

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-526981  
(P2018-526981A)

(43) 公表日 平成30年9月20日(2018.9.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12N 15/13 (2006.01)	C12N 15/13 ZNA	4B063
C12N 15/10 (2006.01)	C12N 15/10 200Z	4B064
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4B065
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4C085
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 122 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-501159 (P2018-501159)  
 (86) (22) 出願日 平成28年7月14日(2016.7.14)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月2日(2018.3.2)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/066845  
 (87) 国際公開番号 WO2017/009442  
 (87) 国際公開日 平成29年1月19日(2017.1.19)  
 (31) 優先権主張番号 PA201500414  
 (32) 優先日 平成27年7月15日(2015.7.15)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)  
 (31) 優先権主張番号 PA201500413  
 (32) 優先日 平成27年7月15日(2015.7.15)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)  
 (31) 優先権主張番号 PA201500416  
 (32) 優先日 平成27年7月16日(2015.7.16)  
 (33) 優先権主張国 デンマーク(DK)

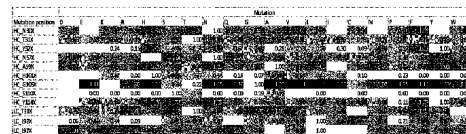
(71) 出願人 507316398  
 ゲンマブ エー/エス  
 デンマーク ディーケイ-1560 コペンハーゲン ブイ カルヴェボー ブリッゲ 43  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100102118  
 弁理士 春名 雅夫  
 (74) 代理人 100160923  
 弁理士 山口 裕孝  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化またはキメラCD3抗体

(57) 【要約】

本発明は、CD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する。本発明はさらに、二重特異性抗体、組成物、薬学的組成物、疾患の処置における該抗体の使用、および処置の方法に関する。



変異

変異位置	D	E	K	R	H	S	T	N	Q	G	A	V	L	I	C	M	P	F	Y	W
HC_N30K	0.97	0.97	0.94	1.00	0.96	1.00	1.00	0.98	0.96	0.96	1.00	0.99	0.94	0.99	1.00	0.99	0.99	1.00	0.97	0.97
HC_T30L	0.66	0.56	0.92	0.93	0.89	0.89	1.00	0.98	0.88	0.89	0.92	0.91	0.88	0.96	0.43	0.78	0.87	0.76	0.76	0.87
HC_N32L	0.34	0.16	0.95	0.96	0.94	1.00	0.92	0.61	0.28	0.55	0.98	0.50	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	1.00	1.00	0.96
HC_N37L	0.94	0.88	0.93	0.90	1.00	0.89	1.00	0.90	0.96	0.87	0.97	0.94	0.94	0.96	0.48	0.88	1.00	0.88	0.88	0.88
HC_A39F	0.94	0.82	0.99	0.95	1.00	0.98	0.74	1.00	0.95	1.00	1.00	0.96	1.00	0.92	1.00	0.91	0.99	1.00	1.00	1.00
HC_H49D	0.91	0.10	1.00	0.86	0.87	0.95	0.16	0.91	0.92	0.88	0.43	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
HC_G49S	1.10	1.07	1.05	0.94	0.92	1.05	1.05	1.00	1.00	1.00	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11	1.11
HC_S18K	0.00	0.00	0.00	1.00	0.32	0.00	0.00	0.39	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
HC_Y14F	0.88	0.86	0.95	1.00	0.99	1.00	0.92	0.83	0.87	0.90	0.96	0.96	0.96	0.96	0.88	0.81	1.00	1.00	1.00	0.99
LC_T10L	0.79	0.98	0.75	0.93	0.97	1.00	0.94	0.88	1.00	1.00	1.00	0.71	0.88	0.97	0.96	1.00	0.93	0.93	0.93	0.93
LC_S2K	0.05	0.45	0.44	0.92	0.87	0.95	0.81	0.76	0.90	0.94	1.00	0.94	1.00	0.99	0.91	0.98	0.97	0.97	0.97	0.97
LC_S7Y	1.00	0.98	1.00	1.00	0.96	0.96	0.97	0.97	1.00	0.99	0.98	1.00	0.98	1.00	0.92	0.94	0.93	0.96	0.94	0.94

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体であって、該抗体が、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、CDR1 SEQ ID NO: 1、CDR2 SEQ ID NO: 2、およびCDR3 SEQ ID NO: 3に示すCDR配列を有する参照抗体の3つのCDR配列のうちの1つに変異を含み、該変異が、T31M、T31P、N57、H101、G105、S110、およびY114からなる群より選択される位置のうちの1つにおける変異であり、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンバリングされている、前記抗体。

## 【請求項 2】

前記抗体が有する、ヒトCD3に対する結合アフィニティーが、CDR1 SEQ ID NO: 1、CDR2 SEQ ID NO: 2、およびCDR3 SEQ ID NO: 3に示すVH CDR配列を有する参照抗体と比較して低減または増強されている、請求項1に記載の抗体。 10

## 【請求項 3】

T31MまたはT31P変異を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 4】

位置N57に変異を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 5】

N57E変異を含む、請求項1、2、および4のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 6】

位置H101に変異を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体。 20

## 【請求項 7】

H101GまたはH101N変異を含む、請求項1、2、および6のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 8】

位置G105に変異を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 9】

G105P変異を含む、請求項1、2、および8のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 10】

位置Y114に変異を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体。

## 【請求項 11】

Y114M、Y114R、またはY114V変異を含む、請求項1、2、および10のいずれか一項に記載の抗体。 30

## 【請求項 12】

前記VH領域が、

a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M];

b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P];

c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E];

d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G];

e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N];

f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P];

g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]; 40

h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G];

i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M];

j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R];

k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]; ならびに

l) a) ~ k) に示す3つのCDR配列のうちのいずれか1つに対して該3つのCDR配列全体で少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3配列であって、ただし、SEQ ID NO: 1、2、3に示す配列を有さない、CDR1、CDR2、およびCDR3配列

からなる群より選択されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体。 50

## 【請求項 1 3】

前記VH領域が、

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；
- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；
- h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；
- i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；
- j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；
- k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]、ならびに

10

l) a) ~ k) にて特定されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列であって、該3つのCDR配列全体で、最大で5個のさらなる変異もしくは置換、最大で4個のさらなる変異もしくは置換、最大で3個のさらなる変異もしくは置換、最大で2個のさらなる変異もしくは置換、または、最大で1個のさらなる変異もしくは置換を有し、該変異もしくは置換が、好ましくは、ヒトCD3に対する結合アフィニティを改変しない、CDR1、CDR2、およびCDR3配列からなる群より選択されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む、請求項1~2のいずれか一項に記載の抗体。

20

## 【請求項 1 4】

前記さらなる変異または置換が、保存的、物理的、または機能的アミノ酸である、請求項13に記載の抗体。

## 【請求項 1 5】

前記VH領域が、

- a) SEQ ID NO: 55に示すVH配列 [T31M]、
- b) SEQ ID NO: 59に示すVH配列 [T31P]、
- c) SEQ ID NO: 107に示すVH配列 [N57E]、
- d) SEQ ID NO: 177に示すVH配列 [H101G]、
- e) SEQ ID NO: 185に示すVH配列 [H101N]、
- f) SEQ ID NO: 221に示すVH配列 [G105P]、
- g) SEQ ID NO: 237に示すVH配列 [S110A]、
- h) SEQ ID NO: 245に示すVH配列 [S110G]、
- i) SEQ ID NO: 285に示すVH配列 [Y114M]、
- j) SEQ ID NO: 293に示すVH配列 [Y114R]、
- k) SEQ ID NO: 299に示すVH配列 [Y114V]、および

30

l) a) ~ k) に示す配列のうちいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有する、VH配列からなる群より選択されるVH配列を有する、請求項1~2のいずれか一項に記載の抗体。

40

## 【請求項 1 6】

前記VH領域が、

- a) SEQ ID NO: 55に示すVH配列 [T31M]、
- b) SEQ ID NO: 59に示すVH配列 [T31P]、
- c) SEQ ID NO: 107に示すVH配列 [N57E]、
- d) SEQ ID NO: 177に示すVH配列 [H101G]、
- e) SEQ ID NO: 185に示すVH配列 [H101N]、
- f) SEQ ID NO: 221に示すVH配列 [G105P]、
- g) SEQ ID NO: 237に示すVH配列 [S110A]、
- h) SEQ ID NO: 245に示すVH配列 [S110G]、
- i) SEQ ID NO: 285に示すVH配列 [Y114M]、

50

j) SEQ ID NO: 293に示すVH配列 [Y114R]、および

k) SEQ ID NO: 299に示すVH配列 [Y114V]

からなる群より選択されるVH配列を有する、請求項1~2のいずれか一項に記載のヒト化またはキメラ抗体。

【請求項17】

前記結合領域が軽鎖可変(VL)領域を含み、該VL領域が、SEQ ID NO: 6、GTN、およびSEQ ID NO: 7に示すCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項18】

前記結合領域が軽鎖可変(VL)領域を含み、該VL領域が、

a) SEQ ID NO: 8に示すVL配列；

b) SEQ ID NO: 10に示すVL配列、または

c) a) ~ b) に示す配列のうちいずれか1つに対して少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を有するVL配列からなる群より選択される、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項19】

前記VL領域が、SEQ ID NO: 6、GTN、およびSEQ ID NO: 7に示す配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含み、前記VH領域が、

a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；

b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；

c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；

d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；

e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；

f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；

g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；

h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；

i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；

j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；ならびに

k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]

からなる群より選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む、請求項1~7に記載の抗体。

【請求項20】

ヒトCD3が、SEQ ID NO: 399にて特定されるヒトCD3 である、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項21】

前記抗体が有する、SEQ ID NO: 402のヒトCD3 ペプチドに対する結合アフィニティーが、バイオレイヤー干渉法により決定した場合の $K_D$ 値  $1.6 \times 10^{-8}$  M ~  $9.9 \times 10^{-8}$  Mまたは  $1.0 \times 10^{-7}$  ~  $9.9 \times 10^{-7}$  Mに相当する、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項22】

前記抗体が有する、SEQ ID NO: 402のヒトCD3 ペプチドに対する結合アフィニティーが、バイオレイヤー干渉法により決定した場合の $K_D$ 値  $1.4 \times 10^{-8}$  ~  $1.0 \times 10^{-8}$  Mまたは  $9.9 \times 10^{-9}$  ~  $1 \times 10^{-9}$  Mに相当する、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項23】

ヒト化抗体である、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項24】

全長抗体である、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項25】

IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択されるアイソタイプの抗体である、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項26】

10

20

30

40

50

一価、二価、または多価である、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 27】

第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 28】

前記抗体が第1および第2免疫グロブリン重鎖を含み、該第1および第2免疫グロブリン重鎖の少なくとも一方において、EUナンバリングに従うヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置における1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、L、D、N、およびPではない、前記請求項のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 29】

前記第1および第2免疫グロブリン重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸がDではない、請求項28に記載の抗体。

【請求項 30】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置N297に対応する位置のアミノ酸がNではない、請求項28に記載の抗体。

【請求項 31】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれLおよびLではない、請求項28に記載の抗体。

【請求項 32】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびE；またはAおよびAである、請求項28および31のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 33】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびEである、請求項32に記載の抗体。

【請求項 34】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれAおよびAである、請求項32に記載の抗体。

【請求項 35】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、L、およびDではない、請求項27に記載の抗体。

【請求項 36】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA；またはA、A、およびAである、請求項35に記載の抗体。

【請求項 37】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである、請求項35～36のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 38】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれA、A、およびAである、請求項35～36のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 39】

前記第1および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、Q、およびSである、請求項28に記載の抗体。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

請求項1～39のいずれか一項に記載の抗体の第1結合領域と、該第1抗原結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む、二重特異性抗体。

【請求項41】

第1および第2重鎖を含む、請求項40に記載の二重特異性抗体。

【請求項42】

前記第1および第2重鎖のそれぞれが、少なくともヒンジ領域、CH2およびCH3領域を含み、該第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸のうちの少なくとも1つが置換されており、該第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸のうちの少なくとも1つが置換されており、該第1および第2重鎖が、同じ位置では置換されていない、請求項40～41のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

【請求項43】

ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸が、前記第1重鎖においてLであり、かつ、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸が、前記第2重鎖においてRであるか、またはその逆である、請求項42に記載の二重特異性抗体。

【請求項44】

前記第1結合領域が請求項1～27のいずれか一項に従い、かつ、前記第2結合領域が該第1結合領域とは異なるターゲットに結合する、請求項40～43のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

【請求項45】

ヒトCD3に結合する抗体の結合アフィニティーを、SEQ ID NO: 1、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変(VH)領域を含む参照抗体と比較して低減させる方法であって、該参照抗体の該3つのCDR配列のうちの1つにおける、T31M、T31P、N57、H101、S110、およびY114の群より選択される位置のうちの1つにおける変異より選択される変異を導入する工程を含み、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンバリングされている、前記方法。

【請求項46】

前記変異が、T31MまたはT31P変異である、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記VH CDR2領域における位置N57に対応する変異を導入する工程を含む、請求項45に記載の方法。

30

【請求項48】

位置N57における前記変異が、N57E変異である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記VH CDR3領域におけるH101、S110、およびY114の群より選択される位置に対応する変異を導入する工程を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項50】

前記VH CDR3領域における前記変異が、H101G、H101N、S110A、S110G、Y114M、Y114R、およびY114Vからなる群より選択される、請求項49に記載の方法。

40

【請求項51】

ヒトCD3に結合する抗体の結合アフィニティーを、SEQ ID NO: 1、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変(VH)領域を含む参照抗体と比較して増強する方法であって、該VH CDR3における位置G105に対応する変異を導入する工程を含み、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンバリングされている、前記方法。

【請求項52】

位置G105における前記変異が、G105P変異である、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

SEQ ID NO: 1、2、3に示す前記参照抗体のVH領域のCDR中に、最大で5個のさらなる変異、最大で4個のさらなる変異、最大で3個のさらなる変異、最大で2個のさらなる変異、ま

50

たは最大で1個のさらなる変異を導入する工程を含む、請求項45～52に記載の方法。

【請求項54】

増強または低減されている結合アフィニティーを有する前記抗体が、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M] ;
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P] ;
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E] ;
- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G] ;
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N] ;
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P] ;
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A] ;
- h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G] ;
- i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M] ;
- j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R] ; ならびに
- k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]

からなる群より選択されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む、請求項45～53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項55】

前記抗体が有する、SEQ ID NO: 402のヒトCD3 ペプチドに対する結合アフィニティーが、バイオレイヤー干渉法により決定した場合の $K_D$ 値  $1.6 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 9.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ または  $1.0 \times 10^{-7} \sim 9.9 \times 10^{-7} \text{ M}$ に相当する、請求項45～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

前記抗体が有する、SEQ ID NO: 402のヒトCD3 ペプチドに対する結合アフィニティーが、バイオレイヤー干渉法により決定した場合の $K_D$ 値  $1.4 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ または  $9.9 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-9} \text{ M}$ に相当する、請求項45～54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

前記ヒトCD3 がT細胞上に発現している、請求項45～57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

前記ヒトCD3 が、単離された形態にある、例えば、単離されたヒトCD3 ペプチドである、請求項45～57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項59】

請求項1～44のいずれか一項に記載の1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする、核酸コンストラクト。

【請求項60】

(i) 請求項1～16のいずれか一項に記載のヒト化もしくはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列；

(ii) 請求項17～18のいずれか一項に記載のヒト化もしくはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列；または

(iii) (i) と (ii) の両方

を含む、発現ベクター。

【請求項61】

請求項60記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項62】

組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞である、請求項61に記載の宿主細胞。

【請求項63】

請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体または請求項28～44に記載の二重特異性抗体を含む、組成物。

【請求項64】

請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体または請求項28～44のいずれか一項に記載の

10

20

30

40

50

二重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 6 5】

医薬として使用するための、請求項1～44のいずれか一項に記載の抗体、請求項63に記載の組成物、または請求項64に記載の薬学的組成物。

【請求項 6 6】

がん、感染性疾患、または自己免疫疾患の処置において医薬として使用するための、請求項1～44のいずれか一項に記載の抗体、請求項63に記載の組成物、または請求項64に記載の薬学的組成物。

【請求項 6 7】

疾患の処置において使用するための、請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体、請求項28～44に記載の二重特異性抗体、請求項63に記載の組成物、または請求項64に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 6 8】

疾患の処置用の医薬を調製するための、請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体または請求項28～44に記載の二重特異性抗体の使用。

【請求項 6 9】

がん、感染性疾患、または自己免疫疾患である疾患の処置のための、請求項68に記載の使用。

【請求項 7 0】

請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体、請求項28～44に記載の二重特異性抗体、請求項63に記載の組成物、または請求項64に記載の薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、疾患の処置方法。

20

【請求項 7 1】

前記疾患が、がん、感染性疾患、または自己免疫疾患である、請求項70に記載の方法。

【請求項 7 2】

請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体、請求項63に記載の組成物、または請求項64に記載の薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、任意で該抗体が検出可能な作用物質で標識されている、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法。

【請求項 7 3】

請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体を生産するための方法であって、  
a) 請求項61～62のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養する工程；および  
b) 培養培地から該抗体を精製する工程

30

を含む、前記方法。

【請求項 7 4】

請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体または請求項28～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体を含む、診断用組成物。

【請求項 7 5】

試料中のCD3抗原またはCD3発現細胞の存在を検出するための方法であって、  
a) 該試料と、請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体または請求項28～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体とを、該抗体または二重特異性抗体とCD3との間の複合体の形成が可能な条件下で接触させる工程；および

40

b) 複合体が形成されているかどうかを解析する工程  
を含む、前記方法。

【請求項 7 6】

以下を含む、試料中のCD3抗原またはCD3発現細胞の存在を検出するためのキット：

i) 請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体または請求項28～44のいずれか一項に記載の二重特異性抗体；および

ii) 該キットの使用説明書。

【請求項 7 7】

請求項1～27のいずれか一項に記載の抗体または請求項28～44のいずれか一項に記載の

50

二重特異性抗体に結合する、抗イデオタイプ抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体、該ヒト化またはキメラ抗体を含む組成物、および疾患の処置における該ヒト化またはキメラ抗体の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

分化抗原群 (Cluster of Differentiation) 3 (CD3) は古くから知られており、それゆえに多くの局面において関心の対象となってきた。具体的には、CD3に対して生じた抗体またはCD3を一成分とするT細胞受容体複合体に対して生じた抗体が、知られている。組換えキメラCD3アイソタイプパリアントならびに多くのヒト化OKT3エフェクター機能変異体抗体のインビトロキャラクタリゼーションが、記述されている [1]。

【0003】

急性の同種異系移植片拒絶の治療において、CD3抗体 (例えば、ムロモナブ-CD3) が広く使用されてきた。さらに、抗CD3モノクローナル抗体hOKT3ガンマ1 (Ala-Ala) による処置は、継続的な免疫抑制薬の投与がない状態で、1型糖尿病の発症後に少なくとも2年間は、Cペプチド応答および臨床パラメータの改良をもたらす [2]。

【0004】

標的抗体療法を改良するための有望なアプローチは、抗原を発現するがん細胞に、細胞傷害性細胞を特異的に送達することによる方法である。腫瘍細胞を効率よく死滅させるためにT細胞を使用するというこのコンセプトは、既に記述されている [3]。しかし、初期の臨床研究はむしろ期待外れで、その理由は主として、二重特異性抗体の低い効力、重篤な有害作用 (サイトカインストーム) および免疫原性にあった [4]。二重特異性抗体の設計と応用が進歩したことにより、サイトカインストームという最初の障壁は部分的に克服され、臨床有効性が改良されて用量制限毒性はなくなっている [5]。

【0005】

例えば、一方のアームで腫瘍細胞上の抗原を標的とし、他方のアームで例えばT細胞上のCD3を標的とし、かつFc受容体結合を提供する活性Fcフラグメントを含有する特定の二重特異性抗体は、腫瘍細胞死を誘導することが示されている。結合すると、T細胞と、腫瘍細胞と、抗体Fc領域に結合するエフェクター細胞との複合体が形成される可能性があり、それが腫瘍細胞の死滅につながる [4]。カツマキソマブは、マウスIgG2a/ラットIgG2b重鎖ヘテロ二量体からなり、腹腔内適用後にがん関連腹水の処置について成功を収めている [6]。しかし、マウス/ラットハイブリッドは免疫原性であり [7]、ヒトにおける長期処置には応用することができない。カツマキソマブに起因する高頻度の処置に関連する有害イベントには、カツマキソマブによる (その活性Fcフラグメントによる) 強力なポリクローナルT細胞活性化に関係するサイトカイン放出関連症状 (すなわち発熱、悪心、嘔吐、悪寒、頻脈および低血圧) [8] ~ [9] が含まれていた。別の抗体が、HER2を発現する細胞株において細胞傷害を誘発するエルツマキソマブ (HER2 x CD3) である。エルツマキソマブは、転移乳がんに関して第II相臨床開発中である [10] ~ [11]。

【0006】

CD3二重特異性抗体および他のCD3二重特異性抗体ベースのフォーマットの効力は、CD3アームのアフィニティーおよび/または第2アームのターゲットに対するアフィニティー、ならびにターゲット細胞上のターゲットコピー数などの、二重特異性抗体のいくつかの特性に依存する。いくつかのCD3二重特異性抗体は、CD3アフィニティーが低い場合に高い効力を示す (EpCam x CD3 - Bortoletto 2002 PMID 12385030, MT103/プリナツモマブ対TandAb - Molhoj 2007 PMID 17083975) が、他のCD3二重特異性物質は、高いCD3アフィニティーを用いて高い効力を示す (Reusch 2015, Mabs, PMID 25875246)。いくつかの場合、

10

20

30

40

50

例えば、抗CD3ターゲティングアームと、選択された腫瘍関連抗原に対する第2アームとから構成される二重特異性抗体で、患者由来のエクスピボで増殖させた活性化T細胞をアミングする際には、高いCD3アフィニティーが必要とされる。後者の場合、腫瘍細胞の細胞溶解を媒介するように産物を患者中に注入して戻す際に、増殖させたT細胞との相互作用を保持するために、CD3アフィニティーは高いべきである (Reusch 2006 Clin Cancer Res PMID 16397041)。しかし、CD3に対する高アフィニティー抗体は、低アフィニティーリガンドと対照的に、低いコピー数でのTCRトリガリングにそれほど有効ではなく、それは、それらが、T細胞応答の連続的なトリガリング様式よりもむしろ単一サイクルを示す、約1:1の化学量論および直線の用量応答曲線を提示するからである (Viola 1996 Science, PMID 8658175)。換言すると、CD3アームの低いアフィニティーは、T細胞が、1つのターゲットおよび/またはターゲット細胞から他へ柔軟に移動するのを可能にすることができる (Hoffman 2005, PMID: 15688411)。

10

## 【0007】

低いCD3アフィニティーは、二重特異性抗体のT細胞に対する偏った局在化 (循環における最初の遭遇による) を潜在的に阻止し、したがって、生体内分布を改良し、かつ正常なT細胞免疫応答の干渉を最小化することができる。第2アームのターゲットおよびターゲットコピー数、適応症、ならびに/または投与経路に依存して、産物の最大効力を強化するように、望ましいCD3アフィニティーをカスタマイズすることができる。ある範囲のCD3アフィニティーをカバーするCD3変異体のパネルは、抗体産物あたりにこれらの特定のテラメードの必要性を合わせるのに必須でありうる。

20

## 【0008】

カニクイザルおよび/またはアカゲザルのCD3に交差反応するCD3抗体が記述されているが [12] ~ [13]、そのような交差反応性抗体にはさらなる改良が必要である。

## 【発明の概要】

## 【0009】

本発明の目的は、CD3に対して最適化されたアフィニティーを有するヒト化またはキメラCD3抗体を提供することである。したがって、SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体などの参照抗体と比較して最適化されているヒト化またはキメラCD3抗体を提供することが、本発明の目的である。したがって、そのような抗体は、SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される参照抗体と比較して低減または増強されている、CD3に対するアフィニティーを有しうる。SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体よりも低い、CD3に対する結合アフィニティーを有する抗体を提供することが、本発明のさらなる目的である。本発明者らは、SEQ ID NO: 4に示すVH領域配列を有する参照抗体と比較して低減されている、SEQ ID NO: 402に示すCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有する抗体は、参照抗体と比較して、インピトロおよびインピボで同じまたは類似の細胞傷害活性を維持していることを見出した。本発明の別の目的は、SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される参照抗体と比較して低減されている、CD3に対する結合アフィニティーを有するが、参照抗体と同じ細胞溶解活性を保持しているCD3抗体を提供することである。SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体よりも高い、CD3に対する結合アフィニティーを有する抗体を提供することが、本発明のさらに別の目的である。

30

40

## 【0010】

本発明は、一局面において、ヒトCD3抗体に結合するヒト化またはキメラ抗体であって、該抗体が、重鎖可変 (VH) 領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、CDR1 SEQ ID NO: 1、CDR2 SEQ ID NO: 2、およびCDR3 SEQ ID NO: 3に示すVH CDR配列を有する参照抗体の3つのCDR配列のうちの1つに変異を含み、該変異が、T31M、T31P、N57、H101、G105、S110、およびY114からなる群より選択される位置のうちの1つにおける変異であり、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンバリングされている、ヒトCD3抗体に結合するヒト化またはキメラ抗体を提供する。SEQ ID NO: 4におけるアミノ酸は、N末端からC末端に

50

向かう方向に、第1のアミノ酸から125番まで、直接数値ナンバリングスキームに従ってナンバリングされている。SEQ ID NO: 4に対応する位置の数値ナンバリングを、図2に示す。さらに、VH CDR領域には、IMGT定義に従って注釈をつけた。

【 0 0 1 1 】

本発明の一態様において、抗体は、CDR1 SEQ ID NO: 1、CDR2 SEQ ID NO: 2、およびCDR3 SEQ ID NO: 3に示すVH CDR配列を有する参照抗体と比較して低減または増強されている、ヒトCD3に対する結合アフィニティを有する。

【 0 0 1 2 】

本発明のいくつかの態様において、参照抗体と比較して低減されている、CD3ペプチド（例えば、SEQ ID NO: 402などのヒトCD3分子）に対する結合アフィニティを有する抗体は、参照抗体と同じ、ターゲット細胞に対する細胞溶解活性を維持しうる。

10

【 0 0 1 3 】

本発明の一態様において、抗体は、SEQ ID NO: 4のN57に対応する位置に変異を含む。一態様において、変異はN57Eである。

【 0 0 1 4 】

本発明の一態様において、抗体は、SEQ ID NO: 4のH101Gに対応する位置に変異を含む。一態様において、変異はH101GまたはH101Nである。

【 0 0 1 5 】

本発明の一態様において、抗体は、SEQ ID NO: 4のG105に対応する位置に変異を含む。一態様において、変異はG105Pである。

20

【 0 0 1 6 】

本発明の一態様において、抗体は、SEQ ID NO: 4のY114に対応する位置に変異を含む。一態様において、変異は、Y114M、Y114R、またはY114Vである。

【 0 0 1 7 】

一態様において、本発明は、重鎖可変（VH）領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、以下からなる群の1つより選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体を提供する；

- a) SEQ ID NO: 12、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- b) SEQ ID NO: 14、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- c) SEQ ID NO: 16、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- d) SEQ ID NO: 18、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- e) SEQ ID NO: 20、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- f) SEQ ID NO: 22、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- g) SEQ ID NO: 24、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- h) SEQ ID NO: 26、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- i) SEQ ID NO: 28、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- j) SEQ ID NO: 30、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- k) SEQ ID NO: 32、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- l) SEQ ID NO: 34、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- m) SEQ ID NO: 36、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- n) SEQ ID NO: 38、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- o) SEQ ID NO: 40、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- p) SEQ ID NO: 42、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- q) SEQ ID NO: 44、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- r) SEQ ID NO: 46、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- s) SEQ ID NO: 48、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- t) SEQ ID NO: 50、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- u) SEQ ID NO: 52、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- v) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- w) SEQ ID NO: 56、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；

30

40

50

- x ) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- y ) SEQ ID NO: 60、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- z ) SEQ ID NO: 62、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- aa ) SEQ ID NO: 64、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- bb ) SEQ ID NO: 66、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- cc ) SEQ ID NO: 68、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- dd ) SEQ ID NO: 70、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ee ) SEQ ID NO: 72、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ff ) SEQ ID NO: 74、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- gg ) SEQ ID NO: 76、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 10
- hh ) SEQ ID NO: 78、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ii ) SEQ ID NO: 80、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- jj ) SEQ ID NO: 82、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- kk ) SEQ ID NO: 84、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ll ) SEQ ID NO: 86、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- mm ) SEQ ID NO: 88、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- nn ) SEQ ID NO: 90、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- oo ) SEQ ID NO: 92、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- pp ) SEQ ID NO: 94、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- qq ) SEQ ID NO: 96、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 20
- rr ) SEQ ID NO: 98、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ss ) SEQ ID NO: 1、100、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- tt ) SEQ ID NO: 1、102、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- uu ) SEQ ID NO: 1、104、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- vv ) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ww ) SEQ ID NO: 1、108、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- xx ) SEQ ID NO: 1、110、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- yy ) SEQ ID NO: 1、112、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- zz ) SEQ ID NO: 1、114、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- aaa ) SEQ ID NO: 1、116、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 30
- bbb ) SEQ ID NO: 1、118、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ccc ) SEQ ID NO: 1、120、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ddd ) SEQ ID NO: 1、122、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- eee ) SEQ ID NO: 1、124、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- fff ) SEQ ID NO: 1、126、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ggg ) SEQ ID NO: 1、128、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- hhh ) SEQ ID NO: 1、130、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- iii ) SEQ ID NO: 1、132、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- jjj ) SEQ ID NO: 1、134、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- kkk ) SEQ ID NO: 1、136、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 40
- lll ) SEQ ID NO: 1、138、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- mmm ) SEQ ID NO: 1、140、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- nnn ) SEQ ID NO: 1、142、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ooo ) SEQ ID NO: 1、144、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ppp ) SEQ ID NO: 1、146、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- qqq ) SEQ ID NO: 1、148、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- rrr ) SEQ ID NO: 1、150、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- sss ) SEQ ID NO: 1、152、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- ttt ) SEQ ID NO: 1、154、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;
- uuu ) SEQ ID NO: 1、156、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 50

vvv ) SEQ ID NO: 1、158、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 www ) SEQ ID NO: 1、160、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 xxx ) SEQ ID NO: 1、162、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 yyy ) SEQ ID NO: 1、164、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 zzz ) SEQ ID NO: 1、166、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 aaaa ) SEQ ID NO: 1、168、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 bbbb ) SEQ ID NO: 1、2、170に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 cccc ) SEQ ID NO: 1、2、172に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 dddd ) SEQ ID NO: 1、2、174に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 eeee ) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 10  
 ffff ) SEQ ID NO: 1、2、178に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 gggg ) SEQ ID NO: 1、2、180に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 hhhh ) SEQ ID NO: 1、2、182に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 iiii ) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 jjjj ) SEQ ID NO: 1、2、186に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 kkkk ) SEQ ID NO: 1、2、188に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 llll ) SEQ ID NO: 1、2、190に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 mmmm ) SEQ ID NO: 1、2、192に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 nnnn ) SEQ ID NO: 1、2、194に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 oooo ) SEQ ID NO: 1、2、196に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 20  
 pppp ) SEQ ID NO: 1、2、198に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 qqqq ) SEQ ID NO: 1、2、200に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 rrrr ) SEQ ID NO: 1、2、202に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ssss ) SEQ ID NO: 1、2、204に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 tttt ) SEQ ID NO: 1、2、206に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 uuuu ) SEQ ID NO: 1、2、208に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 vvvv ) SEQ ID NO: 1、2、210に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 wwww ) SEQ ID NO: 1、2、212に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 xxxx ) SEQ ID NO: 1、2、214に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 yyyy ) SEQ ID NO: 1、2、216に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 30  
 zzzz ) SEQ ID NO: 1、2、218に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 aaaaa ) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 bbbbb ) SEQ ID NO: 1、2、222に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ccccc ) SEQ ID NO: 1、2、224に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ddddd ) SEQ ID NO: 1、2、226に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 eeeee ) SEQ ID NO: 1、2、228に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 fffff ) SEQ ID NO: 1、2、230に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ggggg ) SEQ ID NO: 1、2、232に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 hhhhh ) SEQ ID NO: 1、2、234に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 iiiii ) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 40  
 jjjjj ) SEQ ID NO: 1、2、238に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 kkkkk ) SEQ ID NO: 1、2、240に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 lllll ) SEQ ID NO: 1、2、242に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 mmmmm ) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 nnnnn ) SEQ ID NO: 1、2、246に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ooooo ) SEQ ID NO: 1、2、248に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ppppp ) SEQ ID NO: 1、2、250に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 qqqqq ) SEQ ID NO: 1、2、252に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 rrrrr ) SEQ ID NO: 1、2、254に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 sssss ) SEQ ID NO: 1、2、256に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 50

ttttt) SEQ ID NO: 1、2、258に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 uuuuu) SEQ ID NO: 1、2、260に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 vvvvv) SEQ ID NO: 1、2、262に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 wwwww) SEQ ID NO: 1、2、264に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 xxxxx) SEQ ID NO: 1、2、266に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 yyyyy) SEQ ID NO: 1、2、268に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 zzzzz) SEQ ID NO: 1、2、270に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 aaaaa) SEQ ID NO: 1、2、272に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 bbbbbb) SEQ ID NO: 1、2、274に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 ccccc) SEQ ID NO: 1、2、276に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 ddddd) SEQ ID NO: 1、2、278に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 eeeee) SEQ ID NO: 1、2、280に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 fffff) SEQ ID NO: 1、2、282に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 ggggg) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 hhhhh) SEQ ID NO: 1、2、286に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 iiiii) SEQ ID NO: 1、2、288に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 jjjjj) SEQ ID NO: 1、2、290に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 kkkkk) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 lllll) SEQ ID NO: 1、2、294に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 mmmmm) SEQ ID NO: 1、2、296に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；  
 nnnnn) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびに  
 ooooo) SEQ ID NO: 1、2、300に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列。

10

20

30

40

50

## 【0018】

すなわち、本発明の発明者らは、本発明の第1の局面において、前記配列のヒト化またはキメラ抗体が、SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体などの参照抗体と比較して最適化された、SEQ ID NO: 402のCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有することを見出した。SEQ ID NO: 4およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される参照抗体は、実施例7により例証されるように、 $1.5 \times 10^{-8}$  Mの、SEQ ID NO: 402のCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有する。本発明のいくつかの態様において、抗体は、実施例7において表6に記載したように、バイオレイヤー干渉法により決定した場合に、例えば $1.6 \times 10^{-8}$  M ~  $9.9 \times 10^{-8}$  Mの結合アフィニティー、または例えば $1.0 \times 10^{-7}$  ~  $9.9 \times 10^{-7}$  Mの結合アフィニティーの、 $1.5 \times 10^{-8}$  Mよりも低い、SEQ ID NO: 402のCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有する。本発明のいくつかの態様において、抗体は、例えば $1.4 \times 10^{-8}$  ~  $1.0 \times 10^{-8}$  M、例えば $9.9 \times 10^{-9}$  ~  $1 \times 10^{-9}$  M、または例えば $9.9 \times 10^{-9}$  ~  $1 \times 10^{-9}$  Mの、 $1.5 \times 10^{-8}$  Mよりも高い、SEQ ID NO: 402のCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有する。結合アフィニティーは、 $K_D$ 値に相当する。

## 【0019】

本発明の一局面において、本発明は、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、以下からなる群の1つより選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する；

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；
- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；
- h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；
- i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；
- j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；

k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]、ならびに

l) a) ~ k) に示す3つのCDR配列のうちのいずれか1つに対して該3つのCDR配列全体で少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3配列であって、ただし、SEQ ID NO: 1、2、3に示す配列を有さない、CDR1、CDR2、およびCDR3配列。

【0020】

別の局面において、本発明は、結合領域が軽鎖可変(VL)領域を含み、該VL領域が、SEQ ID NO: 6、GTN、7に示すCDRを有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む、ヒト化またはキメラ抗体に関する。

【0021】

さらに別の局面において、本発明は、ヒトCD3に結合する抗体の結合アフィニティーを、SEQ ID NO: 1、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変(VH)領域を含む参照抗体と比較して低減させる方法であって、T31M、T31P、N57、H101、S110、およびY114の群より選択される位置のうちの1つにおける変異より選択される、該参照抗体の3つのCDR配列のうちの1つにおける変異を導入する工程を含み、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンパリングされている方法に関する。

【0022】

本発明の一態様において、方法は、T31MまたはT31Pに対応するVH領域CDR1領域配列における変異を導入する工程を含む。本発明の別の態様において、方法は、N57Eに対応するVH領域CDR2領域における変異を導入する工程を含む。本発明のさらに別の態様において、方法は、H101G、H101N、G105P、S110A、S110G、Y114M、Y114R、またはY114Vより選択されるVH領域CDR3領域における変異を導入する工程を含む。

【0023】

一態様において、CD3はヒトCD3 である。

【0024】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体の第1結合領域と、該第1抗原結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む、二重特異性抗体に関する。

【0025】

別の局面において、本発明は、本発明の1つまたは複数のアミノ酸配列をコードする核酸コンストラクトに関する。

【0026】

別の局面において、本発明は、(i)本発明のヒト化またはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列、(ii)本発明のヒト化またはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列、または(iii)(i)と(ii)の両方を含む発現ベクターに関する。

【0027】

別の局面において、本発明は、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞に関する。

【0028】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体を含む組成物に関する。

【0029】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物に関する。

【0030】

別の局面において、本発明は、医薬として使用するための、本発明の抗体もしくは二重特異的抗体、組成物、または薬学的組成物に関する。

【0031】

別の局面において、本発明は、疾患の処置に使用するための、本発明の抗体もしくは二重特異的抗体、組成物、または薬学的組成物に関する。

【0032】

別の局面において、本発明は、疾患の処置を必要とする対象に本発明の抗体もしくは二

10

20

30

40

50

重特異的抗体、組成物、または薬学的組成物を投与する工程を含む、疾患の処置方法に関する。

【0033】

別の局面において、本発明は、抗体または二重特異的抗体を皮下投与または局所投与する方法に関する。

【0034】

一局面において、本発明は、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法に関し、本方法は、検出可能な作用物質で標識されていてもよい本発明のヒト化またはキメラ抗体、本発明の組成物、または本発明の薬学的組成物を対象に投与する工程を含む。

10

【0035】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体を生産するための方法に関し、本方法は、a) 本発明の宿主細胞を培養する工程、およびb) 培養培地から前記抗体を精製する工程を含む。

【0036】

別の局面において、本発明は、本明細書において開示される態様のうちのいずれか一つの抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物に関する。

【0037】

一態様において、診断用組成物は、二重特異性抗体による処置から恩恵を受ける患者をスクリーニングおよび選択するのに使用されるコンパニオン診断用である。

20

【0038】

別の局面において、本発明は、試料中のCD3抗原またはCD3発現細胞の存在を検出するための方法に関し、本方法は、a) 前記試料を本発明の抗体または二重特異性抗体と、前記抗体または二重特異性抗体とCD3との複合体の形成が可能な条件下で接触させる工程、およびb) 複合体が形成されたかどうかを解析する工程を含む。

【0039】

別の局面において、本発明は、i) 本発明の抗体または二重特異性抗体と、ii) キットの使用説明書とを含む、試料中のCD3抗原またはCD3発現細胞の存在を検出するためのキットに関する。

【0040】

別の局面において、本発明は、本発明の抗体に結合する抗イディオタイプ抗体または抗イディオタイプ抗体の対に関する。

30

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】ミュータント対wt UniTE-huCD3-H1L1-T41K分子の結合比のヒートプロット。1より上の比は、wtよりも強い結合を示し、他方、1より下の比は、wtよりも弱い結合を示す。結合は、CD3/TCR-LC13をトランスフェクトしたFreestyle 293-F細胞上で決定した。

【図2】VH中に変異を有する作製したライブラリーにおける選択したCD3アフィニティー変異体のアライメント。ヒト化野生型配列 (SEQ ID NO: 4) HuCD3-H1において、CDRに下線を引いている。強調表示したアミノ酸は置換である。

40

【図3】フローサイトメトリーにより決定した、ヒト化CD3 (UniTE-huCD3-H1L1-T41K) 抗体の選択したVHアフィニティー変異体のT細胞結合曲線。図示したアフィニティー変異体は、野生型応答と検出不可能な応答との間の広範囲なT細胞結合能力をカバーする。

【図4】非常に低い、検出不可能なT細胞結合を示す、フローサイトメトリーにより決定した、ヒト化CD3 (UniTE-huCD3-H1L1-T41K) 抗体の選択したVHアフィニティー変異体のT細胞結合曲線。

【図5】フローサイトメトリーにより決定した、ヒト化CD3 (BisG1-huCD3-H1L1-X-FEAL/1014-ハーセプチン-FEAR) 抗体の選択したVHアフィニティー変異体のT細胞結合曲線。図示したアフィニティー変異体は、野生型応答と検出不可能な応答との間の広範囲なT細胞結合能力をカバーする。

50

【図6A】アラマーブルーアッセイにより測定した、固形腫瘍細胞株に対するCD3アフィニティー変異体の細胞傷害。(A)NCI-N87細胞、エフェクター細胞(T細胞):腫瘍細胞(NCI-N87細胞)比=3:1、48時間のインキュベーション、n=2のドナー。図示した試験アフィニティー変異体は、全ての試験腫瘍細胞株について、野生型応答と観察されない細胞傷害との間の広範囲な細胞傷害をカバーしている。

【図6B】アラマーブルーアッセイにより測定した、固形腫瘍細胞株に対するCD3アフィニティー変異体の細胞傷害。(B)SKOV3細胞、T細胞:SKOV3細胞比=4:1、48時間のインキュベーション、n=2のドナー。図示した試験アフィニティー変異体は、全ての試験腫瘍細胞株について、野生型応答と観察されない細胞傷害との間の広範囲な細胞傷害をカバーしている。

【図6C】アラマーブルーアッセイにより測定した、固形腫瘍細胞株に対するCD3アフィニティー変異体の細胞傷害。(C)MDA-MB-231細胞、T細胞:MDA-MB-231細胞比=8:1、48時間のインキュベーション、n=2のドナー。図示した試験アフィニティー変異体は、全ての試験腫瘍細胞株について、野生型応答と観察されない細胞傷害との間の広範囲な細胞傷害をカバーしている。

【図7】クロム放出アッセイにより測定した、血液(Daudi)細胞株に対するCD3アフィニティー変異体の細胞傷害。T細胞:Daudi細胞比=10:1、24時間のインキュベーション、1ドナー。図示した試験アフィニティー変異体は、試験腫瘍細胞株について、野生型応答と観察されない細胞傷害との間の広範囲な細胞傷害をカバーする。

【図8A】NOD-SCIDマウス中のNCI-N87、ヒトPBMC同時移植モデルにおけるCD3×HER2二重特異性抗体の細胞傷害。HLA-Aが適合した非刺激ヒトPBMCをヒトT細胞の供給源として、NOD-SCIDマウスに用量レベル0.05 mg/kgのCD3アフィニティー抗体とNCI-N87腫瘍細胞を同時に接種した。ヒト化WT CD3(huCD3)および4種の異なるCD3アフィニティー変異体(N57E、H101K、S110A、Y114M)を試験した。(A)0.05 mg/kgの抗体での処置後に経時的に追跡した平均腫瘍体積(1群あたりn=4)。

【図8B】NOD-SCIDマウス中のNCI-N87、ヒトPBMC同時移植モデルにおけるCD3×HER2二重特異性抗体の細胞傷害。HLA-Aが適合した非刺激ヒトPBMCをヒトT細胞の供給源として、NOD-SCIDマウスに用量レベル0.5 mg/kgのCD3アフィニティー抗体とNCI-N87腫瘍細胞を同時に接種した。ヒト化WT CD3(huCD3)および4種の異なるCD3アフィニティー変異体(N57E、H101K、S110A、Y114M)を試験した。(B)0.5 mg/kgの抗体での処置後に経時的に追跡した平均腫瘍体積(1群あたりn=4)。

【図8C】NOD-SCIDマウス中のNCI-N87、ヒトPBMC同時移植モデルにおけるCD3×HER2二重特異性抗体の細胞傷害。HLA-Aが適合した非刺激ヒトPBMCをヒトT細胞の供給源として、NOD-SCIDマウスに用量レベル0.05 mg/kgのCD3アフィニティー抗体とNCI-N87腫瘍細胞を同時に接種した。ヒト化WT CD3(huCD3)および4種の異なるCD3アフィニティー変異体(N57E、H101K、S110A、Y114M)を試験した。(C)0日目の0.05 mg/kgの抗体での処置後44日目の平均腫瘍体積(1群あたりn=4)。Cのデータについて統計を行った。

【図8D】NOD-SCIDマウス中のNCI-N87、ヒトPBMC同時移植モデルにおけるCD3×HER2二重特異性抗体の細胞傷害。HLA-Aが適合した非刺激ヒトPBMCをヒトT細胞の供給源として、NOD-SCIDマウスに用量レベル0.5 mg/kgのCD3アフィニティー抗体とNCI-N87腫瘍細胞を同時に接種した。ヒト化WT CD3(huCD3)および4種の異なるCD3アフィニティー変異体(N57E、H101K、S110A、Y114M)を試験した。(D)0日目の0.5 mg/kgの抗体での処置後44日目の平均腫瘍体積(1群あたりn=4)。Dのデータについて統計を行った。

【発明を実施するための形態】

【0042】

詳細な説明

一局面において、本発明は、CD3に対して最適化されたアフィニティーを有する、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する。したがって、SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体などの参照抗体と比較して最適化されているヒト化またはキメラCD3抗体を提供することが、本発明の目的である。SEQ ID NO: 4のV

10

20

30

40

50

H配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体などの参照抗体と比較して最適化されたインビボの効力を有する抗体を提供することが、本発明のさらなる目的である。SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体よりも低い、CD3に対する結合アフィニティーを有する抗体を提供することが、本発明のさらなる目的である。SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される抗体よりも高い、CD3に対する結合アフィニティーを有する抗体を提供することが、本発明のさらに別の目的である。

【0043】

一局面において、本発明は、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体であって、該抗体が、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、CDR1 SEQ ID NO: 1、CDR2 SEQ ID NO: 2、およびCDR3 SEQ ID NO: 3に示すCDR配列を有する参照抗体の3つのCDR配列のうちの一つに変異を含み、該変異が、T31M、T31P、N57、H101、G105、S110、およびY114からなる群より選択される位置のうちの一つにおける変異であり、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンバリングされている、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する。SEQ ID NO: 4におけるアミノ酸は、N末端からC末端に向かう方向に、第1のアミノ酸から125番まで、直接数値ナンバリングスキームに従ってナンバリングされている。SEQ ID NO: 4に対応する位置の数値ナンバリングを、図2に示す。さらに、CDR領域には、IMGT定義に従って注釈をつけた。

10

【0044】

本発明の一態様において、抗体は、CDR1 SEQ ID NO: 1、CDR2 SEQ ID NO: 2、およびCDR3 SEQ ID NO: 3に示すVH CDR配列を有する参照抗体と比較して低減または増強されている、ヒトCD3に対する結合アフィニティーを有する。

20

【0045】

本発明のいくつかの態様において、参照抗体と比較して低減されている、CD3ペプチド(例えば、SEQ ID NO: 402などのCD3分子)に対する結合アフィニティーを有する抗体は、参照抗体と同じ、ターゲット細胞に対する細胞溶解活性を維持しうる。

【0046】

本発明の一態様において、抗体は、T31MまたはT31P変異を含む。位置T31は、SEQ ID NO: 4に従う。

【0047】

本発明の一態様において、抗体は、位置N57に変異を含む。位置N57は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異はN57Eである。

30

【0048】

本発明の一態様において、抗体は、位置H101に変異を含む。位置H101は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異はH101GまたはH101Nである。

【0049】

本発明の一態様において、抗体は、位置G105に変異を含む。位置G105は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異はG105Pである。

【0050】

本発明の一態様において、抗体は、位置Y114に変異を含む。位置Y114は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異は、Y114M、Y114R、またはY114Vである。

40

【0051】

SEQ ID NO: 4およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される参照抗体は、実施例7により例証されるように、 $1.5 \times 10^{-8}$  Mの $K_D$ 値に相当する、SEQ ID NO: 402のCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有する。

【0052】

本発明のいくつかの態様において、抗体は、実施例7に記載したバイオレイヤー干渉法により決定した場合に、例えば $1.6 \times 10^{-8}$  M ~  $9.9 \times 10^{-8}$  Mの結合アフィニティー、または例えば $1.0 \times 10^{-7}$  ~  $9.9 \times 10^{-7}$  Mの結合アフィニティーの、 $1.5 \times 10^{-8}$  Mよりも低い、SEQ ID NO: 402のCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有する。本発明のいくつかの態様

50

において、抗体は、例えば $1.4 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-8}$  M、例えば $9.9 \times 10^{-9} \sim 1.0 \times 10^{-9}$  Mなどの、 $1.5 \times 10^{-8}$  Mよりも高い、SEQ ID NO: 402のCD3ペプチドに対する結合アフィニティーを有する。

【 0 0 5 3 】

一態様において、本発明は、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、以下からなる群の1つより選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する；

- a) SEQ ID NO: 12、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- b) SEQ ID NO: 14、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- c) SEQ ID NO: 16、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- d) SEQ ID NO: 18、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- e) SEQ ID NO: 20、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- f) SEQ ID NO: 22、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- g) SEQ ID NO: 24、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- h) SEQ ID NO: 26、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- i) SEQ ID NO: 28、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- j) SEQ ID NO: 30、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- k) SEQ ID NO: 32、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- l) SEQ ID NO: 34、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- m) SEQ ID NO: 36、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- n) SEQ ID NO: 38、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- o) SEQ ID NO: 40、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- p) SEQ ID NO: 42、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- q) SEQ ID NO: 44、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- r) SEQ ID NO: 46、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- s) SEQ ID NO: 48、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- t) SEQ ID NO: 50、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- u) SEQ ID NO: 52、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- v) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- w) SEQ ID NO: 56、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- x) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- y) SEQ ID NO: 60、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- z) SEQ ID NO: 62、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- aa) SEQ ID NO: 64、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- bb) SEQ ID NO: 66、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- cc) SEQ ID NO: 68、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- dd) SEQ ID NO: 70、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ee) SEQ ID NO: 72、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ff) SEQ ID NO: 74、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- gg) SEQ ID NO: 76、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- hh) SEQ ID NO: 78、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ii) SEQ ID NO: 80、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- jj) SEQ ID NO: 82、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- kk) SEQ ID NO: 84、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ll) SEQ ID NO: 86、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- mm) SEQ ID NO: 88、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- nn) SEQ ID NO: 90、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- oo) SEQ ID NO: 92、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- pp) SEQ ID NO: 94、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- qq) SEQ ID NO: 96、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；

10

20

30

40

50

rr ) SEQ ID NO: 98、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ss ) SEQ ID NO: 1、100、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 tt ) SEQ ID NO: 1、102、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 uu ) SEQ ID NO: 1、104、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 vv ) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ww ) SEQ ID NO: 1、108、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 xx ) SEQ ID NO: 1、110、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 yy ) SEQ ID NO: 1、112、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 zz ) SEQ ID NO: 1、114、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 aaa ) SEQ ID NO: 1、116、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 10  
 bbb ) SEQ ID NO: 1、118、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ccc ) SEQ ID NO: 1、120、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ddd ) SEQ ID NO: 1、122、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 eee ) SEQ ID NO: 1、124、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 fff ) SEQ ID NO: 1、126、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ggg ) SEQ ID NO: 1、128、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 hhh ) SEQ ID NO: 1、130、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 iii ) SEQ ID NO: 1、132、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 jjj ) SEQ ID NO: 1、134、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 kkk ) SEQ ID NO: 1、136、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 20  
 lll ) SEQ ID NO: 1、138、3に示すCDR配列 ;  
 mmm ) SEQ ID NO: 1、140、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 nnn ) SEQ ID NO: 1、142、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ooo ) SEQ ID NO: 1、144、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ppp ) SEQ ID NO: 1、146、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 qqq ) SEQ ID NO: 1、148、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 rrr ) SEQ ID NO: 1、150、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 sss ) SEQ ID NO: 1、152、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ttt ) SEQ ID NO: 1、154、3に示すCDR配列 ;  
 uuu ) SEQ ID NO: 1、156、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 30  
 vvv ) SEQ ID NO: 1、158、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 www ) SEQ ID NO: 1、160、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 xxx ) SEQ ID NO: 1、162、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 yyy ) SEQ ID NO: 1、164、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 zzz ) SEQ ID NO: 1、166、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 aaaa ) SEQ ID NO: 1、168、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 bbbb ) SEQ ID NO: 1、2、170に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 cccc ) SEQ ID NO: 1、2、172に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 dddd ) SEQ ID NO: 1、2、174に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 eeee ) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 40  
 ffff ) SEQ ID NO: 1、2、178に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 gggg ) SEQ ID NO: 1、2、180に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 hhhh ) SEQ ID NO: 1、2、182に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 iiii ) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR配列 ;  
 jjjj ) SEQ ID NO: 1、2、186に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 kkkk ) SEQ ID NO: 1、2、188に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 llll ) SEQ ID NO: 1、2、190に示すCDR配列 ;  
 mmmm ) SEQ ID NO: 1、2、192に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 nnnn ) SEQ ID NO: 1、2、194に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 oooo ) SEQ ID NO: 1、2、196に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 50

pppp ) SEQ ID NO: 1、2、198に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 qqqq ) SEQ ID NO: 1、2、200に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 rrrr ) SEQ ID NO: 1、2、202に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ssss ) SEQ ID NO: 1、2、204に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 tttt ) SEQ ID NO: 1、2、206に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 uuuu ) SEQ ID NO: 1、2、208に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 vvvv ) SEQ ID NO: 1、2、210に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 wwww ) SEQ ID NO: 1、2、212に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 xxxx ) SEQ ID NO: 1、2、214に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 yyyy ) SEQ ID NO: 1、2、216に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 10  
 zzzz ) SEQ ID NO: 1、2、218に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 aaaaa ) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 bbbbb ) SEQ ID NO: 1、2、222に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ccccc ) SEQ ID NO: 1、2、224に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ddddd ) SEQ ID NO: 1、2、226に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 eeeee ) SEQ ID NO: 1、2、228に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 fffff ) SEQ ID NO: 1、2、230に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ggggg ) SEQ ID NO: 1、2、232に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 hhhhh ) SEQ ID NO: 1、2、234に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 iiiii ) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 20  
 jjjjj ) SEQ ID NO: 1、2、238に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 kkkkk ) SEQ ID NO: 1、2、240に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 lllll ) SEQ ID NO: 1、2、242に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 mmmmm ) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 nnnnn ) SEQ ID NO: 1、2、246に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ooooo ) SEQ ID NO: 1、2、248に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ppppp ) SEQ ID NO: 1、2、250に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 qqqqq ) SEQ ID NO: 1、2、252に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 rrrrr ) SEQ ID NO: 1、2、254に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 sssss ) SEQ ID NO: 1、2、256に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 30  
 ttttt ) SEQ ID NO: 1、2、258に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 uuuuu ) SEQ ID NO: 1、2、260に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 vvvvv ) SEQ ID NO: 1、2、262に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 wwwww ) SEQ ID NO: 1、2、264に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 xxxxx ) SEQ ID NO: 1、2、266に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 yyyyy ) SEQ ID NO: 1、2、268に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 zzzzz ) SEQ ID NO: 1、2、270に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 aaaaaa ) SEQ ID NO: 1、2、272に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 bbbbbb ) SEQ ID NO: 1、2、274に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ccccc ) SEQ ID NO: 1、2、276に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 40  
 ddddd ) SEQ ID NO: 1、2、278に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 eeeee ) SEQ ID NO: 1、2、280に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 fffff ) SEQ ID NO: 1、2、282に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 ggggg ) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 hhhhh ) SEQ ID NO: 1、2、286に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 iiiii ) SEQ ID NO: 1、2、288に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 jjjjj ) SEQ ID NO: 1、2、290に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 kkkkk ) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 lllll ) SEQ ID NO: 1、2、294に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ;  
 mmmmm ) SEQ ID NO: 1、2、296に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 ; 50

nnnnnn) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびに

oooooo) SEQ ID NO: 1、2、300に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列。

【0054】

一態様において、本発明は、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、以下からなる群の1つより選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する；

a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；

b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；

c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；

d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；

10

e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；

f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；

g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；

h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；

i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；

j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；

k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]、ならびに

l) a) ~ k) に示す3つのCDR配列のうちのいずれか1つに対して該3つのCDR配列全体で少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3配列であって、ただし、SEQ ID NO: 1、2、3に示す配列を有さない、CDR1、CDR2、およびCDR3配列。

20

【0055】

一態様において、本発明は、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、以下からなる群の1つより選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する；

a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；

b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；

c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；

d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；

e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；

30

f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；

g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；

h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；

i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；

j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；

k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]；ならびに

a. および

l) a) ~ k) にて特定されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列であって、該3つのCDR配列全体で、最大で5個のさらなる変異または置換、最大で4個のさらなる変異または置換、最大で3個のさらなる変異または置換、最大で2個のさらなる変異または置換、あるいは、最大で1個のさらなる変異または置換を有し、該変異または置換が、好ましくは、ヒトCD3に対する結合アフィニティを改変しない、CDR1、CDR2、およびCDR3配列。

40

【0056】

一態様において、本発明は、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、以下からなる群由来のVH配列のうちの1つを含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する；

a) SEQ ID NO: 13に示すVH配列；

b) SEQ ID NO: 15に示すVH配列；

c) SEQ ID NO: 17に示すVH配列；

d) SEQ ID NO: 19に示すVH配列；

50

e ) SEQ ID NO: 21に示すVH配列 ;	
f ) SEQ ID NO: 23に示すVH配列 ;	
g ) SEQ ID NO: 25に示すVH配列 ;	
h ) SEQ ID NO: 27に示すVH配列 ;	
i ) SEQ ID NO: 29に示すVH配列 ;	
j ) SEQ ID NO: 31に示すVH配列 ;	
k ) SEQ ID NO: 33に示すVH配列 ;	
l ) SEQ ID NO: 35に示すVH配列 ;	
m ) SEQ ID NO: 37に示すVH配列 ;	
n ) SEQ ID NO: 39に示すVH配列 ;	10
o ) SEQ ID NO: 41に示すVH配列 ;	
p ) SEQ ID NO: 43に示すVH配列 ;	
q ) SEQ ID NO: 45に示すVH配列 ;	
r ) SEQ ID NO: 47に示すVH配列 ;	
s ) SEQ ID NO: 49に示すVH配列 ;	
t ) SEQ ID NO: 51に示すVH配列 ;	
u ) SEQ ID NO: 53に示すVH配列 ;	
v ) SEQ ID NO: 55に示すVH配列 ;	
w ) SEQ ID NO: 57に示すVH配列 ;	
x ) SEQ ID NO: 59に示すVH配列 ;	20
y ) SEQ ID NO: 61に示すVH配列 ;	
z ) SEQ ID NO: 63に示すVH配列 ;	
aa ) SEQ ID NO: 65に示すVH配列 ;	
bb ) SEQ ID NO: 67に示すVH配列 ;	
cc ) SEQ ID NO: 69に示すVH配列 ;	
dd ) SEQ ID NO: 71に示すVH配列 ;	
ee ) SEQ ID NO: 73に示すVH配列 ;	
ff ) SEQ ID NO: 75に示すVH配列 ;	
gg ) SEQ ID NO: 77に示すVH配列 ;	
hh ) SEQ ID NO: 79に示すVH配列 ;	30
ii ) SEQ ID NO: 81に示すVH配列 ;	
jj ) SEQ ID NO: 83に示すVH配列 ;	
kk ) SEQ ID NO: 85に示すVH配列 ;	
ll ) SEQ ID NO: 87に示すVH配列 ;	
mm ) SEQ ID NO: 89に示すVH配列 ;	
nn ) SEQ ID NO: 91に示すVH配列 ;	
oo ) SEQ ID NO: 93に示すVH配列 ;	
pp ) SEQ ID NO: 95に示すVH配列 ;	
qq ) SEQ ID NO: 97に示すVH配列 ;	
rr ) SEQ ID NO: 99に示すVH配列 ;	40
ss ) SEQ ID NO: 101に示すVH配列 ;	
tt ) SEQ ID NO: 103に示すVH配列 ;	
uu ) SEQ ID NO: 105に示すVH配列 ;	
vv ) SEQ ID NO: 107に示すVH配列 ;	
ww ) SEQ ID NO: 109に示すVH配列 ;	
xx ) SEQ ID NO: 111に示すVH配列 ;	
yy ) SEQ ID NO: 113に示すVH配列 ;	
zz ) SEQ ID NO: 115に示すVH配列 ;	
aaa ) SEQ ID NO: 117に示すVH配列 ;	
bbb ) SEQ ID NO: 119に示すVH配列 ;	50

ccc ) SEQ ID NO: 121に示すVH配列 ;  
ddd ) SEQ ID NO: 123に示すVH配列 ;  
eee ) SEQ ID NO: 125に示すVH配列 ;  
fff ) SEQ ID NO: 127に示すVH配列 ;  
ggg ) SEQ ID NO: 129に示すVH配列 ;  
hhh ) SEQ ID NO: 131に示すVH配列 ;  
iii ) SEQ ID NO: 133に示すVH配列 ;  
jjj ) SEQ ID NO: 135に示すVH配列 ;  
kkk ) SEQ ID NO: 137に示すVH配列 ;  
lll ) SEQ ID NO: 139に示すVH配列 ; 10  
mmm ) SEQ ID NO: 141に示すVH配列 ;  
nnn ) SEQ ID NO: 143に示すVH配列 ;  
ooo ) SEQ ID NO: 145に示すVH配列 ;  
ppp ) SEQ ID NO: 147に示すVH配列 ;  
qqq ) SEQ ID NO: 149に示すVH配列 ;  
rrr ) SEQ ID NO: 151に示すVH配列 ;  
sss ) SEQ ID NO: 153に示すVH配列 ;  
ttt ) SEQ ID NO: 155に示すVH配列 ;  
uuu ) SEQ ID NO: 157に示すVH配列 ;  
vvv ) SEQ ID NO: 159に示すVH配列 ; 20  
www ) SEQ ID NO: 161に示すVH配列 ;  
xxx ) SEQ ID NO: 163に示すVH配列 ;  
yyy ) SEQ ID NO: 165に示すVH配列 ;  
zzz ) SEQ ID NO: 167に示すVH配列 ;  
aaaa ) SEQ ID NO: 169に示すVH配列 ;  
bbbb ) SEQ ID NO: 171に示すVH配列 ;  
cccc ) SEQ ID NO: 173に示すVH配列 ;  
dddd ) SEQ ID NO: 175に示すVH配列 ;  
eeee ) SEQ ID NO: 177に示すVH配列 ;  
ffff ) SEQ ID NO: 179に示すVH配列 ; 30  
gggg ) SEQ ID NO: 181に示すVH配列 ;  
hhhh ) SEQ ID NO: 183に示すVH配列 ;  
iiii ) SEQ ID NO: 185に示すVH配列 ;  
jjjj ) SEQ ID NO: 187に示すVH配列 ;  
kkkk ) SEQ ID NO: 189に示すVH配列 ;  
llll ) SEQ ID NO: 191に示すVH配列 ;  
mmmm ) SEQ ID NO: 193に示すVH配列 ;  
nnnn ) SEQ ID NO: 195に示すVH配列 ;  
oooo ) SEQ ID NO: 197に示すVH配列 ;  
pppp ) SEQ ID NO: 199に示すVH配列 ; 40  
qqqq ) SEQ ID NO: 201に示すVH配列 ;  
rrrr ) SEQ ID NO: 203に示すVH配列 ;  
ssss ) SEQ ID NO: 205に示すVH配列 ;  
tttt ) SEQ ID NO: 207に示すVH配列 ;  
uuuu ) SEQ ID NO: 209に示すVH配列 ;  
vvvv ) SEQ ID NO: 211に示すVH配列 ;  
wwww ) SEQ ID NO: 213に示すVH配列 ;  
xxxx ) SEQ ID NO: 215に示すVH配列 ;  
yyyy ) SEQ ID NO: 217に示すVH配列 ;  
zzzz ) SEQ ID NO: 219に示すVH配列 ; 50

aaaaa ) SEQ ID NO: 221に示すVH配列 ;  
bbbbbb ) SEQ ID NO: 223に示すVH配列 ;  
cccccc ) SEQ ID NO: 225に示すVH配列 ;  
dddddd ) SEQ ID NO: 227に示すVH配列 ;  
eeeeee ) SEQ ID NO: 229に示すVH配列 ;  
ffffff ) SEQ ID NO: 221に示すVH配列 ;  
gggggg ) SEQ ID NO: 223に示すVH配列 ;  
hhhhhh ) SEQ ID NO: 225に示すVH配列 ;  
iiiiii ) SEQ ID NO: 227に示すVH配列 ;  
jjjjjj ) SEQ ID NO: 229に示すVH配列 ; 10  
kkkkkk ) SEQ ID NO: 231に示すVH配列 ;  
llllll ) SEQ ID NO: 233に示すVH配列 ;  
mmmmmm ) SEQ ID NO: 235に示すVH配列 ;  
nnnnnn ) SEQ ID NO: 237に示すVH配列 ;  
oooooo ) SEQ ID NO: 239に示すVH配列 ;  
pppppp ) SEQ ID NO: 241に示すVH配列 ;  
qqqqqq ) SEQ ID NO: 243に示すVH配列 ;  
rrrrrr ) SEQ ID NO: 245に示すVH配列 ;  
ssssss ) SEQ ID NO: 247に示すVH配列 ;  
tttttt ) SEQ ID NO: 249に示すVH配列 ; 20  
uuuuuu ) SEQ ID NO: 251に示すVH配列 ;  
vvvvvv ) SEQ ID NO: 253に示すVH配列 ;  
wwwwww ) SEQ ID NO: 255に示すVH配列 ;  
xxxxxx ) SEQ ID NO: 257に示すVH配列 ;  
yyyyyy ) SEQ ID NO: 259に示すVH配列 ;  
zzzzzz ) SEQ ID NO: 261に示すVH配列 ;  
aaaaaaa ) SEQ ID NO: 263に示すVH配列 ;  
bbbbbbb ) SEQ ID NO: 265に示すVH配列 ;  
ccccccc ) SEQ ID NO: 267に示すVH配列 ;  
ddddddd ) SEQ ID NO: 269に示すVH配列 ; 30  
eeeeeee ) SEQ ID NO: 271に示すVH配列 ;  
fffffff ) SEQ ID NO: 273に示すVH配列 ;  
ggggggg ) SEQ ID NO: 275に示すVH配列 ;  
hhhhhhh ) SEQ ID NO: 277に示すVH配列 ;  
iiiiiii ) SEQ ID NO: 279に示すVH配列 ;  
jjjjjjj ) SEQ ID NO: 281に示すVH配列 ;  
kkkkkkk ) SEQ ID NO: 283に示すVH配列 ;  
lllllll ) SEQ ID NO: 285に示すVH配列 ;  
mmmmmmm ) SEQ ID NO: 287に示すVH配列 ;  
nnnnnnn ) SEQ ID NO: 289に示すVH配列 ; 40  
oooooooo ) SEQ ID NO: 291に示すVH配列 ;  
ppppppp ) SEQ ID NO: 293に示すVH配列 ;  
qqqqqqq ) SEQ ID NO: 295に示すVH配列 ;  
rrrrrrr ) SEQ ID NO: 297に示すVH配列 ;  
sssssss ) SEQ ID NO: 299に示すVH配列、および  
ttttttt ) SEQ ID NO: 301に示すVH配列。

【 0 0 5 7 】

一態様において、本発明は、重鎖可変（VH）領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、以下からなる群より選択されるVH配列のうちの1つを含む、ヒトCD3に結合するヒト化またはキメラ抗体に関する；

- a) SEQ ID NO: 55に示すVH配列 [T31M]、
- b) SEQ ID NO: 59に示すVH配列 [T31P]、
- c) SEQ ID NO: 107に示すVH配列 [N57E]、
- d) SEQ ID NO: 177に示すVH配列 [H101G]、
- e) SEQ ID NO: 185に示すVH配列 [H101N]、
- f) SEQ ID NO: 221に示すVH配列 [G105P]、
- g) SEQ ID NO: 237に示すVH配列 [S110A]、
- h) SEQ ID NO: 245に示すVH配列 [S110G]、
- i) SEQ ID NO: 285に示すVH配列 [Y114M]、
- j) SEQ ID NO: 293に示すVH配列 [Y114R]、および
- k) SEQ ID NO: 299に示すVH配列 [Y114V]。

10

## 【 0 0 5 8 】

本発明の一態様において、ヒト化またはキメラ抗体は、軽鎖可変（VL）領域を含む結合領域を含み、該VL領域は、以下からなる群より選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む；

- a) SEQ ID NO: 6、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- b) SEQ ID NO: 302、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- c) SEQ ID NO: 304、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- d) SEQ ID NO: 306、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- e) SEQ ID NO: 308、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- f) SEQ ID NO: 310、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- g) SEQ ID NO: 312、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- h) SEQ ID NO: 314、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- i) SEQ ID NO: 316、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- j) SEQ ID NO: 318、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- k) SEQ ID NO: 320、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- l) SEQ ID NO: 322、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- m) SEQ ID NO: 324、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- n) SEQ ID NO: 326、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- o) SEQ ID NO: 328、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- p) SEQ ID NO: 330、GTN、7に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- q) SEQ ID NO: 6、GTN、332に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- r) SEQ ID NO: 6、GTN、334に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- s) SEQ ID NO: 6、GTN、336に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- t) SEQ ID NO: 6、GTN、338に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- u) SEQ ID NO: 6、GTN、340に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- v) SEQ ID NO: 6、GTN、342に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- w) SEQ ID NO: 6、GTN、344に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- x) SEQ ID NO: 6、GTN、346に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- y) SEQ ID NO: 6、GTN、348に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- z) SEQ ID NO: 6、GTN、350に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- aa) SEQ ID NO: 6、GTN、352に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- bb) SEQ ID NO: 6、GTN、354に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- cc) SEQ ID NO: 6、GTN、356に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- dd) SEQ ID NO: 6、GTN、358に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ee) SEQ ID NO: 6、GTN、360に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ff) SEQ ID NO: 6、GTN、362に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- gg) SEQ ID NO: 6、GTN、364に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- hh) SEQ ID NO: 6、GTN、366に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ii) SEQ ID NO: 6、GTN、368に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；

20

30

40

50

- jj) SEQ ID NO: 6, GTN, 370に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- kk) SEQ ID NO: 6, GTN, 372に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ll) SEQ ID NO: 6, GTN, 374に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- mm) SEQ ID NO: 6, GTN, 376に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- nn) SEQ ID NO: 6, GTN, 378に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- oo) SEQ ID NO: 6, GTN, 380に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- pp) SEQ ID NO: 6, GTN, 382に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- qq) SEQ ID NO: 6, GTN, 384に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- rr) SEQ ID NO: 6, GTN, 386に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- ss) SEQ ID NO: 6, GTN, 388に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- tt) SEQ ID NO: 6, GTN, 390に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列；
- uu) SEQ ID NO: 6, GTN, 392に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびに
- vv) SEQ ID NO: 6, GTN, 394に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列。

10

## 【0059】

本発明の別の態様において、ヒト化またはキメラ抗体は、軽鎖可変(VL)領域を含む結合領域を含み、該VL領域は、以下からなる群より選択されるVL配列のうちの1つを含む；

- a) SEQ ID NO: 8に示すVL配列；および
- b) SEQ ID NO: 10に示すVL配列。

## 【0060】

本明細書において使用する用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子のフラグメント、またはそのいずれかの誘導体であって、典型的な生理条件下に、かなりの期間の半減期で、例えば少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間以上、約48時間以上、約3、4、5、6、7日以上などの期間の半減期で、または他の任意の機能的に定義される期間（例えば、抗原への抗体結合に関連する生理的応答を誘発し、促進し、強化し、かつ/または調整するのに十分な時間、および/または抗体がエフェクター活性を動員するのに十分な時間）の半減期で、抗原に特異的に結合する能力を有するものを指すものとする。抗原と相互作用する結合領域（本明細書では結合ドメインという用語を使用する場合もあり、どちらの用語も同じ意味を有する）は、免疫グロブリン分子の重鎖と軽鎖の両方の可変領域を含む。抗体(Ab)の定常領域は、宿主組織または宿主因子、例えば免疫系のさまざまな細胞（例えばエフェクター細胞およびT細胞）ならびに補体系の構成要素、例えば補体活性化の古典経路における最初の構成要素であるC1qなどへの免疫グロブリンの結合を媒介しうる。上に示したように、本明細書において使用する抗体という用語は、別段の明言がある場合または文脈上明らかに矛盾する場合を除き、抗原に特異的に相互作用する（例えば結合する）能力を保持している抗体のフラグメントを包含する。抗体の抗原結合機能は全長抗体のフラグメントによって発揮されることが示されている。用語「抗体」に包含される結合性フラグメントの例として、(i) Fab'またはFabフラグメント、 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ および $C_H1$ ドメインからなる一価フラグメント、またはWO2007059782 (Genmab A/S)に記載の一価抗体；(ii)  $F(ab')_2$ フラグメント、ヒンジ領域のジスルフィド架橋によって連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント；(iii)  $V_H$ ドメインおよび $C_H1$ ドメインから本質的になるFdフラグメント；ならびに(iv)抗体の単一アームの $V_L$ ドメインおよび $V_H$ ドメインから本質的になるFvフラグメントが挙げられる。さらにまた、Fvフラグメントの2つのドメイン $V_L$ および $V_H$ は、別個の遺伝子によってコードされているが、組換え法を使用し、それらを $V_L$ 領域と $V_H$ 領域とがペアになって一価分子を形成している単一のタンパク質鎖にすることを可能にする合成リンカーによって、それらを接合してもよい（一本鎖抗体または一本鎖Fv(scFv)として公知である；例えばBird et al., Science 242, 423-426 (1988) およびHuston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 参照)。そのような一本鎖抗体は、別段の注記がある場合を除き、または文脈上明確に示される場合を除き、抗体という用語に包含される。そのようなフラグメントは一般に抗体の意味に含まれるが、それらは全体として、またそれぞれ個別に、本発明のユ

20

30

40

50

ニークな特徴であり、異なる生物学的性質および有用性を呈する。本発明との関連においてこれらの抗体フラグメントおよび他の有用な抗体フラグメントについては、本明細書においてさらに議論する。別段の指定がある場合を除き、抗体という用語がポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (mAb)、キメラ抗体およびヒト化抗体、ならびに酵素切断、ペプチド合成、および組換え技法などといった任意の公知の方法によって得られる抗原に特異的に結合する能力を保持している抗体フラグメント (抗原結合性フラグメント) も包含することを理解すべきである。作製される抗体は任意のアイソタイプであることができる。

#### 【0061】

本明細書において使用する用語「免疫グロブリン重鎖」、「免疫グロブリンの重鎖」または「重鎖」は、免疫グロブリンの鎖の一つを指すものとする。重鎖は、典型的には、重鎖可変領域 (本明細書ではVHと略記する) と、免疫グロブリンのアイソタイプを定義づける重鎖定常領域 (本明細書ではCHと略記する) とから構成される。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメインCH1、CH2、およびCH3から構成される。重鎖定常領域はさらにヒンジ領域を含みうる。本明細書において使用する用語「免疫グロブリン」は、2対のポリペプチド鎖からなる構造的に関連する糖タンパク質のークラスを指すものとし、1対は軽 (L) 鎖、1対は重 (H) 鎖であって、4本全てがジスルフィド結合によって相互に連結される。免疫グロブリンの構造は詳しく特徴づけられている (例えば [14] 参照)。免疫グロブリン (例えばIgG) の構造では、いわゆる「ヒンジ領域」にあるジスルフィド結合によって2つの重鎖が相互に接続されている。重鎖と同じく各軽鎖も、典型的には、数個の領域、すなわち軽鎖可変領域 (本明細書ではVLと略記する) と軽鎖定常領域 (本明細書ではCLと略記する) とから構成される。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメインCLから構成される。また、VH領域とVL領域は、相補性決定領域 (CDR) ととも呼ばれる超可変性領域 (すなわち配列および/または構造的に画定されるループの形態が超可変性でありうる超可変領域) に、さらに細分することができ、それらの間には、フレームワーク領域 (FR) と呼ばれる保存度の高い領域が散在している。VHとVLは、それぞれ典型的には、3つのCDRと4つのFRから構成され、それらがアミノ末端からカルボキシ末端に向かって次の順序で配置されている: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 ([15] 参照)。CDR配列は、IMGTが提供する方法を使用して決定することができる [16] ~ [17]。

#### 【0062】

本明細書において使用する用語「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる免疫グロブリン (サブ) クラス (例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM) またはその任意のアロタイプ、例えばIgG1m (za) およびIgG1m (f) [SEQ ID NO: 407] を指す。したがって、一態様において抗体は、IgG1クラスまたはその任意のアロタイプの免疫グロブリン重鎖を含む。さらに、各重鎖アイソタイプを、カッパ ( ) 軽鎖またはラムダ ( ) 軽鎖と組み合わせることができる。

#### 【0063】

本明細書において使用する用語「キメラ抗体」は、可変領域が非ヒト種に由来し (例えば齧歯類に由来し)、定常領域がヒトなどの異なる種に由来する抗体を指す。キメラ抗体は抗体工学によって作製することができる。「抗体工学」とは、さまざまな種類の抗体修飾に使用される一般的な用語であり、当業者には周知のプロセスである。特にキメラ抗体は、[18]に記載の標準的DNA技法を使って作製することができる。したがってキメラ抗体は遺伝子操作された組換え抗体でありうる。いくつかのキメラ抗体は、遺伝子的または酵素的に操作された抗体である。キメラ抗体の作製は当業者に知られているので、本発明のキメラ抗体の作製は、本明細書に記載する方法以外の方法で行うこともできる。治療用のキメラモノクローナル抗体は抗体免疫原性を低減するために開発される。それらは、典型的には、関心対象の抗原に特異的な非ヒト (例えばマウス) 可変領域と、ヒト定常抗体重鎖および軽鎖ドメインとを含有しうる。キメラ抗体に関連して使用する用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の両方のCDRおよびフレームワーク領域を含む領域を指す。

## 【0064】

本明細書において使用する用語「ヒト化抗体」は、ヒト抗体定常ドメインと、ヒト可変ドメインに対して高レベルの配列相同性を持つように修飾された非ヒト可変ドメインとを含有する、遺伝子操作された非ヒト抗体を指す。これは、全体として抗原結合部位を形成する6つの非ヒト抗体相補性決定領域(CDR)を相同ヒトアクセプターフレームワーク領域(FR)上に移植することによって、達成することができる([19]~[20]参照)。親抗体の結合アフィニティーおよび特異性を完全に再構成するには、親抗体(すなわち非ヒト抗体)からのフレームワーク残基をヒトフレームワーク領域中に置換すること(復帰変異)が必要かもしれない。構造相同性モデリングは、抗体の結合特性にとって重要なフレームワーク領域中のアミノ酸残基を同定するのに役立つ。したがってヒト化抗体は、非ヒトCDR配列、任意で非ヒトアミノ酸配列への1つまたは複数のアミノ酸復帰変異を含む主としてヒトのフレームワーク領域、および完全にヒトの定常領域を含みうる。任意で、アフィニティーや生化学的特性などの好ましい特徴を持つヒト化抗体を得るために、必ずしも復帰変異ではない追加のアミノ酸修飾を適用してもよい。

10

## 【0065】

本発明のいずれかの局面または態様によるヒト化またはキメラ抗体は、「ヒト化またはキメラCD3抗体」、「本発明のヒト化またはキメラ抗体」、「CD3抗体」、または「本発明のCD3抗体」と呼ぶことができ、これらは全て、文脈上矛盾が生じる場合を除き、同じ意味および目的を有する。

20

## 【0066】

非ヒト起源の抗体のアミノ酸配列はヒト起源の抗体とは異なるので、ヒト患者に投与した場合に非ヒト抗体は潜在的に免疫原性である。しかし、抗体が非ヒト起源であるにもかかわらず、そのCDRセグメントはそのターゲット抗原に結合する抗体の能力を担っており、ヒト化はその抗体の特異性および結合アフィニティーを維持することを目指している。このように非ヒト治療用抗体のヒト化は、人間におけるその免疫原性を最小限に抑えると同時に、そのヒト化抗体が非ヒト起源の抗体の特異性および結合アフィニティーを維持するように行われる。

## 【0067】

本明細書において使用する用語「結合領域」は、抗体の一領域であって、例えば細胞、細菌またはビリオン上に存在するポリペプチドなどといった何らかの分子に結合する能力を有する領域を指す。

30

## 【0068】

本明細書において使用する用語「結合」は、前もって決定された抗原またはターゲットへの抗体の結合を指し、その抗原またはターゲットへの結合は、例えば表面プラズモン共鳴(SPR)技術により、BIAcore 3000計器において、抗原をリガンドとし、かつ抗体を分析物として決定した場合に、典型的には、約 $10^{-6}$ M以下、例えば $10^{-7}$ M以下、例えば約 $10^{-8}$ M以下、例えば約 $10^{-9}$ M以下、約 $10^{-10}$ M以下、または約 $10^{-11}$ M以下の $K_D$ に相当するアフィニティーで起こり、前もって決定された抗原でも近縁の抗原でもない非特異的抗原(例えばBSA、カゼイン)に対する結合に関するそのアフィニティーの10分の1以下、例えば100分の1以下、例えば1,000分の1以下、例えば10,000分の1以下、例えば100,000分の1以下の $K_D$ に相当するアフィニティーで前もって決定された抗原に結合する。アフィニティーがどの程度低いかはその抗体の $K_D$ に依存するので、抗体の $K_D$ が非常に低い場合(すなわち抗体が高度に特異的である場合)、抗原に対するアフィニティーの低さは、非特異的抗原に対するアフィニティーと比較して、10,000分の1以下になりうる。本明細書において使用する用語「 $K_D$ 」(M)は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。

40

## 【0069】

本明細書において使用する用語「ヒトCD3」は、T細胞補助受容体タンパク質複合体の一部であって4つの異なる鎖から構成されているヒト分化抗原群3タンパク質を指す。CD3は他の種にも見出されるので、本明細書において使用する用語「CD3」は、文脈上矛盾が生じる場合を除き、ヒトCD3に限定されない。哺乳動物の場合、この複合体は、CD3 (ガン

50

マ) 鎖 (ヒトCD3 鎖Swissprot P09693またはカニクイザルCD3 Swissprot Q95L17)、CD3 (デルタ) 鎖 (ヒトCD3 Swissprot P04234またはカニクイザルCD3 Swissprot Q95L18)、2つのCD3 (イプシロン) 鎖 (ヒトCD3 Swissprot P07766、またはカニクイザルCD3 Swissprot Q95L15、またはアカゲザルCD3 Swissprot G7NCB9) およびCD3 (ゼータ) 鎖 (ヒトCD3 Swissprot P20963、カニクイザルCD3 Swissprot Q09TK0) を含有している。これらの鎖は、T細胞受容体 (TCR) として公知である分子と会合して、Tリンパ球において活性化シグナルを生成する。TCR分子とCD3分子は共にTCR複合体を構成する。

【0070】

Swissprot番号として言及されるアミノ酸配列がタンパク質の翻訳後に除去されるシグナルペプチドを含むことは、当業者には知られている。したがって、細胞表面上に存在するCD3などのタンパク質はシグナルペプチドを含まない。特に、表1に列挙するアミノ酸配列は、そのようなシグナルペプチドを含有していない。表1に列挙するようなタンパク質は「成熟タンパク質」と呼ぶことができる。したがってSEQ ID NO: 398は、成熟ヒトCD3 (デルタ) のアミノ酸配列を表し、SEQ ID NO: 399は成熟ヒトCD3 (イプシロン) のアミノ酸配列を表し、SEQ ID NO: 403は成熟カニクイザルCD3 のアミノ酸配列を表し、SEQ ID NO: 404は成熟アカゲザルCD3 のアミノ酸配列を表す。このように本明細書において使用する用語「成熟」は、シグナル配列またはリーダー配列を一切含まないタンパク質を指す。

【0071】

シグナルペプチド配列の相同性、長さ、および切断部位位置が、タンパク質によってかなり多様であることは周知である。シグナルペプチドは異なる方法で決定することができ、例えば本発明のSEQ ID NO: 399はSignalPアプリケーション (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>で利用可能) に従って決定された。

【0072】

ある特定の態様では、本発明のヒト化またはキメラ抗体が、CD3のイプシロン鎖、例えばヒトCD3のイプシロン鎖 (SEQ ID NO: 399) に結合する。さらに別の特定の態様では、本ヒト化またはキメラ抗体が、ヒトCD3 (イプシロン) (SEQ ID NO: 402) のN末端部分のアミノ酸1~27内のエピトープに結合する。そのような特定の態様において、抗体は、さらに、他の非ヒト霊長類種、例えばカニクイザル (カニクイザルCD3イプシロンSEQ ID NO: 403) および/またはアカゲザル (アカゲザルCD3イプシロンSEQ ID NO: 404) と交差反応しうる。

【0073】

本明細書において定義づけるCDR配列を含み、さらにフレームワーク領域を含む本発明の抗体は、CDR配列外の配列が相違しうるが、それでも元の抗体と比較して完全な結合能力を保持している。したがって本発明は、本明細書に記載するいずれかの配列と一定の配列同一性を有する可変領域のアミノ酸配列を含む抗体にも関係する。

【0074】

本発明との関連において使用する用語「配列同一性」は、2つの配列を最適に整列するために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した、それらの配列が共有する同一位置の数の関数としての2つの配列の間のパーセント同一性を指す (すなわち % 相同性 =  $100 \times \text{同一位置の数} / \text{位置の総数}$ )。2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間のパーセント同一性は、例えばE. MeyersおよびW. Millerのアルゴリズム [21] を使って決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズム [22] を使って決定することもできる。多重アライメントは、好ましくは、(例えばVector NTI Advance (登録商標) ソフトウェアバージョン11.5 (Invitrogen Inc.) で使用されている) Clustal Wアルゴリズム [23] を使って行われる。

【0075】

したがって、本発明の一態様において、抗体は、重鎖可変 (VH) 領域を含む結合領域を

10

20

30

40

50

含み、該VH領域は、以下からなる群の1つより選択される3つのCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む；

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；
- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；
- h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；
- i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；
- j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；
- k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]；ならびに

l) a) ~ k) に示す3つのCDR配列のうちのいずれか1つに対して該3つのCDR配列全体で少なくとも90%または少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する、CDR1、CDR2、およびCDR3配列であって、ただし、SEQ ID NO: 1、2、3に示す配列を有さない、CDR1、CDR2、およびCDR3配列。

#### 【0076】

本文書の配列表1に示すように、VH領域は、125アミノ酸の配列からなる。したがって、その124アミノ酸の位置が上に列挙した第1のVH配列のうちの1つと同一である、125アミノ酸からなる第2のVH配列は、該第1のVH配列と99,2%の配列同一性を有する。その120アミノ酸の位置が上に列挙した第1のVH配列のうちの1つと同一である、125アミノ酸からなる第2の配列は、該第1のVH配列と96%の配列同一性を有する。その115アミノ酸の位置が上に列挙した第1のVH配列のうちの1つと同一である、125アミノ酸からなる第2の配列は、該第1のVH配列と92%の配列同一性を有する。

#### 【0077】

そのある特定の態様において、VH領域は、前記群にて特定されるVH配列の少なくとも1つに対して少なくとも96%のアミノ酸配列同一性を有する。

#### 【0078】

本発明の一態様において、変異は、VH領域のフレームワーク領域中に位置する。したがって、いくつかの態様において、VH領域の3つのCDR配列は、本発明の抗体と100%同一であるが、アミノ酸変動が、VH領域のフレームワーク領域中で起こりうる。そのようなフレームワーク領域中のアミノ酸変動は、好ましくは、CDRがSEQ ID NO: 407の参照フレーム中に含まれる場合の抗体と比較して、CD3に対する抗体の結合アフィニティーを変化させえない。

#### 【0079】

配列同一性における変動を引き起こすVH配列中の変異は、好ましくは、保存的、物理的、または機能的アミノ酸でありうる。アミノ酸の類似アミノ酸との置換は、親抗体の機能性を保つ可能性を増大しうる。

#### 【0080】

本発明の一態様において、抗体はヒト化抗体である。

#### 【0081】

本発明の一態様において、抗体は全長抗体である。

#### 【0082】

本発明のヒト化抗体は、ヒト可変フレームワーク領域として使用するのに適度な相同性を有する重鎖および軽鎖ヒト配列を同定するために、重鎖および軽鎖可変領域アミノ酸配列をヒト生殖細胞系可変領域配列のデータベースと比較することによって、作製することができる。一連のヒト化重鎖および軽鎖可変領域は、例えばマウスのCDRをフレームワーク領域（上述のように同定されるもの）に移植し、必要であれば、抗体結合効率の回復にとって決定的に重要であるかもしれないと同定された残基をその特定マウス配列に復帰変

10

20

30

40

50

異させること（フレームワーク領域中のヒトアミノ酸残基の1つまたは複数をもその特定位置の非ヒトアミノ酸に戻すように変異させること）によって設計することができる。次に、iTope（商標）およびTCED（商標）（[24]、[25]、および[26]）などのインシリコ技術の適用によって決定される、潜在的T細胞エピトープの出現率が最低である変異体配列を選択することができる。

【0083】

さらに、本発明のヒト化抗体を「脱免疫化」（deimmunize）することもできる。本発明のヒト化抗体のようなタンパク質配列内での、ヒトT細胞エピトープの存在は、それらがヘルパーT細胞を活性化する潜在能力を有することから、免疫原性リスクプロファイルを大きくする可能性があるため、脱免疫化（deimmunization）が望ましいかもしれない。ヘルパーT細胞のそのような活性化は脱免疫化によって回避することができる。脱免疫化は、抗体の結合アフィニティーを著しく低減することなくT細胞エピトープを除去するために、ヒト化抗体のアミノ酸配列に変異を導入することによって行うことができる。

10

【0084】

したがって本発明の一態様では、(i) 非ヒト全重鎖可変配列および/または全軽鎖可変配列をヒト生殖細胞系配列のデータベースと比較する工程、(ii) 非ヒト配列に対して最も高い相同性を有するヒト生殖細胞系配列を選択することでヒト化配列を得る工程、(iii) 必要であれば復帰変異によってヒト化配列を最適化する工程、および(iv) 適切な発現系において前記配列を発現させる工程を含む方法によって、ヒト化抗体を生産することができる。

20

【0085】

したがって本発明の全長抗体は、(i) 非ヒト重鎖可変配列および軽鎖可変配列をヒト生殖細胞系配列のデータベースと比較する工程、(ii) 非ヒト配列に対して最も高い相同性を有するヒト生殖細胞系配列を選択する工程、(iii) 選択したヒト生殖細胞系中に非ヒトCDRを移植することでヒト化配列を得る工程、(iv) 必要であれば復帰変異によってヒト化配列を最適化する工程、(v) 定常重鎖および軽鎖配列を同定する工程、および(vi) 適切な発現系において完全重鎖配列および完全軽鎖配列を発現させる工程を含む方法によって生産することができる。したがって本発明の全長抗体は、実施例1で述べるように生産することができる。CDR配列または全可変領域配列のいずれかから出発して全長抗体を生産することは、当業者には知られている。したがって、本発明の全長抗体を作製する方法は、当業者にはわかるであろう。

30

【0086】

本明細書において使用する用語「完全重鎖配列」は、重鎖可変配列と定常重鎖配列とからなる配列を指す。

【0087】

本明細書において使用する用語「完全軽鎖配列」は、軽鎖可変配列と定常軽鎖配列とからなる配列を指す。

【0088】

復帰変異は標準的DNA変異誘発法によって導入することができる。そのようなDNA変異誘発の標準的技法は[18]に記載されている。あるいは、Quickchange（商標）Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene）などの市販のキットを使用するか、デノボDNA合成によって所望の復帰変異を導入することができる。

40

【0089】

したがって一態様では抗体がヒト化抗体である。

【0090】

キメラ抗体は、非ヒト（例えばマウス）抗体の定常領域配列の全てをヒト起源の定常領域配列で置換することによって作製することができる。したがって、キメラ抗体には完全に非ヒトの可変領域配列が維持される。したがって本発明のキメラ抗体は、適切な発現系において非ヒト重鎖可変（SEQ ID NO：405）、非ヒト軽鎖可変配列（SEQ ID NO：406）、ヒト定常重鎖配列およびヒト定常軽鎖配列を発現させ、それによって全長キメラ抗体を作

50

製する工程を含む方法によって生産することができる。代替的方法を使用することもできる。キメラ抗体を生産するそのような方法は当業者に知られているので、本発明のキメラ抗体の生産方法は当業者にはわかるであろう。したがって、本発明のキメラ抗体を作製するために、非ヒト（例えばマウス）VHまたはVL配列に本発明の変異を導入するであろう。

【0091】

したがって一態様では抗体がキメラ抗体である。

【0092】

一態様では、抗体が全長抗体である。本明細書において使用する用語「全長抗体」は、当該アイソタイプの野生型抗体に通常見出されるものに対応する重鎖および軽鎖定常および可変ドメインを全て含有する抗体（例えば親抗体または変異体抗体）を指す。

10

【0093】

一態様において、抗体は、第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む。

【0094】

本明細書において使用する用語「Fc領域」は、N末端からC末端に向かう方向に、少なくともヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域を含む領域を指す。Fc領域はヒンジ領域のN末端側にCH1領域をさらに含む。

【0095】

本明細書において使用する用語「ヒンジ領域」は、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指す。したがって、例えばヒトIgG1抗体のヒンジ領域は、Kabatに記載のEuナンバリングでアミノ酸216～230に対応する。

20

【0096】

別段の明言がある場合を除き、または文脈上矛盾が生じる場合を除き、定常領域配列のアミノ酸は、本明細書では、Euナンバリングインデックス（Eu-index of numbering）（[27]に記載）に従ってナンバリングされ、これを「Kabatに記載のEuナンバリングで」、「KabatのEuナンバリングで」、または「Euナンバリングシステムで」という。

【0097】

本明細書において使用する用語「CH1領域」または「CH1ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のCH1領域を指す。したがって例えばヒトIgG1抗体のCH1領域は、Euナンバリングシステムでアミノ酸118～215に対応する。ただし、CH1領域は本明細書に記載する他のサブタイプのいずれであってもよい。

30

【0098】

本明細書において使用する用語「CH2領域」または「CH2ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のCH2領域を指す。したがって例えばヒトIgG1抗体のCH2領域はEuナンバリングシステムでアミノ酸231～340に対応する。ただし、CH2領域は本明細書に記載する他のサブタイプのいずれであってもよい。

【0099】

本明細書において使用する用語「CH3領域」または「CH3ドメイン」は、免疫グロブリン重鎖のCH3領域を指す。したがって例えばヒトIgG1抗体のCH3領域はEuナンバリングシステムでアミノ酸341～447に対応する。ただし、CH3領域は本明細書に記載する他のサブタイプのいずれであってもよい。

40

【0100】

一態様では、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4からなる群より選択される。免疫グロブリン重鎖は、IgG1m(f)（SEQ ID NO：407）など、各免疫グロブリンクラス内の任意のアロタイプであることができる。したがって、ある特定の態様では、免疫グロブリン重鎖のアイソタイプが、IgG1またはその任意のアロタイプ、例えばIgG1m(f)（SEQ ID NO：407）である。

【0101】

T細胞受容体（TCR）の一部である抗原CD3を標的とする場合は、T細胞特異的な細胞死滅機序が望ましい。他のエフェクター機能、例えば補体活性化は必要ではないだろうから、エフェクター機能の低減が望ましい。C1q結合は補体カスケードにおける第1段階であるた

50

め、抗体の補体依存性細胞傷害（CDC）能の指標として役立つ。抗体に対するC1qの結合を回避することができれば、補体カスケードの活性化も回避することができる。

【 0 1 0 2 】

したがって一態様では、抗体は、該抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも99%、少なくとも99.9%、または100%低減するように修飾されたFc領域を含み、ここではC1q結合はELISAによって決定される。好ましい態様では、抗体は、該抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも99%～100%低減するように修飾されたFc領域を含み、ここではC1q結合はELISAによって決定される。

【 0 1 0 3 】

本明細書において使用する用語「修飾された」は、野生型Fc領域のアミノ酸配列とは同一でないFc領域のアミノ酸配列を指す。すなわち、例えばC1qの結合部位、他のエフェクター分子の結合部位、またはFc受容体（FcR）に対する結合などを改変するために、野生型Fc領域の特定位置にあるアミノ酸残基が置換され、欠失し、または挿入されている。アミノ酸配列のそのような修飾は、1つまたは複数のアミノ酸を保存的アミノ酸で置換することによって調製するか、1つまたは複数のアミノ酸を、野生型に存在するアミノ酸と物理的および/または機能的に類似する代替アミノ酸で置換することによって調製することができる。非保存的アミノ酸で置換することによって置換を調製することもできる。

【 0 1 0 4 】

本発明に関して、アミノ酸は保存的アミノ酸または非保存的アミノ酸と記述することができ、したがってアミノ酸を相応に分類することができる。アミノ酸残基は、代替的な物理的性質および機能的性質によって画定されるクラスに分類することもできる。したがってアミノ酸のクラスは、以下の表の1つまたは両方に反映させることができる。

【 0 1 0 5 】

保存的クラスのアミノ酸残基

酸性残基	D および E
塩基性残基	K, R, および H
親水性非荷電残基	S, T, N, および Q
脂肪族非荷電残基	G, A, V, L, および I
非極性非荷電残基	C, M, および P
芳香族残基	F, Y, および W

アミノ酸残基の代替的な物理的および機能的分類

アルコール基含有残基	SおよびT
脂肪族残基	I, L, V, およびM
シクロアルケニル関連残基	F, H, W, およびY
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, およびY
負荷電残基	DおよびE
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, およびT
正荷電残基	H, K, およびR
小残基	A, C, D, G, N, P, S, T, およびV
極小残基	A, G, およびS
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, およびT
フレキシブル残基	Q, T, K, S, G, P, D, E, およびR

【 0 1 0 6 】

本発明に関して、ヒト化またはキメラ抗体などの抗体における置換は、  
元のアミノ酸-位置-置換後のアミノ酸  
の形で示される。

## 【0107】

よく知られているアミノ酸の命名法を参照して、任意のアミノ酸残基を示すための記号XaaおよびXを含む三文字記号または一文字記号を使用する。したがって「L234F」または「Leu234Phe」という表記は、抗体がアミノ酸位置234に、フェニルアラニンによるロイシンの置換を含むことを意味する。

## 【0108】

所与の位置におけるアミノ酸の他の任意のアミノ酸への置換は、  
元のアミノ酸-位置、すなわち例えば「L234」  
と言及される。

10

## 【0109】

元のアミノ酸および/または置換アミノ酸が2つ以上のアミノ酸を含みうるが、全てのアミノ酸を含むわけではない修飾については、それら2つ以上のアミノ酸を「,」または「/」によって区切ることができる。例えば、位置234におけるフェニルアラニン、アルギニン、リジンまたはトリプトファンによるロイシンの置換は、「Leu234Phe,Arg,Lys,Trp」または「Leu234Phe/Arg/Lys/Trp」または「L234F,R,K,W」または「L234F/R/K/W」または「L234 F,R,KまたはW」である。

## 【0110】

本発明についてはこのような指定を可換的に使用しうるが、それらは同じ意味と目的を有する。

20

## 【0111】

さらにまた、「置換」という用語は、他の19種類の天然アミノ酸のいずれか一つへの、または他のアミノ酸、例えば非天然アミノ酸への置換を包含する。例えば位置234におけるアミノ酸Lの置換には以下の置換のそれぞれが含まれる：234A、234C、234D、234E、234F、234G、234H、234I、234K、234M、234N、234Q、234R、234S、234T、234V、234W、234P、および234Y。なお、これは234Xという指定に等しく、ここではXが元のアミノ酸以外の任意のアミノ酸を指定している。これらの置換は、L234A、L234Cなど、またはL234A,Cなど、またはL234A/Cなどと指定することもできる。同じことが、本明細書において言及するありとあらゆる位置に、同様に当てはまり、そのような置換のいずれか一つが具体的に本明細書に含まれる。

30

## 【0112】

本発明の抗体はアミノ酸残基の欠失も含みうる。そのような欠失は「del」で表され、例えばL234delのような記述が含まれる。したがってそのような態様では、位置234のロイシンがアミノ酸配列から欠失している。

## 【0113】

「アミノ酸」および「アミノ酸残基」という用語は、本明細書では、可換的に使用される。

## 【0114】

本発明の一態様において、抗体は、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域は、以下からなる群の1つより選択される3つのCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む；

40

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；
- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；

50

h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G];

i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M];

j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R];

k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]、ならびに

l) a) ~ k) にて特定されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列であって、該3つのCDR配列全体で、最大で5個のさらなる変異または置換、最大で4個のさらなる変異または置換、最大で3個のさらなる変異または置換、最大で2個のさらなる変異または置換、あるいは、最大で1個のさらなる変異または置換を有し、該変異または置換が、好ましくは、ヒトCD3に対する結合アフィニティーを改変しない、CDR1、CDR2、およびCDR3配列。

【0115】

本発明の一態様において、さらなる変異または置換は、保存的、物理的、または機能的アミノ酸である。

【0116】

いくつかの態様において、CD3に対する結合は、T細胞上に存在するCD3などの、全長CD3に対する結合でありうる。他の態様において、CD3に対する結合は、例えばSEQ ID NO: 402に示すCD3ペプチドに対する結合でありうる。CD3ペプチドに対する結合、およびいずれかのさらなる変異がCD3に対する結合を改変しうるか否かは、実施例7において開示されるバイオレイヤー干渉法により決定することができる。

【0117】

一態様において、抗体は、第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む。

【0118】

本明細書において使用する用語「C1q結合」は、抗体がその抗原に結合している場合の、該抗体に対するC1qの結合を指す。本明細書において使用する用語「その抗原に結合している」とは、インビボおよびインビトロの両方での、抗体のその抗原に対する結合を指す。

【0119】

C1q結合に関する場合の、本明細書において使用する用語「低減されている」は、野生型抗体に対するC1q結合と比較した場合に、本発明の抗体に対するC1qの結合を低減するか、最小限に抑えるか、または完全に阻害する、本発明の抗体の能力を指す。

【0120】

ヒトCD3に結合する抗体の結合アフィニティーに関連して使用する場合の、本明細書において使用する用語「低減されている」もしくは「低減する」またはその任意の変種は、参照結合アフィニティーと比較した場合により低い結合アフィニティーを指す。この文脈において、参照結合アフィニティーは、SEQ ID NO: 402のようなCD3ペプチドに結合し、実施例7に記載したバイオレイヤー干渉法により決定した場合の、SEQ ID NO: 4のVH配列およびSEQ ID NO: 8のVL配列により明記される参照抗体の結合アフィニティーであってもよい。

【0121】

本明細書において使用する用語「結合アフィニティー」とは、前もって決定された抗原またはターゲットに対する抗体の結合であって、典型的には $K_D$ に相当するアフィニティーで起こる、結合を指す。本明細書において使用する用語「 $K_D$ 」(M)は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。

【0122】

本発明の抗体の比較アッセイにおける使用に関して本明細書において使用する用語「野生型抗体」は、不活性でない点以外は被験抗体と同一である抗体を指す。この文脈において「不活性」という用語は、C1qの結合が(すなわちC1q結合をELISAによって決定した場合に)低減しているか存在しない、修飾Fc領域;PBMCに基づく機能アッセイにて決定されるFc媒介T細胞増殖が(すなわちT細胞増殖を末梢血単核球(PBMC)に基づく機能アッセイで測定した場合に)低減しているか存在しない、修飾Fc領域;および/またはPBMCに基づく機能アッセイにおいて決定されるFc媒介CD69発現が低減しているか存在しない、修飾Fc領

10

20

30

40

50

域を指す。したがって野生型抗体は、免疫グロブリン重鎖中に天然のアミノ酸を含む。すなわち、例えばC1q、Fc受容体などと相互作用する抗体の能力を改変または低減するかもしれないアミノ酸修飾を何も含まない抗体である。したがってそのような野生型抗体は、例えばC1qに結合することができる活性化抗体のままであるだろう。野生型抗体および本発明の抗体は、抗体を二重特異性抗体にするなどの目的で、エフェクター機能を誘発する抗体の能力に影響を及ぼすアミノ酸修飾ではない他のアミノ酸修飾を含みうる。

#### 【0123】

本明細書において使用する用語「ELISA」は、抗体と色の変化を使って物質を同定する試験である酵素結合免疫吸着測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay) を指す。第1の特異的抗体をプレート表面に取り付ける。そうすることにより、試料からのタンパク質を加えて、該第1の特異的抗体への結合を調べる。試料からの抗体に結合する第2抗体を加える。第2抗体は酵素に連結されており、最終工程では、酵素の基質を含有する物質が加えられる。その後の反応により、検出可能なシグナル (最も一般的には基質の色の変化) が生じる。ELISAの概念は当技術分野において周知であり、ELISAを実施するさまざまな方法は、本発明の抗体を評価するための方法の一部であると考えられる。

10

#### 【0124】

具体的に述べると、C1qに結合する本発明の抗体の能力は、(i) 該抗体を96ウェルプレートにコーティングする工程、(ii) 3%血清を加える工程、(iii) 抗ヒトC1q抗体を加える工程、(iv) プレートを発色させる工程、および(v)  $OD_{405nm}$ を測定する工程を含むELISAによって決定することができる。したがって一態様において、抗体は、該抗体へのC1qの結合が野生型抗体と比較して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、または100%低減するように修飾されたFc領域を含み、ここではC1q結合が、(i) 該抗体を96ウェルプレートにコーティングする工程、(ii) 3%血清を加える工程、(iii) 抗ヒトC1q抗体を加える工程、(iv) プレートを発色させる工程、および(v)  $OD_{405nm}$ を測定する工程を含むELISAによって決定される。

20

#### 【0125】

本明細書において使用する用語「Fc受容体」または「FcR」は、一定の細胞の表面に見出されるタンパク質を指す。FcRは抗体のFc領域に結合する。FcRには、それらが認識する抗体のタイプに基づいて分類される数種類の異なるタイプが存在する。例えばFc (ガンマ) 受容体はIgGクラスの抗体に結合する。

30

#### 【0126】

本明細書において使用する用語「Fc受容体」、「Fcガンマ受容体」または「FcR」は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属するFc受容体の一群を指し、オプソニン化 (被覆) 微生物の貪食を誘発するのに最も重要なFc受容体である。このファミリーには、分子構造が異なるために抗体アフィニティーが異なるいくつかのメンバー、FcRI (CD64)、FcRIIa (CD32a)、FcRIIb (CD32b)、FcRIIIa (CD16a)、FcRIIIb (CD16b) が含まれる。

#### 【0127】

Fcが媒介するエフェクター機能は、ヒト免疫グロブリンG (IgG) 分子の生物学的活性の一部を形成する。そのようなエフェクター機能の例としては、例えば、Fc領域へのさまざまなエフェクター分子の結合によって引き金が引かれる抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) および補体依存性細胞傷害 (CDC) が挙げられる。本発明に関して「Fc結合」、「Fc受容体結合」、「FcR結合」、および「FcRに対する抗体Fc領域の結合」は、Fc受容体 (FcR) またはエフェクター分子へのFc領域の結合を指す。用語「FcR結合」および「FcRI結合」は、それぞれFcガンマ受容体およびFcガンマ受容体IへのFc領域の結合を指す。CD3抗体がT細胞に結合すると、CD3抗体の野生型Fc領域は他の細胞上、例えば単球上に存在するFcRに結合し、それが、T細胞の非特異的Fc媒介活性化につながる。T細胞のそのような非特異的Fc媒介活性化は、望ましくないだろう。T細胞は、標的 (またはターゲット特異的) T細胞活性化によっても活性化されうる。そのような標的T細胞活性化は、がんなどの、ある範囲の適応症の処置には、非常に望ましいであろう。本明細書において使用する

40

50

用語「標的T細胞活性化」は、腫瘍細胞上の腫瘍ターゲットなどといった特異的ターゲットに結合する第1結合領域とCD3などのT細胞特異的ターゲットに結合する第2結合領域とを含む二重特異性抗体を使用することによって、腫瘍細胞などの特異的細胞にT細胞を誘導することを指す。したがって、一方の結合領域がT細胞上に存在するCD3に結合し、かつ他方の結合領域が例えば腫瘍細胞上のターゲット特異的抗原に結合する二重特異性抗体を使用することによって、腫瘍細胞などの特異的細胞へのT細胞のターゲティングを容易にすることができる。非特異的Fc媒介T細胞活性化は依然として考えられるので、Fc媒介架橋によるそのような望ましくない非特異的Fc媒介T細胞活性化は回避すべきであり、そのような活性に関してFc領域を不活性にすることによって無効にすることができる。これにより、該不活性Fc領域と存在するFc受容体の間の相互作用が防止される。

10

**【0128】**

本発明の抗体はFc領域中に修飾を含みうる。抗体がそのような修飾を含む場合、その抗体は不活性抗体または非活性化抗体になりうる。本明細書において使用する用語「不活性であること」、「不活性」または「非活性化」は、少なくともどのFc受容体にも結合することができず、FcRを介したFc媒介架橋を誘発することができず、またはFc領域を介したターゲット抗原のFcR媒介架橋を誘発することができず、あるいはC1qに結合することができないFc領域を指す。ヒト化またはキメラCD3抗体のFc領域が不活性であることは、単一特異性フォーマットの抗体を使って試験すると好都合であるが、そうして同定された不活性Fc領域は、二重特異性または他のヒト化もしくはキメラ多重特異性CD3抗体に使用することができる。

20

**【0129】**

治療用抗体開発を目的として、Fcガンマ受容体およびC1qとの相互作用について抗体のFc領域を非活性にするために、いくつかの変異体を構築することができる。そのような変異体の例を本明細書に記載する。

**【0130】**

したがって一態様において、抗体は、該抗体が野生型抗体と比較して少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%または100%低減したFc媒介T細胞増殖を媒介するように修飾されたFc領域を含み、ここでは該T細胞増殖が末梢血単核球(PBMC)に基づく機能アッセイにおいて測定される。

30

**【0131】**

T細胞増殖に関する場合、「低減する」という用語は、野生型抗体が結合したT細胞の増殖と比較した場合に、T細胞の増殖を低減するか、最小限に抑えるか、または完全に阻害する本発明の抗体の能力を指す。T細胞増殖を低減する抗体の能力は、PBMCに基づく機能アッセイによって評価することができる。一態様では、アッセイがヒトPBMCで行われる。別の態様では、アッセイがカニクイザルPBMCで行われる。さらに別の態様では、アッセイがアカゲザルPBMCで行われる。本発明の抗体は交差反応性であるから、本明細書に記載するPBMCに基づくアッセイは、使用する種のPBMCが抗体の交差反応性スペクトル内である限り、T細胞増殖の低減を示すために、例えばヒト、カニクイザルまたはアカゲザルなど、任意の種のPBMCを使って行うことができる。

**【0132】**

本明細書において使用する用語「末梢血単核球(PBMC)に基づく機能アッセイ」は、本発明の抗体の機能的特徴、例えばT細胞増殖またはCD69発現に影響を及ぼす該抗体の能力を評価するために使用されるアッセイであって、存在する唯一の細胞が末梢血単核球であるアッセイを指す。したがって一態様では、PBMCを1~1000ng/mLの範囲の抗体と共に5% (vol/vol) CO<sub>2</sub> 湿潤インキュベータ中、37 °C で3日間インキュベートする工程、増殖細胞のDNA中に組み込まれるBrdUなどの化学化合物を加える工程、5時間インキュベートする工程、細胞をペレット化する工程、細胞を乾燥する工程、任意で細胞を4 °C で保存する工程、細胞をELISAプレートにコーティングする工程、抗BrdU-ペルオキシダーゼと共に室温で90分間インキュベートする工程、1mg/mLの2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)で約30分間発色させる工程、反応を停止するために100 μLの2% シュウ酸

40

50

を加える工程、および適切なマイクロプレートリーダーにおいて405nmの吸光度を測定する工程を含む方法によって、T細胞増殖が測定される。

【0133】

本明細書において使用する用語「増殖」は、細胞分裂を背景とする細胞成長を指す。

【0134】

本明細書において使用する用語「BrdU」は、チミジンのホモログである5-プロモ-2'-デオキシウリジンを指す。BrdUを、限られた期間（例えば4時間）、細胞培養に加えると、それは増殖する細胞のDNA中に組み込まれることになる。細胞を固定した後、組み込まれたBrdUの検出は、抗BrdU-ペルオキシダーゼを用いるELISAにおいて行うことができる。それゆえにBrdU組み込みは増殖の尺度になる。

【0135】

一態様において、抗体は、野生型抗体と比較した場合に該抗体がFc媒介CD69発現を、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも99%または100%低減するように修飾されたFc領域を含み、ここでは該Fc媒介CD69発現が、PBMCに基づく機能アッセイにおいて測定される。

【0136】

特に、T細胞活性化マーカーCD69の発現レベルに関する場合、「低減する」という用語は、CD3に結合しかつFc受容体と相互作用する野生型抗体がT細胞に結合した場合のCD69の発現レベルと比較して、CD69の発現レベルの低減を指す。CD69の発現を低減する抗体の能力は、PBMCに基づく機能アッセイによって評価することができる。したがって一態様では、PBMCを1~1000ng/mLの範囲の抗体と共に5% (vol/vol) CO<sub>2</sub> 湿潤インキュベータ中、37°Cで16~24時間インキュベートする工程、細胞を洗浄する工程、4°Cにおいてマウス抗ヒトCD28-PE抗体およびマウス抗ヒトCD69-APC抗体で細胞を染色する工程、およびCD28陽性細胞上のCD69発現をフローサイトメトリーで決定する工程を含む方法によって、CD69の発現が測定される。

【0137】

本明細書において使用する用語「CD69」は、CD69遺伝子によってコードされるヒト膜貫通C型レクチンタンパク質である分化抗原群69を指す。Tリンパ球およびナチュラルキラー（NK）細胞の活性化は、インビボでもインビトロでも、CD69の発現を誘発する。増殖などの細胞活性化イベントに関するシグナル伝達受容体としてのCD69機能は、リンパ球、例えばナチュラルキラー細胞や、血小板において、また特異的遺伝子の誘発において、シグナル伝達受容体として機能する。

【0138】

本明細書において使用する用語「末梢血単核球（PBMC）に基づく機能アッセイ」は、本発明の抗体の機能的特徴、例えばT細胞増殖またはCD69発現に影響を及ぼす該抗体の能力を評価するために使用されるアッセイであって、存在する唯一の細胞が末梢血単核球であるアッセイを指す。PBMCに基づく機能アッセイは、CD69発現を評価する場合には、(i) PBMCを抗体と共に5% (vol/vol) CO<sub>2</sub> 湿潤インキュベータ中、37°Cで約16~24時間インキュベートする工程、(ii) 細胞を洗浄する工程、(iii) 4°Cにおいてマウス抗ヒトCD28-PE抗体およびマウス抗ヒトCD69-APC抗体で細胞を染色する工程、および(iv) CD28陽性細胞上のCD69発現をフローサイトメトリーで決定する工程を含む。

【0139】

C1qおよびFcガンマ受容体との相互作用に主要な役割を果たすFc領域中のアミノ酸を修飾することができる。修飾することができるアミノ酸位置の例としては、位置L234、L235およびP331が挙げられる。それらの組み合わせ、例えばL234F/L235E/P331Sは、ヒトCD64、CD32A、CD16およびC1qへの結合の大幅な減少を引き起こすことができる。

【0140】

したがって一態様において、L234、L235およびP331に対応する少なくとも1つの位置にあるアミノ酸は、それぞれA、AおよびSであることができる（[1]、[28]）。また、L234Fアミノ酸置換およびL235Eアミノ酸置換は、Fcガンマ受容体およびC1qとの相互作用が

10

20

30

40

50

阻止されたFc領域をもたらすことができる（[29]～[30]）。したがって一態様において、L234およびL235に対応する位置のアミノ酸は、それぞれFおよびEであることができる。D265Aアミノ酸置換は、全てのFcガンマ受容体への結合を減少させ、ADCCを防止することができる（[31]）。したがって一態様において、D265に対応する位置のアミノ酸はAであることができる。C1qへの結合は、位置D270、K322、P329、およびP331を変異させることによって阻止することができる。これらの位置をD270AまたはK322AまたはP329AまたはP331Aのいずれかに変異させることで、抗体をCDC活性欠損性にするすることができる（[32]）。したがって一態様において、D270、K322、P329およびP331に対応する少なくとも1つの位置にあるアミノ酸は、それぞれA、A、A、およびAであることができる。

【0141】

Fc領域とFcガンマ受容体およびC1qとの相互作用を最小限に抑えるための代替的アプローチは、抗体のグリコシル化部位の除去によるアプローチである。位置N297を例えばQ、A、およびEに変異させることにより、IgG-Fcガンマ受容体相互作用にとって決定的に重要なグリコシル化部位が除去される。したがって一態様において、N297に対応する位置のアミノ酸は、G、Q、AまたはEであることができる（[33]）。Fc領域とFcガンマ受容体との相互作用を最小限に抑えるための別の代替的アプローチは、以下の変異によって得ることができる：P238A、A327Q、P329AまたはE233P/L234V/L235A/G236del（[31]）。

【0142】

あるいは、ヒトIgG2およびIgG4サブクラスでは、C1qおよびFcガンマ受容体との相互作用がもともと損なわれていると考えられるが、Fc受容体（Fcガンマ受容体）との相互作用も報告されている（[34]～[35]）。どちらのアイソタイプでも、これらの残存相互作用を阻止して、FcR結合に関連する不必要な副作用の低減をもたらす変異を作ることができる。IgG2の場合、それらにはL234AおよびG237Aが含まれ、IgG4の場合はL235Eが含まれる。したがって一態様において、ヒトIgG2重鎖におけるL234およびG237に対応する位置のアミノ酸は、それぞれAおよびAであることができる。一態様において、ヒトIgG4重鎖におけるL235に対応する位置のアミノ酸は、Eであることができる。

【0143】

IgG2抗体においてFcガンマ受容体およびC1qとの相互作用をさらに最小限に抑えるための他のアプローチとして、[36]および[37]に記載されているものが挙げられる。

【0144】

抗体のヒンジ領域も、Fcガンマ受容体および補体との相互作用に関して重要でありうる（[38]-[39]）。したがってヒンジ領域における変異またはヒンジ領域の欠失は抗体のエフェクター機能に影響を及ぼすことができる。

【0145】

本明細書において使用する用語「架橋」は、抗体Fc領域への結合を介した、FcR保持細胞による、ターゲット抗原に結合している抗体Fabアーム（一価または二価）の間接的橋かけを指す。したがって、ターゲット抗原保持細胞上にあるそのターゲット抗原に結合する抗体は、FcRを発現する別の細胞と架橋しうる。

【0146】

本明細書において使用する用語「非特異的死滅」は、T細胞または他のエフェクター細胞の細胞傷害機能による細胞の死滅であって、該細胞の腫瘍ターゲット抗原非依存的な活性化によるものを指す。したがって非特異的死滅とは、腫瘍ターゲット保持細胞を、例えばCDCを誘発することなどにより、腫瘍ターゲットに結合する抗体によって死滅させるのではなく、例えば細胞傷害性T細胞によって死滅させうることを意味する。

【0147】

Fc領域中の少なくとも5つの特異的アミノ酸位置の1つまたは複数を修飾することによって、非活性化Fc領域を得ることができる。一態様では、抗体は、第1および第2免疫グロブリン重鎖を含むFc領域を含む。

【0148】

したがって一態様では、抗体が第1および第2免疫グロブリン重鎖を含み、該第1および

10

20

30

40

50

第2免疫グロブリン重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置の1つまたは複数のアミノ酸は、それぞれL、L、D、N、およびPではない。

【0149】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置の1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、L、D、N、およびPではない。

【0150】

別の態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235およびD265に対応する位置の1つまたは複数のアミノ酸が、それぞれL、LおよびDではなく、ヒトIgG1重鎖におけるN297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

【0151】

本明細書において使用する用語「位置～に対応するアミノ酸」とは、ヒトIgG1重鎖におけるアミノ酸位置番号を指す。別段の明言がある場合を除き、または文脈上矛盾が生じる場合を除き、定常領域配列のアミノ酸は、本明細書では、Euナンバリングインデックス（[27]に記載）に従ってナンバリングされる。したがって、別の他の配列中のアミノ酸またはセグメント「に対応する」ある配列中のアミノ酸またはセグメントとは、例えばALIGN、ClustalWその他の標準的配列アライメントプログラムを、典型的にはデフォルト設定で使用した場合に、前記他のアミノ酸またはセグメントと整列し、ヒトIgG1重鎖に対して少なくとも50%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%の同一性を有するものである。配列または配列中のセグメントを整列させ、それによって本発明のアミノ酸位置に対応する配列中の位置を決定する方法は、当技術分野において周知であると考えられる。

【0152】

本発明においては、アミノ酸を上述のように定義することができる。

【0153】

重鎖におけるアミノ酸に関して「アミノ酸が～ではない」という用語または類似の表現は、そのアミノ酸が言及された特定アミノ酸を除く他の任意のアミノ酸であることを意味すると理解すべきである。例えば、ヒトIgG1重鎖におけるL234に対応する位置のアミノ酸がLではないとは、そのアミノ酸が、L以外の他の天然アミノ酸または非天然アミノ酸のいずれかでありうることを意味する。

【0154】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸がDではない。

【0155】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるD265に対応する位置のアミノ酸がDではなく、ヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。

【0156】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

【0157】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択される。

【0158】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、

10

20

30

40

50

Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒト重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。

【0159】

別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。

【0160】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される。

10

【0161】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、F、T、およびWからなる群より選択される。

【0162】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選ばれる任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、DおよびEからなる群より選択される。

20

【0163】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択される。

【0164】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、Dではない。

30

【0165】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるD265に対応する位置のアミノ酸がDではなく、ヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。

【0166】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

【0167】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択される。

40

【0168】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒト重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミ

50

ノ酸の群から選択される。

【0169】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒト重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。

【0170】

別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。

【0171】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される。

【0172】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、F、T、およびWからなる群より選択される。

【0173】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選ばれる任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、DおよびEからなる群より選択される。

【0174】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択される。

【0175】

さらなる態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置N297に対応する位置のアミノ酸が、Nではない。

【0176】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるN297に対応する位置のアミノ酸がNではなく、ヒトIgG1重鎖における位置P331に対応する位置のアミノ酸がPである。

【0177】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置N297に対応する位置のアミノ酸が、Nではない。

【0178】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるN297に対応する位置のアミノ酸がNではなく、ヒトIgG1重鎖における位置P331に対応する位置のアミノ酸がPである。

【0179】

さらなる態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれLおよびLではない。

【0180】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれLおよびLではなく、ヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。

10

20

30

40

50

## 【0181】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応するアミノ酸が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、Y、Vからなる群より選択される。

## 【0182】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

## 【0183】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

10

## 【0184】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択される。

20

## 【0185】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

## 【0186】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれLおよびLではない。

## 【0187】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234およびL235に対応する位置のアミノ酸がそれぞれLおよびLではなく、ヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸がそれぞれNおよびPである。

30

## 【0188】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

## 【0189】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

## 【0190】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択される。

40

## 【0191】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

## 【0192】

別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。

50

## 【0193】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、G、I、およびVからなる群より選択される。

## 【0194】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、F、T、およびWからなる群より選択される。

10

## 【0195】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、DおよびEからなる群より選択される。

## 【0196】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、D、E、F、G、I、T、V、およびWからなる群より選択される。

20

## 【0197】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、FおよびE、またはAおよびAである。

## 【0198】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびE、またはAおよびAであり、かつヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、NおよびPである。

30

## 【0199】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびE、またはAおよびAである。

## 【0200】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびE、またはAおよびAであり、かつヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

## 【0201】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびEである。

40

## 【0202】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれFおよびEである。

## 【0203】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、少なくともヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれAおよびAである。

## 【0204】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、少なくともヒトIgG1重鎖にお

50

ける位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれAおよびAである。

【0205】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、L、およびDではない。

【0206】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、LおよびDではなく、ヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

10

【0207】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応するアミノ酸が、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、P、Q、R、S、T、Y、V、およびWからなる群より選択され、かつ位置D265に対応するアミノ酸が、A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、Y、V、およびWからなる群より選択される。

【0208】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

20

【0209】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「疎水性」は、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択されるアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択され、かつヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

【0210】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「極性」は、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択され、かつヒト重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。

30

【0211】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

40

【0212】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、疎水性アミノ酸または極性アミノ酸である。

【0213】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、WおよびYからなるアミノ酸の群から選択され、かつヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、F、G、H、I、M、R、T、V、W、およびYからなる群より

50

選択される。

【0214】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、C、D、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなるアミノ酸の群より選択され、かつヒト重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、C、E、H、K、N、Q、R、S、およびTからなる群より選択される。

【0215】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、C、D、E、F、G、H、I、K、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、C、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、およびYからなる群より選択される。

10

【0216】

別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸または酸性アミノ酸である。

【0217】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「脂肪族非荷電」は、A、G、I、L、およびVからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、G、I、およびVからなる群より選択される。

20

【0218】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「芳香族」は、F、T、およびWからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、F、T、およびWからなる群より選択される。

30

【0219】

アミノ酸残基に関して本明細書において使用する用語「酸性」は、DおよびEからなる群より選択される任意のアミノ酸残基を指す。したがって一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、DおよびEからなる群より選択される。

【0220】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択され、かつL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、D、E、F、G、I、T、V、およびWからなる群より選択される。

【0221】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、L、およびDではない。

40

【0222】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれL、L、およびDではなく、かつヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

【0223】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、脂肪族非荷電アミノ酸、芳香族アミノ酸

50

または酸性アミノ酸である。

【0224】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、G、I、L、およびVからなる群より選択され、かつヒトIgG1重鎖における位置L234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、G、I、およびVからなる群より選択される。

【0225】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、DおよびEからなる群より選択される。

【0226】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置D265に対応する位置のアミノ酸が、A、E、F、G、I、L、T、V、およびWからなる群より選択され、かつL234およびL235に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ、A、D、E、F、G、I、T、V、およびWからなる群より選択される。

【0227】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAである。

【0228】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAであり、かつヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

【0229】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAである。

【0230】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびA、またはA、A、およびAであり、かつヒトIgG1重鎖における位置N297およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれNおよびPである。

【0231】

ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【0232】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAである。

【0233】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれA、A、およびAである。

【0234】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれA、A、およびAである。

【0235】

別の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれ

10

20

30

40

50

F、E、A、Q、およびSである。

【0236】

一態様では、前記第1重鎖および第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、Q、およびSである。

【0237】

一態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 107 ; 59 ; 245 ; 299 ; 285 ; 55 ; 185 ; 179 ; 237 ; 177および293の群における配列のうちのいずれか1つに示すVH配列、SEQ ID NO: 8に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方または両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。これにより、SEQ ID NO: 4および8に示すVH配列およびVL配列を含む参照抗体と比較して低減されている、ヒトCD3 に対するアフィニティーを有し、非活性化Fc領域をさらに含む抗CD3抗体の態様が提供される。

10

【0238】

ある特定の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 107 ; 59 ; 245 ; 299 ; 285 ; 55 ; 185 ; 179 ; 237 ; 177および293に示す配列のうちのいずれか1つに示すVH配列、SEQ ID NO: 10に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方または両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。これにより、SEQ ID NO: 4および8に示すVH配列およびVL配列を含む参照抗体と比較して低減されている、ヒトCD3 に対するアフィニティーを有し、非活性化Fc領域、および生産の増強を可能にするVL領域をさらに含む、抗CD3抗体の態様が提供される。

20

【0239】

別の態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 221に示すVH配列、SEQ ID NO: 8または10に示すVL配列を含み、かつ重鎖の少なくとも一方または両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

【0240】

本発明の一態様において、ヒトIgG1重鎖は、SEQ ID NO: 407に示すIgG1m(f)配列を有する。さらに別の態様において、SEQ ID NO: 407に示すヒトIgG1m(f)中の位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

30

【0241】

本発明の一態様において、ヒトIgG1重鎖は、SEQ ID NO: 409に示すIgG1m(f)配列を有する。

【0242】

一局面において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 408のヒトIgLC2/IgLC3定常ドメインラムダ軽鎖を含む。

【0243】

一局面において、本発明の抗体は、発現レベルおよび/または生産収率を増大させるように軽鎖(LC)および/または重鎖(HC)中で修飾されうる。一態様において、本発明の抗体は、軽鎖(LC)中で修飾されうる。そのような修飾は、当技術分野において公知であり、例えば、Zheng, L., Goddard, J.-P., Baumann, U., & Reymond, J.-L. (2004). Expression improvement and mechanistic study of the retro-Diels-Alderase catalytic antibody 10F11 by site-directed mutagenesis. *Journal of Molecular Biology*, 341(3), 807-14. doi:10.1016/j.jmb.2004.06.014に記載されている方法に従って行われうる。

40

【0244】

一局面において、本発明の抗体は、抗体のアフィニティーを改変するように、例えば、抗体のアフィニティーを低減または増強するように、VH領域および/またはVL領域中で修飾されうる。これは、いくつかの設定において有利であって、効力の増強につながる。特に、CD3アームの低いアフィニティーは、循環中および腫瘍部位でのT細胞の運動性に

50

影響を及ぼし、したがってT細胞と腫瘍細胞とのより良好な関与につながりうる。Molhoj et al, Molecular Immunology 44 (2007)を参照されたい。特に、これは、CD3抗体が結合アームの一つとして使用される二重特異性フォーマットにおいて有用でありうる。抗体アフィニティーの低減につながる修飾は、当技術分野において公知であり、例えば、Webster et al. Int J Cancer Suppl. 1988;3:13-6を参照されたい。

【0245】

したがって、一態様において、本発明の抗体は、SEQ ID NO: 6、GTN、7に示す配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む軽鎖可変(VL)領域、ならびに重鎖可変(VH)領域を含み、該VH領域は、以下からなる群の一つより選択されるCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む；

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR配列 [T31M]；
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；
- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；
- h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；
- i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；
- j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；ならびに
- k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]。

【0246】

別の局面において、本発明は、SEQ ID NO: 10に示す配列を有する軽鎖可変(VL)領域と、以下からなる群の一つより選択される配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む重鎖可変(VH)領域とを含む結合領域を含む、ヒトCD3に結合する抗体を提供する；

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；
- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G]；
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N]；
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P]；
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A]；
- h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G]；
- i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M]；
- j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R]；ならびに
- k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V]。

これにより、SEQ ID NO: 10に示すVL領域中にT41K変異を含む態様が提供され、それにより前記抗体の生産の増大が可能になる。

【0247】

一局面において、本発明は、少なくとも、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体の第1結合領域と、第1結合領域とは異なる1つまたは複数のターゲットに結合する1つまたは複数の結合領域とを含む多重特異性抗体に関する。そのような多重特異性抗体は二重特異性抗体であることができる。

【0248】

したがって一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体の第1結合領域と、第1結合領域とは異なるターゲットに結合する第2結合領域とを含む二重特異性抗体に関する。

【0249】

「多重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる、例えば少なくとも3つの、典型的にはオーバーラップしていない、エピトープに対する特異性を有する抗体を指す。

そのようなエピトープは同じターゲット上にあってもよいし異なるターゲット上にあってもよい。エピトープが異なるターゲット上にある場合、そのようなターゲットは同じ細胞または細胞タイプ上にあってもよいし異なる細胞または細胞タイプ上にあってもよい。

【0250】

「二重特異性抗体」という用語は、少なくとも2つの異なる、典型的にはオーバーラップしていないエピトープに対する特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは同じターゲット上にあってもよいし異なるターゲット上にあってもよい。エピトープが異なるターゲット上にある場合、そのようなターゲットは同じ細胞または細胞タイプ上にあってもよいし異なる細胞または細胞タイプ上にあってもよい。

【0251】

一態様では、二重特異性抗体が第1重鎖および第2重鎖を含む。

【0252】

Fc領域の修飾に係する態様および特異的アミノ酸置換に係する態様は、本発明の任意の二重特異性抗体の一部であると考えられる。したがって一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方が、本明細書に記載するいずれかの態様において定義するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸、例えば不活性Fc領域の提供に関して記載するものを含む。一態様では、該第1重鎖および第2重鎖の両方が、本明細書に記載するいずれかの態様において定義するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸、例えば不活性Fc領域の提供に関して記載するものを含む。したがって二重特異性抗体は、本明細書に記載するいずれかの局面または態様にしたがって修飾されたFc領域を含むか、または該第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方が、本明細書に記載するいずれかの局面または態様において定義するように修飾された1つまたは複数のアミノ酸を含む。

【0253】

本発明において使用することができる二重特異性抗体分子の例には、(i)異なる抗原結合領域を含む2つのアームを有する単一抗体、(ii)例えば追加ペプチドリンカーによってタンデムに連結された2つのscFvにより、2つの異なるエピトープに対する特異性を有する一本鎖抗体、(iii)各軽鎖および重鎖が2つの可変ドメインを短いペプチド結合によってタンデムに含有している二重可変ドメイン抗体(dual-variable domain antibody (DVd-Ig (商標)) ([40]))、(iv)化学的に連結された二重特異性(Fab')2フラグメント、(v)ターゲット抗原のそれぞれに対して2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体をもたらす2つの一本鎖ダイアボディ(diabody)の融合物である、TandAb(登録商標)、(vi)多価分子をもたらすscFvとダイアボディとの組み合わせである、フレキシボディ(flexibody)、(vii)プロテインキナーゼA中の「二量体化およびドッキングドメイン」に基づくいわゆる「ドック・アンド・ロック(dock and lock)」分子(Dock-and-Lock(登録商標))、Fabに応用した場合、これは、異なるFabフラグメントに連結された2つの同一Fabフラグメントからなる三価二重特異性結合タンパク質を与えることができる、(viii)例えばヒトFabアームの両端に融合された2つのscFvを含む、いわゆるスコープオン(Scorpion)分子、および(ix)ダイアボディが含まれる。

【0254】

一態様では、本発明の二重特異性抗体がダイアボディ、クロスボディ(cross-body)、または制御されたFabアーム交換(controlled Fab arm exchange)によって得られる二重特異性抗体、例えば本発明において記載するもののようなDuoBody(登録商標)(例えば[41]に記載されているもの)である。

【0255】

異なる種類の二重特異性抗体の例としては、(i)ヘテロ二量体化を強いるための相補的CH3ドメインを有するIgG様分子、(ii)分子の両面がそれぞれ少なくとも2つの異なる抗体のFabフラグメントまたはFabフラグメントの一部を含有している、組換えIgG様二重ターゲット分子、(iii)全長IgG抗体が追加のFabフラグメントまたはFabフラグメントの一部に融合されているIgG融合分子、(iv)一本鎖Fv分子または安定化ダイアボディが重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合されているFc融合分子、(v)異なるF

10

20

30

40

50

abフラグメントが一つに融合されるか、重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合されている、Fab融合分子、および(vi)異なる一本鎖Fv分子、または異なるダイアボディもしくは異なる重鎖抗体(例えばドメイン抗体、Nanobodies(登録商標))が互いに融合しているか、重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合された別のタンパク質または担体分子に融合している、ScFvおよびダイアボディに基づく抗体ならびに重鎖抗体(例えばドメイン抗体、Nanobodies(登録商標))が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

#### 【0256】

相補的CH3ドメイン分子を有するIgG様分子の例としては、Triomab(登録商標)(Trion Pharma/Fresenius Biotech, [42])、ノブ・イントゥ・ホール(Knobs-into-Holes)(Genentech, [43])、CrossMAb(Roche, [44])および静電マッチ(electrostatically-matched)(Amgen, [45]~[46]; Chugai, [47]; Oncomed, [48])、LUZ-Y(Genentech, Wranik et al. *J. Biol. Chem.* 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1)、DIG-ボディおよびPIG-ボディ(Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202)、ストランド・エクステンジ・エンジニアード・ドメイン(Strand Exchange Engineered Domain)ボディ(SEEDbody)(EMD Serono, [49])、Biclonic(Merus, WO2013157953)、Fc Adp(Regeneron, [50])、二重特異性IgG1およびIgG2(Pfizer/Rinat, [51])、Azymetricスキャフォールド(Zymeworks/Merck, [52])、mAb-Fv(Xencor, [53])、二価二重特異性抗体(Roche, WO2009080254)およびDuoBody(登録商標)分子(Genmab A/S, [41])が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

20

#### 【0257】

組換えIgG様二重ターゲティング分子の例としては、デュアル・ターゲティング(Dual Targeting)(DT)-Ig(GSK/Domantis, WO2009058383)、ツー・イン・ワン(Two-in-one)抗体(Genentech, Bostrom, et al 2009. *Science* 323, 1610-1614)、架橋(Cross-linked)Mab(Karmanos Cancer Center)、mAb2(F-Star, [54])、Zybodies(商標)(Zyngenia, LaFleur et al. *MAbs.* 2013 Mar-Apr;5(2):208-18)、共通軽鎖(common light chain)によるアプローチ(Crucell/Merus, [55])、Body(NovImmune, WO2012023053)およびCovX-body(登録商標)(CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. *Bio org. Med. Chem. Lett.* 17,501-506)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

30

#### 【0258】

IgG融合分子の例としては、Dual Variable Domain(DVD)-Ig(商標)(Abbott, [56])、デュアルドメイン・ダブルヘッド(Dual domain double head)抗体(Unilever; Sanofi Aventis, [57])、IgG様二重特異性(ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. *Nat Biotechnol.* 2014 Feb;32(2):191-8)、Ts2Ab(MedImmune/AZ, Dimasi et al. *J Mol Biol.* 2009 Oct 30;393(3):672-92)およびBsAb(Zymogenetics, WO2010111625)、ハーキュリーズ(HERCULES)(Biogen Idec, [58])、scFv融合物(Novartis)、scFv融合物(Changzhou Adam Biotech Inc, [59])およびTvAb(Roche, [59], [60])が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

#### 【0259】

Fc融合分子の例としては、ScFv/Fc融合物(Academic Institution, Pearce et al *Biochem Mol Biol Int.* 1997 Sep;42(6):1179-88.)、スコープオン(SCORPION)(Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100 th Annual meeting 2009 (Abstract # 5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625)、デュアル・アフィニティー・リターゲティング・テクノロジー(Dual Affinity Retargeting Technology)(Fc-DART(商標))(MacroGenics, [62], [63])およびDual(ScFv)2-Fab(National Research Center for Antibody Medicine-China)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

#### 【0260】

Fab融合二重特異性抗体の例としては、F(ab)2(Medarex/AMGEN)、デュアル-アクション(Dual-Action)またはBis-Fab(Genentech)、Dock-and-Lock(登録商標)(DNL)(I

50

ImmunoMedics)、二価二重特異性(Bivalent Bispecific)(Biotecnol)およびFab-Fv(UCB-Celltech)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

【0261】

ScFvに基づく抗体、ダイアボディに基づく抗体およびドメイン抗体の例としては、二重特異性T細胞エンゲイジャー(Bispecific T Cell Engager)(BiTE(登録商標))(MicroMet)、タンデム・ダイアボディ(Tandem Diabody)(Tandab)(Affimed)、デュアル・アフィニティー・リターゲティング・テクノロジー(DART(商標))(MacroGenics)、一本鎖ダイアボディ(Single-chain Diabody)(Academic, Lawrence FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84)、TCR様抗体(AIT, ReceptorLogics)、ヒト血清アルブミンScFv融合物(Merrimack, WO2010059315)およびCOMBODY分子(Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75)、二重ターゲティング(dual targeting)ナノボディ(nanobodies(登録商標))(Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010)、二重ターゲティング重鎖単独ドメイン抗体(dual targeting heavy chain only domain antibody)が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

10

【0262】

さらに、本明細書に記載するアッセイ条件を満たす単一特異性抗体はいずれも、二重特異性抗体の基礎を形成しうると考えられる。すなわち、結合領域の1つがCD3に結合する二重特異性抗体は、機能アッセイで試験され本明細書に明言する要件を満たす任意の単一特異性CD3抗体に由来しうる。そのような二重特異性抗体は、参照により本明細書に組み入れられる[41]に記載の方法によって提供されうる。

20

【0263】

一局面において、本発明の二重特異性抗体は、第1CH3領域を含む第1Fc領域と、第2CH3領域を含む第2Fc領域とを含み、ここで、第1CH3領域と第2CH3領域の配列は異なっており、かつ該第1CH3領域と該第2CH3領域との間のヘテロ二量体相互作用は、該第1CH3領域および該第2CH3領域のホモ二量体相互作用のそれぞれよりも強い状態である。これらの相互作用についてのさらに詳細、およびそれらをいかに達成できるかは、参照により本明細書に組み入れられるWO2011131746およびWO2013060867(Genmab)に提供されている。

【0264】

したがって、ある特定の態様では、前記第1重鎖および第2重鎖のそれぞれが、少なくともヒンジ領域、CH2およびCH3領域を含み、該第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも1つが置換されており、かつ該第2重鎖では、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも1つが置換されており、しかも該第1重鎖と該第2重鎖とは同じ位置では置換されていない。この文脈において「置換されている」という用語は、特定アミノ酸位置のアミノ酸が別の天然または非天然アミノ酸で置換されていることを指す。したがって、ヒトIgG1重鎖における位置に対応する位置の「置換」アミノ酸とは、その特定位置にあるアミノ酸が、IgG1重鎖における天然のアミノ酸とは異なることを意味する。

30

【0265】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がKでもLでもMでもなく、任意で、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がFであり、かつ前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、F405、およびY407からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも1つが置換されている。

40

【0266】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がKでもLでもMでもなく、かつ前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がFではなく、任意で、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がKである。

50

## 【0267】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がFでもRでもGでもなく、前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるT366、L368、K370、D399、Y407、およびK409からなる群より選択される位置に対応する位置のアミノ酸が置換されている。

## 【0268】

一態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がKでもLでもMでもなく、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がFではない。

## 【0269】

さらに別の態様では、前記第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ前記第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRであるか、またはその逆である。

## 【0270】

したがって一態様では、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

## 【0271】

さらに別の態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、およびD265Aの1つまたは複数を含むし、かつ、F405に対応する位置のアミノ酸がFではない。一態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、およびD265Aの1つまたは複数と、K409位のさらに別の置換、例えばK409Rとを含む。特に、一態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖と第2重鎖の両方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、およびD265Aの1つまたは複数と、F405位の置換、例えばF405Lとを含む。一態様では、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体が、第1重鎖と第2重鎖の両方に、上記態様のいずれか一つに開示する不活性化置換、例えばL234F、L235E、およびD265Aの1つまたは複数と、K409位のさらに別の置換、例えばK409Rとを含む。そのような抗体は二重特異性抗体を

10

20

30

## 【0272】

したがって、さらに別の態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸がそれぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

## 【0273】

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

40

## 【0274】

ある代替態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

## 【0275】

50

一態様では、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

【0276】

別の態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

10

【0277】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRである。

【0278】

ある代替態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、およびAであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

20

【0279】

一態様では、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖におけるL234、L235、D265、N297、およびP331に対応する位置のアミノ酸が、それぞれF、E、A、N、およびPであり、第1重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるK409に対応する位置のアミノ酸がRであり、かつ第2重鎖において、ヒトIgG1重鎖におけるF405に対応する位置のアミノ酸がLである。

【0280】

本明細書で述べるように、がん細胞または腫瘍細胞などの特異的ターゲット細胞へのT細胞動員は、ターゲット細胞を死滅させる方法になる。T細胞が媒介する死滅は、第1結合領域でCD3を標的としかつ第2結合領域で別のターゲットを標的とする二重特異性抗体によって得ることができる。したがって一態様では、第1結合領域がヒト化またはキメラCD3抗体に関して本明細書に記載するいずれかの態様に従い、第2結合領域は第1結合領域とは異なるターゲットに結合する。抗体が二重特異性抗体である場合、抗体の少なくとも半分、すなわち抗体の重鎖と軽鎖の対の一つは、本明細書に記載するヒト化またはキメラ抗体であることを理解すべきである。したがって、二重特異性抗体の半分は、CD3に結合する本発明のヒト化またはキメラ抗体であり、他方の半分は、第2のターゲットに結合するヒト化体、キメラ体、完全非ヒト体または完全ヒト体でありうる。したがって一態様では、抗体が、第1重鎖および第2重鎖、第1軽鎖および第2軽鎖を含み、該第1重鎖および該第1軽鎖はヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、かつ該第2重鎖および第2軽鎖は完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、該第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、かつ該第2結合領域は異なるターゲットに結合する。一態様では、抗体が、第1重鎖および第2重鎖、第1軽鎖および第2軽鎖を含み、該第1重鎖および該第1軽鎖はヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、かつ該第2重鎖および第2軽鎖はヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、該第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、かつ該第2結合領域は該第1結合領域とは異なるCD3エピトープに結合する。

30

40

【0281】

本明細書において使用する用語「ジスルフィド架橋」は、2つのシステイン残基の間の共有結合を指す。すなわちこの相互作用はCys-Cys相互作用と呼ぶこともできる。

50

## 【0282】

本明細書において使用する用語「ターゲット」は、本発明の抗体の結合領域が結合する分子を指す。抗体の結合に関連して使用する場合、この用語が包含する任意の抗原に対して当該抗体が作られていることを意味する。

## 【0283】

ある特定の態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は異なるターゲットに結合し、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

10

## 【0284】

ある特定の態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は第1結合領域とは異なるCD3エピトープに結合し、第1重鎖および第2重鎖の少なくとも一方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

20

## 【0285】

ある特定の態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は異なるターゲットに結合し、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

## 【0286】

ある特定の態様では、第1重鎖および第1軽鎖がヒト化体またはキメラ体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第1結合領域を形成し、第2重鎖および第2軽鎖が完全ヒト体であって、ジスルフィド架橋によって接続されて第2結合領域を形成し、ここで、第1結合領域は本明細書に記載するいずれかの局面または態様に従い、第2結合領域は第1結合領域とは異なるCD3エピトープに結合し、第1重鎖と第2重鎖の両方において、ヒトIgG1重鎖における位置L234、L235、およびD265に対応する位置のアミノ酸は、それぞれF、E、およびAである。

30

## 【0287】

別の局面において、本発明は、ヒトCD3に結合する抗体の結合アフィニティーを、SEQ ID NO: 1、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変(VH)領域を含む参照抗体と比較して低減させる方法であって、T31M、T31P、N57、H101、S110、およびY114の群より選択される位置のうちの一つにおける変異より選択される、該参照抗体の3つのCDR配列のうちの一つにおける変異を導入する工程を含み、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンバリングされている方法に関する。

40

## 【0288】

VH領域中のアミノ酸のナンバリングおよび変異している位置は、SEQ ID NO: 4におけるアミノ酸に従う。ナンバリングは、N末端からC末端に向かう方向に、第1のアミノ酸から125番まで、直接数値ナンバリングスキームに従う。SEQ ID NO: 4に対応する位置の数値ナンバリングを、図2に示す。さらに、CDR領域には、IMGT定義に従って注釈をつけた。

## 【0289】

本発明の一態様において、方法は、T31MまたはT31P変異を導入する工程を含む。位置T31は、SEQ ID NO: 4に従う。

50

## 【0290】

本発明の一態様において、方法は、位置N57における変異を導入する工程を含む。位置N57は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異はN57Eである。

## 【0291】

本発明の一態様において、方法は、位置H101における変異を導入する工程を含む。位置H101は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異はH101GまたはH101Nである。

## 【0292】

本発明の一態様において、方法は、位置Y114における変異を導入する工程を含む。位置Y114は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異は、Y114、Y114R、またはY114Vである。

10

## 【0293】

本発明の一態様において、方法は、H101、S110、およびY114の群より選択される位置に対応するVH CDR3領域における変異に、変異を導入する工程を含む。

## 【0294】

本発明の一態様において、方法は、H101G、H101N、S110A、S110G、Y114M、Y114R、およびY114Vからなる群より選択される、VH CDR3領域における変異を導入する工程を含む。

## 【0295】

本発明の一態様において、方法は、変異を導入する工程を含み、ここで、抗体は、バイオレイヤー干渉法により決定した場合の $K_D$ 値  $1.6 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 9.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ または $1.0 \times 10^{-7} \sim 9.9 \times 10^{-7} \text{ M}$ に相当する、SEQ ID NO: 402のヒトCD3 ペプチドに対する結合アフィニティを有する。

20

## 【0296】

本発明の一態様において、方法は、変異を導入する工程を含み、ここで、抗体は、バイオレイヤー干渉法により決定した場合の $K_D$ 値  $1.4 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ または $9.9 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-9} \text{ M}$ に相当する、SEQ ID NO: 402のヒトCD3 ペプチドに対する結合アフィニティを有する。

## 【0297】

本発明の一態様において、抗体は、バイオレイヤー干渉法により決定した場合の $K_D$ 値  $1.6 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 9.9 \times 10^{-8} \text{ M}$ または $1.0 \times 10^{-7} \sim 9.9 \times 10^{-7} \text{ M}$ に相当する、SEQ ID NO: 402のヒトCD3 ペプチドに対する結合アフィニティを有する。

30

## 【0298】

別の局面において、本発明は、ヒトCD3に結合する抗体の結合アフィニティを、SEQ ID NO: 1、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変(VH)領域を含む参照抗体と比較して増強する方法であって、位置G105に対応するVH CDR3における変異を導入する工程を含み、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に従ってナンバリングされている方法に関する。

## 【0299】

本発明の一態様において、方法は、位置G105における変異を導入する工程を含む。位置G105は、SEQ ID NO: 4に従う。一態様において、変異はG105Pである。

## 【0300】

本発明の一態様において、方法は、SEQ ID NO: 1、2、3に示す参照抗体のVH領域のCDR中に、最大で5個のさらなる変異、最大で4個のさらなる変異、最大で3個のさらなる変異、最大で2個のさらなる変異、または最大で1個のさらなる変異を導入する工程を含む。

40

## 【0301】

本発明の一態様において、増強または低減されている結合アフィニティの方法は、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域は、以下からなる群より選択されるCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む；

- a) SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31M]；
- b) SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [T31P]；
- c) SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [N57E]；

50

- d) SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101G] ;
- e) SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [H101N] ;
- f) SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [G105P] ;
- g) SEQ ID NO: 1、2、236に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110A] ;
- h) SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [S110G] ;
- i) SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114M] ;
- j) SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114R] ; ならびに
- k) SEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、およびCDR3配列 [Y114V].

## 【0302】

本発明の別の態様において、方法は、N57Eに対応するVH領域CDR2領域における変異を導入する工程を含む。本発明のさらに別の態様において、方法は、H101G、H101N、G105P、S110A、S110G、Y114M、Y114R、またはY114Vに対応するVH領域CDR3領域における変異を導入する工程を含む。別の局面において、本発明は、CD3に対する抗体の結合アフィニティを低減または増強する方法であって、該抗体が、重鎖可変(VH)領域を含む結合領域を含み、該VH領域が、CDR1 SEQ ID NO: 1、CDR2 SEQ ID NO: 2、およびCDR3 SEQ ID NO: 3により示す参照抗体の3つのCDR配列のうちの一つにおける変異を含み、該抗体が、以下のT31M、T31P、N57、H101、G105、S110、およびY114の群より選択される位置の一つにおける変異を含み、該位置が、SEQ ID NO: 4の参照配列に対応している方法に関する。

## 【0303】

本発明の一態様において、方法は、T31MまたはT31Pに対応するVH領域CDR1領域配列における変異を導入する工程を含む。本発明の別の態様において、方法は、N57Eに対応するVH領域CDR2領域における変異を導入する工程を含む。本発明のさらに別の態様において、方法は、H101G、H101N、G105P、S110A、S110G、Y114M、Y114R、またはY114Vに対応するVH領域CDR3領域における変異を導入する工程を含む。

## 【0304】

さらに別の局面において、本発明は、CD3に結合する抗体の結合アフィニティを、SEQ ID NO: 1、2、および3に示すCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む重鎖可変(VH)領域を含む参照抗体と比較して低減させる方法であって、SEQ ID NO: 1、2、または3に示すVH領域CDR1、CDR2、またはCDR3配列のうちの一つにおける変異を導入する工程を含む方法に関する。

## 【0305】

本発明の一態様において、方法は、以下の位置：T31、N57、H101、S110、またはY114の一つに対応するVH領域の3つのCDR領域の一つにおける変異を導入する工程を含み、ここで、該位置は、SEQ ID NO: 4の参照配列に対応している。

## 【0306】

本発明の一態様において、方法は、位置T31に対応するVH領域CDR1配列における変異を導入する工程を含み、ここで、該CDR1配列は、SEQ ID NO: 1に示すとおりである。変異をXにより表すと、結果として生じたCDR1配列は、GFTFNXYAとして提示されうる。一態様において、VH領域の3つのCDR配列は、以下の配列  
CDR1 GFTFNXYA, CDR2 IRSKYNXYAT および CDR3 VRHGNFGNSYVSWFAY  
を有しうる。一態様において、VH領域CDR1中の位置T31における変異は、T31MまたはT31P変異である。

## 【0307】

本発明の一態様において、方法は、位置N57に対応するVH領域CDR2配列における変異を導入する工程を含み、ここで、該CDR2配列は、SEQ ID NO: 2に示すとおりである。変異をXにより表すと、結果として生じたCDR2配列は、  
IRSKYNXYAT

として提示されうる。一態様において、VH領域の3つのCDR配列は、以下の配列  
CDR1 GFTFNXYA, CDR2 IRSKYNXYAT および CDR3 VRHGNFGNSYVSWFAY

を有しうる。一態様において、VH領域CDR2中の位置N57における変異は、N57E変異である

。

## 【0308】

本発明の一態様において、方法は、位置H101に対応するVH領域CDR3配列における変異を導入する工程を含み、ここで、該CDR3配列は、SEQ ID NO: 3に示すとおりである。変異をXにより表すと、結果として生じたCDR3配列は、

VRXGNFGNSYVSWFAY

として提示されうる。一態様において、VH領域の3つのCDR配列は、以下の配列

CDR1 GFTFNTYA, CDR2 IRSKYNNYAT および CDR3 VRXGNFGNSYVSWFAY

を有しうる。一態様において、VH領域CDR3中の位置H101における変異は、H101GまたはH101N変異である。

10

## 【0309】

本発明の一態様において、方法は、位置S110に対応するVH領域CDR3配列における変異を導入する工程を含み、ここで、該CDR3配列は、SEQ ID NO: 3に示すとおりである。変異をXにより表すと、結果として生じたCDR3配列は、

VRHGNFGNSYVXWFAY

として提示されうる。一態様において、VH領域の3つのCDR配列は、以下の配列

CDR1 GFTFNTYA, CDR2 IRSKYNNYAT および CDR3 VRHGNFGNSYVXWFAY

を有しうる。一態様において、VH領域CDR3中の位置H101における変異は、S110AまたはS110G変異である。

20

## 【0310】

本発明の一態様において、方法は、位置Y114に対応するVH領域CDR3配列における変異を導入する工程を含み、ここで、該CDR3配列は、SEQ ID NO: 3に示すとおりである。変異をXにより表すと、結果として生じたCDR3配列は、

VRHGNFGNSYVSWFAX

として提示されうる。一態様において、VH領域の3つのCDR配列は、以下の配列

CDR1 GFTFNTYA, CDR2 IRSKYNNYAT および CDR3 VRHGNFGNSYVSWFAX

を有しうる。一態様において、VH領域CDR3中の位置Y114における変異は、Y114M、Y114R、またはY114V変異である。

30

## 【0311】

本発明の一態様において、方法は、SEQ ID NO: 1、2、3に示す参照抗体のVH領域の3つのCDRの1つまたは複数中に、最大で3個の変異、最大で2個の変異、または最大で1個の変異を導入する工程を含む。

30

## 【0312】

本発明の一態様において、方法は、抗体の重鎖可変フレームワーク領域中に、最大で10個の変異、最大で9個の変異、最大で8個の変異、最大で7個の変異、最大で6個の変異、最大で5個の変異、最大で4個の変異、最大で3個の変異、最大で2個の変異、または最大で1個の変異を導入する工程を含み、該変異は、好ましくは、CD3に対する抗体の結合を、変異を有さない同じ抗体と比較して変更しない。

## 【0313】

本発明の一態様において、方法は、T31MまたはT31Pより選択されるVH領域CDR1配列における変異を導入する工程を含む。本発明の別の態様において、方法は、N57EのVH領域CDR2配列における変異を導入する工程を含む。本発明のさらに別の態様において、方法は、H101G、H101N、S110A、S110G、Y114M、Y114R、およびY114Vの群より選択されるVH領域CDR3配列における変異を導入する工程を含む。

40

## 【0314】

別の局面において、本発明は、CD3に結合する抗体の結合アフィニティーを、SEQ ID NO: 1、2、および3に示すCDR配列を有するCDR1、CDR2、およびCDR3を含む重鎖可変(VH)領域を含む参照抗体と比較して増強する方法であって、SEQ ID NO: 1、2、または3に示すVH領域CDR1、CDR2、またはCDR3配列のうちの1つにおける変異を導入する工程を含む方法に関する。

50

## 【0315】

本発明の一態様において、方法は、位置G105に対応するVH領域CDR3配列における変異を導入する工程を含み、ここで、該CDR3配列は、SEQ ID NO: 3に示すとおりである。変異をXにより表すと、結果として生じたCDR3配列は、VRHGNTXNSYVSWFAY

として提示されうる。一態様において、VH領域の3つのCDR配列は、以下の配列 CDR1 GFTFNTYA, CDR2 IRSKYNNYAT および CDR3 VRXGNFGNSYVSWFAY

を有しうる。一態様において、VH領域CDR3中の位置G105における変異は、G105P変異である。

## 【0316】

核酸コンストラクト、発現ベクター、および宿主細胞

一局面において、本発明は、表1に示す1つまたは複数の配列をコードする核酸コンストラクトに関する。したがって、本発明は、SEQ ID NO: 107 ; 221 ; 59 ; 245 ; 299 ; 285 ; 55 ; 185 ; 179 ; 237 ; 177 および 293 に示す配列のうちのいずれか1つをコードする核酸コンストラクトに関する。

## 【0317】

さらに別の局面において、本発明は、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体の配列をコードする核酸コンストラクト、本発明の核酸コンストラクトを含む発現ベクター、前記発現ベクターを含む宿主細胞、および適当な条件下で前記宿主細胞を培養することによって前記抗体を生産する方法であって、それにより、抗体を生産し、任意で回収する方法に関する。ヒト化CD3抗体は、「huCD3」と表すこともできる。

## 【0318】

一態様において、本発明は、(i) 本発明のヒト化もしくはキメラ抗体の重鎖配列をコードする核酸配列、(ii) 本発明のヒト化もしくはキメラ抗体の軽鎖配列をコードする核酸配列、または (iii) (i) と (ii) の両方を含む発現ベクターを提供する。したがって、発現ベクターは、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による1つまたは複数の核酸コンストラクトまたは核酸配列を含む。

## 【0319】

一態様において、本発明の発現ベクターは、重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列のうちの1つまたは複数を含む核酸配列を含み、ここで、VH CDR配列は、

10

20

30

SEQ ID NO: 12, 2, 3;

14, 2, 3; 16, 2, 3; 18, 2, 3; 20, 2, 3; 22, 2, 3; 24, 2, 3; 26, 2, 3; 28, 2, 3; 30, 2, 3; 32, 2, 3; 34, 2, 3; 36, 2, 3; 38, 2, 3; 40, 2, 3; 42, 2, 3; 44, 2, 3; 46, 2, 3; 48, 2, 3; 50, 2, 3; 52, 2, 3; 54, 2, 3; 56, 2, 3; 58, 2, 3; 60, 2, 3; 62, 2, 3; 64, 2, 3; 66, 2, 3; 68, 2, 3; 70, 2, 3; 72, 2, 3; 74, 2, 3; 76, 2, 3; 78, 2, 3; 80, 2, 3; 82, 2, 3; 84, 2, 3; 86, 2, 3; 88, 2, 3; 90, 2, 3; 92, 2, 3; 94, 2, 3; 96, 2, 3; 98, 2, 3; 1, 100, 3; 1, 102, 3; 1, 104, 3; 1, 106, 3; 1, 108, 3; 1, 110, 3; 1, 112, 3; 1, 114, 3; 1, 116, 3; 1, 118, 3; 1, 120, 3; 1, 122, 3; 1, 124, 3; 1, 126, 3; 1, 128, 3; 1, 130, 3; 1, 132, 3; 1, 134, 3; 1, 136, 3; 1, 138, 3; 1, 140, 3; 1, 142, 3; 1, 144, 3; 1, 146, 3; 1, 148, 3; 1, 150, 3; 1, 152, 3; 1, 154, 3; 1, 156, 3; 1, 158, 3; 1, 160, 3; 1, 162, 3; 1, 164, 3; 1, 166, 3; 1, 168, 3; 1, 170, 3; 1, 172, 3; 1, 174, 3; 1, 176; 1, 2, 178; 1, 2, 180; 1, 2, 182; 1, 2, 184; 1, 2, 186; 1, 2, 188; 1, 2, 190; 1, 2, 192; 1, 2, 194; 1, 2, 196; 1, 2, 198; 1, 2, 200; 1, 2, 202; 1, 2, 204; 1, 2, 206; 1, 2, 208; 1, 2, 210; 1, 2, 212; 1, 2, 214; 1, 2, 216; 1, 2, 218; 1, 2, 220; 1, 2, 222; 1, 2, 224; 1, 2, 226; 1, 2, 228; 1, 2, 230; 1, 2, 232; 1, 2, 234; 1, 2, 236; 1, 2, 238; 1, 2, 240; 1, 2, 242; 1, 2, 244; 1, 2, 246; 1, 2, 248; 1, 2, 250; 1, 2, 252; 1, 2, 254; 1, 2, 256; 1, 2, 258; 1, 2, 260; 1, 2, 262; 1, 2, 264; 1, 2, 266; 1, 2, 268; 1, 2, 270; 1, 2, 272; 1, 2, 274; 1, 2, 276; 1, 2, 278; 1, 2, 280; 1, 2, 282; 1, 2, 284; 1, 2, 286; 1, 2, 288; 1, 2, 290; 1, 2, 292; 1, 2, 294; 1, 2, 296; 1, 2, 298 および 1, 2, 300

10

20

からなる群より選択され、かつVL CDR配列は、  
SEQ ID

NO: 6, GTN, 7; 302, GTN, 7; 304, GTN, 7; 306, GTN, 7; 308, GTN, 7; 310, GTN, 7; 312, GTN, 7; 314, GTN, 7; 316, GTN, 7; 318, GTN, 7; 320, GTN, 7; 322, GTN, 7; 324, GTN, 7; 326, GTN, 7; 328, GTN, 7; 330, GTN, 7; 6, GTN, 332; 6, GTN, 334; 6, GTN, 336; 6, GTN, 338; 6, GTN, 340; 6, GTN, 342; 6, GTN, 344; 6, GTN, 346; 6, GTN, 348; 6, GTN, 350; 6, GTN, 352; 6, GTN, 354; 6, GTN, 356; 6, GTN, 358; 6, GTN, 360; 6, GTN, 362; 6, GTN, 364; 6, GTN, 366; 6, GTN, 368; 6, GTN, 370; 6, GTN, 372; 6, GTN, 374; 6, GTN, 376; 6, GTN, 378; 6, GTN, 380; 6, GTN, 382; 6, GTN, 384; 6, GTN, 386; 6, GTN, 388; 6, GTN, 390; および 6, GTN, 394

30

に示すCDR配列からなる群より選択される。

【0320】

一態様において、本発明の発現ベクターは、重鎖CDR配列および軽鎖CDR配列のうちの一つまたは複数をコードする核酸配列を含み、ここで、VL領域CDR1、CDR2、CDR3領域のCDR配列は、SEQ ID NO: 6、GTN、7に示すCDR配列を含み、かつVH領域CDR1、CDR2、CDR3領域のCDR配列は、SEQ ID NO: 54、2、3に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 58、2、3に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、106、3に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、2、176に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、2、184に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、2、220に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、2、236; 1、2、244に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、2、244に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、2、284に示すCDR1、CDR2、CDR3; SEQ ID NO: 1、2、292に示すCDR1、CDR2、CDR3、およびSEQ ID NO: 1、2、298に示すCDR1、CDR2、CDR3からなる群より選択される。

40

【0321】

ある特定の態様では、発現ベクターが、上記アミノ酸配列の一つまたは複数の変異体をコードする核酸配列を含み、該変異体は、最大で25個のアミノ酸修飾、例えば最大で20個、例えば最大で15、14、13、12、または11個のアミノ酸修飾、例えば10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1個のアミノ酸修飾、例えば欠失または挿入、好ましくは置換、例えば

50

保存的置換または非保存的置換を有するか、または該配列のいずれかに対して少なくとも80%の同一性、例えば少なくとも85%の同一性または90%の同一性または95%の同一性、例えば前述のアミノ酸配列のいずれかに対して96%の同一性または97%の同一性または98%の同一性または99%の同一性を有する。本発明は、上述の核酸配列とは異なるが、遺伝コードの多様性ゆえに、本発明の抗体と同じアミノ酸配列をコードする核酸配列にも関係する。例えば、核酸配列が変化しても本明細書に記載するいずれかのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をもたらさう。遺伝コードに基づいてそのようなさらなる核酸配列を同定する方法は、当業者には周知である。

#### 【0322】

さらに別の態様では、発現ベクターが、抗体、例えばヒト抗体の、軽鎖、重鎖または軽鎖と重鎖の両方の定常領域をコードする核酸配列をさらに含む。

10

#### 【0323】

上述のような発現ベクターは、本発明の抗体の組換え生産に使用することができる。

#### 【0324】

本発明に関して発現ベクターは、染色体ベクター、非染色体ベクター、および合成核酸ベクター（発現制御要素の適切なセットを含む核酸配列）など、任意の適切なベクターであることができる。そのようなベクターの例として、SV40の誘導體、細菌プラスミド、ファージDNA、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージDNAとの組合せから誘導されるベクター、およびウイルス核酸（RNAまたはDNA）ベクターが挙げられる。一態様では、ヒト化またはキメラCD3抗体をコードする核酸が、裸のDNAまたはRNAベクター、例えば線状発現要素（例えば[64]に記載されているもの）、圧縮された核酸ベクター（例えば[65]および/または[66]に記載されているもの）、pBR322、pUC19/18、またはpUC118/119などのプラスミドベクター、「midge」最小サイズ核酸ベクター（例えば[67]に記載されているもの）、またはCaPO<sub>4</sub>沈降コンストラクトなどの沈降核酸ベクターコンストラクト（例えば[68]、[69]、[70]、および[71]に記載されているもの）に含まれる。そのような核酸ベクターとその使用法は当技術分野において周知である（例えば[72]および[73]を参照されたい）。

20

#### 【0325】

一態様では、ベクターが、細菌細胞におけるヒト化またはキメラCD3抗体の発現に適している。そのようなベクターの例として、例えばBlueScript（Stratagene）、pINベクター（[74]）、pETベクター（Novagen、ウィスコンシン州マディソン）などの発現ベクターが挙げられる。

30

#### 【0326】

これに加えてまたはこれに代えて、発現ベクターは酵母系における発現に適したベクターであってもよい。酵母系における発現に適した任意のベクターを使用することができる。適切なベクターとしては、例えばアルファ因子、アルコールオキシダーゼおよびPGHなどの、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターが挙げられる（[75]および[76]に総説がある）。

#### 【0327】

核酸コンストラクトおよび/またはベクターは、新生ポリペプチド鎖などのポリペプチドを細胞周辺腔にまたは細胞培養培地中にターゲティングすることができる分泌配列/局在化配列をコードする核酸配列も含みうる。そのような配列は当技術分野において公知であり、これには、当技術分野において周知の分泌リーダーまたはシグナルペプチド、細胞小器官ターゲティング配列（例えば核局在化配列、ER保持シグナル、ミトコンドリア輸送配列、クロロプラスト輸送配列）、膜局在化/アンカー配列（例えば膜透過停止配列、GPIアンカー配列）などが含まれる。

40

#### 【0328】

本発明の発現ベクターでは、ヒト化またはキメラCD3抗体をコードする核酸が、任意の適切なプロモーター、エンハンサー、および他の発現促進要素を含むか、またはそれらと関連さう。そのような要素の例としては、強力な発現プロモーター（例えばヒトCMV IE

50

プロモーター/エンハンサー、ならびにRSV、SV40、SL3-3、MMTV、およびHIV LTRプロモーター)、効果的なポリ(A)終結配列、大腸菌におけるプラスミド生産のための複製起点、選択可能マーカーとしての抗生物質耐性遺伝子、および/または好都合なクローニング部位(例えばポリリンカー)が挙げられる。核酸コンストラクトおよび/またはベクターは、構成的プロモーターではなく、CMV IEなどの誘導性プロモーターも含みうる(これらの用語が一定の条件下での遺伝子発現の程度の記述語であることは、当業者にはわかるであろう)。

【0329】

一態様では、ヒト化またはキメラCD3抗体をコードする発現ベクターを、ウイルスベクターによって宿主細胞または宿主動物に配置し、かつ/または送達することができる。

10

【0330】

そのような発現ベクターは、ヒト化またはキメラCD3抗体の組換え生産のために試用することができる。

【0331】

一局面において、本発明は、本発明の発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

【0332】

一局面において、本明細書に記載するいずれかの局面または態様のヒト化またはキメラCD3抗体は、抗体を生産する組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞を利用して提供される。したがって本発明は、本明細書に定義するヒト化またはキメラCD3抗体または免疫グロブリンを生産する組換え真核宿主細胞、組換え原核宿主細胞、または組換え微生物宿主細胞を提供する。宿主細胞の例としては、酵母、細菌細胞および哺乳動物細胞、例えばCHOまたはHEK-293細胞が挙げられる。例えば一態様では、宿主細胞が、本明細書に記載するヒト化またはキメラCD3抗体の発現をコードする配列を含む細胞ゲノムに安定に組み込まれた核酸配列を含む。別の態様では、宿主細胞が、本明細書に記載のヒト化またはキメラCD3抗体の発現をコードする配列を含む非組込み型の核酸配列、例えばプラスミド、コスミド、ファージミド、または線状発現要素を含む。

20

【0333】

本明細書において使用する用語「組換え宿主細胞」(または単に「宿主細胞」)は、発現ベクターまたは核酸コンストラクトもしくは核酸配列が導入されている細胞を指すものとする。このような用語は、その特定対象細胞を指すだけでなく、そのような細胞の子孫も指すものとすることを理解すべきである。世代を重ねるにつれて変異または環境の影響のいずれかによって一定の修飾が起こりうるので、そのような子孫は、実際には親細胞と同一ではないかもしれないが、それでも本明細書において使用する用語「宿主細胞」の範囲内に包含される。組換え宿主細胞としては、例えば、CHO細胞、HEK-293細胞、PER.C6、NS0細胞、およびリンパ球細胞などの真核宿主細胞、大腸菌などの原核細胞、ならびに植物細胞および真菌などの他の真核宿主が挙げられる。

30

【0334】

さらに別の局面において、本発明は、本発明のヒト化またはキメラCD3抗体を生産するための方法に関し、本方法は、

- a) 上述した本発明の宿主細胞を培養する工程、および
- b) 本発明の抗体を培養培地から回収しかつ/または精製する工程を含む。

40

【0335】

さらに別の局面では、ヒト化またはキメラCD3抗体の配列をコードするヌクレオチド配列が、治療用ポリペプチドなどの第2の部分にコードする。例示的な治療用ポリペプチドは本明細書の他の項に記載する。一態様において、本発明は、ヒト化またはキメラCD3抗体融合タンパク質を生産するための方法に関し、本方法は、

- a) そのようなヌクレオチド配列を含む発現ベクターを含む宿主細胞を培養する工程、および
- b) ヒト化またはキメラCD3抗体融合タンパク質を培養培地から回収しかつ/または精製す

50

る工程  
を含む。

【0336】

組成物

一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれかの局面および態様による抗体または二重特異性抗体を含む組成物を提供する。

【0337】

一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれか一つの局面および態様に定義する抗体または二重特異性抗体と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。

10

【0338】

薬学的組成物は、従来技法、例えば[77]に開示されている技法に従って、薬学的に許容される担体または希釈剤ならびに他の任意の公知の佐剤および賦形剤を使って製剤化することができる。

【0339】

薬学的に許容される担体または希釈剤ならびに他の任意の公知の佐剤および賦形剤は、本発明のヒト化またはキメラ抗体および選ばれた投与様式に適しているべきである。薬学的組成物の担体および他の構成要素の適性は、抗原結合に関して、選ばれた本発明の化合物または薬学的組成物の所望の生物学的性質に対する有意な負の影響の欠如（例えば有意でない影響（10%以下の相対的阻害、5%以下の相対的阻害など））に基づいて決定される。

20

【0340】

本発明の薬学的組成物は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、洗浄剤（例えば非イオン性洗浄剤、例えばTween-20またはTween-80）、安定剤（例えば糖またはタンパク質フリーアミノ酸）、保存剤、組織固定剤、可溶化剤、および/または薬学的組成物に含めるのに適した他の材料も含みうる。

【0341】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に対する毒性を伴うことなく、特定の患者、組成物、および投与様式について所望の治療応答を達成するのに有効な活性分量が得られるように、変化させることができる。選択される投薬量レベルは、種々の薬物動態因子、例えば使用される本発明の特定組成物またはそのアミドの活性、投与経路、投与時間、使用されている特定化合物の排出速度、処置の継続時間、使用される特定組成物と併用される他の薬物、化合物および/または材料、処置される患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康状態、および既往歴、その他、医学分野において周知の因子に依存するであろう。

30

【0342】

薬学的組成物は、任意の適切な経路および様式で投与することができる。インピボおよびインピトロで本発明のヒト化またはキメラ抗体を投与する適切な経路は当技術分野において周知であり、当業者であれば選択することができる。

【0343】

一態様では、本発明の薬学的組成物が非経口投与される。

40

【0344】

本明細書において使用する表現「非経口投与」および「非経口投与される」は、経腸投与および外用投与以外の、通常は注射による投与様式を意味し、これには、表皮、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外および胸骨内注射および注入が含まれる。

【0345】

一態様では、上記薬学的組成物が静脈内または皮下注射または注入によって投与される。好ましい態様では、上記薬学的組成物が皮下投与される。

50

## 【0346】

薬学的に許容される担体には、本発明のヒト化またはキメラ抗体と生理学的に適合する、ありとあらゆる適切な溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張剤、酸化防止剤および吸収遅延剤などが含まれる。

## 【0347】

本発明の薬学的組成物に使用することができる適切な水性および非水性の担体の例として、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、植物油、例えばオリーブ油、トウモロコシ油、ラッカセイ油、綿実油、およびゴマ油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴムおよび注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチル、および/またはさまざまな緩衝液が挙げられる。他の担体は薬学分野では周知である。

10

## 【0348】

薬学的に許容される担体としては、滅菌水性溶液または分散液および滅菌注射可能溶液または分散液をその場で調製するための滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。従来の媒質または薬剤は、それらが活性化合物と不適合でない限り、本発明の薬学的組成物におけるその使用が考えられる。「活性化合物」という場合、それは、本発明のヒト化またはキメラ抗体も指すと考えられる。

## 【0349】

適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散系の場合に必要な粒度を維持することによって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。

20

## 【0350】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば（1）水溶性酸化防止剤、例えばアスコルビン酸、システイン塩酸塩、亜硫酸水素ナトリウム、メタ亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなど、（2）油溶性酸化防止剤、例えばパルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール（BHA）、ブチル化ヒドロキシトルエン（BHT）、レシチン、没食子酸プロピル、アルファ-トコフェロールなど、および（3）金属キレート物質、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ソルビトール、酒石酸、リン酸なども含むうる。

30

## 【0351】

本発明の薬学的組成物は、等張剤、例えば糖類、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、グリセロール、または塩化ナトリウムも、組成物中に含むうる。

## 【0352】

本発明の薬学的組成物は、選んだ投与経路に適した1つまたは複数の佐剤、例えば薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を強化しうる保存剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、保存剤または緩衝剤も含有しうる。本発明のヒト化またはキメラ抗体は、例えばインプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む放出制御製剤など、化合物を迅速な放出から保護する担体を使って調製することができる。そのような担体は、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリル、ジステアリン酸グリセリル、生分解性生体適合性ポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸を単独で、もしくはワックスと共に、または当技術分野において周知の他の材料を含むうる。そのような製剤を調製するための方法は一般に当業者には公知である（例えば[78]参照）。

40

## 【0353】

一態様において、本発明のヒト化またはキメラ抗体は、インピボでの適正な分布が保証されるように製剤化することができる。非経口投与用の薬学的に許容される担体としては、滅菌水性溶液または分散液および滅菌注射可能溶液または分散液をその場で調製するための滅菌粉末が挙げられる。薬学的に活性な物質のためのそのような媒質および薬剤の使

50

用は、当技術分野において公知である。従来は媒質または薬剤は、それらが活性化合物と不適合でない限り、本発明の薬学的組成物におけるその使用が考えられる。他の活性化合物または治療用化合物も組成物に組み込むことができる。

#### 【0354】

注射用の薬学的組成物は、典型的には、滅菌状態にあり、かつ製造条件下および貯蔵条件下で安定でなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に適した他の秩序構造として製剤化することができる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適切な混合物、植物油、例えばオリーブ油、および注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルを含有する、水性または非水性の溶媒または分散媒であることができる。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングの使用によって、分散系の場合は必要な粒度を維持することによって、および界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖類、ポリアルコール、例えばグリセロール、マンニトール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物中に含むことが好ましいであろう。注射可能な組成物の長時間吸収は、吸収を遅延させる作用物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含めることによって、生じさせることができる。滅菌注射可能溶液は、必要量の活性化合物を適当な溶媒に必要に応じて上に列挙したような成分の1つまたは組み合わせと共に組み込み、次に滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基礎分散媒と必要な他の成分、例えば上に列挙したものの成分とを含有する滅菌媒体に、活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液を調製するための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、活性成分と所望する任意の追加成分との粉末を前もって滅菌ろ過したその溶液から与える真空乾燥および冷凍乾燥（凍結乾燥）である。

10

20

#### 【0355】

滅菌注射可能溶液は、必要量の活性成分を必要に応じて上に列挙した成分の1つまたは組み合わせと共に適当な溶媒に組み込み、次に滅菌精密ろ過を行うことによって調製することができる。一般に、分散液は、基礎分散媒と必要な他の成分、例えば上に列挙したものの成分とを含有する滅菌媒体に、活性化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液を調製するための滅菌粉末の場合、調製方法の例は、活性成分と所望する任意の追加成分との粉末を前もって滅菌ろ過したその溶液から与える真空乾燥および冷凍乾燥（凍結乾燥）である。

30

#### 【0356】

##### 治療用途

別の局面において、本発明は、医薬として使用するための、本明細書に記載するいずれかの局面または態様に定義した本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物に関する。

#### 【0357】

別の局面において、本発明は、疾患の処置に使用するための、本明細書に記載するいずれかの局面または態様に定義した本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物に関する。

40

#### 【0358】

本発明の一態様において、二重特異性抗体、組成物、薬学的組成物は、疾患の処置に使用するためのものである。

#### 【0359】

本発明の一態様において、二重特異性抗体、組成物、薬学的組成物は、疾患の処置に使用するためのものであり、当該疾患は、がん、感染性疾患、または自己免疫疾患である。

#### 【0360】

本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物は、細胞傷害性T細胞のエフェクター機序が望ましい任意のがんの処置に使用することができる。例えばヒト化またはキメラ抗体は、がん、炎症性障害または自己免疫障害などの障害を処置または防止するた

50

めに、インビトロまたはエクスピボで培養細胞に投与するか、例えばインピボでヒト対象に投与することができる。本明細書において使用する用語「対象」は、典型的には、ヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物に応答するヒトである。対象としては、例えば、ターゲット機能を調整するか直接的または間接的に細胞の死滅につながることによって矯正または改善させることができる障害を有するヒト患者を挙げることができる。

【0361】

別の局面において、本発明は、T細胞の動員が処置または防止に寄与するがんなどの障害を処置または防止するための方法を提供し、本方法は、治療有効量の本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む。この方法では、典型的には、障害を処置または防止するのに有効な量のヒト化またはキメラ抗体を対象に投与する。

10

【0362】

ある特定の局面では、本発明は、本明細書に記載のいずれかの局面および態様に定義する本発明のヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、がんの処置方法に関する。

【0363】

別の局面において、本発明は、本明細書に記載のいずれかの局面または態様に定義する使用または方法に関し、ヒト化またはキメラ抗体は、CD3と、がん特異的ターゲット、またはがんにおいて過剰発現するかもしくはがんに関連するターゲット、例えばHER2、CD19、EpCAM、EGFR、CD66e（またはCEA、CEACAM5）、CD33、EphA2またはMCSP（またはHMW-MAA）、CD20との両方に特異的に結合する二重特異性抗体であり、疾患が、がん、例えば乳がん、前立腺がん、非小細胞肺癌、膀胱がん、卵巣がん、胃がん、直腸結腸がん、食道がん、および頭頸部の扁平上皮癌、子宮頸がん、膵がん、精巣がん、悪性黒色腫、軟組織がん（例えば滑膜肉腫）、低悪性度型または高悪性度型のB細胞性リンパ腫、慢性リンパ性白血病または急性リンパ性白血病である。

20

【0364】

ヒト化またはキメラ抗体の有効な投薬量および投薬レジメンは、処置される疾患または状態に依存し、当業者であれば決定することができる。

【0365】

当技術分野において通常の知識を有する医師は、必要な薬学的組成物の有効量を容易に決定し処方することができる。例えば医師は、薬学的組成物に入れて使用されるヒト化またはキメラ抗体の用量を、所望の治療効果を達成するのに必要な用量より低いレベルから開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量を漸増させることができる。一般に、本発明の組成物の適切な用量は、特定投薬レジメンで治療効果を生じるのに効果的な最小用量であるヒト化またはキメラ抗体の量である。そのような有効用量は、一般に、上述の因子に依存するであろう。

30

【0366】

例えば、治療的使用に関する「有効量」は、疾患の進行を安定化するその能力によって測定することができる。がんを阻害する化合物の能力は、例えば、ヒト腫瘍における効力を予測する動物モデル系で評価することができる。あるいは、組成物のこの性質は、ヒト化またはキメラ抗体が持つ細胞成長を阻害する能力または細胞傷害性を誘発する能力を、当業者に公知のインビトロアッセイで調べることによって評価することもできる。治療有効量の治療用化合物、すなわち本発明の治療用ヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物は、腫瘍サイズを減少させるか、または他の形で対象における症状を改善することができる。当業者は、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および選択した特定組成物または投与経路などといった因子に基づいて、そのような量を決定することができるであろう。

40

【0367】

本発明のヒト化またはキメラ抗体の治療有効量の例示的な非限定的範囲は、約0.001~30mg/kg、例えば約0.001~20mg/kg、例えば約0.001~10mg/kg、例えば約0.001~5mg/kg、

50

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、約5、約8、約10、約12、約15、約18mg/kgである。

【0368】

投与は、例えば静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下投与、例えばターゲット部位の近傍への投与であることができる。

【0369】

上記の処置方法および使用における投薬レジメンは、最適な所望の応答（例えば治療応答）を与えるように調節される。例えば、単回ボラスを投与するか、時間をかけて数回の分割投与を行うか、治療状況の要求に応じて用量を比例的に低減または増加させることができる。

10

【0370】

一態様では、治療中に、例えば所定の時点において、処置の効力をモニタリングする。

【0371】

所望であれば、薬学的組成物の有効1日用量を、1日のうちに適当な間隔で、任意で単位剤形で、個別に投与される2、3、4、5、6またはそれ以上の部分用量に分けて投与してもよい。別の態様では、望ましくない副作用をいずれも最小限に抑えるために、ヒト化もしくはキメラ抗体または薬学的組成物が、長時間、例えば24時間以上にわたる、緩慢な持続注入によって投与される。

【0372】

本発明のヒト化またはキメラ抗体を単独で投与することは可能であるが、ヒト化またはキメラ抗体は上述のような薬学的組成物として投与することが好ましい。

20

【0373】

本発明のヒト化またはキメラ抗体の有効用量は、週に1回、2週間に1回または3週間に1回の投与期間を使って投与することもできる。投与期間は、例えば8週間、12週間、または臨床的進行が確立するまでに制限することができる。あるいは、本発明のヒト化またはキメラ抗体の有効用量を、2週間ごと、3週間ごと、4週間ごとに投与することもできる。

【0374】

一態様では、ヒト化またはキメラ抗体を、 $\text{mg}/\text{m}^2$ で計算される1週間量で、注入によって投与することができる。そのような投薬量は、例えば、次式に従い、上記の $\text{mg}/\text{kg}$ 投薬量に基づくことができる： $\text{用量}(\text{mg}/\text{kg}) \times 70 : 1.8$ 。そのような投与を例えば1~8回、例えば3~5回、繰り返すことができる。投与は、2~24時間の期間、例えば2~12時間の期間にわたる持続注入によって、行うことができる。一態様では、毒性副作用を低減するために、ヒト化またはキメラ抗体を、長時間、例えば24時間以上にわたる、緩慢な持続注入によって投与することができる。

30

【0375】

一態様では、ヒト化またはキメラ抗体を、週に1回投与した場合に8回まで、例えば4~6回にわたって、固定用量として計算された1週間量で投与することができる。そのようなレジメンは、必要に応じて、例えば6ヶ月後または12ヶ月後に、1回または複数回繰り返すことができる。そのような固定投薬量は、例えば、体重を70kgと見積もった上で、上記の $\text{mg}/\text{kg}$ 投薬量に基づくことができる。投薬量は、投与後に血液中の本発明のヒト化またはキメラ抗体の量を、例えば生物学的試料を採取し、本発明のヒト化またはキメラ抗体の結合領域を標的とする抗イディオタイプ抗体を使用して測定することによって、決定または調節することができる。

40

【0376】

一態様では、維持療法で、例えば6ヶ月以上の期間にわたって週に1回、ヒト化またはキメラ抗体を投与することができる。

【0377】

がんを発症するリスクを低減し、がんの進行におけるある事象の発生の開始を遅延させ、かつ/またはがんが寛解状態にある場合には、再発のリスクを低減するために、ヒト化またはキメラ抗体を予防的に投与することもできる。

50

## 【0378】

非経口組成物は、投与が容易になり、投薬量が均一になるように、投薬単位形に製剤化することができる。本明細書にいう投薬単位形とは、処置される対象への単位投薬量として好適な物理的に分散した単位を指し、各単位は、所望の治療効果を生じるように計算された前もって決定された分量の活性化合物を必要な薬学的担体と共に含有する。本発明の投薬単位形の仕様は、(a) 活性化合物に特有の特徴、および達成しようとする具体的治療効果、および(b) 個体における感受性の処置のためにそのような活性化合物を配合する際の当技術分野において固有の制約によって規定されるか、またはそれらに直接依存する。

## 【0379】

がんを発症するリスクを低減し、がんの進行におけるある事象の発生の開始を遅延させ、かつ/またはがんが寛解状態にある場合には、再発のリスクを低減するために、ヒト化またはキメラ抗体を予防的に投与することもできる。他の生物学的因子によって存在することがわかっている腫瘍の位置を特定することが困難な患者では、これがとりわけ有用になりうる。

## 【0380】

診断用途

本発明のヒト化またはキメラ抗体は、本明細書に記載するヒト化またはキメラ抗体を含む組成物を使って、診断目的にも使用することができる。したがって、本発明は、本明細書に記載のヒト化またはキメラ抗体を使用する診断方法および診断用組成物を提供する。そのような方法および組成物は、例えば疾患を検出または同定することなど、純粋な診断目的に使用することができるし、治療的処置の進展をモニタリングするため、疾患の進行をモニタリングするため、処置後の状態を評価するため、疾患の再発をモニタリングするため、および疾患を発症するリスクを評価するためなどといった目的にも使用することができる。

## 【0381】

一局面において、本発明は、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法に関し、本方法は、本発明のヒト化またはキメラ抗体、本発明の組成物、または本発明の薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、任意で該ヒト化またはキメラ抗体は、検出可能な作用物質で標識されている。

## 【0382】

一局面では、本発明のヒト化またはキメラ抗体が、例えば、前記ヒト化またはキメラ抗体が結合する関心対象の特異的ターゲットを発現する細胞が疾患を示すかまたは病理発生過程に関与する疾患の診断において、患者から採取した試料中のターゲットのレベルまたはその細胞表面に関心対象のターゲットを発現する細胞のレベルを検出することによって、エクスピボで使用される。これは、例えば被験試料を、任意で対照試料と共に、本発明のヒト化またはキメラ抗体と、ターゲットへの抗体の結合が可能な条件下で接触させることによって達成することができる。次に、(例えばELISAを使って)複合体形成を検出することができる。対照試料を試験試料と共に使用する場合は、ヒト化もしくはキメラ抗体または抗体-ターゲット複合体のレベルが両方の試料で解析され、試験試料中の統計的に有意に高いヒト化もしくはキメラ抗体または抗体-ターゲット複合体のレベルは、対照試料と比較して高レベルに存在する試験試料中のターゲットを示す。

## 【0383】

本発明のヒト化またはキメラ抗体を使用することができる従来のイムノアッセイの例として、ELISA、RIA、FACSアッセイ、プラズモン共鳴アッセイ、クロマトグラフィーアッセイ、組織免疫組織化学、ウェスタンブロット、および/または免疫沈降が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

## 【0384】

したがって一態様において、本発明は、CD3発現細胞の関与または蓄積を特徴とする疾患を診断する方法に関し、本方法は、本明細書に記載するいずれかの局面または態様によ

10

20

30

40

50

る抗体、二重特異性抗体、組成物または薬学的組成物を対象に投与する工程を含み、任意で抗体は検出可能なラベルで標識されている。

【0385】

一態様において、本発明は、試料中のターゲットまたはターゲットを発現する細胞の存在を検出するための方法に関し、本方法は、

試料を、試料中のターゲットへのヒト化またはキメラ抗体の結合が可能な条件下で、本発明のヒト化またはキメラ抗体と接触させる工程、および

複合体が形成されたかどうかを解析する工程を含む。試料は、典型的には、生物学的試料である。

【0386】

一態様では、試料が、特異的ターゲットおよび/または前記ターゲットを発現する細胞を含有することがわかっているまたはそれらを含有すると疑われる組織試料である。例えば、ターゲット発現のインサイチュー検出は、患者から組織学標本を取り出し、本発明のヒト化またはキメラ抗体をそのような標本に与えることによって、達成することができる。ヒト化またはキメラ抗体は、標本にヒト化またはキメラ抗体を塗布するか重層することによって与えることができ、次にそれが適切な手段を使って検出される。次に、ターゲットまたはターゲット発現細胞の存在だけでなく、被験組織におけるターゲットまたはターゲット発現細胞の分布も（例えばがん細胞の伝播の評価などに関連して）決定することが可能である。本発明を使用することにより、多種多様な組織学的方法（例えば染色手法）のいずれであっても、そのようなインサイチュー検出を達成するために改変しうることは、当業者には容易に理解されるであろう。

【0387】

上記のアッセイでは、結合した抗体を検出することができるように、ヒト化またはキメラ抗体を検出可能な物質で標識することができる。あるいは、結合した（一次）特異的ヒト化またはキメラ抗体を、検出可能な物質で標識された抗体であって一次特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合するもので検出することもできる。さらにまた、上記のアッセイでは、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物を使用することができる。したがって一局面において、本発明は、本明細書に記載するいずれかの局面または態様による抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物に関する。

【0388】

試料中のターゲットのレベルは、検出可能な物質で標識されたターゲット標準物質と非標識ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体とを利用する競合イムノアッセイによって推定することもできる。このタイプのアッセイでは、生物学的試料、標識ターゲット標準物質およびターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を合わせて、非標識ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合した標識ターゲット標準物質の量を決定する。生物学的試料中のターゲットの量は、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合した標識ターゲット標準物質の量に逆比例する。

【0389】

インビトロ診断技法において使用されるターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体、二次抗体および/またはターゲット標準物質に適したラベルとしては、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、および放射性物質が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。適切な酵素の例としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ、適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロライド、およびフィコエリトリンが挙げられる、発光物質の例としてはルミノールが挙げられ、適切な放射性物質の例としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、および $^3\text{H}$ が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0390】

一局面では、本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体が、腫瘍などのターゲット発現組織のインビボイメージングに使用される。インビボ法の場合、例えば(Fab')<sub>2</sub>、FabおよびFab'フラグメントなどの抗体フラグメントは、迅速な分布動態を持つので、特に有利である。

## 【0391】

インビボイメージングは任意の適切な技法によって行うことができる。例えば、<sup>99</sup>Tc、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>Inまたは他のガンマ線放出同位体で標識されたターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体(例えば抗体またはフラグメント)を使って、腫瘍などのターゲット発現組織におけるターゲット特異的抗体の蓄積または分布を、ガンマシンチレーションカメラ(例えばElsint Apex 409ECTデバイス)で、典型的には低エネルギー高分解能コリメーターまたは低エネルギー万能コリメーターを使って、イメージングすることができる。あるいは、<sup>89</sup>Zr、<sup>76</sup>Br、<sup>18</sup>Fまたは他の陽電子放出放射性核種による標識を使用し、陽電子放射断層撮影法(PET)を使って、腫瘍におけるターゲット特異的ヒト化もしくはキメラ抗体または抗体フラグメントの分布をイメージングすることもできる。このような技法を利用して得られるイメージは、例えばがん/腫瘍細胞の存在に関するバイオマーカーとしてターゲットを使用する場合などに、患者、哺乳動物、または組織におけるターゲットの生体内分布を評価するために使用することができる。この技法の変法としては、ガンマカメラ技法よりイメージングを改良するための磁気共鳴イメージング(MRI)の使用を挙げることができる。従来イムノシンチグラフィ法とその原理は、例えば[79]、[80]、および[81]に記載されている。さらにまた、上記に加えて、または上記に代えて、そのようなイメージは、腫瘍を除去するための外科的技法の基礎としても役立つ。さらにまた、そのようなインビボイメージング技法は、患者が腫瘍を有することは(他のバイオマーカー、転移などの存在などによって)確認されるが、その腫瘍を伝統的な解析技法では同定することができない状況において、腫瘍の同定および位置特定も可能にする。これらの方法はいずれも本発明の特徴である。

10

20

## 【0392】

本発明が提供するインビボイメージングおよび他の診断方法は、ヒト患者(例えば以前にがんが診断されたことがない患者、またはがんからの回復/寛解期にある患者)における微小転移の検出には特に有用である。

30

## 【0393】

一態様において、本発明は、本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体が、検出を助長する放射線不透過性物質にコンジュゲートされ、そのコンジュゲートヒト化またはキメラ抗体が血流への注射などによって宿主に投与され、宿主における標識ヒト化またはキメラ抗体の存在および場所がアッセイされるインビボイメージング法を提供する。この技法および本明細書に記載する他の診断方法によって、本発明は、ヒト患者またはヒト患者から採取した生物学的試料における疾患関連細胞の存在についてスクリーニングし、かつ/またはターゲット特異的ADC療法に先だってターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体の分布を評価するための方法を提供する。

40

## 【0394】

画像診断の場合は、放射性同位体をターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に直接的にまたは中間官能基を使って間接的に結合させることができる。有用な中間官能基として、エチレンジアミン四酢酸およびジエチレントリアミン五酢酸が挙げられる(例えば[82]参照)。

## 【0395】

診断方法は、放射性同位体および放射線不透過性物質の他に、色素(例えばビオチン-ストレプトアビジン複合体を使って)、造影剤、蛍光化合物または分子、および磁気共鳴イメージング(MRI)用の増強剤(例えば常磁性イオン)にコンジュゲートされたターゲット特異的抗体を使って行うこともできる(例えば、MRI技法およびMRI増強剤にコンジュゲートされた抗体の調製について記述している[83]を参照されたい)。そのような診断

50

/検出剤は、MRIで使用される作用物質および蛍光化合物から選択することができる。ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に放射性金属または常磁性イオンを負荷するには、それを、長いテールを有する試薬と反応させ、そのテールに、イオンを結合するための複数のキレート基を取り付ける必要があるかもしれない。そのようなテールは、ポリリジン、多糖などのポリマー、または例えばこの目的に有用であることが公知であるポルフィリン、ポリアミン、クラウンエーテル、ビスチオセミカルバゾン、ポリオキシムなどのキレート基を結合させることができるペンダント基を有する他の誘導体化されたまたは誘導体化可能な鎖であることができる。キレートは、標準的な化学を使って、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体にカップリングすることができる。

【0396】

したがって本発明は、診断用ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体であって、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体が、造影剤（例えば磁気共鳴イメージング用、コンピュータ断層撮影用、または超音波コントラスト増強剤）、または例えばガンマ放出同位体、ベータ放出同位体、アルファ放出同位体、オージェ電子放出同位体、もしくは陽電子放出同位体でありうる放射性核種にコンジュゲートされているものを提供する。

【0397】

一局面において、本発明は、本発明の抗体または二重特異性抗体を含む診断用組成物に関する。

【0398】

さらに別の局面において、本発明は、試料中のターゲット抗原またはターゲット抗原を発現する細胞の存在を検出するためのキットであって、

本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体、およびそのキットの使用説明書を含むキットに関する。

【0399】

したがって一局面において、本発明は、

a) 試料を、抗体または二重特異性抗体とCD3の間の複合体の形成が可能な条件下で、本発明の抗体または二重特異性抗体と接触させる工程、および

b) 複合体が形成されたかどうかを解析する工程

を含む、試料中のCD3抗原またはCD3発現細胞の存在を検出するためのキットを提供する。

【0400】

一態様において、本発明は、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を含む容器、およびターゲットに対するターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体の結合を検出するための1つまたは複数の試薬を含む、がんを診断するためのキットを提供する。試薬としては、例えば蛍光タグ、酵素タグ、または他の検出可能タグを挙げることができる。試薬として、二次もしくは三次抗体または酵素反応のための試薬を挙げることができ、この場合、その酵素反応は可視化することができる生成物を生じる。一態様において、本発明は、適切な容器中の標識型または非標識型の1つまたは複数の本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体、間接的アッセイのためのインキュベーション用試薬、およびラベルの性質に依存して、そのようなアッセイにおける検出のための基質または誘導体化剤を含む診断キットを提供する。対照試薬および使用説明書も含めることができる。

【0401】

組織試料または宿主におけるターゲットの存在を検出するために、標識ターゲット特異的抗体などのターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体と共に使用するための診断キットを供給することもできる。そのような診断キット、ならびに本明細書の他の項に記載する治療的使用のためのキットでは、典型的には、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を、凍結乾燥形態で容器中に、単独で、またはターゲット細胞またはターゲットペプチドに特異的な追加抗体と一緒に、提供することができる。典型的には、薬学的に許容される担体（例えば不活性希釈剤）および/またはその構成要素、例えばトリス、リン酸塩、または炭酸塩緩衝液、安定剤、保存剤、殺生物剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミ

10

20

30

40

50

ンなど（典型的には混合用の別個の容器に入れて）や追加の試薬（やはり典型的には別個の容器に入れて）も含まれる。一定のキットでは、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体に結合する能力を有する二次抗体であって、典型的には別個の容器に入っているものも含まれる。第2抗体は、典型的にはラベルにコンジュゲートされ、本発明のターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体と類似する方法で製剤化される。上記の、そして本明細書の他の項に記載する方法を使用することにより、がん/腫瘍細胞のサブセットを定義づけ、そのような細胞および関連腫瘍組織を特徴づけるために、ターゲット特異的ヒト化またはキメラ抗体を使用することができる。

【0402】

#### 抗イディオタイプ抗体

さらに別の局面において、本発明は、本明細書に記載する発明のヒト化またはキメラ抗体に結合する抗イディオタイプ抗体に関する。一態様において、本発明は、本発明の請求項のうちいずれか一項の抗体または本発明の二重特異性抗体に結合する抗イディオタイプ抗体に関する。

【0403】

抗イディオタイプ（Id）抗体は、一般に抗体の抗原結合部位に関連するユニークな決定基を認識する抗体である。抗Id抗体は、CD3モノクローナル抗体の供給源と同じ種および遺伝子型の動物を、抗Idを調製しようとしているモノクローナル抗体で免疫化することによって調製することができる。免疫化した動物は、典型的には、これらのイディオタイプ決定基に应答する抗体（抗Id抗体）を生産することによって、免疫化抗体のイディオタイプ決定基を認識し、それに应答することができる。そのような抗体は、例えばUS4,699,880に記載されている。そのような抗体は本発明のさらなる特徴である。

【0404】

抗Id抗体は、さらに別の動物における免疫応答を誘発していわゆる抗抗Id抗体を生産するための「免疫原」としても使用することができる。抗抗Id抗体は、エピトープ的には、抗Id抗体を誘導した元のモノクローナル抗体と同一でありうる。したがって、モノクローナル抗体のイディオタイプ決定基に対する抗体を使用することにより、同一の特異性を持つ抗体を発現する他のクローンを同定することが可能である。抗Id抗体を、任意の適切な技法によって、例えば本発明のCD3特異的抗体に関して本明細書の他の項で述べるような技法によって、変化させ（それによって抗Id抗体変異体を生産し）、かつ/または誘導体化することができる。例えばモノクローナル抗Id抗体を、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）などの担体にカップリングし、それを使ってBALB/cマウスを免疫化することができる。これらのマウスからの血清は、典型的には、元の/親CD3抗体と同一ではないとしても類似する結合特性を有する抗抗Id抗体を含有するであろう。

【0405】

配列

（表1）

10

20

30

SEQ ID NO:	クローン名	配列
SEQ ID NO:1	VH-huCD3-H1 CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	VH-huCD3-H1 CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	VH-huCD3-H1 CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:4	VH-huCD3-H1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:5	VH-huCD3-H1	GAAGTGAAGCTGGTGGAACTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTG GCGGATCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCA ACACCTACGCCATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCTGGCAAAGGC CTGGAATGGGTGGCCCGGATCAGAAGCAAGTACAACAATTACGC CACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACCGGTTACCATCAGCC GGGACGACAGCAAGAGCAGCCTGTACCTGCAGATGAACAACCTG AAAACCGAGGACACCGCCATGTACTACTGCGTGCGGCACGGCAA CTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGG CACCTCGTGACAGTGTCTAGC
SEQ ID NO:6	VL-huCD3-L1 CDR1	TGAVTTSNY
	VL-huCD3-L1 CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	VL-huCD3-L1 CDR3	ALWYSNLWV

SEQ ID NO:8	VL-huCD3-L1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:9	VL-huCD3-L1	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCTTTCCGTGTCTCCTGGC GGCACCGTGACCCTGACCTGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACC ACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGCAGACACCCGCCAGGC CTTTAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGGCACCTGGCG TGCCAGCCAGATTGACGCGCAGCCTGATCGGAGATAAGGCCGCC CTGACAATCACTGGCGCCCAGGCTGACGACGAGAGCATCTACTTT TGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTGCGCGGAGGCAC CAAGCTGACAGTGCTG	10
SEQ ID NO:6	VL-huCD3-L1-T41K CDR1	TGAVTTSNY	
	VL-huCD3-L1-T41K CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	VL-huCD3-L1-T41K CDR3	ALWYSNLWV	
SEQ ID NO:10	VL-huCD3-L1-T41K	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:11	VL-huCD3-L1-T41K	CAGGCCGTCGTGACCCAGGAACCCAGCTTTCCGTGTCTCCTGGC GGCACCGTGACCCTGACCTGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACC ACCAGCAACTACGCCAACTGGGTGCAGCAGAAGCCCGGCCAGGC CTTTAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAGAGGGGCACCTGGCG TGCCAGCCAGATTGACGCGCAGCCTGATCGGAGATAAGGCCGCC CTGACAATCACTGGCGCCCAGGCTGACGACGAGAGCATCTACTTT TGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTGTTGCGCGGAGGCAC CAAGCTGACCGTCCTA	20
SEQ ID NO:12	HC_N30A CDR1	GFTFATYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30A CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30A CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:13	HC_N30A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFATYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:14	HC_N30C CDR1	GFTFCTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30C CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30C CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:15	HC_N30C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFCTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:16	HC_N30D CDR1	GFTFDTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30D CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30D CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:17	HC_N30D	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:18	HC_N30F CDR1	GFTFFT YA	
SEQ ID NO:2	HC_N30F CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30F CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:19	HC_N30F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFFTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:20	HC_N30G CDR1	GFTFGTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30G CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30G CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:21	HC_N30G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:22	HC_N30H CDR1	GFTFHTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_N30H CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30H CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:23	HC_N30H	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFHTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:24	HC_N30K CDR1	GFTFKTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30K CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30K CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:25	HC_N30K	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:26	HC_N30L CDR1	GFTFLTIA	
SEQ ID NO:2	HC_N30L CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30L CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:27	HC_N30L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFLTYAMNWRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:28	HC_N30P CDR1	GFTFPTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30P CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30P CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:29	HC_N30P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFPTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:30	HC_N30Q CDR1	GFTFQTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30Q CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30Q CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:31	HC_N30Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFQTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:32	HC_N30R CDR1	GFTFRTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30R CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30R CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:33	HC_N30R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFRTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:34	HC_N30T CDR1	GFTFTTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30T CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30T CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:35	HC_N30T	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:36	HC_N30V CDR1	GFTFVTYA	
SEQ ID NO:2	HC_N30V CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30V CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:37	HC_N30V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFVTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:38	HC_N30W CDR1	GFTFWTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_N30W CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N30W CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:39	HC_N30W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFWTYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:40	HC_T31A CDR1	GFTFNAYA	
SEQ ID NO:2	HC_T31A CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_T31A CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:41	HC_T31A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNAYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:42	HC_T31C CDR1	GFTFNCYA	
SEQ ID NO:2	HC_T31C CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_T31C CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:43	HC_T31C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNCYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:44	HC_T31D CDR1	GFTFNDYA	
SEQ ID NO:2	HC_T31D CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_T31D CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:45	HC_T31D	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:46	HC_T31E CDR1	GFTFNEYA	
SEQ ID NO:2	HC_T31E CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_T31E CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:47	HC_T31E	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNEYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:48	HC_T31F CDR1	GFTFNFYA	
SEQ ID NO:2	HC_T31F CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_T31F CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:49	HC_T31F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNFYAMNWRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:50	HC_T31H CDR1	GFTFNHYA	
SEQ ID NO:2	HC_T31H CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_T31H CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:51	HC_T31H	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNHYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:52	HC_T31L CDR1	GFTFNLYA
SEQ ID NO:2	HC_T31L CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_T31L CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:53	HC_T31L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNLYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:54	HC_T31M CDR1	GFTFNMYA
SEQ ID NO:2	HC_T31M CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_T31M CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:55	HC_T31M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYAMNWVRQAPGKGL LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:56	HC_T31N CDR1	GFTFNMYA
SEQ ID NO:2	HC_T31N CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_T31N CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:57	HC_T31N	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:58	HC_T31P CDR1	GFTFNPYA
SEQ ID NO:2	HC_T31P CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_T31P CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:59	HC_T31P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNPYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:60	HC_T31Q CDR1	GFTFNQYA
SEQ ID NO:2	HC_T31Q CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_T31Q CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:61	HC_T31Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNQYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:62	HC_T31W CDR1	GFTFNWYA
SEQ ID NO:2	HC_T31W CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_T31W CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:63	HC_T31W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNWYAMNWVRQAPGKGL LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:64	HC_T31Y CDR1	GFTFNYYA
SEQ ID NO:2	HC_T31Y CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_T31Y CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:65	HC_T31Y	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:66	HC_Y32A CDR1	GFTFN TAA
SEQ ID NO:2	HC_Y32A CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32A CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY

10

20

30

40

SEQ ID NO:67	HC_Y32A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTAAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:68	HC_Y32C CDR1	GFTFNTCA
SEQ ID NO:2	HC_Y32C CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32C CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:69	HC_Y32C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTCAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:70	HC_Y32F CDR1	GFTFNTFA
SEQ ID NO:2	HC_Y32F CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32F CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:71	HC_Y32F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTFAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:72	HC_Y32G CDR1	GFTFNTGA
SEQ ID NO:2	HC_Y32G CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32G CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:73	HC_Y32G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTGAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:74	HC_Y32H CDR1	GFTFNTHA
SEQ ID NO:2	HC_Y32H CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32H CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:75	HC_Y32H	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTHAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:76	HC_Y32I CDR1	GFTFNTIA
SEQ ID NO:2	HC_Y32I CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32I CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:77	HC_Y32I	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTIAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:78	HC_Y32K CDR1	GFTFNTKA
SEQ ID NO:2	HC_Y32K CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32K CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:79	HC_Y32K	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTKAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:80	HC_Y32L CDR1	GFTFNTLA
SEQ ID NO:2	HC_Y32L CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32L CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:81	HC_Y32L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTLAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:82	HC_Y32M CDR1	GFTFNTMA
SEQ ID NO:2	HC_Y32M CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32M CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY

10

20

30

40

SEQ ID NO:83	HC_Y32M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTMAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:84	HC_Y32N CDR1	GFTFNTNA
SEQ ID NO:2	HC_Y32N CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32N CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:85	HC_Y32N	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTNAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:86	HC_Y32P CDR1	GFTFNTPA
SEQ ID NO:2	HC_Y32P CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32P CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:87	HC_Y32P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTPAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:88	HC_Y32Q CDR1	GFTFNTQA
SEQ ID NO:2	HC_Y32Q CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32Q CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:89	HC_Y32Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTQAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:90	HC_Y32R CDR1	GFTFNTRA
SEQ ID NO:2	HC_Y32R CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32R CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:91	HC_Y32R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTRAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:92	HC_Y32S CDR1	GFTFN TSA
SEQ ID NO:2	HC_Y32S CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32S CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:93	HC_Y32S	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TSAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:94	HC_Y32T CDR1	GFTFN TTA
SEQ ID NO:2	HC_Y32T CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32T CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:95	HC_Y32T	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TTAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:96	HC_Y32V CDR1	GFTFN TVA
SEQ ID NO:2	HC_Y32V CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32V CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:97	HC_Y32V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TVAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:98	HC_Y32W CDR1	GFTFN TWA
SEQ ID NO:2	HC_Y32W CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	HC_Y32W CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY

10

20

30

40

SEQ ID NO:99	HC_Y32W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTWAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57A CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:100	HC_N57A CDR2	IRSKYNAYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57A CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:101	HC_N57A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNAYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57C CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:102	HC_N57C CDR2	IRSKYNCYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57C CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:103	HC_N57C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNCYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57D CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:104	HC_N57D CDR2	IRSKYNDYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57D CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:105	HC_N57D	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNDYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57E CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:106	HC_N57E CDR2	IRSKYNEYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57E CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:107	HC_N57E	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNEYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57F CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:108	HC_N57F CDR2	IRSKYNFYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57F CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:109	HC_N57F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNFYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57G CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:110	HC_N57G CDR2	IRSKYNGYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57G CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:111	HC_N57G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNGYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57I CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:112	HC_N57I CDR2	IRSKYNIYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57I CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:113	HC_N57I	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNIYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDT AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57K CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:114	HC_N57K CDR2	IRSKYNKYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57K CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY

10

20

30

40

SEQ ID NO:115	HC_N57K	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNKYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57L CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:116	HC_N57L CDR2	IRSKYNLYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57L CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:117	HC_N57L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNLYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57M CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:118	HC_N57M CDR2	IRSKYNMYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57M CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:119	HC_N57M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNMYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57P CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:120	HC_N57P CDR2	IRSKYNPYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57P CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:121	HC_N57P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNPYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57Q CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:122	HC_N57Q CDR2	IRSKYNQYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57Q CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:123	HC_N57Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNQYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57R CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:124	HC_N57R CDR2	IRSKYNRYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57R CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:125	HC_N57R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNRYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57T CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:126	HC_N57T CDR2	IRSKYNTYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57T CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:127	HC_N57T	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNRYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57V CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:128	HC_N57V CDR2	IRSKYNVYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57V CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:129	HC_N57V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNVYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_N57W CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:130	HC_N57W CDR2	IRSKYNWYAT
SEQ ID NO:3	HC_N57W CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY

10

20

30

40

SEQ ID NO:131	HC_N57W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNWYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_N57Y CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:132	HC_N57Y CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:3	HC_N57Y CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:133	HC_N57Y	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59C CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:134	HC_A59C CDR2	IRSKYNNYCT	
SEQ ID NO:3	HC_A59C CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:135	HC_A59C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYCTYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59D CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:136	HC_A59D CDR2	IRSKYNNYDT	
SEQ ID NO:3	HC_A59D CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:137	HC_A59D	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYDYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_A59E CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:138	HC_A59E CDR2	IRSKYNNYET	
SEQ ID NO:3	HC_A59E CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:139	HC_A59E	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYETYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59F CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:140	HC_A59F CDR2	IRSKYNNYFT	
SEQ ID NO:3	HC_A59F CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:141	HC_A59F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYFTYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_A59G CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:142	HC_A59G CDR2	IRSKYNNYGT	
SEQ ID NO:3	HC_A59G CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:143	HC_A59G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYGTYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59H CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:144	HC_A59H CDR2	IRSKYNNYHT	40
SEQ ID NO:3	HC_A59H CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:145	HC_A59H	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYHTYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59I CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:146	HC_A59I CDR2	IRSKYNNYIT	
SEQ ID NO:3	HC_A59I CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:147	HC_A59I	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYITYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED AMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59K CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:148	HC_A59K CDR2	IRSKYNNYKT	
SEQ ID NO:3	HC_A59K CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:149	HC_A59K	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYKTYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59L CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:150	HC_A59L CDR2	IRSKYNNYLT	
SEQ ID NO:3	HC_A59L CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:151	HC_A59L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNLYTYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59M CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:152	HC_A59M CDR2	IRSKYNNYMT	
SEQ ID NO:3	HC_A59M CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:153	HC_A59M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNMYTYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_A59N CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:154	HC_A59N CDR2	IRSKYNNYNT	
SEQ ID NO:3	HC_A59N CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:155	HC_A59N	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYNTYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59P CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:156	HC_A59P CDR2	IRSKYNNYPT	
SEQ ID NO:3	HC_A59P CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:157	HC_A59P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYPTYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_A59Q CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:158	HC_A59Q CDR2	IRSKYNNYQT	
SEQ ID NO:3	HC_A59Q CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:159	HC_A59Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYQTYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59R CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:160	HC_A59R CDR2	IRSKYNNYRT	
SEQ ID NO:3	HC_A59R CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:161	HC_A59R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNRYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59S CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:162	HC_A59S CDR2	IRSKYNNYST	
SEQ ID NO:3	HC_A59S CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:163	HC_A59S	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYSTYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59V CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:164	HC_A59V CDR2	IRSKYNNYVT	
SEQ ID NO:3	HC_A59V CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:165	HC_A59V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYVTTYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59W CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:166	HC_A59W CDR2	IRSKYNNYWT	
SEQ ID NO:3	HC_A59W CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:167	HC_A59W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYWTYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTE DTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_A59Y CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:168	HC_A59Y CDR2	IRSKYNNYYT	
SEQ ID NO:3	HC_A59Y CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:169	HC_A59Y	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYTYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_H101A CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_H101A CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:170	HC_H101A CDR3	VRAGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:171	HC_H101A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRAGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_H101C CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_H101C CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:172	HC_H101C CDR3	VRCGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:173	HC_H101C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRCGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_H101F CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_H101F CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:174	HC_H101F CDR3	VRFNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:175	HC_H101F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRFGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_H101G CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_H101G CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:176	HC_H101G CDR3	VRGGNFGNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:177	HC_H101G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRGGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_H101I CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_H101I CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:178	HC_H101I CDR3	VRIGNFGNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:179	HC_H101I	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRIGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101K CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101K CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:180	HC_H101K CDR3	VRKGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:181	HC_H101K	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRKGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101L CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101L CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:182	HC_H101L CDR3	VRLGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:183	HC_H101L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRKGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101N CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101N CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:184	HC_H101N CDR3	VRNGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:185	HC_H101N	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRNGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101P CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101P CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:186	HC_H101P CDR3	VRPGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:187	HC_H101P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRPGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101Q CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101Q CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:188	HC_H101Q CDR3	VRQGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:189	HC_H101Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRQGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101R CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101R CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:190	HC_H101R CDR3	VRRGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:191	HC_H101R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRNGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101S CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101S CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:192	HC_H101S CDR3	VRSGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:193	HC_H101S	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRSGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_H101T CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_H101T CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:194	HC_H101T CDR3	VRTGNFGNSYVSWFAY

10

20

30

40

SEQ ID NO:195	HC_H101T	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRTGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_H101V CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_H101V CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:196	HC_H101V CDR3	VRVGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:197	HC_H101V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRVGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_H101W CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_H101W CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:198	HC_H101W CDR3	VRWGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:199	HC_H101W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRWGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_H101Y CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_H101Y CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:200	HC_H101Y CDR3	VRYGNFGNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:201	HC_H101Y	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRVGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_G105A CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105A CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:202	HC_G105A CDR3	VRHGNFANSYVSWFAY	
SEQ ID NO:203	HC_G105A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFANSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105C CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105C CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:204	HC_G105C CDR3	VRHGNFCNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:205	HC_G105C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFCNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_G105E CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105E CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:206	HC_G105E CDR3	VRHGNFENSYVSWFAY	
SEQ ID NO:207	HC_G105E	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFENSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105F CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105F CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:208	HC_G105F CDR3	VRHGNFFNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:209	HC_G105F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFFNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105H CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105H CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:210	HC_G105H CDR3	VRHGNFHNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:211	HC_G105H	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFHNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105I CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105I CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:212	HC_G105I CDR3	VRHGNFINSYVSWFAY	
SEQ ID NO:213	HC_G105I	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFINSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105L CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_G105L CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:214	HC_G105L CDR3	VRHGNFLNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:215	HC_G105L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFLNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105M CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105M CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:216	HC_G105M CDR3	VRHGNFMNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:217	HC_G105M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFMNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_G105N CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105N CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:218	HC_G105N CDR3	VRHGNFNNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:219	HC_G105N	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFNNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105P CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105P CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:220	HC_G105P CDR3	VRHGNFPNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:221	HC_G105P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFPNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_G105Q CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105Q CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:222	HC_G105Q CDR3	VRHGNFQNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:223	HC_G105Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFQNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105R CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105R CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:224	HC_G105R CDR3	VRHGNFRNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:225	HC_G105R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFRNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105S CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105S CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:226	HC_G105S CDR3	VRHGNFSNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:227	HC_G105S	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105T CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105T CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:228	HC_G105T CDR3	VRHGNFTNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:229	HC_G105T	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFTNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105V CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_G105V CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:230	HC_G105V CDR3	VRHGNTNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:231	HC_G105V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFVNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_G105W CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105W CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:232	HC_G105W CDR3	VRHGNTNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:233	HC_G105W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFVNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_G105Y CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_G105Y CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:234	HC_G105Y CDR3	VRHGNTNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:235	HC_G105Y	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110A CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110A CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:236	HC_S110A CDR3	VRHGNTNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:237	HC_S110A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_S110C CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110C CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:238	HC_S110C CDR3	VRHGNTNSYVSWFAY	
SEQ ID NO:239	HC_S110C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110E CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110E CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:240	HC_S110E CDR3	VRHGNTNSYVSWFAY	40
SEQ ID NO:241	HC_S110E	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110F CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110F CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:242	HC_S110F CDR3	VRHGNTNSYVSWFAY	

SEQ ID NO:243	HC_S110F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVFWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110G CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110G CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:244	HC_S110G CDR3	VRHGNFGNSYVGVWFAY	
SEQ ID NO:245	HC_S110G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVGVWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110H CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_S110H CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:246	HC_S110H CDR3	VRHGNFGNSYVHWFAY	
SEQ ID NO:247	HC_S110H	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVHWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110K CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110K CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:248	HC_S110K CDR3	VRHGNFGNSYVKWFAY	
SEQ ID NO:249	HC_S110K	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVKWFAYWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_S110L CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110L CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:250	HC_S110L CDR3	VRHGNFGNSYVLWFAY	
SEQ ID NO:251	HC_S110L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVLWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110N CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110N CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:252	HC_S110N CDR3	VRHGNFGNSYVNWFAFAY	
SEQ ID NO:253	HC_S110N	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVNWFAFAYWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_S110P CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110P CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:254	HC_S110P CDR3	VRHGNFGNSYVPWFAY	
SEQ ID NO:255	HC_S110P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVPWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110Q CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110Q CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:256	HC_S110Q CDR3	VRHGNFGNSYVQWFAY	40
SEQ ID NO:257	HC_S110Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVQWFAYWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_S110R CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_S110R CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:258	HC_S110R CDR3	VRHGNFGNSYVRWFAY	

SEQ ID NO:259	HC_S110R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVRFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_S110T CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_S110T CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:260	HC_S110T CDR3	VRHGNFGNSYVTFAY
SEQ ID NO:261	HC_S110T	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVTFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_S110W CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_S110W CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:262	HC_S110W CDR3	VRHGNFGNSYVWVFAY
SEQ ID NO:263	HC_S110W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVWVFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_S110Y CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_S110Y CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:264	HC_S110Y CDR3	VRHGNFGNSYVYVFAY
SEQ ID NO:265	HC_S110Y	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVYVFAYWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_Y114A CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_Y114A CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:266	HC_Y114A CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAA
SEQ ID NO:267	HC_Y114A	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAAWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_Y114C CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_Y114C CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:268	HC_Y114C CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAC
SEQ ID NO:269	HC_Y114C	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFACWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_Y114E CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_Y114E CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:270	HC_Y114E CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAE
SEQ ID NO:271	HC_Y114E	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAEWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_Y114F CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_Y114F CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:272	HC_Y114F CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAF
SEQ ID NO:273	HC_Y114F	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAFWGQGLTVTVSS
SEQ ID NO:1	HC_Y114G CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	HC_Y114G CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:274	HC_Y114G CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAG

10

20

30

40

SEQ ID NO:275	HC_Y114G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAGWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114H CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114H CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:276	HC_Y114H CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAH	
SEQ ID NO:277	HC_Y114H	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAHWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114I CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_Y114I CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:278	HC_Y114I CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAI	
SEQ ID NO:279	HC_Y114I	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAIHWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114K CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114K CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:280	HC_Y114K CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAK	
SEQ ID NO:281	HC_Y114K	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAKWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_Y114L CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114L CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:282	HC_Y114L CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAL	
SEQ ID NO:283	HC_Y114L	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFALWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114M CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114M CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:284	HC_Y114M CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAM	
SEQ ID NO:285	HC_Y114M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAMWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:1	HC_Y114N CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114N CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:286	HC_Y114N CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAN	
SEQ ID NO:287	HC_Y114N	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFANWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114P CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114P CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:288	HC_Y114P CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAP	40
SEQ ID NO:289	HC_Y114P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAPWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114Q CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114Q CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:290	HC_Y114Q CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAQ	

SEQ ID NO:291	HC_Y114Q	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAQWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114R CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114R CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:292	HC_Y114R CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAR	
SEQ ID NO:293	HC_Y114R	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFARWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114S CDR1	GFTFNTYA	10
SEQ ID NO:2	HC_Y114S CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:294	HC_Y114S CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAS	
SEQ ID NO:295	HC_Y114S	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFASWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114T CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114T CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:296	HC_Y114T CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAT	
SEQ ID NO:297	HC_Y114T	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFATWGQGLTVTVSS	20
SEQ ID NO:1	HC_Y114V CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114V CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:298	HC_Y114V CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAV	
SEQ ID NO:299	HC_Y114V	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAVWGQGLTVTVSS	
SEQ ID NO:1	HC_Y114W CDR1	GFTFNTYA	
SEQ ID NO:2	HC_Y114W CDR2	IRSKYNNYAT	
SEQ ID NO:300	HC_Y114W CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAW	
SEQ ID NO:301	HC_Y114W	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGL EWWARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTED TAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAWWGQGLTVTVSS	30
SEQ ID NO:302	LC_T31A CDR1	TGAVTASNY	
	LC_T31A CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	LC_T31A CDR3	ALWYSNLWV	
SEQ ID NO:303	LC_T31A	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTASNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YNSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:304	LC_T31D CDR1	TGAVTDSNY	
	LC_T31D CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	LC_T31D CDR3	ALWYSNLWV	40
SEQ ID NO:305	LC_T31D	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTDSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YNSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:306	LC_T31E CDR1	TGAVTESNY	
	LC_T31E CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	LC_T31E CDR3	ALWYSNLWV	

SEQ ID NO:307	LC_T31E	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTESNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:308	LC_T31F CDR1	TGAVTFSNY
	LC_T31F CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	LC_T31F CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:309	LC_T31F	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTFSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:310	LC_T31G CDR1	TGAVTGSNY
	LC_T31G CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	LC_T31G CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:311	LC_T31G	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTGSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:312	LC_T31H CDR1	TGAVTHSNY
	LC_T31H CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	LC_T31H CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:313	LC_T31H	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTHSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
	LC_T31I CDR2	GTN
SEQ ID NO:314	LC_T31K CDR1	TGAVTKSNY
	LC_T31K CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	LC_T31K CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:315	LC_T31K	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTKSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:316	LC_T31L CDR1	TGAVTLSNY
	LC_T31L CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	LC_T31L CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:317	LC_T31L	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTLSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:318	LC_T31M CDR1	TGAVTMSNY
	LC_T31M CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	LC_T31M CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:319	LC_T31M	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTMSNYANWVQQKPGQ AFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAL WYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:320	LC_T31N CDR1	TGAVTNSNY
	LC_T31N CDR2	GTN
SEQ ID NO:7	LC_T31N CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:321	LC_T31N	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTNSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:322	LC_T31P CDR1	TGAVTPSNY
	LC_T31P CDR2	GTN

10

20

30

40

SEQ ID NO:7	LC_T31P CDR3	ALWYSNLWV	
SEQ ID NO:323	LC_T31P	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTPSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:324	LC_T31Q CDR1	TGAVTQSNY	
	LC_T31Q CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	LC_T31Q CDR3	ALWYSNLWV	
SEQ ID NO:325	LC_T31Q	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTQSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL	10
SEQ ID NO:326	LC_T31R CDR1	TGAVTRSNY	
	LC_T31R CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	LC_T31R CDR3	ALWYSNLWV	
SEQ ID NO:327	LC_T31R	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTRSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL	
	LC_T31S CDR2	GTN	
SEQ ID NO:328	LC_T31V CDR1	TGAVTVSNY	
	LC_T31V CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	LC_T31V CDR3	ALWYSNLWV	
SEQ ID NO:329	LC_T31V	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTVSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL	20
SEQ ID NO:330	LC_T31Y CDR1	TGAVTYSNY	
	LC_T31Y CDR2	GTN	
SEQ ID NO:7	LC_T31Y CDR3	ALWYSNLWV	
SEQ ID NO:331	LC_T31Y	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTYSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92A CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92A CDR2	GTN	
SEQ ID NO:332	LC_L92A CDR3	AAWYSNLWV	30
SEQ ID NO:333	LC_L92A	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAA WYSNLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92C CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92C CDR2	GTN	
SEQ ID NO:334	LC_L92C CDR3	ACWYSNLWV	
SEQ ID NO:335	LC_L92C	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAC WYSNLWVFGGGTKLTVL	40
SEQ ID NO:6	LC_L92D CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92D CDR2	GTN	
SEQ ID NO:336	LC_L92D CDR3	ADWYSNLWV	
SEQ ID NO:337	LC_L92D	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAD WYSNLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92E CDR1	TGAVTTSNY	

	LC_L92E CDR2	GTN	
SEQ ID NO:338	LC_L92E CDR3	AEWYSLWV	
SEQ ID NO:339	LC_L92E	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAEW YSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92F CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92F CDR2	GTN	
SEQ ID NO:340	LC_L92F CDR3	AFWYSLWV	
SEQ ID NO:341	LC_L92F	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAFW YSLWVFGGGTKLTVL	10
SEQ ID NO:6	LC_L92G CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92G CDR2	GTN	
SEQ ID NO:342	LC_L92G CDR3	AGWYSLWV	
SEQ ID NO:343	LC_L92G	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAG WYSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92I CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92I CDR2	GTN	
SEQ ID NO:344	LC_L92I CDR3	AIWYSLWV	
SEQ ID NO:345	LC_L92I	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAIW YSLWVFGGGTKLTVL	20
SEQ ID NO:6	LC_L92K CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92K CDR2	GTN	
SEQ ID NO:346	LC_L92K CDR3	AKWYSLWV	
SEQ ID NO:347	LC_L92K	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAK WYSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92M CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92M CDR2	GTN	
SEQ ID NO:348	LC_L92M CDR3	AMWYSLWV	30
SEQ ID NO:349	LC_L92M	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAM WYSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92N CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92N CDR2	GTN	
SEQ ID NO:350	LC_L92N CDR3	ANWYSLWV	
SEQ ID NO:351	LC_L92N	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAN WYSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92P CDR1	TGAVTTSNY	40
	LC_L92P CDR2	GTN	
SEQ ID NO:352	LC_L92P CDR3	APWYSLWV	
SEQ ID NO:353	LC_L92P	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAP WYSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92R CDR1	TGAVTTSNY	

	LC_L92R CDR2	GTN	
SEQ ID NO:354	LC_L92R CDR3	ARWYSLWV	
SEQ ID NO:355	LC_L92R	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAR WYSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92S CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92S CDR2	GTN	
SEQ ID NO:356	LC_L92S CDR3	ASWYSLWV	
SEQ ID NO:357	LC_L92S	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCASW YSLWVFGGGTKLTVL	10
SEQ ID NO:6	LC_L92T CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92T CDR2	GTN	
SEQ ID NO:358	LC_L92T CDR3	ATWYSLWV	
SEQ ID NO:359	LC_L92T	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCATW YSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92V CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92V CDR2	GTN	
SEQ ID NO:360	LC_L92V CDR3	AVWYSLWV	
SEQ ID NO:361	LC_L92V	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAV WYSLWVFGGGTKLTVL	20
SEQ ID NO:6	LC_L92W CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92W CDR2	GTN	
SEQ ID NO:362	LC_L92W CDR3	AWWYSLWV	
SEQ ID NO:363	LC_L92W	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAW WYSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L92Y CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L92Y CDR2	GTN	
SEQ ID NO:364	LC_L92Y CDR3	AYWYSLWV	30
SEQ ID NO:365	LC_L92Y	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCAYW YSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97D CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97D CDR2	GTN	
SEQ ID NO:366	LC_L97D CDR3	ALWYSLWV	
SEQ ID NO:367	LC_L97D	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97E CDR1	TGAVTTSNY	40
	LC_L97E CDR2	GTN	
SEQ ID NO:368	LC_L97E CDR3	ALWYSLWV	
SEQ ID NO:369	LC_L97E	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97F CDR1	TGAVTTSNY	

	LC_L97F CDR2	GTN	
SEQ ID NO:370	LC_L97F CDR3	ALWYSNFWV	
SEQ ID NO:371	LC_L97F	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNFWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97G CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97G CDR2	GTN	
SEQ ID NO:372	LC_L97G CDR3	ALWYSNGWV	
SEQ ID NO:373	LC_L97G	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNGWVFGGGTKLTVL	10
SEQ ID NO:6	LC_L97H CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97H CDR2	GTN	
SEQ ID NO:374	LC_L97H CDR3	ALWYSNHWW	
SEQ ID NO:375	LC_L97H	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNHWWFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97K CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97K CDR2	GTN	
SEQ ID NO:376	LC_L97K CDR3	ALWYSNKWV	
SEQ ID NO:377	LC_L97K	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNKWVFGGGTKLTVL	20
SEQ ID NO:6	LC_L97M CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97M CDR2	GTN	
SEQ ID NO:378	LC_L97M CDR3	ALWYSNMWV	
SEQ ID NO:379	LC_L97M	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNMWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97N CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97N CDR2	GTN	
SEQ ID NO:380	LC_L97N CDR3	ALWYSNNWV	
SEQ ID NO:381	LC_L97N	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNNWVFGGGTKLTVL	30
SEQ ID NO:6	LC_L97P CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97P CDR2	GTN	
SEQ ID NO:382	LC_L97P CDR3	ALWYSNPWV	
SEQ ID NO:383	LC_L97P	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNPWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97Q CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97Q CDR2	GTN	
SEQ ID NO:384	LC_L97Q CDR3	ALWYSNQWV	
SEQ ID NO:385	LC_L97Q	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNQWVFGGGTKLTVL	40
	LC_L97R CDR2	GTN	

SEQ ID NO:6	LC_L97S CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97S CDR2	GTN	
SEQ ID NO:386	LC_L97S CDR3	ALWYSNSWV	
SEQ ID NO:387	LC_L97S	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNSWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97T CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97T CDR2	GTN	
SEQ ID NO:388	LC_L97T CDR3	ALWYSNTWV	
SEQ ID NO:389	LC_L97T	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNTWVFGGGTKLTVL	10
SEQ ID NO:6	LC_L97V CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97V CDR2	GTN	
SEQ ID NO:390	LC_L97V CDR3	ALWYSNVWV	
SEQ ID NO:391	LC_L97V	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNVWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97W CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97W CDR2	GTN	
SEQ ID NO:392	LC_L97W CDR3	ALWYSNWWV	20
SEQ ID NO:393	LC_L97W	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNWWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:6	LC_L97Y CDR1	TGAVTTSNY	
	LC_L97Y CDR2	GTN	
SEQ ID NO:394	LC_L97Y CDR3	ALWYSNYWV	
SEQ ID NO:395	LC_L97Y	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQA FRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALW YSNYWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:396	成熟 huTRA	KTTQPNSMESNEEPPVHLPNCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIH GLTSNVNRMASLAIAEDRKSSTLILHRATLRDAVYYCILPLAGGTS YGKLTFGQGTTILVHPNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQ TNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA FNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTRLRLWSS	30
SEQ ID NO:397	成熟 huTRB	GVSQSPRYKVAKRQDVALRCDPISGHVSLFWYQQALGGQPEFLTY FQNEAQLDKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQRTOQEDSAVYLCASSL GQAYEQYFGPGTRLTVTEDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLS SRLRVSATFWQNPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVS AEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLM AMVKRKDF	40
SEQ ID NO:398	成熟 huCD3δ	FKIPIEELEDRVFNCSITWVEGTVGTLSDITRLDLGKRILDPRGIY RCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLLA LGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLG GNWARNK	
SEQ ID NO:399	成熟 huCD3ε	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGG DEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRGSKPEDANFYLYLRA	

		RVCENCMEMDMVMSVATIVIVDICITGGLLLLVIYWSKNRKAKAKPVT RGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDIPIRKQQRDLYSGLNQRRRI	
SEQ ID NO:400	成熟 huCD3 $\gamma$	QSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGMIGFLTED KKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYRMCQNCIELNA ATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASDKQTLPLNDQLY QPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN	
SEQ ID NO:401	成熟 huCD3 $\zeta$	QSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQ LYNELNLGRREEYDVLDRRGRDPEMGGKQRRKNPQEGLYNELQ KDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQ ALPPR	
SEQ ID NO:402	成熟 CD3 $\epsilon$ 27-GSKa	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTGGGGSGGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYCYQQRSNWPITFGQ GTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSPPVTKSFRNGE	10
SEQ ID NO:403	成熟カニクイザルCD3 $\epsilon$ (イプシロン)	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNK EDSGDRLFLPEFSEMEQSGYVVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENC MEMDMVAVATIVIVDICITLGLLLLVIYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPVPNPDIPIRKQQRDLYSGLNQRRRI	
SEQ ID NO:404	成熟アカゲザルCD3 $\epsilon$ (イプシロン)	QDGNEEMGSITQTPYHVSISGTTVILTCSQHLGSEVQWQHNGKNKE DSGDRLFLPEFSEMEQSGYVVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENC MEMDMVAVATIVIVDICITLGLLLLVIYWSKNRKAKAKPVTRGAGA GGRQRGQNKERPPVPNPDIPIRKQQRDLYSGLNQRRRI	20
SEQ ID NO:405	親マウス VH	EVKLLSEGGGLVQPKGSLKLSA AASGFTFNTYAMNWRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYADSV KDRFTISRDDSQSILYLMNNL KTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGLTVTSA	
SEQ ID NO:406	親マウス VL	QAVVTQESALTTSPGETVTLTC RSSTGAVTTSNYANWVQEKPDH LFTGLIGGTNKRAPGVPARFSG SLIGDKAALTITGAQTEDEAIY FCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	
SEQ ID NO:407	IgG1m(f) 重鎖定常領域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK	30
SEQ ID NO:408	ヒトIgLC2/IgLC3 定常ドメイン	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS	
SEQ ID NO:409	IgG1m(f) 重鎖定常領域 (FEA変異を有する)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL PGK	40
SEQ ID NO:410	プライマー CMV P f (MAR5)	GCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATAC	
SEQ ID NO:411	TK pA r(MAR1)	GGATACCCCTAGAGCCCCAGCTGCGCAGATCTGCTATG GC	

CDR領域には、IMGT定義に従って注釈をつけた。

## 【実施例】

## 【0406】

実施例1：ヒト化CD3抗体および非活性化抗体変異体の作製  
CD3抗体のヒト化

マウスCD3抗体（US8,236,308、本明細書ではIgG1-CD3と記す）のヒト化は、Antitope（英国ケンブリッジ）により、彼らの改良版生殖細胞系ヒト化（CDR移植）技術（EP0629240）を使って行われた。この技術を使って、1つの異なるVH鎖（SEQ ID NO：4）と2つの異なるVL鎖（SEQ ID NO：8、10）が設計された。当該1つのVHを当該2つのVL鎖と組み合わせることにより、2つの異なる抗体を作製した。これらのヒト化変異体を本明細書ではhuCD3と記す。したがって、本発明のVHとVLを含むヒト化変異体は、例えばIgG1-huCD3-H1L1と記され、これは該特定変異体が、IgG1アイソタイプであり、ヒト化CD3であって、「H1」と名付けられSEQ ID NO：4に定義するVHアミノ酸配列と、「L1」と名付けられSEQ ID NO：8に定義するVLアミノ酸配列とを含むことを意味する。したがって、例えばH1は重鎖可変領域VH1を指し、L1は軽鎖可変領域VL1を指すことになる。

10

## 【0407】

具体的に述べると、本明細書に記載する実施例では、変異体IgG1-huCD3-H1L1（SEQ ID NO：4に示すVH1配列とSEQ ID NO：8に示すVL1配列とを含むヒト化CD3）、IgG1-huCD3-L1-T41K（SEQ ID NO：4に示すVH1配列とSEQ ID NO：10に示すVL配列とを含むヒト化CD3）。

## 【0408】

## b12抗体

一部の実施例では、HIV-1 gp120特異的抗体である抗体b12（Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3)812-23）を陰性対照として使用した。これを「IgG1-b12」と名付ける。

20

## 【0409】

## 発現

抗体は、後述の非活性化変異を持つか、または非活性化変異を持たず、後述の方法による二重特異性抗体の作製を可能にするCH3ドメイン中の変異を持つ、IgG1、またはIgG1、として発現させた。293fectin（米国Invitrogen）を基本的に製造者の説明どおりに使用することで、抗体の重鎖と軽鎖の両方をコードするプラスミドDNA混合物を、Freestyle HEK293F細胞（米国Invitrogen）に一過性にトランスフェクトした。

30

## 【0410】

## 抗体の精製

培養上清を0.2 μmデッドエンドフィルタでろ過し、5mL MabSelect SuReカラム（GE Health Care）にローディングし、0.1Mクエン酸ナトリウム-NaOH（pH3）で溶出させた。溶出物を2Mトリス-HCl（pH9）で直ちに中和し、12.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140mM NaCl、pH7.4（B.Braun）に対して終夜透析した。あるいは精製に続いて、溶出物をHi Prep脱塩カラムにローディングし、抗体を12.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、140mM NaCl、pH7.4（B.Braun）緩衝液に交換した。透析後または緩衝液交換後に、試料を0.2 μmデッドエンドフィルタで滅菌ろ過した。純度をSDS-PAGEで決定し、濃度を280nmの吸光度で測定した。精製抗体は2～8 で保存した。

40

## 【0411】

## 実施例2：ミュータントライブラリーの作製

Quick change変異誘発キット（Stratagene、製造者の説明書に従う）、ならびに鋳型としてHC（p33HGTE-huCD3-H1）およびLC（p33L-huCD3-L1-T41K）発現プラスミドを用いて行ったランダム変異誘発により、点変異を作製した。HCプラスミドは、WO2011110642に記載の一価UniBody-TEフォーマットをコードする。選択した位置にNNSコドンを含むプライマー（N=G、A、T、またはC、およびS=GまたはC）を用いることにより、それぞれの選択した位置をランダム化した。ミュータントライブラリーで、製造者の説明書に従ってOn eShot DH5（Invitrogen）を形質転換した。

## 【0412】

コロニー選出およびLEE PCR

50

それぞれの変異した位置について96クローンを、個別に、50  $\mu$ L LEE (線状発現要素) PCR緩衝液 (5  $\mu$ L 10  $\times$  AccuPrime PCR緩衝液1、44.6  $\mu$ L 水 (B.Braun)、0.1  $\mu$ L CMV P f (MAR5) および0.1  $\mu$ L Tk pA r (MAR1) プライマー (100  $\mu$ Mストック)、0.2  $\mu$ L Accuprime Taq (Invitrogen) ) 中に選出して、発現プラスミドから発現カセットを増幅した (プロモーターからポリAまで)。LEE PCRを、混合物を、2分94、[35秒94、30秒55、5分68]  $\times$  35、10分72 でインキュベートすること、およびさらなる使用までの4 での保存により行った。

【0413】

96コロニーの各ライブラリー (12) を、サンガー塩基配列決定法を用いて配列決定した (Beckman Coulter Genomics、英国)。

【0414】

(表2) LEE PCRのためのプライマー配列

プライマー名	プライマー配列
CMV P f (MAR5)	GCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATAC
TK pA r(MAR1)	GGATACCCCCTAGAGCCCCAGCTGCGCAGATCTGCTATGGC

【0415】

実施例3: ミュータントライブラリーの発現およびIgG定量

各ミュータント (合計で12  $\times$  96) の1.11  $\mu$ L HCおよび1.11  $\mu$ L LC LEE PCR産物を、2.78  $\mu$ Lの水に希釈した。5  $\mu$ LのDNA希釈液を用いて、96ウェルプレート中の単一ウェルにトランスフェクトした。

【0416】

1ウェルあたり0.4  $\mu$ LのExpiFectamine (商標) 293 (Invitrogen、米国) および4.6  $\mu$ LのOpti-MEM (Gibco、米国) を混合して、室温で5分間インキュベートした。次に、Fectin/Opti-MEMミックスを、5  $\mu$ L DNA希釈液に添加して、室温で30分間インキュベートした。最後に、8.3  $\mu$ LのFectin/Opti-MEM/DNAミックスを、117.5  $\mu$ L Expi293F (商標) 細胞に添加した。全ての手順の間、Expi293F (商標) 細胞を含むプレートを、細胞を浮遊状態に保つように振盪した。トランスフェクション後、細胞を、37 /8% CO<sub>2</sub>で5日間インキュベートした。

【0417】

トランスフェクションの5日後に、上清を採取した。上清中の抗体濃度を、Octet RED (ForteBio、米国) を用いてバイオレイヤー干渉法により測定した。

【0418】

実施例4: CD3/ TCR-LC13スクリーニングライブラリーの作製

Freestyle 293-F細胞 (Invitrogen、米国) に、ヒトTCRの 鎖および 鎖 (それぞれSEQ ID NO: 396およびSEQ ID NO: 397)、ヒトCD3 (SEQ ID NO: 398)、ヒトCD3 (SEQ ID NO: 399)、ヒトCD3 (SEQ ID NO: 400)、ならびにヒトCD3 (SEQ ID NO: 401) をコードする発現コンストラクトを同時トランスフェクトした。これらの配列において、シグナルペプチド配列は排除されている。トランスフェクションは、製造者の説明書 (Invitrogen、米国) に従って行った。トランスフェクションの1日後に、細胞をさらなる使用まで凍結した。

【0419】

実施例5: アフィニティーミュータントのスクリーニング

ホモジニアスアッセイ (用量応答)

配列データに基づいて、配列追跡が高いPHREDスコアを示し、複数の変異はないことを示すミュータントを選択した。入手可能な場合には、変異あたり複数の重複したクローンを選択した。

【0420】

細胞培養上清における組換え生産されたUniBody分子の結合を、蛍光微量アッセイ技術 (Fluorometric Micro volume Assay Technology) (FMAT; Applied Biosystems、米国力

10

20

30

40

50

リフォルニア州フォスターシティ)を用いたホジニアス抗原特異的結合アッセイにより決定した。アッセイ試験設計において、CD3/TCR-LC13(ヒトCD3およびヒトT細胞受容体(TCR))を一過性に発現したFreestyle 293-F細胞;上述のように生産)ならびにFreestyle 293-F野生型細胞(ヒトTCRを発現しない陰性対照)に対する抗体または一価抗体分子の結合について、用量応答で試料を解析した。用量応答結合の前の、試料正規化のためのIgGレベルを、Octet計器(Fortebio、米国メンロパーク)を用いて測定した。

#### 【0421】

試料の希釈系列を細胞に添加して、CD3に結合させた。その後、一価抗体分子の結合を、蛍光コンジュゲート(ヤギ抗ヒトIgG Fc -Alexa647; Jackson ImmunoResearch)を用いて検出した。CD3特異的なヒト化マウス抗体IgG1-HuM291-F405L(Freestyle 293-F細胞において生産)および一価抗体UniTE-huCD3-H1L1-LT41Kを陽性対照として使用し、ChromPure Human IgG, 全分子(Jackson ImmunoResearch)を陰性対照として使用した。試料を、Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System(8200 CDS)を用いてスキャンし、試料濃度にわたる総蛍光を、読み取り値として使用した。カウントが50よりも高く、かつカウント×蛍光(総蛍光)が陰性対照よりも少なくとも3倍高かった場合に、試料を陽性と明言した。

10

#### 【0422】

##### ヒートマップ

ホジニアス用量応答スクリーニングから、4パラメータシグモイドモデルを用いて結合曲線をフィットさせた。フィットから、あらゆるミュータントについて最大結合を決定した。ミュータントあたりの平均最大結合を計算し、図1に示すように、wt結合を上回る平均最大間の比として図示した。

20

#### 【0423】

##### アライメント

これらのライブラリーにおいて作製した、選択したHCミュータントを整列させて、図2に図示する。CDR領域には、IMGT定義に従って注釈をつけた。配列のナンバリングは、直接ナンバリングスキームに従って注釈をつけている。

#### 【0424】

##### 実施例6 2-MEA誘発Fabアーム交換による二重特異性抗体の作製

本発明の二重特異性抗体は、WO2011131746およびWO2013060867(Genmab)において開示されている方法の使用により作製してもよい。

30

#### 【0425】

例として、位置F405Lにおける変異が、一方のIgG1アイソタイプの親抗体に導入されてもよく、位置K409Rにおける変異が、もう一方のIgG1アイソタイプの親抗体に導入されてもよい。

#### 【0426】

これらの2つの親抗体を、それぞれ0.5 mg/mLの最終濃度(等モル濃度)で、100 μL トリス-EDTA(TE)の総体積中、25 mM 2-メルカプトエチルアミン-HCl(2-MEA)を伴う還元条件下で、37 °Cで90分間インキュベートしてもよい。還元剤の2-MEAを、スピンカラム(Microcon遠心式フィルター、30k、Millipore)を製造者のプロトコルに従って用いることにより除去すると、還元反応が停止される。

40

#### 【0427】

二重特異性抗体は、0.2 μmデッドエンドフィルタでろ過してもよく、二重特異性抗体の280 nmでの吸光度(A280)を測定して、その最終濃度を決定してもよい。

#### 【0428】

##### 実施例7: 結合データ

下記の全ての結合アッセイについて、選択したhuCD3-H1L1の重鎖変異体のパネルを、さまざまなフォーマットにおいて試験した。

#### 【0429】

(表3) 選択した一価抗体-TEフォーマットにおけるhuCD3-H1L1のアフィニティー変異

50

体

選択したUniTE-huCD3 HCアフィニティー変異体
UniTE-huCD3-H1L1-LT41K (WT)
UniTE-huCD3-H1L1-T31M-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-T31P-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-Y32A-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-N57E-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-H101F-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-H101G-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-H101I-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-H101K-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-H101L-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-H101N-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-G105P-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-S110A-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-S110G-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-Y114M-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-Y114R-LT41K
UniTE-huCD3-H1L1-Y114V-LT41K

10

20

## 【 0 4 3 0 】

一価抗体-TEフォーマットにおけるCD3アフィニティーミュータントのOctet結合アフィニティーの決定

選択したアフィニティー-VH変異体のパネル(表3)のアフィニティーを、ForteBio Octet HTX上でバイオレイヤー干渉法を用いて決定した。0.4 nmのローディング応答を目指して、Anti-human Fc Capture (AHC) バイオセンサー (ForteBio、英国ボーツマス; カタログ番号18-5060) に600秒間、一価抗体-TEフォーマットにおけるCD3アフィニティーミュータント (2 µg/mL) をロードした。UniBody-TEフォーマットの抗体を使用して、CD3アフィニティーミュータントとCD3 27-GSKaリガンドとの間の一価相互作用アフィニティーを特異的に測定した。ベースライン (150秒) の後、CD3 27-GSKa (100および1000 nM) の会合 (1000秒) および解離 (1000秒) を決定した。CD3 27-GSKaタンパク質は、カップLCのN末端に融合したヒトCD3 ペプチド (アミノ酸1~27) からなる (SEQ ID NO: 402)。計算のために、アミノ酸配列に基づくCD3 27-GSKaの理論的分子量、すなわち27.1 kDaを使用した。実験は、1000 rpmで振盪しながら30で行った。

30

## 【 0 4 3 1 】

データを、1000秒の会合時間および200秒の解離時間での1:1モデルおよびグローバルフルフィットを用いて、ForteBio Data Analysis Software v8.1で解析した。データ追跡を、参照曲線 (CD3 27-GSKaを伴わないCD3アフィニティーミュータント) を引くことにより補正し、Y軸をベースラインの最後の5秒に整列させて、工程間 (interstep) 補正およびサビツキー・ゴレイ (Savitzky-Golay) フィルタリングを適用した。

40

## 【 0 4 3 2 】

(表4) 選択した変異体についての平衡解離定数 (KD)

抗体 ID	KD (M)	1/KD (M <sup>-1</sup> )
UniTE-huCD3-H1L1-N57E-LT41K	2.4x10 <sup>-8</sup>	4.1x10 <sup>7</sup>
uniTE-huCD3-H1L1-LT41K	3.4x10 <sup>-8</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-G105P-LT41K	3.5x10 <sup>-8</sup>	2.8x10 <sup>7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-T31P-LT41K	4.9x10 <sup>-8</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-S110G-LT41K	6.1x10 <sup>-8</sup>	1.6x10 <sup>7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-Y114V-LT41K	7.5x10 <sup>-8</sup>	1.3x10 <sup>7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-Y114M-LT41K	7.6x10 <sup>-8</sup>	1.3x10 <sup>7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-T31M-LT41K	2.0x10 <sup>-7</sup>	5.1x10 <sup>6</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-H101N-LT41K	2.0x10 <sup>-7</sup>	5.1x10 <sup>6</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-H101I-LT41K	2.2x10 <sup>-7</sup>	4.6x10 <sup>6</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-S110A-LT41K	3.2x10 <sup>-7</sup>	3.1x10 <sup>6</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-H101G-LT41K	9.7x10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>6</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-H101L-LT41K	nd	nd
UniTE-huCD3-H1L1-Y32A-LT41K	nd	nd
UniTE-huCD3-H1L1-H101K-LT41K	nd	nd
UniTE-huCD3-H1L1-T31A-LT41K	nd	nd
UniTE-huCD3-H1L1-H101F-LT41K	nd	nd
UniTE-huCD3-H1L1-Y114R-LT41K	nd	nd

nd = 未決定

#### 【0433】

フローサイトメトリー（FACS）でのヒト化CD3（UniTE-huCD3-H1L1-LT41K）のアフィニティー変異体のT細胞結合

精製したヒト化CD3（IgG1-huCD3-H1L1）抗体のVHアフィニティー変異体のT細胞結合を、FACSCanto 752（BD Biosciences）上で蛍光活性化細胞選別を用いて決定した。T細胞を、抗凝固処理したヒトドナー血液試料のパフィーコート画分から単離して、PBS/0.1% BSA/0.02% アジド中に1.8 × 10<sup>6</sup>細胞/mLで再懸濁した。50 μLのT細胞懸濁液と50 μLの抗体希釈液とを、氷上で96ウェルプレートにおいて混ぜ合わせて、4℃で30分間インキュベートし、PBS/0.1% BSA/0.02% アジドで2回洗浄した。次に、50 μLの二次抗体である、PBS/0.1% BSA/0.02% アジド中に1/200希釈したR-フィコエリトリン（PE）コンジュゲートヤギ抗ヒトIgG F(ab')<sub>2</sub>（109-116-098、Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.、ペンシルベニア州ウエストグローブ）を染色のために添加し、混合物を4℃で30分間インキュベートして、その後、PBS/0.1% BSA/0.02% アジドで2回洗浄した。細胞を、120 μL PBS/0.1% BSA/0.02% アジド中に再懸濁して、PE幾何平均蛍光強度を測定した。GraphPad Prism V5.04ソフトウェア（GraphPad Software、米国カリフォルニア州サンディエゴ）を用い、非線形回帰（傾き可変のシグモイド用量応答）を用いて結合曲線を解析し、見かけのアフィニティー（KD）は、最大半減結合時の濃度由来した。図4は、ヒト化CD3（UniTE-huCD3-H1L1-LT41K）のアフィニティー変異体の結合曲線を示し、図5は、ヒト化CD3（UniTE-huCD3-H1L1-LT41K）の低アフィニティー変異体の結合曲線を示す。

#### 【0434】

（表5）一価抗体-TEフォーマットにおけるCD3アフィニティーミュータントの結合データの概要

10

20

30

抗体ID	5000ng/mlでの T細胞結合平均 (幾何MF1)	最大 CD3/TCRLC13 (RFU)	KD (M)
UniTE-huCD3-H1L1-LT41K	13206	2030549	3.4x10 <sup>-8</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-G105P-LT41K	10526	2628228	3.5x10 <sup>-8</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-T31A-LT41K	10240	1836187	
UniTE-huCD3-H1L1-N57E-LT41K	8492	1788851	2.4x10 <sup>-8</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-Y114R-LT41K	6197	1599412	
UniTE-huCD3-H1L1-Y114V-LT41K	6025	1807485	7.5x10 <sup>-8</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-T31P-LT41K	4286	1718317	4.9x10 <sup>-8</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-Y114M-LT41K	3830	1771714	7.6x10 <sup>-8</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-T31M-LT41K	1919	1539506	2.0x10 <sup>-7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-S110A-LT41K	1660	1411016	3.2x10 <sup>-7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-H101K-LT41K	1321	893765	
UniTE-huCD3-H1L1-S110G-LT41K	949	385873	6.1x10 <sup>-8</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-H101N-LT41K	848	1060228	2.0x10 <sup>-7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-Y32A-LT41K	719	541497	
UniTE-huCD3-H1L1-H101F-LT41K	641		
UniTE-huCD3-H1L1-H101I-LT41K	511	603683	2.2x10 <sup>-7</sup>
UniTE-huCD3-H1L1-H101L-LT41K	509	812768	
UniTE-huCD3-H1L1-H101G-LT41K	492	139712	9.7x10 <sup>-7</sup>

10

20

30

40

50

## 【0435】

下記の全ての結合アッセイについて、選択した好ましい重鎖変異体のパネルを試験した（表5を参照されたい）。

## 【0436】

IgG1-huCD3-H1L1-FEALアフィニティーミュータントのOctet結合アフィニティーの決定

選択したIgG1-huCD3-H1L1-FEALフォーマットにおけるCD3アフィニティー変異体のアフィニティーを、ForteBio Octet HTX (ForteBio、英国) 上でバイオレイヤー干渉法を用いて決定した（表6）。Anti-human Fc captureバイオセンサー（カタログ：18-5060、ForteBio、英国）に、hIgG（1μg/mL）を600秒間ロードした。ベースライン（200秒）の後、CD3E27-GSKaの会合（1000秒）および解離（2000秒）を、3倍希釈工程（試料希釈液、カタログ：18-5028、ForteBio、英国）の27.11μg/mL～0.04μg/mL（1000nM～1.4nM）のCD3E27-GSKa濃度範囲を用いて決定した。計算のために、アミノ酸配列に基づくCD3E27-GSKaの理論的分子量、すなわち27.11kDaを使用した。実験は、1000rpmで振盪しながら30で行った。各抗体を、少なくとも2回の独立した実験において試験した（表6）。

## 【0437】

データを、1000秒の会合時間および100秒の解離時間での1:1モデルおよびグローバルフィットを用いて、ForteBio Data Analysis Software v8.1で解析した。データ追跡を、参照曲線（CD3E27-GSKaを伴わない抗体）を引くことにより補正し、Y軸をベースラインの最後の10秒に整列させて、工程間補正およびサビツキー・ゴレイフィルタリングを適用した。0.05nmより短い応答を有するデータ追跡を、解析から排除した。

## 【0438】

（表6）

平均	< KD> (nM)	SDEV	SEM	CV	<Kon>	SDEV	SEM	CV	<Kdis>	SDEV	SEM	CV	pKD	n
IgG1-huCD3-G105P-FEAL	5	2	1	45	4.7E+05	9.7E+04	5.6E+04	21	2.5E-03	1.0E-03	5.8E-04	40	8.3	3
IgG1-huCD3-FEAL	15	6	3	37	2.7E+05	5.1E+04	2.9E+04	19	4.0E-03	1.6E-03	9.1E-04	39	7.8	3
IgG1-huCD3-Y114V-FEAL	29	8	4	26	2.2E+05	3.3E+04	1.9E+04	15	6.3E-03	9.7E-04	5.6E-04	15	7.5	3
IgG1-huCD3-T31P-FEAL	42	9	4	21	1.9E+05	3.8E+04	1.6E+04	20	7.8E-03	1.3E-03	5.3E-04	17	7.4	6
IgG1-huCD3-Y114M-FEAL	42	14	8	33	2.6E+05	6.2E+04	3.6E+04	24	1.0E-02	1.5E-03	8.7E-04	15	7.4	3
IgG1-huCD3-H101N-FEAL	45	13	7	29	4.8E+05	2.2E+05	1.2E+05	45	2.0E-02	3.1E-03	1.8E-03	16	7.3	3
IgG1-huCD3-Y114R-FEAL	46	10	6	22	1.5E+05	4.1E+04	2.4E+04	27	6.8E-03	4.1E-04	2.4E-04	6	7.3	3
IgG1-huCD3-S110A-FEAL	72	15	6	21	1.8E+05	2.5E+04	1.0E+04	14	1.3E-02	1.6E-03	6.4E-04	12	7.1	6
IgG1-huCD3-N57E-FEAL	91	30	17	33	2.1E+05	2.8E+04	1.6E+04	13	1.9E-02	4.0E-03	2.3E-03	21	7.0	3
IgG1-huCD3-T31M-FEAL	99	23	13	23	1.9E+05	2.5E+04	1.5E+04	14	1.8E-02	2.6E-03	1.5E-03	14	7.0	3
IgG1-huCD3-Y32A-FEAL	105	31	22	29	2.2E+05	1.1E+05	7.5E+04	48	2.2E-02	4.4E-03	3.1E-03	20	7.0	2
IgG1-huCD3-H101L-FEAL	107	39	23	37	2.7E+05	4.3E+04	2.5E+04	16	2.8E-02	7.5E-03	4.4E-03	27	7.0	3
IgG1-huCD3-H101K-FEAL	120	94	55	79	2.2E+05	1.9E+05	1.1E+05	84	1.7E-02	9.8E-03	5.7E-03	58	6.9	3
IgG1-huCD3-S110G-FEAL	153	120	70	79	3.8E+05	4.2E+05	2.4E+05	112	2.6E-02	8.3E-03	4.8E-03	32	6.8	3
IgG1-huCD3-H101G-FEAL	683	169	97	25	3.0E+04	9.2E+03	5.3E+03	30	2.0E-02	8.5E-04	4.9E-04	4	6.2	3
IgG1-huCD3-H101I-FEAL	nd													0
IgG1-huCD3-H101F-FEAL	nd													0

10

【 0 4 3 9 】

IgG1-huCD3-H1L1-FEALアフィニティーミュータントのT細胞結合アフィニティーの決定

ドナーパフィーコート（Sanquin、オランダ国アムステルダム）由来のT細胞を、RosetteSepヒトT細胞濃縮カクテル（カタログ：15021C.1、Stemcell Technologies、フランス国）を製造者の説明書に従って用いることにより単離した。簡潔に言うと、50 μLのT細胞単離カクテルを、1 mLのパフィーコートに添加して、室温で20分間インキュベートした。次に、パフィーコートをPBS（カタログ：3623140、B.Braun、ドイツ国）で希釈（1:3、v/v）して、15 mLのリンパ球分離媒質（カタログ：17-829E、Lonza、スイス国）を充填した50 mL falconチューブ（カタログ：227261、Greiner bio-one、オランダ国）にやさしく移した。チューブを、室温、1200 × gで20分間、ブレーキなしで遠心分離した。T細胞を密度媒質から収集し、PBSで2回洗浄した。

20

【 0 4 4 0 】

2 × 10E6 T細胞/mLを、FACS緩衝液中に再懸濁し、50 μLを丸底96ウェルプレート（カタログ：650101、Greiner bio-one、オランダ国）中に移した。50 μLの5倍希釈の抗体溶液を、5 μg/mLから開始して添加し、4 で30分間インキュベートした。96ウェルプレートを300 × gで5分間、4 で遠心分離し、上清を捨てた。細胞を氷冷FACS緩衝液で、氷上で2回洗浄し、1:200希釈した二次抗体（抗IgG Fc -PE(fab)'2、カタログ：109-116-098、Jackson Immuno Research、英国）を添加して100 μL/ウェルにし、30分間インキュベートして、FACS緩衝液で2回洗浄した。蛍光強度をFACS Canto上で測定し、幾何平均をFlowJo V10ソフトウェアにより計算した。GraphPad (V6.04)によりグラフを作成した。図5を参照されたい。

30

【 0 4 4 1 】

実施例9：CD3アフィニティーミュータントのインビトロ細胞傷害スクリーニング

固形腫瘍細胞株に対するCD3アフィニティーミュータントの細胞傷害（アラマーブルーアッセイ）

ドナーパフィーコート（Sanquin、オランダ国アムステルダム）由来のT細胞を、RosetteSepヒトT細胞濃縮カクテル（カタログ：15021C.1、Stemcell Technologies、フランス国）を製造者の説明書に従って用いることにより単離した。NCI-N87（25,000細胞/ウェル）（図6A）、SKOV3（16,000細胞/ウェル）（図6B）、およびMDA-MB-231（16,000細胞/ウェル）（図6C）の細胞を、平底96ウェルプレート（カタログ：655180、Greiner-bio-one、オランダ国）中に播種し、37 で3~5時間、接着させた。T細胞を、以下の比で腫瘍細胞に添加した：NCI-N87細胞：T細胞、1：3；SKOV3細胞：T細胞、1：4；MDA-MB-231細胞：T細胞、1：8。その後、抗体溶液を10倍希釈で添加し、プレートを37 で2日間インキュベートした。次に、上清を捨て、接着した細胞をPBSで2回洗浄した。10%のdonor bovine serum with iron（カタログ：10371-029、Life Technologies、オランダ国）を含有するRP

40

50

MI-1640 (カタログ: BE12-115F、Lonza、スイス国) 培地において調製した10%アラマーブルー (カタログ: DAL1100、Life Technologies、オランダ国) 溶液の150 μLをウェルに添加し、37 °Cで3~5時間インキュベートした。吸光度を、Envisionマルチラベルプレートリーダー (PerkinElmer、米国) で測定した。スタウロスポリン (カタログ: S6942、Sigma-Aldrich、米国) 処理した細胞を、100%死滅として設定し、無処理の細胞を、0%死滅として設定した。生細胞を、全ての群からスタウロスポリン処理した細胞を引くことにより計算し、無処理の群に対するパーセンテージをプロットした。GraphPad (v6.04) によりグラフを作成した。図6を参照されたい。

【0442】

血液細胞株に対するCD3アフィニティーミュタントの細胞傷害 (クロム放出アッセイ)

5 × 10E6 Daudi細胞/mLを、100 μCiクロムを含む完全培養培地中で1時間、振盪条件下、37 °Cでインキュベートした。次に、細胞を、PBS中で2回洗浄し、5 mLの完全細胞培養培地 (RPMI 1640中、10% donor bovine serum with iron) 中に再懸濁した。5,000個のDaudi細胞を、丸底96ウェルプレート中に播種した。ドナーバフィーコート (Sanquin、オランダ国アムステルダムより購入) 由来のT細胞を、RosetteSepヒトT細胞濃縮カクテル (カタログ: 15021C.1、Stemcell Technologies、フランス国) を製造者の説明書に従って用いることにより単離した。T細胞を、(腫瘍細胞:T細胞) 1:10の比でDaudi細胞に添加し、その後、2倍希釈の抗体溶液を添加した。プレートを、37 °Cで24時間インキュベートした。24時間後、プレートを3分間、300 × gで遠心分離し、上清を採取して、放射活性を測定した。図7を参照されたい。

【0443】

(表7)

HER2コピー数	細胞	死滅率 (%)			
		死滅なし	死滅 ≤ 50%	死滅 ≤ wt	死滅 = wt
HER2 ≥ 1,000,000	NCI-N87	H101I, H101L, H101K, Y32A	H101F, S110G, H101N	N57E, H101G	S110A, G105P, S110A, T31M, T31P, Y114M, Y114R, Y114V
50,000 ≤ HER2 ≤ 180,000	SKOV3	H101I, H101F, H101L, Y32A	H101K	H101G, S110G, H101N, N57E	S110A, G105P, S110A, T31M, T31P, Y114M, Y114R, Y114V
HER2 ≤ 30,000	MDA-MB-231	H101F, H101I, S110G, Y32A, H101L, H101K, H101N, N57E	H101G		S110A, G105P, S110A, T31M, T31P, Y114M, Y114R, Y114V

【0444】

実施例10: NOD-SCIDマウス中の (ヒトPBMC + NCI-N87細胞) 同時移植モデルにおけるCD3 × HER2二重特異性抗体の腫瘍効力

いくつかのCD3 × HER2二重特異性抗体のインビボ抗腫瘍効力を、皮下NCI-N87同時移植モデルにおいて評定した (図8)。二重特異性抗体のCD3アームとして、ヒト化WT CD3 (huCD

10

20

30

40

50

3-FEAL) および4種の異なるCD3アフィニティー変異体 (N57E、H101K、S110A、Y114M) を使用した。全ての例において、HER2ターゲティングアームは同じ (ハーセプチン-FEAR) であった。

BisG1-huCD3-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR  
 BisG1-huCD3-N57E-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR  
 BisG1-huCD3-H101K-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR  
 BisG1-huCD3-S110A-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR  
 BisG1-huCD3-Y114M-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR

【0445】

このモデルにおいては、HLA-Aが適合した非刺激ヒトPBMCを、ヒトT細胞の供給源として、2種の異なる用量レベル (0.5および0.05 mg/kg) でNCI-N87腫瘍細胞と同時接種した。

【0446】

マウスを処置群に選別した (1処置群あたりn=4)。0日目に、200  $\mu$ L PBS/0.1% BSA中にHLA-Aが適合したhPBMC (5 x 10E6、Sanquin) およびNCI-N87 (5 x 10E6) 細胞を含有する混合物を、それぞれの雌のNOD-SCIDマウス (NOD.C.B-17-Prkdc<sup>scid</sup>/J、6~11週齢 (Charles-River)) の右側腹部に皮下 (s.c.) 接種した。腫瘍細胞注射の直後に、5種の異なるCD3 x HER2抗体の単回静脈内投与 (150  $\mu$ L) を、全ての二重特異性抗体について2種の異なる濃度 (0.5および0.05 mg/kg) で行った。腫瘍体積を、週あたり少なくとも2回決定した。腫瘍体積 (mm<sup>3</sup>) は、カリパス (PLEXX) 測定値から0.52 x (長さ) x (幅)<sup>2</sup>として計算した。

【0447】

NCI-N87細胞 (ATCC番号CRL-5822、胃から生じた胃がん) を融解し、10% donor bovine serum with iron (Gibco、カタログ番号10371-029)、ペニシリン/ストレプトマイシンおよび0.45% グルコース (Sigma、G8769)、ピルビン酸ナトリウム (Cambrex、BE13-115E)、ならびに0.075% 炭酸水素ナトリウム (Cambrex、BE17-613E) を補給したRPMI 1640 (Lonza、BE12-115F) において培養した。細胞は、CellSTACK培養チャンバーにおいて増殖させ、対数期に採取して、トリパンブルー排除により計数した。

【0448】

各研究のために、hPBMCを、NCI-N87 (HLA-A-01,23) についてヒトのHLA-Aが適合したドナーから、Ficoll密度遠心分離によりパフィーコート (Sanquin) から単離した。単離した細胞を、窒素中で凍結し、使用前に融解した。全ての細胞を、PBS/0.1% BSA中で洗浄し、セルストレーナーを通してろ過し、PBS/0.1% BSA中に50 x 10E6細胞/mLの濃度になるように再懸濁した。

【0449】

結果を、図8に示す。図6A~Bは、処置後の経時的な平均腫瘍体積を示す。図6C~Dは、4日目の平均NCI-N87腫瘍体積のドットプロット表示を示す。全ての群がまだ無傷であった最後の日である44日目の腫瘍体積に対する統計解析 (マン・ホイットニー) により、0.05 mg/kgの用量で、対照 (PBMC) と比較したBisG1-huCD3-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR、BisG1-huCD3-S110A-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR、およびBisG1-huCD3-Y114M-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARの有意な腫瘍成長阻害 (p < 0.05) が明らかになり、BisG1-huCD3-N57E-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARおよびBisG1-huCD3-H101K-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARの阻害は明らかにならなかった。0.5 mg/kgの用量では、BisG1-huCD3-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARおよび全てのCD3アームアフィニティー変異体が、BisG1-huCD3-H101K-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARを除いて、PBS (PBMC) 対照群と比較して有意な腫瘍成長 (p < 0.05) 阻害を示した。

【0450】

BisG1-huCD3-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR、BisG1-huCD3-S110A-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEAR、およびBisG1-huCD3-Y114M-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARは、0.05および0.5 mg/kgの投薬量でNCI-N87腫瘍体積を有意に (p < 0.05) 低減した。BisG1-huCD3-N57E-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARは、0.5 mg/kgの投薬量でのみNCI-N87腫瘍体積を有意に (p

10

20

30

40

50

< 0.05 ) 低減した。BisG1-huCD3-H101K-FEAL x 1014-ハーセプチン-FEARは、試験した投薬量の両方で、NCI-N87腫瘍成長に影響を及ぼさなかった。

【 0 4 5 1 】

参考文献一覧

- [1] Xu *et al.*, 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26
- [2] Herold *et al.*, 2005, Diabetes, 54(6):1763-9
- [3] Staerz, *et al.*, 1985, Nature 314:628-631
- [4] Muller and Kontermann, 2010, BioDrugs 24: 89-98
- [5] Lum and Thakur, 2011, BioDrugs 25: 365-379 10
- [6] Linke *et al.*, 2010, MAbs 2: 129-136
- [7] Ruf *et al.*, 2010, Br J Clin Pharmacol 69: 617-625
- [8] Bokemeyer *et al.*, 2009, J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 3036
- [9] Heiss *et al.*, 2010, Int J Cancer 127: 2209-2221
- [10] Jones *et al.*, 2009, Lancet Oncol 10:1179-1187
- [11] Kiewe *et al.*, 2006, Clin Cancer Res 12:3085-3091
- [12] WO 2012/162067
- [13] WO 2008/119567 20
- [14] Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)
- [15] Lefranc MP, *et al.*, 2003, Dev Comp Immunol. Jan;27(1):55-77
- [16] Brochet, X. *et al.*, 2008, Nucl.Acids Res. 36, W503-508
- [17] Giudicelli, V., Brochet, X, Lefranc, M.-P., 2011, Cold Spring Harb Protoc. Jun 1;2011(6)
- [18] Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15
- [19] WO92/22653 30
- [20] EP 0 629 240
- [21] E. Meyers and W. Miller, 1988, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17
- [22] Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 444-453
- [23] Clustal W algorithm, Thompson, 1994

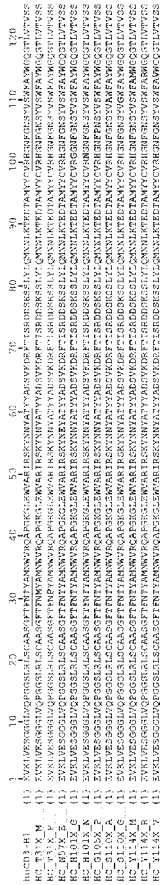
- [24] T cell Epitope Database from e.g. <http://www.iedb.org/>
- [25] Perry *et al.*, 2008 *Drugs R D* 9 (6):385-396
- [26] Bryson *et al.*, 2010, *Biodrugs* 24 (1):1-8
- [27] Kabat, E.A. *et al.*, 1991, *Sequences of proteins of immunological interest*. 5th Edition - US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689
- [28] Oganessian *et al.*, 2008, *Acta Cryst. (D64)*:700-4
- [29] Canfield *et al.*, 1991, *J. Exp.Med.* (173):1483-91 10
- [30] Duncan *et al.*, 1988, *Nature* (332):738-40
- [31] Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* (276):6591-604
- [32] Idusogie EE, *et al.*, 2000, *J Immunol.* 164: 4178-84
- [33] Leabman *et al.*, 2013, *MAbs*; 5(6):896-903
- [34] Parren *et al.*, 1992, *J. Clin Invest.* 90: 1537-1546
- [35] Bruhns *et al.*, 2009, *Blood* 113: 3716-3725
- [36] WO 2011/066501
- [37] Lightle, S., *et al.*, 2010, *Protein Science* (19):753-62 20
- [38] Brekke *et al.*, 2006, *J Immunol* 177:1129-1138
- [39] Dall'Acqua WF, *et al.*, 2006, *J Immunol* 177:1129-1138
- [40] Wu *et al.*, 2010, *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg
- [41] WO 2011/131746
- [42] WO 2002/020039
- [43] WO 98/050431 30
- [44] WO 2011/117329
- [45] EP 1 870 459
- [46] WO 2009/089004
- [47] US 2010 00155133
- [48] WO 2010/129304
- [49] WO 2007/110205
- [50] WO 2010/015792
- [51] WO 2011/143545 40
- [52] WO 2012/058768
- [53] WO 2011/028952
- [54] WO 2008/003116
- [55] US 7,262,028
- [56] US 7,612,181

- [57] WO 2010/0226923
- [58] US 7,951,918
- [59] CN 102250246
- [60] WO 2012/025525
- [61] WO 2012/025530
- [62] WO 2008/157379
- [63] WO 2010/080538
- [64] Sykes and Johnston, 1997, *Nat Biotech* 17, 355-59 10
- [65] US 6,077,835
- [66] WO 2000/70087
- [67] Schakowski *et al.*, 2001, *Mol Ther* 3, 793-800
- [68] WO 2000/46147
- [69] Benvenisty and Reshef, 1986, *PNAS USA* 83, 9551-55
- [70] Wigler *et al.*, 1978, *Cell* 14, 725
- [71] Coraro and Pearson, 1981, *Somatic Cell Genetics* 7, 603
- [72] US 5,589,466 20
- [73] US 5,973,972
- [74] Van Heeke & Schuster, 1989, *J Biol Chem* 264, 5503-5509
- [75] F. Ausubel *et al.*, 1987, ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York
- [76] Grant *et al.*, 1987, *Methods in Enzymol* 153, 516-544
- [77] Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995
- [78] *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978 30
- [79] Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy*, Plenum Press 1988
- [80] Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652, Mack Publishing Co., 1990
- [81] Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al., (eds.), Chapman & Hall 1993
- [82] US 5,057,313 40
- [83] US 6,331,175
- [84] Ritter G, *et al.*; 2001, *Cancer Res.*, 61:6851-9
- [85] Bostrom et al, *Science*. 2009; 323(5921):1610-4
- [86] Bostrom et al, *PLoSOne*. 2011; 6(4)e17887

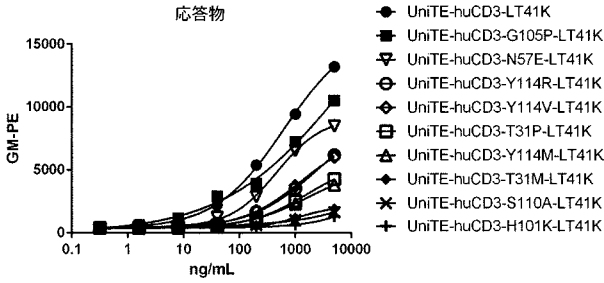
【 図 1 】

変異	D	E	K	R	H	S	T	N	Q	G	A	V	L	I	C	M	P	F	Y	W	
変異位置																					
HC_N30K	0.97	0.94	1.01	1.01	0.96	1.02	1.00	0.98	1.00	0.98	0.96	1.01	0.99	0.94	0.84	0.78	0.87	0.78	0.67	0.97	
HC_T31X	0.66	0.36	0.92	0.88	0.89	0.97	1.00	0.93	0.88	0.93	0.83	0.92	0.91	0.68	0.66	0.43	0.87	0.78	0.66	0.67	
HC_T32X	0.94	0.88	0.95	0.90	1.05	1.05	0.93	1.00	1.00	0.97	0.81	0.78	0.55	0.38	0.30	0.09	0.86	0.33	1.05	1.00	
HC_N57K	0.94	0.82	0.99	0.95	1.00	0.98	0.74	1.03	0.95	1.00	0.90	0.96	0.87	0.97	0.94	0.74	0.94	0.48	0.98	1.02	
HC_A59K	0.94	0.82	0.99	0.95	1.00	0.98	0.74	1.03	0.95	1.00	0.90	0.96	0.87	0.97	0.94	0.74	0.94	0.48	0.98	1.02	
HC_H00X	0.47	0.00	0.00	1.00	0.86	0.97	0.95	0.95	0.97	0.95	0.07	0.92	0.68	0.43	0.32	0.10	0.23	0.00	0.00	0.00	
HC_G10X	1.11	1.07	1.16	1.01	0.94	0.22	1.15	1.28	1.00	1.00	1.72	1.14	1.11	1.15	0.38	1.07	1.38	1.11	1.23	1.10	
HC_S10X	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
HC_Y14K	0.88	0.86	0.96	1.03	1.03	0.98	1.02	0.92	0.43	0.97	0.90	0.95	0.96	0.96	0.98	0.88	0.11	1.03	1.00	0.99	
IC_T31X	0.79	0.88	0.75	1.01	0.97	1.03	1.00	0.94	0.89	1.01	1.03	1.00	0.72	0.68	0.97	0.92	1.00	1.00	0.99	0.99	
IC_L92K	0.66	0.45	0.44	0.00	0.00	0.87	0.95	0.81	0.00	0.76	0.89	0.94	1.00	0.96	1.00	0.93	0.21	0.98	0.97	0.50	
IC_L97K	1.04	0.98	1.01	1.01	0.96	0.96	0.97	0.97	1.01	0.99	0.99	0.98	1.00	1.00	0.92	0.94	0.93	0.95	0.96	0.94	

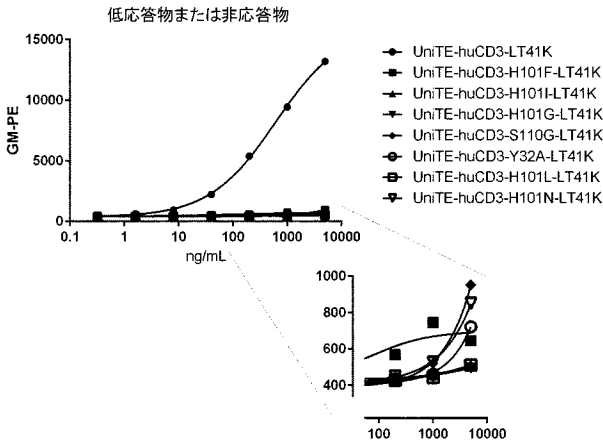
【 図 2 】  
SEQアライメント



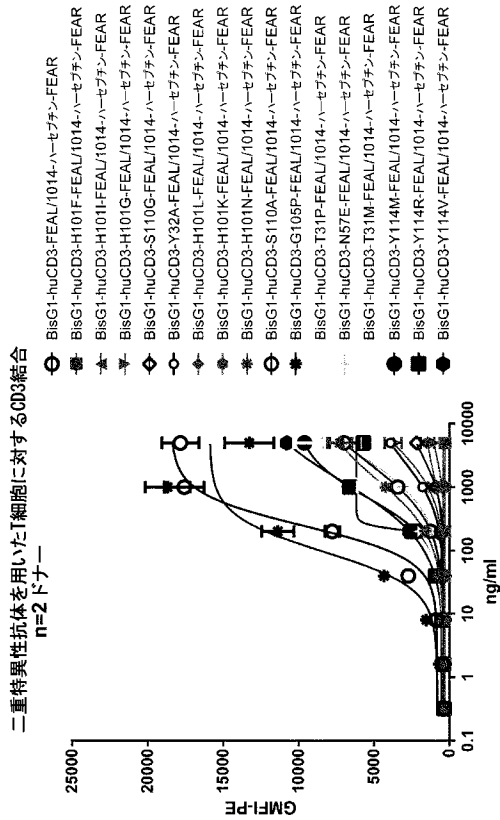
【 図 3 】

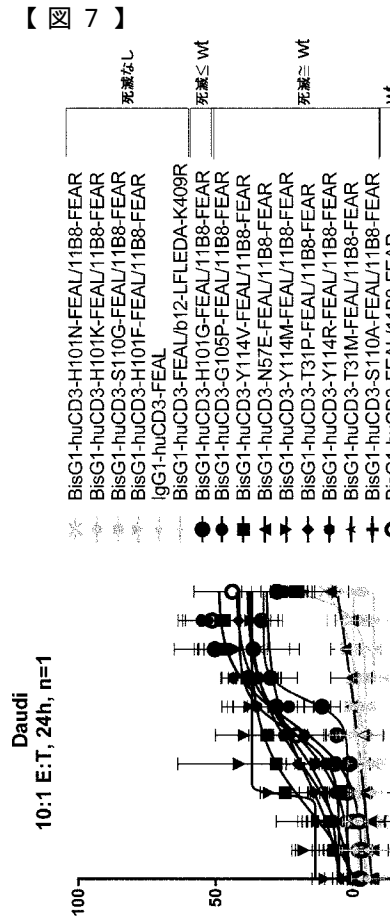
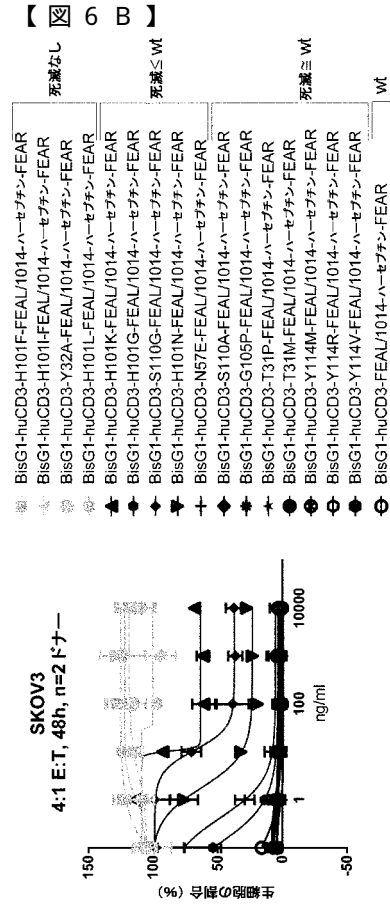
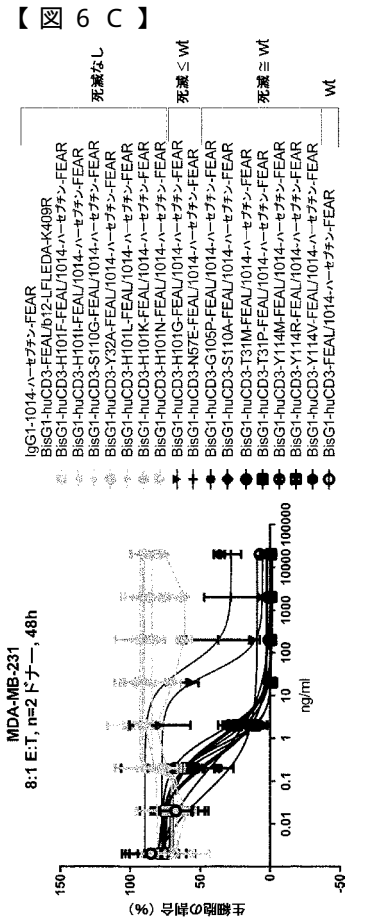
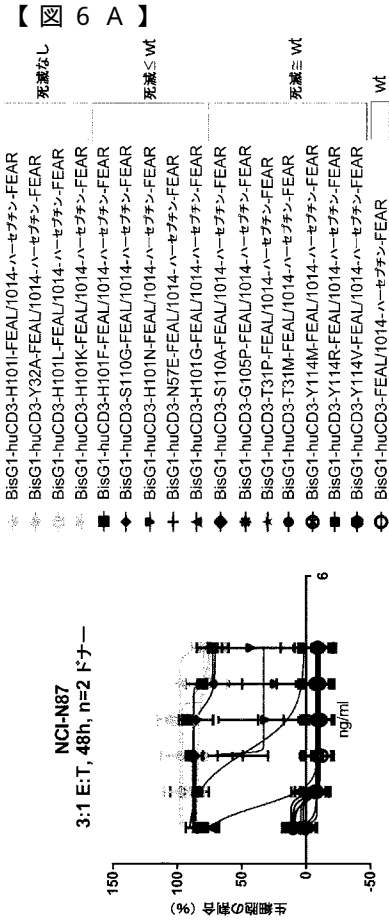


【 図 4 】

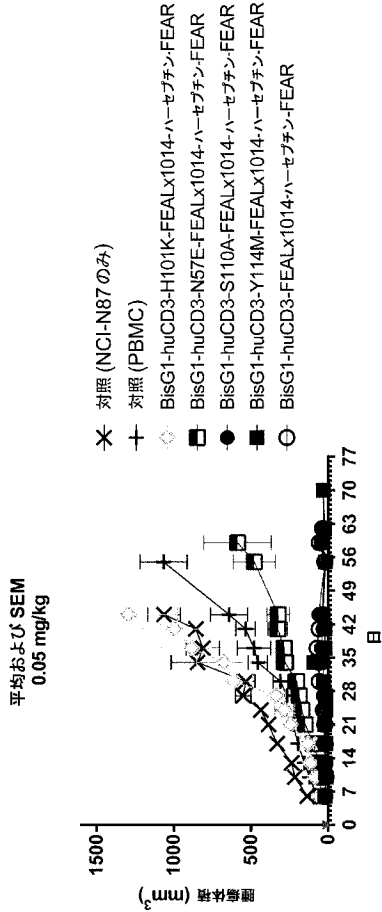


【 図 5 】

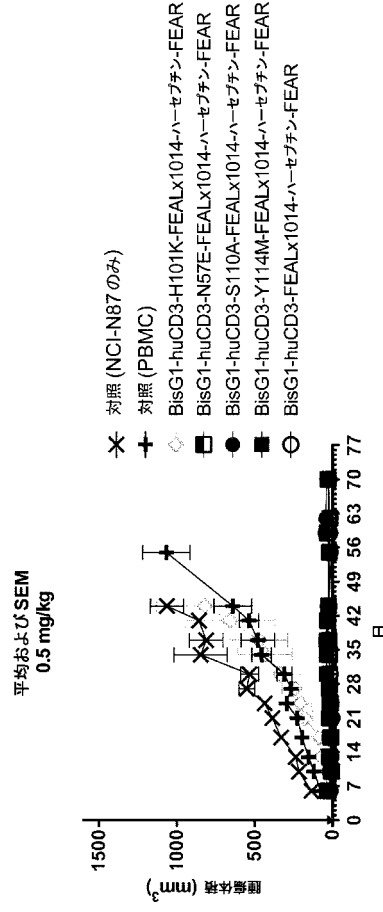




【 図 8 A 】

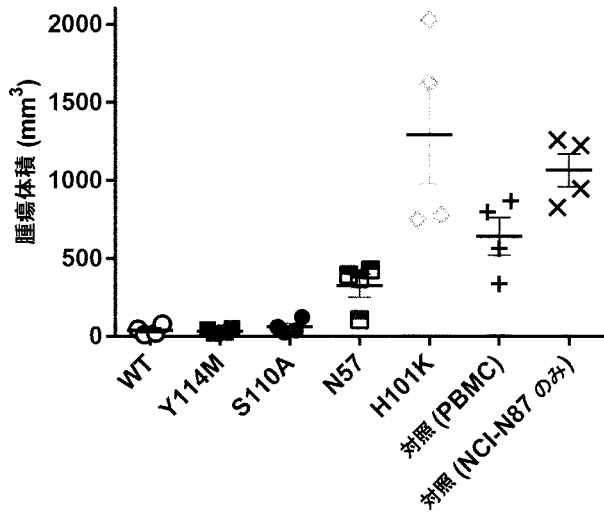


【 図 8 B 】



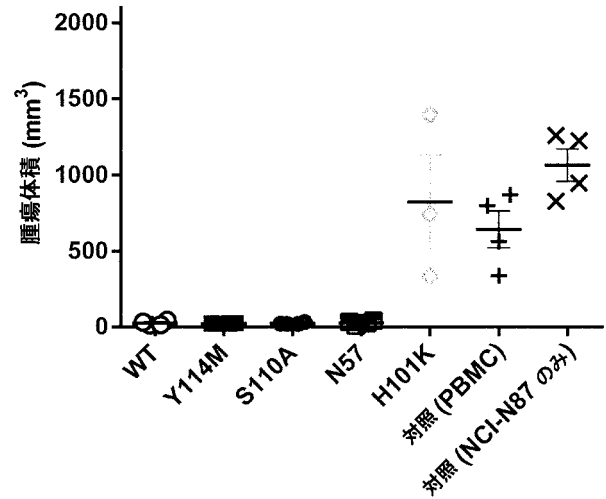
【 図 8 C 】

平均腫瘍体積、平均およびSEM、44日目  
0.05 mg/kg



【 図 8 D 】

平均腫瘍体積、平均およびSEM、44日目  
0.5 mg/kg



【配列表】

2018526981000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/066845
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 C07K16/32 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/001085 A1 (GENMAB B V [NL]) 8 January 2015 (2015-01-08) the whole document in particular, pages 6, 21-23, 31-32, 43-48, 60-65 and 68-77 -----	1-77
Y	WO 2014/108483 A1 (GENMAB B V [NL]) 17 July 2014 (2014-07-17) the whole document in particular, example 1 on pages 53-54, and pages 37-51 and 53. -----	1-77
Y	WO 2013/188693 A1 (IMAGINAB INC [US]) 19 December 2013 (2013-12-19) the whole document in particular, page 2 and example 1 on pages 53-54, pages 24-25, 38-40 and 43-53 ----- -/--	1-77
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  19 September 2016		Date of mailing of the international search report  04/10/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Pérez-Mato, Isabel

3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/186613 A1 (NASVAX LTD [IL]) 19 December 2013 (2013-12-19) the whole document in particular, pages 2-3, 12-14 and 32-33 -----	1-77
Y	WO 2012/143524 A2 (GENMAB AS [DK]; NEIJSEEN JOOST J [NL]; MEESTERS JOYCE I [NL]; DE GOEIJ) 26 October 2012 (2012-10-26) the whole document -----	40-77
Y	LUIS E. HINOJOSA ET AL: "Construction of a Recombinant Non-Mitogenic Anti-Human CD3 Antibody", HYBRIDOMA, vol. 29, no. 2, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 115-124, XP055101580, ISSN: 1554-0014, DOI: 10.1089/hyb.2009.0042 the whole document see abstract and page 121 -----	40-77
Y	JING LI: "Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding anti-CD3 antibody, hu12F6mu in patients receiving renal allografts", MABS, vol. 2, no. 4, 10 August 2010 (2010-08-10) , pages 449-556, XP055101687, the whole document in particular, abstract and pages 449-450 -----	1-77
Y	KIEWE P ET AL: "PHASE I TRIAL OF THE TRIFUNCTIONAL ANTI-HER2 X ANTI-CD3 ANTIBODY ERTUMAXOMAB IN METASTATIC BREAST CANCER", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 12, no. 10, 15 May 2006 (2006-05-15), pages 3085-3091, XP008067039, ISSN: 0732-183X the whole document in particular, see abstract and pages 3085-3086 -----	1-77
Y	ALMAGRO JUAN C ET AL: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE, FRONTIERS IN BIOSCIENCE, ALBERTSON, NY, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP009126790, ISSN: 1093-9946 the whole document in particular, pages 1623-1625 -----	1-77
	----- -/--	

3

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/066845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BORTOLETTO NICOLA ET AL: "Optimizing anti-CD3 affinity for effective T cell targeting against tumor cells", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH &amp; CO. KGAA, DE, vol. 32, no. 11, 1 November 2002 (2002-11-01), pages 3102-3107, XP002436763, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/1521-4141(200211)32:11&lt;3102::AID-IMMU3102&gt;3.0.CO;2-C the whole document in particular, pages 3102-3103 -----</p>	45-58

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/066845

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015001085 A1	08-01-2015	AU 2014286116 A1	04-02-2016
		CA 2915575 A1	08-01-2015
		CN 105722529 A	29-06-2016
		EA 201690167 A1	30-06-2016
		KR 20160027177 A	09-03-2016
		SG 11201510739T A	28-01-2016
		US 2016168247 A1	16-06-2016
		WO 2015001085 A1	08-01-2015
		WO 2015104346 A1	16-07-2015
WO 2014108483 A1	17-07-2014	AU 2013285355 A1	29-01-2015
		CN 104736174 A	24-06-2015
		JP 2015524387 A	24-08-2015
		JP 2016508153 A	17-03-2016
		SG 11201408646V A	29-01-2015
		US 2015175707 A1	25-06-2015
		US 2015337049 A1	26-11-2015
		WO 2014006217 A1	09-01-2014
		WO 2014108483 A1	17-07-2014
WO 2013188693 A1	19-12-2013	EP 2895203 A1	22-07-2015
		US 2015118252 A1	30-04-2015
		WO 2013188693 A1	19-12-2013
WO 2013186613 A1	19-12-2013	CA 2915412 A1	19-12-2013
		CN 104822704 A	05-08-2015
		EP 2892924 A1	15-07-2015
		US 2015175699 A1	25-06-2015
		WO 2013186613 A1	19-12-2013
WO 2012143524 A2	26-10-2012	AU 2012245116 A1	07-11-2013
		CA 2832389 A1	26-10-2012
		CN 103796677 A	14-05-2014
		JP 2014514314 A	19-06-2014
		US 2014170149 A1	19-06-2014
		WO 2012143524 A2	26-10-2012

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
G 0 1 N	33/541 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
		A 6 1 K	39/395	E
		A 6 1 K	39/395	D
		G 0 1 N	33/53	Y
		G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/541	

- (31)優先権主張番号 PCT/EP2016/050296  
(32)優先日 平成28年1月8日(2016.1.8)  
(33)優先権主張国 欧州特許庁(EP)

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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (74)代理人 100148699  
弁理士 佐藤 利光  
(74)代理人 100128048  
弁理士 新見 浩一  
(74)代理人 100129506  
弁理士 小林 智彦  
(74)代理人 100205707  
弁理士 小寺 秀紀  
(74)代理人 100114340  
弁理士 大関 雅人  
(74)代理人 100114889  
弁理士 五十嵐 義弘  
(74)代理人 100121072  
弁理士 川本 和弥

- (72)発明者 ラーデメイカー リック  
オランダ王国 3 5 8 4 - シーエム ユトレヒト イヤレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ .  
内
- (72)発明者 アルティンタス イシル  
オランダ王国 3 5 8 4 - シーエム ユトレヒト イヤレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ .  
内
- (72)発明者 エンジェルパーツ パトリック  
オランダ王国 3 5 8 4 - シーエム ユトレヒト イヤレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ .  
内
- (72)発明者 シュールマン ジャニーヌ  
オランダ王国 3 5 8 4 - シーエム ユトレヒト イヤレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ .  
内
- (72)発明者 パレン ポール  
オランダ王国 3 5 8 4 - シーエム ユトレヒト イヤレラーン 6 0 ゲンマブ ビー . ブイ .  
内
- F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QR48 QS33  
4B064 AG27 CA01 CA19 CC24 DA01 DA13  
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46  
4C085 AA13 AA14 AA15 AA16 BB01 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03  
GG04 GG05 GG06 GG08 GG10  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	人源化或嵌合CD3抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018526981A</a>	公开(公告)日	2018-09-20
申请号	JP2018501159	申请日	2016-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	根马布股份公司		
申请(专利权)人(译)	Genmabu ER / ES		
[标]发明人	ラーデメイカーリック アルティンタスイシル エンジェルパーツパトリック シュールマンジャニーヌ パレンポール		
发明人	ラーデメイカー リック アルティンタス イシル エンジェルパーツ パトリック シュールマン ジャニーヌ パレン ポール		
IPC分类号	C12N15/13 C12N15/10 C12N15/63 C12Q1/04 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/28 C07K16/46 A61P35/00 A61P31/00 A61P37/02 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/541		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K16/2809 C07K16/32 C07K2317/24 C07K2317 /31 C07K2317/526 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/73 C07K2317/92 C07K16/4216		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C12N15/10.200.Z C12N15/63.Z C12Q1/04 C12P21/08 C12N1/15 C12N1/19 C12N1 /21 C12N5/10 C07K16/28 C07K16/46 A61P35/00 A61P31/00 A61P37/02 A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/395.U A61K39/395.E A61K39/395.D G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/541		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B064 /AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085 /AA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	201500414 2015-07-15 DK 201500413 2015-07-15 DK 201500416 2015-07-16 DK PCT/EP2016/050296 2016-01-08 WO		
其他公开文献	JP2018526981A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本发明涉及结合CD3的人源化或嵌合抗体。本发明进一步涉及双特异性抗体，组合物，药物组合物，所述抗体在疾病治疗中的用途以及治疗方法。

表 1

序列号	氨基酸序列
1	... (sequence) ...
2	... (sequence) ...
3	... (sequence) ...
4	... (sequence) ...
5	... (sequence) ...
6	... (sequence) ...
7	... (sequence) ...
8	... (sequence) ...
9	... (sequence) ...
10	... (sequence) ...
11	... (sequence) ...
12	... (sequence) ...
13	... (sequence) ...
14	... (sequence) ...
15	... (sequence) ...
16	... (sequence) ...
17	... (sequence) ...
18	... (sequence) ...
19	... (sequence) ...
20	... (sequence) ...
21	... (sequence) ...
22	... (sequence) ...
23	... (sequence) ...
24	... (sequence) ...
25	... (sequence) ...
26	... (sequence) ...
27	... (sequence) ...
28	... (sequence) ...
29	... (sequence) ...
30	... (sequence) ...
31	... (sequence) ...
32	... (sequence) ...
33	... (sequence) ...
34	... (sequence) ...
35	... (sequence) ...
36	... (sequence) ...
37	... (sequence) ...
38	... (sequence) ...
39	... (sequence) ...
40	... (sequence) ...
41	... (sequence) ...
42	... (sequence) ...
43	... (sequence) ...
44	... (sequence) ...
45	... (sequence) ...
46	... (sequence) ...
47	... (sequence) ...
48	... (sequence) ...
49	... (sequence) ...
50	... (sequence) ...
51	... (sequence) ...
52	... (sequence) ...
53	... (sequence) ...
54	... (sequence) ...
55	... (sequence) ...
56	... (sequence) ...
57	... (sequence) ...
58	... (sequence) ...
59	... (sequence) ...
60	... (sequence) ...
61	... (sequence) ...
62	... (sequence) ...
63	... (sequence) ...
64	... (sequence) ...
65	... (sequence) ...
66	... (sequence) ...
67	... (sequence) ...
68	... (sequence) ...
69	... (sequence) ...
70	... (sequence) ...
71	... (sequence) ...
72	... (sequence) ...
73	... (sequence) ...
74	... (sequence) ...
75	... (sequence) ...
76	... (sequence) ...
77	... (sequence) ...
78	... (sequence) ...
79	... (sequence) ...
80	... (sequence) ...
81	... (sequence) ...
82	... (sequence) ...
83	... (sequence) ...
84	... (sequence) ...
85	... (sequence) ...
86	... (sequence) ...
87	... (sequence) ...
88	... (sequence) ...
89	... (sequence) ...
90	... (sequence) ...
91	... (sequence) ...
92	... (sequence) ...
93	... (sequence) ...
94	... (sequence) ...
95	... (sequence) ...
96	... (sequence) ...
97	... (sequence) ...
98	... (sequence) ...
99	... (sequence) ...
100	... (sequence) ...