

明 細 書

発明の名称： 安定な多重特異性分子及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、2つ以上の抗原を認識する多重特異性抗体、多重特異性分子、その構成要素等に関する。

背景技術

[0002] 複数の標的に結合する分子として、1分子で異なる2種類以上の抗原に結合する抗体（二重特異性抗体や多重特異性抗体）に関する研究が進められている。

[0003] 二重特異性抗体の活用例としては、1分子でT細胞上のCD3とがん細胞表面で発現する標的抗原を認識することによりT細胞とがん細胞を架橋し、T細胞によるがん細胞への細胞傷害を誘導するT細胞リダイレクティング二重特異性抗体が挙げられる。代表例であるB l i n a t u m o m a b は、B i T E（商標）型（s c F v - s c F v 型）から成るCD3とCD19に結合する二重特異性抗体であり、米国では成人及び小児の再発又は難治性のB細胞性非ホジキンリンパ腫及び急性リンパ性白血病の治療薬として承認されている。しかし、B l i n a t u m o m a b はB i T E（商標）型のため半減期が短く、他の医薬品として承認されている抗体に比べ一定の実験条件下において、h i g h m o l e c u l a r w e i g h t s s p e c i e s（HMWS）が多く、安定性に課題があることが示唆された（非特許文献1）。

[0004] 医薬品の前臨床試験では動物、特に高等霊長類であるカニクイザルを用いて行うことが望まれている。抗CD3抗体を用いた候補医薬品の場合、ヒトとカニクイザル両方のCD3に結合可能な抗CD3抗体を活用できることが望ましい。ヒトとカニクイザル両方のCD3に結合し、X線構造解析より同定した新規エピトープを認識する抗CD3抗体が創出され、当該抗CD3抗体と各標的抗原に対する抗体を組合せた二重特異性抗体は、標的抗原を発現

する癌細胞に対して細胞傷害活性を示した（特許文献1及び2）。また、当該抗CD3抗体の一部について改変体等が創出された（特許文献3）。多様なフォーマットから成る多重特異性抗体や多重特異性分子を医薬品として創出するために、様々な種類の抗CD3抗体フラグメントの創出が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2018/117237号

特許文献2：国際公開第2018/147245号

特許文献3：国際公開第2019/244107号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Journal of Chromatography B 1065-1066 (2017) 35-43

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、溶液安定性に優れ、溶液状態で保存した場合に、二量体を含む high molecular weights species (HMWS) が低減できる、二重特異性分子の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、抗CD3 scFv又は抗CD3 Fabを含む新規な二重特異性分子を創出し、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

[1] 下記CDRH1～3及びCDRL1～3を含む、CD3に特異的に結合するFab：

配列番号32で示されるアミノ酸配列からなるCDRH1；

配列番号33で示されるアミノ酸配列からなるCDRH2；

配列番号 34 で示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 ;

配列番号 35 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 1 ;

配列番号 36 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 ; 及び

配列番号 37 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3。

[2] 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 ~ 118 からなる重鎖可変領域及び配列番号 2 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 ~ 107 からなる軽鎖可変領域を含む、[1]の F a b。

[3] 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号 2 で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、[1]又は[2]の F a b。

[4] [1]~[3]のいずれか一つの F a b を含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体 (M H C) の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。

[5] 当該 M H C がヒト白血球抗原 (H L A) である、[4]の多重特異性分子。

[6] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、[4]又は[5]の多重特異性分子。

[7] 多重特異性抗体である、[4]~[6]のいずれか一つの多重特異性分子。

[8] s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c を含む、[4]~[7]のいずれか一つの多重特異性分子。

[9] 三重特異性抗体である、[4]~[8]のいずれか一つの多重特異性分子。

[10] 二重特異性抗体である、[4]~[8]のいずれか一つの多重特異性分子。

[11] 標的分子が G P R C 5 D、C D 9 8 又は T r o p 2 である、[4]~[10]のいずれか一つの多重特異性分子。

[12] 下記 (i) 乃至 (i i i) から選択される一のポリペプチド群を含む、[4]~[11]のいずれか一つの多重特異性分子：

(i) 配列番号29の20～718番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号12の21～233番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) 配列番号30の20～717番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号12の21～233番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(iii) 配列番号31の20～713番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号12の21～233番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[13] [4]～[12]のいずれか一つの多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[14] [13]のポリヌクレオチドを含むベクター。

[15] [13]のポリヌクレオチド又は[14]のベクターを含むか、又は、[4]～[12]のいずれか一つの多重特異性分子を産生する細胞。

[16] [15]の細胞を培養する工程を含む、[4]～[12]のいずれか一つの多重特異性分子の製造方法。

[17] [16]の方法により得られる多重特異性分子。

[18] [1]～[3]のいずれか一つのFab、[4]～[12]若しくは[17]のいずれか一つの多重特異性分子、[13]のポリヌクレオチド、[14]のベクター、又は、[15]の細胞を含む組成物。

[19] 下記CDRH1～3及びCDRL1～3を含む、CD3に特異的に結合し、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合してなるscFv：

配列番号32で示されるアミノ酸配列からなるCDRH1；

配列番号33で示されるアミノ酸配列からなるCDRH2；

配列番号34で示されるアミノ酸配列からなるCDRH3；

配列番号35で示されるアミノ酸配列からなるCDRL1；

配列番号36で示されるアミノ酸配列からなるCDRL2；及び

配列番号37で示されるアミノ酸配列からなるCDRL3。

[20] 配列番号3で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118からなる重鎖可変領域及び配列番号3で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～240からなる軽鎖可変領域を含む、[19]のscFv。

[21] 配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる、[19]又は[20]のscFv。

[22] 配列番号39で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118からなる重鎖可変領域及び配列番号39で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～240からなる軽鎖可変領域を含む、[19]のscFv。

[23] 配列番号39で示されるアミノ酸配列からなる、[19]又は[22]のscFv。

[24] [19]～[23]のいずれか一つのscFvを含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。

[25] 当該MHCがヒト白血球抗原(HLA)である、[24]の多重特異性分子。

[26] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、[24]又は[25]の多重特異性分子。

[27] 多重特異性抗体である、[24]～[26]のいずれか一つの多重特異性分子。

[28] t a F v－ヘテロダイマーFcを含む、[24]～[27]のいずれか一つの多重特異性分子。

[29] 三重特異性抗体である、[24]～[28]のいずれか一つの多重特異性分子。

[30] 二重特異性抗体である、[24]～[28]のいずれか一つの多重特異性分子。

[31] 標的分子がGPCR5D、CD98又はTrop2である、[24]～[30]のいずれか一つの多重特異性分子。

[32] 下記(i)～(iii)から選択される一のポリペプチド群を含む、[24]～[31]のいずれか一つの多重特異性分子：

(i) 配列番号21の20～744番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) 配列番号23の20～743番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(iii) 配列番号25の20～739番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ

酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[33] [24]～[32]のいずれか一つの多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[34] [33]のポリヌクレオチドを含むベクター。

[35] [33]のポリヌクレオチド又は[34]のベクターを含むか、又は、[24]～[32]のいずれか一つの多重特異性分子を産生する細胞。

[36] [35]の細胞を培養する工程を含む、[24]～[32]のいずれか一つの多重特異性分子の製造方法。

[37] [36]の方法により得られる多重特異性分子。

[38] [19]～[23]のいずれか一つのs c F v、[24]～[32]若しくは[37]のいずれか一つの多重特異性分子、[33]のポリヌクレオチド、[34]のベクター、又は、[35]の細胞を含む組成物。

[39] 下記CDRH1～3及びCDRL1～3を含む、CD3に特異的に結合するFab：

配列番号40で示されるアミノ酸配列からなるCDRH1；

配列番号41で示されるアミノ酸配列からなるCDRH2；

配列番号42で示されるアミノ酸配列からなるCDRH3；

配列番号43で示されるアミノ酸配列からなるCDRL1；

配列番号44で示されるアミノ酸配列からなるCDRL2；及び

配列番号45で示されるアミノ酸配列からなるCDRL3。

[40] 配列番号46で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118からなる重鎖可変領域及び配列番号47で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～109からなる軽鎖可変領域を含む、[39]のFab。

[41] 配列番号46で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号47で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、[39]又は[40]

の F a b。

[42] [39]～[41]のいずれか一つの F a b を含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。

[43] 当該 MHC がヒト白血球抗原 (HLA) である、[42]の多重特異性分子。

[44] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、[42]又は[43]の多重特異性分子。

[45] 多重特異性抗体である、[42]～[44]のいずれか一つの多重特異性分子。

[46] 二重特異性抗体である、[42]～[45]のいずれか一つの多重特異性分子。

[47] [42]～[46]のいずれか一つの多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[48] [47]のポリヌクレオチドを含むベクター。

[49] [47]のポリヌクレオチド又は[48]のベクターを含むか、又は、[42]～[46]のいずれか一つの多重特異性分子を産生する細胞。

[50] [49]の細胞を培養する工程を含む、[34]～[38]のいずれか一つの多重特異性分子の製造方法。

[51] [50]の方法により得られる多重特異性分子。

[52] [39]～[41]のいずれか一つの F a b、[42]～[46]のいずれか一つの多重特異性分子、[47]のポリヌクレオチド、[48]のベクター、又は、[49]の細胞を含む組成物。

[53] 下記 C D R H 1 ～ 3 及び C D R L 1 ～ 3 を含む、C D 3 に特異的に結合し、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合してなる s c F v :

配列番号 40 で示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1 ;

配列番号 41 で示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 ;

配列番号 4 2 で示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 ;

配列番号 4 3 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 1 ;

配列番号 4 4 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 ; 及び

配列番号 4 5 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3。

[5 4] 配列番号 4 8 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 ~ 1 1 8 からなる重鎖可変領域及び配列番号 4 8 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 3 4 ~ 2 4 2 からなる軽鎖可変領域を含む、[5 3]の s c F v。

[5 5] 配列番号 4 8 で示されるアミノ酸配列からなる、[5 3]又は[5 4]の s c F v。

[5 6] 配列番号 4 9 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 ~ 1 1 8 からなる重鎖可変領域及び配列番号 4 9 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 3 4 ~ 2 4 2 からなる軽鎖可変領域を含む、[5 3]の s c F v。

[5 7] 配列番号 4 9 で示されるアミノ酸配列からなる、[5 3]又は[5 6]の s c F v。

[5 8] [5 3]~[5 7]のいずれか一つの s c F v を含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。

[5 9] 当該 MHC がヒト白血球抗原 (H L A) である、[5 8]の多重特異性分子。

[6 0] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、[5 8]又は[5 9]の多重特異性分子。

[6 1] 多重特異性抗体である、[5 8]~[6 0]のいずれか一つの多重特異性分子。

[6 2] 二重特異性抗体である、[5 8]~[6 1]のいずれか一つの多重特異性分子。

[6 3] [5 8]~[6 2]のいずれか一つの多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[6 4] [6 3]のポリヌクレオチドを含むベクター。

[65] [63]のポリヌクレオチド又は[64]のベクターを含むか、又は、[58]～[62]のいずれか一つの多重特異性分子を産生する細胞。

[66] [65]の細胞を培養する工程を含む、[58]～[62]のいずれか一つの多重特異性分子の製造方法。

[67] [66]の方法により得られる多重特異性分子。

[68] [53]～[57]のいずれか一つのs c F v、[58]～[62]のいずれか一つの多重特異性分子、[63]のポリヌクレオチド、[64]のベクター、又は、[65]の細胞を含む組成物。

[69] [4]～[12]、[24]～[32]、[42]～[46]及び[58]～[62]のいずれか一つの多重特異性分子を含む医薬組成物。

[0010] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-055375号、2021-157580号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、CD3に結合するs c F vであって重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合で結合したs c F v若しくはCD3に結合するFab、並びにがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に結合する新規な二重特異性抗体（二重特異的分子）が得られる。該抗体は溶液安定性が高く、溶液状態で劣化することなく保存することが可能である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1] C3E-0002～0004のHMWS（％）の経時変化を示す図である。

[図2] 図2Aは、C3E-0002～0004の振とう劣化によるHMWS（％）経時変化を示す図であり、図2Bは、C3E-0002～0004の振とう劣化によるピーク面積の経時変化を示す図である。

[図3] 図3Aは、RX3-0001～0003のHMWS（％）経時変化を示す図であり、図3Bは、CX3-0001～0003のHMWS（％）経時変化を示す図であり、図3Cは、TX3-0001～0003のHMWS（

%) 経時変化を示す図である。

[図4-1]図4-1 Aは、RX3-0001~0003の振とう劣化によるHMS (%) 経時変化を示す図であり、図4-1 Bは、RX3-0001~0003の振とう劣化によるピーク面積の経時変化を示す図である。

[図4-2]図4-2 Aは、CX3-0001~0003の振とう劣化によるHMS (%) 経時変化を示す図であり、図4-2 Bは、CX3-0001~0003の振とう劣化によるピーク面積の経時変化を示す図である。

[図4-3]図4-3 Aは、TX3-0001~0003の振とう劣化によるHMS (%) 経時変化を示す図であり、図4-3 Bは、TX3-0001~0003の振とう劣化によるピーク面積の経時変化を示す図である。

[図5]C3E-7085-Fabのアミノ酸配列(配列番号1)

[図6]C3E-7085-LCのアミノ酸配列(配列番号2)

[図7]C3E-7096のアミノ酸配列(配列番号3)

[図8]HC__h全長のヌクレオチド配列(配列番号4)

[図9]C3E-7085-HC-k全長のヌクレオチド配列(配列番号5)

[図10]C3E-7085-Fab-HC-k全長のヌクレオチド配列(配列番号6)

[図11]C3E-7085-LC全長のヌクレオチド配列(配列番号7)

[図12]C3E-7096-HC-k全長のヌクレオチド配列(配列番号8)

[図13]HC__h全長のアミノ酸配列(配列番号9)

[図14]C3E-7085-HC-k全長のアミノ酸配列(配列番号10)

[図15]C3E-7085-Fab-HC-k全長のアミノ酸配列(配列番号11)

[図16]C3E-7085-LC全長のアミノ酸配列(配列番号12)

[図17]C3E-7096-HC-k全長のアミノ酸配列(配列番号13)

[図18]TX3-0001-HC__k全長のヌクレオチド配列(配列番号14)

[図19]TX3-0003-HC__k全長のヌクレオチド配列(配列番号15)

)

[図20] C X 3 - 0 0 0 1 - H C __ k 全長のヌクレオチド配列 (配列番号 1 6

)

[図21] C X 3 - 0 0 0 3 - H C __ k 全長のヌクレオチド配列 (配列番号 1 7

)

[図22] R X 3 - 0 0 0 1 - H C __ k 全長のヌクレオチド配列 (配列番号 1 8

)

[図23] C X 3 - 0 0 0 1 - H C __ k 全長のヌクレオチド配列 (配列番号 1 9

)

[図24] T X 3 - 0 0 0 1 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 2 0)

[図25] T X 3 - 0 0 0 3 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 2 1)

[図26] C X 3 - 0 0 0 1 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 2 2)

[図27] C X 3 - 0 0 0 3 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 2 3)

[図28] R X 3 - 0 0 0 1 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 2 4)

[図29] R X 3 - 0 0 0 3 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 2 5)

[図30] T X 3 - 0 0 0 2 - H C __ k 全長のヌクレオチド配列 (配列番号 2 6

)

[図31] C X 3 - 0 0 0 2 - H C __ k 全長のヌクレオチド配列 (配列番号 2 7

)

[図32] R X 3 - 0 0 0 2 - H C __ k 全長のヌクレオチド配列 (配列番号 2 8

)

[図33] T X 3 - 0 0 0 2 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 2 9)

[図34] C X 3 - 0 0 0 2 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 3 0)

[図35] R X 3 - 0 0 0 2 - H C __ k 全長のアミノ酸配列 (配列番号 3 1)

[図36] C 3 E - 7 0 8 5 重鎖の C D R H 1 ~ C D R H 3、及び軽鎖の C D R L 1 ~ L 3 のアミノ酸配列 (配列番号 3 2 ~ 3 7)

[図37] ペプチドリンカーのアミノ酸配列 (配列番号 3 8)

[図38A] C D 3 に結合する、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合

した $s c F v$ (VHとVLの間の黒色のバーは両者がジスルフィド結合をしていることを示す。以下同じ。))。

[図38B] CD3に結合する Fab。

[図38C] CD3に結合する、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合した $s c F v$ (右上斜線) と CD3 以外に結合する X (「他の結合部分」) を含む二重特異性分子を示した図である。右上斜線で示した $s c F v$ の配向性は、VHとVLのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。ジスルフィド結合した $s c F v$ は VH と VL がリンカーを介さず構成されていてもよい。

[図38D] CD3に結合する Fab と CD3 以外に結合する X (「他の結合部分」) を含む二重特異性分子を示した図である。

[図38E] CD3に結合する $s c F v$ と CD3 以外に結合する $s c F v$ がリンカーを介して結合した tandem $s c F v$ (taFv) を示した図である。各 $s c F v$ の配向性は、VHとVLのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。

[図38F] CD3に結合する Fab と CD3 以外に結合する $s c F v$ がリンカーを介して結合してなる $s c F v - Fab$ を示した図である。各 $s c F v$ の配向性は、VHとVLのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。

[図39A] CD3に結合する $s c F v$ と CD3 以外に結合する X (「他の結合部分」) 及び Y (「他の結合部分」又は「他の群」) を含んでなる多重特異性分子を示した図である。右上斜線で示した $s c F v$ の配向性は、VHとVLのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。XとYは $s c F v$ 、VHH、Fab等の各種抗体断片、完全抗体のいずれであっててもよい。ジスルフィド結合した $s c F v$ は、VHとVLがリンカーを介さず構成されていてもよい。Yが「他の結合部分」である場合は三重特異性分子となる。

[図39B] CD3に結合する Fab と CD3 以外に結合する X (「他の結合部分

」)及びY(「他の結合部分」又は「他の群」)を含んでなる多重特異性分子を示した図である。XとY(「他の結合部分」である場合)はs c F v、V H H、F a b等の各種抗体断片、完全抗体、免疫グロブリン以外の分子のいずれであってもよい。Yが「他の結合部分」である場合は三重特異性分子となる。

[図40A]C D 3に結合する、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合したs c F v(右上斜線)とC D 3以外に結合するX(「他の結合部分」)を含んでなるF c付加型二重特異性分子を示した図である。F cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである(F cは野生型、変異型のいずれでもよい)。右上斜線で示したs c F vの配向性は、V HとV Lのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。なお、各図におけるXとs c F vは位置が入れ替わっていてもよい。

[図40B]C D 3に結合する、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合したs c F v(右上斜線)とC D 3以外に結合するF a b若しくはs c F vを含んでなるF c付加型二重特異性分子を示した図である。F cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである(F cは野生型、変異型のいずれでもよい)。各s c F vの配向性は、V HとV Lのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。左下図は、t a F v-ヘテロダイマーF c型を示す図でもある(F cがヘテロダイマーである場合)。

[図41A]C D 3に結合する、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合したs c F v(右上斜線)とC D 3以外に結合するX(「他の結合部分」)及びY(「他の結合部分」又は「他の群」)を含んでなるF c付加型多重特異性分子を示した図である。F cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである(F cは野生型、変異型のいずれでもよい)。右上斜線で示したs c F vの配向性は、V HとV Lのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。Yが「他

の結合部分」である場合は三重特異性分子となる。なお、各図におけるX、Yとs c F vは位置が入れ替わっていてもよい。

[図41B] C D 3に結合する、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合したs c F v（右上斜線）及びC D 3以外に結合する2つの抗体断片（F a b若しくはs c F v）を含んでなるF c付加型三重特異性分子を示した図である。F cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである（F cは野生型、変異型のいずれでもよい）。各s c F vの配向性は、V HとV Lのドメインの連結順を入れ換えた、逆でのものあってもよい。

[図42] C D 3に結合するs c F v、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合したs c F v（右上斜線）及びC D 3以外に結合する「他の結合部分」又は「他の群」（それぞれX、Y及びZで示す）を含んでなるF c付加型多重特異性分子を示した図である。F cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである（F cは野生型、変異型のいずれでもよい）。右上斜線で示したs c F vの配向性は、V HとV Lのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。X、Y及びZのうち2つ又は3つが「他の結合部分」の場合は、それぞれ三重特異性分子又は四重特異性分子となる。なお、各図におけるX、Y、Zとs c F vは位置が入れ替わっていてもよい。

[図43A] C D 3に結合するF a bとC D 3以外に結合するX（他の結合部分）を含んでなるF c付加型二重特異性分子を示した図である。F cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである（F cは野生型、変異型のいずれでもよい）。

[図43B] C D 3に結合するF a bとC D 3以外に結合する抗体断片（s c F v若しくはF a b）を含んでなるF c付加型二重特異性分子を示した図である。F cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである（F cは野生型、変異型のいずれでもよい）。左上図は、s c F v－F a b－ヘテロダイマーF c型を示す図でもある（

F_cがヘテロダイマーである場合)。各s c F_vの配向性は、V_HとV_Lのドメインの連結順を入れ換えた、逆のものであってもよい。

[図44A]C D 3に結合するF a bとC D 3以外に結合するX（「他の結合部分」）及びY（「他の結合部分」又は「他の群」）を含んでなるF_c付加型多重特異性分子を示した図である。F_cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである（F_cは野生型、変異型のいずれでもよい）。Yが「他の結合部分」である場合は三重特異性分子となる。

[図44B]C D 3に結合するF a bとC D 3以外に結合する2つの抗体断片（s c F_V若しくはF a b）を含んでなるF_c付加型三重特異性分子（当該2つの抗体断片が同一であれば二重特異分子）を示した図である。F_cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである（F_cは野生型、変異型のいずれでもよい）。各s c F_vの配向性は、V_HとV_Lのドメインの連結順を入れ換えた逆のものであってもよい。

[図45]C D 3に結合するF a bとC D 3以外に結合する「他の結合部分」又は「他の群」（それぞれX、Y及びZで示す。X、Y及びZの少なくとも1つは「他の結合部分」である）を含んでなるF_c付加型多重特異性分子を示した図である。F_cは左上斜線で示す第1ポリペプチドと黒塗りで示す第2ポリペプチドが会合したフォーマットである（F_cは野生型、変異型のいずれでもよい）。X、Y及びZうち2つ又は3つが「他の結合部分」であるはそれぞれ三重特異性分子又は四重特異性分子となる。

[図46]C 3 E－7 0 9 7のアミノ酸配列（配列番号39）

[図47]C 3 E－7 0 9 3重鎖のC D R H 1～C D R H 3、及び軽鎖のC D R L 1～L 3のアミノ酸配列（配列番号40～45）

[図48]C 3 E－7 0 9 3－F a bのアミノ酸配列（配列番号46）

[図49]C 3 E－7 0 9 3－L Cのアミノ酸配列（配列番号47）

[図50]C 3 E－7 0 9 8のアミノ酸配列（配列番号48）

[図51] C 3 E - 7 0 9 9 のアミノ酸配列 (配列番号 4 9)

- [0013] 図 3 8 ~ 4 5 を通じて、X、Y 及び Z は、隣りあう部分の末端に接しているように見えるが、末端への結合又は融合は必須ではない。例えば、X、Y 及び Z が、Fc に接している (ように見える) 場合、当該 X、Y 及び Z は、Fc の N 末端又は C 末端への結合又は融合している、Fc の N 末端又は C 末端以外の部分に結合している、又は、Fc に含まれるアミノ酸に付加した糖鎖に結合又は融合している等のいずれでもよい。隣り合う部分の末端に結合又は融合していない例は、これらに限定されない。

発明を実施するための形態

- [0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

1. 定義

本発明において、「遺伝子」とは、蛋白質のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチド鎖又はその相補鎖を意味し、例えば、蛋白質のアミノ酸をコードする塩基配列が含まれるヌクレオチド鎖又はその相補鎖であるポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、DNA、mRNA、cDNA、cRNA 等は「遺伝子」の意味に含まれる。かかる遺伝子は一本鎖、二本鎖又は三本鎖以上のヌクレオチドであり、DNA 鎖と RNA 鎖の会合体、一本のヌクレオチド鎖上にリボヌクレオチド (RNA) とデオキシリボヌクレオチド (DNA) が混在するもの及びそのようなヌクレオチド鎖を含む二本鎖又は三本鎖以上のヌクレオチドも「遺伝子」の意味に含まれる。本発明において塩基配列とヌクレオチド配列は同義である。

- [0015] 本発明において、「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド鎖」、「核酸」及び「核酸分子」は同義であり、例えば、DNA、RNA、プローブ、オリゴヌクレオチド、プライマー等も「ポリヌクレオチド」の意味に含まれる。かかるポリヌクレオチドは一本鎖、二本鎖又は三本以上の鎖からなるポリヌクレオチドであり、DNA 鎖と RNA 鎖の会合体、一本のポリヌクレオチド鎖上にリボヌクレオチド (RNA) とデオキシリボヌクレオチド (DNA) が混在するもの及びそのようなポリヌクレオチド鎖を含む二本鎖又は三本以

上の鎖の会合体も「ポリヌクレオチド」の意味に含まれる。

[0016] 本発明において、「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「蛋白質」は同義である。

本発明において、「抗原」を「免疫原」の意味に用いることがある。

[0017] 本発明において、「細胞」には、動物個体に由来する各種細胞、継代培養細胞、初代培養細胞、細胞株、組換え細胞及び微生物等も含まれる。

[0018] 本発明において、「抗体」は、定常領域と可変領域とを有する免疫グロブリンの意味で用いる。抗体は、天然のものであるか、又は、部分的若しくは完全合成により製造された免疫グロブリンであるかは特に限定されない。

[0019] 基本的な4鎖抗体の構造は、2つの同一な軽鎖（L鎖）、及び、2つの同一な重鎖（H鎖）から構成される。軽鎖は1つのジスルフィド結合により重鎖に結合する。2つの重鎖は、重鎖のアイソタイプに応じて1つ又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれの軽鎖、重鎖は規則的な間隔を持つ鎖内ジスルフィド結合を持つ。重鎖と軽鎖には、アミノ酸配列が非常に高い類似性を示す定常領域とアミノ酸配列の類似性が低い可変領域とが存在する。軽鎖は、定常領域（CL）が続く可変領域（VL）をアミノ末端に有する。重鎖は3つの定常領域（CH1／CH2／CH3）が続く可変領域（VH）をアミノ末端に有する。VLとVHは対となり、CLは重鎖の第一定常領域（CH1）と並んでいる。VLとVHは対となって、単一の抗原結合部位を形成する。

[0020] 本発明の抗体の定常領域としては、特に限定されるものではないが、ヒトの疾患を治療又は予防するための本発明の抗体としては、好適にはヒト抗体の定常領域が使用される。ヒト抗体の重鎖定常領域としては、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C μ 、C δ 、C α 1、C α 2、C ϵ 等を挙げることができる。ヒト抗体の軽鎖定常領域としては、例えば、C κ 、C λ 等を挙げることができる。

[0021] Fabは、重鎖のVHとそれに続くCH1、及び、軽鎖のVLとそれに続くCLからなる。VHとVLは、相補性決定領域（CDR）を含む。VHと

CH1及びVLとCLの間にはリンカー又は連結部があってもよい。

[0022] Fc (Fc領域ともいう)は、重鎖の定常領域のカルボキシル末端領域であって、CH2とCH3を含み、二量体である。本発明のFcは、天然の配列のFcであっても、天然の配列に変異がなされた変異型のFc (「変異型Fc」という)であってもよく、本発明の多重特異性分子及び二重特異性分子において、好適なFc領域は変異型Fcであり、より好適にはヘテロ二量体を形成し得る1組のFcである。1組のFcとしては、後述の、第1ポリペプチドに含まれるFc (i) 及び第2ポリペプチドに含まれるFc (ii) の組合せをあげることができるが、1組のFcが会合 (ヘテロ二量体形成) することができれば、それらに限定されるものではない。

[0023] 変異型Fcとしては、WO2013/063702に開示される、向上した安定性を有するヘテロ多量体に含まれる改変Fc領域 (ヘテロ二量体Fc領域を含む)、WO96/27011に開示される、異種多量体に含まれる、「突起」及び「空隙」を有するIgG抗体から誘導されるイムノグロブリンのCH3領域を含むFc、WO2009/089004に開示される、1以上のアミノ酸残基を荷電アミノ酸に置換することで静電的に有利であるヘテロ二量体に含まれるCH3ドメインを含むFc、WO2014/110601に開示される、立体構造変異及び/又はpI (等電点) 変異を用いた異種二量体に含まれる異種二量体Fc領域、WO2010/151792に開示される、プロテインAへの結合を無くすか又は減少させる改変を含むCH3ドメインを含む、ヘテロ二量体のFc等が例示されるが、これらに限定されるものではない。

[0024] 可変領域は、超可変領域 (HVR: hypervariable region) と称される極度の可変性を有する領域と、その領域により分離されたフレームワーク領域 (FR: Framework region) と呼ばれる比較的不変の領域からなる。天然の重鎖と軽鎖の可変領域は、3つの超可変領域により接続される4つのFRを含み、各鎖の超可変領域はFRにより他の鎖の超可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形

成に寄与している。

- [0025] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所の相補性決定領域（CDR : Complementarity determining region）があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、通常、それぞれ3ヶ所に分離している。本発明においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。
- [0026] 本発明において、CDRの位置と長さは、IMGTの定義（Developmental and Comparative Immunology 27（2003）55-77）により決定した。
- [0027] FRは、CDR残基以外の可変領域である。可変領域は、一般にFR1、FR2、FR3、FR4の4つのFRを持つ。
- [0028] 重鎖並びに軽鎖に含まれるCDRとFRは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4、並びに、FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4、の順にそれぞれ配置される。
- [0029] CDRとFRの位置は、当技術分野で周知の様々な定義、例えば、IMGT以外にも、Kabat、Chothia、AbM、contact等の定義により決定することもできる。
- [0030] 本発明において、抗体が結合する「部位」、すなわち抗体が認識する「部位」とは、抗体が結合又は認識する抗原上の部分ペプチド又は部分高次構造を意味する。
- [0031] 本発明においては、かかる部位のことをエピトープ、抗体の結合部位とも

呼ぶ。本発明において、「変異抗体」とは、元の抗体が有するアミノ酸配列においてアミノ酸が置換、欠失、付加（付加には挿入が含まれる）（以下、「変異」と総称する）してなるアミノ酸配列を有し、且つ本発明の標的とする抗原に結合するポリペプチドを意味する。かかる変異抗体における変異アミノ酸の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、40又は50個である。かかる変異抗体も本発明の「抗体」に包含される。

[0032] 本発明において、「1又は数個」における「数個」とは、2～10個を指す。

[0033] 本明細書中において、「分子」は、上述の抗体、抗体の抗原結合断片を含む分子であり、さらに抗体又はそれらに由来する複数の抗原結合断片より形成された多重特異的である分子を含む。

[0034] 本明細書中において、「多重特異的である分子」、「多重特異的（な）分子」及び「多重特異性分子」は同義であり、1つの分子上の複数の互いに異なるエピトープ、及び／又は、2つ以上の分子上の互いに異なるエピトープに結合することが可能な分子であれば特に限定されない。多重特異的である分子としては、重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む抗体も含まれる。本発明においては、このような多重特異性分子を、「多重特異的抗体」、「多重特異性抗体」等とも呼ぶことがある。「2つ以上の抗原を認識する」とは「1つの分子上の複数の互いに異なるエピトープに結合すること」又は「2つ以上の分子上の互いに異なるエピトープに結合する」ことを意味する。

[0035] 本明細書中においては、凝集体とはタンパク質が集まって生成されたものであり、粒径により検出できる分析法が異なる。粒径100nm程度以下の凝集体はHPLCなどのサイズ排除クロマトグラフィーにより評価することができる。粒径100nm以上のSubvisible particles（粒径0.1～10μm）や不溶性微粒子（粒径10μm以上）はMicroflow Imaging法などを用いて評価することができる。

[0036] 本明細書において、「HMWS」とは、high molecular weight speciesの略であり、サイズ排除クロマトグラフィーなどを用いたサイズ分画により、得られるクロマトグラムにおいて目的タンパク質のメインピーク画分よりもサイズが大きく分画されるタンパク凝集画分を総称する用語である。「HMWS (%)」とは、目的タンパク質が含まれる溶液サンプルをHPLCなどのサイズ排除クロマトグラフィーに供し、溶出パターンを検出波長280nmにてモニターし、得られたクロマトグラムにおける総ピーク面積に占める、目的タンパク質のメインピーク画分より高分子側に表れたピーク画分の面積の割合を、百分率法により算出した値、を意味する。

2. 抗原

2-1. CD3抗原

本発明において、「CD3」は、CD3蛋白質と同じ意味で用いている。

[0037] CD3は、多分子T細胞レセプター複合体の一部としてT細胞上に発現され、 γ 鎖、 δ 鎖、 ϵ 鎖、 ζ 鎖、 η 鎖の5種類のポリペプチド（分子量は順に25000-28000、21000、20000、16000、22000）の複合体である。

[0038] CD3複合体としては、 γ 、 δ 、 ϵ 、 ζ 、 η 鎖が挙げられる。これらはサブユニットとも称される。抗CD3抗体がT細胞に結合することにより、T細胞活性化を介して細胞傷害を誘導する。多くの抗CD3抗体は、CD3 ϵ に結合する。

[0039] ヒトCD3 ϵ をコードするcDNAのヌクレオチド配列は、NCBI/GenBankにアクセッション番号：NM_000733 (NM_000733.3) で、ヒトCD3 ϵ のアミノ酸配列はNCBI/GenPeptにアクセッション番号：NP_000724 (NM_000724.1) で、それぞれ登録されている。カニクイザルCD3をコードするcDNAのヌクレオチド配列は、GenBankにアクセッション番号：NM_001283615.1で登録されている。

2-2. 標的分子

本発明において、標的分子は、生体に存在するCD3以外の分子であれば特に限定されないが、好適には、治療標的細胞（がん細胞、間質細胞、及び抑制性の免疫細胞を例示できるが、それらに限定されない）の表面に発現しており、CD3発現T細胞のリダイレクションにより当該がん細胞に細胞傷害活性を発揮させる分子であり、より好適には、がん精巣抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）の複合体ではない。

[0040] がん精巣抗原ペプチドは、がん細胞表面抗原ペプチドの1種であり、例えば、MAGEペプチド、XAGEペプチド、LAGE familyペプチド等が挙げられる。MHCはヒト白血球抗原（HLA）、マウスH-2等があり、HLAはクラス1とクラス2に分類され、クラス1はHLA-A、HLA-B及びHLA-Cが、クラス2はHLA-DR、HLA-DP及びHLA-DQ等をそれぞれ含む。がん精巣抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体として、例えば、(1) HLA-A2、(2) β 2-Microglobulin及び(3) MAGE-A3、A4、A10又はLAGEペプチド（例えば、UniProtKB-P78358 (CTG1B HUMAN) のアミノ酸番号157～165）の三者複合体である、HLA-A2/MAGE-A3、A4、A10又はHLA-A2/LAGEが挙げられる。

[0041] 本発明において、がん精巣抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない好適な標的分子として、好ましくはがん抗原ペプチド若しくはがん抗原が挙げられ、具体的には、WT1、gp100、p53、KRAS、CD19、CD20、CD33、CD37、CD38、CD98、CD123、EGFR、HER2、HER3、HER4、EpCAM、CEA、PSMA、B7-H3、Trop-2、BCMA、GPCR5D等が例示できる。間質細胞に対する標的分子としては、FAP、CDH17、LRRC15等を例示できる。骨髄由来免疫抑制細胞（MDSC）に対する標的分子としては、CD33を例示できる。

2-3. 抗原の調製

本発明で用いる上述の抗原蛋白質；CD3及びがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子であるその他の抗原蛋白質は、動物組織（体液を含む）、該組織由来の細胞若しくは該細胞培養物からの精製及び単離、遺伝子組換え、インビトロ翻訳、化学合成等により調製することができる。

[0042] 該抗原蛋白質のcDNAは、例えば、該抗原蛋白質のmRNAを発現している臓器のcDNAライブラリーを鋳型として、該抗原蛋白質のcDNAを特異的に増幅するプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（以下「PCR」という）（Saiki, R. K., et al., Science (1988) 239, 487-49）を行う、いわゆるPCR法により取得することができる。

[0043] ヒト又はラットに発現している該抗原蛋白質をコードするヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、該抗原蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドも、該抗原蛋白質のcDNAに含まれる。さらに、ヒト又はラットに発現している該抗原蛋白質遺伝子座から転写されるスプライシングバリエント又はこれにストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、且つ、該抗原蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするポリヌクレオチドも、該抗原蛋白質のcDNAに含まれる。

[0044] ヒト又はラットの該抗原蛋白質のアミノ酸配列、又はこれらの配列からシグナル配列が除かれたアミノ酸配列において、1乃至数個のアミノ酸が、置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、該抗原蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質をコードするヌクレオチド配列も、該抗原蛋白質遺伝子のヌクレオチド配列に含まれる。

[0045] ヒト又はラットの該抗原蛋白質の遺伝子座から転写されるスプライシングバリエントにコードされるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列において、1又

は数個のアミノ酸が、置換、欠失又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、該抗原蛋白質と同等の生物活性を有する蛋白質も、該抗原蛋白質に含まれる。

[0046] がん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子も同様の手法で調製することができる。

2-4. 抗原蛋白質への結合特異性

本発明の多重特異性分子に含まれる抗CD3抗体及びその結合断片等は、CD3抗原を認識、すなわち、結合する。かかる抗CD3抗体等は、好適には、ヒトCD3、サルCD3等に結合し、より好適には、ヒトCD3及びカニクイザルCD3に結合する。一方、かかる好適な抗CD3抗体は、ラット及び／又はマウスのCD3には結合しない。

[0047] また、本発明の多重特異性分子に含まれる、標的分子、好適には抗がん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に対する抗体及びその結合断片等は、当該標的分子を認識、すなわち、結合する。

[0048] 本発明において「認識」、すなわち「結合」とは、非特異的な吸着ではない結合を意味する。認識しているか否か、すなわち、結合しているか否かの判定基準としては、例えば、解離定数（Dissociation Constant：以下、「KDという」）を挙げることができる。本発明の好適な抗体等の抗原蛋白質に対するKD値は、 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 以下、 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 以下、 $2 \times 10^{-6} \text{M}$ 以下、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 以下である。

[0049] 本発明における抗原と抗体の結合は、SPR法、BLI法等の生体分子間相互作用解析システム、あるいはELISA法、RIA法等により測定又は判定することができる。細胞表面上の発現している抗原と抗体との結合は、フローサイトメトリー法等により測定することができる。

[0050] SPR法（Surface Plasmon Resonance解析法）は、反応速度論的（カイネティクス）解析により結合速度定数（Ka値）と解離速度定数（Kd値）を計測することによりアフィニティーの指標とな

る解離定数（KD値）等を求める分析手法として用いられている。SPR解析に用いる機器としては、Biacore（商標）（GEヘルスケア社製）、Protein（商標）（BioRad社製）、SPR-Navis（商標）（BioNavis社製）、Spreeta（商標）（Texas Instruments社製）、SPRi-PlexII（商標）（ホリバ社製）、Autolab SPR（商標）（Metrohm社製）等を例示することができる。

[0051] BLI法（BioLayer Interferometry）は、バイオレイヤー干渉を用いた生体分子間相互作用を計測する方法である。BLI法を用いた相互作用解析に用いる機器としては、Octetシステム（Pall ForteBio社製）等を例示することができる。

[0052] ELISA（Enzyme-linked Immunosorbent Assay）法は、試料溶液中に含まれる目的の抗原あるいは抗体を、特異抗体あるいは抗原で捕捉するとともに、酵素反応を利用して検出・定量する方法である。酵素標識した抗原あるいは抗体を反応系に組込んで、酵素活性を検出する。酵素活性の検出には、反応によって吸光スペクトルが変化する基質が用いられ、吸光度測定で数値化する。

[0053] Cell-ELISAでは、細胞表面にある測定対象を細胞ごと捕捉するとともに、酵素反応を利用して検出・定量する方法である。

[0054] RIA法（Radio Immunoassay法）では、放射性物質を使って抗体を標識し、抗体からの放射能を測定することで、抗体の定量をすることができる。

[0055] フローサイトメトリー法は、細胞を流体中に分散させ、その流体を細く流して、個々の細胞を光学的に分析する手法である。蛍光色素で標識された抗体が、抗原抗体反応により細胞表面抗原に結合し、細胞に結合した標識された抗体による蛍光強度を測定することにより、抗体の抗原結合性を定量する。

3. 抗原蛋白質に特異的に結合する抗体又はその結合断片

3-1. CD3に特異的に結合する抗体又はその結合断片

本発明のCD3に特異的に結合する抗CD3抗体及び該抗体の抗原結合断片（以下、本発明の抗体等とも記す）は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれであってもよい。本発明のモノクローナル抗体のアイソタイプは、特に限定されるものではなく、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のIgG、IgM、IgA1、IgA2等のIgA、IgD、Ig等をあげることができる。モノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスは、例えば、オクテロニー法、ELISA法、RIA法等で決定することができる。本発明のモノクローナル抗体としては、非ヒト動物由来の抗体（非ヒト動物抗体）、ヒト抗体、キメラ化抗体（「キメラ抗体」ともいう）、ヒト化抗体などを挙げることができ、好ましくはヒト抗体を用いることができる。本発明の抗体の範囲には、抗体の変異体（後述の「変異抗体」）も含まれ、例えば、ヒト抗体の範囲には、ヒト変異抗体も含まれる。

[0056] 非ヒト動物抗体としては、哺乳類、鳥類等の脊椎動物に由来する抗体などを挙げることができる。哺乳類由来の抗体としては、マウス抗体、ラット抗体などのげっ歯類由来の抗体などを挙げることができる。鳥類由来の抗体としては、ニワトリ抗体等を挙げることができる。

[0057] キメラ化抗体としては、非ヒト動物抗体由来の可変領域とヒト抗体（ヒト免疫グロブリン）定常領域とを結合してなる抗体などを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0058] ヒト化抗体としては、非ヒト動物抗体の可変領域中のCDRをヒト抗体（ヒト免疫グロブリンの可変領域）に移植したもの、CDRに加え非ヒト動物抗体のフレームワーク領域の配列も一部ヒト抗体に移植したもの、それらのいずれかの非ヒト動物抗体由来の1つ又は2つ以上のアミノ酸をヒト型のアミノ酸で置換したものなどを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0059] 抗体は、公知の種々の方法で作製することができる。公知の方法として、ハイブリドーマを用いる方法や細胞免疫法等により作製し、遺伝子組換えの

手法により作製することができる。また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を $scFv$ としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法を用いることができる。抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原に結合する $scFv$ の DNA 配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる (WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388, *Ann u. Rev. Immunol* (1994) 12, 433-455)。

[0060] このようにして得られた高活性を有する抗体をリード抗体として用い、該リード抗体をコードする遺伝子を変異させて、より高活性の変異体（後述の「変異抗体」）を作製することもできる。

[0061] 本発明の一つの態様として、本発明の抗体の抗原結合断片（以下、単に「結合断片」という）を提供する。本発明の抗 CD 3 抗体又はがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原 (HLA) の複合体ではない標的分子に対する抗体の結合断片には、キメラ化抗体、ヒト化抗体、又は、ヒト抗体の結合断片が包含される。抗体の結合断片とは、該抗体の有する機能のうち少なくとも抗原結合性を保持する断片又はその修飾物を意味する。かかる抗体の機能としては、一般的には、抗原結合活性、抗原の活性を調節する活性（例えばアゴニスト活性）、抗原を細胞内に内在化させる活性、抗原と相互作用する物質との相互作用を阻害若しくは促進する活性等を挙げることができる。

[0062] 抗体の抗原結合断片としては、該抗体の有する活性のうち少なくとも抗原結合性を保持している該抗体の断片であれば特に限定されないが、例えば、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、重鎖及び軽鎖の Fv を適当なリンカーで連結させた一本鎖 Fv ($scFv$)、単ドメイン抗体 ($s d A b$)

、等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。リンカー部分を保有する s c F v のように、本発明の抗体の抗原結合断片以外の部分を含む分子も、本発明の抗体の抗原結合断片の意味に包含される。

[0063] この中でも F a b や s c F v が好ましい。

[0064] F a b は、図 3 8 B に示すとおり、重鎖の可変領域及び定常領域 C H 1、並びに、軽鎖の可変領域及び定常領域 C L を含む抗原結合断片である。F a b は、完全抗体からパパインなどの酵素消化処理によっても得ることができる。

[0065] s c F v は、抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをポリペプチドのリンカーで連結することにより得られる抗体の抗原結合断片である (P l u c k t h u n A. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113, Rosenberg 及び Moore 編, Springer Verlag, New York, 269-315 (1994), Nature Biotechnology (2005), 23, 1126-1136)。また、2つの s c F v をポリペプチドリリンカーで結合させて作製されるタンデム s c F v も二重特異性分子として使用することができる。さらに3つ以上の s c F v より成るトリアボディ等多重特異性分子として使用することができる。

[0066] s c F v は、抗体の可変領域を一本鎖抗体 (s c F v) としてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法 (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116) により取得することができる。抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする DNA 配列を決定することができる。抗原に結合する s c F v の DNA 配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる (WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、

WO 95/01438、WO 95/15388、Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433-455、Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p. 1105-1116)。

[0067] 本発明の抗CD3 scFvにおいて、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合している。このようなscFvは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合していないscFvと同様に、哺乳類培養細胞を用いて発現することができる。

[0068] 軽鎖可変領域の位置と長さは、IMGTの定義により決定する場合と比べ、IMGTとは異なる定義（例えば、Kabat、Chothia、AbM, contact等）を用いて決定した場合、IMGTの定義により決定した該軽鎖可変領域アミノ酸配列のカルボキシル末端に、さらに、1つ又は2つ以上のアミノ酸、例えば、アルギニンやグリシンが含まれることがある。このような軽鎖可変領域を有する抗体又はその結合断片も本発明の抗体又はその結合断片に包含される。

[0069] 抗CD3抗体又はその抗原結合断片は、ヒトCD3に結合する抗体又はその結合断片であれば特に限定されるものではないが、好適にはカニクイザル等の非ヒト霊長類のCD3にも結合する。より好適な抗CD3抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号32で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDRH1、配列番号33で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDRH2、配列番号34で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDRH3、配列番号35で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDRL1、配列番号36で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDRL2、及び、配列番号37で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDRL3（以上、図36）を含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。

[0070] 図36に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含むより好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号1（図5）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118のアミノ酸配列からなるC3

E-7085 重鎖可変領域、配列番号3（図7）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118のアミノ酸配列からなるC3E-7096 重鎖可変領域、配列番号39（図46）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118のアミノ酸配列からなるC3E-7097 重鎖可変領域を含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。なお、7096 重鎖可変領域のアミノ酸番号110には、C3E-7096 軽鎖可変領域のアミノ酸番号177とS-S結合を形成するようにシステインが追加され、7097 重鎖可変領域のアミノ酸番号44には、C3E-7097 軽鎖可変領域のアミノ酸番号233とS-S結合を形成するようにシステインが追加されている。

[0071] また、図36に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含むより好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号2（図6）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～107のアミノ酸配列からなるC3E-7085 軽鎖可変領域、配列番号3（図7）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～240のアミノ酸配列からなるC3E-7096 軽鎖可変領域、配列番号39（図46）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～240のアミノ酸配列からなるC3E-7097 軽鎖可変領域を含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。なお、7096 軽鎖可変領域のアミノ酸番号177には、7096 重鎖可変領域のアミノ酸番号110とS-S結合を形成するようにシステインが追加され、7097 軽鎖可変領域のアミノ酸番号233には、C3E-7097 重鎖可変領域のアミノ酸番号44とS-S結合を形成するようにシステインが追加されている。

[0072] また、図36に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含むより好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号1（図5）で表されるアミノ酸番号1～118及び配列番号2（図6）で表される1～107からなるC3E-7085 重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せ、配列番号3（図7）で表されるアミノ酸番号1～118及び134～24

0からなるC3E-7096重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せ、配列番号39（図46）で表されるアミノ酸番号1～118及び134～240からなるC3E-7097重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せを含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。

[0073] さらに、図36に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含むより好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号1（図5）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～216のアミノ酸配列と配列番号2（図6）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～213のアミノ酸配列からなるC3E-7085Fabを例示することができる。

[0074] さらに、図36に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含むより好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号3（図7）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～240のアミノ酸配列からなるC3E-7096scFv、配列番号39（図46）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～240のアミノ酸配列からなるC3E-7097scFvを例示することができる。

[0075] また、他の好適な抗CD3抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号40で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDRH1、配列番号41で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDRH2、配列番号42で表されるアミノ酸配列からなる重鎖可変領域CDRH3、配列番号43で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDRL1、配列番号44で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDRL2、及び、配列番号45で表されるアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域CDRL3（以上、図47）を含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。

[0076] 図47に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含む好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号46（図48）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118のアミノ酸配列からなるC3E-7093重鎖可変領域、配列番号48（図50）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118のアミノ酸配列からなるC3E-7098重鎖

可変領域、配列番号49（図51）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118のアミノ酸配列からなるC3E-7099重鎖可変領域を含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。なお、C3E-7098重鎖可変領域のアミノ酸番号110には、C3E-7098軽鎖可変領域のアミノ酸番号177とS-S結合を形成するようにシステインが追加され、C3E-7099重鎖可変領域のアミノ酸番号44には、C3E-7099軽鎖可変領域のアミノ酸番号235とS-S結合を形成するようにシステインが追加されている。

[0077] また、図47に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含む好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号47（図49）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118のアミノ酸配列からなるC3E-7093軽鎖可変領域、配列番号48（図50）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～242のアミノ酸配列からなるC3E-7098軽鎖可変領域、配列番号49（図51）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～242のアミノ酸配列からなるC3E-7099軽鎖可変領域を含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。なお、C3E-7098軽鎖可変領域のアミノ酸番号177には、C3E-7098重鎖可変領域のアミノ酸番号110とS-S結合を形成するようにシステインが追加され、C3E-7099軽鎖可変領域のアミノ酸番号235には、C3E-7099重鎖可変領域のアミノ酸番号44とS-S結合を形成するようにシステインが追加されている。

[0078] また、図47に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含む好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号46（図48）で表されるアミノ酸番号1～118及び配列番号47（図49）で表される1～109からなるC3E-7093重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せ、配列番号48（図50）で表されるアミノ酸番号1～118及び134～242からなるC3E-7098重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せ、配列番号49（図51）で表されるアミノ酸番号1～118及び134

～242からなるC3E-7099重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の組合せを含んでなる抗体又はその抗原結合断片を例示することができる。

[0079] さらに、図46に示す該CDRH1～CDRH3及びCDRL1～CDRL3を含むより好適な抗体又はその抗原結合断片としては、配列番号46（図48）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～216のアミノ酸配列と配列番号47（図49）で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～215のアミノ酸配列からなるC3E-7093Fabを例示することができる。

[0080] また、CD3に結合する、VHとVLがジスルフィド結合しているscFvは、VHとVLの間に、リンカー、連結部、又はその他任意の部分（portion）が含まれていてもよく、かかるscFvが本発明の多重特異性分子に含まれていても、同様である。例えば、抗CD3scFvのVHとVLの間に、後述する「他の結合部分」、「他の群」又はそれらの一部が含まれていてもよい。

3-2. 標的分子に結合する抗体又はその結合断片

「2-2. 標的分子」に結合する抗体又はその結合断片は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれであってもよい。本発明のモノクローナル抗体のアイソタイプは、特に限定されるものではなく、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等のIgG、IgM、IgA1、IgA2等のIgA、IgD、Ig等をあげることができる。モノクローナル抗体のアイソタイプ及びサブクラスは、例えば、オクテロニー法、ELISA法、RIA法等で決定することができる。本発明のモノクローナル抗体としては、非ヒト動物由来の抗体（非ヒト動物抗体）、ヒト抗体、キメラ化抗体（「キメラ抗体」ともいう）、ヒト化抗体などを挙げることができ、好ましくはヒト抗体を用いることができる。本発明の抗体の範囲には、抗体の変異体（後述の「変異抗体」）も含まれ、例えば、ヒト抗体の範囲には、ヒト変異抗体も含まれる。

[0081] 非ヒト動物抗体としては、哺乳類、鳥類等の脊椎動物に由来する抗体など

を挙げることができる。哺乳類由来の抗体としては、マウス抗体、ラット抗体などのげっ歯類由来の抗体などを挙げることができる。鳥類由来の抗体としては、ニワトリ抗体等を挙げることができる。

[0082] キメラ化抗体としては、非ヒト動物抗体由来の可変領域とヒト抗体（ヒト免疫グロブリン）定常領域とを結合してなる抗体などを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0083] ヒト化抗体としては、非ヒト動物抗体の可変領域中のCDRをヒト抗体（ヒト免疫グロブリンの可変領域）に移植したもの、CDRに加え非ヒト動物抗体のフレームワーク領域の配列も一部ヒト抗体に移植したもの、それらのいずれかの非ヒト動物抗体由来の1つ又は2つ以上のアミノ酸をヒト型のアミノ酸で置換したものなどを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0084] 抗体は、公知の種々の方法で作製することができる。公知の方法として、ハイブリドーマを用いる方法や細胞免疫法等により作製し、遺伝子組換えの手法により作製することができる。また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域をscFvとしてファージ表面に発現させて、抗原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法を用いることができる。抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる（WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388、Ann u. Rev. Immunol (1994) 12, 433-455）。

[0085] このようにして得られた高活性を有する抗体をリード抗体として用い、該リード抗体をコードする遺伝子を変異させて、より高活性の変異体（後述の

「変異抗体」)を作製することもできる。

[0086] 抗体の抗原結合断片としては、該抗体の有する活性のうち少なくとも抗原結合性を保持している該抗体の断片であれば特に限定されないが、例えば、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、 Fv 、重鎖及び軽鎖の Fv を適当なリンカーで連結させた一本鎖 Fv ($scFv$)、単ドメイン抗体 ($s dAb$)、等を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。リンカー部分を保有する $scFv$ のように、本発明の抗体の抗原結合断片以外の部分を含む分子も、本発明の抗体の抗原結合断片の意味に包含される。

[0087] がん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原 (HLA) の複合体ではない標的分子に対する $scFv$ は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合していてもよい。

3-3. 抗体又はその抗原結合断片の変異体

本発明の抗体又はその抗原結合断片の変異体には、好適には、蛋白質の分解若しくは酸化に対する感受性の低下、生物活性や機能の維持、改善若しくは低下や変化の抑制、抗原結合能の改善若しくは調節、又は理化学的性質若しくは機能的性質の付与等がなされ得る。蛋白質は、その表面にある特定のアミノ酸側鎖が変化して当該蛋白質の機能や活性が変化することが知られ、そのような例には、アスパラギン側鎖の脱アミド化、アスパラギン酸側鎖の異性化等が含まれる。そのようなアミノ酸側鎖の変化を防ぐために別のアミノ酸に置き換えたものも、本発明の変異体の範囲に含まれる。

[0088] 本発明の変異体の例として、抗体又はその抗原結合断片の有するアミノ酸配列において保存的アミノ酸置換されてなるアミノ酸配列を有する抗体又はその抗原結合断片を挙げることができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。

[0089] 好適なアミノ酸グループは、以下の通りである：酸性グループ＝アスパラギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び非常電極性ファミ

リー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン。かかる変異抗体におけるアミノ酸置換は、元の抗体が有する抗原結合活性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

3－4．抗体又はその結合断片の修飾体、複合体

本発明は、抗体又はその結合断片の修飾体を提供する。本発明の抗体又はその結合断片の修飾体とは、本発明の抗体又はその結合断片に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N－結合又はO－結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、N－結合又はO－結合への糖鎖付加、アミノ末端領域又はカルボキシル末端領域のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによりアミノ末端にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティー標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体又はその結合断片の修飾物は、元の本発明の抗体又はその結合断片の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、かかる抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

[0090] 化学的修飾体に含まれる化学部分としては、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール等の水溶性ポリマーを例示することができる。

[0091] 生物学的な修飾物としては、酵素処理や細胞処理等により修飾が施されたもの、遺伝子組換えによりタグ等他のペプチドが付加された融合体、並びに

内因性又は外来性の糖鎖修飾酵素を発現する細胞を宿主として調製されたものの等を挙げることができる。

[0092] かかる修飾は、抗体又はその結合断片における任意の位置に、又は所望の位置において施されてもよく、1つ又は2つ以上の位置に同一又は2種以上の異なる修飾がなされてもよい。

[0093] しかし、これらの重鎖配列の欠失、あるいは、重鎖又は軽鎖配列の修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用など）にはあまり影響を及ぼさない。

[0094] 従って、本発明には当該欠失又は修飾を受けた抗体も含まれる。例えば、重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失した欠失体（*Journal of Chromatography A*; 705; 129-134（1995））、重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化された当該欠失体（*Analytical Biochemistry*, 360: 75-83（2007））、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端のグルタミン又はグルタミン酸残基がピログルタミル化修飾された抗体（国際特許公開WO2013/147153号）等を挙げることができる（それらをまとめて「欠失体」と呼ぶ）。ただし、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖及び軽鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体が2本以上の鎖（例えば重鎖）を含む場合、当該2本以上の鎖（例えば重鎖）は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であっても良いし、いずれか二種を組合せたものであっても良い。各欠失体の量比又は分子数比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の双方でカルボキシル末端の1つのアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。

[0095] さらに、本発明の抗体又はその抗原結合断片（本発明の分子、多重特異的

分子、二重特異的分子等に含まれるもの等)に、発現ベクター及び／又はシグナル配列等に由来する1乃至数個のアミノ酸がアミノ末端及び／又はカルボキシル末端に付加され(且つその一部又は全部が前記のように修飾され)ていても、所望の抗原結合活性が維持されていれば、本発明の抗体の修飾体又はその抗原結合断片の修飾体の範囲に包含され、そのような抗体又は抗原結合断片の修飾体を含む分子も本発明の分子の範囲に包含される。

[0096] 本発明において「抗体又はその結合断片」は「抗体又はその抗原結合断片の修飾体」もその意味に含むものである。また、本発明の分子、多重特異的な分子、二重特異的な分子等に含まれる「抗体又はその抗原結合断片」はかかる「抗体又はその抗原結合断片の修飾体」もその意味に含むものである。

[0097] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること(グリコシル化、脱フコース化等)によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際特許公開WO 99/54342号、WO 00/61739号、WO 02/31140号等が知られているが、これらに限定されるものではない。

[0098] 本発明には、上述の抗体と他の分子がリンカーでつながれた複合体(Immun conjugate)も含まれる。該抗体が放射性物質や薬理作用を有する化合物(薬物)と結合している抗体-薬物複合体の例としては、ADC(Antibody-Drug Conjugate)を挙げることができる(Methods Mol Biol. (2013) 1045:1-27; Nature Biotechnology (2005) 23, p. 1137-1146)。

[0099] 更に本発明には、これらの抗体と他の機能性ポリペプチドを繋げた複合体も含まれる。このような抗体-ペプチド複合体の例としては、該抗体がアルブミン結合ポリペプチドと複合体を挙げることができる(Protein Eng Des Sel. (2012) (2): 81-8)。

[0100] 上述の抗体の修飾体、糖鎖修飾を調節された抗体、複合体は、本発明の抗体に包含され、上述の抗体の修飾体、糖鎖修飾を調節された抗体、複合体の

結合断片は、本発明の抗体の結合断片に包含される。

4. 抗体又はその抗原結合断片の産生方法

本発明の抗体又はその抗原結合断片は、例えば、重鎖可変領域をコードするDNA又は軽鎖可変領域をコードするDNAを発現ベクターに挿入し、発現用の宿主細胞を該ベクターで形質転換し、宿主細胞を培養することにより、リコンビナント抗体として細胞に産生させることができる。

[0101] 抗体又はその抗原結合断片をコードするDNAは、重鎖可変領域をコードするDNAと重鎖定常領域をコードするDNAを連結することにより重鎖をコードするDNAが得られ、さらに軽鎖可変領域をコードするDNAと軽鎖定常領域をコードするDNAを連結することにより軽鎖をコードするDNAが得られる。

[0102] 本発明の抗体又はその抗原結合断片は、上記の重鎖をコードするDNA及び軽鎖をコードするDNAを発現ベクターに挿入し、宿主細胞を該ベクターで形質転換し、該宿主細胞を培養して産生させることができる。この際、上記の重鎖をコードするDNA及び軽鎖をコードするDNAを同じ発現ベクターに導入し、該ベクターを用いて宿主細胞を形質転換してもよい、重鎖をコードするDNAと軽鎖をコードするDNAを別々のベクターに挿入し、2つのベクターを用いて宿主細胞を形質転換してもよい。この際、重鎖定常領域をコードするDNA及び軽鎖定常領域をコードするDNAを予め導入したベクターに重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードするDNAを導入してもよい。また、該ベクターは宿主細胞からの抗体の分泌を促進するシグナルペプチドをコードするDNAを含んでいてもよい、この場合、シグナルペプチドをコードするDNAと抗体又はその抗原結合断片をコードするDNAをインフレームで連結しておく。抗体又はその抗原結合断片が産生された後にシグナルペプチドを除去することにより、抗体又はその抗原結合断片を成熟タンパク質として得ることができる。

[0103] この際、重鎖可変領域をコードするDNA、軽鎖可変領域をコードするDNA、重鎖可変領域をコードするDNA及び重鎖定常領域をコードするDN

Aを連結したDNA、軽鎖可変領域をコードするDNAと軽鎖定常領域をコードするDNAを連結したDNAをプロモータ、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル等のエレメントと機能的に連結してもよい。ここで機能的に連結とは、エレメントがその機能を果たすように連結することをいう。

[0104] 発現ベクターは、動物細胞、細菌、酵母等の宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、公知のプラスミド、ファージ等が挙げられる。発現ベクターの構築に用いられるベクターとしては、例えば、p cDNA (商標) (Thermo Fisher Scientific社)、Flexi (登録商標) ベクター (プロメガ社)、pUC19、pUEX2 (アマシャム社製)、pGEX-4T、pKK233-2 (ファルマシア社製)、pMAM-neo (クロンテック社製) 等が挙げられる。宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌等の原核細胞も酵母、動物細胞等の真核細胞も用いることができるが、真核細胞を用いることが好ましい。例えば、動物細胞として、ヒト胎児腎細胞株であるHEK293細胞、チャイニーズ・ハムスター・卵巣 (CHO) 細胞等を用いればよい。発現ベクターは公知の方法で宿主細胞に導入し、宿主細胞を形質転換すればよい。例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストラントランスフェクション法等が挙げられる。産生された抗体は、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用して精製することができる。例えば、アフィニティークロマトグラフィー、その他のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択し、組合せればよい。

5. 多重特異性分子

本発明の多重特異性分子は、本発明のCD3に結合するscFvであって重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合で結合したscFv、又は、CD3に結合するFab (以下、「本発明のCD3抗体」という) を含み、且つ、CD3以外の標的分子、好適には、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) の複合体ではない標的分子に結合する部分 (moiety) (以下、「他の結合部分」という) を含む分子であれば特

に限定されるものではなく、「本発明のCD3抗体」及び「他の結合部分」以外に、さらに他の群（group）（以下、「他の群」という）を含んでもよい。「他の結合部分」としては、抗体又はその結合断片、免疫グロブリン由来ではないタンパク質又はペプチド、核酸アプタマー等の核酸分子、低分子化合物、T細胞受容体等を例示することができる。「他の群」としては、生物学的活性、薬理作用、治療効果、予防効果、アジュバント作用、体内動態調節機能、又は標識機能等を奏する化合物（タンパク質、ペプチド、核酸分子、低分子化合物、放射性同位元素を含む化合物、標識物質を含む化合物、人工的に合成したもの、医薬成分、抗腫瘍剤等）、その前駆体（プロドラッグ等）、それらの化合物にリンカー又は連結部が結合又は融合してなるものを例示することができる。「本発明のCD3抗体」及び「他の結合部分」、並びに、任意で「他の群」は、互いに直接結合又は融合していても、リンカーや連結部を介して間接的に結合又は融合していてもよい。「他の結合部分」は1つ以上あればよく、2つ、3つ、又はそれ以上であってもよい。「他の群」は、任意で、1つ、2つ又はそれ以上であってもよい。それらは直線的に結合又は融合していても、分枝して結合又は融合していてもよく、結合又は融合の順序及び分枝の位置等に何ら限定はない。そのような本発明の多重特異性分子は、図38A～F、図39A及びB、図40A及びB、図41A及びB、図42、図43A及びB、図44A及びB、並びに、図45に例示されるフォーマットであるか、又は、例示されるフォーマットを含んでいてもよいが、それらに限定されるものではない。

- [0105] 本発明の好適な多重特異性分子として、多重特異性抗体等の多重特異性蛋白質（全体としてポリペプチド及び／又はペプチドから構成される分子）を例示することができる。多重特異性抗体としては、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体を挙げることができる。「二重特異性」（又は「三重特異性」、「四重特性」等）とは、同一分子の2つ（又は3つ、4つ等）の互いに異なるエピトープ又は2つ分子上（又は3つ分子上、4つ分子上等）の互いに異なるエピトープに結合することが可能であることを意味し、

このような二重特異性を有する抗体又は抗原結合断片を包含する。本発明の二重特異性分子は、CD3に結合し、さらに標的分子、好適には、がん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に結合する。

[0106] 本発明の多重特異性分子として以下の構造（フォーマット）を有するものが挙げられる。

[0107] 本発明の二重特異性分子として、二量体のFcの一方に第1の抗体のFabと第2の抗体のscFvをリンカーを介して結合させた二重特異性分子が挙げられる。この場合、FcにFabを結合させ、該FabにscFvを結合させてもよいし、FcにscFvを結合させ、該scFvにFabを結合させてもよい。好ましくは、Fabを結合させ、該FabにscFvを結合させる。FabとscFvの結合は、Fabの可変領域にリンカーを介してscFvを結合させればよい。該二重特異性分子は、scFvとFabをリンカーでつなげた下流にヘテロダイマーを形成する変異をいれたFcが会合したフォーマットである。このような二重特異性分子をscFv-Fab-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子又はscFv-Fab-ヘテロダイマーFc型と呼ぶ（図43B左上）。

[0108] 本発明においては、例えば、抗CD3 Fabとがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に対するscFvからなるscFv-Fab-ヘテロダイマーFc型を用いればよい。

[0109] また、本発明の二重特異性分子に含まれる抗CD3 scFvは、重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合により結合している。さらに、がん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に対するscFvは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合しているもよい。

[0110] さらに、第1の抗体と第2の抗体の2種類のscFvをリンカーでつなげたフォーマットを有するtaFv（図38E）を、二量体のFcの一方にリンカーを介するか又はリンカーを介せずに直接結合させた二重特異性分子が挙

げられる。このような二重特異性分子を t a F v-ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子又は t a F v-ヘテロダイマー F c 型と呼ぶ（図 4 0 B 左下）。該二重特異性分子は、t a F v の下流にヘテロダイマーを形成する変異をいれた F c がヘテロに会合したフォーマットである。t a F v における第 1 の抗体と第 2 の抗体の連結順序は限定されない。

[0111] 図 4 3 B 左上に s c F v-F a b-ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の構造を示す。また、図 3 8 A に s c F v、図 3 8 B に F a b、図 3 8 E に t a F v、図 3 8 F に s c F v-F a b、図 4 0 B 左下に t a F v-ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子、図 4 1 B 右上に t a F v-F a b-ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の構造を示す。

[0112] 本発明の二重特異性分子は、複数のポリペプチドが会合した構造を有している。

[0113] 本発明においては、例えば、t a F v としては、抗 C D 3 s c F v と標的分子、好適にはがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（H L A）の複合体ではない標的分子に対する s c F v の t a F v を用いればよい。t a F v-ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子は、好適には、（a）N 末端から C 末端に向かって、標的分子、好適にはがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（H L A）の複合体ではない標的分子に特異的に結合する s c F v、C D 3 に特異的に結合する s c F v 及び免疫グロブリン F c 領域（i）をその順に含んでなる第 1 ポリペプチドと、免疫グロブリンのヒンジ領域及び F c 領域（i i）を含んでなる第 2 ポリペプチドを含み、より好適には、（b）第 1 ポリペプチドと第 2 ポリペプチドが F c 領域（i）と F c 領域（i i）において会合してなる。第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドの F c 領域は、ヘテロダイマーを形成する変異を含む。t a F v-ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の例を図 4 0 B 左下に示す。図 4 0 B 左下に示すように、第 1 ポリペプチドの F c 領域（i）部分と黒塗で示す第 2 ポリペプチドの F c 領域（i i）部分が結合し、第 1 ポリペプチドと第 2 ポリペプチドが会合している。例えば、図 4 0 B 左下において、白で表された s c F v が、標的分子

、好適にはがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に対する s c F v であり、右上斜線で表された s c F v が抗 CD 3 s c F v である（VH と VL の間の黒色のバーは両者がジスルフィド結合していることを示す。）。

[0114] 本発明のより好適な t a F v -ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 1 ポリペプチドは、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列を含む。本発明の好適な t a F v -ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 2 ポリペプチドは、ヒト抗体由来のヒンジ領域及び野生型又は変異型 F c を含んでなる。

[0115] s c F v -F a b -ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子は、好適には、
（a）N 末端から C 末端に向かって、がん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に特異的に結合する s c F v、CD 3 に特異的に結合する抗体重鎖の可変領域及び定常領域 C H 1 並びに免疫グロブリン F c 領域（i）をその順で含んでなる第 1 ポリペプチド、免疫グロブリンのヒンジ領域及び F c 領域（i i）を含んでなる第 2 ポリペプチド、並びに、可変領域及び定常領域からなる抗体軽鎖を含む第 3 ポリペプチドを含み、より好適には、（b）第 1 ポリペプチドと第 2 ポリペプチドが F c 領域（i）と F c 領域（i i）において会合し、第 1 ポリペプチドが抗体重鎖の可変領域及び定常領域 C H 1 において第 3 ポリペプチド（の抗体軽鎖）と会合してなる。第 1 ポリペプチド及び第 2 ポリペプチドの F c 領域は、野生型であっても、ヘテロダイマーを形成する変異を含んでいてもよい。s c F v -F a b -ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の例を図 4 3 B 左上に示す。図 4 3 B 左上の右半分が第 1 ポリペプチド及び第 3 ポリペプチドであり、左半分が第 2 ポリペプチドである。図 4 3 B 左上に示すように、第 1 ポリペプチドの F c 領域（i）部分と黒塗で示す第 2 ポリペプチドの F c 領域（i i）部分が会合し、第 1 ポリペプチドと第 3 ポリペプチドが会合している。例えば、図 4 3 B 左上において、黒塗りで表された s c F v が標的分子、好適にはがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではな

い標的分子に対する s c F v であり、白及び市松模様及び横線で表された F a b が抗 C D 3 F a b である。

[0116] 好適な s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 1 ポリペプチドに含まれるアミノ酸配列としては、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を例示することができる。

[0117] 本発明の好適な s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 2 ポリペプチドは、ヒト抗体由来のヒンジ領域及び変異型 F c を含んでなり、より一層好適な s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 2 ポリペプチドは、ヒト抗体由来のヒンジ領域及び野生型又は変異型 F c を含んでなる。

[0118] 本発明の好適な s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 3 ポリペプチドは、ヒト抗体由来の軽鎖を含んでなり、より好適な s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 3 ポリペプチドとしては、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列を例示することができる。

[0119] 本発明の二重特異性分子に含まれる 1 つ、2 つ又は 3 つ以上のペプチドは、前述の「欠失体」であってよく、すなわち、そのカルボキシル末端、とりわけ抗体重鎖に由来するカルボキシル末端において、1 又は 2 個（又はそれ以上）のアミノ酸が変異（欠失を含む）していてもよい。例えば、本発明の好適な s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の一つである R X 3 - 0 0 0 2 に含まれる第 1 ポリペプチドが有するアミノ酸配列のカルボキシル末端は、配列番号 3 1 の 7 1 3 番目 L y s、1 アミノ酸が欠失してなる 7 1 2 番目 G l y、それらを含む混合物、のいずれであってもよい。同様に、本発明の好適な s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子に含まれる第 2 ポリペプチドが有するアミノ酸配列のカルボキシル末端は、配列番号 9 の 2 4 6 番目 L y s、1 アミノ酸が欠失してなる 2 4 5 番目 G l y、それらを含む混合物、のいずれであってもよい。

[0120] 本発明の二重特異性分子に含まれる s c F v 及び F a b は、好ましくは、

ヒト化抗体又はヒト抗体の $s c F v$ 及び $F a b$ であり、 $F c$ は、好ましくは、ヒト抗体の $F c$ である。

[0121] 本発明の二重特異性分子に含まれる可変領域においては、抗体のアミノ末端側から重鎖可変領域、軽鎖可変領域の順で結合していてもよく、あるいは、軽鎖可変領域、重鎖可変領域の順で結合していてもよい。両可変領域の間に、リンカーを有していてもよい（任意で）。また、アミノ末端側の可変領域のアミノ末端にグリシン残基を有していてもよい（任意で）。タンデム $s c F v$ 型の二重特異性分子では、カルボキシル末端側の可変領域のカルボキシル末端に、リンカー、 $F L A G$ タグ、及び／又は、 $H i s$ タグが結合していてもよい（任意で）。好適な態様の一つとして、アミノ末端から、重鎖可変領域、第1のリンカー、軽鎖可変領域、第2のリンカー、 $F L A G$ タグ、及び、 $H i s$ タグの順に結合したものを例示することができる。

[0122] リンカーは、一本鎖ポリペプチド又は一本鎖オリゴペプチド、あるいは、 $P E G$ 、ヌクレオチド、糖鎖、化合物等の合成品も含まれる。その他、二つのポリペプチドを結合するものであれば特に限定されず、公知のリンカーを使用することが可能である。

[0123] リンカーの長さとしては、例えば、ペプチドリンカーの場合5～30アミノ酸である。二重特異性分子に複数のリンカーが含まれる場合、すべて同じ長さのペプチドリンカーを用いてもよいし、異なる長さのペプチドリンカーを用いてもよい。

[0124] ペプチドリンカーとしては、例えば、($G l y \cdot G l y \cdot G l y \cdot G l y \cdot S e r$) (配列番号38)の繰り返しが例示されるが、これらに1～数個の $G l y$ 、 $S e r$ とは異なるアミノ酸残基が付加していてもよい。

[0125] 上述のような、本発明の多重特異性抗体に含まれ得る構造（フォーマット）、特に二重特異性抗体が採り得る構造（フォーマット）のうち、好適なものは、 $t a F v$ －ヘテロダイマー $F c$ 型、及び $s c F v$ － $F a b$ －ヘテロダイマー $F c$ 型であり、より好適なものは $s c F v$ － $F a b$ －ヘテロダイマー $F c$ 型である。 $t a F v$ －ヘテロダイマー $F c$ 型としては、 N 末端から C 末

端に向かって、標的分子、好適にはがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に対する s c F v、抗 C D 3 s c F v の順に位置している型（t a F v－ヘテロダイマー F c 型：図 4 0 B 左下）は、より一層好適である。また、s c F v－F a b－ヘテロダイマー F c 型としては、N 末端に標的分子、好適にはがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子に対する s c F v を含む、s c F v－F a b－ヘテロダイマー F c 型（図 4 3 B 左上）も、本発明の二重特異性抗体が採り得るより一層好適なフォーマットである。

[0126] 上述のような、本発明の多重特異性抗体、特に二重特異性抗体のうち、s c F v－F a b－ヘテロダイマー F c 型を含む好適なものは、（i）配列番号 29 の 20～718 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 12 の 21～233 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（i i）配列番号 30 の 20～717 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 12 の 21～233 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；（i i i）配列番号 31 の 20～713 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び

配列番号 12 の 21～233 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、から選択される一のポリペプチド群を含む。

[0127] 上述のような、本発明の多重特異性抗体、特に二重特異性抗体のうち、t a F v－ヘテロダイマー F c 型を含む好適なものは、(i) 配列番号 21 の 20～744 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；(ii) 配列番号 23 の 20～743 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；(iii) 配列番号 25 の 20～739 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、から選択される一のポリペプチド対を含む。

また、本発明の多重特異性分子がとり得るフォーマットとしては、図 38～45 に例示されるもの及びその他本願が開示するものに加え、Godar 他 Expert Opinion on Therapeutic Patents 28 巻 (3 号) 251～276 頁 (2018 年)、Brinkmann 及び Klottermann MABS 9 巻 (2 号) 182～212 頁 (2017 年)、並びに、Wu 及び Demarest Methods 154 巻 3～9 頁 (2019 年) に記載された各種フォーマットも例示することができる。それらの文献の全記載も本願の開示に包含される。

[0128] 本発明には、本発明の分子に含まれるアミノ酸配列と90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%以上同一のアミノ酸配列を含み、且つ、CD3に結合し、さらにがん精巢抗原ペプチドとヒト白血球抗原（HLA）の複合体ではない標的分子にも結合する分子も含まれる。

[0129] 本発明の多重特異性抗体は、優れた生物学的活性、物理化学的性質（以下「物性」という。）、安全性、体内動態等を具備している。バイオ医薬品に含まれる不純物は、医薬品の安全性に関与するため、製造時及び保存中での増加の有無を適切に規格設定し管理することが求められている。その中でも凝集物は、主要な不純物の一つであり、免疫原性リスクや薬効の低下等にも関与するため、特に厳重に管理すべき項目である。（Guidance for Industry Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products, U. S. Department of Health and Human Services/Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research (CDER)/Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), August 2014, p. 15-16）。不純物の管理は製造時のみでなく、製造工程中や製造後の経時的な安定性（増加の有無）も含めて評価を実施する必要がある。長期安定性試験の結果に基づいて医薬品の有効期間が設定されるため、経時的に安定な抗体のほうがより長い有効期間を設定することができる。よってバイオ医薬品をめざし好適な抗体を選抜する際の指標となる、本発明における物理化学的性質としては、溶液安定性、振とう安定性等が挙げられる。溶液安定性、振とう安定性等に懸念がある多重特異性抗体を医薬品として選択した場合、凝集物の量を低減させるための精製工程の追加（それにより収率の低下が不可避となる）や凝集物が生じ難い処方 の確立などに多大なリソースやコストが必要となるため、これらの懸念の少な

い抗体を選択することが好ましい。

- [0130] 溶液安定性は、例えば、検体を20mg/mLに調製し、40℃で1日、7日、14日間保存した後のHMWSの含有量(%)を、サイズ排除クロマトグラフィーにより測定することで評価することができる。相対的にHMWS(%)の増加率が低い検体は、相対的に溶液安定性が高いと判定することができる。
- [0131] 振とう安定性は、例えば、検体を2mg/mLに調製し、2500rpmで1～2時間振とうし、サイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各検体のピーク面積及びHMWS(%)を算出することで、評価することができる。ただし、当該方法でHMWSとして検出される凝集体は直径10～100nm程度のものであり、粒径100nm以上のSubvisible particles(粒径0.1～10μm)や不溶性微粒子(粒径10μm以上)は、検出することができない。そのようなサイズの粒子形成の有無を確認するためには、例えば、振とう前及び振とう2時間処理の検体を用いて、FlowCAM8100(DKSHジャパン製)等を用いたMicroFlow Imaging法により粒子数を評価する。振とう前後での粒子数が増加していれば、振とう劣化により目的タンパク質の単量体からHMWSを経て粒子が形成していると思倣することができる。従って、振とう安定性の評価においては、(1) HMWS(%)の増加率、(2) ピーク面積の減少率、及び／又は、(3) MicroFlow Imaging法による粒子数の増減の結果を元に解釈し、評価する。例えば、ある検体のHMWS(%)の増加率が他の検体よりも大きい場合であっても、当該検体のピーク面積の減少率及び／又はMicroFlow Imaging法による粒子数の増加が当該他の検体よりも小さい場合、当該検体の方が当該他の検体よりも振とう安定性が高いと評価し得る。その理由は、当該他の検体のHMWSの増加率(%)が低いのは、HMWS相当の凝集体が会合しさらに大きな多量体を形成しサイズ排除クロマトグラフィーでは検出外と考えられるからである。なお、凝集体が目的タンパク質から構成されていることは、振とう前にはほとんど含

まれていない凝集体が、振とう後には増加していることから確認できる。

[0132] 本発明の多重特異性分子、例えば、 $t a F v$ －ヘテロダイマー $F c$ 型であって抗 $C D 3 s c F v$ の重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合により結合している二重特異性抗体、及び $s c F v$ － $F a b$ －ヘテロダイマー $F c$ 型である二重特異性抗体は、溶液状態で長期間にわたって二量体を含む $H M W S$ が生じにくく、溶液安定性が高い。例えば、0137段落で例示した溶液安定性の評価方法において、 $t a F v$ －ヘテロダイマー $F c$ 型であって抗 $C D 3 s c F v$ の重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合により結合していない二重特異性抗体よりも、溶液安定性が高いことが好ましい。

[0133] また、本発明の多重特異性分子、例えば、 $t a F v$ －ヘテロダイマー $F c$ 型であって抗 $C D 3 s c F v$ の重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合により結合している二重特異性抗体、及び $s c F v$ － $F a b$ －ヘテロダイマー $F c$ 型である二重特異性抗体は、二量体を含む（１） $H M W S$ の増加率、（２）ピーク面積の減少率に加えて、及び／又は、（３） $M i c r o F l o w I m a g i n g$ 法による粒子数の増減の結果を元に解釈し、振とう安定性が高い。例えば、0138段落で例示した振とう安定性の評価方法において、 $t a F v$ －ヘテロダイマー $F c$ 型であって抗 $C D 3 s c F v$ の重鎖可変領域と軽鎖可変領域がジスルフィド結合により結合していない二重特異性抗体よりも、振とう安定性が高いことが好ましい。

[0134] 本発明は抗 $C D 3$ 抗体、その抗原結合断片あるいはその修飾体、及び／又は、それらを含む多重特異性分子（以下、「抗 $C D 3$ 抗体等」という。）を含む医薬組成物を提供する。

[0135] 本発明において、疾患の治療及び／又は予防には、かかる疾患の発症の予防、増悪化又は進行の抑制又は阻害、かかる疾患に罹患した個体が呈する一つ又は二つ以上の症状の軽減、増悪化若しくは進行の抑制又は寛解、二次性疾患の治療又は予防等が含まれるが、それらに限定されるものではない。疾患としては、例えば、多重特異性分子を含む医薬組成物の場合、癌が挙げら

れる。

- [0136] 本発明の医薬組成物には、治療又は予防に有効な量の抗CD3抗体等に加えて、薬学上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤を含有せしめることができる。
- [0137] 「治療又は予防に有効な量」とは、特定の疾患、投与形態及び投与径路につき治療又は予防効果を奏する量を意味する。
- [0138] 本発明の医薬組成物には、pH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、無菌性、該組成物又はそれに含まれる抗体の安定性、溶解性、徐放性、吸収性、浸透性、剤型、強度、性状、形状等を変化させたり、維持したり、保持したりするための物質（以下、「製剤用の物質」という）を含有せしめることができる。製剤用の物質としては、薬理学的に許容される物質であれば特に限定されるものではない。例えば、非毒性又は低毒性であることは、製剤用の物質が好適に具備する性質である。
- [0139] 製剤用の物質として、例えば、以下のものを挙げることができるが、これらに限定されるものではない；グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン等のアミノ酸類、抗菌剤、アスコルビン酸、硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム等の抗酸化剤、リン酸、クエン酸、ホウ酸バッファー、炭酸水素ナトリウム、トリスー塩酸（Tris-HCl）溶液等の緩衝剤、マンニトールやグリシン等の充填剤、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）等のキレート剤、カフェイン、ポリビニルピロリジン、 β -シクロデキストリンやヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン等の錯化剤、グルコース、マンノース又はデキストリン等の増量剤、単糖類、二糖類やグルコース、マンノースやデキストリン等の他の炭水化物、着色剤、香味剤、希釈剤、乳化剤やポリビニルピロリジン等の親水ポリマー、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン、塩化ベンズアルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロレルヘキシジン、ソルビン酸又は過酸化水素等の防腐剤、グリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコ

ール等の溶媒、マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール、懸濁剤、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルビテート20やポリソルビテート80等ポリソルビテート、トリトン (t r i t o n)、トロメタミン (t r o m e t h a m i n e)、レシチン又はコレステロール等の界面活性剤、スクロースやソルビトール等の安定化増強剤、塩化ナトリウム、塩化カリウム、マンニトールやソルビトール等の弾性増強剤、輸送剤、希釈剤、賦形剤、及び／又は薬学上の補助剤。

- [0140] これらの製剤用の物質の添加量は、抗CD3抗体等の重量に対して0.001乃至1000倍、好適には0.01乃至100倍、より好適には0.1乃至10倍である。
- [0141] 抗CD3抗体等をリポソーム中に含有せしめたイムノリポソーム、抗体とリポソームとが結合してなる抗体修飾体（米国特許第6214388号等）を含有する医薬組成物も、本発明の医薬組成物に含まれる。
- [0142] 賦形剤や担体は、通常液体又は固体であり、注射用の水、生理食塩水、人工脳脊髄液、その他の、経口投与又は非経口投与用の製剤に用いられる物質であれば特に限定されない。生理食塩水としては、中性のもの、血清アルブミンを含むもの等を挙げることができる。
- [0143] 緩衝剤としては、医薬組成物の最終pHが7.0乃至8.5になるように調製されたT r i sバッファー、同じく4.0乃至5.5になるように調製された酢酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたクエン酸バッファー、同じく5.0乃至8.0になるように調製されたヒスチジンバッファー等を例示することができる。
- [0144] 本発明の医薬組成物は、固体、液体、懸濁液等である。凍結乾燥製剤を挙げることができる。凍結乾燥製剤を成型するには、スクロース等の賦形剤を用いることができる。
- [0145] 本発明の医薬組成物の投与経路としては、経腸投与、局所投与及び非経口投与のいずれでもよく、対象となる疾患によって、好適な投与経路を選択すればよい。具体的には、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、

皮下投与、腹腔内投与、経皮投与、骨内投与、関節内投与等を挙げることができる。

[0146] かかる医薬組成物の組成は、投与方法、抗体のCD3蛋白質結合親和性等に応じて決定することができる。

[0147] 抗CD3抗体等の投与量は、個体の種、疾患の種類、症状、性別、年齢、持病、該抗体のCD3蛋白質結合親和性又はその生物活性、その他の要素に応じて適宜決定することができるが、通常、0.01乃至1000mg/kg、好適には0.1乃至100mg/kgを、1乃至180日間に1回、又は1日2回若しくは3回以上投与することができる。医薬組成物の形態としては、注射剤（凍結乾燥製剤、点滴剤を含む）、坐剤、経鼻型吸収製剤、経皮型吸収製剤、舌下剤、カプセル、錠剤、軟膏剤、顆粒剤、エアゾル剤、丸剤、散剤、懸濁剤、乳剤、点眼剤、生体埋め込み型製剤等を例示することができる。

[0148] 抗CD3抗体等は、他剤と組み合わせて用いることができる。抗CD3抗体等、又はそれを有効成分として含む医薬組成物は、他剤、すなわち抗CD3抗体等以外の薬剤を有効成分として含む医薬組成物と同時にあるいは個別に投与することができる。例えば、他剤を投与した後に抗CD3抗体等を有効成分として含む医薬組成物を投与するか、抗CD3抗体等を有効成分として含む医薬組成物を投与した後に、他剤を投与するか、又は、抗CD3抗体等を有効成分として含む医薬組成物と他剤とを同時に投与してもよい。単一の医薬組成物中に抗CD3抗体等及び他剤の両方の有効成分が含まれる場合と、両有効成分が複数の医薬組成物に分かれて含まれる場合のいずれも、本発明においては「抗CD3抗体等及び他剤を含む医薬組成物」という。本発明において、かかる「医薬組成物」は「抗CD3抗体等と他剤を組み合わせで投与される医薬組成物」と同義である。

[0149] 本発明において、抗CD3抗体等と他剤を「組み合わせで投与される」とは、ある一定期間において、被投与対象の体内に、抗CD3抗体等と他剤が取り込まれることを意味する。抗CD3抗体等と他剤が単一製剤中に含まれ

た製剤が投与されてもよく、またそれぞれが別々に製剤化され、別々に投与されても良い。別々に製剤化される場合、その投与の時期は特に限定されず、同時に投与されてもよく、時間を置いて異なる時間に、又は、異なる日に、投与されても良い。抗CD3抗体等と他剤が、それぞれ異なる時間又は日に投与される場合、その投与の順番は特に限定されない。通常、それぞれの製剤は、それぞれの投与方法に従って投与されるため、それらの投与は、同一回数となる場合もあり、異なる回数となる場合もある。また、それぞれが別々に製剤化される場合、各製剤の投与方法（投与経路）は同じであってもよく、異なる投与方法（投与経路）で投与されてもよい。また、抗CD3抗体等と他剤が同時に体内に存在する必要は無く、ある一定期間（例えば一ヶ月間、好ましくは1週間、さらに好ましくは数日間、さらにより好ましくは1日間）の間に体内に取り込まれていればよく、いずれかの投与時にもう一方の有効成分が体内から消失していてもよい。

[0150] 「抗CD3抗体等と他剤を組み合わせで投与される医薬組成物」の投与形態としては、例えば、1) 抗CD3抗体等と他剤を含む単一の製剤の投与、2) 抗CD3抗体等と他剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での同時投与、3) 抗CD3抗体等と他剤を別々に製剤化して得られる2種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、4) 抗CD3抗体等と他剤を別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での同時投与、5) 抗CD3抗体等と他剤とを別々に製剤化して得られる2種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与などを挙げることができる。

「抗CD3抗体等と他剤を組み合わせで投与される医薬組成物」の投与量、投与間隔、投与形態、製剤等は、抗CD3抗体を含有する医薬組成物のそれらに準ずるが、それらに限定されるものではない。

[0151] かかる医薬組成物は、それが2種の異なる製剤にされた場合には、それらを含むキットであってもよい。

[0152] 本発明において、抗CD3抗体等及び他剤の「組合せ」とは、抗CD3抗体等及び他剤を「組み合わせで投与される」ことを意味する。

[0153] 本発明の組合せ又は医薬組成物には、さらに他の医薬を使用することができる。

[0154] 本発明はCD3に関わる疾患の治療方法又は予防方法、該疾患の治療又は予防用医薬組成物を調製するための本発明の抗体の使用、該疾患の治療又は予防のための本発明の抗体の使用、をも提供する。本発明の抗体を含む治療又は予防用キットも本発明に含まれる。

実施例

[0155] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

(参考例1) C3E-7085の溶液安定性評価

国際公開第2018/117237号に記載のC3E-7085精製タンパク質（国際公開第2018/117237号の配列表の配列番号64、図72で示されるアミノ酸配列を有するscFvである。）を用いて、溶液安定性を評価した。C3E-7085は、Amicon Ultra-4（Millipore社）にて遠心濃縮し25mM酢酸ナトリウム、5%ソルビトール、pH5.5へバッファ交換後、濃度を10mg/mLに調製し、4℃で2週間若しくは40℃で2週間保存した。保存後のサンプルは、TSK gel IUP-SW3000 2μm 4.6X 300mmを用いたサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を行った。移動相は3XPBSを用い、流速0.2mL/minにて分析した（検出波長280nm）。各サンプル中に含まれるHMWS（%）をピーク解析し、面積百分率法により算出、結果を表1に記載した。

[0156] [表1]

C3E-7085 保存条件	HMWS (%)
40℃、2週間	24
4℃、2週間	22

[0157] C3E-7085は、4℃、40℃ともに2週間保存後、特にHMWS中の二量体ピークは20%まで増加した（データ示さず）。また、形成された

二量体は、希釈により単量体へ戻る可逆的な性質をもっていた（データ示さず）ことより、二量体を含むHMWSが生じることが溶液安定性での課題と考えられた。

（実施例1）抗CD3抗体フラグメントヘテロダイマーFc型分子の溶液安定性評価

2) - 1 抗CD3抗体フラグメントのアミノ酸配列の設計

C3E-7085の溶液安定性における物性改善をめざし、フォーマットを変更したC3E-7085 Fabフォーマットのアミノ酸配列として、C3E-7085-Fab（配列番号1、図5）及びC3E-7085-LC（配列番号2、図6）を設計した。また、文献（*Proteins*, 1994, May; 19 (1): 35-47）を参考にジスルフィド導入結合を加えたscFvを設計しC3E-7096と命名した（配列番号3、図7）。

2) - 2 抗CD3抗体フラグメントヘテロダイマーFc発現ベクターの作製

pcDNA3.1、pcDNA3.3あるいはpcDNA3.4（Thermo Fisher Scientific社）を骨格とした各種抗CD3抗体フラグメントヘテロダイマーFc発現用ベクターを設計した。抗CD3抗体フラグメントはC3E-7085（WO2018/117237）及び2) - 1で設計した抗CD3抗体フラグメントを用いた。ヘテロダイマーFc配列（HC__h及びHC__kと以下記載する）には、文献（*Nat Biotechnol*, 1998 Jul; 16 (7): 677-81.）に報告されたものを用いた。

[0158] ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc（HC__h）からなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片を組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__HC__h」と命名した。

[0159] C3E-7085のカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し

、「p__C3E-7085-HC-k」と命名した。

[0160] C3E-7085の重鎖可変領域、及びヒトIgG由来CH1領域、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域の順に付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__C3E-7085-Fab-HC-k」と命名した。またC3E-7085軽鎖可変領域のカルボキシル末端にヒトIgLa b m d a由来CL領域が付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__C3E-7085-LC」と命名した。

[0161] C3E-7096のカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__C3E-7096-HC-k」と命名した。

[0162] p__HC__hのヌクレオチド配列は再解析し、HC__h全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号4（図8）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0163] p__C3E-7085-HC-kのヌクレオチド配列は再解析し、C3E-7085-HC-k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号5（図9）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0164] p__C3E-7085-Fab-HC-kのヌクレオチド配列は再解析し、C3E-7085-Fab-HC-k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号6（図10）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0165] p__C3E-7085-LCのヌクレオチド配列は再解析し、C3E-7085-LC全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号7（図11）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0166] p__C3E-7096-HC-kのヌクレオチド配列は再解析し、C3E-7096-HC-k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号8（図12）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

- [0167] また、上記ヌクレオチド配列から、当該配列がコードするHC__h、C3E-7085-HC-k、C3E-7085-Fab-HC-k、C3E-7085-LC、C3E-7096-HC-k全長のアミノ酸配列を確認した。
- [0168] HC__h全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号9（図13）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、20番目から246番目のアミノ酸配列がHC__hである。
- [0169] C3E-7085-HC-k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号10（図14）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から260番目のアミノ酸配列がC3E-7085であり、261番目から262番目のアミノ酸配列がリンカー、263番目から494番目のアミノ酸配列がHC-kである。
- [0170] C3E-7085-Fab-HC-k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号11（図15）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、20番目から137番目のアミノ酸配列がC3E-7085-重鎖可変領域である。また、138番目から467番目のアミノ酸配列が定常領域である。
- [0171] C3E-7085-LC全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号12（図16）に示されるアミノ酸配列である。1番目から20番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から127番目のアミノ酸配列が可変領域であり、128番目から233番目のアミノ酸配列が定常領域である。
- [0172] C3E-7096-HC-k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号13（図17）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から260番目のアミノ酸配列がC3E-7096であり、261番目から262番目のアミノ酸配列がリンカー、263番目から494番目のアミノ酸配列がHC-k

である。

2) -3 抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFcの発現

Expi293F細胞(Thermo Fisher Scientific社)はマニュアルに従い、継代、培養をおこなった。対数増殖期にあるExpi293F細胞培養液を 2.5×10^6 cells/mLになるようExpi293 Expression medium(Thermo Fisher Scientific社)で希釈し、各種抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFcの生産に用いた。300mL培養する場合は、Polyethyleneimine(Polyscience #24765)1.44mgをOpti-Pro SFM(Thermo Fisher Scientific社)5mLに溶解、次にNucleoBond Xtra Midiキット(タカラバイオ社)を用いて調製したベクターp_C3E-7085-HC-k、p_HC_hを混合したベクター混合物0.3mgを、Opti-Pro SFM(Invitrogen社)5mLに添加した。Polyethyleneimine/Opti-Pro SFM混合液5mLに、発現ベクター/Opti-Pro SFM混合液5mLを加え穏やかに攪拌し、さらに5分間放置した後にExpi293F細胞に添加した。37℃、8%CO₂インキュベーターで6日間、135rpmで振とう培養して得られた培養上清を0.2μm filter(Thermo Fisher Scientific社)でろ過し、抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFc(C3E-0002)の培養上清を得た。C3E-0002を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9(図13)及び10(図14)に示す。

[0173] 同様の手法にて、p_C3E-7085-Fab-HC-k、p_HC_h及びp_C3E-7085-LCを用いて抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFc(C3E-0003)の培養上清を発現調製した。C3E-0003を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9(図13)及び11(図15)及び12(図16)に示す

。

[0174] 同様の手法にて、p__C3E-7096-HC-k、p__HC__hを用いて抗CD3抗体フラグメントーヘテロダイマーFc (C3E-0004) の培養上清を発現調製した。C3E-0004を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9 (図13) 及び13 (図17) に示す。

2) -4 抗CD3抗体フラグメントーヘテロダイマーFcの精製

2) -3で得られた培養上清から抗CD3抗体フラグメントーヘテロダイマーFcをProtein Aアフィニティクロマトグラフィーとゲルろ過クロマトグラフィーの2段階工程で精製した。

[0175] PBS pH7.4で平衡化したMabSelect SuReカラム (Cytiva社) に培養上清をアプライし、目的の抗CD3抗体フラグメントーヘテロダイマーFcを吸着させた。非吸着成分をPBSで除去した後、酢酸バッファ pH3.5で吸着成分を溶出した。溶出画分はTrisバッファ pH9.5でpHを中性に調製した後、濃縮し、予め25mM Histidine、300mM NaCl、5% Sorbitol、pH5.5で平衡化したゲルろ過カラムSuperdex 200 10/300 (Cytiva社) に供した。ゲルろ過クロマトグラフィーで得られたピーク画分より、目的のヘテロダイマーに相当する画分を回収し、キャピラリー電気泳動 (LabChip GX Touch、PerkinElmer社) によって、目的の抗CD3抗体フラグメントーヘテロダイマーFcが形成されていることを確認した。精製タンパク質サンプルは分析用SECに供し、純度と濃度を決定した後、評価に用いた。

2) -5 抗CD3抗体フラグメントーヘテロダイマーFcの溶液安定性評価

2) -4で精製した各サンプルは、Amicon Ultra-4 (Millipore社) にて遠心濃縮しPBSへbuffer交換後、PBSを添加しサンプル濃度を20mg/mLに調製し評価用サンプルとした。また各評

価用サンプルの開始時のHMWS (%)は、Advance Bio SEC 300A 2.7 μ m 4.6 $\times$ 150mm (Agilent社)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出した。移動相は0.2M Ki/200mM KCl/pH7.0を用い、流速0.2 mL/minにて分析した(検出波長280nm)。各サンプルの加速劣化試験は、40℃で1日、7日、14日保存後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのHMWS (%)を面積百分率法にて算出した。

[0176] 各サンプルの40℃で保存した際の経時変化を示した結果を図1に示す。C3E-0003の14日保存後のHMWS (%)は3%であり、15%であったC3E-0002に比べ保存時間経過による増加は顕著に少なかった。C3E-0004の14日保存後のHMWS (%)は13%であり、C3E-0003に比べ増加したものの、C3E-0002に比べ減少傾向を示した。

[0177] 以上の結果より、C3E-7085を用いたヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7085 Fabフォーマットを用いたヘテロダイマーFc型及びC3E-7096を用いたヘテロダイマーFc型分子は、溶液安定性が優れていることが示された。

(実施例2) 抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFcの振とう安定性評価

2)-4で精製した各サンプルをAmicon Ultra-4 (Millipore社)にて遠心濃縮後2mg/mLに調製し、評価用サンプルとした。また各評価用サンプルの開始時のピーク面積及びHMWS (%)は、Advance Bio SEC 300A 2.7 μ m 4.6 $\times$ 150mm (Agilent社)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出した。移動相は0.2M Ki/200mM KCl/pH7.0を用い、流速0.2 mL/minにて分析した(検出波長280nm)。振とう劣化試験は各サンプルをユニバーサル高速ミキサー(Waken製)

を用いて、室温にて、2500rpmで1時間、2時間と経時的に振とうさせた後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのピーク面積及びHMWS (%) を算出した。

[0178] 各サンプルの振とう後のピーク面積及びHMWS (%) を図2A及び図2Bに示す。C3E-0002は振とう後1時間の段階で顕著にHMWS (%) が増加し、振とう後2時間処理検体ではピーク面積の99%が消失していた。C3E-0003は、C3E-0002に比べ振とう時間経過によるピーク面積の減少及びHMWS (%) の増加が顕著に少なかった。C3E-0004は、C3E-0002に比べ振とう1時間処理検体でのHMWS (%) が低く、振とう2時間処理検体のピーク面積も74%消失に留まっていた。なお振とう前後でサイズ排除クロマトグラフィーでは検出できないサイズの粒子形成の有無を確認するため、振とう前及び振とう2時間処理の検体を用いて、FlowCAM8100 (DKSHジャパン製) で粒子数を評価し、振とう前後での粒子数が増加していたことより、振とう劣化により各検体は単量体からHMWSを経て粒子が形成していると推察された。よってHMWS (%) の増加率が低いもの、またピーク面積の減少率が低いもののほうが、振とう劣化に対して安定性が高いと言える。

[0179] 以上の結果より、C3E-7085を用いたヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7085 Fabフォーマットを用いたヘテロダイマーFc型及びC3E-7096を用いたヘテロダイマーFc型分子は、振とう安定性が優れていた。

(実施例3) taFv-ヘテロダイマーFc型及びscFv-Fab-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の作製

4) -1 taFv-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子発現用ベクターの作製

pcDNA3.1、pcDNA3.3あるいはpcDNA3.4 (Thermo Fisher Scientific社) を骨格としたtaFv-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子発現用ベクターを設計した。抗CD3

抗体フラグメントはC3E-7085 (WO2018/117237)、あるいはC3E-7096を用いたヘテロダイマーFc配列 (HC__h及びHC__kと以下記載する) には、(Nat Biotechnol. 1998 Jul; 16(7) 677-81.) に報告されたものを用いた。

[0180] 抗Trop2-CD3二重特異性分子発現用ベクターとして、国際公開第2018/117237号に記載のHT1-11scFvとC3E-7085をGGGGSリンカーでつなげたtaFvのカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__TX3-0001-HC__k」と命名した。また、HT1-11scFvとC3E-7096をGGGGSリンカーでつなげたtaFvのカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__TX3-0003-HC__k」と命名した。

[0181] 抗CD98-CD3二重特異性分子発現用ベクターとして、特開2017-114763号に記載のhM23-H1重鎖可変領域のN末端にグリシンを加えた配列とhM23-L1軽鎖可変領域を(GGGGS)を3回繰り返した配列からなるポリペプチドリンカーを介して連結した抗CD98scFv (以下hM23-H1L1scFvと記載) とC3E-7085をGGGGSリンカーでつなげたtaFvのカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__CX3-0001-HC__k」と命名した。また、hM23-H1L1scFvとC3E-7096をGGGGSリンカーでつなげたtaFvのカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「

p__CX3-0003-HC__k」と命名した。

- [0182] 抗GPCR5D-CD3二重特異性分子発現用ベクターとして、国際公開第2018/147245号に記載のC3022scFvとC3E-7085をGGGGSリンカーでつなげたt a F vのカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__RX3-0001-HC__k」と命名した。また、C3022scFvとC3E-7096をGGGGSリンカーでつなげたt a F vのカルボキシル末端へ、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域を付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__RX3-0003-HC__k」と命名した。

- [0183] p__TX3-0001-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、TX3-0001-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号14（図18）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

- [0184] p__TX3-0003-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、TX3-0003-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号15（図19）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

- [0185] p__CX3-0001-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、CX3-0001-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号16（図20）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

- [0186] p__CX3-0003-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、CX3-0003-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号17（図21）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

- [0187] p__RX3-0001-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、RX3-0001-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号18（図22）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

- [0188] p__RX3-0003-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、RX3

—0003—HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号19（図23）に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0189] また、上記ヌクレオチド配列から、当該配列がコードするTX3—0001—HC__k、TX3—0003—HC__k、CX3—0001—HC__k、CX3—0003—HC__k、RX3—0001—HC__k、RX3—0003—HC__k全長のアミノ酸配列を確認した。

[0190] TX3—0001—HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号20（図24）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から510番目のアミノ酸配列がHT1—11scFvとC3E—7085をGGGGSリンカーでつなげたtaFvであり、511番目から512番目のアミノ酸配列がリンカー、513番目から744番目のアミノ酸配列がHC__kである。

[0191] TX3—0003—HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号21（図25）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から510番目のアミノ酸配列がHT1—11scFvとC3E—7096をGGGGSリンカーでつなげたtaFvであり、511番目から512番目のアミノ酸配列がリンカー、513番目から744番目のアミノ酸配列がHC__kである。

[0192] CX3—0001—HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号22（図26）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から509番目のアミノ酸配列がhM23—H1L1scFvとC3E—7085をGGGGSリンカーでつなげたtaFvであり、510番目から511番目のアミノ酸配列がリンカー、512番目から743番目のアミノ酸配列がHC__kである。

[0193] CX3—0003—HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号23（図27）に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から509番目の

アミノ酸配列がhM23-H1L1scFvとC3E-7096をGGGSリンカーでつなげたt a F vであり、510番目から511番目のアミノ酸配列がリンカー、512番目から743番目のアミノ酸配列がHC__kである。

[0194] RX3-0001-HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号24 (図28) に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から505番目のアミノ酸配列がC3022scFvとC3E-7085をGGGSリンカーでつなげたt a F vであり、506番目から507番目のアミノ酸配列がリンカー、508番目から739番目のアミノ酸配列がHC__kである。

[0195] RX3-0003-HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号25 (図29) に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から505番目のアミノ酸配列がC3022scFvとC3E-7096をGGGSリンカーでつなげたt a F vであり、506番目から507番目のアミノ酸配列がリンカー、508番目から739番目のアミノ酸配列がHC__kである。

4) -2 t a F v-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の発現

2) -3と同様の手法にて、p__TX3-0001-HC__k、p__HC__hを用いて抗Trop2-CD3t a F v-ヘテロダイマーFc (TX3-0001) の培養上清を発現調製した。TX3-0001を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9 (図13) 及び20 (図24) に示す。

[0196] 同様の手法にて、p__TX3-0003-HC__k、p__HC__hを用いて抗Trop2-CD3t a F v-ヘテロダイマーFc (TX3-0003) の培養上清を発現調製した。TX3-0003を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9 (図13) 及び21 (図25) に示す。

[0197] 同様の手法にて、p__CX3-0001-HC__k、p__HC__hを用い

て抗CD98-CD3 t a F v-ヘテロダイマーFc (CX3-0001)の培養上清を発現調製した。CX3-0001を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9 (図13) 及び22 (図26) に示す。

[0198] 同様の手法にて、p__CX3-0003-HC__k、p__HC__hを用いて抗CD98-CD3 t a F v-ヘテロダイマーFc (CX3-0003)の培養上清を発現調製した。CX3-0003を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9 (図13) 及び23 (図27) に示す。

[0199] 同様の手法にて、p__RX3-0001-HC__k、p__HC__hを用いて抗GPRC5D-CD3 t a F v-ヘテロダイマーFc (RX3-0001)の培養上清を発現調製した。RX3-0001を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9 (図13) 及び24 (図28) に示す。

[0200] 同様の手法にて、p__RX3-0003-HC__k、p__HC__hを用いて抗CD98-CD3 t a F v-ヘテロダイマーFc (RX3-0003)の培養上清を発現調製した。RX3-0003を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号9 (図13) 及び25 (図29) に示す。

4) -3 t a F v-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の精製

4) -2で得られた各培養上清は、2) -4と同様の手法で精製した。精製タンパク質サンプルは分析用SECに供し、純度と濃度を決定した後、各種評価に用いた。

4) -4 s c F v-F a b-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子発現用ベクターの作製

p c D N A 3. 1、p c D N A 3. 3あるいはp c D N A 3. 4 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c社)を骨格としたs c F v-F a b-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子発現用ベクターを設計した。

抗CD3抗体フラグメントはC3E-7085 (WO2018/117237) をFabフォーマットへ変更し用いた。ヘテロダイマーFc配列 (HC__h及びHC__kと以下記載する) には、(Nat Biotechnol, 1998 Jul; 16 (7) 677-81.) に報告されたものを用いた。

[0201] 抗Trop2-CD3二重特異性分子発現用ベクターとして、HT1-11scFv、C3E-7085の重鎖可変領域、ヒトIgG由来CH1領域、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域の順に付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__TX3-0002-HC__k」と命名した。

[0202] 抗CD98-CD3二重特異性分子発現用ベクターとして、hM23-H1L1scFv、C3E-7085の重鎖可変領域、ヒトIgG由来CH1領域、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域の順に付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__CX3-0002-HC__k」と命名した。

[0203] 抗GPCR5D-CD3二重特異性分子発現用ベクターとして、C3O22scFv、C3E-7085の重鎖可変領域、ヒトIgG由来CH1領域、ヘテロ多量体を形成させる変異を導入したFc領域の順に付加してなるポリペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするDNA断片が組み込まれた哺乳動物細胞用発現ベクターを作製し、「p__RX3-0002-HC__k」と命名した。

[0204] p__TX3-0002-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、TX3-0002-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号26 (図30) に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0205] p__CX3-0002-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、CX3-0002-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号27 (図

31) に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0206] p__RX3-0002-HC__kのヌクレオチド配列は再解析し、RX3-0002-HC__k全長のヌクレオチド配列は配列表の配列番号28(図32)に示されるヌクレオチド配列であることを確認した。

[0207] また、上記ヌクレオチド配列から、当該配列がコードするTX3-0002-HC__k、CX3-0002-HC__k、RX3-0002-HC__k全長のアミノ酸配列を確認した。

[0208] TX3-0002-HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号29(図33)に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から265番目のアミノ酸配列がHT1-11scFvであり、266番目から270番目のアミノ酸配列がリンカーであり、271番目から388番目のアミノ酸配列がC3E-7085-重鎖可変領域である。また、389番目から718番目のアミノ酸配列が定常領域である。

[0209] CX3-0002-HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号30(図34)に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から264番目のアミノ酸配列がhM23-H1L1scFvであり、265番目から269番目のアミノ酸配列がリンカーであり、270番目から387番目のアミノ酸配列がC3E-7085-重鎖可変領域である。また、388番目から717番目のアミノ酸配列が定常領域である。

[0210] RX3-0002-HC__k全長のアミノ酸配列は配列表の配列番号31(図35)に示されるアミノ酸配列である。当該配列において、1番目から19番目のアミノ酸配列がシグナル配列であり、21番目から260番目のアミノ酸配列がC3022scFvであり、261番目から265番目のアミノ酸配列がリンカーであり、266番目から383番目のアミノ酸配列がC3E-7085-重鎖可変領域である。また、384番目から713番目のアミノ酸配列が定常領域である。

4) - 5 s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の発現

2) - 3 と同様の手法にて、p__T X 3 - 0 0 0 2 - H C __k、p__H C __h 及び p__C 3 E - 7 0 8 5 - L C を用いて抗 T r o p 2 s c F v - C D 3 F a b - ヘテロダイマー F c (T X 3 - 0 0 0 2) の培養上清を発現調製した。T X 3 - 0 0 0 2 を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号 9 (図 1 3) 及び 1 2 (図 1 6) 及び 2 9 (図 3 3) に示す。

[0211] 同様の手法にて、p__C X 3 - 0 0 0 2 - H C __k、p__H C __h 及び p__C 3 E - 7 0 8 5 - L C を用いて抗 C D 9 8 s c F v - C D 3 F a b - ヘテロダイマー F c (T X 3 - 0 0 0 2) の培養上清を発現調製した。C X 3 - 0 0 0 2 を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号 9 (図 1 3) 及び 1 2 (図 1 6) 及び 3 0 (図 3 4) に示す。

[0212] 同様の手法にて、p__R X 3 - 0 0 0 2 - H C __k、p__H C __h 及び p__C 3 E - 7 0 8 5 - L C を用いて抗 G P R C 5 D s c F v - C D 3 F a b - ヘテロダイマー F c (R X 3 - 0 0 0 2) の培養上清を発現調製した。R X 3 - 0 0 0 2 を構成する各ベクターを発現させて得られるアミノ酸の配列を配列表の配列番号 9 (図 1 3) 及び 1 2 (図 1 6) 及び 3 1 (図 3 5) に示す。

4) - 6 s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の精製

4) - 5 で得られた各培養上清は、2) - 4 と同様の手法で精製した。精製タンパク質サンプルは分析用 S E C に供し、純度と濃度を決定した後各種評価に用いた。

(実施例 4) t a F v - ヘテロダイマー F c 型及び s c F v - F a b - ヘテロダイマー F c 型二重特異性分子の溶液安定性評価

実施例 3 にて調製した各サンプルを用いて、A m i c o n U l t r a - 4 (M i l l i p o r e 社) にて遠心濃縮し P B S へ b u f f e r 交換後、P B S を添加しサンプル濃度を 2 0 m g / m L に調製し評価用サンプルとした

。また各評価用サンプルの開始時のHMWS (%) は、Advance Bio SEC 300A 2.7 μ m 4.6 $\times$ 150mm (Agilent 社) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出した。移動相は0.2M K_i/200mM KCl/pH7.0を用い、流速0.2mL/minにて分析した(検出波長280nm)。各サンプルの加速劣化試験は、40℃で1日、7日、14日保存後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのHMWS (%) を面積百分率法にて算出した。

[0213] 各サンプルの40℃で保存した際の経時変化を示した結果を図3A～Cに示す。

[0214] RX3-0001の保存時間経過によるHMWS (%) 量は、13%まで増加した。一方、RX3-0002及びRX3-0003の保存時間経過によるHMWS (%) 量はそれぞれ6%、8%へ低減した(図3A)。

[0215] TX3-0001の保存時間経過によるHMWS (%) 量は、23%まで増加した。一方、TX3-0002及びTX3-0003の保存時間経過によるHMWS (%) 量はそれぞれ10%、11%へ低減した(図3B)。

[0216] CX3-0001の保存時間経過によるHMWS (%) 量は、hM23-H1L1 scFvの溶液安定性の影響が反映され、46%まで増加した。一方、CX3-0002の保存時間経過によるHMWS (%) 量は28%に低減し、CX3-0003のHMWS (%) 量は43%とCX3-0001に比べ微減傾向を示した(図3C)。

[0217] 以上の結果より、C3E-7085を用いたtaFv-ヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7085 Fabフォーマットを用いたscFv-Fab-ヘテロダイマーFc型及びC3E-7096を用いたtaFv-ヘテロダイマーFc型分子は、溶液安定性が優れていることが示された。

(実施例5) taFv-ヘテロダイマーFc型及びscFv-Fab-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の振とう安定性評価

実施例3で精製したサンプルのうち、RX3-0001～0003、CX

3-0001~0003及びTX3-0001~0003をAmicon Ultra-4 (Millipore社)にて遠心濃縮後2mg/mLに調製し、評価用サンプルとした。また各評価用サンプルの開始時のピーク面積及びHMWS (%)は、AdvanceBio SEC 300A 2.7 μ m 4.6 $\times$ 150mm (Agilent社)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出した。移動相は0.2M Ki/200mM KCl/pH7.0を用い、流速0.2mL/minにて分析した(検出波長280nm)。振とう劣化試験は各サンプルをユニバーサル高速ミキサー(Waken製)を用いて、室温にて、2500rpmで1時間、2時間と経時的に振とうさせた後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのピーク面積及びHMWS (%)を算出した。

[0218] 各サンプルの振とう後のピーク面積及びHMWS (%)を図4-1A及びB、図4-2A及びB並びに図4-3A及びBに示す。RX3-0001は振とう2時間処理検体のピーク面積の残存率が2%であった。これに対して、RX3-0002及びRX3-0003のピーク面積の残存率はそれぞれ15%、17%とRX3-0001と比較して良好な結果であった。さらに、RX3-0001の振とう2時間処理検体のHMWS (%)は30%であったが、RX3-0002及びRX3-0003の振とう2時間処理検体のHMWS (%)は共に5%以下であり、RX3-0001と比較して、RX3-0002及びRX3-0003のHMWS (%)は少ない結果となった。

[0219] CX3-0001は振とう2時間処理検体のピーク面積の残存率が6%であった。これに対して、CX3-0002、CX3-0003のピーク面積の残存率はそれぞれ11%、26%とCX3-0001と比較して良好な結果であった。さらに、CX3-0001、CX3-0002、CX3-0003の振とう2時間処理検体のHMWS (%)は、それぞれ54%、17%、41%であり、CX3-0001と比較して、CX3-0002及びCX

3-0003のHMWS (%)は少ない結果となった。

[0220] TX3-0001は振とう2時間処理検体のピーク面積の残存率が22%であった。またTX3-0002、TX3-0003は振とう2時間処理検体のピーク面積の残存率がそれぞれ81%、41%であり、TX3-0001と比較して、ピーク面積の残存率について良好な結果が得られた。一方、TX3-0001、TX3-0002、TX3-0003の振とう2時間処理検体のHMWS (%)については、それぞれ7%、21%、13%であり、TX3-0001のHMWS (%)が最も少なく、他抗体群(RX3、CX3)とは異なる傾向を示した。

[0221] そこで、TX3-0001~0003において、サイズ排除クロマトグラフィーでは検出できない大きなサイズの粒子形成の有無を確認するため、振とう前及び振とう後2時間処理の検体を用いて、FlowCAM8100 (DKSHジャパン製)で粒子数を評価した。各サンプルの粒子数の経時変化を表2に示す。

[0222] [表2]

	TX3-0001	TX3-0002	TX3-0003
initial	63	66	332
1 hr	171340	7107	78992
2 hr	1272905	55243	562921

(Particles/mL)

[0223] TX3-0001は振とう2時間処理検体の粒子数が1272905個/mLであった。TX3-0002、TX3-0003は振とう2時間処理検体の粒子数はそれぞれ55243個/mL、562921個/mLであり、TX3-0001と比較して、凝集による微粒子数形成が少ないことが示された。HMWSとして検出される凝集体は直径10~100nm程度であるのに対して、FlowCAMでは1μm以上の大きな多量体が検出される。TX3-0001の粒子数がTX3-0002、0003と比較して有意に大きいことから、TX3-0001のHMWS (%)が低いのは、HMWS

相当の凝集体が会合しさらに大きな多量体を形成しているためであると推察される。以上からTX3-0002、TX3-0003はTX3-0001より振とう安定性が良好であることが示された。

[0224] 以上の結果より、C3E-7085を用いたt a F v-ヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7085 Fabフォーマットを用いたs c F v-Fab-ヘテロダイマーFc型及びC3E-7096を用いたt a F v-ヘテロダイマーFc型分子は、振とう安定性が優れていた。

[0225] また、上記実施例において、抗CD3 s c F vをC3E-7096からC3E-7097（配列番号39、図46で示されるアミノ酸配列を有する。）に置き換えてサンプル調製、試験及び評価等を実施することができる。
（実施例6）抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の溶液安定性評価

実施例1)-1~2)-4に準じて、C3E-7093（国際公開第2018/117237号の配列番号80、図88で示されるアミノ酸配列を有するs c F vである。）の溶液安定性における物性改善をめざし、フォーマットがFabに変更されたものであるC3E-7093 Fabのアミノ酸配列（配列番号46、図48で示されるC3E-7093-Fabのアミノ酸配列及び配列番号47、図49で示されるC3E-7093-LCのアミノ酸配列）及びジスルフィド結合が導入されたs c F vであるC3E-7098のアミノ酸配列（配列番号48、図50で示されるアミノ酸配列）を設計する。次いで当該Fab及びs c F vを含む抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFc型分子を調製するための各発現ベクターを作製し、当該両分子を発現させ、精製する。

[0226] 得られた各サンプルは、Amicon Ultra-4（Millipore社）にて遠心濃縮しPBS buffer交換後、PBSを添加しサンプル濃度を20mg/mLに調製し評価用サンプルとする。また各評価用サンプルの開始時のHMWS（%）は、Advance Bio SEC 300A 2.7µm 4.6×150mm（Agilent社）を用いたサイズ排

除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出する。移動相は0.2 M K i / 200 mM K C l / p H 7.0を用い、流速0.2 mL / m i nにて分析する（検出波長280 nm）。各サンプルの加速劣化試験は、40℃で1日、7日、14日保存後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのHMWS（%）を面積百分率法にて算出する。

- [0227] 各サンプルの40℃で保存した際の経時変化を比較することにより、C3E-7093を用いたヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7093 Fabフォーマットを用いたヘテロダイマーFc型及びジスルフィド結合が導入されたscFvであるC3E-7098を用いたヘテロダイマーFc型分子は、溶液安定性が優れていることが示される。

（実施例7）抗CD3抗体フラグメント-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の振とう安定性評価

実施例6で精製される各サンプルをAmicon Ultra-4 (Millipore社)にて遠心濃縮後2 mg/mLに調製し、評価用サンプルとする。また各評価用サンプルの開始時のピーク面積及びHMWS（%）は、Advance Bio SEC 300A 2.7 μm 4.6×150 mm (Agilent社)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出する。移動相は0.2 M K i / 200 mM K C l / p H 7.0を用い、流速0.2 mL / m i nにて分析する（検出波長280 nm）。振とう劣化試験は各サンプルをユニバーサル高速ミキサー (Waken製)を用いて、室温にて、2500 rpmで1時間、2時間と経時的に振とうさせた後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのピーク面積及びHMWS（%）を算出する。

- [0228] 各サンプルの振とう後のピーク面積及びHMWS（%）を比較することにより、C3E-7093を用いたヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7093 Fabフォーマットを用いたヘテロダイマーFc型及びジスルフィド結合が導入されたC3E-7098を用いたヘテロダイマーFc型分

子は、振とう安定性が優れていることが示される。

(実施例8) t a F v-ヘテロダイマーFc型及びs c F v-F a b-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の溶液安定性評価

実施例3に準じて、C3E-7098を抗CD3 s c F vとして含む抗T r o p 2-CD3 t a F v-ヘテロダイマーFc、抗CD98-CD3 t a F v-ヘテロダイマーFc及び抗G P R C 5 D-CD3 t a F v-ヘテロダイマーFc、並びに、C3E-7093 F a bを抗CD3 F a bとして含む抗T r o p 2 s c F v-CD3 F a b-ヘテロダイマーFc、抗CD98 s c F v-CD3 F a b-ヘテロダイマーFc及び抗G P R C 5 D s c F v-CD3 F a b-ヘテロダイマーFcを調製する。

[0229] 調製した各サンプルを用いて、Amicon Ultra-4 (Millipore社)にて遠心濃縮しPBSへbuffer交換後、PBSを添加しサンプル濃度を20mg/mLに調製し評価用サンプルとする。また各評価用サンプルの開始時のHMWS (%)は、AdvanceBio SEC 300A 2.7µm 4.6×150mm (Agilent社)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出する。移動相は0.2M K i / 200mM K C l / pH7.0を用い、流速0.2mL/minにて分析する(検出波長280nm)。各サンプルの加速劣化試験は、40℃で1日、7日、14日保存後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのHMWS (%)を面積百分率法にて算出する。

[0230] 各サンプルの40℃で保存した際の経時変化を比較することにより、C3E-7093を用いたt a F v-ヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7093 F a bフォーマットを用いたs c F v-F a b-ヘテロダイマーFc型及びC3E-7098を用いたt a F v-ヘテロダイマーFc型分子は、溶液安定性が優れていることが示される。

(実施例9) t a F v-ヘテロダイマーFc型及びs c F v-F a b-ヘテロダイマーFc型二重特異性分子の振とう安定性評価

実施例8で調製されるサンプルをAmicon Ultra-4 (Millipore社)にて遠心濃縮後2mg/mLに調製し、評価用サンプルとする。また各評価用サンプルの開始時のピーク面積及びHMWS (%)は、Advance Bio SEC 300A 2.7 μ m 4.6 $\times$ 150mm (Agilent社)を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用い面積百分率法により算出する。移動相は0.2M Ki/200mM KCl/pH 7.0を用い、流速0.2mL/minにて分析する(検出波長280nm)。振とう劣化試験は各サンプルをユニバーサル高速ミキサー(Waken製)を用いて、室温にて、2500rpmで1時間、2時間と経時的に振とうさせた後、上記と同条件にてサイズ排除クロマトグラフィーを実施し、各サンプルのピーク面積及びHMWS (%)を算出する。

[0231] 各サンプルの振とう後のピーク面積及びHMWS (%)を比較することにより、C3E-7093を用いたt a F v-ヘテロダイマーFc型分子に比べ、C3E-7093 F a bフォーマットを用いたs c F v-F a b-ヘテロダイマーFc型及びC3E-7098を用いたt a F v-ヘテロダイマーFc型分子は、振とう安定性が優れていることが示される。

[0232] 実施例6～9において、抗CD3 s c F vをC3E-7098からC3E-7099(配列番号49、図51で示されるアミノ酸配列を有する。)に置き換えてサンプル調製、試験及び評価等を実施することができる。

産業上の利用可能性

[0233] 本発明の二重特異的抗体は、がん等の治療剤又は予防剤として利用することができる。

配列表フリーテキスト

[0234] 配列番号1 : C3E-7085-F a bのアミノ酸配列(図5)
配列番号2 : C3E-7085-L Cのアミノ酸配列(図6)
配列番号3 : C3E-7096のアミノ酸配列(図7)
配列番号4 : H C__h全長のヌクレオチド配列(図8)
配列番号5 : C3E-7085-H C-k全長のヌクレオチド配列(図9)

)

配列番号6 : C 3 E - 7 0 8 5 - F a b - H C - k 全長のヌクレオチド配列 (図10) 配列番号7 : C 3 E - 7 0 8 5 - L C 全長のヌクレオチド配列 (図11)

配列番号8 : C 3 E - 7 0 9 6 - H C - k 全長のヌクレオチド配列 (図12)

配列番号9 : H C _ _ h 全長のアミノ酸配列 (図13)

配列番号10 : C 3 E - 7 0 8 5 - H C - k 全長のアミノ酸配列 (図14)

配列番号11 : C 3 E - 7 0 8 5 - F a b - H C - k 全長のアミノ酸配列 (図15)

配列番号12 : C 3 E - 7 0 8 5 - L C 全長のアミノ酸配列 (図16)

配列番号13 : C 3 E - 7 0 9 6 - H C - k 全長のアミノ酸配列 (図17)

配列番号14 : T X 3 - 0 0 0 1 - H C _ _ k 全長のヌクレオチド配列 (図18)

配列番号15 : T X 3 - 0 0 0 3 - H C _ _ k 全長のヌクレオチド配列 (図19)

配列番号16 : C X 3 - 0 0 0 1 - H C _ _ k 全長のヌクレオチド配列 (図20)

配列番号17 : C X 3 - 0 0 0 3 - H C _ _ k 全長のヌクレオチド配列 (図21)

配列番号18 : R X 3 - 0 0 0 1 - H C _ _ k 全長のヌクレオチド配列 (図22)

配列番号19 : C X 3 - 0 0 0 1 - H C _ _ k 全長のヌクレオチド配列 (図23)

配列番号20 : T X 3 - 0 0 0 1 - H C _ _ k 全長のアミノ酸配列 (図24)

)

- 配列番号 21 : TX3-0003-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 25)
)
- 配列番号 22 : CX3-0001-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 26)
)
- 配列番号 23 : CX3-0003-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 27)
)
- 配列番号 24 : RX3-0001-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 28)
)
- 配列番号 25 : RX3-0003-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 29)
)
- 配列番号 26 : TX3-0002-HC__k 全長のヌクレオチド配列 (図 30)
)
- 配列番号 27 : CX3-0002-HC__k 全長のヌクレオチド配列 (図 31)
)
- 配列番号 28 : RX3-0002-HC__k 全長のヌクレオチド配列 (図 32)
)
- 配列番号 29 : TX3-0002-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 33)
)
- 配列番号 30 : CX3-0002-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 34)
)
- 配列番号 31 : RX3-0002-HC__k 全長のアミノ酸配列 (図 35)
)
- 配列番号 32 : C3E-7085 重鎖 CDRH1 アミノ酸配列 (図 36)
- 配列番号 33 : C3E-7085 重鎖 CDRH2 アミノ酸配列 (図 36)
- 配列番号 34 : C3E-7085 重鎖 CDRH3 アミノ酸配列 (図 36)
- 配列番号 35 : C3E-7085 軽鎖 CDRL1 アミノ酸配列 (図 36)
- 配列番号 36 : C3E-7085 軽鎖 CDRL2 アミノ酸配列 (図 36)
- 配列番号 37 : C3E-7085 軽鎖 CDRL3 アミノ酸配列 (図 36)

配列番号 38 : ペプチドリッカーのアミノ酸配列 (図 37)

配列番号 39 : C3E-7097 のアミノ酸配列 (図 46)

配列番号 40 : C3E-7093 重鎖 CDRH1 アミノ酸配列 (図 47)

配列番号 41 : C3E-7093 重鎖 CDRH2 アミノ酸配列 (図 47)

配列番号 42 : C3E-7093 重鎖 CDRH3 アミノ酸配列 (図 47)

配列番号 43 : C3E-7093 軽鎖 CDRL1 アミノ酸配列 (図 47)

配列番号 44 : C3E-7093 軽鎖 CDRL2 アミノ酸配列 (図 47)

配列番号 45 : C3E-7093 軽鎖 CDRL3 アミノ酸配列 (図 47)

配列番号 46 : C3E-7093-Fab のアミノ酸配列 (図 48)

配列番号 47 : C3E-7093-LC のアミノ酸配列 (図 49)

配列番号 48 : C3E-7098 のアミノ酸配列 (図 50)

配列番号 49 : C3E-7099 のアミノ酸配列 (図 51)

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 下記CDRH1～3及びCDRL1～3を含む、CD3に特異的に結合するFab：
- 配列番号32で示されるアミノ酸配列からなるCDRH1；
- 配列番号33で示されるアミノ酸配列からなるCDRH2；
- 配列番号34で示されるアミノ酸配列からなるCDRH3；
- 配列番号35で示されるアミノ酸配列からなるCDRL1；
- 配列番号36で示されるアミノ酸配列からなるCDRL2；及び
- 配列番号37で示されるアミノ酸配列からなるCDRL3。
- [請求項2] 配列番号1で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118からなる重鎖可変領域及び配列番号2で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～107からなる軽鎖可変領域を含む、請求項1記載のFab。
- [請求項3] 配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号2で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項1又は2記載のFab。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか一つに記載のFabを含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。
- [請求項5] 当該MHCがヒト白血球抗原（HLA）である、請求項4記載の多重特異性分子。
- [請求項6] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項4又は5記載の多重特異性分子。
- [請求項7] 多重特異性抗体である、請求項4～6のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項8] scFv-Fab-ヘテロダイマーFcを含む、請求項4～7のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項9] 三重特異性抗体である、請求項4～8のいずれか一つに記載の多重

特異性分子。

[請求項10] 二重特異性抗体である、請求項4～8のいずれか一つに記載の多重特異性分子。

[請求項11] 標的分子がGPRC5D、CD98又はTrop2である、請求項4～10のいずれか一つに記載の多重特異性分子。

[請求項12] 下記(i)乃至(iii)から選択される一のポリペプチド群を含む、請求項4～11のいずれか一つに記載の多重特異性分子：

(i) 配列番号29の20～718番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号12の21～233番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) 配列番号30の20～717番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号12の21～233番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(iii) 配列番号31の20～713番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド、配列番号9の20～246番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において1若しくは2アミノ酸

が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 1 2 の 2 1 ~ 2 3 3 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項13] 請求項 4 ~ 1 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項14] 請求項 1 3 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項15] 請求項 1 3 記載のポリヌクレオチド又は請求項 1 4 記載のベクターを含むか、又は、請求項 4 ~ 1 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子を産生する細胞。

[請求項16] 請求項 1 5 記載の細胞を培養する工程を含む、請求項 4 ~ 1 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子の製造方法。

[請求項17] 請求項 1 6 記載の方法により得られる多重特異性分子。

[請求項18] 請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の F a b、請求項 4 ~ 1 2 若しくは請求項 1 7 のいずれか一つに記載の多重特異性分子、請求項 1 3 記載のポリヌクレオチド、請求項 1 4 記載のベクター、又は、請求項 1 5 記載の細胞を含む組成物。

[請求項19] 下記 C D R H 1 ~ 3 及び C D R L 1 ~ 3 を含む、C D 3 に特異的に結合し、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合してなる s c F v :

配列番号 3 2 で示されるアミノ酸配列からなる C D R H 1 ;

配列番号 3 3 で示されるアミノ酸配列からなる C D R H 2 ;

配列番号 3 4 で示されるアミノ酸配列からなる C D R H 3 ;

配列番号 3 5 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 1 ;

配列番号 3 6 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 2 ; 及び

配列番号 3 7 で示されるアミノ酸配列からなる C D R L 3。

[請求項20] 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 ~ 1 1 8 からなる重鎖可変領域及び配列番号 3 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 3 4 ~ 2 4 0 からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 1 9 記載の

s c F v。

- [請求項21] 配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる、請求項19又は20記載のs c F v。
- [請求項22] 配列番号39で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118からなる重鎖可変領域及び配列番号39で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～240からなる軽鎖可変領域を含む、請求項19記載のs c F v。
- [請求項23] 配列番号39で示されるアミノ酸配列からなる、請求項19又は22記載のs c F v。
- [請求項24] 請求項19～23のいずれか一つに記載のs c F vを含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。
- [請求項25] 当該MHCがヒト白血球抗原（HLA）である、請求項24記載の多重特異性分子。
- [請求項26] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項24又は25記載の多重特異性分子。
- [請求項27] 多重特異性抗体である、請求項24～26のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項28] t a F vーヘテロダイマーFcを含む、請求項24～27のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項29] 三重特異性抗体である、請求項24～28のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項30] 二重特異性抗体である、請求項24～28のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項31] 標的分子がGPCR5D、CD98又はTrop2である、請求項24～30のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項32] 下記（i）～（iii）から選択される一のポリペプチド対を含む、請求項24～31のいずれか一つに記載の多重特異性分子：

(i) 配列番号 21 の 20～744 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(ii) 配列番号 23 の 20～743 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド；

(iii) 配列番号 25 の 20～739 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド及び配列番号 9 の 20～246 番目のアミノ酸残基からなるアミノ酸配列又は該アミノ酸配列のカルボキシル末端において 1 若しくは 2 アミノ酸が欠失してなるアミノ酸配列を含むポリペプチド。

[請求項33] 請求項 24～32 のいずれか一つに記載の多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。

[請求項34] 請求項 33 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項35] 請求項 33 記載のポリヌクレオチド又は請求項 34 記載のベクターを含むか、又は、請求項 24～32 のいずれか一つに記載の多重特異性分子を産生する細胞。

[請求項36] 請求項 35 記載の細胞を培養する工程を含む、請求項 24～32 のいずれか一つに記載の多重特異性分子の製造方法。

[請求項37] 請求項 36 記載の方法により得られる多重特異性分子。

[請求項38] 請求項 19～23 のいずれか一つに記載の scFv、請求項 24～

32若しくは請求項37のいずれか一つに記載の多重特異性分子、請求項33記載のポリヌクレオチド、請求項34記載のベクター、又は、請求項35記載の細胞を含む組成物。

[請求項39] 下記CDRH1～3及びCDRL1～3を含む、CD3に特異的に結合するFab：

配列番号40で示されるアミノ酸配列からなるCDRH1；

配列番号41で示されるアミノ酸配列からなるCDRH2；

配列番号42で示されるアミノ酸配列からなるCDRH3；

配列番号43で示されるアミノ酸配列からなるCDRL1；

配列番号44で示されるアミノ酸配列からなるCDRL2；及び

配列番号45で示されるアミノ酸配列からなるCDRL3。

[請求項40] 配列番号46で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118からなる重鎖可変領域及び配列番号47で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～109からなる軽鎖可変領域を含む、請求項39記載のFab。

[請求項41] 配列番号46で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド及び配列番号47で示されるアミノ酸配列からなる軽鎖を含む、請求項39又は40記載のFab。

[請求項42] 請求項39～41のいずれか一つに記載のFabを含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。

[請求項43] 当該MHCがヒト白血球抗原（HLA）である、請求項42記載の多重特異性分子。

[請求項44] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項42又は43記載の多重特異性分子。

[請求項45] 多重特異性抗体である、請求項42～44のいずれか一つに記載の多重特異性分子。

[請求項46] 二重特異性抗体である、請求項42～45のいずれか一つに記載の

多重特異性分子。

- [請求項47] 請求項42～46のいずれか一つに記載の多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。
- [請求項48] 請求項47記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [請求項49] 請求項47記載のポリヌクレオチド又は請求項48記載のベクターを含むか、又は、請求項42～46のいずれか一つに記載の多重特異性分子を産生する細胞。
- [請求項50] 請求項49記載の細胞を培養する工程を含む、請求項34～38のいずれか一つに記載の多重特異性分子の製造方法。
- [請求項51] 請求項50記載の方法により得られる多重特異性分子。
- [請求項52] 請求項39～41のいずれか一つに記載のFab、請求項42～46のいずれか一つに記載の多重特異性分子、請求項47記載のポリヌクレオチド、請求項48記載のベクター、又は、請求項49記載の細胞を含む組成物。
- [請求項53] 下記CDRH1～3及びCDRL1～3を含む、CD3に特異的に結合し、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がジスルフィド結合してなるs c F v :
- 配列番号40で示されるアミノ酸配列からなるCDRH1 ;
- 配列番号41で示されるアミノ酸配列からなるCDRH2 ;
- 配列番号42で示されるアミノ酸配列からなるCDRH3 ;
- 配列番号43で示されるアミノ酸配列からなるCDRL1 ;
- 配列番号44で示されるアミノ酸配列からなるCDRL2 ; 及び
- 配列番号45で示されるアミノ酸配列からなるCDRL3。
- [請求項54] 配列番号48で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～118からなる重鎖可変領域及び配列番号48で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号134～242からなる軽鎖可変領域を含む、請求項53記載のs c F v。
- [請求項55] 配列番号48で示されるアミノ酸配列からなる、請求項53又は5

4 記載の s c F v。

- [請求項56] 配列番号 4 9 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 ～ 1 1 8 からなる重鎖可変領域及び配列番号 4 9 で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号 1 3 4 ～ 2 4 2 からなる軽鎖可変領域を含む、請求項 5 3 記載の s c F v。
- [請求項57] 配列番号 4 9 で示されるアミノ酸配列からなる、請求項 5 3 又は 5 6 記載の s c F v。
- [請求項58] 請求項 5 3 ～ 5 7 のいずれか一つに記載の s c F v を含み、がん精巢抗原ペプチドと主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) の複合体ではない標的分子に特異的に結合する、多重特異性分子。
- [請求項59] 当該 MHC がヒト白血球抗原 (HLA) である、請求項 5 8 記載の多重特異性分子。
- [請求項60] 当該標的分子に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む、請求項 5 8 又は 5 9 記載の多重特異性分子。
- [請求項61] 多重特異性抗体である、請求項 5 8 ～ 6 0 のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項62] 二重特異性抗体である、請求項 5 8 ～ 6 1 のいずれか一つに記載の多重特異性分子。
- [請求項63] 請求項 5 8 ～ 6 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子に含まれるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むポリヌクレオチド。
- [請求項64] 請求項 6 3 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [請求項65] 請求項 6 3 記載のポリヌクレオチド又は請求項 6 4 記載のベクターを含むか、又は、請求項 5 8 ～ 6 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子を産生する細胞。
- [請求項66] 請求項 6 5 記載の細胞を培養する工程を含む、請求項 5 8 ～ 6 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子の製造方法。
- [請求項67] 請求項 6 6 記載の方法により得られる多重特異性分子。
- [請求項68] 請求項 5 3 ～ 5 7 のいずれか一つに記載の s c F v、請求項 5 8 ～

6 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子、請求項 6 3 記載のポリヌクレオチド、請求項 6 4 記載のベクター、又は、請求項 6 5 記載の細胞を含む組成物。

[請求項69] 請求項 4 ～ 1 2、2 4 ～ 3 2、4 2 ～ 4 6 及び 5 8 ～ 6 2 のいずれか一つに記載の多重特異性分子を含む医薬組成物。