

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7066690号**  
**(P7066690)**

(45)発行日 令和4年5月13日(2022.5.13)

(24)登録日 令和4年5月2日(2022.5.2)

(51)国際特許分類

G 0 1 N	33/53 (2006.01)	F I	G 0 1 N	33/53	V Z N A
C 0 7 K	16/18 (2006.01)		C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)		C 0 7 K	16/46	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)		A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	

請求項の数 18 (全115頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-515904(P2019-515904)  
 (86)(22)出願日 平成29年9月22日(2017.9.22)  
 (65)公表番号 特表2019-533807(P2019-533807  
 A)  
 (43)公表日 令和1年11月21日(2019.11.21)  
 (86)国際出願番号 PCT/US2017/053114  
 (87)国際公開番号 WO2018/058003  
 (87)国際公開日 平成30年3月29日(2018.3.29)  
 審査請求日 令和2年9月14日(2020.9.14)  
 (31)優先権主張番号 62/399,249  
 (32)優先日 平成28年9月23日(2016.9.23)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 62/558,711  
 (32)優先日 平成29年9月14日(2017.9.14)  
 最終頁に続く

(73)特許権者 597160510  
 リジェネロン・ファーマシューティカル  
 ズ・インコーポレイテッド  
 R E G E N E R O N P H A R M A C E  
 U T I C A L S , I N C .  
 アメリカ合衆国 1 0 5 9 1 - 6 7 0 7 2  
 ューヨーク州タリータウン、オールド・  
 ソー・ミル・リバー・ロード 7 7 7 番  
 (74)代理人 100127926  
 弁理士 結田 純次  
 (74)代理人 100140132  
 弁理士 竹林 則幸  
 (72)発明者 ラウリック・ハーバー  
 アメリカ合衆国ニューヨーク州 1 0 5 9  
 1 . タリータウン . オールドソーミルリ  
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗MUC16(ムチン16)抗体

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

ヒトMUC16(配列番号1899)の5つの膜近位SEAドメインのうちの1つ以上に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片であって、前記抗体または抗原結合断片は、配列番号1899の残基14237~14290に結合し、また、それぞれ配列番号20、22、24、28、30および32のアミノ酸配列を含む相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2およびLCDR3を含む、上記抗体又は抗原結合断片。

**【請求項2】**

配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号26のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

**【請求項3】**

請求項1または2に記載の抗MUC16抗体またはその抗原結合断片と、細胞傷害性薬剤とを含む抗体-薬物複合体(ADC)であって、前記抗体または抗原結合断片および前記細胞傷害性薬剤はリンカーを介して共有結合している、上記ADC。

**【請求項4】**

前記細胞傷害性薬剤は、アウリストチン、メイタンシノイド、ツブリシン、トマイマイシン誘導体、またはドラスタチン誘導体から選択される、請求項3に記載のADC。

**【請求項5】**

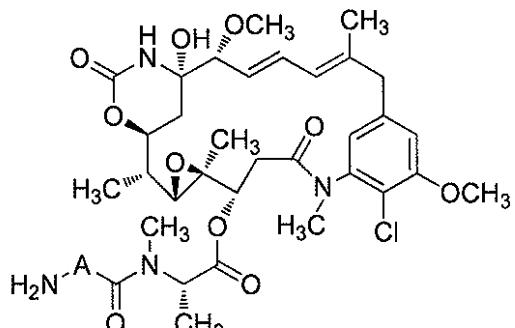
前記細胞傷害性薬剤は、MMAEもしくはMMMFから選択されるアウリストチン、ま

たは D M 1 もしくは D M 4 から選択されるメイタンシノイドである、請求項 3 または 4 に記載の A D C。

【請求項 6】

前記細胞傷害性薬剤は、以下の式(I)または式(II)の構造：

【化 1】

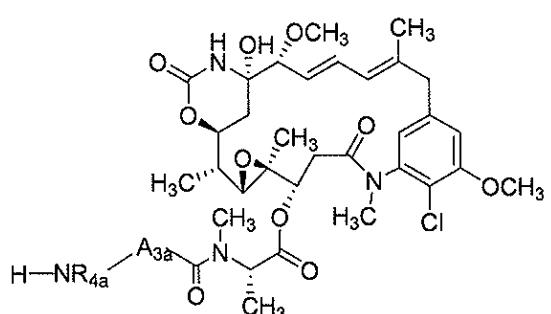


(式 I)

10

式中、A はアリーレンまたはヘテロアリーレンである；または、

【化 2】



(式 II)

20

30

式中、

A<sub>3a</sub>は、アミノ酸、2~20個のアミノ酸を有するペプチド、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、-C R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-、-O-C(=O)-O-、-C(=O)-(C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>-、-C(=O)-O-(C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>-、-(C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>-C(=O)-、-(C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>-C(=O)-O-、-(O-(C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>)p<sub>2</sub>-)p<sub>3</sub>-、-(C<sub>x</sub>H<sub>x</sub>)p<sub>2</sub>-O-)p<sub>3</sub>-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S-O-、-S-O<sub>2</sub>-、-N R<sub>4</sub>-、-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-N(R<sub>8</sub>)-、-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)O-、-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-、-C(=O)-N(R<sub>4</sub>)-、-C(=O)-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-、または-O-C(=O)-NR<sub>4</sub>-であり、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルは置換されていてもよく、

p<sub>1</sub>、p<sub>2</sub>、およびp<sub>3</sub>は、それぞれ独立して0、または1~100の整数であり、xは0、1または2であり、

R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、およびR<sub>8</sub>は、それぞれ独立してH、または置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであり、

R<sub>4a</sub>は、置換または非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロア

40

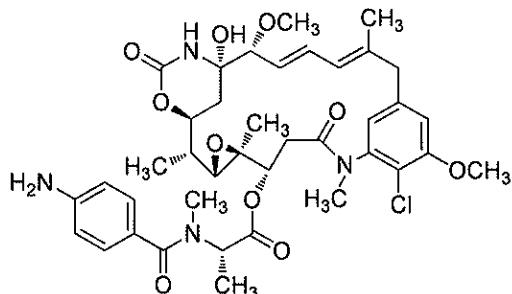
50

リール、またはヘテロシクリルである；  
を有するメイタンシノイドである、  
請求項 3 または 4 に記載の A D C。

## 【請求項 7】

前記メイタンシノイドが：

## 【化 3】



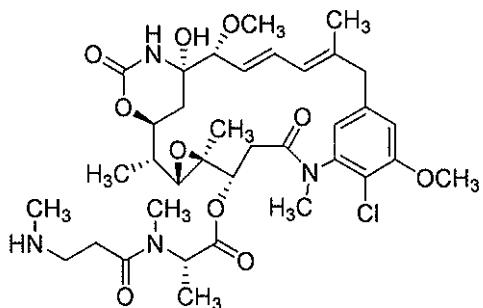
10

である、請求項 6 に記載の A D C。

## 【請求項 8】

前記メイタンシノイドが：

## 【化 4】



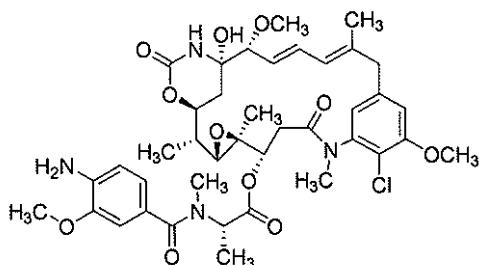
20

である、請求項 6 に記載の A D C。

## 【請求項 9】

前記メイタンシノイドが：

## 【化 5】



40

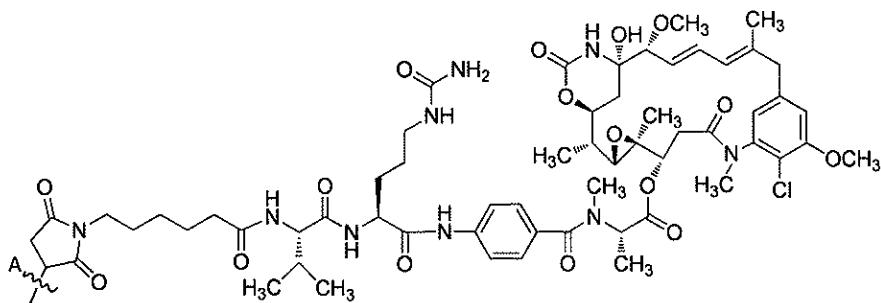
である、請求項 6 に記載の A D C。

## 【請求項 10】

抗 M U C 1 6 抗体またはその断片と、

50

【化 6】



10

式中、

【化 7】

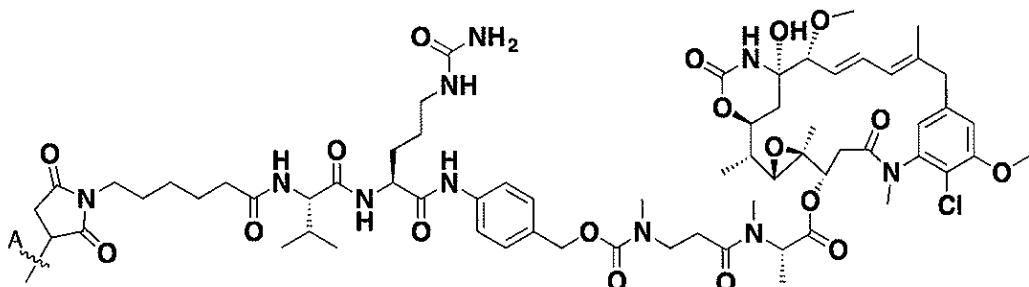


が前記抗 M U C 1 6 抗体またはその断片への結合である；  
とを含む、請求項 3 または 4 に記載の A D C。

【請求項 1 1】

抗 M U C 1 6 抗体またはその断片と、

【化 8】



20

30

式中、

【化 9】

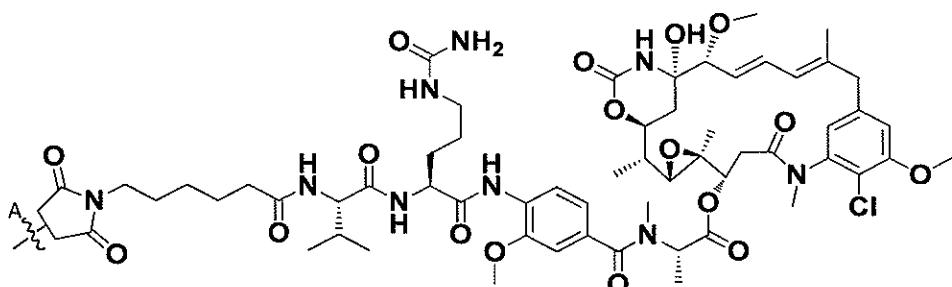


が前記抗 M U C 1 6 抗体またはその断片への結合である；  
とを含む、請求項 3 または 4 に記載の A D C。

【請求項 1 2】

抗 M U C 1 6 抗体またはその断片と、

【化 1 0】



40

50

式中、

【化 1 1】



が前記抗 M U C 1 6 抗体またはその断片への結合である；

とを含む、請求項 3 または 4 に記載の A D C。

【請求項 1 3】

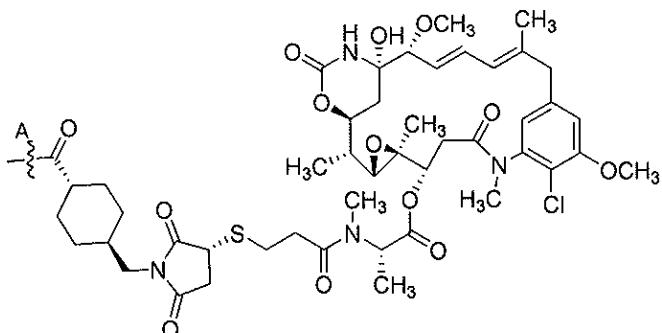
結合がシスティン残基の硫黄成分を介して前記抗体またはその断片に接触する、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の A D C。

10

【請求項 1 4】

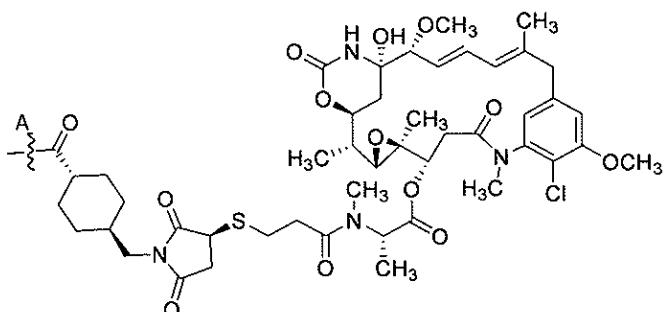
抗 M U C 1 6 抗体またはその断片と、

【化 1 2】



20

、または



30

、または

それらの混合物と、を含み、

式中、

【化 1 3】



40

が前記抗 M U C 1 6 抗体またはその断片への結合である、

請求項 3 または 4 に記載の A D C。

【請求項 1 5】

前記結合が、リジン残基の窒素成分を介して前記抗体またはその断片に接触する、

請求項 1 4 に記載の A D C。

【請求項 1 6】

前記 A D C が、抗 M U C 1 6 抗体またはその断片あたり 1 ~ 4 つの細胞傷害性薬剤を含む、

請求項 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の A D C。

【請求項 1 7】

50

対象から取得された生物学的サンプル中のMUC16を検出する方法のために使用する  
請求項1または2に記載の抗MUC16抗体または抗原結合断片を含む組成物であって  
前記方法は、前記生物学的サンプルを前記抗MUC16抗体または抗原結合断片に接触  
させて、MUC16と前記抗MUC16抗体または抗原結合断片との結合を検出すること  
によって、前記生物学的サンプル中にMUC16が存在するかどうか検出することを含む  
上記組成物。

**【請求項18】**

前記生物学的サンプルが、血漿、血清、腹水、卵巣、子宮、子宮頸、肝臓、膀胱、肺臓  
胃、小腸もしくは大腸、胆嚢、乳房、肺、腎臓、唾液、および涙腺、または任意のそれ  
らの類上皮腫瘍から選択される組織または体液サンプルである、請求項17に記載の組成  
物。

10

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0001】**

配列表の参照

本出願は、2017年9月22日に作成され、893,983バイトを含むファイル10  
295WO02-Sequence.txtとしてコンピュータ可読形式で提出された配  
列表を参照により組み入れる。

**【0002】**

本発明は、ムチン16(MUC16)に特異的である、抗体、およびその抗原結合断片、  
ならびにその使用方法に関する。本発明はまた、MUC16およびCD3に結合する二重  
特異性抗原結合分子、ならびにそれらの使用方法に関する。本発明はさらに、抗MUC1  
6抗体またはその断片および治療薬(例えば細胞傷害性薬剤)を含む抗体-薬物複合体に  
に関する。

20

**【背景技術】**

**【0003】**

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

30

**【0004】**

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

40

50

治療的使用のために提案されている。

**【0005】**

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

**【先行技術文献】**

**【非特許文献】**

**【0006】**

【文献】Haridas, D. et al., 2014, FASEB J., 28: 418  
3-4199

10

Felder, M. et al., 2014, Molecular Cancer, 13:  
129

Das, S. and Batra, S. K. 2015, Cancer Res. 75: 46  
60-4674

**【発明の概要】**

**【0007】**

第1の態様において、本発明は、ヒトMUC16に結合する抗体およびその抗原結合断片を提供する。本発明のこの態様による抗体は、とりわけ、MUC16を発現する細胞を標的とするのに有用である。本発明はまた、ヒトMUC16およびヒトCD3に結合する二重特異性抗体およびその抗原結合断片を提供する。本発明のこの態様による二重特異性抗体は、例えばMUC16を発現する細胞のT細胞媒介性死滅が有益または望ましい状況下で、とりわけ、CD3を発現するT細胞を標的とし、T細胞活性化を刺激するのに有用である。例えば、二重特異性抗体はCD3媒介性T細胞活性化を卵巣腫瘍細胞のような特異的MUC16発現細胞に誘導することができる。

20

**【0008】**

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

30

**【0009】**

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

**【0010】**

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

40

**【0011】**

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

50

**【 0 0 1 2 】**

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

**【 0 0 1 3 】**

本発明はまた、表1に列挙されたH C D R 2アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む重鎖C D R 2 ( H C D R 2 )を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

10

**【 0 0 1 4 】**

本発明はまた、表1に列挙されたH C D R 3アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む重鎖C D R 3 ( H C D R 3 )を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

**【 0 0 1 5 】**

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

20

**【 0 0 1 6 】**

本発明はまた、表1に列挙されたL C D R 2アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む軽鎖C D R 2 ( L C D R 2 )を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

20

**【 0 0 1 7 】**

本発明はまた、表1に列挙されたL C D R 3アミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む軽鎖C D R 3 ( L C D R 3 )を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

30

**【 0 0 1 8 】**

本発明はまた、表1に列挙されたL C D R 3アミノ酸配列のいずれかと対形成した表1に列挙されたH C D R 3アミノ酸配列のいずれかを含むH C D R 3およびL C D R 3のアミノ酸配列対 ( H C D R 3 / L C D R 3 )を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態によると、本発明は、表1に列挙された例示的な抗M U C 1 6抗体のいずれかに含有されるH C D R 3 / L C D R 3アミノ酸配列対を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態において、H C D R 3 / L C D R 3アミノ酸配列対は、配列番号2 4 / 3 2 ( 例えば、H 1 H 8 7 6 7 P )のものである。

**【 0 0 1 9 】**

本発明はまた、表1に列挙された例示的な抗M U C 1 6抗体のいずれかに含有される6つのC D Rのセット ( すなわち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 )を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。特定の実施形態において、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3アミノ酸配列セットは、配列番号2 0 - 2 2 - 2 4 - 2 8 - 3 0 - 3 2 ( 例えば、H 1 H 8 7 6 7 P )からなる群から選択される。

40

**【 0 0 2 0 】**

関連する実施形態において、本発明は、表1に列挙された例示的な抗M U C 1 6抗体のいずれかによって定義されるH C V R / L C V Rアミノ酸配列対に含有される6つのC D Rのセット ( すなわち、H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 )を含む、抗体またはその抗原結合断片を提供する。例えば、本発明は、配列

50

番号 18 / 26 ( 例えば、H1H8767P ) からなる群から選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列対に含有される H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 アミノ酸配列セットを含む、抗体またはその抗原結合フラグメントを含む。 H C V R アミノ酸配列および L C V R アミノ酸配列内の C D R を同定するための方法および技術は、当技術分野において周知であり、それらを使用して、本明細書に開示される特定の H C V R アミノ酸配列および / または L C V R アミノ酸配列内の C D R を同定することができる。 C D R の境界を同定するために使用可能な例示的な規則には、例えば、Kabat 定義、Chothia 定義、および AbM 定義が含まれる。一般的には、Kabat 定義は配列の可変性に基づいており、Chothia 定義は構造ループ領域の位置に基づいており、AbM 定義は Kabat のアプローチと Chothia のアプローチの間の折衷案である。 10 例えば、Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)、Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273: 927 - 948 (1997)、および Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9268 - 9272 (1989) を参照されたい。抗体内の C D R 配列を同定するために、公開データベースも利用可能である。

#### 【 0021 】

本発明はまた、抗 M U C 1 6 抗体またはその部分をコードする核酸分子を提供する。 20 例えば、本発明は、表 1 に列挙された H C V R アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、特定の実施形態において、核酸分子は、表 2 に列挙された H C V R 核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

#### 【 0022 】

本発明は、表 1 に列挙された L C V R アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表 2 に列挙された L C V R 核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。 30

#### 【 0023 】

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

#### 【 0024 】

本発明は、表 1 に列挙された H C D R 2 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表 2 に列挙された H C D R 2 核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。 40

#### 【 0025 】

本発明は、表 1 に列挙された H C D R 3 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表 2 に列挙された H C D R 3 核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 98% もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

#### 【 0026 】

本発明は、表 1 に列挙された L C D R 1 アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も

10

20

30

40

50

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

#### 【0027】

本発明は、表1に列挙されたLCDR2アミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子も提供し、ある特定の実施形態において、この核酸分子は、表2に列挙されたLCDR2核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。 10

#### 【0028】

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

#### 【0029】

本発明はまた、HCVRが3つのCDRのセット（すなわち、HCDR1-HCDR2-HCDR3）を含み、HCDR1-HCDR2-HCDR3アミノ酸配列セットが、表1に列挙された例示的な抗MUC16抗体のいずれかによって定義されるとおりである、HCVRをコードする核酸分子を提供する。 20

#### 【0030】

本発明はまた、LCVRが、3つのCDRのセット（すなわち、LCDR1-LCDR2-LCDR3）を含み、LCDR1-LCDR2-LCDR3アミノ酸配列セットが、表1に列挙された例示的な抗MUC16抗体のいずれかによって定義されるとおりである、LCVRをコードする核酸分子を提供する。

#### 【0031】

本発明は、HCVRが、表1に列挙されたHCVRアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含み、LCVRが、表1に列挙されたLCVRアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む、HCVRおよびLCVRの両方をコードする核酸分子も提供する。特定の実施形態において、核酸分子は、表2に列挙されたHCVR核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、表2に列挙されたLCVR核酸配列のいずれかから選択されるポリヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、を含む。本発明のこの態様によるある特定の実施形態において、この核酸分子は、HCVRおよびLCVRが両方とも、表1に列挙された同じ抗MUC16抗体に由来する、HCVRおよびLCVRをコードする。 30

#### 【0032】

本発明はまた、抗MUC16抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現できる組換え発現ベクターを提供する。例えば、本発明は、上述の核酸分子、すなわち表1に記載のHCVR配列、LCVR配列、および/またはCDR配列のいずれかをコードする核酸分子のいずれかを含む組換え発現ベクターを含む。本発明の範囲内にはまた、このようなベクターが導入された宿主細胞、ならびに抗体または抗体断片の産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することによって抗体またはその一部を産生する方法と、そのように産生された抗体および抗体断片を回収する方法とが含まれる。 40

#### 【0033】

本発明は、修飾されたグリコシル化パターンを有する抗MUC16抗体を含む。いくつかの実施形態において、望ましくないグリコシル化部位を除去するための修飾、または例え

10

20

30

40

50

ば抗体依存性細胞傷害作用（A D C C）機能を増大させるためのフコース部分を欠失している抗体は有用であり得る（Shiel et al. (2002) JBC 277: 26733を参照）。他の応用において、ガラクトシリル化の修飾は、補体依存性細胞障害作用（C D C）を修飾するために行うことができる。

#### 【0034】

別の態様において、本発明は、M U C 1 6 に特異的に結合する組換えヒト抗体またはその断片と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。別の関連する態様において、本発明は、抗M U C 1 6 抗体と第2の治療薬との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施形態において、第2の治療薬は、抗M U C 1 6 抗体と有利に組み合わされる任意の薬剤である。本発明の抗M U C 1 6 抗体を包含する追加の併用療法および併用製剤は、本明細書の他の箇所に開示されている。10

#### 【0035】

別の態様において、本発明は、本発明の抗M U C 1 6 抗体を用いてM U C 1 6 を発現する腫瘍細胞を標的化し／死滅させるための治療方法を提供し、その治療方法は本発明の抗M U C 1 6 抗体を含む治療有効量の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。場合によっては、抗M U C 1 6 抗体（またはその抗原結合断片）は、癌（例えば、卵巣癌）を治療するために使用することができ、またはA D C Cを増強する修飾F cドメイン（see e.g. Shiel et al. (2002) JBC 277: 26733）、放射免疫療法、抗体・薬物複合体、もしくは腫瘍切除の効率を増大させるための他の方法を含むがこれらに限定されない方法によって、より細胞傷害性を高めるように修飾され得る。20

#### 【0036】

本発明はまた、M U C 1 6 発現細胞に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患または障害（例えば、癌）の治療のための薬剤の製造における、本発明の抗M U C 1 6 抗体の使用を含む。一態様において、本発明は、医薬に使用するための、本明細書に開示されている抗M U C 1 6 抗体もしくは抗原結合断片、またはM U C 1 6 × C D 3 二重特異性抗体を含む化合物に関する。一態様において、本発明は、医薬に使用するための、本明細書に開示されている抗体・薬物複合体（A D C）を含む化合物に関する。

#### 【0037】

さらに別の態様において、本発明は、例えば、イメージング試薬などの診断用途のために单一特異性抗M U C 1 6 抗体を提供する。30

#### 【0038】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の抗C D 3 抗体または抗体の抗原結合部分を使用してT細胞活性化を刺激するための治療方法を提供し、その治療方法は抗体を含む治療有効量の薬学的組成物を投与することを含む。

#### 【0039】

別の態様において、本発明は、25の表面プラズモン共鳴アッセイで測定した場合に、約53nM未満の結合解離平衡定数（K D）でヒトムチン16（M U C 1 6）に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。さらに別の態様において、本発明は、25の表面プラズモン共鳴アッセイで測定した場合に、約15分超の解離半減期（t 1 / 2）でヒトM U C 1 6 に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。40

#### 【0040】

本発明はさらに、ヒトM U C 1 6への結合について、表1に記載のH C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む参照抗体と競合する抗体または抗原結合断片を提供する。別の態様において、本発明は、ヒトM U C 1 6への結合について、配列番号2 / 1 0、1 8 / 2 6、3 4 / 4 2、5 0 / 5 8、6 6 / 7 4、8 2 / 9 0、9 8 / 1 0 6、1 1 4 / 1 2 2、1 3 0 / 1 3 8、1 4 6 / 1 5 4、1 6 2 / 1 7 0、1 7 8 / 1 8 6、1 9 4 / 3 9 4、2 0 2 / 2 1 0、2 1 8 / 2 2 6、2 3 4 / 2 4 2、2 5 0 / 1 9 3 6、2 5 8 / 2 6 6、2 7 4 / 1 9 3 6、2 8 2 / 2 9 0、2 9 8 / 3 0 6、3 1 4 / 3 2 2、3 3 0 / 3 3 8

、346/354、362/370、および378/386からなる群から選択されるH C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む参照抗体と競合する単離された抗体または抗原結合断片を提供する。

#### 【0041】

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

#### 【0042】

本発明はさらに、ヒトMUC16に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供し、抗体または抗原結合断片は、表1に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(H C V R)の相補性決定領域(C D R)、および表1に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域(L C V R)のC D Rを含む。別の態様において、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/394、202/210、218/226、234/242、250/1936、258/266、274/1936、282/290、298/306、314/322、330/338、346/354、362/370、および378/386からなる群から選択されるH C V R / L C V R アミノ酸配列対の重鎖C D Rおよび軽鎖C D Rを含む。さらに別の態様において、単離された抗体または抗原結合断片が、配列番号4-6-8-12-14-16、20-22-24-28-30-32、36-38-40-44-46-48、52-54-56-60-62-64、68-70-72-76-78-80、84-86-88-92-94-96、100-102-104-108-110-112、116-118-120-124-126-128、132-134-136-140-142-144、148-150-152-156-158-160、164-166-168-172-174-176、180-182-184-188-190-192、196-198-200-396-398-400、204-206-208-212-214-216、220-222-224-228-230-232、236-238-240-244-246-248、252-254-256-1938-1940-1942、260-262-264-268-270-272、276-278-280-1938-1940-1942、284-286-288-292-294-296、300-302-304-308-310-312、316-318-320-324-326-328、332-334-336-340-342-344、348-350-352-356-358-360、364-366-368-372-374-376、および380-382-384-388-390-392からなる群から選択されるH C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 ドメインをそれぞれ含む。

#### 【0043】

別の態様において、本発明は、ヒトMUC16に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供し、抗体または抗原結合断片が、(a)配列番号2、18、34、50、66、82、98、114、130、146、162、178、194、202、218、234、250、258、274、282、298、314、330、346、362、および378からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域(H C V R)、ならびに(b)配列番号10、26、42、58、74、90、106、122、1

10

20

30

40

50

38、154、170、186、210、226、242、266、290、306、322、338、354、370、386、1936、および394からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（LCVR）、を含む。さらなる態様において、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号2/10、18/26、34/42、50/58、66/74、82/90、98/106、114/122、130/138、146/154、162/170、178/186、194/394、202/210、218/226、234/242、250/1936、258/266、274/1936、282/290、298/306、314/322、330/338、346/354、362/370、および378/386からなる群から選択されるHCVR/LCVRアミノ酸配列対を含む、請求項10に記載の単離された抗体または抗原結合断片。

10

#### 【0044】

本発明はさらに、配列番号1902の残基428～残基481の範囲のエピトープ内のヒトMUC16に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。場合によつては、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号1902のアミノ酸残基428～434、429～434、453～467、459～467、460～467、および/または474～481と相互作用する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号1902のアミノ酸残基428～434、429～434、453～467、459～467、460～467、および474～481と相互作用する。本発明はさらに、配列番号1902の残基126～残基138の範囲のエピトープ内のヒトMUC16に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。場合によつては、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号1902のアミノ酸残基126～131、127～131、および/または132～138と相互作用する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号1902のアミノ酸残基126～131、127～131、および132～138と相互作用する。本発明はさらに、配列番号1902の残基357～残基369の範囲のエピトープ内のヒトMUC16に結合する、単離された抗体または抗原結合断片を提供する。場合によつては、単離された抗体または抗原結合断片は、配列番号1902のアミノ酸残基357～369、358～366、358～369、および/または361～369と相互作用する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号1902のアミノ酸残基357～369、358～366、358～369、および361～369と相互作用する。本発明はさらに、ヒトMUC16（配列番号1899）の5つの膜近位SEAドメインのうちの1つ以上に結合する、単離された抗体またはその抗原結合断片を提供する。5つの膜近位のSEAドメインは、配列番号1899の残基13791～14451に対応する。場合によつては、抗体または抗原結合断片は、25 nmでの表面プラズモン共鳴アッセイにおいて測定した場合に、約60 nM未満のKDで結合する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号1899の残基14237～14290に結合する。一実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号18/26のアミノ酸配列を含むHCVR/LCVR対のCDRを含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号1899の残基13935～13947に結合する。一実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号82/858のアミノ酸配列を含むHCVR/LCVR対のCDRを含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号1899の残基14165～14178に結合する。一実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号98/170のアミノ酸配列を含むHCVR/LCVR対のCDRを含む。

20

#### 【0045】

一態様において、本発明は、MUC16のSEAドメインの1つ以上に結合する抗体またはその抗原結合断片を提供する。様々な実施形態において、抗MUC16抗体または抗体結合断片は、SEA1、SEA2、SEA3、SEA4、SEA5、SEA6、SEA7、SEA8、SEA9、SEA10、SEA11、SEA12、SEA13、SEA14、SEA15、またはSEA16のうちのいずれか1つ以上に結合する。一実施形態にお

30

40

50

いて、抗MUC16抗体または断片はSEA1（配列番号1899の残基12074～12229）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA2（配列番号1899の残基12230から12387）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片は、SEA3（配列番号1899の残基12388～12543）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA4（配列番号1899の残基12544～12698）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA5（配列番号1899の残基12699～12854）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA6（配列番号1899の残基12855～13010）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA7（配列番号1899の残基13011～13166）に結合する。10  
 一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA8（配列番号1899の残基13167～13323）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA9（配列番号1899の残基13324～13478）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA10（配列番号1899の残基13479～13634）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA11（配列番号1899の残基13635～13790）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片は、SEA12（配列番号1899の残基13791～13923）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA13（配列番号1899の残基13924～14074）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA14（配列番号1899の残基14075～14227）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA15（配列番号1899の残基14228～14320）に結合する。一実施形態において、抗MUC16抗体または断片はSEA16（配列番号1899の残基14321～14464）に結合する。20

#### 【0046】

別の態様によると、本発明は、抗MUC16抗体またはその抗原結合断片および治療薬（例えば細胞傷害性薬剤）を含む抗体・薬物複合体を提供する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片および細胞傷害性薬剤は、本明細書で論じるように、リンカーを介して共有結合している。様々な実施形態において、抗MUC16抗体または抗原結合断片は、本明細書に記載の抗MUC16抗体またはその断片のいずれかであり得る。30

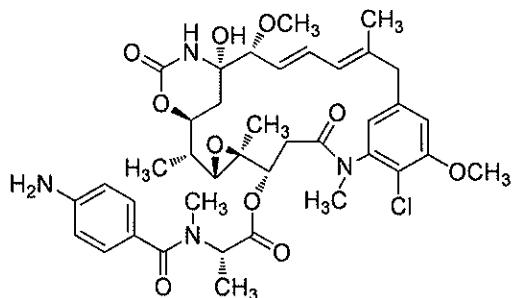
#### 【0047】

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

#### 【0048】

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、以下の構造

#### 【化1】



10

20

30

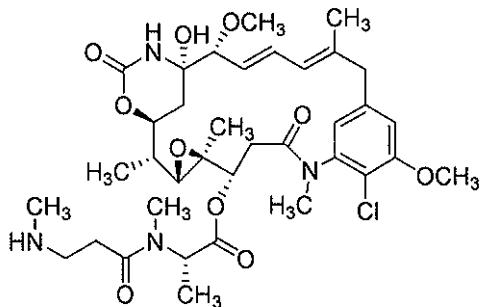
40

50

を有するメイタンシノイドである。

【0049】

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、以下の構造  
【化2】



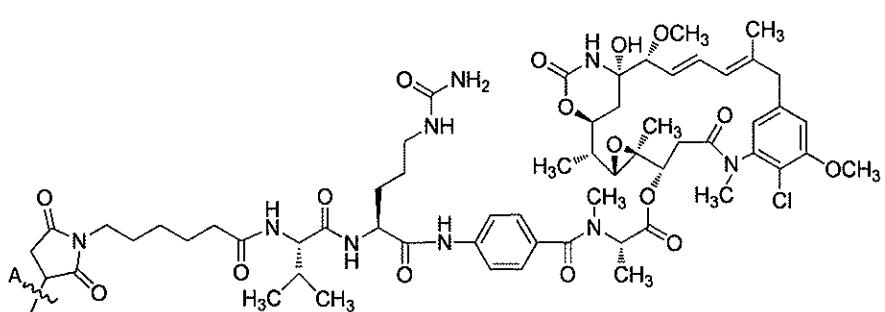
10

を有するメイタンシノイドである。

【0050】

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

【化3】



20

式中、

【化4】



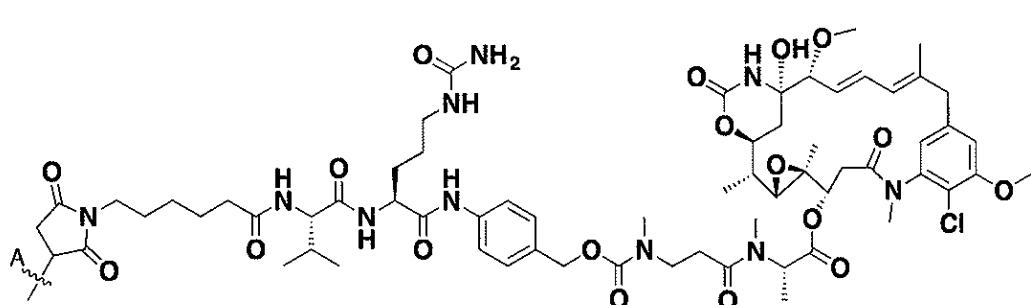
30

は抗MUC16抗体またはその断片への結合である。

【0051】

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

【化5】



40

式中、

50

## 【化6】

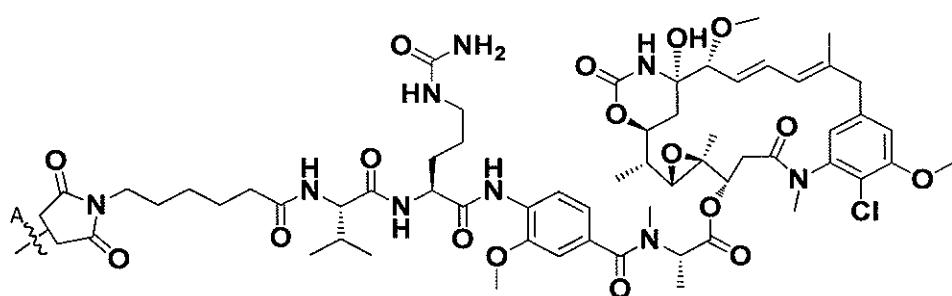


は抗MUC16抗体またはその断片への結合である。

## 【0052】

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

## 【化7】



式中、

## 【化8】



は抗MUC16抗体またはその断片への結合である。

## 【0053】

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

## 【0054】

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

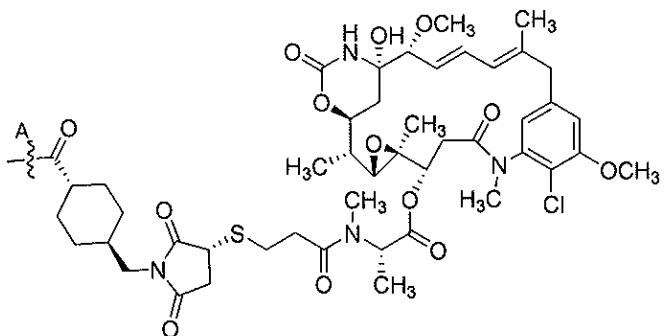
20

30

40

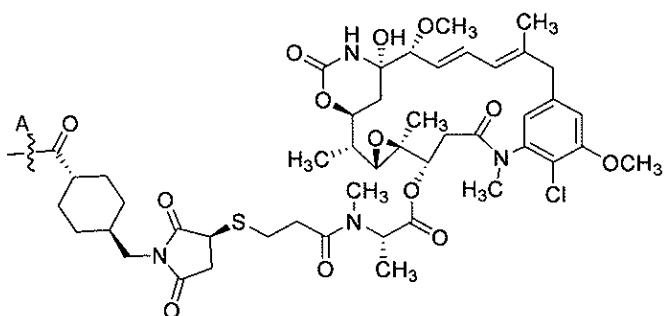
50

## 【化 9】



10

、または



20

、または

それらの混合物を含み、

式中、

## 【化 10】



は、抗 M U C 1 6 抗体またはその断片への結合である。

30

## 【0055】

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

## 【0056】

上記または本明細書で論じられる抗体 - 薬物複合体の様々な実施形態のいずれかにおいて、抗体 - 薬物複合体は、抗 M U C 1 6 抗体またはその断片あたり 1 ~ 4 つの細胞傷害性薬剤を含むことができる。

## 【0057】

別の態様によると、本発明は、M U C 1 6 および C D 3 に結合する二重特異性抗原結合分子（例えば抗体）を提供する。そのような二重特異性抗原結合分子はまた、本明細書において「抗 M U C 1 6 / 抗 C D 3 二重特異性分子」、「抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子」、または「M U C 1 6 × C D 3 b s A b」とも呼ばれる。抗 M U C 1 6 / 抗 C D 3 二重特異性分子の抗 M U C 1 6 部分は、M U C 1 6（例えば卵巣腫瘍）を発現する細胞（例えば腫瘍細胞）を標的化するのに有用であり、二重特異性分子の抗 C D 3 部分は T 細胞を活性化するのに有用である。腫瘍細胞上の M U C 1 6 および T 細胞上の C D 3 の同時結合は、活性化 T 細胞によって標的腫瘍細胞を直接死滅させる（細胞溶解）を促進する。したがって、本発明の抗 M U C 1 6 / 抗 C D 3 二重特異性分子は、とりわけ、M U C 1 6 発現腫瘍（例えば、卵巣癌）に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患および障害を治療するために有用である。

40

## 【0058】

50

本発明のこの態様による二重特異性抗原結合分子は、ヒトCD3に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン、およびMUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインを含む。本発明は、各抗原結合ドメインが軽鎖可変領域(LCVR)と対をなす重鎖可変領域(HCVR)を含む抗MUC16/抗CD3二重特異性分子(例えば、二重特異性抗体)を含む。本発明の特定の例示的実施形態において、抗CD3抗原結合ドメインおよび抗MUC16抗原結合ドメインがそれぞれ共通のLCVRと対をなす異なる別個のHCVRを含む。例えば、本明細書の実施例3に示すように、第1の抗原結合ドメインが抗MUC16抗体(例えば、抗MUC16抗原結合ドメインに含まれるものと同じLCVR)に由来するLCVRと対をなす抗CD3抗体に由来するHCVRを含む、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、第2の抗原結合ドメインが抗MUC16抗体に由来するHCVR/LCVRを含む、MUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗体が構築された。言い換えれば、本明細書に開示される例示的な分子において、抗CD3抗体由来のHCVRと抗MUC16抗体由来のLCVRとの対合は、CD3に特異的に結合する(しかしMUC16には結合しない)抗原結合ドメインを生成する。このような実施形態において、第1および第2の抗原結合ドメインは、異なる抗CD3および抗MUC16のHCVRを含むが、共通の抗MUC16のLCVRを共有する。他の実施形態において、二重特異性抗原結合分子は異なる抗CD3および抗MUC16のHCVRを含むが、共通のLCVRを共有する。このLCVRのアミノ酸配列は、例えば配列番号1890に示されており、対応するCDRのアミノ酸配列(すなわちLCDR1-LCDR2-LCDR3)は配列番号1892、1894、および1896にそれぞれ示される。遺伝子改変マウスを使用して、2つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの1つに由来する可変ドメインを含む同一の軽鎖と会合する2つの異なる重鎖を含む完全ヒト型二重特異性抗原結合分子を産生することができる。あるいは、可変重鎖を1つの共通の軽鎖と対にし、宿主細胞内で組換えにより発現させてもよい。このように、本発明の抗体は、単一の再編成された軽鎖と会合した免疫グロブリン重鎖を含み得る。いくつかの実施形態において、軽鎖は、ヒトV1-39遺伝子セグメントまたはV3-20遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含む。他の実施形態において、軽鎖は、ヒトJ5またはヒトJ1遺伝子セグメントと再編成されたヒトV1-39遺伝子セグメントに由来する可変ドメインを含む。

#### 【0059】

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

#### 【0060】

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

#### 【0061】

10

20

30

40

50

特定の実施形態によると、本発明は、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、C D 3 に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、本明細書の表1 6、1 8、および2 2 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域（H C V R）、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

#### 【 0 0 6 2 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、C D 3 に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、本明細書の表1、6、1 9、および2 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域（L C V R）、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。 10

#### 【 0 0 6 3 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、C D 3 に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、本明細書の表1 6、1 8、1 9、2 2、および2 3 に記載のH C V R およびL C V R ( H C V R / L C V R ) アミノ酸配列対を含む。

#### 【 0 0 6 4 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、C D 3 に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、本明細書の表1 6、1 8、および2 2 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 ( H C D R 3 ) ドメイン、またはそれと少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表1、1 6、1 9、および2 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ( L C D R 3 ) ドメイン、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、を含む。 20

#### 【 0 0 6 5 】

特定の実施形態において、C D 3 に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、本明細書の表1 6、1 8、1 9、2 2、および2 3 に記載のH C D R 3 / L C D R 3 アミノ酸配列対を含む。

#### 【 0 0 6 6 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性抗原結合分子を提供し、C D 3 に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインは、本明細書の表1 6、1 8、および2 2 に記載のアミノ酸を有する重鎖 C D R 1 ( H C D R 1 ) ドメイン、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、表1 6、1 8、および2 2 に記載のアミノ酸を有する重鎖 C D R 2 ( H C D R 2 ) ドメイン、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、表1 6、1 8、および2 2 に記載のアミノ酸を有する重鎖 C D R 3 ( H C D R 3 ) ドメイン、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表1、1 6、1 9、および2 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 ( L C D R 1 ) ドメイン、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表1、1 6、1 9、および2 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 ( L C D R 2 ) ドメイン、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、本明細書の表1、1 6、1 9、および2 3 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 ( L C D R 3 ) ドメイン、または少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、もしくは少なくとも9 9 %の配列同一性を有するその実質的に類似の配列と、を含む。 40

#### 【 0 0 6 7 】

本発明の特定の非限定的で例示的な抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性抗原結合分子は、

10

20

30

40

50

本明細書の表 16、18、19、22、および 23 に記載のアミノ酸配列をそれぞれ有する、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3 ドメインを含む、CD3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインを含む。

#### 【0068】

本発明はさらに、二重特異性抗原結合分子を提供し、ヒト CD3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインは、表 16、表 18、または表 22 に記載のアミノ酸を含む重鎖可変領域 (HCVR) 由来の重鎖相補性決定領域 (HCDR1、HCDR2、および HCDR3) と、表 1、表 16、表 19、または表 23 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LCVR) 由来の軽鎖相補性決定領域 (LCDR1、LCDR2、および LCDR3) とを含む。10

#### 【0069】

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

#### 【0070】

本発明は二重特異性抗原結合分子提供し、ヒト CD3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインは、3つの重鎖相補性決定領域 (A1 - HCDR1、A1 - HCDR2、および A1 - HCDR3) ならびに3つの軽鎖相補性決定領域 (A1 - LCDR1、A1 - LCDR2、および A1 - LCDR3) を含み、A1 - HCDR1 は配列番号 1732、1764、1780、1788、および 1868 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1 - HCDR2 は配列番号 1734、1766、1782、1790、および 1870 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1 - HCDR3 は配列番号 1736、1768、1784、1792、および 1872 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1 - LCDR1 は配列番号 28 のアミノ酸配列を含み、A1 - LCDR2 は配列番号 30 のアミノ酸配列を含み、A1 - LCDR3 は配列番号 32 のアミノ酸配列を含む。20

#### 【0071】

さらなる態様において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、ヒト CD3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインは、配列番号 1730 / 26、1762 / 26、1778 / 26、および 1866 / 26 からなる群から選択される HCVR / LCVR アミノ酸配列対の重鎖 CDR および 軽鎖 CDR を含む。30

#### 【0072】

別の態様において、本発明は抗原結合分子を提供し、ヒト CD3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインが、3つの重鎖相補性決定領域 (A1 - HCDR1、A1 - HCDR2、および A1 - HCDR3) と3つの軽鎖相補性決定領域 (A1 - LCDR1、A1 - LCDR2、および A1 - LCDR3) とを含み、ヒト MUC16 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインが、3つの重鎖相補性決定領域 (A2 - HCDR1、A2 - HCDR2、および A2 - HCDR3) と3つの軽鎖相補性決定領域 (A2 - LCDR1、A2 - LCDR2、および A2 - LCDR3) とを含み、A1 - HCDR1 は、配列番号 1732、1764、1780、1788、および 1868 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1 - HCDR2 は、配列番号 1734、1766、1782、1790、および 1870 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1 - HCDR3 は、配列番号 1736、1768、1784、1792、および 1872 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1 - LCDR1 は配列番号 28 のアミノ酸配列を含み、A1 - LCDR2 は配列番号 30 のアミノ酸配列を含み、A1 - LCDR3 は配列番号 32 のアミノ酸配列を含み、A2 - HCDR1 は配列番号 20 のアミノ酸配列を含み、A2 - HCDR2 は配列番号 22 のアミノ酸配列を含み、A2 - HCDR3 は配列番号 24 のア40

ミノ酸配列を含み、A 2 - L C D R 1 は配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含み、A 2 - L C D R 2 は配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含み、A 2 - L C D R 3 は配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 0 7 3 】

本発明の特定の非限定的で例示的な抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性抗原結合分子は、F R 1 (配列番号 1 9 0 3 )、F R 2 (配列番号 1 9 0 4 )、F R 3 (配列番号 1 9 0 5 )、および F R 4 (配列番号 1 9 0 6 )から選択されるアミノ酸配列を有する可変ドメインフレームワーク領域を含む重鎖を含む C D 3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインを含む。

#### 【 0 0 7 4 】

さらなる実施形態において、本発明の例示的な抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性抗原結合分子は、ヒト C D 3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインが配列番号 1 9 0 7 - 1 9 0 8 - 1 9 0 9 のアミノ酸配列を有する H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 を含む H C V R を含む、二重特異性抗原結合分子を含む。

#### 【 0 0 7 5 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、M U C 1 6 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 2 、 1 8 、 3 4 、 5 0 、 6 6 、 8 2 、 9 8 、 1 1 4 、 1 3 0 、 1 4 6 、 1 6 2 、 1 7 8 、 1 9 4 、 2 0 2 、 2 1 8 、 2 3 4 、 2 5 0 、 2 5 8 、 2 7 4 、 2 8 2 、 2 9 8 、 3 1 4 、 3 3 0 、 3 4 6 、 3 6 2 、 および 3 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域 (H C V R )、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

#### 【 0 0 7 6 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、M U C 1 6 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 1 0 、 2 6 、 4 2 、 5 8 、 7 4 、 9 0 、 1 0 6 、 1 2 2 、 1 3 8 、 1 5 4 、 1 7 0 、 1 8 6 、 2 1 0 、 2 2 6 、 2 4 2 、 2 6 6 、 2 9 0 、 3 0 6 、 3 2 2 、 3 3 8 、 3 5 4 、 3 7 0 、 3 8 6 、 1 9 3 6 、 および 3 9 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (L C V R )、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

#### 【 0 0 7 7 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、M U C 1 6 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 1 8 / 2 6 からなる群から選択される H C V R および L C V R (H C V R / L C V R ) のアミノ酸配列対を含む。

#### 【 0 0 7 8 】

本発明はまた、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性分子を提供し、M U C 1 6 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 8 、 2 4 、 4 0 、 5 6 、 7 2 、 8 8 、 1 0 4 、 1 2 0 、 1 3 6 、 1 5 2 、 1 6 8 、 1 8 4 、 2 0 0 、 2 0 8 、 2 2 4 、 2 4 0 、 2 5 6 、 2 6 4 、 2 8 0 、 2 8 8 、 3 0 4 、 3 2 0 、 3 3 6 、 3 5 2 、 3 6 8 、 および 3 8 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 (H C D R 3 ) ドメイン、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号 1 6 、 3 2 、 4 8 、 6 4 、 8 0 、 9 6 、 1 1 2 、 1 2 8 、 1 4 4 、 1 6 0 、 1 7 6 、 1 9 2 、 2 1 6 、 2 3 2 、 2 4 8 、 2 7 2 、 2 9 6 、 3 1 2 、 3 2 8 、 3 4 4 、 3 6 0 、 3 7 6 、 3 9 2 、 4 0 0 、 および 1 9 4 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 (L C D R 3 ) ドメイン、または少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % の配列同一性を有するその実質的に類似の配列を含む。

#### 【 0 0 7 9 】

特定の実施形態において、M U C 1 6 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインは、配列番号 2 4 / 3 2 からなる群から選択される H C D R 3 / L C D R 3 アミノ酸配列対を含

10

20

30

40

50

む。

### 【0080】

本発明はまた、抗CD3 / 抗MUC16二重特異性抗原結合分子を提供し、MUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインは、配列番号4、20、36、52、68、84、100、116、132、148、164、180、196、204、220、236、252、260、276、284、300、316、332、348、364、および380からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR1(HCDR1)ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号6、22、38、54、70、86、102、118、134、150、166、182、198、206、222、238、254、262、278、286、302、318、334、350、366、および382からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR2(HCDR2)ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号8、24、40、56、72、88、104、120、136、152、168、184、200、208、224、240、256、264、280、304、320、336、352、368、および384からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖CDR3(HCDR3)ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号12、28、44、60、76、92、108、124、140、156、172、188、396、212、228、244、396、268、396、292、308、324、340、356、372、1938、および388からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1(LCDR1)ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号14、30、46、62、78、94、110、126、142、158、174、190、398、214、230、246、398、270、398、294、310、326、342、358、374、1940、および390からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2(LCDR2)ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、ならびに配列番号16、32、48、64、80、96、112、128、144、160、176、192、400、216、232、248、400、272、400、296、312、328、344、360、376、1942、および392からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3(LCDR3)ドメイン、または少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するその実質的に類似の配列、を含む。  
10  
20  
30  
30

### 【0081】

本発明の特定の非限定的で例示的な抗CD3 / 抗MUC16二重特異性抗原結合分子は、配列番号20 - 22 - 24 - 28 - 30 - 32からなる群から選択されるアミノ酸配列をそれぞれ有する、HCDR1 - HCDR2 - HCDR3 - LCDR1 - LCDR2 - LCDR3を含む、MUC16に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインを含む。  
40

### 【0082】

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

### 【0083】

一実施形態において、本発明は、配列番号1959のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1960のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗MUC16結合アーム、配列番号1961のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号1960のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗

10

20

30

40

50

C D 3 結合アームを含む、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性抗体を提供する。別の実施形態において、本発明は、配列番号 1 9 5 9 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 9 6 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗 M U C 1 6 結合アーム、配列番号 1 9 6 2 のアミノ酸配列を含む重鎖および配列番号 1 9 6 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗 C D 3 結合アームを含む、抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性抗体を提供する。

#### 【 0 0 8 4 】

別の態様において、本発明は、ヒト C D 3 に結合する第 1 の抗原結合ドメインおよびヒト M U C 1 6 に結合する第 2 の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子を提供し、第 2 の抗原結合ドメインは、本発明の抗 M U C 1 6 抗体のいずれか 1 つの抗体または抗原結合断片に由来する。さらなる態様において、本発明は、ヒト C D 3 に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン、およびヒト M U C 1 6 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子を提供する。10

#### 【 0 0 8 5 】

本発明はさらに、ヒト C D 3 を発現するヒト細胞およびカニクイザル C D 3 を発現するカニクイザル細胞に結合する二重特異性抗原結合分子を提供する。別の態様において、二重特異性抗原結合分子は、ヒト M U C 1 6 を発現しているヒト細胞に結合する。

#### 【 0 0 8 6 】

別の態様において、本発明は、ヒト卵巣癌異種移植を保有する免疫無防備状態のマウスにおける腫瘍増殖を阻害する二重特異性抗原結合分子を提供する。本発明はさらに、ヒト卵巣癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおける既存腫瘍の腫瘍増殖を抑制する、二重特異性抗原結合分子を提供する。20

#### 【 0 0 8 7 】

別の態様において、本発明は、i) 約 4 n M を超える E C 5 0 値でエフェクター細胞と特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、ii) 3 n M 未満の E C 5 0 値で標的ヒト卵巣腫瘍細胞に特異的に結合する第 2 の抗原結合分子ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供し、このような E C 5 0 結合値はインビトロ F A C S 結合アッセイで測定される。

#### 【 0 0 8 8 】

一実施形態において、二重特異性抗原結合分子は、約 2 n M 未満の E C 5 0 値で、標的とする卵巣腫瘍細胞に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインを含む。場合によっては、第 1 の抗原結合ドメインは、約 4 0 n M 超、約 1 0 0 n M 超、約 2 0 0 n M 超、約 3 0 0 n M 超、約 4 0 0 n M 超、約 5 0 0 n M 超、または約 1 μ M 超の E C 5 0 値で、ヒト C D 3 およびカニクイザル C D 3 のそれぞれに結合する。場合によっては、第 1 の抗原結合ドメインは、弱いもしくは測定不可能な結合もしくは結合親和性で、ヒト C D 3 およびカニクイザル C D 3 のそれぞれに特異的に結合する。30

#### 【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態において、抗原結合分子は、インビトロ T 細胞媒介性腫瘍細胞死滅アッセイで測定した場合に、約 3 1 p M 未満の E C 5 0 値で T 細胞媒介性腫瘍細胞死滅を誘導し、例えば、腫瘍細胞は O V C A R 3 細胞である。

#### 【 0 0 9 0 】

場合によっては、第 1 の抗原結合ドメインは、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、約 1 1 n M 超の K D 値で、ヒト C D 3 に結合する。場合によっては、第 1 の抗原結合ドメインは、インビトロ表面プラズモン共鳴結合アッセイで測定した場合に、約 1 5 n M 超、約 3 0 n M 超、約 6 0 n M 超、約 1 2 0 n M 超、約 3 0 0 n M 超、または約 5 0 0 n M 超の K D 値で、ヒト C D 3 およびカニクイザル C D 3 のそれぞれに結合する。40

#### 【 0 0 9 1 】

特定の実施形態において、本発明の抗 C D 3 抗体、その抗体結合断片および二重特異性抗体は、生殖系列配列と親抗体配列との間の相違に基づいて段階的に親のアミノ酸残基を置き換えることによって作製された。50

**【 0 0 9 2 】**

いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、第2の抗原結合ドメインは、ヒトMUC16への結合について、3つの重鎖相補性決定領域（A2-HCDR1、A2-HCDR2、およびA2-HCDR3）ならびに3つの軽鎖相補性決定領域（A2-LCDR1、A2-LCDR2、およびA2-LCDR3）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、A2-HCDR1は配列番号20のアミノ酸配列を含み、A2-HCDR2は配列番号22のアミノ酸配列を含み、A2-HCDR3は配列番号24のアミノ酸配列を含み、A2-LCDR1は配列番号28のアミノ酸配列を含み、A2-LCDR2は配列番号30のアミノ酸配列を含み、A2-LCDR3は配列番号32のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、第2の抗原結合ドメインは、ヒトMUC16への結合について、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）と、配列番号26のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（LCVR）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合する。

**【 0 0 9 3 】**

いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、ヒトCD3に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインが、ヒトCD3への結合について、3つの重鎖相補性決定領域（A1-HCDR1、A1-HCDR2、およびA1-HCDR3）ならびに3つの軽鎖相補性決定領域（A1-LCDR1、A1-LCDR2、およびA1-LCDR3）を含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、A1-HCDR1は配列番号1732、1764、1780、1788、および1868からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1-HCDR2は配列番号1734、1766、1782、1790、および1870からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1-HCDR3は配列番号1736、1768、1784、1792、および1872からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、A1-LCDR1は配列番号28のアミノ酸配列を含み、A1-LCDR2は配列番号30のアミノ酸配列を含み、A1-LCDR3は配列番号32のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本発明は二重特異性抗原結合分子を提供し、第1の抗原結合ドメインは、ヒトCD3への結合について、配列番号1730、1762、1778、1786、および1866からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）と、配列番号26のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（LCVR）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合する。

**【 0 0 9 4 】**

いくつかの実施形態において、本発明は、二重特異性抗原結合分子を提供し、第1の抗原結合ドメインが、ヒトCD3への結合について、配列番号1730、1762、1778、1786、および1866からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）と、配列番号26のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（LCVR）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合し、第2の抗原結合ドメインは、ヒトMUC16への結合について、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（HCVR）と、配列番号26のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（LCVR）とを含む、参照抗原結合タンパク質と競合する。

**【 0 0 9 5 】**

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

**【 0 0 9 6 】**

別の態様において、本発明は、本明細書に開示の抗CD3/抗MUC16二重特異性抗原

10

20

30

40

50

結合分子の H C V R 、 L C V R または C D R 配列のいずれかをコードする核酸分子を提供し、本明細書の表 2 、 17 、 20 、 21 、 23 、および 25 に記載のポリヌクレオチド配列を含む核酸分子、ならびに表 2 、 17 、 20 、 21 、 23 、および 25 に記載のポリヌクレオチド配列のうちの 2 つ以上をその機能的組み合わせまたは配置のいずれかで含む核酸分子を包含する。本発明の核酸を保有する組換え発現ベクター、およびそのようなベクターが導入された宿主細胞もまた、抗体の產生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することによって、および產生された抗体を回収することによって、抗体を產生する方法と同様に本発明に含まれる。

#### 【 0097 】

本発明は、 C D 3 と M U C 16 に結合する二重特異性抗原結合分子を形成するために、 C D 3 に特異的に結合する前述の抗原結合ドメインのいずれかが、 M U C 16 に特異的に結合する前述の抗原結合ドメインのいずれかと組み合わされ、連結され、あるいは関連付けられる、抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子を含む。

10

#### 【 0098 】

本発明は、改変グリコシリ化パターンを有する抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子を含む。いくつかの用途において、望ましくないグリコシリ化部位を除去するための修飾、または例えば抗体依存性細胞傷害作用 ( A D C C ) 機能を増大させるためのフコース部分を欠失している抗体は有用であり得る ( S h i e l d e t a l . ( 2002 ) J B C 277 : 26733 を参照 ) 。他の応用において、ガラクトシリ化の修飾は、補体依存性細胞障害作用 ( C D C ) を修飾するために行うことができる。

20

#### 【 0099 】

別の態様において、本発明は、本明細書に開示の抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。関連する態様において、本発明は、抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子と第 2 の治療薬との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施形態において、第 2 の治療薬は、抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子と有利に組み合わされる任意の薬剤である。抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子と有利に組み合わせることができる例示的な薬剤は、本明細書の他所に詳細に論じられている。

#### 【 0100 】

さらに別の態様において、本発明は、本発明の抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子を用いて M U C 16 を発現する腫瘍細胞を標的化し / 死滅させるための治療方法を提供し、その治療方法は、本発明の抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子を含む治療有効量の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む。

30

#### 【 0101 】

本発明はまた、 M U C 16 発現細胞に関連するかまたはそれによって引き起こされる疾患または障害の治療のための薬剤の製造における本発明の抗 C D 3 / 抗 M U C 16 二重特異性抗原結合分子の使用を含む。

#### 【 0102 】

別の態様において、本発明は、対象から生物学的サンプルを得ることと、生物学的サンプルを抗 M U C 16 抗体またはその抗原結合断片に接触させて、 M U C 16 と抗 M U C 16 抗体または抗原結合断片との結合を検出することによって、生物学的サンプル中に M U C 16 が存在するかどうかを検出することと、を含む、生物学的サンプル中の M U C 16 を検出する方法を提供する。場合によっては、生物学的サンプルは、血漿、血清、腹水、卵巣、子宮、子宮頸管、肝臓、膀胱、脾臓、胃、小腸もしくは大腸、胆嚢、乳房、肺、腎臓、唾液、および涙腺、または任意のそれらの類上皮悪性腫瘍から選択される組織または体液サンプルである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号 1899 の残基 13791 ~ 14451 に対応するヒト M U C 16 の 5 つの膜近位 S E A ドメインのうちの 1 つ以上にヒト M U C 16 に結合する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、配列番号 1899 の残基 13810 ~ 14451 のヒト M U C 16 と結合する。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片は、ヒト M U

40

50

C 1 6 の S E A 1 、 S E A 2 、 S E A 3 、 S E A 4 、 S E A 5 、 S E A 6 、 S E A 7 、 S E A 8 、 S E A 9 、 S E A 1 0 、 S E A 1 1 、 S E A 1 2 、 S E A 1 3 、 S E A 1 4 、 S E A 1 5 、 または S E A 1 6 のうちのいずれか 1 つ以上に結合する。

#### 【 0 1 0 3 】

別の態様において、本発明は、患者から組織サンプルを得ることと、組織サンプルを抗 M U C 1 6 抗体と接触させて、M U C 1 6 と抗 M U C 1 6 抗体との結合を検出することによって、M U C 1 6 が組織サンプル中に存在するかどうかを検出することと、を含む、患者における M U C 1 6 を検出する方法を提供する。場合によっては、この方法は、組織サンプル中の M U C 1 6 の存在が検出された場合に、癌を有する患者を診断することをさらに含む。一実施形態において、組織サンプルは卵巣組織である。場合によっては、抗 M U C 1 6 抗体は、配列番号 1 8 9 9 の残基 1 2 7 8 3 ~ 1 3 4 6 7 のエピトープに特異的である。一実施形態において、抗 M U C 1 6 抗体は、配列番号 2 0 2 / 2 1 0 のアミノ酸配列を含む H C V R / L C V R 対の C D R を含む。場合によっては、抗 M U C 1 6 抗体は、配列番号 1 8 9 9 の残基 1 3 8 1 0 ~ 1 4 4 5 1 のエピトープに特異的である。一実施形態において、抗 M U C 1 6 抗体は、配列番号 2 5 0 / 1 9 3 6 、 2 5 8 / 2 6 6 、 3 1 4 / 3 2 2 、および 1 9 4 4 / 1 9 5 2 からなる群から選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列対の C D R を含む。

10

#### 【 0 1 0 4 】

別の態様において、本発明は、患者から血漿サンプルを得ることと、血漿サンプルを配列番号 2 0 2 / 2 1 0 のアミノ酸配列を含む H C V R / L C V R 対の C D R を含む抗 M U C 1 6 抗体と接触させて、M U C 1 6 と抗 M U C 1 6 抗体との結合を検出することによって、M U C 1 6 が血漿サンプル中に存在するかどうかを検出することと、を含む、患者における M U C 1 6 を検出する方法を提供する。場合によっては、この方法は、血漿サンプル中の M U C 1 6 の存在が検出された場合に、癌を有する患者を診断することをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、有効量の抗 C D 3 × M U C 1 6 二重特異性抗体を診断した患者に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態において、方法は、抗 M U C 1 6 抗体もしくはその抗原結合断片および細胞傷害性薬剤を含む有効量の A D C を診断した患者に投与することをさらに含む。

20

#### 【 0 1 0 5 】

別の態様において、本発明は、M U C 1 6 に結合する単離された抗体またはその抗原結合断片を提供し、抗体または抗原結合断片が、配列番号 2 0 2 / 2 1 0 、 2 5 0 / 1 9 3 6 、 2 5 8 / 2 6 6 、 3 1 4 / 3 2 2 、 8 2 / 8 5 8 、 9 8 / 1 7 0 、および 1 9 4 4 / 1 9 5 2 からなる群から選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列対の C D R を含む。いくつかの実施形態において、抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 2 0 4 - 2 0 6 - 2 0 8 - 2 1 2 - 2 1 4 - 2 1 6 、 2 5 2 - 2 5 4 - 2 5 6 - 1 9 3 8 - 1 9 4 0 - 1 9 4 2 、 2 6 0 - 2 6 2 - 2 6 4 - 2 6 8 - 2 7 0 - 2 7 2 、 3 1 6 - 3 1 8 - 3 2 0 - 3 2 4 - 3 2 6 - 3 2 8 、 8 4 - 8 6 - 8 8 - 1 8 9 2 - 1 8 9 4 - 1 8 9 6 、 1 0 0 - 1 0 2 - 1 0 4 - 1 7 2 - 1 7 4 - 1 7 6 、および 1 9 4 6 - 1 9 4 8 - 1 9 5 0 - 1 9 5 4 - 1 9 5 6 - 1 9 5 8 からなる群から選択される H C D R 1 - H C D R 2 - H C D R 3 - L C D R 1 - L C D R 2 - L C D R 3 ドメインをそれぞれ含む。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合断片が、2 0 2 / 2 1 0 、 2 5 0 / 1 9 3 6 、 2 5 8 / 2 6 6 、 3 1 4 / 3 2 2 、 8 2 / 8 5 8 、 9 8 / 1 7 0 、および 1 9 4 4 / 1 9 5 2 からなる群から選択される H C V R / L C V R アミノ酸配列対を含む。

30

#### 【 0 1 0 6 】

他の実施形態において、後述の詳細な説明の総説から明らかとなる。

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 1 0 7 】

【 図 1 】野生型マウス（図 1 ）における抗 M U C 1 6 × C D 3 二重特異性抗体の薬物動態プロファイルを示す。

【 図 2 】ヒト化 C D 3 マウス（図 2 ）における抗 M U C 1 6 × C D 3 二重特異性抗体の薬

40

50

物動態プロファイルを示す。

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

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

【図5】OVCA-R-3モデル試験1(20日目の平均放射輝度[p/s/cm<sup>2</sup>/sr])の結果を示す。BSMUC16/CD3-001は、0.1および0.5mg/kgで腫瘍量を有意に減少させる。ヒトT細胞を移植したNSGマウスにヒトOVCA-R-3/Luc細胞を移植した。腫瘍移植の6日後に処置を開始した。マウスを6、10、13、16、および21日目に、0.01、0.1、または0.5mg/kgのBSMUC16/CD3-001を腹腔内投与して、またはCD3結合対照もしくは非結合対照(0.5mg/kg腹腔内)で処置した。示したデータは、腫瘍移植後20日目にBLIによって評価された腫瘍量である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニー-t検定を用いて決定した。BSMUC16/CD3-001による処置を非結合対照と比較した(BSMUC16/CD3-001 0.5mg/kgについて\*\*p<0.01、0.1mg/kgについて#p<0.05)。

【図6】は、OVCA-R-3モデル試験1(D6とD20との間のBLI顕性腫瘍における倍率変化)の結果を示す。BSMUC16/CD3-001は、0.1および0.5mg/kgで腫瘍量における倍率変化を有意に減少させる。ヒトT細胞を移植したNSGマウスにヒトOVCA-R-3/Luc細胞を移植した。マウスを6、10、13、16、および21日目に、0.01、0.1、または0.5mg/kgのBSMUC16/CD3-001を腹腔内投与して、またはCD3結合対照もしくは非結合対照(0.5mg/kg腹腔内)で処置した。示されたデータは、最初の測定値(処置開始前に実施)および試験終了時の20日目の腫瘍量の倍率変化である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニー-t検定を用いて決定した。BSMUC16/CD3-001による処置を非結合対照と比較した(BSMUC16/CD3-001 0.5mg/kgについて\*\*p<0.01、0.1mg/kgについて#p<0.05、0.01mg/kgについて\$p<0.05)。

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

【図8】OVCA-R-3モデル試験2(25日目の平均放射輝度[p/s/cm<sup>2</sup>/sr])の結果を示す。BSMUC16/CD3-005は、0.5、1および5mg/kgで腫瘍量を有意に減少させる。ヒトT細胞を移植したNSGマウスにヒトOVCA-R-3/Luc細胞を移植した。腫瘍移植の5日後に処置を開始した。マウスを5、8、12、15、19、および22日目に、0.1、0.5、1、または5mg/kgのREGN4019を静脈内投与、またはCD3結合対照もしくは非結合対照(5mg/kg静脈内)を投与した。示したデータは、腫瘍移植後25日目にBLIによって評価された腫瘍量である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニー-t検定を用いて決定した。BSMUC16/CD3-005による処置を非結合対照と比較した(BSMUC16/CD3-005 5mg/kgについて\*\*p<0.01、1mg/kgについて##p<0.01、0.5mg/kgについて\$\$p<0.01)。

【図9】OVCA-R-3モデル試験2(D4とD25との間のBLI顕性腫瘍における倍率変化)の結果を示す。BSMUC16/CD3-005は、0.5、1および5mg/kgで腫瘍増殖を有意に減少させる。ヒトT細胞を移植したNSGマウスにヒトOVCA

10

20

30

40

50

R - 3 / L u c 細胞を移植した。マウスを 5、8、12、15、19、および 22 日目に、0.1、0.5、1、または 5 mg / kg の REGN4019 を静脈内投与、または CD3 結合対照もしくは非結合対照 (5 mg / kg 静脈内) で処置した。示されたデータは、最初の測定値 (処置開始の前日に実施) および試験終了時の 25 日目の腫瘍量の倍率変化である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニー t 検定を用いて決定した。BSMUC16 / CD3 - 005 による処置を非結合対照と比較した (REGN4019 5 mg / kg について \*\* p < 0.01、1 mg / kg について # # p < 0.01、0.5 mg / kg について \$ \$ p < 0.01)。

【図 10】ID8 - VEGF / h u M U C 16 モデルの結果を示す。BSMUC16 / CD3 - 001 移植後 47 日目の腫瘍サイズは、移植日または腫瘍移植後 10 日のいずれかに処置を開始する場合、同系モデルにおいて腫瘍増殖を有意に減少させる。マウス CD3 およびキメラ MUC16 分子の代わりにヒト CD3 を発現するマウスに、ヒト MUC16 の一部を発現するマウス卵巣腫瘍株を移植した。移植日または移植後 10 日に、マウスに BSMUC16 / CD3 - 001 (100 μg 腹腔内) を投与するか、または移植日に CD3 結合対照 (100 μg 腹腔内) を投与した。即時処置群については 0、4、7、10、13、17、20、または 24 日目にマウスを処置し、D10 に投与を開始した群については 10、13、17、20、および 24 日目にマウスを処置した。示したデータは移植後 47 日目の腫瘍体積である。統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニー t 検定を用いて決定した。BSMUC16 / CD3 - 001 による処置を CD3 結合対照と比較した (\*\* p < 0.01、D0 から開始、\* p < 0.05、D10 から開始)。  
10

【図 11 A】PEO - 1、OVCA R 3 - L u c、ジャーカット細胞、およびカニクイザル T 細胞に選択二重特異性抗体の結合のフローサイトメトリー分析 (または FACS) の結果を示す。滴定分析は、各抗体の一連の段階希釈物、すなわち MUC16 × CD3 二重特異性抗体 BSMUC16 / CD3 - 001、BSMUC16 / CD3 - 002、もしくは BSMUC16 / CD3 - 003、または第 1 もしくは第 2 のアイソタイプ対照抗体 (CD3 または MUC16 に対する交差反応性を有さない) を試験することによって行った。

【図 11 B】PEO - 1、OVCA R 3 - L u c、ジャーカット細胞、およびカニクイザル T 細胞に選択二重特異性抗体の結合のフローサイトメトリー分析 (または FACS) の結果を示す。滴定分析は、各抗体の一連の段階希釈物、すなわち MUC16 × CD3 二重特異性抗体 BSMUC16 / CD3 - 001、BSMUC16 / CD3 - 002、もしくは BSMUC16 / CD3 - 003、または第 1 もしくは第 2 のアイソタイプ対照抗体 (CD3 または MUC16 に対する交差反応性を有さない) を試験することによって行った。  
30

【図 11 C】PEO - 1、OVCA R 3 - L u c、ジャーカット細胞、およびカニクイザル T 細胞に選択二重特異性抗体の結合のフローサイトメトリー分析 (または FACS) の結果を示す。滴定分析は、各抗体の一連の段階希釈物、すなわち MUC16 × CD3 二重特異性抗体 BSMUC16 / CD3 - 001、BSMUC16 / CD3 - 002、もしくは BSMUC16 / CD3 - 003、または第 1 もしくは第 2 のアイソタイプ対照抗体 (CD3 または MUC16 に対する交差反応性を有さない) を試験することによって行った。

【図 12 A】ヒト PBMC 存在下で抗 MUC16 × 抗 CD3 処置後に、48 時間細胞傷害性アッセイにおける PEO - 1 (図 12 A) 細胞死滅の例を示す。  
40

【図 12 B】ヒト PBMC 存在下で抗 MUC16 × 抗 CD3 処置後に、48 時間細胞傷害性アッセイにおける OVCA R 3 - L u c (図 12 B) 細胞死滅の例を示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0108】

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

## 【0109】

別段の定義がない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語は全て、本発明の属する技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書で使用される場合、用語「約」は、特定の列挙された数値に関して使用されるとき、その値が列挙された値から1%以下だけ変動し得ることを意味する。例えば、本発明で使用する場合、表現「約100」は、99および101、ならびにその間の全値（例えば、99.1、99.2、99.3、99.4など）を含む。

## 【0110】

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

10

## 【0111】

## 定義

本明細書で用いられる「CD3」という表現は、多分子T細胞受容体（TCR）の一部としてT細胞上に発現され、4つの受容体鎖すなわちCD3-イプシロン、CD3-デルタ、CD3-ゼータ、CD3-ガンマのうち2つの会合から形成されるホモ二量体またはヘテロ二量体からなる抗原を指す。ヒトCD3-イプシロンは、配列番号1897に記載のアミノ酸配列を含み、ヒトCD3-デルタは、配列番号1898に記載のアミノ酸配列を含む。本明細書におけるタンパク質、ポリペプチド、およびタンパク質断片への全ての言及は、非ヒト種由来であると明確に特定されない限り、それぞれのタンパク質、ポリペプチド、またはタンパク質断片のヒト型を指すことを意図している。したがって、表現「CD3」は、非ヒト種、例えば「マウスCD3」、「サルCD3」などに由来するものとして特定されない限り、ヒトCD3を意味する。

20

## 【0112】

本明細書で使用される場合、「CD3に結合する抗体」または「抗CD3抗体」は、単一のCD3サブユニット（例えば、イプシロン、デルタ、ガンマ、またはゼータ）を特異的に認識する抗体およびその抗原結合断片、ならびに2つのCD3サブユニットの二量体複合体を特異的に認識する抗体およびその抗原結合断片（例えば、ガンマ/イプシロン、デルタ/イプシロン、およびゼータ/ゼータCD3二量体）を含む。本発明の抗体および抗原結合断片は、可溶性CD3および/または細胞表面発現CD3に結合することができる。可溶性CD3には、天然CD3タンパク質、ならびに膜貫通ドメインを欠くかまたは細胞膜と会合していない、例えば単量体および二量体CD3構築物などの組換えCD3タンパク質変異体が含まれる。

30

## 【0113】

本明細書で使用される場合、表現「細胞表面発現CD3」は、インビトロまたはインビボで細胞表面上に発現される1つ以上のCD3タンパク質（複数可）を意味し、CD3タンパク質の少なくとも一部は細胞膜の細胞外側に曝され、抗体の抗原結合部分に接近可能である。「細胞表面発現CD3」としては、細胞膜内の機能的T細胞受容体の中に含まれるCD3タンパク質が挙げられる。「細胞表面発現CD3」という表現は、細胞の表面上のホモ二量体またはヘテロ二量体の一部として発現されるCD3タンパク質（例えば、ガンマ/イプシロン、デルタ/イプシロン、およびゼータ/ゼータCD3二量体）を含む。「細胞表面発現CD3」という表現はまた、他のCD3鎖型なしで、細胞の表面上にそれ自身で発現するCD3鎖（例えば、CD3-イプシロン、CD3-デルタ、またはCD3-ガンマ）も含む。「細胞表面発現CD3」は、通常その表面にヒトCD3を発現しないがその表面にCD3を発現するように人工的に操作されている細胞の表面上に発現されるCD3タンパク質を含むかまたはそれからなることができる。あるいは、「細胞表面発現CD3」は、通常その表面にヒトCD3を発現しないがその表面にCD3を発現するように人工的に操作されている細胞の表面上に発現されるCD3タンパク質を含むかまたはそれからなることができる。

40

50

**【 0 1 1 4 】**

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

**【 0 1 1 5 】**

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

**【 0 1 1 6 】**

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

10

**【 0 1 1 7 】**

本発明で使用する場合、「抗体」という用語は、特定の抗原（例えばMUC16またはCD3）に特異的に結合するかまたはそれと相互作用する少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）を含む、任意の抗原結合分子または分子複合体を意味する。用語「抗体」は、ジスルフィド結合によって相互連結された4本のポリペプチド鎖、2本の重（H）鎖および2本の軽（L）鎖を含む免疫グロブリン分子、ならびにそれらの多量体（例えば、IgM）を含む。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではHCVRまたはVHと略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではLCVRまたはVLと略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は1つのドメイン（CL1）を含む。VH領域およびVL領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる、より保存された領域が点在する相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域へとさらに細分することができる。各VHおよびVLは、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置された3つのCDRおよび4つのFRからなる。本発明の異なる実施形態において、抗MUC16抗体または抗CD3抗体（またはその抗原結合部分）のFRは、ヒト生殖系列配列と同一であってもよく、または天然にもしくは人工的に修飾されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、2つ以上のCDRの並列分析に基づいて定義され得る。

20

**【 0 1 1 8 】**

本発明で使用する場合、「抗体」という用語は、完全抗体分子の抗原結合断片も含む。抗体の「抗原結合部分」、抗体の「抗原結合断片」という用語、およびこれらに類するものは、本明細書で使用する場合、天然の、酵素処理で入手可能な、合成の、または遺伝子操作された、抗原を特異的に結合して複合体を形成するポリペプチドまたは糖タンパク質を含む。抗体の抗体結合断片は、例えば、抗体可変ドメインおよび場合により定常ドメインをコードするDNAの操作および発現に関連するタンパク質消化技術または組換え遺伝子操作技術などの任意の適切な標準的技術を用いて、完全抗体分子から誘導され得る。このようなDNAは既知であり、および/または例えば市販の供給源、DNAライブラリー（例えばファージ-抗体ライブラリーを含む）から容易に入手可能であるか、または合成することができる。DNAは、例えば、1つ以上の可変ドメインおよび/もしくは定常ドメインを適切な配置変更と配置し、またはコドンを導入し、システイン残基を生成し、アミノ酸を修飾、付加もしくは欠失などするために、化学的にまたは分子生物学技術を用いて配列決定および操作され得る。

30

**【 0 1 1 9 】**

抗体結合断片の非限定例としては、(i)Fab断片、(ii)F(ab')2断片、(iii)Fd断片、(iv)Fv断片、(v)一本鎖Fv(scfv)分子、(vi)dAb断片、および(vii)抗体の超可変領域（例えば、CDR3ペプチドなどの単離された相補性決定領域（CDR））を模倣するアミノ酸残基、または拘束FR3-CDR3-FR4ペプチドからなる最小認識単位が挙げられる。ドメイン特異的抗体、單ードメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、CDR移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディなど

40

50

)、小型モジュール型免疫医薬品( S M I P )、およびサメ可変 I g N A R ドメインなどの他の操作された分子も、本明細書で使用する「抗原結合断片」という表現に包含される。

#### 【 0 1 2 0 】

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

#### 【 0 1 2 1 】

ある特定の実施形態において、抗体の抗原結合断片は、少なくとも 1 つの定常ドメインへ共有結合した少なくとも 1 つの可変ドメインを含有し得る。本発明の抗体の抗原結合断片に見出すことができる可変および定常ドメインの非限定的で例示的な構成としては、( i ) V H - C H 1 、( i i ) V H - C H 2 、( i i i ) V H - C H 3 、( i v ) V H - C H 1 - C H 2 、( v ) V H - C H 1 - C H 2 - C H 3 、( v i ) V H - C H 2 - C H 3 、( v i i ) V H - C L 、( v i i i ) V L - C H 1 、( i x ) V L - C H 2 、( x ) V L - C H 3 、( x i ) V L - C H 1 - C H 2 、( x i i ) V L - C H 1 - C H 2 - C H 3 、( x i i i ) V L - C H 2 - C H 3 、および( x i v ) V L - C L が挙げられる。先に列挙した例示的な立体配置のいずれかを含む、可変ドメインおよび定常ドメインの任意の立体配置において、可変ドメインおよび定常ドメインは、互いに直接連結されていてもよく、または完全もしくは部分的ヒンジ領域もしくはリンカー領域によって連結されていてもよい。ヒンジ領域は、単一のポリペプチド分子において隣接する可変ドメインおよび / または定常ドメイン間の可撓性または半可撓性の結合をもたらす少なくとも 2 つの( 例えば、5 、 10 、 15 、 20 、 40 、 60 またはそれより多数の ) アミノ酸からなり得る。そのうえ、本発明の抗体の抗原結合断片は、互いとのおよび / または 1 つ以上の単量体 V H ドメインもしくは V L ドメインとの非共有結合において、先に列挙した可変ドメイン立体配置および定常ドメイン立体配置のいずれかのホモ二量体またはヘテロ二量体( または他の多量体 ) を含み得る。

#### 【 0 1 2 2 】

完全抗体分子と同様に、抗体結合断片は、单一特異性または多重特異性( 例えば、二重特異性 ) であり得る。抗体の多重特異性抗原結合断片は、典型的には、少なくとも 2 つの異なる可変ドメインを含むことになっており、各可変ドメインは、別個の抗原へまたは同じ抗原上の異なるエピトープへ特異的に結合することができる。本明細書に開示される例示的な二重特異性抗体フォーマットを含む任意の多重特異性抗体フォーマットは、当該技術分野で利用可能な通例の技術を使用して、本発明の抗体の抗原結合断片との関連で使用に適合し得る。

#### 【 0 1 2 3 】

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

10

20

30

40

50

アイソタイプは、その抗体が細胞毒性を媒介することが望ましいかどうかに基づいて選択されてよい。

【0124】

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

10

【0125】

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

20

【0126】

ヒト抗体は、ヒンジの不均一性に関連する2つの形態で存在することができる。一形態において、免疫グロブリン分子は、二量体が鎖間重鎖ジスルフィド結合によって一緒に保持されている約150 ~ 160 kDa の安定な四本鎖構築物を含む。第2の形態において、二量体は鎖間ジスルフィド結合を介して連結されておらず、共有結合した軽鎖と重鎖からなる約75 ~ 80 kDa の分子が形成される（半抗体）。これらの形態は、親和性精製後でさえも分離することが極めて困難であった。

30

【0127】

様々な無傷のIgGアイソタイプにおける第2の形態の出現頻度は、抗体のヒンジ領域アイソタイプに関連する構造上の相違によるが、それに限定されない。ヒトIgG4ヒンジのヒンジ領域における单一アミノ酸置換は、ヒトIgG1ヒンジを用いて典型的に観察されるレベルまで第2の形態の出現を有意に減少させることができる（Angal et al. (1993) Molecular Immunology 30: 105）。本発明は、ヒンジ、CH2またはCH3領域に1つ以上の変異を有する抗体を包含し、例えば産生において、所望の抗体形態の収率を改善するのに望ましい場合がある。

40

【0128】

本発明の抗体は単離された抗体であり得る。本明細書で使用される「単離された抗体」は、同定された抗体、およびその天然環境の少なくとも1つの成分から分離および/または回収された抗体を意味する。例えば、生物の少なくとも1つの成分から、または抗体が天然に存在するかもしくは天然に産生される組織または細胞から分離または除去された抗体は、本発明の目的のための「単離された抗体」である。単離された抗体はまた、組換え細

50

胞内の原位置の抗体を含む。単離された抗体は、少なくとも 1 つの精製または単離工程を受けた抗体である。特定の実施形態によると、単離された抗体は他の細胞性物質および / または化学物質を実質的に含まなくてもよい。

#### 【 0 1 2 9 】

本発明はまた、M U C 1 6 に結合するワンアーム抗体も含む。本明細書中で使用される場合、「ワンアーム抗体」とは、单一の抗体重鎖および单一の抗体軽鎖を含む抗原結合分子を意味する。本発明のワンアーム抗体は、表 1 に記載の H C V R / L C V R または C D R アミノ酸配列のいずれかを含み得る。

#### 【 0 1 3 0 】

本明細書に開示する抗 M U C 1 6 または抗 M U C 1 6 / 抗 C D 3 抗体は、対応する生殖系列配列と比較して、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインのフレームワーク領域および / または C D R 領域に 1 つ以上のアミノ酸置換、挿入および / または欠失を含み得る。このような変異は、本明細書中に開示するアミノ酸配列を、例えば公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明は、本明細書に開示するアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体およびその抗原結合断片を含み、1 つ以上のフレームワークおよび / または C D R 領域内の 1 つ以上のアミノ酸は、抗体が由來した生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基（複数可）へ、または対応する生殖系列残基（複数可）の保存的アミノ酸置換へ変異する（このような配列変化はまとめて、「生殖系列変異」と本明細書で呼ばれる）。当業者は、本明細書に開示する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列から出発して、1 つ以上の個々の生殖系列変異またはこれらの組み合わせを含む多数の抗体および抗体結合断片を容易に产生することができる。ある特定の実施形態において、V H ドメインおよび / または V L ドメイン内のフレームワークおよび / または C D R 残基は全て、抗体が由來した元の生殖系列配列において認められる残基へと変異し戻される。他の実施形態において、ある特定の残基のみが元の生殖系列配列へと変異し戻され、例えば、変異した残基は F R 1 の最初の 8 個のアミノ酸内に、もしくは変異した残基は F R 4 の最後の 8 個のアミノ酸内に認められ、または変異した残基は、C D R 1、C D R 2 もしくは C D R 3 内にのみ認められる。他の実施形態において、フレームワークおよび / または C D R 残基（複数可）の 1 つ以上は、異なる生殖系列配列（すなわち、抗体が本来由來した生殖系列配列とは異なる生殖系列配列）の対応する残基（複数可）へ変異する。さらに、本発明の抗体は、フレームワークおよび / または C D R 領域内に 2 つ以上の生殖系列変異の任意の組み合わせを含有してもよく、例えば、ある特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ変異するのに対し、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持され、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ変異する。いったん得られれば、1 つ以上の生殖系列変異を含有する抗体および抗体結合断片は、結合特異性の改善、結合（例えば、細胞結合滴定または F A C S 結合により測定した場合）または結合親和性（例えば、K D ）の増大、アンタゴニストまたはアゴニストの生物学的特性の改善または増強（場合によって）、免疫原性の低下などの 1 つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。この一般的な方法で得られた抗体および抗体結合断片は、本発明の範囲内に包含される。

#### 【 0 1 3 1 】

本発明はまた、1 つ以上の保存的置換を有する本明細書に開示の H C V R アミノ酸配列、L C V R アミノ酸配列、および / または C D R アミノ酸配列のいずれかの変異体を含む抗 M U C 1 6 抗体または抗 M U C 1 6 / 抗 C D 3 抗体を含む。例えば、本発明は、本明細書の表 1 に記載のまたは本明細書の表 1 6、1 8、1 9、2 2、および 2 3 に記載の H C V R アミノ酸配列、L C V R アミノ酸配列、および / または C D R アミノ酸配列のいずれかに対して、例えば、1 0 個以下、8 個以下、6 個以下、または 4 個以下の保存的アミノ酸置換を有する、H C V R アミノ酸配列、L C V R アミノ酸配列、および / または C D R アミノ酸配列を有する抗 M U C 1 6 または抗 M U C 1 6 / 抗 C D 3 抗体を含む。

#### 【 0 1 3 2 】

10

20

30

40

50

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

#### 【0133】

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

10

#### 【0134】

ポリペプチドへ適用される場合、「実質的な類似性」または「実質的に類似の」という用語は、2つのペプチド配列が、既定のギャップ重みを用いてプログラムGAPまたはBESTFITなどによって最適に整列した場合、少なくとも95%の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも98%または99%の配列同一性を共有する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を備えた側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。概して、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないことになっている。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換だけ互いに異なる場合、配列同一性の割合または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整してもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、参考により本明細書に組み込まれるPearson(1994)Methods Mol. Biol. 24:307-331を参照されたい。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、（1）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、（2）脂肪族-ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン、（3）アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン、（4）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、（5）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン、（6）酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに（7）含硫側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸およびアスパラギン-グルタミンである。あるいは、保存的置換とは、参考により本明細書に組み込まれるGonnert et al. (1992) Science 256:1443-1445に開示されるPAM250対数尤度行列において正值を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、PAM250対数尤度マトリックスにおいて負以外の値を有する任意の変化である。

20

#### 【0135】

ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼ばれ、典型的には配列分析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失および他の修飾へ割り当てられた類似の測定値を用いて類似の配列と一致させる。例えば、GC3Gソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドのような密接に関連するポリペプチド間の、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の

30

40

50

間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータと共に使用することができる G a p および B e s t f i t などのプログラムを含有する。例えば、G C G 第 6 . 1 版を参照されたい。ポリペプチド配列は、G C G 第 6 . 1 版におけるプログラムである、既定パラメータまたは推奨パラメータを備えた F A S T A を使用して比較することができる。F A S T A ( 例えは、F A S T A 2 および F A S T A 3 ) は、問い合わせ配列と検索配列の間の最良重複の領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する ( P e a r s o n ( 2 0 0 0 ) 上述)。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを用いるコンピュータプログラム B L A S T 、特に B L A S T P または T B L A S T N である。例えは、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、A l t s c h u l e t a l . ( 1 9 9 0 ) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 および A l t s c h u l e t a l . ( 1 9 9 7 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 4 0 2 を参照されたい。

#### 【 0 1 3 6 】

##### 生殖系列変異

本明細書に開示する抗 C D 3 抗体は、対応する生殖系列配列と比較して、重鎖可変ドメインのフレームワーク領域および / または C D R 領域に 1 つ以上のアミノ酸置換、挿入および / または欠失を含む。

#### 【 0 1 3 7 】

本発明はまた、本明細書に開示するアミノ酸配列のいずれかに由来する抗体およびその抗原結合断片を含み、1 つ以上のフレームワークおよび / または C D R 領域内の 1 つ以上のアミノ酸は、抗体が由來した生殖系列配列の対応する残基 ( 複数可 ) へ、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基 ( 複数可 ) へ、または対応する生殖系列残基 ( 複数可 ) の保存的アミノ酸置換へ変異し ( このような配列変化はまとめて、「生殖系列変異」と本明細書で呼ばれる ) 、 C D 3 抗原への検出可能な結合が弱いまたはない。 C D 3 を認識するいくつかのそのような例示的抗体は、本明細書の表 1 6 、 1 8 、 1 9 、 2 2 、および 2 3 に記載されている。

#### 【 0 1 3 8 】

さらに、本発明の抗体は、フレームワークおよび / または C D R 領域内に 2 つ以上の生殖系列変異の任意の組み合わせを含有してもよく、例えは、ある特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ変異するのに対し、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は、維持され、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ変異する。いつたん得られれば、1 つ以上の生殖系列変異を含む抗体および抗体結合断片を、結合特異性の向上、結合または結合親和性の弱さまたは低下、薬物動態学的特性の向上または増強、免疫原性の低下などの 1 つ以上の所望の特性に関して試験することができる。本開示の指針を考慮してこの一般的な方法で得られた抗体および抗原結合断片は、本発明の範囲内に包含される。

#### 【 0 1 3 9 】

本発明はまた、1 つ以上の保存的置換を有する本明細書に開示する H C V R アミノ酸配列、L C V R アミノ酸配列、および / または C D R アミノ酸配列のいずれかの変異体を含む抗 C D 3 抗体を含む。例えは、本発明は、本明細書の表 1 6 、 1 8 、 1 9 、 2 2 、および 2 3 に記載の H C V R アミノ酸配列、L C V R アミノ酸配列、および / または C D R アミノ酸配列のいずれかに対して、例えは 1 0 個以下、8 個以下、6 個以下または 4 個以下の保存的アミノ酸置換を有する H C V R アミノ酸配列、L C V R アミノ酸配列、および / または C D R アミノ酸配列を有する抗 C D 3 抗体を含む。本発明の抗体および二重特異性抗原結合分子は、個々の抗原結合ドメインが由來した対応する生殖系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび / または C D R 領域に 1 つ以上のアミノ酸置換、挿入および / または欠失を含むが、 C D 3 抗原への所望の弱い結合から検出不可能な結合を維持または改善する。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性 ( 例えは、電荷または疎水性 ) を備えた側鎖 ( R 基 ) を有する別のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸残基によって置換されたものである。一般に、保存的アミノ酸置換はタンパク質の機能的特性を実質的に変化させない、すなわち、アミノ酸置換が、抗 C D 3 結合分子の場合における所望の弱から検出不可能な結合または結合親和性を維持または改善する。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、(1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシン、(2) 脂肪族 - ヒドロキシル側鎖：セリンおよびトレオニン、(3) アミド含有側鎖：アスパラギンおよびグルタミン、(4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、(5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン、およびヒスチジン、(6) 酸性側鎖：アスパラギン酸およびグルタミン酸、ならびに(7) 含硫側鎖：システインおよびメチオニンが挙げられる。好みの保存的アミノ酸置換基は、バリン - ロイシン - イソロイシン、フェニルアラニン - チロシン、リジン - アルギニン、アラニン - バリン、グルタミン酸 - アスパラギン酸およびアスパラギン - グルタミンである。あるいは、保存的置換とは、参照により本明細書に組み込まれる Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443 - 1445 に開示される P A M 250 対数尤度行列において正値を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、P A M 250 対数尤度マトリックスにおいて負以外の値を有する任意の変化である。

#### 【 0 1 4 0 】

本発明はまた、本明細書に開示される H C V R および / または C D R アミノ酸配列のいずれかと実質的に同一である H C V R および / または C D R アミノ酸配列を有する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子を含むが、C D 3 抗原への所望の弱い親和性を維持または改善する。アミノ酸配列意味する場合、「実質的な同一性」または「実質的に同一の」という用語は、2つのアミノ酸配列が、既定のギャップ重みを用いてプログラム G A P または B E S T F I T などによって最適に整列した場合、少なくとも 95% の配列同一性、さらにより好みは少なくとも 98%、または 99% の配列同一性を共有する。好みは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換だけ互いに異なる場合、配列同一性の割合または類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整してもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307 - 331 を参照されたい。

#### 【 0 1 4 1 】

ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼ばれ、典型的には配列分析ソフトウェアを用いて測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失および他の修飾へ割り当てられた類似の測定値を用いて類似の配列と一致させる。例えば、G C G ソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドのような密接に関連するポリペプチド間の、または野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータと共に使用することができる G a p および B e s t f i t などのプログラムを含有する。例えば、G C G 第 6.1 版を参照されたい。ポリペプチド配列は、G C G 第 6.1 版におけるプログラムである、既定パラメータまたは推奨パラメータを備えた F A S T A を使用して比較することができる。F A S T A ( 例えば、F A S T A 2 および F A S T A 3 ) は、問い合わせ配列と検索配列の間の最良重複の領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する ( Pearson (2000) 上述)。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好みのアルゴリズムは、既定パラメータを用いるコンピュータプログラム B L A S T 、特に B L A S T P または T B L A S T N である。例えば、A l t s c h u l et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 および A l t s c h u l et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 402 を参照されたい。

#### 【 0 1 4 2 】

いったん得られれば、1つ以上の生殖系列変異を含む抗原結合ドメインを、1つ以上のインビトロアッセイを利用して結合または結合親和性の低下について試験した。特定の抗原

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

#### 【0143】

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

#### 【0144】

##### 抗体の結合特性

10

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

#### 【0145】

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

20

#### 【0146】

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

30

#### 【0147】

用語「KD」（M）は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数、または抗原に結合する抗体もしくは抗体結合断片の解離平衡定数を指す。KDと結合親和性との間には逆の関係があり、したがって、KD値が小さいほど、親和性は高い、すなわちより強い。したがって、「より高い親和性」または「より強い親和性」という用語は、相互作用を形成するより高い能力、つまりより小さいKD値に関し、逆に「より低い親和性」または「より弱い親和性」という用語は、相互作用を形成するより低い能力、つまりより大きなKD値に関する。状況によっては、他の相互作用パートナー分子（例えば抗原Y）に対する分子（例えば抗体）の結合親和性と比較して、その相互作用パートナー分子（例えば抗原X）に対する特定の分子（例えば抗体）のより高い結合親和性（またはKD）は、より大きなKD値（より低い、またはより弱い、親和性）をより小さなKD（より高い、またはより強い、親和性）で割ることによって決定される結合比として表され、例えば、場合によって5倍または10倍高い結合親和性として表される。

40

#### 【0148】

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

#### 【0149】

用語「 $k_a$ 」（M<sup>-1</sup> × sec<sup>-1</sup>または1/M）は、特定の抗体-抗原相互作用の会合

50

速度定数、または抗体もしくは抗体結合断片の会合速度定数を指す。

**【0150】**

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

**【0151】**

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

10

**【0152】**

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

**【0153】**

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

20

**【0154】**

**二重特異性抗原結合分子**

本発明の抗体は、单一特異性、二重特異性または多重特異性であり得る。多重特異性抗体は、1つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに特異的であり得るか、または2つ以上の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含有し得る。例えば、Tutt et al. , 1991, J. Immunol. 147: 60 - 69, Kuffer et al. , 2004, Trends Biotechnol. 22: 238 - 244 を参照されたい。本発明の抗MUC16 単一特異性抗体または抗MUC16 / 抗CD3 二重特異性抗体は、別の機能性分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質に連結するか、またはそれと同時発現させることができる。例えば、抗体またはその断片は、別の抗体または抗体断片などの1つ以上の他の分子実体に（例えば、化学結合、遺伝的融合、非共有結合性会合などにより）機能的に連結されて、第2のまたは追加の結合特異性を有する二重特異性または多重特異性抗体を生成することができる。

30

**【0155】**

本明細書での表現「抗CD3 抗体」または「抗MUC16 抗体」の使用は、单一特異性の抗CD3 抗体または抗MUC16 抗体、ならびに CD3 結合アームおよび MUC16 結合アームを含む二重特異性抗体の両方を含むことを意図する。したがって、本発明は、免疫グロブリンの一方のアームがヒトCD3 に結合し、免疫グロブリンの他方のアームがヒト MUC16 に特異的である二重特異性抗体を含む。CD3 結合アームは、本明細書の表1、16、18、19、22、および23 に記載の、HCVR / LCVR または CDR アミノ酸配列のいずれかを含み得る。

40

**【0156】**

特定の実施形態において、CD3 結合アームはヒトCD3 に結合し、ヒトT細胞活性化を誘導する。特定の実施形態において、CD3 結合アームはヒトCD3 に弱く結合し、ヒトT細胞活性化を誘導する。他の実施形態において、CD3 結合アームはヒトCD3 に弱く結合し、二重特異性抗体または多重特異性抗体との関連で腫瘍関連抗原発現細胞死滅を誘導する。他の実施形態において、CD3 結合アームはヒトおよびカニクイザル（サル）CD3 と弱く結合または会合するが、それでも結合相互作用は当技術分野で既知のインビトロアッセイでは検出できない。MUC16 結合アームは、本明細書の表1 に記載の HCV

50

R / L C V R または C D R アミノ酸配列のいずれかを含み得る。

**【 0 1 5 7 】**

特定の例示的な実施形態によると、本発明は C D 3 および M U C 1 6 に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子を含む。そのような分子は、本明細書において、例えば、「抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 」、または「抗 C D 3 × M U C 1 6 」もしくは「 C D 3 × M U C 1 6 」二重特異性分子、または他の同様の用語（例えば、抗 M U C 1 6 / 抗 C D 3 ）と称することができる。本発明は、M U C 1 6 に結合する第 1 の抗原結合アームおよび C D 3 に結合する第 2 の抗原結合アームを用いて構築された二重特異性抗原結合分子を提供する。いくつかの実施形態において、抗 C D 3 アームは、I G H V 3 - 9 \* 0 1 、I G H J 6 \* 0 2 、I G H D 5 - 1 2 \* 0 1 由来の重鎖を含む。他の実施形態において、二重特異性抗原結合分子はヒト P B M C 細胞を活性化し、および / または腫瘍抗原発現細胞株に対する細胞傷害活性を誘導する。

**【 0 1 5 8 】**

本発明で使用する場合、「M U C 1 6」という用語は、非ヒト種由来であると特定されない限り、ヒト M U C 1 6 タンパク質を指す（例えば、「マウス M U C 1 6 」、「サル M U C 1 6 」など）。ヒト M U C 1 6 タンパク質は、配列番号 1 8 9 9 に示されるアミノ酸配列を有する。

**【 0 1 5 9 】**

C D 3 および M U C 1 6 に特異的に結合する前述の二重特異性抗原結合分子は、インビトロ親和性結合アッセイで測定した場合に、約 4 0 n M 超の K D を示す弱い結合親和性で C D 3 に結合する、抗 C D 3 抗原結合分子を含むことができる。前述の二重特異性抗原結合分子は、F A C S 滴定アッセイで測定した場合に、C D 3 に結合して約 1 0 0 n M 超の E C 5 0 を示す、抗 C D 3 抗原結合分子を含むことができる。前述の二重特異性抗原結合分子は、インビトロ親和性結合アッセイまたは F A C S 滴定アッセイによって測定されるように、C D 3 への測定可能なまたは観察可能な結合を示さないが、ヒト P B M C 細胞を活性化する能力を保持し、および / または腫瘍抗原発現細胞株に対して細胞傷害活性を誘導する、抗 C D 3 抗原結合分子を含み得る。

**【 0 1 6 0 】**

本明細書で使用される場合、表現「抗原結合分子」は、単独で、または特定の抗原に特異的に結合する、1つ以上のさらなる C D R および / またはフレームワーク領域（F R ）と組み合わせて少なくとも1つの相補性決定領域（C D R ）を含むまたはそれからなるタンパク質、ポリペプチド、または分子複合体を意味する。特定の実施形態において、抗原結合分子は、それらの用語が本明細書の他所で定義されているように、抗体または抗体の断片である。

**【 0 1 6 1 】**

本明細書で使用される場合、表現「二重特異性抗原結合分子」は、少なくとも第 1 の抗原結合ドメインおよび第 2 の抗原結合ドメインを含むタンパク質、ポリペプチドまたは分子複合体を意味する。二重特異性抗原結合分子内の各抗原結合ドメインは、単独で、または1つ以上の追加の C D R および / または F R と組み合わせて、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも1つの C D R を含む。本発明の文脈において、第 1 の抗原結合ドメインは第 1 の抗原（例えば C D 3 ）に特異的に結合し、第 2 の抗原結合ドメインは第 2 の異なる抗原（例えば M U C 1 6 ）に特異的に結合する。

**【 0 1 6 2 】**

本発明の特定の例示的実施形態において、二重特異性抗原結合分子は二重特異性抗体である。二重特異性抗体の各抗原結合ドメインは、重鎖可変ドメイン（H C V R ）および軽鎖可変ドメイン（L C V R ）を含む。第 1 および第 2 の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）の文脈において、第 1 の抗原結合ドメインの C D R は接頭辞「A 1 」を付けて指定され、第 2 の抗原結合ドメインの C D R は接頭辞「A 2 」を付けて指定され得る。したがって、第 1 の抗原結合ドメインの C D R は、本明細書において A 1 - H C D R 1 、A 1 - H C D R 2 、および A 1 - H C D R 3 と呼ばれてもよ

10

20

30

40

50

く、第2の抗原結合ドメインのCDRは、本明細書においてA2-HCDR1、A2-HCDR2、およびA2-HCDR3と呼ばれてもよい。

#### 【0163】

第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、互いに直接的または間接的に結合して、本発明の二重特異性抗原結合分子を形成し得る。あるいは、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインは、それぞれ別々の多量体化ドメインに連結されていてもよい。1つの多量体化ドメインと別の多量体化ドメインとの会合は、2つの抗原結合ドメイン間の会合を促進し、それによって二重特異性抗原結合分子を形成する。本明細書で使用される場合、「多量体化ドメイン」は、同一または類似の構造または構成の第2の多量体化ドメインと会合する能力を有する任意の高分子、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、またはアミノ酸である。例えば、多量体化ドメインは、免疫グロブリンCH3ドメインを含むポリペプチドであってもよい。多量体化成分の非限定的な例は、免疫グロブリンのFc部分(CH2-CH3ドメインを含む)、例えばアイソタイプIgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選択されるIgGのFcドメイン、ならびに各アイソタイプ群内のアロタイプである。

10

#### 【0164】

本発明の二重特異性抗原結合分子は、典型的には2つの多量体化ドメイン、例えば、それ別々の抗体重鎖の一部である2つのFcドメインを含む。第1および第2の多量体化ドメインは、例えば、IgG1/IgG1、IgG2/IgG2、IgG4/IgG4などの同じIgGアイソタイプであり得る。あるいは、第1および第2の多量体化ドメインは、例えば、IgG1/IgG2、IgG1/IgG4、IgG2/IgG4などの異なるIgGアイソタイプのものであり得る。

20

#### 【0165】

特定の実施形態において、多量体化ドメインは、Fc断片または少なくとも1つのシステム残基を含有する長さが1～約200アミノ酸のアミノ酸配列である。他の実施形態において、多量体化ドメインはシステイン残基、または短いシステイン含有ペプチドである。他の多量体化ドメインには、ロイシンジッパー、ヘリックスループヘリックス、またはコイルドコイルモチーフを含むかまたはそれらからなるペプチドまたはポリペプチドが含まれる。

30

#### 【0166】

任意の二重特異性抗体フォーマットまたは技術を使用して、本発明の二重特異性抗原結合分子を作製することができる。例えば、第1の抗原結合特異性を有する抗体またはその断片は、第2の抗原結合性を有する他の抗体または抗体断片などの1つ以上の他の分子実体に(例えば、化学結合、遺伝的融合、非共有結合などにより)機能的に連結されて、二重特異性抗原結合分子を生成することができる。本発明の文脈において使用できる特定の例示的な二重特異性フォーマットには、例えば、scFv系フォーマットまたはダイアボディ二重特異性フォーマット、IgG-scFv融合、二重可変ドメイン(DVD)-Ig、Quadroma、ノブズ-イントゥ-ホールズ(knobs-into-holes)、共通の軽鎖(例えば、ノブズ-イントゥ-ホールズを備えた共通の軽鎖など)、CrossMab、CrossFab、(SEED)ボディ、ロイシンジッパー、Duobody、IgG1/IgG2、二重作用型Fab(DAF)-IgG、およびMab2二重特異性フォーマットが含まれるが、これらに限定されない(上述のフォーマットの総説については、例えば、Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11、およびそこに引用されている参考文献を参照されたい)。

40

#### 【0167】

本発明の二重特異性抗原結合分子との関連で、多量体化ドメイン、例えば、Fcドメインは、野生型の、天然に存在するFcドメインと比較して、1つ以上のアミノ酸変化(例えば、挿入、欠失または置換)を含んでもよい。例えば、本発明は、FcとFcRnとの間の修飾された結合相互作用(例えば、増強または減少)を有する改変Fcドメインをもたらす、Fcドメイン中の1つ以上の修飾を含む二重特異性抗原結合分子を含む。一実施形

50

態において、二重特異性抗原結合分子は、C<sub>H</sub>2またはC<sub>H</sub>3領域に修飾を含み、この修飾は酸性環境（例えば、pH範囲約5.5～約6.0のエンドソーム内）において、F<sub>c</sub>R<sub>n</sub>に対するF<sub>c</sub>ドメインの親和性を高める。そのようなF<sub>c</sub>修飾の非限定的な例には、例えば、250位（例えば、EまたはQ）、250位および428位（例えば、LまたはF）、252位（例えば、L/Y/F/WまたはT）、254位（例えば、SまたはT）、および256位（例えば、S/R/Q/E/DまたはT）での修飾、または428位および/または433位（例えばL/R/S/P/QまたはK）および/または434位（例えばH/FまたはY）での修飾、あるいは250位および/または428位の修飾、あるいは307位もしくは308位（例えば、308F、V308F）、および434位での修飾が含まれる。一実施形態において、修飾は428L（例えばM428L）および434S（例えばN434S）の修飾、428L、259I（例えば、V259I）、および308F（例えば、V308F）の修飾、433K（例えば、H433K）および434（例えば、434Y）の修飾、252、254、および256（例えば、252Y、254T、および256E）の修飾、250Qおよび428Lの修飾（例えば、T250QおよびM428L）、307および/または308の修飾（例えば、308Fまたは308P）を含む。

#### 【0168】

本発明はまた、第1のC<sub>H</sub>3ドメインおよび第2のIg C<sub>H</sub>3ドメインを含む二重特異性抗原結合分子を含み、第1および第2のIg C<sub>H</sub>3ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸ほど互いに異なっており、少なくとも1つのアミノ酸の相違は、アミノ酸の相違を欠失する二重特異性抗体と比較して、プロテインAへの二重特異性抗体の結合を低減させる。一実施形態において、第1のIg C<sub>H</sub>3ドメインはプロテインAを結合し、第2のIg C<sub>H</sub>3ドメインはH95R修飾（IMGTエクソン番号付けによる、EU番号付けではH435R）などのプロテインA結合を低減または消失させる変異を含有する。第2のC<sub>H</sub>3は、Y96F修飾（IMGTによるものであり、EUではY436F）をさらに含み得る。例えば、米国特許第8,586,713号を参照されたい。第2のC<sub>H</sub>3内に認められ得るさらなる修飾には、IgG1抗体の場合、D16E、L18M、N44S、K52N、V57M、およびV82I（IMGTによるものであり、EUによるD356E、L358M、N384S、K392N、V397M、およびV422I）、IgG2抗体の場合、N44S、K52N、およびV82I（IMGTであって、EUによるN384S、K392N、およびV422I）、ならびにIgG4抗体の場合、Q15R、N44S、K52N、V57M、R69K、E79Q、およびV82I（IMGTによるものであり、EUによるQ355R、N384S、K392N、V397M、R409K、E419Q、およびV422I）が含まれる。

#### 【0169】

特定の実施形態において、F<sub>c</sub>ドメインは、2つ以上の免疫グロブリンアイソタイプに由来するF<sub>c</sub>配列を組み合わせたキメラであり得る。例えば、キメラF<sub>c</sub>ドメインは、ヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4のC<sub>H</sub>2領域に由来するC<sub>H</sub>2配列の一部または全部、およびヒトIgG1、ヒトIgG2、またはヒトIgG4に由来するC<sub>H</sub>3配列の一部または全部を含むことができる。キメラF<sub>c</sub>ドメインはまた、キメラヒンジ領域を含み得る。例えば、キメラヒンジは、ヒトIgG1ヒンジ領域、ヒトIgG2ヒンジ領域、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列と組み合わせた、ヒトIgG1ヒンジ領域、ヒトIgG2ヒンジ領域、またはヒトIgG4ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」配列を含むことができる。本明細書に記載の抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラF<sub>c</sub>ドメインの特定の例は、N末端からC末端に、[IgG4 C<sub>H</sub>1] - [IgG4上方ヒンジ] - [IgG2下方ヒンジ] - [IgG4 C<sub>H</sub>2] - [IgG4 C<sub>H</sub>3]を含む。本明細書に記載の抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラF<sub>c</sub>ドメインの別の例は、N末端からC末端に、[IgG1 C<sub>H</sub>1] - [IgG1上方ヒンジ] - [IgG2下方ヒンジ] - [IgG4 C<sub>H</sub>2] - [IgG1 C<sub>H</sub>3]を含む。本発明の抗原結合分子のいずれかに含まれ得るキメラF<sub>c</sub>ドメインのこれらおよび他の

10

20

30

40

50

例は、2014年8月28日に公開された米国特許公開第2014/0243504号に記載されており、その全体が本明細書に組み込まれる。これらの一般的な構造配置を有するキメラFcドメイン、およびその変異体は、Fc受容体結合を変えてしまうことができ、そのことがFcエフェクター機能に影響を及ぼす。

#### 【0170】

特定の実施形態において、本発明は、重鎖定常領域(CH)領域が、配列番号1911、配列番号1912、配列番号1913、配列番号1914、配列番号1915、配列番号1916、配列番号1917、配列番号1918、配列番号1919、または配列番号1920のいずれか1つと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を含む抗体重鎖を提供する。いくつかの実施形態において、重鎖定常領域(CH)領域は、配列番号1911、配列番号1912、配列番号1913、配列番号1914、配列番号1915、配列番号1916、配列番号1917、配列番号1918、配列番号1919および配列番号1920からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。10

#### 【0171】

他の実施形態において、本発明は、Fcドメインが、配列番号1921、配列番号1922、配列番号1923、配列番号1924、配列番号1925、配列番号1926、配列番号1927、配列番号1928、配列番号1929、または配列番号1930のいずれか1つと少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む、抗体重鎖を提供する。いくつかの実施形態において、Fcドメインは、配列番号1921、配列番号1922、配列番号1923、配列番号1924、配列番号1925、配列番号1926、配列番号1927、配列番号1928、配列番号1929、および配列番号1930からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。20

#### 【0172】

##### 配列変異体

本明細書の抗体および二重特異性抗原結合分子は、個々の抗原結合ドメインが由來した対応する生殖系列配列と比較して、重鎖および軽鎖可変ドメインのフレームワークおよび/またはCDR領域に1つ以上のアミノ酸置換、挿入および/または欠失を含み得る。このような変異は、本明細書中に開示するアミノ酸配列を、例えば公共の抗体配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認することができる。本発明の抗原結合分子は、本明細書に開示する例示的なアミノ酸配列のいずれかに由来する抗原結合ドメインを含んでもよく、1つ以上のフレームワークおよび/またはCDR領域内の1つ以上のアミノ酸は、抗体が由來した生殖系列配列の対応する残基(複数可)へ、または別のヒト生殖系列配列の対応する残基(複数可)へ、または対応する生殖系列残基(複数可)の保存的アミノ酸置換へ変異する(このような配列変化はまとめて、「生殖系列変異」と本明細書で呼ばれる)。当業者は、本明細書に開示する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列から出発して、1つ以上の個々の生殖系列変異またはこれらの組み合わせを含む多数の抗体および抗体結合断片を容易に产生することができる。特定の実施形態において、VHドメインおよび/またはVLドメイン内のフレームワークおよび/またはCDR残基は全て、抗原結合ドメインが由來した元の生殖系列配列において認められる残基へと戻り変異する。他の実施形態において、ある特定の残基のみが元の生殖系列配列へと変異し戻され、例えば、変異した残基はFR1の最初の8個のアミノ酸内に、もしくは変異した残基はFR4の最後の8個のアミノ酸内に認められ、または変異した残基は、CDR1、CDR2もしくはCDR3内にのみ認められる。他の実施形態において、フレームワークおよび/またはCDR残基(複数可)の1つ以上は、異なる生殖系列配列(すなわち、抗原結合ドメインが本来由來した生殖系列配列とは異なる生殖系列配列)の対応する残基(複数可)へ変異する。さらに、抗原結合ドメインは、フレームワークおよび/またはCDR領域内に2つ以上の生殖系列変異のいずれかの組み合わせを含有してもよく、例えば、特定の個々の残基は、特定の生殖系列配列の対応する残基へ変異するのに対し304050

、元の生殖系列配列とは異なるある特定の他の残基は維持され、または異なる生殖系列配列の対応する残基へ変異する。いったん得られれば、1つ以上の生殖系列変異を含有する抗原結合ドメインは、結合特異性の改善、結合または結合親和性の増大、アンタゴニストまたはアゴニストの生物学的特性の改善または増強（場合によって）、免疫原性の低下などの1つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。この一般的な方法で得られた1つ以上の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗原結合分子は、本発明の範囲内に包含される。

#### 【0173】

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

#### 【0174】

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

#### 【0175】

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

10

20

30

40

50

間の配列相同性または配列同一性を決定するための既定パラメータと共に使用することができる G a p および B e s t f i t などのプログラムを含有する。例えば、G C G 第 6 . 1 版を参照されたい。ポリペプチド配列は、G C G 第 6 . 1 版におけるプログラムである、既定パラメータまたは推奨パラメータを備えた F A S T A を使用して比較することができる。F A S T A ( 例えは、F A S T A 2 および F A S T A 3 ) は、問い合わせ配列と検索配列の間の最良重複の領域の整列およびパーセント配列同一性を提供する ( P e a r s o n ( 2 0 0 0 ) 上述)。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを用いるコンピュータプログラム B L A S T 、特に B L A S T P または T B L A S T N である。例えは、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる、A l t s c h u l e t a l . ( 1 9 9 0 ) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 3 - 4 1 0 および A l t s c h u l e t a l . ( 1 9 9 7 ) N u c l e i c A c i d s R e s . 2 5 : 3 3 8 9 - 4 0 2 を参照されたい。

#### 【 0 1 7 6 】

##### p H 依存性の結合

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

#### 【 0 1 7 7 】

場合によっては、「中性 p H と比較して、酸性 p H で . . . 結合の低下」は、中性 p H でその抗原に結合する抗体の K D 値に対する酸性 p H でその抗原に結合する抗体の K D 値の比に関して、表される。( またはその逆 )。例えは、抗体またはその抗原結合断片が約 3 . 0 以上の酸性 / 中性 K D 比を示す場合、本発明の目的のために、抗体またはその抗原結合断片は「中性 p H と比較して酸性 p H では M U C 1 6 への結合の低下」を示すとみなされ得る。特定の例示的実施形態において、本発明の抗体または抗原結合断片の酸性 / 中性 K D 比は、約 3 . 0 、 3 . 5 、 4 . 0 、 4 . 5 、 5 . 0 、 5 . 5 、 6 . 0 、 6 . 5 、 7 . 0 、 7 . 5 、 8 . 0 、 8 . 5 、 9 . 0 、 9 . 5 、 1 0 . 0 、 1 0 . 5 、 1 1 . 0 、 1 1 . 5 、 1 2 . 0 、 1 2 . 5 、 1 3 . 0 、 1 3 . 5 、 1 4 . 0 、 1 4 . 5 、 1 5 . 0 、 2 0 . 0 、 2 5 . 0 、 3 0 . 0 、 4 0 . 0 、 5 0 . 0 、 6 0 . 0 、 7 0 . 0 、 1 0 0 . 0 以上であり得る。

#### 【 0 1 7 8 】

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

#### 【 0 1 7 9 】

##### F c 変異体を含む抗体

本発明の特定の実施形態によると、例えは中性 p H と比較した酸性 p H で、F c R n 受容体へ結合する抗体を増強または低下させる、1 つ以上の突然変異を含む F c ドメインを含む、抗 M U C 1 6 抗体、および抗 C D 3 / 抗 M U C 1 6 二重特異性抗原結合分子を提供する。例えは、本発明は、F c ドメインの C H 2 または C H 3 領域に変異を含む抗体を含み

10

20

30

40

50

、変異（複数可）は、酸性環境においてFcRnに対するFcドメインの親和性を増加させる（例えば、pHが約5.5～約6.0の範囲のエンドソームにおいて）。そのような突然変異は、動物に投与したときに抗体の血清半減期の増加をもたらし得る。そのようなFc修飾の非限定的な例には、例えば、250位（例えば、EまたはQ）、250位および428位（例えば、LまたはF）、252位（例えば、L/Y/F/WまたはT）、254位（例えば、SまたはT）、および256位（例えば、S/R/Q/E/DまたはT）での修飾、または428位および/または433位（例えばH/L/R/S/P/QまたはK）および/または434位（例えばH/FまたはY）での修飾、あるいは250位および/または428位の修飾、あるいは307位もしくは308位（例えば、308F、V308F）、および434位での修飾が含まれる。一実施形態において、修飾は428L（例えばM428L）および434S（例えばN434S）の修飾、428L、259I（例えば、V259I）、および308F（例えば、V308F）の修飾、433K（例えば、H433K）および434（例えば、434Y）の修飾、252、254、および256（例えば、252Y、254T、および256E）の修飾、250Qおよび428Lの修飾（例えば、T250QおよびM428L）、307および/または308の修飾（例えば、308Fまたは308P）を含む。  
10

#### 【0180】

例えば、本発明は、抗MUC16抗体、および抗CD3/抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含み、それらは、250Qおよび248L（例えば、T250QおよびM248L）、252Y、254T、および256E（例えば、M252Y、S254T、およびT256E）、428Lおよび434S（例えば、M428LおよびN434S）、ならびに433Kおよび434F（例えば、H433KおよびN434F）からなる群から選択される1つ以上の対または群の変異を含むFcドメインを含む。前述のFcドメイン変異、および本明細書に開示される抗体可変ドメイン内の他の変異の全ての可能な組み合わせは、本発明の範囲内で企図される。  
20

#### 【0181】

##### 抗体および二重特異性抗原結合分子の生物学的特性

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

#### 【0182】

特定の実施形態によると、本発明は、例えば、本明細書の実施例4に記載のように、表面プラズモン共鳴による測定で約60nM未満のKDでヒトMUC16に結合する（例えば25で）抗体および抗体の抗原結合断片を含む。特定の実施形態において、表面プラズモン共鳴、例えば本明細書の実施例4で定義するアッセイフォーマット（例えば、mAb捕捉または抗原捕捉フォーマット）を用いて、または実質的に類似のアッセイによって測定した場合に、本発明の抗体または抗原結合断片は、約60nM未満、約40nM未満、約20nM未満、約10nM未満、約8nM未満、約7nM未満、約6nM未満、約5nM未満、約4nM未満、約3nM未満、約2nM未満、約1nM未満、約800pM未満、約700pM未満、約500pM未満、約400pM未満、または約300pM未満のKDでMUC16に結合する。本発明は、二重特異性抗原結合分子（例えば、表面プラズモン共鳴、例えば本明細書の実施例4に定義されているアッセイフォーマット（例えばmAb捕捉または抗原捕捉フォーマット）を用いて、または実質的に同様のアッセイによって測定した場合に、約7nM未満のKDでMUC16に結合する二重特異性抗体を含む。  
30  
40

#### 【0183】

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

定した場合に、本発明の抗体または抗原結合断片は、約10分超、約20分超、約30分超、約40分超、約50分超、約60分超、約70分超、約80分超、約90分超、約100分超、約110分超、または約120分超のt<sub>1/2</sub>で、MUC16に結合する。本発明は、二重特異性抗原結合分子（例えば、25の表面プラズモン共鳴、例えば、本明細書の実施例4において定義されたアッセイフォーマットを用いて、または実質的に類似のアッセイにより測定した場合に、約10分超または約20分超でMUC16に結合する二重特異性抗体を含む。

#### 【0184】

実施例2に記載の電気化学発光ベースの検出アッセイまたは実質的に類似のアッセイによって決定されるように、本発明はまた、内因性MUC16（例えば、OVCA-R-3）を発現するヒト細胞株に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片も含む。10

#### 【0185】

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

#### 【0186】

本発明は、ヒトCD3に高い親和性で結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。本発明はまた、治療状況および所望される特定の標的化特性に応じて、中程度または低い親和性でヒトCD3に結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。場合によっては、低親和性には、300nM超、500nM超、または1μM超のKDまたはEC50（例えば、表面プラズモン共鳴アッセイで測定した場合）でCD3と結合する抗体が含まれる。本発明はまた、ヒトCD3に検出不可能な親和性で結合する抗体およびその抗原結合断片を含む。例えば、一方のアームがCD3と結合し、別のアームが標的抗原（例えば、MUC16）と結合する二重特異性抗原結合分子の状況下では、標的抗原結合アームが標的抗原に高い親和性で結合することが望ましいが、抗CD3アームは中程度または低い親和性でまたは親和性なしでCD3に結合する。このようにして、標的抗原を発現する細胞への抗原結合分子の優先的標的化は、一般的/非標的化CD3結合およびそれに付随する結果として生じる有害な副作用を回避しながら達成され得る。20

#### 【0187】

本発明は、ヒトCD3およびヒトMUC16に同時に結合することができる二重特異性抗原結合分子（例えば、二重特異性抗体）を含む。CD3を発現する細胞と相互作用する結合アームは、適切なインビトロ結合アッセイで測定した場合に、弱い結合から検出不可能な結合を有し得る。二重特異性抗原結合分子がCD3および/またはMUC16を発現する細胞と結合する程度は、本明細書の実施例5に示すように、蛍光標示式細胞分取（FACS）によって評価することができる。30

#### 【0188】

例えば、本発明は、CD3を発現するヒト細胞株に特異的に結合するが、MUC16（例えば、ジャーカット）、靈長類T細胞（例えば、カニクイザル末梢血単核球[PBMNC]）、および/またはMUC16発現細胞を発現しない抗体、抗体結合断片、およびその二重特異性抗体を含む。40

#### 【0189】

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

#### 【0190】

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

#### 【0191】

10

20

30

40

50

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

#### 【0192】

本発明は、対象において腫瘍抗原発現細胞を枯渇させることができる、抗CD3 / 抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む（例えば、実施例8、生物発光イメージングアッセイ、または実質的に類似のアッセイを参照されたい）。例えば、特定の実施形態によると、抗CD3 / 抗MUC16二重特異性抗原結合分子が提供され、対象への10 μgの二重特異性抗原結合分子の単回投与が対象におけるMUC16発現細胞数の減少を引き起こす。（例えば、対象における腫瘍増殖が抑制または阻害される）。特に明記しない限り、生物発光放射輝度は、[ p / s / cm<sup>2</sup> / sr ] を指す。

10

#### 【0193】

本発明はまた、MUC16陽性卵巣癌異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する、抗MUC16抗体薬物複合体を含む（例えば、実施例10、生物発光イメージングアッセイ、または実質的に類似のアッセイを参照されたい）。特定の実施形態において、85 μg / kg の用量で投与される4回分の週1回の用量が、インビボでの腹腔内OVCA-R3 / 1 uc 腫瘍増殖を阻害する、化合物7との抗MUC16抗体薬物結合体が提供される。特定の実施形態において、85 μg / kg の用量で投与される4回分の週1回の用量が、インビボでの皮下OVCA-R3 / 1 uc 腫瘍増殖を阻害する、化合物7との抗MUC16抗体薬物複合体が提供される。特定の実施形態において、85 μg / kg、170 μg / kg、または340 μg / kg の用量の単回用量が、インビボでの腹腔内OVCA-R3 / 1 uc 腫瘍増殖を阻害する、化合物10との抗MUC16抗体薬物複合体が提供される。特に明記しない限り、生物発光放射輝度は、[ p / s / cm<sup>2</sup> / sr ] を指す。

20

#### 【0194】

本発明はまた、実施例7に記載し、図1、2、および3に示すように、ヒト化MUC16 × CD3マウス（ヒトMUC16およびCD3発現に対してホモ接合性のマウス、MUC16hu / hu × CD3hu / hu）、CD3ヒト化マウス（ヒトCD3発現に対してホモ接合性のマウス、CD3hu / hu）、および系統適合（75% C57BL、25% 129Sv）野生型（WT）マウスにおける薬物動態プロファイルを示す、抗CD3 / 抗MUC16二重特異性抗原結合分子を含む。

30

#### 【0195】

##### エピトープマッピングおよび関連技術

本発明の抗原結合分子が結合するCD3および/またはMUC16上のエピトープは、3つ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれより多数）のCD3またはMUC16タンパク質のアミノ酸の单一連續配列からなってもよい。あるいは、エピトープは、CD3またはMUC16の複数の非連續アミノ酸（またはアミノ酸配列）からなっていてもよい。本発明の抗体は、単一のCD3鎖内に含まれるアミノ酸（例えば、CD3 - イブシロン、CD3 - デルタ、またはCD3 - ガンマ）と相互作用し得るか、または2つ以上の異なるCD3鎖上のアミノ酸と相互作用し得る。本発明で使用する場合、「エピトープ」という用語は、パラトープとして既知の抗体分子の可変領域における特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は2つ以上のエピトープを有してもよい。したがって、異なる抗体は、抗原上の異なる領域へ結合し得、異なる生物学的效果を有し得る。エピトープは、立体配座または線状のいずれでもよい。立体配座エピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸によって産生される。直鎖状エピトープは、ポリペプチド鎖中の隣接するアミノ酸残基によって産生されるものである。特定の状況において、エピトープは、抗原上の糖類、ホスホリル基、またはスルホニル基の部分を含み得る。

40

#### 【0196】

当業者に既知の種々の技術を用いて、抗体の抗原結合ドメインがポリペプチドまたはタンパク質内にある「1つ以上のアミノ酸と相互作用する」かどうかを判定することができる

50

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

#### 【0197】

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

#### 【0198】

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

#### 【0199】

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

#### 【0200】

特定の抗原結合分子（例えば、抗体）またはその抗原結合ドメインが、本発明の参照抗原結合分子と同じエピトープに結合するか、または結合するために本発明の参照抗原結合分子と競合するかどうかは、当技術分野で既知の常法を用いて容易に判定できる。例えば、試験抗体が本発明の参照二重特異性抗原結合分子と同じMUC16（またはCD3）上のエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照二重特異性分子は最初にMUC16タンパク質（またはCD3タンパク質）に結合させた。次に、MUC16（またはCD3）分子へ結合する試験抗体の能力を評価する。試験抗体が参照二重特異性抗原結合分子と飽和結合後にMUC16（またはCD3）に結合することができる場合、試験抗体は参照二重特異性抗原とは異なるMUC16（またはCD3）のエピトープに結合すると結論

10

20

30

40

50

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

10

#### 【0201】

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

20

#### 【0202】

##### 抗原結合ドメインの調製と二重特異性分子の構築

特定の抗原に特異的な抗原結合ドメインは、当技術分野で既知の任意の抗体産生技術によって調製することができる。いったん得られれば、2つの異なる抗原（例えばCD3およびMUC16）に特異的な2つの異なる抗原結合ドメインを互いに適切に配置して、常法を用いて本発明の二重特異性抗原結合分子を產生することができる。（本発明の二重特異性抗原結合分子を構築するために使用できる例示的な二重特異性抗体フォーマットの考察は、本明細書の他所に提供される）。特定の実施形態において、本発明の多重特異性抗原結合分子の1つ以上の個々の構成要素（例えば、重鎖および軽鎖）は、キメラ抗体、ヒト化抗体または完全ヒト型抗体に由来する。そのような抗体を作製するための方法は当技術分野において周知である。例えば、本発明の二重特異性抗原結合分子の1つ以上の重鎖および/または軽鎖は、VELCIMMUNE（商標）技術を用いて調製することができる。VELCIMMUNE（商標）技術（または任意の他のヒト抗体産生技術）を使用して、特定の抗原（例えば、CD3またはMUC16）に対する高親和性キメラ抗体が、ヒト可変領域およびマウス定常領域を有して最初に単離される。抗体を、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特徴付けし選択する。マウス定常領域は、所望のヒト定常領域と置換されて、本発明の二重特異性抗原結合分子に組み込まれ得る完

30

40

50

全ヒト型重鎖および／または軽鎖を產生する。

【0203】

遺伝子操作された動物は、ヒト二重特異性抗原結合分子を作製するために使用し得る。例えば、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変配列を再編成および発現することができない、遺伝子改変マウスを使うことができ、マウスは、内在性マウスカッパ遺伝子座のマウスカッパ定常遺伝子に作動可能に連結されているヒト免疫グロブリン配列によってコードされる1つまたは2つのヒト軽鎖可変ドメインのみを発現する。そのような遺伝子改変マウスを使用して、2つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの1つに由来する可変ドメインを含む同一の軽鎖と会合する2つの異なる重鎖を含む完全ヒト型二重特異性抗原結合分子を产生することができる。（例えば、U S 2 0 1 1 / 0 1 9 5 4 5 4 を参照されたい）。完全ヒト型とは、抗体またはその抗原結合断片もしくは免疫グロブリンドメインの各ポリペプチドの全長にわたるヒト配列に由来するDNAによってコードされるアミノ酸配列を含む、抗体、またはその抗原結合断片もしくは免疫グロブリンドメインを指す。いくつかの例において、完全ヒト型配列は、ヒトに対して内因性のタンパク質に由来する。他の例において、完全ヒト型タンパク質またはタンパク質配列は、各成分配列がヒト配列に由来するキメラ配列を含む。いずれの理論にも縛られないが、キメラタンパク質またはキメラ配列は、一般に、例えば任意の野生型ヒト免疫グロブリン領域またはドメインと比較して、成分配列の接合部における免疫原性エピトープの生成を最小にするように設計される。

10

【0204】

生物学的等価物

本発明は、本明細書に開示の例示的な分子のものとは異なるが、CD3および／またはMUC16に結合する能力を保持するアミノ酸配列を有する抗原結合分子を包含する。このような変異体抗体は、親配列と比較してアミノ酸の1つ以上の付加、欠失、または置換を含むが、説明された二重特異性抗原結合分子の生物学的活性とは本質的に等価である生物学的活性を呈する。

20

【0205】

本発明は、本明細書に記載の例示的な抗原結合分子のいずれかと生物学的に等価な抗原結合分子を含む。2つの抗原結合タンパク質または抗体は、例えば、それらが類似の実験条件下で単回用量または複数回用量のいずれかで同じモル用量で投与された場合に、吸収速度および吸収の程度が有意差を示さない医薬的等価物または医薬的選択肢である場合、生物学的等価物とみなされる。これらの吸収の程度は等価であるが吸収速度は等価ではなく、吸収速度におけるこのよう差が意図的、かつ標識に反映されているので生物学的に等価とみなされ得る場合、いくつかの抗原結合タンパク質は、等価物または薬学的選択肢とみなされることになっており、例えば長期使用に及ぼす有効な身体薬剤濃度の達成に必須ではなく、試験した特定の薬剤製品にとって医学的に有意ではないとみなされる。

30

【0206】

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

【0207】

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

40

【0208】

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

【0209】

生物学的等価性は、インビボおよびインビトロの方法によって実証され得る。生物学的等

50

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

#### 【0210】

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

10

#### 【0211】

##### 種の選択性および種の交差反応性

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

20

#### 【0212】

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

30

#### 【0213】

##### 抗体 - 薬物複合体 (ADC)

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

40

50

C 1 6 抗体は、配列番号 1 8 9 9 の残基 1 3 8 1 0 ~ 1 4 4 5 1 のヒト M U C 1 6 に結合する抗体または抗原結合断片である。場合によっては、抗 M U C 1 6 は、ヒト M U C 1 6 の S E A 1 、 S E A 2 、 S E A 3 、 S E A 4 、 S E A 5 、 S E A 6 、 S E A 7 、 S E A 8 、 S E A 9 、 S E A 1 0 、 S E A 1 1 、 S E A 1 2 、 S E A 1 3 、 S E A 1 4 、 S E A 1 5 、または S E A 1 6 のうちのいずれか 1 つ以上に結合する、抗体または抗原結合断片である。

#### 【 0 2 1 4 】

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

10

#### 【 0 2 1 5 】

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

20

#### 【 0 2 1 6 】

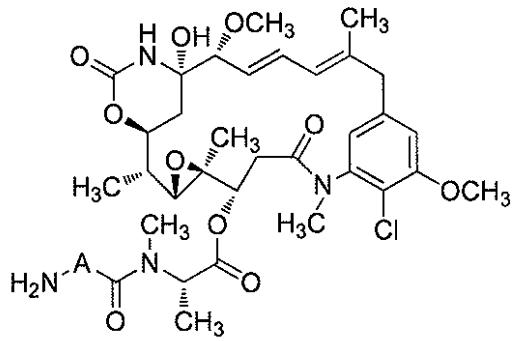
特定の実施形態によると、抗 M U C 1 6 抗体にコンジュゲートする細胞傷害性薬剤は、モノメチルアウリスタチンE( MMA E )またはモノメチルアウリスタチンF( MMA F )などのアウリスタチン、T U B - O H またはT U B - O M O M などのツブリシン、トマイマイシン誘導体、ドラスタチン誘導体、またはD M 1 もしくはD M 4 のようなメイタンシノイドである。いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、式( I )の化合物の立体異性体を含む、式( I )の構造を有するメイタンシノイドである。

30

40

50

【化11】



(式I)

式中、Aはアリーレンまたはヘテロアリーレンである。

【0217】

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

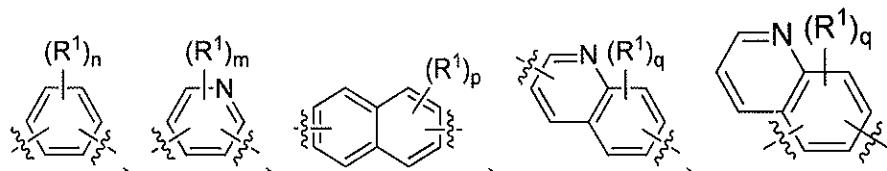
【0218】

いくつかの実施形態において、Aはアリーレンである。

【0219】

いくつかの実施形態において、Aは、

【化12】

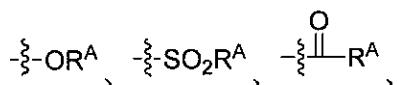


であり、

式中、

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

【化13】



またはアジドであり、

式中、R<sup>A</sup>はアルキルまたはヘテロアルキルであり、

nは0～4の整数であり、

mは0～3の整数であり、

pは0～6の整数であり、

qは0～5の整数である。

【0220】

いくつかの実施形態において、式Iの化合物は、

10

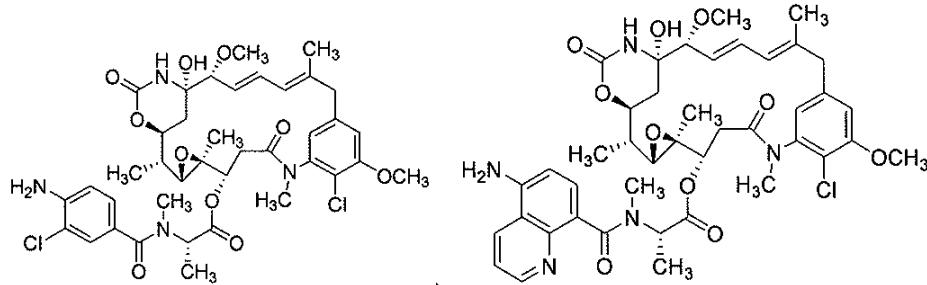
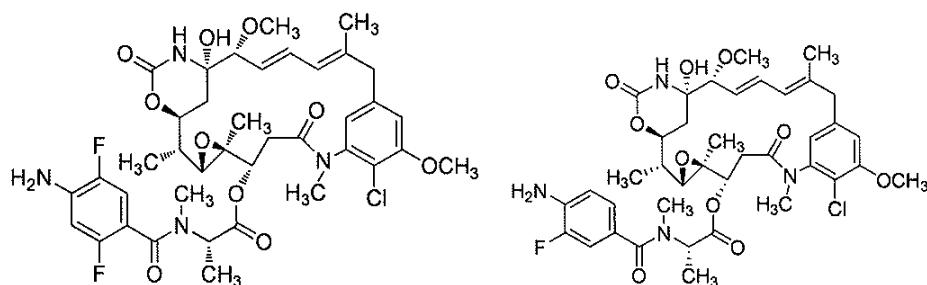
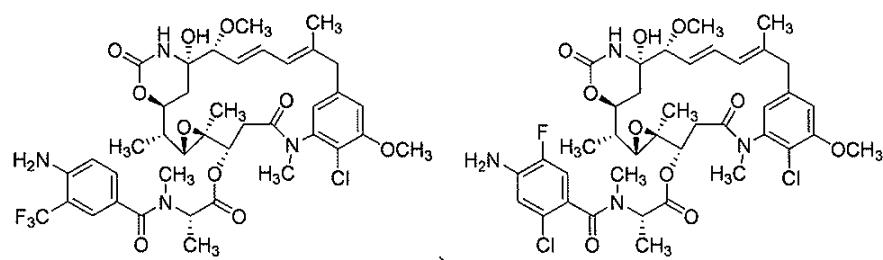
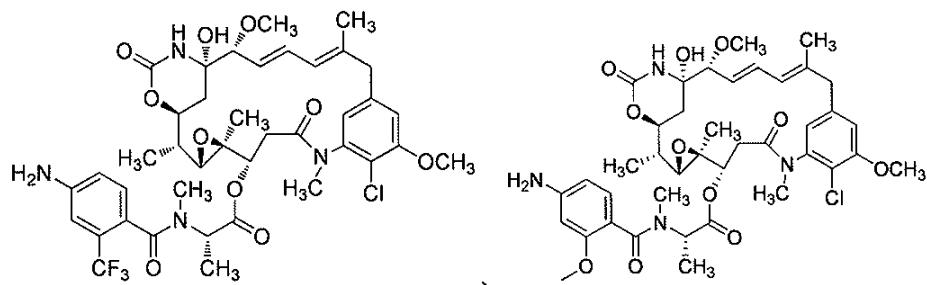
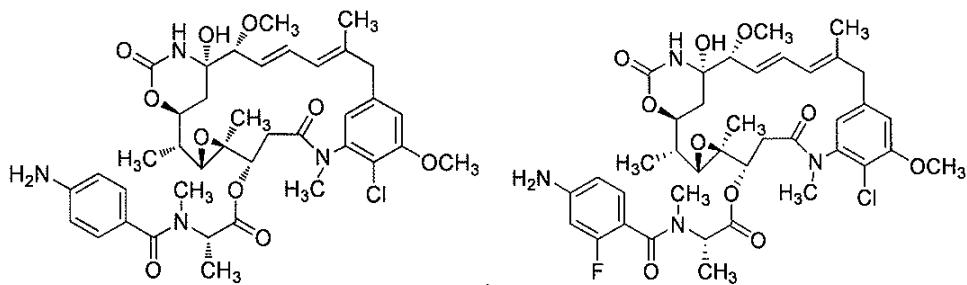
20

30

40

50

【化 1 4】



10

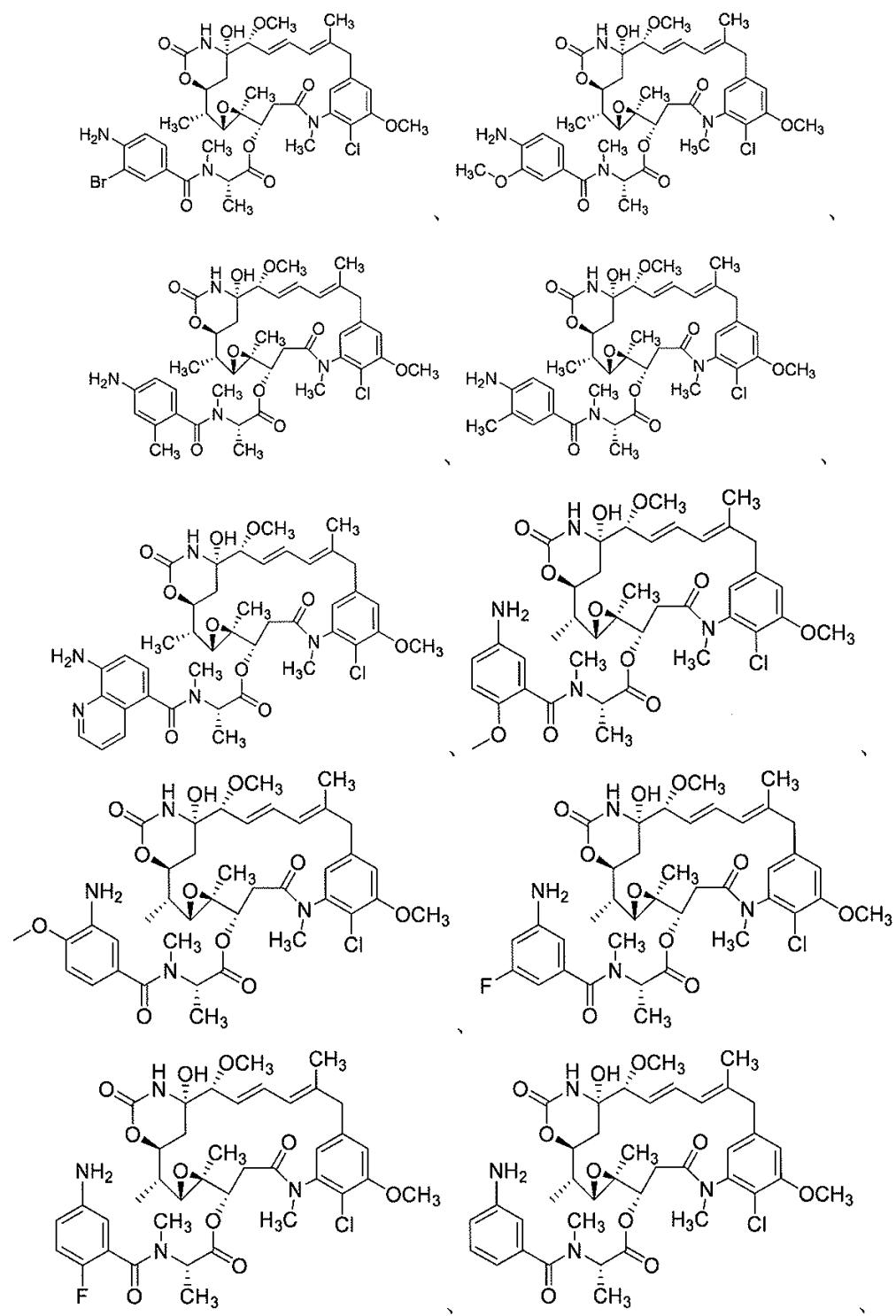
20

30

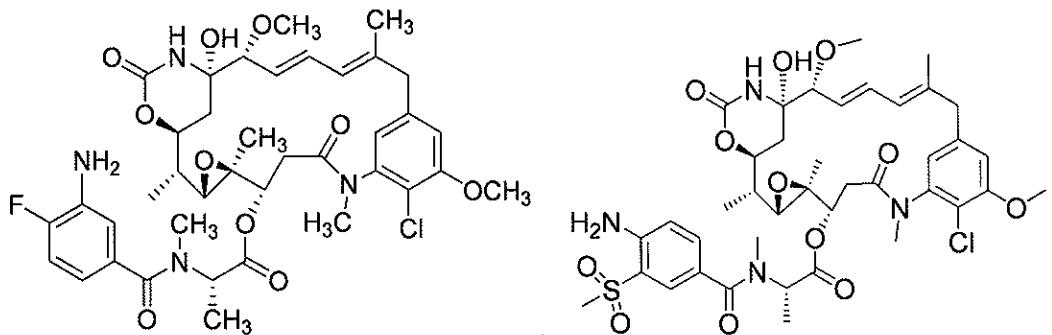
40

50

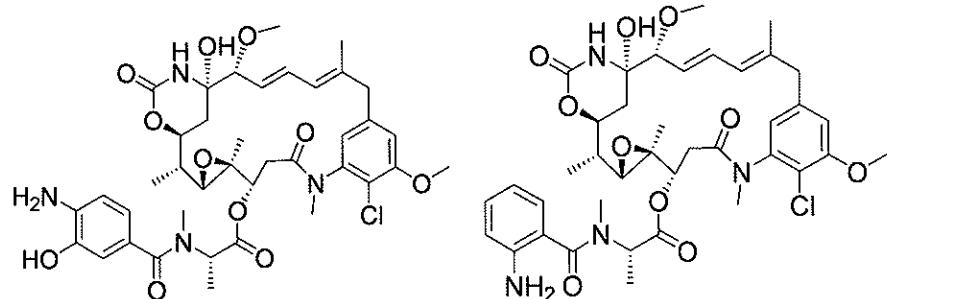
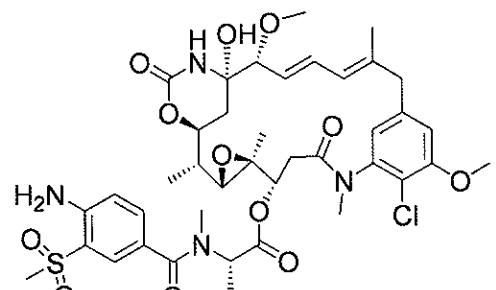
【化 15】



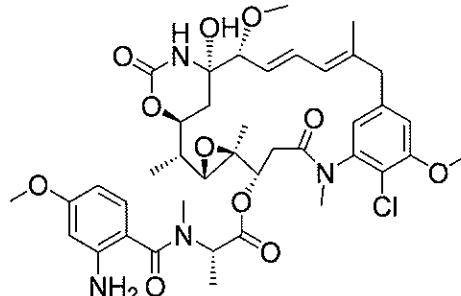
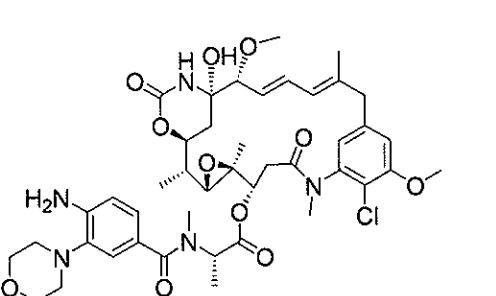
【化 1 6】



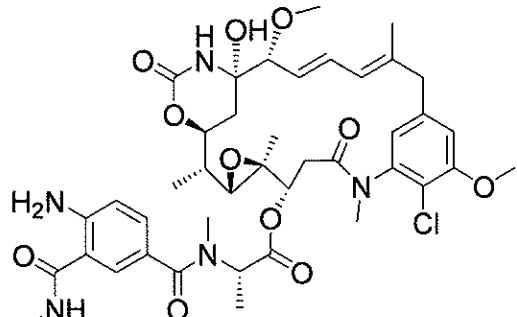
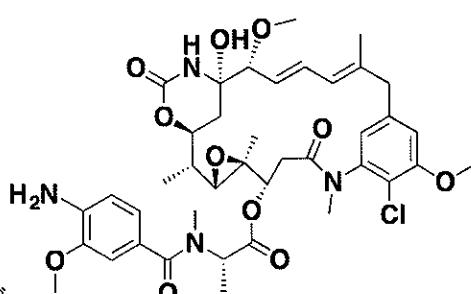
10



20



30



、および

40

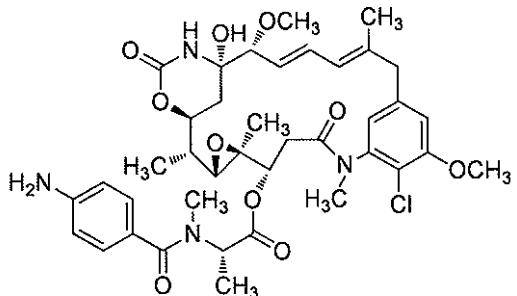
からなる群から選択される。

【 0 2 2 1 】

一実施形態において、式（I）の化合物は、

50

## 【化17】



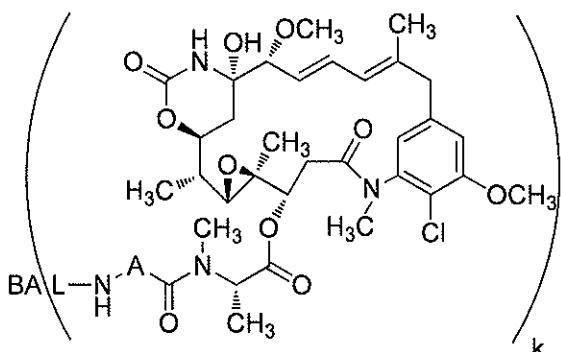
10

である。

## 【0222】

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

## 【化18】



(式IA)

20

30

式中、

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

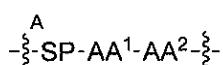
BAは抗MUC16抗体またはその抗原結合断片であり、

kは1～30の整数である。

## 【0223】

様々な実施形態において、Lは次式であり、

## 【化19】



40

式中、

SPはスペーサーであり、

## 【化20】



50

は、抗MUC16抗体またはその断片への1つ以上の結合であり、

AA<sup>1</sup>はアミノ酸であり、

AA<sup>2</sup>はアミノ酸である。

## 【0224】

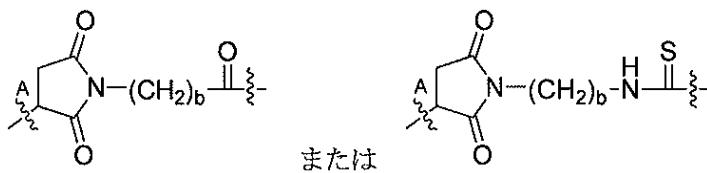
いくつかの実施形態において、AA<sup>1</sup> - AA<sup>2</sup> は、バリン - シトルリン、シトルリン - バリン、リジン - フェニルアラニン、フェニルアラニン - リジン、バリン - アスパラギン、アスパラギン - バリン、スレオニン - アスパラギン、アスパラギン - スレオニン、セリン - アスパラギン、アスパラギン - セリン、フェニルアラニン - アスパラギン、アスパラギン - フェニルアラニン、ロイシン - アスパラギン、アスパラギン - ロイシン、イソロイシン - アスパラギン、アスパラギン - イソロイシン、グリシン - アスパラギン、アスパラギン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

10

## 【0225】

いくつかの実施形態において、SP は、

## 【化21】



20

であり、

式中、

## 【化22】



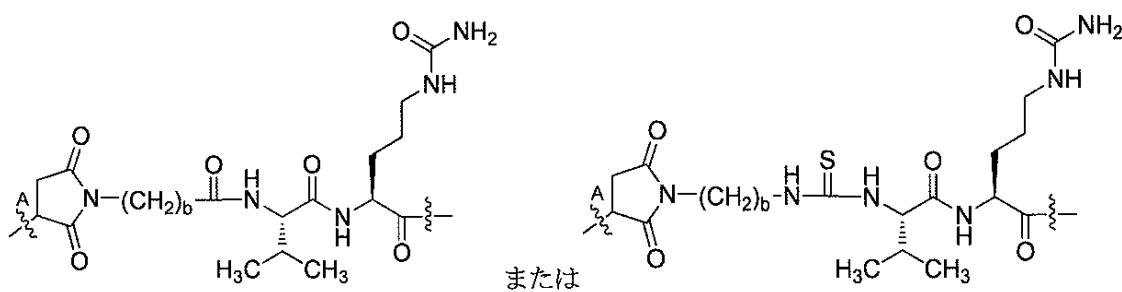
は、抗MUC16抗体またはその断片への結合であり、

b は 2 ~ 8 の整数である。

他の実施形態では、L は、

## 【化23】

30



40

であり、

式中、

## 【化24】



は、抗MUC16抗体またはその断片への結合であり、

b は 2 ~ 8 の整数である。

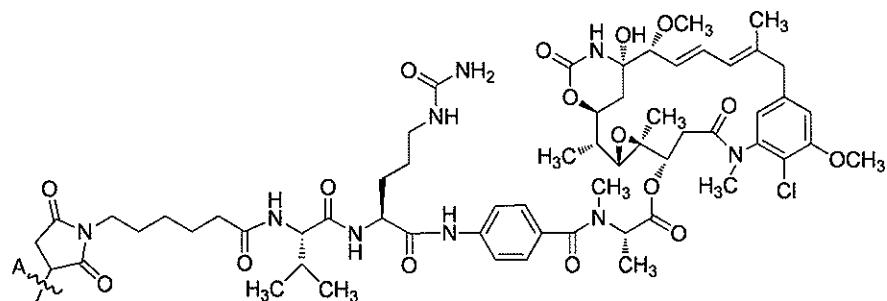
## 【0226】

一実施形態において、抗MUC16抗体またはその抗原結合断片に結合するリンカーを含

50

む式(IA)の化合物は、次式であり、

【化25】



10

式中、

【化26】



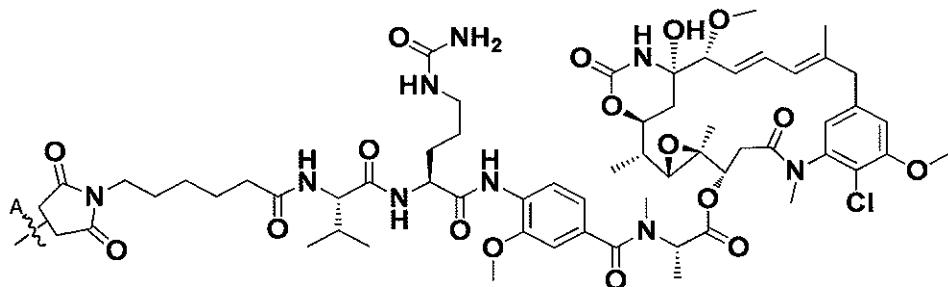
は抗MUC16抗体またはその断片への結合である。場合によっては、この部分は「化合物10」と呼ばれる。

【0227】

20

一実施形態において、抗MUC16抗体またはその抗原結合断片に結合するリンカーを含む式(IA)の化合物は、次式であり、

【化27】



30

式中、

【化28】



は抗MUC16抗体またはその断片への結合である。場合によっては、この部分は「化合物60」と呼ばれる。

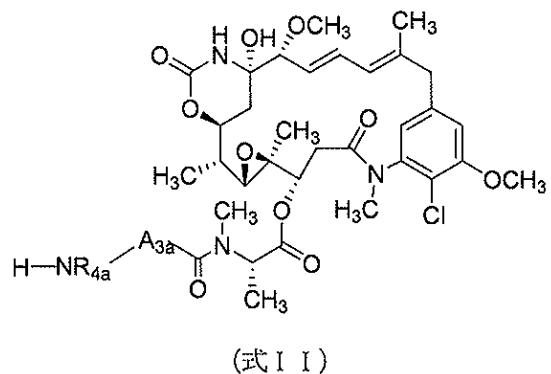
40

【0228】

いくつかの実施形態において、細胞傷害性薬剤は、式(II)の化合物の立体異性体を含む、式(II)の構造を有するメイタンシノイドであり、

50

## 【化 2 9】



10

式中、

A<sub>3a</sub> は、アミノ酸、2 - 20 個のアミノ酸を有するペプチド、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、- C R<sub>5</sub> R<sub>6</sub> -、- O -、- C (= O) -、- O - C (= O) -、- C (= O) - O -、- O - C (= O) - O -、- C (= O) - (C H<sub>x</sub>) p<sub>1</sub> -、- C (= O) - O - (C H<sub>x</sub>) p<sub>1</sub> -、- (C H<sub>x</sub>) p<sub>1</sub> - C (= O) -、- (C H<sub>x</sub>) p<sub>1</sub> - C (= O) - O -、- (O - (C H<sub>2</sub>) p<sub>2</sub> -) p<sub>3</sub> -、- ((C H<sub>2</sub>) p<sub>2</sub> - O -) p<sub>3</sub> -、- C (= S) -、- C (= S) - S -、- C (= S) - NH -、- S - C (= S) -、- S - C (= S) - S -、- S -、- SO -、- SO<sub>2</sub> -、- N R<sub>4</sub> -、- N (R<sub>4</sub>) - C (= O) - N (R<sub>8</sub>) -、- N (R<sub>4</sub>) - C (= O) O -、- N (R<sub>4</sub>) - C (= O) -、- C (= O) - N (R<sub>4</sub>) -、- C (= O) - N (R<sub>4</sub>) - C (= O) -、または- O - C (= O) - N R<sub>4</sub> - であり、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルは置換されていてもよく、

p<sub>1</sub>、p<sub>2</sub>、およびp<sub>3</sub>は、それぞれ独立して0、または1 ~ 100の整数であり、  
xは0、1または2であり、

R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、およびR<sub>8</sub>は、それぞれ独立してH、または置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであり、

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

## 【0229】

いくつかの実施形態において、式(I-I)の化合物は、

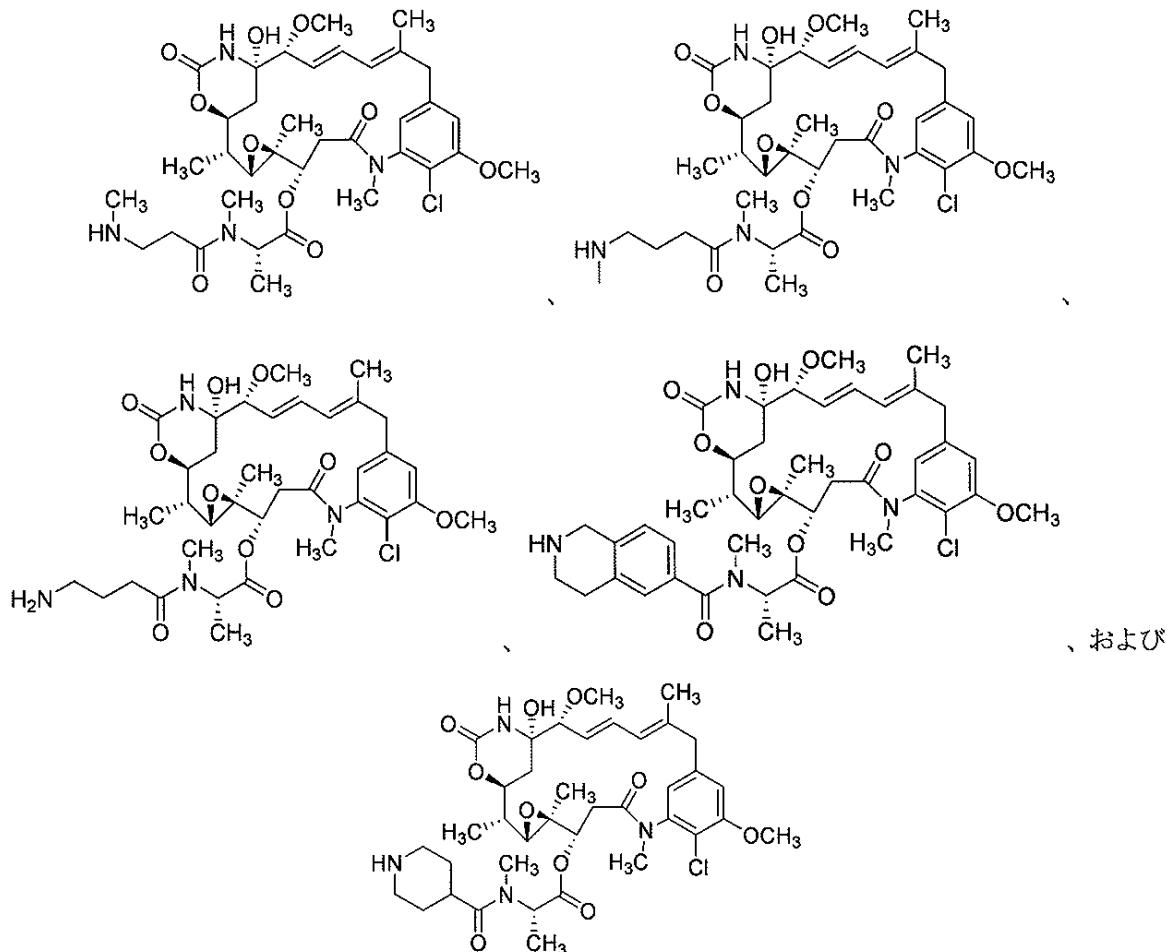
20

30

40

50

【化30】



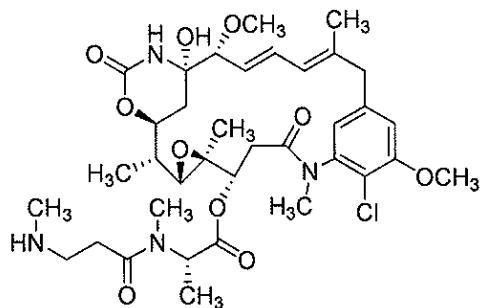
からなる群から選択される。

【0230】

一実施形態において、式(II)の化合物は、

【化31】

30



である。

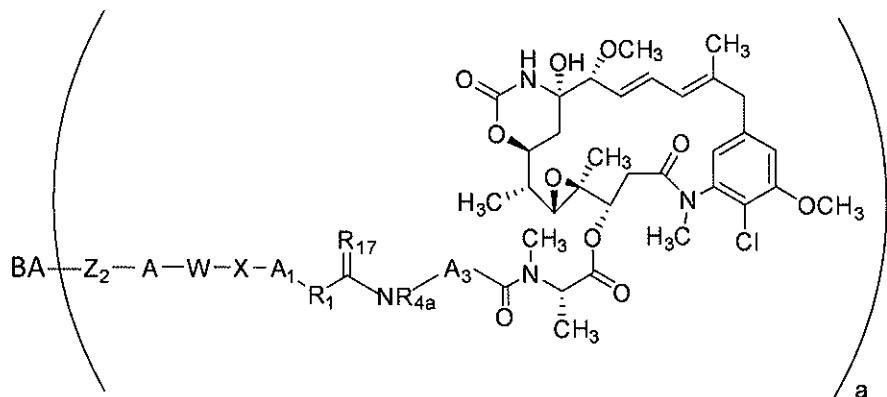
【0231】

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

40

50

【化 3 2】



10

(式 IIA)

式中、

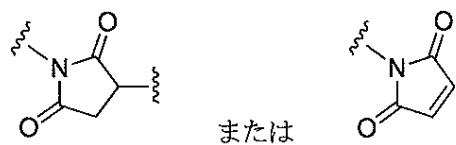
B A は抗 M U C 1 6 抗体またはその抗原結合断片であり、

a は 1 ~ 30 の整数であり、

Z<sub>2</sub>は、以下の構造式 - Z<sub>2A</sub> - Z<sub>2B</sub> - Z<sub>2C</sub> - Z<sub>2D</sub>によって表され、式中、Z<sub>2A</sub>、Z<sub>2B</sub>、Z<sub>2C</sub>、およびZ<sub>2D</sub>は、それぞれ独立して不在であるか、アミノ酸、2~20個のアミノ酸を有するペプチド、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、-CR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>-、-O-、-C(=O)-、-O-C(=O)-、-C(=O)-O-C(=O)-O-C(=O)-、-(CH<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>、-C(=O)-O-(CH<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>、-(CH<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>-C(=O)-、-(CH<sub>x</sub>)p<sub>1</sub>-C(=O)-O-、-(O-(CH<sub>2</sub>)p<sub>2</sub>-)p<sub>3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)p<sub>2</sub>-O-)p<sub>3</sub>-、-C(=S)-、-C(=S)-S-、-C(=S)-NH-、-S-C(=S)-、-S-C(=S)-S-、-S-O-、-SO<sub>2</sub>-、-NR<sub>4</sub>-、-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-N(R<sub>8</sub>)-、-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)O-、-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-、-C(=O)-N(R<sub>4</sub>)-、-C(=O)-N(R<sub>4</sub>)-C(=O)-、-O-C(=O)-N(R<sub>4</sub>)、-O-C(=S)-N(R<sub>4</sub>)-、-C(=S)-N(R<sub>4</sub>)-、-N≡C≡S、-N≡C≡O、

20

【化 3 3】



であり、

40

Aは天然もしくは非天然アミノ酸、または2~20個のアミノ酸を含むペプチドであり、Wは、-O-、-S-、-C R<sub>5</sub> R<sub>6</sub>-、-N R<sub>4</sub>-であり、

50

$2 - O - ) p_3 -$ 、 $- C ( = S ) -$ 、 $- C ( = S ) - S -$ 、 $- S - C ( = S ) -$ 、 $- C ( = S ) - N H -$ 、 $- S - C ( = S ) - S -$ 、 $- S O -$ 、 $- S O_2 -$ 、 $- N R_4 -$ 、 $- N ( R_4 ) - C ( = O ) - N ( R_8 ) -$ 、 $- N ( R_4 ) - C ( = O ) O -$ 、 $- N ( R_4 ) - C ( = O ) -$ 、 $- C ( = O ) - N ( R_4 ) -$ 、 $- C ( = O ) -$ 、または $- O - C ( = O ) - N R_4 -$ であり、アルキル、アルキニル、アルケニル、シクロアルキル、アリール、ヘテロアリール、およびヘテロシクリルは置換されていてもよく、

R<sub>17</sub>は、O、S、NR<sub>18</sub>、およびCR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>からなる群から選択され、

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

R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、およびR<sub>8</sub>は、それぞれ独立してH、または置換もしくは非置換のアルキル、アルケニル、アルキニル、アリール、ヘテロアリール、またはヘテロシクリルであり、

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

p<sub>1</sub>、p<sub>2</sub>、およびp<sub>3</sub>は、それぞれ独立して0、または1～100の整数であり、xは0、1または2である。

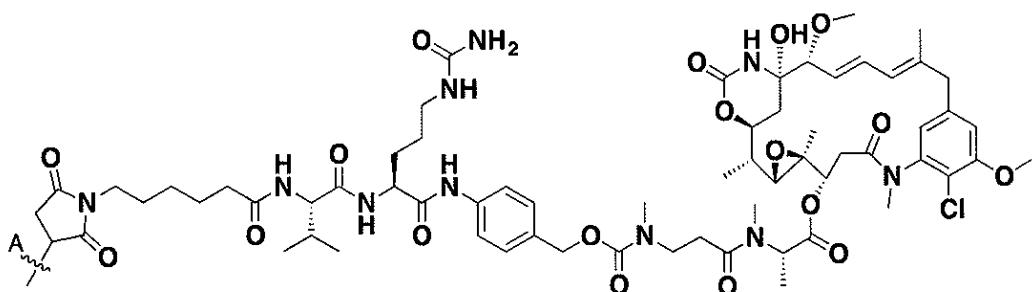
### 【0232】

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

### 【0233】

一実施形態において、抗MUC16抗体またはその抗原結合断片に結合する式(IIA)の化合物は、次式であり、

### 【化34】



式中、

### 【化35】



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

10

20

30

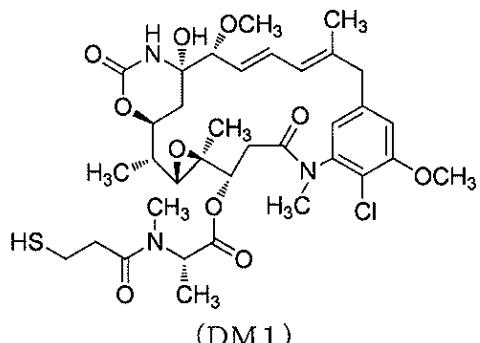
40

50

【 0 2 3 4 】

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

【化 3 6】



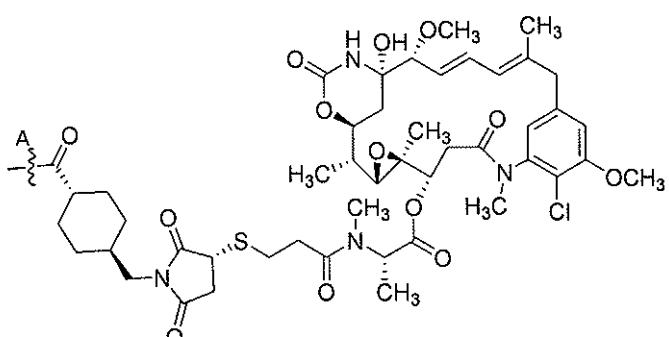
10

$y$  は 1 ~ 0 の整数である。

[ 0 2 3 5 ]

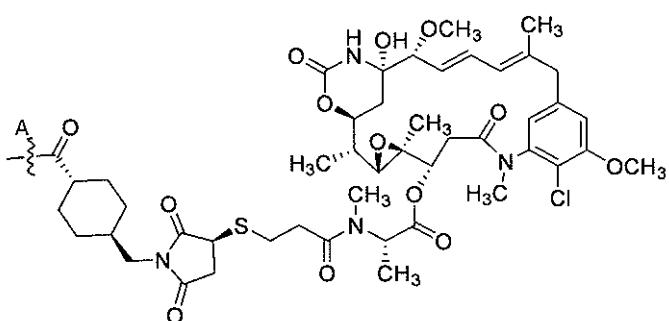
別の実施形態において、ADCは「A-[L-P]y」構造を含み、式中、Aは抗MUC16抗体またはその抗原結合断片であり、「L-P」は、

【化 3 7】



20

または



30

、または

それらの混合物であり、

式中、 $\gamma$  は 1 ~ 30 の整数であり、

【化 3 8】



は、抗MUC16抗体またはその断片への結合である。

[ 0 2 3 6 ]

50

他のメイタンシノイド誘導体は、WO 2014 / 145090、WO 2016 / 160615、およびWO 2015 / 031396に論じられており、それぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

**【0237】**

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

**【0238】**

当技術分野において既知の他の細胞傷害性薬剤が本発明の範囲内で企図され、例えば、リシン、C.ディフィシル毒素、シードモナス外毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素、ブリオジン、サポリン、ヤマゴボウ毒素（すなわち、フィトラカトキシンおよびフィトラクゲゲニン）、ならびにSapra et al., Pharmacol. & Therapeuticics, 2013, 138: 452 - 469に記載のものなどのタンパク質毒素を含む。10

**【0239】**

細胞傷害性薬剤（「ペイロード」）は、ペイロード化合物をタンパク質分子（すなわち抗体）に共有結合する化学リンカーを介して、本発明の抗MUC16抗原結合分子または抗体につながれ得る。特異的リンカーの例示的な実施形態は上述した。より一般的には、本明細書で使用される場合、用語「リンカー」は、結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合断片）を本明細書に記載のペイロード化合物と連結、接続、または結合する任意の二価基または部分を指す。一般に、本明細書に記載の抗体複合体に適した結合剤リンカーは、抗体の循環半減期を利用するのに十分安定であり、同時に、抗原媒介による複合体の内在化後にそのペイロードを放出することができるものである。リンカーは切断可能または切断不可能であり得る。切断可能なリンカーは、内在化に続く細胞内代謝、例えば加水分解、還元、または酵素反応による切断によって切断されるリンカーである。切断不可能なリンカーは、内在化後の抗体のリソソーム分解を介して結合ペイロードを放出するリンカーである。適切なリンカーとしては、酸不安定リンカー、加水分解不安定リンカー、酵素的に切断可能なリンカー、還元不安定的リンカー、自己犠牲的リンカー、および非切断可能なリンカーが挙げられるが、これらに限定されない。適切なリンカーとしては、ペプチド、グルクロニド、スクシンイミド-チオエーテル、ポリエチレングリコール（PEG）単位、ヒドラゾン、m a l - カプロイル単位、ジペプチド単位、バリン-シトルリン単位、およびパラ-アミノベンジル（PAB）単位であるかまたはそれらを含むものも挙げられるが、それらに限定されない。場合によっては、リンカーは、リジン残基もしくはシステイン残基を介して（例えば、抗体もしくは断片のジスルフィド基の開裂を介して、または抗体もしくは断片に組み込まれたシステイン残基を介して）、抗体または抗原結合断片に結合することができる。場合によっては、リンカーは、トランスグルタミナーゼ媒介結合を介して誘導されるものを含む、グルタミン残基を介して抗体または断片に結合することができる。20

**【0240】**

本発明の文脈において使用できる例示的なリンカーとしては、例えば、MC（6-マレイミドカプロイル）、MCC（マレイミドメチルシクロヘキサン-1-カルボキシレート）、MP（マレイミドプロパノイル）、val-cit（バリン-シトルリン）、val-al a（バリン-アラニン）、al a-ph e（アラニン-フェニルアラニン）、ph e-lys（フェニルアラニン-リジン）、プロテアーゼ切断可能なリンカーのジペプチド部位、PAB（p-アミノベンジルオキシカルボニル）、SPP（N-スクシンイミジル4-（2-ピリジルチオ）ペンタノエート）、SMCC（N-スクシンイミジル4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1カルボキシレート）、SIB（N-スクシンイミジル（4-ヨード-アセチル）アミノベンゾエート）、ならびにそれらの変異体および組み合わせを含むまたはからなるリンカーが挙げられる。本発明の文脈において使用できるリンカーのさらなる例は、例えば、米国特許第7,754,681号およびDucry, Bioc conjugate. Chem., 2010, 21: 5-13、およびそこに30

引用される参考文献に開示され、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。場合によっては、リンカーは、Jin, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20: 3465 - 3469、および Wu, et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2016, 24: 2697 - 2706 に記載されているような自己犠牲スペーサーであるかまたはそれを含む。

#### 【0241】

ペイロードは、抗体または抗原結合分子内の特定のアミノ酸での結合を介して抗MUC16抗体または抗原結合断片に連結され得る。本発明のこの態様の文脈において使用できる例示的なアミノ酸結合としては、例えば、リジン（例えば、米国特許第5,208,020号、US2010/0129314、Hollander et al., Biocconjugate Chem., 2008, 19: 358 - 361、WO2005/089808、米国特許第5,714,586号、US2013/0101546、およびUS2012/0585592参照）、システイン（例えば、US2007/0258987、WO2013/055993、WO2013/055990、WO2013/053873、WO2013/053872、WO2011/130598、US2013/0101546、および米国特許第7,750,116号参照）、セレノシステイン（例えば、WO2008/122039、およびHofer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2008, 105: 12451 - 12456参照）、ホルミルグリシン（例えば、Carrico et al., Nat. Chem. Biol., 2007, 3: 321 - 322；Agarwal et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2013, 110: 46 - 51、およびRabuka et al., Nat. Protocols, 2012, 10: 1052 - 1067参照）、非天然アミノ酸（例えば、WO2013/068874、およびWO2012/166559）、ならびに酸性アミノ酸（例えば、WO2012/05982参照）が挙げられる。リンカーはまた、炭水化物への結合（例えば、US2008/0305497、およびRyan et al., Food & Agriculture Immunol., 2001, 13: 127 - 130を参照されたい）およびジスルフィドリンクを介して抗原結合タンパク質にコンジュゲートされることもできる。（例えば、WO2013/085925、WO2010/010324、WO2011/018611、およびShaunk et al., Nat. Chem. Biol., 2006, 2: 312 - 313を参照されたい）。

#### 【0242】

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

#### 【0243】

##### 治療用製剤および投与

本発明は、本発明の抗原結合分子を含む薬学的組成物を提供する。本発明の薬学的組成物は、適切な担体、賦形剤、および改善された移動、送達、耐性などをもたらす他の薬剤と共に製剤化される。多くの適切な製剤は、製薬化学者全員に既知の処方集：Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PAにおいて認めることができる。これらの製剤には、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、ベシクル（LIPOFECTIN（商標）、Life Technologies, Carlsbad, CAなど

10

20

30

40

50

ど)を含有する脂質(カチオン性またはアニオン性)、DNA複合体、無水吸収ペースト、水中油エマルションおよび油中水エマルション、エマルションカーボワックス(種々の分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、ならびにカーボワックスを含有する半固体混合物が含まれる。Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311も参照されたい。

#### 【0244】

患者に投与される抗原結合分子の用量は、患者の年齢および大きさ、標的疾患、病態、投与経路などに応じて変わり得る。好ましい用量は、典型的には体重または体表面積に従つて計算される。本発明の二重特異性抗原結合分子が成人患者の治療目的に使用される場合、本発明の二重特異性抗原結合分子を通常約0.01～約20mg/kg体重の単回投与で、より好ましくは約0.02～約7、約0.03～約5、または約0.05～約3mg/kg体重の単回投与で静脈内投与することが有利であり得る。容態の重症度に応じて、治療の頻度および期間を調整することができる。二重特異性抗原結合分子を投与するための有効投与量およびスケジュールは経験的に決定され、例えば、患者の経過を定期的な評価によってモニターし、それに応じて用量を調整することができる。さらに、投与量の種間スケーリングは、当技術分野において周知の方法を用いて実施することができる(例えば、Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8: 1351)。

#### 【0245】

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

#### 【0246】

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

#### 【0247】

多数の再利用可能なペン送達装置および自動注射送達装置は、本発明の薬学的組成物の皮下送達における応用を有する。例としては、AUTOPEN(商標)(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK)、DISETRONIC(商標)pen(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland)、HUMALOG MIX 75/25(商標) pen、HUMALOG(商標) pen、HUMALIN 70/30(商標) pen(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPEN(商標) I, IIお

10

20

30

40

50

およびIII (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、NOVOPEN JUNIOR (商標) (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark)、BD (商標) pen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)、OPTIPEN (商標)、OPTIPEN PRO (商標)、OPTIPEN STARLET (商標)、およびOPTICLIK (商標) (sanofi - aventis, Frankfurt, Germany) が挙げられるが、ほんの数種類のみ挙げており、これらに限定されない。本発明の薬学的組成物の皮下送達での用途を有する使い捨てペン送達装置の例としては、SOLOSTAR (商標) pen (Sanofi - Aventis)、FLEXPEN (商標) (Novo Nordisk)、およびKWIKPEN (商標) (Eli Lilly)、SURECLICK (商標) 自動注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLET (商標) (Haselmeier, Stuttgart, Germany)、EPIPEN (Dey, L. P.) およびHUMIRA (商標) pen (Abbott Labs, Abbott Park IL) が挙げられるが、ほんの数種類のみ挙げており、これらに限定されない。

#### 【0248】

特定の状況において、薬学的組成物は徐放系で送達することができる。一実施形態において、ポンプを使用することができる (Langer, supra; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 を参照されたい。) 他の実施形態において、ポリマー材料を使用することができる。Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida を参照されたい。さらに別の実施形態において、徐放系を組成物の標的の近傍に配置することができ、それによって全身用量のほんの一部のみが必要となる。(例えば、Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 を参照されたい)。他の徐放系は、Langer, 1990, Science 249: 1527-1533 による総説で論じられている。

#### 【0249】

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

#### 【0250】

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

#### 【0251】

抗原結合分子の治療的使用

10

20

30

40

50

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

#### 【0252】

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

10

#### 【0253】

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

20

#### 【0254】

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

30

#### 【0255】

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

40

#### 【0256】

##### 併用療法と製剤

本発明は、本明細書に記載の例示的な抗体および二重特異性抗原結合分子のいずれかを含む薬学的組成物を1つ以上の追加の治療薬と組み合わせて投与することを含む方法を提供する。本発明の抗原結合分子と組み合わせてまたは併用投与することができる例示的な追加の治療薬には、例えば、EGFRアンタゴニスト（例えば、抗EGFR抗体 [例えば、セツキシマブまたはパニツムマブ] またはEGFRの小分子阻害剤 [例えば、ゲフィチニ

50

10 プまたはエルロチニブ] )、H e r 2 / E r b B 2、E r b B 3、またはE r b B 4などの他のE G F R ファミリーメンバーのアンタゴニスト(例えば抗E r b B 2、抗E r b B 3、もしくは抗E r b B 4抗体、またはE r b B 2、E r b B 3、またはE r b B 4活性の小分子阻害剤)、E G F R v I I I のアンタゴニスト(例えば、E G F R v I I I に特異的に結合する抗体)、c M E T アンタゴニスト(例えば、抗c M E T 抗体)、I G F 1 R アンタゴニスト(例えば、抗I G F 1 R 抗体)、B - r a f 阻害剤(例えば、ベムラフェニブ、ソラフェニブ、G D C - 0 8 7 9、P L X - 4 7 2 0)、P D G F R - 阻害剤(例えば、抗P D G F R - 抗体)、P D G F R - 阻害剤(例えば、抗P D G F R - 抗体)、V E G F アンタゴニスト(例えばV E G F トラップ、例えばU S 7 , 0 8 7 , 4 1 1 (本明細書では「V E G F 阻害融合タンパク質」とも呼ばれる)を参照されたい)、抗V E G F 抗体(例えば、ベバシズマブ)、V E G F 受容体の小分子キナーゼ阻害剤(例えば、スニチニブ、ソラフェニブ、またはパゾパニブ))、D L L 4 アンタゴニスト(例えば、U S 2 0 0 9 / 0 1 4 2 3 5 4 に開示されている抗D L L 4 抗体、例えばR E G N 4 2 1)、A n g 2 アンタゴニスト(例えば、U S 2 0 1 1 / 0 0 2 7 2 8 6 に開示されている抗A n g 2 抗体、例えばH 1 H 6 8 5 P)、F O L H 1 (P S M A) アンタゴニスト、P R L R アンタゴニスト(例えば抗P R L R 抗体)、S T E A P 1 またはS T E A P 2 アンタゴニスト(例えば抗S T E A P 1 抗体または抗S T E A P 2 抗体)、T M P R S S 2 アンタゴニスト(例えば、抗T M P R S S 2 抗体)、M S L N アンタゴニスト(例えば、抗M S L N 抗体)、C A 9 アンタゴニスト(例えば、抗C A 9 抗体)、ウロプラキンアンタゴニスト(例えば、抗ウロプラキン抗体)など、が含まれる。本発明の抗原結合分子と組み合わせて有益に投与され得る他の薬剤は、I L - 1、I L - 2、I L - 3、I L - 4、I L - 5、I L - 6、I L - 8、I L - 9、I L - 1 1、I L - 1 2、I L - 1 3、I L - 1 7、I L - 1 8などのサイトカイン、またはそれらの受容体それぞれに結合する、低分子サイトカイン阻害剤および抗体を含む、サイトカイン阻害剤を含む。本発明の薬学的組成物(例えば、本明細書に開示の抗C D 3 / 抗M U C 1 6二重特異性抗原結合分子を含む薬学的組成物)はまた、「I C E」：イホスファミド(例えば、I f e x (登録商標))、カルボプラチン(例えば、P a r a p l a t i n (登録商標))、エトポシド(例えば、E t o p o p h o s (登録商標)、T o p o s a r (登録商標)、V e P e s i d (登録商標)、V P - 1 6)、「D H A P」：デキサメタゾン(例えば、D e c a d r o n (登録商標))、シタラビン(例えば、C y t o s a r - U (登録商標)、シトシンアラビノシド、a r a - C)、シスプラチン(例えば、P l a t i n o l (登録商標)-A Q)、および「E S H A P」：エトポシド(例えば、E t o p o f o s (登録商標)、T o p o s a r (登録商標)、V e P e s i d (登録商標)、V P - 1 6)、メチルプレドニゾロン(例えば、M e d r o l (登録商標))、高用量シタラビン、シスプラチン(例えば、P l a t i n o l (登録商標)-A Q)から選択される1つ以上の治療用組み合わせを含む治療計画の一部として投与され得る。

### 【0 2 5 7】

40 本発明はまた、本明細書に記載の抗原結合分子のいずれか、およびV E G F、A n g 2、D L L 4、E G F R、E r b B 2、E r b B 3、E r b B 4、E G F R v I I I 、c M e t 、I G F 1 R 、B - r a f 、P D G F R - 、P D G F R - 、F O L H 1 (P S M A) 、P R L R 、S T E A P 1 、S T E A P 2 、T M P R S S 2 、M S L N 、C A 9 、ウロプラキンのうちの1つ以上の阻害剤、または前述のサイトカインのいずれかを含む治療組み合わせを含み、その阻害剤は、アブタマー、アンチセンス分子、リボザイム、s i R N A、ペプチボディ、ナノボディもしくは抗体断片(例えば、F a b 断片、F ( a b ' ) 2 断片、F d 断片、F v 断片、s c F v 、d A b 断片、またはダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、および最小認識ユニット)である。本発明の抗原結合分子は、抗ウイルス薬、抗生物質、鎮痛薬、コルチコステロイドおよび/またはN S A I D と組み合わせて投与および/または同時製剤することもできる。本発明の抗原結合分子はまた、放射線治療および/または従来の化学療法も含む治療計画の一部として投与してもよい。

### 【0 2 5 8】

10

20

30

40

50

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

#### 【0259】

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

#### 【0260】

##### 投与様式

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

10

#### 【0261】

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

20

#### 【0262】

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

30

#### 【0263】

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

40

#### 【0264】

50

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

#### 【0265】

##### 抗体の診断上の使用

本発明の抗MUC16抗体を使用して、例えば、診断目的のための生物学的サンプルなどの、MUC16またはサンプル中のMUC16発現細胞を検出および／または測定してもよい。例えば、抗MUC16抗体、またはその断片を使用して、MUC16の異常な発現（例えば、過剰発現、過少発現、発現欠如など）を特徴とする病態または疾患を診断してよい。MUC16についての例示的な診断アッセイは、例えば、患者から得られたサンプルを本発明の抗MUC16抗体と接触させることを含んでよく、抗MUC16抗体は検出可能な標識またはレポーター分子で標識されている。あるいは、標識されていない抗MUC16抗体は、それ自体が検出可能に標識された2次抗体との組み合わせで診断用途に使用することができる。検出可能な標識またはレポーター分子は、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>32</sup>P、<sup>35</sup>Sもしくは<sup>125</sup>Iなどの放射性同位体、フルオレセインイソチオシアナートもしくはローダミンなどの蛍光部分もしくは化学発光部分、またはアルカリホスファターゼ、<sup>-</sup>ガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、もしくはルシフェラーゼなどの酵素であり得る。本発明の抗MUC16抗体の別の例示的な診断用途は、<sup>89</sup>Zr-デスフェリオキサミン標識などの、対象において腫瘍細胞の非侵襲的識別および追跡の目的のための<sup>89</sup>Zr-標識抗体（例えば、ポジトロン放出断層撮影（PET）イメージング）を含む。（例えば、Tavare, R. et al. Cancer Res. 2016 Jan 1; 76(1): 73-82、およびAzad, B.B. et al. Oncotarget. 2016 Mar 15; 7(11): 12344-58）サンプル中のMUC16を検出または測定するために使用することのできる特定の例示的アッセイには、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、および蛍光標示式細胞分取（FACS）が含まれる。

#### 【0266】

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

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

10

20

30

40

50

び胃腸管の腺癌を含む癌を検出またはモニターしてもよい。

**【実施例】**

**【0267】**

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

**【0268】**

**実施例1：抗MUC16抗体の產生**

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

**【0269】**

遺伝子改変マウスをhMUC16.nub（ムチン16（配列番号1902）の最後の5つのSEAドメイン包含する切断型形態）で免疫し、またはOVCA-R-3細胞などのhMUC16発現細胞株で免疫した。配列番号1902は、配列番号1899の残基13810～14451、ならびにC末端タグを含む。免疫後、各マウスから脾細胞を採取して、（1）マウス骨髄腫細胞と融合してそれらの生存率を維持し、ハイブリドーマ細胞を形成してMUC16特異性についてスクリーニングし、または（2）反応性抗体（抗原陽性B細胞）に結合して同定する選別試薬としてヒトMUC16断片を用いて、B細胞を選別した（US2007/0280945A1に記載のとおり）。

**【0270】**

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

**【0271】**

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

**【0272】**

**抗MUC16抗体の重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列および核酸配列**

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

10

20

30

40

50

## 【表 1】

表1：アミノ酸配列識別子

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

10

20

30

40

50

## 【表2】

表2：核酸配列識別子

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

## 【0273】

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

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

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

10

20

30

40

50

で1回洗浄し、計数した((Cellometer Auto T 4細胞計数器, Next Cellom Bioscience, Lawrence, MA)。約 $1.0 \times 10^4$ 個の細胞をMULTI-ARRAY 96穴カーボン電極プレート(MSD)に播種し、37℃で1時間インキュベートした。非特異的結合部位を、PBS中の2%BSA(w/v)により室温で1時間遮断した。次に、抗MUC16または対照抗体(0.85M~50nM)および無抗体緩衝液対照の段階希釈物をプレート結合細胞に添加し、室温(RT)で1時間インキュベートした。次に、Aquamax 2000プレート洗浄機(MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, CA)を用いて、プレートを洗浄し、未結合抗体を除去した。プレート結合抗体を、SULFO-TAG(商標)結合型抗ヒト軽鎖抗体(Regeneron)またはSULFO-TAG(商標)結合型抗マウスIgG抗体(Jackson Immunoresearch, West Grove, PA)を用いて室温で1時間検出した。洗浄後、プレートを製造元のプロトコルに従ってRead Buffer(MSD)で発色させ、SECTOR Imager 6000(MSD)装置で発光シグナルを記録した。

#### 【0274】

2つの細胞株について、相対発光量(RLU)で測定した発光強度を、各抗体の結合強度を示すために記録した。抗MUC16抗体結合OVCAR-3対SK-OV-3の1.9nMまたは16.7nMで検出されたシグナルの比を、特異性および結合の効力の指標として報告した(表3)。

10

20

30

40

50

【表3】

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

抗体ID	比率：抗MUC16結合OVCAR-3/SK-OV-3	
	[Ab] 1. 9 nM	[Ab] 16. 7 nM
ハイブリドーマ抗MUC16抗体 (H1M、H2M、H3M)		
H2M7128N	5.9	3.1
H1M7129N	6.8	1.9
H2M7131N	8.6	3.7
H2M7133N	6.9	3.3
H2M7134N	6.8	2.9
H2M7135N	3.0	5
H1M7137N	7.7	2.9
H2M7138N	8.2	5.0
H3M7132N	8.9	3.8
H1M9519N	10.9	7.8
H1M9521N	13.2	10.7
H3M9524N	8.1	5.7
H3M9525N	13.7	5.1
H1M9528N	15.3	12.0
H3M9529N	14.3	9.9
H2M9538N	8.9	2.6
ヒトFc抗MUC16抗体 (H1H)		
H1H8755P	1.3	5
H1H8767P	4	NS
H1H8770P	9	3
H1H8783P	1.1	4
H1H8790P	8	3
H1H8794P	8	3
H1H8794P2	5	NS
H1H8799P	1.0	4
H1H8799P2	1.0	4
H1H8804P	8	3
H1H8808P	4	NS
H1H8810P	8	3
H1H8813P	1.1	5
H1H9519N	4.1	3.0
H1H9521N	3.0	2.8
H1H9524N	2.0	4.8
H1H9525N	4	2.1
H1H9528N	4.1	1.8
H1H9529N	10.9	7.4
H1H9538N	1.2	1.3
対照		
m IgG1アイソタイプ対照抗体	NS	NS
m IgG2aアイソタイプ対照抗体	NS	NS
h IgG1アイソタイプ対照抗体	NS	NS

NS=非特異的-1. 9 nMまたは16. 7 nMの<2. 5倍の比

アイソタイプ: H1H: h IgG1、H1M: m IgG1、H2M: m IgG2、H3M: m IgG3

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

10

20

30

40

50

## 【0275】

表3の結果が示すように、本発明の抗MUC16抗体の大部分は、高い(16. 7 nM)および低い(1. 9 nM)抗体濃度の両方でOVCAR-3に特異的に結合した。m IgG1、m IgG2a、およびh IgG1アイソタイプ対照抗体は、OVCAR-3またはSK-OV-3細胞株のいずれに対しても特異的結合を示さなかった。さらに、表面プラズモン共鳴結合アッセイ(以下の実施例4を参照)で可溶性単量体ヒトMUC16タンパク質への結合を示さなかつたいくつかの抗体が、この細胞ベースの結合アッセイで、OVCAR-3細胞上で発現される内在性ヒトMUC16への特異的結合を示したので、方法は不安定であるという証拠が存在する。

## 【0276】

実施例3：卵巣細胞特異的(MUC16)およびCD3に結合する二重特異性抗体の產生  
本発明は、CD3およびMUC16に結合する二重特異性抗原結合分子を提供し、このような二重特異性抗原結合分子はまた、本明細書において「抗MUC16/抗CD3または抗MUC16×CD3二重特異性分子」とも呼ばれる。抗MUC16/抗CD3二重特異性分子の抗MUC16部分は、MUC16(CA-125としても知られる)を発現する腫瘍細胞を標的化するのに有用であり、二重特異性分子の抗CD3部分は、T細胞を活性化するのに有用である。腫瘍細胞上のMUC16およびT細胞上のCD3の同時結合は、活性化T細胞によって標的腫瘍細胞を直接死滅させる(細胞溶解)を促進する。

## 【0277】

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

以下の実施例に記載の二重特異性抗体は、ヒト可溶性ヘテロ二量体hCD33 / タンパク質(本明細書の実施例15に記載)およびヒトMUC16(上記実施例1~2参照)への様々な結合親和性を有する抗CD3結合アームからなる。2014年8月28日に公開された米国特許出願公開US20140243504A1に記載の、Fcドメイン(BSMUC16/CD3-001、-002、-003、および-004)または改変(キメラ)IgG4 Fcドメイン(BSMUC16/CD3-005)を有する例示的な二重特異性抗体を製造した。

## 【0278】

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

【表4】

表4：選択された抗MUC16×CD3二重特異性抗体の構成部分のまとめ

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

## 【0279】

表4に挙げた軽鎖は、二重特異性抗体のCD3およびMUC16標的化アームの両方に共

10

20

30

40

50

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

#### 【0280】

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

ヒト抗MUC16抗体の結合親和性および速度定数をリアルタイム表面プラズモン共鳴(SPR; Biacore 4000 or Biacore T-200, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA)によって25°Cで測定した。本実施例において試験された抗MUC16抗体は、MUC16に対する二価の単一特異的結合(hIgG1(H1H)、mIgG1(H1M)、mIgG2(H2M)、またはmIgG3(H3M)定常領域)、または抗MUC16結合ドメインおよび抗CD3結合ドメインからなる二重特異性抗体であった。モノクローナル抗ヒトFc抗体(GE, #BR-1008-39)またはモノクローナルヤギ抗マウスFc抗体(GE, #BR-1008-38)とのアミンカップリングによって誘導体化された、CM4またはCM5 Biacoreセンサー表面(GE Healthcare Life Sciences)上に抗体を捕捉した。ムチン-16(hMUC16.mmh、またはMUC16「nub」、配列番号1902)の最後の5つのSEAドメインを包含する切断型形態の可溶性単量体ヒトMUC16の様々な濃度を、流速50 μL/分(Biacore T-200)または30 μL/分(Biacore 4000)で、抗MUC16抗体補足表面上に注入した。抗体-試薬会合を4分間モニターし、解離を6~10分間モニターした。全ての結合試験はHBSS-ET緩衝液(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、0.05%v/v界面活性剤P20)中で実施した。

#### 【0281】

Scrubber 2.0c曲線適合ソフトウェアを用いてリアルタイムセンサーグラムを1:1結合モデルへあてはめることによって、動的結合( $k_a$ )速度定数および動的解離( $k_d$ )速度定数を測定した。結合解離平衡定数( $K_D$ )および解離半減期( $t_{1/2}$ )を、動的速度定数から以下のように計算した：

#### 【数1】

$$K_D(M) = \frac{kd}{ka}, \text{ および } t_{1/2}(\text{分}) = \frac{\ln(2)}{60*kd}$$

#### 【0282】

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

10

20

30

40

50

【表 5】

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

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

NB : 結合なし

【表 6】

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

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

10

20

30

40

50

## 【表7】

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

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

## 【0283】

10

結果が示すように、本発明の抗MUC16抗体の大部分は可溶性ヒトMUC16タンパク質に結合し、いくつかはナノモル以下の親和性を示した。いくつかの抗体(H1M9519N、H1M9521N、H3M9524N、H3M9525N、H1M9528N、H3M9529N)は、表面プラズモン共鳴によって最後の5つのSEAドメインを含む切斷型形態に結合を示さなかったが、細胞ベースの結合アッセイにおいて、OVCAR-3細胞に発現した内在性ヒトMUC16に特異的結合を示した。本発明の抗MUC16×CD3二重特異性抗体はまた、このアッセイにおいてナノモルの親和性を示す可溶性の切斷型ヒトMUC16タンパク質に結合した。

## 【0284】

20

実施例5：例示的な二重特異性抗体の追加の結合、T細胞活性化、および細胞傷害性特性  
この例では、MUC16×CD3二重特異性抗体がヒトCD3発現(ヒトT細胞)細胞株に結合する能力を、標的特異的(MUC16特異的)細胞株への結合と比較して、FACSによって決定した。さらに、これらの二重特異性抗体が標的特異的(MUC16特異的)細胞株に対して活性化する能力も同様のアッセイで比較した。

## 【0285】

## FACS分析により測定した例示的二重特異性抗体の結合滴定

A. 簡単に説明すると、フローサイトメトリー分析(すなわち、蛍光標示式細胞分取、またはFACS)を使用して、ヒトMUC16を発現するジャーカット細胞または細胞に対する二重特異性抗体の結合を決定し、続いてフィコエリトリン(Pe)標識またはAPC標識の抗ヒトIgG抗体で検出した。簡潔に説明すると、 $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルを $1.33E-07M \sim 8.03E-12M$ の範囲の各試験抗体またはアイソタイプ対照(MUC16またはCD3に対する交差反応性を示さない、異なる抗原に結合する同じアイソタイプの抗体)の段階希釈物と共に4度30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、1%濾過FBSを含有する冷PBSで2回洗浄し、Pe結合型またはAPC結合型抗ヒト2次抗体を細胞に添加して、さらに30分間インキュベートした。抗体または2次抗体のみを含有しないウェルを対照として使用した。インキュベーション後、細胞を洗浄し、1%濾過したFBSを含有する $200\mu L$ の冷PBSに再懸濁し、BD FACS Canto IIでフローサイトメトリーにより分析した。表7Aを参照されたい。

30

## 【0286】

B. 上述したものと類似の条件による別の実験において、フローサイトメトリー分析(またはFACS)を使用して、ジャーカット細胞、PEO-1、OVCAR3-Luc、およびカニクイザルT細胞に対して選択された二重特異性抗体の結合を決定した。滴定分析のために、 $66.6nM \sim 0.001nM$ の範囲の、選択されたMUC16×CD3二重特異性抗体、第1のアイソタイプ対照抗体(ヒトまたはカニクイザルCD3に対して交差反応性を示さずに無関係のヒト抗原に結合するヒトキメラIgG4抗体)、および第2のアイソタイプ対照抗体(ヒトMUC16とは交差反応性を示さずに無関係のヒト抗原に結合するヒトキメラIgG4抗体)の段階希釈物表7Bおよび図11A～図11Cを参照されたい。

40

## 【0287】

FACS分析について、单一イベント選択のために、前方散乱高さ対前方散乱領域で細胞

50

をゲートした後、側面散乱および前方散乱でゲートした。細胞結合滴定のEC<sub>50</sub>は、PRIISM(商標)ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)を用いて決定した。値は、4パラメータ非線形回帰分析を用いて計算した。(Liu, J., et al. 2005, Biotechnol Letters 27: 1821-1827)。EC<sub>50</sub>値は、その最大結合の50%が観察される試験抗体の濃度を表す。

【表8】

表7A: CD3およびMUC16特異的細胞株に対するFACS結合

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

【表9】

表7B: CD3およびMUC16特異的細胞株に対するFACS結合

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

【0288】

表7Aおよび7Bに示すように、各MUC16二重特異性抗体のCD3結合アームは、T細胞を発現するヒトおよびサルCD3に結合する細胞の範囲を示した（例えば、3.2nMのEC<sub>50</sub>から非常に弱い結合）。BSMUC16/CD3-001二重特異性抗体は、CD3発現細胞への結合の高い測定値を示した（すなわち、<7nM）が、BSMUC16/CD3-002二重特異性抗体は、ヒトおよびサルのCD3発現細胞に対して、弱い結合から非結合を示した。FACSアッセイまたは同等のアッセイにおける測定不可能な結合、または測定不可能な結合は、アッセイの検出限界（例えば、1μM以上）を超える、抗体とその標的抗原との間の結合相互作用を指す。試験した二重特異性抗体は、MUC16発現細胞株に対して同様の細胞結合を示し、CD3との高いまたは弱い（もしくは測定可能でない）相互作用を示す個々のCD3アームとの二重特異性対合は、腫瘍標的特異的結合に影響を及ぼさない、またはそれを減少させることを確認した。（これらの実施例では、MUC16特異的結合は3nM以下（高結合）であった。第1の対照抗体はCD3+細胞に結合せず、第2の対照抗体はMUC16+細胞に結合しなかった。図11A～図11Cも参照されたい。）

【0289】

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

【0290】

インビトロ測定した二重特異性抗体により示されるT細胞活性化および腫瘍特異的細胞毒性A.MUC16を発現する腫瘍標的細胞の特異的死滅を、CD3ベースの二重特異性抗体の存在下で、フローサイトメトリーによってモニターした。先に報告したように、二重特異性抗体はCD3タンパク質およびCD3発現細胞株に対して特異的結合能力（すなわち

10

20

30

40

50

非常に弱いまたは強い結合)を示した。これらの同じ二重特異性抗体を、ナイーブヒトT細胞が標的発現細胞に対して殺滅するのを再誘導する能力について試験した。

#### 【0291】

簡潔に説明すると、MUC16を発現する(OVCA-R3)細胞株を蛍光追跡用色素バイオレット細胞トラッカーの $1\text{ }\mu\text{M}$ で標識した。標識後、細胞を37℃で一晩播種した。別に、ヒトPBMCを $1\times 10^6$ 細胞/mLで補充 RPMI培地に播種し、付着マクロファージ、樹状細胞、およびいくつかの単球を枯渇させることによってリンパ球を濃縮するために37℃で一晩インキュベートした。翌日、標的細胞を、接着性細胞除去非刺激PBMC(エフェクター/標的細胞4:1の比率)、および関連二重特異性抗体またはアイソタイプ対照(濃度範囲: 6.6.7 nM ~ 0.25 M)の段階希釈物と共に37℃で48時間インキュベートした。無酵素胞解離緩衝液を用いて細胞を細胞培養プレートから取り出し、FACSにより分析した。表8Aに表される結果を参照されたい。10

#### 【0292】

B. 類似の試験において、記載されているように、MUC16を発現する(PEO-1またはOVCA-R3-Luc)細胞株を一晩、標識播種し、インキュベートした。MUC16 × CD3二重特異性抗体またはアイソタイプ対照の段階希釈物を同時インキュベートした。表8Bおよび8C、ならびに図12A~12Bに示される結果を参照されたい。

#### 【0293】

FACS分析のために、細胞を死/生の遠赤細胞トラッカー(*In vitro*rogen)で染色した。FACS分析の直前に、 $5\times 10^5$ 個の計数ビーズを各ウェルに加えた。各サンプルにつき $1\times 10^4$ 個のビーズを集めた。殺傷の特異性を評価するために、細胞を生きたバイオレット標識集団にゲートした。生きている集団の割合を記録し、正規化された生存率の計算に使用した。20

#### 【0294】

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

表8A~8Cの結果が示すように、MUC16発現細胞の枯渇は抗MUC16 × CD3二重特異性抗体で観察された。試験した二重特異性抗体は全て、ヒトT細胞を活性化して、標的細胞をピコモル範囲のEC<sub>50</sub>で枯渇するようにヒトT細胞を誘導した。さらに、観察された標的細胞溶解(枯渇)は、同じくピコモル(pM)EC<sub>50</sub>で、CD2+T細胞上のCD69(またはCD25)の上方制御と関連していた。30

#### 【0295】

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

#### 【表10】

表8A: 選択されたMUC16 × CD3二重特異性抗体の細胞傷害性およびT細胞活性化の特性40

二重特異性抗体識別子	抗CD3 結合アーム	OVCA-R3細胞枯渇 EC <sub>50</sub> [M]	T細胞活性化 (CD69上方制御) EC <sub>50</sub> [M]
BSMUC16/CD3-001	CD3-VH-G	2.24E-11	5.88E-12
BSMUC16/CD3-002	CD3-VH-G5	3.06E-11	1.01E-11

## 【表 1 1】

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

二重特異性抗体識別子	P E O - 1 細胞枯渴 E C 5 0 [M]	T 細胞活性化 (CD69 上方制御) E C 5 0 [M]	T 細胞活性化 (CD25 上方制御) E C 5 0 [M]
BSMUC16/CD3-001	2.56E-11	8.34E-12	3.90E-11
BSMUC16/CD3-002	6.75E-11	1.34E-11	8.89E-11
BSMUC16/CD3-005	7.74E-11	1.72E-11	1.06E-10

10

## 【表 1 2】

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

二重特異性抗体識別子	O V C A R 3 - L u c 細胞枯渴 E C 5 0 [M]	T 細胞活性化 (CD69 上方制御) E C 5 0 [M]	T 細胞活性化 (CD25 上方制御) E C 5 0 [M]
BSMUC16/CD3-001	1.54E-11	2.98E-12	3.06E-11
BSMUC16/CD3-005	5.16E-11	1.54E-11	1.17E-10

20

## 【0296】

実施例 6 : h M U C 1 6 の C 末端ドメインの一部に結合する抗 M u c 1 6 抗体 H 4 s H 8 7 6 7 P 、 H 1 H 8 7 9 4 P 2 、および H 1 H 8 7 9 9 P 2 の水素 / 重水素 ( H / D ) 交換ベースのエピトープマッピング

実験は、抗 M U C 1 6 抗体の H 4 s H 8 7 6 7 P 、 H 1 H 8 7 9 4 P 2 、および H 1 H 8 7 9 9 P 2 と相互作用する、 C 末端の 5 つの S E A ドメイン内 M U C 1 6 アミノ酸残基 ( 配列番号 1 9 0 2 、以後 h M U C 1 6 . n u b と称する ) を決定するために実施した。この目的のために、質量分析による水素 / 重水素 ( H / D ) 交換エピトープマッピング ( H D X - M S ) を利用した。 H / D 交換法の一般的な説明は、 E h r i n g ( 1 9 9 9 ) A n a l y t i c a l B i o c h e m i s t r y 2 6 7 ( 2 ) : 2 5 2 - 2 5 9 、および E n g e n a n d S m i t h ( 2 0 0 1 ) A n a l . C h e m . 7 3 : 2 5 6 A - 2 6 5 A に記載されている。

30

## 【0297】

重水素標識のための Leaptac HDX PAL システム、サンプルの消化およびローディングのための Waters Acquity M - Class ( A u x i l i a r y s o l v e n t m a n a g e r ) 、分析カラム勾配のための Waters Acquity M - Class ( μ B i n a r y s o l v e n t m a n a g e r ) 、およびペプシンペプチド質量測定のための Synapt G 2 - S i 質量分析計で構成される Wate r s HDX / M S 統合プラットフォーム上で、 HDX - M S 実験を実行した。

40

## 【0298】

p D 7 . 0 で D 2 O の 1 0 m M の P B S 緩衝液中で標識溶液を調製した。重水素標識のために、 3 . 8 μ L の h M U C 1 6 . n u b ( 1 2 p m o l / μ L ) または抗 M U C 1 6 抗体 H 4 s H 8 7 6 7 P 、 H 1 H 8 7 9 4 P 2 、または H 1 H 8 7 9 9 P 2 と 2 : 1 のモル比で混合した h M U C 1 6 . n u b を 5 6 . 2 μ L でインキュベートした。様々な時点での D 2 O 標識溶液 ( 例 : 非重水素化対照 = 0 秒、重水素化標識 : 1 分と 2 0 分 ) 5 0 μ L のサンプルを 5 0 μ L の予め冷却したクエンチ緩衝液 ( 1 0 0 m M のリン酸緩衝液中の 0 . 2 M の T C E P 、 6 M の塩化グアニジン、 p H 2 . 5 ) に移すことによって重水素化をクエンチし、混合サンプルを 1 . 0 ℃ で 2 分間インキュベートした。次に、クエンチしたサンプルをオンラインペプシン / プロテアーゼ X I I I 消化のために Wate r s HDX

50

Managerに注入した。消化したペプチドを ACQUITY UPLC BEH C18 1.7- $\mu$ m、2.1×5mm Vanguardカラムに、0でトラップし、9分間の5%～40% B勾配分離（移動相A：水中0.1% ギ酸、移動相B：アセトニトリル中0.1% ギ酸）で分析カラムACQUITY UPLC BEH C18 (1.7- $\mu$ m、1.0×50mm)に溶出した。質量分析計は、37Vのコーン電圧、0.5秒のスキャン時間、および50～1700Thの質量／電荷範囲を使用した。

#### 【0299】

H4sH8767P、H1H8794P2、およびH1H8799P2と相互作用する、hMUC16.nubのペプチド残基の同定については、非重水素化サンプルからのLC-MSEデータを処理し、Waters ProteinLynx Global Server (PLGS) ソフトウェアを用いて、hMUC16.nub、ペプシンの配列および無作為化配列を含むデータベースに対して検索した。同定されたペプチドを DynamX ソフトウェアにインポートし、2つの基準1) アミノ酸あたりの最小産物：0.25、および2) 複製ファイル閾値：2でフィルタリングした。その後、DynamX ソフトウェアは、各時点で3回反復して、複数時点にわたる保持時間および高い質量精度(<10 ppm)に基づいて、各ペプチドの重水素取り込みを自動的に決定した。

#### 【0300】

MSEデータ取得と結合したオンラインペプシン／プロテアーゼXIIIカラムを用いて、hMUC16.nubからの109個のペプチドの総数が、H4sH8767Pの非存在下または存在下で同定され、64%の配列範囲を表した。H4sH8767Pに結合した場合、6つのペプチドは重水素の取り込みを有意に減少させ(p値<0.05の少なくとも1つの時点から重心デルタ値>0.5ダルトン)、それは表9Aに示される。記録されたペプチド質量は、3つの複製からの重心MH<sup>+</sup>質量の平均値に対応する。hMuc16.nubのアミノ酸428～434、453～467、および474～481に対応するこれらのペプチドは、H4sH8767Pに結合したとき、重水素化速度はより遅かった。これらの同定された残基はまた、UniprotエントリーQ8WXI7 (MUC16\_HUMAN)、配列番号1899によって定義される、hMUC16の残基14237～14243、14262～14276、および14283～14290に対応する。

#### 【表13】

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

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

#### 【0301】

10

20

30

40

50

M S E データ取得と結合したオンラインペプシン / プロテアーゼ X I I I カラムを用いて、h M U C 1 6 . n u b からの 1 0 9 個のペプチドの総数が、H 1 H 8 7 9 4 P 2 の非存在下または存在下で同定され、6 4 % の配列範囲を表した。H 1 H 8 7 9 4 P 2 に結合したとき、3 つのペプチドは重水素の取り込みを有意に減少させ（p 値 < 0 . 0 5 の少なくとも 1 つの時点から重心デルタ値 > 0 . 5 ダルトン）、それは表 9 B に示される。記録されたペプチド質量は、3 つの複製からの重心M H + 質量の平均値に対応する。h M u c 1 6 . n u b のアミノ酸 1 2 6 ~ 1 3 1 、 1 2 7 ~ 1 3 1 、および 1 3 2 ~ 1 3 8 に対応するこれらのペプチドは、H 1 H 8 7 9 4 P 2 に結合したとき、重水素化速度はより遅かった。これらの同定された残基はまた、U n i p r o t エントリー Q 8 W X I 7 ( M U C 1 6 \_ H U M A N ) 、配列番号 1 8 9 9 によって定義される、h M U C 1 6 の残基 1 3 9 3 5 ~ 1 3 9 4 0 、 1 3 9 3 6 ~ 1 3 9 4 0 、および 1 3 9 4 1 ~ 1 3 9 4 7 に対応する。

#### 【表 1 4】

表 9 B. H 1 H 8 7 9 4 P 2 結合時に重水素化速度が変化した h M U C 1 6 . n u b ペプチド

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

#### 【 0 3 0 2 】

M S E データ取得と結合したオンラインペプシン / プロテアーゼ X I I I カラムを用いて、h M U C 1 6 . n u b からの 1 0 9 個のペプチドの総数が、H 1 H 8 7 9 9 P 2 の非存在下または存在下で同定され、6 4 % の配列範囲を表した。H 1 H 8 7 9 9 P 2 に結合したとき、4 つのペプチドは重水素の取り込みを有意に減少させ（p 値 < 0 . 0 5 の少なくとも 1 つの時点から重心デルタ値 > 0 . 5 ダルトン）、それは表 9 C に示される。記録されたペプチド質量は、3 つの複製からの重心M H + 質量の平均値に対応する。h M u c 1 6 . n u b のアミノ酸 3 5 7 ~ 3 6 9 、 3 5 8 ~ 3 6 6 、 3 5 8 ~ 3 6 9 、および 3 6 1 ~ 3 6 9 に対応するこれらのペプチドは、H 1 H 8 7 9 9 P 2 に結合したとき、重水素化速度はより遅かった。これらの同定された残基はまた、U n i p r o t エントリー Q 8 W X I 7 ( M U C 1 6 \_ H U M A N ) 、配列番号 1 8 9 9 によって定義される、h M U C 1 6 の残基 1 4 1 6 5 ~ 1 4 1 7 8 、 1 4 1 6 6 ~ 1 4 1 7 6 、 1 4 1 6 6 ~ 1 4 1 7 8 、および 1 4 1 7 0 ~ 1 4 1 7 8 に対応する。

10

20

30

40

50

## 【表15】

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

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

## 【0303】

## 実施例7：抗MUC16×CD3二重特異性抗体の薬物動態学的評価

B S M U C 1 6 / C D 3 - 0 0 1 および B S M U C 1 6 / C D 3 - 0 0 5 およびアイソタイプ対照の抗MUC16×CD3二重特異性抗体の薬物動態の評価を、ヒト化MUC16×CD3マウス（ヒトMUC16およびCD3発現についてホモ接合性のマウス、MUC16 hu / hu × CD3 hu / hu）、CD3ヒト化マウス（ヒトCD3発現についてホモ接合性のマウス、CD3 hu / hu）、および系統適合（75% C57BL、25% 129Sv）野生型（WT）マウスで実施した。コホートは、試験抗体あたりおよびマウス系統あたり4～5匹のマウスを含んだ。全てのマウスに単一の腹腔内（i.p.）を投与した。0.4 mg / kg 用量投与後3および6時間後、1、3、7、14および28日後に血液サンプルを採取した。血液を血清に処理し、分析するまで -80°で凍結した。

## 【0304】

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

PKパラメータは、フェニックス（登録商標）ワインノンリン（登録商標）ソフトウェアバージョン6.3（Certara, L.P., Princeton, NJ）、および血管外投与モデルを用いた非コンパートメント解析（NCA）によって決定した。各抗体のそれぞれの平均濃度値を用いて、血清中で観察された最大濃度（Cmax）、推定半減期（t1/2）、および最後の測定可能な濃度までの時間に対する濃度曲線下面積（AUClast）を含む全てのPKパラメータを線形補間および均一の重み付けによる線形台形法則を用いて決定した。

## 【0305】

WTマウスにおける抗体の腹腔内投与後、B S M U C 1 6 / C D 3 - 0 0 1、B S M U C 1 6 / C D 3 - 0 0 5 およびアイソタイプ対照の総IgG濃度・時間プロファイルは全て

同様で、まず短時間の薬物分布で、続いて残りの試験の間の単一薬物消失段階で特徴付けられた。3つの抗体の最大血清濃度( $C_{max}$ )および計算された薬物曝露(AUC<sub>1ast</sub>)は同程度であった(互いに1.3倍以内)。

#### 【0306】

$CD3hu/hu$ マウスにおける抗体の腹腔内投与後、 $BSMUC16/CD3-001$ 、 $BSMUC16/CD3-005$ およびアイソタイプ対照は同等の $C_{max}$ 濃度だった。(それぞれ4.6、3.6、および4.1/ $mL$ の4.1 $\mu g/mL$ )  $BSMUC16/CD3-005$ およびアイソタイプ対照は類似の薬物消失曲線を示したが、 $BSMUC16/CD3-001$ は両者より急勾配の薬物排除を示し、ヒトCD3標的結合がクリアランスを促進することを示唆している。 $BSMUC16/CD3-001$ の末端抗体濃度は0.03 $\mu g/mL$ であり、これはアイソタイプ対照について決定された末端抗体濃度(0.85 $\mu g/mL$ )より約28倍低く、 $BSMUC16/CD3-005$ (0.66 $\mu g/mL$ )血清濃度より22倍低い。

10

#### 【0307】

$MUC16hu/hu \times CD3hu/hu$ 二重ヒト化マウスで、 $MUC16 \times CD3$ 二重特異性抗体およびアイソタイプ対照抗体は、同等の $C_{max}$ 濃度( $C_{max}$ 範囲:4.5~6.9 $\mu g/mL$ )だった。両方の二重特異性抗体は、アイソタイプ対照よりも急勾配の薬物消失を示し、これは標的媒介性効果を示唆している。 $BSMUC16/CD3-001$ および $BSMUC16/CD3-005$ の末端抗体濃度は、アイソタイプ対照について決定された末端抗体濃度(0.86 $\mu g/mL$ )よりもそれぞれ約29倍および2.9倍低かった。

20

#### 【0308】

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

30

40

50

## 【表 16】

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

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

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

10

20

30

40

50

## 【表 17】

表 11 A : 薬物動態学的パラメータの要約 : CD 3<sup>hu/hu</sup>ヒト化マウス

パラメータ	単位	WTマウス			CD 3 <sup>hu/hu</sup> マウス		
		アイソタイプ 対照	BSMUC16/ CD3-001	BSMUC16/ CD3-005	アイソタイプ 対照	BSMUC16/ CD3-001	BSMUC16/ CD3-005
C <sub>max</sub>	μg/mL	5±3	6±0.4	5±0.5	4.1±3	4.6±0.8	3.5±1
T <sub>1/2</sub>	d	11±4	7±3	12±2	14±0.5	3.9±0.6	11±5
AUC <sub>last</sub>	d·μg/mL	35±18	40±11	45±5	49±20	16±3	36±13

C<sub>max</sub>=ピーク濃度、AUC=濃度一時間曲線下面積、AUC<sub>last</sub>=時間0から最後の陽性濃度の時間までに計算されたAUC、T<sub>1/2</sub>=観察された推定半減期

10

## 【表 18】

表 11 B : 薬物動態学的パラメータのまとめ : MUC 1 6<sup>hu/hu</sup>×CD 3<sup>hu/hu</sup>二重ヒト化マウス

パラメータ	単位	WTマウス			MUC 1 6 <sup>hu/hu</sup> ×CD 3 <sup>hu/hu</sup> マウス		
		アイソタイプ 対照	BSMUC16/ CD3-001	BSMUC16/ CD3-005	アイソタイプ 対照	BSMUC16/ CD3-001	BSMUC16/ CD3-005
C <sub>max</sub>	μg/mL	5±3	6±0.4	5±0.5	6.7±0.7	6.9±1	4.5±4
T <sub>1/2</sub>	d	11±4	7±3	12±2	12.9±4	3.3±0.8	8.2±4
AUC <sub>last</sub>	d·μg/mL	35±18	40±11	45±5	46±10	27±3	34±11

C<sub>max</sub>=ピーク濃度、AUC=濃度一時間曲線下面積、AUC<sub>last</sub>=時間0から最後の陽性濃度の時間までに計算されたAUC、T<sub>1/2</sub>=観察された推定半減期

20

## 【0309】

実施例 8 : 抗 MUC 1 6 / 抗 CD 3 二重特異性抗体はインビボで強力な抗腫瘍効果を示す。ヒトおよびカニクイザル CD 3 への弱い結合または検出不可能な結合を有すると同定される、例示的な抗 MUC 1 6 / 抗 CD 3 二重特異性抗体のインビボでの有効性を決定するために、ヒト前立腺癌異種移植片を保有する免疫無防備状態マウスにおいて試験を行った。選択された二重特異性抗体の有効性を、即時処置投薬モデルおよび治療用処置投薬モデルの両方において試験した。

30

## 【0310】

ヒト腫瘍異種移植片モデルにおける抗 MUC 1 6 / 抗 CD 3 二重特異性抗体の有効性ヒト腫瘍異種移植片試験における抗 MUC 1 6 / 抗 CD 3 二重特異性のインビボでの有効性を評価するために、NOD scid ガンマ (NSG) マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) に、ヒト末梢血単核球 (PBMC, Reach Bio LLC., Seattle, WA) を予め移植し、次いでルシフェラーゼを形質導入したヒト卵巣癌細胞株 OVCAR-3 (American Type Tissue Culture, Manassas, VA) (OVCAR-3/Luc) の腹水細胞を与えた。OVCAR-3 細胞は内因的に MUC-16 を発現する。

40

## 【0311】

簡潔に説明すると、NSG マウスに 5.0 × 10<sup>6</sup> 個のヒト PBMC を腹腔内 (i.p.) 注射した。8 日後、予めインビボで継代培養した、OVCAR-3/Luc 細胞株からの 1.5 × 10<sup>6</sup> 腹水細胞を、PBMC を移植した NSG マウスに腹腔内投与した。即時処置群では、OVCAR-3/Luc 細胞移植の日に、マウスを MUC 1 6 / CD 3 二重特異性抗体 BSMUC16/CD3-001 または BSMUC16/CD3-005、またはアイソタイプ対照を 10 μg 用量 / マウスで腹腔内処置した。(N = 5 マウス / 処置

50

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

#### 【0312】

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

10

#### 【0313】

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

20

#### 【表19】

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

##### 即時投与

腫瘍モデル/マウス系統/用量	二重特異性抗体識別子	N	平均生物発光放射輝度（光子/秒/cm <sup>2</sup> /ステラジアン）26日目（平均±SD）
OVCAR-3/ Luc/NSG/ 10μg/マウス	BSMUC16/ CD3-001	5	1. 4×10 <sup>3</sup> ±3. 5×10 <sup>2</sup>
	BSMUC16/ CD3-005	5	1. 5×10 <sup>3</sup> ±9. 7×10 <sup>2</sup>
	アイソタイプ対照	5	2. 0×10 <sup>7</sup> ±1. 0×10 <sup>6</sup>

30

#### 【表20】

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

##### 治療用処置

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

40

#### 【0314】

さらなる実験において、抗MUC16/抗CD3二重特異性抗体のインビボでの有効性を

50

、異種および同系腫瘍モデルで評価した。第1の異種モデルについては、NSGマウスに、ヒトPBMCを移植した11日後に予めインビボで継代培養した(0日目)OVCAR-3/Luc細胞を腹腔内(IP)注射した。マウスを0.01、0.1または0.5mg/kgのBSMUC16/CD3-001で腹腔内処置、または6、10、13、16および21日目に0.5mg/kgの非結合対照またはCD3結合対照を投与した。腫瘍量は、腫瘍移植後6、14、および20日目にBLIによって評価された。0.1または0.5mg/kgのBSMUC16/CD3-001による処置は、表13A~Cおよび図4~6に示されるように、20日目のBLI測定によって決定されるように有意な抗腫瘍効果をもたらした。第2の異種モデルについては、NSGマウスに、ヒトPBMCを移植した13日後に予めインビボで継代培養した(0日目)OVCAR-3/Luc細胞を注射し、4日目にPBMCの第2のバッチを移した。マウスを0.1、0.5、1または5mg/kgのBSMUC16/CD3-005で静脈内(IV)処置、または5、8、12、15、19、および22日目に、5mg/kgの非結合対照またはCD3結合対照を投与した。4、11、18および25日目に、腫瘍量をBLIによって評価した。0.5、1、または5mg/kgのBSMUC16/CD3-005による処置は、BLI測定および倍率変化によって示されるように、有意な抗腫瘍効果をもたらした(表13D~Fおよび図7~9)。免疫適格モデルにおける有効性を調べるために、マウスCD3遺伝子をヒトCD3と置き換え、マウスマUC16遺伝子の一部をヒト配列と置き換えた。置換により、そのT細胞がヒトCD3を発現し、BSMUC16/CD3-001二重特異性抗体が結合するヒトMUC16の一部を含むキメラMUC16分子を発現するマウスが得られた。同系腫瘍モデルについては、ヒトMUC16の一部を発現するように操作されたID8-VEGF細胞株を使用した。マウスにID8-VEGF/huMUC16細胞を皮下に移植し、移植日または腫瘍形成時の移植後10日目のいずれかに100μgのBSMUC16/CD3-001で処置した。表13Gおよび図10に示されるように、100μgのBSMUC16/CD3-001による処置は、有意な抗腫瘍効果をもたらした。

### 【0315】

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

### 【0316】

異種移植腫瘍増殖および阻害の計算：生物発光イメージングを使用して腫瘍量を測定した。マウスに、PBS中に懸濁したルシフェラーゼ基質のD-ルシフェリン150mg/kg(実験開始時の体重により決定)を腹腔内注射した。投与の10分後、マウスのBLIイメージングを、Xenogen IVISシステムを用いてイソフルラン麻酔下で行った。Dでの視野、1.5cmの被写体の高さ、および0.5分間の露光時間の中程度のピニングレベルで、画像取得を行った。BLIシグナルはLiving Imageソフトウェアを用いて抽出した。目的の領域を各腫瘍量の周囲に描き、光子強度をp/s/cm<sup>2</sup>/srとして記録した。GraphPad Prismソフトウェア(バージョン6)を用いて統計分析を行った。BLI結果の統計的有意性は、対応のないノンパラメトリックなマン・ホイットニーt検定を用いて決定した。倍率変化は、式1：試験1では(20日目~6日目)/6日目、試験2では(25日目~4日目)/4日目で計算した。

### 【0317】

移植および同系腫瘍の測定：対応するマウス遺伝子座においてヒトCD3およびMUC16のヒト-マウスマキメラを発現するマウスに10e6 ID8-VEGF/huMUC16細胞を皮下(SC)移植した。試験を通して、マウスにBSMUC16/CD3-001またはCD3結合対照IPを1週間に2回投与した。移植後0日目または10日目に処

10

20

30

40

50

置を開始した。腫瘍増殖を、キャリパーを用いて週2回測定した。腫瘍移植後47日目にマウスを殺した。

【0318】

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

【0319】

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

【表21】

表13A：OVCAR-3モデル試験1腫瘍移植後6日目の生物発光レベル

抗体 (mg/kg)	移植後6日の平均放射輝度 [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (中央値±SEM)
非結合対照 (0.5)	8.15e+05±7.88e+04
CD3結合対照 (0.5)	6.39e+05±8.67e+04
BSMUC16/CD3-001 (0.5)	7.64e+05±1.19e+05
BSMUC16/CD3-001 (0.1)	6.31e+05±1.10e+05
BSMUC16/CD3-001 (0.01)	8.77e+05±7.91e+04

【表22】

表13B：OVCAR-3モデル試験1腫瘍移植後20日目の生物発光レベル

抗体 (mg/kg)	移植後20日の平均放射輝度 [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] (中央値±SEM)
非結合対照 (0.5)	8.63e+06±1.45e+06
CD3結合対照 (0.5)	9.94e+06±1.08e+06
BSMUC16/CD3-001 (0.5)	9.37e+02±9.62e+02
BSMUC16/CD3-001 (0.1)	2.36e+04±1.28e+06
BSMUC16/CD3-001 (0.01)	6.51e+06±1.60e+06

【表23】

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

抗体 (mg/kg)	移植後6日目からD20までの平均放射輝度 [p/s/cm <sup>2</sup> /sr] の倍率変化
非結合対照 (0.5)	9.5±1.9
CD3結合対照 (0.5)	15.6±6.7
BSMUC16/CD3-001 (0.5)	-1.00±0.00
BSMUC16/CD3-001 (0.1)	1.2±4.7
BSMUC16/CD3-001 (0.01)	5.6±4.2

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表13D: OVCAR-3モデル試験2腫瘍移植後4日目の生物発光レベル

抗体 (mg/kg)	移植後4日の平均放射輝度 [p/s/cm²/sr] (中央値±SEM)
非結合対照 (5)	1. 54e+05±9. 93e+03
CD3結合対照 (5)	1. 34e+05±1. 55e+04
B SMUC16/CD3-005 (5)	1. 54e+05±1. 03e+04
B SMUC16/CD3-005 (1)	1. 38e+05±4. 65e+03
B SMUC16/CD3-005 (0. 5)	1. 31e+05±4. 03e+03
B SMUC16/CD3-005 (0. 1)	1. 53e+05±1. 93e+04

10

【表 2 5】

表13E: OVCAR-3モデル試験2腫瘍移植後25日目の生物発光レベル

抗体 (mg/kg)	移植後25日の平均放射輝度 [p/s/cm²/sr] (中央値±SEM)
非結合対照 (5)	7. 20e+06±8. 91e+05
CD3結合対照 (5)	6. 15e+06±7. 26e+05
B SMUC16/CD3-005 (5)	1. 52e+03±4. 86e+05
B SMUC16/CD3-005 (1)	6. 99e+03±6. 23e+03
B SMUC16/CD3-005 (0. 5)	2. 23e+03±2. 35e+05
B SMUC16/CD3-005 (0. 1)	7. 63e+06±1. 83e+06

20

【表 2 6】

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

抗体 (mg/kg)	移植後4日目からD25までの平均放射輝度 [p/s/cm²/sr] の倍率変化 (平均±SD)
非結合対照 (5)	46. 8±20. 6
CD3結合対照 (5)	55. 0±14. 7
B SMUC16/CD3-005 (5)	2. 5±8. 5
B SMUC16/CD3-005 (1)	-0. 9±0. 1
B SMUC16/CD3-005 (0. 5)	0. 7±3. 6
B SMUC16/CD3-005 (0. 1)	45. 4±35. 7

40

50

## 【表27】

表13G: ID8-VEGF/huMUC16モデル47日目の腫瘍サイズ (mm<sup>3</sup>)

治療開始	抗体 (μg)	47日目の腫瘍サイズ (mm <sup>3</sup> ) (平均±SEM)
0日目	CD3結合対照 (100)	827.5±223.5
0日目	B SMUC16/CD3-001 (100)	51.2±51.2
10日目	B SMUC16/CD3-001 (100)	273.8±92.36

10

## 【0320】

## 実施例9：複合体の調製および特徴付け

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

## 【0321】

50 mMのHEPES、150 mMのNaCl、pH 7.5中の抗体 (10 mg/ml) を1 mMジチオトレイトルで、37℃で30分間処理した。ゲル濾過 (G-25、pH 4.5酢酸ナトリウム) 後、DMSO (10 mg/ml) 中のマレイミドリンカーペイロード誘導体化合物7または化合物10 (表14参照) (1.2当量/SH基) の1つを還元抗体に加え、混合物を1 M HEPES (pH 7.4) でpH 7.0に調整した。化合物7および化合物10、ならびにこれらの化合物の製造方法は、それぞれ、2014年9月18日に公開されたPCT公開番号WO 2014/145090および2016年10月6日に公開されたPCT公開番号WO 2016/160615に記載されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。1時間後、反応を過剰のN-エチルマレイミドでクエンチした。複合体をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製し、滅菌濾過した。タンパク質およびリンカーのペイロード濃度は、UVスペクトル分析によって決定した。サイズ排除HPLCは、使用された全ての複合体が>95%の単量体であることを立証した。収量は、タンパク質測定に基づいて表14に報告されている。Hamblett et al., Cancer Res 2004 10 7063に従って、リンカーペイロード負荷値について、全ての複合化抗体をUVによって分析した。結果を表14に要約する。

20

## 【0322】

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

30

40

40

50

## 【表 28】

表14：ペイロード（化学毒性薬）および抗体-薬物-複合体パラメータの要約

化合物	$\epsilon_{252\text{nm}} (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$	$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$
7 [メイタンシン-3-N-メチル-L-(S)-アラニン-プロパンアミジル-3-N-メチル-N-[4-(アミノ-シトルリン-パリシン-ヘキサンアミド-6-マレイミド)/ベンジル]カルバメート]	50600	8100
10 [メイタンシン-N-メチル-L-アラニン-4-アミノベンズアミド-シトルリン-パリシン-カプロリル-6-マレイミジル]	45990	20600
抗体	$\epsilon_{252\text{nm}} (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$	$\epsilon_{280\text{nm}} (\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1})$
H1H9519N	83995	235280
H1H9521N	85564	232050
アイソタイプ対照	75113	218360
抗体複合体	ペイロード: 抗体 (UV)	収量%
H1H9519N-7	3.5	40
H1H9521N-7	3.6	40
H1H9521N-10	3.0	40
アイソタイプ対照-7	3.0	60
アイソタイプ対照-10	3.4	60

10

20

30

## 【0323】

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

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

## 【0324】

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

## 【0325】

40

50

初期腹腔内（IP）の試験において、化合物7にコンジュゲートされた例示的な抗MUC16抗体は、OVCA R3 / 1 uc発光シグナルを減少させる効果について調べた。マウスに、週1回4回の抗MUC16および対照ADCを、ADC薬物：抗体比に基づいて、85 μg / kgの薬物当量で投与した。表15Aに要約されるように、H1H9519N-化合物7およびH1H9521N-化合物7は腹水腫瘍増殖を強力に阻害した。これらの抗MUC16 ADCは、ビヒクル対照に対する腫瘍発光を100%減少させながら、腫瘍サイズを効率的に減少させた。対照ADCは、OVCA R / 1 uc腹水癌細胞増殖のいかなる阻害も媒介しなかった。

#### 【0326】

皮下(SC) OVCA R3 / 1 uc腫瘍に対して抗MUC16 ADCの有効性を評価するさらなる試験を表15Bに要約する。マウスに、週1回4回の抗MUC16および対照ADCを、ADC薬物：抗体比に基づいて、85 μg / kgの薬物当量で投与した。化合物7にコンジュゲートした場合、MUC16 ADC H1H9519N-化合物7およびH1H9521N-化合物7は、今回、皮下のOVCA R3 / 1 uc腫瘍に対して、再び有意な抗腫瘍効果を生じた。したがって、これらのADCはそれぞれ腫瘍増殖の100%および109%の阻害を媒介した。対照ADCは、OVCA R / 1 uc皮下腫瘍増殖のいかなる阻害も媒介しなかった。

10

#### 【0327】

第3の試験において、リンカー薬剤化合物10にコンジュゲートされた抗MUC16抗体H1H9521Nの有効性を腹腔内OVCA R3 / 1 uc腫瘍モデルで評価した。マウスに、ADC薬物：抗体比に基づいて85 μg / kg、170 μg / kg、および340 μg / kgの薬物当量で単回用量の抗MUC16および対照ADCを投与した。表15Cに要約されるように、H1H9519N-10は腹水腫瘍増殖を強力に阻害した。H1H9519N-化合物10の用量は、ビヒクルコントロールに対する腫瘍発光の99~100%の阻害をもたらした。化合物10を使用した対照ADCではいくらかの阻害が観察されたが、これは抗MUC16 H1H9519N-化合物10の後に観察されたものよりも穏やかであった。

20

#### 【表29】

表15A：化合物7にコンジュゲートした抗MUC16抗体で処置したSCIDマウスにおける49日目のOVCA R3 / 1 uc腹腔内腫瘍増殖の阻害

30

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

40

50

## 【表 3 0】

表 15 B : 化合物 7 にコンジュゲートした抗 MUC 1 6 抗体で処置した S C I D マウスにおける  
37 日目の O V C A R 3 / 1 u c 皮下内腫瘍増殖の阻害

処置群	最終腫瘍体積 (平均 ± S E M)	平均腫瘍増殖阻害率 (%)
ビヒクル	1210 ± 426	0
対照 - 化合物 7 8 5 μ g / kg	1737 ± 391	-51
H 1 H 9 5 1 9 N - 化合物 7 8 5 μ g / kg	187 ± 269	100
H 1 H 9 5 2 1 N - 化合物 7 8 5 μ g / kg	89 ± 97	109

10

## 【表 3 1】

表 15 C : 化合物 10 にコンジュゲートした抗 MUC 1 6 抗体で処置した S C I D マウスにおける  
49 日目の O V C A R 3 / 1 u c 腹腔内腫瘍増殖の阻害

処置群	最終腫瘍放射輝度 (平均 ± S E M)	平均腫瘍増殖阻害率 (%)
ビヒクル	29211000 ± 23504780	0
対照 - 化合物 10 8 5 μ g / kg	17332625 ± 14346694	41
対照 - 化合物 10 1 7 0 μ g / kg	32075000 ± 15623403	-10
対照 - 化合物 10 3 4 0 μ g / kg	22882350 ± 18771913	22
H 1 H 9 5 2 1 N - 化合物 10 8 5 μ g / kg	574285 ± 306844	99
H 1 H 9 5 2 1 N - 化合物 10 1 7 0 μ g / kg	236037 ± 226948	100
H 1 H 9 5 2 1 N - 化合物 10 3 4 0 μ g / kg	26472 ± 25079	101

20

30

## 【0 3 2 8】

## 実施例 11 : 抗 C D 3 抗体の產生

抗 C D 3 抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖およびカッパ軽鎖可変領域をコードする D N A を含む遺伝子操作マウスを、C D 3 を発現する細胞または C D 3 をコードする D N A で免疫することによって得た。抗体の免疫応答を、C D 3 特異的イムノアッセイによってモニターした。所望の免疫応答が達成されたとき、脾細胞を収集し、マウス骨髄腫細胞と融合させて、それらの生存率を維持し、ハイブリドーマ細胞株を形成した。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニングおよび選択して、C D 3 特異的抗体を产生する細胞株を同定した。この技術を用いて、いくつかの抗 C D 3 キメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインとマウス定常ドメインとを有する抗体）を得た。さらに、U S 2 0 0 7 / 0 2 8 0 9 4 5 A 1 に記載されるように、いくつかの完全ヒト型抗 C D 3 抗体を骨髄腫細胞に融合させることなく抗原陽性 B 細胞から直接単離した。

40

## 【0 3 2 9】

本実施例の方法に従って產生された例示的な抗 C D 3 抗体の特定の生物学的特性を、本明細書の実施例において詳細に説明する。

## 【0 3 3 0】

実施例 12 : 重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列および核酸配列

50

表16は、本発明の選択された抗CD3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域ならびにCDRのアミノ酸配列識別子を示す。対応する核酸配列識別子を表17に示す。本明細書に開示の抗CD3抗体を作製する方法はまた、米国特許公開第2014/0088295号に見出すことができる。

## 【表32】

表16：アミノ酸配列識別子

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

10

20

30

40

50

【表 3 3】

H1H5752P	946	948	950	952	954	956	958	960
H1H5753B	962	964	966	968	970	972	974	976
H1H5754B	978	980	982	984	986	988	990	992
H1H5755B	994	996	998	1000	1002	1004	1006	1008
H1H5756B	1010	1012	1014	1016	1018	1020	1022	1024
H1H5757B	1026	1028	1030	1032	1034	1036	1038	1040
H1H5758B	1042	1044	1046	1048	1050	1052	1054	1056
H1H5761P	1058	1060	1062	1064	1066	1068	1070	1072
H1H5763P	1074	1076	1078	1080	1082	1084	1086	1088
H1H5764P	1090	1092	1094	1096	1098	1100	1102	1104
H1H5769P	1106	1108	1110	1112	1114	1116	1118	1120
H1H5771P	1122	1124	1126	1128	1130	1132	1134	1136
H1H5772P	1138	1140	1142	1144	1146	1148	1150	1152
H1H5777P	1154	1156	1158	1160	1162	1164	1166	1168
H1H5778P	1170	1172	1174	1176	1178	1180	1182	1184
H1H5780P	1186	1188	1190	1192	1194	1196	1198	1200
H1H5781P	1202	1204	1206	1208	1210	1212	1214	1216
H1H5782P	1218	1220	1222	1224	1226	1228	1230	1232
H1H5785B	1234	1236	1238	1240	1242	1244	1246	1248
H1H5786B	1250	1252	1254	1256	1258	1260	1262	1264
H1H5788P	1266	1268	1270	1272	1274	1276	1278	1280
H1H5790B	1282	1284	1286	1288	1290	1292	1294	1296
H1H5791B	1298	1300	1302	1304	1306	1308	1310	1312
H1H5792B	1314	1316	1318	1320	1322	1324	1326	1328
H1H5793B	1330	1332	1334	1336	1338	1340	1342	1344
H1H5795B	1346	1348	1350	1352	1354	1356	1358	1360
H1H5796B	1362	1364	1366	1368	1370	1372	1374	1376
H1H5797B	1378	1380	1382	1384	1386	1388	1390	1392
H1H5798B	1394	1396	1398	1400	1402	1404	1406	1408
H1H5799P	1410	1412	1414	1416	1418	1420	1422	1424
H1H5801B	1426	1428	1430	1432	1434	1436	1438	1440
H1H7194B	1442	1444	1446	1448	1634	1636	1638	1640
H1H7195B	1450	1452	1454	1456	1634	1636	1638	1640
H1H7196B	1458	1460	1462	1464	1634	1636	1638	1640
H1H7198B	1466	1468	1470	1472	1634	1636	1638	1640
H1H7203B	1474	1476	1478	1480	1634	1636	1638	1640
H1H7204B	1482	1484	1486	1488	1634	1636	1638	1640
H1H7208B	1490	1492	1494	1496	1634	1636	1638	1640
H1H7211B	1498	1500	1502	1504	1634	1636	1638	1640
H1H7221B	1506	1508	1510	1512	1634	1636	1638	1640

10

20

30

40

50

【表 3 4】

H1H7223B	1514	1516	1518	1520	1634	1636	1638	1640
H1H7226B	1522	1524	1526	1528	1634	1636	1638	1640
H1H7232B	1530	1532	1534	1536	1634	1636	1638	1640
H1H7233B	1538	1540	1542	1544	1634	1636	1638	1640
H1H7241B	1546	1548	1550	1552	1634	1636	1638	1640
H1H7242B	1554	1556	1558	1560	1634	1636	1638	1640
H1H7250B	1562	1564	1566	1568	1634	1636	1638	1640
H1H7251B	1570	1572	1574	1576	1634	1636	1638	1640
H1H7254B	1578	1580	1582	1584	1634	1636	1638	1640
H1H7258B	1586	1588	1590	1592	1634	1636	1638	1640
H1H7269B	1594	1596	1598	1600	1634	1636	1638	1640
H1H7279B	1602	1604	1606	1608	1634	1636	1638	1640
H1xH7221G	1610	1612	1614	1616	1634	1636	1638	1640
H1×H7221G3	1618	1620	1622	1624	1634	1636	1638	1640
H1×H7221G5	1626	1628	1630	1632	1634	1636	1638	1640

10

20

30

40

50

## 【表 3 5】

表 17 : 核酸配列識別子

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

10

20

30

40

50

【表 3 6】

H1H5752P	945	947	949	951	953	955	957	959
H1H5753B	961	963	965	967	969	971	973	975
H1H5754B	977	979	981	983	985	987	989	991
H1H5755B	993	995	997	999	1001	1003	1005	1007
H1H5756B	1009	1011	1013	1015	1017	1019	1021	1023
H1H5757B	1025	1027	1029	1031	1033	1035	1037	1039
H1H5758B	1041	1043	1045	1047	1049	1051	1053	1055
H1H5761P	1057	1059	1061	1063	1065	1067	1069	1071
H1H5763P	1073	1075	1077	1079	1081	1083	1085	1087
H1H5764P	1089	1091	1093	1095	1097	1099	1101	1103
H1H5769P	1105	1107	1109	1111	1113	1115	1117	1119
H1H5771P	1121	1123	1125	1127	1129	1131	1133	1135
H1H5772P	1137	1139	1141	1143	1145	1147	1149	1151
H1H5777P	1153	1155	1157	1159	1161	1163	1165	1167
H1H5778P	1169	1171	1173	1175	1177	1179	1181	1183
H1H5780P	1185	1187	1189	1191	1193	1195	1197	1199
H1H5781P	1201	1203	1205	1207	1209	1211	1213	1215
H1H5782P	1217	1219	1221	1223	1225	1227	1229	1231
H1H5785B	1233	1235	1237	1239	1241	1243	1245	1247
H1H5786B	1249	1251	1253	1255	1257	1259	1261	1263
H1H5788P	1265	1267	1269	1271	1273	1275	1277	1279
H1H5790B	1281	1283	1285	1287	1289	1291	1293	1295
H1H5791B	1297	1299	1301	1303	1305	1307	1309	1311
H1H5792B	1313	1315	1317	1319	1321	1323	1325	1327
H1H5793B	1329	1331	1333	1335	1337	1339	1341	1343
H1H5795B	1345	1347	1349	1351	1353	1355	1357	1359
H1H5796B	1361	1363	1365	1367	1369	1371	1373	1375
H1H5797B	1377	1379	1381	1383	1385	1387	1389	1391
H1H5798B	1393	1395	1397	1399	1401	1403	1405	1407
H1H5799P	1409	1411	1413	1415	1417	1419	1421	1423
H1H5801B	1425	1427	1429	1431	1433	1435	1437	1439
H1H7194B	1441	1443	1445	1447	1449	1451	1453	1455
H1H7195B	1449	1451	1453	1455	1457	1459	1461	1463
H1H7196B	1457	1459	1461	1463	1465	1467	1469	1471
H1H7198B	1465	1467	1469	1471	1473	1475	1477	1479
H1H7203B	1473	1475	1477	1479	1481	1483	1485	1487
H1H7204B	1481	1483	1485	1487	1489	1491	1493	1495
H1H7208B	1489	1491	1493	1495	1497	1499	1501	1503
H1H7211B	1497	1499	1501	1503	1505	1507	1509	1511
H1H7221B	1505	1507	1509	1511	1513	1515	1517	1519

10

20

30

40

50

【表 3 7】

H1H7223B	1513	1515	1517	1519	1633	1635	1637	1639
H1H7226B	1521	1523	1525	1527	1633	1635	1637	1639
H1H7232B	1529	1531	1533	1535	1633	1635	1637	1639
H1H7233B	1537	1539	1541	1543	1633	1635	1637	1639
H1H7241B	1545	1547	1549	1551	1633	1635	1637	1639
H1H7242B	1553	1555	1557	1559	1633	1635	1637	1639
H1H7250B	1561	1563	1565	1567	1633	1635	1637	1639
H1H7251B	1569	1571	1573	1575	1633	1635	1637	1639
H1H7254B	1577	1579	1581	1583	1633	1635	1637	1639
H1H7258B	1585	1587	1589	1591	1633	1635	1637	1639
H1H7269B	1593	1595	1597	1599	1633	1635	1637	1639
H1H7279B	1601	1603	1605	1607	1633	1635	1637	1639
H1xH7221G	1609	1611	1613	1615	1633	1635	1637	1639
H1×H7221G3	1617	1619	1621	1623	1633	1635	1637	1639
H1×H7221G5	1625	1627	1629	1631	1633	1635	1637	1639

10

20

## 【0 3 3 1】

抗体は、以下の命名法：F c 接頭辞（例えば、「H 1 H」、「H 1 M」、「H 2 M」など）、続いて数値識別子（例えば、表1に示すように、「2 7 1 2」、「2 6 9 2」など）、続いて「P」、「N」、または「B」の接尾辞により、本明細書で典型的に参照される。したがって、この命名法によれば、抗体は、本明細書では、例えば、「H 1 H 2 7 1 2 N」、「H 1 M 2 6 9 2 N」、「H 2 M 2 6 8 9 N」などと言及され得る。本明細書に使用される抗体名のH 1 H、H 1 M、およびH 2 Mの接頭辞は、抗体の特定のF c 領域アイソタイプを示す。例えば、「H 1 H」抗体はヒトIgG1 F c を有し、「H 1 M」抗体はマウスIgG1 F c を有し、「H 2 M」抗体はマウスIgG2 F c を有する（抗体名の最初の「H」によって示されるように全ての可変領域は完全ヒト型である）。当業者によって理解されているように、特定のF c アイソタイプを有する抗体は、異なるF c アイソタイプを有する抗体へ変換することができる（例えば、マウスIgG1 F c を有する抗体は、ヒトIgG4を有する抗体へ変換することができる、など）が、いずれの事象においても、表1に示す数値識別子によって示される可変ドメイン（CDRを含む）は同じままであることになっており、結合特性はF c ドメインの性質にかかわらず、同一または実質的に類似であると期待される。

30

## 【0 3 3 2】

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

40

50

## 【表 3 8】

表 18 (重鎖可変領域アミノ酸配列)

重鎖識別子	配列番号:			
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
CD3-VH-AA	1642	1644	1646	1648
CD3-VH-B	1658	1660	1662	1664
CD3-VH-C	1674	1676	1678	1680
CD3-VH-D	1690	1692	1694	1696
CD3-VH-E	1706	1708	1710	1712
CD3-VH-F <sup>#</sup>	1721	1722	1723	1724

10

## 【表 3 9】

表 19 (軽鎖可変領域アミノ酸配列)

軽鎖識別子	配列番号:			
	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
CD3-VL-AA	1650	1652	1654	1656
CD3-VL-B	1666	1668	1670	1672
CD3-VL-C	1682	1684	1686	1688
CD3-VL-D	1698	1700	1702	1704
CD3-VL-E	1714	1716	1718	1720
CD3-VL-F <sup>#</sup>	1725	1726	1727	1728

20

## 【0333】

CD3-VH-F および CD3-VL-F の重鎖および軽鎖可変領域は、WO 2004 / 106380 に記載の「L2K」と命名された抗 CD3 抗体に由来した。

## 【0334】

30

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

## 【表 4 0】

表 20 (重鎖可変領域配列をコードするヌクレオチド配列)

重鎖識別子	配列番号:			
	HCVR	HCDR 1	HCDR 2	HCDR 3
CD3-VH-AA	1641	1643	1645	1647
CD3-VH-B	1657	1659	1661	1663
CD3-VH-C	1673	1675	1677	1679
CD3-VH-D	1689	1691	1693	1695
CD3-VH-E	1705	1707	1709	1711

40

50

## 【表 4 1】

表 21 (軽鎖可変領域配列をコードするヌクレオチド配列)

軽鎖識別子	配列番号:			
	LCVR	LCDR 1	LCDR 2	LCDR 3
CD3-VL-AA	1649	1651	1653	1655
CD3-VL-B	1665	1667	1669	1671
CD3-VL-C	1681	1683	1685	1687
CD3-VL-D	1697	1699	1701	1703
CD3-VL-E	1713	1715	1717	1719

10

## 【0335】

以下の実施例にて使用される対照構築物

比較の目的で、種々の対照構築物（抗 CD3 抗体）を以下の実験に含めた。すなわち、カタログ番号 C R L - 8 0 0 1 で American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能なヒト T 細胞表面抗原に対するマウスモノクローナル抗体「OKT - 3」、およびヒト T リンパ球細胞上の T3 複合体のイプシロン鎖に対して反応性である、例えば、Biologics, San Diego, CA (Cat. No. 302914) または BD Pharmingen, Cat. 55052 から入手可能な市販のマウスモノクローナル抗体「SP34」。

20

## 【0336】

実施例 13：さらなる抗 CD3 抗体の產生

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

## 【0337】

抗 CD3 抗体のプールは、遺伝子改変マウスに由來した。簡潔に説明すると、マウスを CD3 抗原で免疫し、多様なレパートリーの高親和性抗原特異的抗体を発現させるために多様なヒト VH 再編成を含む B 細胞を產生した。表 22 ~ 25 に記載の抗体は、VK1-3 9 JK5 の同じ軽鎖配列（配列番号 1890 に記載の LCVR）を有する。

30

## 【0338】

產生された抗体を、インビトロ結合アッセイにおいてヒトおよびカニクイザル CD3 抗原に対する結合について試験し、他のいくつかの中でも特に、例えば、CD3-VH-P（配列番号 1882 に記載の HCVR）と命名された 1 つの CD3 抗体が同定され、ジャーカット細胞およびカニクイザル T 細胞の FACS 滴定において決定されるように、1 ~ 40 nM の結合（または細胞結合滴定）の EC50 を有するヒトおよびカニクイザル CD3 の両方にそれぞれ結合することが見出された。例えば、実施例 15 および 2016 年 7 月 29 日に出願された PCT / US 2016 / 044732 に概説されている FACS 結合実験も参照されたい。

30

## 【0339】

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

40

## 【0340】

FACS アッセイで見られるように、CD3-VH-G およびいくつかの他の操作された抗体はそれらの結合を保持したが、いくつかの抗 CD3 抗体は、40 nM の EC50 など

50

の弱い結合から測定不可能な結合で、ヒトまたはカニクイザルCD3にインピトロで結合する。続いて、例示的な抗CD3抗体を含む二重特異性抗体について、結合親和性、結合動態、ならびに毒性および薬物動態(pK)プロファイルを解明する他の生物学的特性を調べ、本実施例の方法に従って產生し、本明細書の実施例に詳細に記述する。

**【0341】**

実施例14：重鎖および軽鎖可変領域(CDRのアミノ酸配列および核酸配列)

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

**【0342】**

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

**【表42】**

表22：重鎖アミノ酸配列識別子

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

10

20

30

40

50

## 【表 4 3】

表 2 3 : 重鎖核酸配列識別子

抗体CD 3 - VH名	配列番号:			
	HCVR	CDR 1	CDR 2	CDR 3
CD 3 - VH - G	1 7 2 9	1 7 3 1	1 7 3 3	1 7 3 5
CD 3 - VH - G 2	1 7 3 7	1 7 3 9	1 7 4 1	1 7 4 3
CD 3 - VH - G 3	1 7 4 5	1 7 4 7	1 7 4 9	1 7 5 1
CD 3 - VH - G 4	1 7 5 3	1 7 5 5	1 7 5 7	1 7 5 9
CD 3 - VH - G 5	1 7 6 1	1 7 6 3	1 7 6 5	1 7 6 7
CD 3 - VH - G 8	1 7 6 9	1 7 7 1	1 7 7 3	1 7 7 5
CD 3 - VH - G 9	1 7 7 7	1 7 7 9	1 7 8 1	1 7 8 3
CD 3 - VH - G 1 0	1 7 8 5	1 7 8 7	1 7 8 9	1 7 9 1
CD 3 - VH - G 1 1	1 7 9 3	1 7 9 5	1 7 9 7	1 7 9 9
CD 3 - VH - G 1 2	1 8 0 1	1 8 0 3	1 8 0 5	1 8 0 7
CD 3 - VH - G 1 3	1 8 0 9	1 8 1 1	1 8 1 3	1 8 1 5
CD 3 - VH - G 1 4	1 8 1 7	1 8 1 9	1 8 2 1	1 8 2 3
CD 3 - VH - G 1 5	1 8 2 5	1 8 2 7	1 8 2 9	1 8 3 1
CD 3 - VH - G 1 6	1 8 3 3	1 8 3 5	1 8 3 7	1 8 3 9
CD 3 - VH - G 1 7	1 8 4 1	1 8 4 3	1 8 4 5	1 8 4 7
CD 3 - VH - G 1 8	1 8 4 9	1 8 5 1	1 8 5 3	1 8 5 5
CD 3 - VH - G 1 9	1 8 5 7	1 8 5 9	1 8 6 1	1 8 6 3
CD 3 - VH - G 2 0	1 8 6 5	1 8 6 7	1 8 6 9	1 8 7 1
CD 3 - VH - G 2 1	1 8 7 3	1 8 7 5	1 8 7 7	1 8 7 9
CD 3 - VH - P	1 8 8 1	1 8 8 3	1 8 8 5	1 8 8 7

10

20

30

## 【表 4 4】

表 2 4 : 軽鎖アミノ酸配列識別子

抗体名	配列番号:			
	LCVR	CDR 1	CDR 2	CDR 3
VK1-39JK5	1 8 9 0	1 8 9 2	1 8 9 4	1 8 9 6

40

表 2 5 : 軽鎖核酸配列識別子

抗体名	配列番号:			
	LCVR	CDR 1	CDR 2	CDR 3
VK1-39JK5	1 8 8 9	1 8 9 1	1 8 9 3	1 8 9 5

## 【0 3 4 3】

「CD 3 - L 2 K」と命名された対照 1 抗体は、既知の抗 CD 3 抗体（すなわち、WO 2 004 / 106380 に記載の抗 CD 3 抗体「L 2 K」）に基づいて構築された。

## 【0 3 4 4】

50

本明細書の実施例において言及されるアイソタイプ対照抗体は、無関係の抗原、すなわち Fe1D1 抗原と相互作用するアイソタイプ適合（改変 IgG4）抗体である。

#### 【0345】

実施例 15：ヒトモノクローナル抗 CD3 抗体に関するインビトロおよびインビボ試験  
ヒトモノクローナル抗 CD3 抗体に関するインビボおよびインビトロ試験を、2014年  
3月27日に公開された米国特許公開第 2014 / 0088295 号および 2016 年 7  
月 29 日に出願された PCT / US 2016 / 044732 に記載のとおり実施した。

#### 【0346】

本発明のいくつかのヒトモノクローナル抗 CD3 抗体は、抗体捕捉フォーマットまたは抗原捕捉フォーマットのいずれかで、高い親和性で可溶性ヘテロ二量体 CD3 タンパク質に結合する。可溶性ヘテロ二量体 CD3 タンパク質（hCD3 - イプシロン / hCD3 - デルタ；配列番号 1900 / 1901）は、ヒト Fc タグ（hFc Adp / hFc；配列番号 1931 / 1932）またはマウス Fc タグ（mFc Adp / mFc；配列番号 1933 / 1934）のいずれかを用いて調製した。ヘテロ二量体 CD3 タンパク質は、Davisら（US 2010 / 0331527）に記載の方法を用いて精製した。

10

#### 【0347】

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

20

#### 【0348】

実施例 16：ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプル上の免疫組織化学（IHC）に適した抗 MUC16 モノクローナル抗体のスクリーニングおよび同定  
MUC16 発現の既知レベルでのヒト腫瘍細胞株が識別され、10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した。これらの系統を用いて種々の抗 MUC16 抗体をスクリーニングして IHC 試験の候補を同定した。

30

#### 【0349】

細胞株は、以下の MUC16 陰性細胞株を含んでいた。

HT29（結腸）、および PC3 / ATCC 親（前立腺）、低レベルから無レベルの MUC16 を有する肺臓細胞株、Capan1（肺臓腺癌）、HPAC（肺臓腺癌）。内因的に MUC16 を発現する細胞株は、OVCA43（卵巣）および PEO-1（漿液性卵巣癌）を含む。

40

#### 【0350】

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

50

(MUC16のCA125部分に類似)に結合する抗MUC16抗体との区別が可能になる。

### 【0351】

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

### 【表46】

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

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

NT—未テスト

### 【0352】

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

### 【0353】

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

10

20

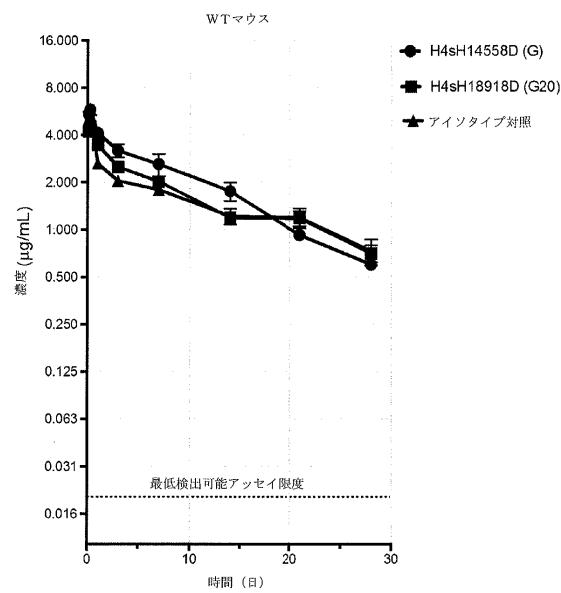
30

40

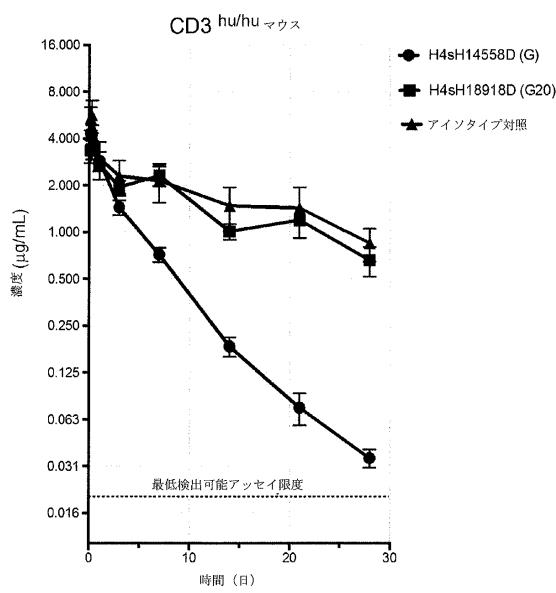
50

【図面】

【図 1】



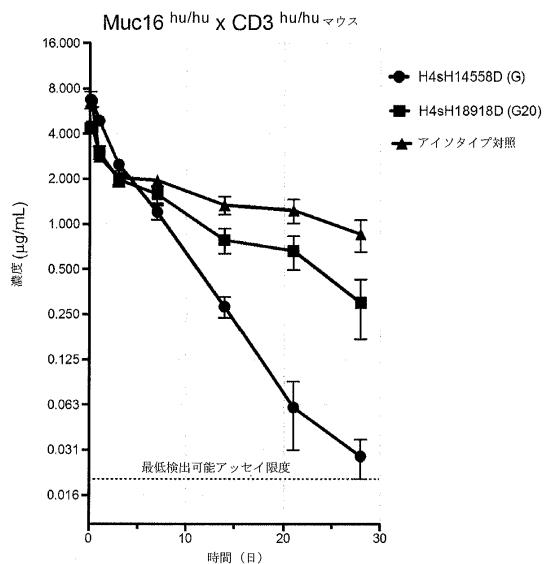
【図 2】



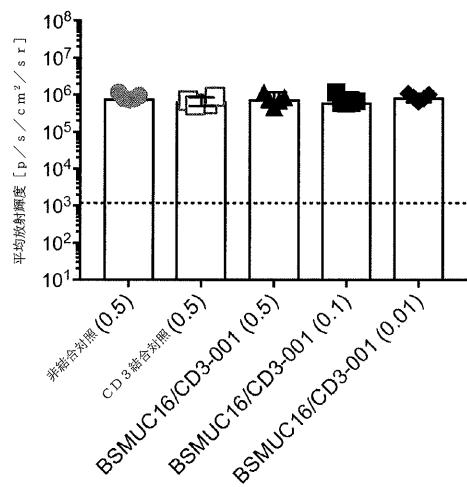
10

20

【図 3】



【図 4】

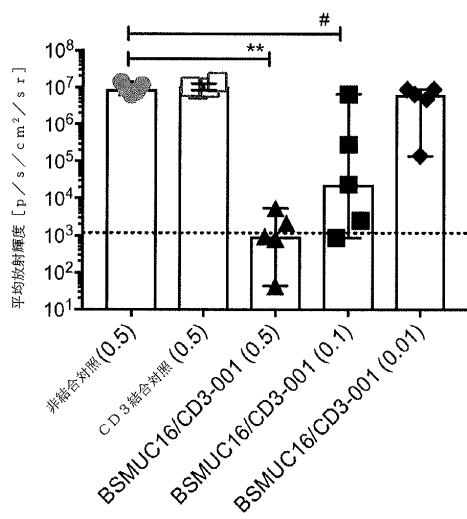


30

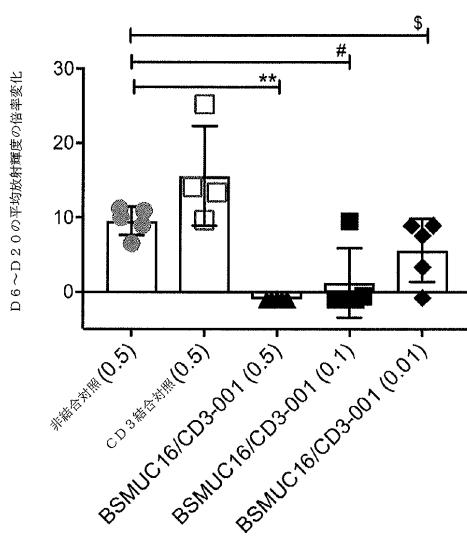
40

50

【図5】



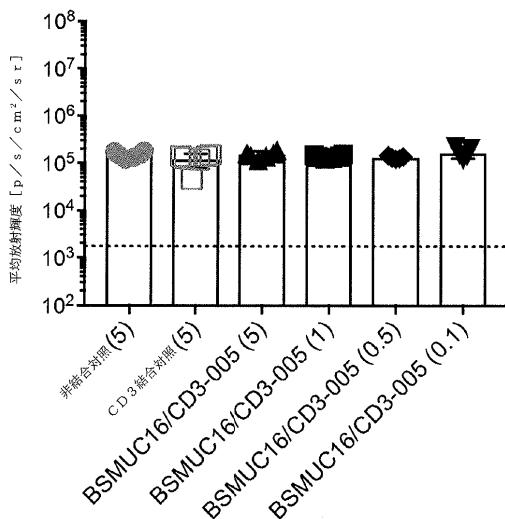
【図6】



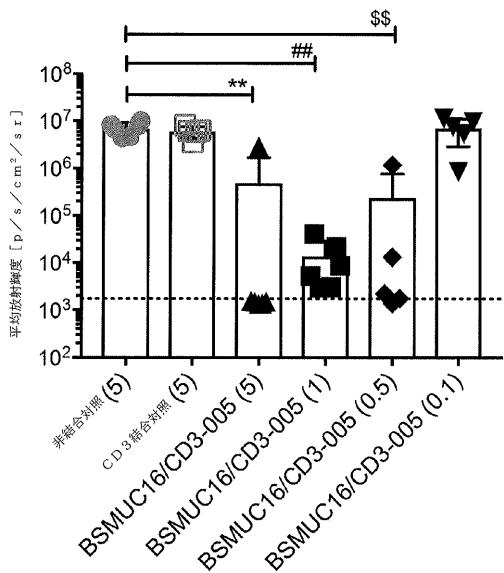
10

20

【図7】



【図8】

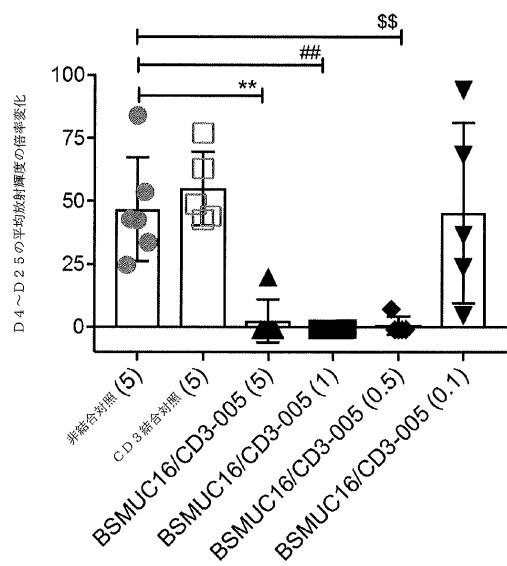


30

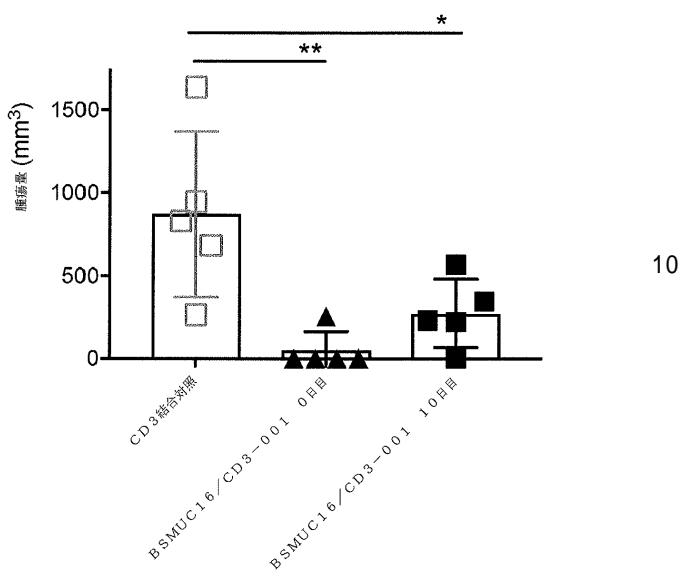
40

50

【図 9】

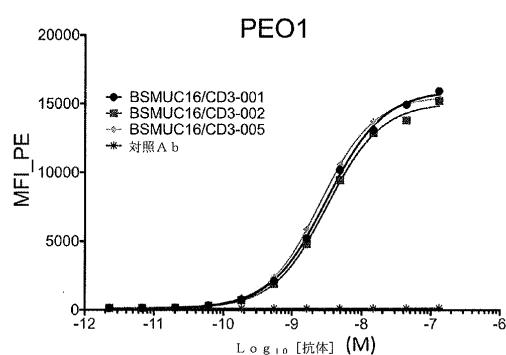


【図 10】

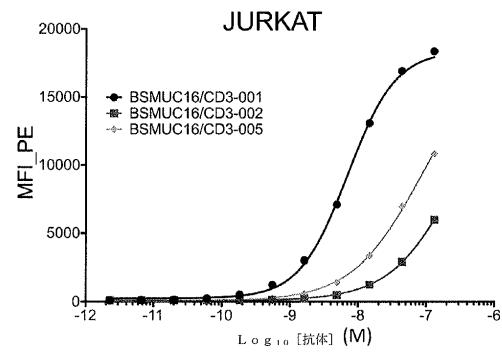


20

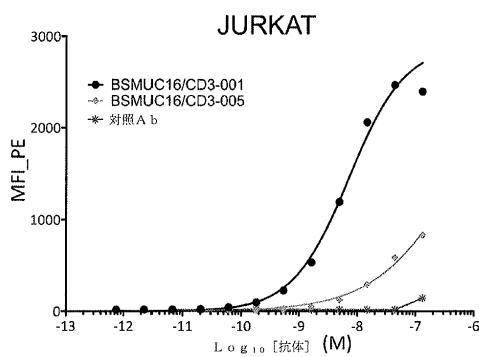
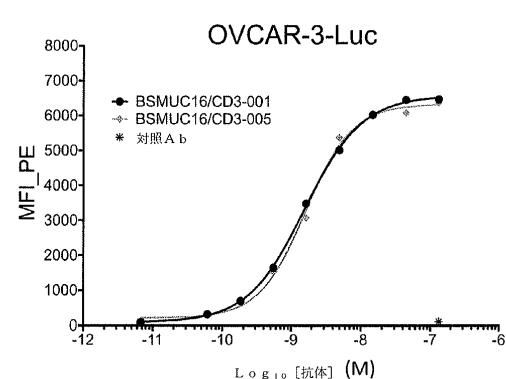
【図 11 A】



【図 11 B】



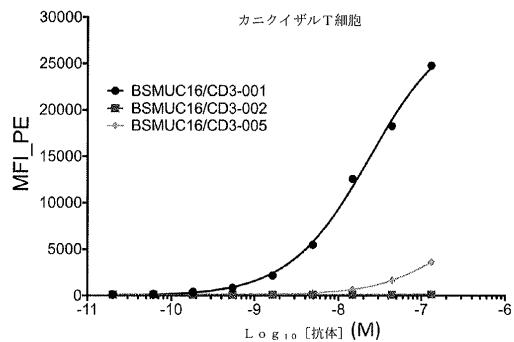
30



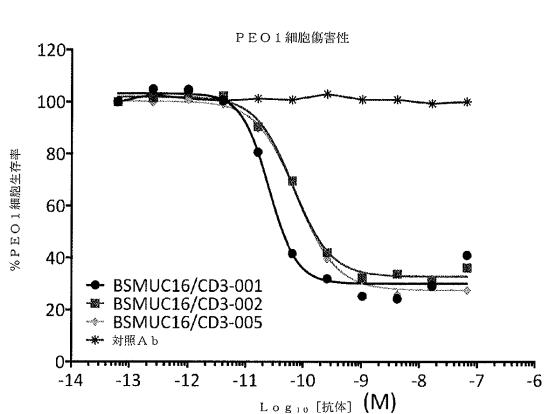
40

50

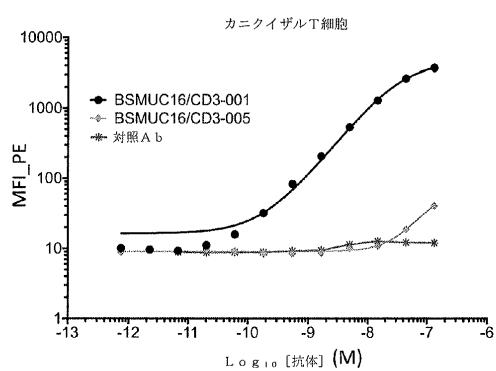
【図 1 1 C】



【図 1 2 A】

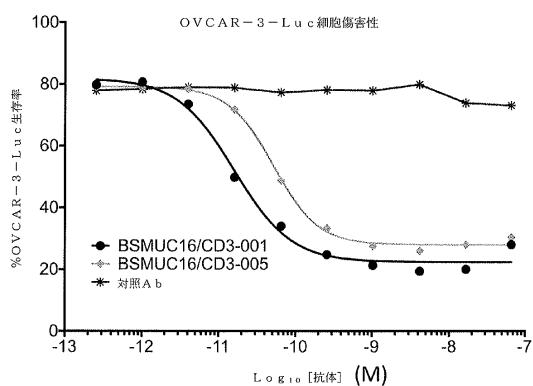


10



20

【図 1 2 B】



30

【配列表】

00070666900000001.app

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類 F I  
C 12 N 15/13 (2006.01) C 12 N 15/13

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)  
バーロード 777 . リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 エリック・スミス  
アメリカ合衆国ニューヨーク州 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 マーカス・ケリー  
アメリカ合衆国ニューヨーク州 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ジェシカ・アール・カーシュナー  
アメリカ合衆国ニューヨーク州 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 サンドラ・クツェー  
アメリカ合衆国ニューヨーク州 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 アリソン・クロフォード  
アメリカ合衆国ニューヨーク州 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 トーマス・ニトリ  
アメリカ合衆国ニューヨーク州 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

(72)発明者 ヤシュー・リウ  
アメリカ合衆国ニューヨーク州 10591 . タリータウン . オールドソーミルリバーロード 777  
. リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド

審査官 大瀧 真理  
(56)参考文献 国際公開第 2016 / 149368 (WO , A1 )  
特表 2013 - 529061 (JP , A )  
特表 2005 - 512057 (JP , A )  
米国特許出願公開第 2010 / 0015639 (US , A1 )  
FRIETZE, K. M. et al. , Identification of Anti-CA125 Antibody Responses in Ovarian Cancer Patients by a Novel Deep Sequence-Coupled Biopanning Platform , Cancer Immunology Research , 2015年11月20日 , Vol.4, No.2 , pp.157-164

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)  
G 01 N 33 / 48 - 33 / 98  
Caplus / REGISTRY / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)