(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6817211号
(P6817211)

(45)発行日　令和3年1月20日(2021.1.20)　(24)登録日　令和2年12月28日(2020.12.28)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15	
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19	
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21	
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	

請求項の数 21　(全 174 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-538599(P2017-538599)
(86)(22)出願日　平成28年1月22日(2016.1.22)
(65)公表番号　特表2018-513831(P2018-513831A)
(43)公表日　平成30年5月31日(2018.5.31)
(86)国際出願番号　PCT/EP2016/051386
(87)国際公開番号　WO2016/116626
(87)国際公開日　平成28年7月28日(2016.7.28)
審査請求日　平成30年12月28日(2018.12.28)
(31)優先権主張番号　15305077.8
(32)優先日　平成27年1月23日(2015.1.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　504456798
サノフイ
ＳＡＮＯＦＩ
フランス国、エフ－７５００８・パリ、リユ・ラ・ボエテイ・５４
５４　ｒｕｅ　Ｌａ　Ｂｏ▲ｅ▼ｔｉｅ，Ｆ－７５００８　Ｐａｒｉｓ，Ｆｒａｎｃｅ
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100140132
弁理士　竹林　則幸

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ１２３抗体及びＣＤ３及び／又はＣＤ１２３に特異的に結合する二重特異性抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

２つの抗原結合部位を形成する２つのポリペプチド鎖を含む、ヒトＣＤ３εおよびＣＤ１２３である少なくとも１つのさらなる標的抗原に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、ここで第一のポリペプチドは、式[I]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

により表される構造を有し、

そして第二のポリペプチドは、式[II]:

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1} \qquad [II]$$

により表される構造を有し、

式中：

V_{D1}は、第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D2}は、第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D3}は、該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D4}は、該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

C_Lは、免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；

C_{H1}は、免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；

L_1、L_2、L_3、及びL_4はアミノ酸リンカーであり；

そしてここで第一及び第二のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そしてここでV_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメイン又は重鎖の可変ドメインのいずれかで

あり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、

ａ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１４２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３８１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３８４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３８２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｂ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｃ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｄ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２

３抗体であるか、又は
ｅ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号２８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｆ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｇ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｈ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号２２７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号２２８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２２９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２３１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＲＤＤを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号２３２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、
上記抗体様結合タンパク質。

【請求項２】
前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１４２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３８１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３８４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３８２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。
【請求項３】
前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。
【請求項４】
前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。
【請求項５】
前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３

７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項６】

前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号２８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項７】

前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１０のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項８】

前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項９】

前記第一又は第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一又は第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号２２７のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号２２８のアミノ酸配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２２９のア

ミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２３１のアミノ酸配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＲＤＤを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号２３２のアミノ酸配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項１０】

ａ）前記第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１４２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３８１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３８４のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３８２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｂ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１０のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｃ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２０のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミ

ノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｄ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｅ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２４のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号２８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｆ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１０のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列若しく

はそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｇ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３７５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号３７６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号３７７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号３７８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＷＡＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号３７９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｈ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号１４のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号１５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号１７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＫＶＳを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号１１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号２２７のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｈ、配列番号２２８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ２－Ｈ、配列番号２２９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｈを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号２３１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ１－Ｌ、アミノ酸配列ＲＤＤを有するＣＤＲ２－Ｌ及び配列番号２３２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列を有するＣＤＲ３－Ｌを含む軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、請求項１に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項１１】

２つの抗原結合部位を形成する２つのポリペプチド鎖を含む、ヒトＣＤ３ε及びＣＤ１２３である少なくとも１つのさらなる標的抗原に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、ここで第一のポリペプチドは、式[I]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

により表される構造を有し、

そして第二のポリペプチドは、式[II]:

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1} \qquad [II]$$

により表される構造を有し、

式中：

V_{D1}は、第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D2}は、第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D3}は、該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D4}は、該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

C_Lは、免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；

C_{H1}は、免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；

L_1、L_2、L_3、及びL_4はアミノ酸リンカーであり；

そしてここで第一及び第二のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして

ここでV_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメイン又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、

ａ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３８のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１４１のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３８３のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３８５のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｂ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号５のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号９のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｃ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１８のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号２１のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｄ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１２のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｅ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２３のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号２６のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｆ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３８のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１４３のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｇ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１７１のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１５８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｈ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１７１のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１５８のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号２２６のアミノ酸配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号２３０のアミノ酸配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、
上記抗体様結合タンパク質。
【請求項１２】
ａ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１４１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３８３のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３８５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｂ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号５のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号９のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｃ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号２１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｄ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、
該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は
ｅ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号２３のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号２６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｆ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１３８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１４３のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｇ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１７１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１５８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号３１２のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号３０８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体であるか、又は

ｈ）該第一若しくは第二の免疫グロブリンは、ヒトＣＤ３εタンパク質の細胞外ドメインに結合する、配列番号１７１のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメイン及び配列番号１５８のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗体であり、

該第一若しくは第二の免疫グロブリンの他方は、配列番号２２６のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる重鎖可変ドメインおよび配列番号２３０のアミノ酸配列若しくはそれと少なくとも９０％同一である配列からなる軽鎖可変ドメインを含む抗ＣＤ１２３抗体である、

請求項１１に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項１３】

式[II]のポリペプチドがFcドメインをさらに含む、請求項１～１２のいずれか１項に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項１４】

式[I]のポリペプチドがFcドメイン(Fc_2)をさらに含む、請求項１３に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項１５】

Fcドメイン(Fc_3)を含む第三のポリペプチド鎖をさらに含む、請求項１３に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項１６】

請求項１～１５のいずれか１項に記載の抗体様結合タンパク質、及び薬学的に許容しうる担体を含む、医薬組成物。

【請求項１７】

それを必要とする対象において癌を処置又は予防するのに適した薬剤を製造するのに有用である、請求項１～１５のいずれか１項に記載の抗体様結合タンパク質又は請求項１６に記載の医薬組成物の使用。

【請求項１８】

癌が血液癌である、請求項１７に記載の使用。

【請求項１９】

請求項１～１５のいずれか１項に記載の抗体様結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸。

【請求項２０】
請求項１９に記載の核酸により形質転換された宿主細胞。
【請求項２１】
請求項１～１５のいずれか１項に記載の抗体様結合タンパク質を含む、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、CD3に特異的に結合し、かつ少なくとも１つのさらなる抗原、例えばCD123に特異的に結合する抗体様結合タンパク質に関する。本発明はさらに、抗CD3抗体及び抗CD123抗体に関する。本発明はまた、CD123に特異的に結合し、かつ少なくとも１つのさらなる抗原に特異的に結合する抗体様結合タンパク質に関する。本発明はまた、本発明の抗体様結合タンパク質、抗CD3抗体又は抗CD123抗体を含む医薬組成物、及び癌を処置するためのそれらの使用に関する。本発明はさらに、上記抗体様結合タンパク質、抗CD3又は抗CD123抗体をコードする配列を含む単離された核酸、ベクター及び宿主細胞、並びに上記抗CD123抗体の診断ツールとしての使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
二重特異性抗体の第一世代は、２０年以上前に開発された。その後、多数の臨床研究は、がん細胞表面抗原を標的とするように操作された二重特異性抗体を試験した。抗癌融合タンパク質のこの群は、抗癌活性を達成するために標的化された癌細胞の近傍に免疫学的エフェクター細胞を局在化させる２つ又はそれ以上の機能性ドメインを含有する。
【０００３】
二重特異性抗体技術が開発されたので、一方のscFvが標的細胞に結合し、他方はT細胞表面上のCD3に結合する、二重特異性T細胞誘導（bispecific T-cell engagers）(BiTE)という名称の融合タンパク質の異なる群が、可動性リンカーのみで(Fcアミノ酸セグメントは含まれなかった）２つの抗体単鎖可変領域(scFv)を接続することにより生成された。CD19xCD3二重特異性結合活性を有する１つのBiTEであるブリナツモマブは、B系急性リンパ芽球性における最少の残存疾患を有する患者についてフェーズII臨床試験において有望な結果を示した。
【０００４】
CD123(インターロイキン-3受容体アルファ鎖 IL-3Rα)は、様々な血液新生物において過剰発現される腫瘍抗原である。大部分のAML芽細胞は表面CD123を発現し、この発現はAMLのサブタイプによって変化しない。診断でのAML上のCD123のより高い発現は、より悪い予後に関連すると報告されている。CD123は白血病幹細胞(LSC)上で発現されるということが報告された。AMLがこれらの白血病幹細胞(LSC)から生じることを示唆する証拠が増えてきており、これらはDNA損傷化学療法に対して無活動かつ比較的抵抗性であることが示されていた。
【０００５】
従って、造血幹細胞(HSC)と比較してLSCでのCD123の増加した発現は、AML-LSCの治療標的化の機会を示す。
【０００６】
CD123に対して産生されたモノクローナル抗体(MAb)7G3は、以前に、白血病細胞株及び初代細胞の両方のIL-3媒介増殖及び活性化を阻害することが示された(特許文献１)。しかし、CD123を標的化することによりAML-LSCを機能的に障害することができるか否かは不明のままである。
【０００７】
CD123xCD3抗体様結合タンパク質の使用は、本発明者らにより本明細書において示されるように、細胞死滅をもたらす。
【０００８】
CD123xCD3二重特異性結合活性を有する二重特異性 抗体様結合タンパク質を製造する考

えは、特許文献２において既に提案され記載されてきた。
【０００９】
さらに、MacroGenicsからのCD123xCD3二重親和性再標的化(DART)二重特異性抗体ベースの分子は、2014年にフェーズI臨床試験に入った。
【００１０】
しかし、本発明者らに示されるように、例えば、MacroGenicsからのCD123xCD3二重親和性再標的化(DART)二重特異性抗体ベースの分子は、標的細胞が存在しない場合に、CD4+を発現しているT細胞の82%及びCD8+を発現しているT細胞の83%の活性化を有する。T細胞の不適切な活性化は、サイトカイン放出症候群のような重篤な副作用を生じ得る。サイトカイン放出症候群は、重篤な感染症において見られるものに類似した一種の全身性の炎症性応答を生じ、そして低血圧、発熱及び悪寒を特徴とする、活性化T細胞によるサイトカインの放出を指す。サイトカイン放出症候群に起因する死亡は、例えばOKT3について報告されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１１】
【特許文献１】米国特許第6,177,078号
【特許文献２】国際特許出願WO2013/173820
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
従って、二重特異性抗体技術のこれらの進歩にも関わらず、さらなる癌治療剤、特に、直接的又は間接的に、癌細胞を効率よく標的化し殺傷するものの必要性が残ったままである。
【００１３】
本発明者らは、ヒト及びカニクイザル（Macaca fascicularis）CD3タンパク質の両方に高い親和性を示す特異的ラット抗CD3抗体を生成、スクリーニング及び選択することに成功した。
【課題を解決するための手段】
【００１４】
本発明者らは、抗原CD3及び少なくとも１つのさらなる標的抗原に対する生物学的及び免疫学的特異性を有する抗体様結合タンパクを開発した。一例において、二重特異性抗体様結合タンパク質の生成におけるこれらの抗CD3抗体の使用を実証するために、本発明者らは、抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質を生成し、そしてそれらの治療上の使用を実証した。それらの二重特異性抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質は、抗CD3抗体単独について観察されたように、低いT細胞活性化を有する。しかし、THP-1細胞のようなCD123を発現する標的細胞が存在すれば、二重特異性抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質は、T細胞の高い活性化を示す。従って、上で定義された本発明の抗CD3抗体は、本発明の抗体様結合タンパク質の製造のために特に有用である。
【００１５】
定義
本出願を通して、用語「及び／又は」は、それが接続する場合の１つ又はそれ以上が存在し得るということを包含すると解釈されるべき文法的接続詞である。例えば、「このような天然配列タンパク質は、標準的な組み換え及び／又は合成方法を使用して製造することができる」という表現は、天然配列タンパク質が標準的な組み換え方法を使用して製造することができるということ、又は天然配列タンパク質が標準的な合成方法を使用して製造することができるということを示す。
【００１６】
さらに、本出願を通して、用語「含む（comprising）」は、全ての具体的に述べられた特徴と同様に任意の、追加的な特定されていないものも包含すると解釈されるべきである

。本明細書で使用される、用語「含む」の使用はまた、具体的に述べられた特徴以外の特徴が存在しない（すなわち、「からなる」）実施態様も開示する。さらに、不定冠詞「a」又は「an」は、複数存在することを除外しない。単に特定の手段が互いに異なる請求項において列挙されるという事実は、これらの手段の組み合わせが有利に使用することができないということを示すものではない。

【００１７】

用語「遺伝子」は、１つ又はそれ以上のタンパク質又は酵素の全て又は一部を含み、かつ例えば遺伝子が発現される条件を決定するプロモーター配列のような制御配列を含んでも含まなくてもよい、特定のアミノ酸配列をコードするか、又はそれに対応するDNA配列を意味する。構造遺伝子ではない幾つかの遺伝子はDNAからRNAへ転写されるが、アミノ酸配列には翻訳されない。他の遺伝子は、構造遺伝子の制御因子として、又はDNA転写の制御因子として機能し得る。特に、用語遺伝子は、タンパク質をコードするゲノム配列、すなわち、ゲノム配列制御因子、プロモーター、イントロン及びエクソン配列を含む配列を意図され得る。

【００１８】

「参照配列と少なくとも85%同一である」配列は、参照配列の全長と、その全長において、85%又はそれ以上、特に90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列である。

【００１９】

本出願の文脈において、「同一性パーセンテージ」は、グローバルペアワイズアライメントを使用して計算される(すなわち、２つの配列は、それらの全長にわたって比較される)。２つ又はそれ以上の配列の同一性を比較するための方法は、当該分野で周知である。例えば、Needleman-Wunschグローバルアライメントアルゴリズム(Needleman and Wunsch、1970 J. Mol. Biol. 48:443-453)を使用して、それらの全長を考慮した場合に２つの配列の最適アライメント（ギャップを含む）を見つける<<needle>>プログラムが使用され得る。needleプログラムは、例えば、ebi.ac.ukワールドワイドウェブサイトで利用可能である。本発明に従う２つのポリペプチド間の同一性パーセンテージは、10.0に等しい「ギャップ開始（Gap Open）」パラメーター、0.5に等しい「ギャップ伸長（Gap Extend）」パラメーター、及びBlosum62マトリックスを用いるEMBOSS：needle（グローバル)プログラムを使用して計算される。

【００２０】

参照配列と「少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%同一である」アミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列と比較して、欠失、挿入及び／又は置換のような変異を含み得る。置換の場合には、参照配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるアミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列とは別の種から誘導された相同配列に相当し得る。

【００２１】

「アミノ酸置換」は保存的でも非保存的でもよい。好ましくは、置換は保存的置換であり、ここで１つのアミノ酸は、類似した構造及び／又は化学特性を有する別のアミノ酸で置き換えられている。置換は、以下の表に示されるように、好ましくは保存的置換に対応する。

【００２２】

【表１】

保存的置換	アミノ酸の種類
Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Phe、Trp	脂肪族疎水性側鎖を有するアミノ酸
Ser、Tyr、Asn、Gln、Cys	非荷電であるが極性の側鎖を有するアミノ酸
Asp、Glu	酸性側鎖を有するアミノ酸
Lys、Arg、His	塩基性側鎖を有するアミノ酸
Gly	中性側鎖

【００２３】

「免疫グロブリン」とも呼ばれる「抗体」は、２つの重鎖がジスルフィド結合により互いに連結され、かつ各重鎖がジスルフィド結合により軽鎖に連結されている天然又は従来の抗体であり得る。ラムダ(l)及びカッパ(k)の２つの型の軽鎖が存在する。抗体分子の機能的活性を決定する５つの主要な重鎖のクラス（又はアイソタイプ）がある：IgM、IgD、IgG、IgA及びIgE。各鎖は別個の配列ドメインを含有する。軽鎖は２つのドメイン又は領域、可変ドメイン(VL)及び定常ドメイン(CL)を含む。重鎖は、４つのドメイン、可変ドメイン(VH)及び３つの定常ドメイン(CH1、CH2及びCH3、集合的にCHと呼ばれる)を含む。軽鎖（VL)及び重鎖（VH)の両方の可変領域は、抗原の結合認識及び特異性を決定する。軽鎖(CL)及び重鎖(CH)の定常領域ドメインは、抗体鎖会合、分泌、経胎盤移動性い、補体結合、及びFc受容体(FcR)への結合のような重要な生物学的特性を付与する。Fvフラグメントは、免疫グロブリンのFabフラグメントのN末端部分であり、そして１つの軽鎖及び１つの重鎖の可変部分からなる。抗体の特異性は、抗体結合部位と抗原決定基との間の酵素的相補性にある。抗体結合部位は、主に超可変性又は相補性決定領域(CDR)からの残基から構成される。非超可変性又はフレームワーク領域(FR)からの残基が全体のドメイン構造に影響を与え、それ故結合部位に影響を与える場合もある。相補性決定領域又はCDRは、ネイティブ免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性及び特異性を一緒に規定するアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖はそれぞれ３つのCDRを有し、それぞれCDR1-L、CDR2-L、CDR3-L及びCDR1-H、CDR2-H、CDR3-Hと指定される。従って、従来の抗体結合部位は６つのCDRを含み、重鎖及び軽鎖V領域のそれぞれからのCDRを含む。

【００２４】

本発明の文脈において、抗体又は免疫グロブリンは、IgM、IgD、IgG、IgA及びIgEである。

【００２５】

「フレームワーク領域」(FR)は、CDRの間に、すなわち、単一の種において異なる免疫グロブリン間で比較的保存されている免疫グロブリン軽鎖及び重鎖可変領域の部分に挿入されたアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖はそれぞれ４つのFRを有し、それぞれFR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L、及びFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hと指定される。従って、軽鎖可変ドメインは、(FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)と指定され、そして重鎖可変ドメインは、(FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)と指定される。

【００２６】

CDRのアミノ酸配列が分かれば、当業者は、フレームワーク領域FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L及び／又はFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hを容易に決定することができる。

【００２７】

本明細書で使用される「ヒトフレームワーク領域」は、天然に存在するヒト抗体のフレームワーク領域と実質的に同一である（約85%、又はそれ以上、特に90%、95%、97%、99%又は100%）フレームワーク領域である。

【００２８】

本発明の文脈において、免疫グロブリン軽鎖又は重鎖におけるCDR/FR定義は、IMGT定義(Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol.、2003、27(1):55-77；www.imgt.org)に基づいて決定されるべきである。

【００２９】

本明細書で使用される用語「抗体」は、従来の抗体及びそのフラグメント、さらには単一ドメイン抗体及びそのフラグメント、特に単一ドメイン抗体の可変重鎖、及びキメラ、ヒト化、二重特異性又は多特異性抗体を示す。

【００３０】

本明細書で使用される抗体又は免疫グロブリンはまた、より最近に記載されており、そしてその相補性決定領域が単一ドメインポリペプチドの一部である抗体である「単一ドメイン抗体」を含む。単一ドメイン抗体の例としては、重鎖抗体、天然に軽鎖を欠いている抗体、従来の四鎖抗体から誘導された単一ドメイン抗体、操作された単一ドメイン抗体が挙げられる。単一ドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギ、ウシを含むがこれらに限定されないいずれかの種に由来し得る。単一ドメイン抗体は、軽鎖を欠いている重鎖抗体として知られる天然に存在する単一ドメイン抗体であってもよい。特に、ラクダ科種、例えばラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ及びグアナコは、軽鎖を天然で欠いている重鎖抗体を産生する。ラクダ科動物重鎖抗体はまた、CH1ドメインも欠いている。

【００３１】

軽鎖を欠いているこれらの単一ドメイン抗体の可変重鎖は、当該分野で「VHH」又は「ナノボディ（nanobody）」として知られる。従来のVHドメインと同様に、VHHは、４つのFR及び３つのCDRを含有する。ナノボディは従来の抗体に勝る利点を有する：これらはIgG分子より約１０倍小さく、結果として、適切に折り畳まれた機能的ナノボディが、高収量を達成しながらインビトロ発現により製造され得る。さらに、ナノボディは非常に安定であり、かつプロテアーゼの作用に対して抵抗性である。ナノボディの特性及び製造は、Harmsen及びDe Haard HJにより概説されている(Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov;77(1):13-22)。

【００３２】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」又は「mAb」は、特定の抗体に対して特異的な単一アミノ酸蘇生の抗体分子を指し、そしていずれかの特定の方法による抗体の産生を必要とするとは解釈されるべきではない。モノクローナル抗体は、B細胞の単一クローン又はハイブリドーマにより産生され得るが、組換え体、すなわちタンパク質操作により産生されてもよい。

【００３３】

用語「キメラ抗体」は、その広い意味で、１つの抗体由来の１つ又はそれ以上の領域及び１つ又はそれ以上の他の抗体由来の１つ又はそれ以上の領域を含有する操作された抗体を指す。特に、キメラ抗体は、別の抗体、特にヒト抗体のCHドメイン及びCLドメインと関連して、非ヒト動物由来の抗体のVHドメイン及びVLドメインを含む。非ヒト動物として、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ又は同様のもののようないずれかの動物が使用され得る。キメラ抗体はまた、少なくとも２つの異なる抗原に対する特異性を有する多特異性抗体も示し得る。

【００３４】

用語「ヒト化抗体」は、全体又は部分的に非ヒト起源であり、かつ特定のアミノ酸、特に重鎖及び軽鎖のフレームワーク領域を、ヒトにおける免疫応答を避けるか又は最少にするために置き換えるように改変された抗体を指す。ヒト化抗体の定常ドメインは、大体の場合、ヒトCH及びCLドメインである。

【００３５】

抗体配列のヒト化のための多数の方法が当該分野で公知である；例えば、Almagro及びFransson(2008)による概説 Front Biosci. 13：1619-1633を参照のこと。１つの一般的に使用される方法は、CDRグラフティング、又は抗体再形成（antibody reshaping）であり

、これはドナー抗体、一般的にはマウス抗体の、異なる特異性のヒト抗体のフレームワーク骨格へのCDR配列のグラフティングを含む。CDRグラフティングは、CDRグラフティングされた非ヒト抗体の結合特異性及び親和性を減少させ得、従って生物活性を減少させ得るので、親抗体の結合特異性おy日親和性を維持するために、CDRグラフティングされた抗体の選択された位置に逆突然変異が導入され得る。可能な逆突然変異の位置の同定は、文献及び抗体データベースにおいて利用可能な情報を使用して行われ得る。逆突然変異の候補であるアミノ酸残基は、典型的には抗体分子の表面に位置するものであるが、埋もれているか表面露出の程度が低い残基は、通常は変更されない。CDRグラフティング及び逆突然変異に対する代替のヒト化技術は表面再形成（resurfacing）であり、ここで非ヒト起源の表面に露出されていない残基は保持されるが、表面残基はヒト残基に変更される。別の代替の技術は、「誘導選択（guided selection）」(Jespers et al. (1994) Biotechnology 12、899)として知られており、例えばマウス又はラットから、親抗体のエピトープ及び結合特徴を保存している完全ヒト抗体を誘導するために使用することができる。ヒト化のさらなる方法は、いわゆる4Dヒト化である。4Dヒト化プロトコルは、特許出願US20110027266 A1(WO2009032661A1)に記載され、以下においてラット抗体可変軽（VL)及び重（VH)ドメインをヒト化するために４Dヒト化を適用して例示される。一例において、ラット抗体相同性モデルは、典型的にMOEソフトウェア(v.2011.10- Chemical Computing Group、Quebec、Canada)を用いてテンプレートとしてPDB構造(Berman et al.、Nucleic Acids Research、2000、28:235-242)を使用して行われ、その後、MOEに実装される標準的手順を使用してエネルギー最小化された。次いで、分子動力学(MD)シミュレーションをラット抗体の最小化された３D相同性モデル(MOEソフトウェアを用いて行われた)に対して行い、そして例えばLGCR/SDIと指定されMOE内で利用可能な、７つの代表的な軽鎖(vk1、vk2、vk3、vk4、vlambda1、vlambda2、vlambda3)及び７つの代表的な重鎖(vh1a、vh1b、vh2、vh3、vh4、vh5、vh6)から誘導された４９のヒトモデルと比較した。例えば、最良の疎水性、静電成分の両方及びCDR外での配列同一性を有する鎖対(Vkx-Vhx)の１つのモデルは、「４Dヒト化」について選択された。ラット可変ドメインと選択されたモデルとの間の対合について、典型的には対応する相同性モデルのアルファ炭素の最適３D重ね合わせに基づいて配列を整列した。次いで望ましくないモチーフを考慮して変異させた。最後に、得られたヒト化配列を、配列がいずれも、列挙されている既知のB細胞又はT細胞エピトープを含有しないということを確実にするために、例えばIEDBデータベース(http://www.immuneepitope.org；バージョン2012/01/30地域でアクセス可能)に対して配列類似性についてblast検索した（blasted)。

【００３６】

キメラ抗体については、ヒト化は典型的には可変領域配列のフレームワーク領域の改変を含む。

【００３７】

CDRの一部であるアミノ酸残基は、典型的にはヒト化に関して変更されないが、特定の場合には、例えば、グリコシル化部位、脱アミド部位又は望ましくないシステイン残基を除去するために、ここのCDRアミノ酸残基を変更することが望ましいかもしれない。N連結グリコシル化は、トリペプチド配列Asn-X-Ser又はAsn-X-Thr、［ここでXはProを除くいずれかのアミノ酸」におけるアスパラギン残基へのオリゴ糖鎖の結合により起こる。N-グリコシル化部位の除去は、Asn又はSer/Thr残基のいずれかを異なる残基に、特に保存的置換を用いて変異させることにより達成され得る。アスパラギン及びグルタミン残基の脱アミドは、pH及び表面露出のような因子に依存して起こり得る。アスパラギン残基は、主に配列Asn-Glyが存在する場合に、Asn-Alaのような他のジペプチド配列においてはより低い程度で、脱アミドに対して特に感受性である。従って、このような脱アミド部位、特にAsn-GlyがCDR配列に存在する場合、その部位を除去すること、典型的には保存的置換により関連する残基の１つを除去することが望ましいかもしれない。関連する残基の１つを除去するためのCDR配列における置換はまた、本発明により包含されることを意図される。

【００３８】

（従来の）抗体の「フラグメント」は、インタクトな抗体の一部、特にインタクトな抗体の抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fv、Fab、F(ab’)2、Fab’、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、二特異性抗体（diabodies）、抗体フラグメントから形成される二重特異性及び多重得意性抗体が挙げられる。従来の抗体のフラグメントはまた、重鎖抗体又はVHHのような単一ドメイン抗体であり得る。

【００３９】

用語「Fab」は、分子量約50,000及び抗原結合活性を有する抗体フラグメントを示し、ここでIgGをプロテアーゼ、パパインで処理することにより得られたフラグメントの間で、H鎖及びL鎖全体のN末端側の約半分は、ジスルフィド結合を通して一緒に結合されている。

【００４０】

用語「F(ab’)2」は、約100,000の分子量及び抗原結合活性を有する抗体フラグメントを指し、これは、IgGをプロテアーゼペプシンで処理することにより得られたフラグメントの中で、ヒンジ領域のジスルフィド結合を介して結合されるFabよりもわずかに大きい。

【００４１】

用語「Fab’」は、約50,000の分子量及び抗原結合活性を有する抗体フラグメントを指し、これは、F(ab’)2のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断することにより得られる。

【００４２】

単鎖Fv(「scFv」)ポリペプチドは、共有結合でVH::VLヘテロ二量体に連結され、これは、通常はペプチドコードリンカーにより連結されるVH及びVLを含む遺伝子融合から発現される。本発明のヒトscFvフラグメントは、特に遺伝子組み換え技術を使用することにより適切なコンホメーションに保持されるCDRを含む。二価及び多価抗体フラグメントは、一価scFvの結合により自発的に形成するか、又は二価$sc(Fv)_2$のようにペプチドリンカーにより一価scFvをカップリングすることにより生成され得る。「dsFv」は、ジスルフィド結合により安定化されたVH::VLヘテロ二量体である。「(dsFv)2」は、ペプチドリンカーによりカップリングされた２つのdsFvを示す。

【００４３】

用語「二重特異性抗体」又は「BsAb」は、典型的には、単一の分子内の２つの抗体の抗原結合部位を組み合わせた抗体を示す。従って、BsAbは、２つの異なる抗原に同時に結合することができる。遺伝子操作は、例えばEP 2 050 764 A1に記載されるように、結合特性及びエフェクター機能の望ましいセットを有する抗体又は抗体誘導体を設計、改変及び製造する頻度を増加しながら使用されてきた。

【００４４】

用語「多重特異的抗体」は、単一の分子内で２つ又はそれ以上の抗体の抗原結合部位を組み合わせた抗体を示す。

【００４５】

用語「二特異性抗体(diabodies)」は、２つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントを指し、これらのフラグメントは、同じポリペプチド鎖(VH-VL)で軽鎖可変ドメイン(VL)に接続された重鎖可変ドメイン(VH)を含む。同じ鎖上の２つのドメイン間を対合させることを可能にするためには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインは別の鎖の相補的ドメインと対にになるを得ず、そして２つの抗原結合部位を生じる。

【００４６】

用語「ハイブリドーマ」は、抗原で非ヒト哺乳動物を免疫することにより製造されたB細胞を、抗原特異性を有する所望のモノクローナル抗体を産生するマウス又は同様のものに由来する骨髄腫細胞との細胞融合にかけることにより得られた細胞を示す。

【００４７】

「精製された」及び「単離された」は、ポリペプチド(すなわち、本発明の抗体)又はヌクレオチド配列に言及する場合、示された分子が、同じ種類の他の生物学的高分子の実質的な不在下で存在するということを意味する。本明細書で使用される用語「精製された」

は、特に少なくとも75質量%、85質量%、95質量%、又は98質量%の同じ型の生物学的高分子が存在することを意味する。特定のポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、対象のポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に含まない核酸分子を指す；しかし、その分子は、組成物の基本的な特徴に有害な影響を及ぼさないいくつかのさらなる塩基または部分を含んでいてもよい。

【００４８】

本明細書で使用される用語「抗原」又は「標的抗原」は、抗体又は抗体様結合タンパク質により結合されることができる分子又は分子の一部を指す。用語さらなるは、その抗原のエピトープに結合することができる抗体を産生するために動物において使用されることができる分子又は分子の一部を指す。標的抗原は、１つ又はそれ以上のエピトープを有し得る。抗体又は抗体様結合タンパク質により認識される各標的抗原に関して、抗体様結合タンパク質は、標的抗原を認識するインタクトな抗体と競合することができる。

【００４９】

「親和性」は、理論上は、抗体全体と抗原との間の平衡結合により定義される。親和性は、例えば半値幅有効濃度(EC_{50})又は平衡解離定数(KD)で表され得る。

【００５０】

「EC_{50}」とも呼ばれる「半値幅有効濃度」は、ベースラインと特定の曝露時間後の最大値との間の中間の応答を誘導する薬物、抗体又は毒物の濃度を指す。EC_{50}及び親和性は逆相関しており、EC_{50}値が低いほど抗体の親和性は高い。

【００５１】

「K_D」は平衡解離定数、抗体とその抗原との間のk_{off}/k_{on}の比である。K_D及び親和性は逆相関している。K_D値は抗体の濃度と関連しており、そしてK_D値が低いほど抗体の親和性は高い。親和性は、様々な公知の方法、例えば、表面プラズモン共鳴で結合及び解離速度を測定すること、又は免疫化学アッセイ(ELISA、FACS)でEC_{50}を測定することにより実験的に評価され得る。酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)は、液体サンプル又は湿潤サンプルにおいて物質、通常は抗原の存在を検出するために固相酵素イムノアッセイを使用する生化学的アッセイである。サンプル由来の抗原は表面に結合される。次いで、さらなる特異的抗体が、抗原に結合できるように表面上に適用される。この抗体は酵素に連結され、そして最終段階で、酵素の基質を含有する物質が添加される。その後の反応が検出可能なシグナル、最も一般的な基質における色変化を生じる。蛍光標識細胞分取(FACS)は、生物学的細胞の異種混合物を、各細胞の特定の光散乱及び蛍光特徴に基づいて、２つ又はそれ以上の容器に一度に１つの細胞を選別するための方法を提供する。これらのアッセイにおいて、EC_{50}は、ELISA(酵素結合免疫吸着測定法)による抗原又はFACS(蛍光標識細胞分取)による抗原を発現する細胞の規定された濃度での、ベースラインといくらかの特定された曝露時間後の最大値との間の中間の応答を湯道する抗体の濃度である。表面プラズモン共鳴は無標識法であり、この方法では、センサー表面上に固定された「リガンド」分子に対する可溶相中の分子（「検体」）の結合が直接測定される。センサーデバイスにおいて、リガンドの結合は、表面プラズモンと呼ばれる光学現象によりモニタリングされる。特に、「検体」分子が「リガンド」分子から解離する場合、SPRシグナル(共鳴単位RUで表される)の現象が観察される。結合速度(「オン速度」、k_a)及び解離速度(「オフ速度」、k_d)は、結合及び解離の間に得られたシグナルから得られ、そして平衡解離定数(「結合定数」、K_D)は、それらから計算することができる。共鳴単位(RU)で示されるシグナルは、検体中に存在するリガンドのサイズに依存するが、実験条件が同じ場合、すなわち同じ条件でリガンドが同じ分子である場合は、得られたRUは親和性を示し得、ここでRUで得られたシグナルが高いほど結合が高い。

【００５２】

抗原1(Ag1)に結合するモノクローナル抗体は、EC_{50}が両方の抗原について同様の範囲にある場合に抗原2(Ag2)に対して「交差反応性」である。本出願において、Ag1に結合する抗体は、両方の抗原について同じ方法で測定した親和性でAg1の親和性に対するAg2の親和性の比が10に等しいか又は１０未満である場合(特に、5、2、1又は0.5)、Ag2に対して交

差反応性である。

【００５３】

Ag1に結合する抗体は、親和性が２つの抗原について非常に異なる場合にはAg2に対して「有意に交差反応性ではない」。Ag2に対する親和性は、結合応答が低すぎる場合には測定不可能かもしれない。本出願において、Ag1に結合するモノクローナル抗体は、モノクローナル抗体のAg2に対する結合応答が同じ実験設定でかつ同じ抗体濃度でAg1に対して同じモノクローナル抗体の結合応答の５％未満である場合は、Ag2に対して有意に交差反応性ではない。実際には、使用される抗体濃度は、EC_{50}又はAg1で得られた飽和プラトーに達するために必要な濃度であり得る。

【００５４】

本明細書で使用される「特異性」は、それが結合する標的ペプチド配列（「エピトープ」)を、緊密に関連した高度に相同性のペプチド配列と区別する抗体の能力を示す。

【００５５】

モノクローナル抗体は、それがAg2と有意に交差反応性出ない場合にAg1に「特異的に結合する」。

【００５６】

「ドメイン」は、一般的には配列相同性に基いて定義され、そしてしばしば、特定の構造又は機能実体に関連するタンパク質のいずれかの領域であり得る。

【００５７】

「組み換え」分子は、組み換え手段により製造、発現、生成、又は単離されたものである。

【００５８】

本明細書で使用される用語「被験体」は、齧歯動物、猫科動物、イヌ科動物、及び霊長類のような哺乳動物を示す。特に、本発明に従う被験体はヒトである。

【００５９】

抗CD3抗体

「CD3」は、多分子T細胞受容体複合体の一部としてT細胞上に発現され、かつ少なくとも２つの異なる鎖CD3ε、CD3δ及びCD3γからなる抗原を示す。CD3δ及びCD3γは、CD3εに対して低い配列同一性及び／又は類似性を有する(類似性及び同一性が20%未満である)。CD3ε及びCDR3δは、一緒に複合体を形成することができる（本明細書では「CD3ε/δ複合体」と呼ばれる）。CD3εはまた、例えば、抗CD3抗体を固定することにより、CDR3γとの複合体、T細胞上のCD3のいわゆる「CD3ε/γ複合体」クラスタリングを形成し、T細胞受容体の結合と類似したT細胞活性化を生じるが、そのクローンに典型的な特異性とは独立したものである。「CD3ε」は３つのドメイン、細胞内ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞外ドメインを含む。

【００６０】

大部分の先行技術の抗CD3抗体はCD3ε鎖を認識する。このような先行技術の抗CD3抗体の１つはOKT3である。先行技術は、抗体分子を使用して、例えば抗体分子OKT3を使用することにより、T細胞活性化事象を例証した。抗CD3抗体及びその変異体は先行技術に記載されている(US 4,361,549；US 4,361,549；US 5,885,573；US 5,929,212；及びWO 98/52975又はUS 5,955,358)。OKT3は、同種移植片拒絶を処置するために臨床移植における有効な免疫抑制剤としてさらに使用されてきた(Thistlethwaite 1984、Transplantation 38、695-701；Woodle 1991、Transplantation 51、1207-1212；Choi 2001、Eur. J. Immunol. 31(1)、94-106)。

【００６１】

この治療の主な欠点は、T細胞とFcγR保有細胞との間の架橋に起因するサイトカイン放出で表されるT細胞活性及びヒト抗マウス抗体(HAMA)応答である。いくつかの刊行物は、OKT3のヒト化のようなこれらの副作用を減らすための変更を記載した：US 5,929,212；US 5,885,573及びその他。他方で、OKT3又は他の抗CD3抗体は、T細胞の活性化及び増殖を刺激する免疫賦活剤として使用することができる(US 6,406,696 Bluestone；US 6,143,297

Bluestone；US 6,113,901 Bluestone；Yannelly 1990、J. Immunol. Meth. 1 、91-100)。抗CD3抗体はまた、T細胞増殖を誘導するために抗CD28抗体と組み合わせて使用される薬剤として記載されている(US 6,352,694)。OKT3はさらに、細胞傷害性T細胞を腫瘍細胞又はウイルス感染細胞に標的化させるために、それ自体で又は二重特異性抗体の成分として使用されている(Nitta 1990、Lancet 335、368-376；Sanna 1995、Bio/Technology 13、1221-1224；WO 99/54440)。

【００６２】

T細胞を動員するための薬剤として抗体を使用する今までのアプローチは、いくつかの知見により妨げられた。第一に、T細胞に対して高い結合親和性を有する天然又は操作された抗体は、しばしば、それらが結合されるT細胞を活性化しない。第二に、T細胞に対する低い結合親和性を有する天然又は操作された抗体はまた、T細胞媒介細胞溶解を開始するそれらの能力に関して有効でない。

【００６３】

シグナルペプチドを含む全長ヒトCD3εタンパク質の参照配列は、Uniprotデータベースから受入番号P07766で入手可能であり、そして本明細書に配列番号1で加入される(2014年12月12日利用可能)。

【００６４】

シグナルペプチドを含む全長カニクイザル（Macaca fascicularis）CD3εタンパク質の参照配列は、Uniprotデータベースから受入番号Q95LI5で利用可能であり、そして本明細書に配列番号2で加入される(2014年12月12日利用可能)。

【００６５】

本発明者らによりゲノムDNAからクローニングされた成熟ヒトCD3ε Hisタグ化（tagged）Fc融合タンパク質の配列は、配列番号3で開示される。上記成熟ヒトCD3ε Hisタグ化Fc融合タンパク質は、全長ヒトCD3εタンパク質のアミノ酸23～126を含み、従ってヒトCD3εの細胞外ドメインを含む。

【００６６】

本発明者らによりゲノムDNAからクローニングされた成熟カニクイザルCD3εFc融合タンパク質の配列は、配列番号4で開示される。上記成熟カニクイザルCD3ε Fc融合タンパク質は、全長カニクイザルCD3εタンパク質のアミノ酸23～117を含み、従って野生型配列のアミノ酸位置57と比較してアミノ酸位置35での１つのアラニンのバリンへの交換を含有するヒト又はカニクイザルCD3εの細胞外ドメインを含む。

【００６７】

ヒト及びカニクイザルCD3εのドメイン編成は以下のとおりである(Uniprot P07766配列(ヒト)及びUniprot Q95LI5配列(カニクイザル)に基づく):

【表２】

CD3ε ドメイン	配列番号１上の位置（ヒト）	配列番号２上の位置（カニクイザル）
細胞外	23 - 126	22 - 117
膜貫通ドメイン	127 - 152	118 - 138
細胞質	153 - 207	139 - 198

【００６８】

従って、ヒトCD3εの細胞外ドメインは、配列番号1の位置23～126におけるアミノ酸からなり、そしてカニクイザルCD3εの細胞外ドメインは、配列番号2の位置22～117のアミノ酸からなる。

【００６９】

本発明者らは、特定のマウス及びラット抗CD3抗体を生成、スクリーニング及び選択す

ることに成功した。これらの抗CD3抗体は、ヒト及びカニクイザルCD3タンパク質の両方について高い親和性を提示するが、標的細胞の存在しない場合は低いT細胞活性化を有する。

【００７０】

本発明者らは、このようなモノクローナル抗体、いわゆる抗CD3抗体「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「12D2-E5」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「18H11-F10」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「3G5-E10」、「9D7-F3」、「8C2-F7」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「6C9-C9」、「3E8-G1」、「3H6-D2」及び「8H2」の可変重鎖及び軽鎖の配列を決定した。

【００７１】

いわゆる「20G6-F3」抗CD3抗体は:

－　配列番号6の配列のCDR1-H、配列番号7の配列のCDR2-H、及び配列番号8の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化１】

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFTKAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKDKSNS**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGVYYALSPFDY**WGQGVM
VTVSS

(配列番号5、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化２】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQSLIY**KVS**N
RFSGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVDPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号9、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００７２】

いわゆる「4B4-D7」抗CD3抗体は:

－　配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号14の配列のCDR2-H、及び配列番号15の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化３】

EVQLVETGGRLVQPGRSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKARSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGTYYASKPFDY**WGQGVM
VTVSS

(配列番号12、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号17の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化４】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHDNGNTY**LSWSLQRPGQSPQVLIY**KVS**N
RFSGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号16、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００７３】
いわゆる「4E7-C9」抗CD3抗体は:
－ 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、及び配列番号20の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化５】

EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKDKSNN**
YATYYAESLKGRFTISRDDPKRSIYLQMNSLREEDTAIYYC**RYVHYGIGYAMDA**WGQGT
SVTVSS

(配列番号18、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－ 配列番号22の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化６】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLEHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQPLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGPGTKLELK

(配列番号21、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００７４】
いわゆる「18F5-H10」抗CD3抗体は:
－ 配列番号24の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、及び配列番号25の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化７】

EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFTNAW**MHWVRRSPEKQLEWVAQ**IKDKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RYVHYRFAYALDA**WGRGT
SVSVSS

(配列番号23、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－ 配列番号27の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L、及び配列番号28のCDR3-Lを含む、配列
【化８】

DVLMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHTNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**NR
LSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTHYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号26、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００７５】
いわゆる「12D2-E5」抗CD3抗体は:
－ 配列番号30の配列のCDR1-H、配列番号31の配列のCDR2-H、及び配列番号32の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化９】

EVKLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS**GFNFYAYW**MGWVRQAPGKGLEWIGE**IKKDGTTI**
NYTPSLKDRFTISRDNAQNTLYLQMTKLGSEDTALYYC**AREERDGYFDY**WGQGVMVTV
SS

(配列番号29、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号34の配列のCDR1-L、 配列「RDD」のCDR2-L、及び配列番号35の配列のCDR3-L
を含む、配列
【化１０】

QFVLTQPNSVSTNLGSTVKLSCKRS**TGNIGSNY**VNWYQQHEGRSPTTMIY**RDD**KRPDG
VPDRFSGSIDRSSNSALLTINNVQTEDEADYFC**QSYSSGIV**FGGGTKLTVL

(配列番号33、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００７６】
いわゆる「11D7-C3」抗CD3抗体は:
－　配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号38の配列のCD
R3-Hを含む、配列
【化１１】

EVQFVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTATYYC**RGLYYGLSPSDY**WGQGV
MVTVSS

(配列番号36、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号28の配列のC
DR3-Lを含む、配列
【化１２】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTHYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号39、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００７７】
いわゆる「11H3-E5」抗CD3抗体は:
－　配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号41の配列のCD
R3-Hを含む、配列
【化１３】

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGTYYAYKPFDY**WGQGV
MVTVSS

(配列番号40、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号17の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のC
DR3-Lを含む、配列
【化１４】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHDNGNTY**LSWSLQKPGQSPQVLIY**KVS**N
RFSGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号42、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００７８】
いわゆる「13H2-C2」抗CD3抗体は:
－ 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号44の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化１５】

EEELVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPDKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLKEEDTAIYYC**RYVHYGLAPMDA**WGQGT
SVTVSS

(配列番号43、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、及び
－ 配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化１６】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKAGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFILKISRVEPDDLGVFYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号45、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【００７９】
いわゆる「13C1-F6」抗CD3抗体は:
－ 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号47の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化１７】

EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLQLNSLREEDTAIYYC**RGTQYGYNPFDY**WGQGV
MVTVSS

(配列番号46、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、及び
－ 配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化１８】

DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQRSGQSPQLLIY**KVS**N
RLSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRIEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGSGTRLEIK

(配列番号48、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【００８０】
いわゆる「18H11-F10」抗CD3抗体は:
－ 配列番号50の配列のCDR1-H、配列番号51の配列のCDR2-H、及び配列番号52の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化１９】

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFIFSDYY**MAWVRQAPKKGLEWVAT**ISISGSRT**Y
YPDSVKGRFTVSRDNAKSSLYLQMNSLKSEDTATYYC**ATNNPGGWFVY**WGQGTLVTV
SS

(配列番号49、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号54の配列のCDR1-L、配列「NAN」からなるCDR2-L、及び配列番号55の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化２０】

NIQMTQSPSLLSASVGDRVTLSCKAG**QNINND**LAWYQQKLGEAPRLLIY**NAN**SLQTGIPS
RFSGSGSGADFTLTISSLQPEDVATYFC**QQYSSGDT**FGAGTKLELK

(配列番号53、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００８１】
いわゆる「1E6-C9」抗CD3抗体は:
－　配列番号57の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号58の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化２１】

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSYAW**MHWVRQSPDKQLQWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVEGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGVYYGLLGLDA**WGQGT
SVTVSS

(配列番号56、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号28の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化２２】

DVVMTQTPVSLSVRLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWFLQKPGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSASGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTHYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号59、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００８２】
いわゆる「10F4-C10」抗CD3抗体は:
－　配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号61の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化２３】

EVQLVETGGSLVQPGKSLKITCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNNY**
ATYYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RAVNYGNYPLDY**WGQGVMV
TVSS

(配列番号60、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、及び
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化２４】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWCLQKPGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号62、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００８３】
いわゆる「10E6-G6」抗CD3抗体は:
－ 配列番号64の配列のCDR1-H、配列番号65の配列のCDR2-H、及び配列番号47の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化２５】

EVQLVETGGGLVQSGKSLKLTCATS**GFTVTNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YETYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RGTQYGYNPFDY**WGQGV
MVTVSS

(配列番号63、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、及び
－ 配列番号67の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号28の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化２６】

DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGYTY**LSWYLQKPGQSPQVFIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRIEPDDLGVYYC**GQGTHYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号66、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【００８４】
いわゆる「18G9-H11」抗CD3抗体は:
－ 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号69の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化２７】

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**IQWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNNY**
ATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTALYYC**TWRHYYSSHTMDA**WGQG
TLVTVSS

(配列番号68、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－ 配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号71の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化２８】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVAPTDLGVYYC**GQGSQYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号70、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【００８５】
いわゆる「11F3-B9」抗CD3抗体は:
－ 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号84の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化２９】

EVQLVETGGSLVQPGKSLTLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RYVNYGLAPMDV**WGQGT
SVTVSS

(配列番号72、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号17の配列のCDR1-L、配列「KVS」CDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化３０】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHDNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号73、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００８６】
いわゆる「12G3-E8」抗CD3抗体は:
－　配列番号75の配列のCDR1-H、配列番号76の配列のCDR2-H、及び配列番号77の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化３１】

EVRVVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSLAW**MHWVRQSPEKKLEWVAQ**IKDKANN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNRLKEEDTAIYYC**RGVYYGFSMTPFDY**WGQ
GVMVTVSS

(配列番号74、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化３２】

DVAMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQVLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGADFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号78、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００８７】
いわゆる「5B1-G2」抗CD3抗体は:
－　配列番号80の配列のCDR1-H、配列番号76の配列のCDR2-H、及び配列番号81の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化３３】

EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFSFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKDKANN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKGSIYLQMNSLKEEDTAVYYC**RGLYYGLFPSDY**WGQGV
MVTVSS

(配列番号79、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化３４】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLLKPGQSPQLLIY**KVS**NR
FSGISDRFSGGGSGTDFTLKISRLEPDDLGIYYC**GQGTQYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号82、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００８８】
いわゆる「16F8-A7」抗CD3抗体は:
－ 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号84の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化３５】

VETGGNLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNNYAT**Y
YAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC**RYVNYGLAPMDV**WGQGTSVTV
SS

(配列番号83、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－ 配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化３６】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号85、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００８９】
いわゆる「11F9-F8」抗CD3抗体は:
－ 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号47の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化３７】

EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLQLNSLREEDTAIYYC**RGTQYGYNPFDY**WGQGV
MVTVSS

(配列番号46、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－ 配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号88の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化３８】

DVVLTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWSLQKPGQSPQVLIY**KVS**NR
FSGISNRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGAHYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号87、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００９０】
いわゆる「3G5-E10」抗CD3抗体は:
－ 配列番号90の配列のCDR1-H、配列番号91の配列のCDR2-H、及び配列番号32の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化３９】

EVKLVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFNFNVYW**MGWVRQAPGKGLEWIGE**IKKDSNSI**
NYTPSLKEKFTISRDNAQNTLYLQVNKLGSEDTAIYYC**AREERDGYFDY**WGQGVMVTVS
S

(配列番号89、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号93の配列のCDR1-L、配列「GAS」からなるCDR2-L、及び配列番号94の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化４０】

NIVMTQSPKSMSMSVGERVTLTCKAS**ENVVTY**VSWYQQKPEQSPKLLIY**GAS**NRYTGV
PDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHC**GQGYSYPYT**FGGGTKLEIK

(配列番号92、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００９１】
いわゆる「9D7-F3」抗CD3抗体は:
－　配列番号96の配列のCDR1-H、配列番号97の配列のCDR2-H、及び配列番号98の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化４１】

AVQLVESGGGLVQPKESLKISCAAS**GFTFSNAA**MYWVRQAPGKGLEWVAR**IRTKPNNY**
ATYYADSVTGRFIISRDDSRSMVYLQMDNLQTEDTAMYYC**TALISTAMAA**WGQGTSVT
VSS

(配列番号95、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号100の配列のCDR1-L、配列「NTN」からなるCDR2-L、及び配列番号101の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化４２】

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKAS**QNINKY**LNWYHQMLGEAPKLVIS**NTN**NLQAGIPS
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC**LQHRSGYT**FGLGTKLELK

(配列番号99、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００９２】
いわゆる「8C2-F7」抗CD3抗体は:
－　配列番号103の配列のCDR1-H、配列番号104の配列のCDR2-H、及び配列番号105の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化４３】

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKAS**GYTFTDFA**MNWVKQAPGNGLKWMGW**INTQTGK**
PTYADGFKQRFVFSLETSASTIYLQINNLNIEDTATYFC**TRGALAS**VGQGVLVTVSS

(配列番号102、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化４４】

DVVMTQTPVSLSVSLGSHVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQPLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLEINRVEPDDLGVYYC**GQGAQYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号106、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００９３】
いわゆる「20E5-F10」抗CD3抗体は:
－　配列番号80の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、及び配列番号108の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化４５】

EVQLVETGENLVQPGKSLRLTCATS**GFSFSNAW**MHWIRQSPEKQLEWVAQ**IKDKSNNY**
ATYYAESVNGRFTISRDDSKSSIYLHMDNLKEEDSAIYYC**RYVHYGVRFFYTMDV**WGQG
TSVTVSS

(配列番号107、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化４６】

DVVMTQTPVSLSVSLGDQVSISCRPS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPHPLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号109、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【００９４】
いわゆる「20B5-F10」抗CD3抗体は:
－　配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、及び配列番号111の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化４７】

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKAKSNN**
YATYYAESVKGRFTISRDDSISSVYLQMNNLKEEDTAIYYC**RGVYYGFLGMDA**WGQGT
SVTVSS

(配列番号110、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号113の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号114の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化４８】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QRLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLVY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTEYPFT**FGSGTKLEIK

(配列番号112、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【００９５】
いわゆる「6C9-C9」抗CD3抗体は:
－　配列番号116の配列のCDR1-H、配列番号117の配列のCDR2-H、及び配列番号118の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化４９】

AVQLVESGGGLVRPKESLKISCAAS**GFTFRNAA**MYWVRQAPGKGLEWVARI**RTQPNNY AK**YYADSVKDRFTISRDDSKSMVYLQMDNLKTEDTAMYYC**TGLVVTAMDA**WGQGTSV TVSS

(配列番号115、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号100の配列のCDR1-L、配列「VTN」からなるCDR2-L、及び配列番号120の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化５０】

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKAS**QNINKY**LNWYQQKLGEAPKLLIY**VTN**NLQTGIPS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFC**LQHRSMYT**FGTGTKLELK

(配列番号119、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン

を含む。

【００９６】

いわゆる「3E8-G1」抗CD3抗体は:

－　配列番号122の配列のCDR1-H、配列番号123の配列のCDR2-H、及び配列番号124の配列のCDR3-Hを含む、配列

【００９７】

【化５１】

EVQVVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFTFSNYY**MDWVRQAPKKGLEWVAT**ITASGSRI** YYPDSVKGRFTISRDNAKSSLYLLMNSLKSEDTATYYC**ARERTDAYFDY**WGQGVMVTV SS

(配列番号121、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号126の配列のCDR1-L、配列「RDD」からなるCDR2-L、及び配列番号127の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化５２】

QFILTQPNSVSTILGSTVKLSCKRS**TGNIGTNY**VSWYQHHEGRSPTTMIY**RDD**KRPDGV PDRFSGSIDRSSNSALLTINNVQTEDEADYFC**QSYISGLNPV**FGGGSKLTVL

(配列番号125、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン

を含む。

【００９８】

いわゆる「3H6-D2」抗CD3抗体は:

－　配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、及び配列番号129の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化５３】

EVQLVETGGRLVQPGKSLKLTCATS**GFTFSNAW**MHWVRQSPEKQLEWVAQ**IKDKSNN YAT**YYAESVKGRFTISRDDSKSIIYLQMNSLKEEDTAIYYC**RALTYYGYKRDAMDG**WGH GTSVTVSS

(配列番号128、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並び

に
－　配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」からなるCDR2-L、及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化５４】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS**QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**N
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GQGTQYPFT**FGAGTKLELK

(配列番号130、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【００９９】
いわゆる「8H2」抗CD3抗体は:
－　配列番号103の配列のCDR1-H、配列番号104の配列のCDR2-H、及び配列番号105の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化５５】

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKAS**GYTFTDFA**MNWVKQAPGNGLKWMGW**INTQTGK**
PTYADGFKQRFVFSLETSASTIYLQINNLNIEDTATYFC**TRGALAS**VGQGVMVTVSS

(配列番号131、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号133の配列のCDR1-L、配列「LVS」からなるCDR2-L、及び配列番号134の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化５６】

DVVMTQTPVSLSVAIGQPASISCKSS**QSLVGTSGKTY**LNWLLQRPGQSPKRLIY**LVS**KLD
SGIPDRFSGSGSETDFTLKISRVETDDLGVYYC**LQGSHFPLT**FGSGTKLEIK

(配列番号132、CDRは太字及び下線を付して示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１００】
一実施態様において、本発明の抗CD3抗体はヒトCD3に結合する。別の実施態様において、本発明の抗CD3抗体は、カニクイザルCD3にさらに結合する。特に、本発明の抗CD3抗体は、ヒトCD3、又はヒト及びカニクイザルCD3の両方の細胞外ドメインに結合する。より詳細には、抗体はCD3εに結合する。より詳細には、抗CD3抗体はCD3εのヒト及びカニクイザル細胞外ドメインに結合する。抗CD3抗体は、単離された形態で発現されたか、又は可溶性細胞外ドメイン若しくは例えばT細胞に存在するような全長膜係留CD3εで存在するかを区別せずに、CD3ε/δ複合体のような複合体の形態で存在する場合、又は単一のタンパク質として存在する場合に、CD3εに結合する。

【０１０１】
本発明に従う抗CD3抗体は、表面ヒトCD3タンパク質に対して、又はヒト及びカニクイザルCD3タンパク質の、特にCD3εに対して特異的である。

【０１０２】
一実施態様において、本発明に従う抗CD3抗体は、≦10、特に≦6、≦5、≦4、≦3、例えば≦2、≦1又は≦0.5である、ヒトCD3についての親和性に対するカニクイザルCD3についての親和性の比(KD(カニクイザル)/ KD(ヒト))を有する。本発明に従うこのようなポリペプチドは、サルにおける毒性研究において使用され得、サルにおいて観察される関連する毒性プロフィールは、ヒトにおける可能性のある有害作用を予測する。

【０１０３】
特に、本発明の抗CD3抗体は、CD3γ及び／又はCD3δタンパク質に結合しないか、又は

それらと有意に交差反応しない。

【０１０４】

特に、抗体は、上述のヒト及びカニクイザルCD3γ及び／又はCD3δタンパク質の細胞外ドメインに結合しないか又は有意に交差反応しない。

【０１０５】

全長ヒトCD3δタンパク質の配列は、Uniprotデータベースにおいて受入番号P04234で利用可能である(配列番号86、2014年12月14日に利用可能なとおり)。ヒトCD3δ細胞外ドメインは、配列番号86の位置22～105のアミノ酸からなる。

【０１０６】

全長ヒトCD3γタンパク質の配列は、Uniprotデータベースにおいて受入番号P09693で利用可能である(配列番号185、2014年12月14日に利用可能なとおり)。ヒトCD3γの細胞外ドメインは、配列番号185の位置23～116のアミノ酸からなる。

【０１０７】

さらに、本発明に従う抗CD3抗体は、ヒトCD3若しくはカニクイザルCD3、又は両方について、≦90nM、≦50nM、又は≦30nM、例えば≦20nM、≦10nM、≦8nM、≦6nM、≦4nM又は≦2nMである親和性(KD)、例えば0.1nM～10nM、特に0.1nM～8nM、又は0.1nM～4nMの親和性を有する。

【０１０８】

ヒトCD3又はカニクイザルCD3についての親和性は、捕捉抗原としてヒト及びカニクイザル由来の可溶性組み換えCD3ε/δ複合体を使用した表面プラズモン共鳴を用いてKD値として測定される。

【０１０９】

一例において、抗CD3抗体の結合親和性は、例えばBiacore3000機器(GE Healthcare)を使用して表面プラズモン共鳴(SPR)により測定される。アッセイ緩衝液は、例えばHBS-EP(BR-1001-88、GE Healthcare)である。例えば、実施例に記載されるFc融合タンパク質の形態の、シグナルペプチドを含む、ヒトCD3ε及びヒトCD3δサブユニット細胞外ドメイン構築物が抗原として使用され得る。あるいは、実施例において記載されるFc融合タンパク質の形態の、シグナルペプチドを含む、カニクイザルCD3ε及びカニクイザルCD3δサブユニット細胞外ドメイン構築物が、抗原として利用され得る。カニクイザルCD3ε/δ-Fc融合タンパク質は、例えば、ヒト抗体捕捉キット(GE Healthcare)を使用して達成される。例えば、捕捉抗体は、例えばアミンカップリングキット(BR-100-50、GE Healthcare)を使用して、例えば約12.000 RUまでCM5チップ(BR-1001-88、GE Healthcare)にカップリングされ得る。CD3ε/δ-Fc融合タンパク質は、10 μl/分で約70RUまで補足されて、Rmax値30RUを生じる。抗CD3抗体についての結合動力学は、例えば30μl/分で240秒及び600秒間、それぞれ結合及び解離領域について測定され得る。例えば、アッセイ緩衝液中3から400nMへの抗CD3抗体の2倍希釈が使用され得る。捕捉表面の再生は、例えば3M $MgCl_2$溶液の30μl/分での例えば1分注入を用いて行われ得る。データ解析のために、例えばBIAevaluationソフトウェアv.4.1(GE Healthcare)が使用され得る。データは、大量転送を用いた１：１Langmuirモデルを使用して全体的にフィッティングされ得る。

【０１１０】

一実施態様において、本発明の抗CD3抗体はまた、≦60nM、例えば≦50nM、≦40nM、≦30nM、≦20nM又は≦15nMである、例えばヒトT細胞においてFACS分析により決定された見かけのEC50を有する。典型的には、見かけのEC50は、1～60nMの範囲内、特に1～30nM、例えば1～20nMの範囲内である。

【０１１１】

一実施態様において、本発明の抗CD3抗体は、標的細胞の存在しない場合には、10%未満、8%未満、6%未満、4%未満、2%未満、1%未満、例えば0.5%未満であるT細胞活性化を有する。

【０１１２】

用語「T細胞の活性化」は、本明細書において、細胞傷害性顆粒融合、一過性サイトカ

イン放出、及び増殖を含むCD3シグナル伝達を誘発することを指す。本発明の抗体様結合タンパク質及び抗CD3抗体は、CD3εを標的とし、そして標的細胞の存在下でT細胞を活性化する；この活性化はまた、「T細胞誘導効果（engaging effect）」とも呼ばれる。T細胞誘導効果は、標的細胞における細胞傷害性を誘導する。

【０１１３】

当業者に公知のように、T細胞の活性化は、CD69及びCD25のような表面マーカーの発現を誘導する。従ってT細胞の活性化は、CD4+/CD25+、CD4+/CD69+、CD8+/CD25+、又はCD8+/CD69+T細胞の発現を検出及び測定することにより測定することができる。T細胞活性化を測定するための方法は当業者に公知である。

【０１１４】

T細胞活性化を測定するための方法は、実施例の項においてさらに開示される(実施例3.3)。従って、本発明の文脈において、T細胞活性化は、細胞の総数のうちのCD69を発現している細胞のパーセンテージ（%）として、又は細胞の総数のうちのCD4及びCD69を発現している細胞のパーセンテージ（%）として、又は細胞の総数のうちのCD8及びCD69を発現している細胞のパーセンテージ（%）のいずれかとして測定される。

【０１１５】

本発明の抗CD3抗体の文脈において「低T細胞活性化」は、標的細胞の存在しない場合に10%未満、8%未満、6%未満、4%未満、2%未満、1%未満、例えば0.5%未満のT細胞活性化を指す。

【０１１６】

「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「12D2-E5」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「18H11-F10」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「3G5-E10」、「9D7-F3」、「8C2-F7」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「6C9-C9」、「3E8-G1」、「3H6-D2」及び「8H2」抗CD3抗体のVH及びVL領域の配列のアライメントが行われた。CDR-H及びCDR-L配列の比較は、構造的に、「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」及び「3H6-D2」が密接に関連しており、上記抗体はおそらく同じエピトープに結合するということを示す傾向がある。上記の関連する抗体のCDR-H及びCDR-L配列の比較を図１及び２にそれぞれ示す。CDR位置は、抗体間で厳密に保存されており、従って特異性のために重要と推測されたが、一方で他の位置は置換を支持し得ると同定された。

【０１１７】

従って、本発明に従う抗体は:

－　配列$GFX_1X_2X_3X_4AW$（配列番号331）［ここで、X_1はT又はSであり、X_2はF又はVであり、X_3はS又はTであり、そしてX_4はN、K、L若しくはY、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR1-H；及び

配列$IKX_1X_2X_3NX_4YX_5T$(配列番号332)［ここで、X_1はA又はDであり、X_2はK又はRであり、X_3はS又はAであり、X_4はN又はSであり、そしてX_5はA若しくはE、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR2-H；及び

配列 TWRHYYSSHTMDA（配列番号69)又は RALTYYGYKRDAMDG（配列番号129)又は $RX_1X_2X_3YX_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}DX_{12}$（配列番号333）［ここで、$X_1$はY、G又はAであり、$X_2$はV、T又はLであり、$X_3$はH、N、Y又はQであり、$X_4$はG、R又はAであり、$X_5$はF若しくはVであるか、又はアミノ酸ではなく、$X_6$はRであるか又はアミノ酸ではなく、$X_7$はF、S若しくはIであるか又はアミノ酸ではなく、$X_8$はF、L、N、M、Y、S、A又はGであり、$X_9$はY、A、K、S、N、T、F又はLであり、$X_{10}$はA、P、G又はTであり、$X_{11}$はM、L、F又はSであり、そして$X_{12}$はA、V若しくはY、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列 $QX_1LX_2HX_3NGX_4TY$（配列番号334）［ここで、X_1はR又はSであり、X_2はV又はEで

あり、X_3はN、D又はTであり、そしてX_4はN若しくはY、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR1-L；及び
配列「KVS」からなるCDR2-L；及び
配列 GQGX$_1$X$_2$YPFT（配列番号335）［ここで、X_1はT、A又はSであり、そしてX_2はH、E若しくはQ、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１１８】

一実施態様によれば、本発明に従う抗CD3抗体は、上に列挙される28のいわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「12D2-E5」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「18H11-F10」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「3G5-E10」、「9D7-F3」、「8C2-F7」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「6C9-C9」、「3E8-G1」、「3H6-D2」及び「8H2」抗CD3抗体のうちの１つの重鎖及び／又は軽鎖のCDR配列を含む。

【０１１９】

従って、本発明は:

ａ）　配列番号6の配列又は配列番号6と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号7の配列又は配列番号7と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号8の配列又は配列番号8と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10若しくは配列番号142の配列又は配列番号10若しくは配列番号142と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｂ）　配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号14の配列又は配列番号14と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号15の配列又は配列番号15と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号17若しくは配列番号184の配列又は配列番号17若しくは配列番号184と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｃ）　配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号19の配列又は配列番号19と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号20の配列又は配列番号20と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号22の配列又は配列番号22と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｄ）　配列番号24の配列又は配列番号24と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号19の配列又は配列番号19と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号25の配列又は配列番号25と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号27の配列又は配列番号27と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号28の配列又は配列番号28と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｅ）　配列番号30の配列又は配列番号30と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCD

R1-H；配列番号31の配列又は配列番号31と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号32の配列又は配列番号32と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号34の配列又は配列番号34と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「RDD」又は配列「RDD」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号35の配列又は配列番号35と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

【０１２０】

ｆ） 配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H； 配列番号38の配列又は配列番号38と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号28の配列又は配列番号28と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｇ） 配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列 配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号41の配列又は配列番号41と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号17の配列又は配列番号17と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｈ） 配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号44の配列又は配列番号44と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｉ） 配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号47の配列又は配列番号47と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｊ） 配列番号50の配列又は配列番号50と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号51の配列又は配列番号51と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号52の配列又は配列番号52と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号54の配列又は配列番号54と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「NAN」又は配列「NAN」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号55の配列又は配列番号55と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

【０１２１】

ｋ） 配列番号57の配列又は配列番号57と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCD

R1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号58の配列又は配列番号58と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号28の配列又は配列番号28と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｌ） 配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号61の配列又は配列番号61と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
C配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｍ） 配列番号64の配列又は配列番号64と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号65の配列又は配列番号65と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号47の配列又は配列番号47と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号67の配列又は配列番号67と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号28の配列又は配列番号28と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｎ） 配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号69の配列又は配列番号69と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号71の配列又は配列番号71と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｏ） 配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号84の配列又は配列番号84と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号17の配列又は配列番号17と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

【０１２２】

ｐ） 配列番号75の配列又は配列番号75と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号76の配列又は配列番号76と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号77の配列又は配列番号77と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｑ） 配列番号80の配列又は配列番号80と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号76の配列又は配列番号76と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異な

る配列のCDR2-H；配列番号81の配列又は配列番号81と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｒ）　配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号84の配列又は配列番号84と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｓ）　配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号47の配列又は配列番号47と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号88の配列又は配列番号88と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｔ）　配列番号90の配列又は配列番号90と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号91の配列又は配列番号91と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号32の配列又は配列番号32と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号93の配列又は配列番号93と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「GAS」又は配列「GAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号94の配列又は配列番号94と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

【０１２３】

ｕ）　配列番号96の配列又は配列番号96と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号97の配列又は配列番号97と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号98の配列又は配列番号98と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号100の配列又は配列番号100と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「NTN」又は配列「NTN」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号101の配列又は配列番号101と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｖ）　配列番号103の配列又は配列番号103と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号104の配列又は配列番号104と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号105の配列又は配列番号105と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｗ）　配列 配列番号80の配列又は配列番号80と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号19の配列又は配列番号19と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列 配列番号108の配列又は配列番号108と１つのアミノ酸置換

によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｘ）　配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号37の配列又は配列番号37と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号111の配列又は配列番号111と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号113の配列又は配列番号113と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号114の配列又は配列番号114と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｙ）　配列番号116の配列又は配列番号116と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号117の配列又は配列番号117と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号118の配列又は配列番号118と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号100の配列又は配列番号100と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「VTN」又は配列「VTN」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号120の配列又は配列番号120と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｚ）　配列番号122の配列又は配列番号122と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号123の配列又は配列番号123と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号124の配列又は配列番号124と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号126の配列又は配列番号126と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「RDD」又は配列「RDD」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号127の配列又は配列番号127と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

【０１２４】

ａａ）　配列番号13の配列又は配列番号13と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号19の配列又は配列番号19と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号129の配列又は配列番号129と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号10の配列又は配列番号10と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「KVS」又は配列「KVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号11の配列又は配列番号11と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｂｂ）　配列番号103の配列又は配列番号103と１つのアミノ酸置換によって異なるCDR1-H；配列番号104の配列又は配列番号104と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号105の配列又は配列番号105と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号133の配列又は配列番号133と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「LVS」又は配列「LVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号134の配列又は配列番号134と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン
を含む、抗CD3抗体に関する。

【０１２５】

1つ又はそれ以上の個々のアミノ酸が、上記CDR配列の1つ又はそれ以上において、置換により、特に保存的置換により変更され得る。このような変更は、抗体のヒト化に関連し

て、例えばグリコシル化部位又は脱アミド部位を除去することを意図され得る。

【０１２６】

「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」及び「3H6-D2」のVH及びVL領域の配列のアライメントに基づいて、様々なアミノ酸置換が同定された。従って、一実施態様において、アミノ酸は:

－ CDR1-Hにおいて位置3～6の1つ又はそれ以上において、例えば配列 GFTFSNAW (配列番号13)のCDR1-Hの位置3、5若しくは6において、又は例えば配列 GFTFSNAW (配列番号13)のCDR1-Hの位置4及び5において；及び／又は

－ CDR2-Hにおいて、位置3～5、7及び9の1つ又はそれ以上において、例えば配列 IKAKSNNYAT (配列番号37)のCDR2-Hの位置3、4、5、7若しくは9において、又は例えば配列 IKAKSNNYAT (配列番号37)のCDR2-Hの位置3及び5若しくは3及び7において；及び／又は

－ CDR3-Hにおいて、位置2～4、7～10及び12のうちの1つ又はそれ以上において、例えば配列 RGVYYALSPFDY (配列番号8)のCDR3-Hの位置2、3、4、6、7、8、9及び10において若しくは位置2、4、6、8、10及び12において若しくは位置2、3、7及び8において、又は配列 RGLYYGLSPSDY (配列番号38)のCDR3-Hの位置7及び8において、又は配列 RGLYYGLSPSDY (配列番号38)のCDR3-Hの位置2、3、4、6、7、8、9及び10において；及び／又は

－ CDR1-Lにおいて、位置2、4、6、及び9のうちの1つ又はそれ以上において、例えば配列 QSLVHDNGNTY (配列番号17)若しくはQSLVHTNGNTY (配列番号27)のCDR1-Lの位置6において又は配列 QSLVHNNGNTY (配列番号10)若しくはQRLVHNNGNTY (配列番号113)のCDR1-Lの位置2において又は配列 QSLVHNNGNTY (配列番号10)のCDR1-Lの位置4、6及び9において；及び／又は

－ CDR3-Lにおいて、位置4及び5のうちの1つ又はそれ以上において、例えば配列 GQGSQYPFT (配列番号71)若しくはGQGTQYPFT (配列番号11)のCDR3-Lの位置4において、又は配列 GQGAHYPFT (配列番号88)のCDR3-Lの位置4及び5において又は 配列 GQGTHYPFT (配列番号28)若しくはGQGTEYPFT (配列番号114)のCDR3-Lの位置5において

置換される。

【０１２７】

本発明に従う抗CD3抗体は、特に従来の抗体であり、特に従来のモノクローナル抗体であり、又は抗体フラグメント、二重特異性若しくは多特異性抗体である。

【０１２８】

本発明に従う抗CD3抗体は、特にIgG、又はそのフラグメントを含むか又はそれらからなる。

【０１２９】

さらなる実施態様によれば、本発明は:

ａ） 配列番号6の配列のCDR1-H、配列番号7の配列のCDR2-H、配列番号8の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10又は配列番号142の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｂ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号14の配列CDR2-H、配列番号15の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに
配列番号17又は配列番号184の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｃ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、配列番号20の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに
配列番号22の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｄ） 配列番号24の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、配列番号25の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに
配列番号27の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号28の配列のCDR3-Lを含む

軽鎖可変ドメイン；又は
ｅ） 配列番号30の配列のCDR1-H、配列番号31の配列のCDR2-H、配列番号32の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに
配列番号34の配列のCDR1-L、配列「RDD」のCDR2-L及び配列番号35の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｆ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号38の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに
配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号28の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｇ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号41の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに
配列番号17の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｈ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号44の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに
配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
【０１３０】
ｉ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号47の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｊ） 配列番号50の配列のCDR1-H、配列番号51の配列のCDR2-H、配列番号52の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに 配列番号54の配列のCDR1-L、配列「NAN」のCDR2-L及び配列番号55の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｋ） 配列番号57の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号58の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号28の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｌ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号61の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｍ） 配列番号64の配列のCDR1-H、配列番号65の配列のCDR2-H、配列番号47の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号67の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号28の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｎ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号69の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号71の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｏ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号84の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号17の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｐ） 配列番号75の配列のCDR1-H、配列番号76の配列のCDR2-H、配列番号77の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｑ） 配列番号80の配列のCDR1-H、配列番号76の配列のCDR2-H、配列番号81の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｒ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号84の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｓ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号47の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及

び配列番号88の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
【０１３１】
ｔ） 配列番号90の配列のCDR1-H、配列番号91の配列のCDR2-H、配列番号32の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号93の配列のCDR1-L、配列「GAS」のCDR2-L及び配列番号94の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｕ） 配列番号96の配列のCDR1-H、配列番号97の配列のCDR2-H、配列番号98の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号100の配列のCDR1-L、配列「NTN」のCDR2-L及び配列番号101の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｖ） 配列番号103の配列のCDR1-H、配列番号104の配列のCDR2-H、配列番号105の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｗ） 配列番号80の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、配列番号108の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｘ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号37の配列のCDR2-H、配列番号111の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号113の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号114の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｙ） 配列番号116の配列のCDR1-H、配列番号117の配列のCDR2-H、配列番号118の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号100の配列のCDR1-L、配列「VTN」のCDR2-L及び配列番号120の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｚ） 配列番号122の配列のCDR1-H、配列番号123の配列のCDR2-H、配列番号124の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号126の配列のCDR1-L、配列「RDD」のCDR2-L及び配列番号127の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
【０１３２】
ａａ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、配列番号129の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｂｂ） 配列番号103の配列のCDR1-H、配列番号104の配列のCDR2-H、配列番号105の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号133の配列のCDR1-L、配列「LVS」のCDR2-L及び配列番号134の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン
を含む抗CD3抗体に関する。
【０１３３】
本発明はまた、上に列挙されたいわゆる抗CD3抗体のうちの１つの少なくとも重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインを含む抗CD3抗体を提供する。
【０１３４】
従って、本発明は、特に:
ａ） 配列番号5の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号9の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｂ） 配列番号12の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号16の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｃ） 配列番号18の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号21の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｄ） 配列番号23の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号26の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｅ） 配列番号29の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン

、及び／又は配列番号33の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｆ）　配列番号36の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号39の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｇ）　配列番号40の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号42の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｈ）　配列番号43の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号45の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｉ）　配列番号46の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号48の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
【０１３５】
ｊ）　配列番号49の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号53の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｋ）　配列番号56の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号59の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；
ｌ）　配列番号60の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号62の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｍ）　配列番号63の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号66の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｎ）　配列番号68の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号70の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｏ）　配列番号72の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号73の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｐ）　配列番号74の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号78の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｑ）　配列番号79の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号82の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｒ）　配列番号83の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号85の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｓ）　配列番号46の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号87の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
【０１３６】
ｔ）　配列番号89の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号92の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｕ）　配列番号95の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン

、及び／又は配列番号99の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｖ） 配列番号102の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号106の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｗ） 配列番号107の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号109の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｘ） 配列番号110の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号112の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｙ） 配列番号115の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号119の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｚ） 配列番号121の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号125の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は

【０１３７】

ａａ） 配列番号128の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号130の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｂｂ） 配列番号131の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号132の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン

を含む、抗CD3抗体に関する。

【０１３８】

例えば、重鎖又は軽鎖の可変ドメインの配列は、必要に応じて、参照配列の配列番号5、9、12、16、18、21、23、26、29、33、36、39、40、42、43、45、46、48、49、53、56、59、60、62、63、66、68、70、72、73、74、78、79、82、83、85、87、89、92、95、99、102、106、107、109、110、112、115、119、121、125、128、130、131、132と、１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって、特に１つ又はそれ以上の保存的アミノ酸置換及び／又は標準残基での置換によって異なっていてもよい。特に、重鎖又は軽鎖の可変ドメインの配列は、参照配列の配列番号5、9、12、16、18、21、23、26、29、33、36、39、40、42、43、45、46、48、49、53、56、59、60、62、63、66、68、70、72、73、74、78、79、82、83、85、87、89、92、95、99、102、106、107、109、110、112、115、119、121、125、128、130、131、132と、保存的アミノ酸置換のみによって異なっていてもよい。

【０１３９】

配列番号5、9、12、16、18、21、23、26、29、33、36、39、40、42、43、45、46、48、49、53、56、59、60、62、63、66、68、70、72、73、74、78、79、82、83、85、87、89、92、95、99、102、106、107、109、110、112、115、119、121、125、128、130、131、132の配列と比較した配列変化は、特に、本質的にフレームワーク領域、FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L及び／又はFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hの１つ又はそれ以上に存在する。

【０１４０】

しかし、１つ又はそれ以上のCDRにおけるアミノ酸置換もまた可能である。特に、軽鎖可変ドメインの配列は、配列番号9の配列と、少なくとも配列番号9(CDR1-Lにおいて)の位置28におけるSからRへの置換により、及び／若しくは少なくとも配列番号9(CDR1-Lにおいて)の位置30におけるVからEへの置換により、及び／若しくは少なくとも配列番号9の(CDR1-Lにおける)位置33におけるNからDま若しくはTへの置換により、及び／若しくは少なくとも配列番号9の(CDR1-Lにおける)位置35におけるNからYへの置換により異なっていてもよく、かつ／又は軽鎖可変ドメインの配列は、配列番号9の配列と、少なくとも配列番号9

の(CDR3-Lにおいて)位置97におけるTからS又はAへの置換によって、及び／若しくは少なくとも配列番号9の(CDR3-Lにおける)位置98におけるQからH若しくはEへの置換によって異なっていてもよく、かつ／又は重鎖可変ドメインは、配列番号5の配列と、少なくとも配列番号5の(CDR1-Hにおける)位置28におけるTからN若しくはSへの置換によって、及び／若しくは少なくとも配列番号5の(CDR1-Hにおける)位置29におけるFからVへの置換によって、若しくは配列番号5の(CDR1-Hにおける)位置30におけるTからN若しくはYへの置換によって、若しくは少なくとも配列番号5の(CDR1-Hにおける)位置31におけるKからL若しくはYへの置換によって異なっていてもよく、かつ／又は重鎖可変ドメインは、配列番号5の配列と、少なくとも配列番号5の(CDR2-Hにおける)位置53におけるDからAへの置換によって、若しくは少なくとも配列番号5の(CDR2-Hにおける)位置54におけるKからRへの置換によって、若しくは少なくとも配列番号5の(CDR2-Hにおける)位置55におけるSからAへの置換によって、若しくは少なくとも配列番号5の(CDR2-Hにおける)位置57におけるSからNへの置換によって、若しくは少なくとも配列番号5の(CDR2-Hにおける)位置59におけるAからEへの置換によって異なっていてもよく、かつ／又は重鎖可変ドメインは、配列番号5の配列と、少なくとも配列番号5の(CDR3-Hにおける)位置100におけるGからAへの置換によって、及び／若しくは少なくとも配列番号5の(CDR3-Hにおける)位置101におけるTからVへの置換によって、少なくとも配列番号5の(CDR3-Hにおける)位置102におけるQからYへの置換によって異なっていてもよい。

【０１４１】

一実施態様において、本発明の抗CD3抗体及びそのフラグメントは、それぞれ、ラット抗体及びラット抗体のフラグメントである。

【０１４２】

本発明の一局面において、本発明の抗CD3抗体はキメラ抗体、及び特にラット／ヒト抗体、例えば重鎖及び軽鎖のラット可変ドメイン並びにヒト抗体由来のCHドメイン及びCLドメインを含む抗体であってもよい。

【０１４３】

本発明のさらなる局面において、抗CD3抗体はまた、例えばCDR-グラフティング又は4D法(US20110027266)によって得られたヒト化抗体又はヒト化抗体のフラグメントであってもよい。

【０１４４】

従って、一実施態様において、本発明の抗CD3抗体は、

ａ） 配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号152、配列番号153からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び
配列番号139、配列番号140、配列番号141、配列番号143、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号154、配列番号155、配列番号156、配列番号157からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、又は

ｂ）配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号183からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、及び
配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号165、配列番号166、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号170、配列番号182からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン
を含むヒト化抗体である。

【０１４５】

さらなる実施態様によれば、本発明の抗CD3抗体は:

ａ） 配列番号138の配列の重鎖可変ドメイン及び／若しくは配列番号143の配列の軽鎖可変ドメイン；又は

ｂ） 配列番号171の配列の重鎖可変ドメイン及び／若しくは配列番号158の配列の軽鎖可変ドメイン；又は

ｃ）　配列番号176の配列の重鎖可変ドメイン及び／若しくは配列番号164の配列の軽鎖可変ドメイン
を含むヒト化抗体である。
【０１４６】
一実施態様において、本発明に従う抗CD3抗体は、上に列挙されるいわゆる抗CD3抗体のうちの１つの、重鎖の３つのCDR配列若しくは可変ドメイン、又は重鎖及び軽鎖の６つのCDR配列若しくは可変ドメインを含む。
【０１４７】
本発明はさらに、上で定義されるヒト化抗CD3抗体のフラグメントに言及する。一実施態様において、上記のヒト化抗CD3抗体はキメラ抗体である。
【０１４８】
本発明に従う抗CD3抗体はまた、単一ドメイン抗体又はそのフラグメントであってもよい。特に、単一ドメイン抗体フラグメントは、上記の抗体の１つのCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hを含む可変重鎖（VHH)からなるものであってもよい。抗CD3抗体はまた、重鎖抗体、すなわち軽鎖を欠いている抗体であってもよく、これはCH1ドメインを含んでいても含んでいなくてもよい。
【０１４９】
単一ドメイン抗体又はそのフラグメントはまた、ラクダ科動物単一ドメイン抗体のフレームワーク領域、及び場合によりラクダ科動物単一ドメイン抗体の定常ドメインを含んでいてもよい。
【０１５０】
本発明に従う抗CD3抗体はまた、Fv、Fab、F(ab’)2、Fab’、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、及び二特異性抗体からなる群より選択される、抗体フラグメント、特にヒト化抗体フラグメントであってもよい。
【０１５１】
従って、本発明の抗CD3抗体は、
ａ）　重鎖アミノ酸配列 配列番号186及び／若しくは軽鎖アミノ酸配列 配列番号187；又は
ｂ）　重鎖アミノ酸配列 配列番号188及び／若しくは軽鎖アミノ酸配列 配列番号189；又は
ｃ）　重鎖アミノ酸配列 配列番号190及び／若しくは軽鎖アミノ酸配列 配列番号191；又は
ｄ）　重鎖アミノ酸配列 配列番号192及び／若しくは軽鎖アミノ酸配列 配列番号193
を含むか又はこれらからなるFabである。
【０１５２】
一実施態様において、CD3抗体は、本発明の抗CD3抗体の少なくとも１つのフラグメント又は少なくとも１つの可変ドメインから形成された二重特異性又は多特異性抗体である。多特異性抗体は、例えばEP 2 050 764 A1又はUS 2005/0003403 A1に記載されるような多価タンパク質複合体である。
【０１５３】
本発明に従う二重特異性又は多特異性CD3抗体は、(a) 上記抗CD3抗体のうちの１つにより標的化される、ヒト及びカニクイザルCD3の細胞外ドメイン、並びに(b)少なくとも１つの他の抗原に対して特異性を有し得る。
【０１５４】
一実施態様において、他の抗原はCD123であり、従って、得られる二重特異性抗体は、CD3/CD123二重特異性抗体である。従来の二重特異性抗体は、当業者に公知の技術により製造することができる。
【０１５５】
本発明に従う抗CD3抗体の抗体及びフラグメントは、膜又は脂質小胞(例えばリポソーム)のようなベクターから単離されて(例えば、精製されて)又はそれらに含有されて使用さ

れ得る。

【０１５６】

１つのさらなる実施態様において、本発明の抗CD3抗体は、「抗体様結合タンパク質」の項においてさらに定義される本発明の抗体様結合タンパク質の製造のための使用のためのものである。上記実施態様のいずれの組み合わせも本発明の一部をなす。

【０１５７】

抗CD123抗体

「CD123」(表面抗原分類123)は、「インターロイキン3受容体、アルファ(IL3RA)」又は「IL3R」、「IL3RX」、「IL3RY」、「IL3RAY」、「hIL-3Ra」としても知られ、そしてヘテロ二量体サイトカイン受容体のインターロイキン３特異的サブユニットを示す。機能的インターロイキン3受容体は、特定のアルファ鎖(IL-3A；CD123)、並びに顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)及びインターロイキン5(IL-5)に対する受容体と共通のIL-3受容体ベータ鎖(β_0；CD 131)を含むヘテロ二量体である。CD123は、IL-3結合に関与する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン及び約５０アミノ酸の短い細胞質側末端を含有する推定分子量約43kDaのI型内在性膜貫通タンパク質である。細胞外ドメインは２つの領域から構成される：その配列がGM-CSF及びIL-5受容体アルファ鎖の等価な領域に対して類似性を示す、約100アミノ酸のN末端領域；並びにこのサイトカイン受容体ファミリーに共通な、４つの保存されたシステイン残基及びWSXWSモチーフを含有する膜貫通ドメインの近傍にある領域。IL-3結合ドメインは、２つのIg様折り畳みドメインから構成される約200アミノ酸残基のサイトカイン受容体モチーフ(CRM)を含む。CD123の細胞外ドメインは、リガンド結合及び受容体シグナル伝達の両方に必要なN－グリコシル化を含めて高度にグリコシル化されている。タンパク質ファミリーは３つのメンバーを集める：IL3RA (CD123A)、CSF2RA及びIL5RA。全体の構造は、３つのメンバー間でよく保存されているが、配列相同性は非常に低い。CD123の１つの300アミノ酸長アイソフォームがこれまでに発見されているが、RNAレベルだけであり、これはGetentryデータベースで受入番号ACM24116.1でアクセス可能である。

【０１５８】

米国特許第6,177,078号は、抗IL-3受容体アルファ鎖(IL-3Rα、CD123)モノクローナル抗体7G3、及びIL-3RαのN末端ドメイン、特にアミノ酸残基19～49に結合する7G3の能力を開示する。米国特許第6,733,743号は、CD123を発現するがCD131はわずかしか発現しない血液癌前駆細胞を、抗体及び細胞傷害性薬剤(化学療法剤、毒素又はアルファ線放射放射線同位体から選択される)の組成物に細胞を接触させ、それにより細胞死を引き起こすために有効な量でCD123に選択的に結合させることにより障害する方法を開示する。しかし、CD123の標的化が機能的にAML-LSCを障害することができるのか否かは不明なままである。

【０１５９】

シグナルペプチドを含む全長ヒトCD123タンパク質の参照配列は、NCBIデータベースから受入番号NP_002174.1で、Uniprot受入番号P26951で入手可能であり、本明細書で配列番号194で開示される(2014年12月14日に利用可能なとおり)。シグナルペプチドを含む全長カニクイザルCD123タンパク質の参照配列は、GenBankデータベースから受入番号EHH61867.1で、そしてUniprot受入番号G8F3K3で入手可能であり、そして配列番号195で本明細書に開示される(2014年12月14日に利用可能なとおり)。

【０１６０】

本発明者らによりゲノムDNAからクローン化された成熟ヒトCD123 Strep-IIタグ化Fc融合タンパク質の配列は、配列番号196で開示される。上記成熟ヒトCD123 Fc融合タンパク質は、全長ヒトCD123タンパク質のアミノ酸19～305を含み、従ってヒトCD123の細胞外ドメインを含む。

【０１６１】

本発明者らによりcDNAからクローン化された成熟カニクイザルCD123 Strep-IIタグ化Fc融合タンパク質の配列は、配列番号197で開示される。上記成熟カニクイザルCD123 Fc融

合タンパク質は、全長カニクイザルCD123タンパク質のアミノ酸19～305を含み、従ってカニクイザルCD123の細胞外ドメインを含む。

【０１６２】

ヒト及びカニクイザルCD123のドメイン構造化は以下のとおりであり(NCBIデータベースにおいて受入NP_002174.1(配列番号194)でアクセス可能なヒトCD123配列に基づき、そしてUniprotデータベースにおいて受入番号G8F3K3、配列番号195でアクセス可能なカニクイザルCD123配列に基づく):

【表３】

ヒトCD123 ドメイン	配列番号 194 上の位置 (ヒト)	配列番号 195 上の位置 (カニクイザル)
細胞外	19 - 305	19 - 305
膜貫通ドメイン	306 - 325	306 - 325
細胞質	326 - 378	326 - 378

【０１６３】

従って、ヒトCD123の細胞外ドメインは、配列番号194の位置19～305におけるアミノ酸からなる。

【０１６４】

CD123(インターロイキン-3受容体アルファ鎖IL-3Rα)は、様々な血液新生物において過剰発現される腫瘍抗原である。AML芽球の大部分は、表面CD123を発現し、そしてこの発現は、AMLのサブタイプによって変化しない。診断時のAML上のCD123の発現が高いほど、より悪い予後に関連すると報告されている。CD123発現は、脊髄形成異常症、全身性肥満細胞症、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)、ALL及び有毛細胞白血病を含む他の血液悪性腫瘍において報告されている。

【０１６５】

CD123は、AML白血病幹細胞で発現し、そしてAMLがこれらのLSCから生じるということを示唆する証拠が増加しており、これはDNA損傷化学療法に対して無活動かつ比較的抵抗性であることが示された。LSCの持続が初回寛解後の再発を支持すると仮定されており、従ってLSCの根絶は治癒のための要件であり、重要な治療目標と考えられ得る。

【０１６６】

「白血病幹細胞(LSC)」は、正常な幹細胞に関連する特徴、すなわち、自己再生の特性及び多数の分化系列を発生させる能力を有する癌細胞である。このような細胞は、特徴的な集団としてAMLのような血液癌において存続すると提案されている。AML患者に存在するLCSは、いわゆる「AML-LCS」である。

【０１６７】

「急性骨髄性白血病(AML)」は、異質かつ未分化の骨髄性芽球の増加した増殖として臨床上提示されるクローン異常である。白血病ヒエラルキーは、LSC(AML-LCS)の小さな集団により維持され、これらは自己再生の独特な能力を有し、かつ白血病前駆体に分化することができる。これらの前駆細胞は、診断及び再発時に患者において容易に検出可能な多数の白血病芽球を生成し、最終的に死に至る。AML-LSCは、急速に分割するクローン原性前駆細胞と対照的に、静止細胞として一般的に報告されている。AML-LSCのこの特性は、増殖する細胞を標的とする従来の化学療法の有効性を弱くし、高い比率のAML患者が完全な寛解に入るが、ほとんど必ず再発し、成人の30%未満しか４年より長く生存しないという現在の経験を説明する可能性がある。さらに、最少の残存疾患発生及び不良な生存は、AML患者における診断時の高いLSC頻度に起因していた。結果として、LSCを特異的に排除するために新しい処置が開発されることは、AML(及び同様に他の上述の血液癌状態)の長期管理に不可欠である。

【０１６８】
CD123の過剰発現は、正常造血細胞と比較してAML芽球及びCD34+/CD38 AML- LSCで報告された。
【０１６９】
従ってCD123は、癌治療に、特に不良な予後を有する患者における癌治療に重要な治療標的を提供する。
【０１７０】
本発明者らは、ヒト及びカニクイザルCD123タンパク質の両方に対して高い親和性を提示する特定のマウス及びラット抗CD123抗体を生成、スクリーニング及び選択することに成功し、これらは、ヒトCSF2RA及びIL5RAタンパク質と、並びにカニクイザルCD3タンパク質と有意に交差反応しない。
【０１７１】
本発明者らは、このようなモノクローナル抗体、いわゆる「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、及び「9F6-G3」抗CD123抗体の可変重鎖及び軽鎖の配列を決定した。
【０１７２】
いわゆる「3E3-D3」抗CD123抗体は:
- 配列番号227の配列のCDR1-H、配列番号228の配列のCDR2-H、及び配列番号229の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化５７】

QVQLQESGPGLVQPSQTLSLTCTVS**GFSLTTYD**VHWVRQPPGKGLEWMGR**IQNGGIT**
DYNSALKSRLIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFC**AKTGSYFYAFDH**WGQGTLVT
VSS

(配列番号226、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、又は
配列番号227の配列のCDR1-H、配列番号353の配列のCDR2-H、及び配列番号229の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化５８】

QVQLQESGPGLVQPSQTLSLTCTVS**GFSLTTYD**VHWVRQPPGKGLEWMGR**IQNAGIT**
DYNSALKSRLIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFC**AKTGSYFYAFDH**WGQGTLVT
VSS

(配列番号277、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、又は
配列番号227の配列のCDR1-H、配列番号279の配列のCDR2-H、及び配列番号229の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化５９】

QVQLQESGPGLVQPSQTLSLTCTVS**GFSLTTYD**VHWVRQPPGKGLEWMGR**IQDGGIT**
DYNSALKSRLIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFC**AKTGSYFYAFDH**WGQGTLVT
VSS

(配列番号278、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに　－　配列番号231の配列のCDR1-L、配列「RDD」からなるCDR2-L、及び配列番号232の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化６０】

QFVLTQPNSVSTNLGSTVKLSCKRNTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPD
GVPDRFSGSIDRSSNSALLTINNVQTEDEADYFCQSYSSGINIIFGGGTKLTVL

(配列番号230、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１７３】

いわゆる「1E1-G5」抗CD123抗体は:

－　配列番号199の配列のCDR1-H、配列番号200の配列のCDR2-H、及び配列番号201の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化６１】

QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAFGYTFTDHIIHWVKQSHGKSLEWIGYINPYSGGT
NYNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSEDSAICYCALNYGSYYAMDAWGQGTSV
TVSS

(配列番号198、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号203の配列のCDR1-L、配列「DAN」からなるCDR2-L、及び配列番号204の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化６２】

DIQMTQSPASLSASLGQTVTIECRPSEDIYSNLAWFQQKPGSSPQLLIYDANNLADGVP
SRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQQYNKYPYTFGTGTKLELK

(配列番号202、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１７４】

いわゆる「2B8-F3」抗CD123抗体は:

－　配列番号206の配列のCDR1-H、配列番号207の配列のCDR2-H、及び配列番号208の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化６３】

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPKKGLEWVATILYDGG
RTYYRGSVKGRFTISRDNAKSTLYLRMDSLRSEDTATYYCATHSRGTDYFDYWGQGV
MVTVSS

(配列番号205、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号210の配列のCDR1-L、配列「ETS」からなるCDR2-L、及び配列番号211の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化６４】

EIVLTQSPTSMTASPGEQVTITCRASSSINYMHWYQQKPGASPRPWIYETSKLASGVP
DRFSGSASGTSYSLTINNMEAEDAATYYCQQWNYPSWTFGGGTKLELK

(配列番号209、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１７５】

いわゆる「2F8-D6」抗CD123抗体は:

－　配列番号213の配列のCDR1-H、配列番号214の配列のCDR2-H、及び配列番号215の配

列のCDR3-Hを含む、配列
【化６５】

QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVS**GFSLTSYG**VSWVRQPPGKGLEWIAT**ISSAGST**Y
YDLVLKSRLSITRDTSKSQVFLKVHSLQTEDTAIYLC**ARDAPVFNYGSYNAMDS**WGQG
TSVTVSS

(配列番号212、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号217の配列のCDR1-L、配列「NTN」からなるCDR2-L、及び配列番号218の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化６６】

DIQMTQSPSFLSATVGDRVTINCKAS**QNINKY**LNWYQQKLGEAPKRLIY**NTN**SLQTGIP
SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFC**LQHKSGLT**FGSGTKLEIK

(配列番号216、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【０１７６】
いわゆる「3B10-E6」抗CD123抗体は:
－　配列番号220の配列のCDR1-H、配列番号221の配列のCDR2-H、及び配列番号222の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化６７】

QVQLQQSGPELRRPGSSVRLSCKAS**GYRIKDFL**IHWIKNRPEHGLEWIGW**IDPEDGET**
KYAQKFQTKATLTADTSSNTAYMQLSSLTSEDTATYFC**ARWGDVYYGLMRGHVMDA**
WGQGTSVTVSS

(配列番号219、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号224の配列のCDR1-L、配列「RVS」からなるCDR2-L、及び配列番号225の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化６８】

DVLMTQTPVSLPVSLGGQVSISCRSS**QSLVHSDGDTY**LHWYLQKPGQSPQLLIY**RVS**N
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGLYYC**LQTTHFPPWT**FGGGTKLEMK

(配列番号223、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【０１７７】
いわゆる「5A5-B4」抗CD123抗体は:
－　配列番号234の配列のCDR1-H、配列番号235の配列のCDR2-H、及び配列番号236の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化６９】

QIQIVQSGSDVTSTCNGCGTCYFS**GFSLSTTGIC**VSWIRQPSGKGQEWLAD**FCWDDG**
KGYNPSLKNRLSISKDTSNNQVFLKITSVDTADTATYYC**ARRRVYYGIYFDY**WGQGVM
VTVSS

(配列番号233、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号238の配列のCDR1-L、配列「GAS」からなるCDR2-L、及び配列番号239の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化７０】

DIVMTQSPALAVSPGERVSISCRAS**NSVSTR**MHWYQQKPGQQPKLLIY**GAS**NLESGVP
ARFSGSGSGTDFTLTIDPVEADDIATYFC**QQSWNDPLT**FGSGTKLEIK

(配列番号237、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１７８】

いわゆる「6B10-E4」抗CD123抗体は:

－　配列番号241の配列のCDR1-H、配列番号242の配列のCDR2-H、及び配列番号243の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化７１】

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS**GFTFSHYN**MAWVRQAPKKGLEWVAT**ITYDDHS**
TYYRDSVKGRFTISRDTAKSTLYLQMDSLRSEDTATYYC**ARLVNYAFAY**WGQGTLVTV
SS

(配列番号240、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号245の配列のCDR1-L、配列「YAS」からなるCDR2-L、及び配列番号246の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化７２】

NIVMTQSPKSMSISVGDRVTMNCKAS**QTVGNN**IAWYQQKPGLSPQLLID**YAS**NRYTGV
PNRFTGGGYGTDFILTINSVQAEDAAFYYC**QRMYNSPT**FGGGTKLELK

(配列番号244、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１７９】

いわゆる「6C10-C4」抗CD123抗体は:

－　配列番号248の配列のCDR1-H、配列番号249の配列のCDR2-H、及び配列番号250の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化７３】

EVKLQESGPSLVQPSETLSLTCTVS**GFSLTSYS**VHWVRQHSGKSLEWMGR**MWNDGD**
TSYNSAFTSRLSISRDTSKGQVFLKMNSLQTEDTGTYYC**ARGHRTPFDY**WGQGVMVT
VSS

(配列番号247、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号252の配列のCDR1-L、配列「WAS」からなるCDR2-L、及び配列番号253の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化７４】

DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSS**QSFLSSGDERNY**VAWYQHKPGQSPKLLIY**WAS**
TRHSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYC**QQYYDTPLT**FGSGTKLEIK

(配列番号251、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１８０】

いわゆる「6D6-B8」抗CD123抗体は:

－　配列番号255の配列のCDR1-H、配列番号200の配列のCDR2-H、及び配列番号201の配

列のCDR3-H、配列
【化７５】

QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAS**AYTFTDNI**IHWVKQSHGKSLDWIGY**INPYSGGT**
NYNGWFRSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSDDSAIYYC**ALNYGSYYAMDA**WGQGTS
VTVSS

(配列番号254、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号257の配列のCDR1-L、配列「DAN」からなるCDR2-L、及び配列番号258の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化７６】

DIQMTQSPASLSASLGETVTIDCRPS**EDIFNN**LAWYQQKPGNSPQLLIY**DAN**SLADGVP
SRFSGSGSGTQYSLMIIRLQSEDVASYFC**HQYNIYPYT**FGAGTKLELK

(配列番号256、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【０１８１】
いわゆる「8B11-B7」抗CD123抗体は:
－　配列番号199の配列のCDR1-H、配列番号260の配列のCDR2-H、及び配列番号201の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化７７】

QVQLQESGPTLVNPGDSVKMSCKAS**GYTFTDHI**IHWVKQSHGKSLEWIGY**INPYSGGA**
NYNGKFKSKATLTIDKSSSTAYMEFSRLTSGDSAIYYC**ALNYGSYYAMDA**WGQGTSVT
VSS

(配列番号259、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号262の配列のCDR1-L、配列「DAS」からなるCDR2-L、及び配列番号263の配列のCDR3-Lを含む、配列
【化７８】

DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRTS**KDIYSN**LAWFQQEPGNSPQLLIY**DAS**NLADGVP
SRFSGSGSGTQYSLQINNLQSEDVASYFC**HQYNNYPYT**FGTGTKLELK

(配列番号261、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。
【０１８２】
いわゆる「9B8-G6」抗CD123抗体は:
－　配列番号265の配列のCDR1-H、配列番号266の配列のCDR2-H、及び配列番号267の配列のCDR3-Hを含む、配列
【化７９】

EVKLQESGPSLVQSSQTLSLTCTVS**GFSLTSYH**IHWVRQPPGKGLEWMGV**MWSDGD**
TSYSSALKSRLSISRDTSQSQVFLKMNSLQTEDTATYYC**ARGDYSSYIYLWFAY**WGQG
TLVTVSS

(配列番号264、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに
－　配列番号252の配列のCDR1-L、配列「WAS」からなるCDR2-L、及び配列番号253の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化８０】

DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSS**QSFLSSGDERNY**VAWYQHKPGQSPKLLIY**WAS**
TRHSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYC**QQYYDTPLT**FGSGTKLEIK

(配列番号251、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１８３】

いわゆる「9D7-C8」抗CD123抗体は:

－　配列番号265の配列のCDR1-H、配列番号266の配列のCDR2-H、及び番号269の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化８１】

EVKLQESGPSLVQSSQTLSLTCTVS**GFSLTSYH**IHWVRQTPGKGLEWMGV**MWSDGD**
TSYNSALKSRLSISRDTSQSQVFLKMNSLQTEDTATYYC**ARGYYSSYLYLWFAY**WGQ
GTLVTVSS

(配列番号268、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン配列、並びに

－　配列番号271の配列のCDR1-L、配列「WAS」からなるCDR2-L、及び配列番号253の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化８２】

DIVMTQSPSSLAVSEGETVTINCKSS**QSFLSSGDGKNY**VAWYQYKPGQSPKLLIY**WAS**
TRQSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISTVQAEDLAIYYC**QQYYDTPLT**FGSGTKLEIK

(配列番号270、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１８４】

いわゆる「9F6-G3」抗CD123抗体は:

－　配列番号273の配列のCDR1-H、配列番号274の配列のCDR2-H、及び配列番号201の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化８３】

QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAS**GYTFTDYI**IHWVKQSHGKSLEWIGY**INPYSDGT**
NYNEKFKSKATLTVDKSTSTAYMEFSRLTSEDSAIYFC**ALNYGSYYAMDA**WGQGTSV
TVSS

(配列番号272、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号276の配列のCDR1-L、配列「DAS」からなるCDR2-L、及び配列番号258の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化８４】

DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRPS**EDIHSN**VAWYQQKPGNSPQLLIY**DAS**NLADGVP
SRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFC**HQYNIYPYT**FGSGTKLELK

(配列番号275、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１８５】

本発明の一局面において、抗CD123抗体はヒトCD123に結合する。別の実施態様において、抗CD123抗体はカニクイザルCD123にさらに結合する。特に、本発明の抗CD123抗体は、

ヒトCD123の、又はヒト及びカニクイザルCD123の両方の細胞外ドメインに結合する。より詳細には、抗CD123抗体は、CD123の遠位部分に、例えば、配列 配列番号194のヒトCD123の位置19～49におけるアミノ酸に結合する。抗CD123抗体は、単離された形態で発現されるか、又はAML細胞若しくはCD123トランスフェクト細胞のようなCD123を発現する細胞に存在するような可溶性細胞外ドメイン又は全長膜係留CD123で存在するかに関係なく、CD123に結合する。本発明に従う抗CD123抗体は、ヒト及びカニクイザルCD123タンパク質をそれらの表面上に発現する細胞、例えばCD123を発現する癌細胞に特異的である。

【０１８６】

本発明に従う抗CD123抗体は、≦10、特に≦6、≦5、≦4、≦3、≦2、≦1又は≦0.5である、ヒトCD123についての親和性に対するカニクイザルCD123についての親和性の比(KD (カニクイザル)/KD (ヒト)を有する。従って、本発明に従うポリペプチドは、サルにおいて行われる毒性学的研究において使用され得、サルにおいて観察される毒性プロフィールは、ヒトにおける可能性のある有害作用の予測に関連する。

【０１８７】

特に、本発明の抗CD123抗体は、CSF2RA及びIL5RAタンパク質に結合しないか、又はこれらと有意に交差反応しない。

【０１８８】

特に、抗体は、前述のヒト及びカニクイザルCSF2RA及びIL5RAタンパク質の細胞外ドメインに結合しないか、又はこれらと有意に交差反応しない。

【０１８９】

さらに、本発明に従うCD123抗体は、ヒトCD123又はカニクイザルCD123、又は両方について、≦50nM、≦40nM、≦30nM、例えば≦20nM、≦15nM、≦10nM、≦8nM、≦6nM、≦4nM、≦2nM、≦1nM又は≦0.5nMの親和性（KD)、例えば0.1nM～20nM、例えば0.1nM～10nM、特に0.1nM～2nM、又は0.1nM～1nMの親和性(KD)を有する。

【０１９０】

一例において、ヒトCD3について又はカニクイザルCD3についての親和性は、表面プラズモン共鳴を用いて、捕捉抗原としてヒト及びカニクイザル由来の組み換えCD123タンパク質を使用して、例えばヒト及びカニクイザルCD123-Fc融合タンパク質を用いて、KD値として決定される。

【０１９１】

抗原として、例えば野生型タンパク質(配列番号194 (ヒト)、配列番号195 (カニクイザル))の位置M1からR305までのアミノ酸配列に対応する、シグナル配列を含むヒト又はカニクイザルCD123細胞外ドメインが使用され得る。ヒト又はカニクイザルCD123成熟タンパク質について得られたアミノ酸配列は、それぞれ配列番号196及び配列番号197としてリストに記載される。Biacore測定は当業者に公知である。現在の例において、Biacore測定は、上の「抗CD3抗体」の項に記載されるように行われ得る。

【０１９２】

本発明の抗CD123抗体はまた、例えば、CD123トランスフェクトHEK293細胞のようなCD123を発現する細胞でハイブリドーマ上清中で未精製抗CD123抗体を使用してFACSにより決定して、≦20nM、例えば≦15nM、≦10nM、≦6nM、≦5nM、≦4nM、≦3nM、≦2nM又は≦1nMである見かけの親和性定数（見掛けのKD)を有し得る。典型的には、見掛けのKDは、0.1～20nM、特に0.1～10nM、例えば0.1～5nMの範囲内である。

【０１９３】

いわゆる「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体のVH及びVL領域の配列のアライメント。CDR-H及びCDR-L配列の比較は、構造的に、一方で「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」及び「9F6-G3」抗CD123抗体、そして他方で「6C10-C4」、9B8-G6」、「9D7-C8」抗CD123抗体が密接に関連しており、上記抗体はおそらく同じエピトープに結合するということを示す傾向がある。いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」及び「9F6-G3」抗CD123抗体並びに「6C10-C4」、9

B8-G6」、「9D7-C8」抗CD123抗体のアライメントを、それぞれ図３及び４に示す。CDR-H及びCDR-L配列の比較は、抗体の２つの群の間で厳密に保存されており、従って特異性に関して重要であると考えられるCDR位置をさらに同定したが、他の位置は置換を支持し得るものであった。

【０１９４】

従って、本発明に従う抗体は:

ａ） 配列 X_1YTFTDX$_2$I（配列番号336)[ここで、X_1はG又はAであり、そしてX_2はH、Y若しくはN、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR1-H；及び
配列 INPYSX$_1$GX$_2$（配列番号337）［ここで、X_1はG又はDであり、そしてX_2はT若しくはA、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR2-H；及び
配列 ALNYGSYYAMDA（配列番号201)からなるCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列 X_1DIX$_2$X$_3$N（配列番号338）［ここで、X_1はE又はKであり、X_2はF、H又はYであり、そしてX_3はN若しくはS、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR1-L；及び
配列「DAN」又は「DAS」からなるCDR2-L；及び
配列 X_1QYNX$_2$YPYT（配列番号339）［ここで、X_1はH又はQであり、そしてX_2はI、K若しくはN、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｂ） 配列 GFSLTSYX$_1$（配列番号340）［ここで、X_1はH又はSである］からなるCDR1-H；及び
配列 MWX$_1$DGDT（配列番号341）［ここで、X_1はS又はNである］からなるCDR2-H；及び
配列 ARGX$_1$X$_2$X$_3$X$_4$X$_5$X$_6$X$_7$X$_8$X$_9$FX$_{10}$Y（配列番号342）［ここで、X_1はD、Y又はHであり、X_2はY又はRであり、X_3はS又はTであり、X_4はS又はPであり、X_5はYであるか又はアミノ酸ではなく、X_6はL、Iであるか又はアミノ酸ではなく、X_7はYであるか又はアミノ酸ではなく、X_8はLであるか又はアミノ酸ではなく、X_9はWであるか又はアミノ酸ではなく、X_{10}はA若しくはD、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列 QSFLSSGDX$_1$X$_2$NY（配列番号343）［ここで、X_1はE又はGであり、そしてX_2はR若しくはK、又はそれらのいずれかの組み合わせである］からなるCDR1-L；及び
配列「WAS」からなるCDR2-L；及び
配列 QQYYDTPLT（配列番号253)からなるCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０１９５】

一実施態様によれば、本発明に従う抗CD123抗体は、上に列挙された13のいわゆる「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、及び「9F6-G3」抗CD123抗体のうちの１つの重鎖及び／又は軽鎖のCDR配列を含む。

【０１９６】

従って、本発明は:

ａ） 配列番号227の配列又は配列番号227と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号228若しくは配列番号353若しくは配列番号279の配列又は配列番号228若しくは配列番号353若しくは配列番号279と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号229の配列又は配列番号229と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号231の配列又は配列番号231と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「RDD」又は「RDD」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号232の配列又は配列番号232と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｂ） 配列番号199の配列又は配列番号199と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号200の配列又は配列番号200と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号201の配列又は配列番号201と１つのアミノ酸置換によっ

て異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号203の配列又は配列番号203と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「DAN」又は「DAN」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号204の配列又は配列番号204と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｃ） 配列番号206の配列又は配列番号206と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号207の配列又は配列番号207と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号208の配列又は配列番号208と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号210の配列又は配列番号210と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「ETS」又は「ETS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号211の配列又は配列番号211と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｄ） 配列番号213の配列又は配列番号213と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号214の配列又は配列番号214と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号215の配列又は配列番号215と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号217の配列又は配列番号217と１つのアミノ酸置換によって異なるCDR1-L；配列「NTN」又は「NTN」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号218の配列又は配列番号218と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｅ） 配列番号220の配列又は配列番号220と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号221の配列又は配列番号221と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号222の配列又は配列番号222と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号224の配列又は配列番号224と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「RVS」又は「RVS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号225の配列又は配列番号225と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
【０１９７】
ｆ） 配列番号234の配列又は配列番号234と１つのアミノ酸置換によって異なる配列CDR1-H；配列番号235の配列又は配列番号235と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号236の配列又は配列番号236と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号238の配列又は配列番号238と１つのアミノ酸置換によって異なるCDR1-L；配列「GAS」又は「GAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号239の配列又は配列番号239と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｇ） 配列番号241の配列又は配列番号241と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号242の配列又は配列番号242と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号243の配列又は配列番号243と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号245の配列又は配列番号245と１つのアミノ酸置換によって異なるCDR1-L；配列「YAS」又は「YAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号246の配列又は配列番号246と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｈ） 配列番号248の配列又は配列番号248と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号249の配列又は配列番号249と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号250の配列又は配列番号250と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに

配列番号252の配列又は配列番号252と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「WAS」又は「WAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号253の配列又は配列番号253と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｉ）　配列番号255の配列又は配列番号255と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号200の配列又は配列番号200と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号201の配列又は配列番号201と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号257の配列又は配列番号257と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「DAN」又は「DAN」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号258の配列又は配列番号258と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

【０１９８】

ｊ）　配列番号199の配列又は配列番号199と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号260の配列又は配列番号260と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号201の配列又は配列番号201と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号262の配列又は配列番号262と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「DAS」又は「DAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号263の配列又は配列番号263と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｋ）　配列番号265の配列又は配列番号265と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号266の配列又は配列番号266と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号267の配列又は配列番号267と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号252の配列又は配列番号252と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「WAS」又は「WAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号253の配列又は配列番号253と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｌ）　配列番号265の配列又は配列番号265と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号266の配列又は配列番号266と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-H；配列番号269の配列又は配列番号269と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号271の配列又は配列番号271と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「WAS」又は「WAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号253の配列又は配列番号253と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｍ）　配列番号273の配列又は配列番号273と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-H；配列番号274の配列又は配列番号274と１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって異なる配列CDR2-H；配列番号201の配列又は配列番号201と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン；並びに
配列番号276の配列又は配列番号276と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR1-L；配列「DAS」又は「DAS」と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR2-L及び配列番号258の配列又は配列番号258と１つのアミノ酸置換によって異なる配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン
を含む、抗CD123抗体に関する。

【０１９９】

１つ又はそれ以上の個々のアミノ酸は、置換により、特に保存的置換により、上記CDR配列の１つ又はそれ以上において変更され得る。このような変更は、例えば、抗体のヒト化と関連して、グリコシル化部位又は脱アミド部位を除去することを意図され得る。

【０２００】
「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のVH及びVL領域の配列のアライメントに基いて、様々なアミノ酸置換を同定した。従って、一実施態様において、アミノ酸は:
－ CDR1-Hにおいて位置1及び7の１つ若しくはそれ以上において、例えば配列 GYTFTDHI (配列番号199)若しくはGYTFTDYI (配列番号273)のCDR1-H位置7において、例えば配列 AYTFTDNI (配列番号255)のCDR1-Hの位置1及び5において；かつ/又は
－ CDR2-Hにおいて、位置6及び8の１つ若しくはそれ以上において、例えば配列 INPYSGGT (配列番号200)若しくはINPYSDGT (配列番号274)若しくはINPYSGGA (配列番号260)のCDR2-Hの位置6及び／若しくは8において；かつ/又は
－ CDR1-Lにおいて、位置1、4及び5の１つ若しくはそれ以上において、例えば配列 KDIYSN (配列番号262)若しくはEDIFNN (配列番号257)のCDR1-Lの位置1若しくは1、4及び5において；かつ/又は
－ CDR2-Lにおいて、配列「DAN」若しくは「DAS」の位置3において；かつ／又は
－ CDR3-Lにおいて、位置1及び5の１つ又はそれ以上において、例えば、配列 HQYNIYPYT (配列番号258)若しくはQQYNKYPYT (配列番号204)若しくはHQYNNYPYT (配列番号263)のCDR3-Lの位置1及び／若しくは5において
置換され得る。
【０２０１】
さらなる実施態様において、アミノ酸は:
－ CDR1-Hにおいて位置8において、例えば、配列 GFSLTSYH (配列番号265)若しくはGFSLTSYS (配列番号248)のCDR1-Hの位置8において；かつ／又は
－ CDR2-Hにおいて位置3において、例えば、配列 MWSDGD (配列番号265)若しくはMWNDGD (配列番号248)のCDR2-Hの位置3において；かつ／又は
－ CDR3-Hにおいて位置4及び9において、例えば配列 ARGDYSSYIYLWFAY (配列番号267)若しくはARGYYSSYLYLWFAY(配列番号269)のCDR3-Hの位置4及び9において；かつ／又は
－ CDR1-L、位置9及び10の１つ又はそれ以上において、例えば配列 QSFLSSGDERNY (配列番号252)若しくはQSFLSSGDGKNY (配列番号271)のCDR1-Lの位置9及び10において
置換される。
【０２０２】
一実施態様によれば、抗体は、
ａ） 配列番号227の配列のCDR1-H、配列番号228、配列番号353、配列番号279の配列のCDR2-H、配列番号229の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号231の配列のCDR1-L、配列「RDD」のCDR2-L及び配列番号232の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｎ） 配列番号199の配列のCDR1-H、配列番号200の配列のCDR2-H、配列番号201の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号203の配列のCDR1-L、配列「DAN」のCDR2-L及び配列番号204の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｏ） 配列番号206の配列のCDR1-H、配列番号207の配列のCDR2-H、配列番号208の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号210の配列のCDR1-L、配列「ETS」のCDR2-L及び配列番号211の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｐ） 配列番号213の配列のCDR1-H、配列番号214の配列のCDR2-H、配列番号215の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号217の配列のCDR1-L、配列「NTN」のCDR2-L及び配列番号218の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｑ） 配列番号220の配列のCDR1-H、配列番号221の配列のCDR2-H、配列番号222の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号224の配列のCDR1-L、配列「RVS」のCDR2-L及び配列番号225の配列のCDR3-Lを含

む軽鎖可変ドメイン；又は
ｒ） 配列番号234の配列のCDR1-H、配列番号235の配列のCDR2-H、配列番号236の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号238の配列のCDR1-L、配列「GAS」のCDR2-L及び配列番号239の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｓ） 配列番号241の配列のCDR1-H、配列番号242の配列のCDR2-H、配列番号243の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号245の配列のCDR1-L、配列「YAS」のCDR2-L及び配列番号246の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｔ） 配列番号248の配列のCDR1-H、配列番号249の配列のCDR2-H、配列番号250の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号252の配列のCDR1-L、配列「WAS」のCDR2-L及び配列番号253の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｕ） 配列番号255の配列のCDR1-H、配列番号200の配列のCDR2-H、配列番号201の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号257の配列のCDR1-L、配列「DAN」のCDR2-L及び配列番号258の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｖ） 配列番号199の配列のCDR1-H、配列番号260の配列のCDR2-H、配列番号201の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号262の配列のCDR1-L、配列「DAS」のCDR2-L及び配列番号263の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｗ） 配列番号265の配列のCDR1-H、配列番号266の配列のCDR2-H、配列番号267の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号252の配列のCDR1-L、 配列「WAS」のCDR2-L及び配列番号253の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｘ） 配列番号265の配列のCDR1-H、配列番号266の配列のCDR2-H、配列番号269の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号271の配列のCDR1-L、配列「WAS」のCDR2-L及び配列番号253の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は
ｙ） 配列番号273の配列のCDR1-H、配列番号274の配列のCDR2-H、配列番号201の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに
配列番号276の配列のCDR1-L、配列「DAS」のCDR2-L及び配列番号258の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０２０３】
本発明に従う抗CD123抗体は、特に従来の抗体、特に従来のモノクローナル抗体、又は抗体フラグメント、二重特異性若しくは多特異性抗体である。

【０２０４】
本発明に従う抗CD123抗体は、特にIgG、又はそのフラグメントを含むか又はそれらからなる。

【０２０５】
本発明はまた、上に列挙されたいわゆる抗CD123抗体のうちの１つの少なくとも重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインを更に含む上で定義された抗CD123抗体を提供する。

【０２０６】
従って、本発明は、特に:
ａ） 配列番号226若しくは配列番号277若しくは配列番号278の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は 配列番号230の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列軽鎖可変ドメイン；又は
ｂ） 配列番号198の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイ

ン、及び／又は配列番号202の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｃ） 配列番号205の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号209の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｄ） 配列番号212の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号216の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｅ） 配列番号219の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号223の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｆ） 配列番号233の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号237の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｇ） 配列番号240の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号244の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｈ） 配列番号247の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号251の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｉ） 配列番号254の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号256の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｊ） 配列番号259の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号261の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｋ） 配列番号264の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号251の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は
ｌ） 配列番号268の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又はの軽鎖可変ドメイン of 配列 配列番号270、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列；又は
ｍ） 配列番号272の配列若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン、及び／又は配列番号275の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン
を含む抗CD123抗体に関する。

【０２０７】

例えば、重鎖又は軽鎖の可変ドメインの配列は、必要に応じて、参照配列配列の配列番号226、277、278、230、198、202、205、209、212、216、219、223、233、237、240、244、247、251、254、256、259、261、264、251、268、270、272又は275と、１つ又はそれ以上のアミノ酸置換によって、特に1つ又はそれ以上の保存的アミノ酸置換及び／又は標準残基での置換によって異なっていてもよい。特に、重鎖又は軽鎖の可変ドメインの配列は、参照配列の配列番号226、277、278、230、198、202、205、209、212、216、219、223、233、237、240、244、247、251、254、256、259、261、264、251、268、270、272又は275と、保存的アミノ酸置換のみによって異なっていてもよい。

【０２０８】

配列番号226、277、278、230、198、202、205、209、212、216、219、223、233、237、240、244、247、251、254、256、259、261、264、251、268、270、272又は275の配列と比較した配列変更は、特に、本質的に、フレームワーク領域、FR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L及び／又はFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hのうちの１つ又はそれ以上に存在する。

【０２０９】
一実施態様において、本発明の抗CD123抗体及びそのフラグメントは、それぞれ、ラット抗体及びラット抗体のフラグメントである。
【０２１０】
本発明の抗CD123抗体はまた、キメラ抗体、そして特にラット／ヒト抗体、例えば、重鎖及び軽鎖のラット可変ドメイン並びにヒト抗体由来のCHドメイン及びCLドメインを含む抗体であってもよい。ポリペプチドはこのような抗体のフラグメントであってもよい。抗CD123抗体はまた、CDRグラフティング又は4D法(US20110027266)により得られたヒト化抗体又はヒト化抗体のフラグメントであってもよい。
【０２１１】
従って、一実施態様において、本発明の抗CD123抗体は:
ａ） 配列番号280、配列番号281、配列番号282、配列番号283、配列番号284、配列番号285、配列番号286、配列番号287、配列番号288、配列番号289、配列番号290、配列番号291、配列番号301及び配列番号302からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；並びに
ｂ） 配列番号292、配列番号293、配列番号294、配列番号295、配列番号296、配列番号297、配列番号298、配列番号299、配列番号300、配列番号303、配列番号304及び配列番号305からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン
を含むヒト化抗体である。
【０２１２】
一実施態様において、本発明に従う抗CD123抗体は、上で列挙されたいわゆる抗CD123抗体のうちの１つの、重鎖の３つのCDR配列若しくは可変ドメイン、又は重鎖及び軽鎖の６つのCDR配列若しくは可変ドメインを含む。
【０２１３】
本発明はさらに、上で定義されたヒト化抗CD123抗体のフラグメントに言及する。一実施態様において、上記のヒト化抗CD123抗体はキメラ抗体である。
【０２１４】
本発明に従う抗CD123抗体はまた、単一ドメイン抗体又はそのフラグメントであってもよい。特に、単一ドメイン抗体フラグメントは、上で定義された抗体のうちの１つのCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hを含む可変重鎖（VHH)からなるものであってもよい。CD123抗体はまた、重鎖抗体、すなわち軽鎖を欠いている抗体であってもよく、これはCH1ドメインを含んでいても含んでいなくてもよい。
【０２１５】
単一ドメイン抗体又はそのフラグメントはまた、ラクダ科動物単一ドメイン抗体のフレームワーク領域、及び場合によりラクダ科動物単一ドメイン抗体の定常ドメインを含んでいてもよい。
【０２１６】
本発明に従う抗CD123抗体はまた、Fv、Fab、F(ab’)2、Fab’、dsFv、(dsFv)2、scFv、sc(Fv)2、及び二特異性抗体からなる群より選択される抗体フラグメント、特にヒト化抗体フラグメントであってもよい。
【０２１７】
CD123抗体はまた、本発明の抗CD123抗体の少なくとも１つの抗体フラグメント又は少なくとも１つの可変ドメインから形成された二重特異性又は多特異性抗体であってもよい。多特異性抗体は、例えばEP 2 050 764 A1又はUS 2005/0003403 A1に記載されるような多価タンパク質複合体である。
【０２１８】
本発明に従う二重特異性又は多特異性CD123抗体は、(a)上記抗CD123抗体のうちの１つにより標的とされるヒト又はヒト及びカニクイザルCD123の細胞外ドメイン、並びに(b)少なくとも１つの他の抗原に対して特異性を有し得る。
【０２１９】

特定の実施態様において、他の抗原はCD3であり、従って得られる二重特異性抗体はCD3/CD123二重特異性抗体である。従来の二重特異性抗体は、当業者に公知の技術により製造することができる。

【０２２０】

本発明に従う抗体及びそのフラグメントは、膜又は脂質小胞(例えば、リポソーム)のようなベクターから単離されて(例えば、精製されて）、又はそれらに含有された状態で使用され得る。

【０２２１】

１つのさらなる実施態様において、本発明の抗CD123抗体は、「抗体様結合タンパク質」の項にさらに定義される本発明の抗体様結合タンパク質の製造に使用される。

【０２２２】

上記実施態様のいずれの組み合わせも本発明の一部を成す。

【０２２３】

抗体様結合タンパク質

本発明者らは、いくつかの抗体様結合タンパク質、いわゆる「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」、「hz4B4x3E3」、「hz20G6x7G3-TL4」及び「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質を生成し、ここで用語「hz」はヒト化抗体を示す。これらの抗体様結合タンパク質は、CODV設計、特にCODV-Fab又はCODV-Ig設計を有する。

【０２２４】

本発明の文脈における「CODV形式」は、二重特異性抗体又は多特異性抗体の交差二重可変(CODV)構成を指す。CODV形式は、折り畳み及び最終的な結合親和性を保持しながら可変ドメインの互換性を可能にする。CODV形式は、国際特許出願WO2012/135345に以前に記載されている。従って、一実施態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、国際特許出願WO2012/135345（これは参照により本明細書に加入される）に以前に記載されるようなCODV形式である。

【０２２５】

一実施態様において、本発明は、CODV-Fab形式である抗体様結合タンパク質に言及する。従って、一実施態様において、本発明は、２つの抗原結合部位を形成する２つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質に言及し、ここで第一のポリペプチドは式[I]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

により表される構造を有し、そして第二のポリペプチドは、式[II]：

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1} \qquad [II]$$

により表される構造を有し、

式中：

V_{D1}は、第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D2}は、第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D3}は、該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D4}は、該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

C_Lは、免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；

C_Hは、免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；

L_1、L_2、L_3、及びL_4はアミノ酸リンカーであり；

そしてここで、第一及び第二のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして

ここで、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメイン又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインである。

【０２２６】

CODV-Fabにおいて抗体様結合タンパク質にFcドメインを加えることは、抗体様結合タンパク質をさらに安定化する。より正確には、CODV-Fabにおいて抗体様結合タンパク質の式

(II)のポリペプチドにFcドメインを加えることは、抗体様結合タンパク質の半減期を増加し、従って抗体様結合タンパク質の薬物動態プロフィールを改善する。１つのFc領域をCODV-Fabに加えると、Fcドメインを含有するポリペプチドの二量体化を生じ、生じた抗体様結合タンパク質は、CODV-Ig形式の抗体様結合タンパク質である。従って本発明は、CODV-Ig形式の抗体様結合タンパク質にさらに言及する。

【０２２７】

従って、本発明は、４つの抗原結合部位を形成する４つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質にさらに言及し、ここで、２つのポリペプチド鎖は、式[I]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

により表される構造を有し

そして２つのポリペプチド鎖は、式[III]：

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}F_c \qquad [III]$$

により表される構造を有し、

式中：

V_{D1}は、第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D2}は、第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメイン であり；

V_{D3}は、該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D4}は、該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

C_Lは、免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；

C_{H1}は、免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；

F_cは、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；

L_1、L_2、L_3、及びL_4はアミノ酸リンカーであり；

そしてここで、式Iのポリペプチド及び式IIIのポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして

ここで、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも、軽鎖の可変ドメイン又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインである。

【０２２８】

上記CODV-Ig形式において、式[III]により表される構造を有する２つのポリペプチド鎖は、それらのF_cドメインを通して二量体化する。

【０２２９】

さらなる実施態様において、第一のF_cドメインは、抗体様結合タンパク質CODV-Fabの式[II]のポリペプチドに加えられ、そして第二のF_cドメイン(F_{c2}と呼ばれる)は、抗体様結合タンパク質CODV-Fabの式[I]のポリペプチドに加えられる。さらに、同じ実施態様において、リンカーL_5は式[I]のポリペプチド鎖のC_LとF_{c2}ドメインとの間に存在し、式[IV]のポリペプチド鎖を生じる。

【０２３０】

従って、本発明は、２つの抗原結合部位を形成する２つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質にさらに言及し、ここで１つのポリペプチド鎖は、式[IV]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L\text{-}L_5\text{-}F_{c2} \qquad [IV]$$

により表される構造を有し、

そして１つのポリペプチド鎖は、式[III]：

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}F_c \qquad [III]$$

により表される構造を有し、

式中：

V_{D1}は、第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D2}は、第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D3}は、該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D4}は、該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
C_Lは、免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；
C_{H1}は、免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；
F_cは、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；
F_{c2}は、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；
L_1、L_2、L_3、L_4及びL_5はアミノ酸リンカーであり；
そしてここで、式[IV]のポリペプチド及び式[III]のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして
ここで、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも、軽鎖の可変ドメイン、又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインである。

【０２３１】

式[III]及び[IV]により表されるポリペプチド鎖がそれぞれのF_{c2}及びF_c領域を通して二量体化するこのCODV形式は、本明細書においてCODV-Fab-TLと呼ばれる。

【０２３２】

CODV-Fabの別の実施態様において、第一のF_cドメインは、式[II]により表されるポリペプチド鎖に加えられ(式[III]を生じる)、そして抗体様結合タンパク質は、第二のF_cドメイン(F_{c3}と呼ばれる)を含むかこれからなる第三のポリペプチド鎖を含む。

【０２３３】

本発明はさらに、２つの抗原結合部位を形成する３つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質に言及し、ここで
第一のポリペプチドは、式[I]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

により表される構造を有し、
第二のポリペプチドは、式[III]：

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}F_c \qquad [III]$$

により表される構造を有し、
第三のポリペプチドF_{c3}(Fc断端（stump）とも呼ばれる)は、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり;
ここで
V_{D1}は、第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D2}は、第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D3}は、上記第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D4}は、上記第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
C_Lは、免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；
C_{H1}は、免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；
F_cは、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；
L_1、L_2、L_3、及びL_4はアミノ酸リンカーであり；
そしてここで、式[I]のポリペプチド及び式[III]のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして
ここで、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも、軽鎖の可変ドメイン、又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり；
そしてここで、式[III]のポリペプチドは、そのF_cドメインを通して第三のポリペプチドとヘテロ二量体化する。

【０２３４】
従って、上記実施態様において、いわゆる「Fc断端」(F_{c3})は、式IIIに従うポリペプチドのFc領域とヘテロ二量体化する。このCODV形式は、本明細書においてCODV-Fab-OLと呼ばれる。この構築物は、CODV-Fabが凝集体を形成することを回避する。
【０２３５】
CODV-Fab-OLの一実施態様において、F_c及びF_{c3}は両方とも、CH3ドメインが改変されている免疫グロブリン変異体であり：F_c及びF_{c3}はそれぞれ、特に特許US5731168及びUS8216805（これらは参照により本明細書に加入される）に記載されているいわゆる「ノブ・イントゥー・ホール（Knob-into-Hole）」技術に従ってヘテロ多量体形成を促進するように、CH3-CH3境界部において遺伝子操作されている。
【０２３６】
従って、一実施態様において、F_c及びF_{c3}のうちの１つのCH3ドメインは、変異Y349C、T366S、L368A、及びY407Vを含有し、一方でF_c及びF_{c3}のうちの他方は変異S354C及びT366Wを含有する(アミノ酸位置はIgG1配列を参照して示されている)。
【０２３７】
適切なF_c及びF_{c3}対の例としては、対配列番号396(F_c)及び配列番号397(F_{c3})、並びに対配列番号394(F_c)及び配列番号398(F_{c3})が挙げられる。
【０２３８】
本発明の一実施態様において、第一の免疫グロブリン又は第二の免疫グロブリンは、上の<<抗CD3抗体>>の項において定義される１つの抗CD3抗体である。
【０２３９】
本発明の別の実施態様において、第一の免疫グロブリン又は第二の免疫グロブリンは、上の<<抗CD123抗体>>の項において定義される１つの抗CD123抗体である。
【０２４０】
本発明の一実施態様によれば、式I又は式[IV]のポリペプチドのV_{D1}及びV_{D2}は両方とも、軽鎖の可変ドメイン、又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてポリペプチドII又はIIIのV_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の又は軽鎖の可変ドメインである。この互換性は、「交換可能性（swapability）」とも呼ばれ、従って本発明の抗体様結合タンパク質の交差二重可変(CODV)構成を決定する。
【０２４１】
上の定義によれば、V_{D1}及びV_{D4}は、第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、そしてV_{D2}及びV_{D3}は、第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、従って、V_{D1}及びV_{D4}は同族ドメインであると考えられ、V_{D2}及びV_{D3}も同様である。
【０２４２】
従って、用語「交差」は、式[I]又は式[IV]のポリペプチドのV_{D1}又はV_{D2}の、式[II]又は式[III]のポリペプチドのその同族可変ドメインV_{D4}又はV_{D3}に関する交換整列を指す。
【０２４３】
１つの特定の実施態様において、V_{D1}及びV_{D2}は軽鎖可変ドメインであり、かつV_{D3}及びV_{D4}は重鎖可変ドメインである。
【０２４４】
本発明の抗体様結合タンパク質は、例えば、ヒト、ラット、又はヒト化抗体を含む、いずれかのヒト抗体又は非ヒト抗体から得られるか又はこれらから誘導されるドメイン又は配列を使用して製造され得る。
【０２４５】
一実施態様において、免疫グロブリンはIgG免疫グロブリンである。
【０２４６】
従って、一実施態様において、C_LはIgG 免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインである。さらなる実施態様において、C_{H1}は IgG免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインである。
【０２４７】
一実施態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、本明細書中に記載される抗CD

3抗体及び抗CD123抗体のドメイン又は配列を使用して製造され得る。

【０２４８】

本明細書で使用される用語「リンカー」は、免疫グロブリンドメイン間に挿入されて軽鎖及び重鎖のドメインが交差二重可変領域免疫グロブリンへと折り畳まるために十分な可動性を提供する1つ又はそれ以上のアミノ酸残基を指す。いくつかの実施態様において、リンカーは０アミノ酸からなり、リンカーが存在しないということを意味する。リンカーは、それぞれ可変ドメイン間又は可変ドメインと定常ドメインとの間の移行部（transition）に配列レベルで挿入される。免疫グロブリンドメインのおよそのサイズが十分理解されているのでドメイン間の移行部を同定することができる。ドメイン移行部の正確な位置は、実験データにより実証されるように又はモデリング若しくは二次構造予測の技術により推定され得るように、ベーターシート又はアルファーヘリックスのような二次構造要素を形成しないペプチド鎖の位置を決定することにより決定され得る。本発明の文脈において記載されるリンカーは、リンカーL_1、L_2、L_3、L_4及びL_5である。L_1はN末端V_{D1}ドメインとV_{D2}ドメインとの間に位置し；L_2はV_{D2}とC末端C_Lドメインとの間に位置する。リンカーL_3及びL_4は抗体様タンパク質の式II又はIIIに従って定義されるようにポリペプチド上に位置する。より正確には、L_3はN末端V_{D3}とV_{D4}ドメインとの間に位置し、そしてL_4はV_{D4}とC末端C_{H1}-Fcドメインとの間に位置する。L_5はC_LとN末端F_{c2}との間に位置する。リンカーL_1、L_2、L_3、L_4及びL_5は独立しているが、いくつかの実施態様において、これらは同じ配列及び／又は長さを有する。

【０２４９】

本発明のいくつかの抗体様結合タンパク質において、L_3の長さはL_1の長さの少なくとも２倍である。本発明の他の抗体様結合タンパク質において、L_4の長さはL_2の長さの少なくとも２倍である。本発明のいくつかの抗体様結合タンパク質において、L_1の長さはL_3の長さの少なくとも２倍である。本発明の他の抗体様結合タンパク質において、L_2の長さはL_4の長さの少なくとも２倍である。

【０２５０】

一実施態様において、リンカーL_1、L_2、L_3及びL_4は、0～20個のアミノ酸を含む。一実施態様において、L_5は0～10アミノ酸を含む。

【０２５１】

本発明のいくつかの抗体様結合タンパク質において、L_1は3～12アミノ酸残基長であり、L_2は3～14アミノ酸残基長であり、L_3は1～8アミノ酸残基長であり、そしてL_4は1～3アミノ酸残基長である。他の抗体様結合タンパク質において、L_1は5～10アミノ酸残基長であり、L_2は5～8アミノ酸残基長であり、L_3は1～5アミノ酸残基長であり、そしてL_4は1～2アミノ酸残基長である。好ましい抗体様結合タンパク質において、L_1は7アミノ酸残基長であり、L_2は5アミノ酸残基長であり、L_3は1アミノ酸残基長であり、そしてL_4は2アミノ酸残基長である。

【０２５２】

本発明のいくつかの抗体様結合タンパク質において、L_1は1～3アミノ酸残基長であり、L_2は1～4アミノ酸残基長であり、L_3は2～15アミノ酸残基長であり、そしてL_4は2～15アミノ酸残基長である。他の抗体様結合タンパク質において、Liは1～2アミノ酸残基長であり、L_2は1～2アミノ酸残基長であり、L_3は4～12アミノ酸残基長であり、そしてL_4は2～12アミノ酸残基長である。好ましい抗体様結合タンパク質において、L_1は1アミノ酸残基長であり、L_2は2アミノ酸残基長であり、L_3は7アミノ酸残基長であり、そしてL_4は5アミノ酸残基長である。

【０２５３】

本発明のいくつかの抗体様結合タンパク質において、L_1、L_3、又はL_4は、０に等しくてもよい。しかし、L_3、又はL_4がゼロに等しい抗体様結合タンパク質において、可変領域と定常領域との間又は他の鎖上の二重可変ドメイン間の対応する移行部リンカーはゼロになることはできない。いくつかの実施態様において、L_1はゼロに等しく、かつL_3は2若しくはそれ以上のアミノ酸残基であり、L_3はゼロに等しくかつL_1は１に等しいか若しくはそれ

以上のアミノ酸残基であり、又はL_4は0に等しく、かつL_2は3若しくはそれ以上のアミノ酸残基である。

【０２５４】

本発明のいくつかの抗体様結合タンパク質において、L_2、L_3、及びL_4からなる群より選択されるリンカーのうちの少なくとも１つは少なくとも１つのシステイン残基を含有する。

【０２５５】

適切なリンカーの例としては、単一のグリシン、スレオニン又はセリン残基；ジグリシンペプチド、ヒスチジン-スレオニンペプチド又はグリシン-セリンジペプチドのようなジペプチド；３つのグリシンを有するトリペプチド、トリペプチドThr-His-Thr、トリペプチドGly-Gly-Ser；４つのグリシン残基を有するペプチド；５つのグリシン残基を有するペプチド；６つのグリシン残基を有するペプチド；７つのグリシン残基を有するペプチド；８つのグリシン残基を有するペプチドが挙げられる。ペプチドGly-Gly-Gly-Ser（配列番号354)、ペプチドGly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号344)、ペプチド Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号355)、ペプチド Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号356)、ペプチド Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号357)、ペプチドGly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号358)、及びペプチド Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号345)のようなアミノ酸残基の他の組み合わせが使用され得る。他の適切なリンカーとしては、単一のSer、及びVal残基；ジペプチドArg-Thr、Gin-Pro、Ser-Ser、Thr-Lys、及びSer-Leu；Lys-Thr-His-Thr（配列番号359)；Lys-Thr-His-Thr-Ser（配列番号360)；Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser（配列番号361)；Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro（配列番号362)；Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro（配列番号363)；Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro（配列番号364)；Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser（配列番号365)；Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser（配列番号366)；Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro（配列番号367)；Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro（配列番号368)；Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly（配列番号369)；Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly（配列番号370)；Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly（配列番号371)；Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly（配列番号372)；Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly（配列番号373)；Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly（配列番号374)；Thr-Val-Ala-Ala-Pro（配列番号346)、Gln-Pro-Lys-Ala-Ala（配列番号347)、Gln-Arg-Ile-Glu-Gly（配列番号348)；Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser（配列番号349)、Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser（配列番号350)、Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro（配列番号307)、Thr-Lys-Gly-Pro-Ser（配列番号309)、His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys（配列番号351)、及びGly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly（配列番号389)が挙げられる。上に列挙された例は、いかなるようにも本発明の範囲を限定することを意図されず、そしてバリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、グリシン、及びプロリンからなる群から選択される無作為に選択されたアミノ酸を含むリンカーは、本発明の抗体様結合タンパク質において適切であることが示されていた。

【０２５６】

リンカー中のアミノ酸残基の同一性及び配列は、リンカーにおいて達成しようとする二次構造要素の種類に依存して変わり得る。例えば、グリシン、セリン、及びアラニンは、最大の可動性を有するリンカーに最良である。グリシン、プロリン、スレオニン、及びセリンのいくつかの組み合わせは、より丈夫で伸長されたリンカーが必要な場合に有用である。いずれのアミノ酸残基も、所望の特性に依存して必要に応じてより大きなペプチドリンカーを構築するための他のアミノ酸残基と組み合わせたリンカーとして考慮され得る。

【０２５７】

一実施態様において、リンカーL_1は、配列 Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (配列番号307)のリンカーであり、リンカーL_2は配列 Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (配列番号309)のリンカーであり、リンカーL_3は配列「S」のリンカーであり、そしてリンカーL_4は配列「RT」のリンカーである。

【０２５８】

さらなる実施態様において、リンカーL_1、L_2、L_3、及びL_4の配列は、スレオニン；ヒスチジン-スレオニンペプチドのようなジペプチド；トリペプチドThr-His-Thr、Lys-Thr-His-Thr（配列番号359)；Lys-Thr-His-Thr-Ser（配列番号360)；Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser (配列番号361)；Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro（配列番号362)；Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro（配列番号363)；Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro（配列番号364)；Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser（配列番号365)；Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser（配列番号366)；Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro（配列番号367)；Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro（配列番号368)；Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly（配列番号369)；Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly（配列番号370)；Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (配列番号371)；Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly（配列番号372)；Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly（配列番号373)及びGly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly（配列番号374)からなる群より選択される。一実施態様において、リンカーL_5の配列は、単一のセリン残基、グリシン-セリンジペプチドのようなジペプチド；トリペプチドGly-Gly-Ser、ペプチドGly-Gly-Gly- Ser（配列番号354)、ペプチドGly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号344)、ペプチドSer-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号355)、ペプチドGly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号356)、ペプチドGly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号357)、ペプチドGly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号358)、ペプチドGly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号345)、及びペプチドGly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly（配列番号389)からなる群より選択される。

【０２５９】

本明細書において使用される用語「Fcドメイン」は、天然Fc及びFc変異体及び上に定義される配列を包含する。Fc変異体及び天然Fc分子と同様に、用語「Fcドメイン」は、全抗体から消化されても他の手段により製造されても、単量体又は多量体形態の分子を含む。

【０２６０】

本明細書で使用される用語「天然Fc」は、単量体形態でも多量体形態でも、抗体の消化により得られたか又は他の手段により製造された非抗原結合フラグメントの配列を含む分子を指し、そしてヒンジ領域を含み得る。天然Fcの元の免疫グロブリン源は、特に、ヒト起源であり、そしていずれの免疫グロブリンでもよいが、IgGl及びIgG2が好ましい。天然Fc分子は、共有結合(すなわち、ジスルフィド結合)及び非共有結合により形成される二量体又は多量体形態へと連結され得る単量体ポリペプチドから構成される。天然Fc分子の単量体サブユニット間の分子間ジスルフィド結合の数は、クラス(例えば、IgG、IgA、及びIgE)又はサブクラス(例えば、IgGl、IgG2、IgG3、IgAl、及びIgGA2)に依存して１～４の範囲に及ぶ。天然Fcの一例は、IgGのパパイン消化により得られるジスルフィド結合二量体である。本明細書で使用される「天然Fc」は、単量体、二量体、及び多量体形態に対して包括的である。

【０２６１】

本明細書で使用される用語「Fc変異体」は、天然Fcから改変された分子又は配列を指すが、サルベージ受容体、FcRn（新生児型（neonatal）Fc受容体)についての結合部位をなお含む。例となるFc変異体、及びそれらのサルベージ受容体との相互作用は、当該分野で公知である。従って、用語「Fc変異体」は、非ヒト天然Fcからヒト化された分子又は配列を含み得る。さらに、天然Fcは、本発明の抗体様結合タンパク質に必要でない構造的特徴

又は生物学的活性を提供するために除去することができる領域を含む。従って、用語「Fc変異体」は、１つ若しくはそれ以上の天然Fc部位若しくは残基を欠いた分子若しくは配列、又は１つ若しくはそれ以上のFc部位若しくは残基が改変されている分子若しくは配列、(1)ジスルフィド結合形成、(2)選択された宿主細胞との不適合、(3)選択された宿主細胞における発現の際のN末端異質性、(4)グリコシル化、(5)補体との相互作用、(6)サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、若しくは(7)交代依存性細胞傷害性(ADCC)に影響を及ぼすか若しくはこれらに関与する分子若しくは配列を含む。

【０２６２】

いくつかの実施態様において、抗体様結合タンパク質が２つのF_cドメインを含有する場合、すなわち、CODV-Ig(F_c及びF_{c2})、CODV-Fab-TL(２つのF_cドメイン)、及びCODV-Fab-OL(F_c及びF_{c3})において、２つのF_cドメインは、同じ免疫グロブリンアイソタイプ又はアイソタイプサブクラスのものである。従って、いくつかの実施態様において、CODV-IgのF_c及びF_{c2}の両方又はCODV-Fab-TLの両方のF_cドメイン、又はCODV-Fab-OLのF_c及びF_{c3}両方が、IgG1サブクラスのものであるか、又はIgG2サブクラスのものであるか、又はIgG3サブクラスのものであるか、又はIgG4サブクラスのものである。

【０２６３】

本明細書において記載される全ての抗体様結合タンパク質は、エフェクター機能を有していない。このことは、抗体様結合タンパク質がIgG1サブクラスの1つ又はそれ以上のF_cドメイン(すなわち、式[III]におけるF_c、式[IV]［F_{c3}におけるF_{c2})を含有する場合、IgG1骨格の上記1つ又はそれ以上のF_cドメインは、Fcエフェクター機能を消失させる二重変異L234A及びL235A(いわゆる「LALA変異」)を含有する。Fc二重変異体L234A及びL235Aは、FcγRにもC1qにも結合せず、そしてIgG1サブクラスのFcドメインのADCC及びCDC機能の両方が消失する(Hezareh、M. et al.,J Virol. 2001 Dec；75(24)：12161－12168)。

【０２６４】

一例において、F_c領域は、配列番号330、配列番号394、又は配列番号396のアミノ酸配列を含む。一実施態様において、F_{C2}領域は、Jendeberg、L. et al. (1997、J. Immunological Meth. 201：25-34)に記載されるように、CH3ドメイン内に２つのアミノ酸交換 H435R及びY436Fを含む。従って、一実施態様において、F_{C2}領域は配列番号327のアミノ酸配列を含む。別の実施態様において、F_{C2}領域は配列番号392のアミノ酸配列を含む。

【０２６５】

いわゆるCODV-Fab「7G3x20G6」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号9の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号308の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化８５】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSN
RFSGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVDPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**GQPK**
AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK
TKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号306、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチド、並びに

－　配列番号312の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号5の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化８６】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSA**S**EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFTKAWMHWVRQSPEKQLEWVAQ
IKDKSNSYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYCRGVYYALSPFDY
WGQGVMVTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号311、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IIに従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２６６】

いわゆるCODV-Fab 「7G3x4E7」 抗体様結合タンパク質は:

－ 配列番号21の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号308の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化８７】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLEHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQPLIYKVSN
RFSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGPGTKLELK**GQPK**
AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK
TKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号314、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチド、並びに

－ 配列番号312の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号18の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化８８】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSA**S**EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVA
QIKDKSNNYATYYAESLKGRFTISRDDPKRSIYLQMNSLREEDTAIYYCRYVHYGIGYA
MDAWGQGTSVTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号315、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IIに従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２６７】

いわゆるCODV-Fab「7G3x4B4」抗体様結合タンパク質は:

－ 配列番号16の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号308の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化８９】

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQRPGQSPQVLIYKVS
NRFSGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**GQP**
KAAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLL
IYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEI
K**TKGPS**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号316、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチド、並びに

－　配列番号312の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号12の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化９０】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSA**S**EVQLVETGGRLVQPGRSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVA
QIKARSNNYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYCRGTYYASKPF
DYWGQGVMVTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号317、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IIに従う１つのポリペプチド

を含む。

【０２６８】

いわゆるCODV-Fab「7G3x18F5」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号26の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号308の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化９１】

DVLMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHTNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSN
RLSGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTHYPFTFGAGTKLELK**GQPK**
AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK
TKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号318、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチド、並びに

－　配列番号312の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号23の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化９２】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSA**S**EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFTNAWMHWVRRSPEKQLEWVA
QIKDKSNNYATYYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLQMNSLKEEDTAIYYCRYVHYRFAYAL
DAWGRGTSVSVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号319、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IIに従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２６９】

いわゆるCODV-Fab「hz20G6x7G3」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号308の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号143の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、配列

【化９３】

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK**GQ**
PKAAPDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEI
K**TKGPS**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号320、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチドアミノ酸、並びに

－　配列番号138の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号312の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化９４】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
GTLVTVSS**S**EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWI
GDIIPSNGATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWF
AYWGQGTLVTVSA**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号321、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IIに従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２７０】

いわゆるCODV-Fab「7G3xhz4B4」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号158の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号308の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化９５】

DVVMTQTPVSLSVSVGGRVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGKSPKVLIYKVSN
RFSGVSSRFTGSGSGTDFTLKISSVQPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**GQPK**
AAPDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK
TKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号322、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチド、並びに

－　配列番号312の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号171の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化９６】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGA
TFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGT
LVTVSA**S**QVQLVETGGGLVKPGQSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKGLEWVA
QIKARSNNYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLTPEDTAIYYCRGTYYASKPFD
YWGQGVMVTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号323、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IIに従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２７１】

いわゆるCODV-Fab「hz4B4x3E3」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号230の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号158の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化９７】

QFVLTQPNSVSTNLGSTVKLSCKRNTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPD
GVPDRFSGSIDRSSNSALLTINNVQTEDEADYFCQSYSSGINIIFGGGTKLTVL**GQPKA**
APDVVMTQTPVSLSVSVGGRVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGKSPKVLIYKV
SNRFSGVSSRFTGSGSGTDFTLKISSVQPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK**TK**
GPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(配列番号324、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチド、並びに

－　配列番号171の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号226の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化９８】

QVQLVETGGGLVKPGQSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKGLEWVAQIKARSN
NYATYYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLTPEDTAIYYCRGTYYASKPFDYWGQG
VMVTVSS**S**QVQLQESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTTYDVHWVRQPPGKGLEWM
GRIQNGGITDYNSALKSRLIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMYFCAKTGSYFYAFDH
WGQGTLVTVSS**RT**ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号325、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IIに従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２７２】

いわゆるCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列:

【化９９】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGS**
GSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQ
SLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTK
VEIK**GGSGSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

(配列番号388、リンカーは太字及び下線を付して示される)から本質的になる式[I]に従う１つのポリペプチド、並びに

－　配列番号138の配列のV_{D3}、0アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}(斜字体で下線を引かれる)、0アミノ酸であるL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}を含む、アミノ酸配列

【化１００】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
GTLVTVSS*EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYMKWARQMPGKGLEWM*
GDIIPSSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWF
*AYWGQGTMVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(配列番号390)から本質的になる式[II]に従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２７３】

一例において、いわゆるCODV-Fab 「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」、「hz4B4x3E3」及び「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドは、ヒンジ配列及び例えば精製に使用されるHis tagに対応する配列 EPKSCDKTHTHHHHHH (配列番号352)を更に含む。

【０２７４】

いわゆるCODV-Fab「hz20G6x7G3-TL4」(CODV-Fab-TL4「hz20G6x7G3」とも呼ばれる)抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号308の配列のV_{D1}、配列番号307の配列のL_1、配列番号143の配列のV_{D2}、配列番号309の配列のL_2、配列番号310の配列のC_L及び配列番号327の配列のF_{c2}（下線を引かれる）を含む、アミノ酸配列

【化１０１】

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK**GQ**
PKAAPDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLI
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEI
K**TKGPS**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**ESK**
YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSLG

（配列番号326、リンカーは太字及び下線を付して示される）から本質的になる式[IV]に従う１つのポリペプチド、並びに

－　配列番号138の配列のV_{D3}、アミノ酸配列「S」のL_3、配列番号312の配列のV_{D4}、アミノ酸配列「RT」のL_4、及び配列番号329の配列のC_{H1}、及び配列番号330の配列のF_cを含む、アミノ酸配列

【化１０２】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
GTLVTVSS**S**EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYMKWVKQSHGKSLEWI
GDIIPSNGATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWF
AYWGQGTLVTVSA**RT**ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES
KYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG

（配列番号328、リンカーは太字及び下線を付して示される）の式[III]に従う１つのポリペプチド

を含む。

【０２７５】

上記CODV-Fab-TL4「hz20G6x7G3」抗体様結合タンパク質において、配列番号330の配列のFc及び配列番号327の配列のF_{c2}は、IgG4骨格由来である。上記抗体様結合タンパク質は、CODV-Fab-TL形式であり、そして式IIIの１つのポリペプチド及び式IVの１つのポリペプチドを含むかこれらからなる。

【０２７６】

いわゆるCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2、配列番号310の配列のC_L、０アミノ酸を含有するL_5、及び配列番号392の配列のF_{c2}（下線を引かれた）を含む、アミノ酸配列

【化１０３】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGS**
GSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQ
SLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTK
VEIK**GGSGSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG

(配列番号391、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式IVに従う１つのポリペプチド；並びに
－　配列番号138の配列のV_{D3}、０アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}(斜字体)、０アミノ酸であるL_4、配列番号313の配列のC_{H1}、及び及び配列番号394の配列のF_c(下線を引かれた)を含む、アミノ酸配列

【化１０４】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
GTLVTVSS*EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYMKWARQMPGKGLEWM*
GDIIPSSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWF
*AYWGQGTMVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号393)の式IIIに従う１つのポリペプチド
を含む。

【０２７７】

CODV-Fab-TL1「hz20G6x7G3」抗体様結合タンパク質において、配列番号394の配列のFc及び配列番号392の配列のF_{c2}はIgG1骨格由来である。上記抗体様結合タンパク質はCODV-Fab-TL形式である。これは、式IVの１つのポリペプチド及び式IIIの１つのポリペプチドを含むか又はこれらからなる。

【０２７８】

いわゆるCODV-Fab-0L1「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質は:

－　配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2、及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化１０５】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGS**
GSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQ
SLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTK
VEIK**GGSGSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

(配列番号388、リンカーは太字及び下線を付して示される)の式Iに従う１つのポリペプチド；並びに

－　配列番号138の配列のV_{D3}、0アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}(斜字体及び下線を引かれる)、0アミノ酸であるL_4、配列番号313の配列のC_{H1}、及び配列番号396の配列のF_c(下線を引かれる)を含む、アミノ酸配列

【化１０６】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
GTLVTVSS*EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYMKWARQMPGKGLEWM*
GDIIPSSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWF
*AYWGQGTMVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**R**FTQKSLSLSPG

(配列番号395)の式IIIに従う１つのポリペプチド

を含み;

そしてここで、いわゆるCODV-Fab-0L1「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質は、アミノ酸配列:

【化１０７】

GSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**HY**TQKSLSLSPG

(配列番号397)のFc断端(F_{c3})をさらに含み、そして式IIIに従うポリペプチドのFc領域とヘテロ二量体化する。

【０２７９】

上記抗体様結合タンパク質はCODV-Fab-0L形式であり、すなわち、式Iの１つのポリペプチド、式IIIの１つのポリペプチド、及び１つのFc断端を含むか又はこれらからなる。そのF_c及びF_{c3}配列は、「ノブ・イントゥ・ホール」技術に従って操作されており、そして二重変異L234A及びL235Aをさらに含有する。

【０２８０】

配列番号396の配列のF_c配列は、そうでなければFc領域のこれらの位置に存在していたであろうHY残基の代わりに、位置200-221（上で太字)においてRF残基を含有するよう設計された。HY＞RF変異(すなわち、Jendeberg、L. et al. 1997、J. Immunological Meth.、201：25-34に記載されているように、CH3ドメインにおけるH435R及びY436F)は、プロテインAへの結合を除くので精製目的のために有利である。CODV-Fab-OL1「hz20G6xhz7G3」の場合、配列番号397の配列のF_c断端は、位置217～218(上で太字)にHY残基を含む。

【０２８１】

いわゆるCODV-Fab-OL1a「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質は:

－ 配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2、及び配列番号310の配列のC_Lを含む、アミノ酸配列

【化１０８】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAS
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGS**
GSSGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQ
SLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTK
VEIK**GGSGSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

(配列番号388)の式Iに従う１つのポリペプチド;

－ 配列番号138の配列のV_{D3}、0アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}(斜字体及び下線を引かれる)、0アミノ酸であるL_4、配列番号313の配列のC_{H1}、及び配列番号400の配列のF_c(下線を引かれる)を含む、アミノ酸配列:

【化１０９】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSN
SYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQ
GTLVTVSS*EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYYMKWARQMPGKGLEWM*
GDIIPSSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWF
*AYWGQGTMVTVSS*ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**HY**TQKSLSLSPG

(配列番号399)の式IIIに従う１つのポリペプチド
を含み;

－ そしてここで、いわゆるCODV-Fab-OL1a「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質は、アミノ酸配列:

【化１１０】

GSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG

(配列番号398)のFc断端(F_{c3})をさらに含み、これは式IIIに従うポリペプチドのFc領域とヘテロ二量体化する。

【０２８２】

配列番号400の配列のF_cは、位置200～221(上で太字)にHY残基を含むが、配列番号398の配列のF_c断端は位置217～218(上で太字)にRF残基を含む。

【０２８３】

上記抗体様結合タンパク質はCODV-Fab-OL形式であり、すなわち、式Iの１つのポリペプチド、式IIIの１つのポリペプチド及び１つのFc断端を含むか又はこれらからなる。そのF_c及びF_{c3}配列は、「ノブ・イントゥ・ホール」技術に従って操作されており、そして二重変異L234A及びL235Aを含む。

【０２８４】

一実施態様において、第一の免疫グロブリン又は第二の免疫グロブリンは、いわゆる「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、及び「9F6-G3」抗CD123抗体から選択される１つの抗CD123抗体、若しくはそのヒト化形態、又は本明細書以下に記載される抗CD123抗体「7G3」、例えば抗CD123抗体「3E3-D3」若しくは「7G3」、若しくはそのヒト化形態である。

【０２８５】

一実施態様において、第一の免疫グロブリン又は第二の免疫グロブリンは、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「12D2-E5」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「18H11-F10」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「3G5-E10」、「9D7-F3」、「8C2-F7」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「6C9-C9」、「3E8-G1」、「3H6-D2」、及び「8H2」抗CD3抗体から選択される１つの抗CD3抗体、又はそのヒト化形態、例えばいわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、及び「hz20G6」抗CD3抗体、例えばいわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」抗CD3抗体から選択されるものである。

【０２８６】

従って、V_{D1}及びV_{D4}、又はV_{D2}及びV_{D3}は、抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は:

ａ） 配列番号6の配列のCDR1-H、配列番号7の配列のCDR2-H、配列番号8の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10又は配列番号142の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｂ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号14の配列のCDR2-H、配列番号15の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号17又は配列番号184の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｃ） 配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、配列番号20の配列の CDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号22の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン；又は

ｄ） 配列番号24の配列のCDR1-H、配列番号19の配列のCDR2-H、配列番号25の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号27の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号28の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメイン

を含み、そして

ここで、V_{D4}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}は上で定義される重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D4}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}は上で定義される軽鎖の可変ドメインであり、又は
V_{D3}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D2}は上で定義される重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D2}は上で定義される軽鎖の可変ドメインである。

【０２８７】

さらなる実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}又はV_{D2}及びV_{D3}は、抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体はヒト化抗体であり、かつ:

ａ） 配列番号138の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号143の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は

ｂ） 配列番号171の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号158の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメイン；又は

ｃ） 配列番号176の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号164の配列、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の軽鎖可変ドメインを含み；又は

ここで、V_{D4}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}は上で定義される重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D4}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}は上で定義された軽鎖の可変ドメインであり、又は
V_{D3}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D2}は上で定義される重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D2}は上で定義される軽鎖の可変ドメインである。

【０２８８】

配列番号138、配列番号143、配列番号171、配列番号158、配列番号176、又は配列番号164と少なくとも85%同一である上記配列において、6つのCDRの配列は、参照配列の配列番号138、配列番号143、配列番号171、配列番号158、配列番号176、又は配列番号164に存在する６つのCDRと比較して変化していない。

【０２８９】

一実施態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒトCD3に結合する。別の実施態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、カニクイザルCD3にさらに結合する。特に、本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒトCD3の、又はヒト及びカニクイザルCD3の両方の細胞外ドメインに結合する。より詳細には、抗体はCD3εに結合する。より詳細には、抗体様結合タンパク質は、CD3εのヒト又はヒト及びカニクイザル細胞外ドメインに結合する。抗体様結合タンパク質は、単離された形態で発現されたか、又は可溶性細胞外ドメイン若しくは例えばT細胞に存在するように全長膜係留CD3εに存在するかに関係なく、CD3ε/δ複合体のような複合体の形態で存在する場合、又は単一のタンパク質として存在する場合に、CD3εに結合する。本発明に従う抗体様結合タンパク質は、表面ヒトCD3タンパク質に対して、又はヒト及びカニクイザルCD3タンパク質の、特にCD3εに対して特異的である。

【０２９０】

本発明に従う抗体様結合は、≦10、特に≦6、≦5、≦4、≦3、≦2、≦1又は≦0.5である、ヒトCD3についての親和性に対するカニクイザルCD3についての親和性の比(KD(カニクイザル)/KD(ヒト)を有する。従って、本発明に従う抗体様結合タンパク質は、サルにおいて行われる毒性学的研究に使用され得、サルにおいて観察される毒性プロフィールは、ヒトにおける可能性のある有害作用を予測することに関連がある。

【０２９１】

さらに、本発明に従う抗体様結合タンパク質は、≦50nM、≦40nM、又は≦30nM、例えば、≦20nMである、ヒトCD3若しくはカニクイザルCD3、又は両方についての親和性(KD)、例

えば、0.1nM～30nM、特に0.4nM～20nM、又は0.4nM～15nMの親和性を有する。

【０２９２】

一実施態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、標的細胞が存在しない場合に、20%未満、18%未満、16%未満、14%未満、12%未満、10%未満より低いT細胞活性化を有する。

【０２９３】

一実施態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、標的細胞の存在下で、55%より高い、60%より高い、62%より高い、64%より高い、66%より高い、68%より高い、70%より高い、T細胞活性化を有する。

【０２９４】

本発明の抗体様結合タンパク質の文脈における「低いT細胞活性化」は、20%未満、18%未満、16%未満、14%未満、12%未満、10%未満のT細胞活性化を指す。

【０２９５】

本明細書における「標的細胞」は、第二の抗原を発現する細胞を指し、一例では、本明細書における標的細胞は、THP-1細胞のようなCD123を発現する細胞を指す。

【０２９６】

本明細書における「高いT細胞活性化」は、50%より高い、55%より高い、60%より高い、62%より高い、64%より高い、66%より高い、68%より高い、70%より高いT細胞活性化を指す。

【０２９７】

さらなる実施態様において、本発明は、少なくとも１つのさらなる標的抗原に対して生物学的及び免疫学的特異性を有する抗体様結合タンパク質に関する。

【０２９８】

従って、本発明の一局面において、本発明の抗体様結合タンパク質は、少なくとも１つの他の標的抗原にさらに結合する。従って、一実施態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、二重特異性であり、そして２つの異なる抗原標的又はエピトープに結合することができる。

【０２９９】

従って、一実施態様において、第二の免疫グロブリンが、上の<<抗CD123抗体>>の項において定義される１つの抗CD123抗体である場合、第一の免疫グロブリンは、少なくとも１つのさらなる標的に特異的な免疫グロブリンであり、又は第一の免疫グロブリンが上の<<抗CD123抗体>>の項において定義される１つの抗CD123抗体である場合、第二の免疫グロブリンは少なくとも１つのさらなる標的に特異的な免疫グロブリンである。

【０３００】

１つのさらなる実施態様において、第二の免疫グロブリンが上の<<抗CD3抗体>>の項において定義される１つの抗CD3抗体である場合、第一の免疫グロブリンは、少なくとも１つのさらなる標的に特異的な免疫グロブリンであり、又は第一の免疫グロブリンが上の<<抗CD3抗体>>の項において定義される１つの抗CD3抗体である場合、第二の免疫グロブリンは、少なくとも１つのさらなる標的に特異的な免疫グロブリンである。

【０３０１】

本発明の抗体様結合タンパク質は、T細胞結合（engaging）効果を有する。このT細胞結合効果は、標的細胞において細胞傷害性を誘導する。一実施態様において、標的細胞は、CD123を発現する癌細胞のようなCD123を発現する細胞、例えばTHP-1又はTF-1である。

【０３０２】

従って、一実施態様において、本発明に従う抗体様結合タンパク質は、インビトロで初代T細胞を結合し、そして標的細胞を溶解することができ、ここで(EC_{50})は≦40pM、≦35pM、例えば≦30pMである。

【０３０３】

本明細書における「細胞傷害性」は、本発明の抗体様結合タンパク質又は抗CD123抗体のような化合物の、細胞に対して毒性である性質を指す。細胞傷害性は、様々な作用機構

により誘導され得、従って細胞媒介細胞傷害、アポトーシス、抗体依存性細胞媒介細胞傷害(ADCC)又は補体依存性細胞傷害(CDC)に分けることができる。

【０３０４】

「抗体依存性細胞媒介細胞傷害」又は「ADCC」は、細胞媒介免疫防御の機構を指し、それにより、免疫系のエフェクター細胞は、その膜表面抗原が特異的抗体に結合されている標的細胞を活動的に溶解する。

【０３０５】

本明細書の文脈における「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」は、補体系タンパク質の存在下での標的細胞の溶解を指す。

【０３０６】

「細胞媒介細胞傷害」は、細胞傷害性Tリンパ球又はナチュラルキラー細胞のようなエフェクターリンパ球による標的細胞の細胞溶解を指し、従ってT細胞媒介細胞傷害及びNK細胞細胞傷害に区別することができる。

【０３０７】

一実施態様において、本明細書における細胞傷害性は、細胞媒介細胞傷害、例えばT細胞媒介細胞傷害を指す。

【０３０８】

さらに、一実施態様において、細胞媒介細胞傷害は、T細胞による細胞媒介細胞傷害を指す。

【０３０９】

従って、本発明の抗体様結合タンパク質は、T細胞により媒介される標的細胞における細胞媒介細胞傷害を誘導する。

【０３１０】

細胞傷害を測定する方法は当業者に公知であり、そしてこれらとしては、51-クロム(Cr)放出アッセイ、ヨウ化プロピジウム、7-AAD、及び当業者に公知の他の染色剤を含む標的細胞の生存／死亡細胞染色、グランザイム及びパーフォリンを含むT細胞により放出された溶解性分子のフローサイトメトリー又はELISAによる検出、細胞性細胞傷害及び細胞溶解についてのバイオマーカーとして損傷された細胞から媒体中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の検出、CD107aの細胞表面動員の検出、アポトーシス性標的細胞のアネキシンV(カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質)染色並びに例えば活性化カスパーゼ-3(CASP3)の検出の使用が挙げられる。さらに、当業者は、選択された試験に基づく細胞傷害性と実験的設定に基づく細胞傷害性の異なる機序を区別することができる。

【０３１１】

一例において、細胞媒介細胞傷害は、例えば実施例3.2に記載されるように、例えば標的細胞を標識するためにCFSE及び死亡した細胞を標識するために7-AADを使用して測定され得る。

【０３１２】

さらなる実施態様において、抗体様結合タンパク質は、CD3及び少なくとも１つのさらなる抗原標的、例えばCD123に結合することができる。

【０３１３】

一実施態様において、抗体様結合タンパク質は、このさらなる抗原標的、例えばCD123の機能を阻害することができる。

【０３１４】

本発明の一局面において、抗体様結合タンパク質はヒトCD123に結合する。別の実施態様において、抗体様結合タンパク質はさらにカニクイザルCD123に結合する。特に、本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒトCD123の、又はヒト及びカニクイザルCD123の両方の細胞外ドメインに結合する。より詳細には、抗体様結合タンパク質は、CD123の遠位部分、例えば、アミノ酸配列 配列番号104のヒトCD123の位置19から開始して49までのアミノ酸に結合する。抗体様結合タンパク質は、単離された形態で発現されるか、又はAML細胞若しくはCD123トランスフェクト細胞のようなCD123を発現する細胞において存在するように

、可溶性細胞外ドメイン若しくは全長膜係留CD123に存在するかに関係なく、CD123に結合する。本発明に従う抗体様結合タンパク質は、それらの表面上にヒト又はヒト及びカニクイザルCD123タンパク質を発現する細胞、例えばCD123を発現する癌細胞に特異的である。

【０３１５】

従って、本発明に従う抗体様結合タンパク質は、≦20nM、≦15nM、又は≦10nM、例えば≦5nMである、ヒトCD123若しくはカニクイザルCD123、又は両方についての親和性(KD)、例えば0.01nM～5nM、特に0.1nM～5nMの親和性を有する。

【０３１６】

従って、一実施態様において、第一の免疫グロブリンは、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「12D2-E5」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「18H11-F10」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「3G5-E10」、「9D7-F3」、「8C2-F7」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「6C9-C9」、「3E8-G1」、「3H6-D2」、及び「8H2」抗CD3抗体、又はそのヒト化形態、例えばいわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「hz4B4」及び「hz20G6」抗CD3抗体から選択される１つの抗CD3抗体であり、そして第二の免疫グロブリンは、いわゆる「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、及び「9F6-G3」抗CD123抗体から選択される１つの抗CD123抗体である。

【０３１７】

従って、さらなる実施態様において、第二の免疫グロブリンは、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「12D2-E5」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「18H11-F10」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「3G5-E10」、「9D7-F3」、「8C2-F7」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「6C9-C9」、「3E8-G1」、「3H6-D2」、及び「8H2」抗CD3抗体、又はそのヒト化形態、例えばいわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「hz4B4」及び「hz20G6」抗CD3抗体から選択される１つの抗CD3抗体であり、そして第一の免疫グロブリンは、いわゆる「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、及び「9F6-G3」抗CD123抗体から選択される１つの抗CD123抗体である。

【０３１８】

従って、一実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}又はV_{D2}及びV_{D3}は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、それらはそれぞれ、３つのCDR配列により、又は上で定義された13のいわゆる「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、及び「9F6-G3」抗CD123抗体のうちの１つの重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列のいずれかにより定義され、

ここで、V_{D2}及びV_{D3}が両方とも、上で定義された抗CD3抗体のうちの１つの重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列の３つのCDR配列を含む場合、V_{D1}及びV_{D4}は両方とも、上で定義された抗CD123抗体のうちの１つの重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列の３つのCDR配列を含み、又は

ここで、V_{D1}及びV_{D4}が、上で定義される抗CD3抗体のうちの１つの重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列のCDR配列を含む場合V_{D2}及びV_{D3}は両方とも、上で定義された抗CD123抗体のうちの１つの重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列の３つのCDRを含む。

【０３１９】

従って、一実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}は、抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号6の配列のCDR1-H、配列番号7の配列のCDR2-H、配列番号8の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに配列番号10の配列又は配列番号142のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含み、そしてV_{D}

$_2$及びV_{D3}は、「抗CD123抗体」の項で上で定義される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、

ここでV_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。

【０３２０】

従って、さらなる実施態様において、V_{D2}及びV_{D3}は抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号6の配列のCDR1-H、配列番号7の配列のCDR2-H、配列番号8の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号10又は配列番号142の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D1}及びV_{D4}は、「抗CD123抗体」の項に上で記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、

ここでV_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。

【０３２１】

従って、さらなる実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}は、抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号14の配列のCDR2-H、配列番号15の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン、並びに配列番号17又は配列番号184の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D2}及びV_{D3}は、「抗CD123抗体」の項で上で記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、

ここで、V_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}aが両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。

【０３２２】

従って、さらなる実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}は抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号13の配列のCDR1-H、配列番号14の配列のCDR2-H、配列番号15の配列のCDR3-Hを含む重鎖可変ドメイン並びに配列番号17又は配列番号184の配列のCDR1-L、配列「KVS」のCDR2-L及び配列番号11の配列のCDR3-Lを含む軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D2}及びV_{D3}は、「抗CD123抗体」の項に上に記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、

ここで、V_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。

【０３２３】

さらなる実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}は、ヒト化抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号138の配列の重鎖可変重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号143の配列の軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D2}及びV_{D3}は、「抗CD123抗体」の項で上に記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又

は軽鎖の可変ドメインであり、
ここで、V_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。
【０３２４】
さらなる実施態様において、V_{D2}及びV_{D3}は、ヒト化抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号138の配列の重鎖可変重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号143の配列の軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D1}及びV_{D4}は、「抗CD123抗体」の項で上に記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、
ここでV_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、V_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。
【０３２５】
さらなる実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}は、ヒト化抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号171の配列の重鎖重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号158の配列の軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D2}及びV_{D3}は、「抗CD123抗体」の項で上に記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、
ここで、V_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。
【０３２６】
さらなる実施態様において、V_{D2}及びV_{D3}は、ヒト化抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号171の配列の重鎖重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号158の配列の軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D1}及びV_{D4}は、「抗CD123抗体」の項で上で記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、
ここで、V_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。
【０３２７】
さらなる実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}は、ヒト化抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、ここで上記抗CD3抗体は、配列番号176の配列の重鎖重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号164の配列の軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D2}及びV_{D3}は、「抗CD123抗体」の項で上に記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、
ここで、V_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。
【０３２８】
さらなる実施態様において、V_{D2}及びV_{D3}は、ヒト化抗CD3抗体の重鎖又は軽鎖の可変ド

メインであり、ここで、上記抗CD3抗体は、配列番号176の配列の重鎖重鎖可変ドメイン及び／又は配列番号164の配列の軽鎖可変ドメインを含み、そしてV_{D1}及びV_{D4}は、「抗CD123抗体」の項で上に記載される「3E3-D3」、「1E1-G5」、「2B8-F3」、「2F8-D6」、「3B10-E6」、「5A5-B4」、「6B10-E4」、「6C10-C4」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9B8-G6」、「9D7-C8」、「9F6-G3」抗CD123抗体からなる群より選択される抗CD123抗体の重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり、

ここでV_{D3}及びV_{D4}が両方とも重鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも軽鎖の可変ドメインであり、又はV_{D3}及びV_{D4}が両方とも軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも重鎖の可変ドメインである。

【０３２９】

本発明のさらなる局面によれば、第一又は第二の免疫グロブリンは、抗CD123抗体7G3である。従って、一実施態様において、V_{D1}及びV_{D4}又はV_{D2}及びV_{D3}は、本明細書以下において定義される抗体7G3の重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列のCDR配列により定義される重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。一実施態様において、V_{D1}及び$V_{D}4$、又はV_{D2}及びV_{D3}は、特許出願WO2013/173820（参照により本明細書に加入される）に記載される抗体7G3の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。

【０３３０】

従って、本明細書で使用されるいわゆる「7G3」抗CD123抗体は:

－　配列番号375の配列のCDR1-H、配列番号376の配列のCDR2-H、及び配列番号377の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化１１１】

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYTFTDYY**MKWVKQSHGKSLEWIGD**IIPSNGA**
TFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYC**TRSHLLRASWFAY**WGQGT
LVTVSA

(配列番号312、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、並びに

－　配列番号378の配列のCDR1-L、配列「WAS」のCDR2-L、及び配列番号379の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化１１２】

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSS**QSLLNSGNQKNY**LTWYLQKPGQPPKLLIY**WA**
STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC**QNDYSYPYT**FGGGTKLEIK

(配列番号308、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含む。

【０３３１】

本発明のさらなる局面において、抗体7G3はまた、ヒト化抗体又はヒト化抗体のフラグメントであってもよい。従って、一実施態様において、本発明の抗体7G3は、

－　配列番号381の配列のCDR1-H、配列番号377の配列のCDR2-H、及び配列番号382の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化１１３】

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS**GYSFTDYY**MKWARQMPGKGLEWMGD**IIPSNGA**
TFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC**ARSHLLRASWFAY**WGQGT
MVTVSS

(配列番号380、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、又は
配列番号381の配列のCDR1-H、配列番号384の配列のCDR2-H、及び配列番号382の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化１１４】

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGS**GYSFTDYY**MKWARQMPGKGLEWMGD**IIPSSGA**
TFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYC*ARSHLLRASWFAY*WGQGT
MVTVSS

(配列番号383、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、又は
－　配列番号378の配列のCDR1-L、配列「WAS」のCDR2-L、及び配列番号379の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化１１５】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESS**QSLLNSGNQKNY**LTWYQQKPGQPPKPLIY**WAS**
TRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC*QNDYSYPYT*FGQGTKLEIK

(配列番号385、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメイン
を含むヒト化抗体である。

【０３３２】

一実施態様において、ヒトCD3ε及びヒトCD123に特異的に結合する抗体様結合タンパク質は、

ａ）　アミノ酸配列 配列番号9若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号308若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号312若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号5若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン、又は

ｂ）　アミノ酸配列 配列番号21若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号308若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号312若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号18若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン、又は

ｃ）　アミノ酸配列 配列番号16若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号308若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号312若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号12若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン、又は

ｄ）　アミノ酸配列 配列番号26若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号308若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号312若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号23若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン、又は

ｅ）　アミノ酸配列 配列番号308若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号143若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号138若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号312若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン、又は

ｆ）　アミノ酸配列 配列番号158若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号308若しくはそれ

と少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号312若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号171若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン、

ｇ） アミノ酸配列 配列番号230若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号158若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号171若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号226若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン、

ｈ） アミノ酸配列 配列番号385若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D1})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号141若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D2})の軽鎖可変ドメイン、アミノ酸配列 配列番号138若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第二の免疫グロブリン(V_{D3})の重鎖可変ドメイン及びアミノ酸配列 配列番号383若しくはそれと少なくとも85％同一な配列からなる第一の免疫グロブリン(V_{D4})の重鎖可変ドメイン

を含む。

【０３３３】

参照配列と少なくとも85%同一な上記配列(例えば、配列番号383又は配列番号385と少なくとも85%同一な配列)において、6つのCDRの配列は、参照配列に存在する６つのCDRと比較して変化していない。

【０３３４】

一実施態様において、定義a)～g)のいずれかに従う抗体結合タンパク質は、配列番号307の配列のL_1、配列番号309の配列のL_2、アミノ酸配列「S」のL_3、アミノ酸配列「RT」のL_4及び配列番号313の配列のC_{H1}のリンカーをさらに含む。

【０３３５】

一実施態様において、定義a)～g)のいずれかに従う抗体結合タンパク質は、配列番号327の配列のF_{c2}をさらに含む。

【０３３６】

一実施態様において、定義ｈ）に従う抗体結合タンパク質は、配列番号389の配列のリンカーL_1、配列番号389の配列のL_2、0アミノ酸からなるL_3及びL_4、並びに配列番号313の配列のC_{H1}をさらに含む。

【０３３７】

一実施態様において、定義h)に従う抗体結合タンパク質は、配列番号392の配列のF_{c2}をさらに含む。

【０３３８】

一実施態様において、定義a)～h)のいずれかに従う抗体結合タンパク質のL_5は０アミノ酸を含有する。

【０３３９】

さらなる実施態様において、定義a)～g)のいずれかに従う抗体結合タンパク質は、配列番号307の配列のリンカーL_1、配列番号309の配列のL_2、アミノ酸配列「S」のL_3、アミノ酸配列「RT」のL_4、配列番号329の配列のC_{H1}及び配列番号330の配列のF_cをさらに含む。

【０３４０】

さらなる実施態様において、定義ｈ）に従う抗体結合タンパク質は、配列番号389の配列のリンカーL_1、配列番号389の配列のL_2、０アミノ酸からなるL_3及びL_4、配列番号313の配列のC_{H1}及び配列番号394の配列のF_cをさらに含む。

【０３４１】

さらなる実施態様において、定義ｈ）に従う抗体結合タンパク質は、配列番号397若しくは配列番号398の配列のFc断端、又は配列番号397若しくは配列番号398と少なくとも85%同一な配列をさらに含む。

【０３４２】
一実施態様において、ヒトCD3ε及びヒトCD123に特異的に結合する抗体結合タンパク質は:
ａ） 配列番号388の配列(配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_L)、
又は配列番号388と少なくとも85%同一である配列［ここで、hz7G3 軽鎖可変ドメイン(配列番号385の配列のV_{D1})の配列番号378配列、「WAS」及び配列番号379の３つのCDR、並びにhz20G6 軽鎖可変ドメイン(配列番号141の配列のV_{D2})の配列番号142、「KVS」及び配列番号11の配列の３つのCDRは変更されていない］からなる式[I]の１つのポリペプチド；及び
ｂ） 配列番号390の配列(配列番号138の配列のV_{D3}、0アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}、0アミノ酸であるL_4及び配列番号313の配列のC_{H1})、又は
配列番号390と少なくとも85%同一な配列［ここで、hz7G3 重鎖可変ドメイン(配列番号383の配列のV_{D4})の配列番号381、配列番号384、及び配列番号382の配列の３つのCDR、並びにhz20G6 重鎖可変ドメイン(配列番号138の配列のV_{D3})の配列番号6、配列番号7、配列番号8の配列の3つのCDRは変更されていない］からなる式[II]の１つのポリペプチド;
を含むか、又はこれらからなり、
そしてここで、式[I]のポリペプチド及び式[II]のポリペプチドは交差軽鎖－重鎖対を形成する。
【０３４３】
一実施態様において、ヒトCD3ε及びヒトCD123に特異的に結合する抗体結合タンパク質は:
ａ） アミノ酸配列 配列番号391(配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2、配列番号310の配列のC_L、0アミノ酸を含有するL_5、及び配列番号392の配列のF_{c2})、又は
配列番号391と少なくとも85%同一な配列［ここで、hz7G3 軽鎖可変ドメイン(配列番号385の配列のV_{D1})の配列番号378、「WAS」及び配列番号379の配列の３つのCDR、並びにhz20G6 軽鎖可変ドメイン(配列番号141の配列のV_{D2})の配列番号142、「KVS」及び配列番号11の配列の３つのCDRは変更されていない］の式[IV]に従う１つのポリペプチド；及び
ｂ） アミノ酸配列 配列番号393(配列番号138の配列のV_{D3}、0アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}、0アミノ酸であるL_4、配列番号313の配列のC_{H1}、及び及び配列番号394の配列のF_c)、又は
配列番号393と少なくとも85%同一な配列［ここで、hz7G3 重鎖可変ドメイン(配列番号383の配列のV_{D4})の配列番号381、配列番号384、及び配列番号382の配列の３つのCDR、並びにhz20G6重鎖可変ドメイン(配列番号138の配列のV_{D3})配列番号6、配列番号7、配列番号8の配列の３つのCDRは変更されていない］の式[III]に従う１つのポリペプチド;
を含むか、又は本質的にこれらからなり、
そしてここで、式[IV]のポリペプチド及び式[III]のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成する。
【０３４４】
上記抗体様結合タンパク質において、式[III]及び[IV]により表されるポリペプチド鎖は、それらのそれぞれのF_{c2}及びF_c領域を通して二量体化する。
【０３４５】
一実施態様において、ヒトCD3ε及びヒトCD123に特異的に結合する抗体結合タンパク質は:
ａ） アミノ酸配列 配列番号388 (配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_L)又は
配列番号388と少なくとも85%同一な配列［ここで、hz7G3軽鎖可変ドメイン(配列番号385の配列のV_{D1})の配列番号378、「WAS」及び配列番号379の配列の３つのCDR、並びにhz20G6軽鎖可変ドメイン(配列番号141の配列のV_{D2})の配列番号142、「KVS」及び配列番号11の配

列の３つのCDRは変更されていない］からなる式[I]に従う１つのポリペプチド；及び
ｂ） アミノ酸配列 配列番号395(配列番号138の配列のV_{D3}、0アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}、0アミノ酸であるL_4、配列番号313の配列のC_{H1}、及び配列番号396の配列のF_c)、又は
配列番号395と少なくとも85%同一な配列［ここで、hz7G3 重鎖可変ドメイン(配列番号383の配列のV_{D4})の配列番号381、配列番号384、及び配列番号382の配列の３つのCDR、並びにhz20G6重鎖可変ドメイン(配列番号138の配列のV_{D3})の配列番号6、配列番号7、配列番号8の配列の３つのCDRは変更されていない］の式[III]に従う１つのポリペプチド；及び
ｃ） アミノ酸配列 配列番号397、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の１つのFc断端(ポリペプチドF_{c3})を含むか、又は本質的にこれらからなり、ここで上記F_{c3}断端又はそれと少なくとも85%同一な配列は、式[III]に従うポリペプチドのF_c領域とヘテロ二量体化し;
そしてここで、式[I]のポリペプチド及び式[III]のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成する。
【０３４６】
一実施態様において、ヒトCD3ε及びヒトCD123に特異的に結合する抗体結合タンパク質は:
ａ） アミノ酸配列 配列番号388(配列番号385の配列のV_{D1}、配列番号389の配列のL_1、配列番号141の配列のV_{D2}、配列番号389の配列のL_2及び配列番号310の配列のC_L)からなる式[I]に従う１つのポリペプチド又は
配列番号388と少なくとも85%同一な配列［ここで、hz7G3 軽鎖可変ドメイン(配列番号385の配列のV_{D1})の配列番号378、「WAS」及び配列番号379の配列の３つのCDR、並びにhz20G6軽鎖可変ドメイン(配列番号141の配列のV_{D2})の配列番号142、「KVS」及び配列番号11の配列の３つのCDRは変更されていない］；
ｂ） アミノ酸配列 配列番号399(配列番号138の配列のV_{D3}、0アミノ酸であるL_3、配列番号383の配列のV_{D4}、0アミノ酸であるL_4、配列番号313の配列のC_{H1}、及び配列番号400の配列のF_c)の式IIIに従うポリペプチド、又は
それらと少なくとも85%同一な配列［ここで、3 CDRs of s hz7G3重鎖可変ドメイン(配列番号383の配列のV_{D4})の配列番号381、配列番号384、及び配列番号382の配列の３つのCDR、並びにhz20G6重鎖可変ドメイン(配列番号138の配列のV_{D3})の配列番号6、配列番号7、配列番号8の配列の３つのCDRは変更されていない］；及び
ｃ） アミノ酸配列 配列番号398、若しくはそれと少なくとも85％同一な配列の１つのFc断端（ポリペプチドF_{c3})を含むか、又はこれらからなり、ここで上記F_{c3}断端又はそれと少なくとも85%同一な配列は、式[III]に従うポリペプチドのFc領域とヘテロ二量体化し;
そしてここで、式[I]のポリペプチド及び式[III]のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成する。
【０３４７】
免疫複合体
一実施態様において、本発明の抗CD123抗体は、増殖阻害剤、細胞傷害剤、又はプロドラッグ活性化酵素に結合又は連結される。特に、本発明の抗CD123抗体は、上記増殖阻害剤、細胞傷害剤、又はプロドラッグを、それらの表面にCD123を過剰発現している癌性細胞に標的化するために実際有用である。
【０３４８】
核酸、ベクター及び組み換え宿主細胞
本発明のさらなる目的は、上で定義された抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質をコードする配列を含むか又はこれらの配列からなる核酸配列に関する。
【０３４９】
典型的には、上記核酸はDNA又はRNA分子であり、これらはプラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージ又はウイルスベクターのようないずれかの適切なベクター

中に含まれ得る。

【０３５０】

用語「ベクター」、「クローニングベクター」及び「発現ベクター」は、DNA又はRNA配列(例えば、外来遺伝子)が宿主細胞に導入されて、宿主を形質転換し、そして導入された配列の発現（例えば、転写及び翻訳）を促進するようにする媒介物を意味する。

【０３５１】

従って、本発明のさらなる目的は、本発明の核酸を含むベクターに関する。

【０３５２】

このようなベクターは、被験体への投与の際に上記ポリペプチドの発現を引き起こすか又は誘導するための、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどのような調節エレメントを含み得る。動物細胞のための発現ベクターにおいて使用されるプロモーター及びエンハンサーの例としては、SV40の初期プロモーター及びエンハンサー(Mizukami T. et al. 1987)、モロニーマウス白血病ウイルスのLTRプロモーター及びエンハンサー(Kuwana Y et al. 1987)、免疫グロブリンH鎖のプロモーター(Mason JO et al. 1985)及びエンハンサー(Gillies SD et al. 1983)などが挙げられる。

【０３５３】

ヒト抗体C領域をコードする遺伝子が挿入され発現され得る限り、動物細胞のためのいずれの発現ベクターも使用することができる。適切なベクターの例としては、pAGE107(Miyaji H et al. 1990)、pAGE103(Mizukami T et al. 1987)、pHSG274(Brady G et al. 1984)、pKCR(O'Hare K et al. 1981)、pSG1ベータd2-4-(Miyaji H et al. 1990)などが挙げられる。プラスミドの他の例としては、複製起点を含む複製プラスミド、又は例えばpUC、pcDNA、pBRなどのような組み込みプラスミドが挙げられる。

【０３５４】

ウイルスベクターの他の例としては、アデノウイルス、レトロウイルス、ヘルペスウイルス及びAAVベクターが挙げられる。このような組み換えウイルスは、当該分野で公知の技術により、例えばパッケージング細胞をトランスフェクトすることにより、又はヘルパープラスミド若しくはウイルスでの一過性トランスフェクションにより製造され得る。ウイルスパッケージング細胞の典型例としては、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞等が挙げられる。このような複製欠損組み換えウイルスを製造するための詳細なプロトコルは、例えばWO 95/14785、WO 96/22378、US 5,882,877、US 6,013,516、US 4,861,719、US 5,278,056及びWO 94/19478に見出され得る。

【０３５５】

本発明のさらなる目的は、本発明に従う核酸及び／又はベクターによりトランスフェクト、感染又は形質転換された細胞に関する。

【０３５６】

用語「形質転換」は、宿主細胞が導入された遺伝子又は配列を発現して、導入された遺伝子又は配列によりコードされる所望の物質、典型的にはタンパク質又は酵素を産生するように、「外来」(すなわち、外因性の)遺伝子、DNA又はRNA配列を宿主細胞への導入することを意味する。導入されたDNA又はRNAを受容し発現する宿主細胞は、「形質転換されている」。

【０３５７】

本発明の核酸は、本発明の組み換え抗体を適切な発現系において製造するために使用され得る。用語「発現系」は、例えば、ベクターにより運搬され、そして宿主細胞に導入される外来DNAによりコードされるタンパク質の発現のために適切な条件下にある宿主細胞及び適合するベクターを意味する。

【０３５８】

一般的な発現系としては、E.coli宿主細胞及びプラスミドベクター、昆虫宿主細胞及びバキュロウイルスベクター、並びに哺乳動物宿主細胞及びベクターが挙げられる。宿主細胞の他の例としては、限定することなく、原核生物細胞(例えば細菌)及び真核生物細胞(例えば、酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など)が挙げられる。具体例とし

ては、E.coli、クリベロマイセス属（Kluyveromyces）又はサッカロミセス属（Saccharomyces）酵母、哺乳動物細胞株(例えば、Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など)、さらには初代又は樹立哺乳動物細胞培養物(例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞などから製造されたもの)が挙げられる。例としては、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子(本明細書以後では「DHFR遺伝子」と呼ぶ)が欠損しているCHO細胞(Urlaub G et al；1980)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL1662、本明細書以後では「YB2/0細胞」と呼ぶ)なども挙げられる。この細胞において発現された場合にキメラ又はヒト化抗体のADCC活性が増強されるので、YB2/0細胞が好ましい。

【０３５９】

特に、ヒト化抗体又は抗体様結合タンパク質の発現のためには、発現ベクターは、抗体重鎖をコードする遺伝子及び抗体軽鎖をコードする遺伝子が別々のベクターに存在する種類のもの、又は両方の遺伝子が同じベクターに存在する種類（タンデム型）のもののいずれであってもよい。ヒト化抗体及び抗体様結合タンパク質発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、並びに動物細胞における抗体H及びL鎖の発現レベル間のバランスの点では、タンデム型のヒト化抗体発現ベクターが好ましい(Shitara K et al. J Immunol Methods. 1994 Jan. 3;167(1-2):271-8)。タンデム型ヒト化抗体発現ベクターの例としては、pKANTEX93(WO97/10354)、pEE18等が挙げられる。

【０３６０】

本発明はまた、本発明に従う抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質を発現する組み換え宿主細胞を製造する方法に関し、上記方法は：(i)インビトロ又はエクスビボで、上記の組み換え核酸又はベクターを形質転換受容性宿主細胞に導入する工程、(ii)得られた組み換え宿主細胞をインビトロ又はエクスビボで培養する工程、及び(iii)、場合により、上記抗体を発現及び／又は分泌する細胞を選択する工程からなる工程を含む。

【０３６１】

このような組み換え宿主細胞は、本発明の抗CD3抗体、少なくとも１つの抗CD123抗体又は少なくとも１つの抗体様結合タンパク質の製造のために使用することができる。

【０３６２】

本発明の抗体 抗体様結合タンパク質を製造する方法

本発明の一実施態様は、２つの抗原結合部位を形成する２つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質を製造する方法を提供し、ここで第一のポリペプチドは、式[I]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

により表される構造を有し、

そして第二のポリペプチドは、式[II]：

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1} \qquad [II]$$

により表される構造を有し、

式中：

V_{D1}は第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D2}は第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D3}は該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

V_{D4}は該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；

C_Lは免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；

C_{H1}は免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；

L_1、L_2、L_3、及びL_4はアミノ酸リンカーであり；

そしてここで、第一及び第二のポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして

ここで、V_{D1}及びV_{D2}は両方とも、軽鎖の可変ドメイン、又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインである。

【０３６３】

さらなる実施態様において、本発明は、４つの抗原結合部位を形成する４つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質を製造する方法を提供し、ここで、２つのポリペプチド鎖は、式[I]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L \qquad [I]$$

により表される構造を有し、
そして２つのポリペプチド鎖は、式(III)：

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}F_c \qquad [III]$$

により表される構造を有し、
式中：
V_{D1}は第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D2}は第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D3}は該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D4}は該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
C_Lは免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；
C_{H1}は免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；
F_cは、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；
L_1、L_2、L_3、及びL_4はアミノ酸リンカーであり；
そしてここで、式Iのポリペプチド及び式IIIのポリペプチドは交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして
ここでV_{D1}及びV_{D2}は両方とも、軽鎖の可変ドメイン、又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも軽鎖の可変ドメインである。

【０３６４】

さらなる実施態様において、本発明は、４つの抗原結合部位を形成する４つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質を製造する方法を提供し、ここで２つのポリペプチド鎖は、式[IV]：

$$V_{D1}\text{-}L_1\text{-}V_{D2}\text{-}L_2\text{-}C_L\text{-}L_5\text{-}F_{c2} \qquad [IV]$$

により表される構造を有し、
そして２つのポリペプチド鎖は、式[III]：

$$V_{D3}\text{-}L_3\text{-}V_{D4}\text{-}L_4\text{-}C_{H1}\text{-}F_c \qquad [III]$$

により表される構造を有し、
式中：
V_{D1}は第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D2}は第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D3}は該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
V_{D4}は該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインであり；
C_Lは免疫グロブリンの軽鎖定常ドメインであり；
C_{H1}は免疫グロブリンのC_{H1}重鎖定常ドメインであり；
F_cは、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；
F_{c2}は、免疫グロブリンの免疫グロブリンヒンジ領域及びCH_2、CH_3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；
L_1、L_2、L_3、L_4及びL_5はアミノ酸リンカーであり；
そしてここで、式Iのポリペプチド及び式IIIのポリペプチドは、交差軽鎖－重鎖対を形成し、そして
ここでV_{D1}及びV_{D2}は両方とも、軽鎖の可変ドメイン、又は重鎖の可変ドメインのいずれかであり、そしてV_{D1}及びV_{D2}が軽鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}は両方とも重鎖の可変ドメインであり、又はV_{D1}及びV_{D2}が重鎖の可変ドメインである場合、V_{D3}及びV_{D4}

は両方とも軽鎖の可変ドメインである。

【０３６５】

本発明の一実施態様において、第一の免疫グロブリン又は第二の免疫グロブリンは、上の<<抗CD3抗体>>の項において定義された１つの抗CD3抗体である。

【０３６６】

本発明の別の実施態様において、第一の免疫グロブリン又は第二の免疫グロブリンは、上の<<抗CD123抗体>>の項において定義される１つの抗CD123抗体である。

【０３６７】

本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び／又は抗体様結合タンパク質は、当該分野で公知のいずれかの技術により、例えば限定することなく、いずれかの科学的、生物学的、遺伝子又は酵素技術を単独で又は組み合わせて、製造され得る。

【０３６８】

所望の配列のアミノ酸配列が分かると、当業者は、ポリペプチドの製造のための標準的な技術により、上記抗体又は免疫グロブリン鎖を容易に製造することができる。例えば、周知の固相法を使用して、特に市販のペプチド合成装置(例えば、Applied Biosystems、Foster City、California製のもの)を使用して、製造者の指示に従ってそれらを合成することができる。あるいは、本発明の抗体、免疫グロブリン鎖及び抗体様結合タンパク質は、当該分野で周知である組み換えDNA技術により合成することができる。例えば、これらのフラグメントは、所望の（ポリ）ペプチドをコードするDNA配列の発現ベクターへの組み込み及びこのようなベクターの、所望のポリペプチドを発現する適切な真核生物又は原核生物宿主への導入後に、DNA発現産物として得ることができ、これらから周知の技術を使用して後に単離することができる。

【０３６９】

特に、本発明はさらに、本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び／又は抗体様結合タンパク質を製造する方法に関し、該方法は：(i)本発明に従う形質転換された宿主細胞を培養すること；(ii)該抗体又はポリペプチドを発現させること；及び(iii)発現された抗体又はポリペプチドを回収することからなる工程を含む。

【０３７０】

本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び／又は抗体様結合タンパク質は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティクロマトグラフィーのような従来の免疫グロブリン精製手順により培地から適切に分離される。

【０３７１】

特定の実施態様において、本発明のヒト化キメラ抗CD3抗体及び／又は抗CD123は、以前に記載されたようにヒト化VL及びVHドメインをコードする核酸配列を得て、ヒト抗体CH及びヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞のために発現ベクターにそれらを挿入することによりヒトキメラ抗体発現ベクターを構築し、そして発現ベクターを動物細胞に導入することによりコード配列を発現させることにより製造することができる。それらと同様に、ヒト化抗体様結合タンパク質は、第一のヒト化免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメイン(V_{D1})について、第二のヒト化免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメイン(V_{D2})について、該第二の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメイン(V_{D3})について、そして該第一の免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の可変ドメインについて、２つのヒト化抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインを使用することにより得ることができる。

【０３７２】

ヒトキメラ抗体のCHドメイン又は本発明の抗体様結合タンパク質のCHドメインとして、ヒト免疫グロブリン重鎖に属するいずれの領域でもよいが、IgGクラスのものが適しており、そしてIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4のようなIgGクラスに属するサブクラスのいずれも使用することができる。また、本発明のヒトキメラ抗体のCL又は抗体様結合タンパク質のCLとして、ヒト免疫グロブリン軽鎖に属するいずれの領域も使用され得、そしてカッパクラス又はラムダクラスが使用され得る。

【０３７３】
ヒト化又はキメラ抗体を製造するための方法は、従来の組み換えDNA及び遺伝子トランスフェクション技術を含み、当該分野で周知である（Morrison SL. et al. (1984)及び特許文書US5,202,238；及びUS5,204、244を参照のこと)。
【０３７４】
従来の組み換えDNA及び遺伝子トランスフェクション技術に基づいてヒト化抗体を製造するための方法は、当該分野で周知である(例えば、Riechmann L. et al. 1988；Neuberger MS. et al. 1985を参照のこと)。抗体は、当該分野で公知の様々な技術を使用してヒト化することができ、これらとしては、例えば、出願WO2009/032661に開示される技術、CDR-グラフティング(EP 239,400；PCT公開WO91/09967；米国特許第5,225,539号；同第5,530,101号；及び同第5,585,089号)、ベニヤリング（veneering）又は表面再形成（resurfacing）(EP 592,106；EP 519,596；Padlan EA (1991)；Studnicka GM et al. (1994)；Roguska MA. et al. (1994))、及び鎖シャフリング（chain shuffling）(米国特許第5,565,332号)が挙げられる。このような抗体の製造のための一般的な組み換えDNA技術も知られている(欧州特許出願EP 125023及び国際特許出願WO 96/02576を参照のこと)。
【０３７５】
本発明のFabは、CD3又はCD123と特異的に反応する抗体をパパインのようなプロテアーゼで処理することにより得ることができる。また、Fabは、抗体のFabの両方の鎖をコードするDNA 配列を原核生物発現のため又は真核生物発現のためのベクターに挿入し、そしてベクターを原核細胞又は真核細胞(それぞれに見合った)に導入してFabを発現させることにより製造され得る。
【０３７６】
本発明のF(ab’)2は、CD3又はCD123と特異的に反応する抗体を、プロテアーゼ、ペプシンで処理することにより得ることができる。また、F(ab’)2は、以下に記載されるFab’をチオエーテル結合又はジスルフィド結合を介して結合することにより製造することができる。
【０３７７】
本発明のFab’は、CD3又はCD123と特異的に反応するF(ab’)2を、ジチオスレイトールのような還元剤で処理することにより得ることができる。また、Fab’は、抗体のFab’鎖をコードするDNA配列を、原核生物発現のためのベクター、又は真核生物発現のためのベクターに挿入し、そしてベクターを原核生物又は真核生物細胞（それぞれに見合った）に導入してその発現を行うことにより製造することができる。
【０３７８】
本発明のscFvは、以前に記載されたCDR又はVH及びVLドメインを選び、scFvフラグメントをコードするDNAを構築し、そのDNAを原核生物又は真核生物発現ベクターに挿入し、次いで発現ベクターを原核生物又は真核生物細胞（それぞれに見合った）に導入してscFvを発現させることにより製造することができる。ヒト化scFvフラグメントを生成するために、CDRグラフティングと呼ばれる周知の技術が使用され得、これは本発明に従う相補性決定領域(CDR)を選択肢、そしてそれらを公知の3次元構造のヒトscFvフラグメントフレームワーク上にグラフティングすることを含む(例えば、W098/45322；WO 87/02671；US5,859,205；US5,585,089；US4,816,567；EP0173494を参照のこと)。
【０３７９】
本発明の抗体の改変
本明細書に記載される抗体又は抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列改変が検討される。例えば、抗体又は抗体様結合タンパク質の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましいかもしれない。例えば、ヒト化抗体が非ヒト動物由来の抗体のVH及びVLにおいてヒト抗体のVH及びVLのFRにおいてCDRのみを単にグラフティングすることにより製造される場合、抗原結合活性は、非ヒト動物由来の元の抗体の活性と比較して減少され得るということが知られている。非ヒト抗体のVH及びVLのいくつかのアミノ酸残基は、CDRだけでなくFRにおいても、抗原結合活性と直接的又は間接的に関連し得ると考えら

れる。それ故、これらのアミノ酸残基の、ヒト抗体のVH及びVLのFR由来の異なるアミノ酸残基での置換は、結合活性を減少させるだろう。問題を解決するために、非ヒトCDRをグラフティングされたヒト抗体において、ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸配列間で、抗体の結合に直接的に関連するアミノ酸残基、又はCDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、又は抗体の3次元構造を維持するアミノ酸残基及び抗原への結合と直接的に関連するアミノ酸残基を同定するための試みがなされなければならない。減少した抗原結合活性は、同定されたアミノ酸を非ヒト動物に由来する元抗体のアミノ酸残基と置き換えることにより増加され得る。本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒト化抗体の可変領域を含み得、従って、本明細書で述べられる考察は本発明の抗体様結合タンパク質に等しく適用される。

【０３８０】

改変及び変更は、本発明の抗体の構造において、及びそれらをコードするDNA配列において行われ得、そしてなお所望の特徴を有する機能的抗体、抗体様結合タンパク質又はポリペプチドを生じる。

【０３８１】

ポリペプチドのアミノ配列において変更を行う際に、アミノ酸の疎水性（hydropathic）インデックスが考慮され得る。タンパク質に相互作用性生物学的機能をもたらす際の疎水性アミノ酸インデックスの重要性は当該分野において一般的に理解される。アミノ酸の相対的疎水性特徴が、結果として得られるタンパク質の2次構造に寄与し、それが今度はタンパク質の他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定するということが受け入れられている。各アミノ酸は、それらの疎水性及び電荷に基いて疎水性インデックスを割り当てられ、これらは以下である：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；及びアルギニン(-4.5)。

【０３８２】

本発明のさらなる目的は、本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質のポリペプチドの機能保存的変異体も包含する。

【０３８３】

例えば、特定のアミノ酸は、活性を多く失うことなくタンパク質構造において他のアミノ酸により置換され得る。タンパク質の相互作用能及び性質はその生物学的機能的活性を規定するので、特定のアミノ酸置換をタンパク質配列において、そして当然のことながらその配列をコードするDNAにおいて、行うことができ、それにもかかわらず同様のタンパク質を得ることができる。従って、それらの生物学的活性を多く失うことのない様々な変更が、本発明の抗体配列、又はそのポリペプチドをコードする対応するDNA配列において行われ得るということが検討される。

【０３８４】

特定のアミノ酸は同様の疎水性インデックス又はスコアを有する他のアミノ酸により置換され得、そしてなお同様の生物学的活性を有するタンパク質を生じ、すなわち、生物学的機能が等価なタンパク質がなお得られるということは当該分野で公知である。アラニンスキャニングアプローチのような十分に確立された技術を使用して、本発明の抗体又はポリペプチドにおいて、抗原に対する結合を有意に失うことなく置換することができる全てのアミノ酸を同定することも可能である。このような残基は、抗原結合又は抗体の構造の維持に関与しないので、中性とみなすことができる。これらの中性位置の1つ又はそれ以上は、本発明の抗体又はポリペプチドの主要な特徴を変更することなく、アラニンにより、又は別のアミノ酸により置換され得る。

【０３８５】

従って、上で概説されるように、アミノ酸置換は、一般的にはアミノ酸側鎖置換基の相

対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。前述の様々な特徴を考慮する例となる置換は、当業者に周知であり、これらとしては：アルギニン及びリジン；グルタミン酸及びアスパラギン酸；セリン及びスレオニン；グルタミン及びアスパラギン；並びにバリン、ロイシン及びイソロイシンが挙げられる。

【０３８６】

本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質を、エフェクター機能に関して、例えば抗体の抗原依存性細胞媒介細胞傷害(ADCC)及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)を増強又は減少するように改変することも望ましいかもしれない。これは、抗体のFc領域において1つ又はそれ以上のアミノ酸置換を導入することにより達成され得る（本明細書では、本発明の抗体様結合タンパク質の文脈においてFc変異体とも呼ばれる）。あるいは、又はさらに、システイン残基はFc領域に導入され得、それによりこの領域における鎖間ジスルフィド結合形成が可能となる。従って、生成されるホモ二量体抗体は、改善若しくは減少された内部移行能及び／又は増加した補体媒介細胞殺傷及び／若しくは抗体依存性細胞傷害(ADCC)を有し得る(Caron PC. et al. 1992；及びShopes B. 1992)。

【０３８７】

本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質の別の種類のアミノ酸改変は、抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質の元のグリコシル化パターンを変更するために、すなわち、抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質において見られる1つ若しくはそれ以上の炭水化物部分を削除することにより、及び／又は抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質に存在しない1つ若しくはそれ以上のグリコシル化部位を加えることにより、有用であるかもしれない。トリペプチド配列 アスパラギン-X-セリン、及びアスパラギン-X-スレオニン［ここで、Xはプロリンを除くいずれかのアミノ酸である］のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を生じる。抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質へのグリコシル化部位の付加又は削除は、上記のトリペプチド配列の1つ又はそれ以上を含むように(N連結グリコシル化部位のため)アミノ酸配列を変更することにより都合よく達成される。

【０３８８】

別の種類の改変は、抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質調製物の分解産物又は不均一性を生じる可能性があると、コンピュータで又は実験的のいずれかで同定された配列の除去を含む。例として、アスパラギン及びグルタミン残基の脱アミドは、pH及び表面露出のような因子に依存して起こり得る。アスパラギン残基は、主に配列Asn-Glyに存在する場合に、及びより少ない程度ではAsn-Alaのような他のジペプチド配列に存在する場合に、脱アミドを特に受けやすい。このような脱アミド部位、特にAsn-Glyが本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質又はポリペプチドに存在する場合、従って、部位を除去すること、典型的には、保存敵置換により原因があるとされる残基のうちの１つを除去することが望ましいかもしれない。原因があるとされる残基の1つ又はそれ以上を除去するための配列におけるこのような置換もまた、本発明に包含されることを意図される。

【０３８９】

別の種類の共有結合改変は、抗CD3抗体、抗CD123抗体及び抗体様結合タンパク質にグリコシドを化学的又は酵素的にカップリングすることを含む。これらの手順は、N-又はO-連結グリコシル化のためのグリコシル化能を有する宿主細胞における抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質の産生を必要としないという点において有利である。使用されるカップリング様式に依存して、糖は、(a)アルギニン及びヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)システインのもののような遊離スルフヒドリル基、(d)セリン、スレオニン、若しくはヒドロキシプロリンのような遊離ヒドロキシル基、(e)フェニルアラニン、チロシン若しくはトリプトファンのような芳香族残基、又は(f)グルタミンのアミド基に結合され得る。例えば、このような方法はWO87/05330に記載される。

【０３９０】

抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質に存在するいずれかの炭水化物部分

の除去は、化学的又は酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシルは、抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質の、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、又は等価な化合物への曝露を必要とする。この処理は、連結糖(N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン)を除く大部分又は全ての糖の切断を生じるが、抗体はインタクトなままである、化学的脱グリコシルは、Sojahr H.ら(1987)により、及びEdge、AS.ら(1981)により記載されている。抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura、NR.ら(1987)により記載されるように様々なエンドー及びエキソーグリコシダーゼの使用により達成され得る。

【０３９１】

抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質の別の種類の共有結合修飾は、様々な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレン類のうちの１つに、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号又は同第4,179,337号に示されるやり方で抗体を連結することを含む。

【０３９２】

医薬組成物

本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体及び／又は抗体様結合タンパク質は、薬学的に許容しうる賦形剤、及び場合により生分解性ポリマーのような徐放性マトリックスと組み合わされて、治療用組成物を形成し得る。

【０３９３】

従って、本発明の別の目的は、本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質及び薬学的に許容しうる担体を含む医薬組成物に関する。

【０３９４】

本発明はまた、薬剤としての使用のための、本発明に従う抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質に関する。本発明はまた、薬剤としての使用のための本発明の医薬組成物に関する。

【０３９５】

本明細書で使用される用語「医薬組成物」又は「治療用組成物」は、患者に適切に投与された場合に、望ましい治療効果を誘導することができる化合物又は組成物を指す。

【０３９６】

このような治療用又は医薬組成物は、投与様式との適合性で選択された薬学的に又は生理学的に許容しうる製剤化剤と混合して、治療有考慮うの抗CD3抗体、抗CD123抗体若しくは抗体様結合タンパク質、又はそれらの薬物結合体を含み得る。

【０３９７】

「薬学的」又は「薬学的に許容しうる」は、適宜、哺乳動物、特にヒトに投与された場合に、有害な、アレルギー性の、又は他の望ましくない反応を生じない分子実体及び組成物を指す。薬学的に許容しうる担体又は賦形剤は、非毒性の固体、半固体又は液体のフィラー、希釈剤、カプセル封入剤又はいずれかの種類の製剤化補助剤を指す。

【０３９８】

本明細書で使用される、「薬学的に許容しうる担体」は、生理的に適合性であるありとあらゆる溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌薬及び抗真菌薬などを含む。適切な担体、希釈剤及び／又は賦形剤の例としては、水、アミノ酸、食塩水、リン酸緩衝化食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1つ又はそれ以上、さらにはそれらの組み合わせが挙げられる。多くの場合、糖、多価アルコール、又は塩化ナトリウムのような等張剤を組成物又は製剤中に含めることが好ましく、トリプタミンのような抗酸化剤及びTween 20のような可溶化剤を含有しても良い。

【０３９９】

医薬組成物の形態、投与経路、投薬量及びレジメンは、当然ながら、処置しようとする状態、疾患の重篤度、患者の年齢、体重、及び性別などに依存する。

【０４００】

本発明の医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋内、皮下又は眼内投与などのために製剤化され得る。

【０４０１】

特に、医薬組成物はビヒクルを含有し、これは注射することができる製剤に薬学的に許容しうるものである。これは特に等張性滅菌食塩水(リン酸一ナトリウム若しくは二ナトリウム、塩化ナトリウム、カリウム、カルシウム若しくはマグネシウムなど又はこのような塩の混合物)、又は場合により、滅菌水若しくは生理食塩水の添加により注射可能液剤の構成が可能となる乾燥、特に凍結乾燥組成物である。

【０４０２】

投与に使用される用量は、様々なパラメーターに応じて、特に使用される投与様式、関連する病理、またあるいは所望の処置期間に応じて適応され得る。

【０４０３】

医薬組成物を製造するために、有効量の本発明の抗体又は免疫複合体は、薬学的に許容しうる担体又は水性媒体に溶解又は分散され得る。

【０４０４】

注射用途に適した医薬形態としては、滅菌水性液剤又は分散剤；ゴマ油、落花生油又は水性プロピレングリコールを含む製剤；及び滅菌注射可能液剤又は分散剤の即時調製のための滅菌散剤が挙げられる。全ての場合において、形態は無菌でなければならず、かつ容易な注射可能性（syringability）が存在する程度まで流動性でなければならない。製造及び貯蔵条件下で安定でなければならず、かつ細菌及び真菌のような微成分の汚染作用に対して保護されていなければならない。

【０４０５】

遊離塩基又は薬理学的に許容しうる塩としての活性化合物の液剤は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合された水中で調製され得る。分散剤もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、及びそれらの混合物中で、並びに油中で調製され得る。貯蔵及び使用の通常条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するための保存料を含有する。

【０４０６】

本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合は、中性又は塩形態で組成物に製剤化され得る。薬学的に許容しうる塩は、酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基と形成される)を含み、そしてこれは、例えば、塩酸若しくはリン酸のような無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などのような有機酸と形成される。遊離カルボキシル基と形成される塩はまた、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は鉄のような無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、グリシン、ヒスチジン、プロカインなどのような有機塩基から誘導され得る。

【０４０７】

担体はまた、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、それらの適切な混合物、及び植物油を含有する溶媒又は分散媒体であってもよい。適切な流動性は、例えば、レシチンのような適切なコーティングの使用により、分散の場合には必要な粒径の維持により、そして界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の活動の防止は、様々な抗菌薬及び抗真菌薬、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサールなどによりもたらされ得る。多くの場合、等張剤、例えば糖又は塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能組成物の長期吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの組成物での使用によりもたらされ得る。

【０４０８】

滅菌注射可能液剤は、必要に応じて、上に列挙された様々な他の成分を含む適切な溶媒中に必要な量で活性化合物を組み入れ、続いて滅菌ろ過することにより調製される。一般的に、分散剤は、様々な滅菌活性成分を、基本的な分散媒体及び上に挙げたものからの必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み入れることにより製造される。滅菌注射可

能液剤の製造のための滅菌粉末の場合、好ましい製造方法は、真空乾燥及び凍結乾燥であり、これらにより、活性成分と、以前に滅菌ろ過されたその溶液からのいずれかのさらなる望ましい成分との粉末が得られる。

【０４０９】

直接注射のためのより多く、又は高度に濃縮された溶液の製造もまた検討され、ここで溶媒としてのDMSOの使用は、非常に急速な浸透、小腫瘍領域への高濃度の活性薬剤の送達をもたらすと想像される。

【０４１０】

製剤化されると、液剤は、投薬製剤と適合性のやり方で、そして治療上有効であるような量で投与される。製剤は、上記の注射可能液剤の種類のような様々な投薬形態で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなども使用され得る。

【０４１１】

水性液剤での非経口投与のために、例えば、液剤は必要な場合は適切に緩衝化され、そして液体希釈剤は最初に十分な食塩水又はグルコースを用いて等張にされる。これらの特定の水性液剤は、静脈内、筋内、皮下及び腹腔内投与に特に適している。これに関連して、使用され得る水性媒体は、本開示を考慮して当業者に理解される。例えば、1回の投薬量は、等張性NaCl溶液1mlに溶解し、そして皮下点滴液1000mlに加えるか又は注入の提案された部位に注射され得る(例えば、「Remington’s Pharmaceutical Sciences」第15版、1035-1038及び1570-1580頁を参照のこと)。投薬量のいくらかの変動は、処置される被験体の状態に依存して必然的に起こる。投与に責任がある人物は、いずれの事象においても、個々の被験体に適切な用量を決定する。

【０４１２】

一実施態様において、本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質は、用量あたり約0.01～100ミリグラムほどを含むように治療混合物内で製剤化される。

【０４１３】

静脈内又は筋内注射のような非経口投与用に製剤化された抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質に加えて、他の薬学的に許容しうる形態としては、例えば、錠剤又は経口投与用の他の固形物；持続放出カプセル剤；及び現在使用されるいずれかの他の形態が挙げられる。

【０４１４】

特定の実施態様において、リポソーム及び／又はナノ粒子の使用は、抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質のようなポリペプチドの宿主細胞への導入について検討される。リポソーム及び／又はナノ粒子の形成及び使用は当業者に公知である。

【０４１５】

ナノカプセルは、一般的には安定した再現性のある方法で化合物を捕捉することができる。細胞内ポリマー過負荷に起因する副作用を避けるために、このような超微細粒子(約0.1μmのサイズ)が一般的にインビボで分解されるポリマーを使用して設計される。これらの要件を満たす生分解性ポリアルキル-シアノアクリレートナノ粒子は、本発明における使用について検討され、そしてこのような粒子は容易に製造され得る。

【０４１６】

リポソームは、水性媒体中に分散されて自発的に多重膜同心二層小胞（多重膜小胞(MLV)とも呼ばれる)を形成するリン脂質から形成される。MLVは、一般的には25nm～4μmの直径を有する。MLVの超音波処理は、コアに水溶液を含有する200～500Aの範囲の直径を有する小さな単層小胞（SUV）の形成を生じる。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度及び二価カチオンの存在に依存する。

【０４１７】

医薬組成物が製剤化されると、それは液剤、懸濁剤、ゲル、乳剤、固形物として滅菌バイアル中に、又は脱水若しくは凍結乾燥粉末として貯蔵され得る。このような製剤は、すぐに使える（ready-to-use）形態又は投与前に再構成を必要とする形態(例えば、凍結乾燥される)のいずれかで貯蔵され得る。

【０４１８】
治療方法及び使用
本発明者らは、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」、「hz4B4x3E3」及び「hz20G6x7G3-TL4」のような本発明のいくつかの二重特異性化合物について、CD123陽性腫瘍細胞株モデルでのT細胞媒介細胞傷害を示した。さらに、本発明者らは、本発明のいくつかの二重特異性化合物について、標的細胞の存在下でT細胞を活性化して腫瘍細胞の細胞傷害性をもたらす能力を実証した。本発明者らは、標的細胞が存在しない場合にT細胞活性化のないT細胞の低い活性化をさらに実証した。
【０４１９】
治療用抗CD123モノクローナル抗体は、抗体により特異的に認識される抗原を保有する細胞の枯渇をもたらし得るということは周知である。この枯渇は、少なくとも３つの機構：抗体媒介細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)及び抗体により標的とされた抗原を介して与えられるシグナルを通じた腫瘍の直接抗腫瘍阻害により媒介され得る。一実施態様において、本発明の抗CD123抗体は、抗体媒介細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)によりCD123を発現する細胞において細胞傷害を誘導する。
【０４２０】
「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的な補体経路の活性化は、それらの同族抗原に結合された抗体への補体系の第一の成分の結合により開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoroら(1997)に記載されるようなCDCアッセイが行われ得る。
【０４２１】
「抗体依存性細胞媒介細胞傷害」又は「ADCC」は、特定の細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)に存在するFc受容体(FcR)上に結合された分泌された抗体が、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原保有標的細胞に特異的に結合して、その後その標的細胞を殺傷することを可能にする、細胞傷害の形態を指す。米国特許第5,500,362号又は同第5,821,337号に記載されるような、目的の分子のADCC活性を評価するために、インビトロADCCアッセイが行われ得る。
【０４２２】
「抗CD3抗体」の項で上に記載されるように、本発明の抗CD3抗体は、低いT細胞活性化を有し、従ってこれらは免疫抑制剤としての使用について被験体における治療可能性を有する。
【０４２３】
さらに、上に定義される抗体様結合タンパク質は、T細胞を腫瘍細胞に標的化させることにより患者の腫瘍に対する免疫応答を増強する目的を有する。一実施態様において、上で定義された抗体様結合タンパク質は、T細胞表面のT細胞受容体(TCR)のCD3εサブユニットを標的とし、そして他のアームは、CD123を発現する癌細胞を標的とし、ここで二重特異性構築物によるT細胞及び腫瘍細胞の同時結合（co-engagement）は、細胞溶解性シナプスの形成をもたらし、これがT細胞活性化を誘導し、そして腫瘍細胞殺傷をもたらす。腫瘍細胞殺傷は、少なくとも２つの機構を通じて媒介され得る：パーフォリン/グランザイム死滅及びFasL/Fas死滅、例えばパーフォリン/グランザイム死滅。
【０４２４】
従って、一実施態様において、本発明は、疾患又は障害を処置又は予防する方法を提供し、治療有効量の、抗CD3抗体、抗CD123抗体、抗体様結合タンパク質又は「医薬組成物」の項において上で定義される本発明の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与することを含む。
【０４２５】
本発明はさらに、本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体、抗体様結合タンパク質又は医薬組成物の、被験体における疾患又は障害を処置又は予防するための薬剤の製造のための使用に言及する。一実施態様において、本発明は、抗CD3抗体、抗CD123抗体、抗体様結合タンパク質又は医薬組成物の、被験体における疾患又は障害の処置又は予防のための使用に言

及する。

【０４２６】

用語「被験体」又は「個体」は交換可能に使用され、そして例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物であり得る。例えば、被験体はコウモリ；フェレット；ウサギ；猫科動物(ネコ)；イヌ科動物(イヌ)；霊長類(サル)、ウマ科動物(ウマ)；ヒト、男性、女性及び小児を含む。一実施態様において、「被験体」はヒトを指す。

【０４２７】

本発明の文脈において、用語「処置すること」又は「処置」は、（所定の疾患を有する被験体に対する）治療上の使用を指し、そしてこのような障害又は状態の１つ又はそれ以上の症状の逆転、軽減、進行の阻害を意味する。従って、処置は、疾患の完全な治癒をもたらす処置だけでなく、疾患の進行を遅らせ、かつ／又は被験体の生存を延長する処置も指す。

【０４２８】

「予防すること」は、予防的使用（すなわち、所定の疾患を発症しやすい被験体に対する）を意味する。

【０４２９】

一実施態様において、「疾患」又は「障害」は、本発明の抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質での処置から利益を得るいずれかの状態である。一実施態様において、これは、患者を問題の障害にかかりやすくする病理的状態を含めて慢性及び急性の障害又は疾患を含む。用語「処置を必要とする」は、既に障害を有する被験体に加えて、障害が予防されるべき被験体を指す。

【０４３０】

一実施態様において、「疾患」又は「障害」は、本発明の抗CD3抗体での処置から利益を得るであろういずれかの状態である。従って、一実施態様において、これは、病理的免疫応答を特徴とする疾患又は障害を含む。

【０４３１】

本発明の文脈における「病理的免疫応答」は、炎症性免疫応答である。

【０４３２】

一実施態様において、病理的免疫応答を特徴とする疾患は、自己免疫疾患、移植関連疾患、又は炎症関連疾患である。

【０４３３】

自己免疫疾患は、例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎及び１型糖尿病又は移植片対宿主病(GVHD）のような移植関連疾患である。

【０４３４】

従って、一実施態様において、被験体は、病理的免疫応答を特徴とする疾患又は障害に罹患していると診断されている。

【０４３５】

一実施態様において、被験体は、自己免疫疾患に罹患していると診断されている。

【０４３６】

別の実施態様において、障害は癌を指す。

【０４３７】

さらなる実施態様において、癌は、血液癌、特にCD123発現に関連する血液癌に関する。

【０４３８】

一実施態様において、癌細胞によるCD123の発現は、例えば以下の「診断上の使用」の項において記載されるように、本発明に従う抗CD123抗体を使用することにより容易にアッセイされる。

【０４３９】

「CD123発現と関連する血液癌」としては、白血病(例えば、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病及び骨髄形

成異常症候群)及びリンパ腫(例えば、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、及び小細胞及び大細胞型濾胞性リンパ腫)を含む、悪性リンパ増殖性状態、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)、全身性肥満細胞症が挙げられる。

【０４４０】

「抗CD123抗体」の項において上で記載されるように、LSCはCD123を発現する。

【０４４１】

従って、関連する実施態様において、癌は白血病幹細胞に関連する血液癌を指す。

【０４４２】

本発明に従って処置しようとする白血病幹細胞(LSC)に関連する血液癌状態としては、白血病(例えば、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病及び骨髄形成異常症候群)及びリンパ腫(例えば、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、並びに小細胞及び大細胞型濾胞性リンパ腫)を含む、悪性リンパ増殖性状態が挙げられる。

【０４４３】

本発明の一局面において、血液癌は急性骨髄性白血病(AML)である。

【０４４４】

一実施態様において、被験体はAMLに罹患していると診断されている。

【０４４５】

さらなる実施態様において、被験体は、完全な寛解まで化学療法で処置されたが、再発した。

【０４４６】

「再発」は、完全な寛解後にAMLが再び起こることとして定義される。

【０４４７】

「完全な寛解」又は「CR」は、以下のように定義される：好中球(>1.0*10^9/L)、ヘモグロビンレベル 10g/dL及び血小板数(>100*10^9/L)についての正常値並びに赤血球輸血からの独立；芽球5%未満、芽球のクラスターも収集もなし、及び骨髄検査でアウエル小体が存在しないこと；並びに血液細胞の正常な成熟(形態；骨髄像（myelogramme）)及び髄外白血病の無いこと。

【０４４８】

一実施態様において、本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質は、単独で、又はいずれかの適切な増殖阻害剤と組み合わせて使用される。

【０４４９】

本発明のポリペプチドの「治療有効量」は、いずれの医療処置にも適用可能な妥当なベネフィット／リスク比で上記癌疾患を処置するために十分な量を意味する。しかし、当然のことながら、本発明のポリペプチド及び組成物の合計日使用は、正常な医学的判断の範囲内で主治医により決定される。いずれか特定の患者についての具体的な治療有効用量は、処置される障害及び障害の重篤度；使用される特定のポリペプチドの活性；使用される特定の組成物、患者の年齢、体重、全体的な健康、性別及び食事；投与の時間、投与経路、及び使用される特定のポリペプチドの排出速度；処置期間；使用される特定のポリペプチドと組み合わせて又は同時に使用される薬物；並びに医学分野で周知の同様の因子を含む様々な因子に依存する。例えば、所望の治療効果を達成するために必要なレベルより低いレベルで化合物の投薬を開始し、そして所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増加させることは当該分野の技術範囲内で周知である。

【０４５０】

一実施態様において、本発明の抗CD3抗体、抗CD123抗体若しくは抗体様結合タンパク質又は本発明に従う免疫複合体での処置の有効性は、例えばインビボで癌のマウスモデルにおいて、及び例えば処置群と対照群との間で腫瘍量の変化を測定することにより容易にアッセイされる。

【０４５１】

診断上の使用

CD123は、様々な血液腫瘍の表面上で過剰発現されると報告されている。

【０４５２】

従って、CD123は癌マーカーを構成し、従って、抗癌治療の有効性又は疾患の再発の検出を示すために使用される可能性を有する。

【０４５３】

一実施態様において、本発明の抗CD123抗体は、CD123を発現する腫瘍を標的とした治療の状況において、治療剤に対する患者の感受性を決定するため、抗癌治療の有効性をモニタリングするため、又は処置後の疾患の再発を検出するために、アッセイの構成要素として使用される。特に、本発明の同じ抗CD123抗体は、治療剤の構成要素として、及び診断アッセイの構成要素としての両方で使用される。

【０４５４】

従って、本発明のさらなる目的は、インビボで被験体におけるCD123発現を検出するための使用のため、又はエクスビボで被験体の生物学的サンプル中のCD123発現を検出するための使用のための、本発明に従う抗CD123抗体に関する。一実施態様において、上記検出は、特に:

a) 被験体における癌の存在を診断するため、又は

b) CD123を標的とする治療剤、特に本発明に従う抗CD123抗体若しくは抗体様結合タンパク質に対する、癌を有する患者の感受性を決定するため、又は

c) 腫瘍細胞上の表面タンパク質CD123の発現を検出することにより；特に、本発明に従う抗CD123抗体若しくは抗体様結合タンパク質を用いた治療について、抗CD123癌治療の有効性をモニタリングするため、若しくは抗CD123癌治療後の癌の再発を検出するために

意図される。

【０４５５】

一実施態様において、抗体は、インビトロ又はエクスビボの使用を意図される。例えば、CD123は、本発明の抗CD123抗体を使用して、被験体から得られた生物学的サンプルにおいてインビトロ又はエクスビボで検出される。本発明に従う使用はまた、インビボでの使用であり得る。例えば、本発明に従う抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質は、被験体に投与され、そして抗体-細胞複合体が検出及び／又は定量化され、それにより、上記複合体の検出は癌を示す。

【０４５６】

本発明はさらに、被験体における癌の存在を検出するインビトロ又はエクスビボの方法に関し、該方法は:

（ａ） c被験体の生物学的サンプルを、本発明に従う抗CD123抗体と、特に抗体が該生物学的サンプルと複合体を形成するために十分な条件下で接触させること;

（ｂ） 該生物学的サンプルに結合した抗体のレベルを測定すること、

（ｃ） 結合した抗体の測定されたレベルを対照と比較すること

からなる工程を含み、対照と比較して結合した抗体の増加したレベルは、癌を示す。

【０４５７】

本発明はまた、CD123を標的とする治療剤、特に本発明に従う抗CD123抗体又は 抗体様結合タンパク質に対する、癌を有する患者の感受性を決定するインビトロ又はエクスビボの方法に関し、該方法は:

（ａ） 癌を有する患者の生物学的サンプルを、本発明に従う抗CD123抗体と、特に抗体が該生物学的サンプルと複合体を形成するために十分な条件で接触させること;

（ｂ） 該生物学的サンプルに結合した抗体のレベルを測定すること、

（ｃ） 該生物学的サンプルに結合した抗体の測定されたレベルを、対照に結合した抗体のレベルと比較すること;

からなる工程を含み、

ここで、対照と比較して該生物学的サンプルに結合した抗体の増加したレベルは、少なくともCD123を標的とする治療剤に感受性である患者を示す。

【０４５８】

上の方法において、上記対照は、同じ種類の正常な非癌性生物学的サンプル、又は同じ種類の正常生物学的サンプルにおける抗体結合レベルの代表で決定された参照値であり得る。

【０４５９】

一実施態様において、本発明の抗CD123抗体は、白血病(例えば、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病及び骨髄形成異常症候群)及びリンパ腫(例えば、多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、並びに小細胞及び大細胞型濾胞性リンパ腫)を含む、悪性リンパ増殖性状態、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)、全身性肥満細胞症を含むCD123発現に関連する血液癌を診断するために有用である。

【０４６０】

本発明はさらに、抗CD123癌治療の有効性をモニタリングするインビトロ又はエクスビボの方法に関し、該方法は:

（ａ） 抗CD123癌治療を受けている被験体の生物学的サンプルを、本発明に従う抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質と、特に抗体が該生物学的サンプルと複合体を形成するために十分な条件で接触させること;

（ｂ） 該生物学的サンプルに結合した抗体のレベルを測定すること、

（ｃ） 結合した抗体の測定されたレベルを、対照に結合した抗体のレベルと比較すること;

からなる工程を含み、

ここで、対照と比較して該生物学的サンプルに結合した抗体の減少したレベルは、該抗CD123癌治療の有効性を示す。

【０４６１】

上記方法において、対照と比較して上記生物学的サンプルに結合した抗体の増加したレベルは、上記抗CD123癌治療の無効性を示す。

【０４６２】

上記対照は、特に、分析に提出された生物学的サンプルと同じ種類の生物学的サンプルであるが、抗CD123癌治療の過程において、期間内に以前に被験体から得られたものである。

【０４６３】

本発明はさらに、抗CD123癌治療後の癌の再発を検出するインビトロ又はエクスビボの方法に関し、該方法は:

（ａ） 抗CD123癌治療を完了した被験体の生物学的サンプルを、本発明に従う抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質と、特に抗体が該生物学的サンプルと複合体を形成するために十分な条件で接触させること;

（ｂ） 該生物学的サンプルに結合した抗体のレベルを測定すること、

（ｃ） 結合した抗体の測定されたレベルを、対照に結合した抗体のレベルと比較すること;

からなる工程を含み、

ここで、対照と比較して、該生物学的サンプルに結合した抗体の増加したレベルは、抗CD123癌治療後の癌再発を示す。

【０４６４】

上記対照は、特に分析に提出された生物学的サンプルと同じ種類の生物学的サンプルであるが、これは、抗CD123癌治療の完了の際に又は完了後に、以前に期間内に被験体から得られたものである。

【０４６５】

上記抗CD123癌治療は、特に、本発明に従う抗CD123抗体又は抗体様結合タンパク質又は免疫複合体を使用した治療である。上記抗CD123癌治療は、CD123を発現する癌、特に、白血病(例えば、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病及び骨髄形成異常症候群)及びリンパ腫(例えば、多発性骨

髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、並びに小細胞及び大細胞型濾胞性リンパ腫)を含む、悪性リンパ増殖性状態、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDCN)、全身性肥満細胞症を含む、CD123発現と関連する血液癌を標的とする。

【０４６６】

一実施態様において、本発明の抗CD123は、蛍光性分子、放射性分子又はシグナルを（直接的又は間接的のいずれかで）生じることが知られているいずれかの他の標識のような検出可能な分子又は物質で標識される。

【０４６７】

本発明に従う抗CD123抗体に関して、本明細書で使用される用語「標識された」は、放射性薬剤又はフルオロフォア(例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)又はフィコエリトリン(PE)又はインドシアニン(Cy5))のような検出可能な物質をポリペプチドにカップリングすること(すなわち、物理的連結)による抗CD123抗体の直接標識に加えて、検出可能な物質との反応性によるポリペプチドの間接的標識を包含することを意図される。

【０４６８】

さらなる実施態様において、本発明の抗CD123抗体は、当該分野で公知のいずれかの方法により放射性分子で標識される。例えば、放射性分子としては、限定されないが、I^{123}、I^{124}、In^{111}、Re^{186}、Re^{188}、Tc^{99}のようなシンチグラフィー研究のための放射性原子が挙げられる。一例において、本発明のポリペプチドはまた、ヨウ素-123、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、マンガン又は鉄のような核磁気共鳴画像法(NMR)（磁気共鳴画像法、MRIとしても知られる）のためのスピン標識で標識される。

【０４６９】

「生物学的サンプル」は、被験体から得られる様々なサンプル種を包含し、そして診断又はモニタリングアッセイにおいて使用され得る。生物学的サンプルとしては、限定されないが、血液及び生物起源の液体サンプル、生検標本又は組織培養物又はそれら由来の細胞及びその後代のような固形組織サンプルが挙げられる。従って、生物学的サンプルは、臨床サンプル、培養物中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生体液、及び組織サンプル、特に腫瘍サンプルを包含する。

【０４７０】

本発明はまた、被験体における癌の存在を検出するインビボでの方法に関し、該方法は:

ａ） 検出可能に標識された本発明に従う抗体を患者に投与すること；

ｂ） 患者における該検出可能に標識された抗体の局在化を画像化法により検出すること

からなる工程を含む。

【０４７１】

一実施態様において、本発明の抗体は、癌の進行度診断(例えば、放射性イメージングにおいて)に有用である。これらは、例えば単独で又は他の癌マーカーと組み合わせて使用される。

【０４７２】

本明細書で使用される用語「検出」又は「検出された」は、対照を参照して又は参照しない定性的及び／又は定量的検出（レベルを測定する）を含む。

【０４７３】

本発明の文脈において、本明細書で使用される用語「診断すること」は、患者に影響を与える病理を同定することを意図された、医学的状態の性質の多数の収集されたデータからの決定を意味する。

【０４７４】

上記方法において、癌は、上で定義されたCD123を発現する癌である。

【０４７５】

キット

最後に、本発明はまた、本発明の少なくとも１つの抗CD3抗体、少なくとも１つの抗CD123抗体又は少なくとも１つの抗体様結合タンパク質を含むキットを提供する。本発明の抗CD123又は抗CD3抗体を含むキットは、表面タンパク質CD123若しくはCD3の検出において、又は治療的若しくは診断的アッセイにおいて用途を見出す。本発明のキットは、固体支持体、例えば、組織培養プレート又はビーズ(例えば、セファロースビーズ)にカップリングされた、ポリペプチド又は抗CD3抗体、少なくとも１つの抗CD123抗体又は少なくとも１つの抗体様結合タンパク質を含有し得る。例えばELISA又はウェスタンブロットでの表面タンパク質CD123又はCD3のインビトロでの検出及び定量のための抗体を含むキットが提供され得る。一実施態様において、該抗体は、検出に有用であり、そして蛍光又は放射標識のような標識を備える。

【０４７６】

一実施態様において、本発明は、単回用量投与単位を製造するためのキットを包含する。これらのキットはそれぞれ、乾燥したタンパク質を有する第一の容器及び水性製剤を有する第二の容器を含み得る。単一及び複数のチャンバーの充填済みシリンジ（例えば、液体シリンジ及びリオシリンジ（lyosyringes））を含むキットもまた本発明の範囲内に含まれる。

【０４７７】

本出願を通して、用語「含むこと（comprising）」は、全ての具体的に述べられた特徴と同様に、任意の、追加的な、特定されていないものも包含すると解釈されるべきである。本明細書で使用される、用語「含むこと」の使用はまた、具体的に述べられる特徴以外の特徴が存在しない（すなわち、「からなる」）実施態様も開示する。さらに、不定冠詞「a」又は「an」は、複数存在することを排除しない。特定の手段が互いに異なる従属請求項に記載されるという単なる事実は、これらの手段の組み合わせを都合よく使用することができないということを示すものではない。

【０４７８】

本発明は、ここで以下の図面及び実施例を参照してより詳細に記載される。本明細書において引用される全ての文献及び特許書類は、参照により本明細書に加入される。本発明は前述の説明において詳細に説明及び記載されたが、実施例は、説明的又は例示的とみなされるべきであり、限定的ではない。

【０４７９】

配列の簡単な説明

配列番号1は、Uniprotデータベースから受入番号P07766で入手可能な、シグナルペプチドを含む、全長ヒトCD3εタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【０４８０】

配列番号2は、全長カニクイザルCD3εタンパク質のアミノ酸配列、シグナルペプチドを含む、Uniprotデータベースから受入番号で入手可能な、 Q95LI5を示す。

【０４８１】

配列番号3は、全長野生型ヒトCD3εタンパク質のアミノ酸23～126を含む成熟ヒトCD3εHisタグ化Fc融合物のアミノ酸配列を示す。

【０４８２】

配列番号4は、野生型配列のアミノ酸位置57と比較してアミノ酸位置35における１つのAlaからValへの交換を含有する全長野生型カニクイザルのCD3εタンパク質(配列番号2)のアミノ酸23～117を含む成熟カニクイザルCD3εFc融合物のアミノ酸配列を示す。

【０４８３】

配列番号5は、いわゆる「20G6-F3」抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０４８４】

配列番号6、7及び8は、いわゆる「20G6-F3」抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０４８５】

配列番号9は、いわゆる「20G6-F3」抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０４８６】

配列番号10は、いわゆる「20G6-F3」、「11D7-C3」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9、「10F4-C10」、「18G9-H11」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「8C2-F7」、「20E5-F10」及び「3H6-D2」抗体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。

【０４８７】

配列番号11は、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「11H3-E5」 、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「10F4-C10」、「4E7-C9」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「20E5-F10」及び「3H6-D2」抗体のCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０４８８】

配列番号12は、いわゆる「4B4-D7」抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０４８９】

配列番号13は、いわゆる「4B4-D7」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「10F4-C10」、「18G9-H11」、「4E7-C9」、「11F3-B9」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20B5-F10」及び「3H6-D2」抗体のCDR1-Hのアミノ酸配列を示す。

【０４９０】

配列番号14及び15は、いわゆる「4B4-D7」抗体のCDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０４９１】

配列番号16は、いわゆる「4B4-D7」抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０４９２】

配列番号17は、いわゆる「4B4-D7」、「11H3-E5」及び「11F3-B9」抗体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。

【０４９３】

配列番号18は、いわゆる「4E7-C9」抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０４９４】

配列番号19は、いわゆる「4E7-C9」、「18F5-H10」、「20E5-F10」及び「3H6-D2」抗体のCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。

【０４９５】

配列番号20は、いわゆる「4E7-C9」抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０４９６】

配列番号21は、いわゆる「4E7-C9」抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０４９７】

配列番号22は、いわゆる「4E7-C9」抗体のCDR1-Hのアミノ酸配列を示す。

【０４９８】

配列番号23は、いわゆる「18F5-H10」抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０４９９】

配列番号24は、いわゆる「18F5-H10」抗体のCDR1-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５００】

配列番号25は、いわゆる「18F5-H10」抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５０１】

配列番号26は、いわゆる「18F5-H10」抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５０２】

配列番号27は、いわゆる「18F5-H10」抗CD3抗体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５０３】

配列番号28は、いわゆる「18F5-H10」、「11D7-C3」、「1E6-C9」及び「10E6-G6」抗CD3抗体のCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５０４】

配列番号29は、いわゆる「12D2-E5」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５０５】
配列番号30及び31は、いわゆる「12D2-E5」抗CD3抗体のCDR1-H及びCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５０６】
配列番号32は、いわゆる「12D2-E5」及び「3G5-E10」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５０７】
配列番号33は、いわゆる「12D2-E5」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５０８】
配列番号34及び35は、いわゆる「12D2-E5」抗CD3抗体のCDR1-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５０９】
配列番号36は、いわゆる「11D7-C3」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５１０】
配列番号37は、いわゆる「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「16F8-A7」、「11F9-F8」及び「20B5-F10」抗CD3抗体のCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５１１】
配列番号38は、いわゆる「11D7-C3」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５１２】
配列番号39は、いわゆる「11D7-C3」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５１３】
配列番号40は、いわゆる「11H3-E5」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５１４】
配列番号41は、いわゆる「11H3-E5」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５１５】
配列番号42は、いわゆる「11H3-E5」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５１６】
配列番号43は、いわゆる「13H2-C2」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５１７】
配列番号44は、いわゆる「13H2-C2」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５１８】
配列番号45は、いわゆる「13H2-C2」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５１９】
配列番号46は、いわゆる「13C1-F6」及び「11F9-F8」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５２０】
配列番号47は、いわゆる「13C1-F6」、「10E6-G6」及び「11F9-F8」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５２１】
配列番号48は、いわゆる「13H2-C2」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５２２】

配列番号49は、いわゆる「18H11-F10」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５２３】

配列番号50、51及び52は、いわゆる「18H11-F10」抗CD3抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５２４】

配列番号53は、いわゆる「18H11-F10」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５２５】

配列番号54及び55は、いわゆる「18H11-F10」抗CD3抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５２６】

配列番号56は、いわゆる「1E6-C9」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５２７】

配列番号57及び58は、いわゆる「1E6-C9」抗CD3抗体のCDR1-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５２８】

配列番号59は、いわゆる「1E6-C9」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５２９】

配列番号60は、いわゆる「10F4-C10」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５３０】

配列番号61は、いわゆる「10F4-C10」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５３１】

配列番号62は、いわゆる「10F4-C10」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５３２】

配列番号63は、いわゆる「10E6-G6」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５３３】

配列番号64及び65は、いわゆる「10E6-G6」抗CD3抗体のCDR1-H及びCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５３４】

配列番号66は、いわゆる「10E6-G6」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５３５】

配列番号67は、いわゆる「10E6-G6」抗CD3抗体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５３６】

配列番号68は、いわゆる「18G9-H11」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５３７】

配列番号69は、いわゆる「18G9-H11」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５３８】

配列番号70は、いわゆる「18G9-H11」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５３９】

配列番号71は、いわゆる「18G9-H11」抗CD3抗体のCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５４０】

配列番号72は、いわゆる「11F3-B9」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５４１】

配列番号73は、いわゆる「11F3-B9」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５４２】

配列番号74は、いわゆる「12G3-E8」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５４３】

配列番号75、76及び77は、いわゆる「12G3-E8」抗CD3抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５４４】

配列番号78は、いわゆる「12G3-E8」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５４５】

配列番号79は、いわゆる「5B1-G2」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５４６】

配列番号80及び81は、いわゆる「5B1-G2」抗CD3抗体のCDR1-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５４７】

配列番号82は、いわゆる「5B1-G2」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５４８】

配列番号83は、いわゆる「16F8-A7」抗CD3抗体の重鎖の可変ドメインの一部のアミノ酸配列を示す。

【０５４９】

配列番号84は、いわゆる「16F8-A7」及び「11F3-B9」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５５０】

配列番号85は、いわゆる「16F8-A7」抗CD3抗体軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５５１】

配列番号86は、Uniprotデータベースから受入番号P04234で入手可能な、シグナルペプチドを含む、全長ヒトCD3δタンパク質のアミノ酸配列を示す。

【０５５２】

配列番号87は、いわゆる「11F9-F8」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５５３】

配列番号88は、いわゆる「11F9-F8」抗CD3抗体のCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５５４】

配列番号89は、いわゆる「3G5-E10」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５５５】

配列番号90及び91は、いわゆる「3G5-E10」抗CD3抗体のCDR1-H及びCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５５６】

配列番号92は、いわゆる「3G5-E10」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５５７】

配列番号93及び94は、いわゆる「3G5-E10」抗CD3抗体のCDR1-L及びCDR3-Lの配列を示す。

【０５５８】

配列番号95は、いわゆる「9D7-F3」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５５９】

配列番号96、97及び98は、いわゆる「9D7-F3」抗CD3抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５６０】

配列番号99は、いわゆる「9D7-F3」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５６１】

配列番号100及び101は、いわゆる「9D7-F3」及び「6C9-C9」抗CD3抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５６２】

配列番号102は、いわゆる「8C2-F7」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５６３】

配列番号103、104及び105は、いわゆる「8C2-F7」抗CD3抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５６４】

配列番号106は、いわゆる「8C2-F7」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５６５】

配列番号107は、いわゆる「20E5-F10」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５６６】

配列番号108は、いわゆる「20E5-F10」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５６７】

配列番号109は、いわゆる「20E5-F10」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５６８】

配列番号110は、いわゆる「20B5-F10」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５６９】

配列番号111は、いわゆる「20B5-F10」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５７０】

配列番号112は、いわゆる「20B5-F10」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５７１】

配列番号113及び114は、いわゆる「20B5-F10」抗CD3抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０５７２】

配列番号115は、いわゆる「6C9-C9」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０５７３】

配列番号116、117及び118は、いわゆる「6C9-C9」抗CD3抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０５７４】

配列番号119は、いわゆる「6C9-C9」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示

す。
【０５７５】
配列番号120は、いわゆる「6C9-C9」抗CD3抗体のCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０５７６】
配列番号121は、いわゆる「3E8-G1」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５７７】
配列番号122、123及び124は、いわゆる「3E8-G1」抗CD3抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５７８】
配列番号125は、いわゆる「3E8-G1」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５７９】
配列番号126及び127は、いわゆる「3E8-G1」抗CD3抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０５８０】
配列番号128は、いわゆる「3H6-D2」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５８１】
配列番号129は、いわゆる「3H6-D2」抗CD3抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０５８２】
配列番号130は、いわゆる「3H6-D2」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５８３】
配列番号131は、いわゆる「8H2」抗CD3抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５８４】
配列番号132は、いわゆる「8H2」抗CD3抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０５８５】
配列番号133及び134は、いわゆる「8H2」抗CD3抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０５８６】
配列番号135は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1aを示す。
【０５８７】
配列番号136は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1bを示す。
【０５８８】
配列番号137は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1cを示す。
【０５８９】
配列番号138は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1dを示す。
【０５９０】
配列番号139は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1aを示す。
【０５９１】
配列番号140は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1bを示す。
【０５９２】
配列番号141は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1cを示す。
【０５９３】
配列番号142は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL1c変異体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。
【０５９４】

配列番号143は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1dを示す。
【０５９５】
配列番号144は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH2aを示す。
【０５９６】
配列番号145は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH2bを示す。
【０５９７】
配列番号146は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH2cを示す。
【０５９８】
配列番号147は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH2dを示す。
【０５９９】
配列番号148は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2aを示す。
【０６００】
配列番号149は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2bを示す。
【０６０１】
配列番号150は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2cを示す。
【０６０２】
配列番号151は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2dを示す。
【０６０３】
配列番号152は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH3aを示す。
【０６０４】
配列番号153は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH3bを示す。
【０６０５】
配列番号154は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL3aを示す。
【０６０６】
配列番号155は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL3bを示す。
【０６０７】
配列番号156は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL3cを示す。
【０６０８】
配列番号157は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL3dを示す。
【０６０９】
配列番号158は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Aを示す。
【０６１０】
配列番号159は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Bを示す。
【０６１１】
配列番号160は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Aを示す。
【０６１２】
配列番号161は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Bを示す。
【０６１３】
配列番号162は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Cmodif1を示す。
【０６１４】
配列番号163は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Cmodif2を示す。
【０６１５】
配列番号164は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Cmodif3を示す。
【０６１６】
配列番号165は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Amodif1を示す。
【０６１７】
配列番号166は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Amodif2を示す。
【０６１８】
配列番号167は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Amodif3を示す。
【０６１９】

配列番号168は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Cを示す。
【０６２０】
配列番号169は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Dを示す。
【０６２１】
配列番号170は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Fを示す。
【０６２２】
配列番号171は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Aを示す。
【０６２３】
配列番号172は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Bを示す。
【０６２４】
配列番号173は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH2Aを示す。
【０６２５】
配列番号174は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH2Bを示す。
【０６２６】
配列番号175は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH6Bmodif1を示す。
【０６２７】
配列番号176は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH6Bmodif2を示す。
【０６２８】
配列番号177は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH6Amodif1を示す。
【０６２９】
配列番号178は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH6Amodif2を示す。
【０６３０】
配列番号179は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH6Amodif3を示す。
【０６３１】
配列番号180は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH6Cを示す。
【０６３２】
配列番号181は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH6Dを示す。
【０６３３】
配列番号182は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL変異体アミノ酸配列 D7-VK3mutを示す。
【０６３４】
配列番号183は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVH変異体アミノ酸配列 D7-VH1mutを示す。
【０６３５】
配列番号184は、ヒト化「4B4」抗CD3抗体のVL1B、VL2B、VL1Cmodif3及びVL2F変異体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６３６】
配列番号185は、Uniprotデータベースから受入番号P09693で入手可能な、シグナルペプチドを含む全長ヒトCD3γタンパク質のアミノ酸配列を示す。
【０６３７】
配列番号186は、いわゆる「20G6-F3」抗CD3抗体のFabの重鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６３８】
配列番号187は、いわゆる「20G6-F3」抗CD3抗体のFabの軽鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６３９】
配列番号188は、いわゆる「4E7-C9」抗CD3抗体のFabの重鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６４０】
配列番号189は、いわゆる「4E7-C9」抗CD3抗体のFabの軽鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６４１】
配列番号190は、いわゆる「4B4-D7」抗CD3抗体のFabの重鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６４２】
配列番号191は、いわゆる「4B4-D7」抗CD3抗体のFabの軽鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６４３】

配列番号192は、いわゆる「18F5-H10」抗CD3抗体のFabの重鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６４４】
配列番号193は、いわゆる「18F5-H10」抗CD3抗体のFabの軽鎖のアミノ酸配列を示す。
【０６４５】
配列番号194は、NCBIデータベースからNP_002174.1及びUniprotデータベースからP26951で利用可能な、シグナルペプチドを含む、全長ヒトCD123タンパク質のアミノ酸配列を示す。
【０６４６】
配列番号195は、GenBankデータベースからEHH61867.1で及びUniprotデータベースからG8F3K3で利用可能な、シグナルペプチドを含む、全長カニクイザルCD123タンパク質のアミノ酸配列を示す。
【０６４７】
配列番号196は、全長ヒトCD123タンパク質(配列番号194)のアミノ酸22～305を含む成熟ヒトCD123 Strep-IIタグ化Fc融合物のアミノ酸配列を示す。
【０６４８】
配列番号197は、全長カニクイザルCD123タンパク質(配列番号195)のアミノ酸22～305を含む成熟カニクイザルCD123 Strep-IIタグ化Fc融合物のアミノ酸配列を示す。
【０６４９】
配列番号198は、いわゆる「1E1-G5」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６５０】
配列番号199は、いわゆる「1E1-G5」及び「8B11-B7」抗CD123抗体のCDR1-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６５１】
配列番号200は、いわゆる「1E1-G5」及び「6D6-B8」抗CD123抗体のCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６５２】
配列番号201は、いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」及び「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６５３】
配列番号202は、いわゆる「1E1-G5」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６５４】
配列番号203及び204は、いわゆる「1E1-G5」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６５５】
配列番号205は、いわゆる「2B8-F3」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６５６】
配列番号206、207及び208は、いわゆる「2B8-F3」抗CD123抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６５７】
配列番号209は、いわゆる「2B8-F3」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６５８】
配列番号210及び211は、いわゆる「2B8-F3」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６５９】
配列番号212は、いわゆる「2F8-D6」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０６６０】
配列番号213、214及び215は、いわゆる「2F8-D6」抗CD123抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６６１】
配列番号216は、いわゆる「2F8-D6」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６６２】
配列番号217及び218は、いわゆる「2F8-D6」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６６３】
配列番号219は、いわゆる「3B10-E6」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６６４】
配列番号220、221及び222は、いわゆる「3B10-E6」抗CD123抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６６５】
配列番号223は、いわゆる「3B10-E6」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６６６】
配列番号224及び225は、いわゆる「3B10-E6」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６６７】
配列番号226は、いわゆる「3E3-D3」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６６８】
配列番号227、228及び229は、いわゆる「3E3-D3」抗CD123抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６６９】
配列番号230は、いわゆる「3E3-D3」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６７０】
配列番号231及び232は、いわゆる「3E3-D3」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６７１】
配列番号233は、いわゆる「5A5-B4」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６７２】
配列番号234、235及び236は、いわゆる「5A5-B4」抗CD123抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６７３】
配列番号237は、いわゆる「5A5-B4」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６７４】
配列番号238及び239は、いわゆる「5A5-B4」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６７５】
配列番号240は、いわゆる「6B10-E4」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６７６】
配列番号241、242及び243は、いわゆる「6B10-E4」抗CD123抗体のCDR1-H、CDR2-H及びC

DR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６７７】
配列番号244は、いわゆる「6B10-E4」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６７８】
配列番号245及び246は、いわゆる「6B10-E4」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６７９】
配列番号247は、いわゆる「6C10-C4」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６８０】
配列番号248、249及び250は、いわゆる「6C10-C4」抗CD123抗体のCDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６８１】
配列番号251は、いわゆる「6C10-C4」及び「9B8-G6」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６８２】
配列番号252は、いわゆる「6C10-C4」及び「9B8-G6」抗CD123抗体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６８３】
配列番号253は、いわゆる「6C10-C4」、「9B8-G6」及び「9D7-G3」抗CD123抗体のCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６８４】
配列番号254は、いわゆる「6D6-B8」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６８５】
配列番号255は、いわゆる「6D6-B8」抗CD123抗体のCDR1-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６８６】
配列番号256は、いわゆる「6D6-B8」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６８７】
配列番号257及び258は、いわゆる「6D6-B8」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６８８】
配列番号259は、いわゆる「8B11-B7」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６８９】
配列番号260は、いわゆる「8B11-B7」抗CD123抗体のCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６９０】
配列番号261は、いわゆる「8B11-B7」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６９１】
配列番号262及び263は、いわゆる「8B11-B7」抗CD123抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６９２】
配列番号264は、いわゆる「9B8-G6」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６９３】
配列番号265及び266は、いわゆる「9B8-G6」及び「9D7-C8」抗CD123抗体のCDR1-H及びCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。

【０６９４】
配列番号267は、いわゆる「9B8-G6」抗CD123抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６９５】
配列番号268は、いわゆる「9D7-C8」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６９６】
配列番号269は、いわゆる「9D7-C8」抗CD123抗体のCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。
【０６９７】
配列番号270は、いわゆる「9D7-C8」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０６９８】
配列番号271は、いわゆる「9D7-C8」抗CD123抗体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。
【０６９９】
配列番号272は、いわゆる「9F6-G3」抗CD123抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０７００】
配列番号273及び274は、いわゆる「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR1-H及びCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。
【０７０１】
配列番号275は、いわゆる「9F6-G3」抗CD123抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０７０２】
配列番号276は、いわゆる「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。
【０７０３】
配列番号277は、「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH_G45Aを示す。
【０７０４】
配列番号278は、「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VHmDGを示す。
【０７０５】
配列番号279は、変異体VHmDG of 「3E3」抗CD123抗体のCDR2-H及びヒト化「3E3」抗CD123抗体の変異体VH1Fm2DGのCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。
【０７０６】
配列番号280は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Aを示す。
【０７０７】
配列番号281は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Bを示す。
【０７０８】
配列番号282は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Cを示す。
【０７０９】
配列番号283は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Dを示す。
【０７１０】
配列番号284は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Eを示す。
【０７１１】
配列番号285は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Fを示す。
【０７１２】
配列番号286は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Gを示す。
【０７１３】
配列番号287は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Fm1を示す。
【０７１４】
配列番号288は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Fm2を示す。
【０７１５】
配列番号289は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Fm2DGを示す。

【０７１６】
配列番号290は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Dm1を示す。
【０７１７】
配列番号291は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH1Em1を示す。
【０７１８】
配列番号292は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Aを示す。
【０７１９】
配列番号293は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Bを示す。
【０７２０】
配列番号294は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Cを示す。
【０７２１】
配列番号295は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Dを示す。
【０７２２】
配列番号296は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Eを示す。
【０７２３】
配列番号297は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Fを示す。
【０７２４】
配列番号298は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Gを示す。
【０７２５】
配列番号299は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Fm1を示す。
【０７２６】
配列番号300は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL1Fm2を示す。
【０７２７】
配列番号301は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH2Aを示す。
【０７２８】
配列番号302は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVH変異体アミノ酸配列 VH3Aを示す。
【０７２９】
配列番号303は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Aを示す。
【０７３０】
配列番号304は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Am1を示す。
【０７３１】
配列番号305は、ヒト化「3E3」抗CD123抗体のVL変異体アミノ酸配列 VL2Am2を示す。
【０７３２】
配列番号306は、いわゆるCODV-Fab 「7G3x20G6」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。
【０７３３】
配列番号307は、いわゆるCODV-Fab「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」、「hz4B4x3E3」及びCODV-Fab「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質のリンカーL1のアミノ酸配列を示す。
【０７３４】
配列番号308は、いわゆるCODV-Fab 「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」及びCODV- Fab「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質のV_{D1}又はV_{D2}ドメインを表す7G3の可変軽鎖ドメインのアミノ酸配列を示す。
【０７３５】
配列番号309は、いわゆるCODV-Fab 「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」、「hz4B4x3E3」及びCODV-Fab「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質のリンカーL2のアミノ酸配列を示す。
【０７３６】
配列番号310は、いわゆるCODV-Fab「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」及び「hz4B4x3E3」抗体様結合タンパク質のアミ

ノ酸配列 CLを示す。

【０７３７】

配列番号311は、いわゆるCODV-Fab「7G3x20G6」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７３８】

配列番号312は、本明細書において、いわゆるCODV-Fab 「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」及びCODV-Fab「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質のV_{H1}又はV_{H2}ドメインを表す7G3の可変重鎖ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０７３９】

配列番号313は、いわゆるCODV-Fab 「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」、「hz4B4x3E3」抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列 C_{H1}を示す。

【０７４０】

配列番号314は、いわゆるCODV-Fab「7G3 x 4E7」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４１】

配列番号315は、いわゆるCODV-Fab「7G3x4E7」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドの式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４２】

配列番号316は、いわゆるCODV-Fab「7G3x4B4」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４３】

配列番号317は、いわゆるCODV-Fab「7G3x4B4」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４４】

配列番号318は、いわゆるCODV-Fab「7G3x18F5」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４５】

配列番号319は、いわゆるCODV-Fab「7G3x18F5」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４６】

配列番号320は、いわゆるCODV-Fab「hz20G6x7G3」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４７】

配列番号321は、いわゆるCODV-Fab「hz20G6x7G3」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４８】

配列番号322は、いわゆるCODV-Fab 7G3xhz4B4」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７４９】

配列番号323は、いわゆるCODV-Fab「7G3xhz4B4」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７５０】

配列番号324は、いわゆるCODV-Fab「hz4B4x3E3」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７５１】

配列番号325は、いわゆるCODV-Fab「hz4B4x3E3」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７５２】

配列番号326は、いわゆるCODV-Fab「hz20G6x7G3 TL4」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７５３】

配列番号327は、いわゆるCODV-Fab 「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列 F_{c2}を示す。

【０７５４】

配列番号328は、いわゆるCODV-Fab「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質の式IIIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０７５５】

配列番号329は、いわゆるCODV-Fab「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列 CH1を示す。

【０７５６】

配列番号330は、いわゆるCODV-Fab 「hz20G6x7G3-TL4」抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列 F_cを示す。

【０７５７】

配列番号331は、配列アライメントに基づく、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「3H6-D2」抗CD3抗体のCDR1-Hのコンセンサス配列を示す。

【０７５８】

配列番号332は、配列アライメントに基づく、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「3H6-D2」抗CD3抗体のCDR2-Hについてのコンセンサス配列を示す。

【０７５９】

配列番号333は、配列アライメントに基づく、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「3H6-D2」抗CD3抗体のCDR3-Hについてのコンセンサス配列を示す。

【０７６０】

配列番号334は、配列アライメントに基づく、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「3H6-D2」抗CD3抗体のCDR1-Lについてのコンセンサス配列を示す。

【０７６１】

配列番号335は、配列アライメントに基づく、いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「3H6-D2」抗CD3抗体のCDR3-Lのコンセンサス配列を示す。

【０７６２】

配列番号336は、配列アライメントに基づく、いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR1-Hについてのコンセンサス配列を示す。

【０７６３】

配列番号337は、配列アライメントに基づく、いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR2-Hについてのコンセンサス配列を示す。

【０７６４】
配列番号338は、配列アライメントに基づく、いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR1-Lについてのコンセンサス配列を示す。
【０７６５】
配列番号339は、配列アライメントに基づく、いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR3-Lのコンセンサス配列を示す。
【０７６６】
配列番号340は、配列 for of 配列アライメントに基づく、いわゆる「6C10-C4」、9B8-G6」、「9D7-C8」抗CD123抗体のCDR1-Hについてのコンセンサス配列を示す。
【０７６７】
配列番号341は、配列アライメントに基づく、いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR2-Hについてのコンセンサス配列を示す。
【０７６８】
配列番号342は、配列アライメントに基づく、いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR3-Hについてのコンセンサス配列を示す。
【０７６９】
配列番号343は、配列アライメントに基づく、「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のCDR1-Lについてのコンセンサス配列を示す。
【０７７０】
配列番号344は、リンカー配列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)のアミノ酸配列を示す。
【０７７１】
配列番号345は、リンカー配列(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)のアミノ酸配列を示す。
【０７７２】
配列番号346は、リンカー配列(Thr-Val-Ala-Ala-Pro)のアミノ酸配列を示す。
【０７７３】
配列番号347は、リンカー配列(Gln-Pro-Lys-Ala-Ala)のアミノ酸配列を示す。
【０７７４】
配列番号348は、リンカー配列(Gln-Arg-Ile-Glu-Gly)のアミノ酸配列を示す。
【０７７５】
配列番号349は、リンカー配列(Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser)のアミノ酸配列を示す。
【０７７６】
配列番号350は、リンカー配列(Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser)のアミノ酸配列を示す。
【０７７７】
配列番号351は、リンカー配列(His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys)のアミノ酸配列を示す。
【０７７８】
配列番号352は、ヒンジ配列及び例えば精製に使用されるHisタグに対応する、いわゆるCODV-Fab 「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」、「7G3x18F5」、「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」及び「hz4B4x3E3」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのC末端に加えられるリンカー及びHisタグ配列のアミノ酸配列を示す。
【０７７９】
配列番号353は、いわゆる「3E3」抗CD123抗体の変異体のCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。
【０７８０】
配列番号354は、リンカー配列(Gly-Gly-Gly-Ser)のアミノ酸配列を示す。
【０７８１】
配列番号355は、リンカー配列(Ser-Gly-Gly-Gly-Ser)のアミノ酸配列を示す。
【０７８２】
配列番号356は、リンカー配列(Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)のアミノ酸配列を示す。
【０７８３】

配列番号357は、リンカー配列(Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)のアミノ酸配列を示す。

【０７８４】

配列番号358は、リンカー配列(Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)のアミノ酸配列を示す。

【０７８５】

配列番号359は、リンカー配列(Lys-Thr-His-Thr)のアミノ酸配列を示す。

【０７８６】

配列番号360は、リンカー配列(Lys-Thr-His-Thr-Ser)のアミノ酸配列を示す。

【０７８７】

配列番号361は、リンカー配列(Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser)のアミノ酸配列を示す。

【０７８８】

配列番号362は、リンカー配列(Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro)のアミノ酸配列を示す。

【０７８９】

配列番号363は、リンカー配列(Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro)のアミノ酸配列を示す。

【０７９０】

配列番号364は、リンカー配列(Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro)のアミノ酸配列を示す。

【０７９１】

配列番号365は、リンカー配列(Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser)のアミノ酸配列を示す。

【０７９２】

配列番号366は、リンカー配列(Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser)のアミノ酸配列を示す。

【０７９３】

配列番号367は、リンカー配列(Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro)のアミノ酸配列を示す。

【０７９４】

配列番号368は、リンカー配列(Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro)のアミノ酸配列を示す。

【０７９５】

配列番号369は、リンカー配列(Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly)のアミノ酸配列を示す。

【０７９６】

配列番号370は、リンカー配列(Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly)のアミノ酸配列を示す。

【０７９７】

配列番号371は、リンカー配列(Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly)のアミノ酸配列を示す。

【０７９８】

配列番号372は、リンカー配列(Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly)のアミノ酸配列を示す。

【０７９９】

配列番号373は、リンカー配列(Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly)のアミノ酸配列を示す。

【０８００】

配列番号374は、リンカー配列(Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly)のアミノ酸配列を示す。

【０８０１】

配列番号375、376及び377は、いわゆる「7G3」抗体CDR1-H、CDR2-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０８０２】

配列番号378及び379は、いわゆる「7G3」抗体のCDR1-L及びCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【０８０３】

配列番号380は、いわゆるヒト化「7G3」抗体の重鎖可変ドメインの変異体アミノ酸配列を示す。

【０８０４】

配列番号381及び382は、いわゆるヒト化「7G3」抗体のCDR1-H及びCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【０８０５】

配列番号383は、いわゆるヒト化「7G3」抗体の重鎖可変ドメインのさらなる変異体のアミノ酸配列を示す。

【０８０６】

配列番号384は、いわゆるヒト化「7G3」抗体の１つのCDR2-Hのアミノ酸配列を示す。

【０８０７】

配列番号385は、いわゆるヒト化「7G3」抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

【０８０８】

配列番号386は、WO2015026892に示される配列番号1のアミノ酸配列を示す。

【０８０９】

配列番号387は、WO2015026892に示される配列番号3のアミノ酸配列を示す。

【０８１０】

配列番号388は、いわゆるCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」、CODV-Fab-OL1「hz20G6xhz7G3」及びCODV-Fab-OL1a 「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の式Iに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０８１１】

配列番号389は、リンカー配列(Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly)のアミノ酸配列を示す。

【０８１２】

配列番号390は、いわゆるCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０８１３】

配列番号391は、いわゆるCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の式IVに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０８１４】

配列番号392は、いわゆるCODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質のF_{c2}領域のアミノ酸配列を示す。

【０８１５】

配列番号393は、いわゆるCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の式IIIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０８１６】

配列番号394は、いわゆるCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」のF_c領域のアミノ酸配列を示す。配列番号395は、いわゆるCODV-Fab-OL1「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０８１７】

配列番号396は、いわゆるCODV-Fab-OL1「hz20G6xhz7G3」 抗体様結合タンパク質のF_c領域のアミノ酸配列を示す。

【０８１８】

配列番号397は、いわゆるCODV-Fab-OL1「hz20G6xhz7G3」 抗体様結合タンパク質のFc断端(Fc_3)のアミノ酸配列を示す。

【０８１９】

配列番号398は、いわゆるCODV-Fab-OL1a「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質のFc断端(Fc_3)のアミノ酸配列を示す。

【０８２０】

配列番号399は、いわゆるCODV-Fab-OL1a「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の式IIに従うポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【０８２１】

配列番号400は、いわゆるCODV-Fab-OL1a「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質のFc断端(Fc_3)のアミノ酸配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【０８２２】

【図１－１】いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「3H6-D2」抗CD3抗体のVH領域の配列アライメント。

【図１－２】図１－１の続き。

【図２－１】いわゆる「20G6-F3」、「4B4-D7」、「4E7-C9」、「18F5-H10」、「11D7-C3」、「11H3-E5」、「13H2-C2」、「13C1-F6」、「1E6-C9」、「10F4-C10」、「10E6-G6」、「18G9-H11」、「11F3-B9」、「12G3-E8」、「5B1-G2」、「16F8-A7」、「11F9-F8」、「20E5-F10」、「20B5-F10」、「3H6-D2」抗CD3抗体のVL領域の配列アライメント。

【図２－２】図２－１の続き。

【図３】いわゆる「1E1-G5」、「6D6-B8」、「8B11-B7」、「9F6-G3」抗CD123抗体のVH及びVL領域の配列アライメント。

【図４】いわゆる「6C10-C4」、9B8-G6」、「9D7-C8」抗CD123抗体のVH及びVL領域の配列アライメント。

【図５】完全ヒトCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」IV Q3dは、ヒトT細胞の存在下で、全ての試験された用量で全身においてMolm13腫瘍成長を阻害する。

【図６】完全ヒトCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」IV Q3dは、ヒトT細胞の存在下で、全ての試験された用量で、長骨における腫瘍退縮と関連がある。

【図７】完全ヒトCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」IV Q3dは、ヒトT細胞の存在下で、全ての試験された用量で全身においてMolm13腫瘍成長を阻害する。

【図８】完全ヒトCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」IV Q3dは、ヒトT細胞の存在下で、全ての試験された用量で、長骨における腫瘍退縮と関連がある。

【図９】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」IVは、ヒトT細胞の存在下で、腫瘍成長を阻害した。

【図１０】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」IVは、ヒトT細胞の存在下で、長骨の腫瘍退縮と関連がある。

【図１１】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」IVは、ヒトT細胞の存在下で、腫瘍成長を阻害した。

【図１２】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」IVは、ヒトT細胞の存在下で、長骨の腫瘍退縮と関連がある。

【図１３】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」CIPはヒトT細胞の存在下で、0.13nmol/Kg/日又はそれ以上の投薬量で全身腫瘍成長を阻害した。

【図１４】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」CIPはヒトT細胞の存在下で、0.13 nmol/Kg/日又はそれ以上の投薬量で長骨において腫瘍成長を阻害した。

【図１５】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」CIPはヒトT細胞の存在下で、0.13nmol/Kg/日又はそれ以上の投薬量で全身腫瘍成長を阻害した。

【図１６】完全ヒトCODV-Fab「hz20G6xhz7G3」CIPはヒトT細胞の存在下で、0.13 nmol/Kg

/日又はそれ以上の投薬量で長骨において腫瘍成長を阻害した。
【図１７】CODV-Ig、CODV-Fab-TL及びCODV-Fab-OLの構造の図表表現(LALA変異(IgG1骨格のFcが使用される場合)及びノブ・イントゥ・ホール変異をさらに示す)
【発明を実施するための形態】
【０８２３】
〔実施例〕
実施例1：抗体生成
1.1 hCD3ε/δ-hFc融合発現プラスミド(CD3ed-Fc)の構築
テンプレートとしてcDNA含有プラスミドを使用して、本明細書の以下において詳細に記載されるように、リーディングフレームにおいてヒト免疫グロブリンIgGのヒンジ領域、CH2及びCH3ドメインを含む重鎖定常領域を含み、任意のタンデム精製のための8xHis又はStrep-IIタグをさらに有する、ヒト及びカニクイザルCD3ε及びCDδ融合タンパク質を生成した。
【０８２４】
テンプレートとしてヒトゲノムDNAを使用して、シグナル配列を含む、ヒトCD3ε及びヒトCDδサブユニット細胞外ドメインを増幅した。増幅され切断され、そして精製された得られたPCR産物を、ライゲーションPCRにより合わせ、結合してNheI及びHindIII部位を使用するInFusion法により哺乳動物発現ベクターpXLとした。各サブユニットを１つのプラスミドでクローン化した。得られた成熟ヒトCD3εHisタグ化Fc融合タンパク質は、本明細書において配列番号3で開示される。配列番号3のアミノ酸1～104は、野生型全長ヒトCD3ε(本明細書において配列番号1で開示される、Uniprotデータベースにおいて受入番号P07766で利用可能)タンパク質のアミノ酸23～126、従ってヒトCD3εの細胞外ドメインに対応する。
【０８２５】
カニクイザルゲノムDNAをテンプレートとして使用して、カニクイザルCD3ε及びCD3δ細胞外ドメインをシグナル配列を含めて増幅した。増幅され切断され、そして精製された得られたPCR産物をライゲーションPCRにより合わせ、そしてNheI及びHindIIIを使用するInFusion法により連結して哺乳動物発現ベクターpXLとした。各サブユニットを１つのプラスミドでクローン化した。成熟カニクイザルCD3εFc融合タンパク質について得られた配列は配列番号4で開示される。配列番号3のアミノ酸1～95は、全長カニクイザルCD3εタンパク質のアミノ酸23～117に対応し、従って野生型全長カニクイザルCD3εの細胞外ドメインを含む(本明細書において配列番号2で開示される、Uniprotデータベースにおいて受入番号Q95LI5で利用可能)。クローン化された融合タンパク質は、野生型配列のアミノ酸位置57と比較して、アミノ酸位置35に１つのアラニンからバリンへの交換をさらに含有する。
【０８２６】
1.2 ヒト及びカニクイザル（cyno）CD3ed-Fcの発現及び精製
F17無血清懸濁培養(Life)で増殖しているFreestyle HEK293細胞を、発現プラスミドを用いて一過性トランスフェクトした。CD3ε及びCD3δ細胞外ドメイン(ECD)サブユニットを提示する両方のプラスミドの同時トランスフェクションを、Cellfectinトランスフェクション試薬(Life)を使用して行った。細胞を37℃で7日間培養した。組み換えタンパク質を含有する培養上清を遠心分離により回収し、そしてろ過(0.22μm)により清澄化した。
【０８２７】
精製のために、Fc融合タンパク質変異体をプロテインAマトリックス(GE)上に捕捉し、そしてpHシフトにより溶出した。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によりSuperdex 200(GE)を使用したタンパク質の精錬（polishing）及び最終限外濾過工程の後、タンパク質をさらなるアッセイに使用した。
【０８２８】
ヒトヘテロ二量体を、プロテインAでの捕捉後にHis-Trapカラム(GE)にさらにアプライし、そして脱塩した。溶出されたタンパク質をStrepavidinカラム(GE)にアプライし、そ

してSuperdex200(GE)を使用するSECによる最終精錬前にd-デスチオビオチンで溶出した。このストラテジーをホモ二量体からヘテロ二量体を単離するために使用した。

【０８２９】

1.3 ヒト／カニクイザル交差反応性抗CD3抗体の生成

ヒト及びカニクイザルCD3ε及びCD3δcDNAを、それぞれAldevron所有（proprietary）免疫ベクター(pB8及びVV8)を使用してクローン化し、そしてラットの遺伝子免疫のために使用した。免疫群MR12-266(「CD3-cyno」)のラットを、最初にヒトCD3ε及びCD3δcDNAで免疫し、続いてヒト及びカニクイザルCD3ε及びCD3δcDNAの混合物でさらに２回免疫した。4回の遺伝子適用(IS24d-4)後に、免疫プロトコルの２４日目に免疫血清を採取した。PBS 1% BSAで希釈された血清を、ヒト及びカニクイザルCD3ε及びCD3δ TCR複合体を得るための同時トランスフェクション実験において標的cDNAで一過性トランスフェクトされた哺乳細胞を使用してフローサイトメトリーにより試験した。さらに、免疫血清を以下の細胞株で試験した：Jurkat E6-1(ヒトTCRを発現する)、Jurkat-RT-T3.5(TCR陰性)及びcyno HSC-F(cyno TCRを発現する)；cyno TCRについて陰性の細胞株は入手不可能であった。ヤギ抗rat IgG R-フィコエリトリン結合体(Southern Biotech、#3030-09)を10μg/mlで二次抗体として使用した。

【０８３０】

特にCD3ε及びCD3δcDNAの組み合わせでトランスフェクトされた細胞に対する免疫血清の特異的反応性を、無関係のcDNAでトランスフェクトされた細胞と比較した場合に、免疫された動物において検出することができた。TCR陰性細胞株(RT-T3.5)と比較した場合に、TCR陽性Jurkat細胞株(E6-1)での試験について、同じことが有効であり、かなり低いシグナルであるが、なお有意なシグナルがカニクイザル（cynomologues）HSC-F細胞株で検出された(表1を参照のこと)。

【０８３１】

【表４】

表1：フローサイトメトリーによる各動物におけるTCR複合体に対する免疫血清の特異的反応性の検出。データは相対的蛍光強度(rfu)の幾何平均として表される。

		pXL-CD3e-ヒト+pXL-CD3d-ヒト	pXL-CD3e-cyno+pXL-CD3d-cyno	pB1_無関係	Jurkat-E6-1	Jurkat-RT-T3.5	cyno HSC-F
	一次抗体なし	5	5	4	7	10	6
	OKT3	–	–	–	858	25	–
	FN18	–	–	4	7	10	1256
	マウス抗HA	6	6	–	–	–	–
	ラット抗myc	9	7	1033	10	14	9
ラット #1	1:1000	290	273	5	186	36	55
	1:5000	79	86	5	65	21	20
ラット #2	1:1000	499	401	5	390	55	75
	1:5000	147	110	4	126	28	25
ラット #3	1:1000	239	247	5	108	30	31
	1:5000	89	92	4	32	17	9
ラット #4	1:1000	280	283	5	176	37	73
	1:5000	97	110	4	55	22	23
ラット #5	1:1000	208	137	4	99	31	11
	1:5000	61	65	4	47	19	7

【０８３２】

免疫群MR12-265(「CD3-ヒト」)のラットを、対応する発現ベクターにクローン化されたヒトCD3ε及びCD3δ cDNAを用いて同時免疫した（co-immunized）

免疫血清を、4回の遺伝子適用(IS24d-4)後に免疫プロトコルの24日目に採取した。PBS 1% BSAで希釈された血清を、ヒト及びカニクイザルCD3ε及びCD3δ TCR複合体を得るために同時トランスフェクション実験において上述された標的cDNAを用いて一過性トランスフェクトされた哺乳動物細胞を使用してフローサイトメトリーにより試験紙た。ヤギ抗ラットIgG R-フィコエリトリン結合体(Southern Biotech、#3030-09)を10μg/mlで二次抗体として使用した。さらに、免疫血清を以下の細胞株で試験した：Jurkat E6-1(ヒトTCRを発現

する)、Jurkat-RT-T3.5 (TCR陰性)及びcyno HSC-F(cyno TCRを発現する)；cyno TCRについて陰性の細胞株は利用可能でなかった。ヤギ抗ラットIgG R-フィコエリトリン結合体(Southern Biotech、#3030-09)を10μg/mlで二次抗体として使用した。

【０８３３】

特にCD3ε及びCD3δ cDNAの組み合わせでトランスフェクトされた細胞に対する免疫血清の特異的反応性は、無関係なcDNAでトランスフェクトされた細胞と比較した場合に、免疫された動物において検出することができた。TCR陰性細胞株t(RT-T3.5)と比較した場合に、TCR陽性Jurkat細胞株(E6-1)での試験について同じことが有効であるが、かなりより低いシグナル(しかし陽性ラットにおいてなお有意である)がcyno HSC-F細胞株で検出された(表2を参照のこと)。

【０８３４】

【表５】

表2：フローサイトメトリーによる各動物におけるTCR複合体に対する免疫血清の特異的反応性の検出。データは相対的蛍光強度(rfu)の幾何平均として表される

		pXL-CD3e-ヒト+ pXL-CD3d-ヒト	pXL-CD3e-cyno+pXL-CD3d-cyno	pB1_無関係	Jurkat-E6-1	Jurkat-RT-T3.5	cyno HSC-F
	一次抗体無し	5	5	4	7	10	6
	OKT3	-	-	-	858	25	-
	FN18	-	-	4	7	10	1256
	マウス抗HA	6	6	-	-	-	-
	ラット抗myc	9	7	1033	10	14	9
ラット #1	1:1000	230	132	5	170	33	50
	1:5000	78	40	4	54	19	15
ラット #2	1:1000	216	136	6	216	48	32
	1:5000	75	40	4	66	24	11
ラット #3	1:1000	73	54	5	56	25	7
	1:5000	25	20	4	23	15	6
ラット #4	1:1000	70	56	5	41	25	8
	1:5000	25	18	4	15	15	6
ラット #5	1:1000	65	37	5	42	20	7
	1:5000	24	17	4	17	14	6

【０８３５】

陽性血清を有するラットを屠殺し、そしてB細胞をマウス骨髄細胞を用いて誘導した。得られたハイブリドーマを、フローサイトメトリーによりJurkat E6.1(CD3+)及びJurkat T3.5(CD3-)でヒト又はカニクイザルCD3ε及びCD3δ発現プラスミドを用いてトランスフェクトされたHEK293細胞でスクリーニングした。ハイブリドーマクローンの上清を使用して、25nMで検体を固定することによりヒト及びカニクイザルCD3ε/δ複合体に対する表面プラズモン共鳴一点動力学により評価した(データを表3に示す)。

【０８３６】

【表６】

表3:フローサイトメトリー及びBiacore分析による異なるハイブリドーマクローン上清の特異的反応性の検出。上清を、異なる細胞株(Jurkat E6-1、Jurkat-RT-T3.5及びcyno HSC-F)で試験した。Biacore分析を、それぞれヒト及びカニクイザルからのCD3e/d複合体に対して行った。

サンプル ID	25nM での Biacore ヒト CD3ε/δ [RU]	25nM での Biacore cyno CD3ε/δ [RU]
3G5-E10	27	3
18G9-H11	7	-7
12D2-E5	27	5
6C9-C9	26	32
11F9-F8	11,5	16
8H2-F3	32,5	40
4B4-D7	11	14
4E7-C9	2,5	10
13C1-F6	17	15,5
11D7-C3	17	10
13H2-C3	16	7
10E6-G6	10,5	0
12G3-E8	24	17
11F3-B9	22	17
20E3-B5	11	5
10F4-C10	22	27
11H3-E5	7	9
18F5-H10	n.a.	n.a.
18H11-F10	35	55
20E5-F10	12	8
3H6-D2	9,5	7
8C2-F7	4,5	3
5B1-G2	1	0,5
7B7-F10	28	42
20B5-F10	1	9,5
16D3-E4	-2	-2
1E6-B8	n.a.	n.a.
16F8-A7	17,5	22,5
11A8-D6		
3E8-G1		
20G6-F3		
9D7-B5	n.a.	n.a.
9G5-G10		
17A11-D3		

【０８３７】

陽性クローンを増幅させ、そして可変重鎖及び軽鎖についてのそれぞれのcDNAをRT-PCRにより単離した。VH及びVL配列を、Fabフラグメント、さらには完全IgGを発現するために、ヒトCH1、IGHG1-骨格又はカッパ鎖のいずれかと融合した発現ベクターにクローン化した。

【０８３８】

1.4 IgG及びFabフラグメントの発現

IgG及びFabフラグメントの重鎖及び軽鎖をコードする発現プラスミドを、E. Coli NEB 10-ベータ(DH10B誘導体)で増殖させた。トランスフェクションに使用したプラスミドは、QIAGENプラスミドプラスキット(カタログ番号：12991)を使用してE. Coliから製造した。

【０８３９】

Freestyle培地(Invitrogen)で増殖するHEK293-FS細胞を、製造者により記載されるように293fectin(Invitrogen)トランスフェクション試薬を使用して重鎖及び軽鎖をコードする示されたLC及びHCプラスミドを用いてトランスフェクトした。細胞を37℃でKuhner ISF 1-X振盪インキュベーターで110rpm 8% CO2にて培養した。７日間の培養の後、細胞を遠心分離により除去し、10%体積/体積 1M Tris HCl pH 8,0を加え、そして粒子を除去するために上清を0,2μMボトルトップフィルターを介してろ過した。CODV-IgG1構築物を、プロテインAカラム(HiTrapプロテインA HPカラム、GE Life Sciences)でのアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。0,1M Citrat、pH 3.0でカラムから溶出した後、CODV-IgG1構築物をPBS中で配合されたHiPrep 26/10脱塩カラム(Gibco 14190-136)を使用して脱塩した。

【０８４０】

二重特異性CODV-Fab構築物を、HisTrap高速カラム(GE Healthcare、カタログ番号：17-5248-02)により精製した。カラムからの溶出後に(溶出緩衝液：20mM リン酸ナトリウム、0.5 M NaCl、500 mM イミダゾール、pH7.4)、タンパク質を含有するフラクションをプールし、そしてPBS中で配合されたHiPrep 26/10脱塩カラム(Gibco 14190-136)を使用して脱塩した。

【０８４１】

凝集体から単量体を分離するために、両方の構築物、CODV-IgG及びCODV-Fabフラグメントについて PBS中の高分解能分別工程(Gibco 14190-136)を、HiLoad Superdex 200 26/60 320mlカラム(GE Healthcare カタログ番号：29-9893-36)を使用して行った。単量体のフラクションをプールし、そしてVivaspin 20遠心分離カラム(VS2002 Sartorius Stedim biotech)を使用して1mg/mlまで濃縮し、そして0.22 μmメンブラン(Millex(R)シリンジフィルターSLGV033RS)を使用してろ過した。

タンパク質濃度を、280nmでの吸光度の測定により決定した。各バッチをSDS-PAGEにより還元及び非還元条件下で分析して、各サブユニット及び各単量体の純度及び分子量を決定した。

【０８４２】

1.5 抗CD3抗体の親和性の評価

1.5.1 ヒト及びカニクイザルCD3ε/δの両方に対する親和性の評価

抗CD3結合Fab又はCODV-Fabの結合親和性を、Biacore3000機器(GE Healthcare)を使用して表面プラズモン共鳴(SPR)により測定した。アッセイ緩衝液はHBS-EP (BR-1001-88、GE Healthcare)であった。CD3ε/δ-Fc融合タンパク質の捕捉は、ヒト抗体捕捉キット(GE Healthcare)を使用して達成された。捕捉抗体をCM5チップ(BR-1001-88、GE Healthcare)に約12.000 RUまでアミンカップリングキット(BR-100-50、GE Healthcare)を使用してカップリングした。CD3ε δ-Fc融合タンパク質を、10μl/分で約70 RUまで捕捉して30RUのRmax値を得た。抗CD3Fab又はCODV-Fabとの結合動力学を、それぞれ結合及び解離領域について30μl/分で240秒間及び600秒間測定した。アッセイ緩衝液中Fab 3から400nMの２倍希釈を使用した。全てのFab濃度を、二連の緩衝液ブランクと一緒に二重参照のために二連で実行した。捕捉表面の再生を、3M MgCl2溶液の30μl/分での１分間注入を用いて行った。データ解析のために、BIAevaluationソフトウェアv.4.1(GE Healthcare)を使用した。物質移動を用いる１：１ラングミュアモデルを使用してデータを全体的にフィッティングした。

【０８４３】

抗CD3 IgG及びCODV-Fcタンパク質の結合親和性の測定を、捕捉抗体を除いてFab及びCODV-Fabの結合アッセイと同様に行った。この場合、His捕捉キット(28-9950-56、GE Healthcare)を、ヒトCD3-Fcタンパク質をHisタグを介して捕捉するために使用した。カニクイザ

ルCD3-Fcを用いた結合アッセイのために、Strep-MAB古典的抗体(2-1507-001、IBA)を捕捉抗体として使用した。この場合、再生溶液は10mM グリシン緩衝液pH2.0であった。

【０８４４】

【表７】

表4：Biacoreにより測定された、選択されたCD3抗体のヒト及びカニクイザルCD3ε/δ複合体に対する親和性

CD3 εδ	クローン (Fab フラグメント)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)	Chi2	比 KD(cy)/KD (ヒト)
ヒト	12D2-E5	5,4E+06	6,2E-03	35	1,2E-09	0,34	4
cyno	12D2-E5	steady state	steady state	8	4,8E-09	0,129	
ヒト	10E6-G6	1,4E+05	2,0E-03	37	1,4E-08	0,218	1
cyno	10E6-G6	1,9E+05	2,4E-03	18	1,3E-08	0,218	
ヒト	4E7-C9	8,9E+04	1,6E-03	29	1,7E-08	0,244	1
cyno	4E7-C9	9,8E+04	1,5E-03	20	1,5E-08	0,232	
ヒト	12G3-E8	1,1E+05	1,1E-03	30	9,3E-09	0,307	1
cyno	12G3-E8	1,7E+05	1,8E-03	15	1,0E-08	0,349	
ヒト	5B1-G2	6,0E+04	3,9E-04	36	6,5E-09	0,218	1
cyno	5B1-G2	3,4E+04	1,5E-04	20	4,3E-09	2,1	
ヒト	18F5-H10	2,0E+05	1,8E-04	28	8,9E-10	0,235	1
cyno	18F5-H10	1,4E+05	1,3E-04	15	8,9E-10	0,224	
ヒト	18G9-H11	2,5E+05	1,1E-03	31	4,4E-09	0,975	6
cyno	18G9-H11	5,1E+04	1,2E-03	18	2,4E-08	0,617	
ヒト	4B4-D7	1,1E+05	2,9E-03	22	2,7E-08	0,147	1
cyno	4B4-D7	1,1E+05	2,7E-03	12	2,4E-08	0,188	
ヒト	1E6-B8	9,3E+04	3,9E-03	26	4,1E-08	0,157	1
cyno	1E6-B8	1,0E+05	4,2E-03	15	4,2E-08	0,122	
ヒト	13H2-C3	1,7E+05	4,9E-03	20	2,9E-08	0,317	1
cyno	13H2-C3	1,8E+05	5,9E-03	12	3,2E-08	0,166	
ヒト	20G6-F3	3,5E+04	2,7E-04	21	7,7E-09	0,208	1
cyno	20G6-F3	2,7E+04	2,2E-04	15	8,2E-09	0,184	
ヒト	11F9-F8	7,7E+04	4,0E-04	22	5,2E-09	0,137	1
cyno	11F9-F8	8,3E+04	3,6E-04	13	4,4E-09	0,109	
ヒト	20E5-F10	9,9E+04	4,3E-04	25	4,3E-09	0,125	1
cyno	20E5-F10	1,2E+05	3,4E-04	14	2,9E-09	0,104	
ヒト	SP-34	1,1E+06	3,0E-03	34	2,7E-09	2,3E-01	5
cyno	SP-34	2,2E+05	2,8E-03	34	1,3E-08	4,7E-01	

SP-34をIgGとして使用した

【０８４５】

1.5.2 HEK293F細胞の表面上に発現されたヒトCD3ε、ヒトCD3δ、及びヒトCD3ε/δへの抗CD3抗体のフローサイトメトリーによる結合

細胞の表面上に発現されたヒトCD3ε及びヒトCD3δへの抗体の結合を分析するために、HEK293F細胞を両方の構築物で単独又は同時トランスフェクションのいずれかでトランスフェクトし、そしてシグナルをフローサイトメトリーにより測定した。トランスフェクシ

ョン手順のためにFuGENE HDトランスフェクション試薬(Promega、#E2311)を、製造者のプロトコルに従って使用した。

【０８４６】

HEK293F細胞をFreestyle293培地(Gibco)にチューブあたり6E6細胞でフィルターを備えた50ml Cellstar細胞反応器チューブ(Greiner bio-one)中に播種した。トランスフェクションを、FuGENEプロトコルに従って行った。複合体調製は、OptiMEMでフェノールレッドを用いずに(Gibco)比3:1(3.0:1のFuGENE(R)HD:DNA比を使用する、T-25フラスコ中培地8,000μlで増殖された293F細胞のトランスフェクションについてのプロトコルhttp://www.promega.com/techserv/tools/FugeneHdTool/default.aspx)。

【０８４７】

細胞を振盪器で37℃及び5% CO2でインキュベートした。トランスフェクションの１～３日後に、細胞を回収し、そして抗体の結合をフローサイトメトリーにより分析した。

【０８４８】

染色用の抗体を、96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)においてFBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)をウェルあたり50 μlで播種した。採取したトランスフェクトされた細胞を、FBSを含む染色緩衝液に再懸濁し、そしてウェルあたり50μlで抗体に加えた。細胞を4℃で暗所にて30分間インキュベートし、そして２回洗浄した。0.5μgの二次抗体ヤギF(ab')2抗ヒトIgG-FITC (Beckman Coulter、#732598)又はヤギF(ab')2抗ヒトカッパ-PE(Southern Biotech、#206209)をそれぞれ１ウェルあたり0.5μg 7-AADと組み合わせて、FBSを含む染色緩衝液100μl中に加えた。細胞を4℃で暗所にて15分間インキュベートし、そして２回洗浄した。測定のために、細胞をFBSを含む染色緩衝液200μl中に再懸濁した。細胞をそれぞれMACSQuant (Miltenyi Biotec)又はLSRII(BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析を、FlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。 読み出しは、抗体染色に陽性の7-AAD陰性単一細胞のパーセンテージであった（データを表５に示す)。

【０８４９】

1.5.3 SPRによる抗CD3 Fabのヒト(hu)CD3ε/δ及びヒト(hu)CD3ε/γへの結合

HBS-EP緩衝液を用いて行うBIAcore3000機器を使用するSPRにより結合を試験した。組み換えhuCD3タンパク質(ε/δ (PB01226)、ε/γ (PB01225))を、10μl/分でFc-タグを介してCM5センサーチップ上に固定した抗ヒトFc捕捉抗体 MAB1302 (Millipore)により捕捉した。抗CD3 Fabを、100nMで30μl/分でそれぞれ240秒及び300秒の結合及び解離時間で検体として使用した。各サイクルの後、表面を10mMグリシン緩衝液pH2.5の２分パルスにより再生した。

【０８５０】

huCD3δのみがHEK293F細胞の表面上で発現された場合、シグナルはフローサイトメトリーで検出できなかった。対照的に、ほとんど全ての抗体は、全くhuCD3εだけでトランスフェクトされたか又はhuCD3δと同時トランスフェトされた細胞に結合することができ、huCD3εがエピトープとして必要であることを示唆した。Biacoreアッセイにおいて、huCD3εへの結合は、δ鎖又はγ鎖のどちらが組み換えタンパク質が使用されるかに関係なく示され、huCD3εが抗原として十分であることを示唆した。抗体12D2は、双対鎖（co-chain）が存在する場合にhuCD3εにのみ例外的に結合した。この抗体についてのエピトープを提示するためにタンパク質の立体配座構造に関してｇ又はｄ鎖の同時発現の間接的な効果があるかもしれない。同じ効果が公開された抗体OKT3について示された。この抗体は、huCD3εのぞれぞれhuCD3δ又はγとの結合後に形成される立体配座エピトープと相互作用すると記載される(Salmeron et al.、1991、The Journal of Immunology)。huCD3εサブユニットだけに結合することも示された(Kjer-Nielsen et al.、2004、PNAS)。12D2及びOKT3の同様の挙動のために、huCD3εとの相互作用は、12D2について想定される。全体から見て、huCD3εは、全ての分析された抗体について抗原性構造であると思われる(データは表５に示される)。

【０８５１】

【表８】

表５：フローサイトメトリー及びBiacoreにより測定された、huCD3δ、huCD3ε、huCD3ε/δ及びhuCD3ε/γ複合体に対する選択されたCD3抗体の親和性

	フローサイトメトリー			Biacore	
	%トランスフェクトされた細胞に陽性の抗体（n=3-6）			100nMでのFab結合のRU	
クローン	huCD3δ	huCD3ε (+/- SEM)	huCD3ε/δ (+/-SEM)	huCD3ε/δ	huCD3ε/γ
10E6	n.b.	96,3 +/- 2,2	93,3 +/- 4,7	11	8
11F9	n.b.	97,0 +/- 1,5	96,0 +/- 2,5	10	7
12D2	n.b.	n.b.	96,3 +/- 2,2	11	5
12G3	n.b.	96,3 +/- 2,2	96,7 +/- 1,9	10	7
13H2	n.b.	93,3 +/- 3,3	93,0 +/- 4,2	9	6
18F5	n.b.	70,6 +/- 11,9	70,4 +/- 9,9	13	7
18G9	n.b.	95,0 +/- 2,5	97,0 +/- 1,5	10	3
1E6	n.b.	87,7 +/- 4,4	91,7 +/- 4,9	10	7
20E5	n.b.	96,7 +/- 1,9	95,3 +/- 3,2	11	8
20G6	n.b.	68,6 +/- 12,1	67,4 +/- 10,4	7	4
4B4	n.b.	71,5 +/- 10,8	69,5 +/- 8,7	11	3
4E7	n.b.	69,0 +/- 12,3	66,4 +/- 10,0	8	6
5B1	n.b.	97,0 +/- 1,5	97,0 +/- 1,5	10	7
OKT3	n.b.	n.b.	70,2 +/- 9,6	4	3

n.b. = 結合なし(huCD3e+huCD3dの結合の<20%)

【０８５２】

1.6 CD3 FabのヒトT細胞の結合

CD3-Fabの結合能をフローサイトメトリーにより決定した。初代ヒトT細胞を標的細胞として使用した。従って、末梢血単核細胞(PBMC)を、Ficoll密度遠心分離によりEDTAで処理された健常ドナーの末梢血200mlから単離した。15ml Histopaque(Sigma-Aldrich)を50ml Leucosepチューブ(Greiner bio-one)に予めロードした。血液をautoMACSリンス緩衝液+ 1 % BSA(Miltenyi Biotec)で希釈し、そして合計で１０の準備したチューブのメンブレンにロードした。チューブを連続して１０分間1000xgで遠心分離した。PBMCを集め、そしてautoMACSリンス緩衝液+1% BSAで３回洗浄した。最後に、製造者の指示に従ってPan T細胞単離キット(Miltenyi Biotec)を使用してautoMACSpro技術によりTリンパ球を単離するためにPBMCをautoMACSランニングバッファー(Miltenyi Biotec)中に再懸濁した。分離されたT細胞の純度を、ヒト7色免疫表現型検査キット(Miltenyi Biotec)を使用してMACSQuantフローサイトメトリーにより分析した。単離されたT細胞をFBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)に再懸濁し、そして１ウェルあたり100μl中1E5細胞を96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)に播種した。Fab抗体をPBS(Invitrogen)で1:3連続希釈し、そして各5μlを最終最大濃度30000ng/mlで細胞に加えた。アッセイ混合物を45分間4℃でインキュベートした。細胞をFBSを含む染色緩衝液で２回洗浄し、そして１ウェルあたり1μg二次抗体ヤギF(ab')2抗ヒトカッパ-FITC (Beckman Coulter、#732621)を１ウェルあたりFBSを含む100μl染色緩衝液に加えた。アッセイ混合物を２０分間4℃でインキュベートし、そしてその後２回洗浄した。細胞を１ウェルあたりFBSを含む150 μl染色緩衝液に再懸濁し、そしてMACSQuant(Miltenyi Biotec)又はLSRII (BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析を、FlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しは抗体結合について陽性の細胞のパーセンテージであった。二次抗体でのみ処理されるが初代抗体で処理されない細胞を、ゲートを設定するために使用した。EC50曲線をXLfit(Algorithm 205)により計算し、EC50値を勾配の変曲点として計算した(データを表６に示す)。

【０８５３】
【表９】

表６：フローサイトメトリーにより測定されたヒトＴ細胞に対するCD3 Fabの親和性。曲線から計算された平均EC50値が示される。

抗体	ヒトＴ細胞に対する結合　EC50[nM] 平均+/- SEM		
12D2-E5-Fab	3,8	+/-	0,2
4B4-D7-Fab	15,3	+/-	3,0
1E6-C9-Fab	18,7	+/-	3,5
10E6-G6-Fab	4,7	+/-	0,9
4E7-C9-Fab	6,2	+/-	0,8
12G3-E8-Fab	4,4	+/-	0,3
5B1-G2-Fab	11,1	+/-	3,6
18F5-H10-Fab	4,1	+/-	0,0
18G9-H11-Fab	1,7	+/-	0,5
13H2-C2-Fab	14,3	+/-	0,9
20G6-F3-Fab	14,0		(n=1)
11F9-F8-huFab	11,6		(n=1)
20E5-F10-huFab	8,2		(n=1)

【０８５４】
1.7 CD3 Fabの安全性
1.7.1 ヒトT細胞でのCD25+及びCD69+発現により測定されたCD3 Fabの安全性。安全性読み出しとしてのT細胞の活性化状態に対する CD3 Fab抗体の効果を、初代ヒトT細胞の表面での活性化マーカーCD25及びCD69の発現のフローサイトメトリーベースの発現により分析した。
【０８５５】
単離された初代ヒトTリンパ球をRPMI＋GlutaMAX I (Gibco)＋10% FCS (Invitrogen)に再懸濁し、そして96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)において１ウェルあたり100 μl中2.5E5細胞を播種した。
【０８５６】
5μl Fab CD3抗体を、最終濃度30 000 ng/mlで細胞に加えた。アッセイ混合物を20時間37℃で5% CO2にてインキュベートした。
【０８５７】
インキュベーション時間の後、細胞を沈降させて、15分間4℃にて1ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)100 μl中にて以下の標識された抗体を用いて染色した：CD25-V450、CD69-APC
細胞を染色後に2回洗浄し、FBSを含む染色緩衝液150 μlに再懸濁し、そして5000個の細胞をLSRII(BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析をFlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しはCD25陽性（pos）及びCD69posT細胞のパーセンテージであった(表7)。
【０８５８】

【表１０】

表７：ヒトＴ細胞でのCD25+及びCD69+発現により測定されたCD3 Fabの安全性

抗体	PBSに対して正規化したヒトＴ細胞のCD25+%活性化 C = 30000ng/ml n=1	PBSに対して正規化したヒトＴ細胞のCD69+%活性化 C = 30000ng/ml n=1
11H3-E5-Fab	0,7	0,5
12D2-E5-Fab - SEC	3,2	11,1
4B4-D7-Fab	2,5	5,4
1E6-B8/B9-C9-Fab	1,8	3,2
10E6-G6-Fab	0,8	2,6
4E7-C9-Fab	0,4	0,1
12G3-E8-Fab	0,0	1,5
5B1-G2-Fab	0,4	4,2
6F4-D10-Fab	2,1	6,4
18F5-H10-Fab	0,0	0,1
18G9-H11-Fab	0,7	2,2
13H2-C2-Fab	0,5	0,4
13C1-F6-Fab	0,4	0,2
1E6-B8/B9-C9-Fab	0,6	1,7
20G6-F3-Fab	0,2	3,2
1E6-B8/B9-C9-Fab	2,5	7,8
1E6-B8/B9-C9-Fab	0,1	1,0
11F9-F8-huFab	1,0	0,8
20E5-F10-huFab	1,5	1,3

【０８５９】

1.7.2 ヒトT細胞でのCD4+/CD69+、CD4+/CD25+、CD8+/CD69+及びCD8+/CD25+発現により測定されたCD3 Fabの安全性

安全性読み出しとしてのT細胞の活性化状態に対するCD3 Fab抗体の効果を、初代ヒトT細胞の表面上での活性化マーカーCD25及びCD69の発現のフローサイトメトリーベースの検出により分析した。単離された初代ヒトTリンパ球を、RPMI＋GlutaMAX I (Gibco)＋10% FCS (Invitrogen)に再懸濁し、そして2.5E5細胞を、96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)において１ウェルあたり50 μl中に播種した。T細胞のみを試験し、そしてウェルを 50 μl RPMI＋GlutaMAX I＋10% FCSで満たすか、又は標的細胞(すなわち、THP-1細胞株)を１ウェルあたり2.5E4細胞で50 μl RPMI＋GlutaMAX I＋10% FCS中に加えた。二重特異性抗体をPBS (Invitrogen)で1:3連続希釈し、そしてそれぞれ5 μlを、最終最小濃度30 000 ng/mlで細胞に加えた。アッセイ混合物を20時間37℃で5% CO2にてインキュベートした。インキュベーション時間の後に、細胞を沈降させ、そして15分間4℃にて1ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)100 μl中で以下の標識された抗体を用いて染色した：CD4-PE、CD8-APC-Cy7、CD25-APC、CD69-PE-Cy7。Fluorescence Minus One (FMO)対照として、１つのチューブでCD25をそのアイソタイプ(アイソタイプAPC-IG1k)と置き換え、そしてCD69を第二のチューブでそのアイソタイプ(アイソタイプPE-Cy7-IG1k)と置き換えた以外は、活性化したT細胞を上記のように染色した。細胞を染色後に2回洗浄し、

FBSを含む染色緩衝液150 μlに再懸濁し、そしてLSRII (BD)フローサイトメーターを使用して5000個の細胞を測定した。さらなるデータ解析を、FlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しは、CD4posCD25pos、CD4posCD69pos、CD8posCD25pos、及びCD8posCD69posT細胞のパーセンテージであった。ゲートをFMO対照に従って設定した(表8を参照のこと)。

【０８６０】

【表１１】

表８：ヒトＴ細胞でのCD4+/CD69+、CD4+/CD25+、CD8+/CD69+及びCD8+/CD25+発現により測定されたCD3 Fabの安全性

抗体	PBSに対して正規化されたCD4+/CD69+%活性化C=100nM平均+/- SEM			PBSに対して正規化されたCD8+/CD69+%活性化C=100nM平均+/- SEM			PBSに対して正規化されたCD4+/CD25+%活性化C=100nM平均+/- SEM			PBSに対して正規化されたCD8+/CD25+%活性化C=100nM平均+/- SEM		
20G6-F3-Fab	0,1	+/-	0,1	0,0	+/-	0,0	0,4	+/-	0,1	0,0	+/-	0,1
4B4-D7-Fab	3,2	+/-	1,1	0,3	+/-	0,3	1,3	+/-	0,6	0,0	+/-	0,0

【０８６１】

実施例2：CD123 配列

2.1 CD123(IL3RA)-hFc融合発現プラスミド(CD123-Fc)の構築

テンプレートしてcDNA含有プラスミドを使用して、ヒト及びカニクイザルCD123融合タンパク質を、Strep-IIタグ(ヒトタンパク質バージョンにおいてのみ)をさらに有するヒト免疫グロブリンIgGのGS-リンカー(Macacaタンパク質において使用される)を含む重鎖定常領域、ヒンジ領域、CH2及びCH3ドメインを有するリーディングフレームで生成した。

【０８６２】

テンプレートとしてヒトゲノムDNAを使用して、シグナル配列を含めて、ヒトCD123(IL3RA)細胞外ドメインを増幅した。増幅され切断され、そして精製された得られたPCR産物を、ライゲーションPCRにより合わせて、NheI及びHindIII部位を使用するInFusion法により哺乳動物発現ベクターpXLにライゲーションした。得られた成熟ヒトCD123 Strep-IIタグ化Fc融合タンパク質の配列は、配列番号196で開示される。アミノ酸1～284は、全長野生型ヒトCD123タンパク質(本明細書において配列番号194で開示される、NCBIデータベースから受入番号NP_002174.1で利用可能)のアミノ酸22～305、及び従ってヒトCD123の細胞外ドメインに対応する。

【０８６３】

カニクイザルCD123をクローン化するために、cDNAをカニクイザル集団の血液から作成した。この単離されたcDNAをテンプレートとして使用して、シグナル配列を含めてMacaca CD123(IL3ra)細胞外ドメインを増幅した。得られた増幅して切断し、そして精製したPCR産物をライゲーションPCRにより合わせて、NheI及びHindIIIを使用するInFusion法により哺乳動物発現ベクターpXLに連結した。得られた成熟ヒトCD123 Strep-IIタグ化Fc-融合タンパク質の配列は、配列番号197で開示される。アミノ酸1～284は、アミノ酸22 to 305 of the 全長野生型カニクイザルCD123タンパク質(本明細書において配列番号195で開示される、NCBIデータベースから受入番号NP_002174.1で入手可能)、従ってヒトCD123の細胞外ドメインに対応する。

【０８６４】

2.2 ヒト及びカニクイザルCD123-Fcの発現及び精製

F17無血清懸濁培養(Life)で増殖するFreestyle HEK293細胞を、発現プラスミドで一過

性トランスフェクトした。Cellfectinトランスフェクション試薬(Life)を使用してトランスフェクションを行った。細胞を37℃で7日間培養した。組み換えタンパク質を含有する培養上清を遠心分離により採取し、そしてろ過により清澄化した(0.22μm)。

【０８６５】

精製のために、Fc融合タンパク質変異体をプロテインAマトリックス(GE)上に捕捉し、そしてpHシフトにより溶出した。タンパク質をPBS中SECによりSuperdex 200(GE)及び最終限外濾過濃縮工程を使用して精錬した後、タンパク質をさらなるアッセイに使用した。

【０８６６】

2.3 ハイブリドーマからのヒト及びカニクイザルCD123ラットIgGの両方に対する親和性の評価

ヒトCD123に対する結合親和性及びcyno CD123に対する交差反応性についての抗CD123ラットIgGのスクリーニングを、one-shot kineticsアプローチでProteon XPR36 (Biorad)を使用してハイブリドーマ上清を用いて行った。捕捉アッセイを、ヤギ抗ラットIgG (112-005-071、Jackson Immuno Research)を使用して確率した。捕捉抗体を、GLCチップ(176-5011、Biorad)上にアミンカップリングキット(176-2410、Biorad)を使用して垂直方向に約8000 RUまでコーティングした。ラットIgGの垂直方向に約200RUまでの捕捉は、CD123-Fcについて100 RUまでのRmax値を生じた。ヒト及びcyno CD123-Fc融合タンパク質を用いた結合動力学を、結合及び解離についてそれぞれ120秒及び600秒で水平方向に100 μl/分で測定した。CD123-Fcタンパク質を6 nMから100 nMの２倍希釈で使用した。PBSET緩衝液(176-2730、Biorad)をアッセイ緩衝液として使用した。10mMグリシン緩衝液pH 1.5を18秒間30 μl/分で注入することにより再生を達成した。データ処理及び解析を、ProteonManagerソフトウェアv3.0を使用して行った。センサーグラムのフィッティングを、1:1ラングミュアモデルを用いて行った。クローンをKD＜1 nMのヒトCD123に対する親和性及びcyno CD123に対する交差反応性に基づいて選択した。

【０８６７】

Fab及びCODV-Fab

抗CD123結合Fab又はCODV-Fabの結合親和性を、Biacore3000機器(GE Healthcare)を使用して測定した。アッセイ緩衝液はHBS-EP(BR-1001-88、GE Healthcare)であった。CD123-Fc融合タンパク質の捕捉を、ヒト抗体捕捉キット(GE Healthcare)を使用して達成した。捕捉抗体を、アミンカップリングキット(BR-100-50、GE Healthcare)を使用してCM5チップ(BR-1001-88、GE Healthcare)に約12.000 RUまでカップリングした。CD123-Fc融合タンパク質を、10 μl/分で約70 RUまで捕捉して、Rmax値30 RUを得た。抗CD123 Fab又はCODV-Fabとの結合動力学を、30 μl/分で結合及び解離領域についてそれぞれ240秒間及び600秒間測定した。Fabのアッセイ緩衝液中3から200nMへの２倍希釈を使用した。全てのFab濃度を、二重参照のために二連緩衝液ブランクと一緒に二連で行った。捕捉表面の再生を、3M MgCl2溶液の30 μl/分での１分注入を用いて行った。データ解析のために、BIAevaluationソフトウェアv.4.1(GE Healthcare)を使用した。物質移動を用いる１：１ラングミュアモデルを使用してデータを全体的にフィッティングした。

【０８６８】

IgG及びCODV-Fcタンパク質

抗CD123 IgG及びCODV-Fcタンパク質の結合親和性の測定を、捕捉抗体を除いてFab及びCODV-Fabにつての結合アッセイと同様に行った。この場合、Strep-MAB古典的抗体(2-1507-001、IBA)を、そのStrepIIタグを介してヒトCD123-Fcを捕捉するために使用した。ここでは再生溶液は10mMグリシン緩衝液pH2.0であった。

【０８６９】

2.4 ヒト及びカニクイザル交差反応性抗CD123抗体の生成

ヒト及びカニクイザルCD123 cDNAを、それぞれAldevron所有の免疫ベクター(pB8及びVV8)にクローン化した。免疫群MR13-296の３匹のラットを、免疫ベクターIL3RA-hum.-ECD (aa19-305)で免疫した。4回の遺伝子適用(IS24d-4)の後に、免疫血清を免疫プロトコルの２４日目に採取した。PBS 3% FBSで希釈した血清を、ヒト及びcyno IL3RA cDNA変異体IL3

RA-hum.ECD及びIL3RA-hum.D3で一過性トランスフェクトされた哺乳動物細胞を使用してフローサイトメトリーにより試験した。

【０８７０】

pB1-IL3RA-hum.ECD、さらにはIL3RA-cyno (pFF1262)でトランスフェクトされた細胞及びTHP-1細胞に対する免疫血清の特異的反応性は、無関係なcDNAデトランスフェクトされた細胞と比較した場合に、全ての免疫された動物において検出することができた。

【０８７１】

陽性血清を有するラットを屠殺し、そしてB細胞をマウス骨髄腫細胞と融合した。得られたハイブリドーマを、ヒト又はカニクイザルCD123発現プラスミドでトランスフェクトされたHEK293細胞で、CD123を発現する異なる細胞株で、フローサイトメトリーによりスクリーニングした(データは表１０に示される)。

【０８７２】

標的細胞を、96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)において１ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)50 μl中5E4個の細胞で播種した。
ハイブリドーマ上清をPBS(Invitrogen)中で1:3連続希釈し、そして各50μlを最終最大濃度1 μg/mlで細胞に加えた。アッセイ混合物を45分間4℃でインキュベートした。

【０８７３】

細胞をFBSを含む染色緩衝液で２回洗浄し、そして1 μg二次抗体ヤギ抗ラットIgG (H+L)-Alexa Fluor 488 (Invitrogen-Life Technologies、# MH10520)を、１ウェル辺りFBSを含む染色緩衝液100 μlに加えた。アッセイ混合物を15分間4℃でインキュベートし、そしてその後２回洗浄した。

【０８７４】

細胞を、１ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液200μlに再懸濁し、そしてMACSQuant (Miltenyi Biotec)又はLSRII(BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析を、FlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しは、抗体結合について陽性の細胞のパーセンテージであった。二次抗体でのみ処理されたが、一次抗体で処理されていない細胞を使用してゲートを設定した。曲線をXLfit(Algorithm 205)により計算した。

【０８７５】

クローンのCD123への特異的結合は、シグナルが全く検出できなかった（データは示していない）非トランスフェクトHEK293細胞と比較して、トランスフェクトされたHEK293の表面上で示されることができた。抗体の結合は濃度依存性であり、EC50値は0.4と17.7ng/mlとの間の範囲に及んだ(表9)。

【０８７６】

【表１２】

表 9：フローサイトメトリーにより検出されたハイブリドーマ上清におけるラット IgG クローンの特異的 CD123 結合。抗体の濃度依存性結合を、標的細胞として CD123 トランスフェクト HEK293 及びヤギ抗ラット IgG (H+L)-Alexa Fluor 488 二次抗体を使用して測定した。曲線の計算された EC50 値を示す。

抗体	EC50 [ng/ml]
BFX - 1A6	6,4
BFX - 1E1	2,2
BFX - 2B8	5,5
BFX - 2F4	4,5
BFX - 2F8	3,4
BFX - 2H7	17,7
BFX - 3B10	2,0
BFX - 3E3	2,0
BFX - 5A5	10,1
BFX - 6B10	5,0
BFX - 6C10	6,1
BFX - 6D6	0,9
BFX - 8B11	0,4
BFX - 9B8	1,2
BFX - 9D7	0,9
BFX - 9F6	1,3
BFX - 9H2	14,9

【０８７７】

【表１３】

表10：組み換えCD123及びCD123発現細胞に対するCD123抗体の結合データ。結合データは、ヒト及びカニクイザル由来の組み換えCD123タンパク質に対するCD123抗体の親和性を示す。細胞表面上の結合はフローサイトメトリーにより検出された。SP2は、CD123のN末端短縮(D1領域)変異体を発現する細胞を指す。抗体をProteon XPR36によりCD123に対するIL3結合と競合するそれらの能力に関して試験した。

クローン	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (nM) ヒト	KD (nM) カニクイザル	Molm-13	THP-1	OCI-AML3	SP2	好塩基球	IL3遮断
1E1	4,6E+05	1,1E-04	0,23	0,72	+	+	+	+	+	−
2B8	6,6E+05	1,2E-05	0,018	0,77	+	+	+	+	+	−
2F8	1,3E+05	6,6E-05	0,53	0,51	+	+	+	−	+	+
3B10	2,2E+05	0,5E-05	0,21	0,27	+	+	+	−	+	+
3E3	1,6E+05	6,4E-05	0,4	0,12	+	+	+	−	+	+
5A5	1,3E+05	1,2E-04	1,1	0,05	+	+	+	+	+	−
6B10	2,3E+05	1,5E-05	0,15	0,1	+	+	+	+	+	−
6C10	1,8E+05	1,4E-04	0,75	0,79	+	+	+	+	+	−
8B11	4,7E+05	6,2E-06	0,01	0,1	+	+	+	+	+	−
9B8	1,5E+06	2,8E-04	0,19	0,17	+	+	+	+	+	+
9D7	1,0E+06	3,2E-04	0,3	0,07	+	+	+	+	+	+
9F6	1,8E+05	6,7E-06	0,04	0,5	+	+	+	+	+	−

【０８７８】

2.5 抗CD123ラット抗体配列のヒト化

ラット抗体のヒト化を、CDR-グラフティングにより、又は4D法(US20110027266)により

行った。ラット-抗CD3抗体 3E3については、同定された一番近いクマネズミ属（Rattus）生殖系列配列は、重鎖可変領域についてIGHV2S48*01及びIGHJ3*01、そして軽鎖可変領域についてIGLV3S2*01及びIGKJ3*01であった。計算されたラットのジャーミナリティインデックス(germinality index)（フレームワーク配列のみ)は、VHについて94.51%及びVLについて98.9%であった。

【０８７９】

潜在的な露出した問題のある残基を確認し、そしてCDRH2における１つの残基を改変した。

【０８８０】

グラフティング法を使用して、様々なヒト化変異体を、同定された最も近いヒト生殖系列配列に基づいて生成した：VHについてIGHV4-59*05及びIGHJ4*01(フレームワークでのジャーミナリティインデックス：75.82%)；VLについてIGLV6-57*01及びIGLJ3*01(フレームワークでのジャーミナリティインデックス：72.22%)。

【０８８１】

CDRグラフティングに加えて、4Dヒト化プロトコル(US20110027266)を使用して、Rat抗CD123 3E3可変軽(VL)ドメイン及び重(VH)ドメインをヒト化した。分子動力学(MD)シミュレーションを、ラット抗CD123 3E3の最小化3D相同性モデル(MOEで行われた；PDBを使用：1FLR)で行い、そしてLGCR/SDIにより設計されMOE内で利用可能な７つの代表的な軽鎖(vk1、vk2、vk3、vk4、vlambda1、vlambda2、vlambda3)及び７つの代表的な重鎖(vh1a、vh1b、vh2、vh3、vh4、vh5、vh6)から誘導された４９のヒトモデルと比較した。

【０８８２】

２つのモデルを「4Dヒト化」のために選択した：最良の疎水性成分及び静電成分の両方並びにCDR外側の同一性を有するVl3-vh4及びVL3-VH2。Rat抗CD123 3E3可変ドメインと２つの選択されたモデルとの間の対結合について、配列を、対応する相同性モデルのアルファ炭素の最適3D重ね合わせに基づいて整列した。

【０８８３】

実施例3：二重特異性CODV-Fab形式の抗体

3.1 それらのT細胞結合活性を調べるための二重特異性CODV-Fab形式の抗CD123 mAb 7G3と組み合わせた選択されたCD3配列のクローニング

I2C、mAb2(Macrogenics)並びにいわゆる「20G6-F3」、「4E7-C9」、「4B4-D7」及び「18F5-H10」のような選択されたCD3抗体配列を、単一特異性抗CD3 Fabとして発現させ、該選択された配列を、モノクローナル抗体7G3の配列を使用して二重特異性CD3xCD123 CODV-Fabとして同様に発現させ、本明細書で上の「抗体様結合タンパク質」の項においてさらに記載されるように、CODV-Fab構築物「I2Cx7G3」並びにいわゆる「7G3x20G6」、「7G3x4E7」、「7G3x4B4」及び「7G3x18F5」を生じた。精製されたタンパク質をBiacoreアッセイで使用して、CD3ε/δ複合体に対する親和性を比較した(データを表１１に示す)。CD3配列が二重特異性CODV-Fab形式に導入された場合、親和性の変化はBiacore分析により検出できなかった。

【０８８４】

【表１４】

表11:Fab-フラグメントとCODV-Fabとの間のヒト及びカニクイザルCD3ε/δ複合体に対する親和性の比較

	分子	hu kon 1/Ms	hu koff 1/s	hu KD nM	cy KD nM
Fab-フラグメント	I2C	1,1E+07	1,3E-03	0,13	0,5
	mAb2	3,1E+05	4,3E-03	13,7	16,3
	BDW-20G6-F3	3,5E+04	2,7E-04	8	8
	BDX-4E7-C9	8,9E+04	1,5E-03	17	15
	BDW-4B4-D7	1,1E+05	2,9E-03	27	24
	BDX-18F5-H10	2,0E+05	1,8E-04	1	1
CODV-Fab	7G3xI2C	4,0E+06	2,0E-03	0,5	0,4
	7G3x20G6	7,2E+04	5,1E-04	7	7
	7G3x4E7	1,2E+05	1,9E-03	16	10
	7G3x4B4	2,7E+05	4,4E-03	17	18

【０８８５】

3.2 CD123及びCD3に特異的な二重特異性CODV-Fabは誘導された（redirected）T細胞死滅を媒介する

このような二重特異性CODV-Fabは、T細胞を(このようなT細胞をCD3結合CODV-FabのCD3結合部分に結合させることにより)腫瘍細胞の位置に局在化させる(このような癌細胞をCODV-FabのCD123部分に結合させることにより)能力を有する。次いで、局在化されたT細胞は、「誘導（redirected）」死滅と本明細書で称されるプロセスにおいて腫瘍細胞の死滅を媒介することができる。モノクローナル抗体7G3の抗CD123可変ドメイン及び実施例１において生成された選択されたCD3抗体の抗CD3可変ドメインを有するCD123及びCD3に特異的な二重特異性CODV-Fabを構築した。

【０８８６】

従って、末梢血単核細胞(PBMC)を、EDTAで処理された健常ドナーの末梢血200mlからFicoll密度遠心分離により単離した。

【０８８７】

15 ml Histopaque (Sigma-Aldrich)を50 ml Leucosepチューブ(Greiner bio-one)に予めロードした。血液をautoMACSリンス緩衝液＋1% BSA(Miltenyi Biotec)で希釈し、そして合計で１０個の準備したチューブのメンブレンにロードした。チューブを連続して10分間1000 xgで遠心分離した。PBMCを集め、そしてautoMACSリンス緩衝液＋1% BSAで３回洗浄した。最後に、製造者の指示に従ってPan T細胞単離キット(Miltenyi Biotec)を使用してautoMACSpro技術によりTリンパ球を単離するために、PBMCをautoMACSランニングバッファ(Miltenyi Biotec)に再懸濁した。分離されたT細胞の純度を、MACSQuantフローサイトメトリーによりヒト7色免疫表現型検査キット(Miltenyi Biotec)を使用して分析した。

【０８８８】

二重特異性抗体のT細胞結合効果を、フローサイトメトリーベースの細胞傷害性アッセイにより分析した。標的細胞(すなわち、THP-1細胞株)を、１５分間３７℃にて1E7細胞あたり1 ml RPMI＋GlutaMAX I (Gibco)中の1 μM CFSEを用いて染色した。その後、細胞を２回洗浄し、そしてRPMI＋GlutaMAX I＋10% FCS (Invitrogen)に再懸濁した。2.5E4個の標的細胞を、96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)において１ウェルあたり50

μl培地に播種した。

【０８８９】

単離された初代ヒトTリンパ球をRPMI＋GlutaMAX Ｉ＋10% FCSに再懸濁し、そして示されたエフェクター対標的比で１ウェルあたり50 μl中で標的細胞に加えた(一般にE:T=10:1)。

【０８９０】

二重特異性抗体をPBS(Invitrogen)で1:3連続希釈し、そしてそれぞれ5 μlを3000 ng/mlの最終最大濃度で細胞に加えた。アッセイ混合物を20時間37℃で5% CO2中でインキュベートした。

【０８９１】

死滅した標的細胞を検出するために、全ての細胞を7-AADで染色した。従って、FBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)で希釈された5 μg/ml 7-AADを各ウェルに加え、そして15分間4℃で暗所にてインキュベートした。細胞をそれぞれMACSQuant (Miltenyi Biotec)又はLSRII (BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析をFlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しはCFSE及び7-AAD二重陽性細胞であった。

【０８９２】

例えば表20～22に示されるこれらの調査の結果は、CD123xCD3 CODV-Fabの腫瘍細胞の誘導死滅を媒介する能力を実証する。

【０８９３】

3.3 誘導T細胞死滅の安全性評価

安全性読み出しとしての二重特異性抗体のT細胞の活性化状態に対する効果を、初代ヒトT細胞の表面上の活性化マーカーCD25及びCD69の発現のフローサイトメトリーベースの検出により分析した。

【０８９４】

単離された初代ヒトTリンパ球を、RPMI＋GlutaMAX Ｉ (Gibco)＋10% FCS (Invitrogen)に再懸濁し、そして2.5E5個の細胞を96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)において１ウェルあたり50 μlに播種した。

【０８９５】

T細胞のみを試験し、そしてウェルを50 μl RPMI＋GlutaMAX Ｉ＋10% FCSで満たすか、又は標的細胞(すなわち、THP-1細胞株)を１ウェルあたり2.5E4個の細胞で50 μl RPMI＋GlutaMAX Ｉ＋10% FCS中に加えた。

【０８９６】

二重特異性抗体をPBS(Invitrogen)で1:3連続希釈し、そしてそれぞれ5 μlを最終最大濃度30 000ng/mlで細胞に加えた。アッセイ混合物を20時間37℃で5% CO2中でインキュベートした。

【０８９７】

インキュベーション時間後に、細胞を沈降させ、そして15分間4℃で1ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)100 μl中で以下の標識された抗体を用いて染色した：CD4-PE、CD8-APC-Cy7、CD25-APC、CD69-PE-Cy7

１つのチューブでCD25をそのアイソタイプ(アイソタイプAPC-IG1k)で置き換え、そして第二のチューブでCD69をそのアイソタイプ(アイソタイプPE-Cy7-IG1k)で置き換えた事以外は、Fluorescence Minus One (FMO)対照として、活性化T細胞を上記のように染色した。

【０８９８】

細胞を染色後に2回洗浄し、FBSを含む染色緩衝液150 μlに再懸濁し、そして5000個の細胞をLSRII(BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析を、FlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しはCD4posCD25pos、CD4posCD69pos、CD8posCD25pos、及びCD8posCD69posT細胞のパーセンテージであった。FMO対照に従ってゲートを設定した(表12を参照のこと)。

【０８９９】
【表１５】

表12：細胞傷害性アッセイにおいて測定されるCD123 x CD3 CODV-Fabの活性及びCD69の発現により測定される安全性

分子	活性 EC50 [ng/ml]	安全性 CD69発現 %細胞/%最大
7G3 x I2C	20 ± 9	25,8 ± 7,6
7G3 x OKT3	16 ± 5	25,5 ± 8,0
7G3 x 20G6	18 ± 5	8,7 ± 0,8
7G3 x 4E7	12 ± 3	12,3 ± 2,5
7G3 x 4B4	11 ± 2	11,6 ± 0,8
7G3 x 18F5	61 ± 15	9,8 ± 1,1

【０９００】
3.4 抗CD3ラット抗体配列及び二重特異性抗体のヒト化
ラット抗体のヒト化を、CDRグラフティングにより又は4D法(US20110027266)により行った。
【０９０１】
ラット抗CD3抗体「20G6」については、最も近いクマネズミ属生殖系列配列をIGHV6S17*01及びIGHJ2*01と同定した(重鎖可変領域について、そして軽鎖可変領域についてIGKV1S21*01及びIGKJ4*01)。計算されたラットジャーミナリティインデックス(フレームワーク配列のみ)は、VHについて97,80%そしてVLについて95,5%であった。
【０９０２】
グラフティング法を使用して様々なヒト化変異体を、
1) VHについてフレームワークでのジャーミナリティインデックス77%を有するIGHV3-30-01_IGHJ4-01；VLについてフレームワークでのジャーミナリティインデックス80%を有するIGK2D-29-02_IGKJ4-01と同定された、最も近いヒト生殖系列配列、又は
2) 又はVHについてフレームワークでのジャーミナリティインデックス75%を有し、VHについてより低いPIを有するIGVH3-48*02-IGHJ4-01；VLについてフレームワークでのジャーミナリティインデックス77,5%を有するIGKV2-28*01-IGKJ4-01と同定された最も近い生殖系列配列に基づいて、又は
3) より離れたヒト生殖系列配列からなる(生殖系列クレードを変更)(VHについてフレームワークでのジャーミナリティインデックス56%を有するIGVH1-46*01-IGHJ4*01；VLについてフレームワークでのジャーミナリティインデックス67,5%を有するIGKV4*01-IGKJ4*01)
に基づいて生成した。
【０９０３】
次いでヒト化配列を、以前に記載したように、抗体7G3由来の抗CD123配列と組み合わせていわゆるいわゆるCODV-Fab「7G3 x 20G6」のCODV-Fab形式に導入した。精製されたCD123 x CD3 CODV-FabをBiacoreアッセイで使用してCD3ε/δに対する親和性を評価した(表13を参照のこと)。
【０９０４】

【表１６】

表13：抗CD3抗体20G6の選択されたヒト化変異体の組み換えCD3ε/δ複合体に対する親和性。

CODV-Fab「7G3 x 20G6」において使用されるヒト化配列組み合わせ	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)
親配列	2,17E+04	5,71E-04	46	2,63E-08
VL1A_VH1A	2,86E+04	4,34E-03	46	1,52E-07
VL1B_VH1A	2,99E+04	4,14E-03	45	1,38E-07
VL1C_VH1D	2,30E+04	1,01E-03	58	4,40E-08
VL1D_VH1B	1,86E+04	1,09E-03	62	5,87E-08
VL1D_VH1C	2,22E+04	7,13E-04	71	3,21E-08
VL1D_VH1D	2,40E+04	7,46E-04	59	3,10E-08

【０９０５】

ラット抗CD3抗体 4B4-D7について、最も近いクマネズミ属生殖系列配列を、重鎖可変領域についてIGHV6S17*01(93%の同一性)及びIGHJ2*01(87.5%の同一性)と同定し、そして軽鎖可変領域についてIGKV1S21*01(93%の同一性)及びIGKJ4*01(100%の同一性)と同定した。

【０９０６】

ヒトジャーミナリティ(フレームワーク配列のみ)に対する同定されたクマネズミ属V-配列の計算された同一性パーセンテージは、VHについて79%及びVLについて77.53%であった。

【０９０７】

VH及びVLについての様々なヒト化変異体対を、最も近いヒト生殖系列配列(IGHV3-30*01_IGHJ6*02；IGKV2-30*02/IGKV2D-39*02_IGKJ2*01)を使用して、さらなる配列操作を用いてグラフティングにより生成した。ヒト化V-配列についてのヒトジャーミナリティの計算されたパーセンテージ(4つのIMGTフレームワーク配列のみ)を表14に記載する。

【０９０８】

【表１７】

表14：いわゆる「B4-D7」抗体のグラフティングにより得られたヒト化V-配列についてのヒトジャーミナリティのパーセンテージ。パーセンテージは4つのIMGTフレームワーク配列のみに基づいて計算された。

グラフト化「4B4-D7」変異体	% ヒトジャーミナリティインデックス
VL1Cmodif1	92.1
VL1Cmodif2	91.0
VL1Cmodif3	91.0
VL1Amodif1	97.8
VL1Amodif2	96.6
VL1Amodif3	95.5
VL2C	95.5
VL2D	96.7
VL2F	96.7
VH6Bmodif1	92.3
VH6Bmodif2	90.1
VH6Amodif1	94.5
VH6Amodif2	92.3
VH6Amodif3	91.2
VH6C	95.5
VH6D	93.5

【０９０９】

CDRグラフティングに加えて、米国特許出願第US20110027266号に記載されるような4Dヒト化プロトコルを使用して、Rat抗CD3 4B4-D7可変軽(VL)ドメイン及び重(VH)ドメインをヒト化した。分子動力学(MD)シミュレーションを、ラット抗CD3 4B4-D7の最小化3D相同性モデル(MOEを用いて行った；PDBを使用：1FLR)に対して行い、MOE内で利用可能なLGCR/SDIにより設計された７つの代表的な軽鎖(vk1、vk2、vk3、vk4、vlambda1、vlambda2、vlambda3)及び７つの代表的な重鎖(vh1a、vh1b、vh2、vh3、vh4、vh5、vh6)から誘導された49のヒトモデルと比較した。

【０９１０】

２つのモデルを「4Dヒト化」のために選択した、最も高い4D類似性を有するvk1-vh6、わずかに疎水性及び静電成分の両方。CDRの外側で最も高い配列同一性を有するvk2-vh3。Rat抗CD3 4B4-D7可変ドメインと２つの選択されたモデルとの間の対結合については、対応する相同性モデルのアルファ炭素の最適3D重ね合わせに基づいて配列を整列した。VH及びVLについての様々な他のヒト化変異体対をさらに最適化した。

【０９１１】

ヒト化V-配列についてのヒトジャーミナリティの計算されたパーセンテージ(4つのIMGTフレームワーク配列のみ)を表15に列挙する：

【０９１２】

【表１８】

表15：いわゆる「B4-D7」抗体の４Dヒト化により得られたヒト化V-配列についてのヒトジャーミナリティのパーセンテージ。パーセンテージは4つのIMGTフレームワーク配列のみに基づいて計算された。

4D 「4B4-D7」変異体	% ヒトジャーミナリティインデックス
VL1A	75
VL1B	75
VL2A	83
VL2B	83
VH1A	80
VH1B	80
VH2A	80
VH2B	84.5

【０９１３】

ヒト化配列をFabフラグメントとして発現させ、そして精製して、CD3ε/δに対する親和性を評価するためにBiacoreアッセイを行った(データを表16に示す)。

【０９１４】

【表１９】

表16：抗CD3抗体 4B4-D7の選択されたヒト化変異体の組み換えCD3ε/δ 複合体に対する親和性。

Fab	VL	VH	リガンド	ka	kd	KD
4B4			huCD3	3,26E+05	2,85E-03	8,79E-09
			cyCD3	1,90E+05	2,37E-03	1,26E-08
4B4_1	VL1a 75%	VH1B 80%	huCD3	6,28E+05	1,74E-03	2,77E-09
			cyCD3	5,06E+05	1,58E-03	3,13E-09
4B4_2	VL1b 75%	VH1B 80%	huCD3	2,86E+05	2,14E-03	7,48E-09
			cyCD3	2,77E+05	2,10E-03	7,57E-09
4B4_5	VL2C 95,5%	VH6D 93,5%	huCD3	2,33E+05	4,23E-03	1,82E-08
			cyCD3	2,53E+05	4,20E-03	1,66E-08
4B4_6	VL1a 75%	VH1A 80%	huCD3	1,50E+06	1,85E-03	1,24E-09
			cyCD3	1,49E+06	1,77E-03	1,19E-09
4B4_7	VL1b 75%	VH1A 80%	huCD3	3,06E+05	2,48E-03	8,10E-09
			cyCD3	3,01E+05	2,19E-03	7,28E-09
4B4_9	VL2B 83%	VH2A 80%	huCD3	2,18E+05	2,91E-03	1,34E-08
			cyCD3	2,85E+05	3,44E-03	1,21E-08
4B4_10	VL1_CM2 91%	VH6_BM2 90%	huCD3	4,34E+05	3,99E-03	9,19E-09
			cyCD3	4,30E+05	3,84E-03	8,94E-09
4B4_11	VL1_CM3 91%	VH6_BM2 90%	huCD3	5,66E+05	7,74E-03	1,37E-08
			cyCD3	2,38E+05	4,86E-03	2,04E-08
4B4_17	VL2A 83%	VH2B 84,5%	huCD3	3,10E+05	2,76E-03	8,91E-09
			cyCD3	2,98E+05	2,70E-03	9,07E-09
4B4_20	VL2F 96,5%	VH6C 95,5%	huCD3	5,09E+04	1,71E-03	3,35E-08
			cyCD3	4,56E+04	1,98E-03	4,34E-08

【０９１５】

3.5 THP-1及びTF-1細胞に対するCODV hu-Fab CD123 x CD3の結合

選択されたCD123抗体の配列を、CD3結合配列と組み合わせたCODV-Fab形式にクローン化し、そしてタンパク質を発現させて精製した。

【０９１６】

CD123を天然に発現する細胞に結合するそれらの能力を、サイトメトリーにより決定し

た。THP-1細胞株又はTF-1細胞株を標的細胞として使用した。

【０９１７】

標的細胞をFcR-Blocker(Sigma)でブロックした。従って、標的細胞をFBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)に再懸濁し、そして1mlあたりブロッキング試薬100μｌを用いて1時間4℃でブロックした。細胞をFBSを含む染色緩衝液で満たし、そして１ウェルあたり50μｌ中1E5個の細胞を96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)において播種した。

【０９１８】

抗体を１ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液50 μｌ中3 μgで加えた。アッセイ混合物を30分間4℃でインキュベートした。

【０９１９】

細胞をFBSを含む染色緩衝液で２回洗浄し、そして１ウェルあたり1 μg二次抗体ヤギF(ab’)2抗ヒトカッパ-FITC(Beckman Coulter、#732621)を、１ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液100 μｌに加えた。アッセイ混合物を２０分間４℃でインキュベートし、そしてその後２回洗浄した。

【０９２０】

細胞を１ウェルあたりFBSを含む染色緩衝液150 μｌに再懸濁し、そしてMACSQuant(Miltenyi Biotec)又はLSRII(BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析をFlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しは抗体結合について陽性のパーセンテージであった。二次抗体でのみ処理されたが初代抗体で処理されていない細胞をゲートを設定するために使用した。

【０９２１】

CD123xCD3 CODV-FabのCD123への結合は、TF-1細胞株又はCD131発現を欠くTHP-1細胞の表面でのCD131の同時発現のいずれかでCD123を発現している２つの異なる細胞株を用いて示された。ネガティブコントロール(特異性対照)としてCD19xCD3 CODV-Fabそしてポジティブコントロールとして参照CD123xCD3 CODV-Fabを使用した(表17)。

【０９２２】

【表２０】

表17：CD3結合配列と組み合わせてCODV-Fab骨格にクローン化されたCD123標的化配列のTHP-1及びTF-1細胞株への特異的結合。抗体の結合を、標的細胞としてCD123を発現するTHP-1及びTF-1を使用して検出した。抗体3 μgを加え、そして二次ヤギ抗ヒトカッパ-FITC抗体により検出した。抗体陽性標的細胞のパーセンテージが示される。

	% FITC陽性細胞	
抗体	THP-1細胞	TF-1細胞
培地対照	0,10	0,00
二次AB対照	0,00	0,20
特異性対照CD19 x CD3	0,10	0,20
CODV-Fab CD123 x CD3	99,90	82,50
CODV-Fab BFX-2F8-D6 x CD3	24,00	9,30
CODV-Fab BFX-3E3-D3 x CD3	99,00	31,60
CODV-Fab BFX-9B8-G6 x CD3	48,80	31,10
CODV-Fab BFX-9D7-C8 x CD3	88,70	50,20
CODV-Fab BFX-9F6-G3 x CD3	99,70	60,70

【０９２３】

3.6 CODV-Fab CD123 x CD3により媒介されるTHP-1細胞に対する細胞傷害性効果

新しく生成されたCD123配列及び同じCD3結合配列からなる二重特異性抗体のT細胞結合効果を、フローサイトメトリーベースの細胞傷害性アッセイにより分析した。エフェクター細胞は、健常ドナーの全血から単離された初代T細胞であった。THP-1細胞を、CD123を発現する標的細胞として使用した。

【０９２４】

末梢血単核細胞(PBMC)を、EDTAで処理された健常ドナーの末梢血200 mlからFicoll密度遠心分離により単離された。15 ml Histopaque (Sigma-Aldrich)を50 ml Leucosepチューブ(Greiner bio-one)に予めロードした。血液をautoMACSリンス緩衝液＋1% BSA (Miltenyi Biotec)で希釈し、そして合計１０個の準備したチューブのメンブレンにロードした。チューブを連続して10分間1000 xgで遠心分離した。PBMCを集め、そしてautoMACSリンス緩衝液＋1% BSAで3回洗浄した。最後に、PBMCを、Pan T細胞単離キット(Miltenyi Biotec)を製造者の指示に従って使用してautoMACSpro技術によりTリンパ球の単離のためautoMACSランニング緩衝液(Miltenyi Biotec)中に再懸濁した。分離されたT細胞の純度を、ヒト7色免疫表現型検査キット(Miltenyi Biotec)を使用してMACSQuantフローサイトメトリーにより分析した。

【０９２５】

標的細胞(すなわち、THP-1細胞株)を15分間37℃にて1 ml RPMI＋GlutaMAX I＋10% FCS (Invitrogen)中1 μM CFSEを用いて染色した。2.5E4標的細胞を、96ウェルU底懸濁培養プレート(Greiner bio-one)において1ウェルあたり培地50 μlに播種した。

【０９２６】
単離された初代ヒトTリンパ球を、RPMI＋GlutaMAX Ｉ＋10% FCSに再懸濁し、そして示されたエフェクター対標的比で1ウェルあたり50 μｌを標的細胞に加えた(一般的にE:T=10:1)。
【０９２７】
二重特異性抗体をPBS(Invitrogen)で1:3連続希釈し、そしてそれぞれ5 μｌを細胞に最終最大濃度3000ng/mlで加えた。アッセイ混合物を20時間37℃で5% CO2中でインキュベートした。
【０９２８】
死滅した標的細胞を検出するために、全ての細胞を7-AADで染色した。従って、FBSを含む染色緩衝液(BD Pharmingen)で希釈された5 μg/ml 7-AADを各ウェルに加え、そして15分間4℃で暗所にてインキュベートした。細胞をそれぞれMACSQuant(Miltenyi Biotec)又はLSRII(BD)フローサイトメーターを使用して測定した。さらなるデータ解析をFlowJoソフトウェア(Tree Star、Inc.)を使用して行った。読み出しはCFSE及び7-AAD二重陽性細胞のパーセンテージであった。曲線をXLfit(Algorithm 205)により計算した。
【０９２９】
表１８に例示されるように、二重特異性抗体は、インビトロで初代T細胞に結合し、THP-1標的細胞を溶解することができた。死滅した標的細胞の抗体濃度依存性増加を、20時間のコインキュベーション後に検出することができた。本明細書に示される抗体について、12.2と429.3ng/mlとの間の範囲に及ぶEC50値が計算された。
【０９３０】
【表２１】

表 18：フローサイトメトリーベースの細胞傷害性アッセイにおいて検出された二重特異性 CODV-Fab CD123 x CD3 の T 細胞結合効果。曲線から計算された平均 EC50 値が示される

抗体	EC50 [ng/ml] 幾何平均 +/- SEM (n=4)	EC50 [nM] 幾何平均 +/- SEM (n=4)	n
CODV-Fab BFX-2B8-F3 x CD3	106,9 +/- 33,9	1420,5 +/- 450,2	4
CODV-Fab BFX-3E3-D3 x CD3	12,2 +/- 5,9	163,0 +/- 80,1	4
CODV-Fab BFX-6B10-E4 x CD3	39,7 +/- 17,9	529,1 +/- 237,7	4
CODV-Fab BFX-9B8-G6 x CD3	106,1 +/- 36,1	1410,2 +/- 479,8	4
CODV-Fab BFX-9D7-C8 x CD3	86,3 +/- 29,3	1148,6 +/- 390,5	4
CODV-Fab BFX-9F6-G3 x CD3	13,9 +/- 7,7	185,9 +/- 104,1	3
CODV-Fab BFX-3B10-E6 x CD3	429,3 +/- 82,6	5709,3 +/- 1099,0	2

【０９３１】
CD123クローン3E3を、抗CD3抗体 4B4のヒト化変異体とCODV-Fab形式で組み合わせた。インビトロでのそれらのT細胞結合効果及びT細胞を活性化する能力を分析した。
【０９３２】
細胞傷害性アッセイを上記のように行った。これらの構築物により媒介される初代T細胞のTHP-1標的細胞への溶解効果は、CODV-Fab hz4B4(4D_A)x3E3により表２０に例示され

る。細胞傷害活性を、７つの異なる健常ドナーから単離されたT細胞を用いて濃度依存性効果とともに確実に誘導することができた(表19)。

【０９３３】

【表２２】

表 19：フローサイトメトリーベースの細胞傷害性アッセイにおいて検出された二重特異性 CODV-Fab hz4B4(4D_A) x 3E3 の T 細胞結合効果。曲線から計算された平均 EC50 値が示される。

CODV-Fab	細胞傷害性 (THP-1)			細胞傷害性 (THP-1)		
	幾何平均 EC50 [pM] +/- SEM n=7			幾何平均 EC50 [ng/ml] +/- SEM n=7		
hz4B4(4D_A) x 3E3 CODV-Fab	26,5	+/-	5,9	2,0	+/-	0,5

【０９３４】

3.7 CD123xCD3 CODV-Fab又はDARTのT細胞活性化効果

安全性読み出しとしてのT細胞の活性化状態に対する二重特異性の効果を、以前に記載されたように、初代ヒトT細胞上の活性化マーカーCD25及びCD69の発現のフローサイトメトリーベースの検出により分析した。比較は、配列番号386の配列(WO2015026892に示される配列番号1である)の第一のポリペプチド鎖及びジスルフィド結合により互いに共有結合で結合された配列番号387の配列(WO2015026892に示される配列番号3である)の第二のポリペプチド鎖を含む、 WO2015026892に記載されるDART形式(本明細書では「MGD006」と呼ばれる)の単鎖CD123 x CD3二重特異性二特異性抗体（diabody）を含んでいた。

【０９３５】

CODV-Fabを単離されたT細胞のみとともにインキュベートした場合、後期活性化マーカーCD25の発現の有意な増加は、CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の表面上で検出できなかった(データは示されていない)。一方で、両方のT細胞サブセットでの初期活性化マーカーCD69の発現レベルの濃度依存性増加はなかった(表20)。従って、構築物は活性ではない(NA)と評価された。対照的に、THP-1標的細胞が加えられた場合、両方のマーカーの発現レベルの大きな増加が測定可能であった(CD25データは示されていない、CD69データ　表21)。

【０９３６】

【表２３】

表 20：フローサイトメトリーベースのアッセイにおいて CD69 発現レベルにより検出される、T 細胞の活性化状態に対する二重特異性 CD123 x CD3 CODV-Fab 又は DART の効果。T 細胞のみを用いるアッセイにおける 100nM 抗体濃度及び最小効果濃度での活性化 CD8 及び CD4 T 細胞の平均パーセンテージにより示される。

CODV-Fab	安全性 - 標的細胞無しの T 細胞活性化 n=3											
	PBS に対して正規化された CD4+/CD69+ % 活性化 C=100nM 平均+/- SEM			CD4+/CD69+ 最小効果-濃度 [pM] 平均+/- SEM			PBS に対して正規化された CD8+/CD69+ %活性化 C=100nM 平均+/- SEM			CD8+/CD69+ 最小効果-濃度 [pM] 平均+/- SEM		
hz4B4(4D_A)x3E3 CODV-Fab	14	+/-	2		NA		13	+/-	2		NA	
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	22	+/-	2				22	+/-	2			
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	18	+/-	4				15	+/-	2			
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	6	+/-	2				9	+/-	2			
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	82	+/-	9				83	+/-	4			

【０９３７】

表20に示される結果は、単鎖抗体(DART)が試験された条件下で標的細胞の存在しない場合に有意により高いT細胞活性化を引き起こすということを示す。

【０９３８】

【表２４】

表 21：フローサイトメトリーベースのアッセイにおいて CD69 発現レベルにより検出された T 細胞の活性状態に対する二重特異性 CODV-Fab hz4B4(4D_A) x 3E3 の効果。最大抗体濃度(Cmax)で、及び細胞傷害性アッセイにおける EC50 での抗体濃度での活性化された CD8 及び CD4T 細胞の平均パーセンテージを示す。アッセイを THP-1 標的細胞及び T 細胞のコインキュベーションを用いて行った。

CODV-Fab	安全性 - THP-1 標的細胞を用いた T 細胞活性化 n=3											
	PBS に対して正規化された CD4+/CD69+ % 活性化 C=平均 EC50 細胞傷害 平均+/- SEM			PBS に対して正規化された CD4+/CD69+ %活性化 Cmax 平均+/- SEM			PBS に対して正規化された CD8+/CD69+ % 活性化 C=平均 EC50 細胞傷害 平均+/- SEM			PBS に対して正規化された CD8+/CD69+ % 活性化 Cmax 平均+/- SEM		
hz4B4(4D_A)x3E3 CODV-Fab	71	+/-	4	84	+/-	2	69	+/-	6	82	+/-	4

【０９３９】

【表２５】

表 22：フローサイトメトリーベースのアッセイにおいて CD69 発現レベルにより検出された T 細胞の活性化状態に対する CODV 分子及び単鎖 Dart を含有する二重特異性完全ヒト化 7G3 の効果。細胞傷害アッセイにおける活性化 CD8 及び CD4 細胞の代表的な試験の EC50 値を示す。アッセイを THP-1 標的細胞及び T 細胞のコインキュベーションを用いて行った。

CODV-Fab	安全性 - THP-1 標的細胞を用いた T 細胞活性化	
	CD4+ T 細胞 (% CD69+ 細胞) EC50 (pM) n=1-6	CD8+ T 細胞 (% CD69+ 細胞) EC50 (pM) n=1-6
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	1.4	3.1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	3.2	9.9
hz20G6xhz7G3 CODV-OL1	1.0	3.3
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	1.0	3.5

【０９４０】

ヒト化CD3部分を有する新しいCD123抗体の細胞傷害性効果を評価するために、Fvの異なる組み合わせを含有するCODV-Fab「hz20G6x7G3」、「7G3xhz4B4」、「hz4B4x3E3」を生成した。対応する重鎖とのFcヘテロ二量体を形成するために、軽鎖でFcタグ化されている１つのFc含有変異体、CODV-Fab 「hz20G6x7G3-TL4」も生成した(TL4変異体)。二重特異性構築物のCD3ε/δ複合体及びCD123に対する親和性をBiacoreにより測定した。さらに、細胞傷害性アッセイを上記のように行い、そしてCD4+活性化及びCD8+活性化を測定した。

【０９４１】

【表２６】

表23：二重特異性CD123 x CD3 CODV分子の親和性及び活性。

二重特異性分子	KD (CD3e/d) [nM]	KD (CD123) [nM]	細胞傷害性アッセイ (THP細胞) EC50 [pM]	EC50細胞傷害でのCD69発現	
				% CD4+ 活性化	% CD8+ 活性化
hz20G6 x 7G3 CODV-Fab	5,0	0,6	30,9+3,6	73	66
7G3 x hz4B4 CODV-Fab	5,4	0,1	26,7+2,9	65	55
hz4B4 x 3E3 CODV-Fab	7,0	4,8	26,5+5,9	71	69
Fc タグ化変異体 TL4: hz20G6 x 7G3 CODV-Fab-TL4	13,9	1,7	16,7+10,1	73	74

【０９４２】

CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」、CODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」、CODV-Fab-OL1 「hz20G6xhz7G3」及び単鎖Dart MGD006の細胞傷害性効も評価した。各二重特異性構築物のCD3ε/δ複合体及びCD123に対する親和性をBiacoreにより測定した。さらに、細胞傷害性アッセイを上記のように行い、そしてCD4+活性化及びCD8+活性化を測定した。

【０９４３】

【表２７】

表24：二重特異性CD123 x CD3 CODV分子及びDART(MGD006)の親和性及び活性

二重特異性分子	KD (CD3e/d) [nM]	KD (CD123) [nM]	細胞傷害性アッセイ (THP細胞) EC50 [pM] n= 3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	9	0.2	2.1+/-0.2
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	11	0.2	1.0+/-0.1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	15	0,4	0.9+/-0.1
単鎖抗体DART形式 MGD006	9	0.2	0.3+/-0.04

【０９４４】

標的細胞の存在下(望ましい)及び存在しない場合(望ましくない)にT細胞活性化を誘発する分子の効力を評価するために、新しいアッセイが実施された。NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞(Promega #CS176403細胞)を、新しく単離されたヒトT細胞とともにエフェクター標的比1:1で37℃及び5% CO2にてRPMI 1640で、2 g/L(11 mM)グルコース、GlutaMAX、25 mM

HEPESとともに386ウェルプレートにおいてインキュベートした。５時間後、インキュベーションを停止し、そして発光をBio-Gloルシフェラーゼアッセイシステム、Promega #G7940を使用して発光HTSマイクロプレートリーダーで測定した

【０９４５】

【表２８】

表 25：Jurkat-NFAT-Luc-レポーター細胞株において測定された、CD123 x CD3 CODV 分子及び MGD006 により誘導された活性化としてのＴ細胞活性化

二重特異性分子	THP1 細胞を用いた EC50 (pM) n= 3	標的細胞無し 標的細胞を用いたアッセイにおける 最大活性化に関連する Cmax での 活性化(%) n= 3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	561±0.2	0.2±0.1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	444±0.2	0.4±0.3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	320±0.2	0.4±0.3
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	370±0.2	25.1±9.9

【０９４６】

表25に示される結果は、全ての抗体が標的細胞の存在下でnM未満のEC50値でレポーター細胞活性化を誘導することを示す。T細胞結合アプローチについては、T細胞活性化は、標的細胞の存在に制限されるはずである。標的細胞の存在しない場合は有意な発光シグナルがないので、これはCODV分子に見られる。対照的に、単鎖DART分子は、標的細胞の存在しない場合により高いレポーター細胞株活性化を誘導する。これらの結果は、初代T細胞で得られた結果と一致する。

【０９４７】

3.8 CD123xCD3二重特異性CODV-Fab-TL1及びCD123xCD3二重特異性CODV-Fabのインビボ抗腫瘍活性

材料及び方法

全血からのヒトPBMCおよびT細胞単離

PBMCを、ヒト健常ドナー全血からFicoll勾配遠心分離を用いて単離した。全血を滅菌リン酸緩衝化食塩水(PBS)で1:1希釈した。次いで、２体積の希釈された血液３５mLを、15 mL Ficoll-Paqueの存在下で２つの50 mL Falconチューブに入れた。これらのチューブを200gで40分間室温にて連続して遠心分離した。２つのバフィーコート層を回収し、そして滅菌PBS45 mLを含む６つの50 mL Falconチューブに入れて100gで１０分間の間に室温で連続して３回遠心分離した(各遠心分離の間に、上清を廃棄し、そしてPBS45 mLを加えた)。最後の遠心分離後に、２つのペレットを、50 mL FalconチューブでPBSにより完了した最終体積50 mLで一緒にした。総生存PBMC数を、Vicell計数により決定した。次いでペレットをAutomacsランニング緩衝液にMyltenyi Biotech(130-091-221)から回収し、そしてT細胞をPBMCからMiltenyi Biotech (130-091-156)からのネガティブ選択KIT及びAutomacsを使用して製造者の指示に従って単離した。精製したT細胞を回収し、そしてXvivo-15 5%HIS +peni-strepto1X培地中2.5 x10E+6細胞/mLで培養液に入れた。

【０９４８】

ヒトT細胞増幅

ヒト濃縮T細胞集団を活性化し、そしてインビトロで１４日間Miltenyi BiotechからのT

細胞活性化／増幅キット(130-091-441)を使用して増幅した。

【０９４９】

インビボ投与のためのヒトT細胞製造

細胞及び細胞培養培地を１０分間400gで遠心分離した。ペレットを滅菌PBS中2x10E+7細胞/mlの濃度で回収した。増幅されたT細胞からの活性化ビーズの除去を、Myltenyi Biotech (130-092-168)からのMACsiMAG分離器を使用して製造者の指示に従って行った。濃縮されたT細胞集団をVicell計数により計数し、そして50 mL Falconチューブ中で滅菌PBS25 mL中に回収した。400gでの１０分間室温での遠心分離の工程後に、細胞ペレットを適切な体積の滅菌PBS中に回収して最終濃度5x10E+7細胞/mLを得た。

【０９５０】

腫瘍モデル

CD123を発現するMolm-13ヒト急性骨髄性白血病細胞を、微生物及び細胞培養のLeibniz-institut DSMZ-Germanコレクション(DSMZ Braunshweig、Germany)から得た。細胞を培養(37℃、5% CO_2、湿度95%)でRPMI1640 Glutamax培地(ウシ胎児血清20%で満たした)で増殖させた。Molm-13細胞を、非複製的レンチウイルスにより保有されるルシフェラーゼベクター(SV40-PGL4-Puro － すなわち、ルシフェラーゼ2及びピューロマイシン抵抗性カセット配列に連結されたサルウイルス40プロモーターにあるルシフェラーゼベクター）で感染させた。

【０９５１】

Molm13-luc+腫瘍性細胞を、NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1WjI/SzJ NSGマウスに静脈内(IV)注射した(動物1匹あたり200μl PBS懸濁液中10E+6細胞)。24時間後、10E+7個のヒトT細胞を同じマウスに滅菌PBS体積0.2 mL化で腹腔内(IP)投与した。

【０９５２】

腫瘍移植3日後にベースライン生物発光画像法を、IVIS100撮像装置(PerkinElmer、Waltham、MA、USA)を使用してLiving Image 3.2画像入力ソフトウェア(Perkin-Elmer、Waltham、M、USA)を用いて行った。北米産ホタルルシフェリン（Beetle luciferin）カリウム塩(バッチ316019、Promega、Lyon、France) 120 mg/kg PBS溶液を、撮像15分前に動物にIP注射した。マウスをketamine(R)/Xylazine(R) (120 mg/kg；6 mg/kg IM、5 ml/kg)で撮像5分前に麻酔した。

【０９５３】

静脈内経路(IV)又は持続腹腔内注入(CIP)によるCODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」、CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」、CD123xCD3二重特異性DART競合物(単鎖抗体 DART形式MGD006又は本明細書で「DART-tool」と呼ばれる近いアナログ)又はPBSでの処置を、腫瘍移植の4日後に、表２６に概要を示されるように、骨において既に検出可能な樹立された腫瘍で開始した(CODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」)、表27(CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 IV)及び表28 (CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 CIP)。

【０９５４】

【表２９】

表 26：CD123xCD3 二重特異性 CODV-Fab-TL1 静脈内(IV)評価研究設計

処置群	用量 (nmol/Kg)	体積/注入経路	スケジュール	動物数
対照	-	-	-	7
CODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」	1.3	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	7
CODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」	0.13	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	8
CODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」	0.013	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	6
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	8
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	7

【０９５５】

【表３０】

表 27：CD123xCD3 二重特異性 CODV-Fab 静脈内(IV)評価研究設計

処置群	用量 (nmol/Kg)	体積/注入経路	スケジュール	動物数
対照	-	-	-	5
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	8
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」	0.13	0.2ml IV	Qd (4-13)	5
単鎖抗体 DART 形式 DART tool	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	8
単鎖抗体 DART 形式 DART tool	0.13	0.2ml IV	Qd (4-13)	7
CODV-Fab hz20G6x7G3	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	8

【０９５６】

【表３１】

表 28：CD123xCD3 二重特異性 CODV-Fab 持続腹腔内注入(CIP)評価研究設計

処置群	用量 (nmol/Kg/日)	体積/日 経路	スケジュール	動物数
ビヒクル	-	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	9
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」	3.9	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	9
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3	1.3	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	10
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	3.9	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	9
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	1.3	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	9
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	10
ビヒクル	-	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	10
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3	0.13	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	8
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3	0.013	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	8
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	0.13	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	8
単鎖抗体 DART 形式 MGD006	0.013	6μl/日 ip Alzet 1002	持続注入 (4-14)	9
CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	10

【０９５７】

DATA収集及び有効性基準

治療の影響を追跡するために、動物体重をアッセイの３日目から終了までモニタリングした。20%の体重減少又は連続した３日間15%の体重減少又は10%又はそれ以上の薬物関連死を生じる投薬量を、過剰に毒性の投薬量とみなした。動物体重は腫瘍質量を含んでいた。

【０９５８】

腫瘍負荷の後に非侵襲性生物発光画像法(BLI)を行った。ベースラインBLIを、腫瘍移植の３日後、処置の２４時間前に行った。動物を、全身生物発光シグナルに基づいて異なる群で屠殺した。腫瘍成長を、腫瘍移植後7日、10日及び14日めに全ての身体及び後肢の長骨においてBLIシグナル測定により追跡した。長骨シグナルをセグメンテーションにより測定し、そしてこれは近隣の局所シグナル(例えば、遅い時点での軟組織における残留シグナル)により影響を受け得る。処置された群を、Molm13-luc+ 播種性腫瘍及びヒトT細胞を保有する対照動物と比較した。

【０９５９】

主要有効性評価項目は、処置群と対照群との間のベースラインからの腫瘍シグナル変化の比(dT/dC)、部分的腫瘍退縮(PR)の数及び完全腫瘍退縮 (CR)の数であった。

【０９６０】

生物発光シグナル曲線に基づく経時的腫瘍成長(Phot/秒で表される)を、各処置群の各

動物についてモニタリングし、そして全ての身体及び骨セグメント化シグナルについて曲線 ± MAD中央値として表した。腫瘍生物発光シグナルの変化を、特定の観察日の腫瘍シグナルから最初の処置（進行度診断日）の腫瘍シグナルを差し引くことにより、各対照(C)又は処置された(T)動物について、及び各日について計算した。T中央値を処置群について計算し、C中央値を対照群について計算した。

【０９６１】

次いで、比T/Cを計算し、そしてパーセンテージで表す：

dT/dC ＝［（T中央値 観察日 － T中央値 3日目）/（C中央値 観察日 － C中央値 3日目）］x 100

【０９６２】

実験の終わり(14日）のdT/dCが42%より低い場合にその用量を治療上活性であるとみなし、そして10％より低い場合に非常に活性とみなす。

【０９６３】

腫瘍退縮パーセントを、処置の最初の日のそのシグナルと比較した、特定の観察日の処置群における腫瘍シグナル減少の％定義する。特定の時点で、かつ各動物について、退縮%を以下のように計算した:

【数１】

$$\text{退縮\%（t での）} = \frac{\text{シグナル}_{t0} - \text{シグナル}_{t}}{\text{シグナル}_{t0}} \times 100$$

【０９６４】

ルシフェリン動力学及び可能なIP（誤注入）に起因するシグナル変動性のリスクを考慮して、動物についてのシグナル退縮は、少なくとも２つの連続した時点で観察された場合にのみ真の腫瘍退縮とみなす。

【０９６５】

部分的退縮(PR)：腫瘍シグナルが２つの連続した時点で処置の開始時のシグナル未満に腫瘍シグナルが減少し、１つがベースラインシグナルの50%より上である場合に、退縮は部分的と定義される。

【０９６６】

完全退縮(CR)：腫瘍シグナルが２つの連続した時点について処置の開始時のシグナルより５０％より多くまで減少する場合に、退縮は完全と定義される。

【０９６７】

統計分析

IV経路化合物評価

処置の各群の個々の生物発光シグナルを、日ごとの反復測定を用いて両側anovaに従う多重度対比較についてBonferroni-Holm調整を使用して他と比較した：p>0.05：NS、0.05 > p > 0.01：*、p<0.01：**。統計分析を、全ての身体生物発光シグナル及び長骨生物発光シグナルの両方について行った。

【０９６８】

CIP経路化合物評価

CODV-Fab「hz20G6xhz7G3」CIP経路評価は、２つの独立した研究をもたらした(高投薬量での化合物に関する第一の研究、低投薬量についての第二の研究、両方の研究がビヒクル対照群及びCODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 1.3nmol/kg IV Qdポジティブコントロール群を含む)。各日の各マウスの生物発光シグナルの統計分析を、同じ実験の同じ日にビヒクル群の生物発光シグナルの平均によりデータ正規化した後に行った(プールしたビヒクル対照 n=19；プールしたポジティブコントロール n=20)。各処置群の個々の正規化された生物発光シグナルを、日ごとの反復測定を用いて両側anovaに従う多重度対比較についてBonferroni-Holm調整を使用して他と比較した：p>0.05：NS、 0.05 > p > 0.01：* 、p<0.01：**。統計分析を、全ての身体生物発光シグナル及び長骨生物発光シグナルについて行った。

【０９６９】
結果
CD123xCD3二重特異性CODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」 IV
ヒトT細胞の存在下での完全ヒトCODV-Fab-TL1 「hz20G6xhz7G3」 IV Q3dは、全ての試験された用量(1.3、0.13及び0.013 nmol/Kg Q3d)で、全身においてそれぞれ20%、14%及び38%のdT/dCでMolm13腫瘍成長を阻害し(図5及び7)、そして全ての試験された用量でそれぞれ4/7CR、6/8CR及び2/6CRで長骨における腫瘍退縮と関連していた(図6及び8)。
【０９７０】
完全ヒトCODV-Fab-TL1「hz20G6xhz7G3」最大応答を全身及び骨において0.13 nmol/kg Q3dで得た。この用量で、活性は、DART 1.3 nmol/kg IV Qdと統計的に異ならず(1/7CRで全身 dT/dC 29%及び長骨において1/7PR)、そしてCODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 1.3 nmol/kg IV Qdと等価であった(全身において1/8CR及び長骨において1/8PRで dT/dC 23%腫瘍退縮)。データを末端病理組織学分析により確認した(示されていない)。
【０９７１】
全身と長骨との間で観察された差異は、IV注射後の髄外腫瘍転移と連続した卵巣及び腹部脂肪における残留腫瘍成長に関連付けられる。
【０９７２】
CD123xCD3二重特異性CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 IV
ヒトT細胞の存在下での完全ヒトCODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 IVは、全ての試験された用量(1.3及び0.13 nmol/Kg Qd4-13)でそれぞれ14%及び39%のdT/dCで腫瘍成長を阻害し(図9及び11)、腸骨では5/8 CRで1.3 nmol/kgの腫瘍退縮を伴っていた(図10及び12)。
【０９７３】
DART 1.3 nmol/kg IV Qd4-13は、全身dT/dC 29%及び長骨において3/8CRの腫瘍退縮で腫瘍成長を阻害し、CODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 1.3 nmol/Kg IVと有意に異なるものではなかった。DARTは、長骨において1/7PR腫瘍退縮にも関わらず、全身腫瘍シグナルの0.13 nmol/Kg IV Qd4-13 (dT/dC 62%)での阻害について不活性であった。有意な差異は、研究の終わりに完全ヒトCODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」の同じ用量で観察されなかった。1.3 nmol/kg iv QD4-13の同じ投薬量で投与された場合に、完全ヒトCODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」と部分的にヒト化されたCODV-Fab hz20G6x7G3化合物との間に統計的な差異を見ることはできなかった：この用量で、CODV-Fab hz20G6x7G3は、dT/dC 34%で全身腫瘍成長を阻害し、長骨における腫瘍退縮を伴っていた(1/8CR及び1/8PR)。
【０９７４】
全身と長骨との間で観察された差異は、IV注射後の髄外腫瘍転移と連続した卵巣及び腹部脂肪における残留腫瘍成長に関連付けられる。
【０９７５】
CD123xCD3二重特異性CODV-Fab CIP
完全ヒトCODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 CIPは、ヒトT細胞の存在下で、全身腫瘍成長を3.9、1.3及び0.13 nmol/Kg/日 CIP4-14で阻害し、そして全身においてそれぞれ2%、3%、21%、及び57%のdT/dCで0.013 nmol/kg/日にて不活性であった(図13及び15)。これは、3.9、1.3、及び0.13 nmol/kgで長骨においてそれぞれ5/9CR 3/9PR、6/10CR 1/10PR及び7/8CRで腫瘍退縮を伴っていた(図14及び16)。
【０９７６】
DART 3.9、1.3、及び0.13 nmol/kg/日 CIP4-14（しかし0.013 nmol/kg/日ではない）は、全身腫瘍成長をそれぞれ21%、5%、21%及び46%のdT/dCで阻害し(図13)、長骨では3.9、1.3、及び0.13 nmol/kgでぞれぞれ3/9 CR 3/9PR；8/9CR；及び4/8CR 2/8PRの腫瘍退縮を誘導した(図14)。
【０９７７】
完全ヒトCODV-Fab 「hz20G6xhz7G3」 1.3 nmol/kg IV Qd4-13は、全身においてdT/dC 4%及び5%で(それぞれ第一及び第二の研究)腫瘍成長を阻害し、長骨における腫瘍退縮を伴っていた(第一の研究及び第二の研究においてそれぞれ8/10CR 1/10PR 対 8/10 CR)。

【図１－１】

```
4E7-C9VH        EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNNYAT 60
18F5-H10VH      EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFTNAWMHWVRRSPEKQLEWVAQIKDKSNNYAT 60
11F3-B9VH       EVQLVETGGSLVQPGKSLTLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
16F8-A7VH       ----VETGGNLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 56
13H2-C2VH       EEELVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPDKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
4B4-D7VH        EVQLVETGGRLVQPGRSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKARSNNYAT 60
20G6-F3VH       EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFTKAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNSYAT 60
13C1-F6VH       EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
11F9-F8VH       EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
10E6-G6VH       EVQLVETGGGLVQSGKSLKLTCATSGFTVTNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYET 60
11H3-E5VH       EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
12G3-E8VH       EVRVVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSLAWMHWVRQSPEKKLEWVAQIKDKANNYAT 60
5B1-G2VH        EVQVVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFSFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKANNYAT 60
11D7-C3VH       EVQFVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
10F4-C10VH      EVQLVETGGSLVQPGKSLKITCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
3H6-D2VH        EVQLVETGGRLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNNYAT 60
18G9-H11VH      EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWIQWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
1E6-C9VH        EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSYAWMHWVRQSPDKQLQWVAQIKAKSNNYAT 60
20B5-F10VH      EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYAT 60
20E5-F10VH      EVQLVETGENLVQPGKSLRLTCATSGFSFSNAWMHWIRQSPEKQLEWVAQIKDKSNNYAT 60
                    ****  ***.*:** :*******:.: **::*:*:**:*:*:****** ::*.* *
```

【図１－２】

```
4E7-C9VH        YYAESLKGRFTISRDDPKRSIYLQMNSLREEDTAIYYCRY-VHYG--IGYAMDAWGQGTS VTVSS 122
18F5-H10VH      YYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLQMNSLKEEDTAIYYCRY-VHYR--FAYALDAWGRGTS VSVSS 122
11F3-B9VH       YYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRY-VNYG---LAPMDVWGQGTS VTVSS 122
16F8-A7VH       YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRY-VNYG---LAPMDVWGQGTS VTVSS 122
13H2-C2VH       YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLKEEDTAIYYCRY-VHYG---LAPMDAWGQGTS VTVSS 121
4B4-D7VH        YYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYCRG-TYYA---SKPFDYWGQGVM VTVSS 117
20G6-F3VH       YYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYCRG-VYYA---LSPFDYWGQGVM VTVSS 121
13C1-F6VH       YYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLQLNSLREEDTAIYYCRG-TQYG---YNPFDYWGQGVM VTVSS 121
11F9-F8VH       YYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLQLNSLREEDTAIYYCRG-TQYG---YNPFDYWGQGVM VTVSS 121
10E6-G6VH       YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRG-TQYG---YNPFDYWGQGVM VTVSS 121
11H3-E5VH       YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRG-TYYA---YKPFDYWGQGVM VTVSS 121
12G3-E8VH       YYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNRLKEEDTAIYYCRG-VYYGF-SMTPFDYWGQGVM VTVSS 121
5B1-G2VH        YYAESVKGRFTISRDDSKGSIYLQMNSLKEEDTAVYYCRG-LYYG---LFPSDYWGQGVM VTVSS 121
11D7-C3VH       YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTATYYCRG-LYYG---LSPSDYWGQGVM VTVSS 123
10F4-C10VH      YYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLQMNSLKEEDTAIYYCRA-VNYG---NYPLDYWGQGVM VTVSS 121
3H6-D2VH        YYAESVKGRFTISRDDSKSIIYLQMNSLKEEDTAIYYCRALTYYGY-KRDAMDGWGHGTS VTVSS 121
18G9-H11VH      YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTALYYCTWRHYYS---SHTMDAWGQGTL VTVSS 121
1E6-C9VH        YYAESVEGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRG-VYYG---LLGLDAWGQGTS VTVSS 124
20B5-F10VH      YYAESVKGRFTISRDDSISSVYLQMNNLKEEDTAIYYCRG-VYYG---FLGMDAWGQGTS VTVSS 122
20E5-F10VH      YYAESVNGRFTISRDDSKSSIYLHMDNLKEEDSAIYYCRY-VHYGVRFFYTMDVWGQGTS VTVSS 124
                *****::*********.  :**::: *:***:* ***      *         * **:*.  *:***
```

【図２－１】

```
11D7-C3VL       DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
1E6-C9VL        DVVMTQTPVSLSVRLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWFLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
20B5-F10VL      DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQRLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLVYKVSNRF 60
4B4-D7VL        DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQRPGQSPQVLIYKVSNRF 60
11H3-E5VL       DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGQSPQVLIYKVSNRF 60
11F9-F8VL       DVVLTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWSLQKPGQSPQVLIYKVSNRF 60
20G6-F3VL       DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRF 60
20E5-F10VL      DVVMTQTPVSLSVSLGDQVSISCRPSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPHPLIYKVSNRF 60
13H2-C2VL       DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKAGQSPQLLIYKVSNRF 60
3H6-D2          DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
18G9-H11VL      DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
10F4-C10VL      DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWCLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
11F3-B9VL       DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
16F8-A7VL       DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
18F5-H10VL      DVLMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHTNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRL 60
12G3-E8VL       DVAMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQVLIYKVSNRF 60
4E7-C9VL        DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLEHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQPLIYKVSNRF 60
5B1-G2VL        DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLLKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
13C1-F6VL       DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQRSGQSPQLLIYKVSNRL 60
10E6-G6VL       DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGYTYLSWYLQKPGQSPQVFIYKVSNRF 60
                ** :**:****** **.*******.** * * ** ***** * :.****: ::******:
```

【図２－２】

```
11D7-C3VL       SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTHYPFTFGSGTKLEIK 112
1E6-C9VL        SGISDRFSGSASGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTHYPFTFGSGTKLEIK 112
20B5-F10VL      SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTEYPFTFGSGTKLEIK 112
4B4-D7VL        SGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK 112
11H3-E5VL       SGTSDRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK 112
11F9-F8VL       SGISNRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGAHYPFTFGSGTKLEIK 112
20G6-F3VL       SGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVDPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK 112
20E5-F10VL      SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK 112
13H2-C2VL       SGISDRFSGSGSGTDFILKISRVEPDDLGVFYCGQGTQYPFTFGAGTKLELK 112
3H6-D2          SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGAGTKLELK 112
18G9-H11VL      SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVAPTDLGVYYCGQGSQYPFTFGAGTKLELK 112
10F4-C10VL      SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGAGTKLELK 112
11F3-B9VL       SGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGAGTKLELK 112
16F8-A7VL       SGFSDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGAGTKLELK 112
18F5-H10VL      SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTHYPFTFGAGTKLELK 112
12G3-E8VL       SGISDRFSGSGSGADFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGAGTKLELK 112
4E7-C9VL        SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGPGTKLELK 112
5B1-G2VL        SGISDRFSGGGSGTDFTLKISRLEPDDLGIYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK 112
13C1-F6VL       SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRIEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTRLEIK 112
10E6-G6VL       SGISDRFSGSGSGTDFTLKISRIEPDDLGVYYCGQGTHYPFTFGSGTKLEIK 112
                ** *:**:*..**:** *****: * ***::*****:.******.**:**:*
```

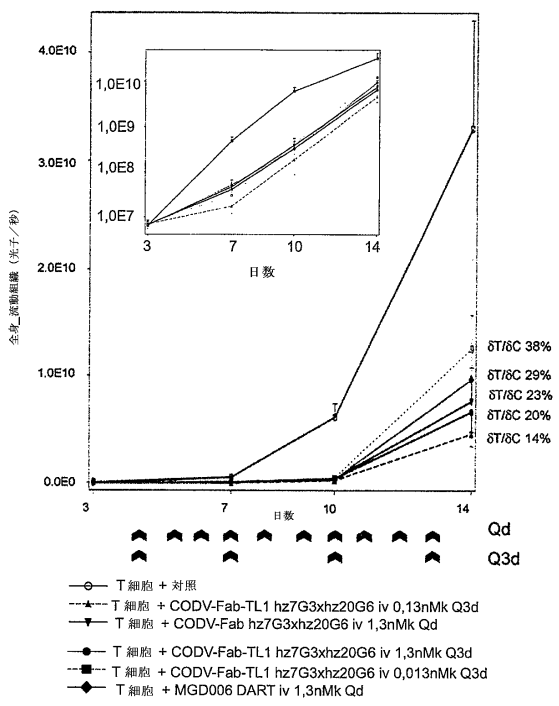
【図３】

```
1E1-G5VH     QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAFGYTFTDHIIHWVKQSHGKSLEWIGYINPYSGGTNY 60
9F6-G3VH     QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKASGYTFTDYIIHWVKQSHGKSLEWIGYINPYSDGTNY 60
8B11-B7VH    QVQLQESGPTLVNPGDSVKMSCKASGYTFTDHIIHWVKQSHGKSLEWIGYINPYSGGANY 60
6D6-B8VH     QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKASAYTFTDNIIHWVKQSHGKSLDWIGYINPYSGGTNY 60
             ************** .***** ********************;*********.*:**

1E1-G5VH     NEKFKSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSEDSAICYCALNYGSYYAMDAWGQGTSVTVSS 119
9F6-G3VH     NEKFKSKATLTVDKSTSTAYMEFSRLTSEDSAIYFCALNYGSYYAMDAWGQGTSVTVSS 119
8B11-B7VH    NGKFKSKATLTIDKSSSTAYMEFSRLTSGDSAIYYCALNYGSYYAMDAWGQGTSVTVSS 119
6D6-B8VH     NGWFRSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSDDSAIYYCALNYGSYYAMDAWGQGTSVTVS- 118
             *  *:*******:***:*************** **** :*************************

6D6-B8VL     DIQMTQSPASLSASLGETVTIDCRPSEDIFNNLAWYQQKPGNSPQLLIYDANSLADGVPS 60
9F6-G3VL     DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRPSEDIHSNVAWYQQKPGNSPQLLIYDASNLADGVPS 60
1E1-G5VL     DIQMTQSPASLSASLGQTVTIECRPSEDIYSNLAWFQQKPGSSPQLLIYDANNLADGVPS 60
8B11-B7VL    DIQMTQSPASLSASLGETVTIECRTSKDIYSNLAWFQQRPGNSPQLLIYDASNLADGVPS 60
             ************************.****:**.*:**:..*:**:**:**.**********..********

6D6-B8VL     RFSGSGSGTQYSLMIIRLQSEDVASYFCHQYNIYPYTFGAGTKLELK 107
9F6-G3VL     RFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCHQYNIYPYTFGSGTKLELK 107
1E1-G5VL     RFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQQYNKYPYTFGTGTKLELK 107
8B11-B7VL    RFSGSGSGTQYSLQINNLQSEDVASYFCHQYNNYPYTFGTGTKLELK 107
             ********** *  ***********;*** ******;********
```

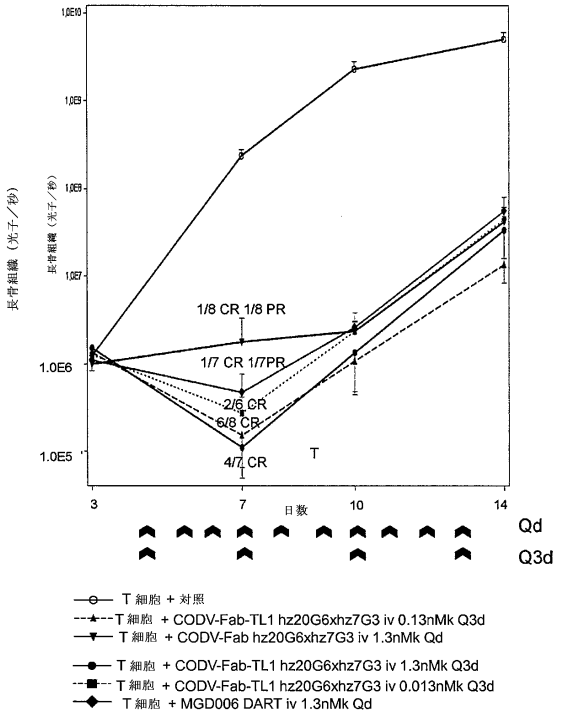
【図４】

```
9B8-G6VH     EVKLQESGPSLVQSSQTLSLTCTVSGFSLTSYHIHWVRQPPGKGLEWMGVMWSDGDTSYS 60
9D7-C8VH     EVKLQESGPSLVQSSQTLSLTCTVSGFSLTSYHIHWVRQTPGKGLEWMGVMWSDGDTSYN 60
6C10-C4VH    EVKLQESGPSLVQPSETLSLTCTVSGFSLTSYSVHWVRQHSGKSLEWMGRMWNDGDTSYN 60
             ********** .*:********************** :***** .**.***** **.******.

9B8-G6VH     SALKSRLSISRDTSQSQVFLKMNSLQTEDTATYYCARGDYSSYIYLWFAYWGQGTLVTVS S 121
9D7-C8VH     SALKSRLSISRDTSQSQVFLKMNSLQTEDTATYYCARGTYSSYILYLWFAYWGQGTLVTVS S 121
6C10-C4VH    SAFTSRLSISRDTSKGQVFLKMNSLQTEDTGTYYCARGHRTP-----FDYWGQGVMVTVS S 116
             **:.**********:.*********.*******  :.    * *****.:**** *

6C10-C4VL    DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSSQSFLSSGDERNYVAWYQHKPGQSPKLLIYWASTR 60
9B8-G6VL     DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSSQSFLSSGDERNYVAWYQHKPGQSPKLLIYWASTR 60
9D7-C8VL     DIVMTQSPSSLAVSEGETVTINCKSSQSFLSSGDGKNYVAWYQYKPGQSPKLLIYWASTR 60
             ********** ********************** :*******:*****************

6C10-C4VL    HSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQQYYDTPLTFGSGTKLEIK 113
9B8-G6VL     HSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQQYYDTPLTFGSGTKLEIK 113
9D7-C8VL     QSGVPDRFIGSGSGTDFTLTISTVQAEDLAIYYCQQYYDTPLTFGSGTKLEIK 113
             :*********************.:*********************************
```

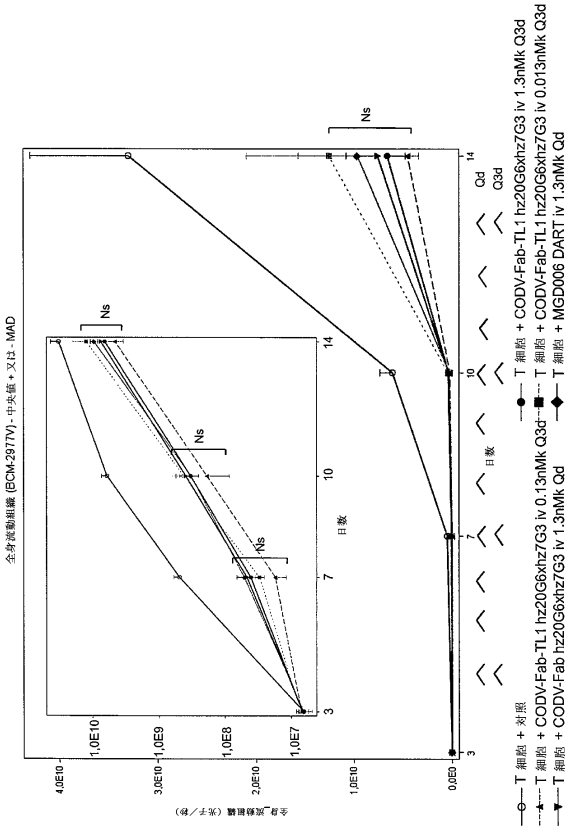
【図５】



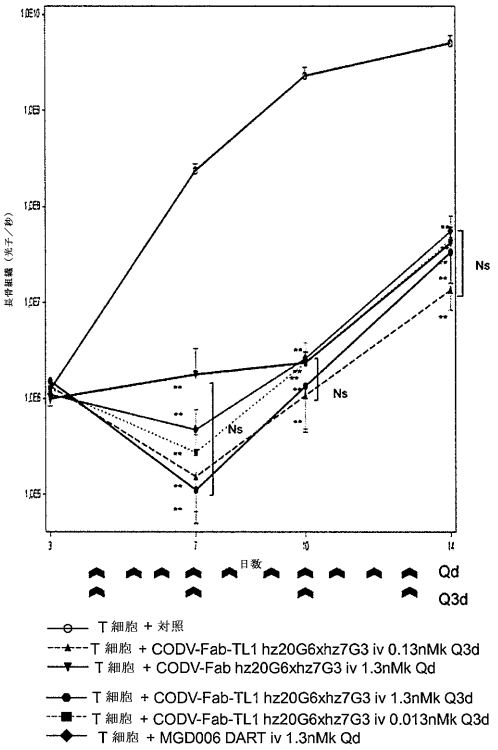
【図６】



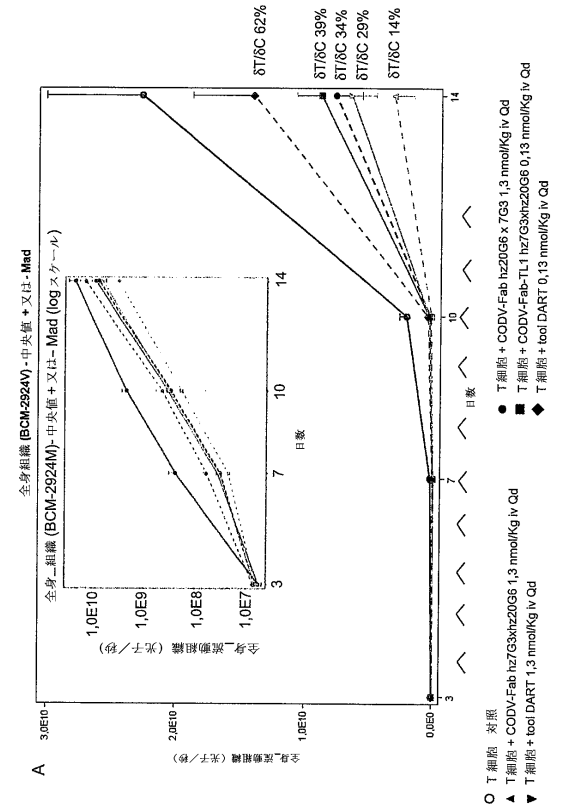
【図７】


全身_腫瘍組織 (光子／秒)
全身_正常組織 (光子／秒)
日数
Ns
Qd
Q3d
T 細胞 + 対照
T 細胞 + CODV-Fab-TL1 hz20G6xhz7G3 iv 0.13nMk Q3d
T 細胞 + CODV-Fab-TL1 hz20G6xhz7G3 iv 1.3nMk Q3d
T 細胞 + CODV-Fab-TL1 hz20G6xhz7G3 iv 0.013nMk Q3d
T 細胞 + CODV-Fab hz20G6xhz7G3 iv 1.3nMk Qd
T 細胞 + MGD006 DART iv 1.3nMk Qd

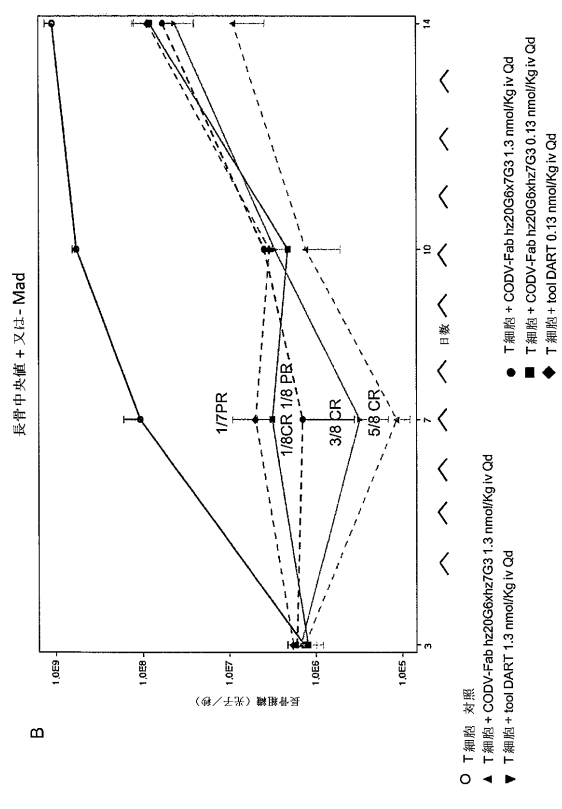
【図８】


長骨組織 (光子／秒)
日数
Ns
Qd
Q3d
T 細胞 + 対照
T 細胞 + CODV-Fab-TL1 hz20G6xhz7G3 iv 0.13nMk Q3d
T 細胞 + CODV-Fab hz20G6xhz7G3 iv 1.3nMk Qd
T 細胞 + CODV-Fab-TL1 hz20G6xhz7G3 iv 1.3nMk Q3d
T 細胞 + CODV-Fab-TL1 hz20G6xhz7G3 iv 0.013nMk Q3d
T 細胞 + MGD006 DART iv 1.3nMk Qd

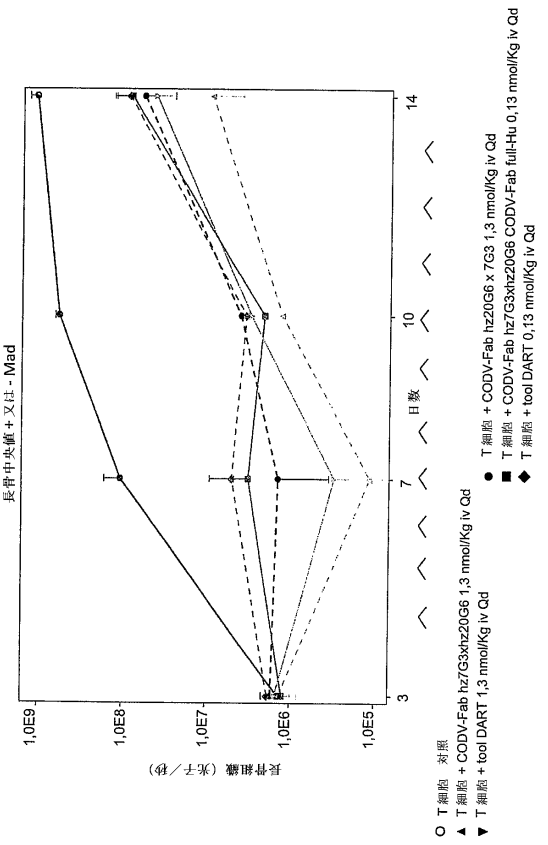
【図９】


A
全身_腫瘍組織 (光子／秒)
全身_正常組織 (光子／秒)
日数
δT/δC 62%
δT/δC 39%
δT/δC 34%
δT/δC 29%
δT/δC 14%
T 細胞 対照
T 細胞 + CODV-Fab hz20G6 x 7G3 1,3 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + CODV-Fab hz7G3xhz20G6 1,3 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + CODV-Fab-TL1 hz7G3xhz20G6 0,13 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + tool DART 1,3 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + tool DART 0,13 nmol/Kg iv Qd

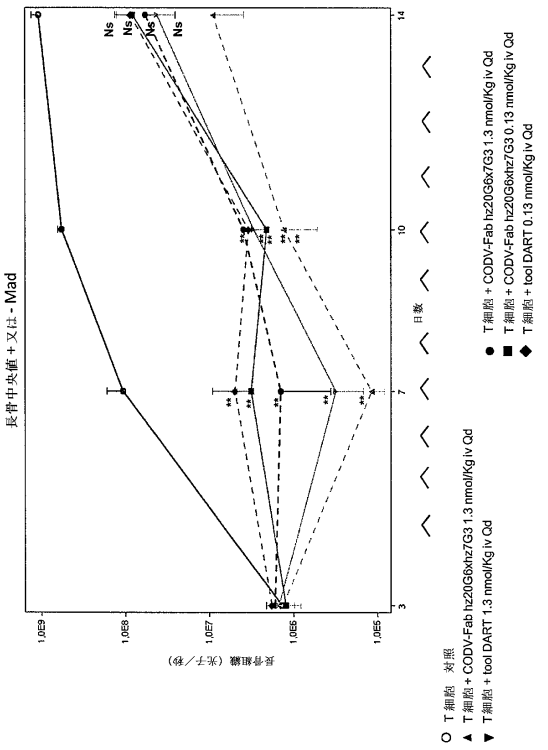
【図１０】


B
長骨中央値 + 又は - Mad
長骨組織 (光子／秒)
日数
1/7PR
1/8CR 1/8 PR
3/8 CR
5/8 CR
T 細胞 対照
T 細胞 + CODV-Fab hz20G6xhz7G3 1.3 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + CODV-Fab hz20G6x7G3 1.3 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + CODV-Fab hz20G6xhz7G3 0.13 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + tool DART 1.3 nmol/Kg iv Qd
T 細胞 + tool DART 0.13 nmol/Kg iv Qd

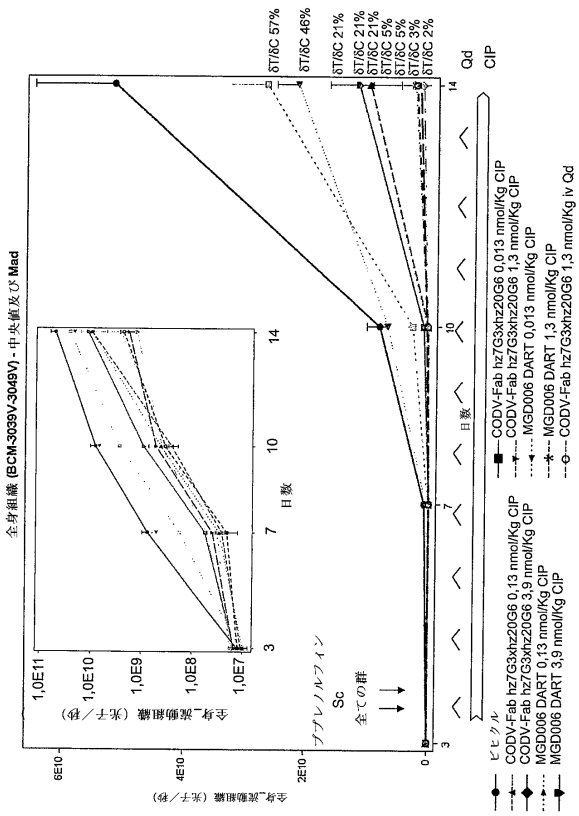
【図１１】



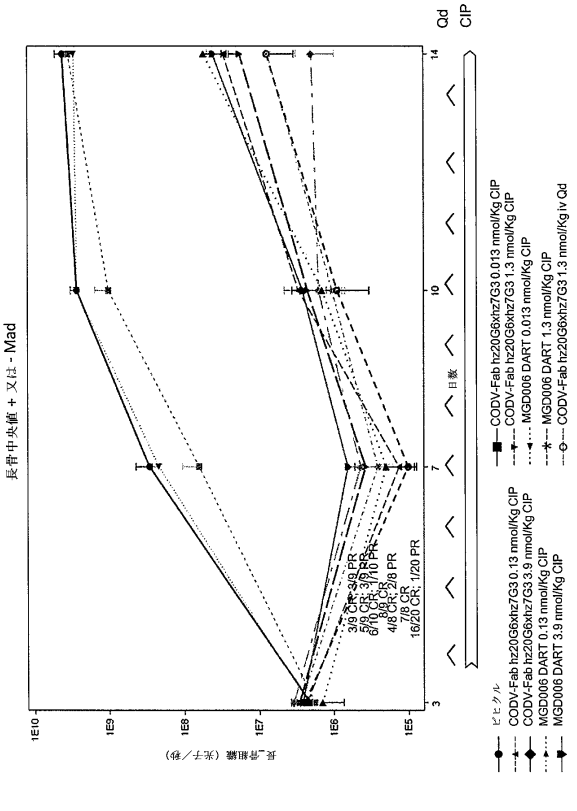
【図１２】



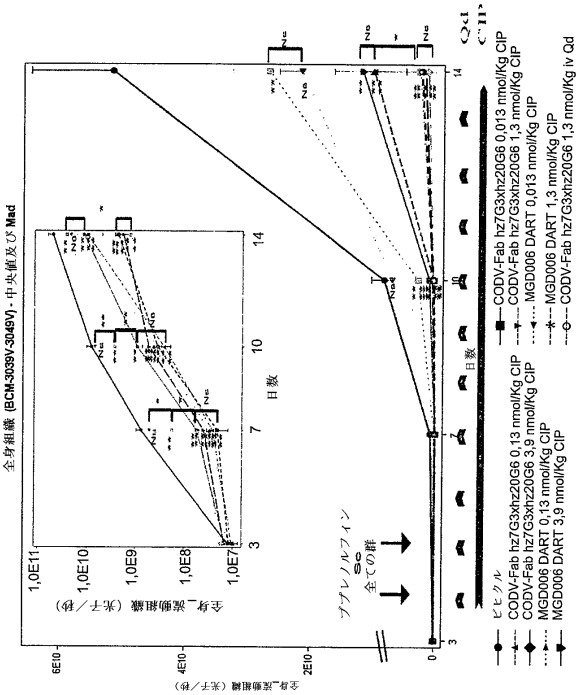
【図１３】



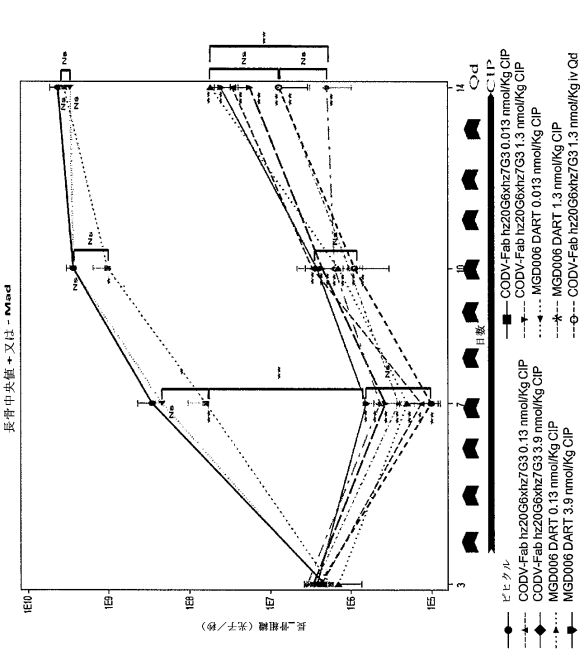
【図１４】



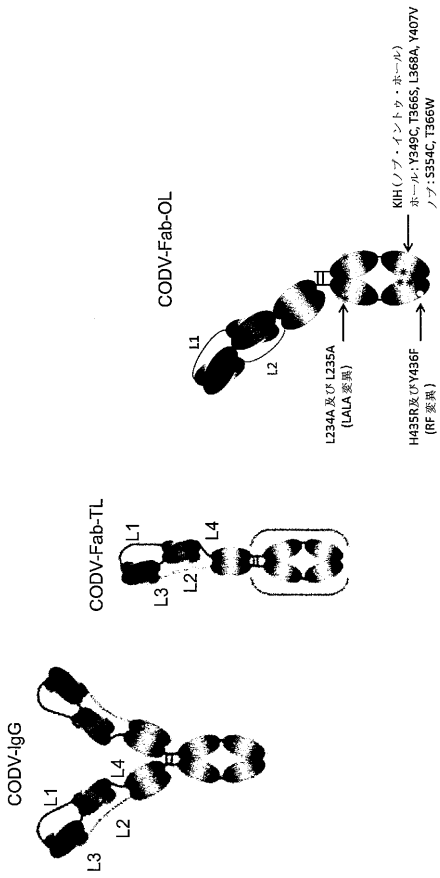
【図１５】


全身組織 (BCM-3039V-3049V) - 中央値及び Mad
全身_蛍光強度 (光子／秒)
日数
ブプレノルフィン
sc
全ての群
Qd
CIP
ビヒクル
CODV-Fab hzTG3xhz20G6 0,13 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hzTG3xhz20G6 3,9 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 0,013 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 0,13 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 3,9 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hz7G3xhz20G6 0,013 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hz7G3xhz20G6 1,3 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 0,013 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 1,3 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hz7G3xhz20G6 1,3 nmol/Kg iv Qd

【図１６】


長骨中央値 + 又は - Mad
長_骨組織 (光子／秒)
日数
Qd
CIP
ビヒクル
CODV-Fab hz20G6xhz7G3 0,13 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hz20G6xhz7G3 3,9 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 0,13 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 3,9 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hz20G6xhz7G3 0,013 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hz20G6xhz7G3 1,3 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 0,013 nmol/Kg CIP
MGD006 DART 1,3 nmol/Kg CIP
CODV-Fab hz20G6xhz7G3 1,3 nmol/Kg iv Qd

【図１７】


CODV-IgG
L1
L2
L3
L4
CODV-Fab-TL
CODV-Fab-OL
KIH（ノブ・イントゥ・ホール）
ホール：Y349C, T366S, L368A, Y407V
ノブ：S354C, T366W
L234A及びL235A
(LALA 変異)
H435R及びY436F
(RF 変異)

【配列表】
0006817211000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C07K	***16/46***	***(2006.01)***	C07K	16/46	
A61K	***39/395***	***(2006.01)***	A61K	39/395	N
A61P	***35/00***	***(2006.01)***	A61K	39/395	T
A61P	***35/02***	***(2006.01)***	A61P	35/00	
G01N	***33/574***	***(2006.01)***	A61P	35/02	
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	G01N	33/574	D
			C12P	21/08	

(72)発明者 ヤーナ・アルブレヒト
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 セドリック・バリエール
フランス国７５００８パリ．リュ・ラ・ボエテイ５４．パテント・デパートメント．サノフィ
(72)発明者 クリスティアン・バイル
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 ヨーヘン・ベニンガ
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 シャンタル・カレー
フランス国７５００８パリ．リュ・ラ・ボエテイ５４．パテント・デパートメント．サノフィ
(72)発明者 シュテファーヌ・グーリフ
フランス国７５００８パリ．リュ・ラ・ボエテイ５４．パテント・デパートメント．サノフィ
(72)発明者 カチャ・クロール
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 クリスティアン・ランゲ
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 センドリーヌ・レモイーヌ
フランス国７５００８パリ．リュ・ラ・ボエテイ５４．パテント・デパートメント．サノフィ
(72)発明者 ヴルフ－ディルク・ロイシュナー
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 エルコーレ・ラオ
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 マーリオン・シュナイダー
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．
(72)発明者 マリー－セシール・ヴェッツェル
フランス国７５００８パリ．リュ・ラ・ボエテイ５４．パテント・デパートメント．サノフィ
(72)発明者 ペーター・ヴォネロー
ドイツ連邦共和国６５９２６フランクフルト．パテント・デパートメント．サノフィ－アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ベー・ハー．

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 特表２０１０－５２４８５１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／１２９２７０（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／１９１１１３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１３／１７３８２０（WO，Ａ１）
国際公開第２０１１／１０９５８８（WO，Ａ１）
MARRELLA, V. et al., Anti-CD3ε mAb improves thymic architecture and prevents autoimmune manifestations in a mouse model of Omenn syndrome: therapeutic implications, IMMUNOBIOLOGY, ２０１２年 ８月 ２日, Vol.120, No.5, p.1005-1014
ALIBAUD, L. et al., A New Monoclonal Anti-CD3ε Antibody Reactive on Paraffin Sections, The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, ２０００年, Vol.48, No.12q, p.1609-1616
KUO, Shu-Ru et al., Engineering a CD123×CD3 bispecific scFv immunofusion for the treatment of leukemia and elimination of leukemia stem cells, Protein Engineering, Design & Selection, ２０１２年 ６月２７日, Vol.25, No.10, p.561-569
STEIN, C. et al., Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells, british journal of haematology, ２０１０年 １月 ８日, Vol.148, p.879-889
KASTRUP, J. et al., In Vitro Production and Characterization of Partly Assembled Human CD3 Complexes, Scand. J. Immunol, ２００２年, Vol.56, p.436-442

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ １６／２８
Ａ６１Ｋ ３９／３９５
Ａ６１Ｐ ３５／００
Ａ６１Ｐ ３５／０２
Ｃ０７Ｋ １６／４６
Ｃ１２Ｎ １／１５
Ｃ１２Ｎ １／１９
Ｃ１２Ｎ １／２１
Ｃ１２Ｎ ５／１０
Ｇ０１Ｎ ３３／５７４
Ｃ１２Ｐ ２１／０８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）