

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-520642

(P2018-520642A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 82 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-557140 (P2017-557140)	(71) 出願人	509012625
(86) (22) 出願日	平成28年4月29日 (2016.4.29)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年12月19日 (2017.12.19)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/030127		ス サンフランシスコ ディーエヌエー
(87) 国際公開番号	W02016/179003		ウェイ 1
(87) 国際公開日	平成28年11月10日 (2016.11.10)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	62/155, 723		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成27年5月1日 (2015.5.1)	(72) 発明者	デニス, マーク エス.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
			80-4990, サウス サンフランシ
			スコ, ディーエヌエー ウェイ 1
		Fターム(参考)	4B064 AG27 CA01 CA02 CA10 CA19
			CC24 DA01
			4B065 AA26X AA90X AB01 BA02 CA25
			CA44
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マスク抗CD3抗体及びその使用方法

(57) 【要約】

本発明は、マスクしたCD3 (cluster of differentiation 3) (CDS) 抗体及びその使用方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗CD3 (cluster of differentiation 3) 抗体であって、前記抗CD3抗体が、(a)結合ドメインと、(b)ポリペプチドマスクと、を含み、前記ポリペプチドマスクが、配列番号1の少なくともアミノ酸残基1～3のアミノ酸配列を含むマスク部分(MM)を含む、前記抗CD3 (cluster of differentiation 3) (CD3) 抗体。

【請求項2】

前記結合ドメインが、重鎖可変(VH)ドメイン及び軽鎖可変(VL)ドメインを含み、前記ポリペプチドマスクが、前記VHドメインまたは前記VLドメインに連結されている、請求項1に記載の抗CD3抗体。

10

【請求項3】

前記MMが、配列番号1の残りの配列のすべてまたはその一部の長さ分C末端で伸長する、請求項1または2に記載の抗CD3抗体。

【請求項4】

前記MMが、配列番号1の少なくともアミノ酸残基1～5のアミノ酸配列を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項5】

前記MMが、配列番号1の少なくともアミノ酸残基1～6のアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の抗CD3抗体。

20

【請求項6】

前記抗CD3抗体及びMMが、(MM)－(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項7】

前記ポリペプチドマスクが、切断可能な部分(CM)をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項8】

前記CMが、酵素により切断することができる、請求項7に記載の抗CD3抗体。

【請求項9】

前記酵素が、マトリックス金属プロテアーゼ(MMP)－2、MMP－9、レグマインアスパラギニルエンドペプチダーゼ、トロンビン、線維芽細胞活性化プロテアーゼ(FAP)、MMP－1、MMP－3、MMP－7、MMP－8、MMP－12、MMP－13、MMP－14、膜型1マトリックス金属プロテアーゼ(MT1-MMP)、プラスミン、膜貫通プロテアーゼ、セリン(TMPPRS3/4)、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンF、カテプシンH、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンL2、カテプシンO、カテプシンS、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カスパーゼ14、ヒト好中球エラスターゼ、ウロキナーゼ/ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)、ジスインテグリン及び金属プロテアーゼ(ADAM)10、ADAM12、ADAM17、トロンボスポンジンモチーフを有するADAM(ADAMTS)、ADAMTS5、ベータセクレターゼ(BACE)、グランザイムA、グランザイムB、グアニジノベンゾエターゼ、ヘプシン、マトリプターゼ、マトリプターゼ2、メプリン、ネプリライシン、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍壊死因子変換酵素(TACE)、カリクレイン関連ペプチダーゼ(KLK)3、KLK5、KLK7、KLK11、C型肝炎ウイルスのNS3/4プロテアーゼ(HCV-NS3/4)、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)、カルパイン、カルパイン2、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼII、血漿カリクレイン、AMSH様プロテアーゼ、AMSH、γ-セクレターゼ成分、抗プラスミン切断酵素(APCE)、デシン1、アボトシス関連システイン

30

40

50

ペプチダーゼ、及びN-アセチル化アルファ結合酸性ジペプチダーゼ様1からなる群から選択される、請求項8に記載の抗CD3抗体。

【請求項10】

前記酵素が、MMP-2、MMP-9、レグマインアスパラギニルエンドペプチダーゼ、トロンビン、またはFAPである、請求項9に記載の抗CD3抗体。

【請求項11】

前記抗CD3抗体、MM、及びCMが、(MM)-(CM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる、請求項7～10のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項12】

前記ポリペプチドマスクが、リンカー部分(LM)をさらに含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項13】

前記LMが、5～24のアミノ酸長さである、請求項12に記載の抗CD3抗体。

【請求項14】

前記LMが、5～15のアミノ酸長さである、請求項13に記載の抗CD3抗体。

【請求項15】

前記LMが、グリシン(G)及びセリン(S)残基を含む、請求項12～14のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項16】

前記LMが、GS反復を含む、請求項15に記載の抗CD3抗体。

【請求項17】

前記抗CD3抗体、MM、及びLMが、(MM)-(LM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる、請求項12～16のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項18】

前記ポリペプチドマスクが、切断可能な部分及びリンカー部分を含み、前記抗CD3抗体、MM、CM、及びLMが、(MM)-(LM)-(CM)-(抗CD3抗体)または(MM)-(CM)-(LM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる、請求項7～17のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項19】

前記結合ドメインが、以下の6つの超可変領域(HVR)：

- (a) 配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (b) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (d) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (e) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び
- (f) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む、請求項1～18のいずれ

れか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項20】

前記結合ドメインが、(a) 配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、(b) 配列番号9のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または(c) (a)と同様のVHドメイン及び(b)と同様のVLドメインを含む、請求項19に記載の抗CD3抗体。

【請求項21】

前記VHドメインが、配列番号8のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の抗CD3抗体。

【請求項22】

前記VLドメインが、配列番号9のアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の抗CD3

10

20

30

40

50

抗体。

【請求項 2 3】

VHドメインが配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、前記 VLドメインが配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 2 4】

前記結合ドメインが、以下の 6 つの HVR :

(a) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む HVR-H 1、
 (b) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む HVR-H 2、
 (c) $X_1 X_2 Y S X_3 X_4 X_5 F D Y$ (式中、 X_1 が、D、T、及び S からなる群から選択され、 X_2 が、G、A、及び S からなる群から選択され、 X_3 が R または N であり、 X_4 が Y または A であり、 X_5 が Y または A である) のアミノ酸配列 (配列番号 1 2) を含む HVR-H 3、

10

(d) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む HVR-L 1、

(e) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む HVR-L 2、ならびに

(f) $X_1 X_2 S X_3 X_4 L R T$ (式中、 X_1 が K または T であり、 X_2 が Q または A であり、 X_3 が F または A であり、 X_4 が I または A である) のアミノ酸配列 (配列番号 1 5) を含む HVR-L 3、を含む、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 2 5】

前記結合ドメインが、以下の 6 つの HVR :

20

(a) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む HVR-H 1、

(b) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む HVR-H 2、

(c) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む HVR-H 3、

(d) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む HVR-L 1、

(e) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む HVR-L 2、ならびに

(f) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む HVR-L 3、を含む、請求項 2 4 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 2 6】

前記結合ドメインが、(a) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VHドメイン、(b) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む VLドメイン、または (c) (a) と同様の VHドメイン及び (b) と同様の VLドメイン、を含む、請求項 2 5 に記載の抗 CD 3 抗体。

30

【請求項 2 7】

前記 VHドメインが、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 2 8】

前記 VLドメインが、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 6 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 2 9】

VHドメインが配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含み、前記 VLドメインが配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 7 または 2 8 に記載の抗 CD 3 抗体。

40

【請求項 3 0】

前記結合ドメインが、以下の 6 つの HVR :

(a) 配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む HVR-H 1、

(b) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む HVR-H 2、

(c) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む HVR-H 3、

(d) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む HVR-L 1、

(e) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列を含む HVR-L 2、ならびに

(f) 配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を含む HVR-L 3、を含む、請求項 2 4 に記載

50

の抗CD3抗体。

【請求項31】

前記結合ドメインが、(a)配列番号107のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、(b)配列番号108のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または(c)(a)と同様のVHドメイン及び(b)と同様のVLドメイン、を含む、請求項30に記載の抗CD3抗体。

【請求項32】

前記VHドメインが、配列番号107のアミノ酸配列を含む、請求項31に記載の抗CD3抗体。

【請求項33】

前記VLドメインが、配列番号108のアミノ酸配列を含む、請求項31に記載の抗CD3抗体。

【請求項34】

VHドメインが配列番号107のアミノ酸配列を含み、前記VLドメインが配列番号108のアミノ酸配列を含む、請求項32または33に記載の抗CD3抗体。

【請求項35】

前記結合ドメインが、以下の6つのHVR：

- (a) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (b) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (d) 配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (e) 配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、ならびに
- (f) 配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む、請求項24に記載

の抗CD3抗体。

【請求項36】

前記結合ドメインが、(a)配列番号109のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、(b)配列番号110のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または(c)(a)と同様のVHドメイン及び(b)と同様のVLドメイン、を含む、請求項35に記載の抗CD3抗体。

【請求項37】

前記VHドメインが、配列番号109のアミノ酸配列を含む、請求項36に記載の抗CD3抗体。

【請求項38】

前記VLドメインが、配列番号110のアミノ酸配列を含む、請求項36に記載の抗CD3抗体。

【請求項39】

VHドメインが配列番号109のアミノ酸配列を含み、前記VLドメイン配列番号110のアミノ酸配列を含む、請求項37または38に記載の抗CD3抗体。

【請求項40】

前記結合ドメインが、以下の6つのHVR：

- (a) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (b) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (c) 配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (d) 配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (e) 配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、ならびに
- (f) 配列番号106のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む、請求項24に記載

の抗CD3抗体。

【請求項41】

前記結合ドメインが、(a) 配列番号 111 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H ドメイン、(b) 配列番号 112 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L ドメイン、または (c) (a) と同様の V H ドメイン及び (b) と同様の V L ドメイン、を含む、請求項 40 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 42】

前記 V H ドメインが、配列番号 111 のアミノ酸配列を含む、請求項 41 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 43】

前記 V L ドメインが、配列番号 112 のアミノ酸配列を含む、請求項 41 に記載の抗 C D 3 抗体。

10

【請求項 44】

V H ドメインが配列番号 111 のアミノ酸配列を含み、前記 V L ドメインが配列番号 112 のアミノ酸配列を含む、請求項 42 または 43 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 45】

前記ポリペプチドマスクが、前記抗 C D 3 抗体のヒト C D 3 ポリペプチドに結合する能力を少なくとも 10% 阻害する、請求項 1～44 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 46】

前記ポリペプチドマスクが、前記抗 C D 3 抗体のヒト C D 3 ポリペプチドに結合する能力を少なくとも 30% 阻害する、請求項 45 に記載の抗 C D 3 抗体。

20

【請求項 47】

前記ポリペプチドマスクが、前記抗 C D 3 抗体のヒト C D 3 ポリペプチドに結合する能力を少なくとも 60% 阻害する、請求項 46 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 48】

前記ポリペプチドマスクが、前記抗 C D 3 抗体のヒト C D 3 ポリペプチドに結合する能力を少なくとも 80% 阻害する、請求項 47 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 49】

前記ポリペプチドマスクが、前記抗 C D 3 抗体のヒト C D 3 ポリペプチドに結合する能力を少なくとも 90% 阻害する、請求項 48 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 50】

前記ヒト C D 3 ポリペプチドが、ヒト C D 3 ε ポリペプチドである、請求項 45～49 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 3 抗体。

30

【請求項 51】

前記抗 C D 3 抗体が、非グリコシル化部位突然変異を含む、請求項 1～50 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 52】

前記非グリコシル化部位突然変異が、置換突然変異である、請求項 51 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 53】

前記置換突然変異が、アミノ酸残基 N 297、L 234、L 235、及び／または D 265 (E U 番号付け) におけるものである、請求項 52 に記載の抗 C D 3 抗体。

40

【請求項 54】

前記置換突然変異が、N 297 G、N 297 A、L 234 A、L 235 A、及び D 265 A からなる群から選択される、請求項 53 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 55】

前記置換突然変異が、N 297 G 突然変異である、請求項 54 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 56】

前記非グリコシル化部位突然変異が、前記抗 C D 3 抗体のエフェクター機能を低下させる、請求項 55 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 57】

50

前記抗CD3抗体が、モノクローナル、ヒト、ヒト化、またはキメラである、請求項1～56のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項58】

前記抗CD3抗体が、CD3に結合する抗体断片である、請求項1～57のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項59】

前記抗体断片が、Fab、Fab'、Fab'-SH、(Fab')₂、Fv、scFv、TaFv、ダイアボディ、bsDb、scDb、DART、BiTE、及びV_HH断片からなる群から選択される、請求項58に記載の抗CD3抗体。

【請求項60】

前記抗CD3抗体が、完全長抗体である、請求項1～57のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項61】

前記抗CD3抗体が、IgG抗体である、請求項1～60のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項62】

前記抗CD3抗体が、単一特異性抗体である、請求項1～61のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項63】

前記抗CD3抗体が、多重特異性抗体である、請求項1～61のいずれか1項に記載の抗CD3抗体。

【請求項64】

前記多重特異性抗体が、二重特異性抗体である、請求項63に記載の抗CD3抗体。

【請求項65】

前記二重特異性抗体が、第2の生物学的分子に結合する第2の結合ドメインを含み、前記第2の生物学的分子が、細胞表面抗原である、請求項64に記載の抗CD3抗体。

【請求項66】

前記細胞表面抗原が、腫瘍抗原である、請求項65に記載の抗CD3抗体。

【請求項67】

前記腫瘍抗原が、CD20；FcRH5（Fc受容体様5）；HER2；LYPD1；Ly6G6D（リンパ球抗原6複合体、遺伝子座G61）；Ly6-D、MEGT1）；PMEL17（シルバーホモログ；SILV；D12S53E；PMEL17；（SI）；（SIL）；ME20；gp100）；Ly6E（リンパ球抗原6複合体、遺伝子座E；Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1）；CD19；CD33；CD22（B細胞受容体CD22-Bアイソフォーム）；CD79a（CD79A、CD79a、免疫グロブリン関連アルファ；BMPRI1B（骨形成タンパク質受容体IB型）；CD79b（CD79B、CD79β、1 Gb（免疫グロブリン関連ベータ）、B29）；EDAR（エクトジスプラシンA受容体）；GFRA1（GDNF-Ra1）；MRP4（多剤耐性タンパク質4）；RET；STEAP1（前立腺の6膜貫通上皮抗原）；TENB2（推定膜貫通プロテオグリカン）；E16（LAT1、SLC7A5）；0772P（CA125、MUC16）；MPF（MPF、MSLN、SMR、巨核球増強因子、メソテリン）；Nap13b（NAPI-3B、NPTI1b、SLC34A2、溶質キャリアファミリー34（リン酸ナトリウム）、メンバー2、II型ナトリウム依存性リン酸輸送体3b）；Sema5b；PSCA hlg（2700050C12Rik、C530008O16Rik、RIKEN cDNA 2700050C12、RIKEN cDNA 2700050C12遺伝子）；ETBR（エンドセリンB型受容体）；MSG783（RNFI24、仮想タンパク質FLJ20315）；STEAP2；TrpM4（BR22450、FLJ20041、TRPM4、TRPM4B、一過性受容体電位陽イオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4）；CRIPTO（CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、奇形腫由来成長因子）；CD21（CR2（補体受容

10

20

30

40

50

体 2) または C 3 D R (C 3 d / エプスタインバーウイルス受容体) または H s . 7 3 7 9 2) ; F c R H 2 (I F G P 4 、 I R T A 4 、 S P A P 1 A (S H 2 ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質 1 a) 、 S P A P 1 B 、 S P A P 1 C) ; N C A ; M D P ; I L 2 0 R α ; プレビカン ; E p h B 2 R ; A S L G 6 5 9 ; P S C A ; G E D A ; B A F F - R (B 細胞活性化因子受容体、 B L y S 受容体 3 、 B R 3) ; C X C R 5 (パーキットリンパ腫受容体 1 ; H L A - D O B (M H C クラス I I 分子のベータサブユニット) ; P 2 X 5 (プリン受容体 P 2 X リガンドゲート化イオンチャンネル 5 ; C D 7 2 (B 細胞分化因子 C D 7 2 、 L y b - 2) ; L Y 6 4 (リンパ球抗原 6 4 (R P 1 0 5) 、 ロイシンリッチ反復 (L R R) ファミリーの I 型膜タンパク質) ; F c R H 1 (F c 受容体様タンパク質 1) ; I R T A 2 (免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転座関連 2) 10 ; T M E F F 1 ; T M E M 4 6 (シガホモログ 2 (アフリカツメガエル) ; S H I S A 2) ; L G R 5 (ロイシンリッチ反復含有 G タンパク質共役受容体 5 ; G P R 4 9 、 G P R 6 7) ; L Y 6 K (リンパ球抗原 6 複合体、遺伝子座 K ; L Y 6 K ; H S J 0 0 1 3 4 8 ; F L J 3 5 2 2 6) ; G P R 1 9 (G タンパク質共役受容体 1 9 ; M m 4 7 8 7) ; G P R 5 4 (K I S S 1 受容体 ; K I S S 1 R ; G P R 5 4 ; H O T 7 T 1 7 5 ; A X O R 1 2) ; A S P H D 1 (アスパラギン酸ベーターヒドロキシラーゼドメイン含有 1 ; L O C 2 5 3 9 8 2) ; チロシナーゼ (T Y R ; O C A I A ; O C A 1 A ; チロシナーゼ ; S H E P 3) ; T M E M 1 1 8 (リングフィンガータンパク質、膜貫通 2 ; R N F T 2 ; F L J 1 4 6 2 7) ; G P R 1 7 2 A (G タンパク質共役受容体 1 7 2 A ; G P C R 4 1 ; F L J 1 1 8 5 6 ; D 1 5 E r t d 7 4 7 e) ; G P C 3 (グリピカン 3) ; C L L 1 20 (C 型レクチン様分子 1) ; B 7 - H 4 (B 7 x ; B 7 S 1) ; R N F 4 3 (リングフィンガータンパク質 4 3) ; C D 7 0 ; C X O R F 6 1 (染色体 X オープンリーディングフレーム 6 1) ; 及び S L C 5 3 D 3 、 かなる群から選択される、請求項 6 6 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 6 8】

前記腫瘍抗原が、 C D 2 0 、 F c R H 5 、 H E R 2 、 L Y P D 1 、 L Y 6 G 6 D 、 P M E L 1 7 、 L Y 6 E 、 C D 1 9 、 C D 3 3 、 C D 2 2 、 C D 7 9 A 、 C D 7 9 B 、 E D A R 、 G F R A 1 、 M R P 4 、 R E T 、 S t e a p 1 、 及び T e n B 2 かなる群から選択される、請求項 6 7 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 6 9】

前記腫瘍抗原が C D 2 0 であり、前記第 2 の結合ドメインが、 6 つの H V R :

- (a) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、
- (b) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、
- (c) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 、
- (d) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、
- (e) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、 及び

(f) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3 、 を含む、請求項 6 8 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 7 0】

前記結合ドメインが、 (a) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V H ドメイン、 (b) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む V L ドメイン、 または (c) (a) と同様の V H ドメイン及び (b) と同様の V L ドメイン、 を含む、請求項 6 9 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 7 1】

前記 V H ドメインが、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 0 に記載の抗 C D 3 抗体。

【請求項 7 2】

前記 V L ドメインが、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 0 に記載の抗 C D 3 抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 7 3】

VHドメインが配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含み、前記 VLドメインが配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む、請求項 7 1 または 7 2 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 7 4】

前記抗 CD 3 抗体が、1 つ以上の重鎖定常ドメインを含み、前記 1 つ以上の重鎖定常ドメインが、第 1 の CH 1 (CH 1₁) ドメイン、第 1 の CH 2 (CH 2₁) ドメイン、第 1 の CH 3 (CH 3₁) ドメイン、第 2 の CH 1 (CH 1₂) ドメイン、第 2 の CH 2 (CH 2₂) ドメイン、及び第 2 の CH 3 (CH 3₂) ドメインから選択される、請求項 1 ～ 7 3 のいずれか 1 項に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 7 5】

前記 1 つ以上の重鎖定常ドメインのうちの少なくとも 1 つが、別の重鎖定常ドメインと対になる、請求項 7 4 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 7 6】

前記 CH 3₁ 及び CH 3₂ ドメインが各々、突起または空隙を含み、前記 CH 3₁ ドメイン内の前記突起または空隙は、それぞれ、前記 CH 3₂ ドメイン内の前記空隙または突起中に位置付けることができる、請求項 7 5 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 7 7】

前記 CH 2₁ 及び CH 2₂ ドメインが各々、突起または空隙を含み、前記 CH 2₁ ドメイン内の前記突起または空隙は、それぞれ、前記 CH 2₂ ドメイン内の前記空隙または突起中に位置付けることができる、請求項 7 4 ～ 7 6 のいずれか 1 項に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 7 8】

前記 CH 2₁ 及び CH 2₂ ドメインが、前記突起と空隙との間の境界面において接触する、請求項 7 7 に記載の抗 CD 3 抗体。

【請求項 7 9】

請求項 1 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の抗 CD 3 抗体をコードする、単離核酸。

【請求項 8 0】

請求項 7 9 に記載の単離核酸を含む、ベクター。

【請求項 8 1】

請求項 8 0 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 8 2】

前記宿主細胞が、哺乳動物細胞である、請求項 8 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 3】

前記哺乳動物細胞が、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項 8 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 4】

前記宿主細胞が、原核細胞である、請求項 8 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 5】

前記原核細胞が、E. coli である、請求項 8 4 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 6】

培養培地中で請求項 8 1 に記載の宿主細胞を培養することを含む、請求項 1 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の抗 CD 3 抗体の産生方法。

【請求項 8 7】

前記方法が、前記宿主細胞または前記培養培地から前記抗 CD 3 抗体を回収することをさらに含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

請求項 1 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の抗 CD 3 抗体及び細胞傷害性薬剤を含む、免疫複合体。

【請求項 8 9】

請求項 1 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の抗 CD 3 抗体または請求項 8 8 に記載の免疫複

10

20

30

40

50

合体を含む、組成物。

【請求項 9 0】

薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、請求項 8 9 に記載の組成物。

【請求項 9 1】

前記組成物が、薬学的組成物である、請求項 9 0 に記載の組成物。

【請求項 9 2】

前記組成物が、さらなる治療剤をさらに含む、請求項 8 9 ～ 9 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9 3】

細胞増殖性障害または自己免疫性障害の前記進行の治療または遅延を必要とする対象における、治療方法または遅延方法であって、前記対象に請求項 1 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 3 抗体を投与することを含む、前記方法。

【請求項 9 4】

細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する対象における免疫機能の増強方法であって、前記対象に有効量の請求項 1 ～ 7 8 のいずれか 1 項に記載の抗 C D 3 抗体を投与することを含む、前記方法。

【請求項 9 5】

前記細胞増殖性障害が癌である、請求項 9 3 または 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記癌が、乳癌、膀胱癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（N H L）、B 細胞リンパ腫、B 細胞白血病、多発性骨髄腫、腎臓癌、前立腺癌、肝臓癌、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、及び膠芽腫からなる群から選択される、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記 B 細胞白血病が、慢性リンパ性白血病（C L L）である、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記自己免疫性障害が、リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス（S L E）、ウェグナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病（I T P）、血栓性血小板減少性紫斑病（T T P）、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、I g A 腎症、I g M 多発ニューロパチー、重症筋無力症、脈管炎、糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群、糸球体腎炎、視神経脊髄炎（N M O）、及び I g G ニューロパチーからなる群から選択される、請求項 9 3 または 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記抗 C D 3 抗体が、（a）免疫エフェクター細胞上に位置する C D 3 分子、及び（b）前記免疫エフェクター細胞以外の標的細胞上に位置する第 2 の生物学的分子に結合する、請求項 9 3 ～ 9 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記抗 C D 3 抗体が、前記 C D 3 分子より前に前記第 2 の生物学的分子に結合する、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記抗 C D 3 抗体が、前記標的細胞の表面上に蓄積する、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記抗 C D 3 抗体が、前記標的細胞への細胞傷害性効果及び／またはアポトーシス効果を提供することができる、請求項 9 3 ～ 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記標的細胞への前記細胞傷害性効果及び／または前記アポトーシス効果が、前記免疫エフェクター細胞の活性化と無関係である、請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

10

20

30

40

50

前記標的細胞への前記細胞傷害性効果及び／または前記アポトーシス効果が、前記免疫エフェクター細胞の活性化に依存している、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 105】

前記抗 CD3 抗体が、前記対象に、約 0.01 mg/kg ～ 約 30 mg/kg の投薬量で投与される、請求項 93 ～ 104 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 106】

前記抗 CD3 抗体が、前記対象に、約 0.1 mg/kg ～ 約 30 mg/kg の投薬量で投与される、請求項 105 に記載の方法。

【請求項 107】

前記抗 CD3 抗体が、前記対象に、約 1 mg/kg ～ 約 30 mg/kg の投薬量で投与される、請求項 106 に記載の方法。

【請求項 108】

前記対象に、PD-1 軸結合アンタゴニストまたは追加の治療剤を投与することをさらに含む、請求項 93 ～ 107 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 109】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニストまたは追加の治療剤が、前記抗 CD3 抗体の投与の前または後に投与される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニスト追加の治療剤が、前記抗 CD3 抗体と同時に投与される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 111】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、PD-1 結合アンタゴニスト、PD-L1 結合アンタゴニスト、及び PD-L2 結合アンタゴニストからなる群から選択される、請求項 108 ～ 110 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 112】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、PD-1 結合アンタゴニストである、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

前記 PD-1 結合アンタゴニストが、MDX-1106 (ニボルマブ)、MK-3475 (ランブロリズマブ)、CT-011 (ピジリズマブ)、及び AMP-224 からなる群から選択される、請求項 112 に記載の方法。

【請求項 114】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、PD-L1 結合アンタゴニストである、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 115】

前記 PD-L1 結合アンタゴニストが、YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105、及び MEDI4736 からなる群から選択される、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

前記 PD-1 軸結合アンタゴニストが、PD-L2 結合アンタゴニストである、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 117】

前記 PD-L2 結合アンタゴニストが、抗体またはイムノアドヘシンである、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

前記対象にグルココルチコイドを投与することをさらに含む、請求項 93 ～ 117 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 119】

前記グルココルチコイドが、デキサメタゾンである、請求項 118 に記載の方法。

【請求項 120】

10

20

30

40

50

前記対象にリツキシマブを投与することをさらに含む、請求項 93～119 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 121】

前記抗 CD3 抗体が、皮下、静脈内、筋肉内、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、埋め込み、吸入、くも膜内、膀胱内、または鼻腔内で投与される、請求項 93～120 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 122】

前記抗 CD3 抗体が、皮下投与される、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 123】

前記抗 CD3 抗体が、静脈内投与される、請求項 121 に記載の方法。

10

【請求項 124】

前記対象が、ヒトである、請求項 93～123 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 125】

(a) 請求項 89～92 のいずれか 1 項に記載の組成物と、

(b) 細胞増殖性障害または自己免疫障害の治療またはその進行の遅延のために、対象に、組成物を投与するための取扱説明書を含む添付文書と、を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表

20

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出された配列表を含み、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。2016 年 4 月 25 日に作成された該 A S C I I コピーは、50474-063WO2__Sequence__Listing__4__25__16__ST25 という名称であり、39,917 バイトのサイズである。

【0002】

本発明は、マスク抗 CD3 (cluster of differentiation 3) 抗体及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0003】

癌等の細胞増殖性障害は、細胞亜集団の制御されていない成長を特徴とする。これらは先進国における死因の第 1 位、及び発展途上国における死因の第 2 位であり、毎年 1200 万人超が新たに癌と診断され、700 万人が癌で死亡している。米国癌協会は、2015 年には 50 万人を超えるアメリカ人が癌によって死亡すると推定しており、これは、ほぼ米国の死亡 4 例中 1 例の割合を占める。癌の発症確率は 70 歳を過ぎると 2 倍以上高くなるため、高齢者人口が増加するにつれて、癌の発生数も同時に上昇している。このため、癌治療は、著しくかつ増え続ける社会的負担を意味する。

30

【0004】

癌治療への長期間にわたるアプローチには、化学療法、放射線療法、固形腫瘍を除去する手術が含まれる。最近では、T 細胞を標的とする治療抗体が開発されている。これらの治療抗体は、T 細胞及び腫瘍細胞上に細胞表面抗原を同時に結合することができる二重特異性抗体を含み、それによって結合した T 細胞が腫瘍細胞の破壊に寄与することが可能である。しかしながら、そのような T 細胞依存性二重特異性 (TDB) 抗体の開発は、免疫介在性副作用という開発につきものの固有のリスクを伴い得る。ある望ましくない効果、たとえば Fcγ 受容体の媒介による T 細胞の枯渇は、エフェクターを有しない TDB 抗体を表示することによって最小限に抑えられ得るが、T 細胞の結合及び活性化のキネティクも解決する代替の TDB 抗体の開発分野において、ニーズは満たされていない。

40

【発明の概要】

【0005】

本発明は、マスク CD3 (cluster of differentiation 3) 抗体及びその使用方法に関する。

50

【0006】

一態様では、本発明は、抗CD3 (cluster of differentiation 3) 抗体を特徴とし、抗CD3抗体は、(a) 結合ドメイン及び(b) ポリペプチドマスクを含み、ポリペプチドマスクは、配列番号1の少なくともアミノ酸残基1-3のアミノ酸配列を含むマスキング部分(MM)を含む(例えば、配列番号1のアミノ酸残基1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8、1-9、1-10、1-11、1-12、1-13、1-14、1-15、1-16、1-17、1-18、1-19、1-20、1-21、1-22、1-23、1-24、1-25、1-26、または1-27を含むMMを含むポリペプチドマスク)、またはそのN末端の環化グルタミン誘導体(例えば、5-オキソピロリジン-2-カルボン酸(PCA)を含むMMを含むポリペプチドマスク)。例えば、いくつかの実施形態では、MMは、1位の残基が、グルタミン残基の代わりにN末端環化グルタミン(PCA)残基であることを除いて、配列番号1の少なくとも初めの3つのアミノ酸残基を含む(例えば、MMは、アミノ酸配列PCA-D-Gを含む)。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、重鎖可変(VH)ドメイン及び軽鎖可変(VL)ドメインを含み、ポリペプチドマスクが、VHドメインまたはVLドメインに連結されている。いくつかの実施形態では、MMは、C末端で配列番号1の残りの配列のすべてまたはその一部の長さ分伸長する。例えば、いくつかの実施形態では、MMは、配列番号1の少なくともアミノ酸残基1-5のアミノ酸配列、またはそのN末端環化グルタミン誘導体を含む(例えば、1位の残基が、グルタミンの代わりにPCAであることを除いて、配列番号1の少なくとも初めの5つのアミノ酸残基を含むMMを含むポリペプチドマスク)。他の実施形態では、MMは、配列番号1の少なくともアミノ酸残基1-6のアミノ酸配列、またはそのN末端環化グルタミン誘導体を含む(例えば、1位の残基が、グルタミンの代わりにPCAであることを除いて、配列番号1の少なくとも初めの6つのアミノ酸残基を含むMMを含むポリペプチドマスク)。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体及びMMは、(MM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる。

【0007】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドマスクは、切断可能な部分(CM)をさらに含む。いくつかの実施形態では、CMは、酵素によって切断することができる。いくつかの実施形態では、酵素は、マトリックス金属プロテアーゼ(MMP)-2、MMP-9、レグマインアスパラギニルエンドペプチダーゼ、トロンビン、線維芽細胞活性化プロテアーゼ(FAP)、MMP-1、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-12、MMP-13、MMP-14、膜型1マトリックス金属プロテアーゼ(MT1-MMP)、プラスミン、膜貫通プロテアーゼ、セリン(TMPPSS-3/4)、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンF、カテプシンH、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンL2、カテプシンO、カテプシンS、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ11、カスパーゼ12、カスパーゼ13、カスパーゼ14、ヒト好中球エラスターゼ、ウロキナーゼ/ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)、ジスインテグリン及び金属プロテアーゼ(ADAM)10、ADAM12、ADAM17、トロンボスポンジンモチーフを有するADAM(ADAMTS)、ADAMTS5、ベータセクレターゼ(BACE)、グランザイムA、グランザイムB、グアニジノベンゾエターゼ、ヘプシン、マトリプターゼ、マトリプターゼ2、メプリン、ネプリライシン、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍壊死因子変換酵素(TACE)、カリクレイン関連ペプチダーゼ(KLK)3、KLK5、KLK7、KLK11、C型肝炎ウイルスのNS3/4プロテアーゼ(HCV-NS3/4)、組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)、カルパイン、カルパイン2、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼII、血漿カリクレイン、AMSH様プロテアーゼ、AMSH、γ-セクレターゼ成分、抗プラスミン切断酵素(APCE)、デシン1、アポトーシス関連システインペプチダーゼ、及びN-アセチル化アルファ結合酸性ジペプチダーゼ様1からな

る群から選択される。例えば、いくつかの実施形態では、酵素は、MMP-2、MMP-9、レグマインアスパラギニルエンドペプチダーゼ、トロンビン、またはFAPである。いくつかの実施形態では、CMは、酸に不安定なリンカーを含み、酸性pH環境において切断することが可能である。いくつかの実施形態では、酸に不安定なリンカーは、ヒドラゾン、イミノ、エステル、またはアミド基を含む。いくつかの実施形態では、酸性pH環境は、細胞のリソソームにおいて見出される。別の実施形態では、酸性pH環境は、腫瘍微環境において見出される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、MM、及びCMは、(MM)-(CM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる。

【0008】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドマスクは、リンカー部分(LM)をさらに含む。いくつかの実施形態では、LMは、5~24のアミノ酸長さである(例えば、LMは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24のアミノ酸長さである)。いくつかの実施形態では、LMは、5~15のアミノ酸長さである(例えば、LMは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のアミノ酸長さである)。いくつかの実施形態では、LMは、グリシン(G)及びセリン(S)残基を含む。いくつかの実施形態では、LMは、GS反復を含む。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体、MM、及びLMは、(MM)-(LM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドマスクは、切断可能な部分及びリンカー部分を含み、抗CD3抗体、MM、CM、及びLMは、(MM)-(LM)-(CM)-(抗CD3抗体)または(MM)-(CM)-(LM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、互いに対して位置付けられる。

【0009】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、以下の6つの超可変領域(HVR)：(a)配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c)配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d)配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f)配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3、のうちの1つ以上(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ)を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、(a)配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変(VH)ドメイン、(b)配列番号9のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変(VL)ドメイン、または(c)(a)と同様のVHドメイン及び(b)と同様のVLドメインを含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VLドメインは、配列番号9のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは配列番号8のアミノ酸配列を含み、VLドメインは配列番号9のアミノ酸配列を含む。

【0010】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、以下の6つの超可変領域(HVR)：(a)配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b)配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) $X_1X_2YSX_3X_4X_5FDY$ (式中、 X_1 が、D、T、及びSからなる群から選択され、 X_2 が、G、A、及びSからなる群から選択され、 X_3 が、RまたはNであり、 X_4 が、YまたはAであり、 X_5 が、YまたはAである)のアミノ酸配列(配列番号12)を含むHVR-H3、(d)配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e)配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f) $X_1X_2SX_3X_4LRT$ (式中、 X_1 が、KまたはTであり、 X_2 が、QまたはAであり、 X_3 が、FまたはAであり、 X_4 が、IまたはAである)のアミノ酸配列(配列番号15)を含むHVR-L3、のうちの1つ以上(例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ)を含む。例えば、いくつかの実施形態では、結合ドメインは、以下の6つの

10

20

30

40

50

HVR：（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、（a）配列番号18のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、（b）配列番号19のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または（c）（a）と同様のVHドメイン及び（b）と同様のVLドメイン、を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号18のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VLドメインは、配列番号19のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号18のアミノ酸配列を含み、VLドメインは、配列番号19のアミノ酸配列を含む。

10

【0011】

他の実施形態では、結合ドメインは、以下の6つのHVR：（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR-L3、のうちの1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ）を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、（a）配列番号107のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、（b）配列番号108のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または（c）（a）と同様のVHドメイン及び（b）と同様のVLドメイン、を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号107のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VLドメインは、配列番号108のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号107のアミノ酸配列を含み、VLドメインは、配列番号108のアミノ酸配列を含む。

20

【0012】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、以下の6つのHVR：（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号105のアミノ酸配列を含むHVR-L3、のうちの1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ）を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、（a）配列番号109のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、（b）配列番号110のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または（c）（a）と同様のVHドメイン及び（b）と同様のVLドメイン、を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号109のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VLドメインは、配列番号110のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号109のアミノ酸配列を含み、VLドメインは、配列番号110のアミノ酸配列を含む。

30

40

【0013】

他の実施形態では、結合ドメインは、以下の6つのHVR：（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号106のアミノ酸配列を含むHVR-L3、のうちの1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ）を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、（a）配列番号111のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性

50

を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、(b)配列番号112のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または(c)(a)と同様のVHドメイン及び(b)と同様のVLドメイン、を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号111のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VLドメインは、配列番号112のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号111のアミノ酸配列を含み、VLドメインは、配列番号112のアミノ酸配列を含む。

【0014】

さらなる抗CD3抗体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、U. S. S. N. 14/574, 132 (米国公開第2015-0166661号)に開示される抗CD3結合ドメイン、及び前述のさらなる特性(例えば、MM、CM、LM)のうちのいずれかを有するポリペプチドマスクを含む。例えば、マスク抗CD3抗体は、参照される抗CD3抗体のうちのいずれかにあるようなHVRを含み得、例えば、MM、CM、及び/またはLMを含むポリペプチドマスクに加えて、参照されるアクセプターフレームワーク領域(FR)のうちのいずれかをさらに含む。いくつかの実施形態では、マスク抗CD3抗体は、参照される抗CD3抗体のうちのいずれかにあるようなVHドメイン及び/またはVLドメインを含み得、例えば、MM、CM、及び/またはLMを含むポリペプチドマスクをさらに含む。例えば、マスク抗CD3抗体は、抗CD3抗体SP34 (Pessano et al. The EMBO Journal. 4:337-344, 1985)と、例えば、MM、CM、及び/またはLMを有するポリペプチドマスクとを含み得る。

【0015】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドマスクは、抗CD3抗体のヒトCD3ポリペプチドに結合する能力を少なくとも10%(例えば、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、もしくは29%)、少なくとも30%(例えば、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、もしくは59%)、少なくとも60%(例えば、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、もしくは79%)、少なくとも80%(例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、もしくは89%)、または少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%)阻害する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドマスクは、抗CD3抗体のヒトCD3ポリペプチドに結合する能力を完全に阻害する(すなわち、100%の阻害)。いくつかの実施形態では、ヒトCD3ポリペプチドは、ヒトCD3εポリペプチドである。

【0016】

いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、非グリコシル化部位突然変異を含む。いくつかの実施形態では、非グリコシル化部位突然変異は、置換突然変異である。いくつかの実施形態では、置換突然変異は、アミノ酸残基N297、L234、L235、及び/またはD265(EU番号付け)におけるものである。いくつかの実施形態では、置換突然変異は、N297G、N297A、L234A、L235A、及びD265Aからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、置換突然変異は、N297G突然変異である。いくつかの実施形態では、非グリコシル化部位突然変異は、抗CD3抗体のエフェクター機能を低下させる。

【0017】

いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、モノクローナル、ヒト、ヒト化、またはキメラである。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、CD3に結合する抗体断片であ

る。いくつかの実施形態では、抗体断片は、F a b、F a b'、F a b' - S H、F v、s c F v、T a F v、(F a b')₂、ダイアボディ、b s D b、s c D b、D A R T、B i T E、及びV_HH断片からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、抗C D 3抗体は、完全長抗体である。いくつかの実施形態では、抗C D 3抗体は、I g G抗体である。いくつかの実施形態では、抗C D 3抗体は、単一特異性抗体である。

【0018】

他の実施形態では、抗C D 3抗体は、多重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、第2の生物学的分子に結合する第2の結合ドメインを含み、該第2の生物学的分子は、細胞表面抗原である。いくつかの実施形態では、細胞表面抗原は、腫瘍抗原である。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、C D 2 0；F c R H 5（F c受容体様5）；H E R 2；L Y P D 1；L y 6 G 6 D（リンパ球抗原6複合体、遺伝子座G 6 1）；L y 6 - D、M E G T 1）；P M E L 1 7（シルバーホモログ；S I L V；D 1 2 S 5 3 E；P M E L 1 7；（S I）；（S I L）；M E 2 0；g p 1 0 0）；L y 6 E（リンパ球抗原6複合体、遺伝子座E；L y 6 7、R I G - E、S C A - 2、T S A - 1）；C D 1 9；C D 3 3；C D 2 2（B細胞受容体C D 2 2 - Bアイソフォームアイソフォーム）；C D 7 9 a（C D 7 9 A、C D 7 9 a、免疫グロブリン関連アルファ；B M P R 1 B（骨形成タンパク質受容体I B型）；C D 7 9 b（C D 7 9 B、C D 7 9 β、1 G b（免疫グロブリン関連ベータ）、B 2 9）；E D A R（エクトジスプラシンA受容体）；G F R A 1（G D N F - R a 1）；M R P 4（多剤耐性タンパク質4）；R E T；S T E A P 1（前立腺の6膜貫通上皮抗原）；T E N B 2（推定膜貫通プロテオグリカン）；E 1 6（L A T 1、S L C 7 A 5）；O 7 7 2 P（C A 1 2 5、M U C 1 6）；M P F（M P F、M S L N、S M R、巨核球増強因子、メソテリン）；N a p i 3 b（N A P I - 3 B、N P T I I b、S L C 3 4 A 2、溶質キャリアファミリー3 4（リン酸ナトリウム）、メンバー2、I I型ナトリウム依存性リン酸輸送体3 b）；S e m a 5 b；P S C A h l g（2 7 0 0 0 5 0 C 1 2 R i k、C 5 3 0 0 0 8 O 1 6 R i k、R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2、R I K E N c D N A 2 7 0 0 0 5 0 C 1 2遺伝子）；E T B R（エンドセリンB型受容体）；M S G 7 8 3（R N F 1 2 4、仮想タンパク質F L J 2 0 3 1 5）；S T E A P 2；T r p M 4（B R 2 2 4 5 0、F L J 2 0 0 4 1、T R P M 4、T R P M 4 B、一過性受容体電位陽イオンチャネル、サブファミリーM、メンバー4）；C R I P T O（C R、C R 1、C R G F、C R I P T O、T D G F 1、奇形腫由来成長因子）；C D 2 1（C R 2（補体受容体2）またはC 3 D R（C 3 d／エプスタインバーウイルス受容体）またはH s. 7 3 7 9 2）；F c R H 2（I F G P 4、I R T A 4、S P A P 1 A（S H 2ドメイン含有ホスファターゼアンカータンパク質1 a）、S P A P 1 B、S P A P 1 C）；N C A；M D P；I L 2 0 R α；プレビカン；E p h B 2 R；A S L G 6 5 9；P S C A；G E D A；B A F F - R（B細胞活性化因子受容体、B L y S受容体3、B R 3）；C X C R 5（パーキットリンパ腫受容体1；H L A - D O B（M H CクラスII分子のベータサブユニット）；P 2 X 5（プリン受容体P 2 Xリガンドゲート化イオンチャネル5；C D 7 2（B細胞分化抗原C D 7 2、L y b - 2）；L Y 6 4（リンパ球抗原6 4（R P 1 0 5）、ロイシンリッチ反復（L R R）ファミリーのI型膜タンパク質）；F c R H 1（F c受容体様タンパク質1）；I R T A 2（免疫グロブリンスーパーファミリー受容体転座関連2）；T M E F F 1；T M E M 4 6（シガホモログ2（アフリカツメガエル）；S H I S A 2）；L G R 5（ロイシンリッチ反復含有Gタンパク質共役受容体5；G P R 4 9、G P R 6 7）；L Y 6 K（リンパ球抗原6複合体、遺伝子座K；L Y 6 K；H S J 0 0 1 3 4 8；F L J 3 5 2 2 6）；G P R 1 9（Gタンパク質共役受容体1 9；M m 4 7 8 7）；G P R 5 4（K I S S 1受容体；K I S S 1 R；G P R 5 4；H O T 7 T 1 7 5；A X O R 1 2）；A S P H D 1（アスパラギン酸ベーターヒドロキシラーゼドメイン含有1；L O C 2 5 3 9 8 2）；チロシナーゼ（T Y R；O C A I A；O C A 1 A；チロシナーゼ；S H E P 3）；T M E M 1 1 8（リングフィンガータンパク質、膜貫通2；R N F T 2；F L J 1 4 6 2 7）；G P R 1 7 2 A（Gタンパク質共役

受容体 172A; GPCR41; FLJ11856; D15Ert d747e); GPC3 (グリピカン3); CLL1 (C型レクチン様分子1); B7-H4 (B7x; B7S1); RNF43 (リングフィンガータンパク質43); CD70; CXORF61 (染色体Xオープンリーディングフレーム61); 及びSLC53D3、からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原は、CD20、FcRH5、HER2、LYPD1、LY6G6D、PMEL17、LY6E、CD19、CD33、CD22、CD79A、CD79B、EDAR、GFRA1、MRP4、RET、Steap1、及びTenB2からなる群から選択される。

【0019】

腫瘍抗原がCD20であるいくつかの実施形態では、第2の結合ドメインは、以下の6つのHVR: (a) 配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) 配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) 配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d) 配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e) 配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f) 配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む。いくつかの実施形態では、結合ドメインは、(a) 配列番号26のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖可変(VH)ドメイン、(b) 配列番号27のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変(VL)ドメイン、または(c) (a)と同様のVHドメイン及び(b)と同様のVLドメインを含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号26のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VLドメインは、配列番号27のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、VHドメインは、配列番号26のアミノ酸配列を含み、VLドメインは、配列番号27のアミノ酸配列を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、1つ以上の重鎖定常ドメインを含み、該1つ以上の重鎖定常ドメインは、第1のCH1(CH1₁)ドメイン、第1のCH2(CH2₁)ドメイン、第1のCH3(CH3₁)ドメイン、第2のCH1(CH1₂)ドメイン、第2のCH2(CH2₂)ドメイン、及び第2のCH3(CH3₂)ドメインから選択される。いくつかの実施形態では、1つ以上の重鎖定常ドメインのうちの少なくとも1つは、別の重鎖定常ドメインと対を作る。いくつかの実施形態では、CH3₁及びCH3₂ドメインは各々、突起または空隙を含み、CH3₁ドメイン内の該突起または空隙は、それぞれ、CH3₂ドメイン内の空隙または突起中に位置付けることができる。いくつかの実施形態では、CH2₁及びCH2₂ドメインは各々、突起または空隙を含み、CH2₁ドメイン内の該突起または空隙は、それぞれ、CH2₂ドメイン内の空隙または突起中に位置付けることができる。いくつかの実施形態では、CH2₁及びCH2₂ドメインは、該突起と空隙との間の境界面において接触する。

【0021】

別の態様では、本発明は、本明細書に開示される抗CD3抗体のうちのいずれかをコードする単離核酸を特徴とする。核酸は、抗体を発現させるためのベクター(例えば、発現ベクター)に含まれ得る。

【0022】

別の態様では、本発明は、前述の核酸及び/またはベクターを含む宿主細胞を特徴とする。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞)である。他の実施形態では、宿主細胞は、原核細胞(例えば、E. coli細胞)である。抗CD3抗体を産生する宿主細胞を培養することを含む、前述の抗CD3抗のうちのいずれか1つの産生方法もまた、提供される。いくつかの実施形態では、本方法は、宿主細胞または培養培地から抗CD3抗体を回収することをさらに含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、本発明は、細胞傷害性薬剤に複合体化される前述の抗CD3抗体のうちのいずれか1つを含む免疫複合体を特徴とする。

【0024】

前述の抗CD3抗体のうちのいずれか1つまたは免疫複合体を含む組成物も提供される。一部の実施形態では、本組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む。一部の実施形態では、本組成物は、薬学的組成物である。いくつかの実施形態では、本組成物は、追加の治療剤をさらに含む。

【0025】

本発明のさらなる態様は、細胞増殖性障害または自己免疫性障害の進行の治療または遅延を必要とする対象における、治療方法または遅延方法であって、本方法は、対象に、有効量の前述の抗CD3抗体のうちのいずれか1つを投与することを含む。別の態様では、本発明は、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する対象における免疫機能の増強方法 10
を特徴とし、本方法は、対象に、前述の抗CD3抗体のうちのいずれか1つを投与することを含む。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、(a)免疫エフェクター細胞上に位置するCD3分子、及び(b)免疫エフェクター細胞以外の標的細胞上に位置する第2の生物学的分子に結合する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、CD3分子より前に第2の生物学的分子に結合する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、例えば、免疫エフェクター細胞上に位置するCD3分子に対する抗CD3抗体の結合定数(K_a)の低下のため、標的細胞の表面で蓄積する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、(例えば、活性化された免疫エフェクター細胞を介して)標的細胞への細胞傷害性効果を提供することができる。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、(例えば、活性化された免疫エフェクター細胞を介して)標的細胞へのアポトーシス効果を提供すること 20
ができる。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、標的細胞への細胞傷害性効果及び／またはアポトーシス効果を提供することができる。いくつかの実施形態では、標的細胞への細胞傷害性効果及び／またはアポトーシス効果は、免疫エフェクター細胞の活性化と無関係である。他の実施形態では、標的細胞への細胞傷害性効果及び／またはアポトーシス効果は、免疫エフェクター細胞の活性化に依存している。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、対象に、約0.01mg/kg～約30mg/kgの投薬量で投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、対象に、約0.1mg/kg～約30mg/kgの投薬量で投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、対象に、約1mg/kg～約30mg/kgの投薬量で投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、皮下、静脈内、筋肉内、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、埋め込み、吸入 30
、くも膜内、膀胱内、または鼻腔内で投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、皮下投与される。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体は、静脈内投与される。

【0026】

いくつかの実施形態では、本方法は、対象にPD-1軸結合アンタゴニストまたは追加の治療剤を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、抗CD3抗体の投与の前または後に投与される。いくつかの実施形態では、追加の治療剤は、抗CD3抗体と同時に投与される。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト、及びPD-L2結合アンタゴニストからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、PD 40
-1軸結合アンタゴニストは、MDX-1106(ニボルマブ)、MK-3475(ランプロリズマブ)、CT-011(ピジリズマブ)、及びAMP-224からなる群から選択される。他の実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-L1結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、YW243、55、S70、MPDL3280A、MDX-1105、及びMED14736からなる群から選択される。他の実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-L2結合アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、PD-L2結合アンタゴニストは、抗体またはイムノアドヘシンである。

【0027】

いくつかの実施形態では、本方法は、対象にグルココルチコイドを投与することをさら 50

に含む。いくつかの実施形態では、グルココルチコイドは、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、トリアムシノロン、パラメタゾン、ベタメタゾン、フルドロコルチゾン、ならびにそれらの薬学的に許容されるエステル、塩、及び複合体からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、グルココルチコイドは、デキサメタゾンである。いくつかの実施形態では、グルココルチコイドは、デキサメタゾンの薬学的に許容されるエステル、塩、または複合体である。

【0028】

いくつかの実施形態では、本方法は、対象にリツキシマブを投与することをさらに含む。

10

【0029】

前述の方法のうちのいずれかでは、細胞増殖性障害は癌であり得る。いくつかの実施形態では、癌は、乳癌、膀胱癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、B細胞リンパ腫、B細胞白血病、多発性骨髄腫、腎臓癌、前立腺癌、肝臓癌、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、及び膠芽腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、B細胞白血病は、慢性リンパ性白血病（CLL）である。

【0030】

前述の方法のうちのいずれかでは、自己免疫性障害は、リウマチ性関節炎、若年性リウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス（SLE）、ウェグナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、IgA腎症、IgM多発ニューロパチー、重症筋無力症、脈管炎、糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群、糸球体腎炎、視神経脊髄炎（NMO）、及びIgGニューロパチーからなる群から選択され得る。

20

【0031】

別の態様では、本発明は、（a）前述の抗CD3抗体のうちのいずれか1つを含む組成物、及び（b）細胞増殖性障害の治療またはその進行の遅延のために、対象に、組成物を投与するための取扱説明書を含む添付文書と、を含む、キットを特徴とする。

【0032】

前述の方法のうちのいずれかでは、対象は、ヒトであり得る。

【図面の簡単な説明】

30

【0033】

【図1A】ファージELISAによって評価される、トロンビンによる切断の前またはその後、CD3 ϵ ¹⁻²⁷-Fc（CD3 ϵ -Fc）に対して指示された切断可能な部分（CM）を含有するマスク抗CD3 SP34変異体の相対的結合を示すグラフである。マスクSP34変異体は、トロンビン切断部位を含む介在するCMを介して、SP34の重鎖可変（VH）領域のN末端に結合される、可変長さ（ヒトCD3 ϵ の初めから3個から初めから15個のアミノ酸残基の範囲に及ぶ）のN末端のCD3 ϵ ペプチドを含むマスキング部分（MM）を有するポリペプチドマスクを含んだ。測定した結合シグナルは、SP34の軽鎖のC末端上にディスプレイされたgDタグに結合することによって評価される、ディスプレイのために規格化された。

40

【図1B】ファージELISAによって評価される、トロンビンによる切断の前またはその後、CD3 ϵ -Fcに対して指示されたCMを含有するマスク抗CD3 SP34変異体の相対的結合を示すグラフである。マスクSP34変異体は、トロンビン切断部位を含む介在するCMを介して、SP34の軽鎖可変（VL）領域のN末端に結合される、可変長さ（ヒトCD3 ϵ の初めから7個から初めから27個のアミノ酸残基の範囲に及ぶ）のN末端のCD3 ϵ ペプチドを含むマスキング部分（MM）を有するポリペプチドマスクを含んだ。測定した結合シグナルは、SP34の軽鎖のC末端上にディスプレイされたgDタグに結合することによって評価される、ディスプレイのために規格化された。

【図1C】図1A及び1Bにおいて試験された抗CD3 SP34変異体のVHまたはVL領域のN末端に結合された、CMを含有するポリペプチドマスクのそれぞれのアミノ酸

50

配列を示す。

【図 2 A】ファージ E L I S A によって評価される、トロンビンによる切断の前またはその後、C D 3 ϵ - F c に対して指示された C M を含有するマスク抗 C D 3 抗体変異体の相対的結合を示すグラフである。マスク抗 C D 3 抗体変異体は、トロンビン切断部位を含む介在する C M を介して、抗 C D 3 抗体の V H 領域の N 末端に結合される、可変長さ（ヒト C D 3 ϵ の第 1 のアミノ酸残基から初めから 1 4 個のアミノ酸残基の範囲に及ぶ）の N 末端の C D 3 ϵ ペプチドを含む M M を有するポリペプチドマスクを含んだ。測定した結合シグナルは、抗 C D 3 抗体の軽鎖の C 末端上にディスプレイされた g D タグに結合することによって評価される、ディスプレイのために規格化された。

【図 2 B】ファージ E L I S A によって評価される、トロンビンによる切断の前またはその後、C D 3 ϵ - F c に対して指示された C M を含有するマスク抗 C D 3 抗体変異体の相対的結合を示すグラフである。マスク抗 C D 3 抗体変異体は、トロンビン切断部位を含む介在する C M を介して、抗 C D 3 抗体の V L 領域の N 末端に結合される、可変長さ（ヒト C D 3 ϵ の第 1 のアミノ酸残基から初めから 1 3 個のアミノ酸残基の範囲に及ぶ）の N 末端の C D 3 ϵ ペプチドを含む M M を有するポリペプチドマスクを含んだ。測定した結合シグナルは、抗 C D 3 抗体の軽鎖の C 末端上にディスプレイされた g D タグに結合することによって評価される、ディスプレイのために規格化された。

【図 2 C】図 2 A 及び 2 B において試験された抗 C D 3 抗体変異体の V H または V L 領域の N 末端に結合された、C M を含有するポリペプチドマスクのそれぞれのアミノ酸配列を示す。

【図 3 A】ファージ E L I S A によって評価される、トロンビンによる切断の前またはその後、C D 3 ϵ - F c に対して指示されたマスク抗 C D 3 抗体変異体の相対的結合を示すグラフである。マスク抗 C D 3 抗体変異体は、トロンビン切断部位を含む C M を介して、抗 C D 3 抗体の V H 領域の N 末端に結合される、可変長さ（ヒト C D 3 ϵ の第 1 のアミノ酸残基から初めから 1 1 個のアミノ酸残基の範囲に及ぶ M M、1 0 ~ 2 0 個のアミノ酸残基の範囲に及ぶ L M）の M M 及びリンカー部分（L M）をそれぞれ有するポリペプチドマスクを含んだ。測定した結合シグナルは、抗 C D 3 抗体の軽鎖の C 末端上にディスプレイされた g D タグに結合することによって評価される、ディスプレイのために規格化された。

【図 3 B】図 3 A において試験された抗 C D 3 抗体変異体の V H の N 末端に結合された、C M 及び L M を含有するポリペプチドマスクのそれぞれのアミノ酸配列を示す。

【図 4 A】ファージ E L I S A によって評価される、C D 3 ϵ - F c に対して指示されたマスク抗 C D 3 抗体変異体の相対的結合を示すグラフである。マスク抗 C D 3 抗体変異体は、L M を介して抗 C D 3 抗体の V H 領域の N 末端に結合される、可変長さ（5 ~ 1 0 個のアミノ酸残基の範囲に及ぶ）のヒト C D 3 ϵ の初めから 7 個のアミノ酸残基を含む M M 及び L M をそれぞれ有する、「固定した」ポリペプチドマスクを含んだ。測定した結合シグナルは、抗 C D 3 抗体の軽鎖の C 末端上にディスプレイされた g D タグに結合することによって評価される、ディスプレイのために規格化された。

【図 4 B】図 4 A において試験された抗 C D 3 抗体変異体の V H の N 末端に結合された、固定したポリペプチドマスクのそれぞれのアミノ酸配列を示す。

【図 4 C】図 4 F 及び 4 G において試験された C D 2 0 T D B の抗 C D 3 アームの V H 領域の N 末端に結合された、可変 M M 長さを有する固定したポリペプチドマスクのそれぞれのアミノ酸配列を示す。

【図 4 D】C M、L M、または C M 及び L M の両方を介して、抗腫瘍抗原アーム（例えば、抗 C D 2 0 アーム）、抗 C D 3 アーム、及び T D B の抗 C D 3 アームに結合された M M を含むポリペプチドマスクを有する、マスク T 細胞依存性二重特異性（T D B）抗体の一般的概略図を示す。示されたマスク T D B のポリペプチドマスクを、抗 C D 3 アームの V L ドメインに結合するが、ポリペプチドマスクが、代替に、抗 C D 3 アームの V H 領域に結合され得ることが理解されるべきである。

【図 4 E】F A C S 分析によって測定される、1 ウェル当たり 2 0 0 , 0 0 0 個のヒト P

10

20

30

40

50

BMC（ドナー番号P0000033694から単離された）を用いた異なる濃度で、様々なCD3/CD20 TDB（非マスクTDB、12aaマスクTDB、及び14aaマスクTDB）のインキュベーションから48時間後に、非TDBで処理された対照と比較して、内因性B細胞を死滅させる割合を示すグラフである。各アッセイの終了時に、生存B細胞は、PI-CD19⁺またはPI-CD20⁺B細胞としてゲートアウトされ、内部計数対照として反応混合物に追加されるFITCビーズを用いて細胞絶対数を得た。

【図4F】FACS分析によって測定される、1ウェル当たり約200,000個のヒトPBMC（ドナー番号P0000033694から単離された）を用いた異なる濃度で、様々なCD3/CD20 TDB（非マスク、マスク6.6、マスク3.9、マスク4.5、マスク5.7、及びマスク4.6のCD20 TDB）のインキュベーションから約20時間後に、CD69及びCD25表面発現の割合によって測定される、CD8⁺T細胞活性化の割合を示すグラフである。T細胞活性化の程度は、CD8⁺T細胞のCD69⁺/CD25⁺集団の割合を比較することによって決定された。

【図4G】FACS分析によって測定される、1ウェル当たり200,000個のヒトPBMC（ドナー番号P0000033694から単離された）を用いた異なる濃度で、様々なCD3/CD20 TDB（非マスク、マスク6.6、マスク3.9、マスク4.5、マスク5.7、及びマスク4.6のCD20 TDB）のインキュベーションから48時間後に、非TDBで処理された対照と比較して、内因性B細胞を死滅させる割合を示すグラフである。各アッセイの終了時に、生存B細胞は、PI-CD19⁺またはPI-CD20⁺B細胞としてゲートアウトされ、内部計数対照として反応混合物に添加されるFITCビーズを用いて細胞絶対数を得た。EC50値（ng/ml）も、試験した各CD20 TDBに対するB細胞を死滅させる有効性を定量的に評価するために表形式で示される。

【図4H】第1の列に提供される非マスクCD3/CD20 TDB（非マスクv1、非マスクv3、非マスクv4、及び非マスクv5）ならびにマスクCD3/CD20 TDB（マスク4.5、マスク4.6、及びマスク5.7）の親和性変異体に対する結合親和性アッセイの結果を示す表である。各TDBについては、計算された会合速度（ k_a ）、解離速度（ k_d ）、及び一本鎖CD3εγヘテロ二量体組み換え抗原に対する全結合親和性（ K_D ）が提供される。

【図4I】非マスクCD3/CD20 TDB（非マスクv1、非マスクv3、非マスクv4、及び非マスクv5）ならびにマスクCD3/CD20 TDB（マスク4.5、マスク4.6、及びマスク5.7）の親和性変異体に対する結合親和性、T細胞活性化、及び細胞傷害性活性を要約する表である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

I. 定義

本明細書で使用される「約」という用語は、当業者であれば容易に理解するそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（かつ説明する）。

【0035】

「抗CD3抗体」及び「CD3に結合する抗体」という用語は、抗体がCD3の標的化において診断剤及び／または治療剤として有用であるように、十分な親和性でCD3と結合することができる抗体を指す。一実施形態では、無関係の非CD3タンパク質への抗CD3抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定した場合に、この抗体のCD3への結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、CD3に結合する抗体は、1μM以下、100nM以下、10nM以下、1nM以下、0.1nM以下、0.01nM以下、または0.001nM（例えば、 10^{-8} M以下、例えば、 10^{-8} M～ 10^{-13} M、例えば、 10^{-9} M～ 10^{-13} M）の解離定数（ K_d ）を有する。ある特定の実施形態では、抗CD3抗体は、異なる種に由来するCD3間で保存されるCD3のエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、抗CD3抗体は、マ

10

20

30

40

50

スクされる（すなわち、それは、ポリペプチドマスクを含有する）。

【0036】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

【0037】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合する、インタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；二重特異性抗体（例えば、bsDb）；一本鎖ダイアボディ（例えば、scDb）；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；タンデム一本鎖抗体分子（例えば、TaFv）；二重親和性再標的分子（例えば、DART）；二重特異性T細胞誘導（例えば、BiTE）；重鎖のみの抗体分子の可変ドメイン（例えば、V_HH）；及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。

【0038】

「結合ドメイン」とは、標的エピトープ、抗原、リガンド、または受容体に特異的に結合する化合物または分子の一部を意味する。結合ドメインとしては、抗体（例えば、モノクローナル、ポリクローナル、組み換え、ヒト化、及びキメラ抗体）、抗体断片またはその部分（例えば、Fab断片、Fab'、(Fab')₂、Fab'-SH、Fv断片、scFv抗体、TaFv抗体、SMIP、ドメイン抗体、ダイアボディ、bsDb、scDb、DART、BiTE、ミニボディ、scFv-Fc、アフィボディ、ナノボディ、V_HHドメイン抗体、ならびに抗体のVH及び／またはVLドメイン）、受容体、リガンド、アダプター、及び特定された結合パートナーを有する他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0039】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパ及びシクロスホスファミド（CYTOXAN（登録商標））等のアルキル化剤；ブスルファン、イムプロスルファン、及びピボスルファン等のスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、及びウレドーパ等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、及びトリメチロメラミンを含む、エチレンイミン及びメチラメラミン（methylamine）；アセトゲニン（特にブラタシン及びブラタシノン；デルター9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；ベーターラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン（scopolectin）、及び9-アミノカンプトテシンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドレゼシン、カルゼレシン、及びビセレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体KW-2189及びCB1-TM1を含む）；エリュテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン（novembichin）、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード等の窒素マスタード類；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン等のナイトロゲンマスタード；エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンガンマ1I及びカリケアマイシンオメガ1I（例えば、Nicolaou et al. Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (19

10

20

30

40

50

94) を参照されたい) ; C D P 3 2 3、経口アルファ-4 インテグリン阻害剤 ; ダイネ
 シン A を含むダイネシン ; エスペラミシン ; ならびにネオカルジノスタチン発色団及び関
 連クロモタンパク質エネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシ
 ン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、
 カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシ
 ン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルビシン (A D
 R I A M Y C I N (登録商標)、モルホリノードキシソルビシン、シアノモルホリノードキ
 ソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシン、ドキシソルビシン H C l リポソーム注射 (D
 O X I L (登録商標))、リポソームドキシソルビシン T L C D-99 (M Y O C E T (登録商標))、
 ペグ化リポソームドキシソルビシン (C A E L Y X (登録商標))、及びデ
 オキシドキシソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロ
 マイシン、ミトマイシン C 等のミトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリ
 ボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、
 ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、
 ジノスタチン、ゾルビシン ; 代謝拮抗剤、例えば、メトトレキセート、ゲムシタビン (G
 E M Z A R (登録商標)、テガフル (U F T O R A L (登録商標))、カペシタビン (X
 E L O D A (登録商標))、エボチロン、及び 5-フルオロウラシル (5-FU) ; コ
 ンプレタスタチン ; 葉酸類似体、例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテ
 リン、トリメトトレキセート ; プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプ
 リン、チアミピリン、チオグアニン ; ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチ
 ジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフル
 リジン、エノシタビン、フロキシウリジン ; アンドロゲン、例えば、カルステロン、プロ
 ピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン ; 抗
 副腎薬、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン ; 葉酸補充薬、例えば、
 フロリン酸 ; アセグラトン ; アルドホスファミドグリコシド ; アミノレブリン酸 ; エニル
 ウラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル ; ビサントレン ; エダトレキサート ; デフォフ
 アミン ; デメコルシン ; ジアジクオン ; エルホルミチン ; 酢酸エリブチニウム ; エボチロ
 ン ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシウレア ; レンチナン ; ロニダイニン ; メイ
 タンシノイド、例えば、メイタンシン及びアンサミトシン ; ミトグアゾン ; ミトキサント
 ロン ; モピダンモル ; ニトラエリン ; ペントスタチン ; フェナメット ; ピラルビシン ; ロ
 ソキサントロン ; 2-エチルヒドラジド ; プロカルバジン ; P S K (登録商標) 多糖複合
 体 (J H S Natural Products, Eugene, Oreg.) ; ラゾキ
 サン ; リゾキシシン ; シゾフラン ; スピログエルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジクオン ;
 2, 2', 2'-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン (特に T-2 毒素、ベラク
 リン A、ロリジン A、及びアングイジン) ; ウレタン ; ビンデシン (E L D I S I N E (登録商標)、
 F I L D E S I N (登録商標)) ; ダカルバジン ; マンノムスチン ; ミトブ
 ロニトール ; ミトラクトール ; ピボプロマン ; ガシトシン ; アラビノシド (「A r a - C
 」) ; チオテバ ; タキソイド、例えば、パクリタキセル (T A X O L (登録商標)、B r
 i s t o l - M y e r s S q u i b b O n c o l o g y, P r i n c e t o n, N.
 J.)、パクリタキセルのアルブミン操作されたナノ粒子製剤 (A B R A X A N E (商標
))、及びドセタキセルのアルブミン操作されたナノ粒子製剤 (T A X O T E R E (登録
 商標)、R h o m e - P o u l e n e R o r e r, A n t o n y, F r a n c e) ; ク
 ロランブシル ; 6-チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキセート ; プラチナ剤、
 例えば、シスプラチン、オキサリプラチン (例えば、E L O X A T I N (登録商標))、
 及びカルボプラチン ; ツブリン重合が微小管を形成するのを防止するビンカ (ビンブラス
 チン (V E L B A N (登録商標))、ビンクリスチン (O N C O V I N (登録商標))、
 ビンデシン (E L D I S I N E (登録商標)、F I L D E S I N (登録商標))、及びビ
 ノレルビン (N A V E L B I N E (登録商標))を含む) ; エトボシド (V P - 1 6) ;
 イホスファミド ; ミトキサントロン ; ロイコボビン ; ノバントロン ; エダトレキサート ;
 ダウノマイシン ; アミノプテリン ; イバンドロン酸塩 ; トボイソメラーゼ阻害剤 R F S

10

20

30

40

50

2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド、例えば、レチノイン酸（ベキサロテン（TARGRETIN（登録商標））を含む；ビスホスホン酸塩、例えば、クロドロネート（例えば、BONEFOS（登録商標）またはOSTAC（登録商標））、エチドロネート（DIDROCAL（登録商標））、NE-58095、ゾレドロ酸／ゾレドロネート（ZOMETA（登録商標））、アレンドロネート（FOSAMAX（登録商標））、パミドロネート（AREDIA（登録商標））、チルドロネート（SKELID（登録商標））、またはリセドロネート（ACTONEL（登録商標））；トロキサシタピン（1，3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常細胞増殖に関わるシグナル伝達経路における遺伝子（例えば、PKC-α、Raf、H-Ras、及び上皮成長因子受容体（EGFR）（例えば、エルロチニブ（Tarceva（商標））の発現を阻害するもの；細胞増殖を低減させるVEGF-A；ワクチン、例えば、THERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、及びVAXID（登録商標）ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤（例えば、LURTOTECAN（登録商標））；rmRH（例えば、ABARELIX（登録商標））；BAY439006（ソラフェニブ；Bayer）；SU-11248（スニチニブ、SUTENT（登録商標）、Pfizer）；ペリフォシン、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ）、プロテオソーム阻害剤（例えば、PS341）；ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標））；CCI-779；チピファルニブ（R11577）；オラフェニブ、ABT510；Bcl-2阻害剤、例えば、オブリメルセンナトリウム（GENASENSE（登録商標））；ピキサントロン；EGFR阻害剤；チロシンキナーゼ阻害剤；セリントレオニンキナーゼ阻害剤、例えば、ラパマイシン（シロリムス、RAPAMUNE（登録商標））；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、ロナファルニブ（SCH 6636、SARASAR（商標））；及び上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上記の2つ以上の組み合わせ、例えば、CHOP（シクロホスファミド、ドキシルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニソロンの複合療法の省略形）、及びFOLFOX（5-FU及びロイコポビンと複合されたオキサリプラチン（ELOXATIN（商標））による治療計画の省略形）；及び上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上記の2つ以上の組み合わせが挙げられる。

【0040】

本明細書で定義される化学治療剤は、癌の成長を促進し得るホルモンの効果を制御、低減、遮断、または阻害するように作用する「抗ホルモン剤」または「内分泌治療薬」を含む。それらは、それら自体がホルモンであってもよく、抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節薬（SERM）、例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標）タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、及びFARESTON、cndot、トレミフェンを含む、副腎におけるエストロゲン産生を調節する、酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）酢酸メゲストロール、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタイン、ファドロゾール、RIVISOR（登録商標）ボロゾール、FEMARA（登録商標）レトロゾール、及びARIMIDEX（登録商標）アナストロゾール等、ならびに抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン、ならびにトロキサシタピン（1，3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、具体的には、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC-α、Raf、及びH-Ras等、リボザイム、例えば、VEGF発現阻害剤（例えば、ANGIOZYME（登録商標）リボザイム）及びHER2発現阻害剤；ワクチン、例えば、遺伝子治療ワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、及びVA

X I D（登録商標）ワクチン；P R O L E U K I N（登録商標）r I L - 2；L U R T O T E C A N（登録商標）トポイソメラーゼ1阻害剤；A B A R E L I X（登録商標）r m R H；ピノレルビン及びエスペラミシン（米国特許第4，675，187号を参照されたい）、ならびに上述のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上述のうちの2つ以上の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

【0041】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／または軽鎖の一部が特定の源または種に由来し、重鎖及び／または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

【0042】

「切断可能な部分」または「C M」という用語は、存在する場合、抗体またはその抗原結合断片（例えば、本発明の抗C D 3抗体またはその抗原結合断片、例えば、本発明のC D 2 0 / C D 3 T D Bまたはその抗原結合断片）にポリペプチドマスクを連結させ、切断される場合、それに連結される抗体またはその抗原結合断片からのポリペプチドマスクの物理的分離をもたらすポリペプチドマスクの任意の成分を指す。いくつかの実施形態では、C Mは、酵素（例えば、標的免疫エフェクター細胞以外の標的細胞によって共発現または上方調節されるプロテアーゼ等のプロテアーゼ）のための基質としての役割を果たし得るアミノ酸配列を含んでもよい。他の実施形態では、C Mは、還元剤の作用によって切断することができるジスルフィド結合を形成することができるシステイン-システイン対を含む。他の実施形態では、C Mは、光分解時に切断することができる基質を含む。いくつかの実施形態では、C Mは、酸性p H環境（例えば、細胞のリソソームまたは腫瘍微環境）において切断することができる酸に不安定なリンカーを含む。

【0043】

本明細書で使用される「C D 3（c l u s t e r o f d i f f e r e n t i a t i o n 3）」または「C D 3」という用語は、別途指示されない限り、霊長類（例えばヒト）及び齧歯動物（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源からの任意の天然C D 3を指し、例えば、C D 3 ε、C D 3 γ、C D 3 α、及びC D 3 β鎖を含み、完全長「未処理の」C D 3（例えば、未処理または未修飾のC D 3 εまたはC D 3 γ）、ならびにすべてのまたは一部のそのシグナルペプチドを有さない「処理された」C D 3 εポリペプチド、具体的には、N C B I参照配列番号N P__000724（ヒトC D 3 εタンパク質）の配列の初めから21または22のアミノ酸を有さないC D 3 εポリペプチドのような細胞における処理によって生じる任意の形態のC D 3を包含する。この用語は、例えば、スプライス変異体または対立遺伝子変異体を含む、C D 3の他の自然発生変異体も包含する。C D 3は、例えば、未処理または処理形態で、207のアミノ酸長であるヒトC D 3 εタンパク質（N C B I参照配列番号N P__000724）、及び182のアミノ酸長であるヒトC D 3 γタンパク質（N C B I参照配列番号N P__000064）の両方を含む。

【0044】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を指す。5つの主要なクラスの抗体：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及びI g A₂にさらに分類され得る。免役グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、α、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。

【0045】

本明細書に記載の本発明の態様及び実施形態が、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0046】

本明細書で使用される「細胞傷害性薬剤」という用語は、細胞機能を阻害するもしくは阻止する、及び／または細胞死もしくは破壊を引き起こす、物質を指す。細胞傷害性薬剤には、放射性同位体（例えば、A t²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、R e¹⁸⁶、

10

20

30

40

50

Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²、及びLuの放射性同位体)；化学療法剤もしくは化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリマイシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他のインターカレート剤）；成長阻害剤；核酸分解酵素等の酵素及びそれらの断片；抗生物質；細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素（それらの断片及び／または変異体を含む）等の毒素；ならびに下に開示される種々の抗腫瘍または抗癌剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

「障害」とは、哺乳動物を問題の障害に罹患しやすくする病理学的状態を含む慢性及び急性障害または疾患を含むが、これらに限定されない、治療から恩恵を受けることになる任意の状態である。

【0048】

「細胞増殖性障害」及び「増殖性障害」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を指す。一実施形態では、細胞増殖性障害は、癌である。一実施形態では、細胞増殖性障害は、腫瘍である。

【0049】

「癌」及び「癌性」という用語は、一般的に無秩序な細胞増殖を特徴とする哺乳動物の生理的状态を指しまたは記述する。癌の例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病またはリンパ性悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体的な例としては、扁平上皮癌（例えば、上皮扁平上皮癌）、肺癌、例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及び肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌（gastric cancer）または胃癌（stomach cancer）、例えば、胃腸癌及び胃腸間質癌、膵臓癌、膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路癌、肝癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、表在拡大黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端性黒子性黒色腫、結節型黒色腫、多発性骨髄腫及びB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）、小リンパ球性（SL）NHL、中悪性度／濾胞性NHL、中悪性度びまん性NHL、高悪性度免疫芽細胞性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非開裂細胞性NHL、巨大病変NHL、マン
トル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、及びワルデンストレームマクログロブリン血症等）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、ならびに母斑症に関連する異常な血管増殖、浮腫（脳腫瘍に関連するもの等）、メーグス症候群、脳癌、ならびに頭頸部癌、及び関連転移が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、本発明の抗体での治療に適する癌としては、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、膠芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、腎細胞癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、軟組織肉腫、カボジ肉腫、カルチノイド癌、頭頸部癌、卵巣癌、中皮腫、及び多発性骨髄腫が挙げられる。いくつかの実施形態では、癌は、小細胞肺癌、膠芽細胞腫、神経芽細胞腫、黒色腫、乳癌、胃癌、結腸直腸癌（CRC）、及び肝細胞癌から選択される。さらに、いくつかの実施形態では、癌は、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、膠芽細胞腫、及び乳癌（これらの転移型を含む）癌から選択される。

【0050】

本明細書で使用される「腫瘍」は、悪性か良性かを問わず、すべての腫瘍性細胞の成長及び増殖、ならびにすべての前癌性及び癌性細胞及び組織を指す。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、及び「腫瘍」という用語は、本明細書で言及される場合、相互排他的ではない。

【0051】

本明細書で使用される「腫瘍抗原」という用語は、腫瘍細胞上に提示される抗原として理解され得る。これらの抗原は、分子の膜貫通及び細胞質部分と結合していることが多い

細胞外部分とともに細胞表面に提示されることがある。これらの抗原は、腫瘍細胞によりのみ提示され、通常細胞によっては決して提示され得ない。腫瘍抗原は、腫瘍細胞上によりのみ発現されるか、または通常細胞と比較して腫瘍特異的な突然変異を表すことがある。この場合、それらは腫瘍特異的抗原と称される。腫瘍細胞及び通常細胞により提示される腫瘍抗原がより一般的であり、それらは腫瘍関連抗原と称される。これらの腫瘍関連抗原は、通常細胞と比較して過剰発現される場合があり、または通常組織と比較して腫瘍組織の構造が小さくないことから腫瘍細胞中で抗体結合を起こしやすい。一態様では、腫瘍抗原は、以下の表 1 に記載されるものから選択される。

【0052】

「エフェクター機能」とは、抗体のアイソタイプにより異なる抗体の Fc 領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q 結合及び補体依存性細胞毒性 (CDC)、Fc 受容体結合、抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (ADCC)、食作用、細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体) の下方制御、及び B 細胞活性化が挙げられる。

【0053】

「有効量」の化合物、例えば、本発明の抗 CD3 抗体またはその組成物 (例えば、薬学的組成物) は、特定の障害 (例えば、細胞増殖性障害、例えば、癌) の測定可能な改善または予防のような所望の治療的または予防的結果の達成に必要な少なくとも最小の量である。本明細書における有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに個体における所望の応答を誘発する抗体の能力等の要因に応じて異なり得る。有効量はまた、治療上有益な作用が治療の任意の毒性作用または有害作用を上回るものでもある。予防的使用の場合、有益なまたは所望の結果としては、疾患の生化学的、組織学的、及び／または挙動的症状、その合併症、ならびに疾患の発症中に現れる中間病理学的表現型を含む、疾患のリスクの排除または低減、疾患の重症度の軽減、または疾患の発生の遅延等の結果が挙げられる。治療的使用の場合、有益なまたは所望の結果としては、疾患に起因する 1 つ以上の症状の軽減、疾患に罹患している者の生活の質の向上、疾患の治療に必要な他の薬剤の用量の低減、別の薬剤の効果の増強 (例えば、標的による)、疾患の進行の遅延、及び／または生存期間の延長等の臨床結果が挙げられる。癌または腫瘍の場合、有効量の薬物は、癌細胞の数を減少させ、腫瘍サイズを低減させ、癌細胞の末梢器官への浸潤を阻害し (すなわち、ある程度遅らせるか、または望ましくは停止し)、腫瘍転移を阻害し (すなわち、ある程度遅らせるか、または望ましくは停止し)、腫瘍成長をある程度阻害し、及び／または障害に関連する症状のうちの 1 つ以上をある程度軽減する効果を有し得る。有効量は、1 回以上の投与で投与され得る。本発明では、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、予防的治療または治療的治療を直接または間接的に達成するのに十分な量である。臨床分野において理解されるように、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、別の薬物、化合物、または薬学的組成物と併せて達成されてもされなくてもよい。したがって、「有効量」は、1 つ以上の治療薬の投与との関連で考慮され得、単剤は、1 つ以上の他の薬剤と併せて、望ましい結果が達成され得るか、または達成される場合、有効量で与えられると見なされ得る。

【0054】

本明細書における「Fc 領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部分を含有する免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を定義するように使用される。この用語は、天然配列 Fc 領域及び変異体 Fc 領域を含む。一実施形態では、ヒト IgG 重鎖 Fc 領域は、Cys 226 から、または Pro 230 から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc 領域の C 末端リジン (Lys 447) は、存在する場合もあれば、しない場合もある。本明細書で別途指示がない限り、Fc 領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 に記載されている、EU インデックスとも称

10

20

30

40

50

されるEU番号付け方式に従う。

【0055】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH（またはVL）において次の配列、FR1-H1（L1）-FR2-H2（L2）-FR3-H3（L3）-FR4で出現する。

【0056】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、天然の抗体構造に実質的に類似な構造を有するか、または本明細書に定義されるFc領域を含む重鎖を有する、抗体を指して、本明細書に互換的に使用される。

10

【0057】

本明細書で使用されるとき、「成長阻害剤」とは、インビトロまたはインビボのいずれかで細胞の成長を阻害する化合物または組成物を指す。一実施形態では、成長阻害剤は、抗体が結合する抗原を発現する細胞の増殖を予防または低減する成長阻害抗体である。別の実施形態では、成長阻害剤は、S期の細胞の割合を著しく減少させるものであり得る。成長阻害剤の例としては、細胞周期進行（S期以外の場所）を遮断する薬剤、例えば、G1停止及びM期停止を誘導する薬剤が挙げられる。従来のM期遮断薬としては、ビンカ（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンが挙げられる。G1を停止する薬剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-C等のDNAアルキル化剤は、S期停止にも波及する。さらなる情報は、MurakamiらのMendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1、表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and anti-neoplastic drugs」（W. B. Saunders, Philadelphia, 1995）、例えば、13頁で見出すことができる。タキサン（パクリタキセル及びドセタキセル）は、いずれもイチイ由来の抗癌薬である。ヨーロッパイイチイ由来のドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体由来の微小管の構築を促進し、脱重合を阻止することによって微小管を安定させ、細胞内での有糸分裂を阻害する。

20

30

【0058】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養」という用語は、同義に使用され、外因性核酸が中に導入された細胞を指し、かかる細胞の子孫を含む。宿主細胞としては、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が挙げられ、これらは、初代形質転換細胞及び継代の数にかかわらずそれに由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸含有量の点で完全に同一ではないが、変異を含み得る。元来形質転換された細胞についてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。

40

【0059】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリ等の当該技術分野で既知の様々な技法を使用して産生され得る。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991) Col

50

e et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)に記載の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原投与に応答してかかる抗体を産生するように修飾されているが、その内因性遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物、例えば、免疫化異種マウスに抗原を投与することによって調製することができる(例えば、XENOMOUSE(商標)技術に関しては、米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号を参照されたい)。また、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体に関して、例えば、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006)も参照されたい。

【0060】

本明細書で使用される「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列中で超可変(「相補性決定領域」または「CDR」)であり、及び／または構造的に定義されたループ(「超可変ループ」)を形成し、及び／または抗原接触残基(「抗原接触体」)を含有する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。概して、抗体は、6つのHVR: VH内に3つ(H1、H2、H3)及びVL内に3つ(L1、L2、L3)を含む。本明細書の例示的なHVRは、

(a) アミノ酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)、及び96-101(H3)で発生する超可変ループ(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))、

(b) アミノ酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)、及び95-102(H3)で発生するCDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))、

(c) アミノ酸残基27c~36(L1)、46~55(L2)、89~96(L3)、30~35b(H1)、47~58(H2)、及び93~101(H3)で発生する抗原接触体(MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))、ならびに

(d) HVRアミノ酸残基46~56(L2)、47~56(L2)、48~56(L2)、49~56(L2)、26~35(H1)、26~35b(H1)、49~65(H2)、93~102(H3)、及び94~102(H3)を含む、(a)、(b)、及び／または(c)の組み合わせを含む。

【0061】

別途指示されない限り、可変ドメイン(例えば、FR残基)におけるHVR残基及び他の残基は、本明細書において上記のKabatらに従って付番される。

【0062】

「免疫複合体」は、細胞傷害性薬剤を含むがこれに限定されない1つ以上の異種性分子(複数可)に複合体化される抗体である。

【0063】

「対象」または「個体」は、哺乳動物である。哺乳動物には、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、及びウマ)、霊長類(例えば、ヒト、及びサル等の非ヒト霊長類)、ウサギ、及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、対象または個体は、ヒトである。

【0064】

「単離」抗体は、その自然環境の構成成分から分離されているものである。いくつかの実施形態では、抗体は、例えば、電気泳動法（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）、またはクロマトグラフ法（例えば、イオン交換または逆相HPLC）によって決定される場合、95%または99%を超える純度まで精製される。抗体純度の評価のための方法の概説に関して、例えばFlatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)を参照されたい。

【0065】

「単離された」核酸とは、その天然環境の成分から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、通常は核酸分子を含有する細胞内に含有される核酸分子を含むが、その核酸分子が染色体外に、またはその天然染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

10

【0066】

「抗CD3抗体をコードする単離された核酸」とは、抗体重鎖及び軽鎖（またはそれらの断片）をコードする1つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター内のかかる核酸分子（複数可）を含み、かかる核酸分子（複数可）は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

【0067】

本明細書で使用される「リンカー部分」または「LM」とは、存在する場合に、抗体またはその抗原結合断片（例えば、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片、例えば、本発明のCD20/CD3 TDBまたはその抗原結合断片）に直接または間接的にポリペプチドマスクのMM要素を結合するポリペプチドマスクの任意の要素を意味する。全般に、LMは、5~24のアミノ酸長さ（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24のアミノ酸長さ）である。いくつかの実施形態では、LMは、5~15のアミノ酸長さ（例えば、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のアミノ酸長さ）である。いくつかの実施形態では、LMは、高度に柔軟であり、グリシン（G）及び/またはセリン（S）残基を多く含み得、GS反復の形態で存在し得る。

20

【0068】

「マスク部分」または「MM」という用語は、抗体またはその抗原結合断片（例えば、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片、例えば、本発明のCD20/CD3 TDBまたはその抗原結合断片）のその標的（例えば、CD3）に特異的に結合する能力を低下させるポリペプチドマスクの要素を指す。いくつかの実施形態では、MMは、CD3ポリペプチドの断片（例えば、ヒトCD3εポリペプチド、例えば、ヒトCD3εポリペプチドのN末端の断片、例えば、処理されたヒトCD3εポリペプチドの少なくとも初めの3個のアミノ酸）を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、MMは、N末端の環化グルタミン（ピログルタミン酸、5-オキソピロリジン-2-カルボン酸（PCA）、5-オキソプロリン、ピドル酸、またはピログルタミン酸塩）を含むアミノ酸配列を含む。MMは、LM、CM、またはLM及びCMの両方を介して、抗体またはその抗原結合断片に結合され得る。あるいは、MMは、抗体またはその抗原結合断片に直接結合され得る。

30

40

【0069】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、及び/または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に発生する、想定される変異型抗体を除いて、かかる変異体は一般に少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対して指向される異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向される。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるも

50

のではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよく、モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法及び他の例示的な方法が、本明細書に記載されている。

【0070】

「裸の抗体」は、異種性部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識に複合されていない抗体を指す。裸の抗体は、薬学的製剤中に存在してもよい。

【0071】

「天然抗体」は、様々な構造を有する、自然発生免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖及び2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端まで、各重鎖は、可変重ドメイン（variable heavy domain）または重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）と、その後に3つの定常ドメイン（CH1、CH2、及びCH3）とを有する。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽ドメイン（variable light domain）または軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）と、その後に定常軽（CL）ドメインとを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる2つの型うちの1つに割り当てられ得る。

【0072】

「添付文書」という用語は、かかる治療薬の適応症、使用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌症についての情報、及び／またはその使用に関する警告を含有する、治療剤製品のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【0073】

「PD-1軸結合アンタゴニスト」という用語は、PD-1シグナル伝達軸上のシグナル伝達に起因するT細胞機能障害を除去するようにPD-1軸結合パートナーとその結合パートナーのうちのいずれか1つ以上との相互作用を阻害し、結果として、T細胞機能（例えば、増殖、サイトカイン産生、標的細胞死滅）を復元または増強する分子を指す。本明細書で使用されるとき、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト、及びPD-L2結合アンタゴニストを含む。

【0074】

「PD-1結合アンタゴニスト」という用語は、PD-1とその結合パートナーのうちの1つ以上、例えば、PD-L1、PD-L2との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、または妨害する分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1のその結合パートナーのうちの1つ以上への結合を阻害する分子である。具体的な態様では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1のPD-L1及び／またはPD-L2への結合を阻害する。例えば、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、ならびにPD-1とPD-L1及び／またはPD-L2との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、または妨害する他の分子を含む。一実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1を介するシグナル伝達を媒介したTリンパ球で発現された細胞表面タンパク質によってまたはそれを介して媒介される負の共刺激シグナルを低減し、機能障害T細胞の機能障害性をより低くする（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、抗PD-1抗体である。具体的な一態様では、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載のMDX-1106（ニボルマブ）である。別の特定の態様では、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるMK-3475（ランブロリズマブ）である。別の具体的な態様では、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載のCT-011（ピジリズマブ）である。別の具体的な態様では、PD-1結合アンタゴニストは、本明細書に記載のAMP-224である。

10

20

30

40

50

【0075】

「PD-L1 結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L1 とその結合パートナー、例えば、PD-1、B7-1 のうちのいずれか1つ以上との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、または妨害する分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、PD-L1 のその結合パートナーへの結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、PD-L1 結合アンタゴニストは、PD-L1 のPD-1 及び/またはB7-1 への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、抗PD-L1 抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、及びPD-L1 とその結合パートナーのうちの1つ以上、例えば、PD-1、B7-1 との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、または妨害する他の分子を含む。一実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、PD-L1 を介するシグナル伝達を媒介したTリンパ球で発現された細胞表面タンパク質によってまたはそれを介して媒介される負の共刺激シグナルを低減し、機能障害T細胞の機能障害性をより低くする（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）。いくつかの実施形態では、PD-L1 結合アンタゴニストは、抗PD-L1 抗体である。具体的な一態様では、抗PD-L1 抗体は、本明細書に記載のYW243、55、S70である。別の具体的な態様では、抗PD-L1 抗体は、本明細書に記載のMDX-1105である。さらに別の具体的な態様では、抗PD-L1 抗体は、本明細書に記載のMPDL3280Aである。さらに別の具体的な態様では、抗PD-L1 抗体は、本明細書に記載のMED14736である。

10

20

【0076】

「PD-L2 結合アンタゴニスト」という用語は、PD-L2 とその結合パートナーのうちのいずれか1つ以上、例えば、PD-1 との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、または妨害する分子を指す。いくつかの実施形態では、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 のその結合パートナーのうちの1つ以上への結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 のPD-1 への結合を阻害する。いくつかの実施形態では、PD-L2 アンタゴニストは、抗PD-L2 抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、及びPD-L2 とその結合パートナーのうちのいずれか1つ以上、例えば、PD-1 との相互作用に起因するシグナル伝達を低減、遮断、阻害、抑止、または妨害する他の分子を含む。一実施形態では、PD-L2 結合アンタゴニストは、PD-L2 を介するシグナル伝達を媒介したTリンパ球で発現された細胞表面タンパク質によってまたはそれを介して媒介される負の共刺激シグナルを低減し、機能障害T細胞の機能障害性をより低くする（例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する）。いくつかの実施形態では、PD-L2 結合アンタゴニストは、イムノアドヘシンである。

30

【0077】

参照ポリペプチド配列に関して「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、配列同一性最大パーセントを達成するために配列を整列させ、かつ必要に応じてギャップを導入した後の、配列同一性の一部としていずれの保存的置換も考慮しない、参照ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一の候補配列におけるアミノ酸残基の割合と定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するための整列は、当該技術分野の技術範囲内の様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN等の公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアを使用して達成され得る。当業者であれば、比較される配列の全長にわたる最大整列を達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、配列の整列に適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. が作成したものであり、ソースコードは、米国著作権局 (Washington D. C., 20559) においてユーザ文書とともに申請されており、これは、米国著作権登録番号TXU51008

40

50

7の下で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公的に入手可能であり、またはソースコードからコンパイルされ得る。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステムでの使用のためにコンパイルされるべきである。すべての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変動しない。

【0078】

ALIGN-2がアミノ酸配列比較に用いられる状況下で、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対する所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%（あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、それとの、またはそれに対するある特定のアミノ酸配列同一性%を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Aと表現され得る）は、以下のように計算される。

$$100 \times \text{画分} X / Y$$

式中、Xは、配列整列プログラムALIGN-2によってそのプログラムのAとBとの整列において完全な一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、AのBに対するアミノ酸配列同一性%は、BのAに対するアミノ酸配列同一性%とは等しくないことが理解される。別途具体的に示されない限り、本明細書で使用されるすべてのアミノ酸配列同一性値%は、直前の段落に記載されるようにALIGN-2コンピュータプログラムを使用して得られる。

【0079】

「薬学的製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、かつ製剤が投与される対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない調製物を指す。

【0080】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体には、緩衝液、賦形剤、安定剤、または防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0081】

「ポリペプチドマスク」という用語は、抗体またはその抗原結合断片（例えば、本発明の抗CD3抗体またはその抗原結合断片、例えば、本発明のCD20/CD3 TDBまたはその抗原結合断片）に結合し、抗体またはその抗原結合断片のその標的（例えば、CD3）に特異的に結合する能力を低下させるように位置付けられるアミノ酸配列を指す。いくつかの実施形態では、ポリペプチドマスクは、LM、CM、またはLM及びCMの両方を介して、抗体またはその抗原結合断片に結合され得る、MMを含む。

【0082】

本明細書で使用されるとき、「治療」（及び「治療する」または「治療すること」等のその文法上の変形）とは、治療されている個体の自然経過を変更することを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程中に実施され得る。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的病理学的帰結の縮小、転移の予防、疾患進行速度の減少、病状の回復または寛解、及び緩解または予後の改善を含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本発明の抗体を使用して、疾患の発達を遅延させるか、または疾患の進行を減速させる。

【0083】

本明細書で使用されるとき、障害または疾患の「進行を遅延させること」とは、疾患または障害（例えば細胞増殖性障害、例えば癌）の発達を延期する、妨げる、減速させる、遅滞させる、安定化させる、及び／または延滞させることを意味する。この遅延は、病歴及び／または治療される個体に応じて様々な期間のものであり得る。当業者に明らかであるように、十分または著しい遅延は、個体が疾患を発症しないという点で、予防を事実上包含し得る。例えば、転移の発症等の末期癌を遅延させることができる。

【0084】

「低減する」または「阻害する」とは、例えば、20%以上の、50%以上の、または75%、85%、90%、95%、もしくはそれ以上の全体的な減少を生じる能力を意味する。ある特定の実施形態では、低減するまたは阻害するとは、マスクされたとき（すなわち、抗CD3抗体がポリペプチドマスクを含むとき）、抗CD3抗体のヒトCD3ポリペプチドに結合する能力の完全な低下を指すことができる。他の実施形態では、低減するまたは阻害するとは、抗体Fc領域によって媒介される抗体のエフェクター機能を指すことができ、かかるエフェクター機能は、具体的に補体依存性細胞傷害（CDC）、抗体依存性細胞傷害（ADCC）、及び抗体依存性細胞食作用（ADCP）を含む。

【0085】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に参与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖（それぞれ、VH及びVL）の可変ドメインは、一般に、各ドメインが4つの保存フレームワーク領域（FR）及び3つの超可変領域（HVR）を含む同様の構造を有する（例えば、Kindt et al. *Immunology*, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照されたい）。単一のVHドメインまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、抗原に結合する抗体のVHドメインまたはVLドメインを使用して単離されて、それぞれ、相補的VLドメインまたはVHドメインのライブラリをスクリーニングすることができる。例えば、Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993)、Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)を参照されたい。

【0086】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、それが結合している別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及び中に導入される宿主細胞のゲノム内に組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に結合している核酸の発現を誘導することができる。かかるベクターは、本明細書で「発現ベクター」と称される。

【0087】

本明細書で使用されるとき、「投与する」とは、ある投薬量の化合物（例えば、本発明の抗CD3抗体もしくは本発明の抗CD3抗体をコードする核酸）または組成物（例えば、薬学的組成物、例えば、本発明の抗CD3抗体を含む薬学的組成物）を対象に与える方法を意味する。本明細書に記載される方法に用いられる組成物は、例えば、筋肉内、静脈内、皮内、経皮的、動脈内、腹腔内、病巣内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、鼻腔内、硝子体内、腔内、直腸内、局所的（topically）、腫瘍内、腹膜内、皮下、結膜下、小胞内、経粘膜、心膜内、臍帯内、眼球内、経口、局所的、局所的（locally）、吸入、注射、注入、持続注入、標的細胞に直接的に流す局所灌流、カテーテル、洗浄、クリーム、または脂質組成物で投与することができる。投与方法は、様々な要素（例えば、投与される化合物または組成物、ならびに治療される状態、疾患、または障害の重症度）に応じて多様であり得る。

【0088】

I I. 組成物及び方法

一態様では、本発明は、ポリペプチドマスクを含むマスク抗CD3抗体に部分的に基づく。ある特定の実施形態では、マスク抗CD3抗体は、多重特異性（例えば、二重特異性）であり、CD3またはその断片に加えて、第2の生物学的分子（例えば、細胞表面抗原、例えば、腫瘍抗原）と結合することができる。本発明のマスク抗体は、T細胞の関与及び活性化の反応速度を具体的に明らかにし、その反応速度を制御する方法で、例えば、細胞増殖性障害（例えば、癌）または自己免疫性障害の進行の治療もしくは遅延のために、またはそのような障害に罹患している対象における免疫機能の増強のために有用であり得る。

10

20

30

40

50

【0089】

A. マスク抗CD3抗体

一態様では、本発明は、(a) CD3 (例えば、CD3 ϵ 及び／または及び／またはCD3 γ 、例えば、ヒトCD3 ϵ 及び／またはCD3 γ) に結合することができる結合ドメイン、(b) 抗体またはその抗原結合断片のCD3に特異的に結合する能力を低減または阻害するように位置付けられるポリペプチドマスクを含むマスク抗CD3抗体を提供する。抗CD3アーム及び抗腫瘍標的アームを含むT細胞依存性二重特異性(TDB)抗体の特定の文脈において、TDBに連結されるポリペプチドマスクは、関与腫瘍標的細胞及びT細胞の細胞生体内分布を独自にシフトし、それによって、TDBの有効性を変化させ得る。

10

【0090】

ポリペプチドマスクは、その重鎖可変(VH)ドメインまたは軽鎖可変(VL)ドメインにより抗CD3抗体の結合ドメインに連結され得る。いくつかの実施形態では、ポリペプチドマスクは、抗CD3抗体のVHドメインまたはVLドメインのN末端に連結されている。ポリペプチドマスクに連結されるか、または修飾される抗CD3抗体は、以下の式によって表され得る(アミノ末端領域からカルボキシ末端領域への順に)：(ポリペプチドマスク)－(抗CD3抗体)。

【0091】

ポリペプチドマスクは、抗CD3抗体のCD3ポリペプチド(例えば、ヒトCD3ポリペプチド、例えば、ヒトCD3 ϵ ポリペプチド)に結合する能力を少なくとも10%(例えば、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、または29%もしくはそれ以上)、少なくとも30%(例えば、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、または59%もしくはそれ以上)、少なくとも60%(例えば、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、もしくは79%)、少なくとも80%(例えば、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、もしくは89%)、少なくとも90%(例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%)、または約100%阻害し得る。

20

30

【0092】

同様に、ポリペプチドマスクの存在は、CD3に対するマスク抗CD3抗体の解離定数(K_d)は、CD3に対する非マスク形態で同じ抗CD3抗体の K_d よりも少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、50,000、100,000、500,000、1,000,000、5,000,000、10,000,000、100,000,000もしくはそれ以上、または5~10、10~100、10~1,000、10~10,000、10~100,000、10~1,000,000、10~100,000,000、100~1,000,000、100~10,000,000、100~100,000,000、100~1,000,000,000、1,000~10,000,000、1,000~100,000,000、1,000~1,000,000,000、10,000~100,000,000、10,000~1,000,000,000、10,000~10,000,000,000、100,000~1,000,000,000、100,000~10,000,000,000、100,000~100,000,000,000、または100,000,000~10,000,000,000倍もしくはそれ以上もたらし得る。

40

【0093】

マスク抗CD3抗体は、マスク抗CD3抗体がそのCD3標的に対して有するよりもそのポリペプチドマスクに対して低い親和性を有し得る。例えば、抗CD3抗体のマスクに対する抗CD3抗体の K_d は、CD3に対する抗CD3抗体の K_d よりも少なくとも5、

50

10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、または100,000倍高くなり得る。そのようなマスクは、例えば、マスクが切断可能な部分を有さない場合に、マスクが連結される抗CD3抗体からの除去を促進するために有用であり得る。あるいは、マスク抗CD3抗体は、マスク抗CD3抗体がそのCD3標的に対して有するよりもそのポリペプチドマスクに対して高い親和性を有し得る。例えば、抗CD3抗体のポリペプチドマスクに対する抗CD3抗体の K_d は、CD3に対する抗CD3抗体の K_d よりも少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1,000、2,500、5,000、10,000、または100,000倍低くなり得る。そのようなマスクは、例えば、マスクが切断可能な部分を有する場合に、マスクが連結される抗CD3抗体からの除去を促進するために有用であり得る。

10

【0094】

場合によっては、マスク抗CD3抗体の結合ドメインは、(a) 配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) 配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの超可変領域(HVR)を含む。場合によっては、マスク抗CD3抗体は、配列番号28~31の配列をそれぞれ含む重鎖フレームワーク領域FR-H1、FR-H2、FR-H3、及びFR-H4のうちの少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ)、及び/または配列番号32~35の配列をそれぞれ含む軽鎖フレームワーク領域FR-L1、FR-L2、FR-L3、及びFR-L4のうちの少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ)を含む。場合によっては、マスク抗CD3抗体は、配列番号8の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性(例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性)を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変(VH)ドメイン、及び/または配列番号9の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性(例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性)を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変(VL)ドメイン、またはその誘導体もしくはクローン関連を有し得る。

20

【0095】

場合によっては、本発明のマスク抗体は、(a) (i) 配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(ii) 配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2、ならびに(iii) 配列番号4から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含むVHドメイン、(b) (i) 配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(ii) 配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(iii) 配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインを含む。場合によっては、マスク抗CD3抗体は、配列番号8のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号9のアミノ酸配列を含むVLドメインを有し得る。場合によっては、マスク抗CD3抗体の結合ドメインは、(a) 配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) 配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) 配列番号12のアミノ酸配列を含むHVR-H3、(d) 配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(e) 配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(f) 配列番号15のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む。

30

40

【0096】

ある特定の実施形態では、上で提供される抗CD3抗体の任意の1つ以上のアミノ酸は、以下のHVR位置：

- HVR-H3 (配列番号12)：位置1、2、5、6、及び7、ならびに
- HVR-L3 (配列番号15)：位置1、2、4、及び5で置換される。

50

【0097】

ある特定の実施形態では、置換は、本明細書で提供される、保存的置換である。ある特定の実施形態では、以下の置換のうちの任意の1つ以上は、任意の組み合わせ：

－HVR－H3（配列番号12）：D1TまたはS；S1DまたはT；T1DまたはS；G2AまたはS；A2GまたはS；S2AまたはG；R5N；N5R；Y6A；A6Y；A7Y；及びY7A；ならびに

－HVR－L3（配列番号15）：K1T；T1K；Q2A；A2Q；F4A；A4F；I5A及びA5I、により作製され得る。

【0098】

例えば、場合によっては、本発明は、（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR－H1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR－H2、（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR－H3、（d）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR－L1、（e）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR－L2、及び（f）配列番号17のアミノ酸配列を含むHVR－L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む結合ドメインを有するマスク抗CD3抗体を提供する。場合によっては、マスク抗CD3抗体は、配列番号36～39の配列をそれぞれ含む重鎖フレームワーク領域FR－H1、FR－H2、FR－H3、及びFR－H4のうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ）、及び／または配列番号40～43の配列をそれぞれ含む軽鎖フレームワーク領域FR－L1、FR－L2、FR－L3、及びFR－L4のうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ）を含む。場合によっては、マスク抗CD3抗体は、配列番号18の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び／または配列番号19の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、またはその誘導体もしくはクローン関連を有し得る。

【0099】

場合によっては、本発明は、（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR－H1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR－H2、（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR－H3、（d）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR－L1、（e）配列番号14のアミノ酸配列を含むHVR－L2、及び（f）配列番号104のアミノ酸配列を含むHVR－L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのHVRを含む結合ドメインを有するマスク抗CD3抗体を提供する。場合によっては、マスク抗CD3抗体は、配列番号36～39の配列をそれぞれ含む重鎖フレームワーク領域FR－H1、FR－H2、FR－H3、及びFR－H4のうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ）、及び／または配列番号40～43の配列をそれぞれ含む軽鎖フレームワーク領域FR－L1、FR－L2、FR－L3、及びFR－L4のうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ）を含む。場合によっては、マスク抗CD3抗体は、配列番号107の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び／または配列番号108の配列の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、またはその誘導体もしくはクローン関連を有し得る。

【0100】

場合によっては、本発明は、（a）配列番号10のアミノ酸配列を含むHVR－H1、（b）配列番号11のアミノ酸配列を含むHVR－H2、（c）配列番号16のアミノ酸配列を含むHVR－H3、（d）配列番号13のアミノ酸配列を含むHVR－L1、（e

）配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び（f）配列番号 105 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 から選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの HVR を含む結合ドメインを有するマスク抗 CD3 抗体を提供する。場合によっては、マスク抗 CD3 抗体は、配列番号 36～39 の配列をそれぞれ含む重鎖フレームワーク領域 FR-H1、FR-H2、FR-H3、及び FR-H4 のうちの少なくとも 1 つ（例えば、1 つ、2 つ、3 つ、もしくは 4 つ）、及び／または配列番号 40～43 の配列をそれぞれ含む軽鎖フレームワーク領域 FR-L1、FR-L2、FR-L3、及び FR-L4 のうちの少なくとも 1 つ（例えば、1 つ、2 つ、3 つ、もしくは 4 つ）を含む。場合によっては、マスク抗 CD3 抗体は、配列番号 109 の配列もしくはその配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む VH ドメイン、及び／または配列番号 110 の配列もしくはその配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む VL ドメイン、またはその誘導体もしくはクローン関連を有し得る。

【0101】

場合によっては、本発明は、（a）配列番号 10 のアミノ酸配列を含む HVR-H1、（b）配列番号 11 のアミノ酸配列を含む HVR-H2、（c）配列番号 16 のアミノ酸配列を含む HVR-H3、（d）配列番号 13 のアミノ酸配列を含む HVR-L1、（e）配列番号 14 のアミノ酸配列を含む HVR-L2、及び（f）配列番号 106 のアミノ酸配列を含む HVR-L3 から選択される少なくとも 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つの HVR を含む結合ドメインを有するマスク抗 CD3 抗体を提供する。場合によっては、マスク抗 CD3 抗体は、配列番号 36～39 の配列をそれぞれ含む重鎖フレームワーク領域 FR-H1、FR-H2、FR-H3、及び FR-H4 のうちの少なくとも 1 つ（例えば、1 つ、2 つ、3 つ、もしくは 4 つ）、及び／または配列番号 40～43 の配列をそれぞれ含む軽鎖フレームワーク領域 FR-L1、FR-L2、FR-L3、及び FR-L4 のうちの少なくとも 1 つ（例えば、1 つ、2 つ、3 つ、もしくは 4 つ）を含む。場合によっては、マスク抗 CD3 抗体は、配列番号 111 の配列もしくはその配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む VH ドメイン、及び／または配列番号 112 の配列もしくはその配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含む VL ドメイン、またはその誘導体もしくはクローン関連を有し得る。

【0102】

本発明の開示に従ってマスク形態で有利な使用に企図される他の抗 CD3 抗体は、抗 CD3 抗体 SP34（Pessano et al. The EMBO Journal. 4:337-344, 1985）及び U. S. S. N. 14/574, 132（米国公開第 2015-016666 号）（参照によりその全体が組み込まれる）に開示される他の抗 CD3 抗体を含む。

【0103】

上の実施形態のいずれにおいても、マスク抗 CD3 抗体は、ヒト化され得る。例えば、マスク抗 CD3 抗体は、上述の実施形態のうちのいずれかにあるように HVR を含んでもよく、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【0104】

マスク抗 CD3 抗体は、抗体の 1 つ以上の特異的残基での置換突然変異であり得る、非グリコシル化部位突然変異を含んでもよい。例えば、非グリコシル化部位突然変異は、アミノ酸残基 N297、L234、L235、及び／または D265（EU 番号付け）（例えば、N297G、N297A、L234A、L235A、及び／または D265A）に

おける置換突然変異であってもよい。非グリコシル化部位突然変異は、マスク抗CD3抗体のエフェクター機能を低下させ得る。

【0105】

上記の実施形態のうちのいずれか1つによるマスク抗CD3抗体は、モノクローナル抗体、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体であり得る。マスク抗CD3抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、(Fab')₂、scFv、TaFv、ダイアボディ、bsDb、scDb、DART、BiTE、またはV_HH断片であり得る。あるいは、マスク抗CD3抗体は、完全長抗体、例えば、本明細書に定義されるインタクトなIgG抗体（例えば、インタクトなIgG1抗体）、または他の抗体クラスもしくはアイソタイプであり得る。

10

【0106】

1. マスキング部分 (MM)

いくつかの実施形態では、マスク抗CD3抗体は、処理されたヒトCD3ε（すなわち、その21のアミノ酸シグナル配列を有さないヒトCD3ε）の初めから27のアミノ酸残基に対応する、配列番号1の少なくともアミノ酸残基1～3のアミノ酸配列を含むマスキング部分 (MM) を含むポリペプチドマスクを有する。したがって、MMは、配列番号1のアミノ酸残基1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～13、1～14、1～15、1～16、1～17、1～18、1～19、1～20、1～21、1～22、1～23、1～24、1～25、1～26、もしくは1～27、またはそのN末端環化グルタミン誘導体（例えば、配列番号1の位置1に5-オキソピロリジン-2-カルボン酸 (PCA)（ピログルタミン酸塩、ピログルタミン酸、5-オキソプロリン、またはピドル酸とも称される）残基を有するMMを含むポリペプチドマスク）を含み得る。前述の実施形態のうちのいずれかにおいて、MMは、配列番号1及び52～103のいずれか1つの1位にPCA残基を含み得る。例えば、MMは、1位のグルタミン残基がN末端環化グルタミンで置換され、アミノ酸配列がPCA-D-Gである、配列番号1のアミノ酸残基1～3を含むことができる。MMは、(MM)-(抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、抗CD3抗体に対して位置付けられ得る。場合によっては、MMは、切断可能な部分 (CM) 及び／またはリンカー部分 (LM) 等の非天然CD3ポリペプチド配列によって、一方の端（すなわち、C末端の端）で、直接または間接的に伸長される。

20

30

【0107】

2. 切断可能な部分 (CM)

上述のように、マスク抗CD3抗体は、MM及び切断可能な部分 (CM) の両方を有するポリペプチドマスクを有し得る。いくつかの実施形態では、CMは、プロテアーゼ等の酵素によって切断することができるアミノ酸配列を含有する。他の実施形態では、CMは、還元によって切断することができるシステイン-システインジスルフィド結合を提供する。さらなる実施形態では、CMは、酸性pH環境の存在下で切断される酸に不安定なリンカーを提供する。さらに他の実施形態では、CMは、光分解によって活性化可能である光分解基質を提供する。

【0108】

したがって、CMを有するポリペプチドマスクを含むマスク抗CD3抗体は、切断状態または切断されていない状態のいずれかで存在し得る。本明細書で使用されるとき、切断状態という用語は、例えば、プロテアーゼによるCMの修飾、CMのシステイン-システインジスルフィド結合の還元、及び／または光活性化の後の抗CD3抗体の状態を指す。本明細書で使用されるとき、切断されていない状態という用語は、たとえばプロテアーゼによるCMの切断の不在下、CMのシステイン-システインジスルフィド結合の還元の不在下、酸性pH環境の不在下（例えば、中性または塩基性pH環境）、及び／または光の不在下での抗CD3抗体の状態を指す。いくつかの実施形態では、切断された抗CD3抗体が、例えば、プロテアーゼによるCMの切断、少なくともMMの放出をもたらすため、MMを欠失し得ることは、当業者であれば明らかであろう。それ故に、マスク抗CD3抗

40

50

体が切断されていない状態であるとき、抗体の結合ドメインがCD3標的分子から有効にマスクされるため、マスク抗CD3抗体は、CD3への結合の低下を示し得る。切断状態では、抗CD3抗体は、抗体の結合ドメインがポリペプチドマスクのMMによってもはや阻害し得ないため、その切断されていない状態であり得る抗体よりもCD3に対してより高い親和性を示し得る。

【0109】

CMが酵素（例えば、プロテアーゼ）によって切断することができ、マスク抗CD3抗体がTDBであるとき、酵素は、組織中でTDBの所望の標的と共局在化されるプロテアーゼに基づいて選択され得る。様々な異なる状態は、対象となる標的がプロテアーゼと共局在化されることが知られており、プロテアーゼの基質が当該技術分野で知られている。癌の例では、標的組織は、癌組織、具体的には、固形腫瘍の癌組織であり得る。固形腫瘍等の多くの癌において既知の基質を有するプロテアーゼの増加したレベルが、当該技術分野で知られている（例えば、La Rocca et al. British J. of Cancer. 90 (7): 1414-1421, 2004及びLopez-Otin et al. Nat Rev Cancer. 7: 800-808, 2007を参照されたい）。例示的なCMには、WO2010/081173、WO2009/025846、WO2010/096838において特定される酵素（例えば、プロテアーゼ）のうちの1つ以上、及び／または表1中の下に列挙される以下の酵素のうちの1つ以上によって切断可能である基質が含まれるが、これらに限定されない。

表 1. 例示的な酵素

プラスミン	レグマインアスパラギニルエンドペプチダーゼ	膜貫通プロテアーゼ	セリン (TMPRSS-3/4)	
マトリックス金属プロテアーゼ (MMP)-1	MMP-2	MMP-3	MMP-7	
MMP-8	MMP-9	MMP-12	MMP-13	
MMP-14	膜型 1 マトリックス金属プロテアーゼ (MT1-MMP)	カテプシン A	カテプシン B	10
カテプシン D	カテプシン E	カテプシン F	カテプシン H	
カテプシン K	カテプシン K	カテプシン L	カテプシン L2	
カテプシン O	カテプシン S	カスパーゼ 1	カスパーゼ 2	
カスパーゼ 3	カスパーゼ 4	カスパーゼ 5	カスパーゼ 6	
カスパーゼ 7	カスパーゼ 8	カスパーゼ 9	カスパーゼ 10	
カスパーゼ 11	カスパーゼ 12	カスパーゼ 13	カスパーゼ 14	
ヒト好中球エラスターゼ	ウロキナーゼ/ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (uPA)	ジスインテグリン及び金属プロテアーゼ (ADAM) 10	ADAM12	20
ADAM17	トロンボスポンジンモチーフを有する ADAM (ADAMTS)	ADAMTS5	ベータセクレターゼ (BACE)	
線維芽細胞活性化プロテアーゼ (FAP)	グランザイム A	グランザイム B	グアニジノベンゾエターゼ	
ゲプシン	マトリプターゼ	マトリプターゼ 2	メプリン	30
ネプリライシン	前立腺特異的膜抗原 (PSMA)	腫瘍壊死因子変換酵素 (TACE)	カリクレイン関連ペプチダーゼ (KLK) 3	
KLK5	KLK7	KLK11	C型肝炎ウイルスの NS3/4プロテアーゼ (HCV-NS3/4)	
組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)	カルパイン	カルパイン 2	グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ II	40
血漿カリクレイン	AMSH様プロテアーゼ	AMSH	γ-セクレターゼ成分	
抗プラスミン切断酵素 (APCE)	デシシン 1	アポトーシス関連システインペプチダーゼ	N-アセチル化アルファ結合酸性ジペプチダーゼ様 1	
トロンビン				

あるいはまたは加えて、マスク抗CD3抗体は、システイン対のジスルフィド結合を含み、それ故に、還元剤によって切断可能である、CMを含み得る。これらには、固形腫瘍の組織またはその周辺に大量に存在し得る、グルタチオン（GSH）、チオレドキシン、NADPH、フラビン、アスコルビン酸塩等の細胞性還元剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0111】

他の実施形態では、マスク抗CD3抗体は、PCT公開WO2006/108052（これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される、酸に不安定なリンカー（例えば、ヒドラゾン、イミノ、エステル、またはアミド基）を含み、それ故に、酸性pH環境の存在下で切断可能であるCMを含み得る。これには、細胞のリソソーム中または腫瘍微環境中に存在し得る酸性pH環境を含むが、これに限定されない。

10

【0112】

CMは、(MM) - (CM) - (抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、抗CD3抗体及びMMに対して位置付けられ得る。

【0113】

他の実施形態では、マスク抗CD3抗体は、そのポリペプチドマスク内に1つ以上（例えば、2つまたは3つもしくはそれ以上）の異なるCMを含み得る。

【0114】

3. リンカー部分 (LM)

上述のように、マスク抗CD3抗体は、MM及びリンカー部分 (LM) の両方、またはあるいは、3つすべての部分（すなわち、MM、LM、及びCM）を有するポリペプチドマスクを含み得る。本明細書に記載されるポリペプチドマスクで用いるのに好適なLMは、マスクに、抗CD3抗体のCD3への結合の阻害の度合いを促進または調節する柔軟性及び／または長さを提供するものである。かかるLMはまた、柔軟性リンカーとも称され得る。好適なLMは、容易に選択され得、1つのアミノ酸（例えば、1つのグリシン（G）または1つのセリン（S）残基）から30のアミノ酸（例えば、GS反復配列を含むLM）等の異なる好適な長さのものであり得る。LMは、好ましくは、1つを超えるアミノ酸長さ（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30もしくはそれ以上のアミノ酸長さ）である。場合によっては、LMは、5～24のアミノ酸長さ、例えば、5～15のアミノ酸長さであり得る。LMは、G及び／またはS含量（すなわち、G/SリッチなLM）が高く、GS反復を含み得る。例えば、LMは、グリシンポリマー (G)_n、グリシン-セリンポリマー（例えば、(GS)_n、(GSGGS)_n 及び (GGGS)_n（式中、nは少なくとも1つの整数である）を含む）、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当該技術分野で周知の他の柔軟性リンカーの組み合わせを含み得る。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは、比較的構造化されておらず、したがって、抗CD3抗体に、ポリペプチドマスクのMM成分を間接または直接連結させる中性LMとしての役割を果たし得る。グリシンは、アラニンよりもさらにフィープシースペースに有意にアクセスし、より長い側鎖を有する残基ほど制限がない（例えば、Schera et al., Rev. Computational Chem. 11:173-142, 1992を参照されたい）。例示的な柔軟性リンカーとしては、Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly等が挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、ポリペプチドマスクの設計が完全にまたは部分的に柔軟であるLMを含み得ることを認識されよう。例えば、LMは、あまり柔軟性のない構造を付与して、CD3結合の阻害の所望の度合いを示すマスク抗CD3抗体を得る柔軟な部分及び1つ以上の部分を含み得、LMは、例えば、以下に詳述されるファージ結合ELISAを用いて評価され得る。

20

30

40

【0115】

50

ポリペプチドマスクがCMを含まないとき、LMは、(MM) - (LM) - (抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、抗CD3抗体及びMMに対して位置付けられ得る。ポリペプチドマスクがCMを含まないとき、LMは、(MM) - (LM) - (CM) - (抗CD3抗体)または(MM) - (CM) - (LM) - (抗CD3抗体)として、N末端からC末端の方向に、抗CD3抗体、MM、及びCMに対して位置付けられ得る。

【0116】

他の実施形態では、マスク抗CD3抗体は、そのポリペプチドマスク内に1つ以上（例えば、2つまたは3つもしくはそれ以上）の異なるCMを含み得る。

【0117】

上記の実施形態のうちのいずれか1つによるマスク抗CD3抗体は、以下の項4～10に記載される特長のうちのいずれかを、単独でまたは組み合わせて組み込むことができる。

【0118】

4. 抗体親和性

ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体は、 $1\mu\text{M}$ 以下、 100nM 以下、 10nM 以下、 1nM 以下、 0.1nM 以下、 0.01nM 以下、または 0.001nM 以下（例えば、 10^{-8}M 以下、例えば、 $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数(K_d)を有する。場合によっては、低い K_d 値は、抗CD3抗体からのポリペプチドマスクの除去の際にのみ観察される。

【0119】

一実施形態では、 K_d は、放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって測定される。一実施形態では、RIAは、目的とする抗体のFabバージョン及びその抗原を用いて実施される。例えば、抗原に対するFabの溶液結合親和性は、非標識抗原の一連の滴定の存在下で、最小濃度の(^{125}I)標識抗原とFabを平衡化し、次いで抗Fab抗体でコーティングされたプレートと結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881 (1999)を参照されたい）。アッセイの条件を確立するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、 50mM の炭酸ナトリウム(pH 9.6)中 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の捕捉抗Fab抗体(Cappel Labs)で一晩コーティングし、その後、室温（およそ 23°C ）で2～5時間にわたりPBS中2% (w/v)のウシ血清アルブミンでブロックした。非吸着性のプレート（Nunc 番号# 269620）中で、 100pM または 26pM [^{125}I] - 抗原を、目的とするFabの段階希釈液と混合する（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)における、抗VEGF抗体Fab-12の評価と一致）と混合する。その後、目的とするFabを一晩インキュベートするが、インキュベーションをより長い期間（例えば、約65時間）続けて、平衡に達することを確実にすることができる。その後、室温でのインキュベーション（例えば、1時間）のために混合物を捕捉プレートに移す。次いで溶液を除去し、プレートをPBS中0.1%ポリソルベート20(TWEEN-20（登録商標）)で8回洗浄する。プレートが乾燥してから、 $150\mu\text{l}/\text{ウェル}$ のシンチラート(MICROSCINT-20（商標）、Packard)を添加し、プレートを、TOPCOUNT（商標）ガンマカウンター(Packard)で10分間計数する。最大結合の20%以下をもたらす各Fabの濃度を競合結合アッセイでの使用に選択する。

【0120】

別の実施形態によると、 K_d は、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定される。例えば、BIACORE（登録商標）-2000またはBIACORE（登録商標）-3000(BIACore, Inc., Piscataway, NJ)を使用したアッセイは、 25°C で、約10の応答単位(RU)で固定化抗原CM5チップを用いて行われる。一実施形態では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサチップ(CM5、BIACORE, Inc.)は、供給者の指示書に従って、N-エチ

10

20

30

40

50

ル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて活性化される。抗原を10mMの酢酸ナトリウム（pH4.8）で5μg/mL（約0.2μM）になるまで希釈した後に、5μL/分の流量で注入して、およそ10応答単位（RU）のカップリングしたタンパク質を得る。抗原の注入後、1Mのエタノールアミンを注入して、未反応基をブロックする。動態測定のために、Fab（0.78nM～500nM）の2倍段階希釈物が、25℃及びおよそ25μL/分の流速で、0.05%のポリソルベート20（TWEEN-20（商標））界面活性剤（PBST）を含むPBSに注入される。会合速度（ k_{on} ）及び解離速度（ k_{off} ）は、単純な1対1のラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2）を使用して、会合センサグラムと解離センサグラムとを同時に当てはめることによって計算される。平衡解離定数（ K_d ）を比率 k_{on}/k_{off} として計算する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881（1999）を参照されたい。上記表面プラズモン共鳴アッセイによるオンレートが $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、オンレートは、ストップトフローを備えた分光光度計（Aviv Instruments）、または攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic）等の分光計で測定される場合に、増加する抗原濃度の存在下で、25℃で、PBS中20nMの抗-抗原抗体（Fab型）（pH7.2）の蛍光発光強度（励起=295nm；発光=340nm、16nm帯域通過）の増加または減少を測定する蛍光消光技法を使用して決定することができる。

【0121】

5. 抗体断片

ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体は、抗体断片であり得る。抗体断片には、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、Tafv、scFv、ダイアボディ、bsDb、scDb、DART、BiTE、及びV_HH断片、ならびに下述の他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134（2003）に記載されている。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315（1994）を参照されたい。WO93/16185、ならびに米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、インビボ半減期が増加したFab及びF(ab')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

【0122】

ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号、WO1993/01161、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134（2003）、及びHollinger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448（1993）を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディもまた、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134（2003）に記載されている。

【0123】

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部、または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部を含む、抗体断片である。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照されたい）。

【0124】

抗体断片は、本明細書に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質消化、なら

びに組み換え宿主細胞（例えば、E. coli またはファージ）による産生を含むがこれらに限定されない、様々な技法によって作製することができる。

【0125】

6. キメラ抗体及びヒト化抗体

ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体が、例えば、米国特許第4,816,567号、及びMorrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、または非ヒト霊長類、例えば、サル由来の可変領域）及びヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変化した「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

10

【0126】

ある特定の実施形態では、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減する一方で、親非ヒト抗体の特異性及び親和性は保持するようにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、1つ以上の可変ドメインを含み、そのHVR、例えば、CDR（またはそれらの部分）は、非ヒト抗体に由来し、そのFR（またはそれらの部分）は、ヒト抗体配列に由来する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元または改善するように、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）からの対応する残基で置換される。

20

【0127】

ヒト化抗体及びそれらの作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) で概説されており、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)、Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、及び同第7,087,409号、Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005)（特異性決定領域（SDR）グラフィングを記載する）、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)（「リサーフェイシング（resurfacing）」を記載する）、Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005)（「FRシャフリング」を記載する）、ならびにOsbourne et al., Methods 36:61-68 (2005) 及びKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)（FRシャッフリングへの「誘導選択」アプローチを記載する）にさらに記載されている。

30

【0128】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域としては、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域（例えば、Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993) を参照されたい）、軽鎖または重鎖可変領域の特定の
下位集団のヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)、及びPresta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993) を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞変異された）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) を参照されたい）、ならびにFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) 及びRosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) を参照されたい）が挙げられるが、これらに限定されな

40

50

い。

【0129】

7. ヒト抗体

ある特定の実施形態では、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の様々な技法を使用して産生され得る。ヒト抗体は、概して、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001) 及び Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) に記載されている。

【0130】

ヒト抗体は、抗原投与に応答してヒト可変領域を有するインタクトなヒト抗体またはインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製することができる。かかる動物は、典型的には、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するか、もしくは動物の染色体にランダムに組み込まれるヒト免疫グロブリン遺伝子座のすべてまたは一部を含有する。かかるトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005) を参照されたい。例えば、米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号(XENOMOUSE (商標) 技術を記載する)、米国特許第5,770,429号(HuMab (登録商標) 技術を記載する)、米国特許第7,041,870号(K-MOUSE (登録商標) 技術を記載する)、米国特許出願公開第US2007/0061900号(VelociMouse (登録商標) 技術を記載する) も参照されたい。かかる動物によって生成されたインタクトな抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによってさらに修飾され得る。

【0131】

ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によって作製することもできる。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株について説明されている(例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, p. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、及び Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991) を参照されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって生成されるヒト抗体も、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) に記載されている。さらなる方法としては、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載する) 及び Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (ヒト-ヒトハイブリドーマを記載する) に記載されるものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)についても、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 及び Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005) に記載されている。

【0132】

ヒト抗体は、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによって生成することもできる。その後、かかる可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられ得る。抗体ライブラリからヒト抗体を選択するための技法が以下に記載されている。

【0133】

8. ライブラリ由来抗体

本発明のマスク抗CD3抗体は、上述のように、コンビナトリアルライブラリを、所望の活性（単数または複数）を有する抗CD3抗体についてスクリーニングし、その後、VHまたはVLドメインの特定された抗CD3抗体をポリペプチドマスクで連結することによって、生成されてもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、所望の結合特性を保有する抗体についてかかるライブラリをスクリーニングするための多様な方法が、当該技術分野で既知である。かかる方法は、例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) で概説されており、例えば、McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554、Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991)、Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)、Marks and Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248: 161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338 (2): 299-310 (2004)、Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340 (5): 1073-1093 (2004)、Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (34): 12467-12472 (2004)、及びLee et al., *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119-132 (2004) にさらに記載されている。

【0134】

ある特定のファージディスプレイ法では、VH及びVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって別個にクローン化され、ファージライブラリ中で無作為に組み換えられ、それは次いでWinter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994) に記載されるように、抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、抗体断片を一本鎖Fv (scFv) 断片またはFab断片のいずれかとしてディスプレイする。免疫化源由来のライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、免疫原に高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., *EMBO J*, 12: 725-734 (1993) によって記載されるように、ナイーブレパートリーは、クローン化され（例えば、ヒトから）、いかなる免疫化も伴わずに、幅広い非自己抗原また自己抗原に対する抗体の単一の源を提供することができる。最後に、Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992) に記載されるように、ナイーブライブラリは、幹細胞から再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して、高度可変CDR3領域をコードし、かつインビトロで再配列を達成することによって合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリについて記載している特許公報としては、例えば、米国特許第5,750,373号及び米国特許公開第2005/0079574号、同第2005/0119455号、同第2005/0266000号、同第2007/0117126号、同第2007/0160598号、同第2007/0237764号、同第2007/0292936号、及び同第2009/0002360号が挙げられる。

【0135】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書においてヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされ、これらの抗体を、上述のポリペプチドマスクと連結させて、本発明のマスク抗CD3抗体を生成し得る。

【0136】

9. 多重特異性抗体

上記の態様のうちのいずれか1つにおいて、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体

は、多重特異性抗体、例えば、T細胞依存性二重特異性（TDB）抗体等の二重特異性抗体である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある特定の実施形態では、マスク抗CD3二重特異性抗体は、CD3（例えば、CD3εまたはCD3γ）の2つの異なるエピトープに結合することができ、ポリペプチドマスクに連結される一方または両方の抗CD3アームを有し得る。他の実施形態では、結合特異性のうちの一方は、CD3（例えば、CD3εまたはCD3γ）に対するものであり、他方は、任意の他の抗原（例えば、第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原、例えば、腫瘍抗原）に対するものである。したがって、マスク抗CD3抗体は、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、表2中に列挙され、米国公開第2010/0111856号に記載される、第2の生物学的分子（例えば、腫瘍抗原）に対する結合特異性を有し得、抗体の抗CD3アームは、ポリペプチドマスクに連結させることができる。

10

表2. 本発明の二特異性抗CD3抗体の腫瘍抗原標的

CD20	Se ma 5 b	LY64
FcRH5	PSCA h l g	FcRH1
HER2	ETBR	IRTA2
LYPD1	MSG783	TMEFF1
LY6G6D	STEAP2	GDNF-Ra1
PMEL17	Tr p M4	TMEM46
LY6E	CRIPTO	LGR5
CD19	CD21	LY6K
CD33	FcRH2	GPR19
CD22	NCA	GPR54
CD79a	MDP	ASPHD1
CD79b	IL20Rα	チロシナーゼ
EDAR	ブレビカン	TMEM118
GFRA1	Ep h B2R	GPR172A
MRP4	ASLG659	GPC3
RET	PSCA	CLL1
STEAP1	GEDA	B7-H4
TENB2	BAFF-R	RNF43
E16	CXCR5	CD70
O772P	HLA-DOB	CXORF61
MPF	P2X5	SLC53D3
Napi3b	CD72	

20

30

【0137】

より具体的には、CD3 TDB抗体は、CD3、ならびにCD20、FcRH5、HER2、LYPD1、LY6G6D、PMEL17、LY6E、CD19、CD33、CD22、CD79A、CD79B、EDAR、GFRA1、MRP4、RET、Steap1、及びTenB2からなる群から選択される第2の生物学的分子に対する結合特異性を有し得る。

40

【0138】

例えば、場合によっては、抗体は、（a）配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つ

50

の超可変領域（HVR）を含む第1の結合ドメインと、CD20に結合する第2の結合ドメインと、を含むマスクCD3／CD20 TDB（マスクCD20 TDB）であり、第1の結合ドメイン（すなわち、抗CD3結合ドメイン）のVHまたはVLドメインのいずれかを、上述のポリペプチドマスク等のポリペプチドマスクに連結させる。CD20に結合する第2の結合ドメインは、例えば、（a）配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの超可変領域（HVR）を含み得る。場合によっては、CD20に結合する第2の結合ドメインは、配列番号44～47の配列をそれぞれ含む重鎖フレームワーク領域FR-H1、FR-H2、FR-H3、及びFR-H4のうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ）、及び／または配列番号48～51の配列をそれぞれ含む軽鎖フレームワーク領域FR-L1、FR-L2、FR-L3、及びFR-L4のうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、もしくは4つ）を含む。場合によっては、CD20に結合する第2の結合ドメインは、例えば、（a）配列番号26の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含むVHドメイン、（b）配列番号27の配列もしくはその配列に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性）を有するアミノ酸配列を含むVLドメイン、または（c）（a）と同様のVHドメイン及び（b）と同様のVLドメイン、を含み得る。

10

20

【0139】

10. 抗体変異体

ある特定の実施形態では、本発明のマスク抗CD3抗体（例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原（例えば腫瘍抗原）に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体）のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び／または他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。抗体のアミノ酸配列変異は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって調製することができる。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／またはそこへの挿入、及び／またはその置換が挙げられる。最終構築物に到達するように、欠失、挿入、及び置換を任意に組み合わせることができるが、但し、その最終構築物が、所望の特徴、例えば、抗原結合性を有することを条件とする。

30

【0140】

a. 置換、挿入、及び欠失変異体

ある特定の実施形態では、1つ以上のアミノ酸置換を有するマスク抗CD3抗体変異体が提供される。置換型変異誘発の目的とする部位としては、HVR及びFRが挙げられる。保存的置換は、表3において、「好ましい置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表3において、「例示的な置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して以下にさらに記載される。アミノ酸置換が目的の抗体中に導入され、その産物が、所望の活性、例えば、保持／改善された抗原結合、減少した免疫原性、または改善されたADCCもしくはCDCについて、スクリーニングされてもよい。

40

表 3. 例示的、かつ好ましいアミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、 L y s、A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u、P C A	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、 A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、 A l a、P h e、ノルロイ シン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、 I l e、A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、 S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、 P h e、A l a、ノルロイ シン	L e u

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って群分けされ得る。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e
- (2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n
- (3) 酸性：A s p、G l u
- (4) 塩基性：H i s、L y s、A r g
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o

10

20

30

40

50

(6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

【0141】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのあるメンバーと別のクラスとの交換を伴う。

【0142】

ある種類の置換型変異体は、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなる試験のために選択される結果として生じる変異体（複数可）は、親抗体と比較したある特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加、免疫原性の低減）の修飾（例えば、改善）を有し、及び／または実質的に保持された親抗体のある特定の生物学的特性を有する。例示的な置換型変異体は、例えば、本明細書に記載の技法等のファージディスプレイに基づく親和性成熟技法を使用して好都合に生成され得る親和性成熟抗体である。簡潔には、1つ以上のHVR残基が変異され、変異体抗体がファージ上にディスプレイされ、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0143】

改変（例えば、置換）がHVRに行われて、例えば、抗体親和性を改善することができる。かかる改変は、HVR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で突然変異を経るコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照されたい）、及び／または抗原と接触する残基において行われてもよく、結果として生じる変異体VHまたはVLは、結合親和性について試験される。二次ライブラリの構築及びそれからの再選択による親和性成熟については、例えば、Hoogenboom et al., Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001))に記載されている。親和性成熟のいくつかの実施形態では、多様性が、様々な方法（例えば、エラープロードPCR、鎖シャフリング、またはオリゴヌクレオチド指向性変異誘発）のうちのいずれかによって、成熟させるために選択された可変遺伝子に導入される。その後、二次ライブラリが作製される。その後、このライブラリがスクリーニングされて、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を特定する。多様性を導入する別の方法は、数個のHVR残基（例えば、一度に4～6個の残基）が無作為化されるHVR指向性アプローチを伴う。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング変異誘発またはモデリングを使用して、特異的に特定され得る。特にCDR-H3及びCDR-L3が標的とされることが多い。

【0144】

ある特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、かかる改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のHVR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的改変（例えば、本明細書に提供される保存的置換）がHVRで行われ得る。かかる改変は、例えば、HVR内の抗原接触残基の外側であってもよい。上述の変異体VH配列及びVL配列のある特定の実施形態では、各HVRは、改変されないか、または1つ、2つ、もしくは3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

【0145】

変異誘発のために標的とされ得る抗体の残基または領域の特定に有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085によって説明される「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基または標的残基群（例えば、arg、asp、his、lys、及びglu等の荷電残基）が特定され、中性または負荷電アミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられて、抗体と抗原との相互作用に影響が及ぼされたかを決定する。さらなる置換が最初の置換に対する機能感受性を示すアミノ酸位置に導入され得る。あるいは、または加えて、抗体と抗原との間の接触点を特定するための抗原-抗体複合体の結晶構造。かかる接触残基及び隣接する残基が置換の候補として標的とされ得るか、また

は排除され得る。変異体はスクリーニングされて、それらが所望の特性を有するかどうかを決定することができる。類似の戦略もまた、1つ以上（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10もしくはそれ以上の）指向性置換突然変異等の変異誘発を耐容し得るまたは有効であり得るマスク抗CD3抗体のポリペプチドマスクの残基（複数可）を特定するために使用され得る。

【0146】

アミノ酸配列挿入としては、長さが1残基から100以上の残基の範囲を含有するポリペプチドの範囲であるアミノ末端及び／またはカルボキシル末端の融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体には、酵素（例えば、ADEPTのための）またはポリペプチドへの抗体のN末端もしくはC末端の融合が挙げられ、これは抗体の血清半減期を増加させる。

10

【0147】

b. グリコシル化変異体

ある特定の実施形態では、本発明のマスク抗CD3抗体（例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原（例えば腫瘍抗原）に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体）は、抗体がグリコシル化される程度を増加または減少させるように変化させられ得る。本発明のマスク抗CD3抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ以上のグリコシル化部位を作り出すかまたは除去するように、アミノ酸配列を変化させることによって、簡便に達成することができる。

20

【0148】

この抗体がFc領域を含む場合、それに結合した炭水化物が改変され得る。哺乳類細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、一般にN結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に結合される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照されたい。オリゴ糖としては、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、ガラクトース、及びシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースが挙げられ得る。いくつかの実施形態では、ある特定の特性が改善された抗体変異体を作製するために、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾が行われ得る。

30

【0149】

一実施形態では、Fc領域に（直接的または間接的に）結合されたフコースを欠く炭水化物構造を有するマスク抗CD3抗体変異体が提供される。例えば、かかる抗体中のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、または20%~40%であり得る。フコースの量は、例えば、WO2008/077546に記載されるMALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に結合したすべての糖構造（例えば、複合体、ハイブリッド、及び高マンノース構造）の合計に対するAsn297での糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域内の約297位（Fc領域残基のEU番号付け）に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体における小規模な配列変異に起因して、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位~300位の間にも位置してもよい。かかるフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許公開第US2003/0157108号（Presta, L.）、同第US2004/0093621号（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）を参照されたい。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関する公報の例としては、US2003/0157108、WO2000/61739、WO2001/29246、US2003/0115614、US2002/0164328、US2004/0093621、US2004/0132140、US2004/0110704、US2004/0110282、US2004/0109865、WO2003/085119、WO2003/0

40

50

84570、WO2005/035586、WO2005/035778、WO2005/053742、WO2002/031140、Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004) が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損した Lec13 CHO細胞 (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)、米国特許出願第US2003/0157108 A1号、Presta, L.、及びWO2004/056312 A1、Adams et al.、特に実施例11)、及びアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞等のノックアウト細胞株 (例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)、Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)、及びWO2003/085107を参照されたい) が挙げられる。

【0150】

二分されたオリゴ糖類を有する、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている、マスク抗CD3抗体変異体がさらに提供される。かかる抗体変異体は、低減されたフコシル化及び／または改善されたADCC機能を有し得る。かかる抗体変異体の例は、例えば、WO2003/011878 (Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号 (Umanaら)、及びUS2005/0123546 (Umanaら) に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。かかる抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。かかる抗体変異体は、例えば、WO1997/30087 (Patelら)、WO1998/58964 (Raju, S.)、及びWO1999/22764 (Raju, S.) に記載されている。

【0151】

c. Fc領域変異体

ある特定の実施形態では、1つ以上のアミノ酸修飾は、本発明のマスク抗CD3抗体 (例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原、例えば腫瘍抗原に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、たとえば本発明のマスクTDB抗体またはその変異体) のFc領域に導入され、それによって、Fc領域変異体を生成し得る。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含むヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fc領域) を含み得る。

【0152】

ある特定の実施形態では、本発明は、すべてではなく、いくつかのエフェクター機能を保有し、それにより、インビボでの抗体の半減期が重要であるが、さらにある特定のエフェクター機能 (補体及びADCC等) が不必要であるか、または有害である用途に対して望ましい候補となる、マスク抗CD3抗体変異体を企図する。インビトロ及び／またはインビボ細胞毒性アッセイを行って、CDC及び／またはADCC活性の低減／枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを行って、抗体がFcγR結合を欠く (故にADCC活性を欠く可能性が高い) が、FcRn結合能力を保持していることを確実にすることができる。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞がFcγRIIIのみを発現する一方で、単球は、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991) の464頁の表3に要約されている。目的とする分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定例が、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986) を参照されたい)、及びHellstrom, I. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985

）、同第5，821，337号（Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)）を参照されたい）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法が用いられ得る（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、及びCytotox 96（登録商標）非放射性細胞毒性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照されたい。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。代替的にまたは追加的に、目的とする分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)）に開示の動物モデルで評価され得る。また、C1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合することができず、それ故にCDC活性を欠くことを確認することができる。例えば、WO2006/029879及びWO2005/100402におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al. J. Immunol. Methods 202:163 (1996)、Cragg, M. S. et al. Blood. 101:1045-1052 (2003)、及びCragg, M. S. and M. J. Glennie Blood. 103:2738-2743 (2004)）を参照されたい）。FcRn結合及びインビボクリアランス／半減期の判定も、当該技術分野で既知の方法を使用し
10
20
て行うことができる（例えば、Petkova, S. B. et al. Int'l. Immunol. 18 (12):1759-1769 (2006)）を参照されたい）。

【0153】

低減したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有する抗体が挙げられる（米国特許第6，737，056号、同第8，219，149号）。かかるFc突然変異体は、アラニンへの残基265及び297の置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体を含む、アミノ酸265位、269位、270位、297位、及び327位のうちの2つ以上において置換を有するFc突然変異体を含む（米国特許第7，332，581号及び同第8，219，149号）。

【0154】

FcRへの結合が改善または低減されたある特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許第6，737，056号；WO2004/056312、及びShields et al., J. Biol. Chem. 9 (2):6591-6604 (2001)）を参照されたい）。

【0155】

ある特定の実施形態では、抗体変異体は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298位、333位、及び／または334位（残基のEU番号付け）での置換を有するFc領域を含む。

【0156】

いくつかの実施形態では、例えば、米国特許第6，194，551号、WO99/51642、及びIdusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)に記載されるように、改変された（すなわち、改善したかまたは減弱したかのいずれかである）C1q結合性及び／または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす改変が、Fc領域においてなされる。

【0157】

増加した半減期、及び母体のIgG類を胎児に移行させる役割を負う新生児型Fc受容体（FcRn）（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)）に対する改善した結合性を伴う抗体が、US2005/0014934A1（Hintonら）に記載されている。それらの抗体は、Fc領域のFcRnへの結合性を改善する1
40
50

つ以上の置換を有するFc領域をそこに含む。かかるFc変異体は、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434のうちの1つ以上での置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものを含む（米国特許第7,371,826号）。

【0158】

Fc領域変異体の他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及びWO94/29351も参照されたい。

【0159】

いくつかの態様では、マスク抗CD3抗体（例えば、マスクTDB）は、N297G突然変異を含むFc領域を含む。いくつかの実施形態では、N297G突然変異を含むマスク抗CD3抗体は、以下の6つのHVR：（a）配列番号2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号3のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号4のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号5のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号6のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号7のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む第1の結合ドメインを含む抗CD3アームと、以下の6つのHVR：（a）配列番号20のアミノ酸配列を含むHVR-H1、（b）配列番号21のアミノ酸配列を含むHVR-H2、（c）配列番号22のアミノ酸配列を含むHVR-H3、（d）配列番号23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、（e）配列番号24のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び（f）配列番号25のアミノ酸配列を含むHVR-L3、を含む第2の結合ドメインを含む抗CD20アームと、抗CD3アームの結合ドメインのVHまたはVLドメインに連結されるポリペプチドマスクと、を含む。

【0160】

いくつかの実施形態では、N297G突然変異を含むマスク抗CD3抗体は、（a）配列番号8のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び（b）配列番号9のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の結合ドメインを含む抗CD3アームと、（a）配列番号26のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び（b）配列番号27のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第2の結合ドメインを含む抗CD20アームと、抗CD3アームの結合ドメインのVHまたはVLドメインに連結されるポリペプチドマスクと、を含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、N297G突然変異を含むマスク抗CD3抗体は、1つ以上の重鎖定常ドメインを含み、該1つ以上の重鎖定常ドメインは、第1のCH1（CH1₁）ドメイン、第1のCH2（CH2₁）ドメイン、第1のCH3（CH3₁）ドメイン、第2のCH1（CH1₂）ドメイン、第2のCH2（CH2₂）ドメイン、及び第2のCH3（CH3₂）ドメインから選択される。いくつかの事例では、1つ以上の重鎖定常ドメインのうちの少なくとも1つは、別の重鎖定常ドメインと対になる。いくつかの事例では、CH3₁及びCH3₂ドメインは各々、突起または空隙を含み、CH3₁ドメイン内の該突起または空隙は、それぞれ、CH3₂ドメイン内の空隙または突起中に位置付けることができる。いくつかの事例では、CH3₁及びCH3₂ドメインは、該突起と空隙との間の境界面において接触する。いくつかの事例では、CH2₁及びCH2₂ドメインは各々、突起または空隙を含み、CH2₁ドメイン内の該突起または空隙は、それぞれ、CH2₂ドメイン内の空隙または突起中に位置付けることができる。他の事例では、CH2₁及びCH2₂ドメインは、該突起と空隙との間の境界面において接触する。いくつかの事例では、抗CD3抗体は、IgG1抗体である。

【0162】

他の実施形態では、N297G突然変異を含むマスク抗CD3抗体は、（a）配列番号8のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び（b）配列番号9のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の結合ドメインを含む抗CD3アームと、（a）配列番号26のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び（b）配列番号27のアミノ酸配列を含むVLドメインを

含む第2の結合ドメインを含む抗CD20アームと、抗CD3アームの結合ドメインのVHまたはVLドメインに連結されるポリペプチドマスクと、を含み、(a)抗CD3アームは、T366S、L368A、Y407V、及びN297G置換突然変異を含み、(b)抗CD20アームは、T366W及びN297G置換突然変異を含む。

【0163】

d. システイン操作された抗体変異体

ある特定の実施形態では、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作された抗体、例えば、「チオマブ(thioMAb)」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換残基は、抗体の利用しやすい部位において生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基がそれにより抗体の接触可能部位に位置付けられ、それを使用して、薬物部分またはリンカー-薬物部分等の他の部分に抗体を複合体化して、本明細書にさらに記載される免疫複合体を作製することができる。ある特定の実施形態では、以下の残基、軽鎖のV205(Kabat付番)、重鎖のA118(EU付番)、及び重鎖Fc領域のS400(EU付番)のうちの任意の1つ以上が、システインで置換されてもよい。システイン操作された抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように作製することができる。

【0164】

e. 抗体誘導体

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される本発明のマスク抗CD3抗体(例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原(例えば腫瘍抗原)に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体)は、当該技術分野で既知であり、容易に利用可能である追加の非タンパク質性部分を含有するためにさらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーを含むが、これに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレノキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、ならびにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造時に有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量のものであり得、分岐状または非分岐状であり得る。本抗体に結合したポリマーの数は異なり得、1つより多くのポリマーが結合している場合、それらは、同じ分子または異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/または種類は、改善される本抗体の具体的な特性または機能、本抗体の誘導体が規定の条件下である療法で使用されるか等を含むが、これらに限定されない検討事項に基づいて決定され得る。

【0165】

別の実施形態では、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る、マスク抗CD3抗体及び非タンパク質性部分の複合体が提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである(Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605(2005))。放射線は、任意の波長のものであってもよく、通常、細胞を傷つけないが、非タンパク質性部分を、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞を死滅させる温度まで加熱する波長を含むが、これらに限定されない。

【0166】

B. 組み換え法及び組成物

本発明のマスク抗CD3抗体（例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原（例えば腫瘍抗原）に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体）は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載される、組み換え法及び組成物を用いて生成され得る。一実施形態では、本明細書に記載されるマスク抗CD3抗体をコードする単離核酸が提供される。かかる核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列及び／または抗体のVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／または重鎖）をコードし得、ポリペプチドマスクは、VLまたはVHドメインのいずれかと同じオープンリーディングフレーム（ORF）内でコードされる。さらなる実施形態では、かかる核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる実施形態では、かかる核酸を含む宿主細胞が提供される。1つのかかる実施形態では、宿主細胞は、（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクターであり、ポリペプチドマスクが、VLドメインもしくはVHドメインのいずれかと同じORF内でコードされる、ベクター、または（2）抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターであって、ポリペプチドマスクが、VLドメインもしくはVHドメインのいずれかと同じORF内でコードされる、第1のベクターを含む（例えば、それらで形質転換されている）。一実施形態では、宿主細胞は、真核生物のもの、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施形態では、マスク抗CD3抗体の作製方法が提供され、該方法は、上に提供されるように、抗体の発現に適した条件下で、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することと、及び任意に、宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から抗体を回収することと、を含む。

【0167】

マスク抗CD3抗体の組み換え産生のために、例えば、上述のもの等の、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び／または発現のために、1つ以上のベクター中に挿入される。かかる核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能であるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離され、配列決定され得る。

【0168】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現のための好適な宿主細胞は、本明細書に記載される原核生物細胞または真核生物細胞を含む。例えば、マスク抗CD3抗体は、特にグリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされないときに、細菌内で産生され得る。細菌内での抗体断片の発現及びポリペプチドについては、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、及び同第5,840,523号を参照されたい。（また、E. coli内での抗体断片の発現を記載するCharlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003)、245～254頁も参照されたい。）発現後、マスク抗CD3抗体は、可溶性画分中で細菌細胞ペーストから単離されてもよく、さらに精製されてもよい。

【0169】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母等の真核微生物は、抗体をコードするベクターに好適なクローニングまたは発現宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトグリコシル化パターンを有するマスク抗CD3抗体の産生をもたらす、真菌及び酵母株を含む。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)、及びLi et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照されたい。

【0170】

グリコシル化マスク抗CD3抗体の発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて、特にSpondoptera frugiperda細胞の

トランスフェクションのために使用され得る、多数のパキウウイルス株が特定されている。

【0171】

植物細胞培養物も宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号（トランスジェニック植物で抗体を産生するための、PLANTIBODIES（商標）技術を記載する）を参照されたい。

【0172】

脊椎動物細胞も宿主として使用することができる。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳類細胞株が、有用である場合がある。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株（COS-7）、ヒト胚性腎臓株（例えば、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)）に記載される293または293細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）に記載されるTM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸部癌細胞（HELA）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝臓細胞（Hep G2）、マウス乳房腫瘍（MMT 060562）、例えば、Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）に記載されるTRI細胞、MRC 5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳類宿主細胞株には、DHFR⁻CHO細胞（Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）を含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ならびにY0、NS0、及びSp2/0等の骨髓腫細胞株が挙げられる。抗体産生に好適なある特定の哺乳類宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 255-268 (2003)を参照されたい。

【0173】

C. アッセイ

本明細書に提供される本発明のマスク抗CD3抗体（例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原（例えば腫瘍抗原）に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体）は、当該技術分野で既知の様々なアッセイによってそれらの物理的／化学的特性及び／または生物学的活性を特徴づけられ得る。

【0174】

1. 結合アッセイ及び競合アッセイ

一態様では、本発明のマスク抗CD3抗体は、例えば、ELISA、ウェスタンブロット等の既知の方法によって、その結合活性に関して試験される。

【0175】

別の態様では、競合アッセイを用いて、CD3への結合について本発明の抗CD3抗体と競合する抗体が特定され得る。ある特定の実施形態では、かかる競合抗体は、本発明の抗CD3抗体が結合するものと同じエピトープ（例えば、直鎖または立体構造のエピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法は、Morris (1996)「Epitope Mapping Protocols,」in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供される。

【0176】

例示的な競合アッセイでは、固定化されたCD3が、CD3に結合する第1の標識抗体と、CD3への結合について第1の抗体と競合するその能力について試験されている第2

10

20

30

40

50

の未標識抗体とを含む溶液中で、インキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化されたCD3を、第1の標識抗体を含むが第2の非標識抗体を含まない溶液中でインキュベートする。第1の抗体のCD3への結合を許容する条件下でのインキュベーションの後、過剰な非結合抗体を除去し、固定化されたCD3に関連する標識の量を測定する。固定化されたCD3に関連する標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に低減される場合、それは、第2の抗体がCD3への結合について第1の抗体と競合していることを示す。例えば、Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

10

【0177】

2. 活性アッセイ

一態様では、所望の生物学的活性を有するマスク抗CD3抗体を特定するためのアッセイが提供される。生物学的活性には、例えば、所望の度合い（すなわち、CD3結合なしから低 K_d を有するCD3結合の範囲に及ぶか、またはCD3についてはマスク抗CD3抗体の好ましい中間体親和性）で、CD3（例えば、T細胞の表面上のCD3）またはそのペプチド断片に、インビボ、インビトロ、またはエキソビボのいずれかで結合することが含まれ得る。

【0178】

本発明のマスクTDBの場合は、望ましい生物学的活性はまた、例えば、ポリペプチドマスクが切断可能である場合、切断されていない状態ではなく切断状態でエフェクター細胞の活性化（例えば、T細胞（例えば、CD8+及び／またはCD4+T細胞）の活性化）及び／または及び／またはエフェクター細胞集団の拡張（すなわち、T細胞計数の増加）を含み得る。ポリペプチドマスクが切断できない場合、望ましい生物学的活性は、例えば、ポリペプチドマスクの不在下での抗CD3抗体のかかる活性と比較して、エフェクター細胞の活性化（例えば、T細胞（例えば、CD8+及び／またはCD4+T細胞）の活性化）の低減もしくは阻害及び／またはエフェクター細胞集団の拡張（すなわち、T細胞計数の増加）を含み得る。他の望ましい活性は、例えば、ポリペプチドマスクが切断可能である場合、切断状態で抗CD3抗体のかかる活性と比較して、切断されない状態で、標的細胞集団の減少またはその低下の阻害（すなわち、それらの細胞表面上に第2の生物学的分子を発現する細胞の集団の減少）及び／または標的細胞を死滅させることを含み得る。ポリペプチドマスクが切断できない場合、望ましい活性は、例えば、ポリペプチドマスクの不在下での抗CD3抗体のかかる活性と比較して、標的細胞集団の減少またはその低下の阻害（すなわち、それらの細胞表面上に第2の生物学的分子を発現する細胞の集団の減少）及び／または標的細胞を死滅させることを含み得る。他の例では、標的細胞集団の減少及び／またはマスク抗CD3抗体による標的細胞の死滅は、エフェクター細胞の活性化（例えば、T細胞（例えば、CD8+及び／またはCD4+T細胞）の活性化）及び／またはエフェクター細胞集団の拡張（すなわち、T細胞計数の増加）がない場合に生じる。

20

30

【0179】

ある特定の実施形態では、本発明のマスク抗CD3抗体は、本明細書において以下の実施例において詳述される、かかる生物学的活性について試験される。

【0180】

D. 免疫複合体及び標識された抗体

本発明は、本明細書において、化学治療剤もしくは薬物、成長阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはそれらの断片）、または放射性同位体等の1つ以上の細胞傷害性薬剤に複合体化されるマスク抗CD3抗体を含む、免疫複合体も提供する。

【0181】

一実施形態では、免疫複合体は、マイタンシノイド（米国特許第5,208,020号

50

、同第5, 416, 064号、及び欧州特許第EP 0 425 235 B1号を参照されたい) ;モノメチルオーリスタチン薬物部分DE及びDF (MMAE及びMMAF)等のオーリスタチン (米国特許第5, 635, 483号、同第5, 780, 588号、及び同第7, 498, 298号を参照されたい) ;ドラスタチン;カリケアマイシンまたはその誘導体 (米国特許第5, 712, 374号、同第5, 714, 586号、同第5, 739, 116号、同第5, 767, 285号、同第5, 770, 701号、同第5, 770, 710号、同第5, 773, 001号、及び同第5, 877, 296号、Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)、ならびにLode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)を参照されたい)、ダウノマイシンまたはドキソルビシン等のアントラサイクリン (Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)、Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)、Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)、Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)、Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)、King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)、及び米国特許第6, 630, 579号) ;メトトレキサート;ビンデシン;ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル等のタキサン;トリコテセン;ならびにCC1065を含むがこれらに限定されない、1つ以上の薬物にマスク抗CD3抗体が複合された抗体-薬物複合体 (ADC) である。

10

20

30

40

50

【0182】

別の実施形態では、免疫複合体は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖 (*Pseudomonas aeruginosa*からの)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファーサルシン、*Aleurites fordii*タンパク質、ジアンシンタンパク質、*Phytolacca americana*タンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、*momordica charantia*阻害剤、クルシン、クロチン、*sapaonarria officinalis*阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンを含むが、これらに限定されない、酵素的活性毒素またはその断片に複合体化される、本明細書に記載されるマスク抗CD3抗体を含む。

【0183】

別の実施形態では、免疫複合体は、放射性原子に複合体化されて放射性複合体を形成する、本明細書に記載されるマスク抗CD3抗体を含む。多様な放射性同位体が、放射性複合体の産生のために利用可能である。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、及びLuの放射性同位体が含まれる。放射性複合体が検出のために使用されるとき、それは、シンチグラフィ研究のための放射性原子、例えば、 tc^{99m} もしくは I^{123} 、または再びヨード-123、ヨード-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、もしくは鉄等の核磁気共鳴 (NMR) 画像法 (磁気共鳴画像法、*mri*としても既知である) のためのスピン標識を含み得る。

【0184】

本発明のマスク抗CD3抗体及び細胞傷害性薬剤の複合体は、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸塩 (SPDP)、サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサ-1-カルボン酸塩 (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (アジブイミド酸ジメチルHCl等)、活性エステル (スベリン酸ジサクシニミジル等)、アルデヒド (グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物 (ビス (p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス- (p-ジアゾニウムベンゾイル) -エチレンジアミン等)、ジイソシア

ネート（トルエン 2，6-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（1，5-ジフルオロ-2，4-ジニトロベンゼン等）等の多様な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製され得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al.，Science 238：1098（1987）に記載されるように調製することができる。炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）は、放射性ヌクレオチドを抗体に複合体化するための例示的キレート剤である。例えば、WO94/11026を参照されたい。カップリング剤は、細胞内において細胞傷害性薬物の放出を容易にするために可逆的であり得る。例えば、Charl et al. Cancer Res. 52：127-131，1992及び米国特許第5，208，020号を参照されたい。

10

【0185】

本明細書のイムヌオ複合体またはADCは、市販される（例えば、Pierce Biotechnology, Inc.，Rockford, IL.，U.S.Aから）BMP S、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、ならびにSVSB（スクシンイミジル-（4-ビニルスルホン）ベンゾエート）を含むがこれらに限定されない、架橋剤試薬で調製されたかかる複合体を明白に企図するが、これらに限定されない。

【0186】

ある特定の実施形態では、標識されたマスク抗CD3抗体が提供される。標識としては、直接検出される標識または部分（蛍光標識、発色団標識、電子密度の高い標識、化学発光標識、及び放射性標識等）、ならびに間接的に、例えば、酵素反応または分子相互作用により検出される酵素またはリガンド等の部分が挙げられるが、これらに限定されない。例示的な標識としては、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H、及び¹³¹I、フルオロフォア、例えば希土類キレートまたはフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルのルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4，737，456号）、ルシフェリン、2，3-ジヒドロフタラジンジオン類、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環式オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼ及びキシナンチンオキシダーゼ、HRP等の、染料前駆体を酸化するために過酸化水素を利用する酵素と結合したもの、ラクトペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼ、ビオチン/アビジン、スピン標識物質、バクテリオファージ標識物質、安定フリーラジカル等が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0187】

E. 薬学的製剤

本発明のマスク抗CD3抗体（例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原（例えば腫瘍抗原）に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体）の薬学的製剤は、所望の純度を有するかかる抗体を1つ以上の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed.（1980））と凍結乾燥製剤または水溶液の形態で混合することによって調製することができる。薬学的に許容される担体は、一般に、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、それらとしては、緩衝液、例えば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸及びメチオニン；防腐剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペン

40

50

タンパク質；及びm-クレゾール等）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン；単糖、二糖、及び他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノース、またはデキストリン；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／または非イオン界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLEN EX（登録商標）、Baxter International, Inc.）等のヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質等の介在性薬物分散剤をさらに含む。rHuPH20を含むある特定の例示的なsHASEGP及び使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様では、sHASEGPは、コンドロイチナーゼ等の1つ以上のさらなるグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0188】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第6,171,586号及びWO2006/044908に記載されるものを含み、後者の製剤は、ヒスチジン-アセテート緩衝剤を含む。

【0189】

本明細書の製剤はまた、治療されている特定の適応症の必要に応じて、1つを上回る活性成分、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する成分を含有してもよい。例えば、追加の治療剤（例えば、化学療法剤、細胞傷害性剤、成長阻害剤、及び／または抗ホルモン剤、例えば、本明細書において上に言及されたもの）をさらに提供することが望ましくあり得る。かかる活性成分は、好適には、意図される目的に有効な量で、組み合わせで存在する。

【0190】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技法または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）中に、またはマクロエマルジョン中に封入され得る。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0191】

徐放性調製物を調製してもよい。持続放出調製物の好適な例としては、本抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、これらのマトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。

【0192】

インビボ投与に使用される製剤は、一般に、滅菌のものである。滅菌性は、例えば、滅菌濾過膜を介する濾過によって容易に達成され得る。

【0193】

F. 治療法及び組成物

本発明のマスク抗CD3抗体（例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原（例えば腫瘍抗原）に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体）のうちのいずれかは、治療方法で使用され得る。

【0194】

一態様では、医薬品として使用するためのマスク抗CD3抗体が提供される。さらなる態様では、細胞増殖性障害（例えば、癌）または自己免疫性障害（例えば、関節炎）の治

10

20

30

40

50

療またはその進行の遅延において使用するためのマスク抗CD3抗体が提供される。ある特定の実施形態では、治療方法において使用するためのマスク抗CD3抗体が提供される。ある特定の実施形態では、本発明は、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する個体を治療する方法において使用するためのマスク抗CD3抗体を提供し、本方法は、個体に、有効量のマスク抗CD3抗体を投与することを含む。1つのかかる実施形態では、本方法は、例えば、以下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む。さらなる実施形態では、本発明は、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する個体の免疫機能の増強において使用するためのマスク抗CD3抗体を提供し、本方法は、個体に、有効量のマスク抗CD3抗体を投与し、エフェクター細胞（例えば、T細胞、例えば、CD8+及び／またはCD4+T細胞）を活性化し、エフェクター細胞集団を拡張する（増加させる）、標的細胞（例えば、本発明のマスクTDBによって認識される第2の生物学的分子を発現する細胞）集団を減少させる、及び／または標的細胞（例えば、標的腫瘍細胞）を死滅させることを含む。上記実施形態のうちのいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0195】

さらなる態様では、本発明は、医薬品の製造または調製におけるマスク抗CD3抗体の使用を提供する。一実施形態では、医薬品は、細胞増殖性障害（例えば、癌）または自己免疫性障害（例えば、関節炎）の治療のためのものである。さらなる実施形態では、医薬品は、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する個体に有効量の医薬品を投与することを含む、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を治療する方法において使用するものである。1つのかかる実施形態では、本方法は、例えば、以下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む。さらなる実施形態では、医薬品は、エフェクター細胞（例えばT細胞、例えば、CD8+及び／またはCD4+T細胞）を活性化し、エフェクター細胞集団を拡張する（増加させる）、標的細胞（例えば、本発明のマスクTDBによって認識される第2の生物学的分子を発現する細胞）集団を減少させる、及び／または個体における標的細胞（例えば、標的腫瘍細胞）を死滅させるためのものである。さらなる実施形態では、医薬品は、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する個体における免疫機能を増強する方法において使用するものであり、本方法は、個体に、有効量の医薬品を投与し、エフェクター細胞（例えば、T細胞、例えば、CD8+及び／またはCD4+T細胞）を活性化し、エフェクター細胞集団を拡張する（増加させる）、標的細胞（例えば、本発明のマスクTDBによって認識される第2の生物学的分子を発現する細胞）集団を減少させる、及び／または標的細胞（例えば、標的腫瘍細胞）を死滅させることを含む。上記実施形態のうちのいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0196】

さらなる態様では、本発明は、細胞増殖性障害（例えば、癌）または自己免疫性障害（例えば、関節炎）を治療するための方法を提供する。一実施形態では、本方法は、このような細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する個体に、有効量のマスク抗CD3抗体を投与することを含む。1つのかかる実施形態では、本方法は、例えば、以下に記載されるような、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む。上記実施形態のうちのいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0197】

さらなる態様では、本発明は、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する個体において、細胞増殖性障害または自己免疫性障害を有する個体における免疫機能を増強するための方法を提供する。一実施形態では、本方法は、個体に、有効量のマスク抗CD3抗体を投与し、エフェクター細胞（例えば、T細胞、例えば、CD8+及び／またはCD4+T細胞）を活性化し、エフェクター細胞集団を拡張する（増加させる）、標的細胞（例えば、本発明のマスクTDBによって認識される第2の生物学的分子を発現する細胞）集

団を減少させる、及び／または標的細胞（例えば、標的腫瘍細胞）を死滅させることを含む。一実施形態では、「個体」は、ヒトである。

【0198】

さらなる態様では、本発明は、例えば、上述の治療方法のいずれかにおいて使用するための、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体のうちのいずれかを含む、薬学的製剤を提供する。一実施形態では、薬学的製剤は、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体のうちのいずれか及び薬学的に許容される担体を含む。別の実施形態では、薬学的製剤は、本明細書に提供されるマスク抗CD3抗体のうちのいずれかと、例えば以下に記載されるような少なくとも1つの追加の治療剤とを含む。

【0199】

本発明のマスク抗CD3抗体は、療法において、単独で、または他の薬剤と組み合わせて使用することができる。例えば、本発明の抗体は、少なくとも1つの追加の治療剤と同時に投与されてもよい。ある特定の実施形態では、追加の治療剤は、化学治療剤、成長阻害剤、細胞傷害性薬剤、放射線療法で使用する薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、または上皮成長因子受容体（EGFR）アンタゴニスト（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、HER1/EGFR阻害剤（例えば、エルロチニブ（Tarceva（商標））、血小板由来成長因子阻害剤（例えば、Gleevec（商標）（メシル酸イマチニブ））、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、次の標的Erbb2、Erbb3、Erbb4、PDGFR-ベータ、BlyS、APRIL、BCMA、VEGF、もしくはVEGF受容体（複数可）のうちの1つ以上に結合する抗体等の本発明の抗CD3抗体以外の抗体、TRAIL/Apo2、または別の生物活性もしくは有機化学剤等の他の薬剤である。

【0200】

本発明のマスク抗CD3抗体はまた、PD-1軸結合アンタゴニストと組み合わせて、単独で、または追加の治療剤とともに使用することもできる。場合によっては、PD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト、またはPD-L2結合アンタゴニストであり得る。PD-1結合アンタゴニストは、例えば、MDX-1106（ニボルマブ）、MK-3475（ランプロリズマブ）、CT-011（ピジリズマブ）、またはAMP-224であり得る。PD-L1結合アンタゴニストは、例えば、YW243、55、S70、MPDL3280A、MDX-1105、またはMEDI4736であり得る。PD-L2結合アンタゴニストは、抗体またはイムノアドヘシンであり得る。

【0201】

他の例では、本発明のマスク抗CD3抗体は、デキサメタゾン等のグルココルチコイドと組み合わせて使用してもよい。上の併用療法の中のいずれかにおいても、マスク抗CD3抗体はまた、リツキシマブと組み合わせて使用してもよい。

【0202】

かかる併用療法には、組み合わせ投与（2つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤中に含まれる）及び別個の投与が含まれ、別個の投与の場合、本発明の抗体の投与は、追加の治療剤（複数可）の投与の前、それと同時に、及び／またはその後に行うことができる。一実施形態では、マスク抗CD3抗体の投与及び追加の治療剤の投与は、互いの約1ヶ月以内、または約1週間、2週間、もしくは3週間以内、または約1、2、3、4、5、もしくは6日以内に生じる。本発明のマスク抗CD3抗体（例えば、CD3及び第2の生物学的分子、例えば、細胞表面抗原（例えば腫瘍抗原）に結合する本発明のマスク抗CD3抗体、例えば、本発明のマスクTDB抗体またはその変異体）はまた、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

【0203】

本発明の抗体（及び／または任意の追加の治療剤）は、非経口投与、肺内投与、及び鼻腔内投与、ならびに局所治療で所望される場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、また

10

20

30

40

50

は皮下投与が含まれる。投薬は、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に応じて、任意の好適な経路、例えば、静脈内または皮下注射等の注射によるものであってもよい。単回投与または種々の時点にわたる複数回投与、ボラス投与、及びパルス注入を含むが、これらに限定されない、種々の投薬スケジュールが本明細書で企図される。

【0204】

本発明のマスク抗体は、良好な医療行為と一致する様式で、製剤化され、投薬され、及び投与されるだろう。これに関連して考慮する要因には、治療されている特定の障害、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュールリング、及び医師に既知である他の要因を含む。抗体は必然的にではなく任意に、問題の障害を予防または治療するために現在使用される1つ以上の薬剤とともに製剤化される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または治療の種類、及び上で考察される他の要因に左右される。これらは一般に、本明細書に記載されるものと同じ投薬量及び投与経路で、または本明細書に記載される投薬量の約1～99%で、または適切であると経験的／臨床的に決定される任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

【0205】

疾患の予防または治療に関して、本発明のマスク抗体の適切な投薬量は（単独で、または1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用される場合）、治療される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴、及び抗体への応答、ならびに主治医の裁量に左右される。抗体は好適に、1回で、または一連の治療にわたって患者に投与される。

【0206】

一般的な提案として、ヒトに投与される治療有効量のマスク抗CD3抗体は、1回以上の投与によるかにかかわらず、約0.01～約100mg／患者の体重kgの範囲であろう。いくつかの実施形態では、使用されるマスク抗体は、例えば、約0.01～約45mg／kg、約0.01～約40mg／kg、約0.01～約35mg／kg、約0.01～約30mg／kg、約0.01～約29mg／kg、約0.01～約28mg／kg、約0.01～約27mg／kg、約0.01～約26mg／kg、約0.01～約25mg／kg、約0.01～約24mg／kg、約0.01～約23mg／kg、約0.01～約22mg／kg、約0.01～約21mg／kg、約0.01～約20mg／kg、約0.01～約19mg／kg、約0.01～約18mg／kg、約0.01～約17mg／kg、約0.01～約16mg／kg、約0.01～約15mg／kg、約0.01～約14mg／kg、約0.01～約13mg／kg、約0.01～約12mg／kg、約0.01～約11mg／kg、約0.01～約10mg／kg、約0.01～約9mg／kg、約0.01～約8mg／kg、約0.01～約7mg／kg、約0.01～約6mg／kg、約0.01～約5mg／kg、約0.01～約4mg／kg、約0.01～約3mg／kg、約0.01～約2mg／kg、または約0.01～約1mg／kgが毎日投与される。一実施形態では、本明細書に記載されるマスク抗CD3抗体は、21日周期の1日目に、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、または約1400mgの用量でヒトに投与される。用量は、注入物等の、単回用量で、または複数回用量（例えば、2回用量または3回用量）で投与されてもよい。病態に応じて数日間以上にわたって反復投与では、治療は一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続されるだろう。マスク抗CD3抗体の1つの例示的な投薬量は、約0.05mg／kg～約10mg／kgの範囲だろう。したがって、約0.5mg／kg、2.0mg／kg、4.0mg／kg、または10mg／kgの1つ以上の用量（またはそれらの任意の組み合わせ）が、患者に投与され得る。かかる用量は、断続的に、例えば、毎週、または3週間毎に投与されてもよい（例えば、患者が、約2回～約20回、または例えば、約6回用量のマスク抗CD3抗体を受容するようにする）。より高い初回負荷量、続いて1回以上のより低い用量が、投与されてもよ

い。この療法の進行は、従来の技法及びアッセイによって容易に監視される。

【0207】

いくつかの実施形態では、これらの方法は、さらなる療法をさらに含み得る。追加の療法は、放射線療法、手術、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノ療法、モノクローナル抗体療法、または前述のものの組み合わせであってもよい。さらなる療法は、アジュバント療法またはネオアジュバント療法の形態であり得る。いくつかの実施形態では、さらなる療法は、小分子酵素阻害剤または抗転移薬の投与である。いくつかの実施形態では、さらなる療法は、副作用制限剤（例えば、治療の副作用の発生及び／または重症度を軽減するよう意図された薬剤、例えば、制嘔吐剤等）の投与である。いくつかの実施形態では、さらなる療法は、放射線療法である。いくつかの実施形態では、さらなる療法は、手術である。いくつかの実施形態では、さらなる療法は、放射線療法と手術との併用である。いくつかの実施形態では、さらなる療法は、ガンマ照射である。いくつかの実施形態では、追加の療法は、上述の治療剤のうちの1つ以上の別個の投与であってもよい。

10

【0208】

G. 製造品

本発明の別の態様では、上述の障害の治療、予防、及び／または診断に有用な材料を含む製造品が提供される。製品は、容器と、容器上のまたは容器に関連するラベルまたは添付文書と、を含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル瓶、シリンジ、IV溶液バッグ等が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は、それ自体によって、または別の組成物と組み合わせて、病態の治療、予防、及び／または診断に有効である組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、静脈注射溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能な栓を有するバイアル瓶であり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は、本発明のマスク抗CD3抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が、選定した病態を治療するために使用されることを示す。さらに、製品は、(a) 本発明のマスク抗CD3抗体を含む組成物をその中に収容した第1の容器、及び(b) さらなる細胞傷害性薬剤、さもなければ治療剤を含む組成物をその中に収容した第2の容器を含み得る。本発明のこの実施形態の製品は、組成物を使用して特定の病態を治療することができることを示す添付文書をさらに含み得る。代替または追加として、製品は、注射用静菌水(BWF I)、リン酸干渉食塩水、リンガー溶液、及びデキストロース溶液等の薬学的に許容される緩衝液を備える第2（または第3）の容器をさらに備えてもよい。それは、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的観点及びユーザの観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

20

30

【0209】

III. 実施例

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上に提供される概要を仮定して、種々の他の実施形態が実践され得ることが理解される。

【0210】

実施例1. 材料及び方法

ファージ結合ELISA

N末端グルタミン残基を環化して、ピログルタミン酸塩(PCA)残基を生成するために、アッセイの前に、すべてのPEG沈殿ファージ調製物をQ-シクラーゼで処理した。ファージ調製物を、これまでに試験した濃度に希釈して、非マスク抗CD3抗体ファージに対して450nmで、約1.0 ODのELISA結合シグナルを得た。

40

【0211】

トロンビンで処理した試料については、トロンビンCleanCleaveキット(Sigma-Aldrich、番号RECOMT)を、キットの取扱説明書に従って使用した。トロンビンCleanCleaveは、50%(v/v)懸濁液のトロンビン-アガロースである。樹脂スラリーを、切断緩衝液(50mM Tris-HCl、pH8.0、

50

10 mM CaCl_2) で3回洗浄し、各洗浄後に、500 x g 遠心分離で懸濁液を除去した。ベレット樹脂を、1 倍の切断緩衝液中で再懸濁し、樹脂 1 : 5 を希釈した。

【0212】

マスク抗 CD3 ファージ変異体を、10.0 ml の一晚培養から精製した。2 ラウンドの PEG 沈殿後、ベレットファージを、1 倍の切断緩衝液中で再懸濁し、268 nm で 4.0 の OD リーディングを得た。切断反応のために、200 μl のトロンビンアガローススラリーを、微小遠心管中で、200 μl の精製ファージに添加した。混合物を、穏やかに振盪しながら、37°C で一晚インキュベートした。ビーズを遠心分離によって除去し、ファージを含有する残りの上清を、アッセイプレートに添加した。

【0213】

CD3 ϵ ¹⁻²⁷ Fc (CD3 ϵ -Fc ; 例えば、U. S. S. N. 61/949, 950 を参照されたい) を、Nunc Maxisorp プレート上に 4°C で PBS 中で一晚コーティングした。PBS Tween (0.05% Tween 20 を含有する PBS) 中の 2% ミルクで 1 時間遮断した後、ファージ上にディスプレイされた PEG 精製したマスク抗 CD3 抗体変異体を、トロンビンによる前処理の前またはその後で結合した。1 時間後、マイクロタイタープレートを 3 回洗浄し、HRP 複合化抗 M13 抗体でインキュベートした。結合シグナルは、軽鎖の C 末端上にディスプレイされた gD タグに結合することによって評価される、ディスプレイのために規格化された。

【0214】

ヒト T 細胞活性化アッセイ

ヘパリン処理されたシリンジ中でヒト血液を採取し、製造業によって推薦される、Leucosep (Greiner Bio-One, Cat. No. 227290P) 及び Ficoll Paque Plus (GE Healthcare Biosciences、カタログ番号 95038-168) を用いて、末梢血単核細胞 (PBMC) を単離した。細胞を、GlutaMax (Gibco、カタログ番号 35050-061) を補充した 10% FBS、ペニシリン、及びストレプトマイシン (Gibco、カタログ番号 15140-122) を含有する RPMI 培地中で洗浄し、約 200,000 個の浮遊細胞を 96 ウェル U 底プレートに追加した。1 つの抗 CD20 アーム及び 1 つの抗 CD3 アームを有する CD3/CD20 TDB (CD20 TDB) を、以前に記載されているように、ヒト IgG1 としてノブ-イントゥーホール (knob-into-hole) 形式で完全長抗体として産生した (例えば、Atwell et al. J. Mol. Biol. 270:26-35, 1997 及び U. S. S. N. 61/949, 950 を参照されたい)。CD20 TDB を、10~0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でウェルに添加した。約 20 時間培養した後、細胞を、FACS 緩衝液 (0.5% BSA、PBS 中 0.05% のアジ化ナトリウム) で細胞を洗浄した。次いで、細胞を、FACS 緩衝液中で抗 CD69-FITC (BD Biosciences、カタログ番号 555530)、抗 CD25-PE (BD Biosciences、カタログ番号 555432)、及び抗 CD8-APC (BD Biosciences、カタログ番号 555369) で染色し、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヨウ化プロピジウム (PI) を含有する 100 μl の FACS 緩衝液中で懸濁した。データを FACS Calibur フローサイトメーター (BD Biosciences) 上で収集した。T 細胞活性化の程度は、CD8⁺ T 細胞中の CD69⁺ 及び CD25⁺ 集団の割合を比較することによって決定された。

【0215】

内因性 B 細胞死滅

Ficoll 分離によって健常ドナーの全血からヒト PBMC を単離した。製造業者の指示書に従って Miltenyi キットを用いて、CD4⁺ T 細胞及び CD8⁺ T 細胞を分離した。細胞を、加湿標準細胞培養インキュベータにおいて 37°C で、10% FBS を補充した RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) 中で培養した。200,000 個の PBMC を、様々な濃度の CD20 TDB 抗体 (上述の) で 48 時間インキュベートした。各アッセイの終了時に、生存 B 細胞は、FACS によって PI-CD19⁺ ま

10

20

30

40

50

たは P I - C D 2 0 + B 細胞としてゲートアウトされ、内部計数対照として反応混合物に追加される F I T C ビーズを用いて細胞絶対数を得た。細胞死滅の割合 (%) を、非 T D B 治療対照に基づいて計算した。活性化 T 細胞は、C D 6 9 及び C D 2 5 表面発現によって検出された。

【0216】

実施例 2. 阻害におけるポリペプチドマスク長さの効果

本明細書に提供され、米国公開第 2 0 1 5 - 0 1 6 6 6 6 1 号 (参照によりその全体が本明細書に組み込まれる) における抗 C D 3 抗体は、C D 3 ε の N 末端に結合する。本明細書に記載される、抗 C D 3 抗体に対する天然 C D 3 ε の N 末端配列の係留部分は、T 細胞上の C D 3 ε への結合から抗 C D 3 抗体を阻害することができる「ポリペプチドマスク」を形成する。

10

【0217】

図 1 及び 2 に示されるように、異なるレベルの阻害は、天然 C D 3 ε の N 末端配列を含むポリペプチドマスクの成分であるマスキング部分 (M M) の長さを短くしたり、長くしたりすることによってポリペプチドマスクの全体の長さを変えることによって達成される。2 つの異なる抗 C D 3 抗体との関連において M M の長さを変える効果を試験した。このために、1 ~ 2 7 の範囲のアミノ酸残基 (図 1 C 及び 2 C ; 配列番号 5 2 ~ 7 8) の M M を有するポリペプチドマスクを、抗 C D 3 抗体 S P 3 4 (図 1 A) の重鎖可変 (V H) 領域の N 末端または第 2 の異なる抗 C D 3 抗体変異体 (図 2 A) の V H 領域の N 末端のいずれかに連結させた。加えて、1 ~ 2 7 の範囲のアミノ酸残基の M M を有するポリペプチドマスクを、同様に、S P 3 4 (図 1 B) の軽鎖可変 (V L) 領域の N 末端または第 2 の異なる抗 C D 3 抗体変異体 (図 2 B) の V L 領域の N 末端のいずれかに連結させた。ファージミドベクターにおいて生成され、ファージ上に一価提示させた構築物のそれぞれは、M M 成分といずれかの抗体可変ドメインの N 末端との間にトロンビン切断部位 (すなわち、切断可能な部分 (C M)) を含んだ。C D 3 ε への結合は、上述のように、ファージ E L I S A を用いて評価した。

20

【0218】

マスク S P 3 4 抗体については、V H 領域がトロンビン切断部位を介して処理されたヒト C D 3 ε の初めから 5 つの残基のみを含むマスキング部分を有するポリペプチドマスクに連結させた場合に、C D 3 ε 結合の阻害が、観察された (図 1 A) 。全般に、このマスクを S P 3 4 抗体変異体の V L 領域に連結させた場合に、より長いポリペプチドマスクが C D 3 ε 結合を遮断するために必要であった (図 1 B) 。第 2 の異なる抗 C D 3 抗体のマスク変異体については、抗 C D 3 抗体変異体の V L または V H 領域のいずれかに連結させて処理されたヒト C D 3 ε の初めから 5 つの残基のみを含むマスキング部分を有するポリペプチドマスクは、C D 3 ε への結合を有意に遮断した (図 2 A 及び 2 B) 。

30

【0219】

すべてのマスク変異体については、C D 3 ε 結合は、トロンビンによる処理後に再構築した。全般に、より長いポリペプチドマスクは、より有効に除去され、より長いポリペプチドマスクがさらに有効なトロンビン切断を支持することを示唆している。

【0220】

実施例 3. 阻害におけるポリペプチドマスク含量の効果

C D 3 ε へのファージ提示した抗 C D 3 抗体結合を阻害するのに必要とされる、N 末端の C D 3 ε 配列の M M の最低含量を決定するために、抗 C D 3 抗体の V H 領域に連結させたポリペプチドマスク長さ全体が、G S リンカー部分 (L M) の含有によって 2 7 のアミノ酸で一定に保たれ、C D 3 ε 残基の数が系統的に減少した (図 3 B 、配列番号 7 9 ~ 8 8) 。図 3 A に示されるように、処理されたヒト C D 3 ε の初めから 6 つの残基は、C D 3 ε 結合を完全に遮断するには十分である。処理されたヒト C D 3 ε の初めから 3 つ ~ 5 つの残基のみを含むマスクを用いた中等度の阻害が、観察された (図 3 A) 。すべての変異体によって C D 3 ε への結合は、トロンビンによる処理後に修復した (図 3 A) 。

40

【0221】

50

実施例 4. CD3/CD20 TDB (CD20 TDB) の生体内分布及び有効性におけるマスクの効果

インビボで 2 つの異なる標的細胞集団を対照とする二重特異性抗体の生体内分布は、各標的に対する二重特異性抗体の親和性及び接触可能性によって異なるであろう。固形腫瘍を標的とする TDB については、T 細胞上の CD3ε の接触可能性は、IgG の制限された腫瘍を透過する能力のため、固形腫瘍に提示される抗原のものよりもはるかに高い。二重特異性の両方のアームが等しい濃度で存在することから考えると、腫瘍に対する TDB の生体内分布をシフトし得るあるアプローチは、腫瘍抗原に対する親和性が CD3ε に対する親和性よりもはるかに高いため、二重特異性の各アームの親和性を調節し得る。しかしながら、腫瘍抗原親和性と CD3ε 結合親和性との間に得られ得る潜在的な親和性比率は、實用限界を有する。標的物への非常に高い親和性は、得ることが困難である場合があり、CD3ε に対して非常に低い親和性は、TDB の潜在性を低下させ得る。

【0222】

CD3ε 結合を減弱させるポリペプチドマスクは、際立った利点を有し、生体内分布を変化させる新規のアプローチを提供する。CD3 結合の阻害及び生体内分布を変化させるためにタンパク質分解または他の手段によってポリペプチドマスクを除去するのではなく、抗 CD3 抗体による CD3 結合の阻害の制御された変化は、「固定されたポリペプチドマスク」の使用によっても構築され得る。図 4B (配列番号 89~94) 及び図 4C (配列番号 95~99) に示されるもののような固定されたポリペプチドマスクは、CM を含まず、それらが連結している抗 CD3 抗体から容易に除去することができない。図 4A に示されるように、抗 CD3 抗体による CD3ε 結合は、異なる全長を有する固定されたポリペプチドマスクを使用することによって任意の所望の度合いに特異的に減弱され得る。適切な長さ及び含量を選択することによって、CD3ε 結合は、0~100% のいずれかに阻害され得、これは、1 から無限大に親和性比率を変化させることに等しい。さらに、このアプローチの効果は、会合速度 (K_a) への特異的かつ直接的な影響を有し、これは、抗 CD3 抗体の活性濃度が、マスクの長さ及び含量によって制御される、結合状態と非結合状態との間で平衡にあるマスクによって有効に軽減されるためである。ポリペプチドマスクは、CD3ε への抗 CD3 抗体結合の速度を低下させ、 k_a の低下をもたらす。

【0223】

TDB との関連においてポリペプチドマスクの効果を評価するために、1 つの抗 CD20 アームと、固定された 12~16-aa のポリペプチドマスクを有するその VH 領域で連結した 1 つの抗 CD3 アームとを有する CD3/CD20 TDB (CD20 TDB) が生成された (図 4B)。生成されたマスク CD20 TDB の重鎖は、以下の通りに設計された。

12aa = 抗 CD3 抗体 7-5: QDGN EEMGGSGG (配列番号 100) - 抗 CD3 抗体重鎖

14aa = 抗 CD3 抗体 7-7: QDGN EEMGGSGGSG (配列番号 101) - 抗 CD3 抗体重鎖

15aa = 抗 CD3 抗体 7-8: QDGN EEMGGSGGSGG (配列番号 102) - 抗 CD3 抗体重鎖

16aa = 抗 CD3 抗体 7-9: QDGN EEMGGSGGSGGS (配列番号 103) - 抗 CD3 抗体重鎖

マスク CD20 TDB は、以前に記載されているように、ノブ-イントゥーホール形式で完全長抗体として産生され (例えば、Atwell et al. J. Mol. Biol. 270: 26-35, 1997 及び U. S. S. N. 14/574, 132 (米国公開第 2015-0166661 号) を参照されたい)、(CD20 TDB のポリペプチドマスクが VL 領域ではなく VH 領域で連結されていることを除いて) 図 4D に示される一般構造を有する。

【0224】

これらの固定されたマスク CD20 TDB は、続いて、上述のように、非マスク CD

20 TDBと比較して、インビトロでのB細胞死滅及びT細胞活性化アッセイにおける有効性について試験した。固定されたマスクの存在により、軽減されたCD3ε結合は、インビトロでのT細胞依存性の内因性B細胞死滅の減弱をもたらし、マスク全長が長いほど、インビトロでのB細胞死滅のより大きい度合いの減弱をもたらした(図4E)。

【0225】

様々なMM及びLMの長さの固定された9ーから12ーaaのポリペプチドマスクを有するそれらのVH領域で連結したさらなるCD20 TDBも生成された(図4C)。これらの生成されたマスクCD20 TDBの重鎖は、以下の通りに設計された。

マスク3. 9 = Q D G S G G G S G G G S (配列番号95) - 抗CD3抗体重鎖

マスク4. 5 = Q D G N S G G G S (配列番号96) - 抗CD3抗体重鎖

マスク4. 6 = Q D G N S G G G S G (配列番号97) - 抗CD3抗体重鎖

マスク5. 7 = Q D G N E S G G G S G G (配列番号98) - 抗CD3抗体重鎖

マスク6. 6 = Q D G N E E S G G G S G (配列番号99) - 抗CD3抗体重鎖

これらのマスクCD20 TDBは、上述のように、ノブ-イントゥーホール形式で完全長抗体として産生した。

【0226】

これらの固定されたマスクCD20 TDBはまた、上述のように、非マスクCD20 TDB対照と比較して、インビトロでのB細胞死滅及びT細胞活性化アッセイにおける有効性についても試験した。全般に、より長いMM長さは、インビトロでのCD8⁺T細胞活性化(図4F)及びインビトロでのB細胞死滅(図4G)のより大きな減弱をもたらした。図4D及び4Eにおいて試験された他のCD20 TDBから得られた結果と一致して、(例えば、より長いLMによって)より長いマスク全長を有するCD20 TDBも、インビトロでのCD8⁺T細胞活性化及びB細胞死滅のより大きな減弱をもたらした(例えば、マスク4. 5及び4. 6 CD20 TDBを比較)。

【0227】

マスクTDBは、組み換え抗原一本鎖CD3εγヘテロ二量体におけるそれらの結合親和性についてさらにアッセイした(Kim, et al. J. Mol. Biol. 302 : 899-916, 2000)。マスク4. 5、マスク4. 6、及びマスク5. 7 CD3/CD20 TDBの結合親和性は、4つの親和性変異体の非マスクCD3/CD20 TDB、非マスクv1 (配列番号18 (VH) 及び配列番号19 (VL))、非マスクv3 (配列番号107 (VH) 及び配列番号108 (VL))、非マスクv4 (配列番号109 (VH) 及び配列番号110 (VL))、及び非マスクv5 (配列番号111 (VH) 及び配列番号112 (VL))の結合親和性と比較した。このアッセイでは、マスクまたは親和性変異体CD3/CD20 TDBを、抗ヒトIgG (Fc) 抗体捕捉キット(GE Healthcare)を用いたアミンカップリングを通してBiacore CM5シリーズSチップ上に固定化した。組み換えCD3εγ抗原を、0.39 nM~500 nMの2倍希釈の濃度シリーズで捕捉したCD3/CD20 TDB上を通過させ、HBS-P泳動緩衝液(pH 7.4)中に調製された。各結合サイクルは、10 mMのグリシン(pH 1.7)を用いて再生ステップが続いた。結合応答は、空のフローセルから結合シグナルを控除することによって訂正した。親和性値は、 k_{on} 及び k_{off} の同時フィッティングの1:1 Langmuirモデルを、Biacore T200 BIAevaluationソフトウェアによって計算した。

【0228】

マスクCD3/CD20 TDB変異体を、同じ全親和性(K_D)の非マスクCD3/CD20 TDB親和性変異体と比較する場合、マスクバージョンのCD3/CD20 TDBは、より遅いオフ速度を有する。全般に、各マスクCD3/CD20 TDB変異体の親和性が減少する場合に、オフ速度が一定になる。しかしながら、非マスクCD3/CD20 TDB親和性変異体については、親和性の減少は、オフ速度に反映する。図4Hの表に要約される結果は、該マスクが濃度依存性変数である会合速度(k_a)の減少によって表される抗CD3結合部分の活性濃度を低下させるという仮説を支持する。 k_a の

減少は、T細胞上のCD3分子の前に、標的抗原に優先的に結合するCD3／CD20 TDB（この場合、CD20）をもたらす。マスクバージョンの動的特性は、局所的な細胞死滅活性に対して好ましい。より遅いオン速度は、非特異的結合及びT細胞の活性化の可能性を減少するが、より遅いオフ速度は、細胞－細胞の架橋接触及び標的特異性の細胞傷害性におけるさらなる時間を可能にする。

【0229】

非マスクCD3／CD20 TDB親和性変異体（非マスクv1、非マスクv3、非マスクv4、非マスクv5）及びマスクCD3／CD20 TDB変異体（マスク4.5、マスク4.6、マスク5.7）に対するT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害性の比較は、マスクCD3／CD20 TDBに対する所望の反応速度に反映する。マスクCD3／CD20 TDBは、同程度の K_D の非マスクCD3／CD20親和性変異体と比較する場合に、より低いレベルのT細胞活性化を有した。さらに、非マスクCD3／CD20

TDB親和性変異体は、親和性の低下と関連して細胞死滅活性のより大きな欠失を示したが、より低い親和性のマスクCD3／CD20 TDBは、低レベルのT細胞活性化を有するより良好な細胞死滅活性を維持した（図4I）。

【0230】

集合的に、データは、マスクTDB等のマスク抗CD3抗体が、関与標的細胞及びT細胞の細胞生体内分布を独自に変化させて、TDBの有効性を制御することができることを示す。ポリペプチドマスクの長さ及び含量を変化させることに加えて、マスク抗CD3抗体の活性化はまた、環境依存性の様式でその除去を可能にするマスクにおいてCMの組み込みによって調節され得る（例えば、WO2012/025525を参照されたい）。例えば、腫瘍微環境において上方調節したプロテアーゼ活性をうまく利用するように設計された好適なタンパク質分解部位が、記載されている（Lopez-Otin et al. Nat Rev Cancer. 7:800-808, 2007）。

【0231】

他の実施形態

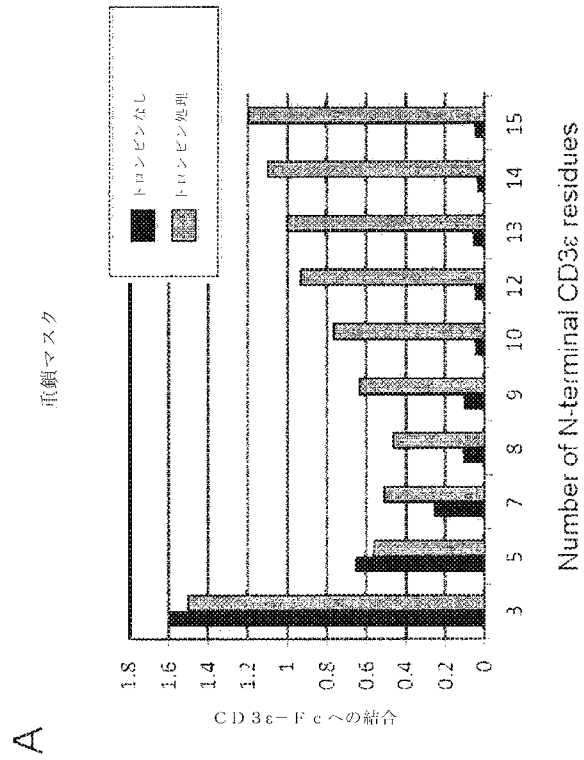
前述の発明が明確な理解のために例証及び例によって多少詳しく説明されているが、これらの説明及び例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用されるすべての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

10

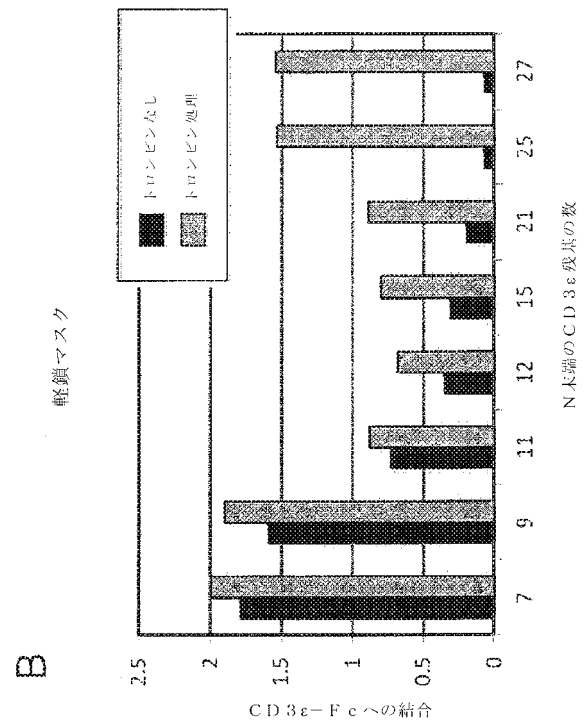
20

30

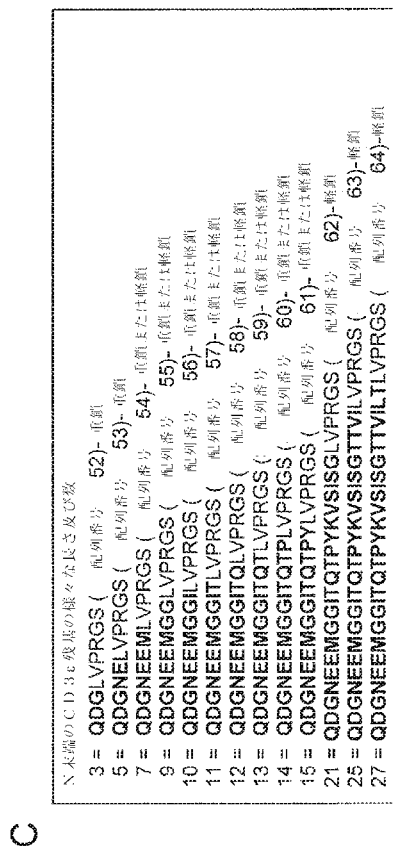
【図 1 A】



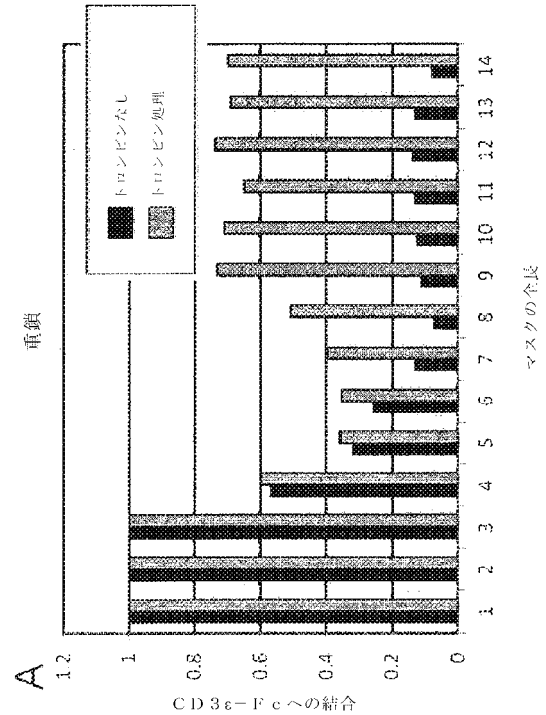
【図 1 B】



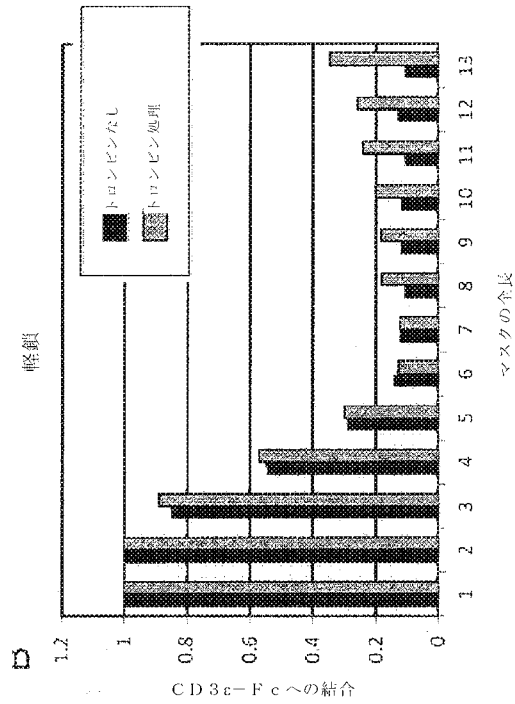
【図 1 C】



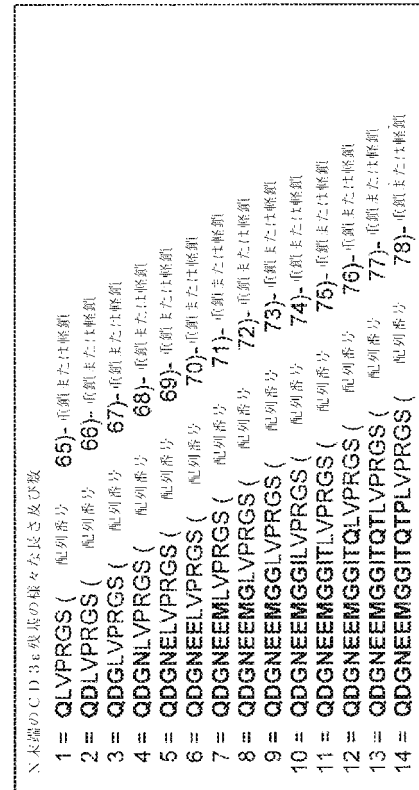
【図 2 A】



【図 2 B】

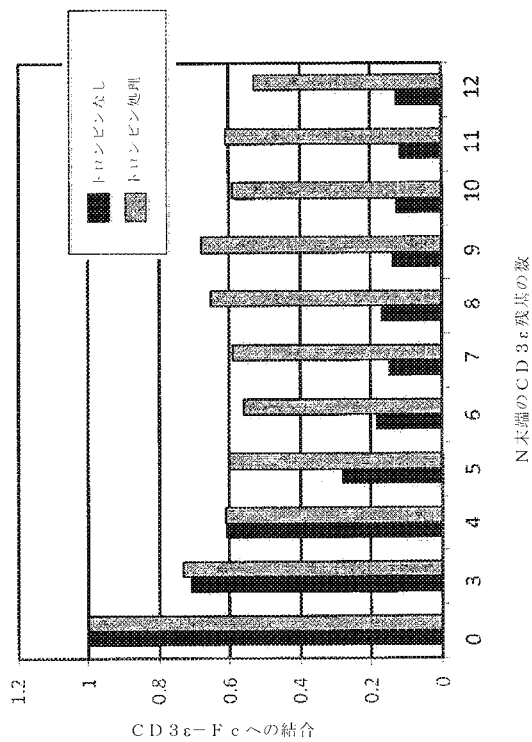


【図 2 C】

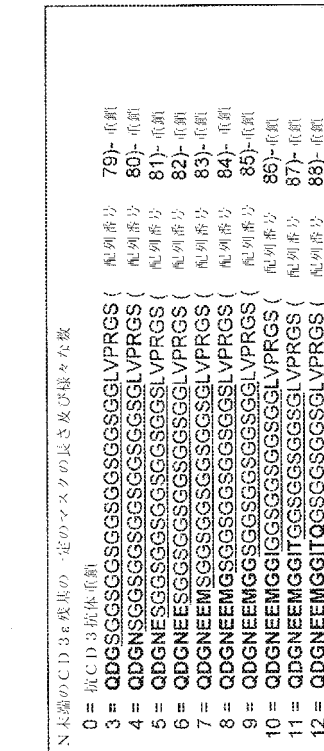


C

【図 3 A】



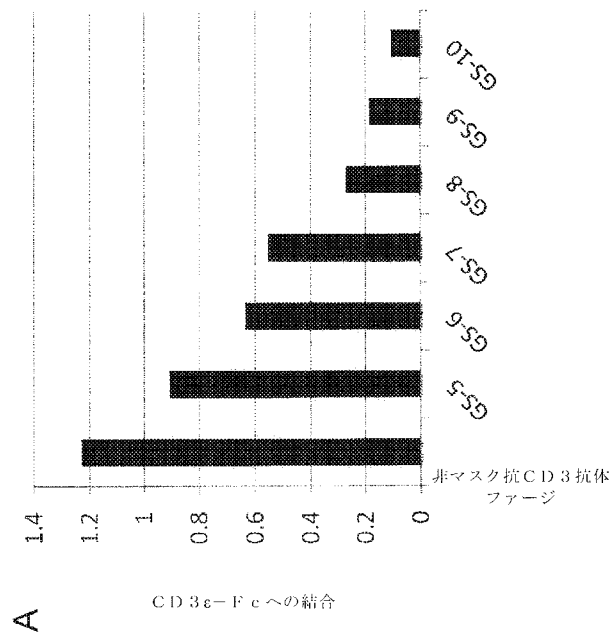
【図 3 B】



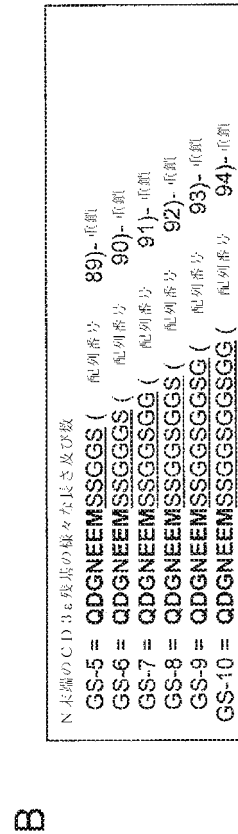
B

A

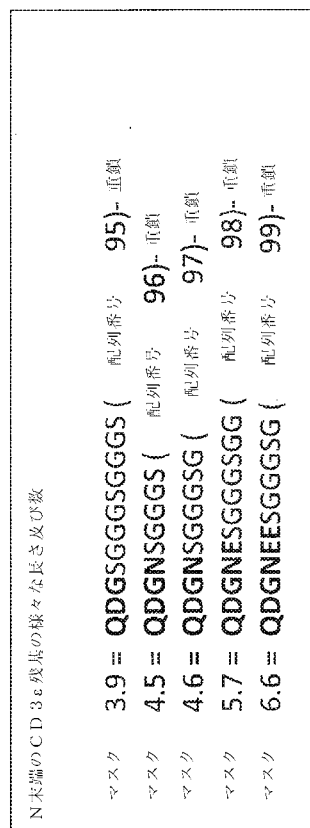
【図 4 A】



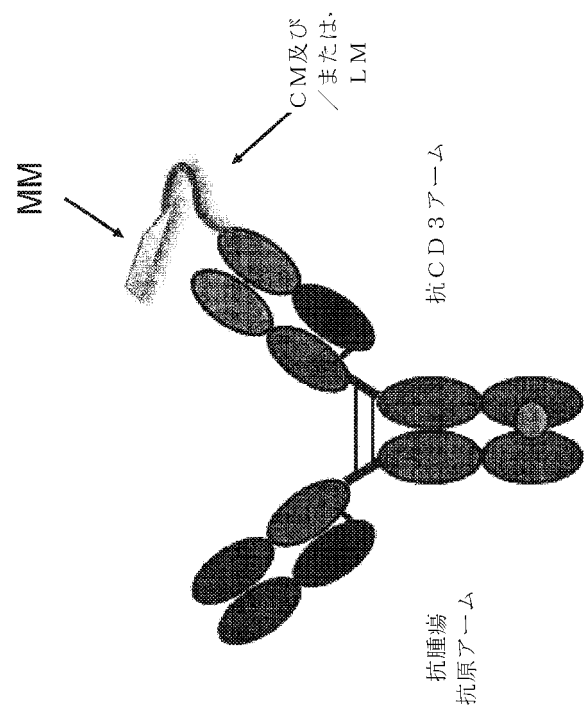
【図 4 B】



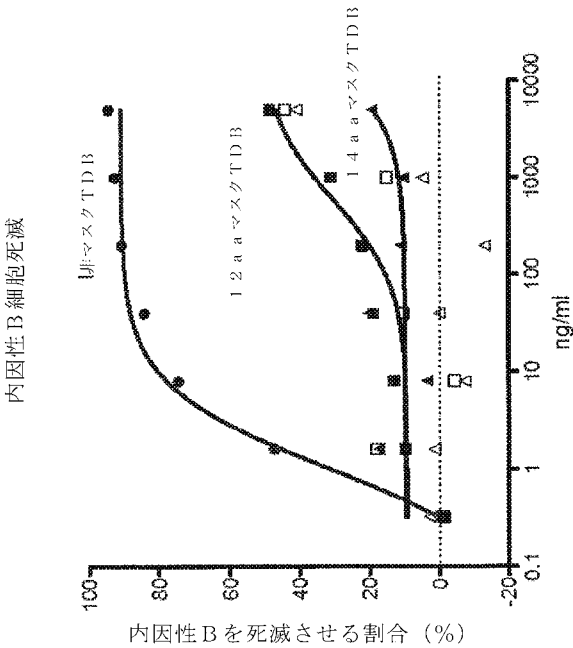
【図 4 C】



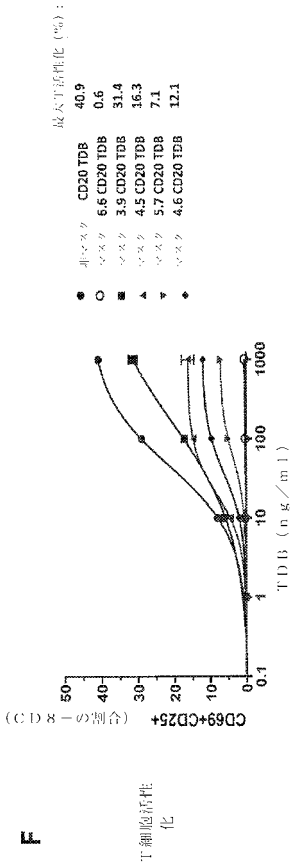
【図 4 D】



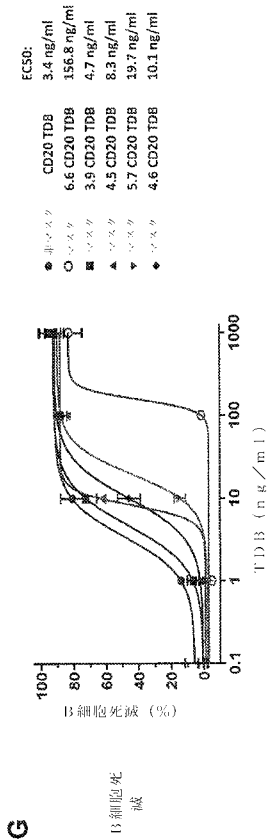
【図 4 E】



【図 4 F】



【図 4 G】



【図 4 H】

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM)
非マスク v 1 TDB	4.0e6	4.8e-3	1.2
非マスク v 3 TDB	4.9e6	1.7e-2	3.5
マスク 4, 5 TDB	5.5e6	2.1e-3	3.8
非マスク v 5 TDB	7.8e5	1.4e-2	18
マスク 4, 6 TDB	1.3e5	2.1e-3	16
非マスク v 4 TDB	7.8e5	9.2e-2	119
マスク 5, 7 TDB	1.9e4	2.1e-3	113

【図 4 I】

	親和性 (nM)	最大の割合 (%) T細胞活性化	EC50 (ng/ml)
非マスキ v 1 TDB	1.2	48	9.77
マスキ 4, 5 TDB	3.8	17	8.21
非マスキ v 3 TDB	3.5	40	8.18
マスキ 4, 6 TDB	16	12	9.77
非マスキ v 5 TDB	18	28	20.4
マスキ 5, 7 TDB	113	7.1	13.7
非マスキ v 4 TDB	119	16	157

【配列表】

2018520642000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/030127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/119566 A2 (MICROMET AG [DE]; EBERT EVELYN [DE]; MEIER PETRA [DE]; SRISKANDARAJAH) 9 October 2008 (2008-10-09) claims 1-35; examples 16-25; tables 2-8 -----	1-125
X	WO 2008/119567 A2 (MICROMET AG [DE]; EBERT EVELYN [DE]; MEIER PETRA [DE]; SRISKANDARAJAH) 9 October 2008 (2008-10-09) claims 1-40; examples 23-28; tables 6-11 -----	1-125
X	WO 2012/162067 A2 (MACROGENICS INC [US]; HUANG LING [US]; JOHNSON LESLIE S [US]) 29 November 2012 (2012-11-29) claims 1-18; example 8 ----- -/--	1-125
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 July 2016		03/08/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, Katell

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/030127

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	US 2015/166661 A1 (CHEN XIAOCHENG [US] ET AL) 18 June 2015 (2015-06-18) claims 1-88; sequences 184,185,188,192-197,199,201,203,205,288 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/030127

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008119566 A2	09-10-2008	AU 2008234019 A1	09-10-2008
		CA 2682626 A1	09-10-2008
		CN 101675077 A	17-03-2010
		EP 2155788 A2	24-02-2010
		HK 1141299 A1	07-12-2012
		HR P20120759 T1	31-10-2012
		IL 201338 A	31-05-2015
		JP 2014064568 A	17-04-2014
		KR 20100016199 A	12-02-2010
		US 2010183615 A1	22-07-2010
		US 2012244162 A1	27-09-2012
		US 2016152707 A1	02-06-2016
		WO 2008119566 A2	09-10-2008
WO 2008119567 A2	09-10-2008	CN 101687915 A	31-03-2010
		CN 103694350 A	02-04-2014
		EP 2155783 A2	24-02-2010
		EP 2520590 A2	07-11-2012
		ES 2432792 T3	05-12-2013
		IL 201340 A	30-11-2015
		KR 20150140399 A	15-12-2015
		NZ 580755 A	25-05-2012
		RS 53008 B	30-04-2014
		RU 2009136912 A	10-05-2011
		RU 2015130097 A	27-11-2015
		SG 182234 A1	30-07-2012
		SG 195609 A1	30-12-2013
		WO 2008119567 A2	09-10-2008
WO 2012162067 A2	29-11-2012	AU 2012259161 A1	12-12-2013
		CA 2836857 A1	29-11-2012
		CN 103703024 A	02-04-2014
		CO 6970560 A2	13-06-2014
		EA 201391735 A1	31-03-2014
		EC SP13013101 A	31-01-2014
		EP 2714733 A2	09-04-2014
		JP 2014517844 A	24-07-2014
		KR 20140033107 A	17-03-2014
		MA 35174 B1	02-06-2014
		NZ 618021 A	27-02-2015
		NZ 703939 A	29-01-2016
		SG 195072 A1	30-12-2013
		SG 10201509588T A	30-12-2015
		US 2014099318 A1	10-04-2014
		WO 2012162067 A2	29-11-2012
		ZA 201308602 B	30-07-2014
US 2015166661 A1	18-06-2015	AU 2014364805 A1	16-06-2016
		CA 2932288 A1	25-06-2015
		TW 201527323 A	16-07-2015
		US 2015166661 A1	18-06-2015
		WO 2015095392 A1	25-06-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	4 C 0 8 6
A 6 1 K	47/65	(2017.01)	A 6 1 K	47/65		4 H 0 4 5
A 6 1 K	47/64	(2017.01)	A 6 1 K	47/64		
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02		
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06		
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1	
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02		
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 P	1/04		
A 6 1 P	7/04	(2006.01)	A 6 1 P	7/04		
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00		
A 6 1 P	17/06	(2006.01)	A 6 1 P	17/06		
A 6 1 P	21/04	(2006.01)	A 6 1 P	21/04		
A 6 1 P	3/10	(2006.01)	A 6 1 P	3/10		
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12		
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	31/573	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	A 6 1 K	31/573		
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 0 7 K	16/30	(2006.01)	C 0 7 K	16/46		
			C 0 7 K	16/30		

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. U N I X
2. T W E E N

Fターム(参考) 4C076 AA12 AA17 AA29 AA61 AA71 BB01 BB13 BB15 BB16 BB21
BB24 BB25 BB27 BB30 BB31 BB32 CC27 EE41 EE59 FF63
FF70
4C084 AA19 MA17 MA22 MA34 MA38 MA44 MA52 MA56 MA57 MA58
MA59 MA63 MA66 MA67 NA05 NA14 ZA01 ZA53 ZA66 ZA81
ZA89 ZA94 ZA96 ZB07 ZB08 ZB11 ZB15 ZB26 ZB27 ZC35
ZC75
4C085 AA14 CC05 CC07 CC23 DD21 DD62 EE01 EE03 GG02 GG03
GG04 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 AA03 DA10 NA05 NA14 ZA01 ZA53 ZA66 ZA81

ZA89	ZA94	ZA96	ZB07	ZB08	ZB11	ZB15	ZB26	ZC35	ZC75
4H045	AA11	CA40	DA76	FA74					