タンパク質レベルの増加又は減少が、医学的状態の指標である。

【0203】

アフィニティー精製。本技術の抗CD3抗体を使用して、免疫反応性CD3タンパク質を試料から精製し得る。いくつかの実施形態において、抗体は、固体支持体上に固定される。かかる固体支持体の例には、ポリカーボネートなどのプラスチック、アガロース及びセファロースなどの複合炭水化物、アクリル樹脂、並びにポリアクリルアミド及びラテックスビーズなどが含まれる。抗体をかかると固体支持体にカップリングするための技術は、当該技術分野で周知である（Weir et al., "Handbook of Experimental Immunology" 4th Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, Chapter 10 (1986)、Jacoby et al., Meth. Enzym. 34 Academic Press, N. Y. (1974)）。

【0204】

抗原を抗体支持体マトリックスに結合させる最も簡単な方法は、ビーズをカラムに集め、抗原溶液をカラムに通すことである。この方法の効率は、固定化抗体と抗原との間の接触時間に依存し、低流速を使用して延長することができる。固定化抗体は、抗原をそれが通過する際に捕捉する。代替的に、抗原は、抗原溶液を支持体（例えば、ビーズ）と混合し、スラリーを回転又は揺動させることによって抗体支持体マトリックスと接触させることができ、抗原と固定化抗体との間の最大限の接触を可能にする。結合反応が完了した後、スラリーをビーズの収集のためのカラムに渡す。ビーズを、好適な洗浄緩衝液を使用して洗浄し、次いで、純粋又は実質的に純粋な抗原を溶離させる。

【0205】

目的の抗体又はポリペプチドは、ビーズなどの固体支持体にコンジュゲートすることができる。加えて、ビーズなどの第1の固体支持体はまた、必要に応じて、ポリペプチドと支持体とのコンジュゲーションのための本明細書に開示されるものを含む任意の好適な手段によって、第2のビーズ又は他の支持体であることができる、第2の固体支持体にコンジュゲートすることができる。したがって、ポリペプチドと固体支持体とのコンジュゲーションに関して本明細書に開示されるコンジュゲーション方法及び手段のうちのいずれかは、第1の支持体と第2の支持体とのコンジュゲーションに適用することもでき、第1及び第2の固体支持体は同じであるか又は異なることができる。

【0206】

ポリペプチドを固体支持体にコンジュゲートするための使用に好適なリンカーには、架橋剤であることができ、支持体の表面に存在する官能基と、若しくはポリペプチドと、又はその両方と反応することができる様々な薬剤と、が含まれる。架橋剤として有用な試薬には、ホモ二官能性、特にヘテロ二官能性の試薬が含まれる。有用な二官能性架橋剤には、N-SIAB、ジマレイミド、DTNB、N-SATA、N-SPDP、SMCC、及

10

20

30

40

50

び 6-HYNIC が含まれるが、これらに限定されない。架橋剤は、ポリペプチドと固体支持体との間の選択的に切断可能な結合を提供するように選択することができる。例えば、3-アミノ-(2-ニトロフェニル)プロピオン酸などの光不安定性架橋剤は、ポリペプチドを固体支持体から切断する手段として用いることができる。(Brown et al., Mol. Divers, pp, 4-12 (1995)、Rothschild et al., Nucl. Acids Res., 24:351-66 (1996)、及び米国特許第5,643,722号)。他の架橋試薬が当該技術分野で周知である。(例えば、Wong (1991)、同上及びHermanson (1996)、同上を参照されたい)。

【0207】

抗体又はポリペプチドは、カルボキシル基官能化ビーズとポリペプチドのアミノ末端との間に形成された共有アミド結合を通して、又は逆に、アミノ基官能化ビーズとポリペプチドのカルボキシル末端との間に形成された共有アミド結合を通して、ビーズなどの固体支持体に固定化することができる。加えて、二官能性トリチルリンカーを、支持体、例えば、ワング樹脂などの樹脂上の4-ニトロフェニル活性エステルに、アミノ樹脂を介した樹脂上のアミノ基又はカルボキシル基を通して結合させることができる。二官能性トリチルアプローチを使用して、固体支持体は、ギ酸又はトリフルオロ酢酸などの揮発性酸での処理を必要とすることで、ポリペプチドが切断され、除去できることを確実にすることができる。かかる事例において、ポリペプチドは、固体支持体のウェルの底部又は固体支持体の平坦な表面上にビーズのないパッチとして堆積され得る。マトリックス溶液の添加後、ポリペプチドをMSに脱離することができる。

【0208】

疎水性トリチルリンカーはまた、揮発性酸又は適切なマトリックス溶液、例えば、3-HPAを含有するマトリックス溶液を使用して、ポリペプチドからアミノ結合トリチル基を切断することによって、酸不安定なリンカーとして利用することができる。酸不安定度も変えることができる。例えば、トリチル、モノメトキシトリチル、ジメトキシトリチル、又はトリメトキシトリチルは、ポリペプチドの適切なp置換又はより酸不安定なトリチルアミン誘導体に変更することができ、すなわち、トリチルエーテル及びトリチルアミン結合を、ポリペプチドに作製することができる。したがって、ポリペプチドは、疎水性リンカーから、例えば、疎水性求引を破壊することによって、又は所望であれば、3-HPAなどのマトリックスが酸として作用する典型的なMS条件下を含む酸性条件下で、トリチルエーテル又はトリチルアミン結合を切断することによって、取り出すことができる。

【0209】

直交的に切断可能なリンカーはまた、第1の固体支持体、例えば、ビーズを、第2の固体支持体に結合するため、又は目的のポリペプチドを固体支持体に結合するためにも有用であることができる。かかるリンカーを使用して、第1の固体支持体、例えば、ビーズを、第2の固体支持体から、ポリペプチドを支持体から切断することなく、選択的に切断することができる。次いで、ポリペプチドをビーズから後になって切断することができる。例えば、DTTなどの還元剤を使用して切断することができるジスルフィドリンカーを用いて、ビーズを第2の固体支持体に結合することができ、酸切断可能な二官能性トリチル基を使用して、ポリペプチドを支持体に固定することができる。所望される場合、ポリペプチドの固体支持体との結合は、例えば、第1の支持体と第2の支持体との間の結合をそのまま残して、最初に切断することができる。トリチルリンカーは、共有結合又は疎水性コンジュゲーションを提供することができ、コンジュゲーションの性質にかかわらず、トリチル基は、酸性条件で容易に切断される。

【0210】

例えば、ビーズは、固体支持体とのビーズの高密度結合、又はビーズとのポリペプチドの高密度結合が促進されるような、長さ及び化学的性質を有するように選択することができる連結基を介して、第2の支持体に結合することができる。かかる連結基は、例えば、「ツリー様」構造を有することができ、それによって固体支持体上の付着部位毎に多様な

官能基を提供する。かかる連結基の例には、ポリリジン、ポリグルタミン酸、ペントーエリスロール、及びトリスーヒドロキシアミノメタンが含まれる。

【0211】

非共有結合。抗体又はポリペプチドは、固体支持体にコンジュゲートすることができるか、又は第1の固体支持体は、非共有結合相互作用によって、第2の固体支持体にコンジュゲートすることができる。例えば、強磁性材から作られた磁性ビーズは、磁化することができ、磁性固体支持体に引き付けられ、磁場の除去によって支持体から解放することができる。代替的に、固体支持体は、イオン性又は疎水性部分を提供することができ、それぞれ、イオン性部分又は疎水性部分と、ポリペプチド、例えば、結合したトリチル基を含有するポリペプチド、又は疎水性特性を有する第2の固体支持体との相互作用を可能にすることができる。

10

【0212】

固体支持体はまた、特異的結合対のメンバーとともに提供することができ、したがって、相補的結合部分を含有するポリペプチド又は第2の固体支持体にコンジュゲートすることができる。例えば、アビジン又はストレプトアビジンでコーティングされたビーズは、その中に組み込まれたビオチン部分を有するポリペプチドに、又はビオチン若しくはイミノビオチンなどのビオチンの誘導体でコーティングされた第2の固体支持体に、結合することができる。

【0213】

本明細書に開示されるか、さもなければ当該技術分野で既知である結合メンバーのうちのいずれかを逆転できることが認識されるべきである。したがって、ビオチンは、例えば、ポリペプチド又は固体支持体のいずれかに組み込むことができ、逆に、アビジン又は他のビオチン結合部分は、それぞれ、支持体又はポリペプチドに組み込むことができる。本明細書における使用のために企図される他の特異的結合対には、ホルモン及びそれらの受容体、酵素及びそれらの基質、ヌクレオチド配列及びその相補性配列、抗体及びそれが特異的に相互作用する抗原、並びに当業者に既知である他のかかる対が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0214】

A. 本技術の抗CD3抗体の診断的使用

一般。本技術の抗CD3抗体は、診断方法に有用である。したがって、本技術は、対象におけるCD3活性の診断において抗体を使用する方法を提供する。本技術の抗CD3抗体は、CD3タンパク質に対する任意のレベルのエピトープ結合特異性及び非常に高い結合親和性を有するように選択され得る。一般に、抗体の結合親和性が高いほど、標的ポリペプチドを取り除くことなく非特異的に結合した物質を除去するために、より厳格な洗浄条件をイムノアッセイで行うことができる。したがって、診断アッセイに有用な本技術の抗CD3抗体は、通常、約 10^8 M^{-1} 、 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 、又は 10^{12} M^{-1} の結合親和性を有する。更に、診断試薬として使用される抗CD3抗体は、標準的な条件下で、少なくとも12時間、少なくとも5時間、又は少なくとも1時間で平衡に達するのに十分な結合動態を有することが望ましい。

30

【0215】

抗CD3抗体を使用して、様々な標準的なアッセイ形式で免疫反応性CD3タンパク質を検出することができる。かかる形式には、免疫沈降、ウェスタンブロッティング、ELISA、ラジオイムノアッセイ、及びイムノメトリックアッセイが含まれる。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988)、米国特許第3,791,932号、同第3,839,153号、同第3,850,752号、同第3,879,262号、同第4,034,074号、同第3,791,932号、同第3,817,837号、同第3,839,153号、同第3,850,752号、同第3,850,578号、同第3,853,987号、同第3,867,517号、同第3,879,262号、同第3,901,654号、同第3,935,

40

50

074号、同第3,984,533号、同第3,996,345号、同第4,034,074号、及び同第4,098,876号を参照されたい。生体試料は、対象の任意の組織又は体液から得ることができる。特定の実施形態において、対象は、がんの初期段階にある。一実施形態において、がんの初期段階は、対象から得られた試料中のCD3タンパク質のレベル又は発現パターンによって決定される。特定の実施形態において、試料は、尿、血液、血清、血漿、唾液、羊水、脳脊髄液(CSF)、及び生検体組織からなる群から選択される。

【0216】

イムノメトリック又はサンドイッチアッセイは、本技術の診断方法における1つの方式である。米国特許第4,376,110号、同第4,486,530号、同第5,914,241号、及び同第5,965,375号を参照されたい。かかるアッセイは、1つの抗体、例えば、固相に固定化された抗CD3抗体又は抗CD3抗体の集団、及び溶液中の別の抗CD3抗体又は抗CD3抗体の集団を使用する。典型的には、溶液抗CD3抗体又は抗CD3抗体の集団が標識される。抗体集団が使用される場合、集団は、標的ポリペプチド内の異なるエピトープ特異性に結合する抗体を含有することができる。したがって、同じ集団を、固相抗体及び溶液抗体の両方に使用することができる。抗CD3モノクローナル抗体が使用される場合、異なる結合特異性を有する第1及び第2のCD3モノクローナル抗体が、固相及び溶液相に使用される。固相(「捕捉」とも称される)及び溶液(「検出」とも称される)抗体は、順次又は同時のいずれかで標的抗原と接触させることができる。固相抗体を最初に接触させる場合、アッセイはフォワードアッセイと称される。逆に、溶液抗体を最初に接触させる場合、アッセイはリバースアッセイと称される。標的を両方の抗体と同時に接触させる場合、アッセイは同時アッセイと称される。CD3タンパク質を抗CD3抗体と接触させた後、試料は、通常、約10分〜約24時間で変動する期間でインキュベートされるが、通常、約1時間である。次いで、洗浄ステップを行い、診断試薬として使用される抗CD3抗体に特異的に結合していない試料の構成成分を除去する。固相及び溶液抗体を別個のステップで結合させる場合、いずれか又は両方の結合ステップの後に洗浄を行うことができる。洗浄後、結合は、典型的には、標識された溶液抗体の結合を介して固相に連結された標識を検出することによって、定量化される。通常、所与の対の抗体又は抗体の集団、及び所与の反応条件について、検量線が既知の濃度の標的抗原を含有する試料から用意される。試験する試料中の免疫反応性CD3タンパク質の濃度は、検量線(すなわち、標準曲線)から補間することによって読み取られる。分析物は、平衡で結合している標識溶液抗体の量から、又は平衡に到達する前の一連の時点における結合した標識溶液抗体の動態測定によって、測定することができる。かかる曲線の勾配は、試料中のCD3タンパク質の濃度の尺度である。

【0217】

上記の方法で使用するための好適な支持体には、例えば、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、及び誘導体化ナイロン膜、並びにアガロースなどの粒子、デキストランベースのゲル、ディップスティック、粒子、微粒子、磁性粒子、試験管、マイクロタイターウェル、SEPHADEX(商標)(Amersham Pharmacia Biotech、Piscataway N.J.)が含まれる。固定化は、吸収又は共有結合によることができる。任意選択的に、抗CD3抗体は、アビジンなどの表面結合リンカーとの結合のために、ビオチンなどのリンカー分子に結合させることができる。

【0218】

いくつかの実施形態において、本開示は、診断剤にコンジュゲートされた本技術の抗CD3抗体を提供する。診断剤は、放射性又は非放射性標識、造影剤(磁気共鳴画像法、コンピュータ断層撮影法、又は超音波法など)を含み得、放射性標識は、ガンマー、ベーター、アルファー、オージェ電子ー、又は陽電子ー放出同位体であることができる。診断剤は、抗体部分、すなわち、抗体若しくは抗体断片、又はサブ断片にコンジュゲートされて投与される分子であり、抗原を含有する細胞の位置を示すことによって、疾患を診断又は検出するのに有用である。

【0219】

有用な診断剤には、放射性同位体、色素（ビオチン-ストレプトアビジン複合体を用いるなど）、造影剤、蛍光化合物又は分子、及び磁気共鳴画像法（MRI）のための増強剤（例えば、常磁性イオン）が含まれるが、これらに限定されない。米国特許第6,331,175号は、MRI技術及びMRI増強剤にコンジュゲートされた抗体の調製を記載しており、参照によりその全体が組み込まれる。いくつかの実施形態において、診断剤は、放射性同位体、磁気共鳴画像法における使用のための増強剤、及び蛍光化合物からなる群から選択される。抗体構成成分を放射性金属又は常磁性イオンで負荷するために、それは、イオンを結合するための複数のキレート基が結合する長い尾部を有する試薬と反応させることが必要であり得る。かかる尾部は、ポリリジン、多糖などのポリマー、又は例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、ポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビスチオセミカルバゾン、ポリオキシムなどのキレート基、及びこの目的のために有用であることが知られている同様な基が結合することができるペンダント基を有する他の誘導体化又は誘導体化可能な鎖であることができる。キレートは、標準的な化学物質を使用して、本技術の抗体にカップリングされ得る。キレートは、免疫反応性の最小限の損失並びに最小限の凝集及び／又は内部架橋で、分子との結合の形成を可能にする基によって、通常、抗体に連結される。キレートを抗体にコンジュゲートするための他の方法及び試薬は、米国特許第4,824,659号に開示されている。特に有用な金属-キレートの組み合わせには、放射線画像法のための診断用同位体とともに使用される、2-ベンジル-DTPA並びにそのモノメチル及びシクロヘキシル類似体が含まれる。マンガン、鉄、及びガドリニウムなどの非放射性金属と複合体化されたとき、同じキレートは、本技術のCD3抗体と一緒に使用される場合、MRIに有用である。

10

20

【0220】

NOTA（1,4,7-トリアザ-シクロノナン-N,N',N''-三酢酸）、DOTA、及びTETA（p-ブromoアセトアミド-ベンジル-テトラエチルアミン四酢酸）などの大環状キレートは、それぞれ、ガリウム、イットリウム、及び銅の放射性核種などの様々な金属及び放射性金属とともに使用される。かかる金属-キレート錯体は、環サイズを目的の金属に合わせることによって安定化させることができる。他のDOTAキレートの例には、(i) DOTA-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-NH₂、(ii) Ac-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Tscg-Cys)-NH₂、(iii) DOTA-D-Asp-D-Lys(HSG)-D-Asp-D-Lys(HSG)-NH₂、(iv) DOTA-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂、(v) DOTA-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂、(vi) DOTA-D-Ala-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂、(vii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-NH₂、(viii) Ac-D-Phe-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Lys(DOTA)-NH₂、(ix) Ac-D-Phe-D-Lys(DTPA)-D-Tyr-D-Lys(DTPA)-NH₂、(x) Ac-D-Phe-D-Lys(Bz-DTPA)-D-Tyr-D-Lys(Bz-DTPA)-NH₂、(xi) Ac-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂、(xii) DOTA-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(Tscg-Cys)-NH₂、(xiii) (Tscg-Cys)-D-Phe-D-Lys(HSG)-D-Tyr-D-Lys(HSG)-D-Lys(DOTA)-NH₂、(xiv) Tscg-D-Cys-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂、(xv) (Tscg-Cys)-D-Glu-D-Lys(HSG)-D-Glu-D-Lys(HSG)-NH₂、(xvi) Ac-D-Cys-D-Lys(DOTA)-D-Tyr-D-Ala-D-Lys(DOTA)-D-Cys-NH₂、(xvii) Ac-D

30

40

50

—Cys—D—Lys (DTPA)—D—Tyr—D—Lys (DTPA)—NH₂、(xviii) Ac—D—Lys (DTPA)—D—Tyr—D—Lys (DTPA)—D—Lys (Tscg—Cys)—NH₂、及び (xix) Ac—D—Lys (DOTA)—D—Tyr—D—Lys (DOTA)—D—Lys (Tscg—Cys)—NH₂が含まれる。

【0221】

RAITのための²²³Raなどの核種に安定して結合する目的のものである、大環状ポリエーテルなどの他の環型キレートもまた企図される。

【0222】

B. 本技術の抗CD3抗体の治療的使用

一態様において、本技術の免疫グロブリン関連組成物（例えば、抗体又はその抗原結合断片）は、固形腫瘍又は液体腫瘍の治療に有用である。好適な固形腫瘍又は液体腫瘍の非限定的な例としては、副腎がん、膀胱がん、血液がん、骨がん、脳がん、乳がん、がん腫、子宮頸がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮体がん、耳、鼻、及び喉の（ENT）がん、子宮内膜がん、食道がん、胃腸がん、頭頸部がん、ホジキン病、腸がん、腎臓がん、喉頭がん、急性及び慢性の白血病、肝臓がん、リンパ節がん、リンパ腫、肺がん、黒色腫、中皮腫、骨髄腫、鼻咽頭がん、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、口腔がん、卵巣がん、膵臓がん、陰茎がん、咽頭がん、前立腺がん、直腸がん、肉腫、セミノーマ、皮膚がん、胃がん、奇形腫、精巣がん、甲状腺がん、子宮がん、膣がん、血管腫瘍、及びそれらの転移が挙げられる。いくつかの実施形態において、哺乳動物は、ヒトである。

【0223】

本技術の組成物は、がんの治療に有用な他の治療剤と併せて用いられ得る。例えば、本技術の抗体は、アルキル化剤、白金剤、タキサン、ビンカ剤、抗エストロゲン薬、アロマターゼ阻害剤、卵巣抑制剤、VEGF／VEGFR阻害剤、EGF／EGFR阻害剤、PARP阻害剤、細胞増殖抑制アルカロイド、細胞傷害性抗生物質、抗代謝剤、内分泌／ホルモン剤、T細胞、ビスホスホネート療法剤、及び標的化された生物学的療法剤（例えば、US6306832、WO2012／007137、WO2005／000889、WO2010／096603などに記載される治療用ペプチド）からなる群から選択される少なくとも1つの追加の治療剤と、別々に、連続して、又は同時に投与され得る。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの追加の治療剤は、化学療法剤である。特定の化学療法剤には、シクロホスファミド、フルオロウラシル（又は5-フルオロウラシル若しくは5-FU）、メトトレキサート、エダトレキサート（10-エチル-10-デアザアミノプテリン）、チオテパ、カルボプラチン、シスプラチン、タキサン、パクリタキセル、タンパク質結合パクリタキセル、ドセタキセル、ビノレルビン、タモキシフェン、ラロキシフェン、トレミフェン、フルベストラント、ゲムシタビン、イリノテカン、エキサベピロン、テモゾリド、トポテカン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エリブリン、ムタマイシン、カペシタビン、アナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、ロイプロリド、アバレリックス、ブセレリン、ゴセレリン、酢酸メゲストロール、リセドロネート、パミドロネート、イバンドロネート、アレンドロネート、デノスマブ、ゾレドロネート、トラスツズマブ、タイケルブ、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン及びドキソルビシン）、ベバシズマブ、オキサリプラチン、メルファラン、エトポシド、メクロレタミン、ブレオマイシン、微小管毒、バンレイシ科アセトゲニン、又はそれらの組み合わせが含まれる。

【0224】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、本技術の抗体又は抗原結合断片は、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIM3抗体、抗4-1BB抗体、抗CD73抗体、抗GITR抗体、及び抗LAG-3抗体を含むがこれらに限定されない、少なくとも1つの追加の免疫調節／刺激抗体と、別々に、連続して、又は同時に投与され得る。

【0225】

10

20

30

40

50

本技術の組成物は、任意選択的に、それを必要とする対象に単回ボラスとして投与され得る。代替的に、投与レジメンは、腫瘍の出現後に様々な回数で行われる複数の投与を含み得る。

【0226】

投与は、経口的、鼻腔内、非経口的（静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下）、直腸、頭蓋内、腫瘍内、髄腔内、又は局所を含む、任意の好適な経路によって実行することができる。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。記載される医学的状態の様々な治療モードは、全治療を含むが、全治療よりも少ない「実質的な」ことを意味することが意図され、いくつかの生物学的又は医学的に関連する結果が達成されることも理解されたい。

【0227】

いくつかの実施形態において、本技術の抗体は、医薬製剤を構成し、それを必要とする対象に、1回以上の用量で投与され得る。投与レジメンは、所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調整することができる。

【0228】

典型的には、治療効果を達成するのに十分な、本技術の抗体組成物の有効量は、1日当たりキログラム体重当たり約0.000001mg～1日当たりキログラム体重当たり約10,000mgの範囲である。典型的には、投与量範囲は、1日当たりキログラム体重当たり約0.0001mg～1日当たりキログラム体重当たり約100mgである。抗CD3抗体の投与では、投与量は、毎週、2週毎、又は3週毎に、対象体重の約0.0001～100mg/kg、より一般的には、0.01～5mg/kgの範囲である。例えば、投与量は、毎週、2週毎、若しくは3週毎に1mg/kg体重、若しくは10mg/kg体重、又は毎週、2週毎、若しくは3週毎に1～10mg/kgの範囲内であることができる。一実施形態において、抗体の単回投与量は、体重1kg当たり0.1～10,000マイクログラムの範囲である。一実施形態において、担体中の抗体濃度は、送達されるミリリットル当たり0.2～2000マイクログラムの範囲である。例示的な治療レジームは、2週に1回、又は月に1回、又は3～6か月毎に1回の投与を伴う。抗CD3抗体は、複数の機会に投与され得る。単回投与間の間隔は、時間単位、日単位、週単位、月単位、又は年単位であることができる。間隔はまた、対象における抗体の血中レベルを測定することによって指示されるとき、不規則であることができる。いくつかの方法において、投与量は、約75μg/mL～約125μg/mL、100μg/mL～約150μg/mL、約125μg/mL～約175μg/mL、又は約150μg/mL～約200μg/mLの対象における血清抗体濃度を達成するように調整される。代替的に、抗CD3抗体は、持続放出製剤として投与することができ、その場合、より頻度の少ない投与が必要とされる。投与量及び頻度は、対象における抗体の半減期に応じて変化する。投与量及び投与頻度は、治療が予防的か又は治療的であるかに応じて変化し得る。予防的適用において、比較的低い投与量は、長期間にわたって比較的低頻度の間隔で投与される。治療的適用では、疾患の進行が減少若しくは終了するまで、又は対象が疾患の症状の部分的若しくは完全な改善を示すまで、比較的高い投与量が比較短的間隔で、時に必要とされる。その後、患者に予防的レジームを投与することができる。

【0229】

別の態様において、本開示は、対象におけるがんをインビボで検出するための方法を提供し、方法は、(a)対象に、有効量の本技術の抗体（又はその抗原結合断片）を投与することであって、抗体が、CD3を発現するがん細胞に局在化するように構成されており、放射性同位体で標識されている、投与することと、(b)参照値よりも高い抗体によって放出された放射性レベルを検出することによって、対象における腫瘍の存在を検出することと、を含む。いくつかの実施形態において、参照値は、グラム当たりの注入された用量(%ID/g)として表される。参照値は、非腫瘍（正常）組織に存在する放射性レベルを測定し、非腫瘍（正常）組織±標準偏差に存在する平均放射性レベルを計算することによって算出され得る。いくつかの実施形態において、腫瘍と正常組織との間の放射性レベルの比率は、約2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、

10

20

30

40

50

10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1、45 : 1、50 : 1、55 : 1、60 : 1、65 : 1、70 : 1、75 : 1、80 : 1、85 : 1、90 : 1、95 : 1、又は100 : 1である。

【0230】

いくつかの実施形態において、対象は、がんを有すると診断されるか、又はがんを有することが疑われる。抗体によって放出された放射性レベルは、陽電子放射断層撮影又は単一光子放射コンピュータ断層撮影を使用して検出され得る。

【0231】

追加的又は代替的に、いくつかの実施形態において、方法は、対象に、放射性核種にコンジュゲートされた本技術の抗体を含む有効量の免疫コンジュゲートを投与することを更に含む。いくつかの実施形態において、放射性核種は、アルファ粒子放出同位体、ベータ粒子放出同位体、オージェ放出体、又はそれらの任意の組み合わせである。ベータ粒子放出同位体の例には、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{165}Dy 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{177}Lu 、及び ^{67}Cu が含まれる。アルファ粒子放出同位体の例には、 ^{213}Bi 、 ^{211}At 、 ^{225}Ac 、 ^{152}Dy 、 ^{212}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{219}Rn 、 ^{215}Po 、 ^{211}Bi 、 ^{221}Fr 、 ^{217}At 、及び ^{255}Fm が含まれる。オージェ放出体の例に、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{51}Cr 、 ^{58}Co 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{103\text{m}}\text{Rh}$ 、 $^{195\text{m}}\text{Pt}$ 、 ^{119}Sb 、 ^{161}Ho 、 $^{189\text{m}}\text{Os}$ 、 ^{192}Ir 、 ^{201}Tl 、及び ^{203}Pb が含まれる。本方法のいくつかの実施形態において、正常組織における非特異的FcR依存性結合は、排除されるか、又は低下される（例えば、非グリコシル化をもたらす、Fc領域におけるN297A変異を介して）。かかる免疫コンジュゲートの治療有効性は、曲線下面積（AUC）腫瘍：AUC正常組織比を計算することによって決定され得る。いくつかの実施形態において、免疫コンジュゲートは、約2 : 1、3 : 1、4 : 1、5 : 1、6 : 1、7 : 1、8 : 1、9 : 1、10 : 1、15 : 1、20 : 1、25 : 1、30 : 1、35 : 1、40 : 1、45 : 1、50 : 1、55 : 1、60 : 1、65 : 1、70 : 1、75 : 1、80 : 1、85 : 1、90 : 1、95 : 1、又は100 : 1のAUC腫瘍：AUC正常組織比を有する。

【0232】

毒性。最適には、有効量（例えば、用量）の本明細書に記載の抗CD3抗体は、対象に実質的な毒性を引き起こすことなく、治療的利益を提供する。本明細書に記載の抗CD3抗体の毒性は、細胞培養物又は実験動物における標準的な薬学的手順によって、例えば、LD₅₀（集団の50%に致死的な用量）又はLD₁₀₀（集団の100%に致死的な用量）を決定することによって、決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指標である。これらの細胞培養アッセイ及び動物試験から得られたデータを使用して、ヒトにおける使用に毒性ではない投与量範囲を製剤化することができる。本明細書に記載の抗CD3抗体の投与量は、有効用量を、ほとんど又は全く毒性を伴わずに含む、循環濃度の範囲内にある。投与量は、用いられる投与形態、及び利用される投与経路に依じて、この範囲内で変更することができる。正確な製剤、投与経路、及び投与量は、対象の病態を考慮して個々の医師によって選択することができる。例えば、Finglet al., In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1 (1975) を参照されたい。

【0233】

医薬組成物の製剤。本技術の方法に従い、抗CD3抗体は、投与に好適な医薬組成物に組み込むことができる。医薬組成物は、一般に、対象への投与に好適な形態で、組換え又は実質的に精製された抗体と、薬学的に許容される担体と、を含む。薬学的に許容される担体は、投与される特定の組成物、並びに組成物を投与するために使用される特定の方法によって部分的に決定される。したがって、抗体組成物を投与するための医薬組成物の多種多様な好適な製剤が存在する（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 18th ed., 1990を参照されたい）。医薬組成物は、一般に、無菌

で実質的に等張性として、米国食品医薬品局（U．S．Food and Drug Administration）の全ての適正製造基準（Good Manufacturing Practice）（GMP）の規制を完全に遵守して製剤化される。

【0234】

「薬学的に許容される」、「生理学的に耐えられる」という用語、及びそれらの文法的変形は、組成物、担体、希釈剤、及び試薬を指す場合、互換的に使用され、材料が、組成物の投与を禁止するほどの望ましくない生理学的効果を生じることなく、対象へ又は対象で投与できることを表す。例えば、「薬学的に許容される賦形剤」は、一般に安全、非毒性、及び望ましい医薬組成物を調製する際に有用である賦形剤を意味し、獣医学的使用において並びにヒトの薬学的使用において許容される賦形剤を含む。かかる賦形剤は、固体、液体、半固体、又はエアロゾル組成物の場合、気体であることができる。「薬学的に許容される塩及びエステル」は、薬学的に許容され、所望の薬理学的特性を有する、塩及びエステルを意味する。かかる塩には、組成物中に存在する酸性プロトンが無機又は有機塩基と反応することができる場合に形成することができる塩が含まれる。好適な無機塩には、アルカリ金属、例えば、ナトリウム及びカリウム、マグネシウム、カルシウム、並びにアルミニウムで形成されたものが含まれる。好適な有機塩には、アミン塩基、例えば、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン、N-メチルグルカミンなどの有機塩基で形成されたものが含まれる。かかる塩にはまた、無機酸（例えば、塩酸及び臭化水素酸）及び有機酸（例えば、酢酸、クエン酸、マレイン酸、並びにアルカン-及びアレ-ンスルホン酸、例えばメタンスルホン酸及びベンゼンスルホン酸など）で形成された酸付加塩が含まれる。薬学的に許容されるエステルには、抗CD3抗体中に存在するカルボキシ、スルホニルオキシ、及びホスホノキシ基から形成されたエステル、例えば、C₁-6アルキルエステルが含まれる。2つの酸性基が存在する場合、薬学的に許容される若しくはエステルは、一酸-塩若しくはエステル、又は二塩若しくはエステルであることができ、同様に、2つを超える酸性基が存在する場合、かかる基のいくつか又は全ては、塩化又はエステル化することができる。本技術において命名された抗CD3抗体は、非塩化若しくは非エステル化形態、又は塩化及び／若しくはエステル化形態で存在することができる、かかる抗CD3抗体の命名は、元の（非塩化及び非エステル化）化合物及びその薬学的に許容される塩及びエステルの両方を含むことが意図される。また、本技術の特定の実施形態は、2つ以上の立体異性体形態で存在することができ、かかる抗CD3抗体の命名は、全ての単一立体異性体及びかかる立体異性体の全ての混合物（ラセミ又はそれ以外のいずれか）を含むことが意図される。当業者であれば、本技術の特定の薬物及び組成物の投与の適切な時期、順序、及び投与量を決定することは難しくないのであろう。

【0235】

かかる担体又は希釈剤の例には、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンが含まれるが、これらに限定されない。リポソーム、及び固定油などの非水性ビヒクルも使用され得る。薬学的に活性な物質のためのかかる媒体及び化合物の使用は、当業者に周知である。いずれかの従来媒体又は化合物が抗CD3抗体と不適合である程度又は範囲を除き、組成物におけるそれらの使用が企図される。補助的な活性化化合物も、組成物中に組み込むことができる。

【0236】

本技術の医薬組成物は、その意図された投与経路と適合するように製剤化される。本技術の抗CD3抗体組成物は、非経口、局所、静脈内、経口、皮下、動脈内、皮内、経皮、直腸、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、鼻腔内、若しくは筋肉内の経路、又は吸入剤として投与することができる。抗CD3抗体は、任意選択的に、様々ながんの治療に少なくとも部分的に有効である他の薬剤と組み合わせて投与することができる。

【0237】

非経口、皮内、又は皮下適用に使用される溶液又は懸濁液は、以下の構成成分：注射用水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール

10

20

30

40

50

、若しくは他の合成溶媒などの無菌希釈剤、ベンジルアルコール若しくはメチルパラベンなどの抗細菌化合物、アスコルビン酸若しくは亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート化合物、アセタート、シトラート、若しくはホスファートなどの緩衝剤、及び塩化ナトリウム若しくはデキストロースなどの張度調整のための化合物を含むことができる。pHは、塩酸又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。非経口調製物は、ガラス又はプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、又は複数用量バイアルに封入することができる。

【0238】

注入可能な使用に好適な医薬組成物には、無菌注入可能な溶液又は分散剤の即時調製のための無菌水溶液（水溶性の場合）又は分散剤及び無菌粉末が含まれる。静脈内投与では、好適な担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany, N. J.）、又はリン酸緩衝化食塩水（PBS）が含まれる。全ての場合において、組成物は無菌でなければならず、容易なシリンジ通過性（syringeability）が存在する程度に流動性であるべきである。製造及び保存の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散剤の場合には必要とされる粒子サイズの維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌化合物及び抗真菌化合物、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合、組成物中に、等張性化合物、例えば、糖、マンニトールなどの多価アルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含めることが望ましいであろう。注入可能な組成物の長期吸収は、組成物中に、吸収を遅延させる化合物、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含むことによってもたすことができる。

10

20

【0239】

無菌注入可能な溶液は、必要な量の本技術の抗CD3抗体を、上記に列挙される成分のうちの1つ又は組み合わせとともに適切な溶媒に組み込むことによって調製することができる。必要に応じて、濾過滅菌が続けられる。一般に、分散剤は、抗CD3抗体を、塩基性分散媒及び上に列挙されるものからの必要な他の成分を含有する無菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。無菌注入可能な溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製方法は、活性成分及び既に無菌濾過された溶液からの任意の追加の所望の成分の粉末を生じる真空乾燥及び凍結乾燥である。本技術の抗体は、活性成分の持続的又は脈動的放出を可能にするような手段で製剤化することができるデポー注入又はインプラント調製物の形態で投与することができる。

30

【0240】

経口組成物は一般に、不活性希釈剤又は食用担体を含む。それらは、ゼラチンカプセルに封入するか、又は錠剤に圧縮することができる。経口治療投与の目的のため、抗CD3抗体は、賦形剤とともに組み込まれ、錠剤、トローチ、又はカプセルの形態で使用することができる。経口組成物はまた、洗口剤としての使用のための流体担体を使用して調製することができる。流体担体中の化合物は、口腔に適用され、漱いで、吐き出されるか、又は飲み込まれる。薬学的に適合する結合化合物及び／又はアジュバント材料を、組成物の一部として含むことができる。錠剤、ピル、カプセル、トローチなどは、結晶セルロース、トラガカントゴム、若しくはゼラチンなどの結合剤、デンプン若しくはラクトースなどの賦形剤、アルギン酸、プリモゲル、若しくはコーンスターチなどの崩壊性化合物、ステアリン酸マグネシウム若しくはステロート（Sterote）などの滑剤、コロイド状二酸化ケイ素などの滑沢剤、スクロース若しくはサッカリンなどの甘味性化合物、又はペパーミント、サリチル酸メチル、若しくはオレンジ香料などの香料化合物の成分、又は同様な性質の成分のうちのいずれかを含むことができる。

40

50

【0241】

吸入による投与では、抗CD3抗体は、好適な推進剤、例えば、二酸化炭素などのガスを含有する加圧容器若しくはディスペンサー、又はネブライザーからのエアロゾルスプレーの形態で送達される。

【0242】

全身投与はまた、経粘膜又は経皮手段によることができる。経粘膜又は経皮投与では、浸透させる障壁に適した浸透剤が製剤に使用される。かかる浸透剤は、当該技術分野で一般に知られており、例えば、経粘膜投与では、界面活性剤、胆汁塩、及びフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻腔スプレー又は坐剤の使用を通して達成することができる。経皮投与では、抗CD3抗体は、当該技術分野で一般に知られている軟膏、膏薬、ゲル、又はクリームに製剤化される。

10

【0243】

抗CD3抗体はまた、直腸送達のための坐剤（例えば、カカオバター及び他のグリセリドなどの従来の坐剤ベースを有する）又は停留浣腸の形態で医薬組成物として調製することができる。

【0244】

一実施形態において、抗CD3抗体は、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムを含む制御放出製剤などの、体からの迅速な排除に対して抗CD3抗体を保護する担体とともに調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生体分解性の生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤の調製方法は、当業者に明らかであろう。材料はまた、Alza Corporation及びNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手することができる。リポソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体で感染した細胞を標的とするリポソームを含む）はまた、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるように、当業者に既知の方法に従って調製することができる。

20

【0245】

本明細書に開示されるCD3多重特異性結合分子に結合したT細胞。いかなる理論にも拘束されることなく、本明細書に提供される抗CD3多重特異性結合分子（CD3×腫瘍抗原）が、例えば、本明細書に記載されるような手順によってT細胞に結合されるとき、多重特異性結合分子の抗CD3 scFvがT細胞の表面でCD3に結合すると考えられる。いかなる理論にも拘束されることなく、T細胞との多重特異性結合分子の結合（すなわち、T細胞で発現されたCD3との抗CD3 scFvの結合）がT細胞を活性化し、結果として、MHC制限を回避して、T細胞受容体ベースの細胞傷害性が所望の腫瘍標的に再指向されることを可能にすると考えられる。

30

【0246】

したがって、本開示はまた、本技術の多重特異性結合分子に結合されたT細胞を提供する。具体的な実施形態において、T細胞は、多重特異性結合分子に非共有結合的に結合される。具体的な実施形態において、T細胞は、T細胞が投与される対象に対して自家である。具体的な実施形態において、T細胞は、T細胞が投与される対象に対して同種異系である。具体的な実施形態において、T細胞は、ヒトT細胞である。

40

【0247】

具体的な実施形態において、本発明の多重特異性結合分子に結合するT細胞は、本明細書に記載される治療方法に従って使用される。具体的な実施形態において、本開示の多重特異性結合分子に結合されるT細胞は、以下に記載されるような併用療法の一部として使用される。

【0248】

T細胞の注入との併用療法を伴う具体的な実施形態において、（a）本明細書に記載の多重特異性結合分子、（b）T細胞、及び／又は（c）薬学的に有効な担体を含む、医薬組成物が本明細書に提供される。具体的な実施形態において、T細胞は、T細胞が投与さ

50

れる対象に対して自家である。特定の実施形態において、T細胞は、T細胞が投与される対象に対して同種異系である。具体的な実施形態において、T細胞は、多重特異性結合分子に結合されているか、又は結合されていない、いずれかである。具体的な実施形態において、多重特異性結合分子とのT細胞の結合は、非共有結合である。具体的な実施形態において、T細胞は、ヒトT細胞である。多重特異性結合分子をT細胞に結合させるために使用することができる方法は、当該技術分野で既知である。例えば、Lum et al., 2013, Biol Blood Marrow Transplant, 19:925-33、Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 5th edition, New York: Garland Science、Vaishampayan et al., 2015, Prostate Cancer, 2015:285193、及びStromnes et al., 2014, Immunol Rev. 257 (1): 145-164を参照されたい。

10

【0249】

具体的な実施形態において、本明細書に提供される多重特異性結合分子、多重特異性結合分子をコードするポリヌクレオチド、ベクター、若しくは細胞、又は多重特異性結合分子を含む医薬組成物の投与は、患者をT細胞注入で治療した後に行われる。具体的な実施形態において、T細胞注入は、T細胞が投与される対象に対して自家であるT細胞を用いて行われる。具体的な実施形態において、T細胞注入は、T細胞が投与される対象に対して同種異系であるT細胞を用いて行われる。具体的な実施形態において、T細胞は、本明細書に記載の多重特異性結合分子と同一の分子に結合することができる。具体的な実施形態において、多重特異性結合分子と同一の分子とのT細胞の結合は、非共有結合である。具体的な実施形態において、T細胞は、ヒトT細胞である。

20

【0250】

C. キット

本技術は、本技術の少なくとも1つの免疫グロブリン関連組成物（例えば、本明細書に記載の任意の抗体又は抗原結合断片）、又はその機能的バリエーション（例えば、置換バリエーション）を含む、CD3の検出及び／又はがんの治療のためのキットを提供する。任意選択的に、本技術のキットの上述の構成成分は、好適な容器にパッケージングされ、がんの治療について表示される。上記の構成成分は、水性の、好ましくは無菌の溶液として、又は再構成のための凍結乾燥された、好ましくは無菌の製剤として、単位又は複数用量の容器、例えば、密封したアンプル、バイアル、ボトル、シリンジ、及び試験管に保存され得る。キットは、医薬組成物をより大きい体積に希釈するのに好適な希釈剤を保持する第2の容器を更に含み得る。好適な希釈剤には、医薬組成物の薬学的に許容される賦形剤及び生理食塩水が含まれるが、これらに限定されない。更に、キットは、医薬組成物を希釈するための説明書、及び／又は希釈されるかどうかにかかわらず、医薬組成物を投与するための説明書を含み得る。容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得、無菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液バッグ、又は皮下注射針によって穿刺され得るストッパーを有するバイアルであり得る）。キットは、リン酸緩衝化食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液などの薬学的に許容される緩衝液を含む、より多くの容器を更に含み得る。それは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、好適な宿主のうちの1つ以上のための培地を含む、商業的及びユーザの観点から望ましい他の材料を更に含み得る。キットは、任意選択的に、例えば、かかる治療用製品又は診断用製品の適応症、使用法、投与量、製造、投与、禁忌、及び／又はその使用に関する警告についての情報を含む、治療用製品又は診断用製品の商用パッケージに通例含まれる説明書を含み得る。

30

40

【0251】

キットは、例えば血清、血漿、リンパ、囊胞液、尿、糞便、脳脊髄液、腹水、又は血液、体組織からの生検試料を含むが、これらに限定されない生体試料における免疫反応性CD3タンパク質の存在の検出するために有用である。例えば、キットは、生体試料中のC

50

D 3 タンパク質に結合することができる本技術の 1 つ以上のヒト化、キメラ、又は二重特異性抗 C D 3 抗体（又はその抗原結合断片）と、試料中の C D 3 タンパク質の量を決定するための手段と、試料中の免疫反応性 C D 3 タンパク質の量を標準と比較するための手段と、を含むことができる。抗 C D 3 抗体のうちの 1 つ以上が、標識され得る。キット構成成分（例えば、試薬）は、好適な容器にパッケージングすることができる。キットは、キットを使用して免疫反応性 C D 3 タンパク質を検出するための説明書を更に含むことができる。

【0252】

抗体ベースのキットでは、キットは、例えば、1) C D 3 タンパク質に結合する固体支持体に結合した、本技術の第 1 の抗体、例えば、ヒト化、キメラ、又は二重特異性 C D 3 抗体（又はその抗原結合断片）と、任意選択的に、2) C D 3 タンパク質又は第 1 の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識にコンジュゲートされている第 2 の異なる抗体と、を含むことができる。

10

【0253】

キットはまた、例えば、緩衝剤、保存剤、又はタンパク質安定化剤を含むことができる。キットは、検出可能な標識、例えば、酵素又は基質を検出するために必要な構成成分を更に含むことができる。キットはまた、アッセイして、試験試料と比較することができる、対照試料又は一連の対照試料を含むことができる。キットの各構成成分は、個々の容器内に封入することができ、様々な容器の全ては、キットを使用して行われるアッセイの結果を解釈するための説明書とともに、単一のパッケージ内にあることができる。本技術のキットは、キット容器の上、又は中に記載物を含み得る。記載物は、例えば、インビトロ若しくはインビボでの C D 3 タンパク質の検出のために、又はがんの治療を必要とする対象におけるがんの治療のために、キットに含まれる試薬を使用する方法を説明する。特定の実施形態において、試薬の使用は、本技術の方法に従うことができる。

20

【実施例】

【0254】

本技術は、以下の実施例によって更に例示されるが、これは、決して限定するものとして解釈されるべきではない。以下の実施例は、本技術の例示的な抗 C D 3 抗体の調製、特性評価、及び使用を示す。以下の実施例は、本技術のキメラ、ヒト化、及び二重特異性抗体の産生、並びにそれらの結合特異性及びインビトロ及びインビボ生物学的活性の特性評価を実証する。

30

【0255】

実施例 1：マウス S P 3 4 のヒト化

ネズミ抗 C D 3 抗体である S P 3 4 の相補性決定領域（C D R）、超可変ループ、及びフレームワーク領域（F R）を、可変配列内で分析し、K a b a t 描写システムにより特定した。ネズミ抗体の C D R を、ネズミ対応物（例えば、I G H V 3 - 7 3 * 0 1 及び I G L V 7 - 4 3 * 0 1）と最も高い配列同一性を共有する重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）を使用して、ヒトアクセプターフレームワークに直接移植した。次いで、相同性モデリングを行い、マウス抗体のモデル化された構造を取得し、フレームワーク残基の溶媒アクセス可能な表面積を計算して、埋められたフレームワーク残基を特定した。次いで、移植抗体フレームワーク配列及びマウス抗体フレームワーク配列において異なる V_H 及び V_L ドメイン配列における重要な残基を特定し、逆変異させた。最後に、移植された配列を、N-グリコシル化部位、翻訳後修飾、及び移植抗体の結合活性に影響を及ぼし得る対合していないシステイン残基などの潜在的な傾向について検査した。

40

【0256】

最初に、抗 C D 3 クローンの親和性測定は、表面プラズモン共鳴（S P R）バイオセンサー、B i a c o r e 8 K（G E H e a l t h c a r e）を使用して決定した。平衡解離定数（K D）は、k_aに対する k_dの比から計算した。特定の残基の抗体親和性及び発現への寄与を決定するために、パラトープマッピングを、N N K ライブラリのスクリーニングによって行った。簡潔に述べると、親抗体の V_H 及び V_L は、N C B I I g - B

50

last (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/igblast/) を使用して検索され、CDRは、KABAT描写システムによって定義された。CDR内の全ての残基を定義し、NNK法によって変異させた。各個々のNNKライブラリを、20の理論的多様性を有するFASEBAプラットフォームに基づいて残基毎に生成した。重鎖及び軽鎖の両方をコードするDNAを哺乳類発現ベクターに挿入し、CHO-S細胞にトランスフェクトし、最高発現の安定したクローンを選択した。上清をシェーカーフラスコから収集し、プロテインA親和性クロマトグラフィーで精製した。

【0257】

96ディープウェルプレートにおけるE. coliでの発現のために、48を超えるクローンを各NNKライブラリからランダムに選択した。次いで、全てのクローンを配列決定し、固有のクローンを選択した。発現及び結合特異性の評価のために、培地中で分泌される粗製の選択されたタンパク質を、それぞれ、ウシ血清アルブミン(BSA)、及びヒト及びカニクイザル抗原タンパク質に対するELISAによって分析した。抗体発現を損なうことなく、抗体親和性を減少させる「有益な変異体」は、スクリーニング及び親和性順位付けを介して、GenScriptの発現レベル、生物物理学的特性、及び親和性のための迅速なスクリーニング(Fast Screening for Expression level, Biophysical properties, and Affinities) (FASEBA) プラットフォームによって確認された。

【0258】

本技術のヒト化SP34バリエーションの例示的な重鎖可変ドメイン(V_H)及び軽鎖可変ドメイン(V_L)アミノ酸配列が、図1に記載される。ABP100s.10.0の抗CD3 V_H及びV_L配列(それぞれ、配列番号22及び配列番号28)は、親SP34クローンを表す。

【0259】

実施例2：本開示の抗CD3免疫グロブリン関連組成物の生化学的及び機能的特徴付け

熱安定性。有益な変異体を選択し、発現上清を42℃で24時間インキュベートすることによって、熱安定性について評価した。インキュベーション後、上清を4500rpmで遠心分離し、未溶解物質を廃棄した。熱処理され、精製された全長二重特異性抗体をその濃度について再評価し、ヒト及びカニクイザルCD3に対する熱処理による試料の親和性順位付けを行った。表2を参照されたい。

【0260】

親和性順位付け。親及び親和性調整二重特異性抗体とヒト及びカニクイザル標的タンパク質(HER2及びCD3)との間の結合をELISAによって検証し、Biacore 8Kを使用して、抗原と二重特異性抗体との間の相互作用の動態を研究した。表2及び図2を参照されたい

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2

捕捉	分析物	Chi ² (RU ²)	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)	Rmax(RU)
ScFv-Fc	HuCD3E	1.04E+00	2.27E+05	2.69E-04	1.19E-09	147.2
VH2(配列番号 21)+VL6(配列番号 19)	HuCD3E	9.57E-01	3.52E+05	3.57E-04	1.01E-09	79
VH2(配列番号 21)+VL6(配列番号 19)42℃	HuCD3E	NA	NA	NA	NA	NA
VH3(配列番号 18)+VL4(配列番号 20)	HuCD3E	4.69E-01	1.92E+05	3.31E-04	1.72E-09	142.6
VH3(配列番号 18)+VL4(配列番号 20)42℃	HuCD3E	1.19E-01	2.32E+05	3.49E-04	1.50E-09	62.5
VH3(配列番号 18)+VL6(配列番号 19)	HuCD3E	3.82E-01	2.29E+05	2.86E-04	1.25E-09	112.5
VH3(配列番号 18)+VL6(配列番号 19)42℃	HuCD3E	5.22E-01	2.49E+05	3.43E-04	1.38E-09	79.7
ScFv-Fc	CynoCD3E	2.10E+00	2.44E+05	3.93E-04	1.61E-09	139.5
VH2(配列番号 21)+VL6(配列番号 19)	CynoCD3E	1.65E+00	4.83E+05	8.21E-04	1.70E-09	87
VH2(配列番号 21)+VL6(配列番号 19)42℃	CynoCD3E	NA	NA	NA	NA	NA
VH3(配列番号 18)+VL4(配列番号 20)	CynoCD3E	6.42E-01	2.34E+05	5.01E-04	2.14E-09	141
VH3(配列番号 18)+VL4(配列番号 20)42℃	CynoCD3E	1.79E-01	2.57E+05	4.90E-04	1.90E-09	61.9

【表 2 - 2】

VH3(配列番号 18)+VL6(配列番号 19)	CynoCD3E	8.97E-01	2.74E+05	4.69E-04	1.71E-09	117.6
VH3(配列番号 18)+VL6(配列番号 19)42℃	CynoCD3E	4.97E-01	3.59E+05	4.89E-04	1.36E-09	75.2

【 0 2 6 1】

実施例 3：がんを治療するための本開示の免疫グロブリン関連組成物の使用

腫瘍抗原（例えば、HER2）／CD3 結合、T 細胞活性化、T 細胞媒介性殺傷、及び
サイトカイン産生に対する、試験した各二重特異性抗体クローン（例えば、抗HER2×
CD3 BsAb）の様々なCD3 親和性の影響を、様々なレベルの腫瘍抗原（例えば、

HER2)を発現する腫瘍細胞株の存在下又は不存在下で調べた。SKBR3及びHCC1954は、高密度Her-2発現細胞株を表すが(Ram et al., MAb s. 20146(5):1211-1219)、MCF-7及びHT55は、Her2を発現する内因性非がん細胞と同様の発現レベルを有する低密度Her2発現細胞を表す。NFAT T細胞受容体活性化アッセイ、細胞傷害性アッセイ、及びサイトカインアッセイについての以下のデータからの全てのp値は、Graphpad Prism Version 9.4.0上で実行したTukeyの多重比較法を用いた二元配置ANOVAから導かれた。ABP100s.10.0の抗CD3 V_H及びV_L配列(それぞれ、配列番号22及び配列番号28)を含む抗HER2×CD3 BsAbは、親クローンを表し、本明細書では10.0と略される。ABP100s.10.5.1及びABP100s.10.6.1(CD3に対する親和性が低減されている)のV_H及びV_L配列を含む抗HER2×CD3 BsAbは、それぞれ、10.5.1及び10.6.1と略される。

10

【0262】

CD3/T_{CR} NFAT T細胞活性化レポーターアッセイ:本技術の抗CD3二重特異性抗体によるT細胞活性化を評価するために、T細胞活性化バイオアッセイキット(Promega J1621/J1625)を、T_{CR}/CD3 Jurkatエフェクター細胞(NFATレポーター)とともに使用し、Bio-Gloルシフェラーゼアッセイシステム(Promega G7941)を使用して検出した。簡潔に述べると、白色底/チムニー(白色)TC処理プレート(Corning 3917)を使用して、40,000個の標的細胞(Her2-高:SK-BR-3、HCC1954;Her2-低:MCF-7、HT55)を100μL培地中で一晚プレティングし、標的細胞を含まない条件でも使用した。次いで、アッセイを、アッセイキットとともに提供される詳細な指示に従って行い、7時間のインキュベーション、続いて発光読み出しを行った。

20

【0263】

一般に、より高い量のHer2を発現する標的細胞では、より高いT細胞活性化が見られた(図3A~3B)。特に、10.5.1及び10.6.1クローン(CD3への低減された結合親和性を示す)は、Her2-高標的(SK-BR-3、HCC1954)で親構築物(10.0クローン)からわずかに減少したのみで、全てのクローンの全ての活性化読み出しは、調べた最高用量(40nM)で300,000~600,000RLU以内であった(図3A~3B)。Her2-低標的細胞では、10.0構築物は、わずかに低い活性化の場合でも同様の活性化を示した(MCF-7及びHT-55細胞株の両方で40nMで約300,000RLU)。対照的に、10.5.1及び10.6.1構築物は、Her2-低標的細胞(HT55、MCF-7;図3C~3D)上で40nM(約100,000RLU)(10.5.1対10.0及び10.6.1対10.0の両方の比較でp<0.0001)で有意に低い活性化を示し、アイソタイプ対照と統計的に異ならず、標的細胞の不存在下で見られるバックグラウンド活性化と同様であった(図3E)。まとめると、これらのデータは、低Her2発現細胞における10.5.1及び10.6.1誘導T細胞活性化の欠如と一致する。

30

【0264】

T細胞依存性細胞傷害性(TDCC):Her2発現標的細胞のT細胞媒介性殺傷を媒介する抗HER2×CD3二重特異性抗体のインビトロ機能的能力を評価するために、CD3+T細胞でT細胞依存性細胞傷害性(TDCC)アッセイを行った。標的細胞を、100μL培地中10,000個の細胞/ウェルで白色底/チムニー組織培養処理プレート(Corning 3917)にプレティングし、一晚インキュベートした(Her2-高:SK-BR-3、HCC1954;Her2-低:MCF-7、HT55)。二重特異性抗体を、RPMI1640/10%熱不活性化FBS中で希釈した(範囲:30、0.3、0.003、0.00003nMの最終濃度)。培養培地を標的細胞から除去し、二重特異性抗体を100μLで添加し、続いて5対1のエフェクター:標的比(T細胞:標的細胞)で精製されたヒト凍結保存T細胞(StemCell Technologies 70024)を添加した。検出は、SpectraMax iD3プレートリーダー

40

50

ー上で、CellTiterGlo2.0 (Promega) 及び発光検出を用いて40時間で行った。示される図中の結果は、3つの異なるドナーCD3+T細胞試料を用いて行われた実験を表す。

【0265】

SK-BR-3 標的細胞では、10.5.1 及び 10.6.1 は、40 nM での親構築物 (10.0) と比較して、殺傷におけるわずかであるが有意な (10.0 対 10.5.1: $p=0.0042$; 10.0 対 10.6.1: $p=0.0002$) 減少を示したのみであり (図 4A)、10.5.1 及び 10.6.1 クローンによる高 Her2 発現細胞の意図された標的化と一致していた。40 nM の Her2-低 (HT55、MCF-7) 標的細胞では、アイソタイプ対照殺傷レベルと 10.5.1 及び 10.6.1 の殺傷レベルとの間に有意差はなかった (図 4C~4D)。対照的に、MCF-7 及び HT-55 細胞株の両方で同じ用量で、これらのクローンの両方が、親の 10.0 クローンと比較して有意に低減された殺傷を示し ($p<0.0001$: 10.0 対 10.5.1 及び 10.0 対 10.6.1 について) (図 4C~4D)、CD3 変異クローンによる低 Her2 発現細胞株の殺傷がほとんど又は全くなかったことを示す。

10

【0266】

ヒト PBMC での Her2-高 及び Her2-低 の標的細胞株におけるマルチプレックスサイトカイン検出アッセイ及び関連する細胞傷害性。抗 HER2×CD3 二重特異性抗体構築物によって媒介されるサイトカイン放出を分析するために、ヒト PBMC を、SKBR-3 (Her2-高) 及び MCF-7 (Her2-低)、並びに「標的細胞なし」条件で可溶性抗体と接触させた。モノクローナル抗 CD3 / 抗 CD28 抗体は、対照として機能した。簡潔に述べると、SKBR-3 (Her2-高) 及び MCF-7 (Her2-低) 標的細胞株を、アッセイの前夜にプレATINGした。二重特異性抗体を、RPMI 1640 / 10% 熱不活性化 FBS 中で希釈した (範囲: 30、0.3、0.003、0.00003 nM の最終濃度)。培養培地を標的細胞から除去し、二重特異性抗体を 100 μ L で添加し、続いて RPMI / 10% HI FBS 中の白色-チムニー / 底プレートにヒト PBMC (1ドナー、Stem Cell Technologies PBMC 約 5×10^7 個の細胞 / バイアル) (10:1 E:T 比; 100,000 PBMC:10,000 個の標的細胞) を添加した。培養上清を、Magpix (Luminex) を使用したシグナル検出、及び Luminex xMAP ソフトウェアを使用した標準ウェルと比較したピコグラム / mL のサイトカインの定量化と併せて、マルチプレックスビーズベースのサイトカイン放出アッセイ (R&D Systems Human High Sensitivity Cytokine Base Kit B: IFN- γ 、IL-2、TNF- α 、IL-6、GM-CSF) のために、24 時間で採取し、-80°C で凍結させた。CellTiterGlo2.0 (Promega) を使用して、SpectraMax iD3 プレートリーダー上での発光検出を用いた TDC 細胞傷害性 % 評価のためのアッセイを開発した。示される図中の結果は、3つの異なるドナー PBMC 試料を用いて行われた実験を表す。細胞傷害性及びサイトカイン放出結果を Excel にまとめ、GraphPAD PRISM においてグラフ化した。

20

30

【0267】

T細胞エンゲージャー投与に関連する過剰なサイトカイン産生は、T細胞エンゲージャー、サイトカイン放出症候群 (CRS) の一次毒性をもたらす可能性があるため、高 (SKBR3) 又は低 (MCF-7) Her2 レベルを発現する腫瘍細胞株及びヒト PBMC の存在下で、サイトカイン産生に対する CD3 の弱化した親和性の影響を調べた。

40

【0268】

親 10.0 クローン、CD3 弱化親和性 10.5.1 及び 10.6.1 クローンは全て、HER2-高 SKBR3 細胞の存在下でアイソタイプ対照 (バックグラウンドサイトカイン産生を表す対照) よりも有意に高かったサイトカイン産生を刺激した (図 5A~5D)。しかしながら、HER2-低 MCF-7 細胞の存在下では、10.0 クローンのみが、アイソタイプ対照と比較して有意にサイトカイン産生の増加を示し、本技術の CD3 弱

50

化クローン（例えば、10.5.1及び10.6.1クローン）のサイトカイン産生を刺激する能力の低減を示した（図5E～5H）。

【0269】

30 nMでは、全てのCD3親和性弱化クローンは、MCF-7細胞の存在下で、有意に低減されたIL-2、IFN- γ 、及びTNF- α の産生を示した（ $p < 0.0001$ ：10.0対10.5.1及び10.0対10.6.1について）。重要なことに、免疫調節剤に関連するCRSの重要な媒介物であるサイトカインであるIL-6の産生（Morris et al., Nat Rev Immunol 2022; 22(2): 85-96）は、MCF-7細胞の存在下で10.0と比較して、CD3親和性弱化クローン10.5.1及び10.6.1で有意に低減された（それぞれ、 $p = 0.0432$ 及び $p = 0.029$ ）（図5F）。「標的細胞なし」条件は、二重特異性抗体を有するPBMCが単独でサイトカイン放出を促進しないことを示した。SKBR-3（Her2-高）標的細胞について、細胞傷害性は、親構築物（10.0）と比較して、10.5.1及び10.6.1で同等であった。本技術のCD3親和性弱化配列が、他の腫瘍抗原（例えば、CLDN18.2、GPC-3など）とともに二重特異性抗体フォーマットに組み込まれるとき、同様の結果が期待される。

【0270】

これらの結果は、これらの薬剤が、内因性、非がん組織レベルの腫瘍抗原（例えば、HER2）を有する低腫瘍抗原（例えば、HER2）発現組織を温存しながら、高腫瘍抗原（例えば、HER2）発現細胞に応答して選択的にサイトカインを殺傷及び産生し、したがって、臨床におけるオンターゲット、正常組織に対する毒性（off-tumor）を低減することによって、高腫瘍抗原（例えば、HER2）発現がんを有する患者を治療する場合にCRSの発生率を低減するのに有用であることを実証する。

【0271】

活性化T細胞及びHer-2発現標的細胞に結合する二重特異性抗体のフローサイトメトリー分析。二重特異性抗体の活性化T細胞へのフローサイトメトリー結合を評価するために、ヒトPBMC（StemCell Technologies 70025.2）を、12日間にわたってOKT3/IL-2刺激プロトコルを用いて刺激した。簡潔に述べると、PBMCを、100IU/mLの組換えヒトIL-2（Stemcell Technologies、カタログ番号78145.1）及び20ng/mLのOKT3（Biolegend、マウスIgG2a、カタログ番号317326）で、可溶性フォーマットで3日間活性化し、その後、RPMI1640/10%FBS中で細胞を 1×10^6 個の細胞/mLに正規化することによって、新鮮な培地及びIL-2のみを使用することによって拡大/維持した。活性化T細胞を凍結保存し、液体窒素冷凍庫に保存した。アッセイの日に、T細胞を解凍し、洗浄し、続いて、希釈した二重特異性抗体で染色した（最初の作業ストックは、120nMの最終濃度で240nM（2倍）であり、FACS緩衝液中で1:10で連続希釈し、合計7回の連続希釈を行った）。細胞を、一次抗体で、冷PBS/1%BSA中で4℃で30分間染色し、続いて、洗浄し、冷PBS/1%BSA中で、4℃で30分間、1:250の二次抗体（抗ヒトIgG-PE、Thermo Fisher Scientific）を添加した。洗浄ステップの後、細胞を150 μ LのPBS/1%BSA中に再懸濁し、96ウェルのV底プレートを備えるFACS Cella HTSシステム上でPEシグナルを検出する。アッセイの前に、生/死をBV421チャンネル（Zombie violet、Thermo Fisher Scientific）又はTrypan Blueを使用して評価した

【0272】

Her2-高（SKBR-3、SKOV-3）及びHer2-低（MCF-7、HT55）を含む細胞株への二重特異性抗体のフローサイトメトリー結合を評価するために、ATCCプロトコルに従って、細胞をそれぞれの培養培地中で70～80%コンフルエンスまで成長させた。細胞株をAccutaseで処理して、フローサイトメトリーのために細胞表面エピトープを保存した。細胞を5mLのPBS（BSAなし）中に再懸濁し、1

：1000希釈のLive/Dead Zombie色素(Biolegend)で、室温で20分間染色した。次いで、細胞を洗浄し、正規化して、96ウェルのV底プレート上に100,000個の細胞/ウェルを添加し、一次抗体で、冷PBS/1%BSA中で4℃で30分間染色した。これに続いて、洗浄し、1:250の二次抗体(抗ヒトIgG-PE、Thermo Fisher Scientific)を、冷PBS/1%BSA中で4℃で30分間添加した。洗浄ステップの後、細胞を150μLのPBS/1%BSA中に再懸濁し、96ウェルのV底プレートを備えるFACS Celesta HTSシステム上でPEシグナルを検出する。アッセイの前に、生/死をBV421チャネル(Zombie violet、Thermo Fisher Scientific)又はTrypan Blueを使用して評価した分析をFlowJoソフトウェアで行い、PE(抗ヒトIgG-PE)中央値(MFI)の値を得た後、Microsoft Excel及びGraphPad Prism softwareのGraphPad PRISMソフトウェアでデータを整理し、プロットした。

10

【0273】

結果：活性化T細胞結合は、親構築物(10.0クローン)と比較して、10.5.1及び10.6.1について低減された(図6E)。10.5.1及び10.6.1で観察されるT細胞結合の低減は、親和性の低減を示すCD3アームを有することに少なくとも部分的に起因し得る。

【0274】

Her2-高(SK-BR-3、SK-OV-3)細胞株に結合する標的細胞株は、親構築物(10.0)と比較して、10.5.1及び10.6.1構築物でわずかに低減した(約100nMの濃度で10.0と比較して、両方のクローンについてMFIが約33%低減した)(図6A~6B)。Her2-低(MCF-7、HT55)標的細胞株に結合する標的細胞株は、親構築物(10.0)と比較して、10.5.1及び10.6.1構築物で大幅に低減した(約100nMの濃度で10.0と比較して、両方のクローンについてMFIが約84%低減した)(図6C~6D)。これらの結果は、CD3親和性弱化HER2×CD3構築物(10.5.1、10.6.1)が、Her2-高標的細胞株についての選択性に寄与し、細胞傷害性を増強するためにCD3+T細胞に結合する能力を維持する特性を有することを実証する。親和性弱化構築物10.5.1及び10.6.1は、親構築物と比較した場合、Her2-低標的細胞上での低減された細胞傷害性及びサイトカイン放出を示す。

20

30

【0275】

まとめると、10.5.1及び10.6.1と同等の親和性を有する、図2に記載のCD3低減親和性二重特異性抗体配列は、NFAT活性化、TDCC、及び/又はFACSのうちの少なくとも1つにおいて、10.5.1及び10.6.1クローンと同様の挙動を示すと予想される。

【0276】

実施例4：本技術のHER2親和性調整二重特異性抗体のインビボ有効性

インビボ有効性は、ヒトPBMC又は単離されたT細胞をエフェクター細胞として使用し、様々な程度のHER2発現を有するHER2発現腫瘍細胞株を使用して二重特異性活性をモデル化する二重異種移植片モデルにおいて試験される。KPL-4及び/又はHC1954腫瘍細胞は、高HER2発現細胞として使用され、MCF7又はHT55細胞は、HER2の低発現又は内因性発現を有する細胞の殺傷を温存しながら、高HER2発現細胞の選択的殺傷があることを予想して、低レベル又は内因性レベルの発現細胞として使用される。1~500万個の腫瘍が皮下に移植され、エフェクター細胞は、皮下移植の前に腫瘍細胞と予め混合されるか、又は静脈内に養子移植され、腫瘍のみが皮下に移植されるかのいずれかである(1:2又は1:3のPBMC:腫瘍(E:T)比)。腫瘍細胞及びPBMCの移植後、CD3親和性弱化クローンを含む様々なHer2 BsAbの異なる用量レベル(少なくとも5mg/kg~0.005mg/kgを含む範囲)をマウスに投与する。用量は、週に1回以上、1週間以上、非経口(例えば、i.v.又はi.p

40

50

。)で投与される。腫瘍体積は、研究の期間にわたって測定される。一次データ読み出しは、キャリパーによって測定されるように、経時的な腫瘍体積の成長の阻害である。並行して、キメラ同系モデルを使用して活性を確認する。このモデルは、ヒトHER2をトランスジェニックに発現するマウス胃腫瘍細胞株(MC38)と、ヒトCD3εのみ又はヒトCD3ε、CD3δ、及びCD3γのいずれかでヒトCD3を発現するマウスとの使用を伴い、二重特異性が、ヒトCD3のマウスT細胞発現を介してマウスT細胞に直接結合することを可能にする。

【0277】

親10.0クローンは、本技術のCD3低減親和性構築物を含む抗HER2 BsAbが高Her2腫瘍の成長を選択的に阻害するが、低Her2発現腫瘍に対する成長阻害活性がほとんど又は全くない用量で、高Her2発現腫瘍細胞及び低Her2発現腫瘍細胞の両方の成長を非選択的に阻害することが予想される。また、親10.0クローンと比較して、本技術のCD3低減親和性構築物を含む抗HER2 BsAbを投与された動物において、IL-2、IL-6、IFN-γ、及びTNF-αなどのサイトカインのレベルが低減することが予想される。

【0278】

これらの結果は、本技術の抗CD3免疫グロブリン関連組成物を使用してがんを治療することができることを実証する。

【0279】

等価物

本技術は、本出願に記載される特定の実施形態に関して限定されるべきではなく、本出願は、本技術の個々の態様の1つの例示として意図される。本技術の多くの修正及び変化は、当業者に明らかであるように、その趣旨及び範囲から逸脱することなく行うことができる。本明細書に列挙されるものに加えて、本技術の範囲内の機能的に等価な方法及び装置は、前述の説明から当業者に明らかであろう。かかる修正及び変化は、本技術の範囲内であることが意図される。本技術は、勿論、変化し得る特定の方法、試薬、化合物組成物、又は生物系に限定されるものではないことを理解されたい。本明細書に使用される用語が、単に特定の実施形態を記載する目的のためであり、制限することが意図されないことも理解されたい。

【0280】

加えて、本開示の特徴又は態様がマーカッシュ群の観点から記載される場合、当業者であれば、本開示が、それによって、マーカッシュ群の任意の個々の構成要素又は構成要素のサブグループの観点からも記載されることを認識するであろう。

【0281】

当業者によって理解されるように、任意及び全ての目的のために、特に書面による説明を提供するという点で、本明細書に開示される全ての範囲はまた、任意及び全ての可能なサブ範囲及びそのサブ範囲の組み合わせも包含する。任意の列挙された範囲は、同じ範囲が少なくとも等しい2分の1、3分の1、4分の1、5分の1、10分の1などに分類されることを十分に示し、可能にするものとして、容易に認識することができる。非限定的な例として、本明細書で考察される各範囲は、容易に、下側の3分の1、中間の3分の1、及び上側の3分の1などに分類することができる。また、当業者によって理解されるように、「最大」、「少なくとも」、「より大きい」、「より少ない」などの全ての言語は、列挙される数を含み、続いて、上述のようにサブ範囲に分類され得る範囲を指す。最後に、当業者に理解されるように、範囲は各個別の数を含む。したがって、例えば、1～3個の細胞を有する群は、1、2、又は3個の細胞を有する群を指す。同様に、1～5個の細胞を有する群は、1個、2個、3個、4個、又は5個などの細胞を有する群を指す、などなど。

【0282】

本明細書に言及又は引用される全ての特許、特許出願、仮出願、及び刊行物は、本明細書の明示的な教示と矛盾しない限り、全ての図及び表を含む、それらの全体が参照により

10

20

30

40

50

組み込まれる。

【図面】

【図 1 - 1】

【図 1】

図 1	
クローム名	CD3Vfl aas seq
ABP100s.1	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKSLYLOM NSLKTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 13)
ABP100s.2	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKSLYLOM NSLKTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 15)
ABP100s.3	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKSLYLOM NSLKRAEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 16)
ABP100s.4	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKSLYLOM NSLKRAEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 17)
ABP100s.5	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKNTAYLOM MSLKSTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 18)
ABP100s.6	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKNTAYLOM MSLKSTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 18)
ABP100s.7	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQASGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKNTAYLOM MSLKSTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 21)
ABP100s.5.1	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKNTAYLOM MSLKSTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 22)
ABP100s.5.2	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKNTAYLOM MSLKSTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 24)
ABP100s.5.3	EVQLVSGGGLVPGGSKLLSCAASGEFT NTYAMNWWVQAPRGKLEWVARIRSKYN NYATYADSVSKDRFTISRDDSKNTAYLOM MSLKSTEDTAVVYCVRHGNEFGNSYSWFE LWQGGTLTVTSS (配列番号 18)
	CD3Vfl aa seq
	QAVVVOEPTSPFSVSGGTVTLTCSGSGTAVTSS YANWVQQTQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITGGAQADESDYFCALWYSN LWYFGGGTKLTVL (配列番号 14)
	QAVVVOEPTSPFSVSGGTVTLTCSGSGTAVTSS YANWVQQTQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITGGAQADESDYFCALWYSN LWYFGGGTKLTVL (配列番号 14)
	QAVVVOEPTSPFSVSGGTVTLTCSGSGTAVTSS YANWVQQTQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITGGAQADESDYFCALWYSN LWYFGGGTKLTVL (配列番号 14)
	QAVVVOEPTSPFSVSGGTVTLTCSGSGTAVTSS YANWVQQTQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITGGAQADESDYFCALWYSN LWYFGGGTKLTVL (配列番号 14)
	QAVVVOEPTSPFSVSGGTVTLTCSGSGTAVTSS YANWVQQTQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITGGAQADESDYFCALWYSN LWYFGGGTKLTVL (配列番号 14)
	QTVVVOEPTSLVSPGGTVTLTCSRSGTAVTSS YANWVQKQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITSGVQPEDEAIFYCALWYSN LWYFGGGTKLEIK (配列番号 19)
	QTVVVOEPTSLVSPGGTVTLTCSRSGTAVTSS YANWVQKQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITSGVQPEDEAIFYCALWYSN LWYFGGGTKLEIK (配列番号 20)
	QTVVVOEPTSLVSPGGTVTLTCSRSGTAVTSS YANWVQKQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITSGVQPEDEAIFYCALWYSN LWYFGGGTKLEIK (配列番号 19)
	QTVVVOEPTSLVSPGGTVTLTCSRSGTAVTSS YANWVQKQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITSGVQPEDEAIFYCALWYSN LWYFGGKLTLEIK (配列番号 23)
	QTVVVOEPTSLVSPGGTVTLTCSRSGTAVTSS YANWVQKQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITSGVQPEDEAIFYCALWYSN LWYFGGGTKLEIK (配列番号 25)
	QTVVVOEPTSLVSPGGTVTLTCSRSGTAVTSS YANWVQKQQAARFLGIGLNKRAPGVPRF SGSLGDLKAAALITSGVQPEDEAIFYCALWYSN LWYFGGGTKLEIK (配列番号 26)

【圖 1-2】

【図1（続き）】

[illegible]

50

【図 1 - 7】

【図 1（続き）】

図 1		
クローン名	CD3 VII aa seq	CD3 VL aa seq
ABP100s.22	EVQLVESGGGLVQP GG SLRLSCAASGTEF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDSKSSLYLQM NSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTILTVSS (配列番号 15)	QAVVTQEP SF SVSPGGTVTLTCGSSTGAVTISN YANWVQQT PG QAFRGLIGGTINKRASGVDPDF SGSLLGDKAALITITGAQADDES DY YCALWYS NLWYFGGGTKLTVL (配列番号 47)
ABP100s.23	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGTEF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDSKSSLYLQM NSLRADDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTILTVSS (配列番号 16)	QAVVTQEP SF SVSPGGTVTLTCGSSTGAVTISN YANWVQQT PG QAFRGLIGGTINKRASGVDPDF SGSLLGDKAALITITGAQADDES DY YCALWYS NLWYFGGGTKLTVL (配列番号 47)
ABP100s.24	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGTEF NTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRFTISRDDAKSSLYLQ MNSLRADDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA AYWGQGTILTVSS (配列番号 17)	QAVVTQEP SF SVSPGGTVTLTCGSSTGAVTISN YANWVQQT PG QAFRGLIGGTINKRASGVDPDF SGSLLGDKAALITITGAQADDES DY YCALWYS NLWYFGGGTKLTVL (配列番号 47)

【図 2 - 1】

【図 2】

図 2			
クローン名	ジスルフィド置換	CD3親和性 (高/ 低/中)	Kd
ABP100s.1	n/a	高	<10nM
ABP100s.2	n/a	高	<10nM
ABP100s.3	n/a	高	<10nM
ABP100s.4	n/a	高	<10nM
ABP100s.5	n/a	高	<10nM
ABP100s.6	n/a	高	<10nM
ABP100s.7	n/a	高	<10nM
ABP100s.5.1	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.5.2	Q105C (CD3 VH), A43C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.5.3	n/a	低	>100nM
ABP100s.5.4	n/a	高	<10nM
ABP100s.10.0	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.1	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.2	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.3	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM

【図 2 - 2】

【図 2（続き）】

図 2			
クローン名	ジスルフィド置換	CD3親和性 (高/ 低/中)	Kd
ABP100s.10.4	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.5	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.6	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.0.1	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.0.2	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.0.3	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.0.4	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.0.5	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	低	>100nM
ABP100s.10.0.6	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	低	>100nM
ABP100s.10.5.1	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM

【図 2 - 3】

【図 2（続き）】

図 2			
クローン名	ジスルフィド置換	CD3親和性 (高/ 低/中)	Kd
ABP100s.10.5.2	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.5.3	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.5.4	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.5.5	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	低	>100nM
ABP100s.10.5.6	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	低	>100nM
ABP100s.10.6.1	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.10.6.2	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.6.3	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.6.4	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	中	10 - 100nM
ABP100s.10.6.5	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	低	≥100nM

10

20

30

40

50

【図 2 - 4】

【図 2（続き）】

図 2			
クローン名	ジスルフィド置換	CD 3 親和性 (高 / 低 / 中)	Kd
ABP100s.10.6.6	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	低	≥100nM
ABP100s.11.0	n/a	高	<10nM
ABP100s.11.5	n/a	高	<10nM
ABP100s.12.0	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
ABP100s.12.5	G44C (CD3 VH), G100C (CD3 VL)	高	<10nM
32G4-V8 x huSP34-v5	n/a	高	<10nM
47D10-V7 x huSP34-v5	n/a	高	<10nM
32G4-V8 x huSP34-v5 (N297A, K322A)	n/a	高	<10nM
47D10-V7 x huSP34-v5 (N297A, K322A)	n/a	高	<10nM
32G4-V8-v5.1	n/a	高	<10nM
32G4-V8-v5.2	n/a	中	10 - 100nM
32G4-V8-v5.3	n/a	中	10 - 100nM
32G4-V8-v5.4	n/a	中	10 - 100nM
32G4-V8-v5.5	n/a	低	≥100nM
32G4-V8-v5.6	n/a	低	≥100nM
47D10-V7-v5.1	n/a	高	<10nM
47D10-V7-v5.2	n/a	中	10 - 100nM
47D10-V7-v5.3	n/a	中	10 - 100nM
47D10-V7-v5.4	n/a	中	10 - 100nM

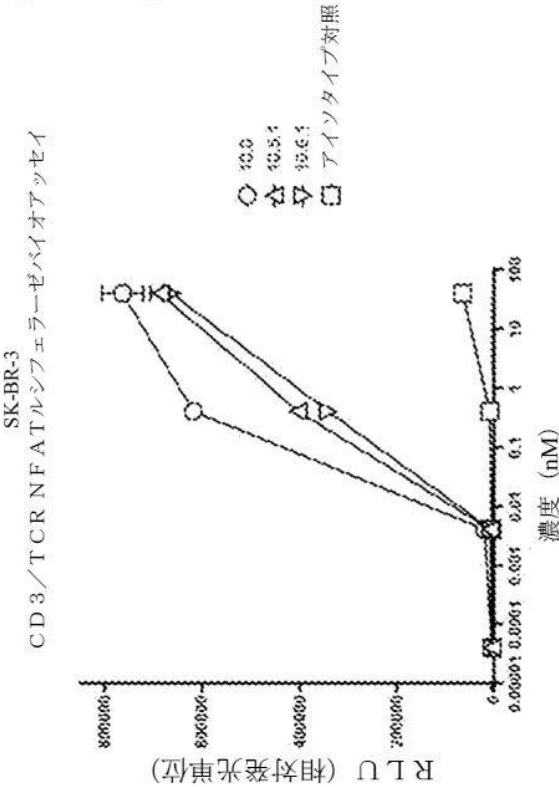
【図 2 - 5】

【図 2（続き）】

図 2			
クローン名	ジスルフィド置換	CD 3 親和性 (高 / 低 / 中)	Kd
47D10-V7-v5.5	n/a	低	>100nM
47D10-V7-v5.6	n/a	低	>100nM
ABP100s.13	n/a	高	<10nM
ABP100s.14	n/a	高	<10nM
ABP100s.15	n/a	高	<10nM
ABP100s.16	n/a	高	<10nM
ABP100s.17	n/a	高	<10nM
ABP100s.18	n/a	高	<10nM
ABP100s.19	n/a	高	<10nM
ABP100s.20	n/a	高	<10nM
ABP100s.21	n/a	高	<10nM
ABP100s.22	n/a	高	<10nM
ABP100s.23	n/a	高	<10nM
ABP100s.24	n/a	高	<10nM

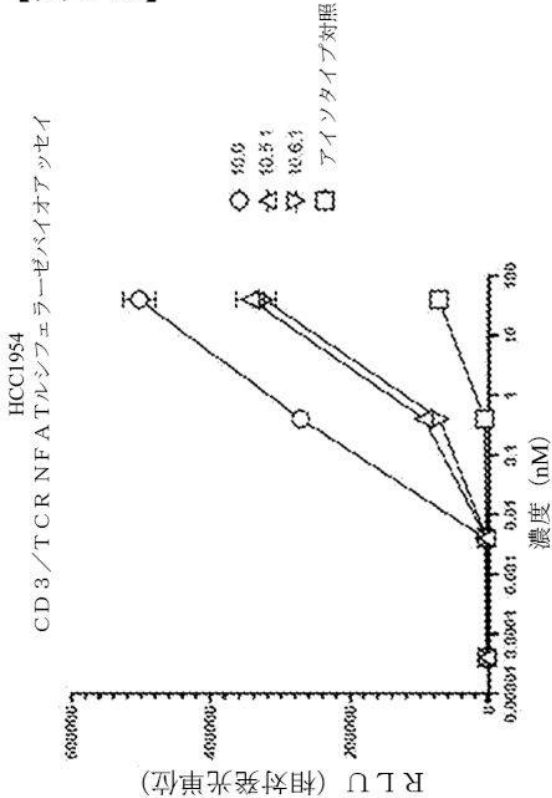
【図 3 A】

【図 3 A】



【図 3 B】

【図 3 B】



10

20

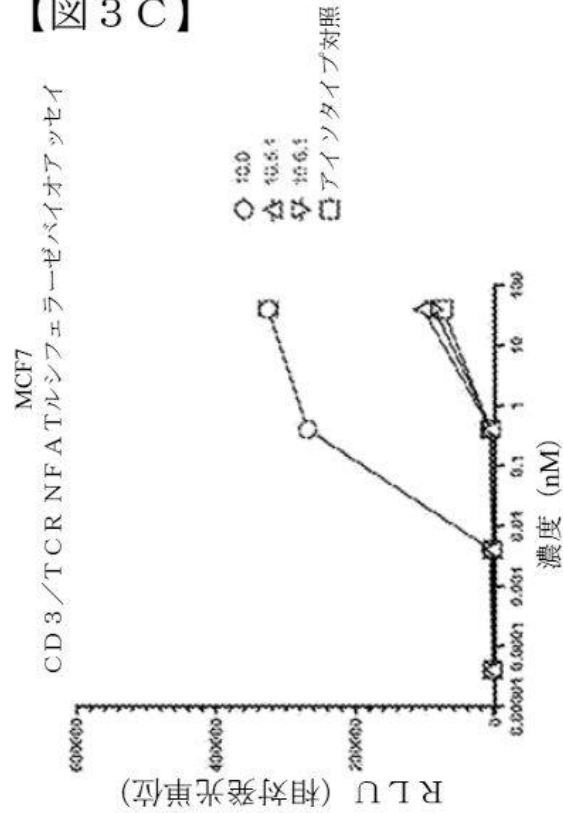
30

40

50

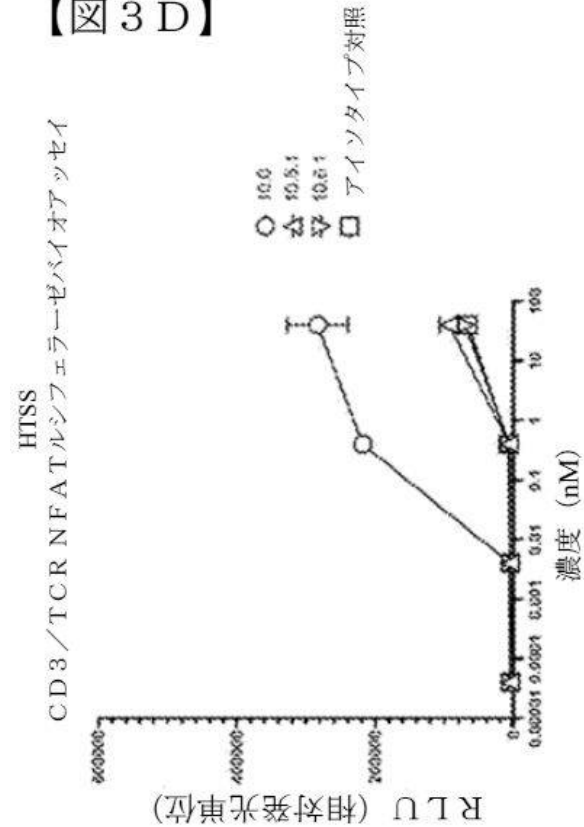
【図 3 C】

【図 3 C】



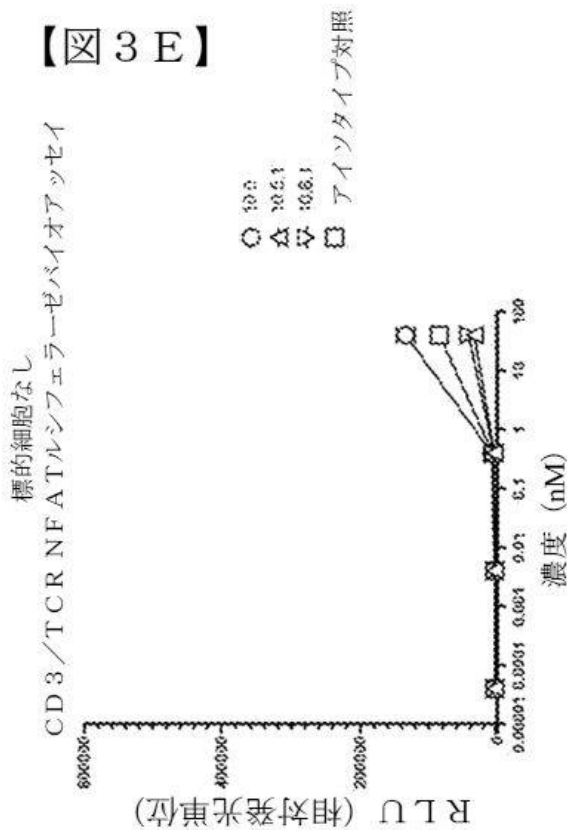
【図 3 D】

【図 3 D】



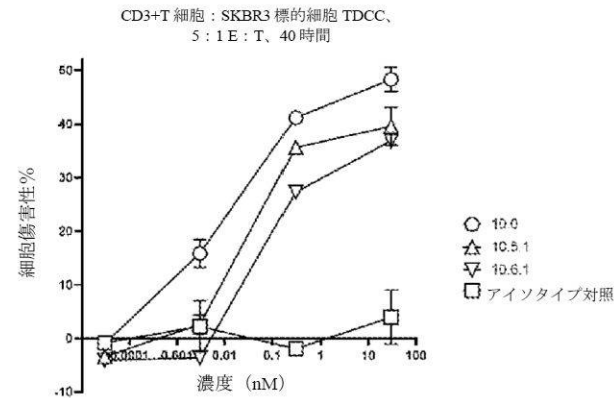
【図 3 E】

【図 3 E】



【図 4 A】

【図 4 A】



10

20

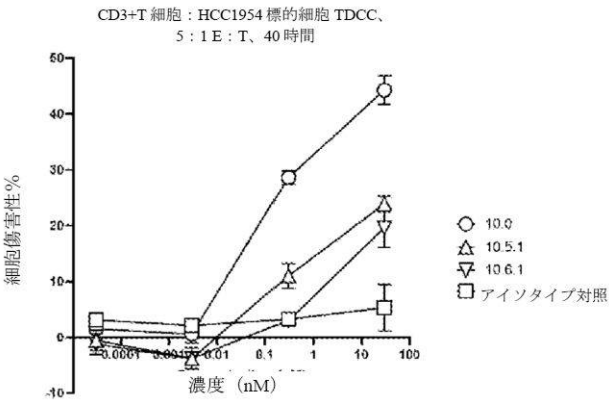
30

40

50

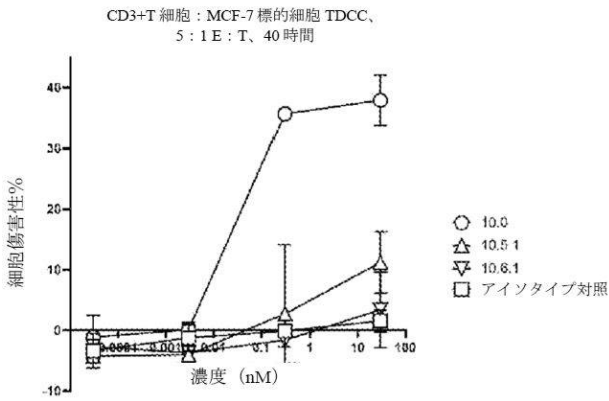
【図 4 B】

【図 4 B】



【図 4 C】

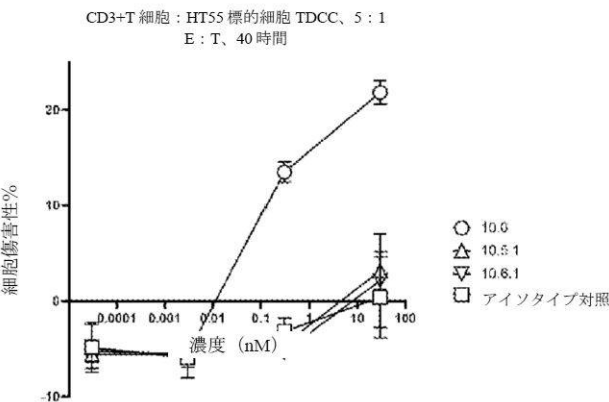
【図 4 C】



10

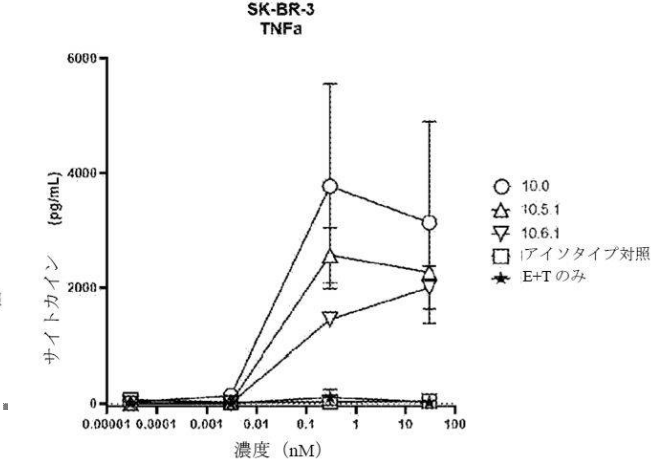
【図 4 D】

【図 4 D】



【図 5 A】

【図 5 A】



20

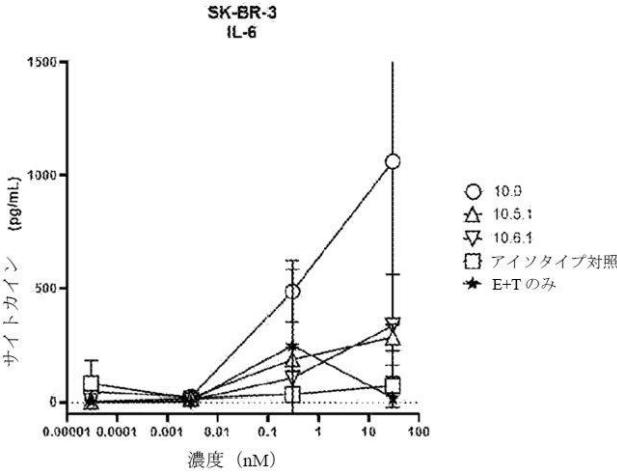
30

40

50

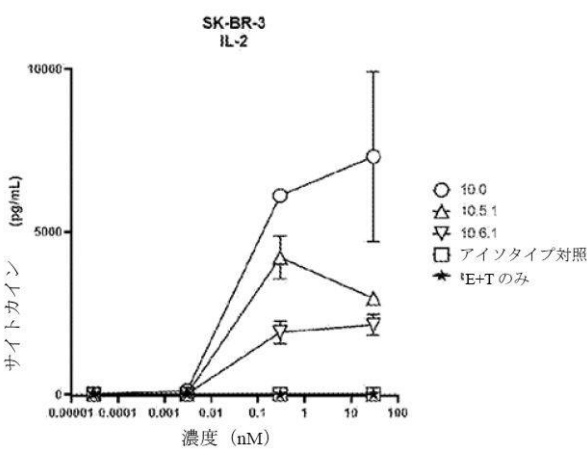
【図 5 B】

【図 5 B】



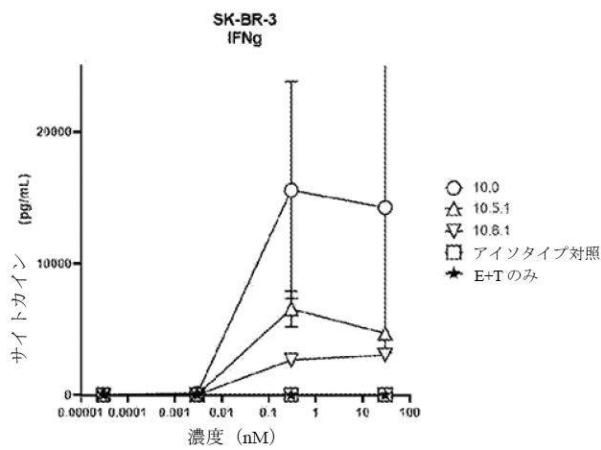
【図 5 C】

【図 5 C】



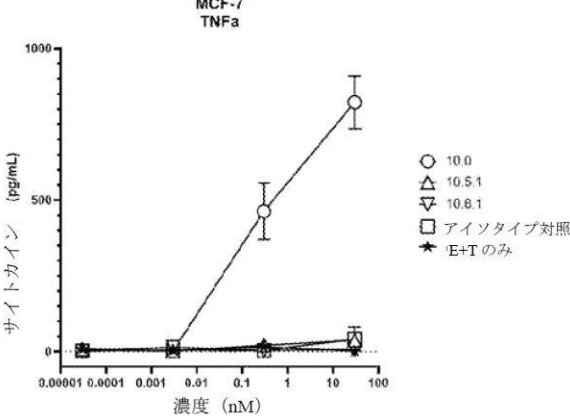
【図 5 D】

【図 5 D】



【図 5 E】

【図 5 E】



10

20

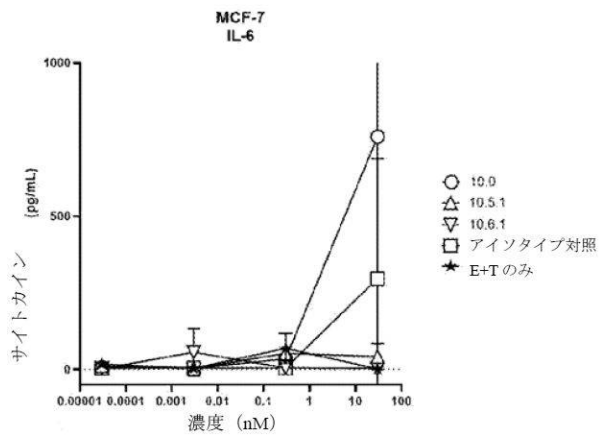
30

40

50

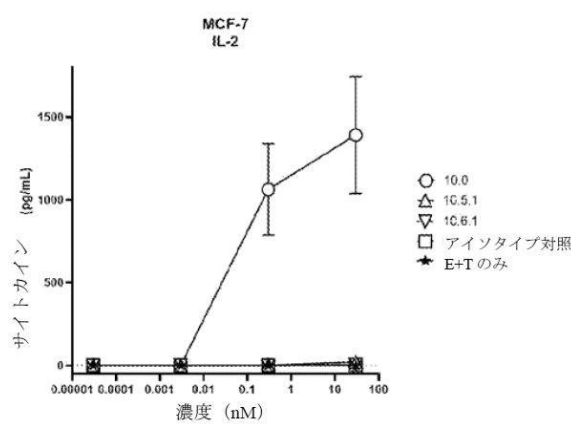
【図 5 F】

【図 5 F】



【図 5 G】

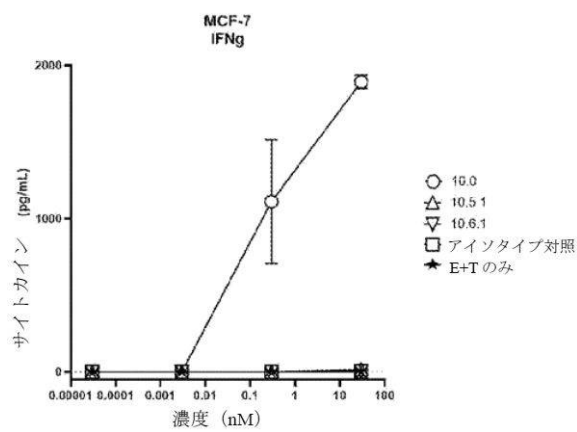
【図 5 G】



10

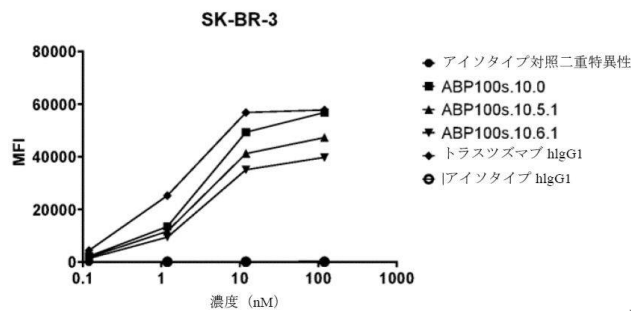
【図 5 H】

【図 5 H】



【図 6 A】

【図 6 A】



20

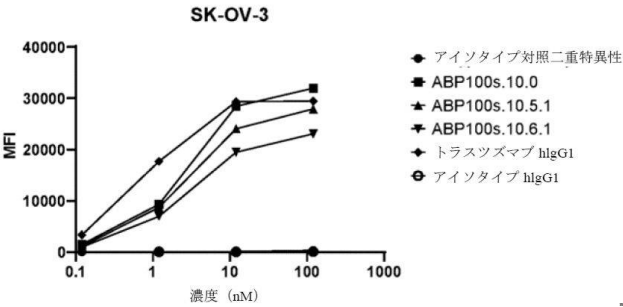
30

40

50

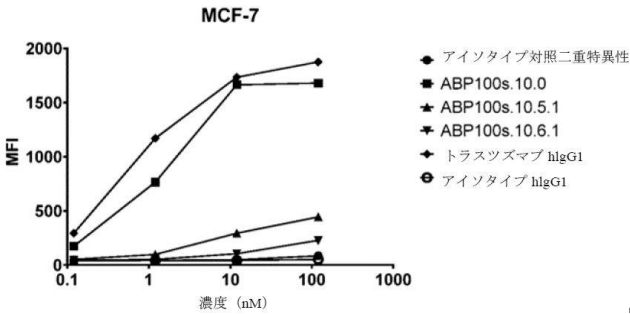
【図 6 B】

【図 6 B】



【図 6 C】

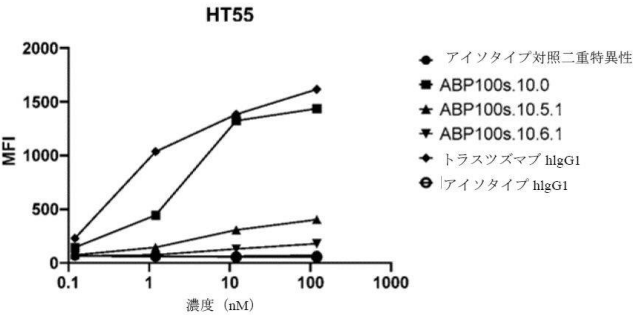
【図 6 C】



10

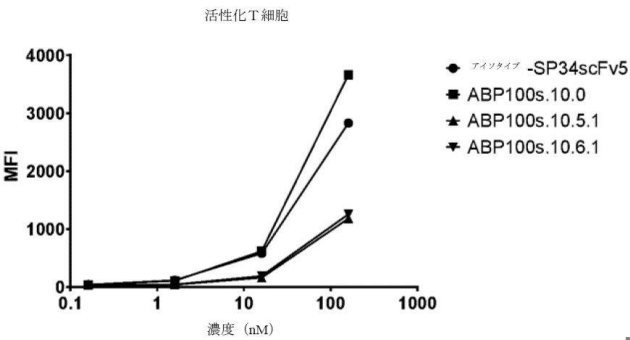
【図 6 D】

【図 6 D】



【図 6 E】

【図 6 E】



20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
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	N
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	51/10 (2006.01)	A 6 1 K	51/10	2 0 0
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,J
M,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,ST,SV,SY,T
H,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(72)発明者	ルロ, ジェイムズ
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1, ウォーバン, カミングス パーク ドライブ 6 8
(72)発明者	ムダ, マルコ
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1, ウォーバン, カミングス パーク ドライブ 6 8
(72)発明者	マーフィー, ショーン
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1, ウォーバン, カミングス パーク ドライブ 6 8
(72)発明者	ペルゼック, アダム
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 1, ウォーバン, カミングス パーク ドライブ 6 8

F ターム (参考)	4B065	AA01X AA57X AA72X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA43 CA44
	4C076	AA95 CC27 CC41 EE59
	4C084	AA19 NA05 ZB26 ZB27
	4C085	AA14 AA16 BB11 BB31 DD62 EE01 EE03 HH03 HH11 HH13
		KA29 KB05 KB07 KB10 KB11 KB12 KB82 LL18
	4C087	AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 NA14 ZB26 ZB27
	4H045	AA11 BA70 BA71 DA76 FA74