

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-520600

(P2016-520600A)

(43) 公表日 平成28年7月14日(2016.7.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B065
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C085
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4H045
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-515677 (P2016-515677)
 (86) (22) 出願日 平成26年5月28日 (2014.5.28)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年11月27日 (2015.11.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/001460
 (87) 国際公開番号 W02014/191113
 (87) 国際公開日 平成26年12月4日 (2014.12.4)
 (31) 優先権主張番号 13002769.1
 (32) 優先日 平成25年5月28日 (2013.5.28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 13005113.9
 (32) 優先日 平成25年10月25日 (2013.10.25)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 PCT/EP2014/001282
 (32) 優先日 平成26年5月12日 (2014.5.12)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 515310984
 ヌマブ アクチェンゲゼルシャフト
 スイス国, ツェーハー 8820 ベーデ
 ンスビル, アインジードラーシュトラッ
 ー 34
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

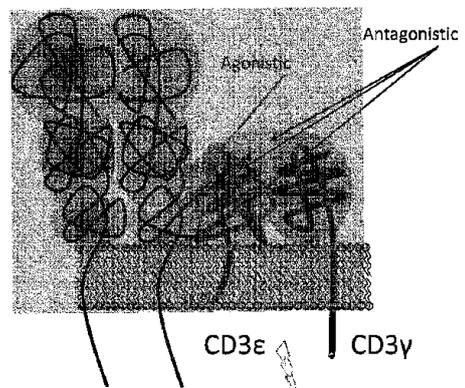
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規抗体

(57) 【要約】

本発明は、高い効能と高い親和性とを兼ね備える新規抗体、特に新規エピトープに対する新規抗体に関する。

Figure 5:



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトCD3のエピトープに特異的である抗原結合領域を含む単離抗体又はその機能的フラグメントであって、当該エピトープが、結合のために重要である残基としてアミノ酸残基N4を含む、前記単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 2】

前記エピトープが、さらに、結合に関与する残基としてアミノ酸残基E6を含む、請求項1に記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 3】

カニクイザルCD3、特にカニクイザルCD3と交差反応性であり、特にヒトCD3の親和性とは、100倍未満、特に30倍未満、さらにより特定には15倍未満、及び最も特定には5倍未満異なる、カニクイザルCD3に対する親和性を有する、請求項1又は2に記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

10

【請求項 4】

ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗原-結合領域を含む、単離抗体又はその機能的フラグメントであって、前記抗体又はその機能的フラグメントが、 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための解離定数でヒトCD3に結合する、単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 5】

ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗原-結合領域を含む、単離抗体又はその機能的フラグメントであって、架橋されてIgG形式で試験される場合に、当該抗体又はその機能的フラグメントが、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での24時間の刺激後において、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍強いT-細胞活性化を誘発する、前記単離抗体又はその機能的フラグメント。

20

【請求項 6】

ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗原-結合領域を含む単離抗体又はその機能的フラグメントであって、架橋されてIgG形式で試験される場合、前記抗体又はその機能的フラグメントが、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での72時間の刺激後において、CD69発現の少なくとも1.5倍の増加により示される、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT-細胞活性化をもたらす、前記単離抗体又はその機能的フラグメント。

30

【請求項 7】

ヒトCD3のエピトープに特異的である抗原-結合領域を含む単離抗体又はその機能的フラグメントであって、架橋されてIgG形式で試験される場合、当該抗体又はその機能的フラグメントが、T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす、前記単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 8】

ヒトCD3のエピトープに特異的である抗原-結合領域を含む単離抗体又はその機能的フラグメントであって、IgG形式で試験される場合、前記抗体又はその機能的フラグメントが、(i) 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合についての解離定数でヒトCD3に結合し；そして(ii a) 架橋された状態で、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での24時間の刺激後に、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍強いT-細胞活性化を誘発し；(ii b) $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での72時間の刺激後に、CD69発現において少なくとも1.5倍の増加により示される、抗体OKT-3又はTR66と比べて長く持続するT-細胞活性化をもたらす；(ii c) T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす、及び/又は(ii d) ヒトCD3のエピトープに特異的であり、ここで当該エピトープが結合に重要である残基としてアミノ酸残基N4を含む、前記単離抗体又はその機能的フラグメント。

40

50

【請求項 9】

前記エピトープがヒトCD3の鎖上に位置する、請求項4～8のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 10】

ヒトCD3への前記結合が、ヒト起源のヘテロダイマーCD3の精製された細胞外ドメインへの、IgG形式の前記抗体又はその機能的フラグメントの親和性を、表面プラズモン共鳴実験を用いて、特に次の条件：

M A S S - 1 S P R 装置 (Sierra Sensors) ; 捕捉抗体 : 標準アミン - カップリング方法を用いて、S P R - 2 Affinity Sensor chip, Amine, Sierra Sensors上に固定された前記IgGのFc領域に対して特異的な抗体 ; 90 - 2 . 81 n Mの範囲のヒトヘテロダイマー一本鎖CD3細胞外ドメインの二倍連続希釈、フローセル中への3分間の注入、及びセンサーチップ上に捕捉されたIgGからのタンパク質の5分間の解離、10 m Mのグリシン - H C lの2回の注入による各注入サイクル後の表面再生、one - to - one Langmuir結合モデルを用いて、M a s s - 1分析ソフトウェア (Analyzer, Sierra Sensors) による見掛け解離 (k d) 及び会合 (k a) 速度定数及び見掛け解離平衡定数 (K_D) の計算

を用いて、決定することにより決定される、請求項1～3、及び9のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 11】

(i i a) 及び / 又は (i i c) に従った T - 細胞活性化の前記誘発が、IgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるCD69発現の刺激を、特に次の条件 : 3倍過剰の抗 - IgG抗体 (対照 : ウサギ抗 - マウスIgG抗体 (JacksonImmuno Research、カタログ番号315 - 005 - 008) と架橋されているO K T 3 (BioLegend、カタログ番号317302) 又はT R 6 6 (Novns Biolgicals、カタログ番号N B P 1 - 99446)) の添加による事前の架橋の後において、20 μ g / m l、5 μ g / m l 及び1 . 25 μ g / m lのIgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメントにより、24時間Jurkat細胞 (100, 000個の細胞 / ウェル) を刺激し ;

ヒトCD69に対して特異的なフィコエリトリン (P E) - 標識された抗体 (BioLegend、カタログ番号310906) を用いて、刺激後のCD69発現を細胞染色し ; フローサイトメーター (F A C S aria III、Becton Dickinson) で分析し ; ここで陰性対照が前記架橋抗体とインキュベートされ、前記抗 - C D 6 9抗体により染色された未刺激のJurkat細胞である

を用いて決定することにより、決定される、請求項1～10のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 12】

(i i b) に従った前記長く持続する T - 細胞活性化が、IgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるCD69発現の刺激のタイムコースを、特に次の条件 :

5 μ g / m lのIgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメント、すなわち請求項10に記載のようにして架橋された抗 - C D 3抗体により、0, 4, 15, 24, 48及び72時間の100, 000個のJurkat細胞 / ウェルを刺激し、そして請求項10に記載のようによりフローサイトメーターによりCD69発現の分析する

を用いて決定することにより、決定される、請求項1～11のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 13】

(i i a) 及び / 又は (i i c) に従った T - 細胞活性化の前記誘発が、IgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるI L - 2分泌の刺激を、

特に次の条件 :

5 μ g / m lの濃度でIgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるJurkat細胞 (200, 000個の細胞 / ウェル) を、次の4種の異なったアッセイ設定を用いて刺激し :

10

20

30

40

50

(a) 3 倍高い濃度の抗 I g G 抗体の添加により架橋された I g G 形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメント (対照 : ウサギ抗マウス I g G 抗体 (JacksonImmuno Research、カタログ番号 3 1 5 - 0 0 5 - 0 0 8) で架橋されている O K T 3 (BiLegend、カタログ番号 3 1 7 3 0 2) 又は T R 6 6 (Novus Biologicals、カタログ番号 N B P - 9 7 4 4 6)) による Jurkat 細胞の刺激 ;

(b) 架橋抗体の不在下での T - 細胞活性化 ;

(c) 一晚のインキュベーションによる組織培養プレート上への前記架橋抗体の固定化 ;

(d) 架橋抗体の不在下での一晚のインキュベーションによる組織培養プレート上への I g G 形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメント (又は対照抗体) の固定化

各設定においては、添加の 1 時間後、1 0 n g / m l の P M A で細胞を刺激し、そして 2 4、4 8 及び 7 2 時間後に上清を収集して、市販の ELISA (BiLegend、カタログ番号 4 3 1 8 0 1) を用いて定量された I L - 2 放出を測定する

を用いて決定することにより決定される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 1 4】

前記単離抗体又はその機能的フラグメントが、カニクイザル C D 3 と交差反応性である、請求項 4 ~ 1 3 のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 1 5】

前記単離抗体又はその機能的フラグメントが、(i) ウサギ抗体又はその機能的フラグメント、又は (ii) (i) の前記ウサギ抗体又はその機能的フラグメントをヒト化することに得られる抗体又はその機能的フラグメントである、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 1 6】

前記単離抗体又はその機能的フラグメントが、配列番号 2、4、6、8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、及び 2 2、特に配列番号 4、6、1 0 及び 2 2、より特定には配列番号 1 0 及び 2 2 に存在する、1 つの C D R 1、1 つの C D R 2 及び 1 つの C D R 3 領域の組合せを含む V H ドメイン (特に、前記 V H ドメインは、配列番号 2、4、6、8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、及び 2 2、特に配列番号 4、6、1 0 及び 2 2、より特定には配列番号 1 0 及び 2 2 に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含む)、及び配列番号 1、3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、及び 2 1、特に配列番号 3、5、9 及び 2 1、より特定には配列番号 9 及び 2 1 に存在する、1 つの C D R 1、1 つの C D R 2 及び 1 つの C D R 3 領域の組合せを含む V L ドメイン (特に、前記 V L ドメインは、配列番号 1、3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、及び 2 1、特に配列番号 3、5、9 及び 2 1、より特定には配列番号 9 及び 2 1 に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含む) を含む抗原 - 結合領域を含む、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 1 7】

前記単離抗体又はその機能的フラグメントが、配列番号 2、4、6、8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、及び 2 2、特に配列番号 4、6、1 0 及び 2 2、より特定には配列番号 1 0 及び 2 2 の 1 つに存在する、C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の組合せを含む V H ドメイン (特に、前記 V H ドメインは、配列番号 2、4、6、8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、及び 2 2、特に配列番号 4、6、1 0 及び 2 2、より特定には配列番号 1 0 及び 2 2 の 1 つに存在するフレームワークドメインの組合せを含む)、及び配列番号 1、3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、及び 2 1、特に配列番号 3、5、9 及び 2 1、より特定には配列番号 9 及び 2 1 の 1 つに存在する、C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の組合せを含む V L ドメイン (特に、前記 V L ドメインは、配列番号 1、3、5、7、9、1 1、1 3、1 5、1 7、1 9、及び 2 1、特に配列番号 3、5、9 及び 2 1、より特定には配列番号 9 及び 2 1 の 1 つに存在するフレームワークドメインの

10

20

30

40

50

組合せを含む)を含む抗原 - 結合領域を含む、請求項 16 に記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 18】

前記単離抗体又はその機能的フラグメントが、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、及び 22、特に配列番号 4、6、10 及び 22、より特定には配列番号 10 及び 22 から選択された V H ドメイン、及び配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、及び 21、特に配列番号 3、5、9 及び 21、より特定には配列番号 9 及び 21 から選択された V L ドメインを含む抗原 - 結合領域を含む、請求項 17 に記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 19】

前記単離抗体又はその機能的フラグメントが、配列番号 1 / 配列番号 2 ; 配列番号 3 / 配列番号 4 ; 配列番号 5 / 配列番号 6 ; 配列番号 7 / 配列番号 8、配列番号 9 / 配列番号 10、配列番号 11 / 配列番号 12、配列番号 13 / 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、配列番号 19 / 配列番号 20、及び配列番号 2 / 配列番号 22 ; 特に配列番号 3 / 配列番号 4 ; 配列番号 5 / 配列番号 6 ; 配列番号 9 / 配列番号 10、及び配列番号 21 / 配列番号 22 ; より特定には配列番号 9 / 配列番号 10 及び配列番号 21 / 配列番号 22 から選択された V H / V L ドメイン組合せを含む抗原 - 結合領域を含む、請求項 18 に記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 20】

請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載される単離抗体又はその機能的フラグメントと実質的に同じエピトープに結合する単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 21】

前記単離抗体又はその機能的フラグメントが、請求項 18 又は 19 に記載される抗原 - 結合領域をヒト化することにより得られる抗原 - 結合領域を含む、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメント。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の単離抗体又はその機能的フラグメント、及び場合により医薬的に許容される担体及び / 又は賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメントをコードする核酸配列又はその集合物。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の核酸配列又はその集合物を含む、ベクター又はその集合物。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の核酸配列又はその集合物、又は請求項 24 に記載のベクター又はその集合物を含む、宿主細胞、特に発現宿主細胞。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 21 のいずれか一項記載の単離抗体又はその機能的フラグメントの生成方法であって、請求項 23 に記載の核酸配列又はその集合物、又は請求項 24 に記載のベクター又はその集合物、又は請求項 25 に記載の宿主細胞、特に発現宿主細胞を発現する工程を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

【0002】

本発明は、高い効能と高い親和性とを兼ね備える新規抗体、特に新規エピトープに対する新規抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

発明の背景

【0004】

本発明は、高い能力と高い親和性とを兼ね備える新規抗体、及び特に、新規CD3エピトープを特異的に認識する新規抗体に関する。

【0005】

T細胞受容体又はTCRは、抗原提示細胞(APC)の表面上の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合される抗原の認識のために応答できるTリンパ球(又はT細胞)の表面上に見出される分子である。TCRと抗原との間の結合は、比較的低い親和性のものである。TCRが抗原及びMHCと係合する場合、Tリンパ球は、関連酵素、共受容体、特殊化されたアクセサリー分子、及び活性化されたか又は放出された転写因子により介在される一連の生化学的現象を通して活性化される。

10

【0006】

TCRは、哺乳類における3種の異なった鎖(、及び)、及び2(CD247)複合体又は/複合体の何れかを有する、CD3のような他の分子に関連している。それらのアクセサリー分子はトランスメンブラン領域を有し、そして細胞中へのTCRからのシグナルを伝搬するために不可欠であり;TCRの細胞質端は非常に短く、シグナル伝達への参加を不可能にする。CD3-及び鎖は、TCRと一緒に、T細胞受容体複合体として知られているものを形成する。

【0007】

CD3は、特定のT細胞の表面上に発現されるタイプIトランスメンブランタンパク質である。それは、T細胞受容体(TCR)複合体に関与し、そしてこの複合体の他のドメインと相互作用する。それらの相互作用パートナーの1つはCD3であり、これは1:1の化学量的にCD3に結合する(De la Hera et al, J. Exp. Med.1991; 173: 7-17)。図5は、CD3/CD3を包含するTCR複合体の概略図を示す。抗原提示細胞(APC)の表面上のMHC-ペプチド複合体へのTCRの結合、及びAPCに沿ってのT細胞の続く移動が、TCR複合体の一定の回転を導き、お互いに関してCD3及びCD3の変位をもたらし、これは、効果的TCRシグナル伝達及び従って、T細胞の活性化のために必要とされると思われる。CD3に対する特定の抗体は、他の抗体では示されていないが、TCRシグナル伝達を誘発することが実証されている。TCR-活性化抗体は典型的には、CD3上の露出されたエピトープに結合し(図5、「アゴニストエピトープ」を参照のこと)、ところがいくつかの非刺激性抗体は、CD3とCD3との間のインターフェースに結合するか、又は同時に、CD3及びCD3に結合することが示されており(図5、「アンタゴニストエピトープ」を参照のこと)、従って、たぶん、CD3及びCD3の相対的変位を干渉する(Kim et al, JBC.2009; 284: 31028-31037)。

20

30

【0008】

ペプチド-MHC複合体が、低親和性及び早い解離速度でTCRを結合することは十分に確立されている(Matsui et al, Science.1991; 254: 1788-1791; Weber et al, Nature.1992; 356: 793-796)。この低い親和性は、反復された結合及び解離により、多くのTCRを連続的にトリガーする(Valitutti et al, Nature.1995; 375: 148-151)、少数のペプチド-MHC複合体を可能にするための手段であることが示唆されている。この連続的トリガーは、時間と共にシグナル伝達を維持するために重要であり、結果的に、活性化閾値へのT細胞の到達を可能にする(Valitutti et al, Immunol. Today. 1997; 18: 299-304; Lanzavecchia et al, Cell. 1999; 96: 1-4)。この概念は、ペプチド-MHC複合体に比較して、高親和性抗-CD3抗体は、それらが1:1の化学量的にTCRをトリガーするので、T細胞を効果的に刺激せず(Viola et al, Science 1996; 273: 104-106)、このことは、低親和性抗体が、反復して、解離し、そしてCD3に再結合するそれらの能力のために、TCRシグナル伝達を介してのT細胞の刺激において、より効果的であり得ることを示唆する発見により支持される。実際、異なった親和性ですべて結合する、抗-CD3抗体TR66の3種の誘導体の直接的比較によれば、中間の親和性を有

40

50

する野生型 T R 6 6 は、より高いか又はより低い親和性を有する誘導体に比較して、T 細胞活性化に最良の有効性を示した (Bortoletto et al, J. Immuno.2002;32:3 02-3107)。従って、T R 6 6 の K_D 近くの K_D が、T 細胞の刺激のためには理想的である。T R 6 6 の親和性は、表面プラスモン共鳴 (S P R) 技法の使用により、及びそれぞれ 2.6×10^{-7} M (Moore et al, Blood.2011; 117: 4542-4551) 及び 1.0×10^{-7} M (A mann et al, Cancer Res. 2008; 68: 143-151) の平衡解離定数をもたらす、フローサイトメトリーにより決定された。これに伴い、 10^{-8} M 未満の親和性を有する抗 - C D 3 抗体 (米国特許第 7, 1 1 2, 3 2 4 号) を使用することが推薦されており、そしてヒト治療用途のために公開された T 細胞 - 刺激抗体は、同じ範囲でヒト C D 3 への親和性で結合する。従って、連続的 T C R トリガーの理論によれば、及び抗 - C D 3 抗体について 10 の公開された結果と一致して、公開された親和性よりも有意に良好な親和性を有するモノクローナル抗体は、T 細胞のより有能な刺激因子であることは予想されないが、しかし対照的に、より弱い活性化因子であることが予想される。

10

【 0 0 0 9 】

C D 3 に対する公開された抗体のいくつかは、T 細胞調製物による動物の免疫化、及びいわゆるハイブリドーマ方法によるモノクローナル抗体の続く単離を介して生成されて来た。このアプローチの弱点は、一方では、動物における外来性 (ヒト) T 細胞の種々の抗原に対する非選択的免疫応答、及び他方では、ハイブリドーマ方法の不良な効率、T 細胞 - 刺激活性を有するモノクローナル抗体を同定する確立を低め、また、それらのアゴニスト抗体が抗 - C D 3 抗体全体において少数派を表すためである。標的化されたエピトープに及ぶ線状ペプチドによる免疫化が免疫応答の選択性を高めるが、しかしながら、ネイティブ完全長 C D 3 を認識しないか、又は非最適 T C R 刺激を発揮することができる抗体をもたらすことができる。

20

【 0 0 1 0 】

他のタイプ I トランスメンブランタンパク質による動物の免疫化のために、精製された細胞外ドメイン (E C D) を用いることが特に有用であった。しかしながら、C D 3 の精製された E C D は凝集する傾向があり、そして凝集物は、ネイティブタンパク質に比べて、変更された構造を有する。さらに、このアプローチは、C D 3 と C D 3 との間のインターフェースに結合する抗体を優先的に導くことができる。対照的に、柔軟なペプチドリンカーにより結合される、一本鎖タンパク質として精製される C D 3 及び C D 3 の複合体は、モノマー画分及びその天然のコンホメーション下で精製され得る (Kim et al, JMB.2000; 302: 899-916)。しかしながら、そのような C D 3 / 一本鎖タンパク質による動物の免疫化は、アンタゴニスト効果をもたらすであろう、C D 3 及び C D 3 に同時に結合する抗体を導くことができる。

30

【 0 0 1 1 】

ヒト C D 3 に対して向けられたいくつかの抗体は、これまで開発されている。

【 0 0 1 2 】

モノクローナル抗体 S P 3 4 は、非ヒト霊長類 C D 3 と交差反応し、そしてまた、ヒト及び非ヒト霊長類 P B M C 上で細胞増殖を誘発することもできるネズミ抗体である (Pessano et al., The T3/T cell receptor complex: antigenic distinction between the two 20-kD T3 (α and β) subunits. EMBO J 4 (1985) 337-344)。

40

【 0 0 1 3 】

国際公開第 2 0 0 7 / 0 4 2 2 6 1 号及び国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 号 (両者とも Micromet に譲渡されている) は、それぞれ、C D 3 において、エピトープ F S E X E 及び Q D G N E に対して向けられた交差反応性結合体を開示する。付与された欧州特許 E P 2 1 5 5 7 8 3 号 (国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 号の広域段階に基づかれる) に対するいくつかの異議申立入により提出された異議申立手続きにおいて、S P 3 4 がエピトープ Q D G N E にも結合することが提出されている。

【 0 0 1 4 】

しかしながら、多くの試みが、抗 - C D 3 抗体を得るための、又は特に有用な性質を有

50

する、一般的に結合分子への問題に対処するためになされてきた事実にもかかわらず、これまで、それらの試みは限られた成功を収めて来た。

【0015】

従って、高い効力のために制限されない高親和性のための新規CD3結合分子、特に新規抗-CD3抗体を開発する大きな満たされていない必要性が依然として残っている。さらに、他の種、特に非ヒト霊長類、例えばカニクイザルと交差反応性である、高親和性のための新規CD3結合分子、特に新規抗-CD3抗体を開発する大きな満たされていない必要性が依然として存在する。

【0016】

本発明により提供されて来たこの問題、すなわちCD3-結合分子、特にウサギの遺伝学的免疫化及び親和性成熟記憶B細胞のスクリーニングにより得られる抗-CD3抗体、及び特に新規アゴニストエピトープに対する特異性を有するCD3-結合分子、特に抗-CD3抗体についての解決策は、これまで先行技術によって達成もまた、示唆もされていない。

10

【発明の概要】

【0017】

本発明は、結合領域、特に抗原-結合領域を個々に含む、新規単離CD3-結合分子、特に単離抗体又はその機能的フラグメントに関し、ここで前記結合分子、特に前記抗体又はその機能的フラグメントは、ヒトCD3のエピトープ、特にCD3の新規アゴニストエピトープに対して特異的であり、より高い効力を発揮しながら、従来技術の抗体、特にOKT-3及び/又はTR66よりも高い親和性を有する。

20

【0018】

従って、1つの態様によれば、本発明は、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である結合領域を含む単離結合分子、特に抗原-結合領域を含む単離抗体又はその機能的フラグメントに関し、ここで前記エピトープは、結合のために重要である残基としてアミノ酸残基N4を含む。

【0019】

第2の態様によれば、本発明は、 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための解離定数を有するヒトCD3に結合する、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である新規単離CD3-結合分子、特に 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための解離定数を有するヒトCD3に結合する、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗原-結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

30

【0020】

第3の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での刺激の24時間後、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍、強いT-細胞活性化を誘発する、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗体-結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

40

【0021】

第4の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での刺激の72時間後、CD69発現において少なくとも1.5倍高い増加により示されるように、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT-細胞活性化をもたらす、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗体-結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

【0022】

第5の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす、ヒトCD3のエピトープに対して特異的であ

50

る抗体 - 結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

【0023】

第6の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、(i) 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための解離定数を有するヒトCD3に結合し；そして(ii a) 架橋に基づいて、 $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度での刺激の24時間後、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍、強いT-細胞活性化を誘発し；(ii b) $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度での刺激の72時間後、CD69発現において少なくとも1.5倍高い増加により示されるように、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT-細胞活性化をもたらす；(ii c) T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす、ヒトCD3のエピトープに対して特異的であり；そして/又は(ii d) 結合のために重要である残基としてアミノ酸残基N4を含む、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である、抗原 - 結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

10

【0024】

第7の態様によれば、本発明は、セクション[0078] - [0080]、[0083] - [0085]及び[0089]の単離抗体又はその機能的フラグメントと実質的に同じエピトープに結合する、単離された結合分子、特に単離抗体又は機能的フラグメントに関する。

【0025】

第8の態様によれば、本発明は、本発明の結合分子、特に単離抗体又はその機能的フラグメント、及び任意には、医薬的に許容できる担体及び/又は賦形剤を含む医薬組成物に関する。

20

【0026】

第9の態様によれば、本発明は、本発明の結合分子、特に単離抗体又はその機能的フラグメントをコードする核酸配列又はその集合物に関する。

【0027】

第10の態様によれば、本発明は、本発明の核酸配列又はその集合物を含むベクター又はその集合物に関する。

【0028】

第11の態様によれば、本発明は、本発明の核酸配列又はその集合物、又は本発明のベクター又はその集合物を含む宿主細胞、特に発現宿主に関する。

30

【0029】

第12の態様によれば、本発明は、本発明の結合分子、特に単離抗体又はその機能的フラグメントの生成方法に関し、ここで前記方法は、本発明の核酸配列又はその集合物、又は本発明のベクター又はその集合物、又は本発明の宿主細胞、特に発現宿主細胞を発現する工程を含んで成る。

【0030】

第13の態様によれば、本発明は、本発明の単離抗体又はその機能的フラグメントの生成方法に関し、ここで前記方法は、下記工程：

a) 宿主細胞の表面上にネイティブ完全長CD3を提供するために、CD3 - 発現プラスミドによるウサギの免疫化；

40

b) 蛍光活性化細胞選別を用いての、CD3 / 一本鎖と相互反応する親和性成熟記憶B細胞のクローン単離；

c) 選別されたクローンの不死化を必要としない、共培養システムにおける単一の選別されたB細胞の培養；

d) T細胞の表面上のTCR複合体に埋封されたネイティブCD3に結合する抗体を同定するために、細胞ベースのELISAにおけるB細胞培養上清液のスクリーニングの工程を含んで成る。

【0031】

第14の態様によれば、本発明は、CD3 とCD3 との間のインターフェースに配

50

置されず、そしてT細胞上に発現されるナイティブTCRに関して抗体によりまだ結合され得る、CD3のアミノ酸残基を独占的に含むヒトCD3の特定エピトープに関し、ここで本発明の架橋された抗体によるその結合は、1.25 μg/mlのIgG濃度での刺激の24時間後、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍、強いT細胞活性化を誘発し；(iib) 1.25 μg/mlのIgG濃度での刺激の72時間後、CD69発現において少なくとも1.5倍高い増加により示されるように、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT細胞活性化をもたらす；そして/又は(icc) T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす。

【0032】

第15の態様によれば、本発明は、ヒトCD3の新規エピトープに対して特異的である結合領域を含む結合分子の同定方法に関し、ここで前記方法は、(a) 結合のために重要である残基としてアミノ酸残基N4を含む、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である結合領域を含む少なくとも1つの結合分子を、ヒトCD3に結合する1又は2以上の分子から選択する工程を含んで成る。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は、ウサギモノクローナル抗体からの連結されたVH及びVL CDR配列の系統発生的クラスタリングを示す。

【0034】

【図2】図2は、Jurkat T細胞への精製されたウサギモノクローナル抗体の結合を示す。

【0035】

【図3-1】図3は、架橋された抗-CD3 mAbによるCD69発現の刺激を示す。精製されたウサギモノクローナル抗-CD3抗体及び比較抗体TR66及びOKT-3のT細胞活性化を誘発する可能性が、CD69発現の測定により評価された。3種の異なる濃度の架橋された抗体がJurkat細胞を刺激するために使用され、そしてCD69発現が、24時間後、フローサイトメリーにより評価された。抗体濃度は、1.25 μg/ml (a)、50 μg/ml (b)及び20 μg/ml (c)であった。

【図3-2】図3は、架橋された抗-CD3 mAbによるCD69発現の刺激を示す。精製されたウサギモノクローナル抗-CD3抗体及び比較抗体TR66及びOKT-3のT細胞活性化を誘発する可能性が、CD69発現の測定により評価された。3種の異なる濃度の架橋された抗体がJurkat細胞を刺激するために使用され、そしてCD69発現が、24時間後、フローサイトメリーにより評価された。抗体濃度は、1.25 μg/ml (a)、50 μg/ml (b)及び20 μg/ml (c)であった。

【0036】

【図4】図4は、時間の経過とともに、架橋されたウサギmAbによるCD69の刺激を示す。T細胞活性化を誘発する、精製されたウサギモノクローナル抗-CD3抗体の可能性が、CD69発現の測定により評価された。架橋された抗体は、Jurkat細胞を刺激するために5.0 μg/mlの濃度で使用され、そしてCD69発現は、0、4、15、24、48及び72時間後、フローサイトメリーにより評価された。CD69発現の定性的検出に関しては、幾何学的平均でのシグナル強度を反映する平均蛍光強度(MFI)が、負の対照及び試験抗体の両者のために測定された。試験抗体と負の対照との間のMFIの差異(MFI)が、CD69発現のために尺度として計算された。

【0037】

【図5】図5は、CD3 / CD3 を包含するTCR複合体の単純化された概略図を示す。

【0038】

【図6】図6は、従来技術の抗体についての次のエピトープマッピング実験の結果を示す：(a) 抗体SP34のエピトープマッピング(欧州特許第2155788号のファイル履歴を参照のこと)；(b) Micromet抗体のエピトープマッピング(欧州特許第2155

10

20

30

40

50

788号/国際公開第2008/119567号を参照のこと) ; 図6は、単一のアラニン変異体の結合実験の結果を示し、ここで所定の変異体についての結合の低下が、抗体結合についてのその対応する野生型アミノ酸残基の関連性を示唆する(すなわち、低いバー=結合についての高い関連性)。

【0039】

【図7A】図7は、本発明の抗体についてのELISAによるエピトープマッピング実験の結果を示し(クローン-02、クローン-03、クローン-06) ; 図7は、ペプチド走査分析における結合実験の結果を示す。ヒトCD3に由来する15マー線状アレイ、すなわち各位置が18個のアミノ酸(システインを除くすべての天然アミノ酸)により置換される残基1-15が、エピトープに対する結合に影響を及ぼすアミノ酸特異性を研究するために、0.1μg/mlの各抗体によりプローブされた。ELISAにおける結合シグナルの低下が、(a)個々の各置換のために、与えられ、そして(b)各位置について18の異なる置換にわたって平均化される。図7bにおけるバーの高さは、抗体結合についてのその対応する野生型アミノ酸残基の関連性を示唆する(すなわち、大きなバー=結合について高い関連性)。

10

【図7B】図7は、本発明の抗体についてのELISAによるエピトープマッピング実験の結果を示し(クローン-02、クローン-03、クローン-06) ; 図7は、ペプチド走査分析における結合実験の結果を示す。ヒトCD3に由来する15マー線状アレイ、すなわち各位置が18個のアミノ酸(システインを除くすべての天然アミノ酸)により置換される残基1-15が、エピトープに対する結合に影響を及ぼすアミノ酸特異性を研究するために、0.1μg/mlの各抗体によりプローブされた。ELISAにおける結合シグナルの低下が、(a)個々の各置換のために、与えられ、そして(b)各位置について18の異なる置換にわたって平均化される。図7bにおけるバーの高さは、抗体結合についてのその対応する野生型アミノ酸残基の関連性を示唆する(すなわち、大きなバー=結合について高い関連性)。

20

【0040】

【図8-1】図8は、Jurkat T-細胞及びCHO-IL5R細胞への抗-CD3×抗-IL5R s c D bの結合を示す。Jurkat T-細胞及びCD3-陰性Jurkat細胞へのA)コンストラクト1、B)コンストラクト2及びC)コンストラクト3の結合、及びIL5R-CHO細胞及び野生型CHO細胞へのD)コンストラクト1、E)コンストラクト2及びF)コンストラクト3の結合が、フローサイトメトリーにより評価された。コンストラクト1、コンストラクト2及びコンストラクト3は、同じ抗-IL5R成分を有するが、しかし多様な親和性(コンストラクト1については $1,15 \times 10^{-8}$ M、コンストラクト2については $2,96 \times 10^{-8}$ M、及びコンストラクト3については $2,23 \times 10^{-7}$ M)でCD3に結合する3種の異なる抗-CD3成分を有する;コンストラクト1=クローン-06のヒト化された可変ドメインを含み;コンストラクト2=クローン-02のヒト化された可変ドメインを含み;コンストラクト3=クローン-03のヒト化された可変ドメインを含む。

30

【図8-2】図8は、Jurkat T-細胞及びCHO-IL5R細胞への抗-CD3×抗-IL5R s c D bの結合を示す。Jurkat T-細胞及びCD3-陰性Jurkat細胞へのA)コンストラクト1、B)コンストラクト2及びC)コンストラクト3の結合、及びIL5R-CHO細胞及び野生型CHO細胞へのD)コンストラクト1、E)コンストラクト2及びF)コンストラクト3の結合が、フローサイトメトリーにより評価された。コンストラクト1、コンストラクト2及びコンストラクト3は、同じ抗-IL5R成分を有するが、しかし多様な親和性(コンストラクト1については $1,15 \times 10^{-8}$ M、コンストラクト2については $2,96 \times 10^{-8}$ M、及びコンストラクト3については $2,23 \times 10^{-7}$ M)でCD3に結合する3種の異なる抗-CD3成分を有する;コンストラクト1=クローン-06のヒト化された可変ドメインを含み;コンストラクト2=クローン-02のヒト化された可変ドメインを含み;コンストラクト3=クローン-03のヒト化された可変ドメインを含む。

40

50

【 0 0 4 1 】

【図 9】図 9 は、s c D b による細胞傷害性 T - 細胞と標的細胞との架橋によるインターロイキン - 2 分泌の特異的刺激を示す。C D 8 + T - 細胞が、C H O - I L 5 R 又は C H O 細胞の存在下で、上昇する濃度の s c D b と共にインキュベートされた。培養上清液におけるインターロイキン - 2 濃度が、インキュベーションの 1 6 時間後、E L I S A により測定された；コンストラクト 1 = クローン - 0 6 のヒト化された可変ドメインを含み；コンストラクト 2 = クローン - 0 2 のヒト化された可変ドメインを含み；コンストラクト 3 = クローン - 0 3 のヒト化された可変ドメインを含む。

【 0 0 4 2 】

【図 1 0】図 1 0 は、抗 - C D 3 × 抗 - I L 5 R s c D b によるヒト I L 5 R - 発現 C H O 細胞の特異的溶解を示す。C H 8 + T - 細胞が、C H O - I L 5 R 又は C H O 細胞の存在下で上昇する濃度の s c D b と共にインキュベートされた。標的細胞 (C H O - I L 5 R 又は C H O) が、緑色細胞毒性色素により標識され、そして細胞溶解が、インキュベーションの 8 8 時間後、蛍光強度の測定により決定された；コンストラクト 1 = クローン - 0 6 のヒト化された可変ドメインを含み；コンストラクト 2 = クローン - 0 2 のヒト化された可変ドメインを含み；コンストラクト 3 = クローン - 0 3 のヒト化された可変ドメインを含む。

10

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 3 】

以前の抗 - C D 3 抗体と比較して、本発明の特異性は、ヒト C D 3 のエピトープに対して特異的である抗原 - 結合領域を含む新規の単離抗体又はその機能的フラグメントが、より高い効力を同時に示しながら、従来技術の抗体、特に C K T - 3 及び / 又は T R 6 6 よりも高い親和性を有する事実である。

20

【 0 0 4 4 】

従って、第 1 の態様によれば、本発明は、ヒト C D 3 のエピトープに対して特異的である結合領域を含む単離結合分子、特に抗原 - 結合領域を含む単離抗体又はその機能的フラグメントに関し、ここで前記エピトープは、結合のために重要である残基としてアミノ酸残基 N 4 を含む。

【 0 0 4 5 】

本発明に関しては、アミノ酸残基は、前記アミノ酸残基位置を含むペプチドへの結合分子の結合親和性が、野生型ペプチド配列への結合親和性の少なくとも 5 0 %、特に少なくとも 2 5 %、より特定には少なくとも 1 0 %、及び最も特定には少なくとも 5 % 低められる場合、すなわち前記重要なアミノ酸残基がアラニンにより置換される場合、そして / 又は実施例 7 の E L I S A により決定されるように、前記アミノ酸残基位置を含むペプチドへの結合に起因する平均シグナル強度が、野生型ペプチド配列への結合シグナルの少なくとも 5 0 %、特に少なくとも 2 5 %、及び最も特定には少なくとも 1 0 % 低められる場合、すなわち前記重要なアミノ酸残基がシステインを除く他の天然の各アミノ酸残基により、別々に置換される場合、「結合のために重要である (critical for binding)」として見なされる。

30

【 0 0 4 6 】

特定の実施形態によれば、前記エピトープはさらに、結合に関与する残基として、アミノ酸残基 E 6 を含む。特定の実施形態によれば、前記エピトープはさらに、結合のために重要である残基として、アミノ酸残基 E 6 を含む。

40

【 0 0 4 7 】

本発明に関しては、アミノ酸残基は、結合分子の結合親和性が少なくとも 8 0 % まで低められる場合、すなわち前記アミノ酸残基がアラニンにより置換される場合、そして / 又は実施例 7 の E L I S A により決定されるように、前記アミノ酸残基位置を含むペプチドへの結合に起因する平均シグナル強度が少なくとも 8 0 % に低められる場合、すなわち、前記アミノ酸残基がシステインを除く他の天然の各アミノ酸残基により別々に置換される場合、「結合に関与する (involved in binding)」として見なされる。

50

【0048】

特定の実施形態によれば、前記結合分子は、抗体又はその機能的フラグメントである。

【0049】

特定の実施形態によれば、前記結合分子、特に前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、カニクイザルCD3、特にカニクイザルCD3 と交差反応性であり、特にヒトCD3 の親和性とは、100倍未満、特に30倍未満、さらにより特定には15倍未満、及び最も特定には5倍未満、異なる、カニクイザルCD3 に対する親和性を有する。

【0050】

特定の実施形態によれば、前記結合分子、特に前記抗体又はその機能的フラグメントは、 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための平衡解離定数を有するヒトCD3に結合する。

10

【0051】

特定の実施形態によれば、前記結合分子は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での刺激の24時間後、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍、強いT-細胞活性化を誘発する、抗体又はその機能的フラグメントである。

【0052】

特定の実施形態によれば、前記結合分子は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での刺激の72時間後、CD69発現において少なくとも1.5倍高い増加により示されるように、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT-細胞活性化をもたらす、抗体又はその機能的フラグメントである。

20

【0053】

特定の実施形態によれば、前記結合分子は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、OKT-3又はTR66による活性化に比較して、低い不均一性である、T-細胞の用量依存性活性化状態をもたらす抗体又はその機能的フラグメントである。

【0054】

第2の態様によれば、本発明は、 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための解離定数を有するヒトCD3に結合する、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である新規単離CD3-結合分子、特に 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための解離定数を有するヒトCD3に結合する、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗原-結合領域を含んでなる単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

30

【0055】

特定の実施形態によれば、前記結合分子、特に前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、カニクイザルCD3、特にカニクイザルCD3 と交差反応性であり、特にヒトCD3 の親和性とは、100倍未満、特に30倍未満、さらにより特定には15倍未満、及び最も特定には5倍未満、異なる、カニクイザルCD3 に対する親和性を有する。

40

【0056】

第3の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、 $1.25 \mu\text{g/ml}$ のIgG濃度での刺激の24時間後、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍、強いT-細胞活性化を誘発する、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗体-結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

【0057】

特定の実施形態によれば、前記結合分子、特に前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、カニクイザルCD3、特にカニクイザルCD3 と交差反応性であり、特にヒトCD3 の親和性とは、100倍未満、特に30倍未満、さらにより特定には15倍未満、

50

及び最も特定には5倍未満、異なる、カニクイザルCD3 に対する親和性を有する。

【0058】

第4の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、1.25 µg/mlのIgG濃度での刺激の72時間後、CD69発現において少なくとも1.5倍高い増加により示されるように、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT-細胞活性化をもたらす、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗体-結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

【0059】

特定の実施形態によれば、前記結合分子、特に前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、カニクイザルCD3、特にカニクイザルCD3 と交差反応性であり、特にヒトCD3 の親和性とは、100倍未満、特に30倍未満、さらにより特定には15倍未満、及び最も特定には5倍未満、異なる、カニクイザルCD3 に対する親和性を有する。

【0060】

第5の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、架橋に基づいて、OKT-3又はTR66による活性化に比較して、低い不均一性である、T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす、ヒトCD3のエピトープに対して特異的である抗体-結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。

【0061】

特定の実施形態によれば、前記結合分子、特に前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、カニクイザルCD3、特にカニクイザルCD3 と交差反応性であり、特にヒトCD3 の親和性とは、100倍未満、特に30倍未満、さらにより特定には15倍未満、及び最も特定には5倍未満、異なる、カニクイザルCD3 に対する親和性を有する。

【0062】

第6の態様によれば、本発明は、IgG形式で試験される場合、(i) 3.0×10^{-8} M未満、特に 1.5×10^{-8} M未満、より特定には 1.2×10^{-8} M未満、及び最も特定には 1.0×10^{-8} M未満の一価結合のための解離定数を有するヒトCD3に結合し；そして(ii a) 架橋に基づいて、1.25 µg/mlのIgG濃度での刺激の24時間後、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍、強いT-細胞活性化を誘発し；(ii b) 1.25 µg/mlのIgG濃度での刺激の72時間後、CD69発現において少なくとも1.5倍高い増加により示されるように、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT-細胞活性化をもたらす；(ii c) OKT-3又はTR66による活性化に比較して、低い不均一性である、T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす、ヒトCD3のエピトープに対して特異的であり；そして/又は(ii d) 結合のために重要である残基としてアミノ酸残基N4を含む、ヒトCD3 のエピトープに対して特異的である、抗原-結合領域を含んで成る単離抗体又はその機能的フラグメントに関する。明確にするために、本実施形態によれば、単離抗体又はその機能的フラグメントは、(i)の性質、及びさらに、(ii a) - (ii d)の性質の少なくとも1つを有する。

【0063】

特定のそのような実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、さらに、カニクイザルCD3、特にカニクイザルCD3 と交差反応性であり、特にヒトCD3 の親和性とは、100倍未満、特に30倍未満、さらにより特定には15倍未満、及び最も特定には5倍未満、異なる、カニクイザルCD3 に対する親和性を有する。

【0064】

本発明に関しては、用語「抗体」(antibody)とは、クラスIgG、IgM、IgB、IgA又はIgD(又はそれらの何れかのサブクラス)に属するタンパク質として定義され、そしてすべての従来公知抗体及びそれらの機能的フラグメントを包含する、「免疫グロブリン」(immunoglobulin)(Ig)の同義語として使用される。抗体/免疫グロブリンの「機能意的フラグメント」(functional fragment)は、抗原-結合領域を保持する、抗体/免疫グロブリンのフラグメント(例えば、IgGの可変領域)として定義される

10

20

30

40

50

。抗体の「抗原 - 結合領域」(antigen-binding region)は典型的には、抗体の1又は2以上の超可変領域、すなわちCDR-1、-2及び/又は-3領域に見出されるが；しかしながら、その可変「骨格」(framework)領域はまた、例えばCDRのための足場を提供することにより、抗原結合において重要な役割も演じることができる。好ましくは、「抗原 - 結合領域」(antigen-binding region)は、可変L鎖(VL)の少なくともアミノ酸残基4-103及び可変H鎖(VH)のアミノ酸残基5-109、より好ましくは、VLのアミノ酸残基3-107及びVHのアミノ酸残基4-111を含み、そして完全VL及びVH鎖(VLのアミノ酸位置1-109及びVHの1-113；国際公開第97/08320号に従っての番号付け)が特に好ましい。ウサギ抗体の場合、CDR領域が表4に示されている(下記参考のこと)。本発明に使用のための好ましい種類の免疫グロブリンはIgGである。本発明の「機能的フラグメント」(functional fragments)は、F(ab')₂フラグメント、Fabフラグメント及びscFvのドメインを含む。(F(ab')₂又はFabは、CH1とCLドメインとの間で生じる分子間ジスルフィド相互作用を最少にするか、又は完全に除去するよう構築され得る。

10

【0065】

本明細書において使用される場合、結合分子は、結合特異性は絶対的ではないが、しかし相対的性質であるので、そのような結合分子がそのような標的生体分子と、1又は2以上の参照分子との間を区別できるので、標的物、例えばヒトCD3(又はヒトCD3のエピトープ)、「に対して特異的であり」(specific to/for)、「特異的に認識し」(specifically recognizes)、又は「特異的に結合する」(specifically binds to)。その最も一般的な形で(及び定義される参照が言及されていない場合)、「特異的結合」(specific binding)とは、当業界において公知の特異性アッセイ方法に従って決定される場合、目的の生体分子と無関係な生体分子との間を区別する結合分子の能力を言及する。そのような方法は、ウェスタンブロット、ELISA、RIA、ECL、IRMA試験及びペプチド走査を包含するが、但しそれらだけには限定されない。例えば、標準ELISAアッセイが実施され得る。スコアリングは、標準的発色(例えば、二次抗体とホースラディッシュペルオキシダーゼ及びテトラメチルベンジジンと過酸化水素)により実施され得る。特定ウェル中の反応が、例えば450nmでの光学密度によりスコアリングされる。典型的なバックグラウンド(=負の反応)は、約0.1のODであり得；典型的な陽性反応は、約1のODであり得る。これは、正の評点と負の評点との間の比が10倍又はそれ以上であることを意味する。典型的には、結合特異性の決定は、単一の参照生体分子ではなく、約3~5種の無関係生体分子、例えば粉乳、BSA、トランスフェリン又は同様のものを用いることにより実施される。

20

30

【0066】

本発明においては、用語「約」(about)又は「およそ」(approximately)とは、所定の値又は範囲の90%~110%を意味する。

【0067】

しかしながら、「特異的結合」(specific binding)とはまた、参照点として使用される、標的生体分子と1又は2以上の密接に関連する生体分子との間を区別する結合分子の能力を言及することができる。さらに、「特異的結合」(specific binding)は、その標的抗原の異なった部分、例えば標的生体分子の異なったドメイン、領域又はエピトープ間、又は標的生体分子の1又は2以上のキープアミノ酸残基又は一定長のアミノ酸残基間を区別する結合分子の能力に関連する。

40

【0068】

本発明においては、用語「エピトープ」(epitope)とは、標的生体分子と結合分子との間の特異的結合のために必要とされる所定の標的生体分子のその部分を言及する。エピトープは、連続的であり得、すなわち標的生体分子に存在する隣接する構造要素により形成されるか、又は不連続であり得、すなわち標的生体分子の一次配列において、例えば標的物としてのタンパク質のアミノ酸配列において異なった位置で存在する構造要素により形成される。

50

【0069】

1つの実施形態によれば、エピトープは、ヒトCD3の鎖上に位置する。

【0070】

特定の実施形態によれば、ヒトCD3への前記結合は、表面プラズモン共鳴実験を用いて、ヒト起源のヘテロダイマーCD3の精製された細胞該ドメインへの、IgG形式での前記抗体又はその機能的フラグメントの親和性を決定することにより決定される。

【0071】

特定の実施形態によれば、次の条件が、実施例1に示されるように、使用される：MAS-1 SPR計器（Sierra Sensors）；捕捉抗体：標準のアミンカップリング法を用いて、SPR-2 Affinity Sensorチップ、Amine, Sierra Sensors上に固定された前記IgGのFc領域に対して特異的な抗体；90-2.81 nMの範囲のヒトヘテロダイマー一本鎖CD3細胞外ドメインの二倍連続希釈、流動細胞中への3分間の注入及びセンサーチップ上に捕捉されたIgGからのタンパク質の5分間の解離、10 mMのグリシン-HClの2回の注入での各注入サイクル後の表面再生、one-to-one Langmuir結合モデルを用いて、Mass-1分析ソフトウェア（Analyzer, Sierra Sensors）による見掛け解離（kd）及び会合（ka）速度定数及び見掛け解離平衡定数（ K_D ）の計算。

【0072】

特定の実施形態によれば、(iia)及び/又は(lia)に従ってのT-細胞活性化の前記誘発は、IgG形式での前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるCD69発現の刺激を決定することにより決定される。

【0073】

特定の実施形態によれば、次の条件が、実施例3に示されるようにして使用される：3倍過剰の抗-IgG抗体（対照：ウサギ抗体-マウスIgG抗体（JacksonImmuno Research、カタログ番号315-005-008）と架橋しているOKT3（BioLegend、カタログ番号317302）又はTR66（Novns Biologicals、カタログ番号NB P1-99446））の添加による事前の架橋後において、20 µg/ml、5 µg/ml及び1.25 µg/mlのIgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメントにより、24時間のJurkat細胞（100,000個の細胞/ウェル）を刺激する；刺激後にCD69発現を、ヒトCD69に対して特異的なフィコエリトリン（PE）-標識された抗体（BioLegend、カタログ番号310906）を使用して細胞染色し、フローサイトメーター（FACSaria III、Becton Dickinson）により分析する；陰性対照：前記架橋抗体とインキュベートされた未刺激刺のJurkat細胞を前記抗-CD69抗体により染色する。

【0074】

特定の実施形態によれば、(iib)に従っての前記長く持続するT-細胞活性化は、IgG形式での前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるCD69発現の刺激の経時を決定することにより決定される。

【0075】

特定の実施形態によれば、次の条件が、実施例3に示されるようにして使用される：段落【0071】のようにして架橋された、IgG形式の前記単離抗体又はその機能的フラグメント、抗-CD3抗体による、0, 4, 15, 24, 48及び72時間の100,000個のJurkat細胞/ウェルの刺激、及び段落【0071】に記載のフローサイトメーターによるCD69発現の分析。

【0076】

特定の実施形態によれば、(iia)及び/又は(lia)に従ってのT-細胞活性化の前記誘発は、IgG形式での前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるIL-2分泌の刺激を決定することにより決定される。

【0077】

特定の実施形態によれば、次の条件が、実施例4に示されるようにして使用される：5 µg/mlの濃度でのIgG形式での前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるJurkat細胞（200,000個の細胞/ウェル）の下記4種の異なったアッセイ設定を用い

10

20

30

40

50

ての刺激：(a) 3倍高い濃度の抗-IgG抗体(対照：ウサギ抗-マウスIgG抗体(JacksonImmuno Research、カタログ番号315-005-008)と架橋する、OKT3(BiLegend、カタログ番号317302)又はTR66(Novus Biologicals、カタログ番号NB P-97446))の添加により架橋された、IgG形成での前記単離抗体又はその機能的フラグメントによるJurkat細胞の刺激；(b) 架橋抗体の不在下でのT-細胞活性化；(c) 一晚のインキュベーションによる組織培養プレート上への前記架橋抗体の固定化；(d) 架橋抗体の不在下での一晚のインキュベーションによる組織培養プレート上へのIgG形式での前記単離抗体又はその機能的フラグメント(又は対照抗体)の固定化；各設定においては、添加の1時間後、10ng/mlのPMAによる細胞の刺激及び24、48及び72時間後での上清液の収集、IL-2放出の測定、市販のELISA(Biolegend、カタログ番号431801)を用いての定量化を伴う。

【0078】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、(i)ウサギ抗体又はその機能的フラグメント、又は(ii)(i)の前記ウサギ抗体又はその機能的フラグメントをヒト化することに得られる抗体又はその機能的フラグメントである。

【0079】

ウサギ抗体のヒト化のための方法は、当業者の誰にでも良く知られている(例えば、Borras et al., J Biol Chem. 2010 Mar 19;285(12):9054-66; Rader et al, The FASEB Journal, express article 10.1096/fj.02-0281 fje, published online October 18, 2002; Yu et al (2010) A Humanized Anti-VEGF Rabbit Monoclonal Antibody Inhibits Angiogenesis and Blocks Tumor Growth in Xenograft Models. PLoS ONE 5(2): e9072. doi: 10.1371/journal.pone.0009072を参照のこと)。

【0080】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20、特に配列番号4、6、及び10、より特定には配列番号10に存在する、1つのCDR1、1つのCDR2及び1つのCDR3領域の組合せを含むVHドメイン(特に、前記VHドメインは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20、特に配列番号4、6、及び10、より特定には配列番号10に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含む)、及び配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9に存在する、1つのCDR1、1つのCDR2及び1つのCDR3領域の組合せを含むVLドメイン(特に、前記VLドメインは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含む)を含む抗原-結合領域を含む。特定の実施形態によれば、VLドメインは、配列番号21に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含み、そしてVHドメインは、配列番号22に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含む。他の特定の実施形態によれば、VLドメインは、配列番号21に存在するフレームワークドメインの変異体であるフレームワークドメインを含み、そして/又はVHドメインは、配列番号22に存在するフレームワークドメインの変異体、特に配列番号21及び/又は22に存在するその対応するヒト受容体アミノ酸残基の代わりに、1又は2以上の非ヒトドナーアミノ酸残基、特に配列番号1-20から選択された配列の1つに存在するドナーアミノ酸残基を含む変異体であるフレームワークドメインを含む。

【0081】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20、特に配列番号4、6、及び10、より特定には配列番号10の1つに存在する、CDR1、CDR2及びCDR3の組合せを含むVHドメイン(特に、前記VHドメインは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20、特に配列番号4、6、及び10、より特定には配列番

号10の1つに存在するフレームワークドメインの組合せを含む)、及び配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9の1つに存在する、CDR1、CDR2及びCDR3の組合せを含むVLドメイン(特に、前記VLドメインは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9の1つに存在するフレームワークドメインの組合せを含む)を含む抗原-結合領域を含む。特定の実施形態によれば、VLドメインは、配列番号21に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含み、そしてVHドメインは、配列番号22に存在するフレームワークドメインから選択されたフレームワークドメインを含む。他の特定の実施形態によれば、VLドメインは、配列番号21に存在するフレームワークドメインの変異体であるフレームワークドメインを含み、そして/又はVHドメインは、配列番号22に存在するフレームワークドメインの変異体、特に配列番号21及び/又は22に存在するその対応するヒト受容体アミノ酸残基の代わりに、1又は2以上の非ヒトドナーアミノ酸残基、特に配列番号1-20から選択された配列の1つに存在するドナーアミノ酸残基を含む変異体であるフレームワークドメインを含む。

10

【0082】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20、特に配列番号4、6、及び10、より特定には配列番号10から選択されたVHドメイン、及び配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9から選択されたVLドメインを含む抗原-結合領域を含む。他の特定の実施形態によれば、VHドメインは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20、特に配列番号4、6、及び10、より特定には配列番号10から選択されたVHドメインの変異体であり、そして/又はVLドメインは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9から選択されたVLドメインの変異体、特にフレームワークドメイン、及び/又は抗原結合に関与しないCDR残基に、1又は2以上のアミノ酸残基置換を含む変異体である。

20

【0083】

高く保存された残基(特に、一定に維持される)及び多彩な配列位置(特に、その位置で天然において見出される残基の1つにより修飾され得る)の存在について相同配列群の分析を包含する、相同アミノ酸残基による、置換のために適切なフレームワーク領域におけるアミノ酸残基の同定方法は、当業者に良く知られている。

30

【0084】

抗体結合ドメインの構造、特に抗原-相互作用残基(特に、一定に維持される)及び抗原と接触して存在しない配列位置(修飾され得る)の存在について抗原との複合体中の抗体結合ドメインの構造の分析を包含する、相同アミノ酸残基による、置換のために適切なCDR領域におけるアミノ酸残基の同定方法は、当業者に良く知られている。

【0085】

特に他の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、及び22、特に配列番号4、6、10及び22、より特定には配列番号10及び22から選択されたVHドメイン、及び配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、及び21、特に配列番号3、5、9及び21、より特定には配列番号9及び21から選択されたVLドメインを含む抗原-結合領域を含む。他の特定の実施形態によれば、VHドメインは、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、及び22、特に配列番号4、6、10及び22、より特定には配列番号10及び22から選択されたVHドメインの変異体であり、そして/又はVLドメインは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、及び21、特に配列番号3、5、9及び21、より特定には配列番号9及び21から選択されたVLドメインの変異体、特にフレームワークドメイン、及び/又は抗原

40

50

結合に関与しないCDR残基に、1又は2以上のアミノ酸残基置換を含む変異体である。

【0086】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、配列番号1/配列番号2; 配列番号3/配列番号4; 配列番号5/配列番号6; 配列番号7/配列番号8、配列番号9/配列番号10、配列番号11/配列番号12、配列番号13/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/配列番号20、特に配列番号3/配列番号4; 配列番号5/配列番号6; 及び配列番号9/配列番号10、より特定には配列番号9/配列番号10から選択されたVH/VLドメイン組合せを含む抗原-結合領域を含む。特に他の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、配列番号1/配列番号2; 配列番号3/配列番号4; 配列番号5/配列番号6; 配列番号7/配列番号8、配列番号9/配列番号10、配列番号11/配列番号12、配列番号13/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/配列番号20、特に配列番号3/配列番号4; 配列番号5/配列番号6; 及び配列番号9/配列番号10、より特定には配列番号9/配列番号10から選択されたVH/VLドメイン組合せの変異体を含む抗原-結合領域を含み、ここでそのような変異体においては、少なくともVL又はVHドメインは、列挙されるVL/VHドメインの変異体である。

10

【0087】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的にフラグメントは、配列番号21/配列番号22のVH/VLドメイン組合せを含む抗原-結合領域を含む。別の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、配列番号21/配列番号22のVH/VLドメイン組合せを含む抗原-結合領域の変異体を含み、ここでそのような変異体においては、少なくともVL又はVHドメインは、列挙されるVL/VHドメインの変異体である。

20

【0088】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、本明細書に開示される配列の変異体である抗原-結合領域を含む。従って、本発明は、配列番号1-20を含む、単離抗体又はその機能的フラグメントの性質、特に配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18又は20、特に配列番号4、6及び10、より特定に配列番号10に含まれるCDR領域とCDR領域における少なくとも60%の配列同一性、特に少なくとも70%の配列同一性、より特定には少なくとも80%の配列同一性、及び最も特定には、少なくとも90%の配列同一性、及び/又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20、特に配列番号4、6、及び10、より特定には配列番号10に含まれるCDR領域とCDR領域における少なくとも80%の配列同一性、より特定には少なくとも90%の配列同一性、及び最も特定には少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖アミノ酸配列、及び/又は配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9に含まれるCDR領域とCDR領域における少なくとも60%の配列同一性、特に少なくとも70%の配列同一性、より特定には少なくとも80%の配列同一性、及び最も特定には、少なくとも90%の配列同一性、及び/又は配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、及び19、特に配列番号3、5、及び9、より特定には配列番号9に含まれるCDR領域とCDR領域における少なくとも80%の配列同一性、より特定には少なくとも90%の配列同一性、最も特定には少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖アミノ酸配列を含む、セクション[0042]、[0047]及び[0054] [0061]に定義される性質の1又は2以上の性質を有する単離抗体又はその機能的フラグメントを包含する。例えば、相同性検索マトリックス、例えばBLOSUM (Henikoff, S. & Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919)を用いることによる配列同一性の決定方法、及び相同性に従っての配列の分類方法は、当業者に良く知られている。

30

40

【0089】

50

特定の実施形態によれば、そのような変異体は、配列番号 19 の V L 配列に従っての C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の配列の組を含む V L 配列、及び / 又は配列番号 20 の V H 配列に従っての C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 の配列の組を含む V H 配列を含み、ここで各場合、配列番号 19 及び / 又は 20 におけるすべての縮重位置「X」で示される、それらの示されるアミノ酸残基が選択される。例えば、配列番号 19 の C D R 1 において「X (S / N)」として示される各位置の場合、任意のそのような変異体は、それらの対応する位置で、アミノ酸残基「S」又はアミノ酸残基「N」の何れかを含む。

【 0 0 9 0 】

特定の他の実施形態によれば、そのような変異体は、配列番号 19 の配列に従っての V L 配列、及び / 又は配列番号 20 の配列に従っての V H 配列を含み、ここで各場合、配列番号 19 及び / 又は 20 におけるすべての縮重位置「X」で示される、それらの示されるアミノ酸残基が選択される。例えば、配列番号 19 のフレームワーク 1 における「X (P / A)」として示される位置の場合、任意のそのような変異体は、その位置でアミノ酸残基「P」又はアミノ酸残基「A」の何れかを含む。

10

【 0 0 9 1 】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、セクション [0078]-[0080]、及び [0083]-[0085] の抗原 - 結合領域をヒト化することにより得られる抗原 - 結合領域を含む。

【 0 0 9 2 】

第 7 の態様によれば、本発明は、セクション [0078]-[0080]、[0083]-[0085] 及び [0089] の単離抗体又はその機能的フラグメントと実質的に同じエピトープに結合する、単離された結合分子、特に単離抗体又は機能的フラグメントに関する。

20

【 0 0 9 3 】

特定の実施形態によれば、前記単離抗体又はその機能的フラグメントは、カニクイザル C D 3、特にカニクイザル C D 3 と交差反応性であり、特にヒト C D 3 の親和性とは、100 倍未満、特に 30 倍未満、さらにより特定には 15 倍未満、及び最も特定には 5 倍未満、異なる、カニクイザル C D 3 に対する親和性を有する。

【 0 0 9 4 】

第 8 の態様によれば、本発明は、本発明の結合分子、特に単離抗体又はその機能的フラグメント、及び任意には、医薬的に許容できる担体及び / 又は賦形剤を含む医薬組成物に関する。

30

【 0 0 9 5 】

第 9 の態様によれば、本発明は、本発明の結合分子、特に単離抗体又はその機能的フラグメントをコードする核酸配列又はその集合物に関する。

【 0 0 9 6 】

第 10 の態様によれば、本発明は、本発明の核酸配列又はその集合物を含むベクター又は該ベクターの集合物に関する。

【 0 0 9 7 】

第 11 の態様によれば、本発明は、本発明の核酸配列又はその集合物、又は本発明のベクター又はその集合物を含む宿主細胞、特に発現宿主に関する。

40

【 0 0 9 8 】

第 12 の態様によれば、本発明は、本発明の結合分子、特に単離抗体又はその機能的フラグメントの生成方法に関し、ここで前記方法は、本発明の核酸配列又はその集合物、又は本発明のベクター又はその集合物、又は本発明の宿主細胞、特に発現宿主細胞を発現する工程を含んで成る。

【 0 0 9 9 】

第 13 の態様によれば、本発明は、本発明の単離抗体又はその機能的フラグメントの生成方法に関し、ここで前記方法は、下記工程：

a) 宿主細胞の表面上にネイティブ完全長 C D 3 を提供するために、C D 3 - 発現プラスミドによるウサギの免疫化；

50

b) 蛍光活性化細胞選別を用いての、CD3 / 一本鎖と相互反応する親和性成熟記憶B細胞のクローン単離；

c) 選別されたクローンの不死化を必要としない、共培養システムにおける単一の選別されたB細胞の培養；

d) T細胞の表面上のTCR複合体に埋封されたネイティブCD3 に結合する抗体を同定するために、特に細胞ベースのELISAによる、B細胞培養上清液のスクリーニングの工程を含んで成る。

【0100】

第14の態様によれば、本発明は、CD3 とCD3 との間のインターフェースに配置されず、そしてT細胞上に発現されるネイティブTCRに関して抗体によりまだ結合され得る、CD3 のアミノ酸残基を独占的に含むヒトCD3 の特定エピトープに関し、ここで本発明の架橋された抗体によるその結合は、1.25 μg/mlのIgG濃度での刺激の24時間後、抗体OKT-3又はTR66よりも少なくとも1.5倍、強いT-細胞活性化を誘発し；(iib) 1.25 μg/mlのIgG濃度での刺激の72時間後、CD69発現において少なくとも1.5倍高い増加により示されるように、抗体OKT-3又はTR66と比べて、長く持続するT-細胞活性化をもたらす；そして/又は(icc) T細胞の用量依存性均質活性化状態をもたらす。

【0101】

第15の態様によれば、本発明は、ヒトCD3 の新規エピトープに対して特異的である結合領域を含む結合分子の同定方法に関し、ここで前記方法は、(a) 結合のために重要である残基としてアミノ酸残基N4を含む、ヒトCD3 のエピトープに対して特異的である結合領域を含む少なくとも1つの結合分子を、ヒトCD3 に結合する1又は2以上の分子から選択する工程を含んで成る。

【0102】

特定の実施形態によれば、工程(a)は、それぞれのCD3 - 結合体の重要な線状結合領域を同定するために、CD3 のN末端部分に及ぶオーバーラップペプチドを用いてエピトープマッピングを実施することにより行われる。工程(b)においては、この線状結合領域の誘導体が生成され、ここでそれぞれ各位置で、野生型アミノ酸が、(i)アラニン、又は(ii)天然のアミノ酸(システインを除く)の何れかにより、別々に置換される。得られるペプチドライブラリーは、結合のための各位置の関連性を評価するために、実施例7及び8に記載されるELISAの使用により、スクリーンをされる。

【実施例】

【0103】

次の実施例は、本発明のを例示するもので、その範囲を制限するものではない。

【0104】

本明細書に記載される本発明のために使用されるアプローチは、T細胞刺激抗体を同定するために、成功の確率を高める段階的手順である。このアプローチは、次の手順を包含する：

a) ウサギ抗体は一般的に、齧歯類に比較して、より高いクローン多様性を示すので、免疫化のための宿主としてのウサギの使用。従って、ウサギの使用は、特定のエピトープに対する結合体を同定する確立を高め、そして新規エピトープの同定の確立を増強する。

b) 宿主細胞の表面上にネイティブ完全長CD3 を提供するために、CD3 - 発現プラスミドによるウサギの免疫化。このアプローチは、完全長CD3 に対する強い免疫応答を導き、そしてCD3 及びCD3 に同時に結合する抗体の生成を回避する。

c) 蛍光活性化細胞選別を用いて、CD3 / 一本鎖と相互作用する親和性成熟記憶B-細胞のクローン単離。この方法は、CD3 をCD3 との間のインターフェースに結合する抗体の選択を回避し、それにより、選択の特異性を高める。

d) 選別されたクローンの免疫化を必要とせず、それにより、ハイブリドーマ手順の不良な効率を克服する、共培養システムにおける単一の選別されたB細胞の培養。

e) T細胞の表面上のTCR複合体に埋封されたネイティブCD3 に結合する抗体を

10

20

30

40

50

同定するために、細胞ベースの E L I S A における B 細胞培養上清液のスクリーニング。

【 0 1 0 5 】

実施例 1 : C D 3 上の T 細胞 - 刺激性エピトープに結合するモノクローナル抗体の同定及び選択

C D 3 に結合するウサギ記憶 B 細胞を、蛍光活性化細胞選別を用いて、1つの免疫化されたウサギから単離した。C D 3 及び C D 3 のインターフェースに結合する抗体を排除するために、柔軟ペプチドリンカー (s c C D 3) により連結される、C D 3 及び C D 3 の細胞外ドメインから成る、フィコエリトリン (P E) - 標識された一本鎖タンパク質コンストラクトを使用した。P E - s c C D 3 に結合する 4 , 2 7 0 の記憶 B 細胞を、96 ウェル培養プレート中に個々に選別し、そして他の場所に公開された条件で培養した (Lightwood et al, JIM 2006; 316: 133-143)。まず最初に、すべての培養上清液を、s c C D 3 への結合のために E L I S A によりスクリーンし、これにより、441 のヒットをもたらした。第 2 のスクリーニングにおいて、最初のスクリーニングからの陽性上清液を、Jurkat 細胞の表面上の T C R 複合体に埋封されたネイティブ C D 3 を結合するそれらの能力について試験した (下記方法を参照のこと)。合計 22 のヒットが、C D 3 発現 Jurkat 細胞への結合を示したが、しかし c d 3 - / - Jurkat 細胞への結合は示さなかった。ヒト及びカニクイザル起源のヘテロダイマー C D 3 の精製された細胞外ドメインへの親和性を、22 のヒットに関して、S P R を用いて測定した。K_D により表されるように、ヒト C D 3 への親和性は、0 . 1 6 - 9 . 2 8 n M の範囲であった (データは示されていない)。スクリーニングヒットの 1 つは、S P R による結合を示されず、そして従って、さらなる分析のためには見なされなかった。

10

20

【 0 1 0 6 】

残る 21 のクローンの可変ドメインをコードする D N A 配列を、R T - P C R 及び D N A 配列決定により検索し、そして 18 の独立したクローンをもたらした。それらのウサギ I g G を、哺乳類発現システム下で組換え的に生成し、そしてヒト及びカニクイザル起源の s c C D 3 への親和性及び Jurkat 細胞に結合するそれらの能力について特徴づけた。それらの 18 の配列の系統発生的配列分析は、2つの主要クラスターを示し、それらはお互い明確に異なるが、ところが 2つのクラスター内に有意な相同性が存在した (図 1)。1つのクラスターからのすべての代表物はたぶん、同じ抗原 - 結合親 B 細胞由来であるので、それらはたぶん、同じエピトープに結合する。従って、最大の多様性をカバーするために、最も多様なクローンを、T 細胞を結合し、そして活性化するそれらの能力について、さらに試験された 12 のクローンをもたらす各クラスターから選択した。T 細胞を、細胞ベースの E L I S A により評価し、そして T 細胞刺激を、F A C S により C D 6 9 の発現を測定することにより定量化した。代表的抗体をさらに、実施例 2 - 4 に示されるようにして、特徴づけた。

30

【 0 1 0 7 】

実施例 2 : Jurkat T 細胞及びカニクイザル H S C - F T 細胞への精製されたモノクローナルウサギ抗 - C D 3 抗体の結合

Jurkat ヒト T 細胞及びカニクイザル H S C - F T 細胞を、方法セクションに記載のようにして、上昇する濃度の精製されたモノクローナルウサギ抗体と共にインキュベートした。試験されるすべての抗体に関して、ヒト C D 3 に対する特異的結合は、抗体濃度の上昇と共に上昇した (図 2)。Jurkat ヒト T 細胞への最大結合の半分を示す E C₅₀ 値は、すべての抗体に関して非常に類似し、0 . 2 8 ~ 1 . 8 7 n M の範囲であった (表 1 を参照のこと、これは、精製されたモノクローナルウサギ抗体の薬力学的特性を示す。C D 6 9 発現の定性的検出のために、幾何学的平均でシグナル強度に影響を及ぼす平均蛍光強度 (M F I) を、負の対照及び試験抗体の両者のために測定した。標準化された M F I を、負の対照抗体の M F I を介して試験抗体の M F I を割算することにより計算した。) カニクイザル H S C - F T 細胞への結合についての E C₅₀ 値が、3種の抗体 (クローン - 0 6、クローン - 0 2、クローン - 0 3) について示されている (表 2 C を参照のこと)。

40

50

【表 1】

表 1

クローンID	SPR データ ヒト CD3ge			SPR データ マウス CD3ge			Jurkat 細胞に対する特異的結合性		CD69 発現の増加倍数： [陰性対照に対し標準化された MF]			
	ka [M ⁻¹ s ⁻¹]	kd [s ⁻¹]	KD [M]	ka [M ⁻¹ s ⁻¹]	kd [s ⁻¹]	KD [M]	EC50 (nM)	相対 EC50 (EC50, クローン 5 / EC50, 試験)	20 µg/ml 抗-CD3 IgG	5 µg/ml 抗-CD3 IgG	1.25 µg/ml 抗-CD3 IgG	ND
クローン-01	5.36E+05	1.59E-03	2.97E-09	3.86E+05	3.92E-03	1.02E-08	0.58	0.88	ND	ND	ND	ND
クローン-02	8.69E+05	2.64E-04	3.04E-10	6.68E+05	2.58E-03	3.86E-09	0.71	0.59	7.4	4.6	3.3	3.3
クローン-03	5.51E+05	4.98E-04	9.05E-10	3.50E+05	4.03E-03	1.15E-08	1.45	0.37	6.6	4.6	2.6	2.6
クローン-04	8.73E+05	9.88E-05	1.13E-10	6.46E+05	2.66E-03	4.12E-09	1.87	0.29	7.8	3.5	2.6	2.6
クローン-06	6.18E+05	1.38E-03	2.23E-09	4.44E+05	3.97E-03	8.95E-09	0.67	0.76	5.3	5.1	2.7	2.7
クローン-09	6.01E+05	6.88E-04	1.14E-09	2.32E+05	2.69E-03	1.16E-08	0.82	0.90	ND	ND	ND	ND
クローン-10	7.57E+05	1.26E-03	1.66E-09	3.21E+05	3.49E-03	1.09E-08	0.35	2.10	6.2	4.2	2.6	2.6
クローン-11	4.25E+05	1.33E-03	3.13E-09	3.63E+05	3.65E-03	1.00E-08	0.28	2.39	ND	ND	ND	ND
クローン-12	7.21E+05	7.98E-04	1.11E-09	1.42E+05	3.14E-03	2.22E-08	0.59	1.14	ND	ND	ND	ND
OKT3	ND			ND			ND		3.1	2.5	1.8	1.8
TR66	ND			ND			ND		3.0	2.2	1.6	1.6

【表 2】

表 2 A :

クローン ID	KD(ヒト)/KD(カニクイザル)
クローン-01	3
クローン-02	13
クローン-03	13
クローン-04	36
クローン-06	4
クローン-09	10
クローン-10	7
クローン-11	3
クローン-12	20

10

【 0 1 0 9 】

【表 3】

表 2 B :

クローン ID	ヒト CD 3 ε に対する親和性 [KD]	カニクイザル CD 3 ε に対する親和性 [KD]
クローン-06	$2.23 \times 10^{-9} \text{M}$	$8.95 \times 10^{-9} \text{M}$
クローン-02	$3.04 \times 10^{-10} \text{M}$	$3.86 \times 10^{-9} \text{M}$
クローン-03	$9.05 \times 10^{-10} \text{M}$	$1.15 \times 10^{-8} \text{M}$

20

【 0 1 1 0 】

【表 4】

表 2 C : 細胞表面へのウサギ Ig G 結合

クローン ID	ヒト Jurkat T 細胞への結合 [EC ₅₀]	カニクイザル HSC-F T 細胞への結合 [EC ₅₀]
クローン-06	0.67nM	1.6nM
クローン-02	0.71nM	3.82nM
クローン-03	1.45nM	23.9nM

30

40

【 0 1 1 1 】

実施例 3 : T 細胞上の CD 6 9 発現を刺激する、精製されたモノクローナルウサギ抗 - CD 3 抗体の可能性

CD 6 9 発現の測定 (方法を参照のこと) により評価されるように、T - 細胞活性化を誘発する、精製されたモノクローナルウサギ抗 - CD 3 抗体の可能性を、公開されている抗体 OKT - 3 及び TR 6 6 と比較した。第 1 のアプローチによれば、3 種の異なる濃度の架橋された抗体を用いて、Jurkat 細胞を刺激し、そして CD 6 9 発現を、24 時間後、フローサイトメトリーにより評価した。CD 6 9 発現の有意な上昇が、 $1.25 \mu\text{g}/\text{ml}$ で、すべての試験された抗体により観察された (図 3 及び表 I)。興味深いことには、すべての試験されたウサギ抗体は、公開されている OKT - 3 及び TR 6 6 よりも、C

50

D 6 9 発現のより強い刺激を示した。これは、ウサギ抗体が、従来技術によれば、連続的にトリガーし、そして T C R シグナル伝達を増強するそれらの能力に負の影響を及ぼさずである O K T - 3 又は T R 6 6 よりも、より高い親和性でヒト s c C D 3 に結合するので、予測外である。上昇する濃度のウサギ抗体により、C D 6 9 発現レベルはさらに上昇し、ところが、上昇する濃度の O K T - 3 又は T R 6 6 により、C D 6 9 発現の単に中程度の上昇が存在した。さらに、ウサギ抗体により、ヒストグラムのピークが狭くなり、このことは、T 細胞のより均質な集団を示し、すべては同様に高レベルで C D 6 9 を発現した。対照的に、試験された各濃度で O K T - 3 又は T R 6 6 により刺激された T 細胞集団において C D 6 9 発現レベルの広範囲な分布が存在した。用量に依存して、明確で且つ均質な T 細胞活性化レベルをもたらす抗体は、効能を最適化し、そして副作用を制限するために良好な用量調節を可能にする。

10

【 0 1 1 2 】

第 2 のアプローチによれば、抗 - C D 3 抗体により異なった時点での刺激の後の T - 細胞活性化を分析した。Jurkat 細胞を、架橋された抗体により刺激し、そして C D 6 9 発現を、0, 4, 15, 24, 48 及び 72 時間後、上記のようにして評価した (図 4)。

【 0 1 1 3 】

実施例 4 : Jurkat T 細胞及び C H O - I L 5 R 細胞への抗 - C D 3 × 抗 - I L 5 R 抗体の結合

アゴニスト性抗 - C D 3 抗体の効果を示すために、1 組の二重特異性抗 - C D 3 × I L 5 R 一本鎖ダイアボディ (diabodies) (scDb) を、標準方法により構成した (方法 / データは示されたいない ; コンストラクト 1 = クローン - 0 6 のヒト化された可変ドメインを含む ; コンストラクト 2 = クローン - 0 2 のヒト化された可変ドメインを含む ; コンストラクト 3 = クローン - 0 3 のヒト化された可変ドメインを含む)。

20

【 0 1 1 4 】

Jurkat T 細胞及び I L 5 R - 発現 C H O 細胞 (C H O - I L 5 R) を、方法セクションに記載のようにして、1 μ g / m l 及び 10 μ g / m l の s c D b と共にインキュベートした。試験されるすべての s c D b に関して、C D 3 及び I L 5 R 発現細胞系に対する特異的結合が検出されたが、しかし対照細胞系に対する非特異的結合は検出されない。抗 - C D 3 成分とは異なるが、同一の抗 - I L 5 R 成分を含む 3 種の異なった s c D b (コンストラクト 1 - 3) を、I L 5 R 又は C D 3 の何れかを発現する細胞に対する特異的結合について試験した。抗 - C D 3 部分は、可変性親和性を有する重複エピトープに結合する (表 1 及び 3、及び図 7)。予想されるように、C H O - I L 5 R 細胞への結合は、試験されたすべての s c D b に関して、類似した (図 8)。対照的に、Jurkat T - 細胞への結合は、C D 3 結合ドメインの親和性の低下と共に、低下した。Jurkat T - 細胞への結合が、試験される最高濃度で低親和性結合体コンストラクト 3 については検出されなかった (図 8)。

30

【 0 1 1 5 】

実施例 5 : T 細胞からの I L - 2 分泌を刺激する、二重特異的抗 - C D 3 × I L 5 R s c D b の可能性

T - 細胞活性化を誘発する、標的細胞に結合される s c D b の可能性を、ヒト血液から精製された細胞毒性 T - 細胞による I L - 2 分泌の測定 (方法を参照のこと) により評価することができる。異なった s c D b を、10 : 1 のエフェクター : 標的細胞比で、標的発現 C H O - I L 5 R 細胞の存在下で C D 8 + 細胞毒性 T - 細胞と共にインキュベートし、そして I L - 2 分泌を、16 時間のインキュベーションの後、分析する。I L - 2 分泌の用量依存性刺激が、C H O - I L 5 R 細胞の存在下で観察されるが、ところが I L - 2 分泌は、野生型 C H O 細胞の存在下では実質的に観察されない (表 3 及び図 9) における代表的データを参照のこと)。従って、T - 細胞活性化は、標的発現細胞の不在下で特異的に誘発される。さらに、I L - 2 分泌を誘発する可能性は、組換え的に生成された C D 3 への結合親和性及び T - 細胞に結合する能力と相関する。親和性分析と一致して、最高の親和性を有する結合体であるコンストラクト 1 は、コンストラクト 2 よりも、I L -

40

50

2分泌のより有能なインヂューサーであり、ところがIL2分泌は、低親和性s c D bコンストラクト3には観察されない(図9)。

【表5】

表3：IL5R×CD3 s c D b形式でのヒト化抗-CD3εドメイン

クローンID	親和性ヒトCD3ε [KD]	標的細胞を溶解する効能 [EC ₅₀]	T細胞によるIL-2を刺激する効能 [EC ₅₀]
クローン-06	1.15×10 ⁻⁸ M	0.1nM	0.96nM
クローン-02	2.96×10 ⁻⁸ M	0.96nM	5.67nM
クローン-03	1.23×10 ⁻⁷ M	溶解なし	シグナルなし

10

【0116】

実施例6：細胞毒性T-細胞による特異的s c D b介在性標的細胞溶解

抗-CD3×IL5R s c D bにより介在される細胞毒性T-細胞による標的細胞の特異的溶解を、88時間のインキュベーションの後、CellTox(登録商標)緑色細胞毒性アッセイ(方法を参照のこと)により分析する。T-細胞活性化について上記に論じられた結果に類似して、用量依存性標的細胞溶解が、CHO-IL5R細胞の存在下で、コンストラクト1及びコンストラクト2に関して観察され、ところが溶解は、野生型CHO細胞の存在下では観察されていない(表3及び図10におけるコンストラクト1-3についての代表的データを参照のこと)。上記に言及された結果と一致して、CD3に対する高い親和性を有するs c D b結合は、低い親和性のs c D bに比較して、より有能な溶解性を示す。標的細胞溶解は、低親和性s c D bコンストラクト3については観察されない。本発明者はさらに、カニクイザルCD3に対してもまた交差反応する抗体の異なったクラスター(クラスター1)に起因する追加のCD3クローン(クローン-05)のヒト化変異体を含むs c D bの標的細胞を溶解する可能性を試験した。クローン-05は、クローン-06と比較して、さらに高い親和性で結合し(それぞれ、ウサギIgG及びヒト化されたその誘導体について、KD=8.45×10⁻¹⁰M及び4.29×10⁻⁹M)、但し重要なことには、クラスター2(クローン-06、クローン-2及びクローン-02)からの結合体とは異なるエピトープに結合する。興味深いことには、本発明者は、それぞれの抗-IL5R×CD3 s c D bが、ヒト化されたクローン-06を含むs c D bよりも弱い、CHO-IL5R標的細胞(EC₅₀=9.9×10⁻⁹M)のT-細胞依存性溶解を誘発する可能性を示すことを見出し、このことは、クローン-06のエピトープが特に標的細胞を溶解する細胞毒性T細胞の再方向付けのために適していることを示唆する。OKT-3及びTR66に対するクラス2からの架橋された親IgGの卓越した効能(実施例3)は、s c D b形式で試験されたそれらの親和性よりも高い親和性でさえ、親和性の最適性は、見出されず、その後、効力は低下するであろうことを確認する。

20

30

【0117】

実施例7：エピトープマッピング及びファイン-マッピング

エピトープマッピング及びファイン-マッピングを、記載のようにして実質的に実施した(Timmerman et al., Functional reconstruction and synthetic mimicry of a conformational epitope using CLIPS™ technology. J. Mol. Recognit. 20 (2007) 283-99; Slootstra et al., Structural aspects of antibody antigen interaction revealed through small random peptide libraries, Molecular Diversity 1: 87 (1996) 96)。手短に言えば、CLIPS技法は、ペプチドを、定義された立体構造に固定する。これは、最も複雑な結合部位の機能的模倣をもたらす。CLIPS技法は現在、日常、単一、二重又は三重ループ構造、及びシート及びヘリックス様折りたたみにペプチドライブラリーを成形するために使用される。

40

50

) ベンゼンの 0.5 mM の溶液を、炭酸水素アンモニウム (20 mM、pH 7.9) / アセトニトリル (1:1 (v/v)) に溶解する。この溶液を、ペプチドアレイ上に添加する。CLIPS 鑄型は、ペプチドアレイの固相結合ペプチドに存在するような 2 つのシステインの側鎖に結合するであろう (3 μ l のウェルを有する 455 のウェルプレート)。ペプチドアレイを、完全に溶液で覆いながら、30 ~ 60 分間、溶液中で軽く振盪する。最後に、ペプチドアレイを、過剰の水により十分に洗浄し、そして PBS (pH 7.2) 中、1% の SDS / 0.1% の β -メルカプトエタノールを含む破壊緩衝液下で 70 $^{\circ}$ C で 30 分間、音波処理し、続いて水中において、さらに 45 分間、音波処理する。T3 CLIPS 担持ペプチドを、類似する手段で、但し 3 個のシステインを用いて製造した。

【0121】

10

ELISA スクリーニング

各アレイへの抗体の結合を、一次抗体溶液と共にインキュベートした (4 $^{\circ}$ C で一晩)。洗浄の後、ペプチドアレイを、抗体ペルオキシダーゼ接合体 (SBA, cat.nr.2010 05) の 1/1000 希釈溶液と共に、25 $^{\circ}$ C で 1 時間、インキュベートした。洗浄の後、ペルオキシダーゼ基質 2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリンスルホネート (ABTS) 及び 2 μ /ml の 3% H_2O_2 を添加した。1 時間後、発色を測定した。発色を、電荷結合素子 (CCD) カメラ及び画像処理システムにより定量化した。

【0122】

ペプチドの設計

化学的に合成された CLIPS ペプチドを、次の企画に従って、上記のようにして合成した。

20

【化 3】

第 1 セット

模倣タイプ：線状ペプチド：ヒト及びカニクイザル配列の両方についての線状ペプチドの 2 つのセット。長さは、14 の重なりを有する 15 個の残基である。このセットの 2 つ目は、2 つのアラニン変異を特徴とする（灰色で示される）。

配列（下記の最初の 10 個がヒト配列）

```

DGNEEMGGITQTPYK                                     10
GNEEMGGITQTPYKV
NEEMGGITQTPYKVS
EEMGGITQTPYKVSI
EMGGITQTPYKVSIS
MGGITQTPYKVSISG
GGITQTPYKVSISGT
GITQTPYKVSISGTT
ITQTPYKVSISGTTV
TQTPYKVSISGTTVI

```

```

DGNEEMGGITAAAPYK                                     20
GNEEMGGITQAAAYKV
NEEMGGITQTAARKVS
EEMGGITQTPAAVSI
EMGGITQTPYAAASIS
MGGITQTPYKAAISG
GGITQTPYKVAASGT
GITQTPYKVSAAAGTT
ITQTPYKVSIAAATTV
TQTPYKVSISAATVI

```

30

【化4】

第2セット

模倣タイプ：荷電を付加された線状ペプチド

説明：ペプチドアレイ表面と強く相互作用するいくつかの抗体に必要とされる荷電を付加された対照セット

配列（下記の最初の10個がヒト配列）

EDGNEEMGGITQTPYK	10
EEMGGITQTPYKVSI	
EGGITQTPYKVSISGT	
ETQTPYKVSISGTTVI	
EPYKVSISGTTVILTC	
EVSISGTTVILTCPOY	
ESGTTVILTCPOYPGS	
ETVILTCPOYPGSEIL	
ELTCPQYPGSEILWQH	
EPQYPGSEILWQHNDK	
KDGNEEMGGITQTPYK	20
KEEMGGITQTPYKVSI	
KGGITQTPYKVSISGT	
KTQTPYKVSISGTTVI	
KPYKVSISGTTVILTC	
KVSISGTTVILTCPOY	
KSGTTVILTCPOYPGS	
KTVILTCPOYPGSEIL	
KLTCPQYPGSEILWQH	
KPQYPGSEILWQHNDK	

【化5】

第3セット

模倣タイプ：コンホメーションペプチド

説明：ペプチド配列は、第1セットに類似するが、CLIPSコンホメーションループに制約される。

配列（下記の最初の10個が未修飾のヒト配列）

CDGNEEMGGITQTPYKC	40
CGNEEMGGITQTPYKVC	
CNEEMGGITQTPYKVC	
CEEMGGITQTPYKVSIC	
CEMGGITQTPYKVSISGC	
CMGGITQTPYKVSISGC	
CGGITQTPYKVSISGTC	
CGITQTPYKVSISGTTVC	
CGITQTPYKVSISGTTVC	
CTQTPYKVSISGTTVIC	

【化6】

第4セット

模倣タイプ：CLIPSコンホメーションペプチド

説明：重複する20マーのCLIPSコンホメーションペプチドのセット

配列（下記の最初の10個がヒト配列）

```

CDGNEEMGGITQTPYKVSISG
  CDNEEMGGITQTPYKVSISGTT
    GEMGGITQTPYKVSISGTTVI
      GGITQTPYKVSISGTTVILT
        GITQTPYKVSISGTTVILTSP
          QTPYKVSISGTTVILTSPQY
            PYKVSISGTTVILTSPQYPG
              KVSISGTTVILTSPQYPGSE
                SISGTTVILTSPQYPGSEIL
                  SGTTVILTSPQYPGSEILWQ
  
```

10

【化7】

20

第5セット

模倣タイプ：CLIPS不連続マトリックスペプチド

説明：ペアで二重ループCLIPS構造に制約された、13マーのペプチドの組合せセット。ヒト及びカニクイザルペプチドを、技術的変動を最少にするようなペアのアライメントに従い整列させる。

配列（最初の10個が示される）

```

CDGNEEMGGITQTPCDGNEEMGGITQTP
CDGNEEMGSITQTPGDGNEEMGSITQTP
CEEMGGITQTPYKVC DGNEEMGGITQTP
CEEMGSITQTPYQVCDGNEEMGSITQTP
GGGITQTPYKVSISGDGNEEMGGITQTP
CGSITQTPYQVSISCDGNEEMGSITQTP
GTQTPYKVSISGTTGDGNEEMGGITQTP
CTQTPYQVSISGTTGDGNEEMGSITQTP
CPYKVSISGTTVILCDGNEEMGGITQTP
CPYQVSISGTTVILCDGNEEMGSITQTP
  
```

30

40

【0123】

推定エピトープの同定

一般的に、すべての5種の抗体が、非常に類似する結果特性を示した。すべての結合は、ヒトCD3のN末端上で行われた（データは示されていない）。制限された及び制限されていないペプチドからの結合強度及び観察を考慮すれば、すべての抗体は、下記理由で、線状ペプチドに優先的に結合する可能性が高い：

- ・ N末端配列に対してのみの結合が観察された、
- ・ D2又はG3の損失は結合を強く低めない、
- ・ 2DGN4の損失は結合を完全になくす。

50

【0124】

結論

分析により、試験されたすべての5種の抗体についての結合領域を同定した。すべての抗体は、N末端上の一見直線状のエピトープに結合することが見出された。すべての抗体は、結合のために2DGN4に強く依存する類似するエピトープに結合することが見出された。

【0125】

実施例8：エピトープファイン - マッピング

方法

各位置が18種のアミノ酸（システインを除くすべての天然のアミノ酸）により置換されている、ヒト及びカニクイザルCD3 残基2 - 16及び5 - 20由来の15マーの線状アレイを、抗体によりプローブし、そしてその結合に影響を及ぼす特異性が見出された。

10

【0126】

結果

すべての抗体は、N4のための絶対的条件及びE6の関与でN末端を結合し、そして有意な類似性を共有する。すべての抗体は、コアエピトープに近接する配列における小さな差異にもかかわらず、ヒト及びカニクイザルバージョンのCD3 を結合する。

【0127】

標的タンパク質

初期マッピングは、試験されるすべての抗体のためのコアエピトープとして、CD3のN末端上に線状ストレッチを同定した。下記配列の残基2 - 20を用いて、15マーの線状ペプチドの十分な置換ライブラリーを企画した。

20

【0128】

方法

ペプチドの合成

線状ペプチドを、Hi - Sense表面のヒドロゲル上で標準Fmoc合成により合成した。保護解除及び洗浄の後、カードを、独自の洗浄緩衝液により、音波処理浴中で広範囲に洗浄した。

【0129】

ELISAスクリーニング

各合成されたペプチドへの抗体の結合を、ELISAにより試験した。ペプチドアレイを、一次抗体溶液と共にインキュベートした（4 で一晩）。洗浄の後、ペプチドアレイを、抗体ペルオキシダーゼ接合体（SBA, cat.nr.2010 05）の1 / 1000希釈溶液と共に、25 で1時間、インキュベートした。洗浄の後、ペルオキシダーゼ基質2,2 - アジノ - ジ - 3 - エチルベンズチアゾリンスルホネート（ABTS）及び2 µ / mlの3% H₂O₂を添加した。1時間後、発色を測定した。発色を、電荷結合素子（CCD）カメラ及び画像処理システムにより定量化した。

30

【0130】

ペプチドの企画

化学的に合成されたCLIPSペプチドを、次の企画に従って、上記のようにして合成した。

40

【化 8】

第1セット

模倣タイプ：線状ペプチド

説明

ヒトCD3ε 残基2-16由来の15マーの線状ペプチド。各ペプチドにおいては、残基の1つは、すべての天然に存在するアミノ酸（システインを除く）により置換され、飽和突然変異誘発ライブラリーが創造される。

配列（最初の10個が示される）

10

AGNEEMGGITQTPYK
 DGNEEMGGITQTPYK
 GGNEEMGGITQTPYK
 HGNEEMGGITQTPYK
 LGNEEMGGITQTPYK
 MGNEEMGGITQTPYK
 NGNEEMGGITQTPYK
 PGNEEMGGITQTPYK
 QGNEEMGGITQTPYK
 RGNEEMGGITQTPYK

20

【化 9】

第2セット

模倣タイプ：線状ペプチド

説明

カニクイザルCD3ε 残基2-16由来の15マーの線状ペプチド。各ペプチドにおいては、残基の1つは、すべての天然に存在するアミノ酸（システインを除く）により置換され、飽和突然変異誘発ライブラリーが創造される。

30

配列（最初の10個が示される）

AGNEEMGSITQTPYQ
 DGNEEMGSITQTPYQ
 GGNEEMGSITQTPYQ
 HGNEEMGSITQTPYQ
 LGNEEMGSITQTPYQ
 MGNEEMGSITQTPYQ
 NGNEEMGSITQTPYQ
 PGNEEMGSITQTPYQ
 QGNEEMGSITQTPYQ
 RGNEEMGSITQTPYQ

40

【化 1 0】

第3セット

模倣タイプ：線状ペプチド

説明

ヒトCD3ε残基5-20由来の15マーの線状ペプチド。各ペプチドにおいては、残基の1つは、すべての天然に存在するアミノ酸（システインを除く）により置換され、飽和突然変異誘発ライブラリーが創造される。

配列（最初の10個が示される）

10

```

AEMGGITQTPYKVSI
DEMGGITQTPYKVSI
GEMGGITQTPYKVSI
HEMGGITQTPYKVSI
LEMGGITQTPYKVSI
MEMGGITQTPYKVSI
NEMGGITQTPYKVSI
PEMGGITQTPYKVSI
QEMGGITQTPYKVSI
REMGGITQTPYKVSI

```

20

【0 1 3 1】

【化 1 1】

第4組

模倣タイプ：線状ペプチド

説明

カニクイザルCD3ε残基5-20由来の15マーの線状ペプチド。各ペプチドにおいては、残基の1つは、すべての天然に存在するアミノ酸（システインを除く）により置換され、飽和突然変異誘発ライブラリーが創造される。

30

配列（最初の10個が示される）

```

AEMGSITQTPYQVSI
DEMGSITQTPYQVSI
GEMGSITQTPYQVSI
HEMGSITQTPYQVSI
LEMGSITQTPYQVSI
MEMGSITQTPYQVSI
NEMGSITQTPYQVSI
PEMGSITQTPYQVSI
QEMGSITQTPYQVSI
REMGSITQTPYQVSI

```

40

【0 1 3 2】

サンプルの比較

すべての5種の抗体は、N4を絶対的に必要とすることにより（唯一ヒスチジンにより取って代わられる）、及びE6のための高い優先を伴って（このためには、制限された置換が許容されるが、しかしながら、グルタミン酸がその位置での最も好ましい残基である

50

)、非常に類似する態様で、CD3 N末端のヒト及びカニクイザル変異体由来の線状ペプチドに結合する。何れの抗体も、残基5 - 20に及びペプチドには結合しなかった。5種のこのグループ内で、3種の抗体(クローン2、クローン3及びクローン4)が他の2種(クローン6及びクローン10)よりも、前者の3種のグループはまた、G3、E5、及び/又はG8の置換に対してより敏感であることから、カニクイザル配列における突然変異に対してより敏感である。この観察は、SPRにより決定されるように、タンパク質のヒト及びカニクイザル形についての親和性の差異と一致する(表1を参照のこと)。

【0133】

結論

この分析は、N4及びE6の絶対的必要性を伴って、N末端を結合し、そして有意な類似性を共有する、5種の抗体のエピトープをファインマッピングした。すべての抗体は、コアエピトープに隣接する配列における小さな差異にかかわらず、CD3のヒト及びカニクイザルバージョンに結合する。

【0134】

一般的方法:

一次配列分析

その対応するH鎖及びL鎖可変ドメイン(VL及びVH)の得られる配列情報を、配列相同性に従って、整列し、そしてグループ分けした。ウサギ可変ドメインの組を、ユニーククローン及びユニーク組のCDRを同定するために分析した。VL及びVHドメインの組合わされたアライメントを、ユニーククローンを同定するために、両ドメインの結合アミノ酸配列に基づいて実施した。可変ドメインのアライメントの他に、各ウサギIgGクロンの6個の相補性決定領域(CDR)の配列組を、ユニーク組のCDRを同定するために、異なったクローン間で比較した。それらのユニークCDR組を、複数のアライメントツールCOBAITを用いて整列し、そして系統樹を、近隣結合アリゴリズムにより生成した。CDR組を、各クロンの結合されるCDR配列の配列相同性に基づいてグループ分けし、そしてクラスター閾値を、配列相同性及び同一性に基づいて決定した。個々のウサギIgGクロンのスクリーニングアッセイ結果及びクラスター所属に基づいて、候補体を、さらなる分析のために選択する。異なったクラスターからのクローンを、高い配列多様性を続行することを目的として選択した。

【0135】

ウサギIgGの製造

ウサギIgG可変ドメインを、RT-PCR増幅、及びリーダー配列及びそれぞれの不変ドメイン、例えばpFUSE-rIgGベクター(Invivogen)を含む一過性異種発現のための適切な哺乳類発現ベクター中への連結によりクローン化した。機能的rIgGの一過性発現を、CHO S細胞における、H及びL鎖をコードするベクターとFreeStyle™ MAXシステムとの同時トランスフェクションにより実施した。7日間の培養の後、抗体分泌細胞の上清液を、精製のために回収した。続いて、分泌されたウサギIgGを、磁気プロテインAビーズ(GH Healthcare)により親和性精製した。IgG負荷ビーズを洗浄し、そして精製された抗体を、pHシフトにより溶出した。溶出画分を、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳道(SDS-PAGE)、280nmでのUV吸光度、及びサイズ排除高速流体クロマトグラフィー(SE-HPLC)により分析し、すべてのサンプルの同等の品質を確保した。

【0136】

ヒト化された一本鎖Fvフラグメント及びIgGの構築及び特性化

ウサギ抗体クロンのヒト化は、Vk1/VH3タイプのNumab独自のscFc受容体フレームワーク上へのウサギCDRのトランスファーを包含した。この工程においては、所定のウサギクロンの6種のCDR領域のアミノ酸配列を、他に記載されるように、ウサギ抗体ドナー配列上で同定し(Borras, L. et al. 2010. JBC;285:9054-9066)、そしてNumab受容体足場配列中に移植した。ウサギクローン、クローン-06の場合、例えば得られるヒト化クローン-06のVL及びVH配列が、それぞれ配列番号21及び22で

10

20

30

40

50

示される。

【0137】

ヒト化 I g G コンストラクトを、[00129]に記載される方法に類似して製造することができる。

【0138】

モノクローナル抗 - C D 3 抗体の結合動力学及び種交差性の決定のためのアッセイ

モノクローナルウサギ抗 - C D 3 抗体の結合親和性を、M A S S - 1 S P R 装置 (Sierra Sensors) を用いて、表面プラズモン共鳴 (S P R) により測定した。親和性測定のために、ウサギ I g G の F c 領域に対して特異的な抗体 (Bethyl Laboratories, カタログ番号 A120-111A) を、センサーチップ (SPR-2 Affinity Sensor, Amine, Sierra Sensor) 上に標準アミン - カップリング手順を用いて固定した。90 ~ 2.81 nM の範囲のヒトヘテロダイマー - 本鎖 C D 3 細胞外ドメイン (内製) の二倍連続希釈溶液を、流動細胞中に3分間、注入し、そしてセンサーチップ上に捕捉された I g G からタンパク質の解離を、5分間、進行せしめた。各注入サイクルの後、表面を、10 mM のグリシン - H C l の2回の注入により再生した。見掛け解離 (k d) 及び会合 (k a) 速度定数、及び見掛け解離平衡定数 (K D) を、one - to - one Langmair 結合モデルを用いて、M A S S - 1 分析ソフトウェア (Analyzer, Sierra Sensors) により計算した。

10

【0139】

種交差反応性の決定

カニクイザル - 本鎖 C D 3 細胞外ドメインに対する種交差反応性を、同じアッセイ設定を用いて測定した。90 ~ 0.12 nM の範囲のカニクイザルヘテロダイマー - C D 3 細胞外ドメイン (内製) の連続三倍希釈溶液を、流動細胞中に3分間、注入し、そしてセンサーチップ上に捕捉された I g G からタンパク質の解離を、5分間、進行せしめた。各注入サイクルの後、表面を、10 mM のグリシン - H C l の2回の注入により再生した。見掛け解離 (k d) 及び会合 (k a) 速度定数、及び見掛け解離平衡定数 (K D) を、one - to - one Langmair 結合モデルを用いて、M A S S - 1 分析ソフトウェア (Analyzer, Sierra Sensors) により計算した。

20

【0140】

T - 細胞の細胞表面上で発現される C D 3 へのモノクローナル抗 - C D 3 抗体の結合の決定のための細胞ベースの E L I S A

ヒト T 細胞系の Jurkat 細胞 (クローン E 6 - 1) を、10% F B S を含むリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 100 μ l を含む丸底 96 - ウェルプレートにおいて、300,000 細胞 / ウェルで播種した。90 nM ~ 0.0058 nM の範囲である抗 - C D 3 ウサギモノクローナル抗体の連続5倍希釈溶液を、10% F B S を含む P B S 100 μ l を含むプレートに添加した。Jurkat 細胞の表面上に発現された C E 3 へのウサギ抗体の結合を、I g G サブタイプのウサギ抗体の F c 部分 (Jackson Immuno Research, カタログ番号 11-035-046) を特異的に認識する二次抗体により検出した。この二次抗体を、酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼ (H R P) に連結した。H R P 活性を、比色反応において、H R P により処理される T M B 基質 (3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、K P L、カタログ番号 53-00-00) の添加により測定した。処理された基質の色の強度は、Jurkat 細胞に結合される抗 - C D 3 抗体の量に正比例する。色の強度を定量化するために、それぞれの波長での吸光度 (光学密度) を、マイクロタイタープレートリーダー (Infinity reader M200 Pro, Tecan) を用いて測定した。

30

40

【0141】

Jurkat 細胞の細胞表面上に提供される未知の成分への抗体の非特異的結合を補正するために、Jurkat T 細胞系 (J. R T 3 - T 3.5) の C D 3 欠損誘導体を使用した。この細胞系へのモノクローナル抗体の結合を、Jurkat 細胞について上記に記載のようにして、測定した。Jurkat 細胞への特異的結合の定量化のために、負の対照への結合のための光学密度を、Jurkat 細胞への結合のための光学密度から差し引いた。データを、Softmax Data Analysis Software (Molecular Devices) を用いて 4 - パラメーターロジスティック曲

50

線フィットを用いて分析し、そして50%結合に達するために必要とされる抗体 - CD3 抗体のモル濃度 (EC₅₀、標準曲線の間 - OD) を、用量応答曲線から得た。

【0142】

種交差 - 反応性の決定

HSC-F T細胞の表面上に提供されるカニクイザルCD3への結合を、同じアッセイ設定を用いて測定した。カニクイザルT細胞系のHSC-F細胞を、10%FBSを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)100μlを含む丸底96-ウェルプレートにおいて、300,000細胞/ウェルで播種した。18nM~0.0058nMの範囲である抗-CD3ウサギモノクローナル抗体の連続5倍希釈溶液を、10%FBSを含むPBS100μlを含むプレートに添加した。HSC-F細胞の表面上に発現されたカニクイザルCE3へのウサギ抗体の結合を、IgGサブタイプのウサギ抗体のFc部分(Jackson Immuno Research, カタログ番号11-035-046)を特異的に認識する二次抗体により検出した。この二次抗体を、酵素ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)に連結した。HRP活性を、上記のようにして測定した。

10

【0143】

細胞表面上に提供される未知の成分への抗体の非特異的結合を補正するために、CD3負のヒトBリンパ芽球細胞系(DB)を用いた。この細胞系へのモノクローナル抗体の結合を、上記のようにして測定した。HSC-F細胞への特異的結合の定量化のために、負の対照への結合のための光学密度を、HSC-F細胞への結合のための光学密度から差し引いた。データを、Softmax Data Analysis Software (Molecular Devices)を用いて4-パラメーターロジスティック曲線フィットを用いて分析し、そして50%結合に達するために必要とされる抗体 - CD3抗体のモル濃度 (EC₅₀、標準曲線の間 - OD) を、用量応答曲線から得た。

20

【0144】

モノクローナル抗体 - CD3抗体によるT-細胞活性化：CD69発現の誘発

T-細胞活性化を誘発するモノクローナルウサギ抗-CD3抗体の可能性を、他に記載されるようにして(Gil et al, Cell.2002; 109: 901-912)、Jurkat細胞におけるCD69発現の誘発の測定、すなわち初期T-細胞活性化マーカーにより評価した。用量-応答アッセイのために、Jurkat細胞(100,000細胞/ウェル)を、20μg/ml、6μg/ml及び1.25μg/mlの抗-CD3抗体により24時間、刺激した。Jurkat細胞への抗-CD3モノクローナル抗体の添加の前、抗-CD3抗体を、OKT3(BioLegend, カタログ番号317302)又はTR66C(Novus Biologicals, Cat. No. NBP 1-97446)が使用される場合、それぞれ、3倍過剰のヤギ抗-ウサギIgG抗体(Bethyl Laboratories, カタログ番号A120-111A)、及びウサギ抗-マウスIgG抗体(Jackson Immuno Research, カタログ番号315-005-008)の添加により架橋した。刺激の後、細胞を、ヒトCD69(BioLegend, カタログ番号310906)に対して特異的なフィコエリトリン(PE)-標識された抗体を用いて、CD69発現のために染色し、そして次に、フローサイトメーター(FACS aria III, Becton Dickinson)により分析した。負の対照として、架橋抗体と共にインキュベートされた、刺激されていないJurkat細胞を、上記抗-CD69抗体により染色した。時間の経過にわたってのT-細胞活性化を、上記のようにして類似するアッセイ設定により評価した。100,000Jurkat細胞/ウェルを、上記のようにして架橋された抗-CD3抗体5μg/mlにより、0, 4, 15, 24, 48及び72時間、刺激した。用量応答アッセイと同一のCD69発現を、フローサイトメーターにより分析した。

30

40

【0145】

scDbコンストラクトの製造

種々の抗-IL5R x CDE3 scDbコンストラクトをコードするヌクレオチド配列を、新たに合成し、そしてpET26b(+)主鎖(Novagen)に基づかれるE.コリ(E.coli)発現のための適合ベクター中にクローン化した。この発現コンストラクトを用いて、E.コリ株BL12(DE3)(Novagen)を形質転換し

50

、そして細胞を、出発培養物として、2 Y T 培地 (Sambrook, J., et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual) において培養した。発現培養物を接種し、そして振盪フラスコにおいて 37 °C 及び 200 rpm でインキュベートした。1 の OD 600 に達すると、タンパク質発現を、0.5 mM の最終濃度での IPTG の添加により誘発した。一晚の発現の後、細胞を、4000 g の遠心分離により収穫した。封入体の調製のために、細胞ペレットを、IB 再懸濁緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、5 mM EDTA、0.5 % Triton X-100) に再懸濁した。細胞スラリーを、1 Mm の DTT、0.1 mg/mL のリゾチーム、10 mM のロイペプチン、100 μM の PMSF 及び 1 μM のペプスタチンにより補充した。細胞を、氷上で冷却しながら、3 サイクルの超音波均質化により溶解した。続いて、0.01 mg/mL の DNase を添加し、そして均質物を室温で 20 分間インキュベートした。封入体を、15000 g 及び 4 °C での遠心分離により沈降せしめた。IB を、IB 再懸濁緩衝液に再懸濁し、そして音波処理により均質化し、その後、別の遠心分離にゆだねた。IB 再懸濁緩衝液により、合計で最少 3 回の洗浄工程を実施し、そして続いて、IB 洗浄緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.5、100 mM NaCl、5 mM EDTA) による 2 回の洗浄を実施し、最終 IB を得た。

10

【0146】

タンパク質再折りたたみのために、単離された IB を、可溶化緩衝液 (100 mM Tris/HCl pH 8.0、6 M Gdn-HCl、2 mM EDTA) に、湿った IB の 1 g 当たり 5 mL の比率で再懸濁した。可溶化は、DTT が 20 mM の最終濃度で添加されるまで、室温で 30 分間インキュベートされ、そしてインキュベーションはさらに 30 分間、続けられた。可溶化が完了された後、溶液は、21500 g 及び 4 °C での 10 分間の遠心分離により透明化された。再折りたたみを、再折りたたみ緩衝液 (典型的には: 100 mM Tris-HCl pH 8.0、5.0 M のウレア、5 mM のシステイン、1 mM のシスチン) 中、0.3 g/L の最終タンパク質濃度の溶解されたタンパク質による急速希釈により実施した。再折りたたみ反応を、最少 14 時間、通常通りインキュベートした。得られるタンパク質溶液を、8500 g 及び 4 °C での 10 分間の遠心分離により透明化した。再折りたたまれたタンパク質を、Capto L 樹脂 (GE Healthcare) 上での親和性クロマトグラフィーにより精製した。単離されたモノマー画分を、サイズ排除 HPLC、純度に関しては SDS-PAGE、及びタンパク質含有量に関しては UV/VIS 分光計により分析した。緩衝液を、透析により、ネイティブ緩衝液 (50 mM のクエン酸 - リン酸 pH 6.4、200 mM の NaCl) に交換した。

20

30

【0147】

二重特異性抗 - CD3 × IL5R s c D b の結合動力学的決定のための SPR アッセイ

抗 - CD3 × IL5R s c D b の結合親和性を、MASS - 1 SPR 装置 (Sierra Sensors) を用いて、表面プラズモン共鳴 (SPR) により測定した。CD3 への親和性測定のために、ヒトヘテロダイマー一本鎖 CD3 細胞外ドメイン (内製) を、標準アミン - カップリング方法を用いて、センサーチップ (SPR-2 Affinity Sensor High Capacity, Amine, Sierra Sensors) 上に固定した。90 ~ 0.1 nM の範囲の s c D b の連続的 3 倍希釈溶液を、流動細胞中に 3 分間、注入し、そしてセンサーチップ上に固定された CD3 からのタンパク質の解離を、12 分間、進行せしめた。各注入のサイクルの後、表面を、10 mM のグリシン - HCl (pH 2.0) の 2 回の注入により再生する。IL5R に対する親和性測定のために、ヒト IgG の Fc 領域に対して特異的な抗体を、アミン - カップリングにより、センサーチップ (SPR-2 Affinity Sensor High Capacity, Amine, Sierra Sensors) 上に固定した。IL5R (90 nM - 0.1 nM) に対して特異的な s c D b の連続 3 倍希釈溶液を、流動細胞中に 3 分間、注入し、そして解離を 12 分間、モニターした。各注入サイクルの後、表面を、10 mM のグリシン - HCl (pH 1.5) の 3 回の注入により再生した。見掛け解離 (k_d) 及び会合 (k_a) 速度定数、及び見掛け解離平衡定数 (K_D) を、one-to-one Langmuir 結合モデルを用いて、MASS - 1 分析ソフトウェア (Analyzer, Sierra Sensors) により計算した。

40

【0148】

50

T細胞の細胞表面上に発現されるCD3及びCHO細胞(CHO-IL5R細胞)の表面上に発現されるIL5Rへの二重特異的抗-CD3 x IL5R scDbの結合

ヒトT細胞系のJurkat細胞(クローンE6-1、ATCC)の細胞表面上に発現されるCD3へのscDbの結合を、フローサイトメトリーにより分析した。Jurkat細胞の細胞表面上に提供される未知の成分へのscDbの非特異的結合を評価するために、Jurkat T細胞系(J.RT3-T3.5, ATCC)のCD3欠損誘導体を使用した。細胞表面上に発現されるIL5RへのscDbの結合を、トランスジェニックCHO-IL5R細胞(ZHAWで生成された)を用いて分析し、そして野生型CHO細胞(Invitrogen)を、非特異的結合のための対照として使用した。両細胞系を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のscDbと共に1時間インキュベートし、そして結合されたscDbを、RPE-標識されたプロテインL(BioVision)の添加により検出し、そして次に、フローサイトメーター(ACS aria III, Becton Dickinson)により分析した。負の対照として、無関係な標的物に対して特異的なc s F vを使用した。Jurkat及びCHO-IL5R細胞への結合の定性的評価のために、幾何学的平均でのシグナル強度に影響を及ぼす平均蛍光強度(MFI)を、非特異的s c F v及び試験s c D bの両者について測定した。試験抗体と負の対照抗体との間のMFIの差異(MFI)を、結合のための尺度として計算した。さらに、標準化されたMFIを、負の対照s c F vのMFIを介して試験s c D bのMFIを割算することにより計算した。

【0149】

二重特異的抗-CD3 x IL5R scDbによるT-細胞活性化：IL-2分泌の誘発

標的細胞の存在下でCD8+細胞毒性T-細胞におけるIL-2発現を誘発する、抗-CD3 x 抗-IL5R scDbの可能性を、次の通りに評価した。細胞毒性T-細胞を、RosetteSep(登録商標)ヒトCD8+ T-細胞 富化カクテル(STEMCELL Technologies)を用いて、その製造業者の説明書に従って、ヒト血液から新たに単離した。CHO-IL5R細胞(10,000細胞/ウェル)を、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて、10倍に連続的に希釈されたscDb(100nM-0.001nM)の存在下で、CD8+細胞毒性T-細胞と共に、10:1のエフェクター：標的物比でインキュベートした。T-細胞の非特異的刺激を評価するために、野生型CHO細胞を、標的細胞として使用した。上清液を、16時間の同時インキュベーションの後、収集し、IL-2放出を測定した。IL-2放出を、市販のELISAキット(BioLegend)を用いて定量化した。データを、SoftMax(登録商標)Proデータ分析ソフトウェア(Molecular Devices)を用いて、4-パラメーターロジスティック曲線適合により分析し、そして最大の半分のIL-2分泌(EC_{50})を誘発するのに必要とされるscDbのモル濃度を、用量応答曲線から誘導する。

【0150】

細胞毒性T細胞によりIL5R発現CHO細胞のscDb介在性溶解

標的細胞溶液を誘発する二重特異的抗-CD3 x IL5R scDbの可能性の評価のために、トランスジェニックIL5R発現CHO細胞系を用いて(CHO-IL5R)。上記のようにして単離された、刺激されていないヒトCD8+ T-細胞を、エフェクター細胞として使用した。標的細胞を、細胞tox緑色色素(Promega)により、その製造業者の説明書に従って、標識した。細胞溶液を、CellTox(登録商標)緑色細胞毒性アッセイ(Promega)緑色細胞毒性アッセイ(Promega)によりモニターした。アッセイは、細胞死の結果として生じる膜完全性の変化を測定する。アッセイは、生存細胞から排除されるが、しかし死亡細胞DNAを優先的に染色する非対称シアニン色素を用いる。色素が危険にさらされた細胞においてDNAを結合する場合、蛍光特性は実質的に増強される。生存細胞は、蛍光の適切な上昇を生成しない。従って、死亡細胞DNAとの結合相互作用により生成される蛍光シグナルは、細胞毒性に比例する。同様に、上記のように、標識されたCHO-IL5R細胞(10,000細胞/ウェル)を、96ウェルマイクロタイタープレートにおいて、10倍に連続的に希釈されたscDb(100nM-0.0

10

20

30

40

50

0.1 nM) の存在下で、10 : 1 のエフェクター : 標的物比で CD8 + 細胞毒性 T - 細胞と共にインキュベートした。標的物を発現しない細胞の非特異的溶解性を評価するために、T - 細胞を、標識された野生型 CHO 細胞と共に同時インキュベートした。蛍光強度を、マルチモードマイクロタイターリーダー (FlexStation 3, Molecular Devices) を用いて、88 時間のインキュベーションの後、分析した。データを、SoftMax (登録商標) Pro データ分析ソフトウェア (Molecular Devices) を用いて、4 - パラメーターロジスティック曲線適合により分析し、そして最大の半分の IL - 2 分泌 (EC₅₀) を誘発するのに必要とされる s c D b のモル濃度を、用量応答曲線から誘導する。

【 0 1 5 1 】

【表 6】

10

表 3 : 異なった抗体の結合に最も影響を及ぼす残基

クローンID 番号	第 1 組	第 2 組	第 3 組	第 4 組
クローン-06	N4:E6	N4:E6	結合低い	結合低い
クローン-02	N4:E6	N4:E6	結合低い	結合低い
クローン-03	N4:E6	N4:E6 ; (G8)	結合低い	結合低い
クローン-04	N4:E6	G3:E6 ; (G8)	結合低い	結合低い
クローン-10	N4:E6	N4:E6	結合低い	結合低い

20

【 0 1 5 2 】

【表 7】

表 4 : 抗CD3抗体の配列

配列 番号	抗体 クローン	重鎖/ 軽鎖	アミノ酸配列
1	クローン-01	VL	AQVLTQTASSVSAVGGT VTISCQSS ESVY NNR LSWFQQKPGQPPKQLIY SASS LASG VPSRFKGS SGTQFTLTISDLE CDDAATYY CQGEF SCSSADCFTFGGGTEVVKGD
2	クローン-01	VH	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPL SS YAMIWVRQAPGKGLEWIGMILRAGNIYYAS WAKGR FRTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYF CARRQYNTDGYPIGIGDLWGPGLTVTVSS
3	クローン-02	VL	AQVLTQTPSSVSAVGGT VTISCQSS ESVY SNNR LSWFQQKPGQPPKLLI YSASTLASGV PSRFKGS SGTQFTLTITDLE CDDAATYFC QGEFSCSSVDCFSFGGGTEVVKGD
4	クローン-02	VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSA YAMIWVRQAPGKGLEWIGMIIRSGTVYYAN WAKGRFRTISKTSTTVDLKITSPTTEDTATYF CARRHYNADGYPIGIGDLWGPGLTVTVSS
5	クローン-03	VL	AQVLTQTPSSVSAVGGT VTISCQSN ENIYS NNR LSWFQQKPGQPPNQLI YSASSLASGV PSRFKGS SGTQFTLTISDLE CDDAATYYC QGEFNCSADCFTFGGGTEVVKGD
6	クローン-03	VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLNR YAMLWVRQAPGKGLEWIGLITRADKKYYAS WAKGRFRTISKTSTTV DLEITG PTTEDTATYF CARRHYNTDGYPIAIGDLWGPGLTVTVSS
7	クローン-04	VL	AQVLTQTPSSVSAVGGT VTINCQSS QSVY NNR LSWFQQKPGQPPKLLI YTTSSLASGV PSRFKGS SGTEFTLTISDLE CADAATYYC QGEFSCSRADCFNFGGGTEVVKGD

10

20

30

【表 8】

8	クローン-04	VH	QSLEESGGRLVKPDETLTLTCTVSGFPLSS YAMGWFRQAPGKGLEWIGMILRSDNTYYA SWAKGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATY FCARRHYNASGNPIAIGDLWGPGLTVTVSS
9	クローン-06	VL	AQVLTQTPSSVSAAVGGTVTISCQSSSESVY NNKRLSWFQQKPGQPPKQLIYTASSLASGV PSRFKGS SGTQFTLTISDLECDAAATYYC QGEFTCSNADCFTFGGGTEVVVKGD
10	クローン-06	VH	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSS YAMIWVRQAPGKGLEWIGMILRAGNIYYAS WVKGRVTISKSTTVDLKITSPTTEDTATYF CARRHYNREGYPYIGDLWGPGLTVTVSS
11	クローン-09	VL	AQVLTQTPSSVSAAVGGTVTISCQSNENIYS NNRLSWFQQKPGQPPNQLIYSASSLASGV PSRFKGS SGTQFTLTISDLECDAAATYYC QGEFNCNSADCFTFGGGTEVVVKGD
12	クローン-09	VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLNR YAMLWVRQAPGKGLEWIGLITRADKYYAS WAKGRFTISKSTTVDLKITGPTTEDTATYF CARRHYNTDGYPIAIGDLWGPGLTVTVSS
13	クローン-10	VL	AQVLTQTPSSVSAAVGGTATISCQSNENIYS NNRLSWFQQKAGQPPNQLIYSASSLASGV PSRFKGS SGTQFTLTISDLECDAAATYYC QGEFSCSSADCFTFGGGTEVVVKGD
14	クローン-10	VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSS FAMLWVRQAPGKGLEWIGMIMRAHNMYYA SWAKGRFTISKSTTVDLKITGPTTEDTATY FCARRHYNTYGYPIAIGDLWGPGLTVTVSS
15	クローン-11	VL	AQVLTQTPSSVSAAVGGTVTINCQSSQSVY NNRLSWFQQKPGQPPKLLIYTASSLASGV PSRFKGS SGTQFTLTISDLECDAAATYYC QGEFSCSSADCFTFGGGTEVVVKGD
16	クローン-11	VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSS YAMGWFRQAPGKGLEWIGMILRADNTYYA SWVNGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTATY FCARRHYNTYGYPIAIGDLWGPGLTVTVSS
17	クローン-12	VL	AQVLTQTPSSVSATVGGTVTISCQSNENIYS NNRLSWFQQKPGQPPKLLIYSASSLASGVP SRFKGS SGTQFTLTISDLECDAAATYYCQ GEFNCNSADCFTFGGGTEVVVKGD
18	クローン-12	VH	QSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFPLSR YAMLWVRQAPGKGLEWIGLITRADNKYYAS WAKGRFTISKSTTVDLKITGPTTEDTATYF CARRHYNTDGYPIAIGDLWGPGLTVTVSS
19	コンセンサス	VL	AQVLTQTX(P/A)SSVSAX(A/V/T)VGGTX(V/A)TIX(S/N)CQSX(S/N)X(E/Q)X(S/N)X(V/I)YX(S)N)NX(N/K)RLSWFQQKX(P/A)GQPPX(K/N)X (Q/L)LIYX(S/T)X(A/T)SX(S/T)LASGVPSRFK GSGSGTX(Q/E)FTLTIX(S/T)DLECX(D/A)DA

10

20

30

40

【表 9】

			ATYX(Y/F)CQGEFX(S/N/T)CX(S/N)X(S/N/R) X(A/V)DCFX(T/S/N)FGGGTEVVKGD
20	コンセンサス	VH	Q SX(L/V)EESGGRLVX(T/K)PX(G/D)X(T/E)X(P/T)LTLTCTVSGFPLX(S/N)X(S/A/R)X(Y/F)A MX(L/I/G)WX(V/F)RQAPGKGLEWIGX(M/L)I X(L/T/M/I)RX(A/S)X(D/G/H)X(N/K/T)X(K/T/I/M)YYAX(S/N)WX(A/V)X(K/N)GRX(F/M)TISKTS TTVDLX(K/E)ITX(S/G)PTTEDTATYFCARRX(H/Q)YNX(T/A/R)X(D/Y/S/E)GX(Y/N)PX(I/V)X(A/G)IGDLWGPGTLVTVSS
21	ヒト化 クローン-06	VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCQSSSESVY NNKRLSWYQQKPGKAPKLLIYTASSLASGV PSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QGEFTCSNADCFTFGGQGTKLTVLG
22	ヒト化 クローン-06	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFPL SSYAMIWVRQAPGKGLEWIGMILRAGNIYY ASWVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSLRAED TAVYYCARRHYNREGYP IGI GDLWGQGT L V TVSS

10

20

[全ての配列の代表として、配列番号 1 及び 2 において、CDR 1～3 を太字及び下線で示す]

[配列番号 19 及び 20 において、位置「X」は縮重位置であり、各「X」の後ろのかっこに示される縮重である]

【 0 1 5 3 】

本発明は、本明細書に記載される特定の実施形態により範囲を限定するものではない。実際、本発明に記載される修飾の他に、本発明の種々の修飾が前述の説明から当業者に明らかになるであろう。そのような修飾は、添付の特許請求の範囲内にあることが意図される。

30

【 0 1 5 4 】

それぞれの特許法の下で可能な限り、本明細書に引用される、すべての特許、出願、出版物、試験方法、文献及び他の材料は、引用により本明細書に組込まれる。

【 図 1 】

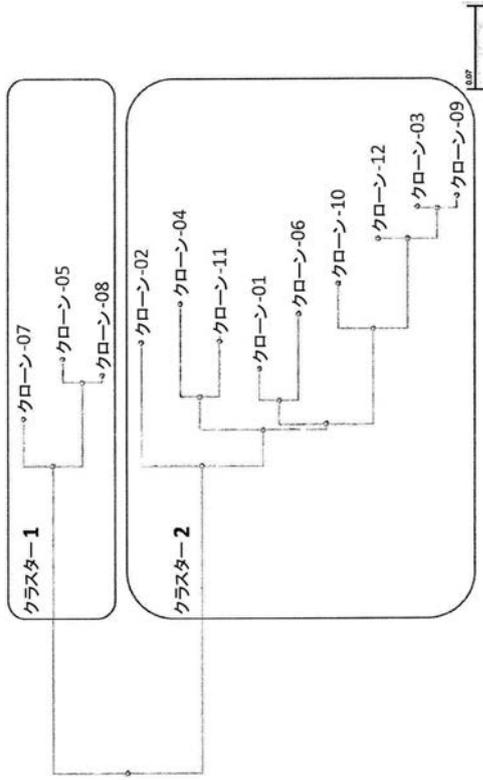


Figure 1:

【 図 2 】

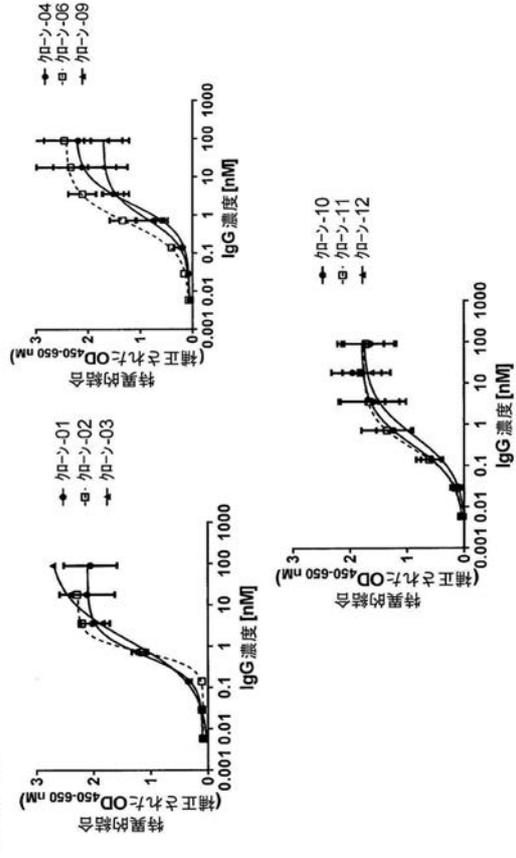


Figure 2:

【 図 3 - 1 】

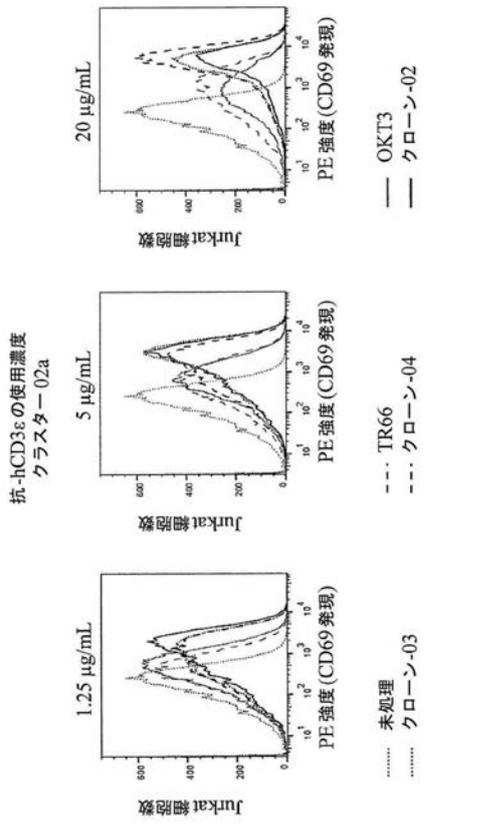


Figure 3:

【 図 3 - 2 】

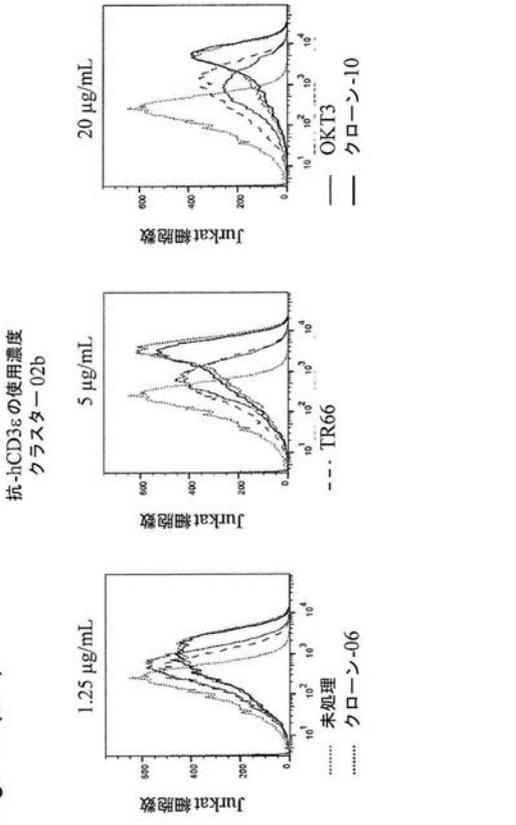
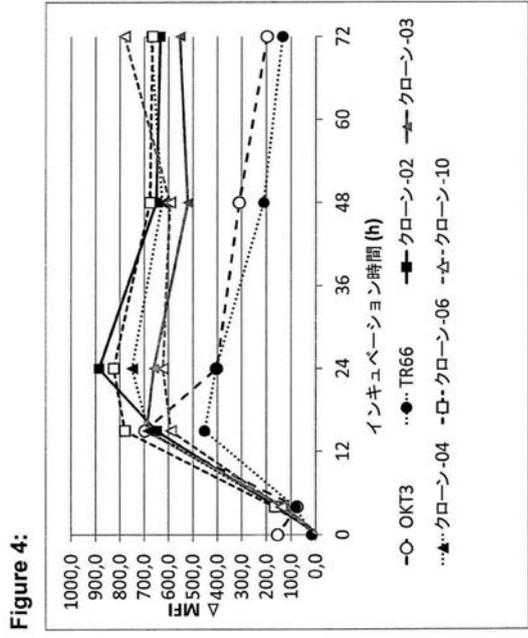


Figure 3 (続き):

【 図 4 】



【 図 5 】

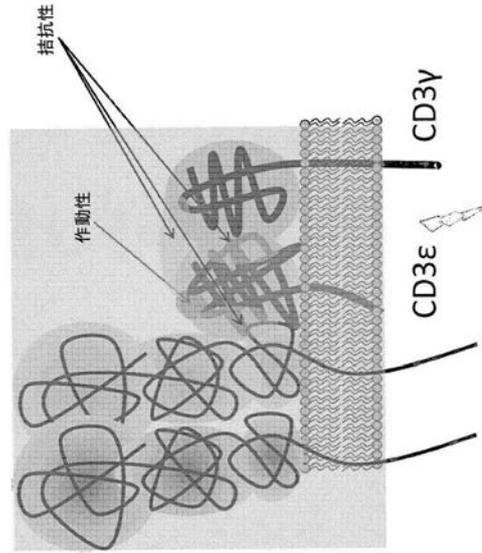
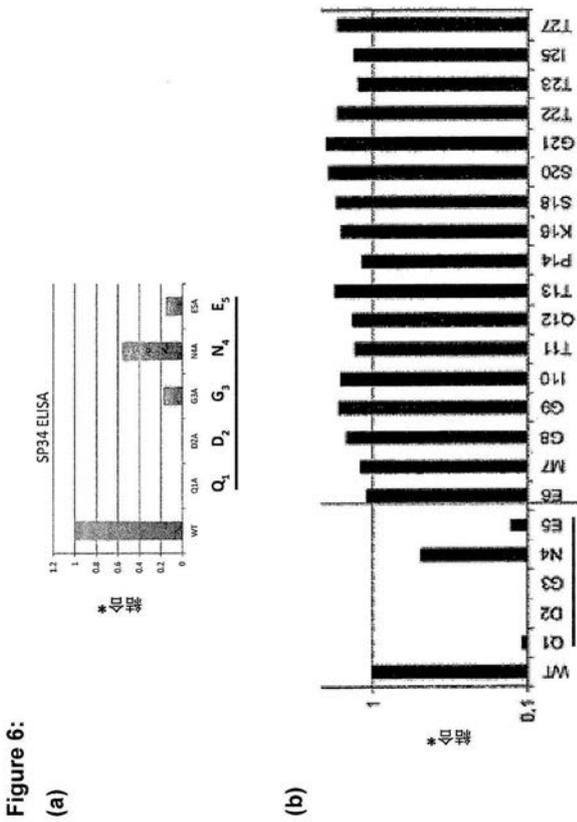


Figure 5:

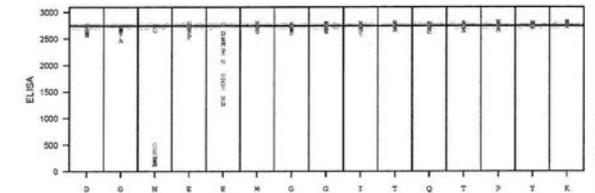
【 図 6 】



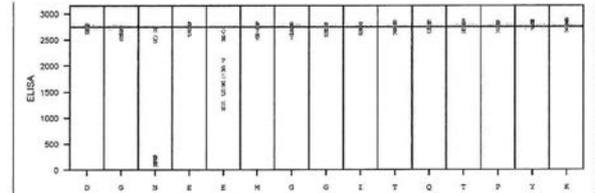
【 図 7 A 】

Figure 7A:

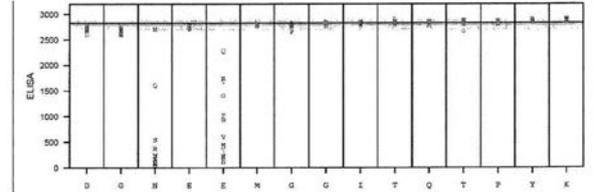
クローン 6



クローン 2



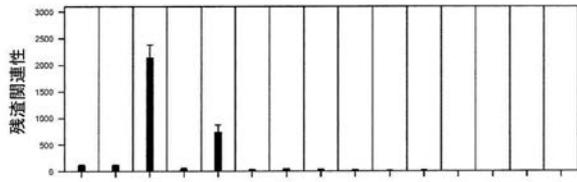
クローン 3



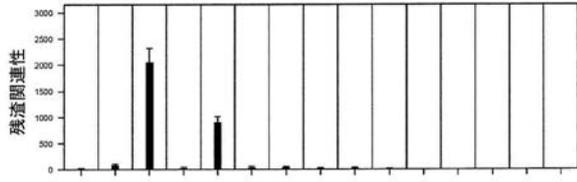
【 図 7 B 】

Figure 7B

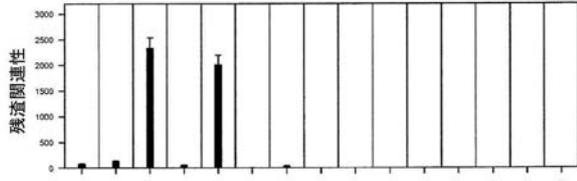
クローン 6



クローン 2



クローン 3



【 図 8 - 1 】

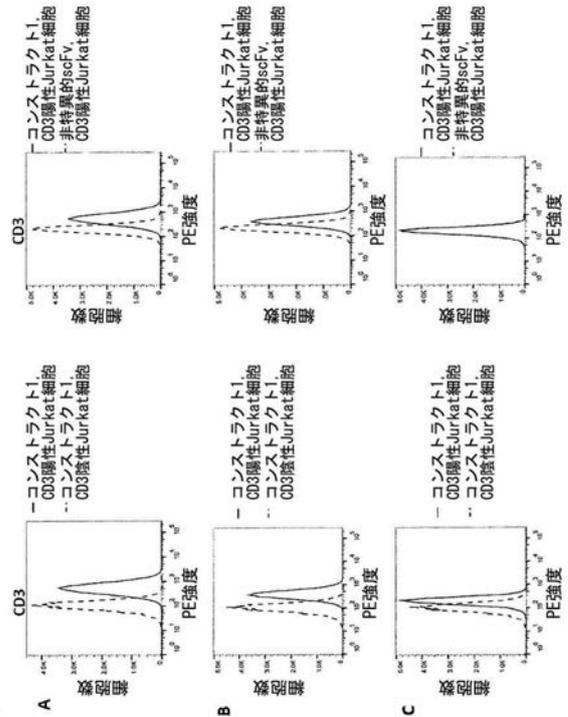


Figure 8:

【 図 8 - 2 】

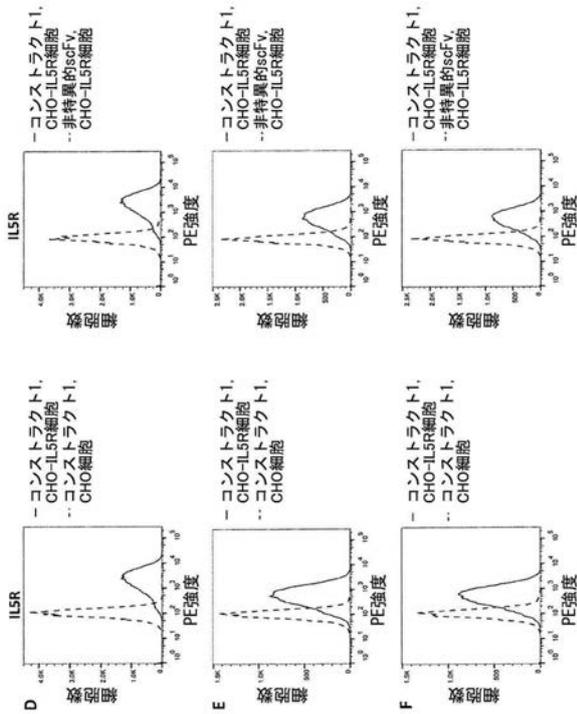


Figure 8 (続き):

【 図 9 】

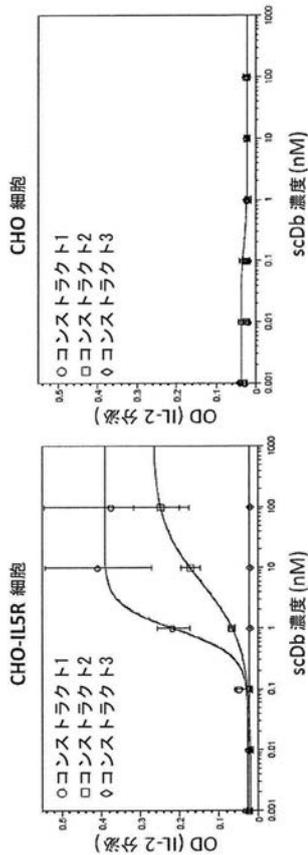


Figure 9:

【 図 1 0 】

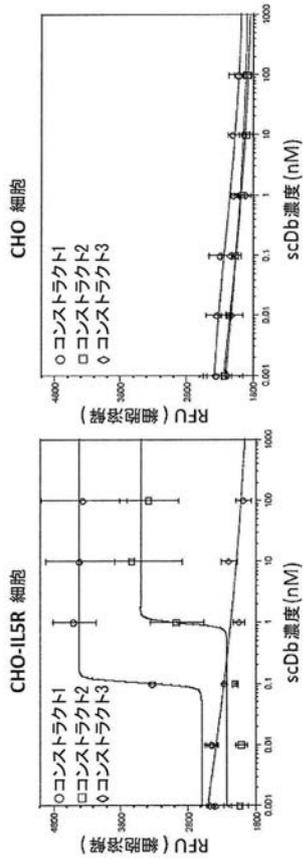


Figure 10:

【 配 列 表 】

2016520600000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/001460

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 C07K16/24 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, 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 2010/037838 A2 (MICROMET AG [DE]; KUFER PETER [DE]; RAUM TOBLAS [DE]) 8 April 2010 (2010-04-08) The whole document, in particular, figure 8 -----	1-3,8-26
X	TUNNACLIFFE A ET AL: "The majority of human CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY 1989, vol. 1, no. 5, 1989, pages 546-550, XP9179788, ISSN: 0953-8178 The whole document, in particular Table 1 ----- -/--	1-3,8-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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
14 October 2014		03/11/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Chapman, Rob

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2014/001460

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SALMERÓN A ET AL: "A conformational epitope expressed upon association of CD3-epsilon with either CD3-delta or CD3-gamma is the main target for recognition by anti-CD3 monoclonal antibodies", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 147, no. 9, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 3047-3052, XP002453512, ISSN: 0022-1767 The whole document, in particular Table1 -----</p>	1-3,8-26
X	<p>JACOBS N ET AL: "Efficiency of T cell triggering by anti-CD3 monoclonal antibodies (mAb) with potential usefulness in bispecific mAb generation", CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE, vol. 44, no. 5, 1 July 1997 (1997-07-01), pages 257-264, XP002453511, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S002620050381 the whole document -----</p>	1-3,8-26
A	<p>KIPRIYANOV S M ET AL: "Two amino acid mutations in an anti-human CD3 single chain Fv antibody fragment that affect the yield on bacterial secretion but not the affinity", PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 4, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 445-453, XP002237690, ISSN: 0269-2139, DOI: 10.1093/PROTEIN/10.4.445 The whole document, in particular Table 1 -----</p>	3
A	<p>RUDIKOFF S ET AL: "Single amino acid substitution altering antigen-binding specificity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 79, 1 March 1982 (1982-03-01), pages 1979-1983, XP007901436, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.79.6.1979 the whole document ----- -/--</p>	16-19

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/001460

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PANKA D J ET AL: "VARIABLE REGION FRAMEWORK DIFFERENCES RESULT IN DECREASED OR INCREASED AFFINITY OF VARIANT ANTI-DIGOXIN ANTIBODIES", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 85, no. 9, 1 May 1988 (1988-05-01), pages 3080-3084, XP000611718, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.85.9.3080 the whole document -----</p>	16-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/001460**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
8(completely); 1-3, 9-26(partially)
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2014/ 001460

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-3, 10-26(all partially)

An isolated antibody or functional fragment thereof comprising an antigen-binding region that is specific for an epitope of human CD3c, wherein said epitope comprises amino acid residue N4 as residue that is critical for binding, wherein said isolated antibody or functional fragment thereof comprises an antigen-binding region comprising a VH domain comprising a combination of one CDR1, one CDR2 and one CDR3 region present in SEQ ID NOs: 2 and a VL domain comprising a combination of one CDR1, one CDR2 and one CDR3 region present in SEQ ID NOs: 1, and related subject-matter

2-122. claims: 1-3, 10-26(all partially)

An isolated antibody or functional fragment thereof comprising an antigen-binding region that is specific for an epitope of human CD3c, wherein said epitope comprises amino acid residue N4 as residue that is critical for binding, wherein said isolated antibody or functional fragment thereof comprises an antigen-binding region comprising a VH domain comprising a combination of one CDR1, one CDR2 and one CDR3 region present in SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, and 22, and a VL domain comprising a combination of one CDR1, one CDR2 and one CDR3 region present in SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, and 21, and related subject-matter

123. claims: 4(completely); 9-26(partially)

An isolated antibody or functional fragment thereof comprising an antigen-binding region that is specific for an epitope of human CD3, wherein said antibody or functional fragment thereof, is binding to human CD3 with a dissociation constant for monovalent binding of less than 3.0×10^{-8} M, particularly less than 1.5×10^{-8} M, more particularly less than 1.2×10^{-8} M, and most particularly less than 1.0×10^{-8} M, and related subject-matter

124. claims: 5(completely); 9-26(partially)

An isolated antibody or functional fragment thereof comprising an antigen-binding region that is specific for an epitope of human CD3, wherein said antibody or functional fragment thereof, when tested in an IgG format, upon cross-linking, is inducing T-cell activation at least 1.5-fold stronger than antibodies OKT-3 or TR66 after 24 h of stimulation at an IgG concentration of 1.25 pg/ml, and related subject-matter

International Application No. PCT/ EP2014/ 001460

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

125. claims: 6(completely); 9-26(partially)

An isolated antibody or functional fragment thereof comprising an antigen-binding region that is specific for an epitope of human CD3, wherein said antibody or functional fragment thereof, when tested in an IgG format, upon cross-linking, is resulting in T-cell activation, which lasts longer than with antibodies OKT-3 or TR66 as indicated by at least 1.5-fold greater increase in CD69 expression after 72 hours of stimulation at an IgG concentration of 1.25 pg/ml, and related subject-matter

126. claims: 7(completely); 9-26(partially)

An isolated antibody or functional fragment thereof comprising an antigen-binding region that is specific for an epitope of human CD3, wherein said antibody or functional fragment thereof, when tested in an IgG format, upon cross-linking, is resulting in a dose-dependent homogeneous activation state of T-cells, and related subject-matter

127. claims: 8(completely); 9-26(partially)

An isolated antibody or functional fragment thereof comprising an antigen-binding region that is specific for an epitope of human CD3, wherein said antibody or functional fragment thereof, when tested in an IgG format, (i) is binding to human CD3 with a dissociation constant for monovalent binding of less than 3.0×10^{-8} M, particularly less than 1.5×10^{-8} M, more particularly less than 1.2×10^{-8} M, and most particularly less than 1.0×10^{-8} M; and (ia), upon cross-linking, is inducing T-cell activation at least 1.5-fold stronger than antibodies OKT-3 or TR66 after 24 h of stimulation at an IgG concentration of 1.25 pg/ml; (iib) is resulting in T-cell activation, which lasts longer than with antibodies OKT-3 or TR66 as indicated by at least 1.5-fold greater increase in CD69 expression after 72 hours of stimulation at an IgG concentration of 1.25 pg/ml; (iic) is resulting in a dose-dependent homogeneous activation state of T-cells; and/or (iid) is specific for an epitope of human CD3s, wherein said epitope comprises amino acid residue N4 as residue that is critical for binding, and related subject-matter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/001460

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010037838 A2	08-04-2010	AU 2009299794 A1	08-04-2010
		CA 2738568 A1	08-04-2010
		EP 2352765 A2	10-08-2011
		US 2011275787 A1	10-11-2011
		WO 2010037838 A2	08-04-2010

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, 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, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74) 代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎

(74) 代理人 100166165
弁理士 津田 英直

(72) 発明者 テア グンデ
スイス国, ツェーハー - 8 0 0 5 チューリッヒ, トウルピネンシュトラッセ 3 3

(72) 発明者 セバスティアン マイヤー
スイス国, ツェーハー - 5 4 4 5 エッゲンビル, キルヒラインシュトラッセ 6

(72) 発明者 ダービト ウレツヒ
スイス国, ツェーハー - 8 6 4 5 ヨーナ, ゾンネンブリックシュトラッセ 8

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA02 CA10 CA19 CC24 CE10 CE12 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 BA02 CA25 CA44
4C085 AA14 BB11 CC23 DD62 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA22 FA74 GA22
GA26