(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-513714
(P2025-513714A)
(43)公表日　令和7年4月30日(2025.4.30)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA　4B065
C07K 16/46	*(2006.01)*	C07K	16/46	4C085
C12N 15/13	*(2006.01)*	C12N	15/13	4H045
C12N 15/63	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z
C12N 1/15	*(2006.01)*	C12N	1/15	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全103頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-556078(P2024-556078)
(86)(22)出願日　令和5年3月21日(2023.3.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年11月19日(2024.11.19)
(86)国際出願番号　PCT/EP2023/057248
(87)国際公開番号　WO2023/180346
(87)国際公開日　令和5年9月28日(2023.9.28)
(31)優先権主張番号　22163663.2
(32)優先日　令和4年3月22日(2022.3.22)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　316005432
モルフォシス・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング
ＭｏｒｐｈｏＳｙｓ　ＧｍｂＨ
ドイツ８２１５２プラネック、ゼンメルヴァイスシュトラーセ７
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口 昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤 和彦
(72)発明者　ムースメイヤー，マーカス
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＤ３に特異的な脱免疫抗体

(57)【要約】
本発明は、ＣＤ３に特異的に結合する親和性最適化ヒト抗体及び脱免疫ヒト抗体を提供する。本開示はまた、Ｔ細胞の活性化などに関して最適化されたヒト抗体を含む二重特異的抗体を提供する。本発明はさらに、ヒト抗体の発生方法及び疾患の処置でのその使用方法に関する。
【選択図】なし

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ｉ．以下
（ａ）ＧＦＳＦＧＳＨＹＭＳ（配列番号１）のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）１、
（ｂ）ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＶＥＳＶＫＧ（配列番号２）、ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＧＥＳＶＫＧ（配列番号３）、又はＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＥＥＳＶＫＧ（配列番号４）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び
（ｃ）ＧＹＳＡＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号５）、ＧＹＳＤＥＦＡＴＲＳＧＬＤＶ（配列番号６）、ＧＹＳＥＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号７）、ＧＹＳＤＥＦＡＫＲＳＧＬＤＶ（配列番号８）、又はＧＹＳＤＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号９）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、
を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、並びに
ｉｉ．以下
（ａ）ＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＹＶＹ（配列番号１０）のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）１、
（ｂ）ＲＮＮＱＲＰＳ（配列番号１１）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び
（ｃ）ＡＧＷＳＲＳＬＨＧＡＶ（配列番号１２）又はＡＧＷＳＲＥＬＨＧＡＶ（配列番号１３）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３、
を含む可変軽鎖領域（ＶＬ）、
を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項２】
前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、カニクイザルＣＤ３に交差反応的に結合する、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項３】
前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが脱免疫抗体である、請求項１又は２に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項４】
前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、ヒトにおいて低減された免疫応答選出リスクを有する、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項５】
前記ＶＨが、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、及び配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％同一のアミノ酸配列を含み、及び／又は前記ＶＬが、配列番号２０若しくは配列番号２１のアミノ酸配列に対して少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％同一のアミノ酸配列を含む、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項６】
前記ＶＨ及びＶＬが、以下：
ｉ．配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉ．配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉｉ．配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｖ．配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｖ．配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶ

Ｌ、並びに
　ｖｉ．配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
からなる群から選択される、請求項１～５のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項７】
　前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、組換え抗体又はその抗原結合性フラグメントである、請求項１～６のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項８】
　前記抗体又はその抗原結合性フラグメントが、モノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントである、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項９】
　前記抗原結合性フラグメントが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、（Ｆａｂ’）$_2$、Ｆｖ、又はｓｃＦｖである、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項１０】
　前記抗体が全長抗体である、請求項１～９のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性フラグメント。
【請求項１１】
　請求項１～１０のいずれか一項に記載の抗体の抗原結合性フラグメントと、前記第１の抗原結合性フラグメントとは異なる標的抗原に結合する抗体の第２の抗原結合性フラグメントと、を含む二重特異的抗体。
【請求項１２】
　前記第２の抗原結合性フラグメントが、細胞表面抗原、特定的には腫瘍関連細胞表面抗原に結合する、請求項１１に記載の二重特異的抗体。
【請求項１３】
　Ｆｃレセプターへの結合性及び／又はエフェクター機能を低減する１つ以上のアミノ酸置換を含むＦｃ領域を含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は請求項１１若しくは１２に記載の二重特異的抗体。
【請求項１４】
　請求項１～１０及び１３のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は請求項１１～１３のいずれか一項に記載の二重特異的抗体をコードする１つの核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物。
【請求項１５】
　請求項１４に記載の１つの核酸配列又は複数の核酸配列を含む１つのベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物。
【請求項１６】
　請求項１５に記載のベクター組成物を含む宿主細胞。
【請求項１７】
　請求項１～１０及び１３のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は請求項１１～１３のいずれか一項に記載の二重特異的抗体と、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤と、を含む医薬組成物。
【請求項１８】
　医薬剤としての使用のための、請求項１～１０及び１３のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は請求項１１～１３のいずれか一項に記載の二重特異的抗体又は請求項１７に記載の医薬組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

発明の分野

本発明は、ＨＬＡタンパク質への低減された結合潜在能力を有する、ひいては一旦投与されたヒトにおいて低減された免疫応答選出リスクを有する、ＣＤ３に結合する完全ヒト抗体（それからの構造修飾バリアントを含む）に関する。本発明はさらに、本明細書に開示されるＣＤ３特異的抗体を利用した二重特異的抗体、かかる抗体の産生方法、及び癌の処置などの疾患の処置でのその使用方法を提供する。

【背景技術】

【０００２】

背景

ＣＤ３（分化クラスター３）は、Ｔ細胞の表面上のＴ細胞レセプター（ＴＣＲ）に非共有結合で会合する、少なくとも４つのインバリアントペプチド鎖からなるタンパク質複合体であり、典型的にはＣＤ３抗原複合体といわれる。ＣＤ３抗原複合体は、抗原がＴ細胞レセプターに結合した際にＴ細胞活性化に重要な役割を果たす。ＣＤ３は、薬剤標的として広範に探究されている。ＣＤ３を標的とする二重特異的抗体に基づく治療概念は、腫瘍細胞上に存在する細胞表面抗原及び細胞傷害性Ｔ細胞上に存在するＣＤ３への同時結合に依拠し、結合された細胞傷害性Ｔ細胞により腫瘍細胞を直接死滅させることを目指す（Miller and Kontermann,Bispecific antibodies for cancer immunotherapy:Current perspectives.BioDrugs 2010,24(2):89-98）。

【０００３】

ＣＤ３標的療法のメジャーな問題の１つは、オフターゲットＴ細胞活性化が原因であるその用量制限的毒性にある。かかる毒性は、基本的には、標的細胞の存在にかかわらずＴ細胞を刺激するＣＤ３抗体本来の能力により駆動される。実際には、ＣＤ３ベース抗体療法との関連で観察される多くの副作用は、毒性サイトカイン放出症候群をもたらしうるサイトカインの随伴産生などの誤ったＴ細胞機能に関連するとみられている。そのため、かかる毒性を低減するために、一方では、単球、Ｂ細胞、ＮＫ細胞などのアクセサリー細胞上のＦｃレセプターへの結合能の欠如した抗体骨格を使用することにより、Ｔ細胞上に存在するＣＤ３に１価方式でエンゲージすることが十分に確立されている。このアプローチは、Ｔ細胞上に存在するＣＤ３複合体の架橋及びその後続活性化を回避する。ＣＤ３に結合するおびただしい数の抗体が当技術分野で記載されている。こうしたものとしては、ＯＫＴ－３（Kung P.et al.,Science,1979 Oct 19;206(4416):347-9）やＳＰ３４（Yoshino N.et al.,Exp.Anim 49:97-110, 2000;Conrad ML.et al.,Cytometry 71A:925-33,2007）などの齧歯動物起源の抗体、さらにそれらのヒト化誘導体が挙げられる。そのほか、ＣＤ３に対して特異性のある一群の莫大なｄｅ　ｎｏｖｏ発生ヒト抗体又はヒト化抗体が当技術分野で記載されている。ネズミ科動物起源が原因で、ＳＰ３４又はＯＫＴ－３は、非免疫抑制ヒトにおいて強いヒト抗マウス抗体（ＨＡＭＡ）免疫原性反応を誘導し、それによりそれらの投与の潜在能力が制限され、さらにまた危険なアレルギー反応の原因になる可能性がある。一般的には、かかる免疫応答は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）による治療用（外来）タンパク質（すなわち治療用抗体）の取込みを必要とする。一旦かかる細胞内に入ると、タンパク質はプロセスされ、タンパク質の放出断片（ある特定のショートペプチド配列は、ＭＨＣクラスＩＩ分子との複合体を形成する）は、細胞表面上に提示される。Ｔ細胞上に存在するＴ細胞レセプターの結合によりかかる複合体が認識されれば、かかる細胞は、活性化されて刺激性サイトカインを産生可能である。サイトカインは、Ｂ細胞から抗体産生性成熟細胞への分化を惹起する。そのほか、かかるＴ細胞応答はまた、炎症や場合によりアレルギー反応など、患者への他の有害作用を媒介するおそれもある。しかしながら、ＭＨＣクラスＩＩ分子に結合することが見いだされたある特定のペプチドは、最終タンパク質が投与された生物内で「自己」として認識されるため、免疫応答を惹起しないものと理解されている。かかるペプチドは、たとえば、生殖系統ヒトイムノグロブリン可変領域タンパク質配列中に見いだされる。

【０００４】

それゆえ、ヒトにおいて低減された免疫原性を有するヒト化ＣＤ３特異的抗体が設計さ

れた。ヒト化プロセスの共通態様は、ヒト抗体タンパク質中に存在するものとまったく同じアミノ酸配列の有意部分の導入であり、このため、例として最も近い生殖系統ヒトアクセプター抗体フレームワーク中への非ヒト抗体のＣＤＲのグラフト化が関与する。ヒト化プロセスに伴う有意な欠点は、得られるヒト化抗体の結合親和性の有意な低減、さらには不十分な生産性及び安定性である。オリジナルの性質の回復は、典型的には、非ヒトドナー抗体中の同一位置のアミノ酸によるヒト残基の繰返し復帰変異プロセスにより達成される。しかしながら、かかる復帰変異は、ヒトにおいて免疫原性反応の誘導リスクを再び増加させるおそれがある。

【０００５】

したがって、ヒト抗体の使用は、ネズミ抗体又はヒト化抗体を使用する上述した短所を克服するのに理想的な解決策であるように思われる。というのは、免疫応答は、一般的には、イムノグロブリンなどの循環性自家タンパク質に対しては開始されないからである。しかし、依然として、ヒト抗体は、ある特定の個体に投与したときに免疫応答を惹起したり又は免疫原性であったりするおそれがある。例として、ヒトファージディスプレイライブラリーから選択された組換えヒト抗体は、依然として、ヒトフレームワーク配列解析に由来するコンセンサスフレームワーク配列などの非生殖系統コードタンパク質配列を利用することもありうることから、免疫反応を惹起するおそれがある。そのほか、ＣＤＲ領域に導入された変動は、（特定的には初期選択抗体の親和性成熟時に）免疫反応を引き起こすおそれがある。かかる選択ＣＤＲアミノ酸配列は、外来タンパク質への類似性を有しうるので、免疫系に一般に利用可能でないとみなされるエピトープを提供するおそれがある。

【０００６】

以上に概説したように、ＣＤ３を標的とする治療剤では、いずれの望ましくないＴ細胞活性化も回避することがこの上なく重要である。治療用ＣＤ３特異的抗体に対する免疫反応は、２価又は多価のＣＤ３結合及びＴ細胞上のＣＤ３複合体の望ましくない架橋ひいてはその活性化を回復するおそれがある。それゆえ、本発明は、親完全ヒト抗体カウンターパートのＣＤＲ領域中に存在する潜在的Ｔ細胞エピトープの除去により特徴付けられるため、ヒトにおいて一旦投与されると低減された免疫応答選出リスクを有して、ＣＤ３に特異的な最適化完全ヒト抗体を提供する新しいアプローチを主に取り入れる。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

発明の概要

本開示は、親和性最適化ヒトＣＤ３特異的抗体及びその脱免疫バリアントを提供する。親和性最適化抗体は、ヒトにおいてその免疫原性を低減するように又は一旦投与されたヒトにおいてその免疫応答選出リスクを低減するようにその相補性決定領域（ＣＤＲ）が改変されたものである。

【０００８】

ある一実施形態では、本開示は、

ｉ．以下

（ａ）ＧＦＳＦＧＳＨＹＭＳ（配列番号１）のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）１、

（ｂ）ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＶＥＳＶＫＧ（配列番号２）、ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＧＥＳＶＫＧ（配列番号３）、又はＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＥＥＳＶＫＧ（配列番号４）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び

（ｃ）ＧＹＳＡＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号５）、ＧＹＳＤＥＦＡＴＲＳＧＬＤＶ（配列番号６）、ＧＹＳＥＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号７）、ＧＹＳＤＥＦＡＫＲＳＧＬＤＶ（配列番号８）、又はＧＹＳＤＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号９）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、

を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、並びに

ｉｉ．以下
（ａ）ＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＹＶＹ（配列番号１０）のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）１、
（ｂ）ＲＮＮＱＲＰＳ（配列番号１１）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び
（ｃ）ＡＧＷＳＲＳＬＨＧＡＶ（配列番号１２）又はＡＧＷＳＲＥＬＨＧＡＶ（配列番号１３）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３、
を含む可変軽鎖領域（ＶＬ）、
を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【０００９】

ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、交差反応的にカニクイザルＣＤ３に結合する。

【００１０】

ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又は抗原結合性フラグメントは、脱免疫抗体である。

【００１１】

ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒトにおいて低減された免疫応答選出リスクを有する。

【００１２】

ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、及び配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％同一のアミノ酸配列を含むＶＨ、及び／又は配列番号２０若しくは配列番号２１のアミノ酸配列に対して少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％同一のアミノ酸配列を含むＶＬを含む。

【００１３】

ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、ＶＨ及びＶＬは、以下：
ｉ．配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉ．配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉｉ．配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｖ．配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｖ．配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、並びに
ｖｉ．配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
からなる群から選択される。

【００１４】

本開示のある一実施形態では、前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、組換え抗体又はその抗原結合性フラグメントである。本開示のある一実施形態では、前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、モノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントである。

【００１５】
本開示のある一実施形態では、前記ＣＤ３に特異的な単離された抗原結合性フラグメントは、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、（Ｆａｂ’）2、Ｆｖ、又はｓｃＦｖである。本開示のある一実施形態では、ＣＤ３抗体に特異的な前記単離されたヒト抗体は、全長抗体である。
【００１６】
ある一実施形態では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体の第１の抗原結合性フラグメント及び前記第１の抗原結合性フラグメントとは異なる標的抗原に結合する抗体の第２の抗原結合性フラグメントを含む二重特異的抗体を提供する。本開示のある一実施形態では、前記第２の抗原結合性フラグメントは、細胞表面抗原、特定的には腫瘍関連細胞表面抗原に結合する。
【００１７】
本開示のある一実施形態では、本開示に係る前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又は本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体の抗原結合性フラグメントを含む二重特異的抗体は、Ｆｃレセプターへの結合及び／又はエフェクター機能を低減する１つ以上のアミノ酸置換を含むＦｃ領域を含む。
【００１８】
ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体の抗原結合性フラグメントを含む二重特異的抗体をコードする１つの核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を提供する。
【００１９】
ある一実施形態では、本開示は、本開示に係る１つの核酸配列又は複数の核酸配列を含む１つのベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を提供する。ある一実施形態では、本開示は、本開示に係るベクター組成物を含む宿主細胞を提供する。ある一態様では、前記宿主細胞は哺乳動物細胞である。ある一態様では、前記宿主細胞は原核細胞である。
【００２０】
ある一態様では、本開示は、本開示に係る抗体又はその抗原結合性フラグメントの産生方法を提供するものであり、抗体の発現に好適な条件下で前記宿主細胞を培養するステップと、任意に前記抗体又はその抗原結合性フラグメントを回収するステップと、を含む。さらなるある一態様では、本開示は、本明細書に記載の方法により産生される抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。
【００２１】
ある一実施形態では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体の抗原結合性フラグメントを含む二重特異的抗体と、薬学的に許容可能な担体又は賦形剤と、を含む医薬組成物を提供する。
【００２２】
ある一実施形態では、本開示は、医薬剤としての使用のためのＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は本開示に係る医薬組成物を提供する。
【００２３】
特許請求された抗体又はその抗原結合性フラグメントには有用性がある。さらに、かかる抗体又はその抗原結合性フラグメントの特許請求された発生方法には有用性がある。特許請求された抗体又はその抗原結合性フラグメントの利用は、ＣＤ３を発現するＴ細胞を標的とするため及びＴ細胞活性化をたとえばＴ細胞媒介死滅が有益な又は望ましい状況下で刺激するためである。特定的には、特許請求された抗体又はその抗原結合性フラグメントは、癌の処置などの治療的使用に供されるものである。
【図面の簡単な説明】
【００２４】

図面の簡単な説明

【図１Ａ】実施例１の二重特異的２＋１Ｆａｂ$_2$－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体フォーマットの基本構造を描く。二重特異的抗体フォーマットは、無グリコシル化モノクローナルＩｇＧ１骨格と１つの追加ｓｃＦｖ抗体とを包含し、ペプチドリンカーを介してｓｃＦｖのＶＬのＮ末端が一方のＩｇＧ重鎖のＣ末端に融合されている。２つの異なる重鎖のヘテロダイマー化を促進するために、両方のＣＨ３－Ｆｃドメインにｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ変異を導入した。こうした変異に加えて、Ｆｃ領域は、ＩｇＧ　Ｆｃレセプター（ＦｃガンマレセプターＩ）と相互作用できないＦｃ領域及び相補体をもたらすアミノ酸置換を含んでいた。本実施例では、二重特異的抗体のＦａｂアームは両方ともＨＥＲ２に結合し、一方、ｓｃＦｖはＣＤ３に特異的である。

【図１Ｂ】実施例２の二重特異的１＋１Ｆａｂ$_2$－Ｆｃ抗体フォーマットの基本構造を描く。この二重特異的抗体フォーマットは、従来のＩｇＧ分子の典型的Ｙ形状を反映して、一方のＦａｂアームが腫瘍標的に結合し、且つ他方のＦａｂアームがＣＤ３に結合する。二重特異的１＋１Ｆａｂ$_2$－Ｆｃ抗体は、Ｆａｂアーム交換によりｉｎ　ｖｉｔｒｏで発生された。この方法による二重特異的抗体の産生を可能にするために、ＣＨ３ドメインに単一変異を担持する源ＩｇＧ１分子：Ｆ４０５Ｌ変異を担持する一方の源ＩｇＧ１抗体（すなわちＣＤ３特異的抗体）、Ｋ４０９Ｒ変異を担持する他方の源ＩｇＧ１抗体（すなわち抗ＨＥＲ抗体）を発生した。こうした変異に加えて、源ＩｇＧ１抗体は、ＩｇＧ　Ｆｃレセプター（ＦｃガンマレセプターＩ）と相互作用できないＦｃ領域及び相補体をもたらす置換を含んでいた。

【図２】実施例３及び実施例４の二重特異的Ｆａｂ$_2$－Ｆｖ－Ｆｃ抗体フォーマットの基本構造。この二重特異的抗体フォーマットは、無グリコシル化モノクローナルヒトＩｇＧ１抗体骨格と、ＩｇＧ１骨格のＦｃ領域及び２つのＦａｂアーム間に取り込まれた１つの追加Ｆｖフラグメントと、から構築される。本実施例では、Ｆａｂアームは両方とも、ＨＥＲ２に結合し、一方、「エキストラ」Ｆｖフラグメントは、本開示に係るＣＤ３に特異的な抗体の可変領域を含む。また、追加ＦｖフラグメントをＦａｂアーム及びＦｃ領域に接続するために使用された異なる改善されたペプチドリンカーを描く。

【図３】本開示に係る親和性成熟又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体の可変ドメインを含む実施例２．２に係るＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある哺乳動物産生二重特異的抗体の細胞結合。フローサイトメトリーにより決定されたＣＤ３陽性ジャーカット細胞への細胞結合（シグナル／バックグラウンド）が二重特異的抗体濃度の関数として示される。

【図４Ａ】図４Ａは、１ドナーに由来するヒトＴ細胞の存在下でのＨＥＲ２発現性ＳＫＢＲ３細胞に対する本開示に係る親和性成熟又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体の可変ドメインを含む実施例２．４に係るＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある哺乳動物産生二重特異的抗体の細胞傷害性アッセイ。ヒトＴ細胞の細胞傷害活性は、取り込まれたCellToxGreenの蛍光を測定することによりアセスされる。グラフは、ＨＥＲ２発現性ＳＫＢＲ３細胞の相対蛍光レベルを二重特異的抗体濃度の関数として示す。

【図４Ｂ】図４Ｂは、１ドナーに由来するヒトＴ細胞の存在下でのＨＥＲ２陽性ＭＣＦ－７細胞に対する本開示に係る親和性成熟又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体の可変ドメインを含む実施例２．４に係るＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある哺乳動物産生二重特異的抗体の細胞傷害性アッセイ。ヒトＴ細胞の細胞傷害活性は、取り込まれたCellToxGreenの蛍光を測定することによりアセスされる。グラフは、ＭＣＦ－７細胞の相対蛍光レベルを二重特異的抗体濃度の関数として示す。

【図５】本開示に係る親和性成熟又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体の可変ドメインを含む実施例２．５に係るＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある哺乳動物産生二重特異的抗体のＴ細胞活性化アッセイ。Ｔ細胞の活性化は、フローサイトメトリーによりアセスされるＣＤ８陽性Ｔ細胞上のＣＤ６９発現の評価により決定される。異なる３ドナーに由来するＣＤ６９＋活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージが二重特異的抗体濃度の関数として示される。

【図６】実施例２の１つのクロスクローンＣＤ３特異的抗体（ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃ）の可変ドメインと最初に開示されたリンカー組合せＰを基準にした最大級の効力のある２つのリンカー組合せ（リンカー組合せ２及びリンカー組合せ５）とを含む実施例３．６に係るＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある哺乳動物産生二重特異的抗体の細胞傷害性アッセイ。１ドナーに由来するヒトＴ細胞の存在下でのＨＥＲ２発現性ＳＫＢＲ３細胞の死滅が示される。ヒトＴ細胞の細胞傷害活性は、取り込まれたCellToxGreenの蛍光を測定することによりアセスされる。グラフは、ＨＥＲ２発現性ＳＫＯＶ－３細胞の相対蛍光レベルを二重特異的抗体濃度の関数として示す。

【図７Ａ】図７Ａは、実施例２の１つのクロスクローンＣＤ３特異的抗体（ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃ）の可変ドメインと最初に開示されたリンカー組合せＰを基準にした６つのリンカー組合せ（リンカー組合せ１～６）とを含む実施例３．７に係るＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある哺乳動物産生二重特異的抗体のＴ細胞活性化アッセイ。Ｔ細胞の活性化は、フローサイトメトリーによりアセスされるＣＤ４＋Ｔ細胞上のＣＤ６９発現の評価により決定される。異なる３ドナーに由来するＣＤ６９＋活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞の平均パーセンテージを二重特異的抗体濃度の関数として示すグラフである。

【図７Ｂ】図７Ｂは、実施例２の１つのクロスクローンＣＤ３特異的抗体（ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃ）の可変ドメインと最初に開示されたリンカー組合せＰを基準にした６つのリンカー組合せ（リンカー組合せ１～６）とを含む実施例３．７に係るＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある哺乳動物産生二重特異的抗体のＴ細胞活性化アッセイ。Ｔ細胞の活性化は、フローサイトメトリーによりアセスされるＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ６９発現の評価により決定される。異なる３ドナーに由来するＣＤ６９＋活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞の平均パーセンテージを二重特異的抗体濃度の関数として示すグラフである。

【図８】潜在的Ｔ細胞エピトープの同定のための実施例２からのクロスクローン抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＨＣＤＲ３領域のEpibase（商標）（Lonza,Epibase Version:v3.0）ｉｎ ｓｉｌｉｃｏスクリーニング結果。ヒト抗体生殖系統コード配列領域は、解析から除外された。解析では、ＶＨ配列全体は、各々１アミノ酸ずつシフトされたオーバーラッピング１０ｍｅｒペプチドにスプリットされる。図８の左側パネルは、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＶＨ上でその全ＨＣＤＲ３領域をまたいでアミノ酸位置９０から開始して位置１１２まで解析１０ｍｅｒペプチドをリストする。各解析１０ｍｅｒペプチドの潜在的ペプチド／ＨＬＡ結合は、図８の上側パネル／カラムに示されるメジャーコーカサス人ＤＲＢ１アレルのＨＬＡクラスＩＩアロタイプに対して決定される。各ＤＲＢ１アロタイプに対して、その自然発生頻度が提供される（たとえば、ＤＲＢ１＊０１：０１：１５％）。実施例によれば、ペプチド９３は、ＤＲＢ１アレルの３つのアロタイプに中（Ｍ）親和性及びＤＲＢ１アレルの２つのアロタイプに強（Ｓ）親和性で結合すると予測される。かかるペプチドは、本明細書に定義される「Ｔ細胞エピトープ」を反映する。このペプチドに対して提供された２４．５というリスクスコアは、かかるペプチドに結合するＤＲＢ１アレルのアロタイプの自然発生頻度の和として計算される（たとえば、ペプチド９３では：２４＋６＋１２＋６＋５＝５３（丸め）、厳密には：５１．９）。要するに、１０のＴ細胞エピトープ（ペプチド９２、９３、９４、９５、９７、１００、１０２、１０４、１１０、１１２）及び２つのホットスポットは、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＨＣＤＲ３領域に割当て可能である（第１のホットスポットは、ペプチド９２～９７をまたぎ、第２のホットスポットは、ペプチド１１０～１１２をまたぐ）。ホットスポットは、近接Ｔ細胞エピトープの累積を反映する。かかるホットスポットは、ＤＲＢ１アレルの少なくとも４つのアロタイプが３つの連続する解析１０ｍｅｒペプチドの少なくとも２つに中又は強親和性で結合しなければならないことを意味する「４オーバー３」に基づいて同定される。そのほか、Ｔ細胞エピトープとして同定されない多くとも１つの１０ｍｅｒペプチドは、ホットスポットの一部でありうる。そのため、同定されたどのＴ細胞エピトープも、ホットスポットの一部でなければならないというわけではない（例として、図８のペプチド１００、１０２、又は１０４を参照されたい）。他方、Ｔ細胞エピトープとして同定されないペプチドは、それでもなおホットスポットの一部でありうる（例として

、図４のペプチド９６又はペプチド１１１を参照されたい）。ホットスポットの一部である各解析１０ｍｅｒペプチドは、Ｈラインとして定義される。ホットスポットの累積リスクスコアは、ホットスポット内の各Ｔ細胞エピトープで決定されたリスクスコアの和として計算可能であり、本明細書では「Ｈスコア」として定義される。例として、ＨＣＤＲ３の第２のホットスポットは、３つのＨラインからなる。このため、Ｈスコアは、このホットスポットによりカバーされる各Ｔ細胞エピトープのリスクスコアの和により計算され、たとえば、２７．８＋６０．３＝８８である。

【図９】Ｅｐｉｂａｓｅ（商標）ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ変異解析：ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨのＴ細胞エピトープの数（図４の左側パネル）及び対応する絶対リスクスコア（図４の右側パネル）に及ぼすＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の各ＨＣＤＲ３位置（位置９２～１１２）のｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ単一アミノ酸置換（上側パネル）の影響。境界太線付きの数は、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のそれぞれのＶＨバリアントの遺伝子合成のために選択されたアミノ酸置換に対応する。２以上のＴ細胞エピトープの減少をもたらすとともに保存的アミノ酸置換を行うことを可能にしたアミノ酸置換が、好ましくは選択された。そのほか、ＣＤＲ領域中に潜在的翻訳後修飾部位（「ＰＴＭモチーフ」）が導入されないように注意した。実施例によれば、ＨＣＤＲ３では、４２の単一アミノ酸置換（単一点バリアント）が遺伝子合成のために選択された。

【図１０】実施例４の二重特異的Ｆａｂ$_2$－Ｆｖ－Ｆｃ抗体フォーマットでの特徴付けに従うＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の２７の好ましいＣＤＲ単一点バリアントの生物物理学的及び機能的性質の概要。各置換に対して、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨ又はＶＬのＴ細胞エピトープの低減、さらには精製二重特異的抗体調製物のモノマー含有率及び収量、組換えヒトＣＤ３イプシロンへのＥＬＩＳＡ結合及び親和性が示される。図１０の最後のカラムは、コンビナトリアルｉｎ　ｓｉｌｉｃｏ変異解析のために選択されたバリアントを表す。第１行（ｗｔ（親））は、抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の可変ドメインを含む二重特異的抗体で決定された機能的性質を表す。

【図１１】Ｅｐｉｂａｓｅ（商標）ｉｎ　ｓｉｌｉｃｏコンビナトリアル変異解析。３つのホットスポットの低減をもたらしたＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＨＣＤＲ１～３領域中の５４のコンビナトリアルアミノ酸置換の模範的結果。示された表の第１行は、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨのリスクパラメーター（絶対スコア、ホットスポット、絶対Ｈスコア、及び絶対Ｈライン）を表す。各組合せバリアントに対して、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨの決定リスクパラメーターを基準にして（デルタ値として）各リスクパラメーターの低減が提供される。

【図１２】実施例４の二重特異的Ｆａｂ$_2$－Ｆｖ－Ｆｃ抗体フォーマットでの特徴付けに従うＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の３３の好ましい組合せバリアントの生物物理学的及び機能的性質の概要。第１行は、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨ及びＶＬを含む二重特異的抗体で決定された機能的性質を表す。各組合せバリアントに対して、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨの決定リスクパラメーターを基準にして（デルタ値として）各リスクパラメーター（絶対スコア、ホットスポット、絶対Ｈスコア、及び絶対Ｈライン）の低減が提供される。そのほか、精製二重特異的抗体調製物のモノマー含有率、組換えヒトＣＤ３イプシロン抗原へのＥＬＩＳＡ結合及び親和性、さらには２つの二重特異的抗体濃度でのＳＫＯＶ－３細胞上のレセプター遺伝子アッセイにおける機能的活性が示される。

【図１３】ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃの未改変ＣＤ３特異的可変ドメインを含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃを基準にしたＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３の最も好ましい脱免疫組合せバリアントＶＨ及びＶＬ配列を含む哺乳動物産生二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３の１ドナーでの実施例４．１２に係る細胞傷害性アッセイ。ヒトＴ細胞の細胞傷害活性は、取り込まれたＣｅｌｌＴｏｘＧｒｅｅｎの蛍光を測定することによりアセスされる。グラフは、ＨＥＲ２発現性ＳＫＯＶ－３細胞の相対蛍光レベルを二重特異的抗体濃度の関数として示す。

【図１４Ａ】図１４Ａは、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃの未改変ＣＤ３特異的可変ドメインを含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃを基準にした

５つの最高に好ましい脱免疫組合せバリアントＶＨ及びＶＬ配列を包含する二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５の実施例４．１３アッセイに係る模範的Ｔ細胞活性化アッセイ。陽性コントロールとして、ネズミＣＤ３特異的ＯＫＴ－３ＩｇＧの結果が示される。Ｔ細胞の活性化は、フローサイトメトリーによりアセスされるＣＤ４＋Ｔ細胞上のＣＤ６９発現の評価により決定される。１ドナーに由来するＣＤ６９＋活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞の平均パーセンテージが二重特異的抗体濃度の関数として示される。

【図１４Ｂ】図１４Ｂは、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃの未改変ＣＤ３特異的可変ドメインを含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃを基準にした５つの最高に好ましい脱免疫組合せバリアントＶＨ及びＶＬ配列を包含する二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＿ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５の実施例４．１３アッセイに係る模範的Ｔ細胞活性化アッセイ。陽性コントロールとして、ネズミＣＤ３特異的ＯＫＴ－３ＩｇＧの結果が示される。Ｔ細胞の活性化は、フローサイトメトリーによりアセスされるＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ６９発現の評価により決定される。１ドナーに由来するＣＤ６９＋活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞の平均パーセンテージが二重特異的抗体濃度の関数として示される。

【発明を実施するための形態】

【００２５】

開示の詳細な説明

定義

「ＣＤ３」は、４つのレセプター鎖：ＣＤ３イプシロン（ＣＤ３イプシロン）、ＣＤ３デルタ、ＣＤ３ゼータ、及びＣＤ３ガンマの２つの会合から形成されるホモダイマー又はヘテロダイマーからなる、多分子Ｔ細胞レセプター（ＴＣＲ）の一部としてＴ細胞上に発現される抗原を意味する。

【００２６】

ヒトＣＤ３イプシロン（又はヒトＣＤ３ｅ）は、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｐ０７７６６のアミノ酸配列：

【化１】

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP
GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPE
DANFYLYLRARVCENCMEMD**VMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWS***KNRKAKAKP*
VTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI (配列番号45)(シグナル配列は下線付き、細胞内領域はイタリック体、膜貫通領域はボールド体)

を有する。

【００２７】

シグナル配列なしのヒトＣＤ３イプシロンの成熟細胞外ドメインは、アミノ酸残基２２～１２６を含み、以下：

【化２】

QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIG
SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD
(配列番号46)

のアミノ酸配列を有する。

【００２８】
カニクイザルＣＤ３イプシロン（又はｃｙｎｏＣＤ３ｅ）は、ＵｎｉＰｒｏｔ Ｑ９５ＬＩ５のアミノ酸配列：
【化３】

MQSGTRWRVLGLCLLSIGVWGQDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLG
SEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLK
ARVCENCMEMD**VMAVATIVIVDICITLGLLLLVYYWS***KNRKAKAKPVTRGAGAG*
GRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI (配列番号47)
(シグナル配列は下線付き、細胞内領域はイタリック体、膜貫通領域はボールド体)

を有する。
【００２９】
シグナル配列なしのカニクイザルＣＤ３イプシロンの成熟細胞外領域は、アミノ酸残基２２～１９８を含み、以下：
【化４】

QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLF
LPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENCMEMDVMAVATIVIV
DICITLGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNPDYE
PIRKGQQDLYSGLNQRRI (配列番号48)

のアミノ酸配列を有する。
【００３０】
特定記載数値との関連で用いられるときの「約」という用語は、その値が記載値から１％以内で変動しうることを意味する。たとえば、本明細書で用いられる場合、「約１００」という表現は、９９及び１０１並びにそれらの間のすべての値（たとえば、９９．１、９９．２、９９．３、９９．４など）を含む。
【００３１】
本明細書で用いられる「抗原」又は「標的抗原」という用語は、抗体中に存在する結合性部位の１つが結合可能ないずれかの対象分子を意味する。典型的には、抗原は、ペプチド、タンパク質、又はいずれかの他のタンパク質性分子である。代替的に、抗原は、炭水化物、脂肪酸、脂質、色素、フルオロフォアなどのいずれかの他の有機分子又は無機分子でありうる。
【００３２】
本明細書で用いられる「抗体」という用語は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖を含む、抗原と相互作用するタンパク質を意味する。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではＶＨと略記される）と重鎖定常領域とで構成される。重鎖定常領域は、３つのドメインＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではＶＬと略記される）と軽鎖定常領域とで構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣＬで構成される。ＶＨ及びＶＬの領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称されるより保存された領域が介在する相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性領域にさらに細分可能である。各ＶＨ及びＶＬは、アミノ末端からカルボキシ末端へ次の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４で配置された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲから構成される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の各種細胞（たとえばエフェクター細胞）及び古典的補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）

をはじめとする宿主組織又は因子へのイムノグロブリンの結合を媒介しうる。「抗体」という用語は、たとえば、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ科抗体、及びキメリック抗体を含む。抗体は、いずれかのアイソタイプ（たとえば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）、クラス（たとえば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）、又はサブクラスでありうる。軽鎖及び重鎖は両方とも、構造的及び機能的相同性の領域に分割される。ＣＤＲなどのイムノグロブリン可変ドメインの構造及び位置は、周知の番号付けスキーム、たとえば、Ｋａｂａｔ番号付けスキーム、Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けスキーム、又はＫａｂａｔ及びＣｈｏｔｈｉａの組合せを用いて定義されうる（たとえば、Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services(1991),eds. Kabat et al.、Lazikani et al.,(1997) J.Mol.Bio.273:927-948)、Kabat et al.,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th edit.,NIH Publication no.91-3242 U.S Department of Health and Human Services、Chothia et al.,(1987) J.Mol.Biol.196:901-917、Chothia et al.,(1989) Nature 342:877-883、及びAl-Lazikani et al.,(1997) J.Mol.Biol.273:927-948を参照されたい。本明細書で用いられる「抗体」という用語は、単一特異的な特異的抗体、さらには二重特異的及び多重特異的抗体を含むことが意図される。

【００３３】

本明細書で用いられる「抗体フラグメント」又は抗体の「抗原結合性フラグメント」という用語は、（たとえば、結合性、立体障害、空間分布安定化により）抗原と特異的に相互作用する能力を保有する抗体の１つ以上の部分を意味する。抗体フラグメント又は抗原結合性フラグメントの例としては、限定されるものではないが、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、及びＣＨ１ドメインからなる１価フラグメントであるＦａｂフラグメント、ヒンジ領域でジスルフィドブリッジにより連結された２つのＦａｂフラグメントを含む２価フラグメントであるＦ（ａｂ）２フラグメント、ＶＨ及びＣＨ１ドメインからなるＦｄフラグメント、抗体の単一アームのＶＬドメイン及びＶＨドメインからなるＦｖフラグメント、ＶＨドメインからなるｄＡｂフラグメント（Ward et al.,(1989) Nature 341:544-546）、並びに単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）が挙げられる。さらに、Ｆｖフラグメントの２つのドメインＶＬ及びＶＨは、別々の遺伝子によりコードされるが、それらは、組換え法を用いて合成リンカーにより接合可能であり、それにより、ＶＬドメインとＶＨドメインとが対をなして１価分子を形成する単一タンパク質鎖にすることができる（一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）として知られるものであり、たとえば、Bird et al.,(1988) Science 242:423-426、及びHuston et al.,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883を参照されたい）。かかる一本鎖抗体もまた、「抗体フラグメント」又は「抗原結合性フラグメント」という用語に包含されることが意図される。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、フラグメントは、インタクト抗体と同様に有用性に関してスクリーニングされる。抗体フラグメントはまた、単一ドメイン抗体、マキシボディー、ミニボディー、イントラボディー、ダイアボディー、トリアボディー、テトラボディー、ｖ－ＮＡＲ、及びｂｉｓ－ｓｃＦｖにも取込み可能である（たとえば、Hollinger and Hudson,(2005) Nature Biotechnology 23:1126-1136を参照されたい）。抗体フラグメントは、フィブロネクチンＩＩＩ型（Ｆｎ３）などのポリペプチドに基づくスキャフォールド中にグラフト可能である（フィブロネクチンポリペプチドモノボディーを記載する米国特許第６，７０３，１９９号を参照されたい）。抗体フラグメント又は抗原結合性フラグメントは、タンデムＦｖセグメント対（ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１）を含む一本鎖分子に取込み可能であり、この一本鎖分子は、相補的軽鎖ポリペプチドと一緒になって抗原結合性部位対を形成する（Zapata et al.,(1995) Protein Eng.8:1057-1062及び米国特許第５，６４１，８７０号）。

【００３４】

本明細書で用いられる「Ｆｃ領域」という用語は、互いに安定に会合してイムノグロブリンのダイメリックＣ末端領域を形成する能力のある２つのＦｃ領域サブユニットを意味

する。それゆえ、２つのＦｃ領域サブユニット（たとえば、第１、第２のＦｃ領域サブユニット）は、互いに相補的である。レギュラーＩｇＧ分子のＦｃ領域は、ダイマーとして存在し、その各サブユニットは、ＣＨ２及びＣＨ３ＩｇＧ重鎖定常ドメインを含む。

【００３５】

本明細書で用いられる「Ｆｃ領域サブユニット」は、イムノグロブリンのダイメリックＦｃ領域を形成する２つのポリペプチド、すなわち、安定に自己会合する能力のあるイムノグロブリン重鎖のＣ－末端定常領域を含むポリペプチドの１つを意味する。それゆえ、ダイメリックＦｃ領域を形成する２つのＦｃ領域サブユニット（たとえば、第１第２のＦｃ領域サブユニット）は、互いに相補的である。たとえば、ＩｇＧ　Ｆｃ領域サブユニットは、ＩｇＧ　ＣＨ２及びＩｇＧ　ＣＨ３定常ドメインを含む。この用語は、ネイティブ配列Ｆｃ領域サブユニット及びバリアントＦｃ領域サブユニットを含む。ＩｇＧ重鎖のＦｃ領域サブユニットの境界域は、わずかに変動しうるが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域サブユニットは、通常、Ｃｙｓ２２６から又はＰｒｏ２３０から重鎖のＣ末端まで延在すものと定義される。しかしながら、Ｆｃ領域サブユニットのＣ－末端リシン（Ｌｙｓ４４７）は、存在していてもいなくてもよい。本明細書にとくに明記されていない限り、Ｆｃ領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991に記載のＥＵ番号付けシステム（ＥＵインデックスとも呼ばれる）に従う。

【００３６】

本明細書で用いられる「ヒト抗体」又は「ヒト抗体フラグメント」又は「ヒト抗原結合性フラグメント」は、フレームワーク領域及びＣＤＲ領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体及び抗体フラグメントを含む。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域もまたかかる配列に由来する。ヒト起源は、たとえば、ヒト生殖系統配列、又は変異型ヒト生殖系統配列、又はヒトフレームワーク配列解析に由来するコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体、たとえば、Knappik et al.,(2000) J Mol Biol 296:57-86に記載のものを含む）。それにより、前記ヒト抗体は、Ｂ細胞から単離されたＶＨＡ／Ｌレパートリーの ＰＣＲ増幅によりどれも発生されるヒト生殖系統遺伝子に由来する抗体を含む又は合成的に発生される技術プラットフォームから得ることが可能である。技術プラットフォームは、ファージ、リボソーム、又は酵母上にディスプレイされるヒトイムノグロブリン遺伝子を含むライブラリーベースアプローチを含む。それぞれのディスプレイ技術は、科学界では標準的である。さらに、ヒトイムノグロブリンレパートリーを担持するトランスジェニックマウスの免疫化は、対象抗原に対するヒト抗体を発生するための他の一アプローチである。MorphoSys HuCAL（登録商標）コンセプト（Knappik et al.,(2000) J Mol Biol 296:57-86）又はYlanthia（登録商標）コンセプトライブラリー（Tiller et al.mAbs 5:3,1-26;May/June(2013)及び米国特許第８，７２８，９８１号）に基づいて抗体ライブラリーから選択される抗体又はそのフラグメントは、完全ヒトとみなされる。

【００３７】

「単離された」という用語は、たとえば、異なる抗原特異性を有する他の抗体又は抗体フラグメントが実質的にフリーの抗体又は抗体フラグメント又は抗原結合性フラグメントでありうる化合物を意味する。このため、いくつかの態様では、提供される抗体は、異なる特異性の抗体から分離された単離された抗体である。単離された抗体は、モノクローナル抗体でありうる。単離された抗体は、組換えモノクローナル抗体でありうる。しかしながら、標的のエピトープ、アイソフォーム、又はバリアントに特異的に結合する単離された抗体は、他の関連抗原、たとえば、他の種（たとえば、種ホモログ）からのものへの交差反応性を有する。

【００３８】

本明細書で用いられる「組換え抗体」という用語は、天然には存在しない手段により調製、発現、作成、又は分離されるすべての抗体又は抗原結合性フラグメントを含む。たと

えば、抗体を発現するようにトランスフォームされた宿主細胞から単離された抗体、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから選択及び単離された抗体、並びに他のＤＮＡ配列へのヒトイムノグロブリン遺伝子の全部又は一部の配列のスプライシングが関与するいずれかの他の手段により調製、発現、作成、又は単離された抗体、或いはヒトイムノグロブリン遺伝子のトランスジェニック若しくはトランスクロモソーマル動物（たとえば、マウス）又はそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体。好ましくは、かかる組換え抗体は、フレームワーク領域及びＣＤＲ領域がヒト生殖系統イムノグロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ変異発生（又はヒトＩｇ配列のトランスジェニック動物が使用されるときはｉｎ　ｖｉｖｏ体細胞変異発生）に付すことが可能であり、このため、組換え抗体のＶＨ及びＶＬ領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系統ＶＨ及びＶＬ配列に由来し関係付けられるがｉｎ　ｖｉｖｏヒト抗体生殖系統レパートリー内に天然には存在しえない配列である。組換え抗体は、モノクローナル抗体でありうる。

【００３９】

本明細書で用いられる場合、「モノクローナル抗体」という用語は、いずれの真核、原核、又はファージクローンも含めて、単一クローンに由来する抗体を意味し、それが産生される方法を意味しない。本明細書に開示されるモノクローナル抗体は、たとえば、Kohler et a/.;Nature,256:495(1975)に記載のハイブリドーマ法により作られうるか又は本明細書に記載の技術を用いてファージライブラリーから単離されうる。クローナル細胞系統及びそれにより発現されるモノクローナル抗体の他の調製方法は、当技術分野で周知である（たとえば、Chapter 11 in:Short Protocols in Molecular Biology,(2002) 5th Ed.,Ausubel et al.,eds.,John Wiley and Sons,New Yorkを参照されたい）。他のモノクローナル抗体の他の模範的産生方法は、本明細書の実施例に提供される。

【００４０】

本明細書で用いられる場合、抗体が「特異的に抗原に結合する」、「抗原に特異的に結合する」とは、かかる抗体がかかる抗原と１つ以上の参照抗原とを識別できる場合であっても、抗原「に／に対して特異的な」又は抗原「を特異的に認識する」ことである。というのは、結合特異性は、絶対的ではなく相対的な性質であるからである。たとえば、標準的ＥＬＩＳＡアッセイを行うことが可能である。スコアリングは、標準的発色により行われうる（たとえば、ホースラディッシュペルオキシド及びテトラメチルベンジジンと過酸化水素を併用する二次抗体）。ある特定のウェルでの反応は、光学濃度により、たとえば４５０ｎｍでスコア付けされる。典型的バックグラウンド（＝陰性反応）は、０．１ＯＤでありうるとともに、典型的陽性反応は、１ＯＤでありうる。このことは、陽性／陰性差が１０倍超でありうることを意味する。典型的には、結合特異性の決定は、単一参照抗原ではなく乳粉末、ＢＳＡ、トランスフェリンなどの約３～５つの非関連抗原セットを用いて実施される。

【００４１】

本明細書で用いられる場合、「ＣＤ３に結合する抗体若しくはその抗原結合性フラグメント」又は「抗ＣＤ３抗体若しくはその抗原結合性フラグメント」又は「ＣＤ３に特異的な抗体若しくはその抗原結合性フラグメント」は、１つ以上のＣＤ３サブユニット（たとえば、イプシロン）を特異的に認識する抗体及びその抗体フラグメント又はその抗原結合性フラグメント、さらには２つのＣＤ３サブユニットのダイメリック複合体（たとえば、ガンマ／イプシロン、デルタ／イプシロン）を特異的に認識する抗体及び抗体フラグメントを含む。本開示の抗体及びその抗原結合性フラグメントは、可溶性ＣＤ３及び／又は細胞表面発現ＣＤ３に結合しうる。可溶性ＣＤ３としては、膜貫通ドメインを欠如したさもなければ細胞膜に会合していない天然ＣＤ３タンパク質さらには組換えＣＤ３タンパク質バリアント、たとえば、モノメリック及びダイメリックＣＤ３構築物が挙げられる。

【００４２】

本明細書で用いられる場合、「細胞表面」という用語は、タンパク質の少なくとも一部

分が細胞膜の細胞外側に露出されるように且つ抗体の抗原結合性部分又はフラグメントにアクセス可能なようにｉｎ ｖｉｔｒｏ又はｉｎ ｖｉｖｏで細胞の表面上に発現される１つ以上のタンパク質を意味する。「細胞表面発現ＣＤ３」としては、細胞膜中の機能性Ｔ細胞レセプターとの関連の範囲内で含有されるＣＤ３タンパク質が挙げられる。「細胞表面発現ＣＤ３」という表現は、細胞の表面上にホモダイマー又はヘテロダイマー（たとえば、ガンマ／イプシロン、デルタ／イプシロン、及びゼータ／ゼータＣＤ３ダイマー）の一部として発現されるＣＤ３タンパク質を含む。「細胞表面発現ＣＤ３」という表現はまた、細胞の表面上に他のＣＤ３鎖型なしで単独で発現されるＣＤ３鎖（たとえば、ＣＤ３イプシロン）も含む。「細胞表面発現ＣＤ３」は、ＣＤ３タンパク質を正常に発現する細胞の表面上に発現されるＣＤ３タンパク質を含むこと又はそれからなることが可能である。代替的に、「細胞表面発現ＣＤ３」は、その表面上にヒトＣＤ３を正常に発現しないがその表面上にＣＤ３を発現するように人工的に工学操作された細胞の表面上に発現されるＣＤ３タンパク質を含むこと又はそれからなることが可能である。

【００４３】

「交差反応的に結合する」という用語又は「交差反応性である」という用語は、本明細書では互換的に用いられ、２つ以上の抗原に特異的に結合する能力を有する抗体又は抗原結合性フラグメントを意味する。たとえば、本開示の抗体に係る抗体は、カニクイザルＣＤ３イプシロンなどのカニクイザルＣＤ３に交差反応的に結合する。

【００４４】

本明細書で用いられる場合、「親和性」という用語は、単一部位での抗体とその標的との相互作用の強度を意味する。各部位内では、抗体の結合性領域は、その標的と数多くの部位で弱非共有結合力を介して相互作用し、相互作用が大きくなるほど親和性は強くなる。

【００４５】

本明細書で用いられる「K_D」という用語は、K_d対K_aの比（すなわちK_d／K_a）から得られ、モル濃度（Ｍ）として表される解離定数を意味する。たとえば、モノクローナル抗体のような抗原結合性部分のK_D値は、当技術分野で十分に確立された方法を用いて決定可能である。たとえば、モノクローナル抗体のような抗原結合性部分のK_Dの決定方法は、ＳＥＴ（可溶性平衡滴定）又はBiacore（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを用いる表面プラズモン共鳴である。本開示では、ＣＤ３イプシロンポリペプチドに特異的な抗体は、典型的には、5×10^{-2}Ｍ未満、10^{-2}Ｍ未満、5×10^{-3}Ｍ未満、10^{-3}Ｍ未満、5×10^{-4}Ｍ未満、10^{-4}Ｍ未満、5×10^{-5}Ｍ未満、10^{-5}Ｍ未満、5×10^{-6}Ｍ未満、10^{-6}Ｍ未満、5×10^{-7}Ｍ未満、10^{-7}Ｍ未満、5×10^{-8}Ｍ未満、10^{-8}Ｍ未満、5×10^{-9}Ｍ未満、10^{-9}Ｍ未満、5×10^{-10}Ｍ未満、10^{-10}Ｍ未満、5×10^{-11}Ｍ未満、10^{-11}Ｍ未満、5×10^{-12}Ｍ未満、10^{-12}Ｍ未満、5×10^{-13}Ｍ未満、10^{-13}Ｍ未満、5×10^{-14}Ｍ未満、10^{-14}Ｍ未満、5×10^{-15}Ｍ未満、又は10^{-15}Ｍ以下の解離速度定数（K_D）（k_{off}／k_{on}）を有する。

【００４６】

本開示の組成物は、治療又は予防用途に使用されうる。したがって、本開示は、本明細書に開示される抗体（又はその抗原結合性フラグメント）及び薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を含有する医薬組成物を含む。関連態様では、本開示は、癌の処置方法を提供する。かかる方法は、必要とする被験者に本明細書に記載の抗体（又はその抗原結合性フラグメント）を含有する有効量の医薬組成物を投与するステップを含有する。本開示は、処置を必要とする被験者への本明細書に開示されるＣＤ３に特異的な治療有効量のヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントの投与を含む治療方法を提供する。本明細書で用いられる「治療有効量」又は「有効量」は、所望の生物学的反応を惹起するのに必要なＣＤ３特異的抗体の量を意味する。本開示によれば、治療有効量は、疾患を処置及び／又は防止するのに必要なＣＤ３特異的抗体又はその抗原結合性フラグメントの量である。

【００４７】

「細胞増殖性疾患」又は「増殖性疾患」という用語は、ある程度の異常細胞増殖に関連する疾患を意味する。一実施形態では、細胞増殖性疾患は癌である。一実施形態では、細胞増殖性疾患は腫瘍である。「癌」及び「癌性」という用語は、未レギュレート細胞成長により典型的に特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態を意味又は説明する。

【００４８】

「腫瘍関連抗原」という用語は、腫瘍又は腫瘍間質細胞の表面上に発現される又は存在する抗原を意味する。

【００４９】

「増加」とは、たとえば、２０％以上、５０％以上、又は７５％、８５％、９０％、９５％以上の全体的増加を引き起こす能力を意味する。

【００５０】

本明細書で用いられる「ＥＣ５０」という用語は、ベースライン及び最大間の中間でアッセイの応答を誘導する抗体又は抗体フラグメント又は二重特異的抗体の濃度を意味する。それは、最大効果の５０％が観測される抗体濃度を表す。

【００５１】

本明細書で用いられる「ＩＣ５０」という用語は、最大応答及びベースライン間の中間でアッセイの応答を阻害する抗体又は抗体フラグメント又は二重特異的抗体の濃度を意味する。それは、所与の応答を５０％低減する抗体濃度を表す。

【００５２】

「阻害」、「阻害する」、「低減」、「低減する」、「中和」、「中和する」などの用語は、いずれかの表現型特性（たとえば、結合性、生物学的活性、若しくは機能）の減少若しくは中止又はその特性の発生率若しくは程度若しくは尤度の減少若しくは中止を意味する。「阻害」、「低減」、「中和」などは、それが適切なアッセイを用いて検出可能である限り、必ずしも完全である必要はない。いくつかの態様では、「低減する」、「阻害する」などは、２０％以上の減少を引き起こす能力を意味する。他の一態様では、「低減する」又は「阻害する」とは、５０％以上の減少を引き起こす能力を意味する。さらに他の一態様では、「低減する」、「阻害する」などは、７５％、８５％、９０％、９５％以上の全体的減少を引き起こす能力を意味する。

【００５３】

「投与される」又は「投与」は、限定されるものではないが、注射可能な形態、たとえば、静脈内、筋内、皮内、皮下経路などによる、又は粘膜経路、たとえば、鼻腔スプレーや吸入用エアロゾルなどとして、又は摂取可能な溶液剤、カプセル剤、錠剤などによる薬剤の送達を含む。好ましくは、投与は注射可能な形態による。

【００５４】

本明細書で用いられる場合、「処置」、「処置する」、「処置すること」などは、処置される被験者において疾患の自然経過の改変を試みる際の臨床介入を意味し、予防目的又は臨床病理期間のどちらかで実施可能である。望ましい処置効果としては、限定されるものではないが、疾患の発生又は再発の防止、症状の和らぎ、疾患の直接的又は間接的病理学的帰趨のいずれかの縮小、転移の防止、疾患進行速度の減少、疾患状態の回復又は緩和、及び寛解又は予後改善が挙げられる。いくつかの態様では、本開示に係る抗体又はその抗原結合性フラグメントは、疾患の発生を遅延するために又は疾患の進行を緩徐化するために使用される。

【００５５】

「多重特異的」という用語は、抗体が２つ以上の異なる抗原に特異的に結合できることを意味する。典型的には、多重特異的抗体は、異なる抗原又はエピトープに各々が特異的な２つ以上の抗原結合性部位で構成される。

【００５６】

「二重特異的」という用語は、抗体が２つの異なる抗原に特異的に結合できることを意味する。典型的には、二重特異的抗体は、異なる抗原又はエピトープに各々が特異的な２つの抗原結合性部位を含む。

【００５７】
本明細書で用いられる場合、「第１」や「第２」などの用語は、各成分型又は各型が２つ以上存在するときに区別するために使用される。これらの用語の使用は、明示的にその旨明記されていない限り、具体的順序又は方向を付与することは意図されない。
【００５８】
本明細書で用いられる場合、「アミノ酸残基」又は「アミノ酸」は、その正式名称又は標準的３文字若しくは１文字アミノ酸コードのどれかで表されるであろう。「天然に存在するアミノ酸」は、下記アミノ酸を意味する。
【００５９】
【表１】

表1: 天然に存在するアミノ酸

アミノ酸	三文字コード	一文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リシン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
トレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

【００６０】
「エフェクター機能」は、抗体のＦｃ領域に帰属可能な生物学的活性を意味し、これは、抗体アイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例としては、以下：Ｃ１ｑ結合性及び補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）、Ｆｃレセプター結合性、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、食作用、細胞表面レセプター（たとえば、Ｂ細胞レセプター）のダウンレギュレーション、及びＢ細胞活性化が挙げられる。
【００６１】
本発明との関連で用いられる「種」は、マウスやラットなどの齧歯動物及びカニクイザル（マカカ・ファスシクラリス（Macaca fascicularis））、アカゲザル（マカカ・ムラッタ（Macaca mulatta））、ヒト（ホモ・サピエンス（Homo sapiens））などの霊長動物をはじめとするいずれかの哺乳動物を意味する。好ましくは被験者は霊長動物、最も好ましくはヒトである。
【００６２】
「脱免疫化」は、ＨＬＡ分子に効果的に結合すると予測される所与の抗体配列内のアミノ酸を、もはやＨＬＡに結合しないようにひいてはもはやＴ細胞応答を刺激可能でないように変化させる方法を意味する。それゆえ、脱免疫化は、所与のタンパク質又はポリペプ

チドを所与の種に対して非免疫原性又はより低い免疫原性にする。タンパク質からのＴ細胞エピトープの排除は、以前に開示されている（国際公開第９８／５２９７６号を参照されたい）。抗体を脱免疫するのに好適な一技術は、たとえば、国際公開第００／３４３１７号又は国際公開第２００３／１０５０５８号に記載されている。治療用抗体では、潜在的Ｔ細胞エピトープは好ましくはすべて、未修飾親抗体の機能的活性を保有しつつ除去される。

【００６３】

本明細書で用いられる「脱免疫」抗体は、脱免疫化を受けた抗体を意味する。「脱免疫」抗体は、ｉｎ　ｖｉｖｏで使用されたとき、未修飾親抗体と比較して所与の種においてより低い免疫原性又は非免疫原性でありうる。

【００６４】

本明細書で用いられる「Ｔ細胞エピトープ」又は「潜在的Ｔ細胞エピトープ」又は「ＭＨＣクラスＩＩ結合性モチーフ」という用語は、合理的効率でＭＨＣクラスＩＩ分子と結合するか、又は治療用タンパク質を摂取する種からのＴ細胞レセプターにペプチド：ＭＨＣ複合体の形態で強く結合するか、又はＭＨＣクラスＩＩ上への提示を介してＴ細胞を刺激する能力を示すかのどれかである、所与のタンパク質又はポリペプチド配列内の特異的１０ｍｅｒペプチド配列を意味する。潜在的Ｔ細胞エピトープは、ＭＨＣ結合性を確立するいずれかのコンピュテーショナル又は物理的方法により測定可能である。

【００６５】

本明細書で用いられる「ホットスポット」という用語は、隣接（予測）Ｔ細胞エピトープが累積した所与の抗体重鎖又は軽鎖可変領域内の領域を意味する。本開示に係るホットスポットは、ＤＲＢ１アレルの少なくとも４つのアロタイプが中（Ｍ）又は強（Ｓ）親和性で３つの連続する解析１０ｍｅｒペプチドの少なくとも２つに結合することを必要とする図８説明及び実施例４．１に詳述される４オーバー３アルゴリズムを介して同定されている。そのほか、Ｔ細胞エピトープとして同定されない多くとも１つの１０ｍｅｒペプチドは、ホットスポットの一部でありうる。

【００６６】

本明細書で用いられる「リスクスコア」という用語は、所与の集団たとえばコーカサス人集団において免疫反応又は免疫応答を引き起こすＴ細胞エピトープ（解析１０ｍｅｒペプチド）のリスク尺度としての数値を提供する。値が大きいほどリスクは高い。Ｔ細胞エピトープのリスクスコアは、かかるＴ細胞エピトープ（１０ｍｅｒペプチド）が結合するＤＲＢ１アレル（ＨＬＡアロタイプ）の自然発生集団頻度の和として計算される。リスクスコアは、市販のｉｎ　ｓｉｌｉｃｏスクリーニングツール：Epibase（商標）、Epibaseバージョン：v3.0（Lonza）を用いて本明細書の実施例４に記載のコンピュテーショナル方法により決定される。その基本的方法は、国際公開第２００３／１０５０５８号に記載されている。

【００６７】

本明細書で用いられる「絶対リスクスコア」又は「スコア」という用語は、所与の集団たとえばコーカサス人集団において免疫反応又は免疫応答を引き起こす全解析ポリペプチドのリスク尺度としての数値を提供する。「絶対リスクスコア」は、解析ポリペプチド配列、たとえば、抗体の全ＶＨ又はＶＬ配列中に存在するすべてのＴ細胞エピトープで決定されたすべての個別リスクスコアの和として計算される。

【００６８】

本明細書で用いられる「Ｈライン」は、ホットスポットの一部であるとして同定された抗体重鎖又は軽鎖可変領域の１つの解析１０ｍｅｒペプチド配列を意味する。

【００６９】

本明細書で用いられる「Ｈライン数」は、ホットスポットの一部であるとして同定された抗体重鎖又は軽鎖可変領域の解析１０ｍｅｒペプチド配列の総数の数値を提供する。

【００７０】

本明細書で用いられる「絶対Ｈライン数」は、ポリペプチド中で同定されたすべてのホ

ットスポットの一部であるＨライン数の和の数値を提供する。
【００７１】
本明細書で用いられる「Ｈスコア」は、所与のヒト集団たとえばコーカサス人集団において免疫反応又は免疫応答を引き起こす１つのホットスポットのリスク尺度としての数値を提供する。Ｈスコアは、ホットスポットの一部であるすべてのＴ細胞エピトープで決定された個別リスクスコアの和として計算される。
【００７２】
本明細書で用いられる「絶対Ｈスコア」は、所与のヒト集団たとえばコーカサス人集団において免疫反応又は免疫応答を引き起こす所与の抗体重鎖又は軽鎖可変領域中で同定されたすべてのホットスポットの累積リスク尺度としての数値を提供する。絶対Ｈスコアは、所与の抗体重鎖又は軽鎖可変領域中で同定されたすべてのホットスポットの一部であるすべてのＴ細胞エピトープで決定されたリスクスコアの和として計算される。
【００７３】
本開示の実施形態
本開示に係るＣＤ３に特異的な親和性最適化ヒト抗体は、表５及び表６にリストされる。本開示に係るＣＤ３に特異的な脱免疫ヒト抗体は、表７にリストされる。ある一態様では、本開示は、表５～７にリストされる抗体のいずれか１つに記載の６つのＣＤＲを含むＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。一態様では、本開示は、表５～７にリストされる抗体のいずれか１つに記載のＶＨ及びＶＬを含む単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。
【００７４】
ある一実施形態では、本開示は、
ｉ．以下
（ａ）ＧＦＳＦＧＳＨＹＭＳ（配列番号１）のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）１、
（ｂ）ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＶＥＳＶＫＧ（配列番号２）、ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＧＥＳＶＫＧ（配列番号３）、又はＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＥＥＳＶＫＧ（配列番号４）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び
（ｃ）ＧＹＳＡＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号５）、ＧＹＳＤＥＦＡＴＲＳＧＬＤＶ（配列番号６）、ＧＹＳＥＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号７）、ＧＹＳＤＥＦＡＫＲＳＧＬＤＶ（配列番号８）、又はＧＹＳＤＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号９）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、
を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、並びに
ｉｉ．以下
（ｄ）ＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＹＶＹ（配列番号１０）のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）１、
（ｅ）ＲＮＮＱＲＰＳ（配列番号１１）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び
（ｆ）ＡＧＷＳＲＳＬＨＧＡＶ（配列番号１２）又はＡＧＷＳＲＥＬＨＧＡＶ（配列番号１３）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３、
を含む可変軽鎖領域（ＶＬ）、
を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。
【００７５】
ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、
ａ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号２３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、

ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。
【００７６】
ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、
ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、
ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号２４のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。
【００７７】
ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、
ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、
ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。
【００７８】
ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、
ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、
ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。
【００７９】
ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、
ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号９のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、
ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。
【００８０】
ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、

ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、
ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。

【００８１】

ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、
ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号７のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、
ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。

【００８２】

ある一実施形態では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供するものであり、
ａ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１領域、
ｂ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２領域、及び
ｃ）配列番号８のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３領域、
を含むＶＨ、並びに
ｄ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１領域、
ｅ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２領域、及び
ｆ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３領域、
を含むＶＬ、を含む。

【００８３】

ある一実施形態では、本開示は、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、及び配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一実施形態では、本開示は、配列番号２０又は配列番号２１のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一実施形態では、本開示は、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、及び配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、並びに配列番号２０又は配列２１のアミノ酸配列に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一実施形態では、本開示は、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、及び配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一実施形態では、本開示は、配列番号２０又は

配列２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一実施形態では、本開示は、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、及び配列番号１９からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、並びに配列番号２０又は配列２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【００８４】

ある一実施形態では、本開示は、重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、ＶＨ及びＶＬは、以下：

ｉ．配列番号２５のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ、並びに

ｉｉ．配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２６のアミノ酸配列を含むＶＬ、

からなる群から選択される。

【００８５】

ある一実施形態では、本開示は、重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、ＶＨ及びＶＬは、以下：

ｉ．配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｉｉ．配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｉｉｉ．配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｉｖ．配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｖ．配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、並びに

ｖｉ．配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

からなる群から選択される。

【００８６】

ある一実施形態では、本開示は、配列番号１４のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２０のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【００８７】

ある一実施形態では、本開示は、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【００８８】

ある一実施形態では、本開示は、配列番号１６のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【００８９】

ある一実施形態では、本開示は、配列番号１７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（Ｖ

Ｈ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【００９０】

ある一実施形態では、本開示は、配列番号１８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【００９１】

ある一実施形態では、本開示は、配列番号１９のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【００９２】

ある一態様では、前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、モノクローナル抗体又は抗原結合性フラグメントである。他の一態様では、前記単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、組換え抗体又は抗原結合性フラグメントである。ある一態様では、前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、合成抗体又は抗原結合性フラグメントである。本開示のある一態様では、前記ＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４からなる群から選択されるアイソタイプの全長ＩｇＧである。

【００９３】

特異性

ある一実施形態では、本開示は、分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一態様では、本開示に係る前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒトＣＤ３に特異的である。ある一態様では、本開示に係る前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又は及びその抗原結合性フラグメントは、カニクイザルＣＤ３に特異的である。ある一態様では、本開示に係る前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒト及びカニクイザルＣＤ３に特異的である。

【００９４】

本開示のある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒトＣＤ３イプシロンに特異的である。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、カニクイザルＣＤ３イプシロンに特異的である。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒト及びカニクイザルＣＤ３イプシロンに特異的である。ある一態様では、本開示に係る単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒト及びカニクイザルＣＤ３イプシロンに特異的である。

【００９５】

ある一態様では、本開示は、本開示に係るヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、カニクイザルＣＤ３に交差反応的に結合する。ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３イプシロンに特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、カニクイザルＣＤ３イプシロンに交差反応的に結合する。ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒトＣＤ３イプシロンに特異的に結合する。本開示のある一態様では、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒト及

びカニクイザルＣＤ３イプシロンに特異的に結合する。
【００９６】
ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記ヒトＣＤ３は、配列番号４５又は配列番号４６のアミノ酸配列を含むヒトＣＤ３イプシロンである。ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４１、及び配列番号４３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むヒトＣＤ３イプシロンポリペプチドに特異的に結合する。
【００９７】
ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記カニクイザルＣＤ３は、配列番号４７又は配列番号４８のアミノ酸配列を含むカニクイザルＣＤ３イプシロンである。ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４２、及び配列番号４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むカニクイザルＣＤ３イプシロンポリペプチドに特異的に結合する。
【００９８】
ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号４１、配列番号４３、配列番号４２、及び配列番号４４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する。本開示のある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、細胞外領域ヒトＣＤ３イプシロンに特異的に結合する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、細胞外領域ヒト及びカニクイザルＣＤ３イプシロンに特異的に結合する。本開示のある一態様では、ヒトＣＤ３イプシロンの前記細胞外領域は、配列番号４６のアミノ酸配列を含む。さらなるある一態様では、カニクイザルＣＤ３イプシロンの前記細胞外領域は、配列番号４８のアミノ酸配列を含む。ある一態様では、本開示は、以下：配列番号４５、配列番号４６、配列番号４７、配列番号４８、配列番号４１、配列番号４２、配列番号４３、及び配列番号４４からなる群から選択されアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。ある一態様では、本開示は、配列番号４５、配列番号４６、配列番号４１、又は配列番号４３によりコードされるポリペプチド、及び配列番号４７、配列番号４８、配列番号４２、又は配列番号４４によりコードされるポリペプチドに特異的に結合する本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関する。
【００９９】
本開示のある一態様では、前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、
ｉ．以下
（ａ）ＧＦＳＦＧＳＨＹＭＳ（配列番号１）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１、
（ｂ）ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＶＥＳＶＫＧ（配列番号２）、ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＧＥＳＶＫＧ（配列番号３）、又はＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＥＥＳＶＫＧ（配列番号４）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び
（ｃ）ＧＹＳＡＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号５）、ＧＹＳＤＥＦＡＴＲＳＧＬＤＶ（配列番号６）、ＧＹＳＥＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号７）、ＧＹＳＤＥＦＡＫＲＳＧＬＤＶ（配列番号８）、又はＧＹＳＤＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号９）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、
を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、並びに
ｉｉ．以下

（ｄ）ＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＹＶＹ（配列番号１０）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ１、
（ｅ）ＲＮＮＱＲＰＳ（配列番号１１）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び
（ｆ）ＡＧＷＳＲＳＬＨＧＡＶ（配列番号１２）又はＡＧＷＳＲＥＬＨＧＡＶ（配列番号１３）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３、
を含む可変軽鎖領域（ＶＬ）、
を含む。

【０１００】

本開示のある一態様では、前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、以下：
ｉ．配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉ．配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉｉ．配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｖ．配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｖ．配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、並びに
ｖｉ．配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
からなる群から選択されるＶＨ及びＶＬを含む。

【０１０１】

キネティクス

ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、それぞれ配列番号２５及び配列番号２６のアミノ酸配列を含むＶＨ及びＶＬを含む抗体のK_Dと比較してより低いK_Dで、配列番号４１及び／又は配列番号４３を含むヒトＣＤ３イプシロンペプチドへの１価親和性を有する。

【０１０２】

ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、１０ｎＭ以下、たとえば、８ｎＭ以下、７ｎＭ以下、６ｎＭ以下、５ｎＭ以下、４ｎＭ以下、３ｎＭ以下、２ｎＭ以下、１ｎＭ以下、０．１ｎＭ以下、０．２ｎＭ、又は０．１ｎＭ以下のK_Dで、配列番号４１及び／又は配列番号４３を含むヒトＣＤ３イプシロンペプチドへの１価親和性を有する。

【０１０３】

ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、約１０ｎＭ、約９ｎＭ、７ｎＭ、約６ｎＭ、約５ｎＭ、約４ｎＭ、約３ｎＭ、約２ｎＭ、約１ｎＭ、約０．９ｎＭ、約０．８ｎＭ、約０．７ｎＭ、約０．６ｎＭ、約０．５ｎＭ、約０．４ｎＭ、約０．３ｎＭ、約０．２ｎＭ、約０．１ｎＭのK_Dで、配列番号４１又は配列番号４３を含むヒトＣＤ３イプシロンペプチドへの１価親和性を有する。

【０１０４】

ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、０．１ｎＭ～１０ｎＭのK_Dで、配列番号４１又は配列番号３４を含むヒトＣＤ３イプシロンポリペプチドへの１価親和性を有する。

【０１０５】

ある特定の態様では、前記１価親和性は、ｓｃＦｖ、Ｆｖ、又はＦａｂで決定される。ある一態様では、前記１価親和性は、本明細書の実施例２．１、実施例３．４、実施例４．４、又は実施例４．８に記載のように決定される。ある一態様では、前記１価親和性は、本明細書の実施例２、実施例３、又は実施例４に記載の抗体フォーマットで決定される。

【０１０６】

ある一態様では、前記分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１０７】

細胞結合

ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、４０ｎＭ～１２０ｎＭ、たとえば、１ｎＭ～１０ｎＭのＥＣ$_{50}$濃度で、ヒトジャーカット細胞（ATCC #TIB-152）に特異的に結合する。

【０１０８】

ある一態様では、本開示は、ヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、約１ｎＭ、約２ｎＭ、約３ｎＭ、約４ｎＭ、約５ｎＭ、約６ｎＭ、約７ｎＭ、約８ｎＭ、約９ｎＭ、約１０ｎＭ、約２０ｎＭ、約３０ｎＭ、約４０ｎＭ、約５０ｎＭ、約６０ｎＭ、約７０ｎＭ、約８０ｎＭ、約９０ｎＭ、約１００ｎＭのＥＣ$_{50}$濃度で、ヒトジャーカット細胞（ATCC #TIB-152）に特異的に結合する。

【０１０９】

ある一態様では、前記ＥＣ$_{50}$濃度は、本明細書の実施例２．２又は実施例３．５に記載のＦＡＣＳアッセイで決定される。ある一態様では、前記ＥＣ$_{50}$濃度は、Ｆａｂフォーマットで決定される。ある一態様では、前記ＥＣ$_{50}$濃度は、抗体Ｆｖフォーマットで決定される。ある一態様では、前記ＥＣ$_{50}$濃度は、本開示に係るヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む実施例２又は実施例３に係る二重特異的抗体フォーマットで決定される。

【０１１０】

ある一態様では、前記分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１１１】

ＥＬＩＳＡ結合

ある一態様では、本開示は、１～４０ｎＭ、好ましく１～１５ｎＭのＥＣ$_{50}$濃度で、配列番号４１又は配列番号４３を含む組換えヒトＣＤ３イプシロンポリペプチドに特異的に結合する、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一態様では、前記単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、４０ｎＭ未満、好ましくは１５ｎＭ未満の濃度のＥＣ$_{50}$で、配列番号４１又は配列番号４３を有する組換えヒトＣＤ３イプシロンポリペプチドに特異的に結合する。ある一態様では、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬ又は配列番号２５のＶＨ及び配列番号２６のＶＬを含むＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントで決定されたＥＣ$_{50}$濃度の約１／０．５、約１／１、約１／１．５、約１／２、約１／２．５、又は約１／３の濃度のＥＣ$_{50}$で、配列番号４１又は配列番号４３を有する組換えヒトＣＤ３イプシロンポリペプチドに特異的に結合する。

【０１１２】

ある一態様では、前記ＥＣ$_{50}$濃度は、本明細書の実施例４．７に記載のように決定される。ある一態様では、前記ＥＣ$_{50}$濃度は、ＥＬＩＳＡアッセイで決定される。ある一

態様では、前記ＥＣ５０濃度は、抗体Ｆｖで決定される。ある一態様では、前記ＥＣ５０濃度は、本開示に係るヒトＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む実施例４に係る二重特異的抗体フォーマットで決定される。

【０１１３】

ある一態様では、前記分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１１４】

安全性

ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬを含むＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントと比較してＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞上でのＣＤ６９発現のより少ないアップレギュレーションを誘導する。

【０１１５】

ある一態様では、本開示は、ＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞上に発現されるＣＤ３に特異的に結合し、且つ配列番号１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬを含むＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントと比較してより少ない数のＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞でＣＤ６９発現のアップレギュレーションを誘導する、単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【０１１６】

ある特定の態様では、ＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋Ｔ細胞上のＣＤ６９のアップレギュレーションは、本明細書の実施例４．１３に記載の方法により決定される。ある特定の態様では、ＣＤ６９のアップレギュレーションは、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む実施例４に係る二重特異的抗体で決定される。ある一態様では、前記抗体は二重特異的抗体である。ある一態様では、前記二重特異的抗体は、ＣＤ４＋及び／又はＣＤ８＋陽性Ｔ細胞上に発現されるＣＤ３に１価で結合する。ある一態様では、前記ＣＤ６９アップレギュレーションはＦｖフラグメントで決定される。ある特定の態様では、前記ＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントは、表８にリストされる抗体又はその抗原結合性フラグメントである。

【０１１７】

ある一態様では、前記分化クラスター３（ＣＤ３）に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む。

【０１１８】

脱免疫化

Ｔ細胞エピトープは、ＭＨＣクラスＩＩ分子と合理的効率で結合するか、又は（治療用）タンパク質若しくはポリペプチドを摂取する種からのＴ細胞レセプターにペプチド：ＭＨＣ複合体の形態で強く結合するか、又はＭＨＣクラスＩＩ上への提示を介してＴ細胞を刺激する能力を示すかどれかである、ポリペプチド配列内の特異的ペプチド配列である。（潜在的）Ｔ細胞エピトープは、ＭＨＣ結合性を確立するいずれかのコンピュテーショナル又は物理的方法による測定可能である。しかしながら、ＭＨＣクラスＩＩ分子に結合することが見いだされたある特定のペプチドは、タンパク質が投与された生物内で「自己」として認識されるため、免疫応答を惹起しないものと理解されている。かかるペプチドは、たとえば、生殖系統ヒトイムノグロブリン可変領域タンパク質配列中に見いだされる。本開示は、ＣＤ３に特異的な親ヒト抗体中に存在する潜在的Ｔ細胞エピトープの除去によりＣＤ３に特異的な改善されたヒト抗体を設計するアプローチを取り入れる。これには、同定されたＴ細胞エピトープの除去を可能にするアミノ酸置換の選択及び異なるアミノ酸置換を有するある範囲内のバリアント分子の検査が関与する。本開示の原理は、潜在的Ｔ細胞エピトープの同定によるヒトＣＤ３特異的抗体の一次ＣＤＲ配列の改変及びかかる潜

在的Ｔ細胞エピトープの排除のためＣＤＲ内のその後続的改変にある。治療用抗体の一次配列は、いずれかの好適な手段によりＴ細胞エピトープの存在に関して解析可能である。本開示の方法では、Lonza（Epibase（商標）、Epibaseバージョン：v3.0、国際公開第２００３／１０５０５８号）により提供されるコンピュテーショナルスクリーニング方法。

【０１１９】

ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な脱免疫された単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な脱免疫された単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントである、ＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。ある一態様では、本開示は、配列番号１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬを含むＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントと比較したときにヒトにおいてより低い免疫原性又は非免疫原性である、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。

【０１２０】

ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又は抗原結合性フラグメントは、ヒトにおいて低減された免疫応答選出リスク又は免疫原性反応選出リスクを有する。ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体又は抗原結合性フラグメントは、ヒトにおいて低減されたヒト抗ヒト抗体応答選出リスクを有する。

【０１２１】

ある一態様では、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、ヒトにおいて前記ヒトに一旦投与されると低減された免疫応答選出リスク又は免疫原性反応選出リスクを有する。ある一態様では、前記低減されたリスクは、配列番号１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬを含むヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントのヒトにおける免疫応答選出リスク又は免疫原性反応選出リスクを基準にする。本開示のある一態様では、ヒトにおける前記低減された免疫応答選出リスク又は免疫原性反応選出リスクは、本明細書の実施例４に記載のように決定される。本開示のある一態様では、前記低減されたリスクは、本開示に係るＣＤ３に特異的なヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントのＶＨ及び／又はＶＬで決定される。

【０１２２】

本開示のある一態様では、前記リスク又は低減されたリスクは、Ｔ細胞エピトープ数、リスクスコア、絶対スコア、Ｈライン数、絶対Ｈライン数、Ｈスコア、及び絶対Ｈスコア、及び／又はホットスポット数で決定される数値として提供され、上記はすべて、本明細書に定義される。本開示のある一態様では、前記リスク又は低減されたリスクは、配列番号１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬを含むヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントで決定されたリスクを基準にする。ある一態様では、前記数値は、国際公開第２００３／１０５０５８号（その全体が本明細書に組み込まれる）に基づくｉｎ ｓｉｌｉｃｏ Ｔ細胞エピトープスクリーニングツールEpibase（商標）、Epibaseバージョン：v3.0（Lonza）を用いて、Ｔ細胞エピトープ数、リスクスコア、絶対スコア、Ｈライン数、絶対Ｈライン数、Ｈスコア、及び絶対Ｈスコア、及び／又はホットスポット数で決定された。ある一態様では、アレルセットは、メジャーコーカサス人ＤＲＢ１アレルである。ある一態様では、リスクは、コーカサス人ＤＲＢ１アレルのさまざまなアロタイプで決定される。ある一態様では、フィルターセットは、ヒト抗体生殖系統配列に対するものである。ある一態様では、リスクは、本開示に係るＣＤ３に特異的なヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントのＶＨ及び／又はＶＬに存在するヒト抗体生殖系統配列を除外することにより決定される。ある一態様では、リスクは、本開示に係るＣＤ３に特異的なヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントのＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及びＬＣＤＲ３領域で決定される。ある一態様では、前記リスクでは、ヒトにおいて免疫応答を惹起する際にヒト抗体生殖系統配列のリスクは除外される。ある一態様では、選択集団はコーカサス人

である。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、コーカサス人集団のヒトにおいて低減された免疫応答選出リスク又は免疫原性反応選出リスクを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬを含むＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントのリスクと比較してコーカサス人集団のヒトにおいて低減された免疫応答選出リスク又は免疫原性反応選出リスクを有する。

【０１２３】

ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、約３８０～４５０、好ましくは約３９０～４２５の範囲内の本明細書で決定される絶対スコアのＶＨを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、４４０未満、４３０未満、４２０未満、４１０未満、４００未満、３９５未満の絶対スコアのＶＨを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４を含むＶＨと比較して低減された絶対スコアのＶＨを有する。ある一態様では、前記低減された絶対スコアは、２００超、たとえば、２１０、２１５、２２０、２３０、２３５、２４０、２４５、又は２５０超低減される。

【０１２４】

ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、約３３０～３７０、好ましくは約３３５～３６５の範囲内の絶対ＨスコアのＶＨを有する。ある一態様では、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、約３３５又は３６５の絶対ＨスコアのＶＨを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、３７０未満、３６４未満、３６０未満、３５５未満、３５０未満、３４５未満、３４０未満、又は３３５未満の絶対ＨスコアのＶＨを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４を含むＶＨと比較して低減された絶対ＨスコアのＶＨを有する。ある一態様では、前記低減された絶対Ｈスコアは、２００超、たとえば、２１０、２１５、２２０、２３０、２３５、２４０、２４５、又は２５０超低減される。

【０１２５】

ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、１４の絶対ＨラインのＶＨを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４を含むＶＨと比較して低減された絶対ＨラインのＶＨを有する。ある一態様では、前記低減された絶対Ｈラインは、１１低減される。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、４の絶対ホットスポット数のＶＨを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４を含むＶＨと比較して低減された絶対ホットスポット数のＶＨを有する。ある一態様では、前記低減された絶対ホットスポット数は、２低減される。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、６２の絶対スコア及び／又は絶対ＨスコアのＶＬを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号１４を含むＶＨと比較して低減された絶対スコア及び／又は絶対ＨスコアのＶＬを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、２の絶対Ｈライン数のＶＬを有する。ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、０の絶対ホットスポット数のＶＬを有する。

【０１２６】

ある一実施形態では、前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、以下：

ｉ．配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉ．配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｉｉ．配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｉｖ．配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、並びに
ｖ．配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、
からなる群から選択されるＶＨ及びＶＬを含む。

【０１２７】

多重特異的抗体

本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、たとえば、腫瘍細胞などの特異的細胞型のＴ細胞媒介死滅が有益又は望ましい状況下で、ＣＤ３発現性細胞傷害性Ｔ細胞を標的として細胞傷害性Ｔ細胞活性化を刺激する二重又は多重特異的抗体フォーマットで優先的に使用されるべきである。

【０１２８】

本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、もう１つの機能性分子、たとえば、もう１つのペプチド又はタンパク質に連結可能であるか、又はそれと共発現可能である。ある一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントに関し、その場合、前記抗体又はその抗原結合性フラグメントは、異種タンパク質又はポリペプチドに融合される。ある一態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメント及び異種タンパク質又はポリペプチドを含む融合タンパク質に関する。たとえば、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、第２又は任意に第３の結合特異性を有する二重特異的又は多重特異的抗体を産生するために、１つ以上の他の分子エンティティー、たとえば、もう１つの抗体又はその抗原結合性フラグメントに（たとえば、化学的カップリング、ジェネティック融合、非共有結合性会合、又は他の形で）機能的に連結可能である。２つ以上の抗原に結合する能力のある二重特異的又は多重特異的抗体は、治療用途に大きな関心が寄せられている。他の一態様では、本開示は、ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供し、その場合、前記抗体は、単一特異的、二重特異的、若しくは多重特異的抗体又はその抗原結合性フラグメントである。多重特異的抗体は、同一標的抗原上の異なるエピトープに特異的な抗体若しくはその抗原結合性フラグメントを含有しうるか、又は２つ以上の標的抗原に特異的な抗体若しくはその抗原結合性フラグメントを含有しうる。本開示に係る二重特異的又は多重特異的抗体との関連では、細胞表面標的抗原は、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）でありうる。腫瘍関連抗原の非限定的例としては、たとえば、腫瘍又は癌性細胞の表面上に発現される抗原が挙げられる。本開示との関連で使用可能な模範的多重特異的抗体フォーマットとしては、限定されるものではないが、たとえば、ｓｃＦｖベース又はダイアボディー二重特異的フォーマット、ＩｇＧ－ｓｃＦｖ融合、デュアル可変ドメイン（ＤＶＤ）－Ｉｇ、クアドローマ、ｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ、共通軽鎖（たとえば、ｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ型共通軽鎖など）、ＣｒｏｓｓＭａｂ、ＣｒｏｓｓＦａｂ、（ＳＥＥＤ）ｂｏｄｙ、ロイシンジッパー、Ｄｕｏｂｏｄｙ、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、デュアル作用性Ｆａｂ（ＤＡＦ）－ＩｇＧ、Ｍａｂ２二重特異的フォーマット（たとえば、Klein et al.2012, mAbs 4:6,1-11を参照されたい）、及びヘミボディー（たとえば、Stuhler et al.Nat Commun.2019;10:5387を参照されたい）が挙げられる。好ましくは、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントは、本明細書の実施例３若しくは実施例５又は国際公開第２０２０／１１５１１５号に記載のフォーマットで使用される。

【０１２９】
ある一態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的なヒト抗体の抗原結合性フラグメント及び前記第１の抗原結合性フラグメントとは異なる抗原に結合する第２の抗体の第２の抗原結合性フラグメントを含む二重特異的又は多重特異的抗体を提供する。本開示のある一態様では、前記第２の抗原結合性フラグメントは、細胞表面抗原に結合する。ある一態様では、前記細胞表面標的抗原は腫瘍関連抗原である。ある一態様では、前記第１の抗原結合性フラグメントは、免疫エフェクター細胞上に存在する又は発現されるＣＤ３に結合する。ある一態様では、前記免疫エフェクター細胞はＴ細胞である。ある一態様では、前記Ｔ細胞は細胞傷害性Ｔ細胞である。ある一態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的なヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む二重特異的又は多重特異的抗体を提供し、その場合、二重特異的又は多重特異的抗体は、標的抗原発現性細胞のリダイレクトＴ細胞性死滅を媒介する。ある特定の態様では、前記標的細胞死滅は、本明細書に記載の方法、たとえば、実施例４．１２に記載のものにより決定可能である。
【０１３０】
本開示の態様では、本開示に係る二重特異的又は多重特異的抗体は、Ｔ細胞上に発現されるＣＤ３及びＴ細胞以外の細胞上に存在する第２の抗原に特異的に結合する。ある特定の態様では、前記二重特異的又は多重特異的抗体は、Ｔ細胞上に発現されるＣＤ３への結合及びＴ細胞以外の標的細胞上に存在する第２の抗原への結合に続いてＴ細胞を活性化する。ある特定の態様では、活性化Ｔ細胞は、他の細胞上で細胞傷害作用及び／又はアポトティック作用を発揮する能力がある。ある一態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的なヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む二重特異的又は多重特異的抗体を提供し、その場合、前記二重特異的又は多重特異的抗体は、Ｔ細胞上に発現されるＣＤ３及び細胞表面標的発現性細胞への結合に続いて細胞表面標的抗原発現性細胞の存在下でヒトＴ細胞増殖を誘導する。
【０１３１】
リンカー最適化
ある一態様では、本開示に係る二重特異的抗体は、３つのＦｖ領域で構成される。これは、レギュラーイムノグロブリン構造の２つのＦａｂアーム及びＦｃ部分間に追加Ｆｖ領域を取り込んだレギュラーイムノグロブリン（たとえば、ＩｇＧ）抗体構造（２つの重鎖が２つの軽鎖と会合して２つのＦｖ領域を形成する）を用いることにより達成される。ある一態様では、本開示に係る二重特異的抗体は、図２に描かれる一般構造を有する。
【０１３２】
ある一態様では、本開示は、
ａ）第１の抗原に特異的に結合する第１のＦｖ領域を含む第１のＦａｂ、
ｂ）第２の抗原に特異的に結合する第２のＦｖ領域、及び
ｃ）第３の抗原に特異的に結合する第３のＦｖ領域を含む第２のＦａｂ、並びに
ｄ）第１及び第２のＦｃ領域サブユニットで構成されたＦｃ領域、
を含み、
ｉ．第１のＦａｂ重鎖のＣ末端が、第１のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＨ又はＶＬのＮ末端に融合され、
ｉｉ．第２のＦｖ領域のＶＨ又はＶＬのＣ末端が、第２のペプチドリンカーを介して第１のＦｃ領域サブユニットのＮ末端に融合され、
ｉｉｉ．第２のＦｃ領域サブユニットのＮ末端が、第４のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域の相補的可変ドメインのＣ末端に融合され、且つ
ｉｖ．第２のＦａｂ重鎖のＣ末端が、第３のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＨ又はＶＬのＮ末端に融合され、ただし、第１及び第２のＦａｂが、第２のＦｖ領域の識別可能可変領域に融合される、
二重特異的抗体を提供する。
【０１３３】
ある一態様では、第１のＦａｂのＣＨ１ドメインのＣ末端は、第１のペプチドリンカー

を介して第２のＦｖ領域のＶＨ又はＶＬのＮ末端に融合され、ただし、第１及び第２のＦａｂは、第２のＦｖ領域の識別可能可変ドメインに融合される。ある一態様では、第１のＦａｂのＣＨ１ドメインのＣ末端は、第１のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＨのＮ末端に融合され、ただし、第１及び第２のＦａｂは、第２のＦｖ領域の識別可能可変ドメインに融合される。ある一態様では、第１のＦａｂのＣＨ１ドメインのＣ末端は、第１のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＬのＮ末端に融合され、ただし、第１及び第２のＦａｂは、第２のＦｖ領域の識別可能可変ドメインに融合される。

【０１３４】

ある一態様では、第２のＦａｂのＣＨ１ドメインのＣ末端は、第３のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＨ又はＶＬのＮ末端に融合され、ただし、第１及び第２のＦａｂは、第２のＦｖ領域の識別可能可変ドメインに融合される。ある一態様では、第２のＦａｂのＣＨ１ドメインのＣ末端は、第３のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＨのＮ末端に融合され、ただし、第１及び第２のＦａｂは、第２のＦｖ領域の識別可能可変ドメインに融合される。ある一態様では、第２のＦａｂのＣＨ１ドメインのＣ末端は、第３のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＬのＮ末端に融合され、ただし、第１及び第２のＦａｂは、第２のＦｖ領域の識別可能可変ドメインに融合される。

【０１３５】

ある一態様では、第１のＦａｂの重鎖のＣ末端は、第１のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＬのＮ末端に融合され、且つ第２のＦａｂの重鎖のＣ末端は、第３のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＨのＮ末端に融合される。ある一態様では、第１のＦａｂの重鎖のＣ末端は、第１のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＨのＮ末端に融合され、且つ第２のＦａｂの重鎖のＣ末端は、第３のペプチドリンカーを介して第２のＦｖ領域のＶＬのＮ末端に融合される。

【０１３６】

ある一態様では、本開示に係る二重特異的抗体は、４つのポリペプチドを含み、

ａ）第１のポリペプチドは、第１のＦａｂの軽鎖を含み、

ｂ）第２のポリペプチドは、そのＮ末端からそのＣ末端に、

ｉ．第１のＦａｂの重鎖、

ｉｉ．第１のペプチドリンカー、

ｉｉｉ．第２のＦｖ領域のＶＬ、

ｉｖ．第２のペプチドリンカー、及び

ｖ．第１のＦｃ領域サブユニット、

を含み、

ｃ）第３のポリペプチドは、そのＮ末端からそのＣ末端に、

ｉ．第２のＦａｂの重鎖、

ｉｉ．第３のペプチドリンカー、

ｉｉｉ．第２のＦｖ領域のＶＨ、

ｉｖ．第４のペプチドリンカー、

ｖ．第２のＦｃ領域サブユニット、

を含み、且つ

ｄ）第４のポリペプチドは、第２のＦａｂの軽鎖を含む。

【０１３７】

ある一態様では、本開示に係る二重特異的抗体は、４つのポリペプチドを含み、

ａ）第１のポリペプチドは、第１のＦａｂの軽鎖を含み、

ｂ）第２のポリペプチドは、そのＮ末端からそのＣ末端に、

ｉ．第１のＦａｂの重鎖、

ｉｉ．第１のペプチドリンカー、

ｉｉｉ．第２のＦｖ領域のＶＨ、

ｉｖ．第２のペプチドリンカー、及び

ｉｉｉ．第１のＦｃ領域サブユニット、

を含み、
ｃ）第３のポリペプチドは、そのＮ末端からそのＣ末端に、
ｉ．第２のＦａｂの重鎖、
ｉｉ．第３のペプチドリンカー、
ｉｉｉ．第２のＦｖ領域のＶＬ、
ｉｖ．第４のペプチドリンカー、及び
ｖ．第２のＦｃ領域サブユニット、
を含み、
ｄ）第４のポリペプチドは、第２のＦａｂの軽鎖を含む。
【０１３８】
本開示のある一態様では、第１、第２、第３、及び第４のペプチドリンカーは、以下：
ａ）ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号３０）
ｂ）ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）、
ｃ）ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）、
ｄ）ＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＧＨ（配列番号３２）、
ｅ）ＰＫＡＡＰ（配列番号３６）、
ｆ）ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮ（配列番号３４）、
ｇ）ＡＳＴＫＧＰ（配列番号３７）、及び
ｈ）ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ（配列番号３５）、
からなるアミノ酸配列の群から選択される。
【０１３９】
本開示のある一態様では、第２及び第４のペプチドリンカーは、ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号３８）のアミノ酸配列にＣ末端で融合される。本開示のある一態様では、第２及び第４のペプチドリンカーは、ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号３８）のアミノ酸配列をＣ末端に追加的に含む。
【０１４０】
本開示のある一態様では、第２及び第４のペプチドリンカーは、以下：
ａ）ＰＫＡＡＰＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７６）、
ｂ）ＡＳＴＫＧＰＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７７）、及び
ｃ）ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７８）、
ｄ）ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７９）、
ｅ）ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号８０）、
からなるアミノ酸配列の群から選択される。
【０１４１】
本開示のある一態様では、
ａ）第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰ（配列番号３６）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰ（配列番号３７）のアミノ酸配列を含み、又は
ｂ）第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、且つ第２及び第４のペプチドリンカーは、ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）のアミノ酸配列を含み、又は
ｃ）第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮ（配列番号３４）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ（配列番号３５）のアミノ酸配列を含み、又は

ｄ）第１及び第３のペプチドリンカーは、ＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＧＨ（配列番号３２）のアミノ酸配列を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮ（配列番号３４）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ（配列番号３５）のアミノ酸配列を含み、又は

ｅ）第１及び第３のペプチドリンカーは、ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）のアミノ酸配列を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮ（配列番号３４）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ（配列番号３５）のアミノ酸配列を含み、又は

ｆ）第１及び第３のペプチドリンカーは、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号３０）のアミノ酸配列を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮ（配列番号３４）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ（配列番号３５）のアミノ酸配列を含む。

【０１４２】

本開示のある一態様では、

ａ）第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７６）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７７）のアミノ酸配列を含み、又は

ｂ）第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、且つ第２及び第４のペプチドリンカーは、ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７８）のアミノ酸配列を含み、又は

ｃ）第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７９）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号８０）のアミノ酸配列を含み、又は

ｄ）第１及び第３のペプチドリンカーは、ＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＧＨ（配列番号３２）のアミノ酸配列を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７９）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号８０）のアミノ酸配列を含み、又は

ｅ）第１及び第３のペプチドリンカーは、ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）のアミノ酸配列を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７９）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号８０）のアミノ酸配列を含み、又は

ｆ）第１及び第３のペプチドリンカーは、ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号３０）のアミノ酸配列を含み、第２のペプチドリンカーは、ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７９）のアミノ酸配列を含み、且つ第４のペプチドリンカーは、ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号８０）のアミノ酸配列を含む。

【０１４３】

本開示のある一態様では、第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、且つ第２及び第４のペプチドリンカーは、ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）のアミノ酸配列を含む。本開示のある一態様では、第１及び第３のペプチドリンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）を含み、且つ第２及び第

４のペプチドリンカーは、ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号７８）のアミノ酸配列を含む。

【０１４４】

本開示のある一態様では、第２のＦｖ領域は、ＣＤ３に特異的に結合する。ある一態様では、第２のＦｖは、ＣＤ３、特定的にはヒトＣＤ３、より特定的にはヒトＣＤ３イプシロンに特異的である。

【０１４５】

本開示のある一態様では、第２のＦｖは、

ｉ．以下

（ａ）ＧＦＳＦＧＳＨＹＭＳ（配列番号１）のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ）１、

（ｂ）ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＶＥＳＶＫＧ（配列番号２）、ＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＧＥＳＶＫＧ（配列番号３）、又はＮＩＮＱＩＧＹＳＳＹＹＥＥＳＶＫＧ（配列番号４）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び

（ｃ）ＧＹＳＡＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号５）、ＧＹＳＤＥＦＡＴＲＳＧＬＤＶ（配列番号６）、ＧＹＳＥＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号７）、ＧＹＳＤＥＦＡＫＲＳＧＬＤＶ（配列番号８）、又はＧＹＳＤＥＦＡＨＲＳＧＬＤＶ（配列番号９）のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、

を含む重鎖可変領域（ＶＨ）、並びに

ｉｉ．以下

（ｄ）ＳＧＳＳＳＮＩＧＳＮＹＶＹ（配列番号１０）のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ）１、

（ｅ）ＲＮＮＱＲＰＳ（配列番号１１）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び

（ｆ）ＡＧＷＳＲＳＬＨＧＡＶ（配列番号１２）又はＡＧＷＳＲＥＬＨＧＡＶ（配列番号１３）のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３、

を含む可変軽鎖領域（ＶＬ）、

を含む。

【０１４６】

本開示のある一態様では、第２のＦｖは、以下：

ｉ．配列番号１４のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２０のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｉｉ．配列番号１５のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｉｉｉ．配列番号１６のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｉｖ．配列番号１７のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

ｖ．配列番号１８のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、並びに

ｖｉ．配列番号１９のアミノ酸配列を含むＶＨ及び配列番号２１のアミノ酸配列を含むＶＬ、

からなる群から選択されるＶＨ及びＶＬを含む。

【０１４７】

本開示のある一態様では、第１のＦａｂ又は第２のＦａｂの軽鎖は、それぞれ、第１のＦａｂ又は第２のＦａｂのＶＬ及びＣＬを含む。本開示のある一態様では、第１のＦａｂ及び第２のＦａｂの軽鎖は、まったく同じである。本開示のある一態様では、第１のＦａｂ及び第２のＦａｂの重鎖は、まったく同じである。本開示のある一態様では、第１のＦａｂ及び第２のＦａｂは、まったく同じである。

【０１４８】

ある一態様では、第１及び第２のＦｃ領域サブユニットは、Ｆｃ領域を形成する。ある

一態様では、Ｆｃ領域は、ＩｇＧ１　Ｆｃ領域である。ある一態様では、前記ＩｇＧ１Ｆｃ領域は、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ領域である。ある一態様では、Ｆｃ領域は、第１及び第２のＦｃ領域サブユニットの会合を促進する１つ以上のアミノ酸修飾を含む。ある一態様では、ＥＵインデックスによる番号付けを用いて、第１のＦｃ領域サブユニットのＣＨ３ドメイン中、位置３６６のトレオニン残基は、トリプトファン残基に置き換えられ（Ｔ３６６Ｗ）、且つ位置３５４のセリン残基は、システイン残基に置き換えられ（Ｓ３５４Ｃ）、且つ第２のＦｃ領域サブユニットのＣＨ３ドメイン中、位置４０７のチロシン残基は、バリン残基に置き換えられ（Ｙ４０７Ｖ）、位置３６６のトレオニン残基は、セリン残基に置き換えられ（Ｔ３６６Ｓ）、位置３６８のロイシン残基は、アラニン残基に置き換えられ（Ｌ３６８Ａ）、且つ位置３４９のチロシン残基は、システイン残基に置き換えられる（Ｙ３４９Ｃ）。本開示のある一態様では、本開示に係る二重特異的抗体のＦｃ領域は、Ｆｃレセプター及び／又はＣ１ｑへの低減された結合親和性を有し、及び／又は低減されたエフェクター機能を有する。本開示のある一態様では、Ｆｃ領域は、各Ｆｃ領域サブユニットに１つ以上のアミノ酸変異を含み、前記１つ以上のアミノ酸変異は、ＥＵインデックスによる番号付けを用いて、以下：Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ｅ、Ｇ２３７Ａ、Ａ３３０Ｓ、及びＰ３３１Ｓからなる群から選択される。ある一態様では、ＥＵインデックスによる番号付けを用いて、各Ｆｃ領域サブユニット中、ヒトＩｇＧ１の位置Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｇ２３７、Ａ３３０、Ｐ３３１に対応する位置の少なくとも５アミノ酸残基は、それぞれ、Ａ、Ｅ、Ａ、Ｓ、及びＳに変異される。

【０１４９】

ある一態様では、第１の抗原及び第３の抗原は、まったく同じである。ある一態様では、第１及び第３の抗原は、腫瘍関連抗原である。ある一態様では、第１及び第３の抗原は、腫瘍細胞又は癌性細胞上に発現される腫瘍関連抗原である。ある一態様では、第２の抗原は、免疫細胞関連抗原である。ある一態様では、第２の抗原は、免疫細胞上に発現される。ある一態様では、第２の抗原は、免疫エフェクター細胞上に発現される。ある一態様では、第２の抗原は、細胞傷害性Ｔ細胞上に発現される。ある一態様では、第２の抗原はＣＤ３である。ある一態様では、第２の抗原はＣＤ３イプシロンである。ある一態様では、第２の抗原はヒトＣＤ３である。ある一態様では、第２の抗原はヒトＣＤ３イプシロンである。ある一態様では、本開示に係る二重特異的抗体は、第１の抗原への２価結合及び第２の抗原への１価結合を提供する。ある一態様では、前記二重特異的抗体は、３価二重特異的抗体である。

【０１５０】

効能

ある特定の態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的なヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む本開示に係る二重特異的抗体を提供し、その場合、前記二重特異的抗体は、標的抗原発現性細胞の標的細胞死滅を媒介する。ある一態様では、その標的細胞死滅は、細胞傷害性Ｔ細胞の存在下で媒介される。ある特定の態様では、前記二重特異的抗体は、細胞表面標的抗原に特異的に結合する抗体の第２の抗原結合性フラグメントを含む。ある特定の態様では、前記標的抗原は、腫瘍関連抗原である。ある一態様では、その標的抗原はＨＥＲ２である。ある一態様では、抗体のその第２の抗原結合性フラグメントは、ＨＥＲ２（UniProtKB - P04626）に結合する。ある一態様では、その標的細胞は、腫瘍細胞又は癌細胞である。ある一態様では、その標的細胞は、ＳＫＯＶ－３（ATCC（登録商標）HTB-77（商標））、ＳＫＢＲ３（ATCC（登録商標）HTB-30（商標））、又はＭＣＦ－７（ATCC（登録商標）HTB-22（商標））細胞である。ある特定の態様では、標的細胞死滅は、本明細書の実施例４．１３に記載の方法により決定される。

【０１５１】

処置

ある一態様では、本開示は、医薬剤としての使用のための本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を提供す

る。ある一態様では、本開示は、医薬剤の調製又は製造での使用のための本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体に関する。ある一態様では、本開示は、細胞増殖性疾患を有する被験者における免疫機能の増強での使用のための本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を提供する。

【０１５２】

ある一態様では、本開示は、必要とする被験者における細胞増殖性疾患の処置又は進行遅延の方法を提供し、この方法は、有効量の本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を前記被験者に投与することを含む。ある一態様では、本開示に係る前記ＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体は、必要とする被験者における細胞増殖性疾患の処置又は進行遅延での使用のためのものである。ある一態様では、前記細胞増殖性疾患は癌である。ある一態様では、前記癌は、限定されるものではないが、以下：食道癌、胃癌、小腸癌、大腸癌、結腸直腸癌、乳癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、Ｂ細胞リンパ腫、Ｂ細胞白血病、多発骨髄腫、腎癌、前立腺癌、肝癌、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、膠芽腫、胚中心Ｂ細胞様（ＧＣＢ）ＤＬＢＣＬ、活性化Ｂ細胞様（ＡＢＣ）ＤＬＢＣＬ、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、小リンパ球白血病（ＳＬＬ）、リンパ形質細胞リンパ腫（ＬＬ）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ）、中枢神経系リンパ腫（ＣＮＳＬ）、バーキットリンパ腫（ＢＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、脾辺縁帯リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、分類不能型脾リンパ腫／白血病、脾瀰漫性赤髄小Ｂ細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病バリアント、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、形質細胞骨髄腫、骨孤立性形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、粘膜関連リンパ組織節外辺縁帯リンパ腫（ＭＡＬＴリンパ腫）、結節性辺縁帯リンパ腫、小児結節性辺縁帯リンパ腫、小児濾胞性リンパ腫、原発性皮膚濾胞中心リンパ腫、Ｔ細胞／組織球リッチ大Ｂ細胞リンパ腫、ＣＮＳ原発性ＤＬＢＣＬ、原発性皮膚ＤＬＢＣＬ下肢型、高齢者ＥＢＶ陽性ＤＬＢＣＬ、慢性炎症併発ＤＬＢＣＬ、リンパ腫様肉芽腫症、原発性縦隔（胸腺）大Ｂ細胞リンパ腫、血管内大Ｂ細胞リンパ腫、ＡＬＫ陽性大Ｂ細胞リンパ腫、形質芽球性リンパ腫、ＨＨＶ８関連多中心性キャッスルマン病で発生する大Ｂ細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫：瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫とバーキットリンパ腫との中間的特徴を有する分類不能型Ｂ細胞リンパ腫、及び瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫と古典的ホジキンリンパ腫との中間的特徴を有する分類不能型Ｂ細胞リンパ腫からなる群から選択される。

【０１５３】

ある一態様では、本開示は、細胞増殖性疾患の処置又は進行遅延のための医薬剤の製造のための本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体の使用を提供する。ある一態様では、本開示は、細胞増殖性疾患を有する被験者における免疫機能を増強するための医薬剤の製造のための本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体の使用を提供する。ある一態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体による必要とする被験者の処置方法を提供する。

【０１５４】

ある一態様では、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体或いは前記抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を含む医薬組成物は、皮下に、静脈内に、筋内に、局所的に、経口的に、経真皮的に、腹腔内に、眼窩内に、植込みにより、吸入により、髄腔内に、脳室／心室内に、又は鼻内に投与される。

【０１５５】

組成物

ある一態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体及び薬学的に許容可能な担体又は賦形剤を含む医薬組成物を提供する。かかる担体又は賦形剤は、当技術分野で周知であり、当業者であれば本開示に係る抗体又はその抗原結合性フラグメントによる被験者の処置に最適な処方及び投与経路を見いだすであろう。ある一態様では、本開示は、疾患の処置のための医薬剤の調製での本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を含む医薬組成物の使用に関する。ある一態様では、本開示は、疾患の処置のための前記医薬組成物の使用に関する。ある一態様では、本開示は、被験者における細胞増殖性疾患の処置方法を提供し、前記方法は、治療有効量の本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を含む医薬組成物を前記被験者に投与することを含む。ある一態様では、本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体及び第２の治療剤の組合せを含む医薬組成物を提供する。ある一態様では、前記第２の治療剤は、本開示に係る前記ヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体と有利に組み合わされるいずれかの作用剤である。本開示は、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を用いてＴ細胞活性化を刺激する治療方法を提供し、治療方法は、必要とする被験者に本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む。本開示はまた、本開示に係るＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を用いて癌性細胞又は組織にＴ細胞性死滅をリダイレクトする治療方法を提供し、治療方法は、必要とする被験者に本開示に係る前記抗体若しくはその抗原結合性フラグメント又は二重特異的抗体を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む。

【０１５６】

産生

他の一態様では、本開示は、表５～７にリストされる抗体のいずれかのＣＤ３に特異的な単離されたヒト抗体又はその抗原結合性フラグメントの産生方法に関する。

【０１５７】

本開示に係るＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントの重鎖及び軽鎖のコーディング配列は、遺伝子発現に必要とされる所要の発現制御領域（たとえば、レギュラトリー領域）にＤＮＡを作動的に連結することにより発現ベクターに導入される組換えＤＮＡ分子でありうる。重鎖又は軽鎖をコードするポリヌクレオチドは、異なるベクター又は同一ベクターにクローニング可能であることは、当業者であれば分かるであろう。ベクターは、適切な宿主細胞、たとえば、原核細胞（たとえば、細菌）又は真核細胞（たとえば、酵母若しくは哺乳動物）に当技術分野で周知の方法により導入可能である（たとえば、“Current Protocol in Molecular Biology”,Ausubel et al.(eds.),Greene Publishing Assoc. and John Wiley Interscience,New York,1989 and 1992を参照されたい）。数多くのクローニングベクターが、当業者に知られており、適切なクローニングベクターの選択は、好みの問題である。遺伝子は、所望のタンパク質をコードするＤＮＡ配列がこの発現構築物を含有するベクターによりトランスフォームされた宿主細胞中でＲＮＡに転写されるように、プロモーター、リボソーム結合性部位（細菌発現用）、及び任意にオペレーター（本明細書では総称して「制御」エレメントという）の制御下に配置可能である。コーディング配列は、シグナルペプチド又はリーダー配列を含有していてもいなくてもよい。宿主細胞で発現されると、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントが得られる。当業者の熟知するところであろうが、これらのステップは、さまざまな方法で達成可能である。一般に、かかるステップは、典型的には、抗体分子をコードする核酸又はベクター又は感染性粒子を用いて好適な宿主細胞をトランスフォーム又はトランスフェクトすることを含む。さらに、かかるステップは、典型的には、前記宿主細胞の増殖（増大、成長）に好適な条件下で前記宿主細胞を培養することを含み、培養ステ

ップは、コード抗体又は抗原結合性フラグメントの産生（発現、合成）に好適な条件下である。増殖又は発現に好適な条件下での宿主細胞の培養は、典型的には、細胞成長又は発現誘導に好適な成分を含む培地の存在下で達成される。特定態様では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントの産生方法はさらに、産生された抗体又はその抗原結合性フラグメントを宿主細胞又は培地から単離するステップを含む。選択される発現系及び宿主に依存して、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、以上に記載の発現ベクターによりトランスフォームされた宿主細胞を対象タンパク質が発現される条件下で成長させることにより産生される。次いで、タンパク質を宿主細胞から単離し精製する。発現系により成長培地中にタンパク質が分泌される場合、タンパク質を培地から直接精製可能である。タンパク質が分泌されない場合、それは、細胞ライセートから単離されるか又は細胞膜画分から回収される。適切な成長条件及び回収方法の選択は、当該技術の範囲内である。次いで、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、当業者に公知のいくつかの技術により精製可能である。本開示のＦａｂが天然に存在するタンパク質ではないことに留意されるべきである。本開示はまた、本開示に係るＣＤ３に特異的な抗体又はその抗原結合性フラグメントの重鎖又は軽鎖可変領域を含むポリペプチドを発現する能力のある組換え発現ベクターを提供する。たとえば、本開示は、表５～７に挙げられたアミノ酸配列のいずれかをコードする組換え発現ベクターを含む。また、かかるベクターが導入された宿主細胞、さらには抗体又はその抗原結合性フラグメントの産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養すること及びそうして産生された抗体及びその抗原結合性フラグメントを回収することによる抗体又はその一部分の産生方法も本開示の範囲内に含まれる。

【０１５８】

抗原配列

【０１５９】

【表２】

表2: 本実施例で使用されるヒトIgG Fc又はFLAGタグに融合された組換えヒト及びカニクイザルCD3イプシロン細胞外ドメイン抗原のアミノ酸配列。

CD3抗原	配列番号	[aa]
成熟ヒトCD3e(22-49)_Fc2(K105-K330)	41	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCDIKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
成熟カニクイザルCD3e(22-49)_Fc2(K105-K330)	42	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCDIKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
成熟ヒトCD3e(22-118)_FLAG-chLys_Avi	43	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQH NDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYP RGSKPEDANFYLYLRARVDIDYKDDDDKIEGRMDKVFGR CELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQAT NRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSA LLSSDITASVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDV QAWIRGCRLVNSRGLNDIFEAQKIEWHE
成熟カニクイザルCD3e(22-109)_FLAG-chLys_Avi	44	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQ HNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPED ASHHLYLKARVVIDYKDDDDKIEGRMDKVFGRCELAAAM KRHGLDNYRGYSLGNWVCAAKFESNFNTQATNRNTDGS TDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCNIPCSALLSSDITA SVNCAKKIVSDGNGMNAWVAWRNRCKGTDVQAWIRGC RLVNSRGLNDIFEAQKIEWHE

【０１６０】

抗体配列

【０１６１】

【表３】

表3: 本開示の実施例で使用される抗HER2抗体トラスツズマブの抗体可変軽鎖(VL)及び可変重鎖(VH)領域配列。

抗体	鎖	配列番号	[aa]
トラスツズマブ	VH	28	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSS
	VL	29	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRT

【０１６２】

【表４】

表4: 国際出願PCT/EP2021/076052号に記載の祖父母CD3特異的抗体CD3-MAB_{GP}の抗体可変軽鎖(VL)及び可変重鎖(VH)領域ならびにCDR配列(CDR配列は組合せKabat + Chothiaアノテーションで提供される)。

抗体	VH/VL/CDR	配列番号	[aa]
CD3-MAB_{GP}	VH	25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	26	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDHHRSGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	22	GFTFSSYWMS
	HCDR2	23	NIKQDGSEKYYVDSVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	24	AAWDHHRSGAV

【０１６３】

【表５】

表5: 祖父母抗体CD3-MAB$_{GP}$の両方の誘導体の親和性最適化抗体CD3-MABopt_VL及びCD3-MABopt_VH#1の抗体VL、VH、及びCDR配列(CDRは組合せKabat + Chothiaアノテーションで提供される)。

抗体	VH/VL/CDR	配列番号	[aa]
CD3-MAB$_{opt_VL}$ (CD3-MAB$_{GP}$のLCDR3誘導体)	VH	25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	20	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	22	GFTFSSYWMS
	HCDR2	23	NIKQDGSEKYYVDSVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	12	AGWSRSLHGAV
CD3-MAB$_{opt_VH\#1}$ (CD3-MAB$_{GP}$のHCDR1-2誘導体)	VH	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	26	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDHHRSGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	2	NINQIGYSSYYVESVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	24	AAWDHHRSGAV

【０１６４】

【表６】

表6: 親和性最適化抗体CD3-MAB$_{opt_VH\#1}$の可変重鎖領域(VH)及び親和性最適化抗体CD3-MAB$_{opt_VL}$の可変軽鎖領域(VL)を含むクロスクローンCD3-MABopt_ccの抗体VL、VH、及びCDR配列(CDR配列は組合せKabat + Chothiaアノテーションで提供される)

抗体	VH/VL/CDR	配列番号	[aa]
CD3-MAB$_{opt_cc}$	VH	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	20	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	2	NINQIGYSSYYVESVKG
	HCDR3	5	GYSAEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	12	AGWSRSLHGAV

【０１６５】

【表７】

表7: クロスクローンCD3-MABopt_ccの脱免疫CDRバリアントの抗体VL、VH、及びCDR配列(CDR配列は組合せKabat + Chothiaアノテーションで提供される)

抗体	VH/VL/CDR	配列番号	[aa]
CD3-MAB$_{deimm_1}$	VH	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYEESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSEEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	4	NINQIGYSSYYEESVKG
	HCDR3	7	GYSEEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY

【０１６６】

【表８】

抗体	VH/VL/CDR	配列番号	[aa]
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_2}$	VH	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSDEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	9	GYSDEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_3}$	VH	15	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSDEFATRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	6	GYSDEFATRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_4}$	VH	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSEEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	7	GYSEEFAHRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV
CD3-MAB$_{deimm_5}$	VH	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPG KGLEWVANINQIGYSSYYGESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSDEFAKRSGLDVWGQGTLVTVSS

【０１６７】

【表９】

抗体	VH/VL/CDR	配列番号	[aa]
	VL	21	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFGGGTKLTVLGQ
	HCDR1	1	GFSFGSHYMS
	HCDR2	3	NINQIGYSSYYGESVKG
	HCDR3	8	GYSDEFAKRSGLDV
	LCDR1	10	SGSSSNIGSNYVY
	LCDR2	11	RNNQRPS
	LCDR3	13	AGWSRELHGAV

【０１６８】
【表１０】

表8: 実施例3に係る二重特異的2+1 Fab_2-Fv-Fc抗体で使用されるペプチドリンカーのアミノ酸配列。

リンカー	配列　[aa]	配列番号
$(GGS)_3$	GGSGGSGGS	30
$(GGGGS)_4$ / $(G_4S)_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	31
20aa-PAH	AHPAAPAPAHPAAPAPAHGH	32
20aa-PAPDA	AQPAAPAPDAHEAPAPAQGS	33
20aa-Cλ	PKAAPSVTLFPPSSEELQAN	34
20aa-CH1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG	35
5aa-Cλ	PKAAP	36
6aa-CH1	ASTKGP	37
$Hinge_{trunc.}$	DKTHTCPPCP	38

【０１６９】
【表１１】

表9: 実施例1に係る二重特異的2+1 Fab_2-Fc-scFv抗体フォーマットで使用されるペプチドリンカーのアミノ酸配列。

リンカー	配列　[aa]	配列番号
10aa-PAPAE [一方のFc領域サブユニットをscFvに接続するリンカー]	AQPAAPAPAE	39
20aa-PAPNA [scFv-リンカー]	AQPAAPAPNAHEAPAPAQGS	40

【０１７０】

【表１２】

表10: 図1Aに示されるようにHER2への2価結合及びCD3への1価結合を有して実施例1.2に係る3価二重特異的Fab2-Fc-scFv抗体フォーマットを形成する模範的ポリペプチドのアミノ酸配列。二重特異的抗体BissIg_08_#1は、CD3-MABopt_VLの抗体可変ドメインを含み、一方、BissIg_08_#2は、MABopt_VH#1の抗体可変ドメインを含む。

抗体		配列番号	[aa]
BissIg_08_#1	Fab HC(Trast) - CH2AEASS - CH3Knob –リンカー– scFv(CD3-MABopt_VL)	49	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAQPAAPAPAEQ SVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQAQPA APAPNAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKY YVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	Fab-HC(Trast) - CH2AEASS - CH3Hole	50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Fab-LC(Trast.)	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
BissIg_08_#2	Fab-HC(Trast) - CH2AEASS - CH3Knob –リンカー– scFv(CD3-MABopt_VH#1)	52	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW

【０１７１】

【表１３】

抗体		配列番号	[aa]
			ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGAQPAAPAPAEQ SVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQL PGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDHHRSGAVFGGGTKLTVLGQAQPA APAPNAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYY VESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG YSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSS
	Fab-HC(Trast)-CH2AEASS - CH3Hole	50	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQP REPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Fab-LC(Trast.)	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１７２】

【表１４】

表11: Fabアーム交換を介して二重特異的抗体BissIg_18_opt_cc#を発生するために使用されるHER2(IgG1#)及びCD3(IgGopt_cc)に対して特異性のある実施例2の源IgG1分子を形成するポリペプチドのアミノ酸配列。CD3特異的IgGは、CD3-MABopt_VLのVL及びMABopt_VH#1のVHを含み、このため、クロスクローン抗体CD3-MABopt_ccを反映する。

抗体		配列番号	[aa]
IgG#1	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 — $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409R)}$	53	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
IgGopt_cc	$VH_{(CD3\text{-}MABopt_VH\#1)}$ – CH1 – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409L)}$	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(CD3\text{-}MABopt_VL)}$ – CL	55	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【０１７３】

【表１５】

表12: 表11、実施例2に係る及び図1Bに示される2価二重特異的1+1抗体BissIg_18_opt_cc#(IgG#1及びIgGopt_ccのFabアーム交換後)を形成するポリペプチドのアミノ酸配列。

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_18_opt_cc#	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 — $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409R)}$	53	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	$VH_{(CD3\text{-}MABopt_VH\#1)}$ – CH1 – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(K409L)}$	54	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(CD3\text{-}MABopt_VL)}$ – CL	55	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【０１７４】

【表１６】

表13: 表23にリストされる改善されたペプチドリンカー組合せを有する実施例3に係る(及び図2に示される)二重特異的抗体を形成するポリペプチドのアミノ酸配列。すべての二重特異的抗体でクロスクローン抗体CD3-MABopt_ccのVH及びVLが利用される。

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21#P リンカー組合せP	$VH_{(a\text{-}HER2)}$ – CH1 –リンカー$_{(GGS)3}$ – $VL_{(a\text{-}CD3)}$ – リンカー$_{(5aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	56	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSQSVLTQP PSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKL LIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(GGS)3}$ – $VH_{(a\text{-}CD3)}$ – リンカー$_{(6aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	57	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGL EWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSAS TKGPDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

【０１７５】

【表１７】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21#1 リンカー 組合せ 1	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – $リンカー_{(G4S)4}$ – $VL_{(a-CD3)}$ – $リンカー_{(5aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	58	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGS NYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGT SASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVL GQPKAAPDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – $リンカー_{(G4S)4}$ – $VH_{(a-CD3)}$ – $リンカー_{(6aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	59	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQ APGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFG SHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFT ISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRS GLDVWGQGTLVTVSSASTKGPDKTHTCPPCPAPEAEGAP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQK PGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

【０１７６】

【表１８】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21#2 リンカー組合せ2	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(G4S)4}$ – $VL_{(a\text{-}CD3)}$ – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	60	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVY WYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQAQ PAAPAPDAHEAPAPAQGSDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(G4S)4}$ – $VH_{(a\text{-}CD3)}$ – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	61	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYM SWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVW GQGTLVTVSSAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

【０１７７】

【表１９】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21#3 リンカー組合せ3	VH(Trast.) – CH1 – リンカー(G4S)4 – VL(a-CD3) – リンカー(20aaCLλ) – CH2(AEASS) – CH3(knob)	62	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVY WYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLA ISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
	VH(Trast.) – CH1 – リンカー(G4S)4 – VH(a-CD3) – リンカー(20aaCH1) – CH2(AEASS) – CH3(hole)	63	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYM SWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
	VL(Trast.) – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

【０１７８】

【表２０】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21#4 リンカー 組合せ 4	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAH)}$ – $VL_{(a\text{-}CD3)}$ – リンカー$_{(20aaCLλ)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	64	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAHPAAPAPAHPAAPAPA HGHQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWY QQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAH)}$ – $VH_{(a\text{-}CD3)}$ – リンカー$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	65	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAHPAAPAPAHPAAPAPA HGHEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMS WVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCPA PEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

【０１７９】

【表２１】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21#5 リンカー組合せ5	VH(Trast.) – CH1 – リンカー(20aaPAPDA) – VL(a-CD3) – リンカー(20aaCLλ) – CH2(AEASS) – CH3(knob)	66	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
	VH(Trast.) – CH1 – リンカー(20aaPAPDA) – VH(a-CD3) – リンカー(20aaCH1) – CH2(AEASS) – CH3(hole)	67	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPAPDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20
	VL(Trast.) – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30

【０１８０】

【表２２】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21#6 リンカー組合せ6	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(GGS)3}$ – $VL_{(a-CD3)}$ – リンカー$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	68	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSQSVLTQP PSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKL LIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAGWSRSLHGAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEE LQANDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(GGS)3}$ – $VH_{(a-CD3)}$ – リンカー$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	69	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQA PGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFGSHYMSWVRQAPGKGL EWVANINQIGYSSYYVESVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARGYSAEFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPSSIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

【０１８１】

【表２３】

表14: 本開示に係る好ましい脱免疫CD3特異的結合性抗体を利用する実施例4に係る3価二重特異的抗体を形成するポリペプチドのアミノ酸配列。

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_1}$	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – $VL_{(CD3\text{-}MABdeimm_1)}$ – リンカー$_{(20aaCL\lambda)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VH_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – $VH_{(CD3\text{-}MABdeimm_1)}$ – リンカー$_{(20aaCH1)}$ – $CH2_{(AEASS)}$ – $CH3_{(hole)}$	71	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYEES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSE EFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	$VL_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１８２】

【表２４】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_2}$	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – VL$_{(CD3\text{-}MABdeimm_2)}$ – リンカー$_{(20aaCL\lambda)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(PAPDA_20aa)}$ – VH$_{(CD3\text{-}MABdeimm_2)}$ – リンカー$_{(20aaCH1)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(hole)}$	72	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSD EFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VL$_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１８３】

【表２５】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_3}$	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – VL$_{(CD3\text{-}MABdeimm_3)}$ – リンカー$_{(20aaCL\lambda)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – VH$_{(CD3\text{-}MABdeimm_3)}$ – リンカー$_{(20aaCH1)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(hole)}$	73	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSD EFATRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEK TISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VL$_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１８４】

【表２６】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_4}$	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – VL$_{(CD3\text{-}MABdeimm_4)}$ – リンカー$_{(20aaCL\lambda)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – VH$_{(CD3\text{-}MABdeimm_4)}$ – リンカー$_{(20aaCH1)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(hole)}$	74	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSE EFAHRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VL$_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０１８５】

【表２７】

二重特異的抗体		配列番号	[aa]
BissIg_21# CD3-MAB$_{deimm_5}$	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – VL$_{(CD3-MABdeimm_5)}$ – リンカー$_{(20aaCL\lambda)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(knob)}$	70	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGS SSNIGSNYVYWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFS GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAGWSRELHGAVFG GGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANDKTHTCPPC PAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VH$_{(Trast.)}$ – CH1 – リンカー$_{(20aaPAPDA)}$ – VH$_{(CD3-MABdeimm_5)}$ – リンカー$_{(20aaCH1)}$ – CH2$_{(AEASS)}$ – CH3$_{(hole)}$	75	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCAQPAAPA PDAHEAPAPAQGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSFGSHYMSWVRQAPGKGLEWVANINQIGYSSYYGES VKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYSD EFAKRSGLDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIE KTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	VL$_{(Trast.)}$ – CL	51	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【実施例】

【０１８６】

実施例

実施例１：親和性最適化ＣＤ３特異的ヒト抗体の同定

祖父母ヒトカニクイザルＣＤ３交差反応性完全ヒト抗体ＣＤ３－ＭＡＢＧＰ（配列番号２５のＶＨ及び配列番号２６のＶＬを含む）の発生は、国際出願ＰＣＴ／ＥＰ２０２１／０７６０５２号に記載されている。簡潔に述べると、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$を同定するために、MorphoSys Ylanthia（登録商標）ライブラリーを用いてヒト及びカニクイザルＣＤ３に対するＦａｂフラグメントを選択した。MorphoSys Ylanthia（登録商標）ライブラリー（Tiller et al. mAbs 5:3,1-26;May/June(2013）及び米国特許第８，７２８，９８１号）は、市販のファージミドライブラリーであり、ファージ表面上にＦａｂをディスプレイするためにCysDisplay（登録商標）技術を利用する（Lohning et al.,国際公開第２００１／０５９５０号）。親和性、種交差反応性、及び生物学的活性をさらに増加させるために、Slonomics（登録商標）技術（van den Brulle et al.2008

）を用いて以前に発生させた多様化Ylanthia（登録商標）成熟モジュールを用いて、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$のＬＣＤＲ３及びＨＣＤＲ１／ＨＣＤＲ２領域をパラレルに最適化した。ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$の親和性改善誘導体の選択のために、成熟ライブラリーに由来するファージを３ラウンドの成熟パニングに付した。各パニングラウンドでＣＤ３抗原濃度又はＣＤ３発現性細胞の細胞カウントを低下させることによりパニングストリンジェンシーを増加させた（Low et al.1996）。選択ストリンジェンシーをさらに増加させるために、抗原低減に加えて、コンペティターとして過剰の未ビオチン化ＣＤ３イプシロン抗原を用いてオフレート選択を実施した（Hawkins et al 1992）。すべてのストラテジーを長時間洗浄ステップと組み合わせた。

【０１８７】

実施例１．１：親和性成熟後のＳＥＴ親和性スクリーニング

一次親和性スクリーニングに使用されるＦａｂ含有粗細菌ライセート（ＢＥＬ抽出物）の発生のために、Ｆａｂ含有細菌グリセロールストックを用いて成長培地（クロラムフェニコール、ＩＰＴＧ、及び低グルコースを含有する２×ＹＴ）が予充填されたマイクロタイタープレートに接種した。細菌増殖のために３７℃でプレートをインキュベートし、Ｆａｂ発現のために２２℃で一晩振盪した。翌日、ホウ酸緩衝液、ＥＤＴＡ、及びリゾチームを含有するＢＥＬ緩衝液の添加により、発現培養物をライシスした。選択プレートフォーマット及び適用に依存して、体積をアジャストした。

【０１８８】

ＳＥＴ（溶液平衡滴定）スクリーニング（Della Ducata et al.2015）は、原理的にはHaenelらにより記載されるように実施された（Haenel et al.2005）。さまざまな濃度のＣＤ３イプシロン抗原（hCD3e(22-118)_FLAG_chLys_avi（配列番号４３））と共に、一定量の希釈されたＦａｂ含有ＢＥＬ抽出物を一晩平衡化した。次いで、混合物をあらかじめ抗原で被覆されたＭＳＤプレートに移し、インキュベーション及び洗浄後、好適なＭＳＤ－Ｓｕｌｆｏタグ標識検出抗体を添加した。続いて、Sector Imager 6000（Meso Scale Discovery ┆ Gaithersburg ┆ MD ┆ USA）を用いてＥＣＬ検出を介して未結合Ｆａｂの濃度を定量した。XLfit（IDBS）ソフトウェアを用いて以上に記載の対応する当てはめモデルを適用し結果を処理して親和性を推定することにより、成熟により最も改善されたクローンを同定した。

【０１８９】

３回目のパニングラウンドアウトプットから得られた約１０００のクローンを親和性に関してスクリーニングし、所要により、組換えヒトＣＤ３イプシロン抗原に対して≦４０ｎＭのＳＥＴ　ＫＤ推定値を有する１８９クローンをＶＨ又はＶＬシーケンシングに付した。シーケンシングの結果、１０１の配列ユニークＨＣＤＲ１＋２親和性成熟誘導体が同定されたが、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$の配列ユニークＬＣＤＲ３親和性成熟誘導体はわずか１５であった。

【０１９０】

実施例１．２：二重特異的２＋１Ｆａｂ$_2$－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体フォーマットへの変換及びその産生

二重特異的抗体フォーマットで使用される実施例１．１の配列ユニーク親和性最適化ＣＤ３特異的抗体の好適性を決定するために、ヒトＣＤ３イプシロンに対して≦１０ｎＭのＳＥＴ　ＫＤ推定値を有する４８×配列ユニークＨＣＤＲ１～３及び３×配列ユニークＬＣＤＲ３誘導体のＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$のＶＨ及びＶＬを図１Ａに示される二重特異的２＋１Ｆａｂ$_2$－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体フォーマットに変換した。この二重特異的抗体フォーマットは、無グリコシル化ヒトＩｇＧ１骨格から構築され、且つ１つのエキストラｓｃＦｖ断片を包含し、ｓｃＦｖ　ＶＬドメインのＮ末端を一方のＩｇＧ重鎖のＣ末端にペプチドリンカーを介して融合した。２つの異なる重鎖のヘテロダイマー化を促進するために、両方のＣＨ３－Ｆｃドメインにｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅ変異を導入した。本実施例では、ＩｇＧ骨格のＦａｂアームは両方とも、腫瘍標的ＨＥＲ２に結合し、一方、エキストラｓｃＦｖは、本開示のＣＤ３特異的抗体の可変ドメインを含む。ＨＥＲ２結合性のため

に、Baselga et al.1998,Cancer Res 58(13):2825-2831により記載される「トラスツズマブ」（HERCEPTIN（登録商標）からのＶＨ及びＶＬドメインをコードするヌクレオチド配列を使用した。トラスツズマブ及びその調製方法は、米国特許第５，８２１，３３７号に記載されている。実施例１．２に従って作られたＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt_VL}$（配列番号２５及び配列番号２０）の親和性改善ＶＬドメインを担持する模範的二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃１又はＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt_VH\#1}$（配列番号１４及び配列番号２６）の親和性改善ＶＨドメインを担持する模範的二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃２を形成するポリペプチド配列の概要は、表１０に示される。

【０１９１】

すべての核酸配列又は所望の遺伝子セグメントは、適切な鋳型を用いてＰＣＲにより発生されたか、又はインハウスで若しくは外部プロバイダーにより適切なフランキング領域（たとえば、好適な制限酵素認識部位、リンカー配列）を有する線状ＤＮＡ断片として遺伝子合成されたか、のどちらかであった。シンギュラー制限エンドヌクレアーゼ切断部位によりフランキングされた核酸配列又は遺伝子セグメントは、標準的分子生物学的方法を用いてそれぞれの哺乳動物発現ベクター中にクローニングされた。哺乳動物発現ベクターでの使用が意図されるとき、構築物はすべて、真核細胞での分泌用タンパク質を対象とするリーダーペプチドをコードする５’末端ＤＮＡ配列を用いて設計された。サブクローン遺伝子断片のＤＮＡ配列は、ＤＮＡの二本鎖シーケンシングにより確認された。二重特異的抗体の重鎖及び軽鎖のすべての成分をコードする哺乳動物発現ベクターＤＮＡで真核ＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞をトランスフェクトして２：１：１ヘテロダイメリック二重特異的抗体を得た。トランスフェクションの７日後に細胞培養上清を採取し、液体ハンドリングステーションを用いてプロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（MabSelect SURE ¦ GE Healthcare）に付した。サンプルは、中和溶出緩衝液（ＮａＰＳ：１３７ｍＭのリン酸Ｎａ、８１ｍＭ　ＮａＣｌ、ｐＨ７）中に残留させた。サンプルは、無菌濾過された（０．２μｍポアサイズ）。タンパク質濃度は、ＵＶ分光測光により決定され、抗体の純度は、ＣＥ－ＳＤＳ（LabChip GXII ¦ Perkin Elmer ¦ USA）を用いて変性還元性条件下で解析された。ＨＰ－ＳＥＣは、ネイティブ状態で二重特異的抗体調製物を解析するために実施された。

【０１９２】

要するに、４１／５１二重特異的抗体は、分析用サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したときに＞８５％のモノマー含有率を有して許容可能な品質及び収量で産生可能であった。表１６は、ＣＤ３－ＭＡＢopt＿ＶＬ及びＣＤ３－ＭＡＢopt＿ＶＨ＃１を含めて、以上に記載の祖父母ＣＤ３抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$又は６つの好ましい親和性最適化ＣＤ３抗体のどちらかの可変ドメインを含む７つの産生された二重特異的抗体調製物のモノマー含有率の概要を示す。

【０１９３】

二重特異的２＋１Ｆａｂ２－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体フォーマットの親和性最適化ＣＤ３特異的抗体の機能性特徴付け

実施例１．２のすべての産生二重特異的抗体は、以下：

・表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）による親和性決定

・ＣＤ３の内因性発現ありのヒトＴ細胞及びジャーカット細胞並びにＣＤ３発現なしのＪ．ＲＴ－Ｔ３．５細胞への結合

・癌細胞系統ＳＫＢＲ３を用いた機能性ＮＦＡＴレポーター遺伝子アッセイ

・ＳＫＢＲ３細胞上での機能性細胞傷害性アッセイ

を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイで検査された。

【０１９４】

実施例１．３：抗体キャプチャーセットアップを介するK_D決定

ヒトＣＤ３イプシロン及び実施例１．２の４１の産生二重特異的Fab_2－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体間の相互作用のキネティック特徴付けは、溶液中で抗原をアナライトとして適用して抗体キャプチャーフォーマットで行われた。高容量キャプチャー表面は、いくつかの

ストレプトアビジンセンサー（fortebio, part 18-5021）上にビオチン化MabSelect SuReリガンド（非ビオチン化リガンド：GE Healthcare, 28-4018-60）をロードすることにより調製された。キネティック実験の各サイクルは、キャプチャーステップ（パラレルに使用されるいくつかのセンサー上の１リガンドの）、続いてアナライト結合ステップからなっていた（会合相、さまざまなアナライト濃度、及びアッセイ緩衝液、すなわち、ブランク減算用の抗原濃度０）。結合後、結合抗原の解離をモニターした（センサーをアッセイ緩衝液に暴露）。各サイクルの終了時、キャプチャー表面のインテグリティーを維持しつつ、１０ｍＭグリシン／ＨＣｌ　ｐＨ１．５（GE Healthcare, BR 10035 4）を用いて２回の２０ｓ連続再生ステップにより、結合リガンド及び／又はリガンド－抗原複合体をセンサー表面から除去した。キャプチャーリガンドを有するセンサー上で結合時に抗原の代わりにアッセイ緩衝液に暴露されて記録されたシグナルは、たとえば、キャプチャーリガンドの潜在的解離を補正するために、非ゼロ抗原濃度でのセンサーグラムから減算された。会合は、３００ｓにわたり記録され、解離は、１０００ｒｐｍのオービタル振盪スピードで３００ｓにわたり記録された。０．０５％（ｖ／ｖ）ポリソルベート２０（Merck, 8.22184.0500）及び０．１％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（Sigma, A7906）が補充されたＤＰＢＳ（ＧＩＢＣＯ、Ca^{2+}なし、Mg^{2+}なし、Thermo Fisher Cat.No.14190）がアッセイ緩衝液として使用された。リガンドのキャプチャーレベルは、ヒトＣＤ３ｅアナライトにより約０．２ｎｍの飽和レベルＲｍａｘを達成するように約２ｎｍにアジャストされた。キネティック実験時、解析のために７つの異なるアナライト濃度が使用された（ｈＣＤ３ｅ（２２－１１８）＿Ｆ－ｃｈＬｙｓ＿ａｖｉ（配列番号４３）、適用モル濃度１５．６～１０００ｎＭ、２倍段階希釈シリーズ）。センサーグラムは、Data Analysis Software v 10（Octet / fortebio）で評価された。すべてのセンサーグラムを１：１結合性モデルに当てはめてk_{on}及びk_{off}速度定数を決定し、これを用いてK_D値を計算した。予想１：１結合性から外れたキネティックプロファイルでは、１価キネティクスへの最良近似を用いてセンサーグラムを評価し、「ヘテロジニアス結合性」というコメントを記した。これらの結果は、予想１価結合カイネティクスに完全に従うキネティックプロファイルよりも精密でないとみなされるが、K_Dの良好な近似であると推測される。

【０１９５】

全体的に、ヒトＣＤ３ｅ抗原上で４１のすべての検査された親和性最適化ＣＤ３特異的抗体で決定された１価親和性は、３９ｎＭ～１２０ｎＭの範囲内であったが、祖父母抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$では、同一二重特異的抗体フォーマットで試験したとき２４０ｎＭのK_Dであることが明らかになった。表１６は、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃１）及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃２）のものを含めて、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$及び６つの本開示に係る好ましい親和性最適化ＣＤ３抗体で決定されたキネティック試験の結果をまとめたものである。

【０１９６】

実施例１．４：細胞結合性

親和性改善ＣＤ３特異的抗体を含む実施例１．２の４１の産生二重特異的Fab_2－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体は、ＣＤ３陽性ヒトＴ細胞及びＣＤ３陰性細胞系統Ｊ．ＲＴ３－Ｔ３．５へのそれらの結合能に関して検査された。

【０１９７】

ヒトＴ細胞の単離及び精製のために、健常ドナーからのヒト全血をＬｉ－ヘパリン含有S-Monovette容器（Sarstedt）中に採取した。血液を５０ｍｌコニカルチューブに移して、２％ウシ胎仔血清（Sigma, #F7524）及び２ｍＭ　ＥＤＴＡを含有する等体積のＰＢＳと混合した。希釈血液を１５ｍｌ　Biocoll溶液（Biochrom#L6115）を含有するSepMate-50チューブ（StemCell Technologies#86450）に移して、１２００×ｇで１０ｍｉｎ遠心分離した。上清を５０ｍｌコニカルチューブに移してＰＢＳで４５ｍｌに希釈し、３００×ｇで８ｍｉｎ遠心分離した。上清を廃棄して細胞ペレットを１ｍｌＰＢＳ中に再懸濁し、Neubauerチャンバーを用いて細胞をカウントした。EasySep（

商標）ヒトＴ細胞単離キット（StemCell Technologies）を用いてプロバイダー説明書に従ってＴ細胞を単離及び精製した。抗ヒトＣＤ３　ＰＥコンジュゲート抗体（Biolegend #12-0037-42）を用いてフローサイトメトリーにより、ＣＤ３＋Ｔ細胞の純度アセスメントを行った。ジャーカット及びＪ．ＲＴ３－Ｔ３．５細胞をSuperblock（ThermoScientific, #37515）中に再懸濁してカウントし、氷上で１ｈブロックした。ブロック細胞を段階希釈二重特異的抗体と共にSuperblock中に再懸濁し（開始最終濃度：５００ｎＭ～０．６９ｎＭ／０．２３ｎＭ、１：３段階希釈）、氷上で１ｈインキュベートした。３％ウシ胎仔血清（Sigma, #F7524）を含有するＤ－ＰＢＳ（Gibco）中で細胞を２回洗浄した。AlexaFluor 647標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆ（ａｂ’）２フラグメント特異的）（Jackson Immuno Research Cat#109-606-097）を用いて結合二重特異的抗体を検出した。ＦＡＣＳアレイ（Beckton Dickinson）又はIntelliCyt iQueフローサイトメーターを用いて抗体染色を測定し、それぞれ、FlowJo又はForeCyt（IntelliCyt）ソフトウェアで解析した。Prismソフトウェア（GraphPad Software Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてEC_{50}値を計算した。

【０１９８】

表１６は、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃１）及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃２）のものを含めて、ＣＤ３－ＭＡB_{GP}及び６つの本開示に係る好ましい親和性最適化ＣＤ３抗体の可変ドメインを含む実施例１．２に係る二重特異的抗体で決定された細胞結合性試験の結果をまとめたものである。細胞結合性は、１６７ｎＭの選択抗体濃度でのシグナル／バックグラウンド比として示される。親和性改善ＣＤ３特異的抗体は、祖父母抗体ＣＤ３－ＭＡB_{GP}と比較したときヒトＴ細胞上でより強い有意なシグナル強度を呈した。さらに、ＣＤ３陰性細胞系統Ｊ．ＲＴ３－Ｔ３．５への結合はまったく観測できないか又は非常に弱い結合が観測可能であるにすぎなかった（データは示されていない）。

【０１９９】

実施例１．５　ジャーカットＮＦＡＴレポーター遺伝子細胞アッセイ

実施例１．２に係る二重特異的Ｆａｂ２－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体の機能的活性を評価するために、ＮＦＡＴレポーター遺伝子構築物で一過性トランスフェクトされたジャーカット細胞（ATCC #TIB-152）をサロゲートエフェクター細胞として使用した。標的細胞として、ＨＥＲ２陽性ヒト腺癌腫ＳＫＢＲ－３（ATCC（登録商標）HTB-30（商標））細胞系統を使用した。細胞系統の維持のために、下記成長培地：（ａ）ジャーカット：１０％ＦＣＳ（Sigma, #F7524）が補充されたＲＰＭＩ－１６４０＋Ｌ－グルタミン（Thermo Fisher, #21875-034）、（ｂ）ＳＫＢＲ－３：１０％ＦＣＳ（Sigma #F7524）が補充されたMcCoy 5a（Gibco, #26600）を使用した。ＳＫＢＲ－３細胞は、成長培地で４Ｅ＋０５細胞／ｍｌの密度に希釈された。４０，０００細胞に対応する１００μｌ細胞サスペンジョンを組織培養処理９６ウェルプレート（Corning, #3917）の各ウェルに播種し、加湿インキュベーター中、３７℃及び５％CO_2で一晩インキュベートした。ジャーカット細胞は、成長培地で２．５Ｅ＋０５細胞／ｍｌの濃度に再懸濁された。トランスフェクション成分ｐＧＬ４．３０［luc2P/NFAT-RE/Hygro］レポーター遺伝子ベクター（Promega #9PIE848）、OptiMEM-I培地（Life Technologies, #31985-047）、及びTransIT-LT1トランスフェクション試薬（Mirus, #MIR2304）をＲＴで１５ｍｉｎインキュベートし、次いで、ジャーカット細胞サスペンジョンに添加し、加湿インキュベーター中、３７℃及び５％CO_2で１７ｈインキュベートした。ジャーカット細胞を採取して成長培地で１．２Ｅ＋０６／ｍｌの濃度で再懸濁した。被覆標的細胞から培地を除去し、６０，０００細胞／ウェルに対応する５０μｌジャーカット細胞サスペンジョンに置き換えた。ジャーカット成長培地で二重特異的抗体を段階希釈した。５０μｌ抗体希釈物を各ウェルに添加して１０ｎＭ～０．０１ｎＭの最終濃度範囲を得た（４ステップ希釈）。加湿インキュベーター中、３７℃及び５％CO_2でアッセイプレートを５ｈインキュベートした。製造業者の説明書に従ってBright-Glo（商標）試薬（Promega, #E2620）を再構成した。アッセイプレート及び試薬を室温で平衡化した。

１００μｌのBright-Glo（商標）試薬をアッセイプレートの各ウェルに添加し混合した。InfiniteM1000 Proプレートリーダー（Tecan）を用いてルミネセンスを測定した。

【０２００】

表１６は、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃１）及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃２）のものを含めて、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$又は６つの本開示に係る好ましい親和性最適化ＣＤ３抗体の可変ドメインを含む二重特異的抗体で決定されたレポーター遺伝子アッセイの結果をまとめたものである。結果は、１ｎＭの二重特異的抗体濃度でのシグナル／バックグラウンド比として示される。親和性最適化ＣＤ３特異的抗体を含む二重特異的抗体は、ほとんど活性を示さなかった祖父母ＣＤ３特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$の可変ドメインを含む二重特異的抗体と比較したとき、ジャーカット細胞でレポーター遺伝子系のより強い有意な活性化を呈した。

【０２０１】

実施例１．６：二重特異的抗体による細胞傷害性アッセイ。

実施例１．２に係る親和性最適化ＣＤ３特異的抗体を含む４１の二重特異的Ｆａｂ$_2$－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体は、ＨＥＲ２発現性ＳＫＢＲ３細胞又はＨＥＲ２陰性ＭＤＡ－ＭＢ４６８細胞のＴ細胞依存性死滅を媒介するそれらの能力に関して検査された。ＰＢＭＣは、実施例１．４に記載のように調製された。培養培地（ＳＫＢＲ３：McCoy’s 5A培地（Gibco, #26600）、１０％ＦＣＳ（Sigma, #F7524）、ＭＤＡ－ＭＢ４６８：ＤＭＥＭ（Gibco, #10938）、GlutaMax（Gibco, #35050）、１０％ＦＣＳ、１×ナトリウムピルベート（Gibco, #11360-039））中に５，０００のＳＫＢＲ３又はＭＤＡ－ＭＢ４６８細胞を懸濁し、黒色９６ウェルアッセイプレート（Corning, #3340）に播種し、３７℃及び５％CO_2で一晩インキュベートした。CellToxGreen色素（Promega, #G8731）、段階希釈二重特異的抗体構築物（最終濃度：５ｎＭ～１００ｐＭ）、及び１００，０００精製ＰＢＭＣをすべて、RPMI 1640 w/oフェノールレッド（Gibco, #32404-014）、GlutaMax、及び１０％ウシ胎仔血清を含むアッセイ培地で希釈して細胞に添加し、３７℃及び５％CO_2で４８ｈインキュベートした。７２ｈ後、取り込まれたCellToxGreenの蛍光を４８５ｎｍ励起及び５３５ｎｍ発光でTecan Infinite F500デバイスを用いて測定することにより、細胞傷害性活性をアセスした。Prismソフトウェア（GraphPad Software Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてEC_{50}値を計算した。

【０２０２】

全体的に、実施例１．２の親和性最適化ＣＤ３特異的可変ドメインを含む２４の検査二重特異的抗体のみが、ＳＫＢＲ３細胞のＴ細胞性死滅を媒介した。実施例１．５のＲＧＡアッセイの知見と合致して祖父母抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$の可変ドメインを含む二重特異的抗体では、死滅はまったく観測できなかった。表１６は、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃１）及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃２）のものを含めて、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$又は６つの本開示に係る好ましい親和性最適化ＣＤ３抗体の可変ドメインを含む二重特異的抗体で決定されたＳＫＢＲ３細胞のＴ細胞性リダイレクト死滅の結果（IC_{50}濃度）をまとめたものである。

【０２０３】

実施例１．７：ＥＬＩＳＡ結合性

実施例１．２に係る二重特異的Ｆａｂ$_2$－Ｆｃ－ｓｃＦｖ抗体は、組換えヒト及びカニクイザルＣＤ３イプシロン抗原へのそれらの結合能に関してＥＬＩＳＡで検査された。５ｎＭの組換えヒトＣＤ３ｅ（２２－４９）－Ｆｃ２（Ｋ１０５－Ｋ３３０）（配列番号４１）又は１ｎＭの組換えカニクイザルＣＤ３ｅ（２２－４９）－Ｆｃ２（Ｋ１０５－Ｋ３３０）（配列番号４２）をMaxisorpプレート上に被覆した（Nunc, #460518）。被覆プレートをＰＢＳ中５％スキム乳でブロックした。０．５％スキム乳及び０．５％Tween-20を含有するＰＢＳで抗体を段階希釈した。ヒトＦ（ａｂ’）２フラグメントに対するアルカリ性ホスファターゼコンジュゲート検出抗体（Jackson Immuno Research, #109-055-097）を用いて結合抗体を検出した。Prismソフトウェア（GrapPad S

oftware Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０２０４】

表１５は、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃１）及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（ＢｉｓｓＩｇ＿０８＿＃２）のものを含めて、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$及び６つの本開示に係る好ましい親和性最適化ＣＤ３抗体の可変ドメインを含む二重特異的抗体で決定されたＥＬＩＳＡ　ＥＣ$_{50}$値をまとめたものである。親和性最適化ＣＤ３特異的抗体が、祖父母抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$と比較したとき、ヒト及びカニクイザルＣＤ３イプシロン抗原への１０～２０倍改善された結合性を呈したことは、結果から明らかである。

【０２０５】

【表２８】

表15: 実施例1の二重特異的抗体フォーマットFab2-Fc-scFvで試験したときの組換えヒト又はカニクイザルCD3イプシロン抗原への本開示の親和性改善CD3特異的抗体のELISA結合性。

二重特異的抗体		抗CD3抗体			EC_{50} [nM]	
	配列番号(表10)		配列番号: VH	配列番号: VL	hCD3e(22-49)_ Fc2(K105-K330)	cyCD3e(22-49)_ Fc2(K105-K330)
BissIg_08_#GP	n.a	CD3-MAB$_{GP}$	25	26	248,0	369
BissIg_08_#3	n.a	CD3-MABopt_VH#2	n.a.	n.a.	11,8	15,6
BissIg_08_#4	n.a	CD3-MABopt_VH#3	n.a.	n.a.	17,0	30,9
BissIg_08_#5	n.a	CD3-MABopt_VH#4	n.a.	n.a.	9,9	11,0
BissIg_08_#6	n.a	CD3-MABopt_VH#5	n.a.	n.a.	20,3	30,9
BissIg_08_#2	52, 50, 51	CD3-MABopt_VH#1	14	26	11,1	15,0
BissIg_08_#1	49, 50, 51	CD3-MABopt_VL	25	20	26,1	29,5

n.a.: 適用不可

【０２０６】

親和性改善抗体の要約機能性特徴付け

祖父母抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$の親和性成熟では、好ましい特性及び二重特異的抗体フォーマットでの使用適合性を有するＣＤ３－ＭＡＢ$_{GP}$の５つの親和性最適化ＨＣＤＲ１～２バリアント及び１つの親和性最適化ＬＣＤＲ３バリアントが同定された。

【０２０７】

表１６は、実施例１の二重特異的抗体フォーマットで試験したときの祖父母抗体と比較したこれらの抗体の有利な機能的及び生物物理学的性質の概要を示す。

【０２０８】

【表２９】

表16: 本開示に係る親和性最適化CD3特異的抗体の要約機能的及び生物物理学的性質。

二重特異的抗体		抗CD3抗体								
	配列番号 (表10)		配列番号: VH	配列番号: VL	最適化 CDR	SEC モノマー含有率 [%]	K_D [nM] ヒト CD3e	167nMの抗体濃度でのT細胞結合性 [S/BG]	1nMの抗体濃度でのRGA[S/BG] SKBR3	SKBR3死滅IC_{50} [pM]
BisIg_08_#GP	n.a	CD3-MAB_{GP}	25	26	n.a.	85,7	240	1,4	1	活性なし
BisIg_08_#3	n.a	CD3-MABopt_VH#2	n.a.	n.a.	HCDR1+2	87,1	83	13,9	917	26
BisIg_08_#4	n.a	CD3-MABopt_VH#3	n.a.	n.a.	HCDR1+2	86,0	94	8,2	209	39
BisIg_08_#5	n.a	CD3-MABopt_VH#4	n.a.	n.a.	HCDR1+2	86,5	39	14,4	693	82
BisIg_08_#6	n.a	CD3-MABopt_VH#5	n.a.	n.a.	HCDR1+2	85,3	93	11,6	205	59
BisIg_08_#2	52, 50, 51	CD3-MABopt_VH#1	14	26	HCDR1+2	86,1	55	15,8	306	46
BisIg_08_#1	49, 50, 51	CD3-MABopt_VL	25	20	LCDR3	85,4	62	20,0	367	40

n.a.: 適用不可

【０２０９】

実施例２：親和性改善ＣＤ３特異的抗体のさらなる最適化－親和性最適化可変ドメインのクロスクローニング及びさらなる二重特異的抗体フォーマットへの変換

すでに同定された親和性最適化ＣＤ３特異的抗体の機能的特性をさらに改善するために、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（配列番号１４）、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃２、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃３、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃４、及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃５のＶＨと、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ（配列番号２０）のＶＬと、を組み合わせることにより５つのクロスクローンを発生した。

【０２１０】

続いて、親和性改善抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃２、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃３、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃４、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃５、及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ、さらにはこれらから発生された５つのクロスクローンを、図１Ｂに示される二重特異的１＋１抗体フォーマットに変換した。実施例２の二重特異的抗体フォーマットは、従来のＩｇＧ分子の典型的Ｙ形状を有して、一方のＦａｂアームが腫瘍標的（ＨＥＲ２）に結合し、且つ他方のＦａｂアームがＣＤ３に結合する。ＨＥＲ２結合性のために、Baselga et al.1998,Cancer Res 58(13):2825-2831により記載される「トラスツズマブ」（HERCEPTIN（登録商標））のＶＨ及びＶＬドメイン（それぞれ、配列番号２８及び配列番号２９）を使用した。トラスツズマブ及びその調製方法は、米国特許第５，８２１，３３７号に記載されている。

【０２１１】

二重特異的１＋１抗体は、国際公開第２０１１／１４７９８６号、国際公開第２０１１／１３１７４６号、及び国際公開第２０１３／０６０８６７号、並びにLabrijn et al.(Labrijn et al.,PNAS 2013,110:5145-50、Gramer et al.,MAbs 2013,5:962-973)に記載の２－ＭＥＡ－誘導Ｆａｂアーム交換によりｉｎ　ｖｉｔｒｏで発生された。この方法による二重特異的抗体の産生を可能にするために、ＣＨ３ドメインに変異を担持する２つの源ＩｇＧ１分子：Ｆ４０５Ｌ変異を担持する一方の源ＩｇＧ１抗体（すなわちＣＤ３特異的抗体）、Ｋ４０９Ｒ変異を担持する他方の源ＩｇＧ１抗体（すなわち抗ＨＥＲ２抗体）を発生した。こうした変異に加えて、源ＩｇＧ１分子は、ＩｇＧ　Ｆｃレセプター（Ｆｃガンマレセプター）及び補体と相互作用できないＦｃ領域をもたらす置換：Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ｅ、Ｇ２３７Ａ、Ａ３３０Ｓ、及びＰ３３１Ｓ（「ＡＥＡＳＳ」）を含んでいた。

【０２１２】

ＨＥＲ２（ＩｇＧ＃１：配列番号５３及び５１）又はＣＤ３（ＩｇＧｏｐｔ＿ｃｃ：配列番号５４及び５５）に対してそれぞれ特異性のある２つの模範的産生源ＩｇＧ１分子を形成する、実施例２に従って使われるポリペプチド配列の概要は、表１１に示される。ＣＤ３特異的ＩｇＧは、クロスクローンＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＶＨ及びＶＬ（それぞれ、配列番号１４及び配列番号２０）を含む。（Ｆａｂアーム交換後）得られる二重特異的１＋１抗体ＢｉｓｓＩｇ＿１８＿ｏｐｔ＿ｃｃ＃（配列番号５３、５１、５４、５５）を形成するポリペプチド配列の概要は、表１２に示される。

【０２１３】

源ＩｇＧ１分子のレギュラー産生のために、源ＩｇＧ分子の重鎖及び軽鎖をコードする哺乳動物発現ベクターＤＮＡで真核ＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後の３又は６日目に細胞培養上清を採取し、標準的プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（MabSelect SURE ¦ GE Healthcare）に付した。１×ダルベッコＰＢＳ（ｐＨ７．２¦Invitrogen)への緩衝液交換を実施し、サンプルを無菌濾過した（０．２μｍ細孔サイズ）。タンパク質濃度は、ＵＶ分光測光により決定され、ＩｇＧの純度は、ＣＥ－ＳＤＳ（LabChip GXII ¦ Perkin Elmer ¦ USA）を用いて変性還元性及び非還元性条件下で解析された。ＨＰ－ＳＥＣは、ネイティブ状態でＩｇＧ調製物を解析するために実施された。

【０２１４】

Ｆａｂアーム交換を介して二重特異的１＋１抗体を発生するために、ＰＢＳ緩衝液（リン酸緩衝生理食塩水、８．７ｍＭ HPO_4^{2-}、１．８ｍＭ H_2PO^{4-}、１６３．９ｍＭ Ｎａ＋、１４０．３ｍＭ Ｃｌ－、ｐＨ７．４）中で２つの産生源ＩｇＧを等質量で混合した。２－メルカプトエチルアミン－ＨＣｌ（２－ＭＥＡ）を７５ｍＭの最終濃度になるように添加し、反応混合物を室温で５ｈインキュベートした。ＰＤ－１０カラムを用いてＰＢＳへの緩衝液交換により２－ＭＥＡを除去し、鎖間ジスルフィド結合の再酸化及びインタクト二重特異的抗体の形成を可能にした。タンパク質濃度は、ＵＶ分光測光により決定され、二重特異的ＩｇＧ調製物の純度は、ＣＥ－ＳＤＳ（LabChip GXII ¦ Perkin Elmer ¦ USA）を用いて変性還元性及び非還元性条件下で解析された。ＨＰ－ＳＥＣは、ネイティブ状態で二重特異的ＩｇＧ調製物を解析するために実施された。

【０２１５】

表１７－１は、制御Ｆａｂアーム交換（ＦＡＥ）前の実施例１に係る親和性改善ＣＤ３特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃２、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃３、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃４、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃５、及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬの哺乳動物産生源ＩｇＧ１分子の品質管理をまとめたものである。表１７－２は、制御Ｆａｂアーム交換（ＦＡＥ）前の実施例２に係る対応するクロスクローンＣＤ３特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ＃２、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ＃３、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ＃４及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ＃５の哺乳動物産生源ＩｇＧ１分子の品質管理をまとめたものである。

【０２１６】

全体的に、クロスクローンＣＤ３特異的抗体可変ドメインを含むＩｇＧでは、親和性改善単独ＣＤ３特異的抗体可変ドメインを含むＩｇＧと比較したとき、ＩｇＧ調製物のモノマー含有率がより低いことであることが明らかになった。

【０２１７】

【表３０】

表17-1: Fabアーム交換前の親和性最適化CD3特異的抗体を含む産生源IgGの品質管理

IgG	親和性最適化抗CD3抗体	配列番号: VH	配列番号: VL	モノマー含有率 [%] IgG
IgG#opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	n.a.	20	95.1
IgG#opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	n.a.	20	84.8 / 94.3
IgG#opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	n.a.	20	90.6
IgG#opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	n.a.	20	90.6
IgG#opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	14	26	96.1
IgG#opt_VL	CD3-MABopt_VL	25	20	90.8

n.a.: 適用不可

【０２１８】

【表３１】

表17-2: Fabアーム交換前のCD3特異的クロスクローンを含む産生源IgGの品質管理

IgG		クロスクローン抗CD3抗体		モノマー含有率 [%] IgG
ID	配列番号: [HC, LC]	ID	起源CD3可変ドメイン	
IgG#opt_cc#2	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#2}$	CD3 -MABopt_VH#2 CD3-MABopt_VL	85.9
IgGopt_cc#3	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#3}$	CD3-MABopt _VH#3 CD3-MABopt_VL	78 / 84.5
IgGopt_cc#4	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#4}$	CD3-MABopt_VH#4 CD3-MABopt_VL	80.8 / 90.2
IgGopt_cc#5	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#5}$	CD3-MABopt_VH#5 CD3-MABopt_VL	90.9
IgGopt_cc#	54, 55	CD3-MAB$_{opt_cc}$	CD3-MABopt_VH#1 CD3-MABopt_VL	82.8 / 94.4 / 95.7

【０２１９】

表１８は、クロスクローンＣＤ３特異的結合性ドメインを含む制御Ｆａｂアーム交換（ＦＡＥ）後の二重特異的ＩｇＧ調製物の品質管理をまとめたものである。全体的に、二重特異的抗体調製物では、対応する源単一特異的ＩｇＧ調製物と比較したとき、モノマー含有率が高いことが明らかになった。

【０２２０】

【表３２】

表18: Fabアーム交換後のクロスクローンCD3特異的結合性ドメインを含む発生二重特異的抗体の品質管理。

二重特異的抗体		クロスクローン抗CD3抗体		モノマー含有率 [%] IgG
ID	配列番号	ID	起源CD3可変ドメイン	
BissIg_18_opt_cc#2	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#2}$	CD3 -MABopt_VH#2	89,8
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#3	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#3}$	CD3-MABopt _VH#3	87,3
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#4	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#4}$	CD3-MABopt_VH#4	87,1
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#5	n.a.	CD3-MAB$_{opt_cc\#5}$	CD3-MABopt_VH#5	90,4
			CD3-MABopt_VL	
BissIg_18_opt_cc#	51, 53,54, 55	CD3-MAB$_{opt_cc}$	CD3-MABopt_VH#1	88,3
			CD3-MABopt_VL	

【０２２１】

実施例２．１：抗体キャプチャーセットアップを介するK$_D$決定

Octet HTX（ForteBIO, Sartorius AG）機器でキネティック速度定数を決定することにより親和性決定を実施した。アッセイ緩衝液（０．０５％（ｖ／ｖ）ポリソルベート２０（Merck, 8.22184.0500）及び０．１％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（Sigma, A7906）が補充されたＤＰＢＳ（ＧＩＢＣＯ、Ｃａ$^{2+}$なし、Ｍｇ$^{2+}$なし、Thermo Fisher Cat. No. 14190）で希釈された実施例２の二重特異的抗体調製物を約２ｎｍのローディングレベルでＩｇＧ特異的ＢＬＩセンサー上にキャプチャーした。解析のために、ヒトＣＤ３イプシロン抗原ｈＣＤ３ｅ（２２－１１８）＿Ｆ－ｃｈＬｙｓ＿ａｖｉ－ビオチン（配列番号４３）を７．８ｎＭ～５００ｎＭ（段階１：２希釈）の範囲内の濃度になるようにアッセイ緩衝液で希釈した。基準にするために、すなわち、キャプチャー抗体の解離を補正するために、アッセイ緩衝液のブランクサンプルを含めた。会合相を３００ｓ記録し、１８０ｓの解離相がそれに続いた。各サイクル後、キャプチャー表面のインテグリティーを維持しつつ、１０ｍＭグリシン　ＨＣｌ　ｐＨ１．７でバイオセンサーを２回再生し、結合リガンド／抗体複合体を除去した。再生ステップ間で、バイオセンサーをアッセイ緩衝液で２０ｓ洗浄した。センサーグラムは、Data Analysis Software v 10（Octet / fortebio）で評価された。すべてのセンサーグラムを１：１結合性モデルに当てはめてｋ$_{on}$及びｋ$_{off}$速度定数を決定し、これを用いてK$_D$値を計算した。予想１：１結合性から外れたキネティックプロファイルでは、１価キネティクスへの最良近似を用いてセンサーグラムを評価し、「ヘテロジニアス結合性」というコメントを記した。これらの結果は、予想１価結合カイネティクスに完全に従うキネティックプロファイルよりも精密でないとみなされるが、K$_D$の良好な近似であると推測される。

【０２２２】

表１９は、本開示に係る親和性最適化又はクロスクローンＣＤ３特異的結合性ドメインを含む二重特異的抗体のＫＤ値をまとめたものである。最適化又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体は、ＨＣＤＲ１～２成熟抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（配列番号１４及び配列番号２６）並びにＬＣＤＲ３成熟抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬ（配列番号２５及び配列番号２０）を除いて、低い１桁ナノモル範囲内のK$_D$値で組換えヒトＣＤ３イプシロン抗原を認識した。これらの２つの抗体は、低い２桁ナノモル範囲内でＣＤ３ｅに対してヘテロジニアス結合性であることが明らかになった。驚くべきことに、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１のＶＨ及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＬのＶＬから構築された発生クロスクローンＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ（配列番号１４及び配列番号２０）は、その

起源抗体と比較したとき、ＣＤ３ｅへの約２０～３０倍改善された結合親和性を示すことが見いだされた。

【０２２３】

【表３３】

表 19: CD3 及び HER2 に対して特異性のある実施例 2 に係る二重特異的 1+1 抗体のヒト CD3 イプシロンに対する K_D 値。

二重特異的抗体	CD3 特異的抗体	ヒト CD3e に対するキネティクス		
		k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]
BissIg_18 opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	1.4E+05	3.4E-04	2.5
BissIg_18 opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	9.5E+04	3.2E-04	3.4
BissIg_18 opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	1.8E+05	3.3E-04	1.9
BissIg_18 opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	1.6E+05	2.9E-04	1.9
BissIg_18 opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	2.5E+05	*4.4E-03*	*17**
BissIg_18 opt_VL	CD3-MABopt_VL	1.5E+05	*4.1E-03*	*28**
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	3.9E+05	1.6E-03	4.2
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	2.4E+05	1.1E-03	4.4
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	5.3E+05	1.4E-03	2.6
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	3.2E+05	6.2E-04	1.9
BissIg_18_opt_cc#	CD3-MAB_{opt_cc}	*1.2E+06*	1.1E-03	*0.9**
		** ヘテロジニアス結合性*		

【０２２４】

実施例２．２：細胞結合性

本開示に係る親和性改善又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体を含む実施例２の二重特異的抗体は、ジャーカット（ＣＤ３＋）及びＪ．ＲＴ３－Ｔ３．５（ＣＤ３－）細胞へのそれらの結合能に関して試験された。３％ウシ胎仔血清（Sigma, #F7524）を含有するD-PBS（Gibco）中で標的細胞を段階希釈（最終濃度：０．１ｎＭ～２００ｎＭ）二重特異的抗体と混合し、氷上で１ｈインキュベートした。３％ウシ胎仔血清（Sigma, #F7524）及び０．０２％ナトリウム酸を含有するＤ－ＰＢＳ（Gibco）中で細胞を２回洗浄した。AlexaFluor 647標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆ（ａｂ’）２フラグメント特異的）（Jackson Immuno Research Cat#109-606-097）を用いて二重特異的抗体を検出した。ＦＡＣＳアレイ（Beckton Dickinson）又はIntelliCyt iQueフローサイトメーターを用いて抗体染色を測定し、それぞれ、FlowJo又はForeCyt（IntelliCyt）ソフトウェアで解析した。Prismソフトウェア（GraphPad Software Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてＥＣ$_{50}$値を計算した。

【０２２５】

表２０及び図３は、本開示に係る親和性成熟又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体可変ドメインを含む検査二重特異的抗体調製物の細胞結合性をまとめたものである。全体的に、ＣＤ３特異的クロスクローンは、親和性改善単独カウンターパートと比較したとき、ジャーカット細胞への結合性がより強いことが明らかになった。特定的には、クロスクローンＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ（配列番号１４及び配列番号２０）は、ジャーカット細胞への最強の結合性を呈した。２つの親和性改善ＣＤ３特異的抗体（ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃２及びＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃５）並びにそれらの２つのクロスクローンカウンターパート（ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ＃２及びＣＤ３－　ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ＃５）では、ＣＤ３陰性細胞系統Ｊ．ＲＴ３－Ｔ３．５への結合性が観測可能であった。

【０２２６】
【表３４】

表 20: 表 20: 本開示の親和性成熟又はクロスクローン CD3 特異的結合性抗体を含む HER2 及び CD3 に対して特異性のある実施例2に係る二重特異的抗体の細胞結合性（EC_{50} 値）。

二重特異的抗体	CD 特異的抗体	細胞結合性	
		ジャーカット EC_{50} [nM]	J.RT3-T3.5 結合性@200nM
BissIg_18_opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	>50	あり
BissIg_18_opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	>100	なし
BissIg_18_opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	44	なし
BissIg_18_opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	>50	あり
BissIg_18_opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	9	なし
BissIg_18_opt_VL	CD3-MABopt_VL	18 / >100	なし
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	>50	あり
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	>50	なし
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	>20	なし
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	>50	あり
BissIg_18_opt_cc#	CD3-MAB_{opt_cc}	7	なし

【０２２７】
実施例２．３　ジャーカットＮＦＡＴレポーター遺伝子細胞アッセイ
　実施例２の二重特異的抗体の機能的活性を評価するために、ＮＦＡＴレポーター遺伝子構築物で一過性トランスフェクトされたジャーカット細胞（ATCC #TIB-152）をサロゲートエフェクター細胞として使用した。ＨＥＲ２陽性標的腫瘍細胞系統として、ＳＫＯＶ－３（ATCC（登録商標）HTB-77（商標））及びＭＣＦ－７（ATCC（登録商標）HTB-22（商標））を使用した。アッセイは、実施例１．５に本質的に記載のように行われた。細胞系統の維持のために、下記成長培地：ジャーカット：１０％ＦＣＳ（Sigma, #F7524）が補充されたＲＰＭＩ－１６４０＋Ｌ－グルタミン（Thermo Fisher, #21875-034）、ＳＫＯＶ－３：１０％ＦＣＳ（Sigma #F7524）が補充されたＭｃＣｏｙ　５ａ（Gibco, #26600）、ＭＣＦ－７：＋１０％ＦＣＳ（Sigma #F7524)＋１×Glutamax（Gibco #35050-061）＋１×ナトリウムピルベート（Gibco #11360-039）が補充されたＤＭＥＭ（Gibco # 10938）を使用した。ＳＫＢＲ－３細胞は、成長培地で４Ｅ＋０５細胞／ｍｌの密度に希釈された。ＳＫＯＶ－３及びＭＣＦ－７細胞は、成長培地で４Ｅ＋０５細胞／ｍｌの密度に希釈された。４０，０００細胞に対応する１００μｌ細胞サスペンジョンを組織培養処理９６ウェルプレート（Corning, #3917）の各ウェルに播種し、加湿インキュベーター中、３７℃及び５％CO_2で一晩インキュベートした。ジャーカット細胞は、成長培地で２．５Ｅ＋０５細胞／ｍｌの濃度に再懸濁された。トランスフェクション成分ｐＧＬ４．３０［ｌｕｃ２Ｐ／ＮＦＡＴ－ＲＥ／Ｈｙｇｒｏ］レポーター遺伝子ベクター（Promega #9PIE848）、ＯｐｔｉＭＥＭ－Ｉ培地（Life Technologies, #31985-047）、及びTransIT-LT1トランスフェクション試薬（Mirus, #MIR2304）をＲＴで１５ｍｉｎインキュベートし、次いで、ジャーカット細胞サスペンジョンに添加し、加湿インキュベーター中、３７℃及び５％CO_2で１７ｈインキュベートした。ジャーカット細胞を採取して成長培地で１．２Ｅ＋０６／ｍｌ

の濃度で再懸濁した。被覆標的細胞から培地を除去し、６０，０００細胞／ウェルに対応する５０μｌジャーカット細胞サスペンジョンに置き換えた。ジャーカット成長培地で二重特異的抗体を段階希釈した。５０μｌ抗体希釈物を各ウェルに添加して５０ｎＭ～０．０１ｎＭの最終濃度範囲を得た（４ステップ希釈）。加湿インキュベーター中、３７℃及び５％CO_2でアッセイプレートを５ｈインキュベートした。製造業者の説明書に従ってBright-Glo（商標）試薬（Promega, #E2620）を再構成した。アッセイプレート及び試薬を室温で平衡化した。１００μｌのBright-Glo（商標）試薬をアッセイプレートの各ウェルに添加し混合した。InfiniteM1000 Proプレートリーダー（Tecan）を用いてルミネセンスを測定した。

【０２２８】

表２１は、本開示の二重特異的抗体により媒介されたジャーカット細胞／ＮＦＡＴレポーター系の活性化をまとめたものである。この場合も、クロスクローン抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ（配列番号１４及び配列番号２０）を含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿１８＿ｏｐｔ＿ｃｃ＃は、ＳＫＯＶ－３及びＭＣＦ－７細胞の両方の存在下で０．２ｎＭ未満のEC_{50}値でジャーカット細胞／ＮＦＡＴレポーター系の最強活性化を呈した。

【０２２９】

【表３５】

表 21: 本開示の親和性成熟又はクロスクローン CD3 特異的結合性ドメインを含む HER2 及び CD3 に対して特異性のある実施例 2 に係る二重特異的抗体を用いたレポーター遺伝子アッセイ。

二重特異的抗体	CD 特異的抗体	レポーター遺伝子アッセイ	
		SKOV3 EC_{50} [nM]	MCF-7 EC_{50} [nM]
BissIg_18 opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	1.18	>5
BissIg_18 opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	1.62	0.85
BissIg_18 opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	0.89	2.04
BissIg_18 opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	1.73	>5
BissIg_18 opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	0.18	0.33
BissIg_18 opt_VL	CD3-MABopt_VL	0.81/2.18	0.44/0.48
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	0.61	0.39
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	0.04	0.43
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	0.33	<0.5
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	1.15	0.39
BissIg_18_opt_cc#	$CD3\text{-}MAB_{opt_cc}$	0.07	<0.2

">" = 不完全タイトレーション / 当てはめ不良

【０２３０】

実施例２．４：二重特異的抗体による細胞傷害性アッセイ。

実施例２に係る二重特異的抗体は、ＨＥＲ２発現性腫瘍細胞系統ＳＫＢＲ３、ＭＣＦ－７、及びＨＥＲ２陰性細胞系統ＭＤＡ－ＭＢ－４６８のＴ細胞依存性死滅を媒介するそれらの能力に関して検査された。アッセイは、実施例１．６に記載のように行われた。エフェクター細胞として、ヒトＰＢＭＣ（ＳＫＢＲ３に対して）細胞又は精製ヒトＴ細胞（ＭＣＦ－７細胞に対して）のどちらかが使用された。ヒトＰＢＭＣ及びヒトＴ細胞の調製及び精製は、実施例１．４に記載のように行われた。５０００のＳＫＢＲ－３、ＭＤＡ－Ｍ

Ｂ－４６８、又はＭＣＦ－７細胞を黒色９６ウェルアッセイプレート（Corning#3340）に播種して、３７℃及び５％CO_2で一晩インキュベートした。CellToxGreen色素（Promega, #G8731）、段階希釈二重特異的抗体構築物、及びＳＫＢＲ－３細胞に対して１００．０００の精製ＰＢＭＣ（１：２０の標的／エフェクター比）又はＭＣＦ－７細胞に対して５０．０００の精製Ｔ細胞（１：１０の標的／エフェクター比）は、すべてアッセイ培地で希釈して細胞に添加され、３７℃及び５％CO_2で７２ｈインキュベートされた。７２ｈ後、取り込まれたCellToxGreenの蛍光を４８５ｎｍ励起及び５３５ｎｍ発光でTecan Infinite F500デバイスを用いて測定することにより、細胞傷害性活性をアセスした。Prismソフトウェア（GraphPad Software Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてEC_{50}値を計算した。

【０２３１】

表２２及び図４（１ドナー）は、本開示の二重特異的抗体により媒介される癌細胞系統のＴ細胞性リダイレクト死滅をまとめたものである。クロスクローンＣＤ３特異的抗体を含む二重特異的抗体は、ＳＫＢＲ３細胞及びＭＣＦ－７細胞の両方の優れた死滅を明確に示した。これらのうち、クロスクローン抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ（配列番号１４及び配列番号２０）を含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿１８＿ｏｐｔ＿ｃｃ＃は、両方の癌細胞系統の最良死滅活性を呈した。クロスクローンＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ＃４では、より高い検査抗体濃度でＨＥＲ２陰性細胞系統ＭＤＡ－ＭＢ－４６８の弱い細胞死滅が観測可能であった（データは示されていない）。

【０２３２】

【表３６】

表 22: 本開示の親和性成熟又はクロスクローン CD3 特異的抗体を含む HER2 及び CD3 に対して特異性のある実施例 2 に係る二重特異的抗体によるT細胞媒介死滅アッセイ。

二重特異的抗体	CD3 特異的抗体	SKBR3 [PBMCs] IC_{50} [pM]	MCF-7 [T 細胞] IC_{50} [pM]
BissIg_18_opt_VH#2	CD3-MABopt_VH#2	n.t.	n.t.
BissIg_18_opt_VH#3	CD3-MABopt_VH#3	n.t.	146.9 / >300*
BissIg_18_opt_VH#4	CD3-MABopt_VH#4	n.t.	n.t.
BissIg_18_opt_VH#5	CD3-MABopt_VH#5	n.t.	n.t.
BissIg_18_opt_VH#1	CD3-MABopt_VH#1	15.0	209.7 /inc. Tit.
BissIg_18_opt_VL	CD3-MABopt_VL	12.6 / 13.9	n.t.
BissIg_18_opt_cc#2	CD3-MABopt_cc#2	1.9	n.t.
BissIg_18_opt_cc#3	CD3-MABopt_cc#3	2.1	28.9 /62.7
BissIg_18_opt_cc#4	CD3-MABopt_cc#4	1.4	28.9 /46.1
BissIg_18_opt_cc#5	CD3-MABopt_cc#5	2.9	n.t.
BissIg_18_opt_cc#	CD3-$MAB_{opt\ cc}$	1.8	<10* /13.2

*当てはめ不良; n.t. = 検査せず

【０２３３】

実施例２．５：標的癌細胞の不在下でのＴ細胞活性化（高密度ＰＢＭＣアッセイ）

実施例２の二重特異的抗体は、標的癌細胞の不在下で異なる３ドナーのヒト血液サンプルに由来するヒトＴ細胞を活性化するその能力に関して検査された。アッセイは、Roemerらにより提案された高ＰＢＭＣ密度プレ培養条件下で行われた（Roemer et al.,BLOOD,22 DECEMBER 2011,VOLUME 118,NUMBER 26,PAGE 6772-6781）。ヒトＰＢＭＣは、以上に記載のように調製され精製された（実施例１．４参照）。Ｔ細胞は、GlutaMax（Gibco, #35050-038）、非必須アミノ酸（Gibco, #11140-035）、ＨＥＰＥＳ緩衝剤溶液（Gibco #15630-056）、ナトリウムピルベート（Gibco, #11360-039）、β－メルカプトエタノール、ペニシリン／ストレプトマイシン（Gibco

#15140-122）、及びヒト血清（Sigma, #H4522）が補充されたRPMI1640培地（Gibco, #31870-025）中に１Ｅ＋０７細胞／ｍＬの密度で再懸濁され、３７℃及び５％CO_2で４８ｈインキュベートされた。高密度プレインキュベーション後、培地中の２００，０００のＰＢＭＣを培地で段階希釈された等体積の抗体（最終濃度：１０００ｎＭ、２００ｎＭ、及び４０ｎＭ）と混合し、３７℃及び５％CO_2で２４ｈインキュベートした。陽性コントロールとして、市販のネズミＩｇＧ抗体ＯＫＴ３を使用した。Ｔ細胞の活性化は、ＣＤ３陽性リンパ球上のＣＤ６９発現のアップレギュレーションの評価によりアセスされた。このため、ＰＢＭＣは、ＢＶ／ＰＥ及びＡＰＣにそれぞれコンジュゲートされたＣＤ３及びＣＤ６９に対する抗体で染色された（Biolegend,#300434,#12003742,#310910）。抗体染色は、NovoCyte 3000フローサイトメーター（Acea Biosciences, Inc.）を用いて測定され、FlowJoソフトウェアを用いて解析された。

【０２３４】

図５は、３ドナーから得られたヒトＣＤ８＋Ｔ細胞でのＴ細胞活性化実験の平均的模範的結果を示す。予想通り、陽性ネズミコントロールＩｇＧ　ＯＫＴ－３では、ＣＤ６９発現の強いアップレギュレーションが観測可能であった。ＣＤ８＋Ｔ細胞のドナー依存性活性化は、親和性最適化又はクロスクローンＣＤ３特異的抗体を含むすべての検査二重特異的抗体で観測可能であった。これらのうち、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ＶＨ＃１（配列番号１４及び配列番号２６）又はそのクロスクローンカウンターパートＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ（配列番号１４及び配列番号２０）のどちらかを含む二重特異的抗体は、標的癌細胞系統の不在下で最低レベルのヒトＴ細胞活性化を呈した。

【０２３５】

実施例２．６：親和性改善及びクロスクローンＣＤ３特異的抗体の概要。

強親和性改善クロスクローンＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃ（配列番号１４及び配列番号２０）は、祖父母抗体ＣＤ３－ＭＡB_{GP}の親和性成熟キャンペーンに由来する最も効力のある且つ最も安全なＣＤ３特異的抗体として同定された。

【０２３６】

ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ＿ｃｃは、ヒト及びカニクイザルＣＤ３への有利な結合性を示すとともに、ＨＥＲ２低、中、及び高発現性癌細胞系統への優れた細胞傷害性活性を媒介し、ＨＥＲ２陰性癌細胞系統の死滅はまったくみられず、実施例２の二重特異的抗体フォーマットで試験したとき、標的細胞の不在下では低レベルのＴ細胞活性化がみられるにすぎなかった。

【０２３７】

実施例３：最適化ＣＤ３特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃから改善された２＋１Ｆａｂ２－Ｆｖ－Ｆｃ抗体フォーマットへの変換

実施例３．１：リンカー最適化３価二重特異的抗体の調製、産生、及び特徴付け。

二重特異的Fab_2－Ｆｖ－Ｆｃ抗体は、国際公開第２０２０／１１５１１５号（その全体が本明細書に組み込まれる）に記載の二重特異的抗体プラットフォーム技術を用いてｉｎ　ｖｉｔｒｏで発生された。この二重特異的抗体フォーマットは、レギュラーヒトＩｇＧ１分子のＦｃ領域及び２つのＦａｂアーム間に挿入された１つのエキストラ抗体Ｆｖフラグメントを取り込んだ無グリコシル化モノクローナルヒトＩｇＧ１抗体骨格から構築される。かかる二重特異的抗体の基本構造は、図２に提供される。かかるフォーマットは、腫瘍関連抗原などの標的細胞表面抗原には２価結合するがＴ細胞上に発現されるＣＤ３には１価結合するという利点を提供する。このフォーマットはまた、二重特異的抗体を介して一旦ブリッジされると標的細胞及び細胞傷害性Ｔ細胞間の距離を短くできる。この狭い免疫学的シナプスは、リクルート細胞傷害性Ｔ細胞による標的細胞の効率的死滅をもたらす。

【０２３８】

実施例３．２：リンカー最適化

二重特異的抗体フォーマットの個別成分を接続する適正ペプチドリンカーの選択（アミノ酸配列及び長さに関して）は、こうしたリンカーがエキストラＦｖフラグメントのフレ

キシビリティー及び二重特異的抗体の２つのＦａｂアームの各々の結合性領域とそれとの距離を決定するので、とくに重要である。以前に国際公開第２０２０／１１５１１５号に開示されたペプチドリンカーをさらに最適化するために、それぞれのリンカーの伸長及び配列最適化を行った。

【０２３９】

ＣＤ３特異的Ｆｖフラグメントの Ｎ－末端リンカー

取込みＣＤ３特異的ＦｖフラグメントのＶＨ又はＶＬのどちらかのＮ末端への各Ｆａｂ重鎖のＣ末端の融合は、下記ペプチドリンカー：

ａ）９ｍｅｒグリシン－セリンリンカー（ＧＧＳ）$_3$：ＧＧＳＧＧＳＧＧＳ（配列番号３０）

ｂ）２０ｍｅｒ（Ｇ$_4$Ｓ）$_4$リンカー：ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３１）

ｃ）２０ｍｅｒＰＡＰＤＡリンカー：ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）、又は

ｄ）２０ｍｅｒＰＡＨリンカー：ＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＰＡＡＰＡＰＡＨＧＨ（配列番号３２）

の１つを用いることにより達成された。

【０２４０】

ＣＤ３特異的Ｆｖフラグメントの Ｃ－末端リンカー

２つのＦｃ領域サブユニットのどちらか一方のＮ末端へのＣＤ３特異的ＦｖフラグメントのＶＨ及びＶＬドメインの各々のＣ末端の融合は、下記ペプチドリンカー：

ｉ）ＣＤ３特異的ＦｖフラグメントのＶＬドメインを２つのＦｃ領域サブユニットの一方に融合する場合、

ａ）ＣＬλ定常ドメインの最初の５アミノ酸残基：ＰＫＡＡＰ（配列番号３６）

ｂ）２０ｍｅｒＰＡＰＤＡリンカー：ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）、若しくは

ｃ）ＣＬλ定常ドメインの最初の２０アミノ酸残基：ＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮ（配列番号３４）、又は

ｉｉ）ＣＤ３特異的ＦｖフラグメントのＶＨドメインを２つのＦｃ領域サブユニットの一方に融合する場合、

ａ）ＣＨ１定常ドメインの最初の６アミノ酸残基：ＡＳＴＫＧＰ（配列番号３７）、

ｂ）２０ｍｅｒＰＡＰＤＡリンカー：ＡＱＰＡＡＰＡＰＤＡＨＥＡＰＡＰＡＱＧＳ（配列番号３３）、若しくは

ｃ）ＣＨ１定常ドメインの最初の２０アミノ酸残基：ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧ（配列番号３５）

の１つを用いることにより達成された。

【０２４１】

検査されたリンカー組合せの概要は、表２３にリストされる。図２は、実施例３の二重特異的抗体フォーマットの異なる成分を接続するために使用されるさまざまなペプチドリンカーを描く。

【０２４２】

【表３７】

表 23: 二重特異的 Fab_2-Fv-Fc 抗体フォーマットで取込みエキストラ CD3 特異的 Fv フラグメントの VH 及び VL ドメインを Fab アーム及び Fc 領域サブユニットに接続するために使用されたリンカー組合せ。

	CD3 特異的 Fv フラグメントの VL ドメイン (knob 鎖)				CD3 特異的 Fv フラグメントの VH ドメイン (hole 鎖)			
リンカー組合せ	N-末端リンカー	配列番号	C-末端リンカー	配列番号	N-末端リンカー	配列番号	C-末端リンカー	配列番号
P (親)*	$(GGS)_3$	30	5aa-Cl	36	$(GGS)_3$	30	6aa-CH1	37
1	$(G_4S)_4$	31	5aa-Cl	36	$(G_4S)_4$	31	6aa-CH1	37
2	$(G_4S)_4$	31	20aa-PAPDA	33	$(G_4S)_4$	31	20aa-PAPDA	33
3	$(G_4S)_4$	31	20aa-Cl	34	$(G_4S)_4$	31	20aa-CH1	35
4	20aa-PAH	32	20aa-Cl	34	20aa-PAH	32	20aa-CH1	35
5	20aa-PAPDA	33	20aa-Cl	34	20aa-PAPDA	33	20aa-CH1	35
6	$(GGS)_3$	30	20aa-Cl	34	$(GGS)_3$	30	20aa-CH1	35

*国際公開第 2020/115115 号に最初に開示された通り

【０２４３】

Ｃ－末端リンカーはすべて、ヒトＩｇＧ１ヒンジ配列ＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰ（配列番号３８）の一部分によりＣ末端がさらに伸長された。トランケートヒトＩｇＧ１ヒンジ配列の使用は、Ｆａｂ重鎖を含む２つのポリペプチド鎖間の鎖間ジスルフィドブリッジの形成を介してヘテロダイメリック分子のさらなる安定化を可能した。Ｆｃ領域は、「ｋｎｏｂ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ」技術に従って各Ｆｃ領域サブユニットのＣＨ３ドメイン中に変異を導入することにより修飾された。それにより、一方の変異ＣＨ３ドメインを含むポリペプチドは、相補的に工学操作された他方のＣＨ３ドメインを含む他方のポリペプチドと強制的にヘテロダイマー化される。ＨＥＲ２結合性のために、Baselga et al.1998,Cancer Res58(13):2825-2831により記載される「トラスツズマブ」（HERCEPTIN（登録商標））のＶＨ及びＶＬドメイン（それぞれ、配列番号２８及び配列番号２９）を使用した。トラスツズマブ及びその調製方法は、米国特許第５，８２１，３３７号に記載されている。ＣＤ３結合性のために、実施例２のＣＤ３特異的クロスクローンＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＶＨ及びＶＬ（それぞれ、配列番号１４及び配列番号２０）を使用した。実施例３に従って作られた表２３のさまざまなリンカー組合せを利用して産生される二重特異的３価$Ｆａｂ_2$－Ｆｖ－Ｆｃ抗体を形成する個別ポリペプチドの概要は、表１３に示される。

【０２４４】

実施例３．３：遺伝子合成及び産生

すべての核酸配列又は所望の遺伝子セグメントは、適切な鋳型を用いてＰＣＲにより発生されたか、又はインハウスで若しくは外部プロバイダーにより適切なフランキング領域（たとえば、好適な制限酵素認識部位、リンカー配列）を有する線状ＤＮＡ断片として遺伝子合成されたか、のどちらかであった。シンギュラー制限エンドヌクレアーゼ切断部位によりフランキングされた核酸配列又は遺伝子セグメントは、標準的分子生物学的方法を用いてそれぞれの発現ベクター（たとえば、哺乳動物発現ベクター）又はシーケンシングベクター中にクローニングされた。哺乳動物発現ベクターでの使用が意図されるとき、構

築物はすべて、真核細胞での分泌用タンパク質を対象とするリーダーペプチドをコードする５’末端ＤＮＡ配列を用いて設計された。サブクローン遺伝子断片のＤＮＡ配列は、ＤＮＡの二本鎖シーケンシングにより確認された。二重特異的抗体の発現のために、二重特異的抗体のすべての成分をコードする哺乳動物ベクター発現系で指数関数的成長期の真核ＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞をトランスフェクトし、それぞれ、２つのＦｃ領域サブユニットを含む２つのポリペプチド及びトラスツズマブのＦａｂ軽鎖を含む２つのポリペプチドの１：１：２比を得た。トランスフェクション後の６日目に細胞培養上清を採取し、標準的プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（MabSelect SURE ¦ GE Healthcare）に付した。１×ダルベッコＰＢＳ（ｐＨ７．２ ¦ Invitrogen）への緩衝液交換を実施し、サンプルを無菌濾過した（０．２μｍ細孔サイズ）。タンパク質濃度は、ＵＶ分光測光により決定され、構築物の純度は、ＣＥ－ＳＤＳ（LabChip GXII ¦ Perkin Elmer ¦ USA）を用いて変性還元性及び非還元性条件下で解析された。ＨＰ－ＳＥＣは、ネイティブ状態で二重特異的抗体調製物を解析するために実施された。そのほか、質量分析解析により二重特異的抗体の分子質量及びホモジニアス性を確認した。

【０２４５】

表２４は、産生二重特異的抗体で得られたさまざまな調製物のモノマー含有率及びボルメトリック収量をまとめたものである。産生二重特異的抗体はすべて、同等な産生特性であることが明らかになった。

【０２４６】

しかしながら、ＣＨ１又はＣλ由来ペプチドリンカーを用いたすべての二重特異的抗体で、こうしたリンカーの潜在的Ｏ－連結グリコシル化を示唆する非常にヘテロジニアスな質量パターンが明らかになった。リンカー組合せ２、すなわち、２０ｍｅｒグリシン－セリンリンカー（配列番号３１）と２０ｍｅｒＰＡＰＤＡリンカー（配列番号３３）との組合せを用いた二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃２のみは、ホモジニアス質量パターンを示し、Ｏ－連結グリコシル化の潜在的兆候はなかった。

【０２４７】

【表３８】

表 24: 同一 HER2 及び CD3 結合性ドメインを含むがリンカー組合せが異なる哺乳動物産生二重特異的 Fab_2-Fv-Fc 抗体の品質管理。

二重特異的抗体 (表 13)	リンカー組合せ (表 23)	SEC モノマー含有率 [%]	ボルメトリック収量 [mg/L]	質量分析解析
BissIg_21#P	P	92.3*	61.7	ヘテロジニアスパターン - 潜在的 O-連結グリコシル化
BissIg_21#1	1	91.2*	73.3	ヘテロジニアスパターン - 潜在的 O-連結グリコシル化
BissIg_21#2	**2**	**84.0** / 91.4***	**81.3 / 58.3**	**ホモジニアスパターン – O 連結グリコシル化の兆候なし**
BissIg_21#3	3	91.3*	70.0	ヘテロジニアスパターン - 潜在的 O-連結グリコシル化
BissIg_21#4	4	91.4*	67.1	ヘテロジニアスパターン - 潜在的 O-連結グリコシル化
BissIg_21#5	5	91.9*/ 90.9***	61.3 / 48.2	ヘテロジニアスパターン - 潜在的 O-連結グリコシル化
BissIg_21#6	6	91.0*	68.3	ヘテロジニアスパターン - 潜在的 O-連結グリコシル化

【０２４８】

実施例３．４：抗体キャプチャーセットアップを介するK_D決定

Octet HTX（ForteBIO, Sartorius AG）機器でキネティック速度定数を決定することにより親和性決定を実施した。アッセイ緩衝液（Ｄ－ＰＢＳ、０．０５％（ｖ／ｖ）ＰＳ２０、０．１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ）で希釈された実施例３のさまざまな二重特異的抗

体調製物をおおよそ２ｎｍのローディングレベルでＩｇＧ特異的ＢＬＩセンサー上にキャプチャーした。解析のために、ヒトＣＤ３イプシロン抗原ｈＣＤ３ｅ（２２－１１８）＿Ｆ－ｃｈＬｙｓ＿ａｖｉ（配列番号４３）を１．５６ｎＭ～５００ｎＭ（段階１：３希釈）の範囲内の濃度になるようにアッセイ緩衝液で希釈した。基準にするために、すなわち、キャプチャー抗体の解離を補正するために、アッセイ緩衝液のブランクサンプルを含めた。会合相を３００ｓ記録し、１８０ｓの解離相がそれに続いた。Octet Data Analysis Software 10.0（ForteBio, Sartorius AG）を用いてセンサーグラムの当てはめを行ってk_{on}及びk_{off}速度定数を決定し（１：１結合性モデルを用いて）、これを用いてK_Dを計算した。

【０２４９】

表２５は、表２３のさまざまなリンカー組合せを用いた本実施例の二重特異的抗体でヒトＣＤ３イプシロン抗原K_D値をまとめたものである。検査されたすべてのリンカー組合せで同等のＣＤ３結合性が観測された。

【０２５０】

【表３９】

表 25: CD3-MABopt-cc の可変ドメインを含むがリンカー組合せが異なる二重特異的抗体のヒト CD3 イプシロン抗原への親和性

二重特異的抗体 (表 13)	リンカー組合せ (表 23)	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [nM]
BissIg_21#P	P	3.04E+05	1.21E-03	4.0*
BissIg_21#1	1	2.67E+05	1.12E-03	4.2*
BissIg_21#2	2	2.66E+05	9.74E-04	3.7*
BissIg_21#3	3	2.46E+05	1.08E-03	4.4*
BissIg_21#4	4	2.14E+05	1.13E-03	5.3*
BissIg_21#5	5	1.92E+05	9.84E-04	5.1*
BissIg_21#6	6	2.87E+05	1.02E-03	3.6*

* わずかにヘテロジニアス結合性であり、値は 1:1 結合性への最良近似を表す

【０２５１】

実施例３．５：細胞結合性

表２３のさまざまなリンカー組合せを含む実施例３に係る二重特異的抗体は、ＣＤ３陽性ジャーカット細胞及びＣＤ３陰性Ｊ．ＲＴ３－Ｔ３．５細胞へのそれらの結合能に関して検査された。ジャーカット及びＪ．ＲＴ３－Ｔ３．５細胞を再懸濁し、カウントし、ブロックし、洗浄緩衝液（ＤＰＢＳ＋（Gibco）／３％ＦＢＳ（Sigma）／０．０２％ナトリウム酸）中、氷上で１ｈブロックした。洗浄緩衝液で段階希釈された二重特異的抗体（最終濃度：５００ｎＭ～３１ｐＭ）中にブロック細胞を再懸濁し、氷上で１ｈインキュベートした。洗浄緩衝液中で細胞を２回洗浄した。AlexaFluor 647標識ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント特異的）（Jackson Immuno Research Cat#109-606-097）を用いて結合抗体を検出した。Prismソフトウェア（GraphPad Software Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてEC_{50}値を計算した。

【０２５２】

表２６は、２つの独立した実験の細胞結合性結果（EC_{50}値）をまとめたものである。さまざまなリンカー組合せを含むＨＥＲ及びＣＤ３に対して特異性のある二重特異的抗体は、最初に記載のリンカー組合せＰと比較したとき、ジャーカット細胞への同等の結合性を呈した。ＣＤ３陰性ジャーカット細胞（ＲＴ３－Ｔ３．５）への結合は観測できなかった（データは示されていない）。

【０２５３】

【表４０】

表 26: 細胞結合性

二重特異的抗体 (表 13)	リンカー組合せ (表 23)	ジャーカット EC_{50} [nM]
BissIg_21#P	P	61.5 / 83.7
BissIg_21#1	1	54.8 / 53.9
BissIg_21#2	2	71.7
BissIg_21#3	3	89.2 / 58.2
BissIg_21#4	4	43.2 / 64.1
BissIg_21#5	5	98.3 / 132.7
BissIg_21#6	6	60.9 / 64.1

【０２５４】

実施例３．６：さまざまなリンカー組合せを含む二重特異的抗体による細胞傷害性アッセイ

さまざまなリンカー組合せを含む実施例３に係る二重特異的抗体は、ＨＥＲ２発現性ＳＫＯＶ－３及びＨＥＲ－２陰性ＭＤＡ－ＭＢ４６８細胞のＴ細胞媒介死滅を誘導するそれらの能力に関して検査された。２ドナーからのヒト汎Ｔ細胞を以上に記載のように調製し精製した（実施例１．４参照）。５，０００のＨＥＲ２発現性ＳＫＯＶ－３細胞を培養培地（ＳＫＯＶ－３：ＭｃＣｏｙの５Ａ培地（ThermoFisher, #26600)、10%FCS(Sigma, #F7524）中に懸濁し、黒色９６ウェルアッセイプレート（Corning, #3340）に播種し、３７℃及び５％CO_2で一晩インキュベートした。CellToxGreen色素（Promega, #G8731）、段階希釈二重特異的抗体（０．３ｎＭ～１．２ｐＭ）、及び５０，０００の精製Ｔ細胞（１：１０の標的／エフェクター比）をすべて、RPMI 1640 w/oフェノールレッド（Gibco#32404-014）、GlutaMAX、及び１０％ウシ胎仔血清を含むアッセイ培地で希釈して細胞に添加し、３７℃及び５％CO_2で７２ｈインキュベートした。取り込まれたCellToxGreenの蛍光を４８５ｎｍ励起及び５３５ｎｍ発光でTecan Infinite F500デバイスを用いて測定することにより、細胞傷害性活性をアセスした。Prismソフトウェア（GraphPad Software Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてEC_{50}値を計算した。

【０２５５】

表２７は、さまざまなリンカー組合せを含む二重特異的抗体により媒介されたＳＫＯＶ－３細胞のＴ細胞性リダイレクト死滅の平均IC_{50}値をまとめたものである。用量依存性死滅は、すべての二重特異的抗体で確認された。５つのリンカー組合せは、最初に開示されたリンカー組合せＰ（ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃Ｐ）と比較して改善された細胞死滅をもたらした。ＭＤＡ－ＭＢ４６８細胞のＨＥＲ２非依存性死滅は、検査された二重特異的抗体のいずれでも観測できなかった（データは示されていない）。

【０２５６】

図６は、最初に開示されたリンカー組合せＰ（ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃Ｐ）と比較して、最大級の効力のあるリンカー組合せ２及びリンカー組合せ５を含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃２及びＢｉｓｓＩｇ＿２１＃５により媒介される模範的ＳＫＯＶ－３死滅結果ことを示す。

【０２５７】

【表４１】

表 27: HER2 陽性 SKOV-3 細胞の T 細胞性リダイレクト死滅

二重特異的抗体 (表 13)	リンカー組合せ 表 23	SKOV-3 細胞の死滅
		IC_{50} [nM]*
BissIg_21#P	P	48**
BissIg_21#1	1	23
BissIg_21#2	**2**	**21**
BissIg_21#3	3	39
BissIg_21#4	4	21
BissIg_21#5	**5**	**20****
BissIg_21#6	6	74

** 4ドナーの平均 ** 6ドナーの平均*

【０２５８】

実施例３．７：標的癌細胞の不在下でのＴ細胞活性化（高密度ＰＢＭＣアッセイ）

さまざまなリンカー組合せを含む実施例３の二重特異的抗体は、標的癌細胞の不在下で異なる３ドナーのヒト血液サンプルに由来するヒトＴ細胞を活性化するそれらの能力に関して検査された。アッセイは、本質的に実施例２．５に記載のように行われた。二重特異的抗体は、１０００ｎＭ、２００ｎＭ、４０ｎＭ、８ｎＭ、１．６ｎＭ、及び０．３２ｎＭの最終濃度で検査された。陽性コントロールとして、市販のネズミＩｇＧ抗体ＯＫＴ３を使用した。Ｔ細胞の活性化は、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞上でのＣＤ６９発現のアップレギュレーションの評価によりアセスされた。このため、ＰＢＭＣは、ＡＰＣ、ＰＥ、Pacific BlueにそれぞれコンジュゲートされたＣＤ６９、ＣＤ４、及びＣＤ８に対する抗体で染色された（Biolegend, #310910/#300508/#300928）。抗体染色は、NovoCyte 3000フローサイトメーター（Acea Biosciences, Inc.）を用いて測定され、FlowJoソフトウェアを用いて解析された。

【０２５９】

３ドナーから得られたＴ細胞活性化実験の平均結果は、ＣＤ４＋／ＣＤ８－Ｔ細胞については図７Ａ及びＣＤ４－／ＣＤ８＋Ｔ細胞については図７Ｂに示される。予想通り、陽性コントロールＩｇＧ　ＯＫＴ－３では、ＣＤ４陽性及びＣＤ８陽性Ｔ細胞上でのＣＤ６９発現の強いアップレギュレーションが観測可能であった。ＨＥＲ２発現性標的細胞の不在下では、検査された二重特異的抗体のいずれでも、たとえ１μＭの最高試験濃度であったとしても、ＣＤ４＋Ｔ細胞の活性化は観測可能ではなかった（抗体濃度は左から右に減少する）。検査されたリンカー組合せのいくつかでは、ＣＤ８＋Ｔ細胞のわずかなドナー依存性活性化が観測されたが、１μＭの最高検査抗体濃度でのみ観測されたにすぎなかった。最大級の顕著な活性化は、最初に開示されたリンカー組合せＰ（ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃Ｐ）、リンカー組合せ１（ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃１）、及びリンカー組合せ６（ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃６）で観測可能であった。

【０２６０】

実施例３．８：要約リンカー最適化

新しいリンカー組合せを利用する実施例３の二重特異的２＋１Ｆａｂ$_2$－Ｆｖ－Ｆｃ抗体はすべて、最初に記載のリンカー組合せＰを含む二重特異的抗体（ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃Ｐ）と比較したとき、産生特性及びＣＤ３への結合性が類似していることが明らかになった。

【０２６１】

しかしながら、それぞれリンカー組合せ１、２、３、４、及び５を含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃１、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃２、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃３、Ｂｉｓｓ

Ｉｇ＿２１＃４、及びＢｉｓｓＩｇ＿２１＃５は、最初に記載のリンカー組合せＰを含むＢｉｓｓＩｇ＿２１＃Ｐと比較したとき、ＳＫＯＶ－３細胞のＴ細胞媒介死滅の効能が改善されるとともに標的非依存性Ｔ細胞活性化がより少ないことが明らかになった。しかしながら、ＣＨ１又はＣλベースペプチドリンカーを含む二重特異的抗体はすべて、質量分析解析により決定したとき、哺乳動物産生後のＯ－グリコシル化の兆候が明らかになった。伸長２０ｍｅｒペプチドリンカー（$G_4S)_4$（配列番号３１）及び２０ａａ－ＰＡＰＤＡ（配列番号３３）を包含するリンカー組合せ２を含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃２のみは、Ｏ－グリコシル化の兆候をまったく示さなかった。それゆえ、リンカー組合せ２は、実施例３の改善二重特異的２＋１Ｆａｂ２－Ｆｖ－Ｆｃ抗体フォーマットで使用されるべき最も好ましいリンカー組合せとして同定された。

【０２６２】

実施例４：最適化ＣＤ３特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の脱免疫バリアント抗体の発生

配列ＩＤ１４のＶＨ及び配列番号２０のＶＬを有する実施例２のＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のヒトＣＤ３特異的抗体の脱免疫バリアントを調製した。この抗体は、そのＶＨ及びＶＬの生殖系統コードヒトフレームワーク領域、さらには生殖系統コードＬＣＤＲ１及びＬＣＤＲ２領域により特徴付けられる。下記実施例には、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の非ヒト生殖系統コードＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、及びＬＣＤＲ３領域の脱免疫化が記載される。

【０２６３】

実施例４．１：ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＣＤＲ領域中の（潜在的）Ｔ細胞エピトープ数、Ｈライン数、及びホットスポット数の同定

ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨ（配列ＩＤ１４）及びＶＬ（配列番号２０）のアミノ酸配列は、ｉｎ ｓｉｌｉｃｏ Ｔ細胞エピトープスクリーニングツール（Lonza, Epibase（商標）, Epibaseバージョン:v3.0）を用いることにより、潜在的Ｔ細胞エピトープ数、Ｈライン数、及びホットスポット数に関して解析された。その基本的コンピューティングルーチンは、国際公開第２００３／１０５０５８号（その全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。このスクリーニングツールは、抗体などのバイオ治療用タンパク質中の潜在的Ｔ細胞エピトープの同定を可能にする。Ｔ細胞活性化に必要な条件である潜在的ペプチド／ＨＬＡ結合性を予測するために、実験的に決定された結合親和性と共にＨＬＡレセプターの構造的特性がツールで使用される。

【０２６４】

解析のために、全ＶＨ又はＶＬ配列は、各々１アミノ酸ずつシフトされたオーバーラッピング１０ｍｅｒペプチド（本明細書中では「解析１０ｍｅｒペプチド」という）にスプリットされる。各１０ｍｅｒペプチドの潜在的ペプチド／ＨＬＡ結合は、メジャーコーカサス人ＤＲＢ１アレルのＨＬＡクラスＩＩアロタイプで決定された。ヒト抗体生殖系統コード配列領域は、解析から除外された。

【０２６５】

Epibase（商標）解析の結果

ｉｎ ｓｉｌｉｃｏ「検索」プロセスの結果から、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３領域内の６つのホットスポット及びＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＬＣＤＲ３領域中の１つのホットスポットの存在が明らかになった。ホットスポットは、近接／隣接Ｔ細胞エピトープの累積を反映する。かかるホットスポットは、ＤＲＢ１アレルの少なくとも４つのアロタイプが中（Ｍ）又は強（Ｓ）親和性で３つの連続する解析１０ｍｅｒペプチドの少なくとも２つに結合することを必要とする図８説明及び図８に詳述される「４オーバー３」アルゴリズムに基づいて同定された。そのほか、Ｔ細胞エピトープとして同定されない多くとも１つの１０ｍｅｒペプチドは、ホットスポットの一部でありうる。そのため、同定されたどのＴ細胞エピトープも、ホットスポットの一部でなければならないというわけではない（例として、図４のペプチド１００、１０２、又は１０４を参照されたい）。他方、Ｔ細胞エピトープとして同定されないペプチドは、

それでもなおホットスポットの一部でありうる（例として、図４のペプチド９６又はペプチド１１１を参照されたい）。ホットスポットの一部である各１０ｍｅｒペプチドは、Ｈラインとして定義される。ホットスポットの絶対リスクスコアは、ホットスポット内の各Ｔ細胞エピトープで決定されたリスクスコアの和として計算可能であり、「Ｈスコア」として提供される。

【０２６６】

表２８及び表２９は、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＶＨ及びＶＬで決定された免疫原性リスクパラメーター全体のまとめを提供する。ＬＣＤＲ１＋２領域は生殖系統コード配列であるので、これらの領域にはホットスポットを割り当てなかった。

【０２６７】

【表４２】

表 28: 抗体 CD3-MAB$_{opt-cc}$ の VH の Epibase スクリーニング結果

絶対スコア	652.5
絶対ホットスポット数	6
絶対Ｈスコア	580
絶対Ｈライン数	25
絶対Ｔ細胞エピトープ数	23

【０２６８】

【表４３】

表 29: CD3-MABopt-cc の VL の Epibase スクリーニング結果

絶対スコア	188.8
絶対ホットスポット数	1
絶対Ｈスコア	188.8
絶対Ｈライン数	7
絶対Ｔ細胞エピトープ数	6

【０２６９】

ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＨＣＤＲ３領域の模範的詳細スクリーニング解析は、図８に示される（詳細説明については図８の図の説明を参照されたい）。要するに、ＨＣＤＲ３領域では、２３６のＨスコアで７つのＴ細胞エピトープ及び９つのＨラインを包含する２つのホットスポットが同定された。ＨＣＤＲ２領域では、２５４．１のＨスコアで１０のＴ細胞エピトープ数及び１２のＨラインを包含する３つのホットスポット、ＨＣＤＲ１領域では、８９．９のＨスコアで３つのＴ細胞エピトープ及び４つのＨラインを包含する１つのホットスポットが同定された。ＬＣＤＲ３領域では、１８８．８のＨスコアで６つのＴ細胞エピトープ及び７つのＨラインを包含する１つのホットスポットが同定された。

【０２７０】

実施例４．２：ＣＤＲ領域中の単一アミノ酸置換による抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃの脱免疫バリアントＶＨ及びＶＬ配列の発生

ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＣＤＲ領域からすでに同定されたホットスポット、Ｔ細胞エピトープ、及び／又はＨラインを除去又は低減するために、ｉｎ ｓｉｌｉｃｏ Ｅｐｉｂａｓｅ（商標）変異解析を実施した。その場合、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＶＨ及びＶＬ中の各アミノ酸位置は、システイン、プロリン、及びヒスチジンを除いて、天然に存

在するアミノ酸残基の各々で実質的に置換／ランダム化された。好ましくは、同定されたホットスポット内で≧２のＴ細胞エピトープ数の減少をもたらした、且つたとえば、類似した電荷又は極性のアミノ酸を選択するために、好ましくは保存的アミノ酸置換が可能であったアミノ酸置換を、脱免疫バリアントＶＨ及びＶＬ抗体配列の遺伝子合成のために選択した。そのほか、ＣＤＲ領域中に潜在的翻訳後修飾部位（「ＰＴＭモチーフ」）が導入されないように注意した。

【０２７１】

図９は、未修飾親配列と比較してＴ細胞エピトープ数（図４の左側パネル）及び対応する絶対リスクスコア（図４の右側パネル）に及ぼすＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃの各ＨＣＤＲ３位置での単一アミノ酸置換の影響を描く。図１０は、ＶＨ又はＶＬ単一点変異体バリアントを含む２４の実際に産生され特徴付けられた二重特異的抗体（以下に記載の通り）でＴ細胞エピトープ数に及ぼす好ましい単一アミノ酸置換の影響を描く。

【０２７２】

合計で、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃの９２の物理的ＶＨ又はＶＬ単一点バリアントをＰＣＲベース変異発生ストラテジーにより発生した。簡潔に述べると、有利な変異及び相同的オーバーラッピング配列を保有する好適なオリゴヌクレオチドを用いてＰＣＲにより線状ＤＮＡ断片を産生し、続いて、ＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある実施例３に記載の二重特異的２＋１Ｆａｂ$_2$－Ｆｖ－Ｆｃ抗体フォーマットをコードする対応する哺乳動物二重特異的抗体発現ベクター中にクローニングした。ＶＨバリアントは、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃの親未修飾ＶＬ（配列番号２０）と組み合わせ、一方、ＶＬバリアントは、ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃの親未修飾ＶＨ（配列番号１４）と組み合わせた。二重特異的抗体は、実施例３にすでに記載のように産生された。

【０２７３】

全体的に、二重特異的抗体のおおよそ５０％は、＞８５％の許容可能なモノマー含有率で産生可能であった（表３０参照）。図１０は、以上で参照された２４の好ましい単一点バリアントを含む二重特異的抗体調製物の収量及び最終モノマー含有率をまとめたものである。

【０２７４】

【表４４】

表 30: 分析用サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したときにモノマー含有率>85%である CD3-MABopt-cc の CDR 単一点バリアントを含む産生二重特異的抗体の概要。

CDR 領域の単一点バリアント	産生二重特異的抗体の合計数を基準にしたモノマー含有率>85%の二重特異的抗体調製物の数
HCDR1	5/6
HCDR2	13/22
HCDR3	18/42
LCDR3	10/23

【０２７５】

驚くべきことに、特定ＣＤＲ位置でのアミノ酸交換（保存的なときでさえも）は、二重特異的抗体の産生性に強いマイナスの影響を及ぼすこと、すなわち、アグリゲーション傾向の増加をもたらすことが見いだされた。表３１は、対応する産生二重特異的抗体のモノマー含有率の顕著な減少をもたらしたＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＣＤＲ内の置換アミノ酸位置を描く。

【０２７６】
【表４５】

表 31: 二重特異的抗体調製物のアグリゲート形成の顕著な増加をもたらした CD3-MAB$_{opt-cc}$ の CDR 内置換アミノ酸位置。

CDR 領域内の変異 aa 位置	変異 CDR 領域	産生バリアント数/位置	全体的 SEC モノマー含有率範囲 [%]<77 %
W47	HCDR2	1	64
V48		2(+1)	7-8
Y94	HCDR3	2	8-10
Y95		1	n.a.
R98		3(+1)	61-76
L110		6(+2)	12-35
V112		5(+1)	17-70
Y87	LCDR3	3	20-24
Y88		1	25
G91		1	64
G98		1	65

【０２７７】
実施例４．３：ＥＬＩＳＡ結合性
＞８５％のモノマー含有率を有する実施例４．２に係る４６の産生二重特異的単一点バリアント抗体は、Maxisorpプレート（Nunc, #460518）上に被覆されたヒトＣＤ３イプシロン抗原（ｈＣＤ３ｅ（２２－１１８）＿Ｆ－ｃｈＬｙｓ＿ａｖｉ（配列番号４３）へのＥＬＩＳＡ結合性に関して特徴付けられた。最終抗体濃度は、それぞれ、５０、１０、２、０．４ｎＭに設定された。ヒトＦ（ａｂ’）２フラグメントに対するアルカリ性ホスファターゼコンジュゲート検出抗体（Jackson Immuno Research, #109-055-097）を用いて結合抗体を検出した。Prismソフトウェア（GrapPad Software Inc.）中の４パラメーター非線形回帰分析を用いてＥＣ$_{50}$値を計算した。
【０２７８】
図１０は、２４の二重特異的単一点バリアント抗体でヒトＣＤ３イプシロン抗原に対するＥＬＩＳＡ　ＥＣ$_{50}$推定値をまとめたものであり、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$と比較したとき、ＣＤ３への類似のさらにはより良好な結合性が明らかにする（ＥＣ$_{50}$推定値＋すべての検査抗体濃度にわたるシグナル対バックグラウンド比の和が提供される）。
【０２７９】
実施例４．４：抗体キャプチャーセットアップを介するＫ$_{D}$決定
キネティック速度定数を決定することによる親和性決定は、実施例３．４にすでに記載のように二重特異的単一点バリアント抗体で実施された。アッセイ緩衝液（１％ＢＰＢＳ

＋０．０５％Tween 20）で希釈されたさまざまな二重特異的抗体サンプルをおおよそ２ｎｍのローディングレベルでＩｇＧ特異的ＢＬＩセンサー上にキャプチャーした。解析のために、ヒトＣＤ３イプシロン抗原ｈＣＤ３ｅ（２２－１１８）＿Ｆ－ｃｈＬｙｓ＿ａｖｉ（配列番号４３）を２００ｎＭ～３．１ｎＭの範囲内の濃度になるようにアッセイ緩衝液で希釈した。基準にするために、すなわち、キャプチャー抗体の解離を補正するために、アッセイ緩衝液のブランクサンプルを含めた。会合相を３００ｓ記録し、１８０ｓの解離相がそれに続いた。Octet Data Analysis Software 10.0（ForteBio, Sartorius AG）を用いてセンサーグラムの当てはめを行ってk_{on}及びk_{off}速度定数を決定し（１：１結合性モデルを用いて）、これを用いてK_Dを計算した。

【０２８０】

図１０は、ヒトＣＤ３イプシロン抗原に対する２４の好ましい二重特異的単一点バリアント抗体のK_D値をまとめたものである。これらのバリアントは、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のものと同等の１桁ナノモル範囲内の１価親和性であることが明らかになった。

【０２８１】

実施例４．５：ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の脱免疫単一点バリアントの概要

図１０は、産生性及びＥＬＩＳＡ結合性に基づいて選択された２４の好ましい二重特異的単一点バリアント抗体（５つのＬＣＤＲ３バリアント及び１９のＨＣＤＲバリアント）の生物物理学的及び機能的特性をまとめたものである。すべてバリアントで、本明細書に記載の二重特異的抗体フォーマットで検査したとき、Ｔ細胞エピトープ数、Ｈライン数、絶対スコア、及びＨスコアの低減により決定されるように免疫原性リスクは低減されるが、親ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の生物物理学的及び機能的特性は保有されることが明らかになった。

【０２８２】

１９の単一点バリアント（表３２にリストされる）のうち１４は、以下に記載のコンビナトリアルＴ細胞エピトープEpibase（商標）解析に選択された（実施例４．６参照）。というのは、１９の単一点バリアントのうち５つのみで、ホットスポット数の低減が決定可能であるにすぎなかったからである。表３２は、親抗体のパラメーターと比較される免疫原性リスクパラメーターに及ぼす選択された１４の単一点バリアントの各々の影響をまとめたものである。注目すべきこととして、ＨＣＤＲ２位置Ｖ６１及びＨＣＤＲ１位置Ｙ３３の置換のみが、ホットスポット数の低減をもたらした。

【０２８３】

ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＬでは、いずれかの他のＶＨバリアントと組み合わせて使用されるべき唯一の好ましいＶＬバリアントとして、ＬＣＤＲ３バリアントＳ９５Ｅが選択された。この単一点ＬＣＤＲ３バリアントは、ＬＣＤＲ３で４つのＨラインの低減をもたらすとともに、実施例４．２の二重特異的抗体フォーマットで検査したときに、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の親抗体ＶＨに類似した機能的及び生物物理学的特性であることが明らかにされた。

【０２８４】

【表４６】

表32: 好ましいHCDR単一点バリアントのCD3-MAB$_{opt-cc}$のVHの要約Epibase™ T細胞エピトープスクリーニング

HCDR バリアント	変異領域	EpiBase™ スクリーン							
		絶対スコア	Δ 絶対スコア	ホットスポット数	Δ ホットスポット数	絶対Hスコア	Δ 絶対Hスコア	絶対Hライン数	Δ 絶対Hライン数
wt (CD3-MAB$_{opt-cc}$)	n.a	653	n.a	6	n.a.	580	n.a.	25	n.a.
F104A	HCDR3	610	-43	6	0	556	-24	23	-2
A105G		595	-58	6	0	556	-24	23	-2
H106G		626	-27	6	0	556	-24	23	-2
H106K		611	-42	6	0	556	-24	23	-2
H106T		626	-27	6	0	556	-24	23	-2
A102D		548	-104	6	0	494	-86	22	-3
A102E		578	-75	6	0	524	-56	22	-3
Y56S	HCDR2	643	-9	6	0	571	-9	20	-5
Y56T		599	-54	6	0	526	-54	20	-5
V61A		618	-35	5	-1	479	-101	20	-5
V61D		497	**-155**	4	**-2**	421	**-159**	17	**-8**
V61E		497	**-155**	4	**-2**	421	**-159**	17	**-8**
V61G		512	-140	4	**-2**	421	**-159**	17	**-8**
Y33W	HCDR1	607	-45	5	-1	490	-90	21	-4

【０２８５】

実施例４．６　コンビナトリアルアミノ酸置換バリアント（「組合せバリアント」）による脱免疫配列の発生

ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨ－ＣＤＲ領域の潜在的Ｔ細胞エピトープ数及び他の免疫原性リスクパラメーターをさらに低減するために、ｉｎ ｓｉｌｉｃｏ Epibase（商標）変異解析を実施した。その場合、表３２のすでに同定された１４の好ましいＨＣＤＲ単一点バリアントの各々は、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$の野生型残基を含めて実質的に各位置で互いに組み合わされた。それゆえ、潜在的Ｔ細胞エピトープに関して、２５１の新しいコンビナトリアルＶＨ－ＣＤＲ配列バリアント（ダブル、トリプル、及びクアドラプル変異を含めて）をスクリーニングした。

【０２８６】

コンビナトリアル変異バリアントでのEpibase（商標）スクリーニング解析の結果

図１１は、さまざまな免疫原性リスクパラメーターに及ぼす３つのホットスポットの最大低減をもたらしたＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＶＨ＿ＨＣＤＲ１～３領域中の５４のコンビナトリアルアミノ酸置換の影響の模範的結果を描く。表の第１行は、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$（「ｗｔ（親）と記される）のＶＨのリスクパラメーター：絶対スコア、ホットスポット数、絶対Ｈスコア、及び絶対Ｈライン数を表す。驚くべきことに、ホットスポット数、絶対Ｈライン数、及び絶対Ｈスコアの低減にきわめて重要な組合せバリアントは、Ｙ３３Ｗ（ＨＣＤＲ１）＋ｗｔＹ５６（ＨＣＤＲ２）＋Ｖ６１Ｄ／Ｅ／又はＧ（ＨＣＤＲ２）の変異体組合せに割当て可能であった。

【０２８７】

３つのホットスポットの低減をもたらした５４のＶＨ組合せバリアントすべて、及び２つのホットスポット数の低減（図示せず）をもたらすとともにＨライン数及び絶対スコアの最大級の低減が明らかにされた４０の追加のバリアント組合せを、実施例３に記載の二重特異的抗体フォーマットでのクローニング及び産生のために選択した。このため、５４の組合せＶＨバリアントの各々は、ＬＣＤＲ３バリアントＳ９５Ｅ（配列番号２１）を含むＶＬバリアントと一緒に発現された。２５／９４の産生二重特異的組合せバリアント抗

体は、＞８５％のモノマー含有率であることが明らかになった。図１２は、分析用サイズ排除クロマトグラフィーにより決定したときの３３の好ましい二重特異的組合せバリアント抗体調製物のモノマー含有率をまとめたものである。

【０２８８】

実施例４．７：組換えヒトＣＤ３イプシロンへの二重特異的抗体のＥＬＩＳＡ結合性。

実施例４．６の９４の産生二重特異的組合せバリアント抗体はすべて、実施例４．３にすでに記載のように組換えＣＤ３イプシロン抗原へのＥＬＩＳＡ結合性に関して検査された。まとめると、４６の二重特異的組合せバリアント抗体は、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$と比較したとき、＜３０ｎＭのＥＣ$_{50}$値を有してＣＤ３イプシロンへのより良好な結合性が明らかにされた。図１２は、ヒトＣＤ３イプシロン抗原に対して決定された３３の好ましい二重特異的組合せバリアントのＥＬＩＳＡ　ＥＣ$_{50}$値をまとめたものである。

【０２８９】

実施例４．８：抗体キャプチャーセットアップを介するＫ$_{D}$決定

ＣＤ３へのより良好なＥＬＩＳＡ結合性（実施例４．７）が明らかになった実施例４．６の４６の二重特異的組合せバリアントでのキネティック速度定数の決定による親和性決定は、実施例４．４にすでに記載のように行われた。全体的に、二重特異的組合せバリアント抗体は、中１桁～低２桁のナノモル範囲内のＣＤ３イプシロンへの１価親和性であることが明らかになった。親抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$を含む二重特異的抗体（Ｋ$_{D}$＝５ｎＭ）よりも優れたＣＤ３への改善された結合性は達成可能でなかった。図１２は、ヒトＣＤ３イプシロン抗原に対する３３の好ましい二重特異的単一点バリアント抗体のＫＤ値をまとめたものである。これらのバリアントは、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$を含む対応する二重特異的抗体で決定された親和性に匹敵する５～１１ｎＭの範囲内のＫ$_{D}$値であることが明らかにされた。

【０２９０】

実施例４．９　ジャーカットＮＦＡＴレポーター遺伝子細胞アッセイ

ＨＥＲ２及びＣＤ３に対して特異性のある実施例４．８の４６の二重特異的組合せバリアント抗体の機能的活性を評価するために、ジャーカットＮＦＡＴレポーター遺伝子細胞アッセイを行った。ＮＦＡＴレポーター遺伝子構築物で安定にトランスフェクトされたジャーカット細胞（ATCC #TIB-152）をサロゲートエフェクター細胞として使用した。腫瘍標的細胞として、ＨＥＲ２陽性ヒトＳＫＯＶ－３（ATCC（登録商標）HTB-77）腫瘍細胞系統を使用した。アッセイは、以上の実施例２．３に記載のように行われた。二重特異的抗体は、５０ｎＭ～０．５ｎＭの最終アッセイ濃度範囲に段階希釈された（４ステップ希釈）。

【０２９１】

ほとんどの二重特異的組合せバリアント抗体は、ＳＫＯＶ－３細胞の存在下でルシフェラーゼ活性を誘導した。しかしながら、検査された二重特異的抗体はどれも、ＥＣ$_{50}$値に関してそれほど優れた活性ではなく、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$を含む二重特異的抗体を超える最大ルシフェラーゼ活動レベルではないことが明らかになった。

【０２９２】

図１２は、３３の好ましい二重特異的組合せバリアント抗体でのＲＧＡ結果をまとめたものである。結果は、２つの検査抗体濃度でシグナル／バックグラウンド値として提供され、それゆえ、抗体はそれに応じてソートされた。表の上の行は、５０ｎＭ及び０．５ｎＭの抗体濃度でのこの抗体の最高シグナル強度を表す親二重特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＲＧＡ結果を提供する。全体的に、ＲＧＡの活性及びＣＤ３への結合親和性間に正の相関を推測可能である。

【０２９３】

実施例４．１０　探索的スケールでの産生

より大スケール産生のために、実施例４．９の３３の好ましい二重特異的組合せバリアントを選択した。選択基準には、ヒトＣＤ３ｅに対するＫ$_{D}$値（実施例４．８）、レポー

ター遺伝子アッセイでの機能的活性（実施例４．９）、及びより小スケール産生後のモノマー含有率（実施例４．６）が含まれていた。

【０２９４】

二重特異的抗体の重鎖及び軽鎖の両方をコードする哺乳動物発現ベクターＤＮＡで真核ＨＥＫ２９３－６Ｅ細胞をトランスフェクトした。トランスフェクション後の６日目に細胞培養上清を採取し、標準的プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（MabSelect SURE ┆ GE Healthcare）に付した。１×ダルベッコＰＢＳ（ｐＨ７．２ ┆ Invitrogen）への緩衝液交換を実施し、サンプルを無菌濾過した（０．２μｍ細孔サイズ）。二重特異的抗体のタンパク質濃度及び純度は、すでに記載のように決定された。

【０２９５】

図１２は、３３の産生二重特異的組合せバリアント抗体調製物でのモノマー含有率のパーセンテージをまとめたものである。これらの調製物のうち１５は、９０％超のモノマー抗体含有率であることが明らかになった。

【０２９６】

実施例４．１１：最も適切な組合せバリアントＣＤ３特異的抗体の選択

ＣＤ３特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢ$_{opt-cc}$のＬＣＤＲ３領域及びＨＣＤＲ１～３領域のパラレル脱免疫化は、５つの好ましい脱免疫ＶＨ／ＶＬバリアントの同定をもたらした。これらのバリアントは、実施例４の上述したアッセイの各々でベスト１０の性能の二重特異的抗体として現れたので、Ｔ細胞媒介細胞傷害性アッセイ（実施例４．１２）及び標的細胞の不在下でＴ細胞活性化を誘導するそれらの能力（実施例４．１３）でさらに特徴付けした。

【０２９７】

これらの上述した５つの脱免疫ＣＤ３特異的抗体は、本明細書では以下：ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１、ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２、ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３、ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４、及びＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５で表される。５つの脱免疫抗体の各々のＶＨ、ＶＬ、及びＣＤＲ配列は、表７に提供される。５つの脱免疫抗体を含む対応する二重特異的抗体は、本明細書では、それぞれ、以下：ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４及びＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５として表される。実施例４に従って作られた二重特異的抗体を形成する個別ポリペプチドの概要は、表１４に示される。表２９は、これらの５つの脱免疫ＣＤ３特異的抗体及び対応する二重特異的抗体の生物物理学的及び機能的特性、さらには免疫原性リスクパラメーターのまとめを提供する。

【０２９８】

実施例４．１２：５つの好ましい脱免疫ＣＤ３特異的抗体を含む二重特異的抗体により媒介されるリダイレクトＴ細胞性細胞傷害性。

二重特異的組合せバリアント抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４、及びＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５は、ＣＤ３及びＨＥＲ２への結合の際に腫瘍細胞のＴ細胞媒介死滅を誘導するそれらの能力に関して検査された。本方法は、実施例３．６に記載のように行われた。標的細胞として、１：１０の標的／エフェクター細胞比をもたらように５，０００のＨＥＲ２発現性ＳＫＯＶ－３細胞が使用された。

【０２９９】

表３３は、５つすべての検査された二重特異的組合せバリアント抗体によるＴ細胞媒介死滅のＩＣ$_{50}$値をまとめたものである。ＨＥＲ２高発現性ＳＫＯＶ－３細胞の濃度依存性死滅は、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃを含む二重特異的抗体のものと同等であることが５つすべての二重特異的抗体で確認可能であった。図１３は、１ドナーから得られたＴ細胞及び最も好ましい組合せバリアント抗体ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３（Ｂｉｓ

ｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３）での模範的ＳＫＯＶ－３死滅結果を、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃ（ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔｃｃ）を基準にして描く。

【０３００】

実施例４．１３：標的癌細胞の不在下での二重特異的抗体のＴ細胞活性化（高密度ＰＢＭＣアッセイ）

脱免疫ＣＤ３特異的抗体の安全性を評価するために、５つの対応する二重特異的組合せバリアント抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１（ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１）、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２（ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２）、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３（ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３）、ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４（ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４）、及びＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５（ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５）を、標的癌細胞の不在下でヒトＴ細胞を活性化するそれらの能力に関して検査した。アッセイは、先の実施例３．７の下でのものと同様に行われた。ヒト血液サンプルは、異なる２ドナーから取り出された。Ｔ細胞の活性化は、ＣＤ４陽性又はＣＤ８陽性Ｔ細胞上でのＣＤ６９発現のアップレギュレーションの評価によりアセスされた。

【０３０１】

表３３は、５つの二重特異的組合せバリアント抗体のＴ細胞活性化能力を定性的にまとめたものである。Ｔ細胞の活性化は、標的細胞を発現するＨＥＲ２の不在下では、最高検査抗体濃度でさえも、二重特異的組合せバリアント抗体のいずれでも観測可能ではなかった。Ｔ細胞のドナー依存性活性化は、より高い試験濃度で親抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃを含む二重特異的抗体ＢｉｓｓＩｇ＿２１＃ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔｃｃで観測可能であった。陽性コントロールＯＫＴ－３は、２０ｎＭのＩｇＧ濃度で７６～７８％の範囲内でＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞の両方のＣＤ６９発現を強く誘導した。１ドナーでのＴ細胞活性化実験の模範的結果は、図１４に示される。図１４Ａは、ＣＤ４＋／ＣＤ８－Ｔ細胞の活性化の結果を描き、図１４Ｂは、ＣＤ４－／ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化の結果を示す。これらの結果から、本開示の脱免疫ヒトＣＤ３特異的抗体の顕著な安全性プロファイルが明確に実証される。

【０３０２】

実施例４．１４：脱免疫組合せバリアントの概要：

本発明は、ＣＤ３に対して特異性のある完全ヒト抗体でＣＤＲ脱免疫化アプローチを初めて提供する。５つの好ましい脱免疫バリアントＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿１、ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿２、ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿３、ＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿４、及びＣＤ３－ＭＡＢｄｅｉｍｍ＿５、並びに実施例２で同定されたそれらの親ヒトＣＤ３特異的抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃの機能的及び生物物理学的特性の概観は、表３３に提供される。ＣＤ３－ＭＡＢ$_{deimmun_3}$は、本発明の最も好ましい脱免疫ＣＤ３特異的抗体として同定された。親抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＣＤＲ工学操作は、この抗体のＨＣＤＲ２領域で２つのホットスポット及びＬＣＤＲ３領域で１つのホットスポットの合計低減をもたらした。そのほか、Ｔ細胞エピトープ数、Ｈライン数、絶対リスクスコア、及び絶対Ｈスコアの有意な減少を達成可能であった。それゆえ、ＣＤ３－ＭＡＢ$_{deimmun_3}$は、一旦投与されたヒトにおいて免疫原性反応の誘導リスクが有意に低減されるというＴ細胞エンゲージング療法のきわめて重要な態様を有する。ＣＤ３－ＭＡＢ$_{deimmun_3}$のこの顕著な安全性プロファイルは、標的細胞の不在下ではＴ細胞活性化を誘導不能であることにより、さらには強化された。注目に値することとして、ＣＤＲ工学操作は、親抗体ＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃと比較したとき、特異性、機能的活性、及び産生性の損失をもたらさなかった。このことは、ＣＤＲ工学操作が抗原認識に最も関連の深いＣＤＲであるＣＤ３－ＭＡＢｏｐｔ－ｃｃのＨＣＤＲ３領域に影響を及ぼすことでさらにより顕著となる。

【０３０３】

【表４７】

表33: 本発明に係る親抗体CD3-MABopt-ccに由来する5つの好ましいの脱免疫組合せバリアント抗体の機能的及び生物物理学的特性の概観。

二重特異的抗体		抗CD3抗体			変異CDR3位置				
組合せバリアント	配列番号	脱免疫抗CD3抗体ID	配列番号: VH	配列番号: VL	HCDR1	HCDR2	HCDR3a	HCDR3b	LCDR3
Bisslg_21#CD3-MABopt-cc	66, 67, 51	CD3-MABopt_cc	14	20	wt	wt	wt	wt	wt
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_1	70, 71, 51	CD3-MAB$_{deimm_1}$	18	21	wt	V61E	A102E	wt	S95E
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_2	70, 72, 51	CD3-MAB$_{deimm_2}$	19	21	wt	V61G	A102D	wt	S95E
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_3	70, 73, 51	CD3-MAB$_{deimm_3}$	15	21	wt	V61G	A102D	H106T	S95E
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_4	70, 74, 51	CD3-MAB$_{deimm_4}$	16	21	wt	V61G	A102E	wt	S95E
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_5	70, 75, 51	CD3-MAB$_{deimm_5}$	17	21	wt	V61G	A102D	H106K	S95E

二重特異的抗体	抗CD3抗体	Epibase™リスク解析 VH								Epibase™リスク解析 VL							
組合せバリアント	脱免疫抗CD3抗体ID	絶対スコア	ΔスコアΔ	絶対ホットスポット数	Δホットスポット数	絶対Hスコア	ΔHスコア	絶対Hライン数	ΔHライン数	絶対スコア	ΔスコアΔ	絶対ホットスポット数	Δスポット数	絶対Hスコア	ΔHスコア	絶対Hライン数	ΔHライン数
Bisslg_21#CD3-MABopt-cc	CD3-MABopt_cc	653	-	6	-	580	-	25	-	189	-	1	-	189	-	7	-
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_1	CD3-MAB$_{deimm_1}$	422	-230	4	-2	365	-215	14	-11								
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_2	CD3-MAB$_{deimm_2}$	408	-245	4	-2	335	-245	14	-11								
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_3	CD3-MAB$_{deimm_3}$	393	-260	4	-2	335	-245	14	-11	62	127	0	-1	62	127	2	-4
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_4	CD3-MAB$_{deimm_4}$	437	-215	4	-2	365	-215	14	-11								
Bisslg_21#CD3-MABdeimm_5	CD3-MAB$_{deimm_5}$	393	-260	4	-2	335	-245	14	-11								

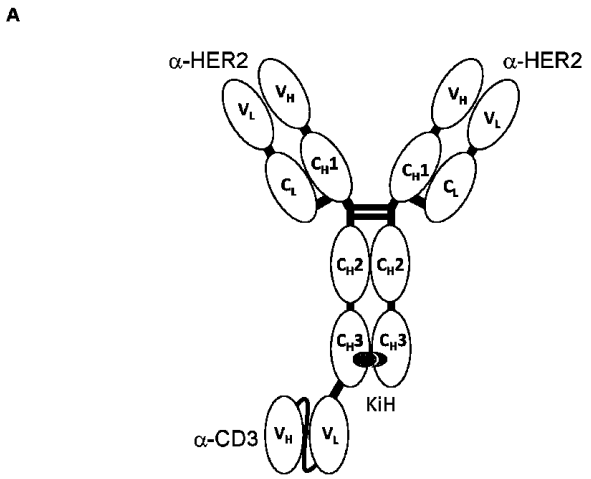
【０３０４】

【表４８】

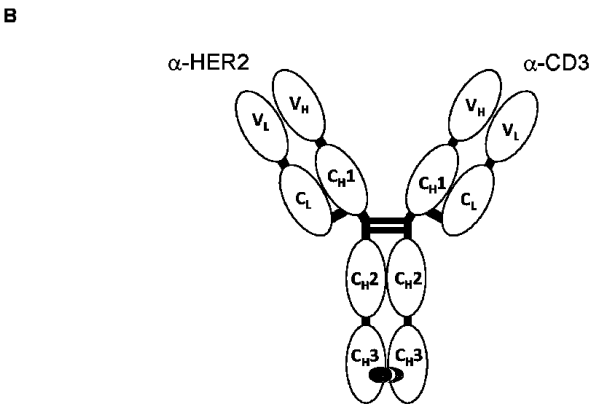
二重特異的抗体	抗CD3抗体	産生		結合性		RGA SKOV-3		T細胞性 SKOV-3 死滅	T細胞 活性化	
組合せバリアント	脱免疫 抗CD3抗体ID	SECモノマー 含有率[%]	ボルメトリック収量 [mg/L]	hCD3に対する ELISA EC50 [nM]	hCD3eに対するKD [nM]	0.5nMでの シグナルBG	50nMでの シグナルBG	IC50 [pM] (n=2)	CD4+ T細胞/CD64 アップレギュレーション	CD8+ T細胞/CD64 アップレギュレーション
BissIg_21#CD3-MABopt-cc	CD3-MABopt_cc	n.a	n.a.	30,1	4,9	10348	45145	9,8	あり	あり
BissIg_21#CD3-MABdeimm_1	CD3-MAB$_{deimm_1}$	91,2	78,9	10,8	6,3	5025	35088	17,9	なし	なし
BissIg_21#CD3-MABdeimm_2	CD3-MAB$_{deimm_2}$	87,0	90,3	10,2	6,0	7993	32409	10,5	なし	なし
BissIg_21#CD3-MABdeimm_3	CD3-MAB$_{deimm_3}$	91,9	86,0	10,8	5,0	5680	36813	13,1	なし	なし
BissIg_21#CD3-MABdeimm_4	CD3-MAB$_{deimm_4}$	91,8	73,6	8,3	3,9	4750	39388	10,9	なし	なし
BissIg_21#CD3-MABdeimm_5	CD3-MAB$_{deimm_5}$	91,8	74,3	10,5	6,0	7592	37235	19,0	なし	なし

【図面】

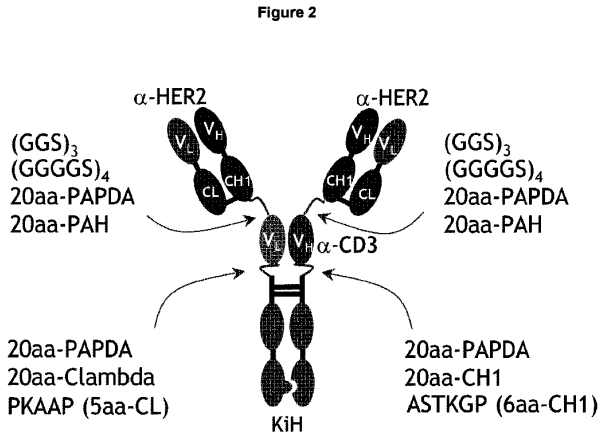
【図１Ａ】



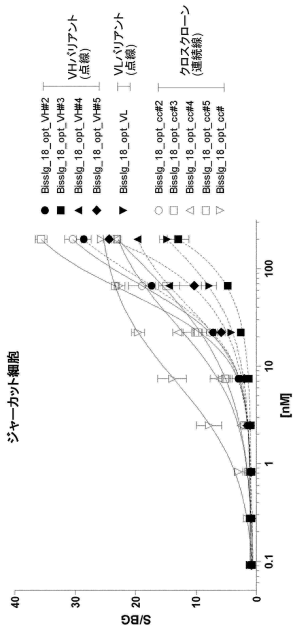
【図１Ｂ】



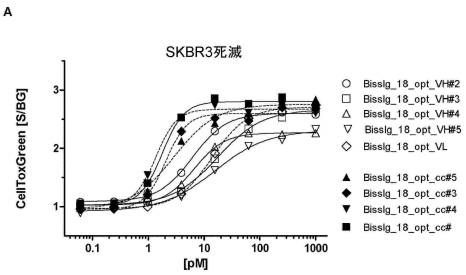
【図２】


Figure 2
α-HER2
α-HER2
(GGS)3
(GGGGS)4
20aa-PAPDA
20aa-PAH
(GGS)3
(GGGGS)4
20aa-PAPDA
20aa-PAH
α-CD3
20aa-PAPDA
20aa-Clambda
PKAAP (5aa-CL)
20aa-PAPDA
20aa-CH1
ASTKGP (6aa-CH1)
KiH

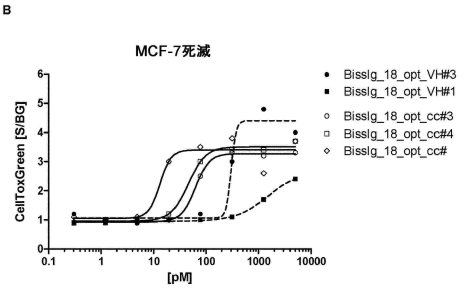
【図３】


VH/VLバリアント (点線)
VLバリアント (点線)
クロスクローン (連続線)
ジャーカット細胞
S/BG
[nM]

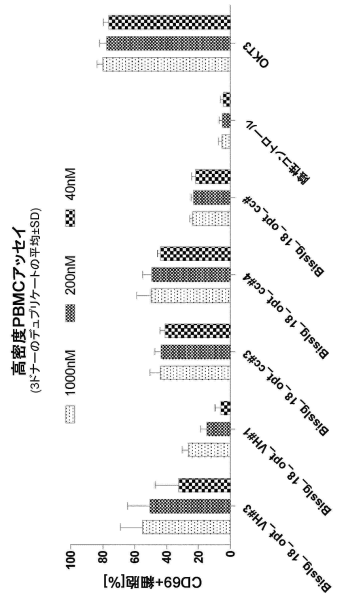
【図４Ａ】


A
SKBR3死滅
CellToxGreen [S/BG]
[pM]

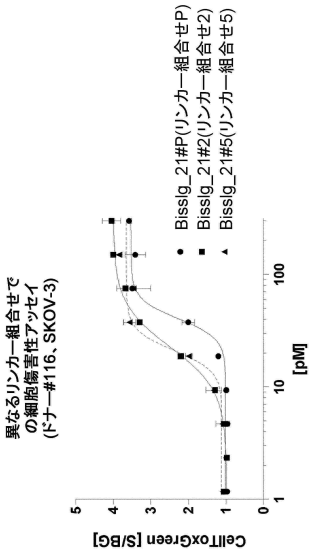
【図４Ｂ】


B
MCF-7死滅
CellToxGreen [S/BG]
[pM]

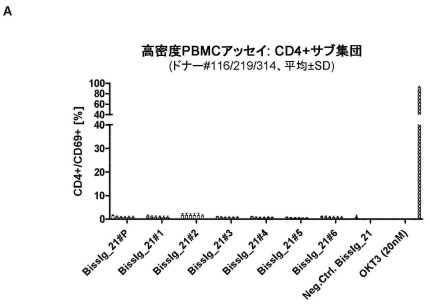
【図５】


高密度PBMCアッセイ
(3ドナーのデュプリケートの平均±SD)
1000nM
200nM
40nM
CD69+細胞[%]
0
20
40
60
80
100
OKT3
陰性コントロール
BisslG_18_opt_cc#
BisslG_18_opt_cc#4
BisslG_18_opt_cc#3
BisslG_18_opt_VH#1
BisslG_18_opt_VH#3

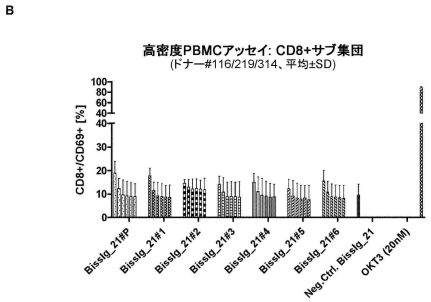
【図６】


異なるリンカー組合せでの細胞傷害性アッセイ
(ドナー#116、SKOV-3)
BisslG_21#P(リンカー組合せP)
BisslG_21#2(リンカー組合せ2)
BisslG_21#5(リンカー組合せ5)
CellToxGreen [S/BG]
0
1
2
3
4
5
1
10
100
[pM]

【図７Ａ】


A
高密度PBMCアッセイ: CD4+サブ集団
(ドナー#116/219/314、平均±SD)
CD4+/CD69+ [%]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
BisslG_21#P
BisslG_21#1
BisslG_21#2
BisslG_21#3
BisslG_21#4
BisslG_21#5
BisslG_21#6
Neg.Ctrl. BisslG_21
OKT3 (20nM)

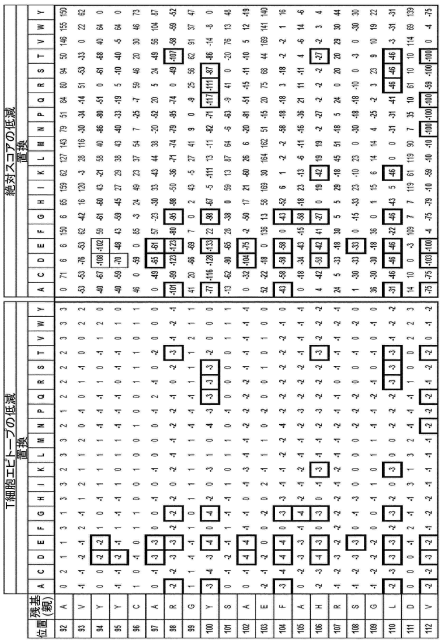
【図７Ｂ】


B
高密度PBMCアッセイ: CD8+サブ集団
(ドナー#116/219/314、平均±SD)
CD8+/CD69+ [%]
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
BisslG_21#P
BisslG_21#1
BisslG_21#2
BisslG_21#3
BisslG_21#4
BisslG_21#5
BisslG_21#6
Neg.Ctrl. BisslG_21
OKT3 (20nM)

【図８】

VH_HCDR3_Parental																		
位置	ペプチド	アロタイプ(名称、%)														リスクスコア	Hライン
		DRB1*01:01	DRB1*01:02	DRB1*03:01	DRB1*04:01	DRB1*04:04	DRB1*07:01	DRB1*08:01	DRB1*11:01	DRB1*11:04	DRB1*12:01/12:06/12:10	DRB1*13:01	DRB1*13:02	DRB1*14:01/14:54	DRB1*15:01	DRB1*16:01		
		15	4	24	16	6	23	5	12	6	3	11	8	5	25	5		
90	DTAVYYCARG																	
91	TAVYYCARGY																	
92	AVYYCARGYS														M		24.5	H
93	VYYCARGYSA			M		M				M	S			S			51.9	H
94	YYCARGYSAE	S	M				M										42.1	H
95	YCARGYSAEF							M									4.9	H
96	CARGYSAEFA																	H
97	ARGYSAEFAH														M		24.5	H
98	RGYSAEFAHR																	-
99	GYSAEFAHRS																	-
100	YSAEFAHRSG	M															15	-
101	SAEFAHRSGL																	-
102	AEFAHRSGLD										M						3.3	-
103	EFAHRSGLDV																	-
104	FAHRSGLDVW	M															15	-
105	AHRSGLDVWG																	-
106	HRSGLDVWGQ																	-
107	RSGLDVWGQG																	-
108	SGLDVWGQGT																	-
109	GLDVWGQGTL																	-
110	LDVWGQGTLV										M				M		27.8	H
111	DVWGQGTLVT																	H
112	VWGQGTLVTV		M		M	M								M	M	M	60.3	H

【図９】



【図１０】

単一点変異体	変異ホットスポット領域	低減Hライン数	SECモノマー含有率[%]	収量/精製培養物[mg/L]	huCD3eに対するELISA推定EC_{50}[nM]	すべての検査濃度のS/BGのELISA和[S/BG]	キネティクスhuCD3e K_D[nM]	組合せバリアントEpibase解析
wt(親)	wt	n.a.	87.50	44.7	10.9	283	5.4	あり
VL_R94A	LCDR3	-2	87.70	53.7	14.9	197	12	なし
VL_R94Q	LCDR3	-3	88.60	41.8	9.4	216	9.5	なし
VL_S95D	LCDR3	-4	89.10	47.7	9.6	190	7.8	なし
VL_S95E	LCDR3	-4	89.20	44.7	8.1	227	6.4	なし
VL_L96Q	LCDR3	-3	86.70	38.8	13.7	144	8	なし
VH_Y33W	HCDR1	-1	90,00	47.7	18.7	171	6.6	あり
VH_Y56A	HCDR2_2	-4	90.60	56.7	13.5	277	7	なし
VH_Y56E	HCDR2_2	-5	90.80	50.7	9.9	215	9.4	なし
VH_Y56S	HCDR2_2	-4	90.70	53.7	6.0	318	5.2	あり
VH_Y56T	HCDR2_2	-4	90.30	53.7	6.0	306	5.3	あり
VH_S57E	HCDR2_2	-2	86.30	23.9	10.0	210	8.8	なし
VH_S57T	HCDR2_2	-2	89,00	50.7	5.6	279	5.1	なし
VH_S58T	HCDR2_2	-1	88.90	8.9	2.6	329	5.6	なし
VH_V61A	HCDR2_2	-3	89.90	50.7	4.5	439	3.3	あり
VH_V61D	HCDR2_2	-6	90.10	38.8	6.4	338	4.4	あり
VH_V61E	HCDR2_2	-6	89.60	44.7	6.7	291	4.4	あり
VH_V61G	HCDR2_2	-5	89.10	47.7	6.6	341	4	あり
VH_A102D	HCDR3_1	-4	88.80	44.7	7.0	285	7.4	あり
VH_A102E	HCDR3_1	-4	87.80	38.8	7.0	310	5.9	あり
VH_F104A	HCDR3_2	-3	88.40	32.8	11.3	219	6.3	あり
VH_A105G	HCDR3_2	-4	89.90	44.7	18.4	109	13	あり
VH_H106G	HCDR3_2	-3	88.80	20.9	13.4	203	6.7	あり
VH_H106K	HCDR3_2	-3	85.90	38.8	7.2	236	5.2	あり
VH_H106T	HCDR3_2	-3	87.40	50.7	6.6	256	5.1	あり

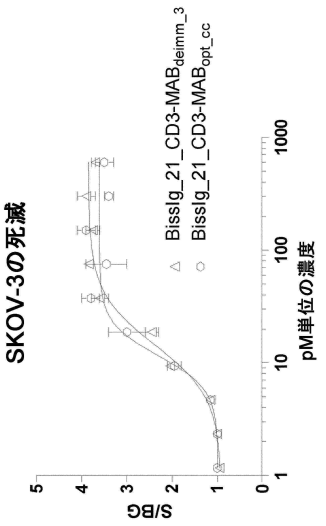
【図１１】

組合せバリアント	変異領域							EpiBase™スクリーン			
	HCDR1	HCDR2	HCDR3a	HCDR3b				Δ絶対スコア	Δホットスポット数	Δ絶対Hスコア	ΔHライン数
	33	56	61	102	104	105	106				
wt/(親)	Y33	Y56	V61	A102	104F	105A	106H	653	6	580	25
var_c198	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	wt	-200.8	-3	-248.6	-12
var_c199	Y33W	wt	V61D	wt	F104A	wt	wt	-243.6	-3	-273.1	-14
var_c200	Y33W	wt	V61D	wt	wt	A105G	wt	-258.6	-3	-273.1	-14
var_c201	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106G	-227.4	-3	-273.1	-14
var_c202	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106K	-242.4	-3	-273.1	-14
var_c203	Y33W	wt	V61D	wt	wt	wt	H106T	-227.4	-3	-273.1	-14
var_c204	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	wt	-305.2	-3	-334.7	-15
var_c205	Y33W	wt	V61D	A102D	F104A	wt	wt	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c206	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	A105G	wt	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c207	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106G	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c208	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106K	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c209	Y33W	wt	V61D	A102D	wt	wt	H106T	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c210	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	wt	-275.6	-3	-305.1	-15
var_c211	Y33W	wt	V61D	A102E	F104A	wt	wt	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c212	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	A105G	wt	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c213	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106G	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c214	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106K	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c215	Y33W	wt	V61D	A102E	wt	wt	H106T	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c216	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	wt	-200.8	-3	-248.6	-12
var_c217	Y33W	wt	V61E	wt	F104A	wt	wt	-243.6	-3	-273.1	-14
var_c218	Y33W	wt	V61E	wt	wt	A105G	wt	-258.6	-3	-273.1	-14
var_c219	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106G	-227.4	-3	-273.1	-14
var_c220	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106K	-242.4	-3	-273.1	-14
var_c221	Y33W	wt	V61E	wt	wt	wt	H106T	-227.4	-3	-273.1	-14
var_c222	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	wt	-305.2	-3	-334.7	-15
var_c223	Y33W	wt	V61E	A102D	F104A	wt	wt	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c224	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	A105G	wt	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c225	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106G	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c226	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106K	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c227	Y33W	wt	V61E	A102D	wt	wt	H106T	-320.2	-3	-334.7	-15
var_c228	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	wt	-275.6	-3	-305.1	-15
var_c229	Y33W	wt	V61E	A102E	F104A	wt	wt	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c230	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	A105G	wt	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c231	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106G	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c232	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106K	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c233	Y33W	wt	V61E	A102E	wt	wt	H106T	-290.6	-3	-305.1	-15
var_c234	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	wt	-185.8	-3	-248.6	-12
var_c235	Y33W	wt	V61G	wt	F104A	wt	wt	-228.6	-3	-273.1	-14
var_c236	Y33W	wt	V61G	wt	wt	A105G	wt	-243.6	-3	-273.1	-14
var_c237	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106G	-212.4	-3	-273.1	-14
var_c238	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106K	-227.4	-3	-273.1	-14
var_c239	Y33W	wt	V61G	wt	wt	wt	H106T	-212.4	-3	-273.1	-14
var_c240	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	wt	-290.2	-3	-334.7	-15
var_c241	Y33W	wt	V61G	A102D	F104A	wt	wt	-305.2	-3	-334.7	-15
var_c242	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	A105G	wt	-305.2	-3	-334.7	-15
var_c243	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106G	-305.2	-3	-334.7	-15
var_c244	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106K	-305.2	-3	-334.7	-15
var_c245	Y33W	wt	V61G	A102D	wt	wt	H106T	-305.2	-3	-334.7	-15
var_c246	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	wt	-260.6	-3	-305.1	-15
var_c247	Y33W	wt	V61G	A102E	F104A	wt	wt	-275.6	-3	-305.1	-15
var_c248	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	A105G	wt	-275.6	-3	-305.1	-15
var_c249	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106G	-275.6	-3	-305.1	-15
var_c250	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106K	-275.6	-3	-305.1	-15
var_c251	Y33W	wt	V61G	A102E	wt	wt	H106T	-275.6	-3	-305.1	-15

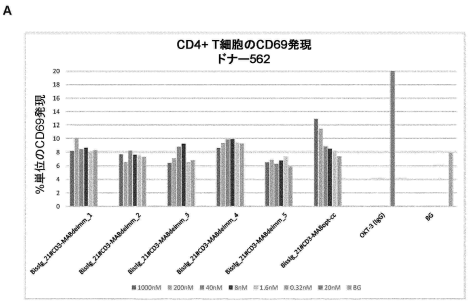
【図１２】

	変異ホットスポット領域				EpiBase™スクリーン				産生	結合性		機能的活性	
部分セバリアント	HCDR1	HCDR2	HCDR3a	HCDR3b	Δ絶対スコア	Δホットスポット数	Δ絶対Hスコア	Δ絶対Hライン数	SECモノマー含有率[%]	ELISA EC50 [nM] hCD3e	キネティクス KD[nM] hCD3e	RGA(SKOV-3)シグナル/BG	
												50nM	0.5nM
wt	wt	wt	wt	wt	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	30.1	4.9	45145	10348
var_c114	wt	V61G	A102D	wt	-245	-2	-245	-11	87	10.2	6.0	32409	7993
var_c118	wt	V61G	A102D	H106K	-260	-2	-245	-11	91.8	10.5	6.0	37235	7592
var_c98	wt	V61E	A102D	wt	-260	-2	-245	-11	89.6	10.1	6.8	26417	6836
var_c78	wt	V61D	A102D	wt	-260	-2	-245	-11	87.5	13.4	6.3	26758	6486
var_c119	wt	V61G	A102D	H106T	-260	-2	-245	-11	91.9	10.8	5.0	36813	5680
var_c240	Y33W	V61G	A102D	wt	-290	-3	-335	-15	90.2	15.4	7.8	35160	5028
var_c102	wt	V61E	A102E	wt	-230	-2	-215	-11	91.2	10.8	6.3	35088	5025
var_c89	wt	V61D	A102E	H106T	-245	-2	-215	-11	89.2	16.3	11.0	26196	4815
var_c124	wt	V61G	A102E	H106K	-230	-2	-215	-11	88.4	18.2	8.0	30771	4760
var_c120	wt	V61G	A102E	wt	-215	-2	-215	-11	91.8	8.3	3.9	39388	4750
var_c84	wt	V61D	A102E	wt	-230	-2	-215	-11	89.3	10.6	5.8	30354	4684
var_c125	wt	V61G	A102E	H106T	-230	-2	-215	-11	88	10.8	9.6	30721	4049
var_c117	wt	V61G	A102D	H106G	-280	-2	-245	-11	90.6	17.8	8.1	24615	3329
var_c246	Y33W	V61G	A102E	wt	-281	-3	-305	-15	n.a.	21.5	7.7	31833	3277
var_c107	wt	V61E	A102E	H106T	-245	-2	-215	-11	90.2	22.3	7.3	21083	2878
var_c115	wt	V61G	A102D	F104A	-260	-2	-245	-11	91.3	16.4	7.9	25488	2728
var_c97	wt	V61E	A102D	F104A	-275	-2	-245	-11	90.3	15.0	9.5	17487	2573
var_c106	wt	V61E	A102E	H106K	-245	-2	-215	-11	90.8	18.4	9.0	24108	2433
var_c88	wt	V61D	A102E	H106K	-245	-2	-215	-11	89.6	14.1	7.3	24540	2363
var_c241	Y33W	V61G	A102D	F104A	-305	-3	-335	-15	88.7	15.7	10.0	28739	2307
var_c101	wt	V61E	A102D	H106T	-275	-2	-245	-11	89.9	9.6	8.0	24690	2123
var_c237	Y33W	V61G	wt	H106G	-212	-3	-273	-14	90.9	27.5	7.9	20639	2026
var_c100	wt	V61E	A102D	H106K	-275	-2	-245	-11	90.3	15.6	10.0	20044	1963
var_c210	Y33W	V61D	A102E	wt	-276	-3	-305	-15	91.4	11.5	11.0	23892	1928
var_c190	Y33W	V61A	A102D	H106K	-200	-2	-277	-12	89.9	23.0	8.8	25368	1808
var_c82	wt	V61D	A102D	H106K	-275	-2	-245	-11	89.4	11.4	9.1	21790	1803
var_c205	Y33W	V61D	A102D	F104A	-320	-3	-335	-15	89.6	22.0	11.0	21524	1728
var_c228	Y33W	V61E	A102E	wt	-276	-3	-305	-15	91.7	28.9	10.0	27263	1706
var_c87	wt	V61D	A102E	H106G	-245	-2	-215	-11	89.7	12.9	10.0	20616	1583
var_c121	wt	V61G	A102E	F104A	-230	-2	-215	-11	88.3	11.9	11.0	25699	1528
var_c85	wt	V61D	A102E	F104A	-245	-2	-215	-11	89.4	16.5	11.0	19242	1293
var_c204	Y33W	V61D	A102D	wt	-305	-3	-335	-15	89.9	21.7	8.7	25496	1198
var_c208	Y33W	V61D	A102D	H106K	-320	-3	-335	-15	90.9	21.9	10.0	16920	448

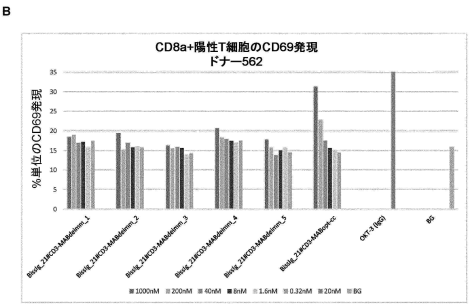
【図１３】



【図１４Ａ】



【図１４Ｂ】



【配列表】

20255137140000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/070061 A1 (SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; EUREKA THERAPEUTICS INC [US]) 14 May 2015 (2015-05-14) claims 6-12, 41 -----	1-18
X	WO 2019/034580 A1 (MORPHOSYS AG [DE]) 21 February 2019 (2019-02-21) claims 1-15 -----	1-18
	-/--	

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[x] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 June 2023	14/06/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Klee, Barbara

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057248

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JONES TIM D ET AL: "Deimmunization of Monoclonal Antibodies", ANTIBODY-DRUG CONJUGATES; IN: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-3745; VOL. 263; [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-3745], HUMANA PRESS, US, vol. 525, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 405-423, XP009137530, ISBN: 978-1-62703-541-5 the whole document	1-18
A	Lonza: "Applied Protein Services Company / City, Country First Last / Lonza Inc. / DD Month YYYY", Applied Protein Services, 28 October 2011 (2011-10-28), XP093050700, Retrieved from the Internet: URL:n [retrieved on 2023-05-31] the whole document	1-18
A	WO 2015/181098 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 3 December 2015 (2015-12-03) claims 1-15	1-18

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/057248

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☐ forming part of the international application as filed.

   b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2023/057248

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015070061 A1	14-05-2015	CN 106414500 A	15-02-2017
		EP 3066130 A1	14-09-2016
		ES 2742224 T3	13-02-2020
		JP 6553069 B2	31-07-2019
		JP 2017500057 A	05-01-2017
		WO 2015070061 A1	14-05-2015
WO 2019034580 A1	21-02-2019	EP 3668898 A1	24-06-2020
		US 2020377594 A1	03-12-2020
		WO 2019034580 A1	21-02-2019
WO 2015181098 A1	03-12-2015	AU 2015266077 A1	29-09-2016
		BR 112016022819 A2	16-01-2018
		CA 2942453 A1	03-12-2015
		CN 106459201 A	22-02-2017
		EP 3149041 A1	05-04-2017
		EP 3763739 A1	13-01-2021
		JP 6738285 B2	12-08-2020
		JP 2017516786 A	22-06-2017
		KR 20170003591 A	09-01-2017
		SG 11201609950Y A	29-12-2016
		US 2017233475 A1	17-08-2017
		US 2020299385 A1	24-09-2020
		US 2020325224 A1	15-10-2020
		WO 2015181098 A1	03-12-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ	*1/19 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	*1/21 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ａ６１Ｋ	*39/395(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ａ６１Ｐ	*37/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

ドイツ国，タールハム／ランダウ エー．ディー．イザール ９４４０５ ヌスバウムシュトラーセ ２６エー

(72)発明者 ブルトマン，アンドレアス

ドイツ国，プラネック ８２１５２ ジョゼフ フォン ヒルシュシュトラーセ ４６

(72)発明者 ルンツ，シュテファン

ドイツ国，ハイデルベルク ６９１２６ ゲオルク－メヒタースハイマーシュトラーセ ２

Ｆターム（参考） 4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA14 BB11 DD62 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74