(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)公開番号
特開2023-11774
(P2023-11774A)
(43)公開日　令和5年1月24日(2023.1.24)

(51)国際特許分類			FI		
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13	
C07K	*16/46*	*(2006.01)*	C07K	16/46	
C12N	*5/12*	*(2006.01)*	C12N	5/12	
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28	
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395	N

審査請求　有　請求項の数　41　ＯＬ　外国語出願　（全116頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-173361(P2022-173361)
(22)出願日　令和4年10月28日(2022.10.28)
(62)分割の表示　特願2019-502647(P2019-502647)の分割
原出願日　平成29年7月20日(2017.7.20)
(31)優先権主張番号　62/364,811
(32)優先日　平成28年7月20日(2016.7.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関　米国(US)

(71)出願人　397060175
ヤンセン ファーマシューティカ エヌ．ベー．
ベルギー国 ベー．－２３４０ ベルセトルンハウッサーヴェヒ ３０
(74)代理人　100092783
弁理士　小林 浩
(74)代理人　100095360
弁理士　片山 英二
(74)代理人　100093676
弁理士　小林 純子
(74)代理人　100120134
弁理士　大森 規雄
(74)代理人　100149010
弁理士　星川 亮

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗ＧＰＲＣ５Ｄ抗体、ＧＰＲＣ５ＤとＣＤ３を結合する二重特異性抗原結合分子、及びその使用

(57)【要約】　（修正有）
【課題】ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体を提供する。
【解決手段】ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであって、特定のアミノ酸配列を有する、相補性決定領域を含む、単離された組み換え抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。提供されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントをコード可能な関連するポリヌクレオチド、提供された抗体又は抗原結合フラグメントを発現している細胞及び関連するベクター、並びに検出可能に標識された抗体又は抗原結合フラグメントも記載されている。加えて、提供された抗体を使用する方法が記載される。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであって、
ａ．配列番号１のアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、配列番号５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｂ．配列番号２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｃ．配列番号３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｄ．配列番号４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｅ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｆ．配列番号２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｇ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｈ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｉ．配列番号６２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｊ．配列番号６３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｋ．配列番号６４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｌ．配列番号６５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、又は
ｍ．配列番号６６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、を含む、単離された組み換え抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項２】
請求項１に記載の単離された抗体又は抗原結合フラグメントであって、
ａ．配列番号１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｂ．配列番号２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｃ．配列番号３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｄ．配列番号４のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列

を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｅ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｆ．配列番号２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３０のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｇ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｈ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｉ．配列番号６２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７４のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｊ．配列番号６３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｋ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｌ．配列番号６５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号９５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、又は

ｍ．配列番号６６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項３】

ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、かつ配列番号５２、５３、５４、５５、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、又は９１からなる群から選択される重鎖可変（ＶＨ）領域を含む、単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項４】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：５６、５７、５８、９２、９３、又は９４からなる群から選択される軽鎖可変（ＶＬ）領域を含む、請求項３に記載の抗体。

【請求項５】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：５２、５３、５４、５５、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、又は９１からなる群から選択されるＶＨ領域と、

配列番号５６、５７、５８、９２、９３、又は９４からなる群から選択されるＶＬ領域と、を含む、請求項３に記載の抗体。

【請求項６】

前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５６を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５２、５３、又は８３を含む、請求項５に記載の抗体。

【請求項７】

前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５７を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５４、８４、８５、８６、又は９０を含む、請求項５に記載の抗体。

【請求項８】

前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５８を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５５又は８８を含む、請求項５に記載の抗体。

【請求項９】

前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９２を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号８２又は８７を含む、請求項５に記載の抗体。

【請求項１０】

前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９３を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号８９を含む、請求項５に記載の抗体。

【請求項１１】

前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９４を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号９１を含む、請求項５に記載の抗体。

【請求項１２】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号２２のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する、請求項１～１１のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項１３】

前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト抗体又は抗原結合フラグメントである、請求項１～１２のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項１４】

前記抗体又は抗原結合フラグメントは、組み換え体である、請求項１～１３のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項１５】

前記抗原結合フラグメントは、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ２フラグメント、又は一本鎖抗体である、請求項１～１４のいずれか一項に記載の抗原結合フラグメント。

【請求項１６】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプである、請求項１～１５のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項１７】

ＩｇＧ１又はＩｇＧ４のアイソタイプである、請求項１～９のいずれかに記載の抗体又

は抗原結合フラグメント。
【請求項１８】
前記ＩｇＧ１は、そのＦｃ領域中に、Ｋ４０９Ｒ置換を有する、請求項１７に記載の抗体。
【請求項１９】
前記ＩｇＧ１は、そのＦｃ領域中に、Ｆ４０５Ｌ置換を有する、請求項１７に記載の抗体。
【請求項２０】
前記ＩｇＧ４は、そのＦｃ領域中に、Ｆ４０５Ｌ置換及びＲ４０９Ｋ置換を有する、請求項２０に記載の抗体。
【請求項２１】
Ｆｃ領域中に、Ｓ２２８Ｐ置換、Ｌ２３４Ａ置換、及びＬ２３５Ａ置換を更に含む、請求項１６に記載の抗体。
【請求項２２】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄと交差反応する、請求項１～１４のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【請求項２３】
前記抗体又は抗原結合フラグメントは、約２８ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$でＡＤＣＣをインビトロで誘導する、請求項１７のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【請求項２４】
請求項１～１１のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントを発現している単離された細胞。
【請求項２５】
前記細胞は、ハイブリドーマである、請求項２４に記載の細胞。
【請求項２６】
前記抗体は、組み換えにより生成される、請求項２４に記載の細胞。
【請求項２７】
単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体であって、
ａ）第１の重鎖（ＨＣ１）と、
ｂ）第２の重鎖（ＨＣ２）と、
ｃ）第１の軽鎖（ＬＣ１）と、
ｄ）第２の軽鎖（ＬＣ２）と、を含み、
前記ＨＣ１及び前記ＬＣ１は、対を成してＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合部位を形成し、前記ＨＣ２及び前記ＬＣ２は、対を成してＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第２の抗原結合部位を形成する、単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体、又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。
【請求項２８】
ＨＣ１は、配列番号２５を含み、ＬＣ１は、配列番号２６を含む、請求項２７に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【請求項２９】
ＨＣ２は、配列番号５２を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【請求項３０】
ＨＣ２は、配列番号５３を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【請求項３１】
ＨＣ２は、配列番号５４を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【請求項３２】

ＨＣ２は、配列番号５５を含み、ＬＣ２は、配列番号５８を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項３３】

ＨＣ２は、配列番号８２を含み、ＬＣ２は、配列番号９２を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項３４】

ＨＣ２は、配列番号８３を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項３５】

ＨＣ２は、配列番号８４を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項３６】

ＨＣ２は、配列番号８５を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項３７】

ＨＣ２は、配列番号８６を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項３８】

ＨＣ２は、配列番号８７を含み、ＬＣ２は、配列番号９２を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項３９】

ＨＣ２は、配列番号８８を含み、ＬＣ２は、配列番号５８を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４０】

ＨＣ２は、配列番号８９を含み、ＬＣ２は、配列番号９３を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４１】

ＨＣ２は、配列番号９１を含み、ＬＣ２は、配列番号９４を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４２】

ＨＣ２は、配列番号８５を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、請求項２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４３】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプである、請求項２７～４２のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４４】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ４のアイソタイプである、請求項４３に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４５】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ５Ｄに結合する、請求項２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４６】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒトの多発性骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ５Ｄに結合する、請求項２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４７】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのヒトＴ細胞活性化を約０．２２ｎＭ未満の$ＥＣ_{50}$で誘導する、請求項２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二

重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４８】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞のＴ細胞依存性細胞傷害を約０．８９ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$で誘導する、請求項２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項４９】

請求項２７～４２のいずれか一項に記載の抗体又は二重特異性結合フラグメントを発現している、単離された細胞。

【請求項５０】

前記細胞はハイブリドーマである、請求項４９に記載の細胞。

【請求項５１】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、組み換えにより生成される、請求項４９に記載の細胞。

【請求項５２】

がんを有する対象を処置するための方法であって、前記方法は、

治療的に有効な量の、請求項２７～４２のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを、処置を必要とする患者に、前記がんを処置するのに十分な時間投与する工程を含む、方法。

【請求項５３】

がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法であって、前記方法は、

がん細胞の前記成長又は増殖を阻害するために、治療的に有効な量の、請求項２７～４２のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを投与する工程を含む、方法。

【請求項５４】

Ｔ細胞をＧＰＲＣ５Ｄ発現がん細胞に対し再指向する方法であって、前記方法は、

Ｔ細胞をがんに再指向するために、治療的に有効な量の、請求項２７～４２のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを投与する工程を含む、方法。

【請求項５５】

前記がんは、血液がんである、請求項５２、５３、又は５４に記載の方法。

【請求項５６】

前記血液がんは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がんである、請求項５５に記載の方法。

【請求項５７】

前記ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がんは、多発性骨髄腫である、請求項５６に記載の方法。

【請求項５８】

第２の治療剤を投与する工程を含む、請求項５２に記載の方法。

【請求項５９】

前記第２の治療剤は、化学療法剤又は標的を設定した抗がん治療剤である、請求項５８に記載の方法。

【請求項６０】

前記化学療法剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン２である、請求項５９に記載の方法。

【請求項６１】

前記第２の治療剤を、前記二重特異性抗体と同時に、連続的に、又は別個に、前記対象に投与する、請求項５９に記載の方法。

【請求項６２】

請求項２７～４２のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項６３】

請求項４９～５１のいずれか一項に記載の細胞を培養することにより、請求項２７～４

２のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを生成するための方法。

【請求項６４】

請求項２７～４２のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの、前記ＨＣ１、前記ＨＣ２、前記ＬＣ１、又は前記ＬＣ２をコードする、単離された合成ポリヌクレオチド。

【請求項６５】

請求項２７～４２のいずれか一項に定義されるとおりのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント、及び／又は請求項６３に定義されるとおりのポリヌクレオチドと、これらのための包装と、を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

（関連出願の相互参照）

本出願は２０１６年７月２０日に出願された米国仮特許出願第６２／３６４，８１１号の優先権を主張するものである。前述の出願の全内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０００２】

（配列表）

本出願は、ＡＳＣＩＩフォーマットで電子的に提出済みの配列表を含み、その配列表の全体を参照により本明細書に援用するものである。当該ＡＳＣＩＩのコピーは、２０１７年６月２８日に作成され、ファイル名はＰＲＤ３４２２ＵＳＮＰ＿ＳＬ．ｔｘｔであり、そのサイズは５７，６７３バイトである。

【０００３】

（発明の分野）

本明細書に提供される開示は、Ｇタンパク質連結受容体クラスＣグループ５メンバーＤ（ＧＰＲＣ５Ｄ）に特異的に結合するモノクローナル抗体、ＧＰＲＣ５Ｄ及びクラスター決定因子３（ＣＤ３）に特異的に結合する多重特異的抗体、並びに記載された抗体の生成方法及び使用方法に関する。

【背景技術】

【０００４】

多発性骨髄腫（ＭＭ）は、２番目に多い血液系腫瘍であり、がんによる全死亡者の２％を占める。ＭＭは、異質性疾患であり、ほとんどが特にｔ（１１；１４），ｔ（４；１４），ｔ（８；１４），ｄｅｌ（１３），ｄｅｌ（１７）の染色体の転座によって引き起こされる（Ｄｒａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）Ｂｌｏｏｄ　９２（３）：８０２～８０９；Ｇｅｒｔｚ　ｅｔ　ａｌ．，（２００５）Ｂｌｏｏｄ　１０６（８）：２８３７～２８４０；Ｆａｃｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，（２００１）Ｂｌｏｏｄ　９７（６）：１５６６～１５７１）。ＭＭに罹患している患者は、骨髄浸潤、骨破壊、腎不全、免疫不全、及びがん診断の心理的負荷によって、種々の疾患関連症状になり得る。２００６の時点で、ＭＭの５年相対生存率は約３４％であり、ＭＭは治療が難しい疾患であることは際立っており、現在のところ治療選択肢は存在しない。

【０００５】

Ｇタンパク質連結受容体、クラスＣ、グループ５、メンバーＤ（ＧＰＲＣ５Ｄ）は、２００１年に最初に同定されたオーファン、非定型、クラスＣ　ＧＰＣＲである（Ｂｒａｕｎｅｒ－Ｏｓｂｏｒｎｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｃｈｉｍ　Ｂｉｏｐｈｙｓ　Ａｃｔａ．１５１８（３）：２３７～２４８，２００１）。ＧＰＲＣ５Ｄ及びグループ５の他のＧＰＣＲ群は、クラスＣ受容体に対する非常に短いアミノ末端ドメインを有し、それゆえクラスＡ受容体と立体構造が類似すると予測される。これに関し、これらは、クラスＣのＧＰＣＲに対する配列相同性を有すること、並びに構造トポロジーがクラスＡ受容体と同程度であると予想されることからユニークである。ＧＰＲＣ５Ｄ活性化の機能的意義については

報告されておらず、リガンドは未だ不明である。ヒトにおいては、かかる遺伝子は３つのエキソンを有しており、染色体１２ｐ１３．３上に位置する。ＧＰＲＣ５Ｄ受容体は多様な種間で高度に保存されており、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄとは９２％の同一性を共有している。

【０００６】

ＧＰＲＣ５Ｄ ｍＲＮＡは、ほとんどがＭＭ患者由来の全ての悪性腫瘍細胞で発現している（Ａｔａｍａｎｉｕｋ ＪＡ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ４２（９）９５３～９６０；２０１２；Ｆｒｉｇｙｅｓｉ－ｂｌｏｏｄ ａｎｄ Ｃｏｈｅｎ，ｅｔ ａｌ．Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ １８（６）：３４８～３５；２０１３）。ＧＰＲＣ５Ｄ発現は患者間で様々に異なり、血漿細胞負荷及びＲｂ１欠損などの遺伝子異常と関連している（Ａｔａｍａｎｉｕｋ ＪＡ ｅｔ ａｌ．Ｅｕｒ Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ ４２（９）９５３～９６０；２０１２）。

【０００７】

この血漿細胞系列でのＧＰＲＣ５Ｄのみの発現が、かかる発現を抗骨髄腫抗体の理想的な標的とする。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントが提供される。また、提供されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントをコード可能な関連するポリヌクレオチド、提供された抗体及び抗原結合フラグメントを発現している細胞、並びに関連するベクター、並びに検出可能に標識された抗体及び抗原結合フラグメントもまた記載されている。加えて、提供された抗体及び抗原結合フラグメントを使用する方法が記載されている。例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントを使用することで、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの進行、退縮、又は不変性を診断若しくはモニタすること、患者ががんを処置される必要があるかを判定すること、又は対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでおり、かつＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗がん治療剤、例えば、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３に対する多重特異的抗体による処置に適しているかを判定すること、を行うことができる。

【０００９】

本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３に免疫特異的に結合する多重特異的抗体、並びにその多重特異的抗原結合フラグメントが更に提供される。提供されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体をコード可能な関連するポリヌクレオチド、提供された抗体を発現している細胞、並びに関連するベクター、並びに検出可能に標識された多重特異的抗体もまた記載されている。加えて、提供された多重特異的抗体を使用する方法が記載されている。例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体を使用することで、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの進行、退縮、又は不変性を診断若しくはモニタすること、患者ががんを処置される必要があるかを判定すること、又は対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでおり、かつＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗がん治療剤、例えば、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体による処置に適しているかを判定することができる。

【００１０】

ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体

本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的な、単離された抗体及び抗原結合フラグメントが記載されている。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに結合する。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄ及びカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに結合する。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２２のアミノ酸配列を有するポリペプチドの１つ又は２つ以上の残基に結合する。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、インビトロにて２８ｎＭ以下のEC_{50}でＡＤＣＣを誘導し得る。

【００１１】
表１に、本明細書に記載された一部のＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体の例の概要を提供する。
【００１２】
【表１】
表１．ヒトＧＰＲＣ５Ｄに対して生成されたｍＡｂのＣＤＲ配列

ID	HC－CDR1	HC－CDR2	HC－CDR3	LC－CDR1	LC－CDR2	LC－CDR3
GC5B81	SYAIS（配列番号1）	GIIPIFGTANYAQKFQG（配列番号5）	ESRWRGYKLD（配列番号9）	RASQSISSYLN（配列番号13）	AASSLQS（配列番号16）	QQSYSTPLT（配列番号19）
GC5B465 GC5B597	NYWMS（配列番号2）	GISYSGGSKYYASSVKG（配列番号6）	AAFDFGRRAVRLD（配列番号10）	RASQSISSYLN（配列番号13）	AASSLQS（配列番号16）	QQSYSTPLT（配列番号19）
GC5B483 GC5B599	SYFIG（配列番号3）	IIYPGKSDTRYSPSFQG（配列番号7）	VYSFGGRHKALFDY（配列番号11）	RASQSVSSYLA（配列番号14）	DASNRAT（配列番号17）	QQRSNWPLT（配列番号20）
GC5B596	GYTMN（配列番号4）	LINPYNSDTNYAQKLQG（配列番号8）	VALRVALDY（配列番号12）	KASQNVATHVG（配列番号15）	SASYRYS（配列番号18）	QQYNRYPYT（配列番号21）
GC5B382	DYGMH（配列番号61）	AIKYSGGSTYYADSVKG（配列番号67）	RAESGPGLDY（配列番号72）	KSSQSVLYSSNNKNYLA（配列番号98）	WASTRES（配列番号78）	QQYYSTPLT（配列番号80）
GC5B379	NYWMS（配列番号2）	GISYSGGSKYYADSVKG（配列番号28）	AAWDFGRRAVRLDY（配列番号30）	RASQSISSYLN（配列番号13）	AASSLQS（配列番号16）	QQSYSTPLT（配列番号19）
GC5B373	SYWIG（配列番号27）	IIYPGDSDTRYSPSFQG（配列番号29）	IGFYGRSFRIFDY（配列番号73）	RASQSVSSYLA（配列番号14）	DASNRAT（配列番号17）	QQRSNWPLT（配列番号20）
GC5B376	SYWIG（配列番号27）	IIYPGDSDTRYSPSFQG（配列番号29）	VYSFGGRHKALFDY（配列番号11）	RASQSVSSYLA（配列番号14）	DASNRAT（配列番号17）	QQRSNWPLT（配列番号20）
GC5B385	GYAMS（配列番号62）	AISGSGGSTYYADSVKG（配列番号68）	VDRSFGRSRYTLDY（配列番号74）	RASQSVSSYLA（配列番号14）	DASNRAT（配列番号17）	QQRSNWPLT 配列番号20
GC5B370 GC5B598	SYGIS（配列番号63）	GIIPIFGNINYAQKFQG（配列番号69）	VSRRFKRFAYYFDY（配列番号75）	KSSQSVLYSSNNKNYLA（配列番号98）	WASTRES（配列番号78）	QQYYSTPLT（配列番号80）
GC5B602	GYSFTGYTMN（配列番号64）	LINPYNGDTN（配列番号70）	VALRVALDY（配列番号12）	KASQNVATHVG（配列番号15）	SASYRYS（配列番号18）	QQYNRYPYT（配列番号21）
GC5B603	SYAMS（配列番号65）	AISGSGGSTYYADSVKG（配列番号68）	SNFLPVVFDY（配列番号76）	RASQSVRKSLA（配列番号95）	TASNRAT（配列番号79）	QQYFRAPIT（配列番号81）
GC5B601	GFSLTSYNVH（配列番号66）	VIWAGGSTNYNSALMS（配列番号71）	DGIRLRFAY（配列番号77）	KASQNVATHVG（配列番号15）	SASYRYS（配列番号18）	QQYNRYPYT（配列番号21）

【００１３】
一部の実施形態では、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖を含む、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。一部の実施形態では、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖と、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖と、を含む、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。本明細書に記載された一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントは、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖と、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖と、を含む抗体又は抗原結合と、ＧＰＲＣ５Ｄに対する結合について競合する。
【００１４】
ＩｇＧクラスは、ヒトにおいて、４つのアイソタイプ：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４に分割される。これらのアイソタイプは、Ｆｃ領域のアミノ酸配列において９５％超の相同性を共有するが、ヒンジ領域のアミノ酸組成及び構造において主な差異を示す。Ｆｃ領域は、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を介在する。ＡＤＣＣにおいて、抗体のＦｃ領域は、免疫エフェクター細胞、例えば、ナチュラルキラー及びマクロファージの表面上のＦｃ受容体（ＦｃｇＲ）に結合する。同免疫エフェクター細胞は、標的細胞の貪食又は溶解をもたらす。ＣＤＣにおいて、抗体は、標的細胞を、細胞表面における補体カスケードをトリガーすることにより殺傷する。本明細書に記載された抗体は、ＩｇＧアイソタイプのいずれかとの組み合わせで、可変ドメインの記載された特徴を有する抗体を含む。同ＩｇＧアイソタイプは、Ｆｃ配列が異なるエフェクター機能をもたらすために改変されている改変版を含む。
【００１５】
治療用抗体の多くの応用に関し、Ｆｃ介在性エフェクターの機能は、作用機序を担わない。これらのＦｃ介在性エフェクター機能は、メカニズム外の毒性を引き起こすことによ

り有害であるおそれがあり、かつ安全性リスクを引き起こすおそれがある。エフェクター機能を改変することは、Ｆｃ領域を遺伝子操作して、ＦｃｇＲ又は補体因子への結合性を低下させることにより達成され得る。活性化（ＦｃｇＲＩ、ＦｃｇＲＩＩａ、ＦｃｇＲＩＩＩａ、及びＦｃｇＲＩＩＩｂ）及び阻害性（ＦｃｇＲＩＩｂ）ＦｃｇＲ又は補体の第１成分（Ｃ１ｑ）へのＩｇＧの結合性は、ヒンジ領域及びＣＨ２ドメイン中に位置する残基により決まる。ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ４に変異が導入されて、Ｆｃ機能を低下又はサイレンシングさせる。本明細書に記載された抗体は、これらの改変を含んでもよい。

【００１６】

一実施形態では、抗体は、下記特性：（ａ）親Ｆｃと比較した場合、低下したエフェクター機能、（ｂ）ＦｃｇＲＩ、ＦｃｇＲＩＩａ、ＦｃｇＲＩＩｂ、ＦｃｇＲＩＩＩｂ、及び／又はＦｃｇＲＩＩＩａに対する低下した親和性、（ｃ）ＦｃｇＲＩに対する低下した親和性、（ｄ）ＦｃｇＲＩＩａに対する低下した親和性、（ｅ）ＦｃｇＲＩＩｂに対する低下した親和性、（ｆ）ＦｃｇＲＩＩＩｂに対する低下した親和性、又は（ｇ）ＦｃｇＲＩＩＩａに対する低下した親和性のうち１つ又は２つ以上を有するＦｃ領域を含む。

【００１７】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ又はその誘導体、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４のアイソタイプである。抗体がＩｇＧ１アイソタイプを有する一部の実施形態では、抗体は、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及び／又はＫ４０９Ｒ置換を、そのＦｃ領域中に含有する。抗体がＩｇＧ４アイソタイプを有する一部の実施形態では、抗体は、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、及びＬ２３５Ａ置換を、そのＦｃ領域中に含有する。本明細書に記載された抗体は、これらの改変を含んでもよい。

【００１８】

記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントに加えて、記載された抗体及び抗原結合フラグメントをコード可能なポリヌクレオチド配列もまた提供される。記載されたポリヌクレオチドを含むベクターも提供され、同様に、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントを発現している細胞も本明細書において提供される。また、開示されたベクターを発現可能な細胞も記載される。これらの細胞は、哺乳類細胞（例えば、２９３Ｆ細胞、ＣＨＯ細胞）、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ７細胞）、酵母細胞、植物細胞、又は細菌細胞（例えば、大腸菌）でもよい。記載された抗体はまた、ハイブリドーマ細胞により産生できる。

【００１９】

ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体を使用する方法

記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントを使用する方法もまた開示されている。本節において検討されている方法で使用する特定の抗体には、表１に抗体に対して記載された一連のＣＤＲを有するものが含まれる。例えば、これらの抗体又は抗原結合フラグメントは、がん治療においてＧＰＲＣ５Ｄ受容体相互作用と干渉することにより有用であり得、すなわち、抗体に毒素がコンジュゲートされると、毒物はＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを標的とするようになる。更に、これらの抗体又は抗原結合フラグメントは、生体サンプル、例えば、血液又は血清中のＧＰＲＣ５Ｄの存在を検出するのに、生体サンプル、例えば、血液又は血清中のＧＰＲＣ５Ｄの量を定量するのに、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを診断するのに、がんで苦しむ対象を処置する方法を決定するのに、又は対象におけるＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの進行をモニタするのに、有用であり得る。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんは、多発性骨髄腫（ＭＭ）などのリンパ腫であり得る。記載された方法は、対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３に対する多重特異的抗体による処置を受ける前に行われてもよい。更に、記載された方法は、対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置、例えば、本明細書に記載されるＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３に対する多重特異的抗体による処置を受けた後に行われてもよい。

【００２０】

生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出する記載された方法は、生体サンプルを、本明細

書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントのうち１つ又は２つ以上にさらすことを含む。

【００２１】

また、対象におけるＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを診断する記載された方法は、生体サンプルを、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントのうち１つ又は２つ以上にさらすことを伴う。但し、この方法は、サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を定量する工程と、サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を、既知の標準又は参照サンプルと比較する工程と、対象のＧＰＲＣ５Ｄレベルががんに関連付けられるＧＰＲＣ５Ｄのレベル内に入るかどうかを判定する工程と、を含む。

【００２２】

本明細書において、対象中のＧＰＲＣ５Ｄ発現がんをモニタする方法もまた記載されている。記載された方法は、生体サンプルを、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントのうち１つ又は２つ以上にさらす工程と、抗体又はその抗原結合フラグメントに結合したサンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を定量する工程と、サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を、既知の標準若しくは参照サンプル、又は対象から以前に得られた同様のサンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量のいずれかと比較する工程と、比較されたサンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量における差異に基づいて、対象のＧＰＲＣ５Ｄレベルががんの進行、退縮、又は不変を示すかどうかを判定する工程と、を含む。

【００２３】

対象から得られ、又は同対象に由来するサンプルは、生体サンプル、例えば、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環している腫瘍細胞、組織会合していない細胞、組織、外科手術的に切除された腫瘍組織、生検、微細針吸引サンプル、又は組織学的調製物である。

【００２４】

記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、記載された方法又は当業者に既知の他の方法での使用のために標識されてもよい。例えば、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合フラグメントは、放射線標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ＥＣＬ標識、酵素、ルテニウム、^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ、^{111}Ｉｎ－ジ
エチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びβガラクトシダーゼ、若しくはポリヒスチジン、又は当技術分野において既知の類似するこのような標識で標識されてもよい。

【００２５】

ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体キット

開示されるＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントを含むキットが本明細書において記載されている。記載されたキットを使用して、本明細書で提供されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントを使用する方法、又は当業者に既知の他の方法を行うことができる。一部の実施形態では、記載されたキットは、本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントと、生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの存在を検出する際に使用する試薬と、を含んでもよい。したがって、記載されたキットは、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合フラグメントのうち１つ又は２つ以上と、使用していないときに抗体又はフラグメントを収容するための容器と、抗体又はフラグメントを使用するための使用説明書と、本明細書に記載されたとおり、固体支持体に固定された抗体若しくはフラグメント及び／又は検出可能に標識された形態の抗体若しくはフラグメントと、を含んでもよい。

【００２６】

ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体

ＴＣＲ／ＣＤ３複合体によるＧＰＲＣ５Ｄ発現ＭＭ細胞へのＴリンパ球の再指向は、魅力的な代替アプローチを提示する。Ｔリンパ球のＴＣＲ／ＣＤ３複合体は、ガンマ（γ）、デルタ（δ）、イプシロン（ε）、ゼータ（ζ）、及びエータ（η）標識されたＣＤ３

のインバリアントなサブユニットと細胞表面で共発現した、ＴＣＲアルファ（α）／ベータ（β）又はＴＣＲガンマ（γ）／デルタ（δ）ヘテロ二量体のいずれかからなる。ヒトＣＤ３εは、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０７７６６（ＣＤ３Ｅ＿ＨＵＭＡＮ）に記載されている。従来技術において記載される抗ＣＤ３ε抗体は、ＳＰ３４である（Ｙａｎｇ　ＳＪ，Ｔｈｅ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（１９８６）１３７；１０９７～１１００）。ＳＰ３４は霊長類及びヒトの両方のＣＤ３と反応する。ＳＰ３４はＰｈａｒｍｉｎｇｅｎから入手できる。従来技術で記載される更なる抗ＣＤ３抗体は、ＵＣＨＴ－１である（国際公開第２０００４１４７４号を参照されたい）。従来技術で記載される更なる抗ＣＤ３抗体は、ＢＣ－３である（Ｆｒｅｄ　Ｈｕｔｃｈｉｎｓｏｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ；ｕｓｅｄ　ｉｎ　Ｐｈａｓｅ　Ｉ／ＩＩ　ｔｒｉａｌｓ　ｏｆ　ＧｖＨＤ，Ａｎａｓｅｔｔｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ　５４：８４４（１９９２））。ＳＰ３４とＵＣＨＴ－１及びＢＣ－３との間の違いは、ＳＰ－３４がＣＤ３のε鎖上に単独で存在するエピトープを認識する（Ｓａｌｍｅｒｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：３０４７を参照されたい）のに対して、ＵＣＨＴ－１及びＢＣ－３はε鎖及びγ鎖の両方が寄与するエピトープを認識するという点である。抗体ＳＰ３４のものと同じ配列を有する抗体の配列は、国際公開第２００８１１９５６５号、同第２００８１１９５６６号、同第２００８１１９５６７号、同第２０１００３７８３６号、同第２０１００３７８３７号及び同第２０１００３７８３８号に言及されている。抗体ＳＰ３４のＶＨに対して９６％の同一性を有する配列は、米国特許第８２３６３０８号（国際公開第２００７０４２２６１号）に言及されている。

【００２７】

本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３に結合する、単離された多重特異的抗体（「ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体」）及びその多重特異的抗原結合フラグメントが記載されている。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに免疫特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。

【００２８】

一部の実施形態では、多重特異的抗体のＧＰＲＣ５Ｄ特異的アームは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄ及びカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに結合する。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又は抗原結合フラグメントのＧＰＲＣ５Ｄ特異的アームは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄの細胞外ドメインに結合する。好ましい実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、二重特異性抗体又は抗原結合フラグメントである。一部の実施形態では、ａ）第１の重鎖（ＨＣ１）と、ｂ）第２の重鎖（ＨＣ２）と、ｃ）第１の軽鎖（ＬＣ１）と、ｄ）第２の軽鎖（ＬＣ２）と、を含み、ＨＣ１とＬＣ１とが対を成して、ＧＰＲＣ５Ｄに免疫特異的に結合する第１の抗原結合部位を形成し、ＨＣ２とＬＣ２とが対を成して、ＣＤ３に免疫特異的に結合する第２の抗原結合部位を形成する、単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメントが提供される。別の実施形態では、抗体又は二重特異性結合フラグメントを発現している単離された細胞が提供される。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体のＧＰＲＣ５Ｄ結合アーム（又は「ＧＰＲＣ５Ｄ特異的アーム」）は、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ抗体から（例えば、表１で列記されたＣＤＲ配列を有する抗体から）得られる。

【００２９】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又は抗原結合フラグメントのＧＰＲＣ５Ｄ特異的アームは、ＩｇＧ又はその誘導体である。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体のＣＤ３結合アーム（又は「ＣＤ３特異的アーム」）は、マウスモノクローナル抗体ＳＰ３４、マウスＩｇＧ３／ラムダアイソタイプに由来する。（Ｋ．Ｒ．Ａｂｈｉｎａｎｄａｎ　ａｎｄ　Ａ．Ｃ．Ｍａｒｔｉｎ，２００８．Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４５，３８３２～３８３９）。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体のＣＤ３結合アームは、表２から選択された１つのＶＨドメイン

及び１つのＶＬドメインを含む。

【００３０】

【表２】

表２．ＣＤ３特異的抗体及び抗原結合フラグメントの重鎖及び軽鎖

ＶＨ	ＶＬ
ＣＤ３Ｂ２１９（配列番号９９）： EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTE DTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	ＣＤ３Ｂ２１９（配列番号１００）： QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCAL WYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFP PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLT PEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S

【００３１】

ＩｇＧクラスは、ヒトにおいて、４つのアイソタイプ：ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４に分割される。これらのアイソタイプは、Ｆｃ領域のアミノ酸配列において９５％超の相同性を共有するが、ヒンジ領域のアミノ酸組成及び構造において主な差異を示す。Ｆｃ領域は、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を介在する。ＡＤＣＣにおいて、抗体のＦｃ領域は、免疫エフェクター細胞、例えば、ナチュラルキラー及びマクロファージの表面上のＦｃ受容体（ＦｃｇＲ）に結合する。同免疫エフェクター細胞は、標的細胞の貪食又は溶解をもたらす。ＣＤＣにおいて、抗体は、標的細胞を、細胞表面における補体カスケードをトリガーすることにより殺傷する。

【００３２】

多くの治療用抗体の適用に関し、Ｆｃ介在性エフェクター機能は、作用機序を担わない。これらのＦｃ介在性エフェクター機能は、メカニズム外の毒性を引き起こすことにより有害であるおそれがあり、かつ安全性リスクを引き起こすおそれがある。エフェクター機能の改変は、Ｆｃ領域を遺伝子操作して、ＦｃｇＲ又は補体因子への結合性を低下させることにより達成され得る。活性化（ＦｃｇＲＩ、ＦｃｇＲＩＩａ、ＦｃｇＲＩＩＩａ、及びＦｃｇＲＩＩＩｂ）及び阻害性（ＦｃｇＲＩＩｂ）ＦｃｇＲ又は補体の第１成分（Ｃ１ｑ）へのＩｇＧの結合性は、ヒンジ領域及びＣＨ２ドメイン中に位置する残基により決まる。ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ４に変異が導入されると、Ｆｃ機能が低下又はサイレンシングする。

【００３３】

一実施形態では、抗体は、下記特性：（ａ）親Ｆｃと比較した場合、低下したエフェクター機能、（ｂ）ＦｃｇＲＩ、ＦｃｇＲＩＩａ、ＦｃｇＲＩＩｂ、ＦｃｇＲＩＩＩｂ、及び／又はＦｃｇＲＩＩＩａに対する低下した親和性、（ｃ）ＦｃｇＲＩに対する低下した親和性、（ｄ）ＦｃｇＲＩＩａに対する低下した親和性、（ｅ）ＦｃｇＲＩＩｂに対する低下した親和性、（ｆ）ＦｃｇＲＩＩＩｂに対する低下した親和性、又は（ｇ）ＦｃｇＲＩＩＩａに対する低下した親和性のうち１つ又は２つ以上を有するＦｃ領域を含む。

【００３４】

一部の実施形態では、多重特異的抗体のＣＤ３特異的アームが得られるＣＤ３特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ又はその誘導体である。一部の実施形態では、多重特異的抗体のＣＤ３特異的アームが得られるＣＤ３特異的抗体又は抗原結合フラグメン

トは、ＩｇＧ１又はその誘導体である。一部の実施形態では、例えば、ＣＤ３結合アームが得られるＣＤ３特異的ＩｇＧ１抗体のＦｃ領域は、そのＦｃ領域中に、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＦ４０５Ｌ置換を含む。一部の実施形態では、多重特異的抗体のＣＤ３特異的アームが得られるＣＤ３特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ４又はその誘導体である。一部の実施形態では、例えば、ＣＤ３結合アームが得られるＣＤ３特異的ＩｇＧ４抗体のＦｃ領域は、そのＦｃ領域中に、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｆ４０５Ｌ、及びＲ４０９Ｋ置換を含む。一部の実施形態では、多重特異的抗体のＣＤ３特異的アームが得られるＣＤ３特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒトＴ細胞及び／又は初代カニクイザルＴ細胞上のＣＤ３εに結合する。一部の実施形態では、多重特異的抗体のＣＤ３特異的アームが得られるＣＤ３特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞及び／又は初代カニクイザルＣＤ４＋Ｔ細胞を活性化する。

【００３５】

記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体に加えて、記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体をコード可能なポリヌクレオチド配列も提供される。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントのＨＣ１、ＨＣ２、ＬＣ１、又はＬＣ２をコードする単離された合成ポリヌクレオチドが提供される。記載されたポリヌクレオチドを含むベクターも提供され、同様に、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体を発現している細胞も本明細書において提供される。また、開示されたベクターを発現可能な細胞も記載される。これらの細胞は、哺乳類細胞（例えば、２９３Ｆ細胞、ＣＨＯ細胞）、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ７細胞）、酵母細胞、植物細胞、又は細菌細胞（例えば、大腸菌）でもよい。記載された抗体はまた、ハイブリドーマ細胞により産生できる。一部の実施形態では、細胞を培養することにより、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを生成するための方法が提供される。

【００３６】

本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又は抗原結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体とを含む医薬組成物が更に提供される。

【００３７】

ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体を使用する方法

記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体及びその多重特異的抗原結合フラグメントを使用する方法もまた開示される。例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体及びその多重特異的抗原結合フラグメントは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置を必要とする対象における、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置に有用であり得る。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんは、多発性骨髄腫などのリンパ腫である。

【００３８】

ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置を、かかる処置を必要とする対象において行う記載された方法は、この対象に、治療的に有効な量の記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントを投与する工程を含む。一部の実施形態では、対象は、哺乳類、好ましくは、ヒトである。好ましい実施形態では、治療的に有効な量のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性抗原結合フラグメントを、処置を必要とする患者に、がんを処置するのに十分な時間投与することにより、がんを有する対象を処置するための方法が提供される。

【００３９】

がん細胞の成長又は増殖を阻害するために、治療的に有効な量のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性抗原結合フラグメントを投与することにより、がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法が更に提供される。

【００４０】

また、本明細書において、Ｔ細胞をがんに再指向するために、治療的に有効な量のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを投与することにより、Ｔ細胞をＧＰＲＣ５Ｄ発現がん細胞に再指向する方法もまた提供される。

【００４１】

ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３特異的抗体キット

本明細書において、開示されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体を含むキットが記載されている。記載されたキットを使用して、本明細書で提供されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体を使用する方法又は当業者に既知の他の方法を行うことができる。一部の実施形態では、記載されたキットは、本明細書に記載された抗体と、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置に使用するための試薬と、を含んでもよい。したがって、記載されたキットは、本明細書に記載された多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントのうち１つ若しくは２つ以上、使用していないときに抗体又はフラグメントを収容するための容器、並びに／又は抗体若しくはフラグメントを使用するための使用説明書、本明細書に記載されたとおりの、固体支持体に固定された抗体若しくはフラグメント及び／若しくは検出可能に標識された形態の抗体若しくはフラグメントと、を含んでもよい。

【図面の簡単な説明】

【００４２】

【図１】選択された抗ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂの、ヒトＧＰＲＣ５Ｄ細胞及び遺伝子導入していないＨＥＫ２９３細胞に対する濃度依存的結合プロファイル。３種類のｍＡｂ、すなわちＧＣ５Ｂ３６、ＧＣ５Ｂ１６８、及びＧＣ５Ｂ２０５は、遺伝子導入していない（ＧＰＲＣ５Ｄ　ｎｕｌｌ）ＨＥＫ２９３細胞にも結合することが観察された。

【図２】ヒトＧＰＲＣ５Ｄ　ＨＥＫ２９３Ｆ細胞に対する抗ＧＰＣＲ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の用量依存的結合。

【図３】ＦＡＣＳを使用して、二重特異性抗体のＭＭ１Ｒ細胞及びＨ９２９細胞に対する結合プロファイルを、過剰発現させたヒトＧＰＣＲ５Ｄ　ＨＥＫ２９３細胞及び遺伝子導入していないＨＥＫ２９３細胞の場合と比較した。

【図４Ａ】ヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞に対する抗ＧＰＣＲ５Ｄ×ＣＤ３抗体によるＴ細胞介在性細胞傷害及びＴ細胞活性化。

【図４Ｂ】ヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞に対する抗ＧＰＣＲ５Ｄ×ＣＤ３抗体によるＴ細胞介在性細胞傷害及びＴ細胞活性化。

【図５Ａ】カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞に対する抗ＧＰＣＲ５Ｄ×ＣＤ３抗体によるＴ細胞介在性細胞傷害及びＴ細胞活性化。

【図５Ｂ】カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞に対する抗ＧＰＣＲ５Ｄ×ＣＤ３抗体によるＴ細胞介在性細胞傷害及びＴ細胞活性化。

【図６Ａ】ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３　Ａｂは、予防的（prophylactic）ＮＳＧマウスモデルにおいて、Ｈ９２９細胞を効率的に殺傷する。ＧＣＤＢ３２（６Ａ）及びＧＣＤＢ３５（６Ｂ）では、投与量１０μｇで腫瘍の成長が完全に阻害され、ＧＣＤＢ３２については、投与量１μｇでも腫瘍の成長阻害率は１００％が可能であった。

【図６Ｂ】ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３　Ａｂは、予防的（prophylactic）ＮＳＧマウスモデルにおいて、Ｈ９２９細胞を効率的に殺傷する。ＧＣＤＢ３２（６Ａ）及びＧＣＤＢ３５（６Ｂ）では、投与量１０μｇで腫瘍の成長が完全に阻害され、ＧＣＤＢ３２については、投与量１μｇでも腫瘍の成長阻害率は１００％が可能であった。

【図７Ａ】Ｆｃブロックの非存在下（７Ａ）での力価の比較。

【図７Ｂ】Ｆｃブロックの存在下（７Ｂ）での力価の比較。

【図８Ａ】ＧＣＤＢ３５　ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ４０及びＧＣＤＢ４３のＦｃγ受容体に対する結合。

【図８Ｂ】ＧＣＤＢ３５　ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ４０及びＧＣＤＢ４３のＦｃγ受容体に対する結合。

【図８Ｃ】ＧＣＤＢ３５　ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ４０及びＧＣＤＢ４３のＦｃγ受容体に対する結合。

【図８Ｄ】ＧＣＤＢ３５　ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ４０及びＧＣＤＢ４３のＦｃγ受容体に対する結合。

【図９Ａ】ハイブリドーマ由来ｍＡｂの、ＦＡＣＳによる結合評価。

【図９Ｂ】ハイブリドーマ由来ｍＡｂの、ＦＡＣＳによる結合評価。

【図１０Ａ】Ｈ９２９細胞に対するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体のＴ細胞介在性細胞傷害。
【図１０Ｂ】Ｈ９２９細胞に対するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体のＴ細胞介在性細胞傷害。
【図１１Ａ】ＧＰＲＣ５Ｄ陽性細胞株（Ｈ９２９、ＭＭ１Ｒ、ＬＰ１、ＯＰＭ２）及び陰性細胞株（ＮＡＬＭ６）に結合するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体。
【図１１Ｂ】ＧＰＲＣ５Ｄ陽性細胞株（Ｈ９２９、ＭＭ１Ｒ、ＬＰ１、ＯＰＭ２）及び陰性細胞株（ＮＡＬＭ６）に結合するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体。
【図１１Ｃ】ＧＰＲＣ５Ｄ陽性細胞株（Ｈ９２９、ＭＭ１Ｒ、ＬＰ１、ＯＰＭ２）及び陰性細胞株（ＮＡＬＭ６）に結合するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体。
【図１１Ｄ】ＧＰＲＣ５Ｄ陽性細胞株（Ｈ９２９、ＭＭ１Ｒ、ＬＰ１、ＯＰＭ２）及び陰性細胞株（ＮＡＬＭ６）に結合するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体。
【図１１Ｅ】ＧＰＲＣ５Ｄ陽性細胞株（Ｈ９２９、ＭＭ１Ｒ、ＬＰ１、ＯＰＭ２）及び陰性細胞株（ＮＡＬＭ６）に結合するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体。
【図１２Ａ】ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂは、生体内において強力な腫瘍阻害剤である。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂ（図１２ＡにはＧＣＤＢ３２を示す）は、投与量１０μｇ及び１μｇで多発性骨髄腫細胞（Ｈ９２９）の腫瘍成長を完全に阻害した。
【図１２Ｂ】ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂは、生体内において強力な腫瘍阻害剤である。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂ（図１２ＢにはＧＣＤＢ５３を示す）は、投与量１０μｇ及び１μｇで多発性骨髄腫細胞（Ｈ９２９）の腫瘍成長を完全に阻害した。
【図１２Ｃ】ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂは、生体内において強力な腫瘍阻害剤である。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂ（図１２ＣにはＧＣＤＢ６１を示す）は、投与量１０μｇ及び１μｇで多発性骨髄腫細胞（Ｈ９２９）の腫瘍成長を完全に阻害した。
【図１２Ｄ】ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂは、生体内において強力な腫瘍阻害剤である。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂ（図１２ＤにはＧＣＤＢ７２を示す）は、投与量１０μｇ及び１μｇで多発性骨髄腫細胞（Ｈ９２９）の腫瘍成長を完全に阻害した。ＧＣＤＢ７２を０．１μｇで投与した場合には、腫瘍の成長阻害率は８０％であるという差異が観察された。
【図１３】様々な濃度のリード抗体（lead antibodies）でＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$ＭＭ１．Ｒ細胞株を６０分間染色し、表面結合プロファイルを測定した（ｎ＝３）。フィコエリトリン標識したヒトＩｇＧ４Ｆｃ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＨＰ６０２５クローン）を、シグナルを捕捉する二次抗体として使用した。結合は、ＦＡＣＳにより求められた、正規化された幾何平均蛍光強度として表される。データのグラフ化及びフィッティングは、勾配が可変の非線形回帰（４パラメータ）及び最小二乗法を使用して、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　６で実施した。
【図１４Ａ－１】様々な濃度のＦＡＢ６３００抗体及びＧＣ５Ｍ４８１抗体でＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$細胞株を６０分間染色し、表面結合プロファイルを測定した。フィコエリトリン標識したヒトＩｇＧ４Ｆｃ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＨＰ６０２５クローン）を、シグナルを捕捉する二次抗体として使用した。結合をヒストグラムとして表す。黒線はアイソタイプを示し、赤線はＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体を表す。影をつけた点線は、アイソタイプ対照を示し、実線はリード分子の結合を示す。
【図１４Ａ－２】様々な濃度のＦＡＢ６３００抗体及びＧＣ５Ｍ４８１抗体でＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$細胞株を６０分間染色し、表面結合プロファイルを測定した。フィコエリトリン標識したヒトＩｇＧ４Ｆｃ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＨＰ６０２５クローン）を、シグナルを捕捉する二次抗体として使用した。結合をヒストグラムとして表す。黒線はアイソタイプを示し、赤線はＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体を表す。影をつけた点線は、アイソタイプ対照を示し、実線はリード分子の結合を示す。

【図１４Ｂ－１】様々な濃度のＦＡＢ６３００抗体及びＧＣ５Ｍ４８１抗体でＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$細胞株を６０分間染色し、表面結合プロファイルを測定した。フィコエリトリン標識したヒトＩｇＧ４Ｆｃ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＨＰ６０２５クローン）を、シグナルを捕捉する二次抗体として使用した。ＧＰＲＣ５Ｄ＋多発性骨髄腫細胞株に対するリード分子の結合パターンを示す。影をつけた点線は、アイソタイプ対照を示し、実線はリード分子の結合を示す。

【図１４Ｂ－２】様々な濃度のＦＡＢ６３００抗体及びＧＣ５Ｍ４８１抗体でＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$細胞株を６０分間染色し、表面結合プロファイルを測定した。フィコエリトリン標識したヒトＩｇＧ４Ｆｃ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＨＰ６０２５クローン）を、シグナルを捕捉する二次抗体として使用した。ＧＰＲＣ５Ｄ＋多発性骨髄腫細胞株に対するリード分子の結合パターンを示す。影をつけた点線は、アイソタイプ対照を示し、実線はリード分子の結合を示す。

【図１４Ｂ－３】様々な濃度のＦＡＢ６３００抗体及びＧＣ５Ｍ４８１抗体でＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$細胞株を６０分間染色し、表面結合プロファイルを測定した。フィコエリトリン標識したヒトＩｇＧ４Ｆｃ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＨＰ６０２５クローン）を、シグナルを捕捉する二次抗体として使用した。ＧＰＲＣ５Ｄ＋多発性骨髄腫細胞株に対するリード分子の結合パターンを示す。影をつけた点線は、アイソタイプ対照を示し、実線はリード分子の結合を示す。

【図１５Ａ】２名の異なるＭＭ患者由来の、凍結した骨髄由来単核細胞を使用して、ＩｇＧ４アイソタイプ対照と比較したＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の結合、プラズマ細胞の細胞傷害（plasma cell cytotoxicity）及びＴ細胞活性化を評価した。細胞傷害アッセイのため、患者のＢＭ　ＭＮＣサンプルに健常ドナー由来のＴ細胞を外部より添加し、４種類のリード分子と共に４８時間インキュベートした。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体は、全てのドナーサンプルについて用量依存的な様式で血漿細胞に結合した。平均蛍光強度をＹ軸に記録した。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体処理に応答する血漿生細胞（ＣＤ１３８$^{+}$）の減少及び付随するＴ細胞でのＣＤ２５の上方制御に注目されたい。

【図１５Ｂ】２名の異なるＭＭ患者由来の、凍結した骨髄由来単核細胞を使用して、ＩｇＧ４アイソタイプ対照と比較したＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の結合、プラズマ細胞の細胞傷害（plasma cell cytotoxicity）及びＴ細胞活性化を評価した。細胞傷害アッセイのため、患者のＢＭ　ＭＮＣサンプルに健常ドナー由来のＴ細胞を外部より添加し、４種類のリード分子と共に４８時間インキュベートした。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体は、全てのドナーサンプルについて用量依存的な様式で血漿細胞に結合した。平均蛍光強度をＹ軸に記録した。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体処理に応答する血漿生細胞（ＣＤ１３８$^{+}$）の減少及び付随するＴ細胞でのＣＤ２５の上方制御に注目されたい。

【図１６】第０日目に、ＮＳＧマウスに、ＭＭ．１Ｓヒト多発性骨髄腫細胞を皮下移植した。７日目に、ヒトＰＢＭＣを静脈内投与した。第１５、１８、２２、２４、２９、３２、及び３６日目に、ＰＢＳ、ＧＣＤＢ７２（０．１μｇ、１μｇ、１０μｇ、及び５０μｇ／個体（それぞれ０．００５、０．０５、０．５及び２．５ｍｇ／ｋｇ相当））、及びＮｕｌｌ対照抗体を静脈内投与した。週に２度皮下腫瘍を測定し、その結果を、それぞれの群における平均腫瘍体積としてｍｍ^{3}±（ＳＥＭ）で表した。１μｇ（０．０５ｍｇ／ｋｇ）で投与した場合、ＧＣＤＢ７２抗体処理では、ＰＢＳと比較して皮下腫瘍の成長は有意に阻害された（ＴＧＩ＝６４％，ｐ＜０．０００１）。ＧＣＤＢ７２は、１０μｇ／個体（０．５ｍｇ／ｋｇ）及び５０μｇ／個体（２．５ｍｇ／ｋｇ）の投与量では、腫瘍の成長を完全に退縮させた（ｐ≦０．０００１）。Ｎｕｌｌ対照抗体は、ほとんど影響がなく、又は全く影響がなかった。テューキー多重比較検定（Ｇｒａｐｈ　Ｐａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェア（バージョン６）を使用）を利用した、多重比較２－ｗａｙ　ＡＮＯＶＡを用いて、統計的有意性を評価した。確率値（ｐ）が＜０．０５であれば、グループ間の差分は有意であるとみなした。

【図１７】第０日目に、ＮＳＧに、ＭＭ．１Ｓヒト多発性骨髄腫細胞を皮下移植した。７日目に、ヒトＰＢＭＣを静脈内投与した。第１５、１８、２２、２４、２９、３２、及び３６日目に、ＰＢＳ、ＧＣＤＢ７２（０．１μｇ、１μｇ、１０μｇ、及び５０μｇ／個体（それぞれ０．００５、０．０５、０．５及び２．５ｍｇ／ｋｇ相当））、及びＮｕｌｌ対照抗体を静脈内投与した。体重は、処置の開始時から試験終了までの体重の絶対値（absolute body weight）として表す。

【発明を実施するための形態】

【００４３】

定義

本明細書及び特許請求の範囲を通して本明細書の諸態様に関する様々な用語が使用される。別途記載のない限り、そのような用語には、当該技術分野におけるそれらの通常の意味が与えられるものとする。その他の具体的に定義される用語は、本明細書に提供される定義と一致する様式で解釈されるものとする。

【００４４】

本明細書及び添付の「特許請求の範囲」において使用されるとき、単数形「ａ」、「ａｎ」及び「ｔｈｅ」は、その内容について別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を包含する。したがって、例えば、「細胞（a cell）」という言及には、２つ以上の細胞の組み合わせ、及びこれに類するものなどが含まれる。

【００４５】

本明細書で使用されるとき、測定値、例えば、量、持続時間等に言及する場合の「約」という用語は、指定された値から最大±１０％の偏差を包含することを意味する。同様に、このような偏差は、開示された方法を行うのに適している。別途記載のない限り、本明細書及び特許請求の範囲において使用される、成分の量、並びに分子量及び反応条件等の特性を表わす全ての数字は、全ての事例において「約」という用語により修飾されていると理解されたい。したがって、そうではないと示されない限り、下記明細書及び添付の特許請求の範囲で説明された数値パラメータは、本発明により得ようとする所望の特性に応じて変動する場合がある近似値である。最低でも、特許請求の範囲の範囲に対して均等論の適用を制限することを試みてはならず、各数値パラメータは、報告された有効桁の数字を考慮し、通常の四捨五入の手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

【００４６】

本発明の広い範囲を説明する数値範囲及びパラメータは近似値であるが、特定の実施例に記載された数値は、可能な限り正確に報告される。但し、任意の数値は、各試験測定において見出される標準偏差から必然的に生じる一定の誤差を本質的に含有する。

【００４７】

「単離された」とは、生物学的成分（例えば、核酸、ペプチド、又はタンパク質）が、これらの成分が本来存在する生物の他の生物学的成分、すなわち、他の染色体及び染色体外ＤＮＡ及びＲＮＡ、並びにタンパク質から、実質的に分離され、同他の成分とは別に生成され、又は同他の成分から離して精製されていることを意味する。このため、「単離」されている核酸、ペプチド、及びタンパク質は、標準的な精製法により精製された核酸及びタンパク質を含む。「単離された」核酸、ペプチド、及びタンパク質は、組成物の一部であることができ、このような組成物が核酸、ペプチド、又はタンパク質の本来の環境の一部ではない場合であっても単離されている。また、この用語は、宿主細胞中での組み換え発現により調製された核酸、ペプチド、及びタンパク質、並びに化学合成された核酸も包含する。本明細書で使用されるとき、「単離された」抗体又は抗原結合フラグメントは、種々の抗原特異性を有する他の抗体又は抗原結合フラグメントを実質的に含まない抗体又は抗原結合フラグメントを意味することを意図している（例えば、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する単離された抗体は、ＧＰＲＣ５Ｄ以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。但し、ＧＰＲＣ５Ｄのエピトープ、アイソフォーム、又は変異体に特異的に結合する単離された抗体は、例えば、他の種に由来する他の関連する抗原（例えば、

ＧＰＲＣ５Ｄ種間ホモログ）に対する交差反応性を有してもよい。

【００４８】

「ポリヌクレオチド」は、同義的に「核酸分子」、「ヌクレオチド」、又は「核酸」と呼ばれ、非修飾ＲＮＡ若しくはＤＮＡ又は修飾ＲＮＡ若しくはＤＮＡでもよい、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを指す。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖及び二本鎖ＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖ＲＮＡ、並びに一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるＲＮＡ、ＤＮＡ及びＲＮＡを含むハイブリッド分子（一本鎖、又はより典型的には、二本鎖、又は一本鎖及び二本鎖の領域の混合物でもよい）が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、「ポリヌクレオチド」は、ＲＮＡ若しくはＤＮＡ又はＲＮＡ及びＤＮＡの両方を含む三本鎖領域を指す。用語、ポリヌクレオチドには、１つ又は２つ以上の修飾塩基を含有するＤＮＡ又はＲＮＡ、及び安定性若しくは他の理由により修飾された主鎖を有するＤＮＡ又はＲＮＡも含まれる。「修飾」塩基は、例えば、トリチル化塩基及び異常な塩基、例えば、イノシンを含む。各種の修飾が、ＤＮＡ及びＲＮＡになされてもよい。したがって、「ポリヌクレオチド」は、典型的に天然に認められるポリヌクレオチドの化学的、酵素的又は代謝的に修飾された形態、並びにウイルス及び細胞のＤＮＡ及びＲＮＡの特徴を有する化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、比較的短い核酸鎖（多くの場合、オリゴヌクレオチドと呼ばれる）も包含する。

【００４９】

「実質的に同じ」の意味は、この用語が使用される文脈に応じて異なる場合がある。重鎖及び軽鎖並びにこれらをコードする遺伝子中には天然の配列バリエーションが存在し得ることから、本明細書に記載されたアミノ酸配列又は抗体若しくは抗原結合フラグメントをコードする遺伝子内には、固有の結合特性（例えば、特異的及び親和性）にはほとんど影響しない、又は影響しない、ある程度のバリエーションが見られることが予測される。このような予測は、部分的には、遺伝暗号の縮重及び保存的アミノ酸配列バリエーションの進化的成功による。同バリエーションは、コードされたタンパク質の性質を、認識され得るほどには改変させない。したがって、核酸配列の文脈において、「実質的に同じ」は、２つ以上の配列間での少なくとも６５％の同一性を意味する。好ましくは、この用語は、２つ以上の配列間での少なくとも７０％の同一性、より好ましくは、少なくとも７５％の同一性、より好ましくは、少なくとも８０％の同一性、より好ましくは、少なくとも８５％の同一性、より好ましくは、少なくとも９０％の同一性、より好ましくは、少なくとも９１％の同一性、より好ましくは、少なくとも９２％の同一性、より好ましくは、少なくとも９３％の同一性、より好ましくは、少なくとも９４％の同一性、より好ましくは、少なくとも９５％の同一性、より好ましくは、少なくとも９６％の同一性、より好ましくは、少なくとも９７％の同一性、より好ましくは、少なくとも９８％の同一性、及びより好ましくは、少なくとも９９％以上の同一性を意味する。２つの配列間の同一性（％）は、ギャップ数及び各ギャップの長さを考慮して、配列により共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、相同性の割合（％）＝同一位置数／位置の総数×１００）。同考慮は、２つの配列の最適なアライメントを導くのに必要である。２つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の同一性（％）は、例えば、Ｅ．Ｍｅｙｅｒｓ ａｎｄ Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ ４，１１～１７（１９８８）のアルゴリズムを使用して決定されてもよい。同アルゴリズムは、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれており、ＰＡＭ１２０重み付け残基テーブル、ギャップ長ペナルティ１２、及びギャップペナルティ４を使用する。加えて、２つのアミノ酸配列間の同一性（％）は、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４４～４５３（１９７０）のアルゴリズムを使用して決定されてもよい。

【００５０】

タンパク質の機能に実質的な影響を有することなく、タンパク質のアミノ酸配列内に生じ得るバリエーションの度合いは、核酸配列のバリエーションの度合いより非常に小さい。これは、同じ縮重原理がアミノ酸配列には適用しないためである。したがって、抗体又

は抗原結合フラグメントの文脈において、「実質的に同じ」は、記載された抗体又は抗原結合フラグメントに対して、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する抗体又は抗原結合フラグメントを意味する。他の実施形態は、本明細書に記載された抗体及び抗原結合フラグメントと有意な同一性を共有しないが、１つ又は２つ以上のＣＤＲ又は結合性を付与するのに必要とされる他の配列を組み込む、フレームワーク、スキャフォールド、又は他の非結合領域を有し、本明細書に記載されたこのような配列に対して、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントを含む。「ベクター」とは、セグメントの複製又は発現をもたらすように、別の核酸セグメントを操作可能に挿入できる、レプリコン、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、又はウイルスのことである。

【００５１】

「クローン」は、有糸分裂により、単一の細胞又は共通する祖先から得られる細胞集団である。「細胞株」は、インビトロにおいて何代にもわたって安定して成長させることができる初代細胞のクローンである。本明細書で提供された一部の例では、細胞は、細胞をＤＮＡで遺伝子導入することにより、形質転換される。

【００５２】

「発現する」及び「生成する」という用語は、本明細書において同義的に使用され、遺伝子産物の生合成を意味する。これらの用語は、遺伝子のＲＮＡへの転写を包含する。また、これらの用語は、ＲＮＡの１つ又は２つ以上のポリペプチドへの翻訳を包含し、全ての天然の転写後及び翻訳後修飾を更に包含する。抗体又はその抗原結合フラグメントの発現又は生成は、細胞の細胞質内、又は細胞外環境、例えば、細胞培養の増殖培地内でもよい。

【００５３】

「処置すること」又は「処置」という用語は、損傷、病理、又は病状の減弱又は改善における、何らかの成功又は成功の兆候を指し、これには、寛解、緩解、症状の低減若しくは病状を患者にとってより許容できるものにすること、変性又は低下速度を遅くすること、変性による最終的な衰弱を和らげること、患者の肉体的又は精神的健康を改善すること、あるいは生存期間を延長することなどの、何らかの客観的又は主観的パラメータを含む。治療は、客観的又は主観的なパラメータにより評価されてもよい。同パラメータには、身体検査、神経学的検査、又は精神医学評価の結果が挙げられる。

【００５４】

「有効量」又は「治療的に有効な量」は、必要とされる用量及び期間において、所望の治療結果を達成するのに有効な量を意味する。治療的に有効な量のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体は、個体の病態、年齢、性別、及び体重、並びに個体における所望の応答を引き出す抗体の能力等の要因に従って変動し得る。治療的に有効な量はまた、抗体又は抗体部分の任意の毒性又は有害作用より、治療的に有益な作用が上回る量でもある。

【００５５】

「抗体」は、特に断らない限り、免疫グロブリンの全てのアイソタイプ（ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、及びＩｇＹ）を指し、種々の単量体、多量体、及びキメラ型を含む。ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（ｍＡｂ）、及び抗体様ポリペプチド、例えば、キメラ抗体及びヒト化抗体が、「抗体」という用語に具体的に包含される。

【００５６】

「抗原結合フラグメント」は、特定の抗原に対して結合親和性を示し得る任意のタンパク質性構造体である。抗原結合フラグメントは、任意の既知の手法、例えば、酵素開裂、ペプチド合成、及び組み換え手法により提供されたものを含む。一部の抗原結合フラグメントは、親抗体分子の抗原結合特異性を保持しているインタクトな抗体の部分から構成される。例えば、抗原結合フラグメントは、特定の抗原に結合することが既知である抗体の、少なくとも１つの可変領域（重鎖若しくは軽鎖の可変領域のいずれか一方）、又は１つ若しくは２つ以上のＣＤＲを含んでもよい。適切な抗原結合フラグメントの例には、ディ

アボディ（diabodies）及び一本鎖分子、並びにＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｃ、Ｆａｂｃ、及びＦｖ分子、一本鎖（Ｓｃ）抗体、個々の抗体軽鎖、個々の抗体重鎖、抗体鎖若しくはＣＤＲと他のタンパク質との間でのキメラ融合体、タンパク質スキャフォールド、重鎖単量体若しくは二量体、軽鎖単量体若しくは二量体、１本の重鎖と１本の軽鎖とからなる二量体、ＶＬ、ＶＨ、ＣＬ、及びＣＨ１ドメインからなる一価フラグメント、国際公開第２００７０５９７８２号に記載された一価抗体、ヒンジ領域においてジスルフィド結合により連結された２つのＦａｂフラグメントを含む二価フラグメント、Ｖ．ｓｕｂ．Ｈ及びＣ．ｓｕｂ．Ｈ１ドメインから本質的になるＦｄフラグメント、抗体の１つのアームのＶＬ及びＶＨドメインから本質的になるＦｖフラグメント、ＶＨドメインから本質的になり、ドメイン抗体とも呼ばれる（Ｈｏｌｔ ｅｔ ａｌ；Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００３ Ｎｏｖ．；２１（１１）：４８４～９０）ｄＡｂフラグメント（Ｗａｒｄ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４１，５４４～５４６（１９８９））、ラクダ科動物のもの又はナノボディ（Ｒｅｖｅｔｓ ｅｔ ａｌ；Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ Ｂｉｏｌ Ｔｈｅｒ．２００５ Ｊａｎ．；５（１）：１１１～２４）、単離された相補性決定領域（ＣＤＲ）などが挙げられる。全ての抗体アイソタイプが、抗原結合フラグメントを生成するのに使用されてもよい。加えて、抗原結合フラグメントは、対象となる所与の抗原に対する親和性を付与する方向にポリペプチドセグメントをうまく組み込み得る、抗体以外のタンパク質性フレームワーク、例えば、タンパク質スキャフォールドを含んでもよい。抗原結合フラグメントは、組み換えにより生成されてもよく、又はインタクトな抗体の酵素分解若しくは化学分解により生成されてもよい。「抗体又はその抗原結合フラグメント」という表現は、所与の抗原結合フラグメントが、この表現内で参照された抗体の１つ又は２つ以上のアミノ酸セグメントを組み込んでいることを示すために使用されてもよい。

【００５７】

「ＣＤＲ」及びその複数形「ＣＤＲｓ」という用語は、相補性決定領域（ＣＤＲ）であって、そのうちの３つが軽鎖可変領域（ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、及びＣＤＲＬ３）の結合特性を構成し、３つが重鎖可変領域（ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、及びＣＤＲＨ３）の結合特性を構成する、相補性決定領域（ＣＤＲ）を意味する。ＣＤＲは、抗体分子の機能的活性に寄与し、スキャフォールド領域又はフレームワーク領域を含むアミノ酸配列によって分離される。正確な定義上のＣＤＲの境界及び長さは、様々な分類及び番号付けシステムによって異なる。したがって、ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ定義、Ｃｈｏｔｈｉａ定義、接触定義、又は任意の他の境界定義によって参照され得る。境界が異なるにもかかわらず、これらのシステムの各々は、可変配列内のいわゆる「超可変領域」を構成する要素においてある程度のオーバーラップを有する。したがって、これらのシステムによるＣＤＲの定義は、隣接するフレームワーク領域についての長さ及び境界領域の点で異なることがある。例えば、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ ｅｄ．ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１～３２４２（１９９１）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，「Ｃａｎｏｎｉｃａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ Ｆｏｒ ｔｈｅ Ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ Ｒｅｇｉｏｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ，」Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１（１９８７）；並びにＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，「Ａｎｔｉｂｏｄｙ－Ａｎｔｉｇｅｎ Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ：Ｃｏｎｔａｃｔ Ａｎａｌｙｓｉｓ ａｎｄ Ｂｉｎｄｉｎｇ Ｓｉｔｅ Ｔｏｐｏｇｒａｐｈｙ，」Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２（１９９６））を参照されたい。

【００５８】

典型的には、ＣＤＲは、カノニカル構造として分類され得るループ構造を形成する。「カノニカル構造」という用語は、抗原結合（ＣＤＲ）ループによって採用される主鎖立体構造を意味する。比較構造の研究から、６つの抗原結合ループのうちの５つは利用可能な立体構造のレパートリーがごく限られていることが判明している。各カノニカル構造は、

ポリペプチド主鎖のねじれ角によって特徴付けられ得る。したがって、ループの大部分のアミノ酸配列の可変性は高いのにもかかわらず、抗体間の対応するループは非常に類似した三次元構造を有している（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，「Ｃａｎｏｎｉｃａｌ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ Ｆｏｒ ｔｈｅ Ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ Ｒｅｇｉｏｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ，」Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１（１９８７）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，「Ｃｏｎｆｏｒｍａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｈｙｐｅｒｖａｒｉａｂｌｅ Ｒｅｇｉｏｎｓ，」Ｉ ３４２：８７７（１９８９）；Ｍａｒｔｉｎ ａｎｄ Ｔｈｏｒｎｔｏｎ，「Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｆａｍｉｌｉｅｓ ｉｎ Ｌｏｏｐｓ ｏｆ Ｈｏｍｏｌｏｇｏｕｓ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ａｕｔｏｍａｔｉｃ Ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎ，Ｍｏｄｅｌｌｉｎｇ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ｔｏ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，」Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６３：８００（１９９６）、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。更に、とられるループ構造とその周囲のアミノ酸配列との間には関係がある。特定のカノニカルクラスの立体構造は、ループの長さと、ループ内の重要な位置並びに保存されたフレームワーク（すなわち、ループの外側）内にあるアミノ酸残基とによって決定される。したがって、これらの重要なアミノ酸残基の存在に基づいて、特定のカノニカルクラスへの割り当てを行うことができる。

【００５９】

「ポリペプチド」という用語は、「タンパク質」という用語と互換的に使用され、その最も広い意味において、２つ又はそれ以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体、又はペプチド模倣体の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合によって連結されていてもよい。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル、エーテルなどによって連結されてもよい。本明細書で使用されるとき、「アミノ酸」という用語は、グリシン並びにＤ及びＬ光学異性体の両方と、アミノ酸類似体と、ペプチド模倣体とを含む、天然及び／若しくは非天然アミノ酸又は合成アミノ酸のいずれかを指す。３つ又はそれ以上のアミノ酸のペプチドは、ペプチド鎖が短い場合、一般にオリゴペプチドと称される。ペプチド鎖が長い場合、ペプチドは、一般にポリペプチド又はタンパク質と称される。

【００６０】

抗体又は抗体フラグメントの文脈において使用されるとき、「特異的に結合（Specifically binds）」若しくは「特異的に結合（binds specifically）」又はそれらの派生語は

、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによりコードされたドメインを介し、混合された様々な分子を含有するサンプル中で他の分子に優先的に結合することなく対象となるタンパク質の１つ又は２つ以上のエピトープに結合することを表わす。典型的には、抗体は、表面プラズモン共鳴アッセイ又は細胞結合アッセイにより測定された場合、約1×10^{-8}Ｍ未満のK_dで、同種の抗原に結合する。「［抗原］特異的」抗体（例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体）等の表現は、列挙された抗体が列挙された抗原に特異的に結合することを伝える意味である。

【００６１】

「ポリヌクレオチド」は、同義的に「核酸分子」、「ヌクレオチド」、又は「核酸」と呼ばれ、非修飾ＲＮＡ若しくはＤＮＡ又は修飾ＲＮＡ若しくはＤＮＡでもよい、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを指す。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖及び二本鎖ＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるＤＮＡ、一本鎖及び二本鎖ＲＮＡ、並びに一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるＲＮＡ、ＤＮＡ及びＲＮＡを含むハイブリッド分子（一本鎖、又はより典型的には、二本鎖、又は一本鎖及び二本鎖の領域の混合物でもよい）が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、「ポリヌクレオチド」は、ＲＮＡ若しくはＤＮＡ又はＲＮＡ及びＤＮＡの両方を含む三本鎖領域を指す。用語、ポリヌクレオチドには、１つ又は２つ以上の修飾塩基を含有するＤＮＡ又はＲＮＡ、及び安定性若しくは他の理由により修飾された主鎖を有するＤＮＡ又はＲＮＡも

含まれる。「修飾」塩基は、例えば、トリチル化塩基及び異常な塩基、例えば、イノシンを含む。各種の修飾が、ＤＮＡ及びＲＮＡになされてもよい。したがって、「ポリヌクレオチド」は、典型的に天然に認められるポリヌクレオチドの、化学反応、酵素反応又は代謝反応により修飾された形態、並びにウイルス及び細胞のＤＮＡ及びＲＮＡの特徴を有する化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、比較的短い核酸鎖（多くの場合、オリゴヌクレオチドと呼ばれる）も包含する。

【００６２】

「ベクター」とは、セグメントの複製又は発現をもたらすように、別の核酸セグメントを操作可能に挿入できるレプリコン、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド、又はウイルスのことである。

【００６３】

本明細書で使用されるとき、「宿主細胞」という用語は、例えば、初代細胞、培養中の細胞、又は細胞株由来の細胞といった任意のタイプの細胞であってよい。特定の実施形態では、「宿主細胞」という用語は、核酸分子を遺伝子導入された細胞、及びそのような細胞の子孫又は潜在的子孫を指す。このような細胞の子孫は、核酸分子で遺伝子導入された親細胞とは、例えば、宿主細胞ゲノムへの核酸分子の後続の生成又は集積において生じ得る、変異又は環境からの影響により、同一ではないことがある。「発現」及び「生成」という用語は、本明細書において同義的に使用され、遺伝子産物の生合成を意味する。これらの用語は、遺伝子のＲＮＡへの転写を包含する。また、これらの用語は、ＲＮＡの１つ又は２つ以上のポリペプチドへの翻訳を包含し、全ての天然の転写後及び翻訳後修飾を更に包含する。抗体又はその抗原結合フラグメントの発現又は生成は、細胞の細胞質内、又は細胞外環境、例えば、細胞培養用の増殖培地内でもよい。「実質的に同じ」の意味は、この用語が使用される文脈に応じて異なる場合がある。重鎖及び軽鎖並びにこれらをコードする遺伝子中には天然の配列バリエーションが存在し得ることから、本明細書に記載されたアミノ酸配列又は抗体若しくは抗原結合フラグメントをコードする遺伝子内には、固有の結合特性（例えば、特異的及び親和性）にはほとんど影響しない、又は影響しない、ある程度のバリエーションが見られることが予測される。このような予測は、部分的には、遺伝暗号の縮重及び保存的アミノ酸配列バリエーションの進化的成功による。同バリエーションは、コードされたタンパク質の性質を認識され得るほどには改変させない。したがって、核酸配列の文脈において、「実質的に同じ」は、２つ以上の配列間での少なくとも６５％の同一性を意味する。好ましくは、この用語は、２つ以上の配列間での少なくとも７０％の同一性、より好ましくは、少なくとも７５％の同一性、より好ましくは、少なくとも８０％の同一性、より好ましくは、少なくとも８５％の同一性、より好ましくは、少なくとも９０％の同一性、より好ましくは、少なくとも９１％の同一性、より好ましくは、少なくとも９２％の同一性、より好ましくは、少なくとも９３％の同一性、より好ましくは、少なくとも９４％の同一性、より好ましくは、少なくとも９５％の同一性、より好ましくは、少なくとも９６％の同一性、より好ましくは、少なくとも９７％の同一性、より好ましくは、少なくとも９８％の同一性、及びより好ましくは、少なくとも９９％以上の同一性を意味する。２つの配列間の同一性（％）は、ギャップ数及び各ギャップの長さを考慮して、配列により共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、相同性の割合（％）＝同一位置数／位置の総数×１００）。同考慮は、２つの配列の最適なアライメントを導くのに必要である。２つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の同一性パーセントは、例えば、Ｅ．Ｍｅｙｅｒｓ ａｎｄ Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ ４，１１～１７（１９８８）のアルゴリズムを使用して決定されてもよい。同アルゴリズムは、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれており、ＰＡＭ１２０重み付け残基テーブル、ギャップ長ペナルティ１２、及びギャップペナルティ４を使用する。加えて、２つのアミノ酸配列間の同一性（％）は、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８，４４４～４５３（１９７０）のアルゴリズムを使用して決定されてもよい。

【００６４】

タンパク質の機能に実質的な影響を有することなく、タンパク質のアミノ酸配列内に生じ得るバリエーションの度合いは、核酸配列のバリエーションの度合いより非常に小さい。これは、同じ縮重原理がアミノ酸配列には当てはまらないためである。したがって、抗体又は抗原結合フラグメントの文脈において、「実質的に同じ」は、記載された抗体又は抗原結合フラグメントに対して、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する抗体又は抗原結合フラグメントを意味する。他の実施形態は、本明細書に記載された抗体及び抗原結合フラグメントと有意な同一性を共有しないが、１つ又は２つ以上のＣＤＲ又は結合性を付与するのに必要とされる他の配列を組み込む、フレームワーク、スキャフォールド、又は他の非結合領域を有し、本明細書に記載されたこのような配列に対して、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性を有する、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントを含む。

【００６５】

「対象」という用語は、ヒト及び非ヒト動物を意味し、全ての脊椎動物、例えば、哺乳類及び非哺乳類、例えば、非ヒト霊長類、マウス、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、及び爬虫類を意味する。記載された方法の多くの実施形態では、対象はヒトである。

【００６６】

本明細書で使用されるとき、「再指向」又は「再指向する」という用語は、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体が、Ｔ細胞の活性を、かかる細胞がもともと備えている同種に特異的なものから、ＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞に対し反応性があるものへと効果的に変換する能力を指す。

【００６７】

本明細書で使用されるとき、「サンプル」という用語は、対象から単離された、類似する流体、細胞、又は組織（例えば、外科手術により切除された腫瘍組織、微細針吸引を含む生検）の収集物、並びに対象内に存在する流体、細胞、又は組織を意味する。一部の実施形態では、サンプルは、体液である。体液は、典型的には、生理学的温度において液体であり、対象又は生物学的資源中に存在し、これらから採取され、これらから外に出され、あるいは抽出された天然に生じる流体を含んでもよい。特定の組織、臓器、又は局所的な領域から得られたある種の体液及びその他のある種の体液は、対象又は生物学的資源において、より全体的に又は全身的に適していてもよい。体液の例としては、血液、血清及び漿膜液、血漿、リンパ、尿、唾液、嚢胞液、涙、糞、痰、分泌組織及び臓器の粘膜分泌物、膣分泌物、腹水液、例えば、非固体腫瘍に関連するもの、胸膜、心膜、腹膜、腹部及び他の体腔の液体、気管支洗浄により収集された液体等が挙げられる。体液はまた、対象又は生体資源と接触した溶液、例えば、細胞又は臓器馴化培地を含む細胞及び臓器培養培地、洗浄液等を含んでもよい。本明細書で使用されるとき、「サンプル」という用語は、対象から取り出された材料又は対象中に存在する材料を包含する。

【００６８】

「既知の標準」は、既知の量又は濃度のＧＰＲＣ５Ｄを有する溶液でもよい。この場合、この溶液は、自然発生する溶液、例えば、初期、中期、後期、進行性、又は静的がんを有することが判明している患者由来のサンプルでもよく、又はこの溶液は、希釈された既知の量のＧＰＲＣ５Ｄを含む緩衝水溶液等の合成溶液でもよい。本明細書に記載された既知の標準は、対象から単離されたＧＰＲＣ５Ｄ、組み換え若しくは精製されたＧＰＲＣ５Ｄタンパク質、又は病態に関連するＧＰＲＣ５Ｄ濃度の値を含んでもよい。

【００６９】

本明細書で使用するとき、用語「Ｇタンパク質連結受容体ファミリーＣグループ５メンバーＤ」及び「ＧＰＲＣ５Ｄ」は、特に、例えば、ＧｅｎＢａｎｋアクセッション番号ＢＣ０６９３４１、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿０６１１２４．１及びＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔアクセッション番号Ｑ９ＮＺＤ１に記載のとおりのヒトＧＰＲＣ５Ｄタンパク質を包含する（Ｂｒａｕｎｅｒ－Ｏｓｂｏｒｎｅ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．２００１

，Ｂｉｏｃｈｉｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ａｃｔａ　１５１８，２３７～２４８も参照のこと）。

【００７０】

「ＣＤ３」という用語は、ヒトＣＤ３タンパク質マルチサブユニット複合体を意味する。ＣＤ３タンパク質マルチサブユニット複合体は、６つの区別できるポリペプチド鎖から構成される。これらは、ＣＤ３γ鎖（ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　Ｐ０９６９３）、ＣＤ３δ鎖（ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　Ｐ０４２３４）、２つのＣＤ３ε鎖（ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　Ｐ０７７６６）、及び１つのＣＤ３ζ鎖ホモ二量体（ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ　２０９６３）を含み、Ｔ細胞受容体α及びβ鎖と会合する。「ＣＤ３」という用語は、特に断りのない限り、細胞（Ｔ細胞を含む）により本来発現されているか、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子若しくはｃＤＮＡにより遺伝子導入された細胞上に発現され得る任意のＣＤ３変異体、アイソフォーム、及び種間ホモログを含む。

【００７１】

「ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体」は、多重特異的抗体、場合により、二重特異性抗体であり、同二重特異性抗体は、２種類の異なる抗原結合領域を含み、一方の抗原結合領域は、抗原ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、もう一方の抗原結合領域は、ＣＤ３に特異的に結合する。多重特異的抗体は、二重特異性抗体、ディアボディ（diabody）、又は類似する分子であり得る（ディアボディの説明については、例えば、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　９０（１４），６４４４～８（１９９３）を参照のこと）。本明細書で提供された二重特異性抗体、ディアボディ等は、ＧＰＲＣ５Ｄの一部分に加えて、任意の適切な標的に結合してもよい。「二重特異性抗体」という用語は、異なる抗体配列により定義された、２種類の異なる抗原結合領域を有する抗体と理解されたい。これは、異なる標的結合と理解され得るが、１つの標的中の異なるエピトープに同様に結合することを含む。

【００７２】

「参照サンプル」は、別のサンプル、例えば、試験サンプルと比較することで、比較されるサンプルの特性を評価できるサンプルである。参照サンプルは、試験サンプルとの比較の際に基準として機能する、特性評価済みの何らかの特性を有する。例えば、参照サンプルは、がんを有する対象を示すＧＰＲＣ５Ｄレベルについてのベンチマークとして使用することができる。参照サンプルは、必ずしも試験サンプルと平行して分析されなくてもよい。そのため一部の例では、参照サンプルは、所与の状態を特性評価するために予め設定された数値又は範囲、例えば、対象におけるがんの指標となるＧＰＲＣ５Ｄレベルでもよい。この用語はまた、生理学的状態又は病態、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに関連することが既知であるが、含まれるＧＰＲＣ５量が不明である、比較目的で使用されるサンプルを含む。

【００７３】

ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの進行の文脈において使用されるとき、「進行」という用語は、より重篤でない状態からより重篤な状態へのがんの変化を含む。これは、腫瘍の数又は重症度、転移の程度、がんが成長又は拡散する速度等の増大を含むことができる。例えば、「結腸がんの進行」には、このようながんの、より重篤でない状態からより重篤な状態への進行、例えば、ステージＩからステージＩＩへ、ステージＩＩからステージＩＩＩへ等の進行が挙げられる。

【００７４】

ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの退縮の文脈において使用されるとき、「退縮」という用語は、より重篤な状態からより重篤でない状態へのがんの変化を含む。これは、腫瘍の数又は重症度、転移の程度、がんが成長又は拡散する速度等の低減を含むことができると考えられる。例えば、「結腸がんの退縮」には、このようながんの、より重篤な状態からより重篤でない状態への退縮、例えば、ステージＩＩＩからステージＩＩへ、ステージＩＩからステージＩへ等の回復（progression）が挙げられる。

【００７５】

不変のＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの文脈において使用されるとき、「不変の」という用語は

、臨床的に関連する期間にわたって、がんが進行している又は退縮しているとみなすのに有意に十分な程度の変化が生じていない、又は変化していなかったと病態を説明することを意図している。

【００７６】

本明細書に記載された実施形態は、特定の方法、試薬、化合物、組成物、又は生物系に限定されるものではなく、当然、様々に変更され得る。

【００７７】

ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメント

本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体又は抗原結合フラグメントが記載されている。抗体分子の全体的な構造は、抗原結合ドメインを含む。同ドメインは、重鎖及び軽鎖並びにＦｃドメインを含み、補体固定及び抗体の結合受容体（binding antibody receptors）を含む各種の機能を果たす。

【００７８】

記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、全てのアイソタイプである、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭ、並びに４本鎖免疫グロブリン構造の合成多量体を含む。記載された抗体又は抗原結合フラグメントはまた、雌鳥又はシチメンチョウの血清及び雌鳥又はシチメンチョウの卵黄中に一般的に見出されるＩｇＹアイソタイプも含む。

【００７９】

ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、組み換え手法により任意の種から得ることができる。例えば、抗体又は抗原結合フラグメントは、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、ニワトリ、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヒト、又はそれらのキメラ版でもよい。ヒトへの投与に使用するために、非ヒト由来の抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト患者への投与時に、抗原性がより低くなるよう遺伝的に又は構造的に改変されてもよい。

【００８０】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントはキメラである。本明細書で使用されるとき、「キメラ」という用語は、抗体又はその抗原結合フラグメントであって、非ヒト哺乳類、げっ歯類、又は爬虫類の抗体アミノ酸配列に由来する少なくとも１つの可変ドメインの少なくともいくらかの部分を有するものの、それらの残りの部分はヒトに由来するものである、抗体又はその抗原結合フラグメントを指す。

【００８１】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最少配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、その免疫グロブリン鎖、又はフラグメント（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、又は抗体の他の抗原結合部分配列）であってもよい。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（ＣＤＲ）からの残基が所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種、例えば、マウス、ラット、又はウサギのＣＤＲからの残基（ドナー抗体）により置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一般的には、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含むこととなる。同可変ドメイン中、全て又は実質的に全てのＣＤＲ領域は、非ヒト免疫グロブリンのＣＤＲ領域に対応し、全て又は実質的に全てのフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域である。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Ｆｃ）、典型的には、ヒト免疫グロブリンのＦｃのうち少なくとも一部分を含んでもよい。

【００８２】

本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントは、各種の形態で存在し得るが、表１に示された抗体ＣＤＲのうち１つ又は２つ以上を含むこととなる。

【００８３】

本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄに免疫特異的に結合する、単離された抗体及び抗原結合フラグメントが記載されている。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗

原結合フラグメントは、ヒトＩｇＧ又はその誘導体である。本明細書で例示されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトのものであるが、例示された抗体又は抗原結合フラグメントは、キメラ化されてもよい。

【００８４】

一部の実施形態では、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖を含む、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。一部の実施形態では、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む重鎖と、表１に記載された抗体のうちいずれか１つのＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む軽鎖と、を含む、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。

【００８５】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号１を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号５を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号１を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号５を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号９を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１３を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５２と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５２と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５６と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００８６】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号１０を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１３を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５３と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５３と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５６と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００８７】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号３を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号７を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号３を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号７を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号１１を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１４を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５４と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５４と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５７と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗

体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００８８】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号４を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号８を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号４を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号８を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号１２を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１５を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５５と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号５５と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５８と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００８９】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６１を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６１を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号７２を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１３を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８２と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８２と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号９２と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９０】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３０を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号３０を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１３を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８３と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８３と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５６と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９１】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２７を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２７を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号７３を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１４を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７を含む軽鎖Ｃ

ＤＲ２、及び配列番号２０を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８４と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８４と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５７と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９２】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２７を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号２７を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号１１を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１４を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８５と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８５と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５７と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９３】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６２を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７４を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６２を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号７４を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１４を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８６と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８６と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５７と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９４】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６３を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７５を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６３を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号７５を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１３を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８７と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８７と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号９２と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９５】
一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６４を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号７０を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６４を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号７０を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号１２を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１５を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８８と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８８と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号５８と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９６】
一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６５を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６５を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号７６を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号９５を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７９を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８１を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８９と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号８９と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号９３と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９７】
一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６６を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１を含む重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７７を含む重鎖ＣＤＲ３を含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号６６を含む重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１を含む重鎖ＣＤＲ２、配列番号７７を含む重鎖ＣＤＲ３、配列番号１５を含む軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８を含む軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１を含む軽鎖ＣＤＲ３を含む。このＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号９１と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号９１と実質的に同じ又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号９４と実質的に同じ又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、１つのアームが抗ＧＰＲＣ５Ｄアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【００９８】
一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ又はその誘導体、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４のアイソタイプである。抗体がＩｇＧ１アイソタイプである一部の実施形態では、抗体は、ＩｇＧ１のＦｃ領域（配列番号６０）を含む。

【００９９】
配列番号６０
ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳ

ＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴ
ＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧ
ＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷ
ＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫ
ＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥ
ＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶ
ＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴ
ＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

【０１００】

抗体がＩｇＧ４アイソタイプである一部の実施形態では、抗体は、Ｆｃ領域（配列番号５９）中にＳ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、及びＬ２３５Ａ置換を含有する。

【０１０１】

配列番号５９

ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＣＳＲＳＴＳＥＳＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳ
ＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＫＴ
ＹＴＣＮＶＤＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＳＫＹＧＰＰＣＰＰＣＰＡＰＥＡＡＧＧＰＳＶ
ＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＱＥＤＰＥＶＱＦＮＷＹＶＤ
ＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＦＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫ
ＣＫＶＳＮＫＧＬＰＳＳＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＱＥＥＭＴＫ
ＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳ
ＤＧＳＦＦＬＹＳＲＬＴＶＤＫＳＲＷＱＥＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳ
ＬＳＬＳＬＧＫ

【０１０２】

上記段落において検討された、ＣＤＲ及び／又は可変ドメイン配列により定義された特異的抗体は、これらの変形例を含んでもよい。

【０１０３】

ＧＰＲＣ５Ｄに免疫特異的に結合する抗体又は抗原結合フラグメントをコードする単離されたポリヌクレオチドもまた開示される。本明細書で提供された可変ドメインセグメントをコード可能な単離されたポリヌクレオチドは、抗体又は抗原結合フラグメントを生成する同一の又は異なるベクターに含まれてもよい。ＧＰＲＣ５Ｄ抗体をコードする例示的なポリヌクレオチド配列を以下に示す抗体をコード：

重鎖配列（配列番号：９６）：

ａｔｇｇｃｃｔｇｇｇｔｃｔｇｇａｃｃｃｔｇｃｔｇｔｔｃｃｔｇａｔｇｇｃｃｇｃｔｇ
ｃｃｃａｇａｇｃａｔｃｃａｇｇｃｃｃａｇｇｔｇｃａｇｃｔｇｇｔｇｃａｇａｇｃｇｇ
ｃｇｃｃｇａｇｇｔｇａａｇａａｇｃｃｃｇｇｃｇｃｃａｇｃｇｔｇａａｇｇｔｇａｇｃ
ｔｇｃａａｇｇｃｃａｇｃｇｇｃｔａｃａｇｃｔｔｃａｃｃｇｇｃｔａｃａｃｃａｔｇａ
ａｃｔｇｇｇｔｇｃｇｇｃａｇｇｃｃｃｃｇｇｃｃａｇｇｇｃｃｔｇｇａｇｔｇｇａｔ
ｇｇｇｃｃｔｇａｔｃａａｃｃｃｃｔａｃａａｃａｇｃｇａｃａｃｃａａｃｔａｃｇｃｃ
ｃａｇａａｇｃｔｇｃａｇｇｇｃｃｇｇｇｔｇａｃｃａｔｇａｃｃａｃｃｇａｃａｃｃａ
ｇｃａｃｃａｇｃａｃｃｇｃｃｔａｃａｔｇｇａｇｃｔｇｃｇｇａｇｃｃｔｇｃｇｇａｇ
ｃｇａｃｇａｃａｃｃｇｃｃｇｔｇｔａｃｔａｃｔｇｃｇｃｃｃｇｇｇｔｇｇｃｃｃｔｇ
ｃｇｇｇｔｇｇｃｃｃｔｇｇａｃｔａｃｔｇｇｇｇｃｃａｇｇｇｃａｃｃｃｔｇｇｔｇａ
ｃｃｇｔｇａｇｃａｇｃｇｃｃｔｃｃａｃｃａａｇｇｇｃｃｃａｔｃｃｇｔｃｔｔｃｃｃ
ｃｃｔｇｇｃｇｃｃｃｔｇｃｔｃｃａｇｇａｇｃａｃｃｔｃｃｇａｇａｇｃａｃａｇｃｃ
ｇｃｃｃｔｇｇｇｃｔｇｃｃｔｇｇｔｃａａｇｇａｃｔａｃｔｔｃｃｃｃｇａａｃｃｇｇ
ｔｇａｃｇｇｔｇｔｃｇｔｇｇａａｃｔｃａｇｇｃｇｃｃｃｔｇａｃｃａｇｃｇｇｃｇｔ
ｇｃａｃａｃｃｔｔｃｃｃｇｇｃｔｇｔｃｃｔａｃａｇｔｃｃｔｃａｇｇａｃｔｃｔａｃ
ｔｃｃｃｔｃａｇｃａｇｃｇｔｇｇｔｇａｃｃｇｔｇｃｃｃｔｃｃａｇｃａｇｃｔｔｇｇ
ｇｃａｃｇａａａａｃｃｔａｃａｃｃｔｇｃａａｃｇｔａｇａｔｃａｃａａｇｃｃｃａｇ
ｃａａｃａｃｃａａｇｇｔｇｇａｃａａｇａｇａｇｔｔｇａｇｔｃｃａａａｔａｔｇｇｔ

ｃｃｃｃｃａｔｇｃｃｃａｃｃａｔｇｃｃｃａｇｃａｃｃｔｇａｇｇｃｃｇｃｃｇｇｇｇ
ｇａｃｃａｔｃａｇｔｃｔｔｃｃｔｇｔｔｃｃｃｃｃｃａａａａｃｃｃａａｇｇａｃａｃ
ｔｃｔｃａｔｇａｔｃｔｃｃｃｇｇａｃｃｃｃｔｇａｇｇｔｃａｃｇｔｇｃｇｔｇｇｔｇ
ｇｔｇｇａｃｇｔｇａｇｃｃａｇｇａａｇａｃｃｃｃｇａｇｇｔｃｃａｇｔｔｃａａｃｔ
ｇｇｔａｃｇｔｇｇａｔｇｇｃｇｔｇｇａｇｇｔｇｃａｔａａｔｇｃｃａａｇａｃａａａ
ｇｃｃｇｃｇｇｇａｇｇａｇｃａｇｔｔｃａａｃａｇｃａｃｇｔａｃｃｇｔｇｔｇｇｔｃ
ａｇｃｇｔｃｃｔｃａｃｃｇｔｃｃｔｇｃａｃｃａｇｇａｃｔｇｇｃｔｇａａｃｇｇｃａ
ａｇｇａｇｔａｃａａｇｔｇｃａａｇｇｔｃｔｃｃａａｃａａａｇｇｃｃｔｃｃｃｇｔｃ
ｃｔｃｃａｔｃｇａｇａａａａｃｃａｔｃｔｃｃａａａｇｃｃａａａｇｇｇｃａｇｃｃｃ
ｃｇａｇａｇｃｃａｃａｇｇｔｇｔａｃａｃｃｃｔｇｃｃｃｃｃａｔｃｃｃａｇｇａｇｇ
ａｇａｔｇａｃｃａａｇａａｃｃａｇｇｔｃａｇｃｃｔｇａｃｃｔｇｃｃｔｇｇｔｃａａ
ａｇｇｃｔｔｃｔａｃｃｃｃａｇｃｇａｃａｔｃｇｃｃｇｔｇｇａｇｔｇｇｇａｇａｇｃ
ａａｔｇｇｇｃａｇｃｃｇｇａｇａａｃａａｃｔａｃａａｇａｃｃａｃｇｃｃｔｃｃｃｇ
ｔｇｃｔｇｇａｃｔｃｃｇａｃｇｇｃｔｃｃｔｔｃｔｔｃｃｔｃｔａｃａｇｃａｇｇｃｔ
ａａｃｃｇｔｇｇａｃａａｇａｇｃａｇｇｔｇｇｃａｇｇａｇｇｇｇａａｔｇｔｃｔｔｃ
ｔｃａｔｇｃｔｃｃｇｔｇａｔｇｃａｔｇａｇｇｃｔｃｔｇｃａｃａａｃｃａｃｔａｃａ
ｃａｃａｇａａｇａｇｃｃｔｃｔｃｃｃｔｇｔｃｔｃｔｇｇｇｔａａａｔｇａ

軽鎖配列（配列番号：９０）：

ａｔｇｃｇｇｇｔｇｃｔｇｇｃｃｃａｇｃｔｇｃｔｇｇｇａｃｔｇｃｔｇｃｔｇｃｔｇｔ
ｇｃｔｔｃｃｃｔｇｇｃｇｃｃａｇａｔｇｃｇａｃａｔｃｃａｇａｔｇａｃｃｃａｇａｇ
ｃｃｃｃａｇｃａｇｃｃｔｇａｇｃｇｃｃａｇｃｇｔｇｇｇｃｇａｃｃｇｇｇｔｇａｃｃ
ａｔｃａｃｃｔｇｃａａｇｇｃｃａｇｃｃａｇａａｃｇｔｇｇｃｃａｃｃｃａｃｇｔｇｇ
ｇｃｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇａａｇｃｃｃｇｇｃａａｇｇｃｃｃｃｃａａｇｃｇｇｃｔ
ｇａｔｃｔａｃａｇｃｇｃｃａｇｃｔａｃｃｇｇｔａｃａｇｃｇｇｃｇｔｇｃｃｃａｇｃ
ｃｇｇｔｔｃａｇｃｇｇｃａｇｃｇｇｃａｇｃｇｇｃａｃｃｇａｇｔｔｃａｃｃｃｔｇａ
ｃｃａｔｃａｇｃａａｃｃｔｇｃａｇｃｃｃｇａｇｇａｃｔｔｃｇｃｃａｃｃｔａｃｔａ
ｃｔｇｃｃａｇｃａｇｔａｃａａｃｃｇｇｔａｃｃｃｃｔａｃａｃｃｔｔｃｇｇｃｃａｇ
ｇｇｃａｃｃａａｇｃｔｇｇａｇａｔｃａａｇｃｇｔａｃｇｇｔｇｇｃｔｇｃａｃｃａｔ
ｃｔｇｔｃｔｔｃａｔｃｔｔｃｃｃｇｃｃａｔｃｔｇａｔｇａｇｃａｇｔｔｇａａａｔｃ
ｔｇｇａａｃｔｇｃｃｔｃｔｇｔｔｇｔｇｔｇｃｃｔｇｃｔｇａａｔａａｃｔｔｃｔａｔ
ｃｃｃａｇａｇａｇｇｃｃａａａｇｔａｃａｇｔｇｇａａｇｇｔｇｇａｔａａｃｇｃｃｃ
ｔｃｃａａｔｃｇｇｇｔａａｃｔｃｃｃａｇｇａｇａｇｔｇｔｃａｃａｇａｇｃａｇｇａ
ｃａｇｃａａｇｇａｃａｇｃａｃｃｔａｃａｇｃｃｔｃａｇｃａｇｃａｃｃｃｔｇａｃｇ
ｃｔｇａｇｃａａａｇｃａｇａｃｔａｃｇａｇａａａｃａｃａａａｇｔｃｔａｃｇｃｃｔ
ｇｃｇａａｇｔｃａｃｃｃａｔｃａｇｇｇｃｃｔｇａｇｃｔｃｇｃｃｃｇｔｃａｃａａａ
ｇａｇｃｔｔｃａａｃａｇｇｇｇａｇａｇｔｇｔｔｇａ

【０１０４】

組み換え抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドもまた、本開示の範囲内である。一部の実施形態では、記載されたポリヌクレオチド（及びこのポリヌクレオチドがコードするペプチド）は、リーダー配列を含む。当技術分野において既知の任意のリーダー配列を利用することができる。リーダー配列は、制限部位又は翻訳開始部位を含み得るがこれらに限定されない。

【０１０５】

本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントの生物学的特性（例えば、結合親和性又は免疫エフェクター活性）を保持している、１つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、又は付加を有する多様体を含む。本発明の文脈において、下記注釈は、別途記載のない限り、変異を説明するのに使用される。ｉ）所与の位置におけるアミノ酸の置換は、例えば、Ｓ２２８Ｐと記載される。Ｓ２２８Ｐは、２２８位におけるセリンのプロリンによる置換を意味する。ｉｉ）特定の多様体について、特定の三文字又は一文字コードは、コードＸ

ａａ及びＸを含めて、アミノ酸残基を示すのに使用される。このため、２２８位におけるアルギニンについてのセリンの置換は、Ｓ２２８Ｐと表記され、又は２２８位におけるセリンについての任意のアミノ酸残基の置換は、Ｓ２２８Ｐと表記される。２２８位におけるセリンの欠失の場合には、この欠失は、Ｓ２２８*により示される。当業者であれば、１つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、又は付加を有する多様体を生成することができる。

【０１０６】

これらの多様体としては、（ａ）１つ又は２つ以上のアミノ酸残基が保存的又は非保存的アミノ酸により置換されている多様体、（ｂ）１つ又は２つ以上のアミノ酸がポリペプチドに付加され、又は同ポリペプチドから欠失している多様体、（ｃ）１つ又は２つ以上のアミノ酸が置換基を含む多様体、及び（ｄ）ポリペプチドが別のペプチド又はポリペプチド、例えば、融合パートナー、タンパク質タグ、又は他の化学部分と融合した多様体、を挙げることができる。これらは、ポリペプチドに有用な特性、例えば、抗体に対するエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分等を付与してもよい。本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントは、保存的又は非保存的位置のいずれかにおいてある種からのアミノ酸残基が別の種における対応する残基に置換されている多様体を含んでもよい。他の実施形態では、非保存的位置におけるアミノ酸残基は、保存的又は非保存的残基により置換される。これらの多様体を得るための手法は、遺伝的（欠失、変異等）、化学的、及び酵素的手法を含めて、当業者に既知である。

【０１０７】

本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、いくつかの抗体アイソタイプ、例えば、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＥを具現化することができる。一部の実施形態では、抗体アイソタイプは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプ、好ましくは、ＩｇＧ１又はＩｇＧ４のアイソタイプである。抗体又はその抗原結合フラグメントの特異性は、ＣＤＲのアミノ酸配列及び配置により主に決定される。したがって、あるアイソタイプのＣＤＲは、抗原特異性を変化させることなく、別のアイソタイプに変更することができる。あるいは、抗原特異性を変化させることなく、ハイブリドーマに、ある抗体アイソタイプを別のものにスイッチさせる技術（アイソタイプスイッチング）が確立されてきた。したがって、このような抗体アイソタイプは、記載された抗体又は抗原結合フラグメントの範囲内にある。

【０１０８】

本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターもまた提供される。ベクターは、発現ベクターであり得る。このため、対象となるポリペプチドをコードする配列を含有する組み換え発現ベクターは、本開示の範囲内であると想到される。発現ベクターは、１つ又は２つ以上の追加配列を含有してもよい。同追加配列には、例えば、制御配列（例えば、プロモータ、エンハンサー）、選択マーカー、及びポリアデニル化シグナルが挙げられるが、これらに限定されない。広い各種の宿主細胞を形質転換するためのベクターは公知であり、プラスミド、ファージミド、コスミド、バキュロウイルス、バクミド、細菌人工染色体（ＢＡＣ）、酵母人工染色体（ＹＡＣ）、並びに、他の細菌、酵母、及びウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１０９】

本説明の範囲内にある組み換え発現ベクターは、適切な調節エレメントに操作可能に連結することができる少なくとも１つの組み換えタンパク質をコードする、合成、ゲノム、又はｃＤＮＡ由来の核酸フラグメントを含む。このような調節エレメントには、転写プロモータ、適切なｍＲＮＡリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終了を制御する配列を挙げることができる。発現ベクター、特に、哺乳類の発現ベクターはまた、１つ又は２つ以上の非転写エレメント、例えば、複製の起点、発現される遺伝子に連結された適切なプロモータ及びエンハンサー、他の５’又は３’フランキング非転写配列、５’又は３’非翻訳配列（例えば、必須リボソーム結合部位）、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位、又は転写終了配列を含んでもよい。宿主において複製する能力を付与する複製の起点もまた包含されてもよい。

【０１１０】
脊椎動物細胞を形質転換するのに使用される発現ベクター中の転写及び翻訳制御配列は、ウイルス資源により提供することができる。例示的なベクターは、Ｏｋａｙａｍａ ａｎｄ Ｂｅｒｇ，３ Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２８０（１９８３）に記載されたように構築されてもよい。

【０１１１】
一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントのコード配列は、強力な構成的プロモータ、例えば、下記遺伝子：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＰＲＴ）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ベータアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン等のためのプロモータの制御下に置かれる。加えて、多くのウイルスプロモータが、真核細胞中で恒常的に機能し、記載された実施形態での使用に適している。このようなウイルスプロモータには、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）中間初期プロモータ、ＳＶ４０の初期及び後期プロモータ、マウス乳がんウイルス（ＭＭＴＶ）プロモータ、モロニー白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）、エプスタインバーウイルス（ＥＢＶ）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、及び他のレトロウイルスの長端末反復配列（ＬＴＲ）、並びに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントのコード配列は、誘導性プロモータ、例えば、メタロチオネインプロモータ、テトラサイクリン誘導性プロモータ、ドキシサイクリン誘導性プロモータ、１つ又は２つ以上のインターフェロン刺激応答エレメント（ＩＳＲＥ）、例えば、プロテインキナーゼＲ ２’，５’－オリゴアデニレート合成酵素、ＭＸ遺伝子、ＡＤＡＲ１等を含有するプロモータの制御下に置かれる。

【０１１２】
本明細書に記載されたベクターは、１つ又は２つ以上の配列内リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）を含有してもよい。ＩＲＥＳ配列の融合ベクター内への包含は、一部のタンパク質の発現を増強させるのに有益であり得る。一部の実施形態では、ベクター系は、１つ又は２つ以上のポリアデニル化部位（例えば、ＳＶ４０）を含むこととなる。同部位は、前述の核酸配列のうちいずれかの上流又は下流にあってもよい。ベクターの成分は、近接して連結されてもよく、又は遺伝子産物を発現させるのに最適な間隔を提供するように（すなわち、ＯＲＦ間に「スペーサー」ヌクレオチドを導入することにより）配置されてもよく、若しくは別の方法で位置付けられてもよい。調節エレメント、例えば、ＩＲＥＳモチーフはまた、発現に最適な間隔を提供するように配置されてもよい。

【０１１３】
ベクターは、当技術分野において既知の選択マーカーを含んでもよい。選択マーカーには、陽性及び陰性選択マーカー、例えば、抗生物質耐性遺伝子（例えば、ネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ペニシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ブラストサイジン耐性遺伝子）、グルタミン酸合成酵素遺伝子、ガンシクロビル選択用のＨＳＶ－ＴＫ、ＨＳＶ－ＴＫ誘導体、又は６－メチルプリン選択用の細菌のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子（Ｇａｄｉ ｅｔ ａｌ．，７ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１７３８～１７４３（２０００））が挙げられる。選択マーカーをコードする核酸配列又はクローニング部位は、対象となるポリペプチドをコードする核酸配列又はクローニング部位の上流又は下流にあってもよい。

【０１１４】
本明細書に記載されたベクターを使用して、記載された抗体又は抗原結合フラグメントをコードする遺伝子により種々の細胞を形質転換することができる。例えば、ベクターを使用して、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントの生成細胞を生じさせることができる。このため、別の態様は、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載され、例示された抗体又は抗原結合フラグメントをコードする核酸配列を含むベクターで形質転換された宿主細胞を特徴とする。

【０１１５】
外来遺伝子を細胞内に導入するための数多くの手法が、当技術分野において既知であり、本明細書に記載され、例示された種々の実施形態に従って、記載された方法を行う目的で組み換え細胞を作成するのに使用することができる。使用される手法は、異種遺伝子配列が細胞の子孫により遺伝及び発現可能であり、かつレシピエント細胞に必須の成育及び生理学的機能を損なうことのないよう、異種遺伝子配列を宿主細胞に安定して導入するものでなければならない。使用することができる手法としては、染色体導入法（例えば、細胞融合、染色体介在性遺伝子導入、マイクロ細胞介在性遺伝子導入）、物理的方法（例えば、トランスフェクション、スフェロプラスト融合、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム担体）、ウイルスベクター導入（例えば、組み換えＤＮＡウイルス、組み換えＲＮＡウイルス）等が挙げられる（Ｃｌｉｎｅ，２９　Ｐｈａｒｍａｃ．Ｔｈｅｒ．６９～９２（１９８５）に記載）が、これらに限定されない。哺乳類細胞による細菌プロトプラストのリン酸カルシウム沈殿及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）誘導融合を使用しても、細胞を形質転換することができる。

【０１１６】
本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントの発現に使用するのに適した細胞は、好ましくは、真核細胞、より好ましくは、植物、げっ歯類、又はヒト起源の細胞である。これらの細胞には、例えば、ＮＳＯ、ＣＨＯ、ＣＨＯＫ１、ｐｅｒＣ．６、Ｔｋ－ｔｓ１３、ＢＨＫ、ＨＥＫ２９３細胞、ＣＯＳ－７、Ｔ９８Ｇ、ＣＶ－１／ＥＢＮＡ、Ｌ細胞、Ｃ１２７、３Ｔ３、ＨｅＬａ、ＮＳ１、Ｓｐ２／０骨髄腫細胞、とりわけＢＨＫ細胞株等が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、抗体の発現は、ハイブリドーマ細胞を使用して達成されてもよい。ハイブリドーマを生成するための方法は、当該技術分野において十分確立されている。

【０１１７】
本明細書に記載された発現ベクターにより形質転換された細胞は、本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントの組み換え発現について選択され、又はスクリーニングされてもよい。組み換え陽性細胞は、タンパク質改変又は変化させた翻訳後修飾により、所望の表現型、例えば、高レベルの発現、向上した増殖特性、又は所望の生化学的特性を有するタンパク質を生成する能力を示すサブクローンについて、増殖され、スクリーニングされる。これらの表現型は、所与のサブクローンの本来の特性又は変異によるものであり得る。変異は、化学薬品、ＵＶ波長光、照射、ウイルス、挿入変異源、ＤＮＡミスマッチ修復の阻害、又はこのような方法の組み合わせにより生じ得る。

【０１１８】
処置のためにＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体を使用する方法
本明細書において、治療に使用するための、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。特に、これらの抗体又は抗原結合フラグメントは、がん、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを処置するのに有用であり得る。したがって、本発明は、本明細書に記載されたとおりの抗体、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントを投与することを含む、がんを処置する方法を提供する。例えば、使用は、ＧＰＲＣ５Ｄ受容体相互作用と干渉することによるものであってよく、すなわち、かかる抗体に毒素がコンジュゲートされると、毒素はＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを標的とするようになる。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現には多発性骨髄腫（ＭＭ）などのリンパ腫を含む。これらの方法において使用する抗体には、本明細書に前述したもの、例えば、表１及びこれらの抗体の更なる検討において列記された特徴、例えば、ＣＤＲ又は可変ドメイン配列を有するＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントが含まれる。

【０１１９】
本明細書に記載された一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体の免疫エフェクター特性は、当業者に既知の技術によるＦｃ改変によって増強又はサイレンシングさせることができる。例えば、Ｆｃエフェクター機能、例えば、Ｃｌｑ結合、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞介在性貪食（

ＡＤＣＰ）、細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体、ＢＣＲ）のダウンレギュレーションなどのＦｃエフェクター機能は、これらの活性に関与するＦｃの残基を修飾することによって提供及び／又は調節され得る。

【０１２０】

「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」又は「ＡＤＣＣ」は、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）を発現している非特異的細胞傷害細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、及びマクロファージ）が標的細胞上に結合した抗体を認識し、続けて、標的細胞の溶解を引き起こす、細胞介在性反応を指す。

【０１２１】

ＡＤＣＣを誘導するモノクローナル抗体の能力は、そのオリゴ糖成分を操作することにより増強され得る。ヒトＩｇＧ１又はＩｇＧ３は、Ａｓｎ２９７においてＮ－グリコシル化される。ここで、グリカンの大部分は、公知の二分岐Ｇ０、Ｇ０Ｆ、Ｇ１、Ｇ１Ｆ、Ｇ２、又はＧ２Ｆの形態である。遺伝子操作されていないＣＨＯ細胞により生成される抗体は、典型的には、少なくとも約８５％のグリカンフコース含量を有する。Ｆｃ領域に付着した二分岐の複雑なタイプのオリゴ糖からコアフコースを除去すると、抗原結合性又はＣＤＣ活性を変化させることなく改善されたＦｃ．γ．ＲＩＩＩａ結合により、抗体のＡＤＣＣが向上される。このようなｍＡｂは、二分岐の複雑なタイプのＦｃオリゴ糖を有する、比較的高い脱フコシル化抗体の成功した発現をもたらすことが報告された種々の方法、例えば、培養浸透圧の制御（Ｋｏｎｎｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｙｔｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ６４：２４９～６５，２０１２）、宿主細胞株としての変異体ＣＨＯ株Ｌｅｃ１３の適用（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７７：２６７３３～２６７４０，２００２）、宿主細胞株としての変異体ＣＨＯ株ＥＢ６６の適用（Ｏｌｉｖｉｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＭＡｂｓ；２（４），２０１０、Ｅｐｕｂ ａｈｅａｄ ｏｆ ｐｒｉｎｔ、ＰＭＩＤ：２０５６２５８２）、宿主細胞株としてのラットハイブリドーマ細胞株ＹＢ２／０の適用（Ｓｈｉｎｋａｗａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２７８：３４６６～３４７３，２００３）、アルファ．１，６－フコシルトランスフェラーゼ（ＦＵＴ８）遺伝子に対して特異的な低分子干渉ＲＮＡの導入（Ｍｏｒｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ ８８：９０１～９０８，２００４）、又はベーター１，４－Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩとゴルジアルファ－マンノシダーゼＩＩとの共発現又は強力なアルファ－マンノシダーゼＩ阻害剤であるキフネンシン（Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２８１：５０３２～５０３６；２００６、Ｆｅｒｒａｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ ９３：８５１～８６１，２００６；Ｘｈｏｕ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ Ｂｉｏｅｎｇ ９９：６５２～６５，２００８）を使用して達成され得る。

【０１２２】

本明細書において記載された一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ抗体により引き起こされたＡＤＣＣはまた、抗体Ｆｃ中の特定の置換によって増強され得る。例示的な置換は、例えば、米国特許第６，７３７，０５６号に記載されたように、アミノ酸位置２５６、２９０、２９８、３１２、３５６、３３０、３３３、３３４、３６０、３７８、又は４３０（ＥＵインデックスに従った残基番号付け）における置換である。

【０１２３】

ＧＰＲＣ５Ｄを検出する方法

本明細書において、サンプルを、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより、生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出するための方法が提供される。本明細書に記載されたように、サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微細針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得ることができる。一部の実施形態では、記載された方法は、サンプルを、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントのいずれかと接触させることにより、生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出することを含む。

【０１２４】
一部の実施形態では、サンプルを、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントの２つ以上と接触させてもよい。例えば、サンプルを、第１のＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させ、次いで、第２のＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよく、この場合、第１の抗体又は抗原結合フラグメントと第２の抗体又は抗原結合フラグメントとは、同じ抗体又は抗原結合フラグメントではない。一部の実施形態では、第１の抗体又はその抗原結合フラグメントは、サンプルと接触させる前に、表面、例えば、マルチウェルプレート、チップ、又は類似する基材に固定されてもよい。他の実施形態では、第１の抗体又はその抗原結合フラグメントは、サンプルと接触させる前に、何にも固定されず又は付着されなくてもよい。

【０１２５】
記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、検出可能に標識されてもよい。一部の実施形態では、標識された抗体及び抗原結合フラグメントは、本明細書に記載された方法により、ＧＰＲＣ５Ｄの検出を容易にし得る。多くのこのような標識が、当業者に容易に既知である。例えば、適切な標識としては、放射線標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ＥＣＬ標識、又は酵素が挙げられるが、これらに限定されると考えられるべきではない。より詳細には、記載された標識には、ルテニウム、^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ、^{111}Ｉｎ－ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びベータガラクトシダーゼ、ポリヒスチジン（ＨＩＳタグ）、アクリジン染料、シアニン染料、フルオロン染料、オキサジン染料、フェナントリジン染料、ローダミン染料、Ａｌｅｘａｆｌｕｏｒ（登録商標）染料などが挙げられる。

【０１２６】
記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントは、生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出するための各種のアッセイに使用されてもよい。一部の適切なアッセイには、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、免疫蛍光測定法、免疫沈澱法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光（ＥＣＬ）イムノアッセイ、免疫組織化学法、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）又はＥＬＩＳＡアッセイが挙げられるが、これらに限定されると考えられるべきではない。

【０１２７】
本明細書に記載された一部の実施形態では、対象におけるＧＰＲＣ５Ｄ発現がん細胞の検出を用い、対象がＧＰＲＣ５Ｄを目標とする治療剤により処置され得るかを判定することができる。

【０１２８】
ＧＰＲＣ５Ｄは、血液及び血清サンプル中に、検出可能なレベルで存在する。このため、本明細書において、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより、血液から得られたサンプル、例えば、血清サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出するための方法が提供される。血液サンプル又はその派生物は、希釈され、画分され、又は他の方法で処理されて、記載の方法が実施され得るサンプルを生成することができる。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄは、当該技術分野において既知の任意の回数のアッセイにより、血液サンプル又はその派生物中で検出することができる。例えば、同アッセイには、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、免疫蛍光測定法、免疫沈澱法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光（ＥＣＬ）免疫アッセイ、免疫組織化学法、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）又はＥＬＩＳＡアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２９】
がんを診断するための方法
本明細書において、対象におけるＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを診断するための方法が提供さ

れる。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんには多発性骨髄腫（ＭＭ）などのリンパ腫を含む。一部の実施形態では、上記されたように、生体サンプル、例えば、血液サンプル又は血清サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出することは、サンプルが得られた対象におけるがんを診断する能力を提供する。あるいは、一部の実施形態では、他のサンプル、例えば、組織学的サンプル、微細針吸引サンプル、切除された腫瘍組織、循環細胞、循環腫瘍細胞等もまた、サンプルが得られた対象ががんを有するかどうかを評価するのに使用されてもよい。一部の実施形態では、サンプルが得られた対象ががんを有することが既に判明していてもよいが、対象を苦しめているがんの種類は、診断されていなくてもよく、又は予備的診断では不明であってもよく、そのため、対象から得られた生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出することにより、がんの診断を可能にし、又は明確にすることができる。例えば、対象ががんを有することが判明していてもよいが、不明であってもよく、又は対象のがんがＧＰＲＣ５Ｄを発現しているかどうかが不明確であってもよい。

【０１３０】

一部の実施形態では、記載された方法は、対象から得られた生体サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を決定し、観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量を対照又は参照サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量と比較することにより、対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいるどうかを評価することを含む。この場合、対象から得られたサンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量と対照又は参照サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量との間の差が、対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいることの指標となる。別の実施形態では、対象から得られた生体サンプル中に観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量を、特定の形態又はステージのがんに関連することが既知のＧＰＲＣ５Ｄのレベルと比較して、対象のがんの形態又はステージを求めることができる。一部の実施形態では、対象から得られたサンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量は、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに免疫特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体と接触させることにより評価される。ＧＰＲＣ５Ｄの存在について評価されるサンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微細針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得られてもよい。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんは、多発性骨髄腫（ＭＭ）などの血液系のがんを含む。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

【０１３１】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを診断する方法は、対象の生体サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表１で提供された抗体及びフラグメントから得られたもの）と接触させること、抗体又はその抗原結合フラグメントが結合したサンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を定量すること、サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を既知の標準又は参照サンプルと比較すること、及び対象のＧＰＲＣ５Ｄレベルががんに関連するＧＰＲＣ５Ｄのレベル内に入るかどうかを判定することを含む。更なる実施形態では、診断方法は、がん特異的治療剤を投与又は処方する更なる工程が続き得る。別の実施形態では、診断方法は、がんの処置を容易にするために、判定の結果を伝達する更なる工程が続き得る。一部の実施形態では、がん特異的処置は、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体などのＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを目標としてもよい。

【０１３２】

一部の実施形態では、記載された方法は、対象から得られた血液又は血清サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を決定することと、観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量を対照又は参照サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量と比較することと、により、対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいるかどうかを評価することを含む。この場合、対象から得られたサンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量と対照又は参照サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量との間の差は、対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいることの指標である。

【０１３３】

一部の実施形態では、対照又は参照サンプルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいな

い対象から得られてもよい。一部の実施形態では、対照又は参照サンプルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいる対象から得られてもよい。対照又は参照サンプルがＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいない対象から得られる一部の実施形態では、対照又は参照サンプルについて観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量に対して、試験サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量において観察された増大は、評価される対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいることの指標である。対照サンプルがＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいない対象から得られる一部の実施形態では、対照又は参照サンプルについて観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量に対して、試験サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量において観察される減少又は類似性は、評価される対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいないことの指標である。対照又は参照サンプルがＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいる対象から得られる一部の実施形態では、対照又は参照サンプルについて観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量に対して、試験サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量において観察された類似性は、評価されている対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいることの指標である。対照又は参照サンプルがＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいる対象から得られる一部の実施形態では、対照又は参照サンプルについて観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量に対して、試験サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量において観察された減少は、評価される対象がＧＰＲＣ５Ｄ発現がんに苦しんでいないことの指標である。

【０１３４】

一部の実施形態では、対象から得られたサンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量は、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載された抗体と接触させることにより評価される。ＧＰＲＣ５Ｄの存在について評価されるサンプルは、血液サンプル、血清サンプル、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微細針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得られてもよい。

【０１３５】

種々の態様において、ＧＰＲＣ５Ｄの量は、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより求められる。一部の実施形態では、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する２つ以上の種類の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよい。一部の実施形態では、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第１の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させ、次いでＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第２の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよい。本明細書に記載されたものなどのＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントを、この能力範囲において使用してもよい。

【０１３６】

ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体及び抗原結合フラグメントの種々の組み合わせを使用して、記載された診断方法を実施するための「第１」及び「第２」の抗体又は抗原結合フラグメントを提供することができる。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんは、多発性骨髄腫（ＭＭ）などのリンパ腫を含む。

【０１３７】

特定の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄの量は、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光測定法、免疫沈降法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光（ＥＣＬ）免疫アッセイ、免疫組織化学法、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）又はＥＬＩＳＡアッセイにより決定される。

【０１３８】

記載された診断方法の種々の実施形態では、対照又は参照サンプルが使用される。このサンプルは、使用されるアッセイが適切に機能していることを保証する陽性又は陰性のアッセイ対照でもよい。例えば、この性質のアッセイ対照は、免疫組織化学アッセイに一般的に使用されてもよい。あるいは、サンプルは、健康な対象からの生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量について標準化された参照であってもよい。一部の実施形態では、試験された対象の観察されたＧＰＲＣ５Ｄレベルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんを有することが判明し

ている対象由来のサンプル中に観察されたＧＰＲＣ５Ｄレベルと比較されてもよい。一部の実施形態では、対照群の対象は、標的となる特定のがんに苦しんでいてもよい。一部の実施形態では、対照群の対象は、初期ステージのがんを有することが判明しており、かかるがんは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんであってもよく、又はＧＰＲＣ５Ｄ発現がんでなくてもよい。一部の実施形態では、対照群の対象は、中間ステージのがんを有することが判明しており、かかるがんは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんであってもよく、又はＧＰＲＣ５Ｄ発現がんでなくてもよい。一部の実施形態では、対照群の対象は、後期ステージになっていることが判明しており、かかるがんは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんであってもよく、又はＧＰＲＣ５Ｄ発現がんでなくてもよい。

【０１３９】

がんをモニタするための方法

本明細書において、対象におけるＧＰＲＣ５Ｄ発現がんをモニタするための方法が提供される。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんは、多発性骨髄腫（ＭＭ）などのリンパ腫を含む。一部の実施形態では、記載された方法は、対象から得られた試験サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を決定することと、観察されたＧＰＲＣ５Ｄの量をより早い時点で対象から同様にして得られた生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量と比較することと、により、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんが進行性、退縮性、又は不変なままであるかどうかを評価することを含む。この場合、試験サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量とより早期のサンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量との間の差は、がんが、進行性、退縮性、又は不変なままであるかどうかの指標を提供する。これに関して、より早期のサンプルについて観察された量と比較して増大した量のＧＰＲＣ５Ｄを含む試験サンプルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの進行を示すことができる。逆に、より早期のサンプルで観察された量と比較して減少した量のＧＰＲＣ５Ｄを含む試験サンプルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの退縮を示すことができる。

【０１４０】

したがって、より早期のサンプルについて観察された量と比較してＧＰＲＣ５Ｄの量におけるわずかな差しか有さない試験サンプルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんについて不変の病態を示すことができる。一部の実施形態では、対象から得られた生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄの量は、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載された抗体と接触させることにより評価される。ＧＰＲＣ５Ｄの存在について評価されるサンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微細針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得られてもよい。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

【０１４１】

一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんをモニタする方法は、対象の生体サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表１で提供された抗体及びフラグメントから得られたもの）と接触させることと、サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量を定量することと、サンプル中に存在するＧＰＲＣ５Ｄの量をより早い時点において同じ対象から同様にして得られた生体サンプル中に存在することが決定されているＧＰＲＣ５Ｄの量と比較することと、対象のＧＰＲＣ５Ｄレベルが経時的に変化していたかどうかを判定することと、を含む。より早期のサンプルについて観察された量と比較して増大した量のＧＰＲＣ５Ｄを含む試験サンプルは、がんの進行を示すことができる。逆に、より早期のサンプルについて観察された量と比較して減少した量のＧＰＲＣ５Ｄを含む試験サンプルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの退縮を示すことができる。したがって、より早期のサンプルについて観察された量と比較してＧＰＲＣ５Ｄの量においてわずかな差しか有さない試験サンプルは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんについて不変の病態を示すことができる。一部の実施形態では、サンプルのＧＰＲＣ５Ｄレベルは、単独で、又はより早い時点において評価されたサンプルについて観察されたＧＰＲＣ５Ｄレベルに加えて、既知の標準又は参照サンプルと比較されてもよい。更なる実施形態では、診断方法は、がん特異的処置を行う更なる工程が続き得る。一部の実施形態では、がん特異的処置は、ＧＰＲ

Ｃ５Ｄ発現がんを目標としてもよい。

【０１４２】

種々の態様において、ＧＰＲＣ５Ｄの量は、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより決定される。一部の実施形態では、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する２つ以上の種類の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよい。一部の実施形態では、サンプルを、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第１の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させ、次いで、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第２の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよい。本明細書に記載されたもの等の抗体を、この能力において使用されてもよい。

【０１４３】

表１で記載された抗体及び抗原結合フラグメントの種々の組み合わせを使用して、記載されたモニタ方法を行うための「第１」及び「第２」の抗体又は抗原結合フラグメントを提供することができる。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんは、多発性骨髄腫（ＭＭ）などの血液系のがんを含む。

【０１４４】

特定の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄの量は、ウェスタンブロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光測定法、免疫沈降法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光（ＥＣＬ）免疫アッセイ、免疫組織化学法、蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）又はＥＬＩＳＡアッセイにより決定される。

【０１４５】

ＧＰＲＣ５Ｄを検出するためのキット

本明細書において、生体サンプル中のＧＰＲＣ５Ｄを検出するためのキットが提供される。これらのキットは、本明細書に記載されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又はその抗原結合フラグメントのうち１つ又は２つ以上と、このキットを使用するための使用説明書とを含む。

【０１４６】

提供されたＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、溶液であってもよく、凍結乾燥されていてもよく、基材、担体、又はプレートに固定されていてもよく、又は検出可能に標識化されていてもよい。

【０１４７】

記載されたキットはまた、本明細書に記載された方法を行うのに有用な更なる構成要素を含んでもよい。例として、キットは、対象からサンプルを得るための手段、対照若しくは参照サンプル、例えば、ゆっくり進行するがんを有する対象及び／又はがんを有さない対象からのサンプル、１つ若しくは２つ以上のサンプル区画、及び／又は本発明の方法の実施について説明する指示材料、並びに組織特異的な対照若しくは基準物質を含んでもよい。

【０１４８】

ＧＰＲＣ５Ｄのレベルを決定するための手段は、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄのレベルを決定するためのアッセイに使用するための緩衝液又は他の試薬を更に含み得る。使用説明書は、例えば、アッセイを行うための印刷された使用説明書及び／又はＧＰＲＣ５Ｄの発現レベルを評価するための使用説明書であり得る。

【０１４９】

記載されたキットはまた、対象からサンプルを単離するための手段を含んでもよい。これらの手段は、対象から流体又は組織を得るのに使用され得る機器又は試薬のうち１つ又は２つ以上の品目を含み得る。対象からサンプルを得るための手段はまた、血液サンプルから血液成分、例えば、血清を単離するための手段を含んでもよい。好ましくは、キットは、ヒト対象で使用するために設計されている。

【０１５０】

多重特異的抗体

本明細書に記載された抗ＧＰＲＣ５Ｄ抗体の結合ドメインは、その表面上にＧＰＲＣ５

Ｄを発現している細胞を認識する。上記したように、ＧＰＲＣ５Ｄの発現は、がん細胞を示し得る。特定の細胞分画に対するより特異的な標的化は、二重特異性分子、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ及び別の標的（ＣＤ３及びＢＣＭＡなど）に結合する抗体又は抗体フラグメントを作製することにより達成され得る。これは、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の領域及び他の標的抗原に結合する第２の結合領域を含む分子を作製することにより達成される。抗原結合領域は、標的の特異的な認識を可能にする任意の形態を取ることができ、例えば、結合領域は、重鎖可変ドメイン、Ｆｖ（重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの組み合わせ）、フィブロネクチンＩＩＩ型ドメインに基づいた結合ドメイン（Ｊａｎｓｓｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．のＣｅｎｔｙｒｉｎ分子など、フィブロネクチン由来、若しくはフィブロネクチン由来のＩＩＩ型ドメインのコンセンサスに基づいたもの、又はテネイシン由来、若しくはテネイシン由来のＩＩＩ型ドメインのコンセンサスに基づいたもの、例えば、国際公開第２０１０／０５１２７４号及び同第２０１０／０９３６２７号を参照されたい）であっても、これらを含んでいてもよい。したがって、ＧＰＲＣ５Ｄ及び別の抗原にそれぞれに結合する２種類の異なる抗原結合領域を含む二重特異性分子が提供される。

【０１５１】

本明細書に記載された一部の多重特異的抗体は、ＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３にそれぞれ結合する２種類の異なる抗原結合領域を含む。好ましい実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３に結合する多重特異的抗体（ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体）及びその多重特異的抗原結合フラグメントが提供される。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体は、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第１の抗原結合部位を対を成して形成する第１の重鎖（ＨＣ１）及び第１の軽鎖（ＬＣ１）と、ＣＤ３に特異的に結合する第２の抗原結合部位を対を成して形成する第２の重鎖（ＨＣ２）及び第２の軽鎖（ＬＣ２）と、を含む。好ましい実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体は、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合部位を対を成して形成する第１の重鎖（ＨＣ１）及び第１の軽鎖（ＬＣ１）を含むＧＰＲＣ５Ｄ特異的アームと、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第２の抗原結合部位を対を成して形成する第２の重鎖（ＨＣ２）及び第２の軽鎖（ＬＣ２）を含むＣＤ３特異的アームと、を含む二重特異性抗体である。一部の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、完全長の抗体構造を有する抗体を含む。本明細書で使用されるとき、「完全長の抗体」は、２本の完全長の抗体重鎖と２本の完全長の抗体軽鎖とを有する抗体を意味する。完全長の抗体重鎖（ＨＣ）は、重鎖可変ドメイン及び定常ドメイン、ＶＨ、ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３を含む。完全長の抗体軽鎖（ＬＣ）は、軽鎖可変ドメイン及び定常ドメイン、ＶＬ及びＣＬを含む。完全長の抗体は、一方又は両方の重鎖のいずれかにおいて、Ｃ末端リジン（Ｋ）を欠いていてもよい。「Ｆａｂアーム」又は「半分子」という用語は、抗原に特異的に結合する一対の重鎖－軽鎖を意味する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインのうちの１つは、非抗体ベースの結合ドメイン、例えば、Ｃｅｎｔｙｒｉｎなど、フィブロネクチン３型ドメインに基づいた結合ドメインである。

【０１５２】

本明細書で提供された多重特異的抗体のＧＰＲＣ５Ｄ結合アームは、上記のＧＰＲＣ５Ｄ特異的抗体のいずれから得られてもよい。このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、表１に記載されたとおり抗体クローンから得られた重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む。このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、表１に記載されたとおり抗体クローンから得られた、重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３と、軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３とを含む。このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、以下のクローンの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３を含む：ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、ＧＣ５Ｂ５９６、ＧＣ５Ｂ３８２、ＧＣ５Ｂ３７９、ＧＣ５Ｂ３７３、ＧＣ５Ｂ３７６、ＧＣ５Ｂ３８５、ＧＣ５Ｂ３７０、ＧＣ５Ｂ６０２、ＧＣ５Ｂ６０３、ＧＣ５Ｂ５９９、ＧＣ５Ｂ６０１、ＧＣ５Ｂ５９８、

又はＧＣ５Ｂ５９７。

【０１５３】

このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、以下のクローンの重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３と、軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３と、を含む：ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、又はＧＣ５Ｂ５９６。このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、表１に記載されたとおり抗体クローンから得られた重鎖可変ドメインを含む。このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、表１に記載されたとおり抗体クローンから得られた重鎖可変ドメインと、軽鎖可変ドメインとを含む。このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、クローンＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、又はＧＣ５Ｂ５９６の重鎖可変ドメインを含む。このようなＧＰＲＣ５Ｄ結合アームの一部の例示的な実施形態ではＧＰＲＣ５Ｄに結合する第１の抗原結合領域は、以下のクローンの重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む：ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、ＧＣ５Ｂ５９６、ＧＣ５Ｂ３８２、ＧＣ５Ｂ３７９、ＧＣ５Ｂ３７３、ＧＣ５Ｂ３７６、ＧＣ５Ｂ３８５、ＧＣ５Ｂ３７０、ＧＣ５Ｂ６０２、ＧＣ５Ｂ６０３、ＧＣ５Ｂ５９９、ＧＣ５Ｂ６０１、ＧＣ５Ｂ５９８、又はＧＣ５Ｂ５９７。

【０１５４】

表３は、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的な、ある重鎖及び軽鎖対と、ＣＤ３に特異的な、別の重鎖及び軽鎖対と、を有する、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の一覧を提供する。表中には、記載の実施形態を作成するのに使用される抗原特異的抗体アームを示すため、具体的な抗体ＩＤを掲載する。

【０１５５】

【表３】

表３：

GPRC5D特異的アーム＝抗体ID	CD3特異的アーム＝抗体ID
GC5B81	CD3B219
GC5B465	CD3B219
GC5B483	CD3B219
GC5B596	CD3B219
GC5B382	CD3B219
GC5B379	CD3B219
GC5B373	CD3B219
GC5B376	CD3B219
GC5B385	CD3B219
GC5B370	CD3B219
GC5B602	CD3B219
GC5B603	CD3B219
GC5B599	CD3B219
GC5B601	CD3B219
GC5B598	CD3B219
GC5B597	CD3B219

【０１５６】

二重特異性抗体の一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ結合アームは、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ、好ましくは、その細胞外ドメインにも結合する。

【０１５７】

一部の実施形態では、多重特異的抗体のＧＰＲＣ５Ｄ結合アームは、ＩｇＧ又はその誘

導体、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４のアイソタイプである。ＧＰＲＣ５Ｄ結合アームがＩｇＧ４アイソタイプを有する一部の実施形態では、結合アームは、Ｆｃ領域中にＳ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、及びＬ２３５Ａ置換を含有する。

【０１５８】

二重特異性抗体の一部の実施形態では、第２の抗原結合アームは、ヒトＣＤ３に結合する。一部の好ましい実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体のＣＤ３特異的アームは、ヒト初代Ｔ細胞及び／又はカニクイザル初代Ｔ細胞に結合し、これらを活性化するＣＤ３特異的抗体から得られる。一部の実施形態では、ＣＤ３結合アームは、ＣＤ３εのＮ末端において、エピトープに結合する。一部の実施形態では、ＣＤ３結合アームは、ＣＤ３εの６つのＮ末端アミノ酸を含むエピトープと接触する。一部の実施形態では、二重特異性抗体のＣＤ３特異的結合アームは、マウスモノクローナル抗体ＳＰ３４、マウスＩｇＧ３／λアイソタイプから得られる。一部の実施形態では、ＣＤ３結合アームは、抗体ＳＰ３４のＣＤＲを含む。このようなＣＤ３結合アームは、５×１０$^{-7}$Ｍ以下、例えば、１×１０$^{-7}$Ｍ以下、５×１０$^{-8}$Ｍ以下、１×１０$^{-8}$Ｍ以下、５×１０$^{-9}$Ｍ以下、又は１×１０$^{-9}$Ｍ以下の親和性で、ＣＤ３に結合し得る。ＣＤ３特異的結合アームは、マウスモノクローナル抗体ＳＰ３４のヒト化版のアームでもよい。ヒトフレームワークを用いる適合（ＨＦＡ）を使用して、ＣＤ３特異的アームが得られる抗ＣＤ３抗体をヒト化してもよい。二重特異性抗体の一部の実施形態では、ＣＤ３結合アームは、表２から選択される重鎖及び軽鎖の対を含む。

【０１５９】

一部の実施形態では、ＣＤ３結合アームは、ＩｇＧ又はその誘導体である。一部の実施形態では、ＣＤ３結合アームは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４である。ＣＤ３結合アームがＩｇＧ４アイソタイプを有する一部の実施形態では、結合アームは、Ｆｃ領域中にＳ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｆ４０５Ｌ、及びＲ４０９Ｋ置換を含有する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒトＴ細胞上のＣＤ３εに結合する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代カニクイザルＴ細胞上のＣＤ３εに結合する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒト及びカニクイザルＴ細胞上のＣＤ３εに結合する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒトＣＤ３＋Ｔ細胞を活性化する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代カニクイザルＣＤ４＋Ｔ細胞を活性化する。

【０１６０】

一部の実施形態では、抗体クローン：ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、ＧＣ５Ｂ５９６、ＧＣ５Ｂ３８２、ＧＣ５Ｂ３７９、ＧＣ５Ｂ３７３、ＧＣ５Ｂ３７６、ＧＣ５Ｂ３８５、ＧＣ５Ｂ３７０、ＧＣ５Ｂ６０２、ＧＣ５Ｂ６０３、ＧＣ５Ｂ５９９、ＧＣ５Ｂ６０１、ＧＣ５Ｂ５９８、又はＧＣ５Ｂ５９７の重鎖を含むＧＰＲＣ５Ｄ結合アームを有する、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローン：ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、ＧＣ５Ｂ５９６、ＧＣ５Ｂ３８２、ＧＣ５Ｂ３７９、ＧＣ５Ｂ３７３、ＧＣ５Ｂ３７６、ＧＣ５Ｂ３８５、ＧＣ５Ｂ３７０、ＧＣ５Ｂ６０２、ＧＣ５Ｂ６０３、ＧＣ５Ｂ５９９、ＧＣ５Ｂ６０１、ＧＣ５Ｂ５９８、又はＧＣ５Ｂ５９７の重鎖及び軽鎖を含むＧＰＲＣ５Ｄ結合アームを有する、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローンＣＤ３Ｂ２１９の重鎖を含むＣＤ３結合アームを有するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローンＣＤ３Ｂ２１９の重鎖及び軽鎖を含むＣＤ３結合アームを有するＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローン：ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、ＧＣ５Ｂ５９６、ＧＣ５Ｂ３８２、ＧＣ５Ｂ３７９、ＧＣ５Ｂ３７３、ＧＣ５Ｂ３７６、ＧＣ５Ｂ３８５、ＧＣ５Ｂ３７０、ＧＣ５Ｂ６０２、ＧＣ５Ｂ６０３、ＧＣ５Ｂ５９９、ＧＣ５Ｂ６０１、ＧＣ５Ｂ５９８、又はＧＣ５Ｂ５９７の重鎖を含むＧＰＲＣ５Ｄ結合アームと、抗体クローンＣＤ３Ｂ２１９の重鎖を含むＣＤ３結合アームと、を有する、Ｇ

ＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローン：ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、ＧＣ５Ｂ５９６、ＧＣ５Ｂ３８２、ＧＣ５Ｂ３７９、ＧＣ５Ｂ３７３、ＧＣ５Ｂ３７６、ＧＣ５Ｂ３８５、ＧＣ５Ｂ３７０、ＧＣ５Ｂ６０２、ＧＣ５Ｂ６０３、ＧＣ５Ｂ５９９、ＧＣ５Ｂ６０１、ＧＣ５Ｂ５９８、又はＧＣ５Ｂ５９７の重鎖及び軽鎖を含むＧＰＲＣ５Ｄ結合アームと、抗体クローンＣＤ３Ｂ２１９の重鎖及び軽鎖を含むＣＤ３結合アームと、を有する、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体が提供される。

【０１６１】

例示的なＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体が、表２３に提供される。

【０１６２】

これまでに種々のフォーマットの二重特異性抗体が記載されており、近年ではＣｈａｍｅｓ ａｎｄ Ｂａｔｙ（２００９）Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃ Ｄｅｖ １２：２７６によりレビューされている。

【０１６３】

一部の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、本発明において記載されたもの等の制御されたＦａｂアーム交換により得られたディアボディ、クロスボディ、又は二重特異性抗体である。

【０１６４】

一部の実施形態では、二重特異性抗体としては、ヘテロ二量体形成する相補性ＣＨ３ドメインを有するＩｇＧ様分子、組み換えＩｇＧ様デュアル（dual）標的分子（この分子の２つの側面は各々少なくとも２種類の異なる抗体のＦａｂフラグメント又はＦａｂフラグメントの一部を含有する）、ＩｇＧ融合分子（完全長ＩｇＧ抗体がエクストラＦａｂフラグメント又はＦａｂフラグメントの一部に融合されている）、Ｆｃ融合分子（一本鎖Ｆｖ分子又は安定化ディアボディが重鎖定常ドメイン、Ｆｃ領域又はその一部に融合されている）、Ｆａｂ融合分子（異なるＦａｂフラグメントが互いに融合されている）、ＳｃＦｖ－及びディアボディ－ベース及び重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）（異なる一本鎖Ｆｖ分子又は異なるディアボディ若しくは異なる重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）が互いに又は別のタンパク質若しくは担体分子に融合されている）が挙げられる。

【０１６５】

一部の実施形態では、相補性ＣＨ３ドメイン分子を有するＩｇＧ様分子には、Ｔｒｉｏｍａｂ／Ｑｕａｄｒｏｍａ（Ｔｒｉｏｎ Ｐｈａｒｍａ／Ｆｒｅｓｅｎｉｕｓ Ｂｉｏｔｅｃｈ）、Ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－Ｈｏｌｅｓ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、ＣｒｏｓｓＭＡｂｓ（Ｒｏｃｈｅ）及び静電的に調整された抗体（Ａｍｇｅｎ）、ＬＵＺ－Ｙ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、ストランドを交換し操作したドメインボディ（ＳＥＥＤｂｏｄｙ）（ＥＭＤ Ｓｅｒｏｎｏ）、Ｂｉｃｌｏｎｉｃ（Ｍｅｒｕｓ）、並びにＤｕｏＢｏｄｙ（Ｇｅｎｍａｂ Ａ／Ｓ）が挙げられる。

【０１６６】

一部の実施形態では、組み換えＩｇＧ様デュアル標的分子には、Ｄｕａｌ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ（ＤＴ）－Ｉｇ（ＧＳＫ／Ｄｏｍａｎｔｉｓ）、Ｔｗｏ－ｉｎ－ｏｎｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、Ｃｒｏｓｓ－ｌｉｎｋｅｄ Ｍａｂｓ（Ｋａｒｍａｎｏｓ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｎｔｅｒ）、ｍＡｂ２（Ｆ－Ｓｔａｒ）、及びＣｏｖＸ－ｂｏｄｙ（ＣｏｖＸ／Ｐｆｉｚｅｒ）が挙げられる。

【０１６７】

一部の実施形態では、ＩｇＧ融合分子には、Ｄｕａｌ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｄｏｍａｉｎ（ＤＶＤ）－Ｉｇ（Ａｂｂｏｔｔ）、ＩｇＧ－ｌｉｋｅ Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ（ＩｎｎＣｌｏｎｅ／Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ）、Ｔｓ２Ａｂ（ＭｅｄＩｍｍｕｎｅ／ＡＺ）、及びＢｓＡｂ（Ｚｙｍｏｇｅｎｅｔｉｃｓ）、ＨＥＲＣＵＬＥＳ（Ｂｉｏｇｅｎ Ｉｄｅｃ）、並びにＴｖＡｂ（Ｒｏｃｈｅ）が挙げられる。

【０１６８】

一部の実施形態では、Ｆｃ融合分子には、ＳｃＦｖ／Ｆｃ Ｆｕｓｉｏｎｓ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ）、ＳＣＯＲＰＩＯＮ（Ｅｍｅｒｇｅｎｔ ＢｉｏＳｏｌｕｔｉｏｎｓ／Ｔｒｕｂｉｏｎ，Ｚｙｍｏｇｅｎｅｔｉｃｓ／ＢＭＳ）、Ｄｕａｌ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｒｅｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｆｃ－ＤＡＲＴ）（ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓ）、及びＤｕａｌ（ＳｃＦｖ）．ｓｕｂ．２－Ｆａｂ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ－－Ｃｈｉｎａ）が挙げられる。

【０１６９】

一部の実施形態では、Ｆａｂ融合二重特異性抗体には、Ｆ（ａｂ）２（Ｍｅｄａｒｅｘ／ＡＭＧＥＮ）、Ｄｕａｌ－Ａｃｔｉｏｎ ｏｒ Ｂｉｓ－Ｆａｂ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、Ｄｏｃｋ－ａｎｄ－Ｌｏｃｋ（ＤＮＬ）（ＩｍｍｕｎｏＭｅｄｉｃｓ）、Ｂｉｖａｌｅｎｔ Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ（Ｂｉｏｔｅｃｎｏｌ）、及びＦａｂ－Ｆｖ（ＵＣＢ－Ｃｅｌｌｔｅｃｈ）が挙げられる。ＳｃＦｖ－、ディアボディ－ベース及びドメイン抗体には、Ｂｉｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ Ｃｅｌｌ Ｅｎｇａｇｅｒ（ＢＩＴＥ）（Ｍｉｃｒｏｍｅｔ）、Ｔａｎｄｅｍ Ｄｉａｂｏｄｙ（Ｔａｎｄａｂ）（Ａｆｆｉｍｅｄ）、Ｄｕａｌ Ａｆｆｉｎｉｔｙ Ｒｅｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（ＤＡＲＴ）（ＭａｃｒｏＧｅｎｉｃｓ）、Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｈａｉｎ Ｄｉａｂｏｄｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ）、ＴＣＲ－ｌｉｋｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（ＡＩＴ，ＲｅｃｅｐｔｏｒＬｏｇｉｃｓ）、Ｈｕｍａｎ Ｓｅｒｕｍ Ａｌｂｕｍｉｎ ＳｃＦｖ Ｆｕｓｉｏｎ（Ｍｅｒｒｉｍａｃｋ）、及びＣＯＭＢＯＤＹ（Ｅｐｉｇｅｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ）、二重標的指向性ナノボディ（dual targeting nanobody）（Ａｂｌｙｎｘ）、二重標的指向性の重鎖のみの
ドメイン抗体（dual targeting heavy chain only domain antibody）が挙げられるが、
これらに限定されない。

【０１７０】

本発明の完全長の二重特異性抗体は、例えば、２つの単一特異的二価抗体間でのＦａｂアーム交換（又は半分子交換）を用い、インビトロにおいて、無細胞環境下又は共発現使用下のいずれかで、別個の特異性を有する２つの抗体半分子を好ましくヘテロ二量体形成させるべく各半分子における重鎖ＣＨ３界面に置換を導入することにより生成されてもよい。Ｆａｂアーム交換反応は、ジスルフィド結合異性化反応及びＣＨ３ドメインの解離－会合の結果である。単一特異的親抗体のヒンジ領域における重鎖ジスルフィド結合は減少する。単一特異的親抗体のうち１つについて生じる遊離システインは、第２の単一特異的親抗体分子のシステイン残基と重鎖内ジスルフィド結合を形成し、同時に、親抗体のＣＨ３ドメインは、解離－会合により開放及び再形成する。ＦａｂアームのＣＨ３ドメインは、ホモ二量体形成より好ましいヘテロ二量体形成をするよう操作されてもよい。得られた生成物は、各々別個のエピトープ、すなわち、ＧＰＲＣ５Ｄ上のエピトープ及びＣＤ３上のエピトープに結合する、２つのＦａｂアーム又は半分子を有する二重特異性抗体である。

【０１７１】

本明細書で使用されるとき、「ホモ二量体形成」は、同一のＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖の相互作用を意味する。本明細書で使用されるとき、「ホモ二量体」は、同一のＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖を有する抗体を意味する。

【０１７２】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロ二量体形成」は、同一でないＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖の相互作用を意味する。本明細書で使用されるとき、「ヘテロ二量体」は、同一でないＣＨ３アミノ酸配列を有する２本の重鎖を有する抗体を意味する。

【０１７３】

「ノブインホール（knob-in-hole）」戦略（例えば、国際公開第２００６／０２８９３

６号を参照のこと）を使用して、完全長の二重特異性抗体を生成することもできる。簡潔に、ヒトＩｇＧにおけるＣＨ３ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸は、ヘテロ二量体形成を促進するために、ＣＨ３ドメイン相互作用に影響を及ぼす位置において変異され得る。小さな側鎖を有するアミノ酸（ホール）が、第１の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入され、大きな側鎖を有するアミノ酸（ノブ）が、第２の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入される。２つの抗体の共発現後に、ヘテロ二量体が、「ホール」を有する重鎖と「ノブ」を有する重鎖との優先的な相互作用の結果として形成される。ノブ及びホールを形成する例示的なＣＨ３置換の対は、Ｔ３６６Ｙ／Ｆ４０５Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｆ４０５Ｗ、Ｆ４０５Ｗ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３９４Ｗ／Ｙ４０７Ｔ、Ｔ３９４Ｓ／Ｙ４０７Ａ、Ｔ３６６Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、Ｆ４０５Ｗ／Ｔ３９４Ｓ、及びＴ３６６Ｗ／Ｔ３６６Ｓ＿Ｌ３６８Ａ＿Ｙ４０７Ｖである（第１の重鎖の第１のＣＨ３ドメインにおける改変位置／第２の重鎖の第２のＣＨ３ドメインにおける改変位置として表現）。

【０１７４】

他の戦略、例えば、第１のＣＨ３表面における正に荷電した残基及び第２のＣＨ３表面における負に荷電した残基を置換することによる静電的相互作用を用いる重鎖ヘテロ二量体形成の促進が、米国特許公開第２０１０／００１５１３３号、米国特許公開第２００９／０１８２１２７号、米国特許公開第２０１０／０２８６３７号、又は米国特許公開第２０１１／０１２３５３２号に記載されるように使用されてもよい。他の戦略では、ヘテロ二量体形成は、米国特許公開第２０１２／０１４９８７６号又は米国特許公開第２０１３／０１９５８４９号に記載されるように、下記置換：Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ　Ｙ４０７Ｖ／Ｔ３９４Ｗ、Ｔ３６６Ｉ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ／Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｍ＿Ｔ３９４Ｗ／Ｆ４０５Ａ＿Ｙ４０７Ｖ、Ｌ３５１Ｙ＿Ｙ４０７Ａ／Ｔ３６６Ａ＿Ｋ４０９Ｆ、Ｌ３５１Ｙ＿Ｙ４０７Ａ／Ｔ３６６Ｖ　Ｋ４０９Ｆ　Ｙ４０７Ａ／Ｔ３６６Ａ＿Ｋ４０９Ｆ、又はＴ３５０Ｖ＿Ｌ３５１Ｙ＿Ｆ４０５Ａ　Ｙ４０７Ｖ／Ｔ３５０Ｖ＿Ｔ３６６Ｌ＿Ｋ３９２Ｌ＿Ｔ３９４Ｗ（第１の重鎖の第１のＣＨ３ドメインにおける改変位置／第２の重鎖の第２のＣＨ３ドメインにおける改変位置として表現）により促進されてもよい。

【０１７５】

上記された方法に加えて、本発明の二重特異性抗体は、国際公開第２０１１／１３１７４６号に記載された方法に従って、インビトロにおいて、無細胞環境下で、２つの単一特異的ホモ二量体抗体のＣＨ３領域中に非対称な変異を導入し、ジスルフィド結合を異性化させる還元条件下において、２つの単一特異的ホモ二量体親抗体から二重特異性ヘテロ二量体抗体を形成することにより生成されてもよい。この方法において、第１の単一特異的二価抗体（例えば、抗ＧＰＲＣ５Ｄ抗体）及び第２の単一特異的二価抗体（例えば、抗ＣＤ３抗体）は、ヘテロ二量体の安定性を促進するＣＨ３ドメインにおける特定の置換を有するように操作される。これらの抗体は、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合を異性化させるのに十分な還元条件下において共にインキュベートされ、それにより、Ｆａｂアーム交換により二重特異性抗体が生成される。インキュベート条件は、最適には、非還元条件に戻されてもよい。使用され得る例示的な還元剤は、２－メルカプトエチルアミン（２－ＭＥＡ）、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、ジチオエリスリトール（ＤＴＥ）、グルタチオン、トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）、Ｌ－システイン、及びβ－メルカプトエタノールであり、好ましくは、２－メルカプトエチルアミン、ジチオスレイトール、及びトリス（２－カルボキシエチル）ホスフィンからなる群から選択される還元剤である。例えば、少なくとも２０℃の温度において、少なくとも２５ｍＭの２－ＭＥＡの存在下又は少なくとも０．５ｍＭのジチオスレイトールの存在下で、ｐＨ５～８、例えば、ｐＨ７．０又はｐＨ７．４において、少なくとも９０分のインキュベートが使用されてもよい。

【０１７６】

記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体に加えて、記載されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体をコード可能なポリヌクレオチド配列も提供される。記載されたポ

リヌクレオチドを含むベクターも提供され、同様に、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体を発現している細胞も本明細書において提供される。また、開示されたベクターを発現可能な細胞も記載される。これらの細胞は、哺乳類細胞（例えば、２９３Ｆ細胞、ＣＨＯ細胞）、昆虫細胞（例えば、Ｓｆ７細胞）、酵母細胞、植物細胞、又は細菌細胞（例えば、大腸菌）でもよい。記載された抗体はまた、ハイブリドーマ細胞により生成することができる。

【０１７７】

多重特異的抗体及びその多重特異的抗原結合フラグメントを使用する治療組成物及び処置方法

上記で検討されたＧＰＲＣ５Ｄ二重特異性抗体、例えば、上記で検討されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体は、治療に有用である。特に、ＧＰＲＣ５Ｄ二重特異性抗体は、がんを処置するのに有用である。また、本明細書において、治療的に有効な量の、本明細書に記載された多重特異的抗体又は多重特異的抗原結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体とを含む、哺乳類における過剰増殖性障害を処置するための治療組成物が提供される。好ましい実施形態では、多重特異的抗体は、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗原結合フラグメントである。一実施形態では、医薬組成物は、下記：多発性骨髄腫（ＭＭ）などのＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がん、並びにＧＰＲＣ５Ｄを発現しているかの判定がまだなされていないその他のがんを含む（が、これらに限定されない）、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置のためのものである。がん、例えば、上記で検討された特定のがんを含む血液がんを処置するのに使用されてもよい特定の二重特異性抗体としては、抗体ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ４６５、ＧＳ５Ｂ４８３、又はＧＣ５Ｂ５９６が挙げられる。

【０１７８】

本明細書で提供された医薬組成物は、ａ）有効量の本発明の多重特異的抗体又は抗体フラグメントと、ｂ）不活性でも又は生理学的に活性でもよい医薬的に許容され得る担体とを含む。好ましい実施形態では、多重特異的抗体は、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗原結合フラグメントである。本明細書で使用されるとき、「医薬的に許容され得る担体」という用語は、生理学的に適合性である、任意かつ全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、及び抗真菌剤等を含む。適切な担体、希釈剤、及び／又は賦形剤の例としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等のうち１種又は２種以上、並びにそれらの任意の組み合わせが挙げられる。多くの場合、等張性剤、例えば、糖、ポリアルコール、又は塩化ナトリウムを組成物中に含めるのが好ましい。特に、適切な担体の関連する例には、（１）ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ約７．４、約１ｍｇ／ｍＬ～２５ｍｇ／ｍＬのヒト血清アルブミンを含有又は非含有、（２）０．９％の生理食塩水（０．９％ｗ／ｖの塩化ナトリウム（ＮａＣｌ））、及び（３）５％（ｗ／ｖ）のデキストロース、が挙げられ、抗酸化剤、例えば、トリプタミン、及び安定化剤、例えば、Ｔｗｅｅｎ２０（登録商標）をも含有してもよい。

【０１７９】

本明細書における組成物はまた、処置される特定の疾患にとって必要な場合には、更なる治療剤を含有してもよい。好ましくは、多重特異的抗体又は抗体フラグメントと補助的な活性化合物とは、互いに有害に影響を及ぼさない補完的な活性を有することとなる。好ましい実施形態では、更なる治療剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン２である。好ましい実施形態では、更なる治療剤は、化学療法剤である。

【０１８０】

本発明の組成物は、様々な形態であってよい。このような形態としては、例えば、液体、半固体、及び固体の剤形が挙げられるが、好ましい形態は、意図された投与方式及び治療用途により決まる。典型的に好ましい組成物は、注射可能な溶液又は注入可能な溶液の形態である。好ましい投与方式は、非経口（例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下）である。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、ボーラス又は一定期間にわたる連続的な注入により静脈投与される。別の好ましい実施形態では、本組成物は、局所及び全身性の治療効果を発揮するために、筋肉内、皮下、関節内、関節滑液嚢内、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内、又は病巣周囲の経路により投与される。

【０１８１】

非経口投与用の無菌組成物が、本発明の抗体、抗体フラグメント、又は抗体コンジュゲートを、必要とされる量で適切な溶媒に包含させ、続けて、マイクロフィルター法により滅菌することにより調製され得る。溶媒又は賦形剤として、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、並びにこれらの組み合わせを使用することができる。多くの場合には、等張性剤、例えば、糖、ポリアルコール、又は塩化ナトリウムを組成物中に含むのが好ましい。これらの組成物はまた、補助剤、特に、湿潤剤、等張化剤、乳化剤、分散剤、及び安定化剤を含有してもよい。非経口投与用の無菌組成物はまた、使用時に滅菌水又は任意の他の注射可能な無菌媒体中に溶解されてもよい、無菌の固体組成物の形態で調製されてもよい。

【０１８２】

多重特異的抗体又は抗体フラグメントはまた、経口投与されてもよい。経口投与用の固体組成物として、錠剤、丸剤、粉末剤（ゼラチンカプセル剤、サッシェ剤）、又は顆粒剤が使用されてもよい。これらの組成物において、本発明による活性成分は、１つ又は２つ以上の不活性な希釈剤、例えば、デンプン、セルロース、スクロース、ラクトース、又はシリカと、アルゴン流下において混合される。これらの組成物はまた、希釈剤以外の物質、例えば、１つ又は２つ以上の潤滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム又はタルク、着色剤、コーティング（糖衣錠）、あるいはグレーズを含んでもよい。

【０１８３】

経口投与用の液体組成物として、不活性な希釈剤、例えば、水、エタノール、グリセロール、植物油、又はパラフィンオイルを含有する、医薬的に許容され得る液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、及びエリキシル剤が使用されてもよい。これらの組成物は、希釈剤以外の物質、例えば、湿潤剤、甘味料、増粘剤、着香剤、又は安定化製品を含んでもよい。

【０１８４】

用量は、所望の効果、治療の期間、及び使用される投与経路により決まる。用量は、一般的には、成人では１日あたり経口で５ｍｇ～１０００ｍｇであり、単位用量は、活性物質１ｍｇ～２５０ｍｇの範囲である。一般的には、医師は、適切な用量を、処置される対象の年齢、体重、及び同対象に固有の任意の他の因子に応じて決定する。

【０１８５】

また、本明細書において、ＧＰＲＣ５Ｄ＋細胞を殺傷するための方法であって、かかる細胞の殺傷を必要とする患者に、かかるＧＰＲＣ５Ｄに結合し、Ｔ細胞を補充して、かかるＧＰＲＣ５Ｄ＋細胞を殺傷する（すなわち、Ｔ細胞を再指向する）ことが可能な多重特異的抗体を投与することにより、ＧＰＲＣ５Ｄ＋細胞を殺傷するための方法が提供される。本発明の多重特異的抗体又は抗体フラグメントのいずれかは、治療的に使用されてもよい。例えば、一実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体は、対象におけるがんを処置するために治療的に使用され得る。

【０１８６】

好ましい実施形態では、本発明の多重特異的抗体又は抗体フラグメントは、哺乳類における過剰増殖性障害を処置するために使用される。より好ましい実施形態では、本発明の多重特異的抗体又は抗体フラグメントを含有する、上記で開示された医薬組成物のうち１つは、哺乳類における過剰増殖性障害を処置するために使用される。一実施形態では、この障害は、がんである。特に、かかるがんは、下記：多発性骨髄腫（ＭＭ）などのＧＰＲ

Ｃ５Ｄ発現Ｂ細胞がん、並びにＧＰＲＣ５Ｄを発現しているかの判定がまだなされていないその他のがんを含む（但しこれらに限定されない）ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんである。好ましい実施形態では、多重特異的抗体は、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗原結合フラグメントである。

【０１８７】

したがって、本発明の医薬組成物は、例えば、急性多発性骨髄腫（ＭＭ）又はＭＧＵＳ（意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症）及びＳＭＭ（くすぶり型多発性骨髄腫）などの前がん性骨髄腫、及びプラズマ細胞腫などの、ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ／プラズマ細胞がんを含むＧＰＲＣ５Ｄ発現がん（但しこれらに限定されない）；並びにＧＰＲＣ５Ｄを発現しているかの判定がまだなされていないその他のがん、を含む、様々ながんの処置又は予防に有用である。

【０１８８】

同様に、本明細書において、選択された細胞集団の成長を阻害するための方法であって、ＧＰＲＣ５Ｄ発現標的細胞又はこのような標的細胞を含有する組織を、有効量の本発明の多重特異的抗体又は抗体フラグメントと、単独で、又は他の細胞傷害剤若しくは治療剤との組み合わせにおいてのいずれかで、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）の存在下で接触させることを含む、方法が更に提供される。好ましい実施形態では、多重特異的抗体は、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗原結合フラグメントである。好ましい実施形態では、更なる治療剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン２である。好ましい実施形態では、更なる治療剤は、化学療法剤である。選択された細胞集団の成長を阻害するための方法は、インビトロ、インビボ、又はエクスビボにおいて実施され得る。

【０１８９】

インビトロでの使用例には、疾患細胞又は悪性細胞を殺傷することを目的とした、同じ患者への移植前の自家骨髄の処理、コンピテントＴ細胞を殺傷し、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）を防止するための移植前の骨髄の処理、標的抗原を発現していない所望の多様体を除く全ての細胞を殺傷するため、又は不要な抗原を発現している多様体を殺傷するための細胞培養物の処理、が挙げられる。非臨床的なインビトロでの使用条件は、当業者により容易に決定される。

【０１９０】

臨床的なエクスビボでの使用例は、がん処置における自家移植前に、骨髄から腫瘍細胞を除去することである。処置は、下記のように行われ得る。骨髄を患者又は他の個体から採取し、次いで本発明の細胞傷害剤を添加した血清含有培地中でインキュベートする。濃度は、約３７℃で約３０分～約４８時間の間、約１０μＭ～１μＭの範囲である。インキュベートの濃度及び時間の厳密な条件、すなわち、投与量は、当業者により容易に決定される。インキュベート後、骨髄細胞を、血清含有培地で洗浄し、既知の方法に従って、静脈注射により患者に戻す。患者が他の処置、例えば、一連の骨髄破壊的化学療法又は全身照射を受けている状況において、骨髄の収集時間と処理された細胞の再注入の時間との間、処理された骨髄細胞は、標準的な医療機器を使用して、液体窒素中で凍結保存される。

【０１９１】

臨床的なインビボでの使用について、治療的に有効な量の多重特異的抗体又は抗原結合フラグメントが、かかる抗体又はフラグメントを必要とする対象に投与される。例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体及びその多重特異的抗原結合フラグメントは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置を必要とする対象における、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんの処置に有用であり得る。一部の実施形態では、ＧＰＲＣ５Ｄ発現がんは骨髄腫（ＭＭ）などのＢ細胞がんである。好ましい実施形態では、多重特異的抗体は、本明細書に記載されるようなＧ

ＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗原結合フラグメントである。一部の実施形態では、対象は、哺乳類、好ましくは、ヒトである。一部の実施形態では、多重特異的抗体又は抗原結合フラグメントは、無菌試験済みの溶液として投与される。

【０１９２】

処置及び使用についての上記方法における投与計画は、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調節される。例えば、単一ボーラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を、時間をかけて投与してもよく、又は治療状況の緊急性が示される蔡に、用量を比例的に減少又は増加させてよい。非経口組成物は、投与しやすくしかつ用量を均一にするために、用量単位の形態に製剤されてもよい。

【０１９３】

多重特異的抗体及びフラグメントの効率的な投与及び投与計画は、処置される疾患又は状態により決まり、当業者により決定されてもよい。本発明の化合物の治療的に有効な量の例示的で非限定的な範囲は、約０．００１～１０ｍｇ／ｋｇ、例えば、約０．００１～５ｍｇ／ｋｇ、例えば、約０．００１～２ｍｇ／ｋｇ、例えば、約０．００１～１ｍｇ／ｋｇ、例えば、約０．００１、約０．０１、約０．１、約１、又は約１０ｍｇ／ｋｇである。

【０１９４】

当該技術分野において通常の技能を有する医師又は獣医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を容易に決定し、処方することができる。例えば、医師又は獣医師は、医薬組成物中に利用される多重特異的抗体又はフラグメントの用量を、所望の治療効果を達成するのに必要されるよりも少ないレベルより開始し、かかる用量を、所望の効果が達成されるまで徐々に増大させることができる。一般的には、本発明の二重特異性抗体の適切な１日量は、治療効果を生じさせるのに有効であるうち最も少ない用量である化合物量である。投与は、例えば、非経口、例えば、静脈内、筋肉内、又は皮下でもよい。一実施形態では、多重特異的抗体又はフラグメントは、ｍｇ／m^2で算出された毎週投与での注入により投与されてもよい。このような用量は、例えば、下記：用量（ｍｇ／ｋｇ）×７０：１．８に従って、上記で提供されたｍｇ／ｋｇ用量に基づくことができる。このような投与は、例えば、１～８回、例えば、３～５回繰り返されてもよい。投与は、２～２４時間、例えば、２～１２時間の期間にわたる連続的な注入により行われてもよい。一実施形態では、多重特異的抗体又はフラグメントは、毒性の副作用を低減させるために、長期間、例えば、２４時間超にわたるゆっくりとした連続的な注入により投与されてもよい。

【０１９５】

一実施形態では、多重特異的抗体又はフラグメントは、１週間に１回で与えられる場合、最大８回、例えば、４～６回の固定用量として算出された毎週投与において投与されてもよい。このような計画は、例えば、６ケ月又は１２ケ月後に、必要に応じて１回又は２回以上繰り返されてもよい。このような固定用量は、例えば、上記で提供されたｍｇ／ｋｇ用量に基づくことができる。ここで、体重は、７０ｋｇと仮定する。用量は、例えば、生体サンプルを採取し、本発明の多重特異的抗体のＧＰＲＣ５Ｄ抗原結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を使用することによって、本発明の二重特異性抗体の投与時の血中量を測定することにより、決定又は調節されてもよい。

【０１９６】

一実施形態では、多重特異的抗体又はフラグメントは、維持治療、例えば、６ケ月以上の期間で週１回等により投与されてもよい。

【０１９７】

多重特異的抗体又はフラグメントはまた、がんの進行リスクを低下させ、がんの進行におけるイベントの発生の開始を遅延させ、かつ／又はがんが緩解した際の再発リスクを低下させるために、予防的に投与されてもよい。

【０１９８】

本明細書に記載された多重特異的抗体及びそのフラグメントはまた、組み合わせ治療において投与されてもよく、すなわち、処置される疾患又は状態に関連する他の治療剤と組み合わせられてもよい。したがって、一実施形態では、抗体含有医薬は、１種又は２種以上の他の治療剤、例えば、化学療法剤と組み合わせるためのものである。一部の実施形態では、他の治療剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン２である。このような組み合わせ投与は、同時、任意の順序において、別々又は連続的でもよい。同時投与では、薬剤は、必要に応じて、１つの組成物又は別々の組成物として投与されてもよい。

【０１９９】

一実施形態では、対象においてＧＰＲＣ５Ｄを発現している細胞が関与する障害を処置するための方法であって、治療的に有効な量の、本明細書に記載された多重特異的抗体又はフラグメント、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体と、放射線治療とを、それを必要としている対象に施すことを含む、方法が提供される。一実施形態では、がんを処置又は予防するための方法であって、治療的に有効な量の、本明細書に記載された多重特異的抗体又はフラグメント、例えば、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体と、放射線治療とを、それを必要としている対象に施すことを含む、方法が提供される。放射線治療としては、提供される患者に対する、放射線又は放射性医薬の関連する投与を含んでもよい。放射線源は、処置される患者の外側又は内側のいずれか一方であってもよい（放射線治療は、例えば、外照射療法（ＥＢＲＴ）又は小線源治療（ＢＴ）の形態でもよい）。このような方法を実施するのに使用することができる放射性元素には、例えば、ラジウム、セシウム－１３７、イリジウム－１９２、アメリシウム－２４１、金－１９８、コバルト－５７、銅－６７、テクネチウム－９９、ヨウ素－１２３、ヨウ素－１３１、及びインジウム－１１１が挙げられる。

【０２００】

キット

また、本明細書において、例えば、記載された多重特異的抗体又はその抗原結合フラグメントと、特定の細胞種を殺傷するための抗体又はフラグメントを使用するための使用説明書と、を含むキットも提供される。好ましい実施形態では、多重特異的抗体は、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗原結合フラグメントである。使用説明書は、多重特異的抗体又はその抗原結合フラグメントを、インビトロ、インビボ、又はエクスビボにおいて使用するための指示を含んでもよい。

【０２０１】

典型的には、キットは、多重特異的抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する区画を有する。多重特異的抗体又はその抗原結合フラグメントは、凍結乾燥状態、液状、又はキットに含ませるのに修正可能な他の形態でもよい。キットはまた、キットの使用説明書に記載された方法を実施するのに必要とされる、更なる要素を含有してもよい。同要素は、例えば、凍結乾燥粉末を再構成するための無菌溶液、患者への投与の前に多重特異的抗体又はその抗原結合フラグメントと組み合わせるための更なる薬剤、及び多重特異的抗体又はその抗原結合フラグメントを患者に投与するのを支援するツールである。

【０２０２】

診断的使用

本明細書に記載された多重特異的抗体及びフラグメントはまた、診断目的に使用されてもよい。このため、本明細書で定義されたような多重特異的抗体又はフラグメントを含む診断組成物及びその使用もまた提供される。好ましい実施形態では、多重特異的抗体は、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３多重特異的抗体又はその多重特異的抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されるようなＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗原結合フラグメントである。一実施形態では、本発明は、二重特異性ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体と、ＧＰＲＣ

５Ｄに対する抗体の結合を検出するための１種又は２種以上の試薬と、を含む容器を含む、がんを診断するためのキットを提供する。試薬には、例えば、蛍光タグ、酵素タグ、又は他の検出可能なタグを挙げることができる。試薬はまた、酵素反応のための二次若しくは三次抗体又は試薬を含んでもよい。この場合、酵素反応は、可視化することができる生成物を生じる。例えば、本明細書に記載された多重特異的抗体又はその抗原結合フラグメントは、放射線標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ＥＣＬ標識、酵素、ルテニウム、^{111}Ｉｎ－ＤＯＴＡ、^{111}Ｉｎ－ジエチレントリアミン五酢酸（ＤＴＰＡ）、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びβガラクトシダーゼ、若しくはポリヒスチジン、又は、当技術分野において公知の類似するこのような標識で標識されてもよい。

【０２０３】

実施形態

本明細書で提供される開示は、以下の非限定的実施形態も提供する。

【０２０４】

実施形態１　ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

ａ．配列番号１のアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、配列番号５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｂ．配列番号２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｃ．配列番号３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｄ．配列番号４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｅ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｆ．配列番号２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｇ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｈ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｉ．配列番号６２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｊ．配列番号６３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｋ．配列番号６４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｌ．配列番号６５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、又は

ｍ．配列番号６６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、を含む、単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。

【０２０５】

実施形態２　実施形態１に記載の単離された抗体又は抗原結合フラグメントであって、

ａ．配列番号１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６の

アミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｂ．配列番号２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｃ．配列番号３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｄ．配列番号４のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｅ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｆ．配列番号２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３０のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｇ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｈ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｉ．配列番号６２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７４のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｊ．配列番号６３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｋ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号

７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｌ．配列番号６５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号９５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、又は

ｍ．配列番号６６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメント。

【０２０６】

実施形態３　ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、かつ配列番号５２、５３、５４、５５、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、又は９１からなる群から選択される重鎖可変（ＶＨ）領域を含む、単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。

【０２０７】

実施形態４　前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：５６、５７、５８、９２、９３、又は９４からなる群から選択される軽鎖可変（ＶＬ）領域を含む、実施形態３に記載の抗体。

【０２０８】

実施形態５　前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：５２、５３、５４、５５、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、又は９１からなる群から選択されるＶＨ領域と、配列番号５６、５７、５８、９２、９３、又は９４からなる群から選択されるＶＬ領域と、を含む、実施形態３に記載の抗体。

【０２０９】

実施形態６　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５６を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５２、５３、又は８３を含む、実施形態５に記載の抗体。

【０２１０】

実施形態７　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５７を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５４、８４、８５、８６、又は９０を含む、実施形態５に記載の抗体。

【０２１１】

実施形態８　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５８を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５５又は８８を含む、実施形態５に記載の抗体。

【０２１２】

実施形態９　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９２を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号８２又は８７を含む、実施形態５に記載の抗体。

【０２１３】

実施形態１０　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９３を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号８９を含む、実施形態５に記載の抗体。

【０２１４】

実施形態１１　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９４を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号９１を含む、実施形態５に記載の抗体。

【０２１５】

実施形態１２　前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号２２のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する、実施形態１～１１のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【０２１６】

実施形態１３　抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト抗体又は抗原結合フラグメントである、実施形態１～１２のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【０２１７】
実施形態１４　前記抗体又は抗原結合フラグメントは、組み換え体である、実施形態１～１３のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【０２１８】
実施形態１５　抗原結合フラグメントは、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ２フラグメント、又は一本鎖抗体である、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の抗原結合フラグメント。
【０２１９】
実施形態１６　抗体又はその抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプである、実施形態１～１５のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【０２２０】
実施形態１７　ＩｇＧ１又はＩｇＧ４のアイソタイプである、実施形態１～９のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【０２２１】
実施形態１８　ＩｇＧ１は、Ｆｃ領域中に、Ｋ４０９Ｒ置換を有する、実施形態１７に記載の抗体。
【０２２２】
実施形態１９　ＩｇＧ１は、Ｆｃ領域中に、Ｆ４０５Ｌ置換を有する、実施形態１７に記載の抗体。
【０２２３】
実施形態２０　ＩｇＧ４は、Ｆｃ領域中に、Ｆ４０５Ｌ置換及びＲ４０９Ｋ置換を有する、実施形態２０に記載の抗体。
【０２２４】
実施形態２１　Ｆｃ領域中に、Ｓ２２８Ｐ置換、Ｌ２３４Ａ置換、及びＬ２３５Ａ置換を更に含む、実施形態１６に記載の抗体。
【０２２５】
実施形態２２　前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄと交差反応する、実施形態１～１４のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【０２２６】
実施形態２３　前記抗体又は抗原結合フラグメントは、約２８ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$でＡＤＣＣをインビトロで誘導する、実施形態１７に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
【０２２７】
実施形態２４　実施形態１～１１のいずれか１つに記載の抗体又は抗原結合フラグメントを発現している単離された細胞。
【０２２８】
実施形態２５　細胞は、ハイブリドーマである、実施形態２４に記載の細胞。
【０２２９】
実施形態２６　抗体は、組み換えにより生成される、実施形態２４に記載の細胞。
【０２３０】
実施形態２７　単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体であって、
ａ）第１の重鎖（ＨＣ１）と、
ｂ）第２の重鎖（ＨＣ２）と、
ｃ）第１の軽鎖（ＬＣ１）と、
ｄ）第２の軽鎖（ＬＣ２）と、を含み、
前記ＨＣ１及び前記ＬＣ１は、ＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合部位を形成するように対を成しており、前記ＨＣ２及び前記ＬＣ２は、ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第２の抗原結合部位を形成するように対を成している、単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体、又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【０２３１】
実施形態２８　ＨＣ１は、配列番号２５を含み、ＬＣ１は、配列番号２６を含む、実施形態２７に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３２】
実施形態２９　ＨＣ２は、配列番号５２を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３３】
実施形態３０　ＨＣ２は、配列番号５３を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３４】
実施形態３１　ＨＣ２は、配列番号５４を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３５】
実施形態３２　ＨＣ２は、配列番号５５を含み、ＬＣ２は、配列番号５８を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３６】
実施形態３３　ＨＣ２は、配列番号８２を含み、ＬＣ２は、配列番号９２を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３７】
実施形態３４　ＨＣ２は、配列番号８３を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３８】
実施形態３５　ＨＣ２は、配列番号８４を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２３９】
実施形態３６　ＨＣ２は、配列番号８５を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２４０】
実施形態３７　ＨＣ２は、配列番号８６を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２４１】
実施形態３８　ＨＣ２は、配列番号８７を含み、ＬＣ２は、配列番号９２を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２４２】
実施形態３９　ＨＣ２は、配列番号８８を含み、ＬＣ２は、配列番号５８を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
【０２４３】
実施形態４０　ＨＣ２は、配列番号８９を含み、ＬＣ２は、配列番号９３を含む、実施

形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２４４】

実施形態４１　ＨＣ２は、配列番号９１を含み、ＬＣ２は、配列番号９４を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２４５】

実施形態４２　ＨＣ２は、配列番号８５を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、実施形態２８に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２４６】

実施形態４３　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプである、実施形態２７～４２のいずれか１つに記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２４７】

実施形態４４　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ４のアイソタイプである、実施形態４３に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２４８】

実施形態４５　前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ５Ｄに結合する、実施形態２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２４９】

実施形態４６　前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒトの多発性骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ５Ｄに結合する、実施形態２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２５０】

実施形態４７　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのヒトＴ細胞活性化を約０．２２ｎＭ未満のEC_{50}で誘導する、実施形態２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２５１】

実施形態４８　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞のＴ細胞依存性細胞傷害を約０．８９ｎＭ未満のEC_{50}で誘導する、実施形態２７～４２に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【０２５２】

実施形態４９　実施形態２７～４２のいずれか１つに記載の抗体又は二重特異性結合フラグメントを発現している、単離された細胞。

【０２５３】

実施形態５０　前記細胞は、ハイブリドーマである、実施形態４９に記載の細胞。

【０２５４】

実施形態５１　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、組み換えにより生成される、実施形態４９に記載の細胞。

【０２５５】

実施形態５２　がんを有する対象を処置するための方法であって、前記方法は、

治療的に有効な量の、実施形態２７～４２のいずれか１つに記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを、処置を必要とする患者に、前記がんを処置するのに十分な時間投与する工程を含む、方法。

【０２５６】

実施形態５３　がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法であって、前記方法は、

がん細胞の前記成長又は増殖を阻害するために、治療的に有効な量の、実施形態２７～４２のいずれか１つに記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを投与する工程を含む、方法。

【０２５７】

実施形態５４　Ｔ細胞をＧＰＲＣ５Ｄ発現がん細胞に再指向する方法であって、前記方法は、

Ｔ細胞をがんに再指向するために、治療的に有効な量の、実施形態２７～４２のいずれか１つに記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを投与する工程を含む、方法。

【０２５８】

実施形態５５　前記がんは、血液がんである、請求項５２、５３、又は５４に記載の方法。

【０２５９】

実施形態５６　前記血液がんは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がんである、実施形態５５に記載の方法。

【０２６０】

実施形態５７　前記ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がんは、多発性骨髄腫である、実施形態５６に記載の方法。

【０２６１】

実施形態５８　第２の治療剤を投与する工程を含む、実施形態５２に記載の方法。

【０２６２】

実施形態５９　前記第２の治療剤は、化学療法剤又は標的を設定した抗がん治療剤である、実施形態５８に記載の方法。

【０２６３】

実施形態６０　前記化学療法剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン２である、実施形態５９に記載の方法。

【０２６４】

実施形態６１　前記第２の治療剤を、前記二重特異性抗体と同時に、連続的に、又は別個に、前記対象に投与する、実施形態５９に記載の方法。

【０２６５】

実施形態６２　実施形態２７～４２のいずれか１つに記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体と、を含む、医薬組成物。

【０２６６】

実施形態６３　実施形態４９～５１のいずれか１つに記載の細胞を培養することにより、実施形態２７～４２のいずれか１つに記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを生成するための方法。

【０２６７】

実施形態６４　実施形態２７～４２のいずれか１つに記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの、前記ＨＣ１、前記ＨＣ２、前記ＬＣ１、又は前記ＬＣ２をコードする、単離された合成ポリヌクレオチド。

【０２６８】

実施形態６５　実施形態２７～４２のいずれか１つに定義されるとおりのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント、及び／又は実施形態６３に定義されるとおりのポリヌクレオチドと、これらのための包装と、を含む、キット。

【実施例】

【０２６９】

下記実施例は、先の開示を補い、本明細書に記載された主題のより良好な理解を提供するために提供される。これらの実施例は、記載された主題を限定すると解釈されるべきでない。本明細書に記載された実施例及び実施形態は例示のみを目的とするものであり、そ

れらを考慮した種々の改変又は変更は、当業者に明らかであり、また、本発明の真の範囲内に含まれ、かつ本発明の真の範囲から逸脱することなくなされ得ることが理解される。

【０２７０】

実施例１：抗原

組み換えＧＰＲＣ５Ｄ抗原の産生が困難であることから、標準法を使用して、ＧＰＲＣ５Ｄ［ヒト（配列番号：２２）、カニクイザル（配列番号：２３）、マウス（配列番号：２４）］を示す形質転換細胞株を作成して抗体生成及び特性評価試験の際に全細胞抗原（whole cell antigens）として使用した（表４）。

【０２７１】

【表４】

表４．ＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞株

タンパク質	細胞株	プロモータ	抵抗
ヒトGPRC5D	HEK293T	CMV	ネオマイシン
カニクイザルGPRC5D	HEK293F	CMV	ブラストサイジン

【０２７２】

実施例２：ファージディスプレイ法を用いたＧＰＲＣ５Ｄ抗体の生成

２つの別個のアプローチは、ファージ：標準的な細胞パニング（負の選択）及びＦＡＣＳによる細胞ファージパニング（競合的な選択）によるＧＰＲＣ５Ｄ抗体の生成によった。

【０２７３】

標準的な細胞ファージパニング（負の選択）：

インハウスの新規ファージライブラリについては詳細に記載されている（Ｓｈｉ　ｅｔ　ａｌ（２０１０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３９７：３８５～３９６；国際公開第０９／０８５４６２号）。これらのライブラリは、ＣＤＲ－Ｈ３に高い多様性を有するように設計された３つのヒトＶＨ生殖系列遺伝子（ＩＧＨＶ１－６９、３－２３、５－５１）及び４つのヒトＶＬ生殖系列遺伝子（Ａ２７、Ｂ３、Ｌ６、Ｏ１２）で構築されたものである。ファージコートタンパク質ｐＩＸに対するＦａｂ多様体を示す３つの新規ファージライブラリ（ＤＮＰ００００４－１６９ＨＣ／ＬＣ　ｍｉｘ、ＤＮＰ００００５－３２３ＨＣ／ＬＣ　ｍｉｘ、及びＤＮＰ００００６－５５１ＨＣ／ＬＣ　ｍｉｘ）を、ラウンド１、３、５並びにラウンド２及び４でＧＰＲＣ５Ｄ発現ＨＥＫ２９３　Ｇ５安定細胞（標的細胞）に対しパニングした。ラウンド前には増殖させたＦａｂ－ｐＩＸファージをＨＥＫ２９３バックグラウンド細胞に適用した（負の選択）（表５を参照）。終夜増殖させるため、標的細胞に結合したラウンド１の新規Ｆａｂ　ｐＩＸファージを回収した。ラウンド１で選択されたファージをラウンド２のためバックグラウンド細胞に適用し、負に選択されたファージを終夜増殖させるのに備え未結合のＦａｂ－ｐＩＸファージを回収した。ラウンド３及び４では、他の正及び負のセットのパニングラウンドを実施した。最終ラウンドは、直前のラウンドで負に選択され増殖させたファージを２つのパニング群に分割して実施した。一方の群は標的細胞のためのサンプルとし、他方の群はバックグラウンド細胞のパニングのためのサンプルとした。

【０２７４】

【表５】

表５：標準的な細胞ファージパニングのフローチャート－負の選択

パニングのラウンド	抗原として使用した細胞
1	ヒトGPRC5D HEK293
2	HEK293
3	ヒトGPRC5D HEK293
4	HEK293
5(分割)	ヒトGPRC5D HEK293
	HEK293

【０２７５】

標準セルファージパンニング（バックグラウンドの選択）：

前述の標準的な細胞パニング手順で実施したものと同様の環境及びインキュベート時間にて、Ｆａｂ－ｐＩＸファージディスプレイライブラリをＨＥＫ２９３細胞に添加した（表６）。３ラウンド後、ＨＥＫ２９３結合Ｆａｂ－ｐＩＸファージに対応するＤＮＡを使用して、ＮＧＳのためＰＣＲ増幅産物を産生した。これらのＮＧＳの結果は、有望な標的特異的なＦａｂ候補を識別するのを助けるソフトウェアＮＧＳ２．０での更なるダイナミックなサブトラクティブ解析に使用される。

【０２７６】

【表６】

表６：標準的な細胞ファージパニングのフローチャート－バックグラウンドの選択

パニングラウンド	抗原として使用した細胞
1	HEK293
2	HEK293
3	HEK293

【０２７７】

ＦＡＣＳによる細胞ファージパニング（競合的な選択）

標的細胞とバックグラウンド細胞との混合物に、Ｆａｂ　ｐＩＸファージを同時に適用して３ラウンドのパニングを行った（表７）。ラウンド１及び２については、ＧＦＰシグナルを使用して、Ｆａｂ－ｐＩＸファージが結合した標的細胞を選別した。選別された細胞から、結合したＦａｂ－ｐＩＸファージを捕捉し、酸による細胞溶解を行った後で、大腸菌を感染させた。ラウンド２で増幅させたＦａｂ　ｐＩＸファージ及び細胞混合物を、最終ラウンドでＧＦＰ標的細胞についてゲート化された集団及び非ＧＦＰバックグラウンド細胞についてゲート化された集団の２集団に選別した。細胞集団の両方に対するＦａｂ－ｐＩＸファージの結合は、酸による溶解及び大腸菌の感染により捕捉した。

【０２７８】

【表７】

表７：ＦＡＣＳによる細胞のファージパニングのフローチャート－競合的な選択

パニングラウンド	抗原として使用した細胞
1	ヒトGPRC5D__GFP＆HEK293
2	ヒトGPRC5D__GFP＆HEK293
3	ヒトGPRC5D__GFP＆HEK293

【０２７９】

ファージパニングの次世代シーケンシング（ＮＧＳ）

最終ラウンドのパニングサンプル６つにグルコース抑制下での終夜増殖を実施した。ｍ

ｉｎｉ－ｐｒｅｐ ＤＮＡ（Ｑｉａｇｅｎ ＱＩＡｓｐｉｎ ＤＮＡキット）を用意するのにこれらの培養物を使用した。６つのＤＮＡサンプルをＰＣＲのテンプレートとして使用して、ＨＣＤＲ１～ＨＣＤＲ３から測定される増幅産物を生成した。６つの増幅産物をゲル精製し、ｋｅｅｐｉｎｇ ｖｅｒｓｉｏｎ ２．１によりプールし、標準的な細胞パニングのため３．０を分離し、ＦＡＣＳによる細胞パニングのため完全にプールした。これらのプールされ、ゲル精製された増幅産物を、Ｇｅｎｅｗｉｚ ＮＧＳサービスに提出し、ＭｉＳｅｑ １×３００法により加工した。ファイルはＧｅｎｅｗｉｚにより送付され、ローカルサーバにアップロードされた（ｎａｓ２．０）。このサーバでは、ＮＧＳ２．０ソフトウェアアプリケーションを使用して、配列ファイルをロード、読み込み、及び解析した。ＩｇＧの変換には、コピー数（＞５０）と、標的細胞（＋）配列のバックグラウンド細胞（－）配列に対する比率（＞５：１の比率）をもとに上位８８の配列を選択した。重鎖可変配列のみがＮＧＳにより決定されることから、完全な重鎖コンストラクトは電子的に適切なフレームワークへと構築する必要があった。更に、重鎖配列のみが判明していることから、各候補を４つの親軽鎖（Ａ２７、Ｂ３、Ｌ６、Ｏ１２）と対形成させた。候補の最終的な変換は、ヒトＩｇＧ４ＰＡＡとして行われる。

【０２８０】

ＥＬＩＳＡスクリーン及び標準シーケンシング

ＮＧＳに用いたものと同一のＤＮＡプレップに、制限酵素による消化と、セルフライゲーションを実施して、遺伝子ｐＩ×を切除し、可溶性Ｆａｂの発現を可能にした。３つのパニングサンプルのそれぞれについて選別した９２のコロニーをＦａｂ発現についてＥＬＩＳＡにより評価し、サンガー法により重鎖及び軽鎖の両方を配列決定した。ＬＣＤＲの多様な配列について最終候補を哺乳動物発現プラスミドにクローン化した。

【０２８１】

実施例４：ファージディスプレイ法により得られたＧＰＲＣ５Ｄ抗体の初期特性評価

ＧＰＲＣ５Ｄ結合：

上記のとおり、ヒトＧＰＲＣ５Ｄ細胞を抗原として使用して、全細胞ファージパニングを完了した。ＮＧＳ分析により、各候補は重鎖配列のみが判明していた。結果として、各重鎖を、４つの親軽鎖（Ａ２７、Ｂ３、Ｌ６、Ｏ１２）と対形成させ、ＮＧＳにより同定された８７のＨｃ配列から３４８のｍＡｂを得た。ＦＡＣＳを使用して、これらのｍＡｂをカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに対する結合についてまずは評価した。カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ細胞株がヒトＧＰＲＣ５Ｄ細胞株の発現レベルよりも高い発現レベルを有したことから、有望な結合シグナルを最大化する初期スクリーニングを行うため、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ細胞株を選択した。簡潔に、タンパク質濃度を１μｇ／ｍＬに正規化してＦＡＣＳスクリーニングを実施し、１ウェルあたり１００μＬのタンパク質を２００，０００個の細胞と混合した。ｍＡｂを細胞と共に４℃で１時間インキュベートした。次に、細胞をＰＢＳ及び０．２％のＦＢＳで３回洗浄した。次に、ＰＥを連結した抗ヒト二次ｍＡｂ（Ｊａｃｋｓｏｎカタログ番号７０９－１１６－１４９）を検出試薬として添加した。細胞及び二次抗体を４℃で１時間インキュベートした。次に、細胞をＰＢＳ及び０．２％のＦＢＳで３回洗浄した。ＰＢＳ及び０．２％のＦＢＳを用い、この細胞を再度洗浄した後、ＦＡＣＳアレイで解析した。

【０２８２】

カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに対する結合について、１５のｍＡｂでは１００，０００超のＭＦＩ、２３のｍＡｂでは１００，０００未満１０，０００超のＭＦＩ、６３のｍＡｂでは１０，０００未満１０００超のＭＦＩといった多数のヒットが観察された（表８）。

【０２８３】

【表８－１】

表８：ＮＧＳにより誘導されたｍＡｂのカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに対する結合についてのＦＡＣＳデータ。ＮＧＳ解析により同定された重鎖配列を、提示のとおり各親Ｌｃと対形成させた。ＧＣ５Ｍ２９を対照（ＰＨ９Ｌ３軽鎖）として使用した。ハイライトしたｍＡｂのＭＦＩは１０００超である。

Hc ID	GPRC5D mAb [PH9L1(A27)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L2(B3)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L3(L6)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L4(O12)]	MFI
GC5H18	GC5B22	198	GC5B23	230	GC5B24	246	GC5B25	31324
GC5H17	GC5B66	242	GC5B67	272	GC5B68	2682	GC5B69	17416
GC5H20	GC5B114	199	GC5B115	266	GC5B116	253	GC5B117	5037
GC5H15	GC5B158	14407	GC5B159	139766	GC5B160	84111	GC5B161	7856
GC5H13	GC5B202	89948	GC5B203	9173	GC5B204	15203	GC5MB205	52663
GC5H23	GC5B242	242	GC5B243	116641	GC5B244	249	GC5B245	469
GC5H14	GC5B282	487	GC5B283	341	GC5B284	249	GC5B285	87116
GC5H22	GC5B326	195	GC5B237	265	GC5B328	248	GC5B329	292
GC5H24	GC5B26	194	GC5B27	265	GC5B28	229	GC5B29	590
GC5H19	GC5B70	214	GC5B71	229	GC5B72	2013	GC5B73	3827
GC5H33	GC5B118	178	GC5B119	222	GC5B120	880	GC5B121	43924
GC5H36	GC5B162	86773	GC5B163	21970	GC5B164	122043	GC5B165	1870
GC5H31	GC5B206	467	GC5B207	3636	GC5B208	481	GC5B209	1409
GC5H29	GC5B246	202	GC5B247	3037	GC5B248	2835	GC5B249	1373
GC5H34	GC5B286	239	GC5B287	163990	GC5B288	259	GC5B289	271
GC5H35	GC5B330	202	GC5B331	552	GC5B332	191978	GC5B333	1591
GC5H26	GC5B30	204	GC5B31	230	GC5B32	16553	GC5B33	270
GC5H27	GC5B74	238	GC5B75	365	GC5B76	829	GC5B77	317
GC5H25	GC5B122	153	GC5B123	237	GC5B124	6026	GC5B125	6197
GC5H30	GC5B166	1510	GC5B167	6266	GC5B168	32482	GC5B169	327
GC5H47	GC5B210	1730	GC5B211	284	GC5B212	278	GC5B213	727
GC5H42	GC5B250	3969	GC5B251	213233	GC5B252	63295	GC5B253	574
GC5H37	GC5B290	8839	GC5B291	201024	GC5B292	110940	GC5B293	305
GC5H45	GC5B334	160	GC5B335	1434	GC5B336	3228	GC5B337	309
GC5H38	GC5B34	157	GC5B35	283	GC5B36	14936	GC5B37	297
GC5H40	GC5B78	162	GC5B79	309	GC5B80	428	GC5B81	74140

【０２８４】

【表８－２】

（表８の続き）

Hc ID	GPRC5D mAb [PH9L1(A27)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L2(B3)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L3(L6)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L4(O12)]	MFI
GC5H43	GC5B126	157	GC5B127	265	GC5B128	268	GC5B129	1283
GC5H49	GC5B170	1014	GC5B171	51995	GC5B172	1434	GC5B173	332
GC5H62	GC5B214	2565	GC5B215	274	GC5B216	263	GC5B217	1589
GC5H60	GC5B254	161	GC5B255	5788	GC5B256	460	GC5B257	308
GC5H94	GC5B294	190	GC5B295	2312	GC5B296	745	GC5B298	261
GC5H69	GC5B338	188	GC5B339	260	GC5B340	1798	GC5B341	290
GC5H85	GC5B38	10809	GC5B39	1112	GC5B40	110654	GC5B41	4379
GC5H96	GC5B82	165	GC5B83	272	GC5B84	1547	GC5B85	3563
GC5H97	GC5B130	174	GC5B131	293	GC5B132	306	GC5B133	343
GC5H76	GC5B174	219	GC5B175	3631	GC5B176	244	GC5B177	324
GC5H68	GC5B218	21420	GC5B219	310	GC5B220	777	GC5B221	762
GC5H79	GC5B256	714	GC5B257	1146	GC5B258	456	GC5B259	1129
GC5H71	GC5B298	185	GC5B299	1370	GC5B300	260	GC5B301	292
GC5H93	GC5B342	164	GC5B343	247	GC5B344	401	GC5B345	283
GC5H21	GC5B42	219	GC5B43	307	GC5B44	2694	GC5B45	1022
GC5H39	GC5B86	192	GC5B87	344	GC5B88	470	GC5B89	41027
GC5H50	GC5B134	764	GC5B135	340	GC5B136	600	GC5B137	2087
GC5H28	GC5B178	750	GC5B179	6708	GC5B180	1005	GC5B181	535
GC5H53	GC5B222	284	GC5B223	264	GC5B224	228	GC5B225	605
GC5H51	GC5B262	159	GC5B263	1013	GC5B267	238	GC5B268	309
GC5H64	GC5B302	184	GC5B303	329	GC5B304	240	GC5B305	1571
GC5H16	GC5B346	182	GC5B347	259	GC5B348	332	GC5B349	552
GC5H65	GC5B46	204	GC5B47	327	GC5B48	1320	GC5B49	392
GC5H32	GC5B90	335	GC5B91	340	GC5B92	1848	GC5B93	1780
GC5H54	GC5B138	193	GC5B139	354	GC5B140	323	GC5B141	292
GC5H99	GC5B182	196	GC5B183	6421	GC5B184	309	GC5B185	280
GC5H52	GC5B226	204	GC5B227	298	GC5B228	247	GC5B229	263
GC5H48	GC5B266	268	GC5B267	2160	GC5B268	235	GC5B269	281
GC5H44	GC5B306	204	GC5B307	313	GC5B308	302	GC5B309	621
GC5H46	GC5B350	198	GC5B351	287	GC5B352	4300	GC5B353	1708

【０２８５】

【表８－３】

（表８の続き）

Hc ID	GPRC5D mAb [PH9L1(A27)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L2(B3)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L3(L6)]	MFI	GPRC5D mAb [PH9L4(O12)]	MFI
GC5H56	GC5B50	229	GC5B51	36679	GC5B52	386	GC5B53	446
GC5H55	GC5B94	255	GC5B95	609	GC5B96	411	GC5B97	350
GC5H98	GC5B142	194	GC5B143	407	GC5B144	284	GC5B145	483
GC5H61	GC5B186	543	GC5B187	1132	GC5B188	376	GC5B189	333
GC5H92	GC5B320	297	GC5B321	294	GC5B322	280	GC5B323	386
GC5H5	GC5B17	243	GC5B18	301	GC5B19	1048	GC5B20	384
GC5H59	GC5B98	272	GC5B99	388	GC5B100	661	GC5B101	528
GC5H66	GC5B354	223	GC5B355	852	GC5B356	374	GC5B357	500
GC5H80	GC5B54	299	GC5B55	415	GC5B56	422	GC5B57	487
GC5H87	GC5B102	383	GC5B103	460	GC5B104	3130	GC5B105	456
GC5H67	GC5B146	325	GC5B147	370	GC5B148	383	GC5B149	487
GC5H73	GC5B190	236	GC5B191	2556	GC5B192	409	GC5B193	387
GC5H86	GC5B230	17885	GC5B231	543	GC5B232	494	GC5B233	620
GC5H70	GC5B270	390	GC5B271	660	GC5B272	389	GC5B273	450
GC5H90	GC5B314	219	GC5B315	334	GC5B316	363	GC5B317	403
GC5H95	GC5B358	211	GC5B359	344	GC5B360	414	GC5B361	449
GC5H74	GC5B58	294	GC5B59	448	GC5B60	477	GC5B61	548
GC5H78	GC5B106	267	GC5B107	440	GC5B108	474	GC5B109	497
GC5H77	GC5B150	312	GC5B151	452	GC5B152	412	GC5B153	709
GC5H91	GC5B194	296	GC5B195	448	GC5B196	491	GC5B197	483
GC5H57	GC5B234	128355	GC5B235	195348	GC5B236	134008	GC5B237	11255
GC5H41	GC5B274	313	GC5B275	7431	GC5B278	435	GC5B279	542
GC5H58	GC5B318	2608	GC5B319	5791	GC5B320	49616	GC5B321	4823
GC5H63	GC5B362	313	GC5B363	392	GC5B364	461	GC5B365	3613
GC5H72	GC5B62	326	GC5B63	463	GC5B64	485	GC5B65	694
GC5H75	GC5B110	208487	GC5B111	692	GC5B112	140269	GC5B113	104136
GC5H81	GC5B154	351	GC5B155	412	GC5B156	440	GC5B157	555
GC5H82	GC5B198	285	GC5B199	593	GC5B200	499	GC5B201	485
GC5H83	GC5B238	3698	GC5B239	4370	GC5B240	4676	GC5B241	825
GC5H88	GC5B278	3659	GC5B279	481	GC5B280	425	GC5B281	633
GC5H89	GC5B332	299	GC5B333	561	GC5B334	4467	GC5B335	494
GC5H84	GC5B366	544	GC5B367	474	GC5B368	6313	GC5B369	26116

【０２８６】

結合親和性が最も高かった４０のｍＡｂを、カニクイザルＧＰＣＲ５Ｄ細胞に対する反復結合試験と、ヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞に対するＦＡＣＳによる結合評価とから構成される、更なる特性評価のために選択した（表９）。これらのデータを解析して、精製及びＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の生成のため１７のｍＡｂを選択した（ハイライトを付した）。精製用ｍＡｂの選択及びＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の生成に使用される因子としては、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに対する結合特異性、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに対する交差反応性、及びＨｃ配列多様性が挙げられる。例えば、ＧＣ５Ｈ３６を３つの別個の軽鎖と対形成させ、結合について解析した（ＧＣ５Ｂ１６２、ＧＣ５Ｂ１６３、ＧＣ５Ｂ１６４）。ＧＣ５Ｂ１６４は、そのｍＡｂが、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに対してＧＣ５Ｂ１６２又はＧＣ５Ｂ１６３より高いＭＦＩを有することが観察されたので、ＧＣ５Ｂ１６４のみで解析を進めた。

【０２８７】

【表９】

表９：ＮＧＳから誘導されたｍＡｂの、カニクイザル及びヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現ＨＥＫ２９３Ｆ細胞に対する結合についてのＦＡＣＳデータ。遺伝子導入していないＨＥＫ２９３Ｆ細胞を用いて、ＧＰＲＣ５Ｄに対する結合特異性を評価した。ＴＦ７Ｍ１６３６は、アイソタイプ対照として用いられた。ハイライトしたｍＡｂを更なる解析に選択した。

タンパク質ID	HCペプチドID	カニクイザルGPRC5D MFI	ヒトGPRC5D MFI	293F MFI
GC5B38	GC5H85	6, 864	280	215
GC5B110	GC5H75	142, 277	2, 543	235
GC5B158	GC5H15	4, 923	285	235
GC5B162	GC5H36	75, 139	2, 981	230
GC5B202	GC5H13	30, 470	2, 152	256
GC5B218	GC5H68	10, 451	277	263
GC5B230	GC5H86	19, 103	364	290
GC5B234	GC5H57	134, 258	1, 657	261
GC5B51	GC5H56	22, 661	667	480
GC5B159	GC5H15	129, 370	1, 987	258
GC5B163	GC5H36	7, 605	840	310
GC5B171	GC5H49	24, 133	1, 144	1, 321
GC5B235	GC5H57	158, 011	2, 643	254
GC5B243	GC5H23	67, 848	20, 458	221
GC5B251	GC5H42	74, 510	11, 418	235
GC5B281	GC5H34	109, 418	5, 317	570
GC5B291	GC5H37	77, 798	10, 427	880
GC5B32	GC5H26	3, 597	14, 656	358
GC5B36	GC5H38	5, 353	2, 002	352
GC5B40	GC5H85	67, 279	4, 510	310
GC5B112	GC5H75	104, 875	470	433
GC5B160	GC5H15	40, 881	635	276
GC5B164	GC5H36	78, 672	12, 664	343
GC5B168	GC5H30	41, 779	28, 885	1, 238
GC5B204	GC5H13	5, 090	390	212
GC5B236	GC5H57	78, 546	1, 442	192
GC5B252	GC5H42	22, 010	1, 498	204
GC5B292	GC5H37	63, 366	1, 872	480
GC5B320	GC5H58	63, 345	22, 891	231
GC5B332	GC5H35	106, 515	13, 348	253
GC5B25	GC5H18	22, 079	705	431
GC5B69	GC5H17	1, 593	851	284
GC5B81	GC5H40	62, 756	9, 986	288
GC5B89	GC5H39	31, 613	1, 068	251
GC5B113	GC5H75	66, 475	550	323
GC5B121	GC5H33	35, 493	3, 061	299
GC5B205	GC5H13	63, 610	25, 199	260
GC5B237	GC5H57	2, 579	267	248
GC5B285	GC5H14	81, 405	19, 870	225
GC5B369	GC5H84	16, 241	559	252
	TF7M1636	956	2, 621	1, 538
	ヒト二次	209	316	228
	抗hGPRC5D	9, 001	379	70
	マウス抗アイソタイプ	60	82	65
	非染色	44	50	33

【０２８８】

選択した各ｍＡｂの、ヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現ＨＥＫ２９３細胞及び遺伝子導入していないＨＥＫ２９３細胞に対する濃度依存的結合プロファイルを、ＦＡＣＳを使用して求めた（図１）。全てのｍＡｂについて、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに対し用量依存的な様式で結合が観察された。３つのｍＡｂ、ＧＣ５Ｂ３６、ＧＣ５Ｂ１６８、及びＧＣ５Ｂ２０５は、遺伝子導入していない（ＧＰＲＣ５Ｄ　ｎｕｌｌ）ＨＥＫ２９３細胞にも結合することが観察されたため、この細胞との非特異的な相互作用を理由として優先順位を下げた。

【０２８９】

抗ＣＤ３アームＣＤ３Ｂ２１９と、抗ＲＳＶ　ｎｕｌｌアームＢ２３Ｍ４６と、を有す

る二重特異性抗体の生成には、残りの１４のｍＡｂを選択した（表１０）。

【０２９０】

【表１０】

表１０：ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂ　ＩＤ及び二重特異性ＩＤ間の関係。

GPRC5D mAb タンパク質ID	×CD3 二重特異性ID	×B23 Null 二重特異性
GC5B320	GCDB44	GCDB30
GC5B243	GCDB40	GCDB26
GC5B285	GCDB43	GCDB29
GC5B332	GCDB45	GCDB31
GC5B164	GCDB35	GCDB21
GC5B251	GCDB41	GCDB27
GC5B81	GCDB32	GCDB18
GC5B235	GCDB38	GCDB24
GC5B110	GCDB34	GCDB20
GC5B202	GCDB36	GCDB22
GC5B234	GCDB37	GCDB23
GC5B252	GCDB42	GCDB28
GC5B236	GCDB39	GCDB25
GC5B89	GCDB33	GCDB19

【０２９１】

二重特異性抗体のうちＧＣＤＢ３８は、組み換えの間に沈殿し、別の抗体のＧＣＤＢ３６は１０％超の凝集体を含有した。全ての他の二重特異性抗体は、標準的なリリース基準に合格した。ｎｕｌｌアーム二重特異性抗体を、ヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現ＨＥＫ２９３細胞に対する濃度依存的結合について解析した（図２）。

【０２９２】

全ての二重特異性抗体は、用量依存的な様式で結合することが観察された。ＧＣ５Ｂ３２０は、二価のｍＡｂ及び一価の二重特異性抗体間の結合差を明らかにするための結合比較分子として含めた。ＧＣＤＢ４４は、抗ＣＤ３二重特異性抗体及び抗ＲＳＶ　ｎｕｌｌアームｍＡｂ間の結合差を明らかにするための結合比較分子として含めた。ｍＡｂのＧＣ５Ｂ３２０を二重特異性抗体ＧＣＤＢ３０及びＧＣＤＢ４４と比較すると、見かけ上の結合親和性に予想される低下が観察された。また、ＧＣＤＢ４４（抗ＣＤ３二重特異性Ａｂ）は、抗ヒトＧＰＲＣ５Ｄ細胞に対する結合親和性が、ＧＣＤＢ３０（抗ＲＳＶ　ｎｕｌｌアーム二重特異性Ａｂ）に比べてわずかに高いことが観察され、これにより、抗ＣＤ３アームは、この細胞株に対する結合に正の影響を与えることが実証された。

【０２９３】

ＧＰＲＣ５Ｄを内因的に発現するＭＭ１Ｒ細胞及びＨ９２９細胞に対する結合について、二重特異性抗体のパネルもプロファイルした（図３）。ＦＡＣＳを使用して、二重特異性抗体のＭＭ１Ｒ及びＨ９２９細胞に対する結合プロファイルを、過剰発現させたヒトＧＰＣＲ５Ｄ　ＨＥＫ２９３細胞及び遺伝子導入していないＨＥＫ２９３細胞の場合と比較した。二重特異性抗体は、ＭＭ１Ｒ細胞及びＨ９２９細胞で内因的に発現し、ある親和性の範囲でＧＰＲＣ５Ｄに結合することが観察された。ＭＭ１Ｒ細胞又はＨ９２９細胞のいずれかよりも受容体密度がかなり高い、過剰発現させた安定な細胞株であるヒトＧＰＲＣ５Ｄ　ＨＥＫ細胞において最も高い結合が観察された。Ｈ９２９及びＭＭ１Ｒ細胞への結合親和性が低いことが観察されたことから、ＧＣＤＢ３７、ＧＣＤＢ３８、ＧＣＤＢ３９及びＧＣＤＢ４１の解析は先に進めなかった。

【０２９４】

インビトロでのＴ細胞依存性細胞傷害

次に、Ｈ９２９及びＭＭ１Ｒ標的細胞を使用して、Ｔ細胞介在性細胞傷害アッセイにより、二重特異性抗体のパネルを力価について評価した（図４Ａ及びＢ、表１１）。簡潔に、標的細胞（Ｈ９２９、ＭＭ１．Ｒ、ＯＰＭ２、ＬＰ－１及びＤａｕｄｉ又はＨＥＫ親及びＨＥＫ＋ＧＰＲＣ５Ｄ細胞）を計数し、10^7個の細胞を１３５０ｒｐｍで３分間遠心分離し、細胞ペレットを１ｍＬのＣＦＳＥ希釈液（ＣｅｌｌＴｒａｃｅ　ＣＦＳＥ増殖染色液を１８μＬの無菌ＤＭＳＯで再構成し、この溶液１μＬを１０ｍＬの無菌ＰＢＳに希釈したもの）に再懸濁し、室温、暗所で８分間インキュベートした。インキュベート後、１ｍＬのＨＩ　ＦＢＳを細胞懸濁液に添加して、余剰のＣＦＳＥを反応停止させた。細胞を、１０％のＦＢＳを添加したＲＰＭＩ－１６４０で２回洗浄した。１０ｍＬのＲＰＭＩで再構成した後、細胞を計数し、細胞活性をスプレッドシートで再コード化した。細胞を２．２×10^5個／ｍＬに希釈し、使用までの間３７℃でインキュベートした。

【０２９５】

健常なドナー由来のＰａｎ　Ｔ細胞を３７℃の水浴で解凍し、次に細胞を４℃にて３分間１３５０ｒｐｍで遠心分離した。上清を廃棄し、１．１×10^6個／ｍＬの濃度で培養培地で再構成した。２×10^5個の標的細胞を９６ウェルＵ底プレートのウェルに添加した後、Ｆｃ阻害剤を添加した（最終濃度２ｍｇ／ｍＬ）。全ての細胞株を室温で１０分間インキュベートし、Ｆｃ受容体活性をブロックした。１×10^5個のＴ細胞をウェルに添加した（エフェクター：標的比５：１）。標的細胞及びＴ細胞を混合した後、２０μＬのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂ希釈物を各ウェルに添加した。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体をＰＢＳで８００μｇ／ｍＬ（１０×）に希釈した。力価測定は、９６ウェルＵ底プレートでＰＢＳに４倍で段階希釈して準備した。最後のカラムはＰＢＳのみのままとした（溶媒対照）。プレートを、５％のCO_2下、３７℃にて４８時間インキュベートした。

【０２９６】

２日（４８時間）後、プレートを遠心分離し、サイトカイン放出アッセイのため、１００μＬの上清を－８０℃で保管した。細胞を２００μＬのＰＢＳで洗浄し、室温で２０分間、５０μＬの近赤外生／死染色（１：２００希釈）及び抗ＣＤ２５　ＰＥ抗体（１：５０希釈）でインキュベートする。次に、細胞を２００μＬのＦＡＣＳ緩衝液で１回洗浄し、最終的に１５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液で再構成した。ＦＡＣＳＣａｎｔｏ　ＩＩ及びＦｌｏｗＪｏ　７．６を使用して、標的細胞傷害（標的％）及びＴ細胞活性化ＣＤ２５＋（生Ｔ細胞率％）について細胞を解析した。データのグラフ化及びフィッティングは、最小二乗法を用い、勾配が可変の非線形回帰（４パラメータ）の関数を使用してＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　６で実施した。

【０２９７】

【表１１】

表１１：Ｈ９２９及びMM１Ｒ標的細胞を用いた、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体のＴ細胞介在性細胞傷害評価から計算した、平均ＥＣ$_{50}$。

GPRC5D×CD3 EC50(nM)			
二重特異性ID	H929(n=5)	MM1R(n=3)	順位(平均) H929／MM1R
GCDB32	0.39±0.3	0.12±0.1	2／1
GCDB33	4.29±1.28	0.8±0.18	7／6
GCDB34	2.13±0.93	0.77±0.24	5／5
GCDB35	1.39±0.84	0.74±0.32	4／4
GCDB36	5.2±0.93	4.22±0.55	8／9
GCDB40	1.2±0.92	0.52±0.38	3／3
GCDB41	NA	2.58±0.15	10／8
GCDB43	0.36±0.41	0.21±0.29	1／2
GCDB44	10.29±2.65	4.41±0.29	9／10
GCDB45	2.25±1	0.91±0.93	6／7

【０２９８】

観察した力価範囲では、全ての二重特異性抗体は、Ｔ細胞介在性のＨ９２９細胞の殺傷を活性化した（表１１）。両細胞株について同様の順位が観察された。しかしながら、ＭＭ１Ｒ細胞で観察されたＥＣ$_{50}$の方が低かった。興味深いことに、結合親和性は、Ｔ細胞介在性細胞傷害アッセイにおいて、必ずしも力価と相関しなかった。例えば、ＧＣＤＢ４４は、親和性結合の最も高い二重特異性抗体であったものの、細胞傷害アッセイにおいては力価が最も小さかった。一方ＧＣＤＢ４３では、わずかに低いものの同様にして、細胞傷害アッセイにおいて結合親和性が最も強力であった。

【０２９９】

次にカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄについて機能の交差反応性を評価するため、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ　ＨＥＫ２９３細胞を使用して、Ｔ細胞介在性細胞傷害及びＴ細胞活性化について、二重特異性抗体を評価した（図５Ａ及びＢ）。このアッセイでは全ての二重特異性抗体には活性があったものの、力価の範囲はカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ＋発現細胞に対して観察された。

【０３００】

インビボ活性

次いで、ベンチマークとなるインビボ試験を実施し、これらのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体のインビボ活性を明らかにした。ＧＣＤＢ３２及びＧＣＤＢ３５（図５Ａ及びＢ）を選択して、Ｈ９２９予防的（prophylactic）腫瘍モデルで試験した。Ｈ９２９細
胞をＮＳＧマウスに移植して一週間後に、ヒトＰＢＭＣを注入した。この二重特異性抗体による処置は、Ｈ９２９細胞の移植と同時に開始し、用量１０μｇ、１μｇ、及び０．１μｇ／個体で２又は３日（ｑ２ｄ又はｑ３ｄ）おきに継続し、合計５群とした。各群１０匹のマウスを使用し、溶媒対照としてはＰＢＳを含めた。１１日目に処置を停止し、２５日目（図６Ａ及びＢ）又は２６日目（図１２Ａ～Ｄ）に試験を終了した。用量１μｇ／個体で約８０％の腫瘍成長阻害を示したＧＣＤＢ３５を除き、この予防的モデルで試験した全てのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体は、用量１０及び１μｇ／個体で１００％の腫瘍成長阻害を示した。用量を１／１０程度（０．１μｇ／個体）に減らすと、これらの二重特異性抗体は、１０～８０％の範囲の様々な有効度で腫瘍成長阻害活性を示した。

【０３０１】

Ｆｃブロッカーの存在下でのインビトロＴ細胞依存性細胞傷害

ＧＰＲＣ５Ｄ標的化アームの特異性を明らかにするために、次に、Ｆｃ阻害剤の存在下

での、Ｔ細胞再指向による細胞傷害アッセイにおいて、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体のパネルを評価した。二重特異性抗体の標的細胞は、インビトロアッセイにおいて二重特異性抗体のＦｃ部分と相互作用し得るＦｃγ受容体を発現しているＢ細胞であることから、この試験は特異性を明らかにするために重要であった。Ｔ細胞介在性細胞傷害アッセイでは、多数の二重特異性抗体について力価のシフトが観察された。最も大きなシフトはＧＣＤＢ４０及びＧＣＤＢ３４で観察された（図７Ａ～７Ｂ）。

【０３０２】

次に、４つの最も強力な二重特異性抗体（ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ３５、ＧＣＤＢ４０、及びＧＣＤＢ４３）及びＦｃγ受容体間の結合相互作用の直接測定を完了した（図８Ａ～８Ｄ）。Ｆｃγ受容体及び上記の二重特異性抗体のそれぞれについて、Ａｌｐｈａ　Ｓｃｒｅｅｎ解析を１ラウンド実施した。全てのサンプルは２連でアッセイした。ＦｃγＲＩでは、４つの二重特異性抗体はＢ２１Ｍ　ｈＩｇＧ４　ＰＡＡ様に挙動する。すなわち、合致するアイソタイプ対照以外に競合はない。ＦｃγＲＩＩＩａに対し、ｈＩｇＧ１野生型対照及び４つの二重特異性抗体間でも同様の差異が観察された。ＧＣＤ４３は最もＩｇＧ４ＰＡＡ様のアイソタイプ対照であり、他の二重特異性抗体は、ＦｃγＲＩＩＩａに対しわずかに高い親和性を有した。ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂの両方において、４つの二重特異性抗体が以下の順で競合する：ＧＣＤＢ４０＞ＧＣＤＢ３２＞ＧＣＤＢ４３＞ＧＣＤＢ３５。ＧＣＤＢ４０は、最も競合的であり、すなわちＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂに対し最も高親和性で結合した。実際のところ、ＧＣＤＢ４０は、ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂに対しｈＩｇＧ１野生型と同程度に競合し、Ｆｃ阻害剤を含めたときにＴ細胞介在性細胞傷害アッセイにおいて観察される力価のシフトが裏付けられる。ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩｂに予期せぬ相互作用があったことから、これ以上ＧＣＤＢ４０についての解析は行わなかった。

【０３０３】

競合的結合アッセイ

ヒトＧＰＣＲ５Ｄ細胞に対する競合的結合について、抗ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂを互いに評価した。簡潔に、５０，０００個／ウェルで５０μＬの培地に細胞を播種し、３７℃で９０分間定着させた。次に、３％のＢＳＡを使用して室温で１時間ウェルをブロックした。ｍＡｂをルテニウム（ＩＩ）トリス－ビピリジン、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（Ｒｕ－標識）で標識し、標準の手順を踏んだ。別個の９６ウェルプレートにおいて、５μＭの競合的ｍＡｂを５０ｎＭのＲｕ標識ｍＡｂとインキュベートした。阻害溶液を細胞プレートから除去し、２５μＬのｍＡｂ溶液を添加した。プレートを振盪しながら室温で１時間インキュベートした。プレートをＰＢＳで３回洗浄した後、１５０μＬのＭＳＤリード緩衝液（界面活性剤非添加）を添加し、ＭＳＤプレートリーダーを使用して、ルテニウム標識した抗体の結合を検出した。

【０３０４】

全てのｍＡｂは同じ競合群に属する。但し、ＧＣ５Ｂ４２０及びＧＣ５Ｂ４２１は、ＧＣ５Ｂ８１、ＧＣ５Ｂ２８５、及び／又はＧＣ５Ｂ３３２とは完全には競合しなかった（阻害率７０％未満）（表１２）。ｍＡｂの大きさと比べてＧＰＲＣ５Ｄの細胞外ドメインの大きさが小さいことから、２つのｍＡｂがＧＰＲＣ５Ｄに対して同時に結合するのは立体的に不可能であるものと仮定される。

【０３０５】

【表１２】

表１２：抗ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂの競合的結合エピトープのビニング。ヒトＧＰＣＲ５Ｄ細胞に対するそれぞれの競合的結合について、抗ＧＰＲＣ５Ｄｍ Ａｂを評価した（±＝阻害率７０％未満）。

mAb ID	GC5B81	GC5B164	GC5B285	GC5B332	GC5B420	GC5B421
GC5B81	＋	＋	＋	＋	＋／－	＋／－
GC5B164	＋	＋	＋	＋	＋	＋
GC5B285	＋	＋	＋	＋	＋	＋／－
GC5B332	＋	＋	＋	＋	＋／－	＋
GC5B420	＋	＋	＋	＋	＋	＋
GC5B421	＋	＋	＋	＋	＋	＋
GC5B243	＋	＋	＋	＋	＋	＋

【０３０６】

実施例４：ハイブリドーマ法を用いたＧＰＲＣ５Ｄ抗体の生成

０、１０、及び２０日目に、完全長のヒトＧＰＲＣ５Ｄを発現しているｐＣＭＶ６－ｎｅｏ（ＣＭＶプロモータ）プラスミドＤＮＡにより、３匹のＢａｌｂ／ｃマウスを尾の付け根から経皮的に免疫した。最後に５９日目に、マウスには、完全長のヒトＧＰＲＣ５Ｄを過剰発現しているラット好塩基球性白血病（ＲＢＬ）細胞を腹腔及び静脈内注射し、免疫した。６３日目にリンパ節及び脾臓を摘出し、Ｂ細胞を濃縮し、この細胞を使用して、約３５００のｍＡｂを分泌するハイブリドーマを作成した。

【０３０７】

実施例５：ハイブリドーマ法により得られたＧＰＲＣ５Ｄ抗体の初回特性評価

ＧＰＲＣ５Ｄ結合

ＲＢＬ及びヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現ＲＢＬ細胞の両方に対する結合についてＦＡＣＳを使用してハイブリドーマをスクリーニングした。各ｍＡｂに関し、バックグラウンドについて調整した、ＧＰＲＣ５Ｄ＿ＲＢＬ細胞に対する結合についてのＭＦＩの、遺伝子導入していないＲＢＬ細胞に対する結合についてのＭＦＩに対する比を計算した。結合比３超の全てのサンプルは有望であるものとみなした。３超の比を有していた９９のハイブリドーマに対しｖ領域のクローニングを行った。３１のｍＡｂ配列を同定し、合成し、発現させ、精製した。３１のｍＡｂのうち２つはＲＢＬ＿ＧＰＲＣ５Ｄ細胞に対しバックグラウンドを超える結合を示した（図９Ａ及び８Ｂ）。発現、精製、及び抗ＣＤ３アームＣＤ３Ｂ２１９を有する二重特異性抗体の生成には、ＧＣＤＢ３９０及びＧＣＤＢ３９６を選択し、それぞれ二重特異性抗体ＧＣＤＢ４６及びＧＣＤＢ４７を生成した。

【０３０８】

Ｔ細胞依存性細胞傷害

Ｔ細胞介在性細胞傷害アッセイでＧＣＤＢ４６及びＧＣＤＢ４７を評価した（図１０Ａ及び図１０Ｂ）。いずれの二重特異性抗体も強力であることが観察され、それぞれEC_{50}は０．６７及び０．１ｎＭであったと報告された。これらのデータに基づいて、いずれのｍＡｂも３種類のファージに由来するｍＡｂによるリード最適化に進めた。

【０３０９】

実施例６：ヒット評価、選択、及び最適化

リード最適化のため、表１３に要約した結合、機能、交差反応性、及び選択性についてのデータに基づき５つのＧＰＲＣ５Ｄ二重特異性抗体（ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ４３、ＧＣＤＢ３５、ＧＣＤＢ４６、ＧＣＤＢ４７）を選択した。

【０３１０】

【表１３】

表１３：ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体のリード最適化データ。

二重特異性抗体を、結合、機能、交差反応性、及び選択性について評価した。

GPRC5D×CD3 ID	選択性	T細胞により介在される標的細胞の殺傷			
	GPRC5A、B、Cに対する結合	H929 EC50±SD（nM）	MM1R EC50±SD（nM）	H929 Fc非添加vs Fcブロック	カニクイザル GPRC5D EC50（nM）
GCDB32	結合せず	０．43±０．29	０．12±０．01	２．４	０．19
GCDB43	結合せず	０．39±０．07	０．54	２．８	０．95
GCDB40	結合せず	１．２±０．83	０．52±０．31	５．１	10．61
GCDB35	低	１．39±０．75	０．74±０．26	２．７	４．65
GCDB34	結合せず	２．01±０．74	０．77±０．09	６．３	１．14
GCDB45	結合せず	２．36±０．84	０．91±０．76	２．２	２．82
GCDB33	結合せず	５．21±１．21	０．８±０．15	１．５	０．２
GCDB36	低	５．57±０．47	４．22±０．29		３．35
GCDB46	結合せず	０．67			
GCDB47	結合せず	０．１			
GCDB48	結合せず	０．17			不活性

【０３１１】

表１４に説明するとおり、リード最適化は、ＧＣＤＢ３２（ＧＣ５Ｂ８１親ｍＡｂ）、ＧＣＤＢ４３（ＧＣ５Ｂ２８５親ｍＡｂ）及びＧＣＤＢ３５（ＧＣ５Ｂ１６４親ｍＡｂ）に可能性のある翻訳後修飾（ＰＴＭ）配列のリスクに対処することを目的とした。

【０３１２】

【表１４】

表１４：ファージに由来するヒットに関し可能性の高いＰＴＭ軽減配列。

ＰＴＭ配列である可能性の高いＨｃ　ＣＤＲ配列は下線を付して示す。

（掲載される各配列の配列番号は丸括弧内に表記する）

GPCR5D ID	GPRC5D Hc ID	Hc CDR1	Hc CDR2	HcCDR3
GC5B81	GC5H40	SYAIS（1）	GIIPIFGTANYAQKFQG（5）	ESRWRGYKLD（9）
GC5B285	GC5H14	NYWMS（2）	GISYSGGSKYYADSVKG（28）	AAWDFGRRAVRLDY（30）
GC5B164	GC5H36	SYWIG（27）	IIYPGDSDTRYSPSFQG（29）	VYSFGGRHKALFDY（11）

【０３１３】

ＧＣ５Ｂ８１についてアッセイした全てのＰＴＭ多様体は、結合親和性が実質的に低下しており、この残基（ＨＣ　Ｗ１０２）のパラトープに対する重要性を実証する（表１５）。

【０３１４】

【表１５】

表１５：ＧＣ５Ｂ８１　ＰＴＭライブラリのＣＤＲ配列及び結合データ。変異部分には下線を付す。結合は、次のとおりに分類した。ＭＦＩ＞１０，０００＝＋＋；ＭＦＩ＞１，０００＝＋；ＭＦＩ＜１，０００

（掲載される各配列の配列番号は丸括弧内に表記する）

GPRC5D ID	重鎖ID	変異	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	ヒトGPRC5D（FACS）
GC5B427	GC5H199	W102Y	SYAIS（1）	GIIPIFGTANYAQKFQG（5）	ESRYRGYKLDY（31）	－
GC5B428	GC5H198	W102V	SYAIS（1）	GIIPIFGTANYAQKFQG（5）	ESRVRGYKLDY（32）	－
GC5B430	GC5H196	W102G	SYAIS（1）	GIIPIFGTANYAQKFQG（5）	ESRGRGYKLDY（33）	－
GC5B431	GC5H195	W102A	SYAIS（1）	GIIPIFGTANYAQKFQG（5）	ESRARGYKLDY（34）	－
GC5B429	GC5H197	W102F	SYAIS（1）	GIIPIFGTANYAQKFQG（5）	ESRFRGYKLDY（35）	－

【０３１５】

結合試験により、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに対する結合を保持していたＧＣ５Ｂ２８５及びＧＣ５Ｂ１６４の両方について、変異の数を特定した（表１６及び１７）。

【０３１６】

【表１６－１】

表１６：ＧＣ５Ｂ１６４　ＰＴＭライブラリのＣＤＲ配列及び結合データ。変異部分には下線を付す。結合は、次のとおりに分類した。ＭＦＩ＞１０，０００＝＋＋；ＭＦＩ＞１，０００＝＋；ＭＦＩ＜１，０００（掲載される各配列の配列番号は丸括弧内に表記する）

GPRC5D ID	重鎖ID	変異	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR3	ヒトGPR5D結合（FACS）
GC5B471	GC5H278	D55A, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B472	GC5H277	D55A, W33V	SYVIG (37)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B473	GC5H276	D55A, W33F	SYFIG (3)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B474	GC5H275	D55A, W33G	SYGIG (38)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B475	GC5H274	D55A, W33A	SYAIG (39)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B476	GC5H273	D55S, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B477	GC5H272	D55S, W33V	SYVIG (37)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B478	GC5H271	D55S, W33F	SYFIG (3)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B479	GC5H270	D55S, W33G	SYGIG (38)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B480	GC5H269	D55S, W33A	SYAIG (39)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B481	GC5H268	D55K, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B482	GC5H267	D55K, W33V	SYVIG (37)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B483	GC5H266	D55K, W33F	SYFIG (3)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B484	GC5H265	D55K, W33G	SYGIG (38)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B485	GC5H264	D55K, W33A	SYAIG (39)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B486	GC5H263	D55E, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋

【０３１７】

【表１６－２】

（表１６の続き）

GPRC5D ID	重鎖ID	変異	HC CDR1	HC CDR2	HC CDR3	ヒトGPR5D結合（FACS）
GC5B487	GC5H262	D55E, W33V	SYVIG (37)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B488	GC5H261	D55E, W33F	SYFIG (3)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B489	GC5H260	D55E, W33G	SYGIG (38)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	－
GC5B490	GC5H259	D55E, W33A	SYAIG (39)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B491	GC5H258	D55Y, W33Y	SYYIG (36)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B492	GC5H257	D55Y, W33V	SYVIG (37)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B493	GC5H256	D55Y, W33F	SYFIG (3)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B494	GC5H255	D55Y, W33G	SYGIG (38)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B495	GC5H254	D55Y, W33A	SYAIG (39)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋
GC5B496	GC5H253	W33Y	SYYIG (36)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B497	GC5H252	W33V	SYVIG (37)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B498	GC5H251	W33F	SYFIG (3)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B499	GC5H250	W33G	SYGIG (38)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	－
GC5B500	GC5H249	W33A	SYAIG (39)	IIYPGDSDTRYSPSFQG (29)	VYSFGGRHKALFDY (11)	－
GC5B501	GC5H248	D55A	SYWIG (27)	IIYPGASDTRYSPSFQG (40)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B502	GC5H247	D55S	SYWIG (27)	IIYPGSSDTRYSPSFQG (41)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B503	GC5H246	D55K	SYWIG (27)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (7)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B504	GC5H245	D55E	SYWIG (27)	IIYPGESDTRYSPSFQG (42)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋
GC5B505	GC5H244	D55Y	SYWIG (27)	IIYPGYSDTRYSPSFQG (43)	VYSFGGRHKALFDY (11)	＋＋

【０３１８】

【表１７－１】

表１７：ＧＣ５Ｂ２８５　ＰＴＭライブラリのＣＤＲ配列及び結合データ。変異部分には下線を付す。結合は、次のとおりに分類した。ＭＦＩ＞１０，０００＝＋＋；ＭＦＩ＞１，０００＝＋；ＭＦＩ＜１，０００（掲載される各配列の配列番号は丸括弧内に表記する）

GPRC5D ID	重鎖ID	変異	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	ヒトGPRC5D (FACS)
GC5B463	GC5H234	D62A, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAASVKG (44)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	＋＋
GC5B432	GC5H228	D62S, W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	＋＋
GC5B465	GC5H227	D62S, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	＋＋
GC5B433	GC5H223	D62K, W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	＋＋
GC5B434	GC5H222	D62K, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	＋＋
GC5B435	GC5H219	D62E, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	＋
GC5B436	GC5H217	D62E, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	＋
GC5B461	GC5H216	D62E, W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAGDFGRRAVRLDY (50)	－
GC5B462	GC5H215	D62E, W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAADFGRRAVRLDY (51)	＋＋
GC5B437	GC5H214	D62Y, W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	＋
GC5B438	GC5H213	D62Y, W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	＋
GC5B439	GC5H212	D62Y, W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	＋
GC5B440	GC5H211	D62Y, W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAGDFGRRAVRLDY (50)	－
GC5B441	GC5H210	D62Y, W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAADFGRRAVRLDY (51)	＋

【０３１９】

【表１７－２】

（表１７の続き）

GPRC5D ID	重鎖ID	変異	Hc CDR1	Hc CDR2	Hc CDR3	ヒトGPRC5D (FACS)
GC5B442	GC5H209	W101Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAYDFGRRAVRLDY (48)	＋
GC5B443	GC5H208	W101V	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAVDFGRRAVRLDY (49)	＋
GC5B444	GC5H207	W101F	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAFDFGRRAVRLDY (97)	＋
GC5B464	GC5H206	W101G	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAGDFGRRAVRLDY (50)	＋
GC5B445	GC5H205	W101A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYADSVKG (28)	AAADFGRRAVRLDY (51)	＋
GC5B446	GC5H204	D62A	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAASVKG (44)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	＋
GC5B447	GC5H203	D62S	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYASSVKG (6)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	＋
GC5B448	GC5H202	D62K	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAKSVKG (45)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	＋
GC5B449	GC5H201	D62E	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAESVKG (46)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	＋
GC5B450	GC5H200	D62Y	NYWMS (2)	GISYSGGSKYYAYSVKG (47)	AAWDFGRRAVRLDY (30)	＋

【０３２０】

この結合データに基づいて、選択されたｍＡｂｓをＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体として生成し、Ｈ９２９細胞のＴ細胞介在性細胞傷害について評価した（表１８）。

【０３２１】
【表１８】
表１８：ＧＣＤＢ１６４及びＧＣＤＢ２８５について選択されたＧＰＲＣ５ＤＰＴＭ多様体の機能活性

親GPRC5D mAb ID	GPRC5Dタンパク質 AA ID	GPRC5D×CD3 ID	H929 EC_{50}(nM)	リードとして選択
GC5B285	GC5B432	GCDB50	1.3	
	GC5B433	GCDB51	0.81	
	GC5B434	GCDB52	2.81	
	GC5B465	GCDB53	0.24	XX
	GC5B463	GCDB54	3.09	
GC5B164	GC5B471	GCDB57	3.87	
	GC5B476	GCDB58	1.24	
	GC5B478	GCDB59	1.54	
	GC5B481	GCDB60	2.94	
	GC5B483	GCDB61	1.51	XX
	GC5B493	GCDB62	3.1	

【０３２２】
Ｔ細胞介在性細胞傷害アッセイにおいて観察された力価の範囲は、観察された結合親和性によって必ずしも予測されるものではなかった。例えば、同様の親和性でヒトＧＰＲＣ５Ｄに結合したＧＣ５Ｂ４６５及びＧＣ５Ｂ４６３は、配列中２つのアミノ酸配列のみ（表１７）が異なり、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂとして、力価において１２．５倍の差を有することが観察された（表１８）。機能データに基づき、ＧＣ５Ｂ４６５及びＧＣ５Ｂ４８３を、ＧＣ５Ｂ２８５（ＣＤ３二重特異性なものとしてＧＣＤＢ４３）及びＧＣ５Ｂ１６４（ＣＤ３二重特異性なものとしてＧＣＤＢ３５）について最適化された配列として選択した。
【０３２３】
また、このマウスハイブリドーマ由来ＧＰＣＲ５Ｄ　ｍＡｂについて、ヒトフレームワークの適合も完了した（それぞれＣＤ３二重特異性なものとしてＧＣ５Ｂ３９０及びＧＣ５Ｂ３９６、又はＧＣＤＢ４６及び４７）。結合試験により、ＧＣ５Ｂ３９６用の多数のフレームワークと、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに対する結合を保持したＧＣ５Ｂ３９０用のフレームワークとを特定した（表１９）。
【０３２４】

【表１９】

表１９：抗ＧＰＲＣ５ＤｍＡｂライブラリに由来するハイブリドーマのヒトフレームワーク適合についての結合及び機能データ。結合は、次のとおりに分類した。ＭＦＩ＞１０，０００＝＋＋＋；ＭＦＩ＞５，０００＝＋＋；ＭＦＩ＞１，０００＝＋；ＭＦＩ＜１０００。

GPRC5D 親mAb ID	GPRC5D mAb AA ID	重鎖ID	軽鎖ID	ヒトGPRC5D (FACS)	GPRC5D× CD3 ID	H929 EC50 (nM)
GPRC5D B396	GC5B541	GC5H241	GC5L58	＋		
	GC5B540	GC5H240	GC5L58	＋＋＋	GCDB69	0.58
	GC5B539	GC5H242	GC5L58	＋＋		
	GC5B538	GC5H243	GC5L58	＋＋		
	GC5B537	GC5H241	GC5L57	＋		
	GC5B536	GC5H240	GC5L57	＋＋＋	GCDB68	2.51
	GC5B535	GC5H242	GC5L57	＋		
	GC5B534	GC5H243	GC5L57	＋＋		
	GC5B533	GC5H241	GC5L56	＋		
	GC5B532	GC5H240	GC5L56	＋＋＋	GCDB67	0.61
	GC5B531	GC5H242	GC5L56	＋＋		
	GC5B530	GC5H243	GC5L56	＋＋＋	GCDB66	1.41
	GC5B529	GC5H241	GC5L55	＋＋		
	GC5B528	GC5H240	GC5L55	＋＋＋	GCDB65	1.01
	GC5B527	GC5H242	GC5L55	－		
	GC5B526	GC5H243	GC5L55	＋＋	GCDB64	1.5
GPRC5D B390	GC5B525	GC5H279	GC5L53	－		
	GC5B524	GC5H237	GC5L53	－		
	GC5B523	GC5H238	GC5L53	－		
	GC5B522	GC5H236	GC5L53	－		
	GC5B521	GC5H279	GC5L52	－		
	GC5B520	GC5H237	GC5L52	－		
	GC5B519	GC5H238	GC5L52	－		
	GC5B518	GC5H236	GC5L52	－		
	GC5B517	GC5H279	GC5L51	＋		
	GC5B516	GC5H237	GC5L51	＋		
	GC5B515	GC5H238	GC5L51	＋＋	GCDB63	0.52
	GC5B514	GC5H236	GC5L51	＋		
	GC5B513	GC5H279	GC5L50	－		
	GC5B512	GC5H237	GC5L50	＋		
	GC5B511	GC5H238	GC5L50	＋		
	GC5B510	GC5H236	GC5L50	＋		
	GC5B509	GC5H279	GC5L49	－		
	GC5B508	GC5H237	GC5L49	＋		
	GC5B507	GC5H238	GC5L49	＋		
	GC5B506	GC5H236	GC5L49	＋		

【０３２５】

結合データに基づいて、ＣＤ３二重特異性抗体としていくつかの抗ＧＰＣＲ５Ｄ　ｍＡｂを生成し、Ｈ９２９細胞のＴ細胞介在性細胞傷害について評価した（表１８）。機能解析により、ＧＣＤＢ６３、ＧＣＤＢ６７、及びＧＣＤＢ６９を強力な完全ヒト化ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体として同定した。これらのデータに基づいて、対応する抗ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂの、ＧＣ５Ｂ５１５、ＧＣ５Ｂ５３２、及びＧＣ５Ｂ５４０を、ＧＣ５Ｂ３９０及びＧＣ５Ｂ３９１の完全なヒト化配列として選択する。

【０３２６】

ＧＣ５Ｂ５１５、ＧＣ５Ｂ５３２、及びＧＣＤＢ５４０の潜在的な翻訳後修飾による配

列リスクに対処することを目的として、完全ヒト化配列の更なるリード最適化を完了した。重鎖配列にＧ５６Ｓ変異を生じさせて、ＧＣ５Ｂ５１５に潜在的な脱アミドリスクを除く（表２０）。

【０３２７】

【表２０】

表２０：選択されたＧＰＲＣ５Ｄ　ＰＴＭ多様体のＧＣ５Ｂ５３２、ＧＣ５Ｂ５４０及びＧＣＤＢ５１５に対する結合及び機能活性。

GPRC5D 親mAb ID	GPRC5D mAb AA ID	変異	ヒトGPRC5D (FACS)	GPRC5D× CD3 ID	H929 EC50 (nM)
GC5B540	GC5B590	M64K	＋＋＋		
	GC5B592	G99A	＋		
	GC5B594	M64K, G99A	＋		
GC5 B532	GC5B591	M64K	＋＋＋		
	GC5B593	G99A	＋		
	GC5B595	M64K, G99A	＋		
GC5 B515	GC5B596	G56S	＋＋	GCDB72	0.15

【０３２８】

ＧＣ５Ｂ５３２及びＧＣ５Ｂ５４０の重鎖は、潜在的な異性化リスク及び酸化リスクの両方を含有する。このリスクを改善するようＭ６４Ｋ及びＧ９９Ａの変異を作成した（表２０）。試験した多様体のうち、Ｇ９９Ａ変異を有するものは全て結合親和性が大幅に低下していたのに対し、Ｍ６４Ｋ及びＧ５６Ａ多様体は影響を受けなかった。結合データに基づき、ＧＣ５Ｂ５９６のみを機能評価に進め、Ｔ細胞介在性細胞傷害アッセイにおいて、ＣＤ３二重特異性（ＧＣＤＢ７２）なものとして力価を実証した。

【０３２９】

したがって、更なる特性評価には、４つのＧＰＲＣ５Ｄ二重特異性ｍＡｂを選択した：ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ５３、ＧＣＤＢ６１、及びＧＣＤＢ７２。以下、表２１及び２２には、二重特異性分子の生成に使用したＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂのＣＤＲ配列と、重鎖及び軽鎖配列とを示す。

【０３３０】

【表２１】

表２１．ＣＤ３二重特異性に生成されたときに、ヒト及びカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに対する結合を示し、かつ機能を有する、４つのＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂ候補のＣＤＲ配列。

ID	HC−CDR1	HC−CDR2	HC−CDR3	LC−CDR1	LC−CDR2	LC−CDR3
GC5B81	SYAIS (配列番号1)	GIIPIFGTANYAQKFQG (配列番号5)	ESRWRGYKLD (配列番号9)	RASQSISSYLN (配列番号13)	AASSLQS (配列番号16)	QQSYSTPLT (配列番号19)
GC5B465	NYWMS (配列番号2)	GISYSGGSKYYASSVKG (配列番号6)	AAFDFGRRAVRLD (配列番号10)	RASQSISSYLN (配列番号13)	AASSLQS (配列番号16)	QQSYSTPLT (配列番号19)
GC5B483	SYFIG (配列番号3)	IIYPGKSDTRYSPSFQG (配列番号7)	VYSFGGRHKALFDY (配列番号11)	RASQSVSSYLA (配列番号14)	DASNRAT (配列番号17)	QQRSNWPLT (配列番号20)
GC5B596	GYTMN (配列番号4)	LINPYNSDTNYAQKLQG (配列番号8)	vALRVALDY (配列番号12)	KASQNVATHVG (配列番号15)	SASYRYS (配列番号18)	QQYNRYPYT (配列番号21)

【０３３１】

【表２２】

表２２：ＣＤ３二重特異性に生成されたときに、ヒト及びカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに対する結合を示し、かつ機能を有する、４つのＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂ候補の重鎖及び軽鎖可変領域の配列。

mAb AA ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
GC5B81	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARESRWRGYKLDYWGQGTLVTVSS	52	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	56
GC5B465	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAFDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS	53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	56
GC5B483	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGKSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS	54	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK	57
GC5B596	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLVTVSS	55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK	58

【０３３２】

実施例７：ＩｇＧ４　Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａの二重特異性フォーマットにおけるＧＰＲＣ５Ｄ及びＣＤ３抗体の調製

４つの単一特異的ＧＰＲＣ５Ｄ抗体（表２１を参照のこと）を、Ｆｃ置換Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、及びＬ２３５Ａ、又はＳ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｆ４０５Ｌ、及びＲ４０９Ｋ（ＣＤ３アーム）（ＥＵインデックスに従ったナンバリング）を有するＩｇＧ４として発現させた。配列番号２５の重鎖及び配列番号２６の軽鎖を有するＶＨ及びＶＬ領域と、Ｓ２２８Ｐ、Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｆ４０５Ｌ、及びＲ４０９Ｋ置換を有するＩｇＧ４定常領域とを含む単一特異的抗ＣＤ３抗体ＣＤ３Ｂ２１９も生成した。

【０３３３】

プロテインＡカラム（ＨｉＴｒａｐ　ＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅカラム）を使用する標準的な方法を使用して、単一特異的抗体を精製した。溶出後、プールを、Ｄ－ＰＢＳ、ｐＨ７．２の中に透析した。

【０３３４】

二重特異性ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体を、（国際公開第２０１１／１３１７４６号に記載されたような）インビトロでのＦａｂアーム交換において、単一特異的ＣＤ３　ｍＡｂと単一特異的ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂとを組み合わせることにより生成した。簡潔に、ＰＢＳ、ｐＨ７～７．４中の約１～２０ｍｇ／ｍＬの抗ＧＰＲＣ５Ｄ／抗ＣＤ３抗体（モル比１．０８：１）と、７５ｍＭの２－メルカプトエタノールアミン（２－ＭＥＡ）とを互いに混合し、２５～３７℃において２～６時間インキュベートし、続けて、透析、透析ろ過、接線流ろ過、及び／又はスピン細胞ろ過により標準的な方法を使用して２－ＭＥＡを除

去した。

【０３３５】

ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性Ａｂの重鎖及び軽鎖を以下の表２３に示す。

【０３３６】

【表２３】

表２３．二重特異性Ａｂ　ＩｇＧ４－ＰＡＡの重鎖及び軽鎖配列

Ab		アミノ酸配列
GCDB32	重鎖1 CD3B219 （配列番号25）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	軽鎖1 CD3B219 （配列番号26）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重鎖2 GC5B81 （配列番号52）	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARESRWRGYKLDYWGQGTLVTVSS
	軽鎖2 GC5B81 （配列番号56）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIK
GCDB53	重鎖1 CD3B219 （配列番号25）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	軽鎖1 CD3B219 （配列番号26）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重鎖2 GC5B465 （配列番号53）	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKG LEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKAAFDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS
	軽鎖2 GC5B465 （配列番号56）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPK LLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQS YSTPLTFGQGTKVEIK
GCDB61	重鎖1 CD3B219 （配列番号25）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	軽鎖1 CD3B219 （配列番号26）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重鎖2 GC5B483 （配列番号54）	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGKSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS
	軽鎖2 GC5B483 （配列番号57）	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRS NWPLTFGQGTKVEIK
GCDB72	重鎖1 CD3B219 （配列番号25）	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
	軽鎖1 CD3B219 （配列番号26）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA PRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVL
	重鎖2 GC5B596 （配列番号55）	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQ GLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLVTVSS
	軽鎖2 GC5B596 （配列番号58）	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPK RLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQY NRYPYTFGQGTKLEIK

【０３３７】

実施例８：ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ５３、ＧＣＤＢ６１、及びＧＣＤＢ７２の機能の特性評価

ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ５３、ＧＣＤＢ６１、及びＧＣＤＢ７２をマウスＧＰＲＣ５Ｄに対する結合について評価した（表２４）。観察された結合親和性の範囲では、４つの二

重特異性抗体の全てが、マウスＧＰＲＣ５Ｄに対し結合していた。

【０３３８】

【表２４】

表２４：抗ＧＰＣＲ５Ｄ×ＣＤ３抗体のマウスＧＰＲＣ５Ｄに対する結合。

GPRC5D×CD3 ID	マウスGPRC5D FACS結合（MFI）
GCDB32	1151
GCDB53	2658
GCDB61	3552
GCDB72	481

【０３３９】

ヒト及びカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄを過剰発現させた細胞株にＴ細胞再指向による細胞傷害アッセイを行い、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄとの交差反応性も評価した（表２５）。ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体は、ヒト及びカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ（ＧＣＤＢ３２）に対し等しい効力を有していたのに対し、試験した他の二重特異性抗体は、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄに対し誘導される細胞傷害性の効力が、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに対する場合よりも劣っていた。

【０３４０】

【表２５】

表２５：ヒト及びカニクイザルＧＰＲＣ５Ｄ発現ＨＥＫ細胞に対するリードＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体の機能活性。

GPRC5D×CD3 ID	ヒトGPRC5D HEK細胞（EC_{50} nM）	カニクイザルGPRC5D HEK細胞（EC_{50} nM）
GCDB32	0.04	0.07
GCDB53	0.08	0.36
GCDB61	0.03	1.22
GCDB72	0.03	3.41

【０３４１】

追加の特性評価は、インビトロでの結合（図１１Ａ～図１１Ｅ）と力価（表２６）とを明らかにすることを目的とした。

【０３４２】

【表２６】

表２６：リードＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３抗体による、いくつかのヒトＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞株のＴ細胞介在性細胞傷害。

GPRC5D×CD3 ID	H929細胞 EC_{50}（nM）（順位）	MM1R EC_{50}nM（順位）	OPM2 EC_{50}nM（順位）	LP－1 EC_{50}nM（順位）
GCDB32	0.45(3)	0.04(1)	0.98(2)	1.02(2)
GCDB53	0.69(4)	0.28(4)	2.83(4)	1.58(3)
GCDB61	0.39(2)	0.06(3)	1.46(3)	1.67(4)
GCDB72	0.22(1)	0.04(1)	0.77(1)	0.7(1)

【０３４３】

ＧＣＤＢ６１は結合が最も強く、ＧＣＤＢ７２及びＧＣＤＢ３２は結合が最も弱いという結合親和性範囲が観察されたものの、二重特異性抗体のパネルで、インビトロでの効力は非常に似通っていた。しかし、順位の解析に基づくと、解析した多様なＢ細胞株の中で、ＧＣＤＢ７２の効力が最も高かった。患者から誘導されたＭＮＣを使用したエクスビボ結合及び力価試験でもインビトロアッセイと非常に似通った結果が得られた（表２７並びに図１５Ａ及び図１５Ｂ）。

【０３４４】
【表２７】
表２７．ＧＰＣＲ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の結合、Ｔ細胞介在性細胞傷害、及びＭＭ患者より誘導されたＭＮＣのＴ細胞活性化。

患者	GPRC5D×CD3 AA ID	結合EC_{50} nM	細胞傷害性EC_{50} nM	T細胞活性化EC_{50} nM
MM303BM	GCDB32	16.1	0.36	0.18
	GCDB53	3.98	0.42	0.17
	GCDB61	5.53	0.89	0.22
	GCDB72	27.5	0.30	0.12
MM305BM	GCDB32	70.4	0.26	0.16
	GCDB53	10.2	0.26	0.19
	GCDB61	6.93	0.6	0.22
	GCDB72	65.9	0.28	0.12

【０３４５】
患者ＭＮＣに対する結合親和性は、ＧＣＤＢ６１が最も高かったのに対し、ＧＣＤＢ７２及びＧＣＤＢ３２は最も弱い結合分子であった。再度、結合親和性において差が観察されたものの、全ての二重特異性抗体は、Ｔ細胞の再指向による細胞傷害アッセイにおいて、ナノモル濃度未満（sub-nanomolar）で活性を示した。分子は、インビトロ及びエクス
ビボでの力価については実質的に識別不能であった。しかしながら、インビボのデータでは差が示された（図１２Ａ～図１２Ｄ）。
【０３４６】
Ｈ９２９細胞をＮＳＧマウスに移植して一週間後に、ヒトＰＢＭＣを注入した。この二重特異性抗体の処置は、Ｈ９２９細胞を移植すると同時に開始し、用量１０μｇ、１μｇ、及び０．１μｇ／個体で２又は３日おき（ｑ２ｄ又はｑ３ｄ）に、合計５つの処置群で継続した。各群１０匹のマウスを使用し、溶媒対照としてはＰＢＳを含めた。１１日目に処置を停止し、２６日目に試験を終了した（図１２Ａ～Ｄ）。この予防的モデルで試験したＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性分子は、全て、用量１０及び１μｇ／個体で１００％の腫瘍成長阻害を示した。最も低い用量の０．１μｇ／個体で差が観察され、ＧＣＤＢ７２は８０％の腫瘍成長阻害率が観察されたことから、試験した他の二重特異性抗体よりも優れていることが実証された。
【０３４７】
実施例９：ＧＰＲＣ５Ｄ＋ＭＭ１．Ｒ細胞株に対するＧＰＲＣ５Ｄ抗体結合プロファイル
ＦＡＣＳを使用して、ＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$ヒトＭＭ細胞株（ＭＭ１．Ｒ、ＡＴＣＣ（アメリカ培養細胞系統保存機関）から購入）に対するＧＰＲＣ５Ｄ抗体の結合親和性を測定した。図１３は、全てのリード抗体が、ＧＰＲＣ５Ｄを発現しているＭＭ．１Ｒ細胞に、０．１０ｎＭ～１３５ｎｍの範囲のEC_{50}値で、用量依存的な様式で結合したことを示す。ＧＣ５Ｂ６０２以外の抗体は全て、EC_{50}値が１２１．７ｎＭであった市販の抗体ＦＡＢ６３００（Ｒ＆ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓカタログ番号ＦＡＢ６３００Ａ、クローン番号５７１９６１）と比較して有意に値が低かった。
【０３４８】
様々な濃度のリード抗体でＧＰＲＣ５Ｄ＋ＭＭ１．Ｒ細胞株を６０分間染色し、表面結合プロファイルを測定した（ｎ＝３）。フィコエリトリン標識したヒトＩｇＧ４Ｆｃ（Ｓｏｕｔｈｅｒｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ，ＨＰ６０２５クローン，カタログ番号９２００－０９）を、シグナルを捕捉する二次抗体として使用した。結合は、ＦＡＣＳにより求められた、正規化された幾何平均蛍光強度として表される。データのグラフ化及びフィッティングは、勾配が可変の非線形回帰（４パラメータ）及び最小二乗法を使用して、ＧｒａｐｈＰ

ａｄ　Ｐｒｉｓｍ　６で実施した。

【０３４９】

更に、ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂ　ＧＣ５Ｍ４８１結合プロファイルを、３種類のＧＰＲＣ５Ｄ$^{+}$多発性骨髄腫細胞株（ＪＩＭ３、ＯＰＭ－２、及びＭＭ．１Ｒ；ＡＴＣＣから購入した細胞株）を使用して、市販の抗体と比較して評価した（図１４Ａ）。更に、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄを発現するＤａｕｄｉ細胞を使用して、カニクイザルとの交差反応性についてＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂ（ＧＣ５Ｍ４８１）を評価したところ、親細胞と比較して強い結合が示された（図１４Ａ）。また、ＧＰＲＣ５Ｄ＋（ＪＩＭ３，ＯＰＭ－２、及びＭＭ１．Ｒ）細胞株（図１４Ｂ）を使用して結合ポテンシャルについて評価したときに、５つのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体（ＧＣＤＢ３２、ＧＣＤＢ４８、ＧＣＤＢ５３、ＧＣＤＢ６１、及びＧＣＤＢ７２）は、アイソタイプ対照（点線で灰色に塗られた波形）と比較してヒストグラム（黒い実線の波形）がシフトしていることから明らかなとおり、有意に結合を示した。

【０３５０】

実施例１０：ＰＢＭＣヒト化ＮＳＧマウスにおけるＭＭ．１Ｓヒト多発性骨髄腫の皮下異種移植に対するＧＣＤＢ７２の抗腫瘍活性。

ＰＢＭＣヒト化ＮＳＧマウスにおいて、確立されたＭＭ．１Ｓヒト多発性骨髄腫（ＭＭ）異種移植に対するＧＣＤＢ７２の活性を確認するため、当該インビボ試験を実施した。試験０日目に、体重及び齢が同様の雌性ＮＳＧマウスの背面後方右側腹部に、ＭＭ．１ＳヒトＭＭ細胞（１×１０^{7}個／２００μＬのＰＢＳ／個体）を皮下（ｓｃ）移植した。腫瘍細胞の移植から７日後に、側面尾静脈から１×１０^{7}個のヒトＰＢＭＣ（２００μＬのＰＢＳ中）を静脈内投与した。１５日目に平均腫瘍体積が約７２～７８ｍｍ^{3}になっていた場合に、処置を開始した。各マウスには、０．１μｇ（０．００５ｍｇ／ｋｇ）、１μｇ（０．０５ｍｇ／ｋｇ）、１０μｇ（０．５ｍｇ／ｋｇ）、及び５０μｇ（２．５ｍｇ／ｋｇ）でＰＢＳ又はＧＣＤＢ７２　ＤｕｏＢｏｄｙ抗体を静脈内（ｉｖ）投与する。Ｎｕｌｌ　ＤｕｏＢｏｄｙ対照、ＣＤ３×Ｎｕｌｌ及びＮｕｌｌ×ＧＰＲＣ５Ｄをそれぞれ１０μｇ／個体で投与した。約３日おき（ｑ３ｄ）に合計７回用量の処置剤を投与した。２とおりの高用量（１０μｇ及び５０μｇ）のＧＣＤＢ７２で強い抗腫瘍活性が観察された。これらの場合、ＭＭ．１Ｓ　ｓｃ腫瘍は試験終了時に１００％のマウス（１群あたり１０／１０）で完全に消失していた（図１６）。また、個体あたり１μｇの用量では、腫瘍の成長はＰＢＳ処置した腫瘍と比較して有意に６５％（ｐ≦０．０００１）も阻害されたのに対し、用量０．１μｇではその効果は小さかった（ＴＧＩ＝１９．３％，ｐ＝０．００２３）。ＣＤ３×Ｎｕｌｌの効果は有効であるとは考えられず（ＴＧＩ＝２８％，ｐ≦０．０００１）、並びにＮｕｌｌ×ＧＰＲＣ５Ｄの有する効果は、３．１％のＴＧＩ，ｐ＝０．９９７１という無視できるものであった。３６日目に、１群あたり少なくとも８０％が生存個体である場合にＴＧＩを確認した。有意な体重減少及び／又は死亡は、３６日以降にＧＶＨＤによって顕著になりはじめた（図１７）。４３日目には、生存しているマウスは各群６０％以下となっており、試験を終了した。

【０３５１】

例１１：ＧＰＲＣ５Ｄ抗体の抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ＡＤＣＣ）

ＩｇＧ１　ｍＡｂ同様抗ヒトＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂのパネルを作成した。更に、実施例２に記載のとおり、新規抗ヒトＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂパネルを作成した。以下、表２８及び表２９には、新規ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂのＣＤＲ配列と、重鎖及び軽鎖可変領域の配列とを示す。これらの新規抗体を使用して、実施例７に記載のとおり二重特異性ＣＤ３分子を作成し、ＡＤＣＣ活性評価にもＩｇＧ１　ｍＡｂとして組み入れた。

【０３５２】

【表２８】

表２８．ＧＰＲＣ５Ｄ抗体の新規パネルのＣＤＲ配列

ID	HC－CDR1	HC－CDR2	HC－CDR3	LC－CDR1	LC－CDR2	LC－CDR3
GC5B382	DYGMH （配列番号61）	AIKYSGGSTYYADSVKG （配列番号67）	RAESGPGLDY （配列番号72）	KSSQSVLYSSNNKNYLA （配列番号98）	WASTRES （配列番号78）	QQYYSTPLT （配列番号80）
GC5B379	NYWMS （配列番号2）	GISYSGGSKYYADSVKG （配列番号28）	AAWDFGRRAVRLDY （配列番号30）	RASQSISSYLN （配列番号13）	AASSLQS （配列番号16）	QQSYSTPLT （配列番号19）
GC5B373	SYWIG （配列番号27）	IIYPGDSDTRYSPSFQG （配列番号29）	IGFYGRSFRIFDY （配列番号73）	RASQSVSSYLA （配列番号14）	DASNRAT （配列番号17）	QQRSNWPLT （配列番号20）
GC5B376	SYWIG （配列番号27）	IIYPGDSDTRYSPSFQG （配列番号29）	VYSFGGRHKALFDY （配列番号11）	RASQSVSSYLA （配列番号14）	DASNRAT （配列番号17）	QQRSNWPLT （配列番号20）
GC5B385	GYAMS （配列番号62）	AISGSGGSTYYADSVKG （配列番号68）	VDRSFGRSRYTLDY （配列番号74）	RASQSVSSYLA （配列番号14）	DASNRAT （配列番号17）	QQRSNWPLT 配列番号20
GC5B370 GC5B597	SYGIS （配列番号63）	GIIPIFGNINYAQKFQG （配列番号69）	VSRRFKRFAYYFDY （配列番号75）	KSSQSVLYSSNNKNYLA （配列番号98）	WASTRES （配列番号78）	QQYYSTPLT （配列番号80）
GC5B602	GYSFTGYTMN （配列番号64）	LINPYNGDTN （配列番号70）	VALRVALDY （配列番号12）	KASQNVATHVG （配列番号15）	SASYRYS （配列番号18）	QQYNRYPYT （配列番号21）
GC5B603	SYAMS （配列番号65）	AISGSGGSTYYADSVKG （配列番号68）	SNFLPVVFDY （配列番号76）	RASQSVRKSLA （配列番号95）	TASNRAT （配列番号79）	QQYFRAPIT （配列番号81）
GC5B601	GFSLTSYNVH （配列番号66）	VIWAGGSTNYNSALMS （配列番号71）	DGIRLRFAY （配列番号77）	KASQNVATHVG （配列番号15）	SASYRYS （配列番号18）	QQYNRYPYT （配列番号21）

【０３５３】

【表２９】

表２９．ＧＰＲＣ５Ｄ抗体の新規パネルの重鎖及び軽鎖可変領域の配列

mAb AA ID	VHアミノ酸配列	配列番号	VLアミノ酸配列	配列番号
GC5B382	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPGLDYWGQGTLVTVSS	82	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	92
GC5B379	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS	83	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK	56
GC5B373	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARIGFYGRSFRIFDYWGQGTLVTVSS	84	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK	57
GC5B376	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS	85	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK	57
GC5B385	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDRSFGRSRYTLDYWGQGTLVTVSS	86	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK	57
GC5B370 GC5B597	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGNINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVSRRFKRFAYYFDYWGQGTLVTVSS	87	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEIK	92
GC5B602	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLVTVSS	88	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK	58
GC5B603	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSNFLPVVFDYWGQGTLVTVSS	89	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYTASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQYFRAPITFGQGTKVEIKK	93
GC5B601	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTSYNVHWIRQPPGKALEWLAVIWAGGSTNYNSALMSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMRAEDTATYYCARDGIRLRFAYWGQGTLVTVSS	91	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVATHVGWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK	94

【０３５４】

Ｈ９２９細胞に対するＡＤＣＣ活性（表３０及び表３１）簡潔に、多発性骨髄腫細胞をカルセインーＡＭで室温で３０分間標識し、２回ＰＢＳで洗浄した後、０．２×１０^{6}個／ｍＬでＲＰＭＩ＋１０％のＨＩ　ＦＢＳに再懸濁した。ＰＢＭＣを解凍し、ＰＢＳで洗浄した後、３×１０^{6}個／ｍＬでＲＰＭＩ増殖培地に再懸濁した。抗体の存在下で１００００又は５００００個の標的細胞を１０００００又は２５０００００個のＰＢＭＣと混合し、３７℃のＣＯ２インキュベーターで３時間インキュベートした。インキュベートプレートを２００ｇで４分間遠心分離した後、１００μＬの上清を新しい９６ウェルプレートに移し、４８５／５３５ｎＭで蛍光強度を測定した。ＲＦＵ値をプロットして、溶解率を

計算した。

【０３５５】

【表３０】

表３０：ＩｇＧ１　Ｆｃを有する抗ＧＰＲＣ５Ｄ　ｍＡｂによるＨ９２９細胞の抗体依存性細胞傷害

GPRC5D IgG4 タンパク質ID	GPRC5D IgG1 タンパク質ID	H929細胞傷害性 EC_{50}(pM)	溶解率(%)
GC5B243	GC5B382	1346.5	29.14
GC5B285	GC5B379	87.4	17.3
GC5B332	GC5B373	244.2	32.94
GC5B164	GC5B376	22.0	32.21
GC5B320	GC5B385	944.0	29.73
GC5B251	GC5B370	24.2	8
GC5B515	GC5B602	27721.7	20
GC5B420	GC5B603	3.4	16
GC5B483	GC5B599	7.4	14
GC5B540	GC5B601	169.6	14
GC5B465	GC5B598	2.0	12
GC5B251	GC5B597	705.1	10

【０３５６】

【表３１】

表３１：Ｈ９２９細胞の抗体依存性細胞傷害及びＴ細胞介在性細胞傷害の比較

		ADCC	CD3再指向
GPRC5D IgG1 タンパク質ID	GPRC5D×CD3 DuoBody ID	H929細胞傷害 EC50(pM)	T細胞介在性H929 細胞傷害EC50(nM)
GC5B382	GCDB40	1346.5	1.2±0.83
GC5B379	GCDB43	87.4	0.39±0.07
GC5B373	GCDB45	244.2	2.36±0.84
GC5B376	GCDB35	22.0	1.39±0.75
GC5B385	GCDB44	944.0	＞10
GC5B370	GCDB41	24.2	＞10
GC5B602	GCDB72	27721.7	0.15
GC5B603	GCDB48	3.4	0.17
GC5B599	GCDB61	7.4	1.51
GC5B601	GCDB69	169.6	0.58
GC5B598	GCDB53	2.0	0.24

【０３５７】

２ｐＭ～２７．７ｎＭの範囲で力価範囲を観察した。結合親和性は、ＡＤＣＣアッセイにおける活性を必ずしも予測するものではなかった。例えば、ＧＣ５Ｂ３８２及びＧＣ５Ｂ３７９はヒトＧＰＲＣ５Ｄ細胞に対して同様の結合親和性を有していたものの、ＡＤＣＣアッセイにおけるＨ９２９細胞に対する細胞傷害については１５倍の差があった。同様に、ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体の細胞傷害誘導は、ＡＤＣＣアッセイにおいてＧＣ５Ｂ３７０及びＧＣ５Ｂ６０２により示される力価の予測因子とはならなかった。ＣＤ３二重特異性なものとしてフォーマットした場合、ＧＣ５Ｂ６０２（ＧＣＤＢ６３）は、ナノモル未満の濃度でＨ９２９細胞に対する力価を有していたのに対し、ＣＤ３二重特異性なＧＣ５Ｂ３７０（ＧＣＤＢ４１）は本質的に不活性であった。ＩｇＧ１　ｍＡｂとしてフォーマットした場合、ＡＤＣＣアッセイにおいて、同じＶ領域により正反対の観察結果が得られ、ＧＣ５Ｂ３７０はＧＣ５Ｂ６０２よりも強力である（約１１００倍）こと

が観察された。

【０３５８】

【表３２－１】

配列表の簡単な説明

配列番号	タイプ	種	説明	配列
1	PRT	ヒト	GC5B81、GC5B427、GC5B428、GC5B430、GC5B431、及びGC5B429－HCDR1	SYAIS
2	PRT	ヒト	GC5B379、GC5B598，GC5B465、GC5B285，GC5B463、GC5B432、GC5B433、GC5B434、GC5B435、GC5B436、GC5B461、GC5B462、GC5B437、GC5B438、GC5B439、GC5B440、GC5B441、GC5B442、GC5B443、GC5B444、GC5B464、GC5B445、GC5B446、GC5B447、GC5B448、GC5B449、及びGC5B450－HCDR1	NYWMS
3	PRT	ヒト	GC5B483、GC5B473、GC5B478、GC5B488、GC5B493、及びGC5B498－HCDR1	SYFIG
4	PRT	ヒト	GC5B596－HCDR1	GYTMN
5	PRT	ヒト	GC5B81、GC5B427、GC5B428、GC5B430、GC5B431、及びGC5B429－HCDR2	GIIPIFGTANYAQKFQG
6	PRT	ヒト	GC5B598、GC5B465、GC5B432、及びGC5B447－HCDR2	GISYSGGSKYYASSVKG
7	PRT	ヒト	GC5B599、GC5B483、GC5B481、GC5B482、GC5B484、GC5B485、及びGC5B503－HCDR2	IIYPGKSDTRYSPSFQG
8	PRT	ヒト	GC5B596－HCDR2	LINPYNSDTNYAQKLQG
9	PRT	ヒト	GCB581－HCDR3	ESRWRGYKLD
10	PRT	ヒト	GC5B598、GCB5465－HCDR3	AAFDFGRRAVRLD
11	PRT	ヒト	GC5B376、GC5B599、GC5B483、GC5B164、GC5B471、GC5B472、GC5B473、GC5B474、GC5B475、GC5B476、GC5B477、GC5B478、GC5B479、GC5B480、GC5B481、GC5B482、GC5B484、GC5B485、GC5B486、GC5B487、GC5B488、GC5B489、GC5B490、GC5B491、GC5B492、GC5B493、GC5B494、GC5B495、GC5B496、GC5B497、GC5B498、GC5B499、GC5B500、GC5B501、GC5B502、GC5B503、GC5B504、及びGC5B505－HCDR3	VYSFGGRHKALFDY

【０３５９】

【表３２－２】

（上記表の続き）

配列番号	タイプ	種	説明	配列
12	PRT	ヒト	GC5B602、GCB596－HCDR3	VALRVALDY
13	PRT	ヒト	GC5B382、GC5B379、GC5B370、GC5B598、GC5B597、GC5B81、GC5B465－LCDR1	RASQSISSYLN
14	PRT	ヒト	GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B599、GC5B483－LCDR1	RASQSVSSYLA
15	PRT	ヒト	GC5B605、GC5B601、GC5B596－LCDR1	KASQNVATHVG
16	PRT	ヒト	GC5B81、GC5B465、GC5B379、GC5B598－LCDR2	AASSLQS
17	PRT	ヒト	GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B599、GC5B483－LCDR2	DASNRAT
18	PRT	ヒト	GC5B602、GC5B601、GC5B596－LCDR2	SASYRYS
19	PRT	ヒト	GC5B379、GC5B598、GC5B81、GC5B465－LCDR3	QQSYSTPLT
20	PRT	ヒト	GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B599、GC5B483－LCDR3	QQRSNWPLT
21	PRT	ヒト	GC5B602、GC5B601、GC5B596－LCDR3	QQYNRYPYT
22	PRT	ヒト	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILESLAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLSV LGLFGLAFAFIIELNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLVKLVRGCVSFSWTTILCIAIGCSLLQ IIIATEYVTLIMTRGMMFVNMTPCQLNVDFVVLLVYVLFLMALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFITV LFSIIIWVVWISMLLRGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNAWVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPLQGNAC PVTAYQHSFQVENQELSRARDSDGAEEDVALTSYGTPIQPQTVDPTQECFIPQAKLSPQQDAGGV
23	PRT	カニクイザル	GPRC5D	MYKDCIESTGDYFLPCDSEGPWGIVLESLAILGIVVTILLLLAFLFLMRKIQDCSQWNVLPTQLLFLLSV LGLFGLAFAFIIQLNQQTAPVRYFLFGVLFALCFSCLLAHASNLVKLVRGRVSFSWTTILCIAIGCSLLQVIIAIEYVTLIMTRGMMFVHMTPYQLNVDFVVLLVYVLFLMALTFFVSKATFCGPCENWKQHGRLIFITVLFSIIIWVVWISMLLRGNPQFQRQPQWDDPVVCIALVTNA WVFLLLYIVPELCILYRSCRQECPSQGHACPVTAYQRSFQVENQELSRARDSDGAEEDVALTSFGTPIQPQTVDPTQECFIPRAKLSPQQDAGV

【０３６０】

【表３２－３】

（上記表の続き）

配列番号	タイプ	種	説明	配列
24	PRT	マウス	GPRC5D	MYEDCVKSTEDYYLFCDNEGPWAIVLES LAVIGIVVTILLLLAFLFLMRKVQDCSQW NVLPTQFLFLLAV LGLFGLTFAFIIQLNHQTAPVRYFLFGVLF AICFSCLLAHASNLVKLVRGRVSFCWTTI LFIAIGVSLLQ TIIAIEYVTLIMTRGLMFEHMTPYQLNVDF VCLLIYVLFLMALTFFVSKATFCGPCENW KQHGRLIFATV LVSIIIWVVWISMLLRGNPQLQRQPHWD DAVICIGLVTNAWVFLLIYIIPELSILYRSC RQECPTQGNVC QVPVYQRSFRMDTQEPTRARDSDGAQE DVALTAYGTPIQLQSADPSREYLIPSATL SPQQDAGL
25	PRT	ヒト	CD3B219－HEAVY CHAIN	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS
26	PRT	ヒト	CD3B219－LIGHT CHAIN	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK RAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
27	PRT	ヒト	GC5B373、GC5B376、GC5B164、GC5B501、GC5B502、GC5B503、GC5B504、及びGC5B505 －HCDR1	SYWIG
28	PRT	ヒト	GC5B379、GC5B285、GC5B442、GC5B443、GC5B444、GC5B464、及びGC5B445－HCDR2	GISYSGGSKYYADSVKG
29	PRT	ヒト	GC5B373、GC5B376、GC5B164、GC5B496、GC5B497、GC5B498、GC5B499、及びGC5B500－HCDR2	IIYPGDSDTRYSPSFQG
30	PRT	ヒト	GC5B379、GC5B285、GC5B446、GC5B447、GC5B448、GC5B449、及びGC5B450－HCDR3	AAWDFGRRAVRLDY
31	PRT	ヒト	GC5B427－HCDR3	ESRYRGYKLDY
32	PRT	ヒト	GC5B428－HCDR3	ESRVRGYKLDY
33	PRT	ヒト	GC5B430－HCDR3	ESRGRGYKLDY
34	PRT	ヒト	GC5B431－HCDR3	ESRARGYKLDY
35	PRT	ヒト	GC5B429HCDR3－VH	ESRFRGYKLDY
36	PRT	ヒト	GC5B471、GC5B476、GC5B486、GC5B481、GC5B491、及びGC5B496－HCDR1	SYYIG
37	PRT	ヒト	GC5B497、GC5B472、GC5B477、GC5B482、GC5B487、及びGC5B492－HCDR1	SYVIG

【０３６１】

【表３２－４】

（上記表の続き）

配列番号	タイプ	種	説明	配列
38	PRT	ヒト	GC5B474、GC5B479、GC5B484、GC5B489、GC5B494、及びGC5B499－HCDR1	SYGIG
39	PRT	ヒト	GC5B475、GC5B480、GC5B485、GC5B490、GC5B495、及びGC5B500－HCDR1	SYAIG
40	PRT	ヒト	GC5B471、GC5B472、GC5B473、GC5B474、GC5B475、及びGC5B501－HCDR2	IIYPGASDTRYSPSFQG
41	PRT	ヒト	GC5B476、GC5B477、GC5B478、GC5B479、GC5B480、及びGC5B502－HCDR2	IIYPGSSDTRYSPSFQG
42	PRT	ヒト	GC5B486、GC5B487、GC5B488、GC5B489、GC5B490、及びGC5B504－HCDR2	IIYPGESDTRYSPSFQG
43	PRT	ヒト	GC5B491、GC5B492、GC5B493、GC5B494、GC5B495、及びGC5B505－HCDR2	IIYPGYSDTRYSPSFQG
44	PRT	ヒト	GC5B463及びGC5B446－HCDR2	GISYSGGSKYYAASVKG
45	PRT	ヒト	GC5B433、GC5B434、及びGC5B448－HCDR2	GISYSGGSKYYAKSVKG
46	PRT	ヒト	GC5B435、GC5B436、GC5B461、GC5B462、及びGC5B449－HCDR2	GISYSGGSKYYAESVKG
47	PRT	ヒト	GC5B437、GC5B438、GC5B439、GC5B440、GC5B441、及びGC5B450－HCDR2	GISYSGGSKYYAYSVKG
48	PRT	ヒト	GC5B463、GC5B435、GC5B437、及びGC5B442－HCDR3	AAYDFGRRAVRLDY
49	PRT	ヒト	GC5B432、GC5B433、GC5B438、及びGC5B443－HCDR3	AAVDFGRRAVRLDY
50	PRT	ヒト	GC5B461、GC5B440、及びGC5B464－HCDR3	AAGDFGRRAVRLDY
51	PRT	ヒト	GC5B462、GC5B441、及びGC5B445－HCDR3	AAADFGRRAVRLDY
52	PRT	ヒト	GC5B81－VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARESRWRGYKLDYWGQGTLVTVSS
53	PRT	ヒト	GC5B598、GC5B465－VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYASSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAFDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS

【０３６２】

【表３２－５】

（上記表の続き）

配列番号	タイプ	種	説明	配列
54	PRT	ヒト	GC5B599、GC5B483－VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYFIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGKSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS
55	PRT	ヒト	GC5B596－VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNSDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLVTVSS
56	PRT	ヒト	GC5B379、GC5B598、GC5B81、及びGC5465－VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGQGTKVEIK
57	PRT	ヒト	GC5B373、GC5B376、GC5B385、GC5B599、GC5B483－VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIK
58	PRT	ヒト	GC5B596、GC5B602－VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVATHVGWYQQKPGKAPKRLIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK
59	PRT	ヒト	IgG4PAA	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
60	PRT	ヒト	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
61	PRT	ヒト	GC5B382－HCDR1	DYGMH
62	PRT	ヒト	GC5B385－HCDR1	GYAMS
63	PRT	ヒト	GC5B370、GC5B597－HCDR1	SYGIS
64	PRT	ヒト	GC5B602－HCDR1	GYSFTGYTMN
65	PRT	ヒト	GC5B603－HCDR1	SYAMS
66	PRT	ヒト	GC5B601－HCDR1	GFSLTSYNVH
67	PRT	ヒト	GC5B382－HCDR2	AIKYSGGSTYYADSVKG
68	PRT	ヒト	GC5B603、GC5B385－HCDR2	AISGSGGSTYYADSVKG
69	PRT	ヒト	GC5B370、GC5B597－HCDR2	GIIPIFGNINYAQKFQG
70	PRT	ヒト	GC5B602－HCDR2	LINPYNGDTN
71	PRT	ヒト	GC5B601－HCDR2	VIWAGGSTNYNSALMS
72	PRT	ヒト	GC5B382－HCDR3	RAESGPGLDY
73	PRT	ヒト	GC5B373－HCDR3	IGFYGRSFRIFDY

【０３６３】

【表３２－６】

（上記表の続き）

配列番号	タイプ	種	説明	配列
74	PRT	ヒト	GC5B385－HCDR3	VDRSFGRSRYTLDY
75	PRT	ヒト	GC5B370、GC5B597－HCDR3	VSRRFKRFAYYFDY
76	PRT	ヒト	GC5B603－HCDR3	SNFLPVVFDY
77	PRT	ヒト	GC5B601－HCDR3	DGIRLRFAY
78	PRT	ヒト	GC5B382、GC5B370、GC5B597－LCDR2	WASTRES
79	PRT	ヒト	GC5B603－LCDR2	TASNRAT
80	PRT	ヒト	GC5B382、GC5B370、GC5B597－LCDR3	QQYYSTPLT
81	PRT	ヒト	GC5B603－LCDR3	QQYFRAPIT
82	PRT	ヒト	GC5B382－VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMHWVRQAPGKGLEWVSAIKYSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAESGPGLDYWGQGTLVTVSS
83	PRT	ヒト	GC5B379－VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGGSKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKAAWDFGRRAVRLDYWGQGTLVTVSS
84	PRT	ヒト	GC5B376－VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARIGFYGRSFRIFDYWGQGTLVTVSS
85	PRT	ヒト	GC5B376－VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARVYSFGGRHKALFDYWGQGTLVTVSS
86	PRT	ヒト	GC5B385－VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVDRSFGRSRYTLDYWGQGTLVTVSS
87	PRT	ヒト	GC5B370、GC5B597－VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYGISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGNINYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARVSRRFKRFAYYFDYWGQGTLVTVSS
88	PRT	ヒト	GC5B602－VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYTMNWVRQAPGQGLEWMGLINPYNGDTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARVALRVALDYWGQGTLVTVSS
89	PRT	ヒト	GC5B603－VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSNFLPVVFDYWGQGTLVTVSS

【０３６４】

【表３２－７】

（上記表の続き）

配列番号	タイプ	種	説明	配列
90	DNA	ヒト	GC5B596軽鎖	Atgcgggtgctggcccagctgctgggactgctgctg ctgtgcttccctggcgccagatgcgacatccagatg acccagagccccagcagcctgagcgccagcgtgg gcgaccgggtgaccatcacctgcaaggccagccag aacgtggccacccacgtgggctggtaccagcagaa gcccggcaaggcccccaagcggctgatctacagcg ccagctaccggtacagcggcgtgcccagccggttc agcggcagcggcagcggcaccgagttcaccctgac catcagcaacctgcagcccgaggacttcgccacct actactgccagcagtacaaccggtacccctacacct tcggccagggcaccaagctggagatcaagcgtacg gtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctga tgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcc tgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtac agtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaact cccaggagagtgtcacagagcaggacagcaagga cagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctga gcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcc tgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtc acaaagagcttcaacaggggagagtgttga
91	PRT	ヒト	GC5B601－VH	QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSL TSYNVHWIRQPPGKALEWLAVIWAGGST NYNSALMSRLTISKDTSKSQVVLTMTNM RAEDTATYYCARDGIRLRFAYWGQGTLV TVSS
92	PRT	ヒト	GC5B382、GC5B597、 GC5B370－VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQS VLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYW ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQYYSTPLTFGQGTKVEI K
93	PRT	ヒト	GC5B603－VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQS VRKSLAWYQQKPGQAPRLLIYTASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCQQYFRAPITFGQGTKVEIKK
94	PRT	ヒト	GC5B601－VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQN VATHVGWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYS GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAV YYCQQYNRYPYTFGQGTKLEIK

【０３６５】

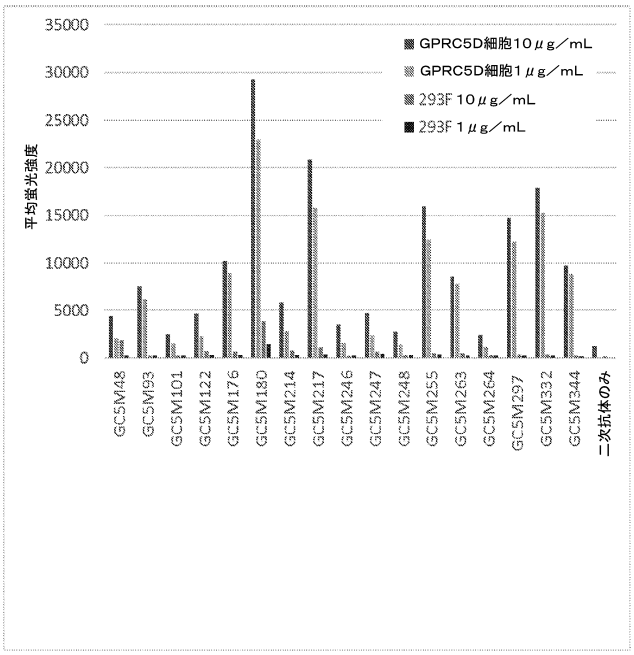
【表３２－８】

（上記表の続き）

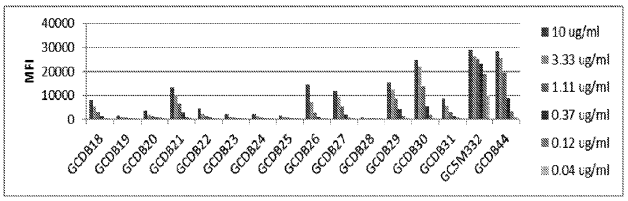
配列番号	タイプ	種	説明	配列
95	PRT	ヒト	GC5B603－LCDR1	RASQSVRKSLA
96	DNA	ヒト	GC5B596重鎖	atggcctgggtctggaccctgctgttcctgatggccg ctgcccagagcatccaggcccaggtgcagctggtg cagagcggcgccgaggtgaagaagcccggcgcca gcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggctacagc ttcaccggctacaccatgaactgggtgcggcaggcc cccggccagggcctggagtggatgggcctgatcaa cccctacaacagcgacaccaactacgcccagaag ctgcagggccgggtgaccatgaccaccgacaccag caccagcaccgcctacatggagctgcggagcctgc ggagcgacgacaccgccgtgtactactgcgcccgg gtggccctgcgggtggccctggactactggggccag ggcaccctggtgaccgtgagcagcgcctccaccaa gggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccag gagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcc tggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgt cgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcac accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctact ccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcac aagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttga gtccaaatatggtcccccatgcccaccatgcccagc acctgaggccgccgggggaccatcagtcttcctgtt ccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccg gacccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgag ccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgt ggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc cgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg aacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaa aggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaa agccaaagggcagccccgagagccacaggtgtac accctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaa ccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttcta ccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg ggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcc cgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagc aggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggg gaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgc acaaccactacacacagaagagcctctccctgtctc tgggtaaatga

【図面】

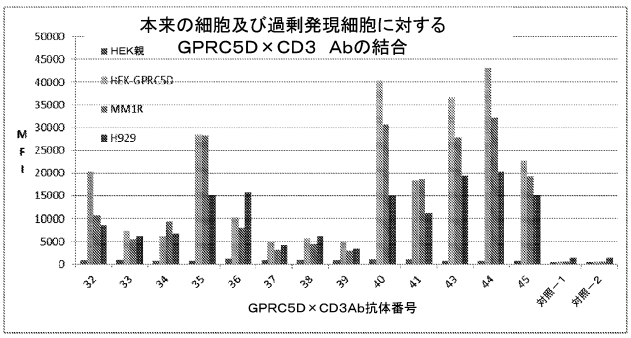
【図１】



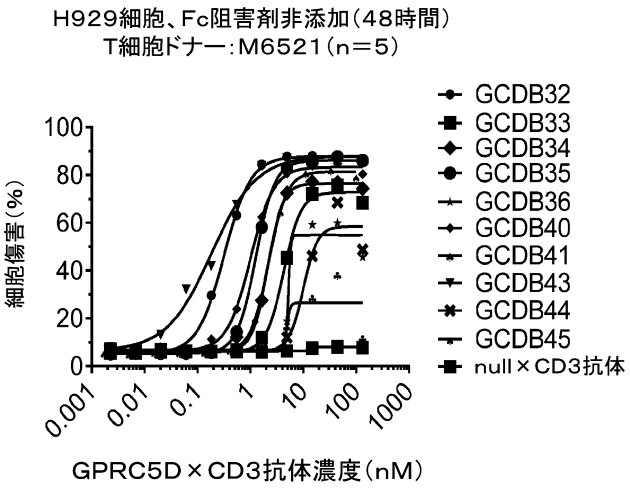
【図２】



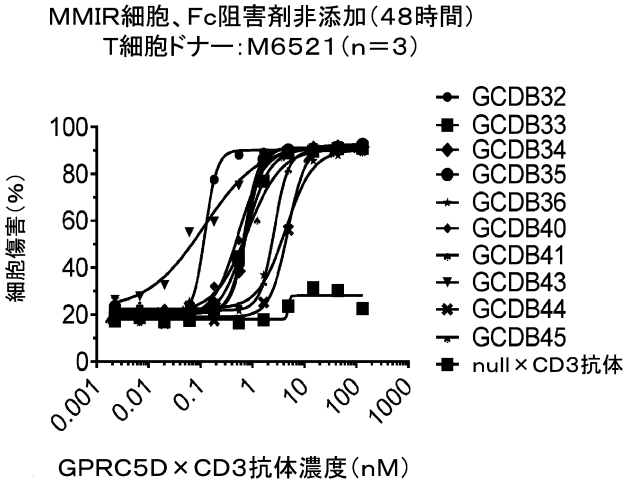
【図３】



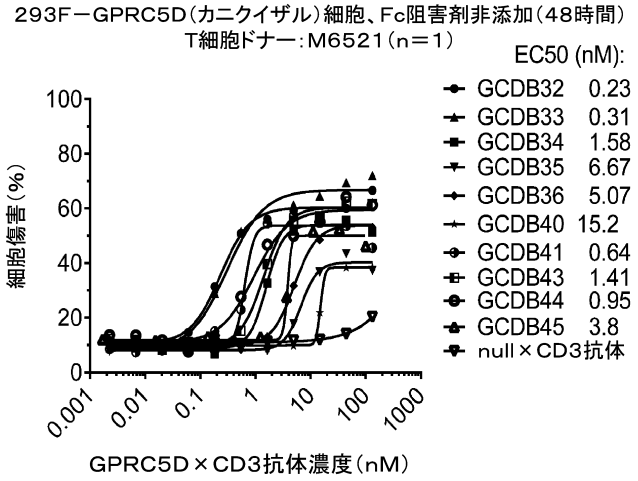
【図４Ａ】



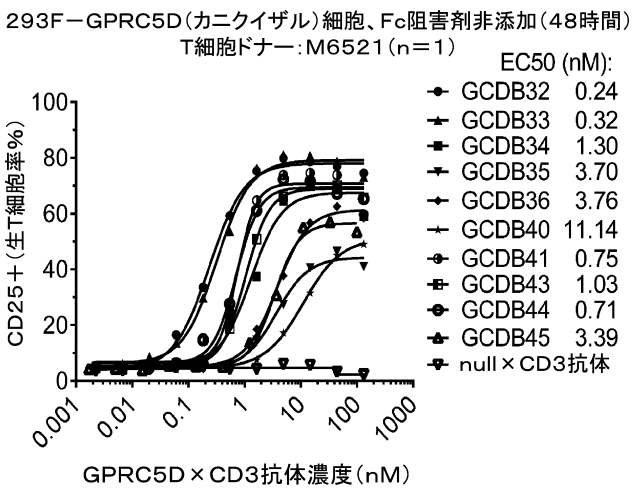
【図４Ｂ】



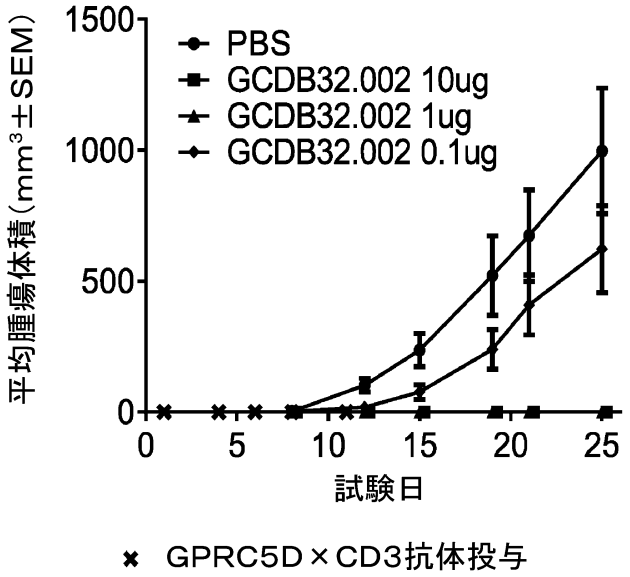
【図５Ａ】



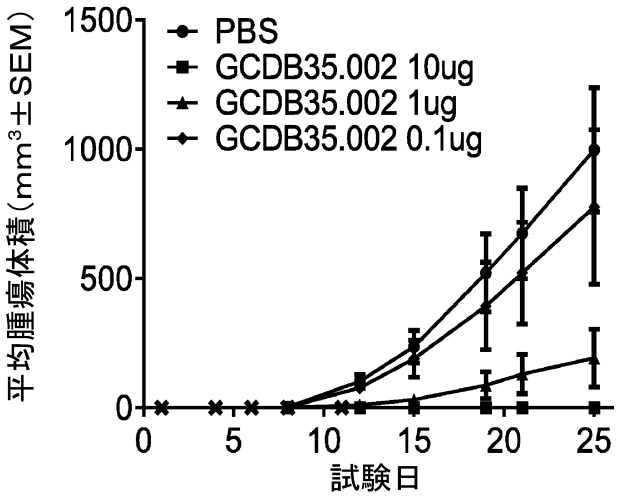
【図５Ｂ】



【図６Ａ】

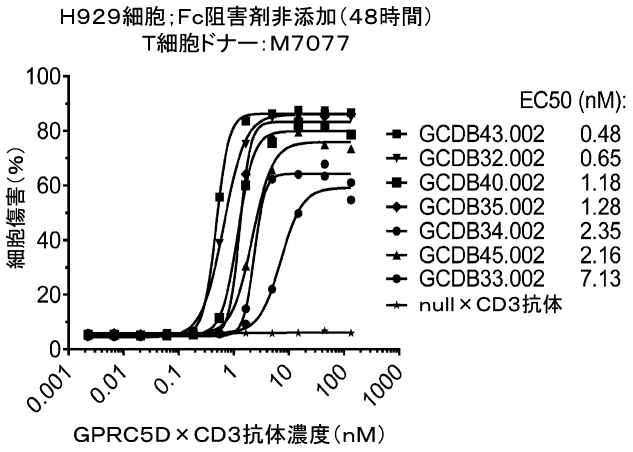


【図６Ｂ】

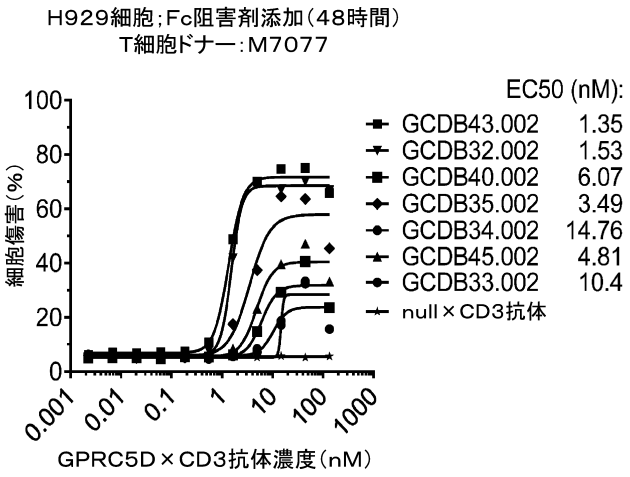


✖ GPRC5D×CD3抗体投与

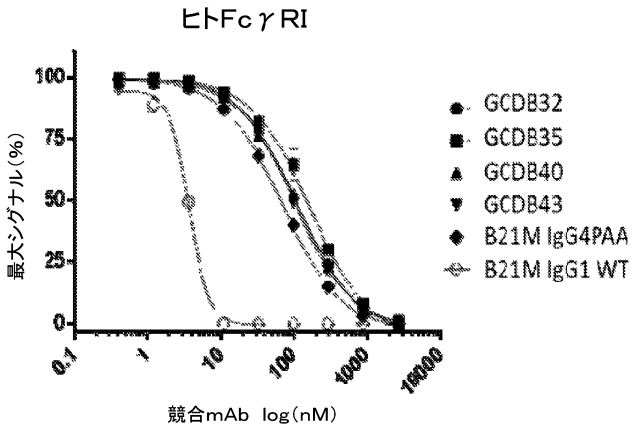
【図７Ａ】



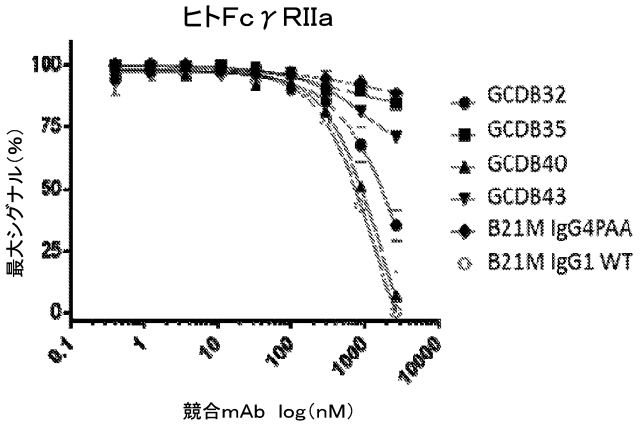
【図７Ｂ】



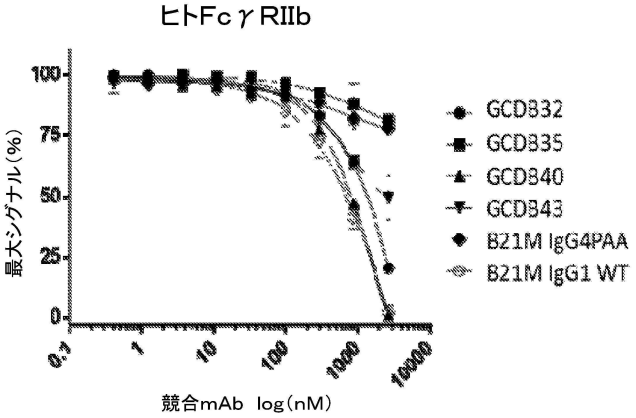
【図８Ａ】



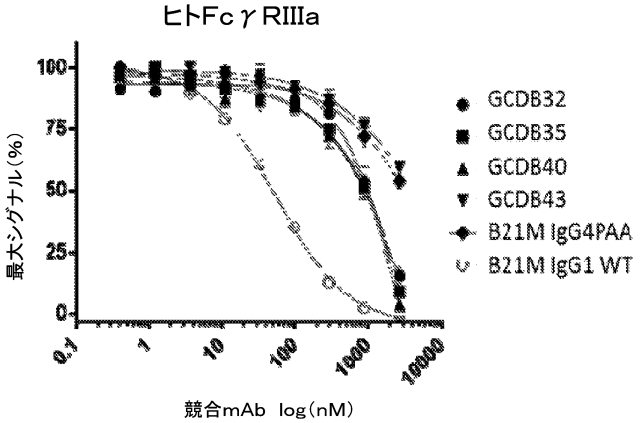
【図８Ｂ】



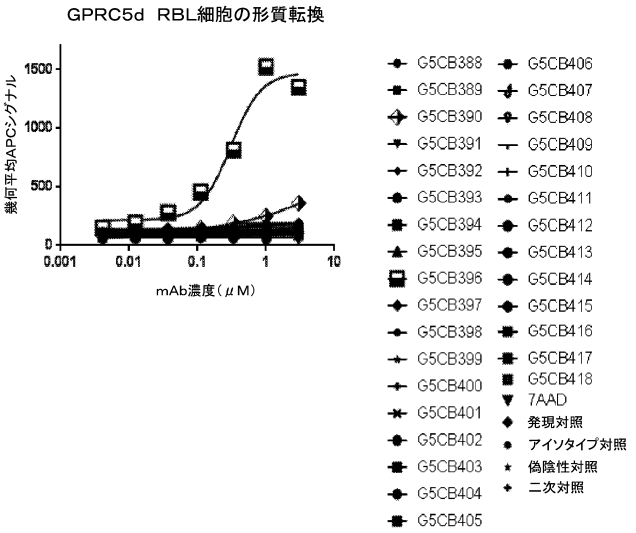
【図８Ｃ】



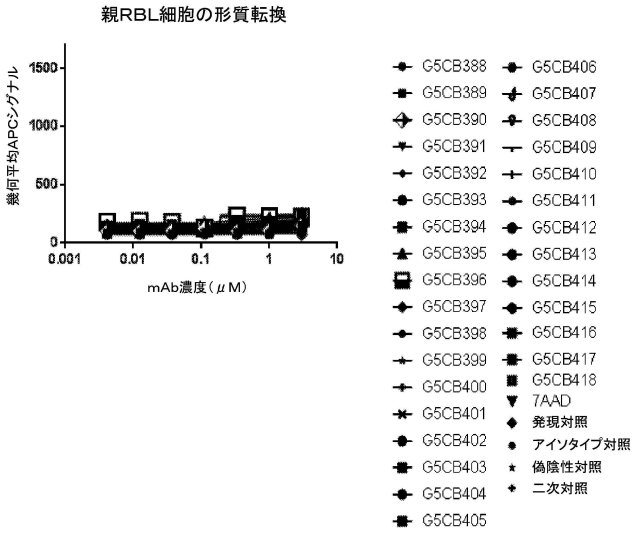
【図８Ｄ】



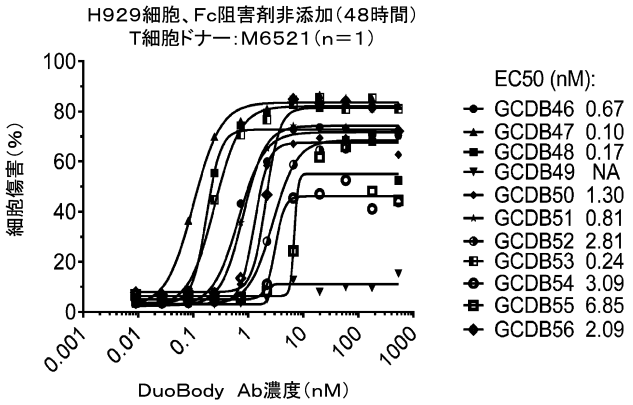
【図９Ａ】



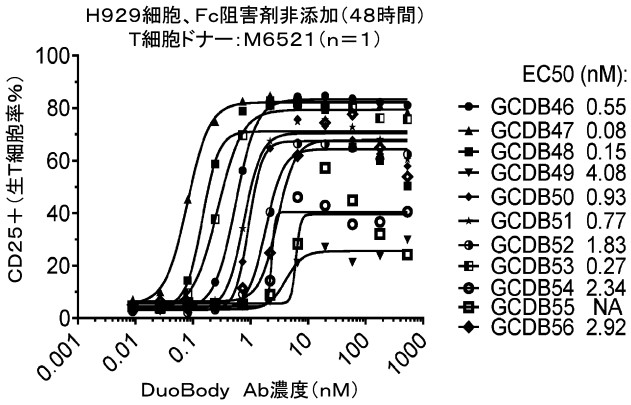
【図９Ｂ】



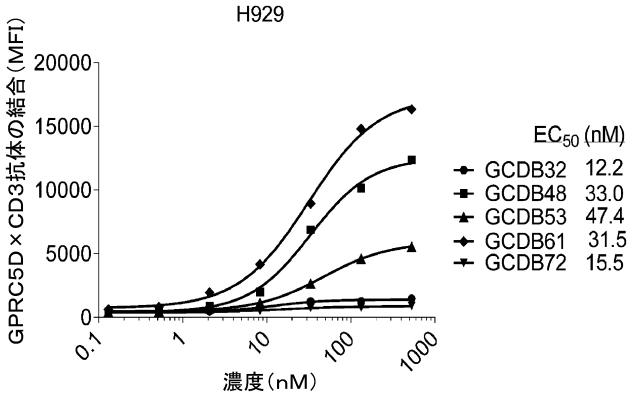
【図１０Ａ】



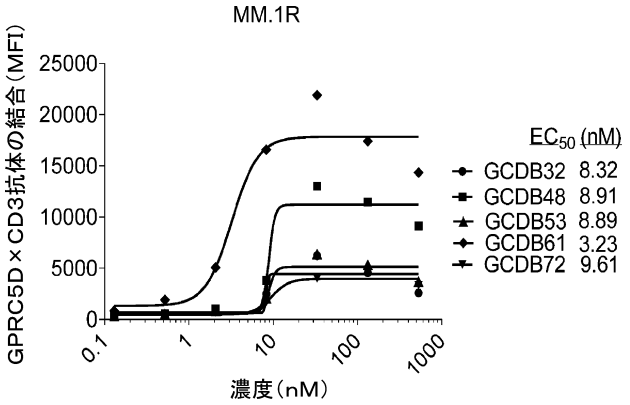
【図１０Ｂ】



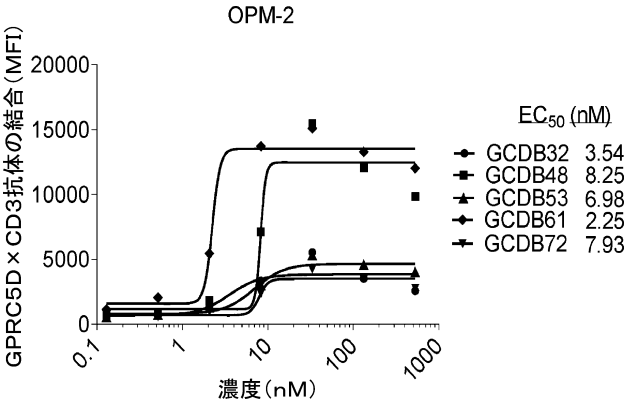
【図１１Ａ】



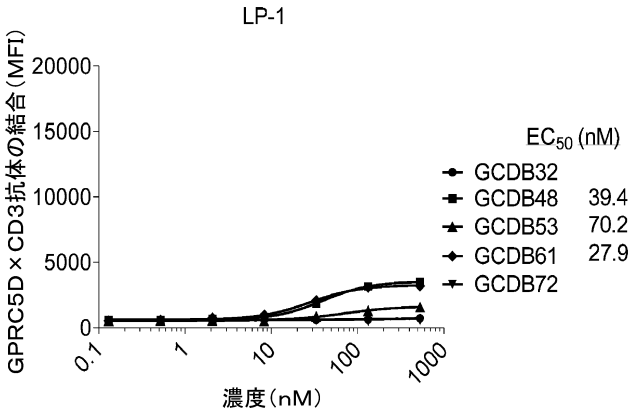
【図１１Ｂ】



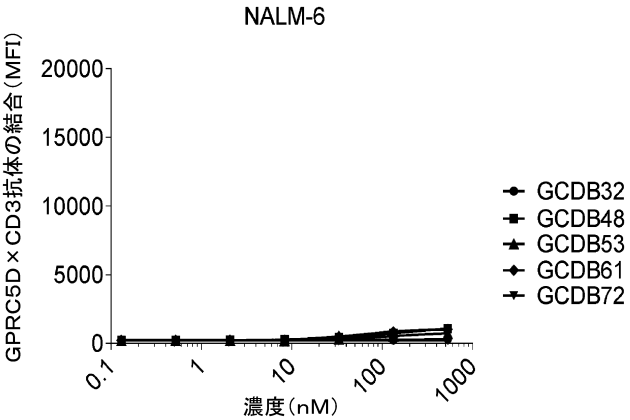
【図１１Ｃ】



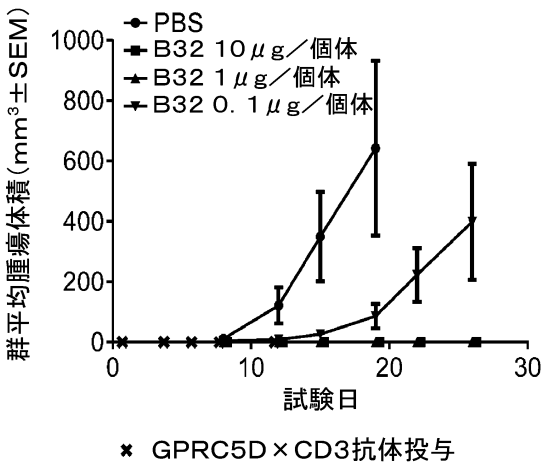
【図１１Ｄ】



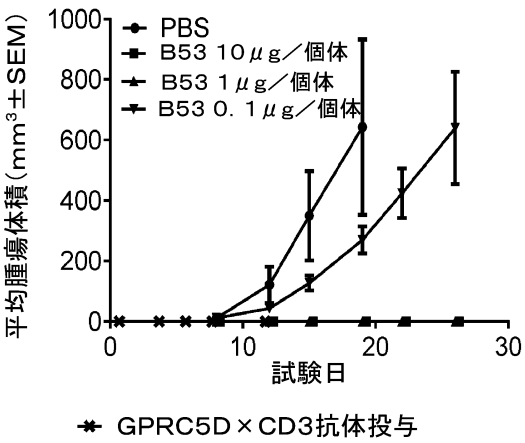
【図１１Ｅ】



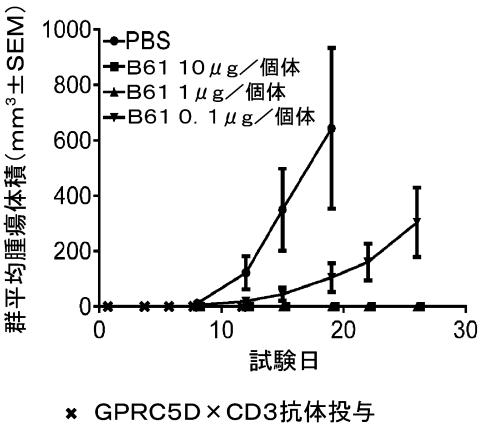
【図１２Ａ】



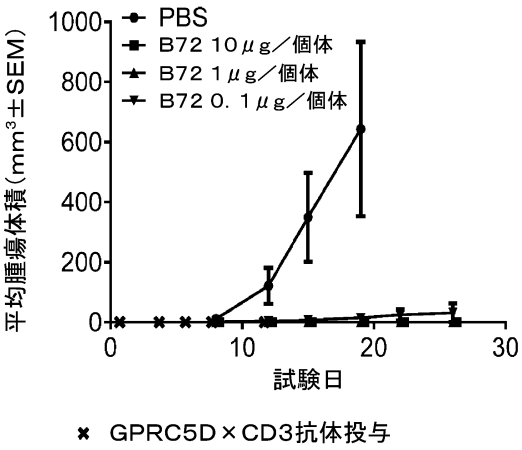
【図１２Ｂ】



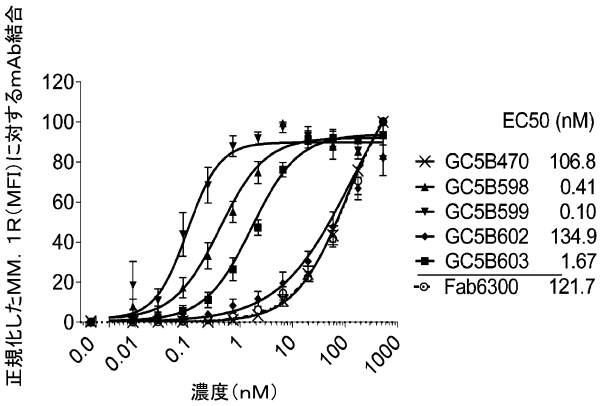
【図１２Ｃ】



【図１２Ｄ】



【図１３】

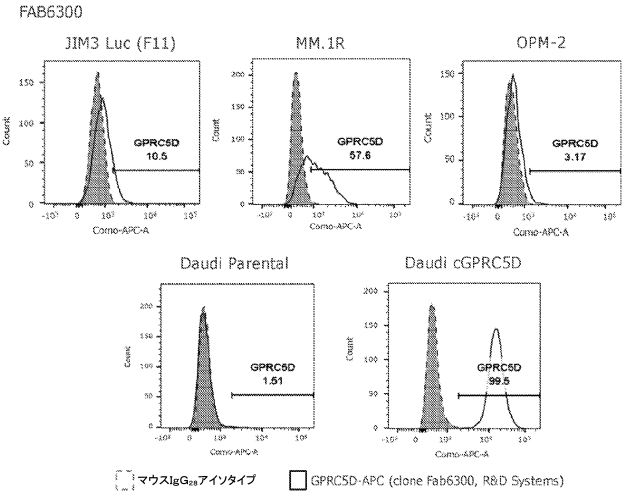


470 GC5M470.GC5B470.002
610 GC5B598 (GC5M610)
611 GC5B599 (GC5M611)
614 GC5B602 (GC5M614)
615 GC5B603 (GC5M615)

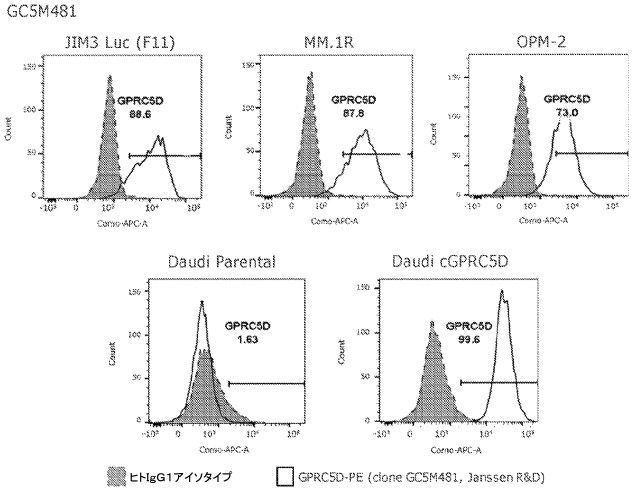
抗体濃度：

μg/mL	0	0.0003	0.001	0.005	0.020	0.078	0.313	1.250	5.000	20.000	80.000
nM	0	0.0020	0.008	0.032	0.130	0.520	2.078	8.313	33.250	133.000	532.000

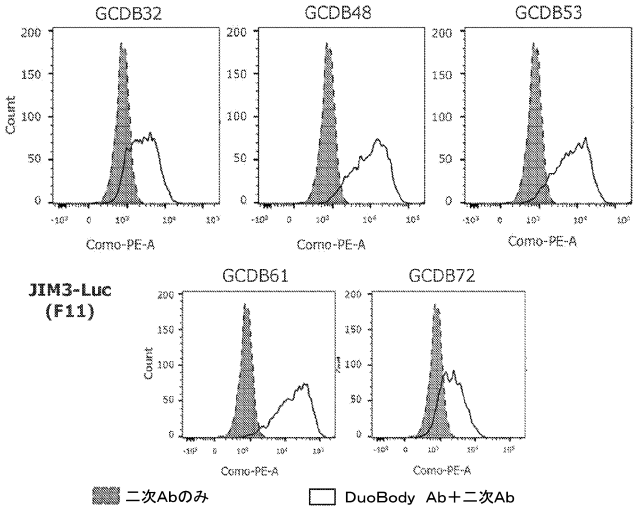
【図１４Ａ－１】



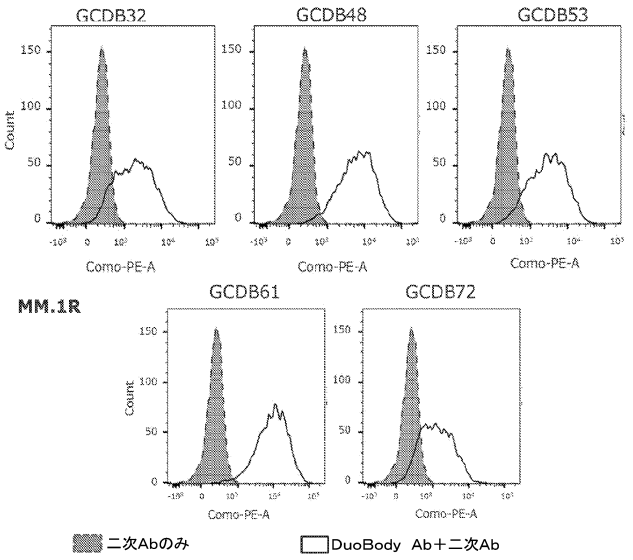
【図１４Ａ－２】
（続き）



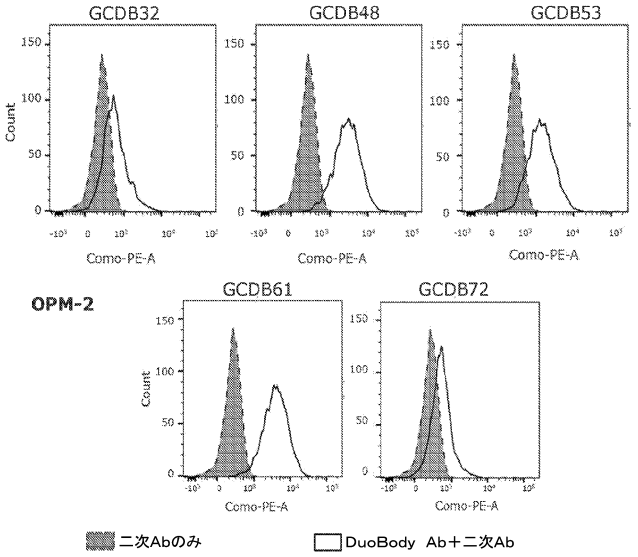
【図１４Ｂ－１】



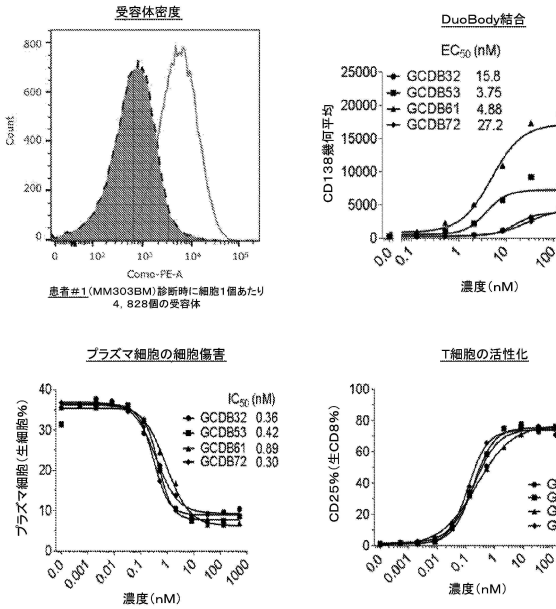
【図１４Ｂ－２】
（続き）



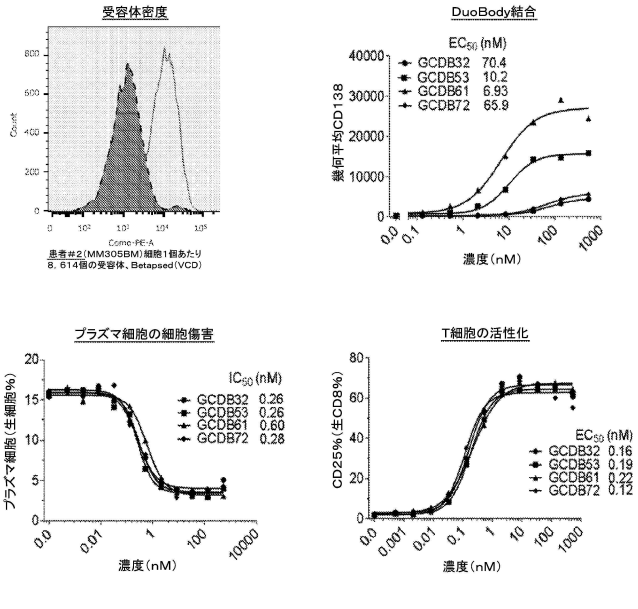
【図１４Ｂ－３】
（続き）



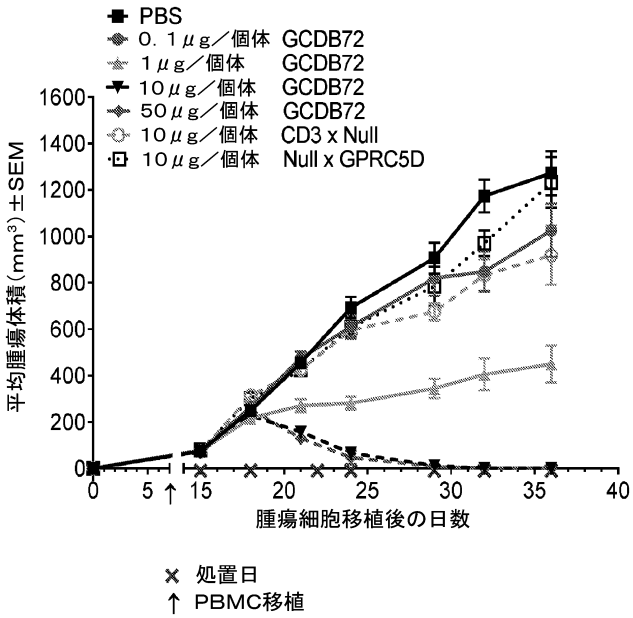
【図１５Ａ】



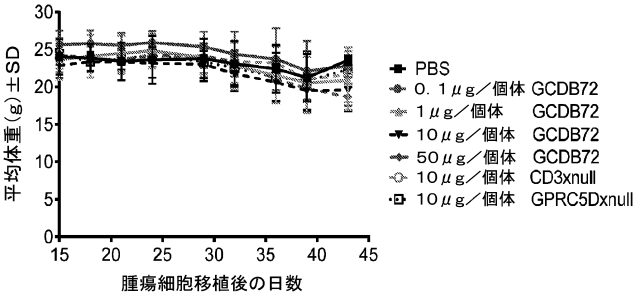
【図１５Ｂ】



【図１６】



【図１７】



【配列表】

<u>202301177400000 1.app</u>

【手続補正書】
【提出日】令和4年11月28日(2022.11.28)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであって、重鎖および軽鎖を含み、
前記重鎖は、配列番号４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３を含み、かつ、
前記軽鎖は、配列番号１５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を含む、
単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項２】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号５５の可変重（ＶＨ）鎖領域と、
配列番号５８の可変軽（ＶＬ）鎖領域と、を含む、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項３】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト抗体又は抗原結合フラグメントである、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項４】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、組み換え体である、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項５】
前記抗原結合フラグメントは、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ２フラグメント、又は一本鎖抗体である、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項６】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプのものである、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項７】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ１又はＩｇＧ４のアイソタイプである、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項８】
前記ＩｇＧ１は、そのＦｃ領域中に、Ｋ４０９Ｒ置換を有する、請求項７に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項９】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、Ｆｃ領域中に、Ｓ２２８Ｐ置換、Ｌ２３４Ａ置換、及びＬ２３５Ａ置換を更に含む、請求項８に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項１０】
前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄと交差反応する、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。
【請求項１１】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、２８ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$でＡＤＣＣをインビトロで誘導する、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項１２】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号５５のアミノ酸配列を有するＶＨと、配列番号５８のアミノ酸配列を有するＶＬと、配列番号５９のアミノ酸配列を有するＦｃドメインと、を含む、請求項１に記載の単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項１３】

請求項１～１２のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントを発現している単離された細胞。

【請求項１４】

前記細胞は、ハイブリドーマである、請求項１３に記載の単離された細胞。

【請求項１５】

前記抗体は、組み換えにより生成される、請求項１３に記載の単離された細胞。

【請求項１６】

単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体、又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメントであって、

ａ）第１の重鎖（ＨＣ１）と、

ｂ）第２の重鎖（ＨＣ２）と、

ｃ）第１の軽鎖（ＬＣ１）と、

ｄ）第２の軽鎖（ＬＣ２）と、を含み、

前記ＨＣ１及び前記ＬＣ１は、対を成してＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合部位を形成し、前記ＨＣ２及び前記ＬＣ２は、対を成してＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第２の抗原結合部位を形成し、

ＨＣ１は、配列番号２５を含み、ＬＣ１は、配列番号２６を含み、

ＨＣ２可変重鎖領域は、配列番号５５を含み、ＬＣ２可変軽鎖領域は、配列番号５８を含む、

単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体、又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項１７】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプのものである、請求項１６に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項１８】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ４のアイソタイプである、請求項１７に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項１９】

前記二重特異性抗体のＧＰＲＣ５Ｄ結合部分は、配列番号５５のアミノ酸配列を有するＶＨと、配列番号５８のアミノ酸配列を有するＶＬと、配列番号５９のアミノ酸配列を有するＦｃドメインと、を含む、請求項１７に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項２０】

前記二重特異性抗体のＣＤ３結合部分は、配列番号２５のアミノ酸配列を有するＶＨと、配列番号２６のアミノ酸配列を有するＶＬと、配列番号５９のアミノ酸配列を有するＦｃドメインと、を含み、前記Ｆｃドメインが、Ｆ４０５Ｌ及びＲ４０９Ｋをさらに含む、請求項１９に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項２１】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ

５Ｄに結合する、請求項１６に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項２２】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒトの多発性骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ５Ｄに結合する、請求項１６に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項２３】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのヒトＴ細胞活性化を０．２２ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$で誘導する、請求項１６に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項２４】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞のＴ細胞依存性細胞傷害を０．８９ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$で誘導する、請求項１６に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。

【請求項２５】

請求項１６～２４のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを発現している、単離された細胞。

【請求項２６】

前記細胞はハイブリドーマである、請求項２５に記載の単離された細胞。

【請求項２７】

前記ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、組み換えにより生成される、請求項２６に記載の単離された細胞。

【請求項２８】

がんを有する対象を処置するための方法で使用するための医薬組成物であって、請求項１６～２４のいずれか一項に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを含み、

前記方法は、

治療的に有効な量の、前記ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを、それを必要とする対象に、前記がんを処置するのに十分な時間投与する工程を含む、医薬組成物。

【請求項２９】

がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法で使用するための医薬組成物であって、請求項１６～２４のいずれか一項に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを含み、

前記方法は、

治療的に有効な量の、前記ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを、それを必要とする対象に、がん細胞の成長又は増殖を阻害するのに十分な時間投与する工程を含む、医薬組成物。

【請求項３０】

Ｔ細胞をＧＰＲＣ５Ｄ発現がん細胞に対し再指向する方法で使用するための医薬組成物であって、請求項１６～２４のいずれか一項に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを含み、

前記方法は、

治療的に有効な量の、前記ＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを、それを必要とする対象に、Ｔ細胞をＧＰＲＣ５Ｄ発現がん細胞に対し再指向するのに十分な時間投与する工程を含む、医薬組成物。

【請求項３１】

前記がん又はがん細胞は、血液がん又はがん細胞である、請求項２８～３０のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項３２】
前記血液がん又はがん細胞は、ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がん又はがん細胞である、請求項３１に記載の医薬組成物。
【請求項３３】
前記ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がん又はがん細胞は、多発性骨髄腫である、請求項３２に記載の医薬組成物。
【請求項３４】
前記使用は、第２の治療剤を投与する工程をさらに含む、請求項２８に記載の医薬組成物。
【請求項３５】
前記第２の治療剤は、化学療法剤又は標的を設定した抗がん治療剤である、請求項３４に記載の医薬組成物。
【請求項３６】
前記化学療法剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン２である、請求項３５に記載の医薬組成物。
【請求項３７】
前記第２の治療剤を、前記二重特異性抗体と同時に、連続的に、又は別個に、前記対象に投与する、請求項３４～３６のいずれか一項に記載の医薬組成物。
【請求項３８】
請求項１６～２４のいずれか一項に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体と、を含む、医薬組成物。
【請求項３９】
請求項２５～２７のいずれか一項に記載の単離された細胞を培養することを含む、請求項１６～２４のいずれか一項に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントを生成するための方法。
【請求項４０】
請求項１６～２４のいずれか一項に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメントをコードする、単離された合成ポリヌクレオチド。
【請求項４１】
請求項１６～２４のいずれか一項に記載の単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又はその二重特異性結合フラグメント、及び／又は請求項４０に記載の単離された合成ポリヌクレオチドと、これらのための包装と、を含む、キット。
【手続補正２】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】０３６５
【補正方法】変更
【補正の内容】
【０３６５】

【表３２－８】

（上記表の続き）

配列番号	タイプ	種	説明	配列
95	PRT	ヒト	GC5B603－LCDR1	RASQSVRKSLA
96	DNA	ヒト	GC5B596重鎖	atggcctgggtctggaccctgctgttcctgatggccg ctgcccagagcatccaggcccaggtgcagctggtg cagagcggcgccgaggtgaagaagcccggcgcca gcgtgaaggtgagctgcaaggccagcggctacagc ttcaccggctacaccatgaactgggtgcggcaggcc cccggccagggcctggagtggatgggcctgatcaa cccctacaacagcgacaccaactacgcccagaag ctgcagggccgggtgaccatgaccaccgacaccag caccagcaccgcctacatggagctgcggagcctgc ggagcgacgacaccgccgtgtactactgcgcccgg gtggccctgcgggtggccctggactactggggccag ggcaccctggtgaccgtgagcagcgcctccaccaa gggcccatccgtcttccccctggcgccctgctccag gagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcc tggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgt cgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcac accttcccggctgtcctacagtcctcaggactctact ccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagct tgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcac aagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttga gtccaaatatggtcccccatgcccaccatgcccagc acctgaggccgccgggggaccatcagtcttcctgtt ccccccaaaacccaaggacactctcatgatctcccg gacccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgag ccaggaagaccccgaggtccagttcaactggtacgt ggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagc cgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctg aacggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaa aggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaa agccaaagggcagccccgagagccacaggtgtac accctgcccccatcccaggaggagatgaccaagaa ccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttcta ccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatg ggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcc cgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagc aggctaaccgtggacaagagcaggtggcaggaggg gaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgc acaaccactacacacagaagagcctctccctgtctc tgggtaaatga

以下の態様を包含し得る。

［１］　ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する、単離された抗体又はその抗原結合フラグメントであって、

ａ．配列番号１のアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、配列番号５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｂ．配列番号２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｃ．配列番号３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｄ．配列番号４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｅ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、

ｆ．配列番号２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｇ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｈ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｉ．配列番号６２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｊ．配列番号６３のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｋ．配列番号６４のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７０のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、
ｌ．配列番号６５のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、又は
ｍ．配列番号６６のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する重鎖ＣＤＲ３、を含む、単離された組み換え抗体又はその抗原結合フラグメント。
［２］　上記［１］に記載の単離された抗体又は抗原結合フラグメントであって、
ａ．配列番号１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｂ．配列番号２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１０のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｃ．配列番号３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｄ．配列番号４のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｅ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｆ．配列番号２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号３０のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号６のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、
ｇ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤ

Ｒ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｈ．配列番号２７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号２９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｉ．配列番号６２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７４のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１４のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１７のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｊ．配列番号６３のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６９のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｋ．配列番号６１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７２のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１３のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８０のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、

ｌ．配列番号６５のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号６８のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号９５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号７９のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号８１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含み、又は

ｍ．配列番号６６のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ１、配列番号７１のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ２、及び配列番号７７のアミノ酸配列を有する前記重鎖ＣＤＲ３を含む、前記抗体は、配列番号１５のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、配列番号１８のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ２、及び配列番号２１のアミノ酸配列を有する軽鎖ＣＤＲ３を更に含む、単離された抗体又は抗原結合フラグメント。

［３］　ＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、かつ配列番号５２、５３、５４、５５、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、又は９１からなる群から選択される重鎖可変（ＶＨ）領域を含む、単離された抗体又はその抗原結合フラグメント。

［４］　前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：５６、５７、５８、９２、９３、又は９４からなる群から選択される軽鎖可変（ＶＬ）領域を含む、上記［３］に記載の抗体。

［５］　前記抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：５２、５３、５４、５５、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、又は９１からなる群から選択されるＶＨ領域と、

配列番号５６、５７、５８、９２、９３、又は９４からなる群から選択されるＶＬ領域と、を含む、上記［３］に記載の抗体。

［６］　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５６を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５２、５３、又は８３を含む、上記［５］に記載の抗体。

［７］　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５７を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５４、８４、８５、８６、又は９０を含む、上記［５］に記載の抗体。

［８］　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号５８を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号５５又は８８を含む、上記［５］に記載の抗体。

［９］　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９２を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号８２又は８７を含む、上記［５］に記載の抗体。
［１０］　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９３を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号８９を含む、上記［５］に記載の抗体。
［１１］　前記ＶＨ鎖領域が、配列番号９４を含むＶＬ鎖領域と対となる配列番号９１を含む、上記［５］に記載の抗体。
［１２］　前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号２２のアミノ酸配列を有するポリペプチドに結合する、上記［１］～［１１］のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
［１３］　前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒト抗体又は抗原結合フラグメントである、上記［１］～［１２］のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
［１４］　前記抗体又は抗原結合フラグメントは、組み換え体である、上記［１］～［１３］のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
［１５］　前記抗原結合フラグメントは、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ２フラグメント、又は一本鎖抗体である、上記［１］～［１４］のいずれか一項に記載の抗原結合フラグメント。
［１６］　前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプである、上記［１］～［１５］のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
［１７］　ＩｇＧ１又はＩｇＧ４のアイソタイプである、上記［１］～［９］のいずれかに記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
［１８］　前記ＩｇＧ１は、そのＦｃ領域中に、Ｋ４０９Ｒ置換を有する、上記［１７］に記載の抗体。
［１９］　前記ＩｇＧ１は、そのＦｃ領域中に、Ｆ４０５Ｌ置換を有する、上記［１７］に記載の抗体。
［２０］　前記ＩｇＧ４は、そのＦｃ領域中に、Ｆ４０５Ｌ置換及びＲ４０９Ｋ置換を有する、上記［２０］に記載の抗体。
［２１］　Ｆｃ領域中に、Ｓ２２８Ｐ置換、Ｌ２３４Ａ置換、及びＬ２３５Ａ置換を更に含む、上記［１６］に記載の抗体。
［２２］　前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒトＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合し、カニクイザルＧＰＲＣ５Ｄと交差反応する、上記［１］～［１４］のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
［２３］　前記抗体又は抗原結合フラグメントは、約２８ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$でＡＤＣＣをインビトロで誘導する、上記［１７］のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。
［２４］　上記［１］～［１１］のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントを発現している単離された細胞。
［２５］　前記細胞は、ハイブリドーマである、上記［２４］に記載の細胞。
［２６］　前記抗体は、組み換えにより生成される、上記［２４］に記載の細胞。
［２７］　単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体であって、
　ａ）第１の重鎖（ＨＣ１）と、
　ｂ）第２の重鎖（ＨＣ２）と、
　ｃ）第１の軽鎖（ＬＣ１）と、
　ｄ）第２の軽鎖（ＬＣ２）と、を含み、
　前記ＨＣ１及び前記ＬＣ１は、対を成してＣＤ３に特異的に結合する第１の抗原結合部位を形成し、前記ＨＣ２及び前記ＬＣ２は、対を成してＧＰＲＣ５Ｄに特異的に結合する第２の抗原結合部位を形成する、単離されたＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体、又はそのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性結合フラグメント。
［２８］　ＨＣ１は、配列番号２５を含み、ＬＣ１は、配列番号２６を含む、上記［２７］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

［２９］　ＨＣ２は、配列番号５２を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３０］　ＨＣ２は、配列番号５３を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３１］　ＨＣ２は、配列番号５４を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３２］　ＨＣ２は、配列番号５５を含み、ＬＣ２は、配列番号５８を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３３］　ＨＣ２は、配列番号８２を含み、ＬＣ２は、配列番号９２を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３４］　ＨＣ２は、配列番号８３を含み、ＬＣ２は、配列番号５６を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３５］　ＨＣ２は、配列番号８４を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３６］　ＨＣ２は、配列番号８５を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３７］　ＨＣ２は、配列番号８６を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３８］　ＨＣ２は、配列番号８７を含み、ＬＣ２は、配列番号９２を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［３９］　ＨＣ２は、配列番号８８を含み、ＬＣ２は、配列番号５８を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４０］　ＨＣ２は、配列番号８９を含み、ＬＣ２は、配列番号９３を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４１］　ＨＣ２は、配列番号９１を含み、ＬＣ２は、配列番号９４を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４２］　ＨＣ２は、配列番号８５を含み、ＬＣ２は、配列番号５７を含む、上記［２８］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４３］　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４のアイソタイプである、上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４４］　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、ＩｇＧ４のアイソタイプである、上記［４３］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４５］　前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ５Ｄに結合する、上記［２７］～［４２］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４６］　前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒトの多発性骨髄腫細胞の表面上のＧＰＲＣ５Ｄに結合する、上記［２７］～［４２］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４７］　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのヒトＴ細胞活性化を約０．２２ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$で誘導する、上記［２７］～［４２］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４８］　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、インビトロでのＧＰＲＣ５Ｄ発現細胞のＴ細胞依存性細胞傷害を約０．８９ｎＭ未満のＥＣ$_{50}$で誘導する、上記［２７］～［４２］に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。
［４９］　上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載の抗体又は二重特異性結合フラグメントを発現している、単離された細胞。
［５０］　前記細胞はハイブリドーマである、上記［４９］に記載の細胞。

［５１］　前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、組み換えにより生成される、上記［４９］に記載の細胞。
［５２］　がんを有する対象を処置するための方法であって、前記方法は、
　治療的に有効な量の、上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを、処置を必要とする患者に、前記がんを処置するのに十分な時間投与する工程を含む、方法。
［５３］　がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法であって、前記方法は、
　がん細胞の前記成長又は増殖を阻害するために、治療的に有効な量の、上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを投与する工程を含む、方法。
［５４］　Ｔ細胞をＧＰＲＣ５Ｄ発現がん細胞に対し再指向する方法であって、前記方法は、
　Ｔ細胞をがんに再指向するために、治療的に有効な量の、上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを投与する工程を含む、方法。
［５５］　前記がんは、血液がんである、上記［５２］、［５３］、又は［５４］に記載の方法。
［５６］　前記血液がんは、ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がんである、上記［５５］に記載の方法。
［５７］　前記ＧＰＲＣ５Ｄ発現Ｂ細胞がんは、多発性骨髄腫である、上記［５６］に記載の方法。
［５８］　第２の治療剤を投与する工程を含む、上記［５２］に記載の方法。
［５９］　前記第２の治療剤は、化学療法剤又は標的を設定した抗がん治療剤である、上記［５８］に記載の方法。
［６０］　前記化学療法剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン２である、上記［５９］に記載の方法。
［６１］　前記第２の治療剤を、前記二重特異性抗体と同時に、連続的に、又は別個に、前記対象に投与する、上記［５９］に記載の方法。
［６２］　上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体と、を含む、医薬組成物。
［６３］　上記［４９］～［５１］のいずれか一項に記載の細胞を培養することにより、上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを生成するための方法。
［６４］　上記［２７］～［４２］のいずれか一項に記載のＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの、前記ＨＣ１、前記ＨＣ２、前記ＬＣ１、又は前記ＬＣ２をコードする、単離された合成ポリヌクレオチド。
［６５］　上記［２７］～［４２］のいずれか一項に定義されるとおりのＧＰＲＣ５Ｄ×ＣＤ３二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント、及び／又は上記［６３］に定義されるとおりのポリヌクレオチドと、これらのための包装と、を含む、キット。
【外国語明細書】
202301177400008３.pdf

フロントページの続き

(51)国際特許分類		ＦＩ	
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00
Ａ６１Ｐ	*35/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/02
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00
Ａ６１Ｋ	*38/20 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/20
Ａ６１Ｋ	*31/7034(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7034
Ａ６１Ｋ	*31/7068(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7068
Ａ６１Ｋ	*31/417(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/417

(72)発明者 アター，リカルド
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 チン，ダイアナ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 エダヴェッタル，スザンヌ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ガウデート，フランコイス
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ９２１２１，ラホヤ，メリーフィールド ロウ ３２１０
(72)発明者 リ，インジェ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ルイストロ，レオポルド
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 マジェースキー，ネイサン
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 メンドンカ，マーク
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 ピラリセッティ，コンダンダラム
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 テプリアコフ，アレクシー
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００
(72)発明者 トルネッタ，マーク
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 １９４７７，スプリング ハウス，マッキーン ロード １４００