

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-513708

(P2022-513708A)

(43)公表日 令和4年2月9日(2022.2.9)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	Z N A 4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T 4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17	A
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全79頁)

(21)出願番号	特願2021-531685(P2021-531685)	(71)出願人	316005432 モルフォシス・アーゲー
(86)(22)出願日	令和1年12月4日(2019.12.4)		ドイツ・8 2 1 5 2・プラネック・ゼン
(85)翻訳文提出日	令和3年6月14日(2021.6.14)		メルヴァイシュトラッセ・7
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/083638	(74)代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87)国際公開番号	WO2020/115115	(74)代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87)国際公開日	令和2年6月11日(2020.6.11)	(74)代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦
(31)優先権主張番号	18210328.3	(72)発明者	アンドレアス ビュルトマン ドイツ連邦共和国 プラネック 8 2 1 5 2 , ヨーゼフ フォン ヒルシュ シュト ラーセ 4 6
(32)優先日	平成30年12月5日(2018.12.5)	(72)発明者	カリン フェルデラー
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
(81)指定国・地域	AP(BW,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,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重特異性抗原結合分子

(57)【要約】

異なる結合価を有する異なる抗原を、例えば、1つの抗原を一価で及び別の抗原を二価で標的化する能力を有する新規の抗原結合分子が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原結合分子であって、

- a) 第 1 の抗原に特異的に結合する第 1 の F v 領域を含む第 1 の F a b、
- b) 第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の F v 領域及び
- c) 第 3 の抗原に特異的に結合する第 3 の F v 領域を含む第 2 の F a b、並びに
- d) 第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットで構成される F c 領域を含み；
 - i . 前記第 1 の F a b の重鎖又は軽鎖の C 末端が、前記第 2 の F v 領域の V H 又は V L の N 末端に融合され、且つ
 - i i . 前記第 2 の F v 領域の V H 又は V L の C 末端が、前記第 1 の F c 領域サブユニットの N 末端に融合され、且つ前記第 2 の F c サブユニットの N 末端が、前記第 2 の F v 領域の相補的な可変ドメインの C 末端に融合され、且つ
 - i i i . 前記第 1 及び第 2 の F a b が、前記第 2 の F v 領域の別個の可変ドメインに融合されることを条件として、前記第 2 の F a b の重鎖又は軽鎖の C 末端が、前記第 2 の F v 領域の V H 又は V L の N 末端に融合され、且つ
 - i v . 前記第 1 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、366 位のスレオニン残基がトリプトファン残基と置き換えられ (T 3 6 6 W)、且つ 354 位のセリン残基がシステイン残基と置き換えられ (S 3 5 4 C)、且つ前記第 2 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、407 位のチロシン残基がバリン残基と置き換えられ (Y 4 0 7 V)、366 位のスレオニン残基がセリン残基と置き換えられ (T 3 6 6 S)、368 位のロイシン残基がアラニン残基と置き換えられ (L 3 6 8 A)、且つ 349 位のチロシン残基がシステイン残基と置き換えられる (Y 3 4 9 C) (E U インデックスに従う付番)、抗原結合分子。

【請求項 2】

各融合が、ペプチドリッカーを介して生じる、請求項 1 に記載の抗原結合分子。

【請求項 3】

前記抗原結合分子が、少なくとも 4 つのポリペプチドで構成され、

- a . 第 1 のポリペプチドが、前記第 1 の F a b の軽鎖又は重鎖を含み、
- b . 第 2 のポリペプチドが、その N 末端からその C 末端に
 - i . 前記第 1 の F a b の相補的な軽鎖又は重鎖、
 - i i . 前記第 2 の F v 領域の V H 又は V L 及び
 - i i i . 前記第 1 又は第 2 の F c 領域サブユニット
 を含み、
- c . 第 3 のポリペプチドが、その N 末端からその C 末端に
 - i . 前記第 2 の F a b の軽鎖又は重鎖、
 - i i . 前記第 2 の F v 領域の相補的な V H 又は V L 及び
 - i i i . 相補的な第 1 又は第 2 の F c 領域サブユニット
 を含み、
- d . 第 4 のポリペプチドが、前記第 2 の F a b の相補的な軽鎖又は重鎖を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4】

前記第 3 の抗原が、前記第 1 の抗原と同一である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 5】

前記抗原結合分子が、前記第 1 の抗原に対する二価の結合及び前記第 2 の抗原に対する一価の結合をもたらす、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 6】

前記抗原結合分子が、三価の二重特異性抗原結合分子である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 7】

前記第 2 の抗原が、免疫エフェクター細胞上で発現される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 8】

前記第 1 の抗原が、T 細胞受容体複合体のメンバーである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 9】

前記第 2 の抗原が、CD 3 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 10】

前記 Fc 領域が、ヒト IgG 1 Fc 領域である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

10

【請求項 11】

前記 Fc 領域が、前記第 1 及び第 2 の Fc 領域サブユニットの会合を促進する 1 つ以上のアミノ酸改変を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 12】

前記 Fc 領域サブユニットの各々において、ヒト IgG 1 における EU インデックスに従う付番を有する位置 L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 7、A 3 3 0、P 3 3 1 に相当する位置における少なくとも 5 個のアミノ酸残基が、それぞれ A、E、A、S、及び S に変異される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗原結合分子及び薬学的に許容される担体又は賦形剤を含む医薬組成物。

20

【請求項 14】

医薬における使用のための請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗原結合分子又は請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

T 細胞の細胞傷害活性を癌細胞にリダイレクトするための方法であって、T 細胞の存在下で前記癌細胞を請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗原結合分子と接触させることを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本開示は、少なくとも 2 つの異なる抗原に同時に結合できる新規の抗原結合分子を提供する。異なる結合価で 2 つの異なる抗原を（例えば、1 つの抗原を一価で及び 1 つの抗原を二価で）標的化する能力は、本明細書で開示される抗原結合分子の特に有用な態様である。本明細書に記載される新規の分子は、免疫グロブリンのヘテロ二量体 Fc 領域を利用することが好ましい。特に、治療のためにそのような抗原結合分子及びそのようなものを含む組成物を生成し且つ使用する方法もまた記載される。

【背景技術】

【0002】

2 つ以上の抗原に結合できる二重特異性抗体などの多重特異性抗原結合分子は、それらが、2 つ以上の標的抗原の同時の結合及び不活性化を可能にし、そのため従来の組合せ療法に対する代替の手法となるため、治療応用のために非常に興味深い。しかしながら、そのような多重特異性形式のための共通の標的として魅力的な多くの抗原に関して、少なくとも 1 つの抗原に対する好ましい結合は、二価ではなく一価である。

40

【0003】

通常免疫グロブリン抗体の二価の結合は、ある種の細胞表面受容体を架橋し、それにより天然のリガンドの効果を模倣することが見出されている。架橋は、受容体活性化（例えば、受容体リン酸化）を引き起こすことができる。対照的に、一価の結合（例えば、同じ抗体に由来する Fab の）は、受容体架橋を引き起こさず、適切なエピトープが標的化される場合、天然のリガンドが結合するのを妨げる。したがって、二価抗原結合はアゴニス

50

ト活性をもたらす可能性があるが、同じ抗原に対する一価の結合は、アンタゴニスト活性をもたらす可能性がある。そのような受容体の例は、インスリン受容体 (Kahn et al., Proc Natl Acad Sci USA. (1978) 75: 4209 - 13)、EGF受容体 (Schreiber et al., J Biol Chem. (1983) 258: 846 - 53)、EPO受容体 (Schneider et al, Blood (1997) 89: 473 - 82)、GH受容体 (Wan et al., Mol Endocrinol. (2003) 17: 2240 - 50) 又はベータ2 - アドレノセプター (Mijares et al., Mol Pharmacol. (2000) 58: 373 - 9) である。

【0004】

一価で共結合することが治療上有益であるか又は必要であり得る他の例示的な抗原としては、CD3などのT細胞受容体複合体のメンバー、低親和性Fcガンマ受容体 (FcγR)、トール様受容体 (TLR)、サイトカイン、ケモカイン、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体又は受容体 - チロシンキナーゼ (RTK) が挙げられる。

【0005】

三価IgG一本鎖可変フラグメント (scFv) 融合物 (例えば、Coloma & Morrison, Nat Biotechnol 15, 159 - 163 (1997) を参照のこと)、三価IgG様二重可変ドメイン (DVD) 抗体 (Wu et al., Nat Biotechnol 25, 1290 - 1297 (2007))、又は二価ラット/マウスハイブリッド二重特異性IgG (例えば、Lindhofer et al., J Immunol 155, 219 - 225 (1995) を参照のこと) を含む多数の多重特異性抗原結合形式が近年開発された。

【0006】

しかしながら、そのようなIgGに基づく手法の欠点は、それらが、多価 (例えば、二価) の様式で同時に標的化される抗原に結合し、したがって、潜在的な非特異的活性化及び関連する副作用を引き起こすという点である。これらのIgGに基づく多重特異性コンストラクトの生成はまた、抗体重鎖のホモ二量体化並びに/又は同時発現時の異なる特異性の抗体重鎖及び軽鎖の誤対合が、正確に会合したコンストラクトの収量を減少させ、所望のコンストラクトを分離するのが困難であり得るいくつかの非機能性の副生成物をもたらすため大きなハードルである。

【0007】

他方で、抗体コア構造 (IgA、IgD、IgE、IgG又はIgM) がもはや維持されていないいくつかの多重特異性抗原結合形式が開発された。例としては、ダイアボディ (例えば、Holliger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444 - 6448 (1995) を参照のこと)、タンデムscFv分子 (例えば、Bargou et al., Science 321, 974 - 977 (2008) を参照のこと)、及びその様々な誘導体が挙げられる。しかしながら、IgGコア構造を欠き且つ少なくとも1つの抗原に対する一価の結合をもたらすことができる抗原結合形式は、短い半減期及びエフェクター機能 (ADCC又はCDCなど) を媒介する能力がないなどのそれらの不十分な生理学的特性及び薬物動態特性のために、不利である場合が多い。

【0008】

国際公開第2016/086189号パンフレットは、IgG分子のいずれか1つのFabアームが一本鎖Fvドメインによって置き換えられるか (「ボトルオープナー」形式) 又は追加のFv又は一本鎖Fvドメインが、IgG分子の一方又は両方の重鎖のC末端に融合される、完全IgG分子に基づく様々な多重特異性二価及び三価抗体形式を開示している。1つの追加の理論的に記述される抗体形式は、第3の抗原結合部位を形成するためにIgGの2つのFabアームとFc領域の間に追加のFvドメインを組み込む「中央 - Fv」形式を指す。しかしながら、本出願は、記載されたコンストラクトが実際に機能することを実験的に証明するものではないし、2つのFc領域サブユニットの効率的なヘテ

10

20

30

40

50

ロ二量体化及び/又はエフェクター機能の消失に關与する、本開示の抗原結合分子で利用される特定のFc改変を組み合わせることを提案するものでもない。

【0009】

本明細書で開示される新規の抗原結合分子は、通常の全長免疫グロブリンによって提供される全ての望ましい特性を有する異なる抗原の同時の二価及び一価の共結合を可能にし、且つそれぞれの生産細胞株の培養上清からの精製が容易な形式を導入することによって、IgG及び非IgGに基づく抗原結合分子の前述の欠点を解決する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本開示は、少なくとも1つの抗原への一価の結合を可能にするが、サイズ及びFc領域の存在について通常の免疫グロブリン分子の特性を保持する新規の多重特異性抗原結合分子に関する。

【0011】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、1つの抗原に対する三価の結合を可能にする。そのような実施形態では、抗原結合分子は、少なくとも3つのFv領域を含み、各Fv領域は、同じ抗原に結合する。そのような実施形態では、本開示による抗原結合分子は、三価の単一特異性抗原結合分子を指す。

【0012】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、3つの異なる抗原に対する一価の結合を可能にする。そのような実施形態では、抗原結合分子は、少なくとも3つのFv領域を含み、3つのFv領域の各々は、1つの異なる抗原に結合する。そのような実施形態では、本開示による抗原結合分子は、三価の三重特異性抗原結合分子を指す。

【0013】

好ましい実施形態では、本開示による抗原結合分子は、1つの抗原に対する二価の結合及び第2の抗原に対する一価の結合を可能にする。そのような実施形態では、抗原結合分子は、少なくとも3つのFv領域を含み、3つのFv領域のうち2つは、2つの標的抗原のうち1つに結合し、第3のFv領域は、他の標的抗原に結合する。そのような好ましい実施形態では、本開示による抗原結合分子は、三価の二重特異性抗原結合分子を指す。

【0014】

したがって、ある実施形態では、本開示は、

- a) 第1の抗原に特異的に結合する第1のFv領域を含む第1のFab、
 - b) 第2の抗原に特異的に結合する第2のFv領域及び
 - c) 第3の抗原に特異的に結合する第3のFv領域を含む第2のFab、並びに
 - d) 第1及び第2のFc領域サブユニットで構成されるFc領域を含み；
- I. 第1のFabの重鎖又は軽鎖のC末端が、第2のFv領域のVH又はVLのN末端に融合され、且つ
- II. 第2のFv領域のVH又はVLのC末端が、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第2のFcドメインサブユニットのN末端が、第2のFv領域の相補的な可変ドメインのC末端に融合され、且つ
- III. 第1及び第2のFabが、第2のFv領域の別個の可変ドメインに融合されることを条件として、第2のFabの重鎖又は軽鎖のC末端が、第2のFv領域のVH又はVLのN末端に融合され、且つ
- IV. 第1のFc領域サブユニットのCH3ドメインにおいて、366位のスレオニン残基がトリプトファン残基と置き換えられ(T366W)、且つ354位のセリン残基がシステイン残基と置き換えられ(S354C)、且つ第2のFc領域サブユニットのCH3ドメインにおいて、407位のチロシン残基がバリン残基と置き換えられ(Y407V)、366位のスレオニン残基がセリン残基と置き換えられ(T366S)、368位のロイシン残基がアラニン残基と置き換えられ(L368A)、且つ349位のチロシン残基がシステイン残基と置き換えられる(Y349C)(EUインデックスに従う付番)、抗

10

20

30

40

50

原結合分子を提供する。

【0015】

ある実施形態では、第3の抗原は、第1又は第2の抗原と同一である。ある実施形態では、第3の抗原は、第1の抗原と同一である。ある実施形態では、第1のF a bは、第2のF a bと同一である。

【0016】

ある実施形態では、第2のF a bは、第2のF v領域に融合される。ある実施形態では、第2のF a bのC末端は、第2のF v領域のN末端に融合される。ある実施形態では、第1及び第2のF a bが、第2のF v領域の別個の可変ドメインに融合されることを条件として、第2のF a bの重鎖又は軽鎖のC末端は、第2のF v領域のV H又はV LのN末端に融合される。ある実施形態では、第1及び第2のF a bが、第2のF v領域の別個の可変ドメインに融合されることを条件として、第2のF a bのC H 1又はC LのC末端は、第2のF v領域のV H又はV LのN末端に融合される。

10

【0017】

ある実施形態では、それぞれの融合は、リンカーを介して生じる。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、同一であるか又は異なる。ある実施形態では、それぞれの融合は、各々が少なくとも1つのアミノ酸残基の長さを有するペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態では、それぞれの融合は、各々が少なくとも5つのアミノ酸残基の長さを有するペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、同一の長さである。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、異なる長さである。ある実施形態では、第1のF a bは、ペプチドリンカーを介して第2のF v領域に融合される。

20

【0018】

ある実施形態では、第1のF a bの重鎖又は軽鎖のC末端は、ペプチドリンカーを介して第2のF v領域のV H又はV LのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のF a bのC H 1又はC LのC末端は、ペプチドリンカーを介して第2のF v領域のV H又はV LのN末端に融合される。

【0019】

ある実施形態では、第2のF v領域は、ペプチドリンカーを介してF c領域に融合される。ある実施形態では、第2のF v領域は、2つのペプチドリンカーを介してF c領域に融合される。ある実施形態では、第2のF v領域のV H又はV LのC末端は、第1のペプチドリンカーを介して第1のF c領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第2のF c領域サブユニットのN末端は、第2のペプチドリンカーを介して第2のF v領域の相補的な可変ドメインのC末端に融合される。ある実施形態において、第1及び第2のペプチドリンカーは異なる。ある実施形態において、第1及び第2のペプチドリンカーは同一である。

30

【0020】

ある実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカーは、もう1つの鎖間ジスルフィド架橋を介して連結される。ある実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカーは、第1のペプチドリンカーと第2のペプチドリンカーの間での1つ以上の鎖間ジスルフィド架橋の形成を可能にする1つ以上のシステイン残基を含む。ある実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカーは、ジスルフィド架橋で安定化された二量体ペプチドリンカーをもたらす第1のペプチドリンカーと第2のペプチドリンカーの間での1つ以上の鎖間ジスルフィド架橋の形成を可能にする1つ以上のシステイン残基を含む。ある実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカーは、免疫グロブリンヒンジ、好ましくはI g Gヒンジ、好ましくはヒトI g Gヒンジ、好ましくはそのフラグメントのヒトI g G 1ヒンジに由来する。ある実施形態では、第2のF v領域のV H又はV Lと第1又は第2のF c領域サブユニットの間の融合は、I g Gヒンジ又はその部分若しくはフラグメントを含むペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態では、I g Gヒンジは、ヒトI g Gヒンジである。ある実施形態では、ヒトI g Gヒンジは、ヒトI g G 1ヒンジである。ある実施形態では、ヒ

40

50

ト I g G 1 ヒンジは、アミノ配列 D K T H T C P P C P (配列番号 13) を含む。ある実施形態では、第 2 の F v 領域と F c 領域の間の融合は、I g G ヒンジ領域又はその部分を介して生じる。

【0021】

ある実施形態では、第 1 の F a b、第 2 の F v 領域及び F c 領域は、ペプチドリンカーを介してそれらの融合パートナーの各々に融合される。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、同一であるか又は異なる。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、同一である。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、異なる。ある実施形態では、ペプチドリンカーの各々は、少なくとも 1 つのアミノ酸残基の長さを有する。ある実施形態では、ペプチドリンカーの各々は、少なくとも 5 つのアミノ酸残基の長さを有する。ある実施形態では、ペプチドリンカーの各々は、1 と 70 の間のアミノ酸残基の長さを有する。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、同一の長さである。ある実施形態では、ペプチドリンカーは、異なる長さである。

10

【0022】

ある実施形態では、ペプチドリンカーは、Q P K A A P (配列番号 12)、A S T K G P (配列番号 11)、(G 4 S)₃ (配列番号 33)、(G G S)₃ (配列番号 10)、D K T H T C P P C P (配列番号 13)、Q P K A A P D K T H T C P P C P (配列番号 15)、及び A S T K G P D K T H T C P P C P (配列番号 14) からなる群から選択されるが、これらに限定されない。

【0023】

ある実施形態では、第 2 の F v 領域の V H 及び V L は、鎖間ジスルフィド架橋を介して任意に連結される。ある実施形態では、第 2 の F v 領域の V H 及び V L は、鎖間ジスルフィド架橋を介して連結される。

20

【0024】

ある実施形態では、ジスルフィド架橋は、K a b a t に従う付番により以下の位置の間に導入される：

- a . V H 位置 4 4 と V L 位置 1 0 0、及び / 又は
- b . V H 位置 1 0 5 と V L 位置 4 3、及び / 又は
- c . V H 位置 1 0 1 と V L 位置 1 0 0。

【0025】

ある実施形態では、ジスルフィド架橋は、K a b a t に従う付番により当該位置の間に導入される：V H 位置 4 4 と V L 位置 1 0 0。ある実施形態では、ジスルフィド架橋は、K a b a t に従う付番により当該位置の間に導入される：V H 位置 1 0 5 と V L 位置 4 3。ある実施形態では、ジスルフィド架橋は、K a b a t に従う付番により当該位置の間に導入される：V H 位置 1 0 1 と V L 位置 1 0 0。ある実施形態では、第 2 の F a b は、ペプチドリンカーを介して第 2 の F v 領域に融合される。

30

【0026】

ある実施形態では、第 2 の F a b の重鎖又は軽鎖の C 末端は、ペプチドリンカーを介して第 2 の F v 領域の V H 又は V L の N 末端に融合される。ある実施形態では、第 2 の F a b の C H 1 又は C L の C 末端は、ペプチドリンカーを介して第 2 の F v 領域の V H 又は V L の N 末端に融合される。ある実施形態では、第 1 及び第 2 の F a b が、第 2 の F v 領域の別個の可変ドメインに融合されることを条件として、第 2 の F a b の C H 1 又は C L の C 末端は、第 2 の F v 領域の V H 又は V L の N 末端に融合され、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

40

【0027】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも 4 つのポリペプチドで構成される。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも 4 つのポリペプチドで構成され、

- a . 第 1 のポリペプチドは、第 1 の F a b の軽鎖又は重鎖を含み、
- b . 第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に

50

- i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖又は重鎖、
 - i i . 第 2 の F v 領域の V H 又は V L 及び
 - i i i . 第 1 又は第 2 の F c ドメインサブユニット
- を含み、
- c . 第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 - i . 第 2 の F a b の軽鎖又は重鎖、
 - i i . 第 2 の F v 領域の相補的な V H 又は V L 及び
 - i i i . 相補的な第 1 又は第 2 の F c ドメインサブユニット
- を含み、
- d . 第 4 のポリペプチドは、第 2 の F a b の相補的な軽鎖又は重鎖を含む。

10

【 0 0 2 8 】

ある実施形態では、第 1 のポリペプチドは、第 4 のポリペプチドと同一である。ある実施形態では、第 1 の F a b の軽鎖は、第 2 の F a b の軽鎖と同一である。ある実施形態では、第 1 の F a b の重鎖は、第 2 の F a b の重鎖と同一である。ある実施形態では、第 1 及び第 2 の F a b の重鎖及び軽鎖は、同一である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、図 1 B に示されるとおりの構造を有する。

【 0 0 2 9 】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 1、第 2 の抗原又は第 3 の抗原に対する一価の結合をもたらす。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 1 の抗原に対する一価の結合をもたらす。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 2 の抗原に対する一価の結合をもたらす。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 3 の抗原に対する一価の結合をもたらす。ある実施形態では、第 3 の抗原は、第 1 又は第 2 の抗原と同一である。ある実施形態では、第 3 の抗原は、第 1 の抗原と同一である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 1 の抗原に対する一価の結合及び第 2 の抗原に対する二価の結合をもたらす。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 1 の抗原に対する二価の結合及び第 2 の抗原に対する一価の結合をもたらす。

20

【 0 0 3 0 】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、二重特異性抗原結合分子である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、三価の二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 3 1 】

ある実施形態では、第 1 又は第 2 の抗原は、T 細胞受容体複合体のメンバーである。ある実施形態では、第 2 の抗原は、T 細胞受容体複合体のメンバーである。ある実施形態では、第 1 の抗原は、T 細胞受容体複合体のメンバーである。ある実施形態では、T 細胞受容体複合体のメンバーは、C D 3 である。ある実施形態では、第 1 の抗原は、C D 3 である。ある実施形態では、第 2 の抗原は、C D 3 である。

30

【 0 0 3 2 】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 1 の抗原に対する二価の結合及び第 2 の抗原に対する一価の結合をもたらす、第 2 の抗原は、C D 3 である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第 1 の抗原に対する一価の結合及び第 2 の抗原に対する二価の結合をもたらす、第 1 の抗原は、C D 3 である。

40

【 0 0 3 3 】

ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を提供し、F c 領域は、第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットの会合を促進する 1 つ以上のアミノ酸改変を含む。ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を提供し、各 F c 領域サブユニットは、第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットの会合を促進する 1 つ以上のアミノ酸改変を含む。ある実施形態では、各 F c 領域サブユニットは、ヘテロ二量体 F c 領域がホモ二量体 F c 領域より好適であるように異なるアミノ酸改変を含む。ある実施形態では、各 F c 領域サブユニットは、第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットの会合が促進されるように、異なるアミノ酸改変を含む。ある実施形態では、F c 領域は、免疫グロブリン F c 領域である。ある実施形態では、免疫グロブリン F c 領域は、I g G F c 領域である。ある実施形態では、I g G F c 領域

50

は、ヒト I g G F c 領域である。ある実施形態では、ヒト I g G F c 領域は、ヒト I g G 1 領域である。

【 0 0 3 4 】

ある実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 位のスレオニン残基はトリプトファン残基と置き換えられ (T 3 6 6 W)、且つ第 2 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、4 0 7 位のチロシン残基はバリン残基と置き換えられる (Y 4 0 7 V) (E U インデックスに従う付番)。ある実施形態では、第 2 の F c 領域サブユニットにおいて、3 6 6 位のスレオニン残基はセリン残基と置き換えられ (T 3 6 6 S)、且つ 3 6 8 位のロイシン残基はアラニン残基と置き換えられる (L 3 6 8 A) (E U インデックスに従う付番)。ある実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットにおいて、3 5 4 位のセリン残基はシステイン残基と置き換えられ (S 3 5 4 C)、且つ F c 領域の第 2 の F c 領域サブユニットにおいて、3 4 9 位のチロシン残基はシステイン残基によって置き換えられる (Y 3 4 9 C) (E U インデックスに従う付番)。

10

【 0 0 3 5 】

ある実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 位のスレオニン残基はトリプトファン残基と置き換えられ (T 3 6 6 W)、且つ 3 5 4 位のセリン残基はシステイン残基と置き換えられ (S 3 5 4 C)、且つ第 2 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、4 0 7 位のチロシン残基はバリン残基と置き換えられ (Y 4 0 7 V)、3 6 6 位のスレオニン残基はセリン残基と置き換えられ (T 3 6 6 S)、3 6 8 位のロイシン残基はアラニン残基と置き換えられ (L 3 6 8 A)、且つ 3 4 9 位のチロシン残基はシステイン残基と置き換えられる (Y 3 4 9 C) (E U インデックスに従う付番)。

20

【 0 0 3 6 】

ある実施形態では、F c 領域は、操作されていない F c 領域と比較するとき、F c 受容体及び / 又は C 1 q に対する改変された結合親和性を有し、且つ / 又は改変されたエフェクター機能を有するように操作される。ある実施形態では、操作された F c 領域は、操作されていない F c 領域と比較するとき、F c 受容体及び / 又は C 1 q に対するより高い結合親和性を有し、且つ / 又は増大されたエフェクター機能を有する。

【 0 0 3 7 】

ある実施形態では、操作された F c 領域は、操作されていない F c 領域と比較するとき、F c 受容体及び / 又は C 1 q に対するより低い結合親和性を有し、且つ / 又は低減されたエフェクター機能を有する。ある実施形態では、操作された F c 領域は、操作されていない F c 領域と比較するとき、F c 受容体及び / 又は C 1 q に対して実質的に結合親和性を有さず、且つ / 又は実質的にエフェクター機能を有しない。ある実施形態では、操作された F c 領域は、操作されていない F c 領域と比較するとき、F c 受容体及び / 又は C 1 q に対して結合親和性を有さず、且つ / 又はエフェクター機能を有しない。

30

【 0 0 3 8 】

ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を提供し、各 F c 領域サブユニットにおいて、ヒト I g G 1 における E U インデックスに従う付番を有する位置 L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 7、A 3 3 0、P 3 3 1 に相当する位置における 5 個のアミノ酸残基のうち少なくとも 1 つが変異される。ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を提供し、各 F c 領域サブユニットにおいて、ヒト I g G 1 における E U インデックスに従う付番を有する位置 L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 7、A 3 3 0、P 3 3 1 に相当する位置における 5 個のアミノ酸残基のうち少なくとも 1 つが変異され、且つ操作された F c 領域は、操作されていない F c 領域と比較するとき、F c 受容体及び / 又は C 1 q に対して実質的に結合親和性を有さず、且つ / 又は実質的にエフェクター機能を有しない。ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を提供し、各 F c 領域サブユニットにおいて、ヒト I g G 1 における E U インデックスに従う付番を有する位置 L 2 3 4、L 2 3 5、G 2 3 7、A 3 3 0、P 3 3 1 に相当する位置における 5 個のアミノ酸残基のうち少なくとも 1 つが、それぞれ A、E、A、S、及び S に変異される。ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を

40

50

提供し、各Fc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1におけるEUインデックスに従う付番を有する位置L234、L235、G237、A330、P331に相当する位置における5個のアミノ酸残基のうち少なくとも1つが、それぞれA、E、A、S、及びSに変異され、且つ操作されたFc領域は、操作されていないFc領域と比較するとき、Fc受容体及び/又はC1qに対して実質的に結合親和性を有さず、且つ/又は実質的にエフェクター機能を有しない。

【0039】

ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を提供し、Fc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1におけるEUインデックスに従う付番を有する位置L234、L235、G237、A330、P331に相当する位置における少なくとも5個のアミノ酸残基が、それぞれA、E、A、S、及びSに変異される。ある実施形態では、本開示は、抗原結合分子を提供し、Fc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1におけるEUインデックスに従う付番を有する位置L234、L235、G237、A330、P331に相当する位置における少なくとも5個のアミノ酸残基が、それぞれA、E、A、S、及びSに変異され、且つ操作されたFc領域は、操作されていないFc領域と比較するとき、Fc受容体及び/又はC1qに対して実質的に結合親和性を有さず、且つ/又は実質的にエフェクター機能を有しない。

10

【0040】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、ポリクローナル又はモノクローナル抗原結合分子である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、モノクローナル抗原結合分子である。

20

【0041】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、単離された抗原結合分子である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、組換え抗原結合分子である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、単離された組換え抗原結合分子である。

【0042】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を提供する。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、本開示による核酸組成物によってコードされる。ある実施形態では、本開示は、本開示による核酸組成物を含むベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、本開示によるベクター組成物を含む宿主細胞又は本開示による抗原結合分子をコードする本開示による核酸組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、本開示による核酸組成物を含む宿主細胞又は本開示によるベクター組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、宿主細胞を提供し、宿主細胞は、真核細胞、特に、哺乳動物細胞である。ある実施形態では、本開示は、宿主細胞を提供し、宿主細胞は、真核細胞である。ある実施形態では、本開示は、宿主細胞を提供し、宿主細胞は、哺乳動物細胞である。

30

【0043】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子を生成する方法であって、a) 抗原結合分子の発現に好適な条件下で本開示による宿主細胞を培養する工程及びb) 抗原結合分子を回収する工程を含む方法を提供する。ある実施形態では、本開示は、本明細書で開示される方法によって生成される抗原結合分子を提供する。

40

【0044】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、薬剤としての使用のための本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、疾患の治療における使用のための本開示による抗原結合分子又は本開示による医薬組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、必要とする個体における疾患の治療における使用のための本開示による抗原結合分子又は本開示による医薬組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、薬剤の製造のための本開示による抗原結合分子の使用を提供する。

50

ある実施形態では、本開示は、必要とする個体における疾患の治療のための薬剤の製造のための本開示による抗原結合分子の使用を提供する。ある実施形態では、本開示は、個体における疾患を治療する方法であって、前記個体に本開示による抗原結合分子を含む治療有効量の医薬組成物を投与することを含む方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】2つ又は3つのFv領域を含む本開示による二価又は三価の二重特異性抗原結合分子の設計。

【図1A】本開示による二価の二重特異性抗原結合分子の構造。構造は、第1のFv領域(Fv₁)によって形成される第1の結合部位を含む通常の免疫グロブリンに由来する1つのFabアーム(Fab₁)を含む。第2の抗原結合部位は、第2のFv領域(Fv₂)によって形成される。第2のFv領域(Fv₂)の各可変ドメイン(VH₂及びVL₂)は、ペプチドリンカーを介してFc領域サブユニットの1つのCH₂ドメインのC末端に融合される。2つのペプチドリンカーは、2つのリンカー(太いクロス・ストローク)間のジスルフィド架橋を安定化する構成を可能にする鎖間システインを含み得る。追加のペプチドリンカーは、第2のFv領域(Fv₂)のVH又はVL(VH₂及びVL₂)のN末端を第1のFabのCH₁又はCLと融合する。2つのFc領域サブユニットを含むポリペプチド鎖のヘテロ二量体化は、ジスルフィド安定化及びノブ・イントゥ・ホール技術の手法による各Fc領域サブユニットにおけるCH₃ドメインの改変によって促進される。加えて、第2のFv領域のVH₂/VL₂界面におけるジスルフィド安定化が適用され得る(示されない)。各Fc領域サブユニットにおけるCH₂ドメインはさらに、Fcに媒介されるエフェクター機能を促進するか又は無効にするために改変され得る(示されない)。

【図1B】第1のFab(Fab₁)、第2のFab(Fab)₂及び第2のFv領域(Fv₂)を含む本開示による三価の二重特異性抗原結合分子の構造。分子は、第1のFv領域(Fv₁)及び第3のFv領域(Fv₃)によって形成される第1及び第3の抗原結合部位を含む通常の免疫グロブリンに由来する2つのFabアームを含む。第2の抗原結合部位は、第2のFv領域(Fv₂)によって形成される。第2のFv領域(Fv₂)の各可変ドメイン(VH₂及びVL₂)は、ペプチドリンカーを介してFc領域サブユニットの1つのCH₂ドメインのC末端に融合される。ペプチドリンカーは、2つのリンカー(太いクロス・ストローク)間のジスルフィド架橋を安定化する構成を可能にする鎖間システインを含む。追加のペプチドリンカーは、第2のFv領域のVH₂及びVL₂のN末端を、それぞれ第1のFab及び第2のFabのCH₁又はCLのN末端と融合する。2つのFc領域サブユニットを含むポリペプチド鎖のヘテロ二量体化は、ジスルフィド安定化及びノブ・イントゥ・ホール技術の手法による各Fc領域サブユニットにおけるCH₃ドメインの改変によって促進される。加えて、第2のFv領域のVH₂/VL₂界面におけるジスルフィド安定化が適用され得る(示されない)。各Fc領域サブユニットにおけるCH₂ドメインはさらに、Fcに媒介されるエフェクター機能を促進するか又は無効にするために改変され得る(示されない)。

【図2】2つ又は3つのFv領域及び追加のIgG定常ドメインを含む本開示による二価又は三価の二重特異性抗原結合分子の設計。

【図2A】本開示による二価の二重特異性抗原結合分子の構造。分子は、第1のFv領域(Fv₁)によって形成される第1の結合部位を含む通常の免疫グロブリンに由来する1つのFabアームを含む。第2の抗原結合部位は、第3のFab(Fab₃)の第2のFv領域(Fv₂)によって形成される。第3のFabの重鎖及び軽鎖(それぞれCH₁又はCL)のC末端は、ペプチドリンカーを介してFc領域のCH₂ドメインのN末端に融合される。ペプチドリンカーは、2つのリンカー(太いクロス・ストローク)間のジスルフィド架橋を安定化する構成を可能にする鎖間システインを含む。追加のペプチドリンカーは、第2のFv領域のVH又はVLのN末端を、それぞれ第1のFabのCH₁又はCLのC末端と融合する。2つのFc領域サブユニットを含むポリペプチド鎖のヘテロ二量

10

20

30

40

50

体化は、ジスルフィド安定化及びノブ・イントゥ・ホール技術の手法による各Fc領域サブユニットにおけるCH3ドメインの改変によって促進される。加えて、第2のFv領域のVH₂/VL₂界面におけるジスルフィド安定化が適用され得る(示されない)。CH2ドメインはさらに、Fcに媒介されるエフェクター機能を促進するか又は無効にするために改変され得る(示されない)。

【図2B】第1のFab(Fab₁)、第2の(Fab₂)及び第3のFab(Fab₃)を含む本開示による三価の二重特異性抗原結合分子の構造。分子は、第1のFv領域(Fv₁)及び第3のFv領域(Fv₃)によって形成される第1及び第3の抗原結合部位を含む通常の免疫グロブリンに由来する2つのFabアーム(Fab₁及びFab₂)を含む。第2の抗原結合部位は、第3のFab(Fab₃)の第2のFv領域(Fv₂)によって形成される。第1及び第3のFabの定常ドメイン(それぞれCH1又はCL)のC末端は、ペプチドリンカーを介してFc領域のそれぞれのCH2ドメインのN末端に融合される。ペプチドリンカーは、2つのリンカー(太いクロス・ストローク)間のジスルフィド架橋を安定化する構成を可能にする鎖間システインを含む。追加のペプチドリンカーは、第2のFv領域(Fv₂)のVH又はVLのN末端を、それぞれ第1のFab及び第2のFabのCH1又はCLのC末端と融合する。2つのFc領域サブユニットを含むポリペプチド鎖のヘテロ二量体化は、ジスルフィド安定化及びノブ・イントゥ・ホール技術の手法による各Fc領域サブユニットにおけるCH3ドメインの改変によって促進される。加えて、第2のFv領域のVH/VL界面におけるジスルフィド安定化が適用され得る(示されない)。CH2ドメインはさらに、Fcに媒介されるエフェクター機能を促進するか又は阻害するために改変され得る(示されない)。

【図3】図1Bに示されるとおりの構造を有する本開示による5種の哺乳動物で生成及び精製された二重特異性三価抗原結合分子の、HER2への二価結合及びCD3(コンストラクト1、3、4)への一価結合並びに陰性対照(コンストラクト5)による細胞結合。図3Aは、フローサイトメトリーにより決定されたコンストラクト濃度に応じたCD3陽性Jurkat細胞に対する細胞結合(バックグラウンドを超えるシグナル)を示す。図3Bは、図3Aと同じものを示し、HER2陽性ヒト腺癌SKOV-3細胞に対する結合が示される点で異なる。

【図4】NFATレポーター遺伝子コンストラクトで一過的にトランスフェクトされたJurkat細胞を代替のエフェクター細胞として使用するNFATレポーター遺伝子アッセイにおける、HER2に対する二価の結合及びCD3(コンストラクト1、3、4)に対する一価の結合を有する図1Bに示される構造を有する本開示による二重特異性三価抗原結合分子並びに陰性対照(コンストラクト5)の機能的活性の評価。標的細胞として、HER2陽性ヒト腺癌SKOV-3又はHER2陰性ヒト腺癌MDA-MB-468細胞株のいずれかが使用される。図4Aは、コンストラクト濃度に応じたSKOV-3細胞の相対的な蛍光を示すグラフである。図4Bは、コンストラクト濃度に応じたMDA-MB-468細胞の相対的な蛍光を示すグラフである。

【図5】ヒト由来PBMCの存在下でのHER2発現SKBR3細胞又はHER2陰性MDA-MB-468細胞のいずれかに対する、HER2に対する二価の結合及びCD3(コンストラクト1、3、4)に対する一価の結合を有する図1Bに示される構造を有する本開示による二重特異性三価抗原結合分子又は陰性対照(コンストラクト5)の細胞傷害性アッセイ。PBMCの細胞傷害活性は、組み込まれたCellToxGreen蛍光を測定することによって評価される。コンストラクト濃度に応じたHER2発現SKBR3細胞及びHER2陰性MDA-MB-468細胞の相対的な蛍光を示すグラフ。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本開示は、2つ以上の抗原に同時に共結合するのに適している抗原結合分子に関する。

【0047】

定義

本明細書で使用する場合、用語「含む(comprising)」、「含む(compr

10

20

30

40

50

ises)」及び「～で構成される (comprised of)」は、「含む (including)」、「含む (includes)」若しくは「含有する (containing)」、「含有する (contains)」、又は「～で構成される (composed of)」と同義であり、包括的又はオープンエンドであり、且つ追加の列挙されていないメンバー、要素又は方法の工程を排除しない。

【0048】

本明細書で使用する場合、用語「ポリペプチド」は、アミノ酸残基のポリマーを指し、特定の長さの生成物を指さない。本用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに適用される。別段の指示がない限り、ポリペプチドの特定のアミノ酸配列もまた、その保存的に改変されたバリエーション (例えば、アミノ酸残基を類似の構造及び/又は化学的特性を有する別のアミノ酸残基と置き換えることによる) を暗示的に包含する。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来してもよいし、組換え技術によって生成されてもよいが、必ずしも設計された核酸配列から翻訳されるわけではない。それは、化学合成を含む任意の様式で作製されてもよい。

10

【0049】

本明細書で使用する場合、用語「抗原結合分子」は、最も広い意味では、少なくとも1つの抗原に特異的に結合するタンパク質性分子を指す。抗原結合分子は、1つ以上のポリペプチドで構成され得る。抗原結合分子の例は、免疫グロブリン並びにその誘導体及び/又はフラグメントである。本開示による抗原結合分子は、2つのFabアームとFc領域の間に追加のFv領域を組み込む通常の免疫グロブリン (例えば、IgG) 構造に基づく。本明細書で開示されるとおりの抗原結合分子はまた、通常のIgGの2つのFabアームの1つを欠いてもよい。そのような実施形態では、追加のFv領域が、通常の免疫グロブリン構造の1つのFabとFc領域の間に組み込まれる。他のタンパク質性抗原結合分子としては、アフィボディ (プロテインAのZ-ドメインを含む) などの抗体様特性を有する骨格、免疫タンパク質 (Immunoglobulin G など)、チトクロムb562、アンキリンリピート、PDZドメイン若しくはKunitzドメインを含むタンパク質、昆虫デフェンシンA、サソリ毒 (カリプトトキシン又はCTL A-4 など)、ノッチン (Mint-23、ネオカルチノスタチン、CBM4-2又はテングミスタットなど)、アンチカリン又はアルマジロリピートタンパク質が挙げられる。

20

【0050】

本明細書で使用する用語「抗体」分子又は「免疫グロブリン」(Ig) 分子は、抗原と相互作用する、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含むタンパク質を指す。各重鎖(HC)は、重鎖可変ドメイン (本明細書中でVHと略記される) 及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、CH1、CH2及びCH3という3つのドメインで構成される。各軽鎖(LC)は、軽鎖可変ドメイン (本明細書中でVLと略記される) 及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、CLという1つのドメインで構成される。VH及びVLドメインは、フレームワーク領域 (FR) と称される、より保存されている領域が挿入された、相補性決定領域 (CDR) と称される超可変領域にさらに細分することができる。VH及びVLはそれぞれ、次の順でN末端からC末端に整列した、3つのCDR及び4つのFRで構成される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4。重鎖及び軽鎖 (VH及びVL) の可変ドメインは、抗原と相互作用する「結合部位」又は「抗原結合部位」を含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの宿主組織への結合、又は免疫系の様々な細胞 (例えば、エフェクター細胞) 及び古典的補体系の第1の成分 (C1q) を含む因子への結合を媒介し得る。用語「抗体」は、例えば、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、ラクダ化抗体及びキメラ抗体を含む。抗体は、任意のアイソタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2) 又はサブクラスのものであり得る。軽鎖及び重鎖は両方ともに、構造的及び機能的相同性の領域に分けられる。

30

40

【0051】

50

本明細書で使用する場合、用語「抗体フラグメント」は、抗原と（例えば、結合、立体障害、安定化空間分布によって）特異的に相互作用する能力を保持する抗体の1つ以上の部分を指す。抗体フラグメントの例としては、V L、V H、C L及びC H 1ドメインからなるF a b、一価フラグメントが挙げられるが、これらに限定されず、F a b重鎖（H C）は、V H及びC H 1ドメイン（V H - C H 1）によって形成され、且つF a b軽鎖は、相補的なV L及びC Lドメイン（V L - C L）によって形成される。したがって、F a b重鎖及びF a b軽鎖は、互いに相補的である；ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのF a bを含むF（a b）₂、二価フラグメント；V H及びC H 1ドメインからなるF dフラグメント；1つのV L及び1つのV Hドメインの二量体からなるF vフラグメント又はF v領域。したがって、F vフラグメント又はF v領域のV H及びV Lドメインは、互いに相補的である；V Hドメインからなるd A bフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341: 544 - 546）；及び単離された相補性決定領域（C D R）。さらに、F vフラグメント又はF v領域、V L及びV Hの2つの可変ドメインは別々の遺伝子でコードされるが、それらは、それらがV L及びV H領域が一価分子（本明細書で「一本鎖F v」又は「s c F v」と称される；例えば、Bird et al., (1988) Science 242: 423 - 426；及びHuston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 5879 - 5883を参照のこと）を形成するように対をなす単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって、組換え法を用いて連結され得る。そのような一本鎖抗体はまた、用語「抗体フラグメント」の中に包含されるものとする。これらの抗体フラグメントは、当業者に知られている従来の技術を使用して得られ、フラグメントは、インタクトな抗体と同じ様式で有用性についてスクリーニングされる。抗体フラグメントはまた、単一ドメイン抗体、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v - N A R、及びビス - s c F vに組み込むことができる（例えば、Hollinger及びHudson, (2005), Nature Biotechnology, 23: 1126 - 1136を参照のこと）。抗体フラグメントは、I I I型フィブロネクチン（F n 3）などのポリペプチドに基づく骨格に移植することができる（フィブロネクチンポリペプチドモノボディについて記載する米国特許第6,703,199号明細書を参照のこと）。抗体フラグメントは、相補的な軽鎖ポリペプチドとともに抗原結合部位の対を形成する、タンデムF vセグメント（V H - C H 1 - V H - C H 1）の対を含む一本鎖分子に組み込むことができる（Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8: 1057 - 1062；及び米国特許第5,641,870号明細書）。

【0052】

「F vフラグメント」又は「F v領域」は、1つのV L及び1つのV Hドメインの二量体からなる一価抗体フラグメントである。したがって、F vフラグメント又はF v領域のV H及びV Lドメインは、互いに相補的である。

【0053】

「F a b」又は「F a bフラグメント」は、V L、V H、C L及びC H 1ドメインからなる一価抗体フラグメントである。F a b重鎖は、1つのV H及び1つのC Hドメイン（V H - C H 1）からなり、F a b軽鎖は、1つのV L及び1つのC Lドメイン（V L - C L）からなる。したがって、F a b重鎖及びF a b軽鎖は、互いに相補的である。

【0054】

本明細書で使用する場合、免疫グロブリン（I g）「ヒンジ」という用語は、免疫グロブリンの二量体「ヒンジ領域」を形成する2つのポリペプチドの1つを指す。ヒンジは、C H 1ドメインをC H 2ドメインに結合する免疫グロブリン重鎖の部分を含む。したがって、天然に存在する免疫グロブリンは2つの同一のヒンジで構成され、これらは、2つのヒンジ中に存在する鎖間システインを通して形成される1つ以上のジスルフィド架橋を介して連結される。言い換えると、天然に存在する免疫グロブリンは、二量体のジスルフィド安定化ヒンジ領域で構成され、これは免疫グロブリンの2つのF a bアームをF c領域に

結合する。ヒンジは、3つの異なるドメイン：上部、中間、及び下部ヒンジに細分され得る (Roux et al., J. Immunol. 1998 161:4083)。

【0055】

本明細書で使用する場合、用語「Fc領域」は、互いに安定な会合を可能にし、それにより免疫グロブリンの二量体C末端領域を形成する2つのFc領域サブユニットを指す。したがって、2つのFc領域サブユニット(例えば、第1、第2のFc領域サブユニット)は互いに相補的である。通常のIgG分子の(及び本開示による抗原結合分子の)Fc領域は、二量体として存在し、その各サブユニットは、CH2及びCH3 IgG重鎖定常ドメインを含む。Fc領域の2つのサブユニットは、互いに安定な会合が可能である。

【0056】

本明細書で使用する場合、「Fc領域サブユニット」は、本開示による免疫グロブリン又は抗原結合分子、すなわち、安定な自己会合が可能な免疫グロブリン重鎖のC末端定常領域を含むポリペプチドの二量体Fc領域を形成する2つのポリペプチドの1つを指す。したがって、二量体Fc領域を形成する2つのFc領域サブユニット(例えば、第1、第2のFc領域サブユニット)は互いに相補的である。例えば、IgG Fc領域サブユニットは、IgG CH2及びIgG CH3定常ドメインを含む。本用語は、天然の配列のFc領域サブユニット及びバリエーションFc領域サブユニットを含む。IgG重鎖のFc領域サブユニットの境界は、わずかに変動する可能性があるが、ヒトIgG重鎖Fc領域サブユニットは通常、Cys226、又はPro230から重鎖のC末端に及ぶように定義される。しかしながら、Fc領域サブユニットのC末端リジン(Lys447)は、存在してもよいし、存在しなくてもよい。本明細書で別段の指定がない限り、Fc領域におけるアミノ酸残基の付番は、Kabata et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるとおりのEUインデックスとも呼ばれるEU付番方式に従う。

【0057】

本明細書で使用する場合、「ヒト抗体」又は「ヒト抗体フラグメント」は、フレームワーク領域及びCDR領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体及び抗体フラグメントを含む。さらに、抗体が定常領域を有する場合、定常領域もそのような配列に由来する。ヒト起源は、例えば、ヒト生殖系列の配列、若しくはヒト生殖系列の配列の変異型、又は例えば、Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57-86)において記載されるとおりのヒトフレームワーク配列分析から導出されたコンセンサスフレームワーク配列を含有する抗体を含む。免疫グロブリン可変ドメイン、例えば、CDRの構造及び位置は、よく知られる付番スキーム、例えば、Kabata付番スキーム、Chothia付番スキーム、又はKabata及びChothiaの組合せ(例えば、Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabata et al.; Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948); Kabata et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; and Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273:927-948を参照のこと)を使用して定義され得る。ヒト抗体及びヒト可変領域はまた、それぞれの系がフレームワーク及びCDR領域の両方がヒト起源の配列に由来する可変領域を有する抗体をもたらすのであれば、合成ライブラリー又はトランスジェニック

10

20

30

40

50

クマウス（例えば、xenomouse）から単離され得る。

【0058】

用語「キメラ抗体」又は「キメラ抗体フラグメント」は、ある種において見出される配列及び別の種に由来する可変抗体領域に由来するか、又はそれに対応する定常抗体領域を有する抗体として本明細書で定義される。好ましくは、定常抗体領域は、ヒトにおいて見出される配列に由来するか、又はそれに対応し、且つ可変抗体領域（例えば、VH、VL、CDR又はFR領域）は、非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ又はハムスターにおいて見出される配列に由来する。

【0059】

「ヒト化抗体」又は「ヒト化抗体フラグメント」は、ヒト起源の配列に由来する定常抗体領域及び可変抗体領域若しくはその部分を有するか、又はCDRのみが別の種に由来する抗体分子として本明細書で定義される。ヒト化は、(a)非ヒト（例えば、ドナー抗体）CDRをヒト（例えば、レシピエント抗体）フレームワーク及び定常領域に決定的なフレームワーク残基（例えば、良好な抗原結合親和性又は抗体機能を保持するのに重要であるもの）の保持の有り無し両方でグラフトすること、(b)非ヒト特異性決定領域（SDR又はa-CDR；抗体-抗原相互作用に重大な意味を持つ残基）のみをヒトフレームワーク及び定常領域にグラフトすること、又は(c)非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、それらを表面残基の置き換えによってヒト様区画で「覆い隠す」ことを含むが、これらに限定されない様々な方法によって達成され得る。ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008)において概説され、且つ例えば、Riechman et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); 米国特許第5,821,337号明細書、同第7,527,791号明細書、同第6,982,321号明細書、及び同第7,087,409号明細書; Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al, Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005) (SDR(a-CDR)グラフティングを記載している); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (「リサーフェシング」を記載している); Dall'Acqua et al, Methods 36, 43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記載している); 並びにOsborn et al, Methods 36, 61-68 (2005)及びKlimka et al, Br J Cancer 83, 252-260 (2000) (FRシャッフリングに対する「誘導型選択」手法を記載している)においてさらに記載される。

【0060】

用語「単離された」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子を実質的に含まない、例えば、抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子であり得る化合物を指す。さらに、単離された抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含み得ない。したがって、いくつかの実施形態では、提供される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、異なる特異性を有する抗体又は抗原結合分子から分離された、単離された抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子である。単離された抗体又は抗原結合分子は、モノクローナル抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子であり得る。単離された抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、組換えモノクローナル抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子であり得る。しかしながら、標的のエピトープ、アイソフォーム又はバリエーションに特異的に結合する単離された抗

体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、例えば、他の種（例えば、種ホモログ）由来の他の関連抗原に対する交差反応性を有し得る。

【0061】

本明細書で使用する場合、用語「組換え抗体」、「組換え抗体フラグメント」又は「組換え抗原結合分子」は、天然に存在しない手段によって調製されるか、発現されるか、作製されるか又は分離される本開示による全ての抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子を含む。例えば、抗体又は抗原結合分子を発現するように形質転換された宿主細胞から単離された抗体又は抗原結合分子、組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから選択され且つ単離された抗体、及びヒト免疫グロブリン遺伝子の全て又は一部の配列を他のDNA配列にスプライシングすることを含む任意の他の手段によって調製されたか、発現されたか、作製されたか又は単離された抗体、又はヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニック又はトランスクロモソームの動物（例えば、マウス）又はそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体。好ましくは、そのような組換え抗体又は抗原結合分子は、フレームワーク領域及びCDR領域がヒト生殖系列の免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある種の実施形態では、そのような組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（又はヒトIg配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）にかけることができ、したがって、組換え抗体のVH領域及びVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH配列及びVL配列に由来し、それらと関係するが、インビボにおいてヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しない場合がある配列である。組換え抗体又は抗原結合分子は、組換えモノクローナル抗体又は組換えモノクローナル抗原結合分子であり得る。ある実施形態では、本明細書で開示される抗体及び抗体フラグメントは、両方が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第13/321,564号明細書又は米国特許第13/299,367号明細書に開示されるとおりのYlantia（登録商標）抗体ライブラリーから単離される。

10

20

【0062】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」、「モノクローナル抗体フラグメント」又は「モノクローナル抗原結合分子」は、任意の真核生物クローン、原核生物クローン、又はファージクローンを含む単一クローンに由来する本明細書で開示される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子を指し、それが生成される方法ではない。モノクローナル抗体又は抗体フラグメントは、Kohler et al; Nature, 256: 495 (1975)に記載されるとおりのハイブリドーマ法によって作製され得るか又はファージライブラリーから単離され得る。クローン細胞株及びそれによって発現される本明細書で開示されるとおりのモノクローナル抗体又は抗原結合分子の調製のための他の方法は、当該技術分野でよく知られている（例えば、Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel et al., eds., John Wiley and Sons, New Yorkにおける第11章を参照のこと）。

30

【0063】

用語「多重特異性」は、抗原結合分子が2つ以上の異なる抗原に特異的に結合できることを意味する。通常、多重特異性抗原結合分子は、各々が異なる抗原又はエピトープに特異的な2つ以上の抗原結合部位で構成される。用語「二重特異性」は、抗体又は抗原結合分子が2つの異なる抗原に特異的に結合できることを意味する。通常、二重特異性抗原結合分子は、各々が異なる抗原又はエピトープに特異的な2つの抗原結合部位を含む。

40

【0064】

本明細書で使用する場合、用語「特異的に～に結合する」、「～に特異的に結合する」、「～に特異的な」又は「特異的に認識する」などは、標的抗原と本明細書で開示される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子の間の結合などの測定可能且つ再現性のある相互作用を指し、これは、生体分子を含む分子の不均一な集団の存在下で標的抗原の存在を決定する。例えば、標的抗原（抗原又は抗原のエピトープであり得る）に特異的に結合する本明細書で開示される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、それが他の標的抗原

50

に結合するときより高い親和性、結合活性を有し、より容易に、且つ／又はより長い期間この標的に結合する抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子である。ある種の実施形態では、抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、異なる種に由来するタンパク質の中で保存されているタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態では、特異的な結合は、排他的な結合を含んでもよいが、必須ではない。本明細書で開示される抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、抗原に特異的に結合する。2つの分子が特異的に結合するかどうかを決定するための方法は、当該技術分野でよく知られており、例えば、標準的なELISAアッセイが挙げられる。スコア化は、標準的な発色現象（例えば、セイヨウワサビペルオキシドを有する二次抗体及び過酸化水素を有するテトラメチルベンジジン）によって実施され得る。特定のウェルにおける反応が、例えば、450nmでの吸光度によってスコア化される。典型的なバックグラウンド（＝陰性反応）は、0.1ODであり得る；典型的な陽性反応は、1ODであり得る。これは、陽性／陰性の差が5倍を超え得ることを意味する。通常、結合特異性の決定は、単一の参照抗体ではなく、ミルク粉末、BSA、トランスフェリンなどの3～5種の関連しない抗原のセットを使用して実施される。

【0065】

本明細書で使用する場合、用語「親和性」は、単一の部位におけるポリペプチドとその標的抗原の間の相互作用の強度を指す。各部位内では、ポリペプチドの結合部位が、多数の部位において、弱い非共有結合性の力を介してその標的と相互作用し；相互作用が大きいほど、親和性は強くなる。

【0066】

本明細書を使用する場合、用語「 K_D 」は、解離定数を指し、これは K_d と K_a の比（すなわち K_d / K_a ）から得られ、且つモル濃度（ M ）として表される。例えば、本明細書で開示されるとおりのモノクローナル抗体又はモノクローナル抗原結合分子のような抗原結合分子に関する K_D 値は、当該技術分野で十分に確立された方法を使用して決定され得る。例えば、本明細書で開示されるとおりのモノクローナル抗体又はモノクローナル抗原結合分子のような抗原結合分子の K_D を決定するための方法は、SET（溶解平衡滴定）又はBiacore（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを使用する表面プラズモン共鳴である。本開示において、抗原に特異的な本開示による抗体又は抗原結合分子は通常、抗原に関して $5 \times 10^{-2} M$ 未満、 $1 \times 10^{-2} M$ 未満、 $5 \times 10^{-3} M$ 未満、 $1 \times 10^{-3} M$ 未満、 $5 \times 10^{-4} M$ 未満、 $1 \times 10^{-4} M$ 未満、 $5 \times 10^{-5} M$ 未満、 $1 \times 10^{-5} M$ 未満、 $5 \times 10^{-6} M$ 未満、 $1 \times 10^{-6} M$ 未満、 $5 \times 10^{-7} M$ 未満、 $1 \times 10^{-7} M$ 未満、 $5 \times 10^{-8} M$ 未満、 $1 \times 10^{-8} M$ 未満、 $5 \times 10^{-9} M$ 未満、 $1 \times 10^{-9} M$ 未満、 $5 \times 10^{-10} M$ 未満、 $1 \times 10^{-10} M$ 未満、 $5 \times 10^{-11} M$ 未満、 $1 \times 10^{-11} M$ 未満、 $5 \times 10^{-12} M$ 未満、 $1 \times 10^{-12} M$ 未満、 $5 \times 10^{-13} M$ 未満、 $1 \times 10^{-13} M$ 未満、 $5 \times 10^{-14} M$ 未満、 $1 \times 10^{-14} M$ 未満、 $5 \times 10^{-15} M$ 未満、若しくは $1 \times 10^{-15} M$ 未満又はそれ以下の解離速度定数（ K_D ）（ k_{off} / k_{on} ）を有する。

【0067】

用語「エピトープ」は、本明細書で開示されるとおりの抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子、又はT細胞受容体によって特異的に認識されるか又はその他の方法で分子と相互作用するポリペプチド又はタンパク質上の部位（例えば、アミノ酸の連続した一続き又は連続的でないアミノ酸残基の異なる領域から構成される立体構造配置）を指す。一般に、エピトープは、アミノ酸又は炭水化物若しくは糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基であり、一般に、特定の三次元構造特性及び特定の電荷特性を有し得る。当業者によって理解されるとおり、事実上、抗体又は抗原結合分子が特異的に結合できるものであれば何れもエピトープになり得る。エピトープは、抗体又は抗原結合分子が結合するそれらの残基を含むことができ、且つ「線状」又は「立体構造的」であり得る。用語「線状エピトープ」は、タンパク質と相互作用分子（抗体など）の間の相互作用の点の全てが、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線的に生じる（連続的）エピトープを指す。用語「立

体構造的エピトープ」は、非連続的なアミノ酸残基が三次的な配座で集合しているエピトープを指す。立体構造的エピトープにおいて、相互作用の点は、互いに別個になっているタンパク質上のアミノ酸残基をまたがって生じる。例えば、エピトープは、ペプチドマッピング又はHDXによって示されるとおりの一続きのアミノ酸残基内の1つ以上のアミノ酸残基、又はX線結晶構造解析によって示されるとおりの1つ以上の個々のアミノ酸残基であり得る。

【0068】

「～と同じエピトープに結合する」は、特定の抗原に結合する抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子の能力及び抗体又は抗原結合分子を比較するための同じエピトープマッピング手法を使用するときの例示される抗体又は抗原結合分子と同じエピトープへの結合を意味する。例示される抗体、抗原結合分子、他の抗体及び抗原結合分子のエピトープは、エピトープマッピング手法を使用して決定され得る。エピトープマッピング手法は、当該技術分野でよく知られている。例えば、立体構造的エピトープは、例えば、水素/重水素交換、X線結晶構造解析及び二次元核磁気共鳴などによってアミノ酸の空間的立体構造を決定することによって、容易に同定される。

10

【0069】

本明細書で使用する場合、用語「操作された」又は「改変された」は、合成手段（例えば、組換え手法、インビトロペプチド合成、ペプチドの酵素的若しくは化学的カップリング又はこれらの手法のいくつかの組合せ）による核酸又はポリペプチドの操作を含む。好ましくは、本開示による抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子は、抗原結合、安定性、半減期、エフェクター機能、免疫原性、安全性などの1つ以上の特性を改善するように操作されるか又は改変される。

20

【0070】

本明細書で使用する場合、用語「価」は、抗原結合分子中の指定された数の抗原結合部位の存在を意味する。

【0071】

本明細書で使用する場合、Fab及び/又はFv領域、Fc領域サブユニットなどに関する用語「第1」及び「第2」は、構成要素の各々の種類が2つ以上存在するときに区別するために使用される。これらの用語の使用は、明示的に述べられない限り二重特異性抗原結合分子の特定の順序又は向きを与えることを意図しない。

30

【0072】

「第1及び第2のFc領域サブユニットの会合を促進する改変」は、ホモ二量体を形成する同一のポリペプチドを有するFc領域サブユニットを含むポリペプチドの会合を低減するか又は妨げるFc領域サブユニットのポリペプチド骨格又は翻訳後修飾の操作である。本明細書で使用されるとおりの会合を促進する改変は、特に、会合することが望まれる2つのFc領域サブユニット（すなわち、第1及び第2のFc領域サブユニット）の各々に対してなされる別々の改変を含み、改変は、2つのFc領域サブユニットの会合を促進するために互いに相補的である。例えば、会合を促進する改変は、Fc領域サブユニットの一方又は両方の構造又は電荷を変えて、それらの会合をそれぞれ立体的又は静電的に有利にし得る。したがって、ヘテロ二量体化は、サブユニットの各々に融合されたさらなる構成要素（例えば、Fab、Fv）が同じではないという意味で異なる可能性がある第1のFc領域サブユニットを含むポリペプチドと第2のFc領域サブユニットを含むポリペプチドの間で生じる。

40

【0073】

本明細書で使用する場合、「アミノ酸残基」又は「アミノ酸」は、それらの完全な名称によって又は標準的な3文字若しくは1文字のアミノ酸コードに従って示されることになる。「天然に存在するアミノ酸」は、以下のアミノ酸を意味する。

【0074】

50

【表 1】

表 1: 天然に存在するアミノ酸

アミノ酸	3 文字コード	1 文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

10

20

30

40

50

【0075】

本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸変異」は、アミノ酸置換、欠失、挿入、及び修飾を包含することを意味する。置換、欠失、挿入、及び修飾の任意の組合せは、最終コンストラクトが所望の特徴、例えば、Fc 受容体に対する結合の減少、又は別のペプチドとの会合の増加を有する限りなされてもよい。アミノ酸配列の欠失及び挿入は、アミノ酸残基のアミノ及び/又はカルボキシ末端での欠失及び挿入を含む。特定のアミノ酸変異は、アミノ酸置換である。アミノ酸置換は、天然に存在しないアミノ酸によるか又は 20 種の標準アミノ酸の天然に存在するアミノ酸誘導体による置き換えを含む。アミノ酸変異は、当該技術分野でよく知られる遺伝的又は化学的方法を使用して作製され得る。遺伝的方法は、部位特異的変異導入、PCR、遺伝子合成などを含んでもよい。化学修飾など、遺伝

子工学以外の方法によってアミノ酸残基の側鎖基を変化させる方法も有用であると考えられる。本明細書では、様々な名称を使用して、同じアミノ酸変位を示す場合がある。例えば、Fc領域の327位でのグリシン (glycine) からアラニンへの置換は、237A、G337、G337A、又はGly329Alaと示され得る。

【0076】

用語「ベクター」は、連結されている別のポリヌクレオチドを輸送できるポリヌクレオチド分子を指す。好ましいベクターは、それらが連結される核酸の自律複製及び/又は発現が可能なものである。ベクターの1つの型は、追加のDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。ベクターの別の型は、ウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントは、ウイルスゲノムにライゲートされ得る。ある種のベクターは、それらが導入される宿主細胞における自律複製が可能である(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクター及び哺乳動物ベクター)。他のベクターは、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ得るが、それにより宿主ゲノムとともに複製される。ベクターは、原核又は真核細胞に適合し得る。原核生物ベクターは通常、原核生物レプリコンを含み、これは、それとともに形質転換されたエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) などの細菌宿主細胞においてペプチドの発現(転写及び翻訳)を誘導できる原核生物プロモーターを含み得る。プロモーターは、RNAポリメラーゼの結合及び転写が起こることを可能にするDNA配列によって形成される発現制御エレメントである。細菌宿主と適合するプロモーター配列は通常、DNAセグメントの挿入のために便利な制限部位を含有するプラスミドベクター中に提供される。そのようなベクタープラスミドの例としては、市販のpUC8、pUC9、pBR322、並びにpBR329、pPL及びpKK223が挙げられる。「発現ベクター」は、それらが作動可能に連結される核酸の発現を誘導できるそれらのベクターであり、且つ同等の機能を果たすウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス)などの発現ベクターのそのような他の形態を含むことが意図される。発現ベクターは、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列(すなわち、コード領域)が、プロモーター及び/又は他の転写若しくは翻訳制御エレメントと作動可能な会合においてクローン化される発現カセットを含む。本明細書で使用する場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「停止コドン」(TAG、TGA、又はTAA)はアミノ酸に翻訳されないが、それは、存在する場合、コード領域の一部であると考えられる場合がある一方で、いずれかの隣接配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、5'及び3'非翻訳領域などは、コード領域の一部ではない。

【0077】

本明細書で使用する場合、用語「宿主細胞」は、本開示による抗原結合分子を生成するように操作され得るあらゆる種類の細胞系を指し、且つ(組換え発現)ベクターが導入されている細胞を指す。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も指すことが意図されることを理解すべきである。一定の改変が変異又は環境的影響のいずれかに起因して後続世代において生じ得るため、そのような子孫は、事実上、親細胞と同一であり得ないが、依然として本明細書において使用される用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。典型的な宿主細胞は、原核(*E. coli* (E. coli)を含むがこれに限定されない細菌性など)又は真核(酵母、哺乳動物細胞などを含む)である。細菌細胞は、好ましい原核宿主細胞であり、通常、例えば、Bethesda Research Laboratories, Inc., Bethesda, Mdから入手可能な*E. coli* (E. coli)株DH5などのエシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) (E. coli (E. coli))の株である。好ましい真核宿主細胞は、酵母並びにネズミ科及び齧歯類を含む哺乳動物細胞、好ましくは、マウス、ラット、サル又はヒト細胞株、例えば、HKB11細胞、PERC.6細胞、又はCHO細胞に由来するものなどの脊椎動物細胞を含む。

【0078】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する場合、用語「EC50」は、アッセイにおける反応をベースラインと最大値の間の中間に誘導する本明細書で開示されるとおりの抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子の濃度を指す。したがって、それは、最大効果の50%が観察される抗体又は抗原結合分子濃度を表す。

【0079】

用語「阻害」又は「阻害する」又は「低減」又は「低減する」又は「中和」又は「中和する」は、任意の表現型の特徴（結合、生物活性又は機能など）の減少若しくは休止又はその特徴の発生、程度、若しくは可能性の減少若しくは休止を指す。「阻害」、「低減」又は「中和」は、それが適切なアッセイを使用して検出可能である限り完全である必要はない。いくつかの実施形態では、「低減する」又は「阻害する」は、20%以上の減少をもたらす能力を意味する。別の実施形態では、「低減する」又は「阻害する」は、50%以上の減少をもたらす能力を意味する。さらに別の実施形態では、「低減する」又は「阻害する」は、75%、85%、90%、95%以上の全体的な減少をもたらす能力を意味する。

10

【0080】

用語「増加させる」又は「増強する」は、任意の表現型の特徴（結合、生物活性又は機能など）の増加又はその特徴の発生、程度、若しくは可能性の増加を指す。「増加させる」、「増強する」は、それが適切なアッセイを使用して検出可能である限り最大効果である必要はない。いくつかの実施形態では、「増加させる」又は「増強する」は、20%以上の増加をもたらす能力を意味する。別の実施形態では、「増加させる」又は「増強する」は、50%以上の増加をもたらす能力を意味する。さらに別の実施形態では、「増加させる」又は「増強する」は、75%、85%、90%、95%以上の全体的な増加をもたらす能力を意味する。

20

【0081】

本明細書で使用する場合、用語「アンタゴニストの」抗原結合分子は、抗原と相互作用し、且つ標的抗原の生物活性又は機能又は任意の他の表現型の特徴を部分的に又は完全に阻害するか又は中和する抗原結合分子を指す。

【0082】

本明細書で使用する場合、用語「アゴニストの」抗原結合分子は、抗原と相互作用し、且つ標的抗原の生物活性又は機能又は任意の他の表現型の特徴を増加させるか又は増強する抗原結合分子を指す。

30

【0083】

薬剤、例えば、医薬組成物の「有効量」は、投与される細胞又は組織における生理学的変化をもたらしに必要な量を指す。

【0084】

薬剤、例えば、医薬組成物の「治療有効量」は、所望の治療又は予防結果を達成するために必要な投与量及び期間で有効な量を指す。治療有効量の薬剤は、例えば、疾患の有害作用を消失させるか、減少させるか、遅らせるか、最小化するか又は予防する。

【0085】

用語「個体」又は「対象」は、哺乳動物を指す。

40

【0086】

用語「医薬組成物」は、その中に含有される活性成分の生物活性を有効にするような形態であり、その製剤が投与されることになる対象に許容できない毒性のある追加の成分を含有しない製剤を指す。

【0087】

用語「薬学的に許容される担体」は、対象に対して非毒性である活性成分以外の医薬組成物中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、緩衝液、賦形剤、安定剤、又は保存剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0088】

本明細書で使用する場合、「治療」、「治療する」又は「治療すること」などは、治療さ

50

れている個体の疾患の自然経過を変化させようとする臨床的介入を指し、予防のため又は臨床病理の経過中のいずれかで実施され得る。治療の望ましい効果としては、疾患の発生又は再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的又は間接的病理学的帰結の減少、転移の予防、疾患進行の速度の低下、疾患状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本開示による抗原結合分子は、疾患の発症を遅らせるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

【0089】

用語「エフェクター機能」は、本開示による抗体又は抗原結合分子のFc領域に起因する生物活性を指し、これらは抗体アイソタイプとともに変化する。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC)；Fc受容体結合及び抗体依存性細胞傷害(ADCC)；貪食作用；細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御；並びにB細胞活性化が挙げられる。

10

【0090】

「抗体依存性細胞傷害」又は「ADCC」は、特定の細胞傷害性細胞(例えば、NK細胞、好中球、及びマクロファージ)上に存在するFc受容体(FcR)上に結合した本開示による抗体又は抗原結合分子が、これらの細胞傷害性エフェクター細胞の抗原保有標的細胞に対して特異的に結合することを可能にし、その後標的細胞を細胞毒素で死滅させる細胞傷害性の一形態を指す。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現するが、一方で、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。

20

【0091】

「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、同族抗原に結合される本開示の(適切なサブクラスの)抗体又は抗原結合分子に対する補体系(C1q)の第一成分の結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載されるとおりのCDCアッセイが実施され得る。改変されたFc領域サブユニットアミノ酸配列(バリエーション又は改変されたFc領域サブユニットを有するポリペプチド)及びC1q結合能の増大又は低減を有するポリペプチドバリエーションは、例えば、米国特許第6,194,551号明細書及び国際公開第1999/51642号パンフレットにおいて記載される。例えば、Idusogie et al., J. Immunol. 164:4178-4184(2000)を参照されたい。

30

【0092】

実施形態

本開示は、2つ以上の(異なる)抗原に同時に共結合するのに適している抗原結合分子に関する。異なる結合価で2つ以上の異なる抗原を(例えば、1つの抗原を一価で及び1つの抗原を二価で)標的化する能力は、本明細書で開示される抗原結合分子の特に有用な態様である。

【0093】

本開示による抗原結合分子の個々の成分は、様々な構成で相互に使用され得る。例示的な構成は、図1及び2において示される。

40

【0094】

一般に、2つの主要なタイプの本明細書に記載されるとおりの抗原結合分子が存在する：
 a. 2つのFv領域を利用するタイプ。このタイプは、(I)2つの(異なる)抗原に対する同時の一価の結合又は(II)1つの抗原に対する二価の結合を可能にする。
 b. 3つのFv領域を利用するタイプ。このタイプは、(I)1の抗原に対する同時の二価の結合及び第2の抗原に対する一価の結合又は(II)1つの抗原に対する三価の結合を可能にする。

【0095】

多重特異性抗原結合分子

50

本開示による抗原結合分子は、2つ以上、好ましくは3つのFv領域で構成され得る。したがって、本分子は、二価又は三価の抗原結合分子として作用し得る。本開示による抗原結合分子の基本的な構造は、図1及び2において示される。

【0096】

二価抗原結合分子

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、2つのFv領域で構成される。これは、免疫グロブリン構造の保持されたFabアームとFc部分の間に追加のFv領域を組み込む通常の免疫グロブリン(例えば、IgG)抗体構造(2つのFabアームのうちの1つを欠く)を使用することによって得られる。

【0097】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、2つの異なる抗原に対する一価の結合を可能にする。そのような実施形態では、抗原結合分子は、少なくとも2つのFv領域を含み、1つのFv領域は第1の抗原に結合し、且つ他のFv領域は第2の抗原に結合する。そのような実施形態では、本開示による抗原結合分子は、二価の二重特異性抗原結合分子を指す。

10

【0098】

ある実施形態では、本開示は、

- a) 第1の抗原に特異的に結合する第1のFv領域を含む第1のFab、
- b) 第2の抗原に特異的に結合する第2のFv領域及び
- c) 第1及び第2のFc領域サブユニットで構成されるFc領域を含み；

20

I. 第1のFabの重鎖又は軽鎖のC末端が、第2のFv領域のVH又はVLのN末端に融合され、且つ

II. 第2のFv領域のVH又はVLのC末端が、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第2のFcドメインサブユニットのN末端が、第2のFv領域の相補的な可変ドメインのC末端に融合される、抗原結合分子に関する。

【0099】

ある実施形態では、第1のFabの重鎖のC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCH1のC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合される。ある実施形態では、融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

【0100】

ある実施形態では、第1のFabの重鎖のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCH1のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合される。ある実施形態では、融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

30

【0101】

ある実施形態では、第1のFabの軽鎖のC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCLのC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合される。

【0102】

ある実施形態では、融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態では、第1のFabの軽鎖のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合される。

40

【0103】

ある実施形態では、第1のFabのCLのC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合される。ある実施形態では、融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

【0104】

ある実施形態では、第2のFv領域のVHのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態では、第2のFv領域のVHのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態では、第2のFv領域のVLのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。ある実施形態

50

LのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVHのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

【0112】

ある実施形態では、第1のFabの重鎖のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCH1のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

10

【0113】

ある実施形態では、第1のFabの重鎖のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCH1のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

【0114】

ある実施形態では、第1のFabの軽鎖のC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVHのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCLのC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVHのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

20

【0115】

ある実施形態では、第1のFabの軽鎖のC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVHのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCLのC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVHのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

30

【0116】

ある実施形態では、第1のFabの軽鎖のC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCLのC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

【0117】

ある実施形態では、第1のFabの軽鎖のC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCLのC末端は、第2のFv領域のVHのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVLのC末端は、第2のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

40

【0118】

ある実施形態では、第1のFabの軽鎖のC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVHのC末端は、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合される。ある実施形態では、第1のFabのCLのC末端は、第2のFv領域のVLのN末端に融合され、且つ第2のFv領域のVHのC末端は、第1のFc領域サブユニット

50

ある実施形態では、第1のF a bの軽鎖のC末端は、第2のF v領域のV LのN末端に融合され、且つ第2のF v領域のV LのC末端は、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第2のF c領域サブユニットのN末端は、第2のF v領域のV HのC末端に融合される。ある実施形態では、第1のF a bのC LのC末端は、第2のF v領域のV LのN末端に融合され、且つ第2のF v領域のV LのC末端は、第1のF c領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第2のF c領域サブユニットのN末端は、第2のF v領域のV HのC末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

【0137】

ある実施形態では、第1のF a bの軽鎖のC末端は、第2のF v領域のV LのN末端に融合され、且つ第2のF v領域のV LのC末端は、第2のF c領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第1のF c領域サブユニットのN末端は、第2のF v領域のV HのC末端に融合される。ある実施形態では、第1のF a bのC LのC末端は、第2のF v領域のV LのN末端に融合され、且つ第2のF v領域のV LのC末端は、第2のF c領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第1のF c領域サブユニットのN末端は、第2のF v領域のV HのC末端に融合される。ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

10

【0138】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも3つのポリペプチドで構成され、

20

- a . 第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖又は重鎖を含み、
 - b . 第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に
 - i . 第1のF a bの相補的な軽鎖又は重鎖、
 - i i . 第2のF v領域のV H又はV L及び
 - i i i . 第1又は第2のF c領域サブユニット
- を含み、
- c . 第3のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に
 - i . 第2のF v領域の相補的なV H又はV L及び
 - i i . 相補的な第1又は第2のF c領域サブユニット
- を含む。

30

【0139】

ある実施形態では、第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖を含む。ある実施形態では、第1のポリペプチドは、第1のF a bの重鎖を含む。

【0140】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

- i . 第1のF a bの相補的な重鎖、
- i i . 第2のF v領域のV H及び
- i i i . 第1のF c領域サブユニット

を含む。

【0141】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

- i . 第1のF a bの相補的な重鎖、
- i i . 第2のF v領域のV L及び
- i i i . 第1のF c領域サブユニット

を含む。

40

【0142】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

- i . 第1のF a bの相補的な重鎖、
- i i . 第2のF v領域のV H及び
- i i i . 第2のF c領域サブユニット

50

を含む。

【 0 1 4 3 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V L 及び
 i i i . 第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 4 4 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V H 及び
 i i i . 第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

10

【 0 1 4 5 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V L 及び
 i i i . 第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 4 6 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V H 及び
 i i i . 第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

20

【 0 1 4 7 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V L 及び
 i i i . 第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

30

【 0 1 4 8 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F v 領域の相補的な V H 及び
 i i . 相補的な第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 4 9 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F v 領域の相補的な V H 及び
 i i . 相補的な第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

40

【 0 1 5 0 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F v 領域の相補的な V L 及び
 i i . 相補的な第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 5 1 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F v 領域の相補的な V L 及び
 i i . 相補的な第 2 の F c 領域サブユニット

50

を含む。

【0152】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも3つのポリペプチドで構成され、

- a. 第1のポリペプチドは、第1のFabの軽鎖を含み、
- b. 第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に
 - i. 第1のFabの相補的な重鎖、
 - ii. 第2のFv領域のVL及び
 - iii. 第1のFc領域サブユニット

を含み、

- c. 第3のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に
 - i. 第2のFv領域の相補的なVH及び
 - ii. 相補的な第2のFc領域サブユニット

を含む。

【0153】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも3つのポリペプチドで構成され、

- a. 第1のポリペプチドは、第1のFabの軽鎖を含み、
- b. 第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に
 - i. 第1のFabの相補的な重鎖、
 - ii. 第2のFv領域のVH及び
 - iii. 第1のFc領域サブユニット

を含み、

- c. 第3のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に
 - i. 第2のFv領域の相補的なVL及び
 - ii. 相補的な第2のFc領域サブユニット

を含む。

【0154】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、3つのポリペプチドで構成される。

【0155】

前述の実施形態によれば、第1のFv領域及び第2のFv領域は、異なる抗原特異性であってもよく、当該技術分野で知られる二重特異性抗体形式のものとは異なる2つのFv領域の間の結合構造及び距離を可能にする配置で互いに融合される。

【0156】

本開示による抗原結合分子は、それが結合する抗原の少なくとも1つに対する一価の結合をもたらす。一価の結合は、標的抗原の内部移行が抗原結合分子の二価の結合後に生じる状況において、望ましいか又は必要となる場合がある。そのような場合において、1つの標的抗原に対する二価の結合は、抗原の内部移行を増強し、それによりその利用可能性を低減する可能性がある。さらに、一価の結合は、標的抗原の架橋が望ましくない場合に必須である。例えば、受容体チロシンキナーゼなどのある種の標的クラスに対する二価の結合は、受容体活性化というよりも不活性化を引き起こす天然のリガンドの機能を模倣する場合がある。

【0157】

本開示による抗原結合分子に存在する配置は、二重特異性抗原結合分子がT細胞結合及びリダイレクションのために使用されることになる場合、必要に応じて、T細胞と標的細胞の間の免疫シナプスを模倣するのに特に適している。活性化T細胞抗原(CD3など)に対する一価の結合を確実にすることは、標的細胞の非存在下での前記T細胞の活性化のリスクを最小化する。

【0158】

しかしながら、標的抗原に対する二価の結合はまた、ある種の状況において、例えば、結

10

20

30

40

50

合親和性を増大させ且つ標的化を最適化するために望ましい場合がある。

【0159】

三価抗原結合分子

ある好ましい実施形態では、本開示による抗原結合分子は、3つのFv領域で構成される。これは、通常の免疫グロブリン構造の2つのFabアームとFc部分の間に追加のFv領域を組み込む通常の免疫グロブリン（例えば、IgG）抗体構造（2つのFv領域を形成する会合した2つの軽鎖を伴う2つの重鎖）を使用することによって得られる。

【0160】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第3の抗原に特異的に結合する第3のFv領域を含む第2のFabを含む。

10

【0161】

ある実施形態では、第3の抗原は、第1又は第2の抗原と同一である。ある実施形態では、第3の抗原は、第1の抗原と同一である。ある実施形態では、第3の抗原は、第2の抗原と同一である。

【0162】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第1又は第2の抗原に特異的に結合する第3のFv領域を含む第2のFabを含む。

【0163】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第1の抗原に特異的に結合する第1のFv領域を含む第1のFab、第3の抗原に特異的に結合する第3のFv領域及び第2の抗原に特異的に結合する第2のFv領域を含む第2のFabを含む。ある実施形態では、第3の抗原は、第1又は第2の抗原と同一である。ある実施形態では、第3の抗原は、第1の抗原と同一である。

20

【0164】

ある実施形態では、第2のFabは、第2のFv領域に融合される。ある実施形態では、第2のFabのC末端は、第2のFv領域のN末端に融合される。ある実施形態では、第2のFabは、ペプチドリンカーを介して第2のFv領域に融合される。

【0165】

ある実施形態では、本開示は、

a) 第1の抗原に特異的に結合する第1のFv領域を含む第1のFab、

30

b) 第2の抗原に特異的に結合する第2のFv領域及び

c) 第3の抗原に特異的に結合する第3のFv領域を含む第2のFab、並びに

d) 第1及び第2のFc領域サブユニットで構成されるFc領域を含み；

I. 第1のFabの重鎖又は軽鎖のC末端が、第2のFv領域のVH又はVLのN末端に融合され、且つ

II. 第2のFv領域のVH又はVLのC末端が、第1のFc領域サブユニットのN末端に融合され、且つ第2のFcドメインサブユニットのN末端が、第2のFv領域の相補的な可変ドメインのC末端に融合され、且つ

III. 第1及び第2のFabが、第2のFv領域の別個の可変ドメインに融合されることを条件として、第2のFabの重鎖又は軽鎖のC末端が、第2のFv領域のVH又はVLのN末端に融合される、抗原結合分子を提供する。

40

【0166】

ある実施形態では、それぞれの融合は、ペプチドリンカーを介して生じる。

【0167】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、3つ以下のFvドメインを含む。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、3つのFv領域からなる。

【0168】

ある実施形態では、第1及び第2のFabが、第2のFv領域の別個の可変ドメインに融合されることを条件として、第2のFabのCH1又はCLのC末端は、第2のFv領域のVH又はVLのN末端に融合される。

50

【 0 1 7 6 】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも4つのポリペプチドで構成され、

a . 第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖又は重鎖を含み、

b . 第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

i . 第1のF a bの相補的な軽鎖又は重鎖、

i i . 第2のF v領域のV H又はV L及び

i i i . 第1又は第2のF cドメインサブユニット

を含み、

c . 第3のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

i . 第2のF a bの軽鎖又は重鎖、

i i . 第2のF v領域の相補的なV H又はV L及び

i i i . 相補的な第1又は第2のF cドメインサブユニット

を含み、

d . 第4のポリペプチドは、第2のF a bの相補的な軽鎖又は重鎖を含む。

【 0 1 7 7 】

ある実施形態では、第1のポリペプチドは、第1のF a bの軽鎖を含む。ある実施形態では、第1のF a bの軽鎖は、第1のF a bのV L及びC Lを含む。ある実施形態では、第1のポリペプチドは、第1のF a bの重鎖を含む。ある実施形態では、第1のF a bの重鎖は、第1のF a bのV H及びC H 1を含む。

【 0 1 7 8 】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

i . 第1のF a bの相補的な重鎖、

i i . 第2のF v領域のV H及び

i i i . 第1のF c領域サブユニット

を含む。

【 0 1 7 9 】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

i . 第1のF a bの相補的な重鎖、

i i . 第2のF v領域のV L及び

i i i . 第1のF c領域サブユニット

を含む。

【 0 1 8 0 】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

i . 第1のF a bの相補的な重鎖、

i i . 第2のF v領域のV H及び

i i i . 第2のF c領域サブユニット

を含む。

【 0 1 8 1 】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

i . 第1のF a bの相補的な重鎖、

i i . 第2のF v領域のV L及び

i i i . 第2のF c領域サブユニット

を含む。

【 0 1 8 2 】

ある実施形態では、第2のポリペプチドは、そのN末端からそのC末端に

i . 第1のF a bの相補的な軽鎖、

i i . 第2のF v領域のV H及び

i i i . 第1のF c領域サブユニット

を含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 8 3 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V L 及び
 i i i . 第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 8 4 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V H 及び
 i i i . 第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

10

【 0 1 8 5 】

ある実施形態では、第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の V L 及び
 i i i . 第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 8 6 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F a b の重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の相補的な V H 及び
 i i i . 相補的な第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

20

【 0 1 8 7 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F a b の重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の相補的な V H 及び
 i i i . 相補的な第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

30

【 0 1 8 8 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F a b の重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の相補的な V L 及び
 i i i . 相補的な第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 8 9 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F a b の重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の相補的な V L 及び
 i i i . 相補的な第 2 の F c 領域サブユニット
 を含む。

40

【 0 1 9 0 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F a b の軽鎖、
 i i . 第 2 の F v 領域の相補的な V H 及び
 i i i . 相補的な第 1 の F c 領域サブユニット
 を含む。

【 0 1 9 1 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に

50

i . 第 2 の F a b の 軽 鎖、
 i i . 第 2 の F v 領 域 の 相 補 的 な V H 及 び
 i i i . 相 補 的 な 第 2 の F c 領 域 サ ブ ユ ニ ッ ト
 を 含 む。

【 0 1 9 2 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に

i . 第 2 の F a b の 軽 鎖、
 i i . 第 2 の F v 領 域 の 相 補 的 な V L 及 び
 i i i . 相 補 的 な 第 1 の F c 領 域 サ ブ ユ ニ ッ ト
 を 含 む。

10

【 0 1 9 3 】

ある実施形態では、第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に

i . 第 2 の F a b の 軽 鎖、
 i i . 第 2 の F v 領 域 の 相 補 的 な V L 及 び
 i i i . 相 補 的 な 第 2 の F c 領 域 サ ブ ユ ニ ッ ト
 を 含 む。

【 0 1 9 4 】

ある実施形態では、第 4 のポリペプチドは、第 2 の F a b の相補的な軽鎖を含む。ある実施形態では、第 4 のポリペプチドは、第 2 の F a b の相補的な重鎖を含む。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、4 つのポリペプチドで構成される。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも 4 つのポリペプチドで構成され、

20

a . 第 1 のポリペプチドは、第 1 の F a b の軽鎖を含み、
 b . 第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領 域 の V L 及 び
 i i i . 第 1 の F c ドメインサブユニット
 を含み、

c . 第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F a b の重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領 域 の 相 補 的 な V H 及 び
 i i i . 相 補 的 な 第 2 の F c ドメインサブユニット
 を含み、

30

d . 第 4 のポリペプチドは、第 2 の F a b の相補的な軽鎖を含む。

【 0 1 9 5 】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、少なくとも 4 つのポリペプチドで構成され、

a . 第 1 のポリペプチドは、第 1 の F a b の軽鎖を含み、
 b . 第 2 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 1 の F a b の相補的な重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領 域 の V H 及 び
 i i i . 第 1 の F c ドメインサブユニット
 を含み、

40

c . 第 3 のポリペプチドは、その N 末端からその C 末端に
 i . 第 2 の F a b の重鎖、
 i i . 第 2 の F v 領 域 の 相 補 的 な V L 及 び
 i i i . 相 補 的 な 第 2 の F c ドメインサブユニット
 を含み、

d . 第 4 のポリペプチドは、第 2 の F a b の相補的な軽鎖を含む。

【 0 1 9 6 】

ある実施形態では、第 1 又は第 2 の F a b の軽鎖は、それぞれ第 1 又は第 2 の F a b の V

50

L及びCLを含む。ある実施形態では、第1又は第2のFabの軽鎖は、それぞれ第1又は第2のFabのVL及びCLからなる。

【0197】

ある実施形態では、第3の抗原は、第1の抗原と同一である。

【0198】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、第1の抗原に対する二価の結合及び第2の抗原に対する一価の結合をもたらす。

【0199】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、三価の二重特異性抗原結合分子である。

10

【0200】

ある実施形態では、第1の抗原は、腫瘍関連抗原である。ある実施形態では、第1の抗原は、腫瘍細胞上で発現される腫瘍関連抗原である。

【0201】

ある実施形態では、第2の抗原は、免疫細胞関連抗原である。ある実施形態では、第2の抗原は、免疫細胞上で発現される。ある実施形態では、第2の抗原は、免疫エフェクター細胞上で発現される。ある実施形態では、第2の抗原は、細胞傷害性T細胞上で発現される。ある実施形態では、第2の抗原は、CD3である。

【0202】

ある実施形態では、Fc領域は、IgG1 Fc領域である。ある実施形態では、前記IgG1 Fc領域は、ヒトIgG1 Fc領域である。ある実施形態では、Fc領域は、第1及び第2のFc領域サブユニットの会合を促進する1つ以上のアミノ酸改変を含む。

20

【0203】

ある実施形態では、第1のFc領域サブユニットのCH3ドメインにおいて、366位のスレオニン残基はトリプトファン残基と置き換えられ(T366W)、且つ354位のセリン残基はシステイン残基と置き換えられ(S354C)、且つ第2のFc領域サブユニットのCH3ドメインにおいて、407位のチロシン残基はバリン残基と置き換えられ(Y407V)、366位のスレオニン残基はセリン残基と置き換えられ(T366S)、368位のロイシン残基はアラニン残基と置き換えられ(L368A)、且つ349位のチロシン残基はシステイン残基と置き換えられる(Y349C)(EUインデックスに従う付番)。

30

【0204】

ある実施形態では、各Fc領域サブユニットにおいて、ヒトIgG1におけるEUインデックスに従う付番を有する位置L234、L235、G237、A330、P331に相当する位置における少なくとも5個のアミノ酸残基が、それぞれA、E、A、S、及びSに変異される。

【0205】

抗体

本開示による抗原結合分子において使用される抗体若しくは抗体フラグメント、又は重鎖及び軽鎖可変領域は、マウス、ラット、ヒト又は非ヒト霊長類などの任意の動物種起源のものであり得る。好ましくは、起源はヒトであるか又はヒト化手法によって得られてもよい。

40

【0206】

したがって、本開示による抗原結合分子において使用されるFab及び/又はFv領域は、ヒト又はヒト化されたものである。ある実施形態では、Fv領域は、ヒトである。ある実施形態では、Fv領域は、ヒト化される。ある実施形態では、Fabは、ヒトである。ある実施形態では、Fabは、ヒト化される。さらに別の実施形態では、Fabは、ヒト重鎖及び軽鎖定常領域を含む。

【0207】

リンカー

50

本開示による抗原結合分子は、その個々の構成要素（例えば、F a b、F v領域、F c領域、可変ドメイン、定常ドメイン）が、互いに直接的に又はリンカーを介して間接的に融合されるように設計され得る。

【0208】

ある種の実施形態では、本開示による抗原結合分子の個々の構成要素は、互いに遺伝的に融合される。そのような融合は、ポリペプチドのN末端とC末端の間のポリペプチド融合、ジスルフィド結合を介する融合、及び化学的架橋試薬を介する融合を含むが、これらに限定されないいくつかの戦略によって達成され得る。

【0209】

様々なリンカーは、本明細書に記載される実施形態において、本開示による抗原結合分子の個々の構成要素をその目的の融合パートナーに共有結合的に融合するために使用され得る。リンカーの構成要素及び長さは、当該技術分野でよく知られる方法に従って決定され得るし、有効性について試験され得る。好ましくは、リンカーは、非免疫原性である。ある実施形態では、リンカーは、ペプチドリナーである。ある実施形態では、リンカーは、当該技術分野で知られるペプチド結合によって結合された1つ以上のアミノ酸残基を含むペプチドリナーである。ペプチドリナーは、2つのポリペプチド（又は構成要素）を、それらが互いに対して妥当な立体構造をとり、その結果、所望の活性を保持するか又は得るように融合するのに十分な長さを有すべきである。

10

【0210】

ある実施形態では、本開示によるペプチドリナーは、1~70アミノ酸残基長、1~50アミノ酸残基長、1~40アミノ酸残基長、1~30アミノ酸残基長、1~20アミノ酸残基長、1~10アミノ酸残基長、1~5アミノ酸残基長である。

20

【0211】

ある実施形態では、本開示によるペプチドリナーは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70アミノ酸残基の長さを有する。ある実施形態では、本開示によるペプチドリナーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、又は70アミノ酸残基の長さを有する

【0212】

ペプチドリナーは、以下のアミノ酸残基を主に含み得る：G l y、S e r、A l a、又はT h r。好適な非免疫原性ペプチドリナーは、グリシン-セリンポリマー、例えば、(G S)_n（配列番号34）、(G 4 S)_n（配列番号35）、(S G 4)_n（配列番号36）、(G S G G S)_n（配列番号37）、(G G G S)_n（配列番号38）又はG 4 (S G 4)_n（配列番号39）を含み、nは、1と10の間、典型的には2と4の間の整数である。本明細書で使用される非免疫原性ペプチドリナーは、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び他のフレキシブルなペプチドリナーを含み得る。第1のF a b及び/又は第2のF a bを第2のF v領域に融合するための好適なペプチドリナーは、(G G S)₃（配列番号10）などのグリシン-セリンポリマーである。

30

40

【0213】

ペプチドリナーはまた、C L 又はC L ドメイン又はC H 1ドメインであるが、そのような定常ドメインの全ての残基ではない、例えば、最初の5~12アミノ酸残基などの免疫グロブリン軽鎖又は重鎖定常ドメインに由来し得る。ある実施形態では、ペプチドリナーは、免疫グロブリン軽鎖又は重鎖定常ドメインではない。ある実施形態では、ペプチドリナーは、C L 、C L 、C H 1、C H 2又はC H 3ドメインではない。

【0214】

抗原結合分子において使用され得る例示的なペプチドリナーは、免疫グロブリン軽鎖又は重鎖定常ドメインに由来するQ P K A A P（配列番号12）又はA S T K G P（配列番号11）である。一般に、ペプチドリナーは、例えば、C y 1、C y 2、C y 3、C y

50

4、Ca1、Ca2、C8、Cs、及びOμを含む任意のアイソタイプの免疫グロブリン重鎖に由来し得る。

【0215】

ペプチドリンカーはまた、免疫グロブリンヒンジ（例えば、ヒトIgG1ヒンジ又はその部分）又はそのようなヒンジに由来する任意のペプチドを含んでもよい。好ましくは、免疫グロブリンヒンジの一部又は部分のみが使用される場合、トランケートされたヒンジは依然としてその鎖間システインの1つ以上を含み得る。鎖間システインの存在は、そのようなヒンジペプチドリンカーのうちの2つが使用される状況において、ジスルフィド架橋によって二量体ペプチドリンカー（又はヒンジ領域）の形成を可能にする。そのようなジスルフィドで安定化された二量体ペプチドリンカーの使用のための好ましい状況は、第2のFv領域の可変ドメインのFcドメインサブユニットへの融合である。二量体ペプチドリンカー又はヒンジ領域の存在はさらに、本開示による抗原結合分子中に存在する2つのFc領域サブユニットの二量体化を促進し、且つ安定化する。二量体化に適した例示的なヒトIgGヒンジに由来するペプチドリンカーは、DKTHTCPPCP（配列番号13）である。

10

【0216】

本明細書で使用されるペプチドリンカーは、前述の及び例示的なペプチドリンカーのうちの1つのみに限定されないが、互いに融合される2つ以上のそのようなリンカーの任意の組合せを含んでもよいことが理解される。例えば、本明細書で使用されるペプチドリンカーは、グリシン-セリンポリマー及び所望の活性を保持するか又は得るための免疫グロブリンヒンジに由来する配列から構築され得る。

20

【0217】

或いは、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーを含むがこれらに限定されない様々非タンパク質合性ポリマーが、リンカーとして使用され得る。

【0218】

Fc領域

本開示による抗原結合分子のFc領域は、通常免疫グロブリンの重鎖ドメインを含むポリペプチドの対からなる。通常IgG分子のFc領域は、二量体として存在し、その各サブユニットは、CH2及びCH3 IgG重鎖定常ドメインを含む。2つのFc領域サブユニットは、互いに安定な会合が可能である。したがって、ある実施形態では、本開示による抗原結合分子の2つのFc領域サブユニットは、互いに安定な会合が可能である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、IgG Fc領域である。ある実施形態では、Fc領域は、IgG1 Fc領域である。ある実施形態では、Fc領域は、ヒトである。ある実施形態では、Fc領域は、ヒトIgG1 Fc領域である。

30

【0219】

ヘテロ二量体Fc領域

本開示による抗原結合分子の2つのFc領域サブユニットは通常、2つの同一ではないポリペプチド鎖で構成される。組換え生成における分子の収量及び純度を向上させるため、Fc領域サブユニットを形成する2つの同一ではないポリペプチドの会合を促進する1つ以上の改変をFc領域において導入することが有利である。したがって、ある種の実施形態では、本開示は、自己会合してヘテロ二量体分子を形成することになる2つの異なるバリエーションFc領域サブユニットの使用に依拠するヘテロ二量体抗原結合分子を提供する。

40

【0220】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、第1及び第2のFc領域サブユニットの会合を促進する1つ以上の改変を含む。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子の第1及び第2のFc領域サブユニットは、第1及び第2のFc領域サブユニットの会合を促進する1つ以上の改変を含む。ある実施形態では、第1のFc領域サブユニット及び第2のFc領域サブユニットは、同じFc領域サブユニットを含む2つの同一

50

のポリペプチド鎖間のホモ二量体化を減少させるか又はホモ二量体形成を減少させる1つ以上の改変を含む。

【0221】

改変は、第1のFc領域サブユニット及び/又は第2のFc領域サブユニット中に存在し得る。好ましい実施形態では、改変は、第1及び第2のFc領域サブユニット中に存在する。一実施形態では、前記改変は、Fc領域サブユニットのCH3ドメイン中に生じる。改変は、例えば、部位特異的変異導入によってポリペプチドをコードする核酸を改変することによって、又はペプチド合成によってなされ得る。ヘテロ二量体化を促進するためのCH3改変に関するいくつかの手法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第96/27011号パンフレット、国際公開第98/050431号パンフレット、欧州特許第1870459号明細書、国際公開第2007/110205号パンフレット、国際公開第2007/147901号パンフレット、国際公開第2009/089004号パンフレット、国際公開第2010/129304号パンフレット、国際公開第2011/90754号パンフレット、国際公開第2011/143545号パンフレット、国際公開第2012/058768号パンフレット、国際公開第2013/157954号パンフレット、国際公開第2013/096291号パンフレットにおいて記載されている。

10

【0222】

通常、当該技術分野で知られるヘテロ二量体化手法において、一方のポリペプチド鎖（例えば、免疫グロブリン重鎖）のCH3ドメイン及び他方のポリペプチド鎖のCH3ドメインは両方ともに、1つの操作されたCH3ドメインを含むポリペプチドが同じ構造の別のポリペプチド鎖ともはやホモ二量体化できないように相補的な様式で操作される。それによって、1つの操作されたCH3ドメインを含むポリペプチドは、相補的な様式で操作されるCH3ドメインを含む他のポリペプチドとヘテロ二量体化させられる。

20

【0223】

当該技術分野で知られる1つのヘテロ二量体化手法は、例えば、参照により組み込まれる国際公開第96/027011号パンフレット、Ridgway, J. B., et al., Protein Eng. 9 (1996) 617-621; Merchant, A. M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681; 米国特許第5,731,168号明細書; 米国特許第7,695,936号明細書; 国際公開第98/050431号パンフレット, Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001) においていくつかの例を提供して詳細に記載される、いわゆる「ノブ・イントゥ・ホール」技術である。「ノブ・イントゥ・ホール」技術は、(1)各Fc領域サブユニットにおいてヘテロ二量体化を促進するためにCH3ドメインを変異させること;及び(2)ヘテロ二量体化を促進する条件下で変異されたFc領域サブユニットを合わせることを広く含む。「ノブ」又は「突起」は通常、親抗体における小さいアミノ酸をより大きいアミノ酸（例えば、T366Y又はT366W）で置き換えることによって作製され;「ホール」又は「空洞」は、親抗体におけるより大きい残基をより小さいアミノ酸（例えば、Y407T、T366S、L368A及び/又はY407V）と置き換えることによって作製され、付番はEUインデックスに従う。

30

40

【0224】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域中に存在する改変は、2つのFc領域サブユニットのうちの一つにおける「ノブ変異」及び他の相補的なFc領域サブユニットにおける「ホール変異」を含む「ノブ・イントゥ・ホール」改変である。ノブ改変及びホール改変は、例えば、部位特異的変異導入によってポリペプチドをコードする核酸を改変することによって、又はペプチド合成によってなされ得る。ある実施形態では、各Fc領域サブユニットのCH3ドメインは、ノブ・イントゥ・ホール技術に従って改変される。

【0225】

ある実施形態では、第1のFc領域サブユニットのCH3ドメインにおいて、366位の

50

スレオニン残基はトリプトファン残基と置き換えられ (T 3 6 6 W)、且つ第 2 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、4 0 7 位のチロシン残基はバリン残基と置き換えられる (Y 4 0 7 V) (E U インデックスに従う付番)。ある実施形態では、第 2 の F c 領域サブユニットの C H 3 において、3 6 6 位のスレオニン残基はセリン残基と置き換えられ (T 3 6 6 S)、且つ 3 6 8 位のロイシン残基はアラニン残基と置き換えられる (L 3 6 8 A) (E U インデックスに従う付番)。

【 0 2 2 6 】

ある実施形態では、第 1 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、3 5 4 位のセリン残基はシステイン残基と置き換えられ (S 3 5 4 C)、且つ第 2 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、3 4 9 位のチロシン残基はシステイン残基と置き換えられる (Y 3 4 9 C) (E U インデックスに従う付番に基づく)。これらの 2 つのシステイン残基の導入は、2 つの F c 領域サブユニットの間にジスルフィド架橋の形成をもたらし、二量体をさらに安定化する (C a r t e r , J I m m u n o l M e t h o d s 2 4 8 , 7 - 1 5 (2 0 0 1))。

10

【 0 2 2 7 】

さらなる特定の実施形態では、本開示は、第 1 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、3 6 6 位のスレオニン残基はトリプトファン残基と置き換えられ (T 3 6 6 W)、且つ 3 5 4 位のセリン残基はシステイン残基と置き換えられ (S 3 5 4 C)、且つ第 2 の F c 領域サブユニットの C H 3 ドメインにおいて、4 0 7 位のチロシン残基はバリン残基と置き換えられ (Y 4 0 7 V)、3 6 6 位のスレオニン残基はセリン残基と置き換えられ (T 3 6 6 S)、3 6 8 位のロイシン残基はアラニン残基と置き換えられ (L 3 6 8 A)、且つ 3 4 9 位のチロシン残基はシステイン残基と置き換えられる (Y 3 4 9 C) (E U インデックスに従う付番) 抗原結合分子を提供する。

20

【 0 2 2 8 】

代替的な実施形態では、第 1 及び第 2 の F c 領域サブユニットの会合を促進する改変は、例えば、P C T 公開国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 9 0 0 4 号パンフレットにおいて記載されるとおり、静電ステアリング作用を媒介する改変を含む。一般に、この方法は、荷電アミノ酸残基による 2 つの F c 領域サブユニットの界面での 1 つ以上のアミノ酸残基の置換を含み、その結果、ホモ二量体形成は静電的に不利になるが、ヘテロ二量体化は静電的に有利になる。

30

【 0 2 2 9 】

F c 結合

免疫グロブリンの F c 領域は一般に、血清中での半減期の延長及び細胞上で発現される F c 受容体に対する結合を介してエフェクター機能を媒介する能力などの抗体の有利な薬物動態特性を与える。他方で、F c 受容体に対する結合はまた、全身投与時の望まれないサイトカイン放出及び重篤な副作用を引き起こすある種の細胞表面受容体の望ましくない活性化を引き起こし得る。

【 0 2 3 0 】

したがって、ある種の実施形態では、本開示による抗原結合分子の F c 領域は、操作されていない F c 領域と比較して、F c 受容体及び / 又は C 1 q に対する結合親和性の改変を有するか又はエフェクター機能の改変を有するように操作される。

40

【 0 2 3 1 】

エフェクター機能の改変は、以下のうちの 1 つ以上を含むことができるが、これらに限定されない：補体依存性細胞傷害 (C D C) の改変、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) の改変、抗体依存性細胞貪食 (A D C P) の改変、サイトカイン分泌の改変、抗原提示細胞による免疫複合体に媒介される抗原取込みの改変、N K 細胞に対する結合の改変、マクロファージに対する結合の改変、単球に対する結合の改変、多形核細胞に対する結合の改変、アポトーシスを誘導する直接的なシグナル伝達の改変、標的結合抗体の架橋の改変、樹状細胞成熟の改変、又は T 細胞プライミングの改変。特定の実施形態では、エフェクター機能の改変は、C D C、A D C C 及び A D C P からなる群から選択される 1 つ以上である。

50

ある実施形態では、エフェクター機能の改変は、A D C Cである。ある実施形態では、エフェクター機能の改変は、C D Cである。ある実施形態では、エフェクター機能の改変は、A D C Pである。ある実施形態では、エフェクター機能の改変は、C D C、A D C C及びA D C Pである。

【0232】

エフェクター機能の改変は通常、親Fcドメインサブユニットの少なくとも1つ、好ましくは両方を変異させることによって達成される。結合の増加及び結合の減少をもたらす置換が有用であり得る。Fc領域の結合特性を改変するために、非保存的アミノ酸置換、すなわち、1つのアミノ酸を異なる構造及び/又は化学的特徴を有する別のアミノ酸と置き換えることが好ましい。

【0233】

Fc受容体結合及び/又はエフェクター機能の低減

ある種の治療的状況のために、Fc領域のFc受容体の1つ以上若しくは全てに対する通常の結合及び/又はC1qなどの補体成分に対する結合を低減するか又は阻害することが望ましい場合がある。例えば、Fc領域のFc受容体(例えば、FcRI、FcRIIa、FcRIIb、FcRIIIa)の1つ以上又は全てに対する結合を低減するか又は妨げることが望ましい場合がある。

【0234】

特に、抗原結合分子が免疫エフェクター細胞の受容体に共結合するとき、A D C C活性を消失させるか若しくは著しく低減するFcRIIIa結合を妨げ、且つ/又はC D C活性を消失させるか若しくは著しく低減するC1q結合を妨げることが望ましい。

【0235】

エフェクター機能の低減又は消失は、以下のうちの1つ以上を含むことができるが、これらに限定されない: 補体依存性細胞傷害(C D C)の低減、抗体依存性細胞傷害(A D C C)の低減若しくは消失、抗体依存性細胞貪食(A D C P)の低減若しくは消失、サイトカイン分泌の低減若しくは消失、抗原提示細胞による免疫複合体に媒介される抗原取込みの低減若しくは消失、NK細胞に対する結合の低減若しくは消失、マクロファージに対する結合の低減若しくは消失、単球に対する結合の低減若しくは消失、多形核細胞に対する結合の低減若しくは消失、アポトーシスを誘導する直接的なシグナル伝達の低減若しくは消失、標的結合抗体の架橋の低減若しくは消失、樹状細胞成熟の低減若しくは消失、又はT細胞プライミングの低減若しくは消失。ある種の実施形態では、エフェクター機能の低減又は消失は、C D C、A D C C及びA D C Pからなる群から選択される1つ以上である。ある実施形態では、エフェクター機能の低減又は消失は、A D C Cである。ある実施形態では、エフェクター機能の低減又は消失は、C D Cである。ある実施形態では、エフェクター機能の低減又は消失は、A D C Pである。ある実施形態では、エフェクター機能の低減又は消失は、C D C、A D C C及びA D C Pである。

【0236】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較して、Fc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性の低減を有し、且つ/又はエフェクター機能の低減を有するように操作される。

【0237】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較したとき、エフェクター機能の低減を有するように操作される。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を低減し、且つ/又はエフェクター機能を低減する1つ以上のアミノ酸変異を含む。一般に、同じ1つ以上のアミノ酸変異は、Fc領域を形成する2つのFc領域サブユニットの各々において存在する。ある実施形態では、1つ以上のアミノ酸変異は、Fc領域のFc受容体に対する結合親和性を低減する。Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を低減する1つのみのアミノ酸変異が存在する場合、1つのアミノ酸変異は、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc領域のFc受容体及び/

10

20

30

40

50

又はC1qに対する結合親和性を少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍低減し、且つ/又はエフェクター機能を少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍低減する。Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を低減する2つ以上のアミノ酸変異が存在する場合、これらのアミノ酸変異の組合せは、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を少なくとも10倍、少なくとも20倍、又は少なくとも50倍低減し得るし、且つ/又はエフェクター機能を少なくとも10倍、少なくとも20倍、又は少なくとも50倍低減し得る。

【0238】

ある実施形態では、操作されたFc領域は、Fc受容体及び/又はC1qに実質的に結合せず、且つ/又はエフェクター機能を実質的に誘導しない。ある実施形態では、Fc受容体は、ヒトFc受容体である。一実施形態では、Fc受容体は、活性化Fc受容体である。ある実施形態では、Fc受容体は、Fc受容体である。ある実施形態では、Fc受容体は、活性化ヒトFc受容体、より特定するとヒトFcRIIIa、FcRI又はFcRIIIa、最も特定するとヒトFcRIIIaである。

10

【0239】

ある実施形態では、Fc領域の補体成分に対する結合親和性、特に、C1qに対する結合親和性は、低減されるか又は消失される。ある実施形態では、エフェクター機能の低減又は消失は、CDCの低減又は消失、ADCCの低減又は消失及びADCPの低減又は消失の群から選択される1つ以上である。特定の実施形態では、エフェクター機能の低減又は消失は、ADCC、CDC、及びADCPの低減である。

20

【0240】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を低減し、且つ/又はエフェクター機能を低減する1つ以上のアミノ酸変異を含む。

【0241】

ある実施形態では、アミノ酸変異は、アミノ酸置換である。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を低減し、且つ/又はエフェクター機能を低減する1つ以上のアミノ酸変異を含み、各Fc領域サブユニットは、EUインデックスに従う付番による234、235、237、330及び331の群から選択される位置でアミノ酸置換を含む。

30

【0242】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子の各Fc領域サブユニットは、L234、L235及びG237（EUインデックスに従う付番）の群から選択される位置でアミノ酸置換を含む。ある実施形態では、各Fcサブユニットは、EUインデックスに従う付番を有するアミノ酸置換L234A及びL235Eを含む。ある実施形態では、各Fc領域サブユニットは、EUインデックスに従う付番を有するアミノ酸置換L234A、L235E及びG237Aを含む。ある実施形態では、各Fc領域サブユニットは、EUインデックスに従う付番を有する330及び331の群から選択される位置でアミノ酸置換を含む。ある実施形態では、各Fc領域サブユニットは、EUインデックスに従う付番を有する位置330及び331でのアミノ酸置換を含む。ある実施形態では、アミノ酸置換は、A330S又はP331Sである。

40

【0243】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を低減し、且つ/又はエフェクター機能を低減する各Fc領域サブユニット中の1つ以上のアミノ酸変異を含み、前記1つ以上のアミノ酸変異は、L234A、L235E、G237A、A330S及びP331Sである。

【0244】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を低減し、且つ/又はエフェクター機能を低減する各F

50

c領域サブユニット中の1つ以上のアミノ酸変異からなり、1つ以上のアミノ酸変異は、L234A、L235E、G237A、A330S及びP331Sである。ある実施形態では、Fc領域は、IgG1 Fc領域、特に、ヒトIgG1 Fc領域である。

【0245】

変異体Fc領域又はFc領域サブユニットは、当該技術分野でよく知られる遺伝的又は化学的方法を使用してアミノ酸欠失、置換、挿入又は改変によって作製され得る。遺伝的方法是、DNA配列をコードする部位特異的変異導入、PCR、遺伝子合成などを含んでもよい。正確なヌクレオチド変化は、例えば、配列決定によって検証され得る。

【0246】

Fc受容体結合及び/又はエフェクター機能の増大

10

ある種の状況では、本開示による抗原結合分子のFc受容体結合及び/若しくはC1q結合並びに/又はエフェクター機能を増強するか又は増大させることが望ましい場合がある。

【0247】

ある実施形態では、エフェクター機能の増大又は増強は、CDC、ADCC、ADCPの群から選択される1つ以上である。ある実施形態では、エフェクター機能の増大又は増強は、ADCCである。ある実施形態では、エフェクター機能の増大又は増強は、CDCである。ある実施形態では、エフェクター機能の増大又は増強は、ADCPである。ある実施形態では、エフェクター機能の増大又は増強は、ADCC、ADCP及びCDCである。したがって、ある種の実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性の増大を有し、且つ/又はエフェクター機能の増大を有するように操作される。

20

【0248】

したがって、ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc受容体に対する結合親和性の増大を有するように操作される。ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較したとき、C1qに対する結合親和性の増大を有するように操作される。ある種の実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、操作されていないFc領域と比較したとき、エフェクター機能の増加を有するように操作される。

【0249】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子のFc領域は、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を増大させ、且つ/又はエフェクター機能を増大させる各Fc領域サブユニット中の1つ以上のアミノ酸変異を含む。結合親和性の増大は、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性における少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍の増大であり得る。通常、同じアミノ酸変異は、2つのFc領域サブユニットの各々において存在する。ある実施形態では、1つ以上のアミノ酸変異は、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc領域のFc受容体に対する結合親和性を増大させる。ある実施形態では、1つ以上のアミノ酸変異は、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc領域のC1qに対する結合親和性を増大させる。Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を増大させるアミノ酸変異の例は、参照により組み込まれる国際公開第2000/042072号パンフレット又は国際公開第2004/099249号パンフレットに記載される。

30

40

【0250】

通常、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を増加させ、且つ/又はエフェクター機能を増加させるアミノ酸変異は、アミノ酸置換である。

【0251】

実施形態において、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を増大させる1つのみのアミノ酸変異が存在する場合、1つのアミノ酸変異は、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を

50

少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍増大させ得るし、且つ/又はエフェクター機能を少なくとも2倍、少なくとも5倍、又は少なくとも10倍増大させ得る。実施形態において、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を増大させる2つ以上のアミノ酸変異が存在する場合、これらのアミノ酸変異の組合せは、操作されていないFc領域と比較したとき、Fc領域のFc受容体及び/又はC1qに対する結合親和性を少なくとも10倍、少なくとも20倍、又は少なくとも50倍増大させ得るし、且つ/又はエフェクター機能を少なくとも10倍、少なくとも20倍、又は少なくとも50倍増大させ得る。

【0252】

ある実施形態では、Fc受容体は、ヒトFc受容体である。ある実施形態では、Fc受容体は、活性化Fc受容体である。ある実施形態では、Fc受容体は、Fc受容体である。ある実施形態では、Fc受容体は、活性化ヒトFc受容体、より特定するとヒトFcRIIIa、FcRI又はFcRIIIaである。ある実施形態では、Fc受容体は、FcRIIIa、FcRI及びFcRIIIaの群から選択される。特定の実施形態では、Fc受容体は、FcRIIIa受容体である。

10

【0253】

ある実施形態では、エフェクター機能の増大は、ADCCの増大、CDCの増大及びADCPの増大の群から選択される1つ以上である。ある実施形態では、エフェクター機能の増大は、ADCCの増大である。

【0254】

Fc受容体に対する結合を評価するか又は免疫エフェクター機能を評価するためのインビトロでの方法

20

Fc領域のFc受容体に対する結合は、例えば、ELISAによって、又はBIAcore機器(GE Healthcare)などの標準的な計測手段を使用する表面プラズモン共鳴(SPR)によって容易に決定することができ、且つFc受容体は、組換え発現によって得てもよい。或いは、Fc領域の結合親和性は、FcRIIIa受容体を発現するNK細胞などの特定のFc受容体を発現することが知られる細胞株を使用して評価され得る。Fc領域のエフェクター機能は、当該技術分野で知られる方法によって測定され得る。目的の分子のADCC活性を評価するための好適なインビトロアッセイは、例えば、国際公開第2012130831号パンフレットにおいて記載される。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。或いは又は加えて、目的の分子のADCC活性は、インビボにおいて、例えば、Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)において開示されるものなどの動物モデルにおいて評価され得る。補体活性化を評価するために、CDCアッセイが実施され得る(例えば、Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996); Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003); 及びCragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)を参照のこと)。C1q結合アッセイ(ELISAなど)は、抗原結合分子がC1qに結合することができ、したがって、CDC活性を有するかどうかを決定するために実行され得る(国際公開第2006/029879号パンフレット及び国際公開第2005/100402号パンフレット)。

30

40

【0255】

標的抗原

本開示による新規の抗原結合分子は、様々な抗原を標的化するのに適しており、且つ異なる抗原を同時に標的化するのに特に適している。

【0256】

本明細書で使用する場合、「抗原」又は「標的抗原」は、本開示による抗原結合結合分子中に存在するFv領域の1つに特異的に結合する目的の任意の分子を指す。通常、抗原は、ペプチド、タンパク質又は任意の他のタンパク質性分子である。或いは、抗原は、炭水

50

化物、脂肪酸、脂質、色素又はフルオロフォア (f l o u r o p h o r) などの任意の他の有機又は無機分子であってもよい。

【 0 2 5 7 】

標的抗原に特異的に結合する本開示による抗原結合分子の能力は、酵素結合免疫吸着測定 (E L I S A) 又は当業者によく知られる他の手法、例えば、表面プラズモン共鳴手法 (B I A C O R E T 1 0 0 システム上で分析される) (L i l j e b l a d , e t a l . , G l y c o J 1 7 , 3 2 3 - 3 2 9 (2 0 0 0))、及び従来 of 結合アッセイ (H e e l e y , E n d o c r R e s 2 8 , 2 1 7 - 2 2 9 (2 0 0 2)) のいずれかを介して測定され得る。

【 0 2 5 8 】

競合アッセイは、特定の抗原又はエピトープに対する結合のための参照抗体と交差競合する抗体、抗体フラグメント、抗原結合ドメイン又は可変ドメインを特定するために使用され得る。「交差競合する」は、標準的な競合的結合アッセイにおいて特定の抗原に対する他の抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子の結合を妨害する抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子の能力を意味する。抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子が、特定の抗原に対する別の抗体、抗体フラグメント又は抗原結合分子の結合を妨害できる能力又は程度、及びしたがって、それが本開示に従って交差競合すると呼ばれ得るかどうかは、標準的な競合的結合アッセイを使用して決定され得る。1つの好適なアッセイは、B i a c o r e 技術 (例えば、B I A c o r e 3 0 0 0 機器 (B i a c o r e , U p p s a l a , S w e d e n) を使用することによる) の使用を含み、これは表面プラズモン共鳴技術を使用して相互作用の程度を測定することができる。交差競合を測定するための別のアッセイは、E L I S A に基づく手法を使用する。それらの交差競合に基づいて抗体を「エピトープピニング」するためのハイスループットなプロセスは、国際公開第 2 0 0 3 / 4 8 7 3 1 号パンフレットにおいて記載される。ある種の実施形態では、そのような競合抗体又は抗原結合分子は、参照抗体又は抗原結合分子によって結合される同じエピトープ (例えば、線状又は立体構造的エピトープ) に結合する。

【 0 2 5 9 】

したがって、本開示による抗原結合分子は、好ましくは、2つ以上、さらにより好ましくは、2つの異なる抗原 (例えば、第1及び第2の抗原) を標的化する。2つの抗原は、1つの細胞の表面上で発現され得るか又は異なる細胞の表面上で発現され得る。異なる結合価で2つの異なる抗原を (例えば、1つの抗原を一価で及び1つの抗原を二価で) 標的化する能力は、本開示による抗原結合分子の特により有用な態様である。前に概説したとおり、いくつかの免疫受容体 (T細胞上のCD3シグナル伝達受容体など) に関して、共通標的 (例えば、腫瘍関連抗原) に対する結合時にのみ受容体活性化が望まれるが、それは、臨床現場における非特異的な架橋が、重篤なサイトカインストームを引き起こす可能性があるためである。そのような免疫受容体を一価で結合することによって、受容体活性化は、共通標的に対する架橋に应答してのみ起こることになる。

【 0 2 6 0 】

ある実施形態では、第1及び/又は第2の抗原は、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞上に提示される抗原、又は炎症の部位で発現される抗原などの病的状況と関連する抗原である。ある実施形態では、第1又は第2の抗原は、好ましくは、T細胞などの免疫細胞上に発現される抗原である。他の好適な抗原としては、細胞表面抗原 (細胞表面受容体など)、血清中に遊離している抗原、及び/又は細胞外マトリックス中の抗原が挙げられる。ある実施形態では、抗原は、ヒト抗原である。

【 0 2 6 1 】

ある実施形態では、第1の抗原は、腫瘍関連抗原、特に、腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞上で提示される抗原である。ある実施形態では、第1の抗原は、HLA限定ペプチドである。ある実施形態では、第1の抗原は、ペプチド/HLA-A0201複合体である。用語「HLA-A0201」は、特定のHLA血清型 (s e r o y t y p e) を指す。HLA-A0201は、アルファ鎖及びベータ鎖を含むヘテロ二量体タンパク質である。ある実

10

20

30

40

50

施形態では、ペプチド/HLA-A0201複合体は、癌細胞上で発現される。ある実施形態では、ペプチド/HLA-A0201複合体は、癌細胞に特異的である。ある実施形態では、第1の抗原は、癌細胞の表面上で発現される癌特異的HLA限定ペプチドである。

【0262】

(腫瘍関連) 抗原の非限定的な例としては、AR、AGR2、A1G1、AKAP1、AKAP2、ANGPT1、ANGPT2、ANPEP、ANGPTL3、APOC1、ANGPTL4、AITGAV、AZGP1、BMP6、BRCA1、BAD、BAG1、BCL2、BL6R、BA2、BPAG1、CDK2、CD52、CD20、CD19、CD3、CD4、CD8、CD164、CDKN1A、CDKN1B、CDKN1C、CDKN2A、CDKN2B、CDKN2C、CDKN3、CDK3、CDK4、CDK5、CDK6、CDK7、CDK9、CLDN3、CLN3、CYB5、CYC1、CCL2、CXCL1、CXCL10、CXCL3、CXCL5、CXCL6、CXCL9、CHGB、CDH20、CDH7、CDH8、CDH9、CD44、CDH1、CDH10、CDH19、CDH20、CDH7、CDH9、CDH13、CDH18、CDH19、CANT1、CAV1、CDH12、CD164、COL6A1、CCL2、CDH5、COL18A1、CHGA、CHGB、CLU、COL1A1、COL6A1、CCNA1、CCNA2、CCND1、CCNE1、CCNE2、COL6A1、CTNNB1、CTSB、CLDN7、CLU、CD44APC、COL4A3、DSFHA、DAB2JP、DES、DNCL1、DD2、DL2、EL24、EGF、E2F1、EGFR、ENO1、ERBB2、ESR1、ESR2、EL2、ESTHA、ELAC2、ENO2、ENO3、ERBB2、ESR1、ESR2、EDG1、EFNA1、EFNA3、EFNB2、EPHB4、ESR1、ESR2、EGF、ERK8、EL12A、EL1A、EL24、EN A、ELK、ECGF1、EREG、EDG1、ENG、E-カドヘリン、FGF1、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF2、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FASN、FLJ12584、FLJ25530、F1GF、FLT1、FGFR3、F3、FOSL1、FLRT1、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、INHA、IGF1、IGF2、IL12A、IL1A、IL1B、IL2、INH A、IGF1R、IL2、IGFBP6、IL1A、IL1B、IGFBP3、IGFBP6、INSL4、IL6ST、ITGA6、IGF1、IGF2、INSL3、INSL4、IFNA1、IFNB1、IFNG、IL1B、IL6、IGFBP2、IL2RA、IL6、IGF1、IGF2、IGFBP3、IGFBP6、ITGA1、IGF1、ITGA6、ITGB4、INSL3、INSL4、IL29、IL8、ITGB3、GRP、GNRH1、GAGEB1、GAGEC1、GGT1、GSTP1、GATA3、GABRP、GNAS1、GSN、H1P1、HUMCYT2A、HGF、JAG1、JUN、LAMA5、S100A2、SCGB1D2、SCGB2A1、SCGB2A2、SPRR1B、SHBG、SERP1NA3、SHBG、SLC2A2、SLC33A1、SLC43A1、STEAP、STEAP2、SERP1NF1、SERPINB5、SERPINE1、STAB1、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TNF、TNFSF10、TGFB1I1、TP53、TPM1、TPM2、TRPC6、TGFA、THBS、TEE、TNFRSF6、TNFSF6、TOP2A、TP53、THBS1、THBS2、THBS4、TNFAIP2、TP53、TEK、TGFA、TGFB1、TGFB2、TGFB3、TGFB3、TNFA1P2、ITGB3、THBS1、THBS2、VEGF、VEGFC、ODZ1、PAWR、PLG、PAP、PCNA、PRKCQ、PRKD1、PRL、PECAM1、PF4、PROK2、PRL、PAP、PLAU、PRL、PSAP、PART1、PATE、PCA3、PIAS2、PGF、PGR、PLAU、PGR、PLXDC1、PTEN、PTGS2、PDGF、MYC、MMP2、MMP9、MSMB、MACMARC

K S、M T 3、M U C 1、M A P 2 K 7、M K i 6 7、M T S S 1、M 1 B 1、M D K、N O X 5、N R 6 A 1、N R 1 H 3、N R 1 I 3、N R 2 F 6、N R 4 A 3、N R 1 H 2、N R 1 H 4、N R 1 I 2、N R 2 C 1、N R 2 C 2、N R 2 E 1、N R 2 E 3、N R 2 F 1、N R 2 F 2、N R 3 C 1、N R 3 C 2、N R 4 A 1、N R 4 A 2、N R 5 A 1、N R 5 A 2、N R 6 A 1、N R O B 1、N R O B 2、N R 1 D 2、N R 1 D 1、N T N 4、N R P 1、N R P 2、N G F B、N G F R、N M E 1、K L K 6、K L K 1 0、K L K 1 2、K L K 1 3、K L K 1 4、K L K 1 5、K L K 3、K L K 4、K L K 5、K L K 6、K L K 9、K 6 H F、K A 2、K R T 2 A、K L K 6、K L K 3、K R T 1、K D R、K L K 5、K R T 1 9、K L F 5、K R T 1 9、K R T H B 6、R A R B、R A C 2、及び R O B O 2 などの抗原が挙げられる。

10

【0263】

ある実施形態では、第1又は第2の抗原は、HER2及びCD3の群から選択される。ある実施形態では、第1の抗原は、HER2、特に、ヒトHER2である。ある実施形態では、第1の抗原は、CD3、特に、ヒトCD3である。ある実施形態では、第2の抗原は、HER2、特に、ヒトHER2である。ある実施形態では、第2の抗原は、CD3、特に、ヒトCD3である。ある実施形態では、第1及び/又は第3のFv領域は、HER2のエピトープに対する結合に関してモノクローナル抗体トラスツズマブと競合し得る。

【0264】

ある実施形態では、第1及び/又は第3のFv領域は、HER2に特異的に結合し、且つ配列番号8と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVH配列及び配列番号9と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVL配列、又は機能性を保持するそのバリエーションを含む。

20

【0265】

ある実施形態では、第1又は第2の抗原は、免疫細胞上で発現される。ある実施形態では、第2の抗原は、T細胞上で発現される。ある実施形態では、第1の抗原は、T細胞上で発現される。

【0266】

ある実施形態では、第1又は第2の抗原は、CD137及びCD3からなる群から選択される。ある実施形態では、第1の抗原は、CD137及びCD3からなる群から選択される。ある実施形態では、第2の抗原は、CD137及びCD3からなる群から選択される。ある実施形態では、第1の抗原は、CD3、特に、ヒトCD3である。ある実施形態では、第2の抗原は、CD3、特に、ヒトCD3である。ある実施形態では、CD3は、本開示の抗原結合分子によって一価で結合される。

30

【0267】

CD3は、治療に関連すると証明されているT細胞刺激抗原である。CD3に対する結合は、T細胞受容体(TCR)を模倣して、T細胞活性化につながる。標的細胞及びT細胞が、多重特異性抗原結合分子を介して架橋されて免疫シナプスの形成をもたらすように多重特異性抗原結合分子においてCD3結合分子を使用して、エフェクターT細胞は、標的細胞を直接的に死滅させることができる。CD3の共結合を有するそのような分子の有効性及び安全性は、結合価、特異性及び使用される形式の両方の親和性によって主に促進されることが知られている。この結合形式は、前に論じられたとおりの副作用の潜在的なリスクを低減する中程度から低い程度の結合親和性を有してCD3に一価で結合するはずである。親和性を増大させるための必要性を伴わずに有効性を増大させるために、標的抗原(例えば、第1の抗原)及びCD3(例えば、第2の抗原)のエピトープは、非常に近接して免疫シナプスを有効にするはずである(Bluemel C., Cancer Immunol. Immunother. 2010 Aug; 59(8): 1197-209)。加えて、その形式はさらに、通常のIgG薬物動態が、例えば、Fc領域を介して得られるように低頻度の投薬を支持するはずである。

40

【0268】

50

本開示のある実施形態では、第2の抗原は、CD3、特に、ヒト又はカニクイザルCD3、最も特定するとヒトCD3である。ある実施形態では、第2の抗原は、CD3のイプシロンサブユニットである。ある実施形態では、第2の抗原は、配列番号1を含むCD3のイプシロンサブユニットである。

【0269】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子の第2のFv領域は、CD3、特に、ヒト又はカニクイザルCD3、最も好ましくはヒトCD3に特異的に結合する。ある実施形態では、CD3は、本開示による抗原結合分子によって一価で結合される。ある実施形態では、第2のFv領域は、CD3のエピトープに対する結合に関してCD3に特異的なモノクローナル抗体と競合し得る。ある実施形態では、第2のFv領域は、CD3のエピトープに対する結合に関して表3～5において記載されるとおりのCD3に特異的な抗体のいずれか1つと競合し得る。

10

【0270】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子中に存在する第2のFv領域は、CD3のエピトープに対する結合に関して配列番号4のVH及び配列番号5のVLを含むモノクローナル抗体と競合し得る。

【0271】

ある実施形態では、第2のFv領域は、CD3のエピトープに対する結合に関して配列番号2のVH及び配列番号3のVLを含むモノクローナル抗体と競合し得る。

【0272】

ある実施形態では、第2のFv領域は、CD3のエピトープに対する結合に関して配列番号6のVH及び配列番号7のVLを含むモノクローナル抗体と競合し得る。

20

【0273】

さらなる実施形態では、CD3に特異的な第2のFv領域は、配列番号2と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVH及び配列番号3と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVL配列、又は機能性を保持するそのバリエーションを含む。

【0274】

さらなる実施形態では、CD3に特異的な第2のFv領域は、配列番号4と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVH配列及び配列番号5と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVL配列、又は機能性を保持するそのバリエーションを含む。

30

【0275】

さらなる実施形態では、CD3に特異的な第2のFv領域は、配列番号6と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVH配列及び配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるVL配列、又は機能性を保持するそのバリエーションを含む。

40

【0276】

本開示のある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、標的細胞抗原、特に、癌細胞上で発現される腫瘍関連抗原及び免疫エフェクター細胞上で発現されるCD3に対する同時の結合の能力がある。1つのそのような実施形態では、標的抗原は二価で結合され、CD3は一価で結合される。

【0277】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子は、標的細胞抗原及びCD3に対する同時の結合によるT細胞と標的細胞の架橋の能力がある。ある実施形態では、そのような同時の結合は、標的細胞の溶解、特に、腫瘍細胞の溶解をもたらす。一実施形態では、そのような同時の結合は、T細胞の活性化をもたらす。ある実施形態では、同時の結合は、増殖

50

、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害性エフェクター分子の放出、細胞傷害活性、及び活性化マーカーの発現の群から選択されるＴリンパ球、特に、細胞傷害性Ｔリンパ球の細胞応答をもたらす。ある実施形態では、標的細胞抗原に対する同時の結合を伴わないＣＤ３に対する本開示による抗原結合分子の結合は、Ｔ細胞活性化をもたらさない。ある実施形態では、抗原結合分子は、標的細胞に対するＴ細胞のリダイレクト細胞傷害活性の能力がある。特定の実施形態では、リダイレクションは、標的細胞によるＭＨＣに媒介されるペプチド抗原提示及び／又はＴ細胞の特異性に依存しない。特に、本開示による実施形態のいずれかによるＴ細胞は、細胞傷害性Ｔ細胞である。いくつかの実施形態では、Ｔ細胞は、ＣＤ４＋又はＣＤ８＋Ｔ細胞、特に、ＣＤ８＋Ｔ細胞である。

【０２７８】

10

本開示の抗原結合分子において実現される形式は、第１の抗原に対する二価の結合及び第２の抗原に対する一価の結合を可能にし、そのため第１の抗原のために高親和性の結合及び結合活性効果を合わせて、ＣＤ３と標的抗原の間の結合親和性において著しい差をもたらす。

【０２７９】

本開示による抗原結合分子は、異なる抗原を標的化するのに特に有益である。しかしながら、いくつかの場合において、それは、１つのみの抗原を標的化し、そのため同じ抗原に関して特異性を有することが有益である場合がある。

【０２８０】

核酸

20

本開示は、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を提供する。本開示による抗原結合分子は、１、２、３、４、又はそれ以上のポリペプチドからなり得る。前記ポリペプチドの各々は、同じ又は異なる核酸配列によってコードされ得る。同様に、本発明による抗原結合分子の前記の個々のポリペプチドをコードする核酸配列は、同じ又は異なるベクター上に存在し得る。

【０２８１】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、表９～１３に記載される抗原結合分子のいずれかをコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を提供する。ある実施形態では、核酸組成物は、単離された核酸組成物である。

30

【０２８２】

ある実施形態では、第１の核酸配列は、Ｎ末端からＣ末端に第１のＦａｂの重鎖又は軽鎖、第２のＦｖ領域のＶＨ又はＶＬ及び第１のＦｃ領域サブユニットを含むポリペプチドをコードする。１つのそのような実施形態では、第２の核酸は、第１のＦａｂの相補的な重鎖又は軽鎖を含むポリペプチドをコードする。１つのそのような実施形態では、第３の核酸は、Ｎ末端からＣ末端に第２のＦｖ領域の相補的なＶＨ又はＶＬ及び第２のＦｃ領域サブユニットを含むポリペプチドをコードする。代替的な実施形態では、第３の核酸は、Ｎ末端からＣ末端に第２のＦａｂの重鎖又は軽鎖、第２のＦｖ領域の相補的なＶＨ又はＶＬ及び第２のＦｃ領域サブユニットを含むポリペプチドをコードする。１つのそのような実施形態では、第４の核酸配列は、第２のＦａｂの相補的な軽鎖又は重鎖を含むポリペプチドをコードする。

40

【０２８３】

核酸配列又は複数の核酸配列によってコードされるポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合又は本明細書に記載されるとおりの機能的な抗原結合分子を形成する他の手段を介して、発現後に会合し得る。例えば、第１のＦａｂの軽鎖は、第１のＦａｂの重鎖を含む抗原結合分子の部分とは別々の核酸配列によってコードされ得る。共発現されるとき、第１のＦａｂの軽鎖は、第１のＦｖ領域を含む第１のＦａｂを形成する第１のＦａｂの重鎖と会合することになる。別の例において、第１のＦｃ領域サブユニットを含む抗原結合分子の部分は、第２のＦｃ領域サブユニットを含む抗原結合分子の部分とは別々の核酸配列によってコードされ得る。共発現されるとき、２つのＦｃ領域サブユニットは、本開示に

50

よる抗原結合分子の二量体Fc領域を形成するために会合することになる。

【0284】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列に向けられ、核酸配列又は複数の核酸配列は、抗原結合分子の個々のポリペプチドをコードする。本開示による例示された抗原結合分子を形成するポリペプチドは、表9～13において記載される。

【0285】

ベクター

ある実施形態では、本開示は、本開示による核酸配列組成物を含むベクター又は複数ベクターを含むベクター組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含むベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、表9～13に記載されるとおりの抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含むベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を提供する。ある種の実施形態では、ベクターは、発現ベクターである。

【0286】

宿主細胞

ある種の実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を含むベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を含む宿主細胞を提供する。ある実施形態では、本開示は、表9～13に記載されるとおりの抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含む核酸組成物を含むベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を含む宿主細胞を指す。

【0287】

本開示による抗原結合分子の発現を複製し且つ支持するのに好適な宿主細胞は、当該技術分野でよく知られている。そのような宿主細胞は、特定の発現ベクターで適宜トランスフェクト又は形質導入されてもよく、且つ大量のベクター含有細胞が、臨床適用のために十分な量のそのような抗原結合分子を得るための大規模な発酵を起こさせる有機体を供給するために増殖され得る。これらのシステムにおいて外来遺伝子を発現させる標準的な技術は、当該技術分野で知られている。一般に、そのような工程は通常、好適な宿主細胞を、本開示による抗原結合分子の個々のポリペプチドをコードする核酸組成物又はベクター組成物で形質転換又はトランスフェクトすることを含む。さらに、そのような工程は通常、宿主細胞の増殖（増加、成長）に好適な条件下で宿主細胞を培養すること及びコードされたポリペプチドの生成（発現、合成）に好適な条件下で培養する工程を含む。

【0288】

生成

本明細書で開示されるとおりの抗体又は抗原結合分子を生成する方法は、当該技術分野でよく知られている（例えば、Harlow and Lane, 「Antibodies, a laboratory manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照のこと）。本開示による抗原結合分子は、例えば、固相ペプチド合成又は組換え生成によって得てもよい。組換え生成のために、本開示による抗原結合分子をコードする1つ以上の核酸配列が単離され、且つさらなるクローニング及び/又は宿主細胞における発現のための1つ以上のベクターに挿入される。

【0289】

当業者によく知られる方法を使用して、適切な転写/翻訳制御シグナルとともに本開示による抗原結合分子のためのコード化配列を含有する発現ベクターを構築することができる。そのような方法としては、インビトロ組換えDNA手法、合成手法及びインビボ組換え/遺伝的組換えが挙げられる。例えば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); 及び Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR

10

20

30

40

50

BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y (1989)において記載される手法を参照されたい。ベクターは、当該技術分野でよく知られる方法によって原核(例えば、細菌)又は真核(例えば、酵母又は哺乳動物)細胞などの適切な宿主細胞に導入され得る(例えば、「Current Protocol in Molecular Biology」, Ausubel et al. (eds.), Greene Publishing Assoc. and John Wiley Interscience, New York, 1989及び1992を参照のこと)。多数のクローニングベクターが当業者に知られており、且つ適切なクローニングベクターの選択は、選択の問題である。コード化配列は、プロモーター、リボソーム結合部位(細菌発現用)及び、任意に、オペレーターの制御下に置かれてもよく、その結果、所望のタンパク質又はポリペプチドをコードするDNA配列は、この発現コンストラクトを含有するベクター又はベクター(複数)によって形質転換された宿主細胞においてRNAに転写される。コード化配列は、シグナルペプチド又はリーダー配列を含有してもよいし、含有しなくてもよい。選択された発現系及び宿主細胞に応じて、本開示による抗原結合分子は、前述の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を、目的のタンパク質が発現される条件下で培養することにより生成される。次に、タンパク質は、宿主細胞から単離され、且つ精製される。発現系が増殖培地中にタンパク質を分泌する場合、タンパク質は、培地から直接的に精製され得る。タンパク質が分泌されない場合、それは細胞可溶化物から単離されるか又は細胞膜画分から回収される。適切な増殖条件及び回収方法の選択は、当該技術分野の範囲内である。

【0290】

本開示による抗原結合分子は天然に存在するタンパク質ではないことが留意されるべきである。通常、本開示による抗原結合分子は、組換え合成又は半合成タンパク質である。

【0291】

ある実施形態では、本開示による抗原結合分子を生成する方法が提供され、方法は、抗原結合分子の発現に好適な条件下で本開示による抗原結合分子をコードする核酸配列又は複数の核酸配列を含むベクター又は複数のベクターを含むベクター組成物を含む宿主細胞を培養すること、及び宿主細胞又は宿主細胞培養培地から抗原結合分子を回収することを含む。

【0292】

実施形態では、本開示による抗原結合分子の生成のための方法はさらに、宿主細胞又は培地から生成された抗原結合分子を単離する工程を含む。本明細書に記載されるとおりに回収された抗原結合分子は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの当該技術分野で知られる手法により精製され得る。特定のタンパク質を精製するために使用される条件は、実効電荷、疎水性、親水性などの因子に部分的に依存することになり、且つ当業者に明らかであろう。アフィニティークロマトグラフィー精製のために、抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体又は抗原が使用され得る。例えば、本開示による抗原結合分子のアフィニティークロマトグラフィー精製のために、プロテインA又はプロテインGを伴うマトリックスが使用され得る。抗原結合分子の純度は、ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィーなどを含む様々なよく知られる分析方法のいずれかによって決定され得る。

【0293】

融合タンパク質

本開示による抗原結合分子は、1つ以上の他の部分に融合されてもよいし、融合されなくてもよい。そのような融合タンパク質は、遺伝的又は化学的手法を含む任意の好適な様式で調製され得る。前記の連結された部分は、分泌若しくはリーダー配列、検出、発現、分離若しくは精製を助ける配列、又は例えば、組換え生成の間に、タンパク質安定性の増大を与える配列を含有し得る。可能な部分の非限定的な例としては、ベータ-ガラクトシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、T7ポリメラーゼフラ

グメント、分泌シグナルペプチド、抗体若しくは抗体フラグメント、毒素、レポーター酵素、ポリ-ヒスチジンタグのような金属イオンに結合できる部分、検出及び/若しくは精製に好適なタグ、ホモ若しくはヘテロ会合ドメイン、タンパク質の安定性を増大させる部分、又は酵素切断部位を含む部分が挙げられる。したがって、本開示による抗原結合分子は、任意に、他の標的又は目的の標的タンパク質に対する結合のための1つ以上の部分を含有し得る。そのようなさらなる部分はさらに、本開示による抗原結合分子に機能性をもたらしてもよいし、もたらさなくてもよく、且つ本開示による抗原結合分子の特性を修飾してもよいし、修飾しなくてもよい。本開示によるポリペプチドは、本明細書で定義されるとおりのリンカーによって融合され得る。

【0294】

10

機能性

本開示による抗原結合分子は、目的の標的抗原が関与する生物学的経路によって媒介される疾患の予防及び治療のために使用され得る。これは、例えば、標的抗原とその同族の受容体又は天然の結合パートナーの間の相互作用を阻害することによって達成され得る。本開示による抗原結合分子の生物活性は、本明細書で開示される実施例3~4に記載されるものを含む当該技術分野で知られる様々なアッセイによって測定され得る。機能活性をアッセイするための方法は、酵素結合免疫吸着測定(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)、蛍光標識細胞分取(FACS)及び当該技術分野でよく知られる他の方法などの結合アッセイを利用してもよい(Hampton, R. et al. (1990; Serological Methods a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, MN)及びMaddox, D. E. et al. (1983; J. Exp. Med. 158: 1211-1216)を参照のこと)。或いは、アッセイは、インビボ又はインビトロのいずれかにおいて、生物学的標的抗原に対する結合に起因して生物学的応答を誘発する際の抗原結合分子の能力を試験し得る。生物活性は、例えば、T細胞の増殖の誘導、T細胞におけるシグナル伝達の誘導、T細胞における活性化マーカーの発現の誘導、T細胞によるサイトカイン分泌の誘導、腫瘍細胞又は腫瘍間質の細胞などの標的細胞におけるシグナル伝達の阻害、標的細胞の増殖の阻害、標的細胞の溶解の誘導、及び腫瘍退縮の誘導並びに/又は生存の改善を含んでもよい。

20

【0295】

ある実施形態では、本開示は、癌細胞の溶解を誘導するための方法であって、細胞傷害性T細胞の存在下で前記癌標的細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

30

【0296】

ある実施形態では、本開示は、癌細胞におけるシグナル伝達の阻害のための方法であって、細胞傷害性T細胞の存在下で前記癌細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

【0297】

ある実施形態では、本開示は、癌細胞の増殖の阻害のための方法であって、細胞傷害性T細胞の存在下で前記癌細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

40

【0298】

ある実施形態では、本開示は、癌抗原を高度に発現する細胞を死滅させるが、癌抗原を低度に発現する細胞を死滅させないための方法であって、細胞傷害性T細胞の存在下で前記癌抗原を高度に発現する細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

【0299】

ある実施形態では、本開示は、細胞傷害性T細胞における細胞応答を誘導するための方法であって、癌細胞の存在下で前記細胞傷害性T細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。ある実施形態では、前記細胞応答は、増殖、分化、サイトカイン分泌、細胞傷害性エフェクター分子の放出、細胞傷害活性、及び活性化マーカー

50

の発現からなる群から選択される。

【0300】

ある実施形態では、本開示は、癌細胞の存在下でヒトT細胞増殖を誘導するための方法であって、T細胞の存在下で前記癌細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

【0301】

ある実施形態では、本開示は、癌細胞の存在下で初代T細胞の応答を刺激するための方法であって、前記T細胞の存在下で前記癌細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

【0302】

ある実施形態では、本開示は、T細胞の細胞傷害活性を癌細胞にリダイレクトするための方法であって、前記T細胞の存在下で前記癌細胞を本開示による抗原結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

10

【0303】

ある実施形態では、本開示は、対象における癌関連抗原について陽性である癌の治療のための本開示による抗原結合分子の使用であって、

(a) 癌で苦しめられる対象を選択すること、

(b) 対象から1つ以上の生体試料を回収すること、

(c) 1つ以上の試料において癌関連抗原を発現する癌細胞を同定すること；及び

(d) 有効量の本開示による抗原結合分子を対象に投与することを含む使用を提供する。

20

【0304】

診断法

ある実施形態では、本開示は、疾患の診断のための本開示による抗原結合分子の使用を提供する。ある実施形態では、本開示は、抗原の検出のための本開示による抗原結合分子の使用を提供する。ある実施形態では、本開示は、対象又は試料において抗原を検出するための方法であって、前記対象又は試料を本開示による抗原結合分子と接触させる工程を含む方法を提供する。ある実施形態では、本開示は、対象における疾患を診断するための方法であって、前記対象又は試料を本開示による抗原結合分子と接触させる工程を含む方法を提供する。

【0305】

治療方法

本開示による抗原結合分子は、治療方法において使用され得る。本開示による抗原結合分子は、癌の治療のために使用され得る。ある実施形態では、本開示は、疾患の治療のための方法を提供する。ある実施形態では、本開示は、疾患の治療のための本開示による抗原結合分子を提供する。ある実施形態では、本開示は、疾患の治療における使用のための本開示による抗原結合分子を提供する。ある実施形態では、本開示は、必要とする個体における疾患の治療における使用のための本開示による抗原結合分子を提供する。ある実施形態では、本開示は、薬剤の製造のための本開示による抗原結合分子の使用を提供する。ある実施形態では、本開示は、薬剤としての使用のための本開示による抗原結合分子を提供する。ある実施形態では、本開示は、必要とする個体における疾患の治療のための薬剤としての使用のための本開示による抗原結合分子を提供する。ある実施形態では、疾患は、抗原の望まれない存在と関連する。ある実施形態では、治療されることになる疾患は、増殖性疾患である。特定の実施形態では、疾患は、癌である。

30

40

【0306】

癌の非限定的な例としては、膀胱癌、脳癌、頭頸部癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、直腸癌、胃癌、前立腺癌、血液癌、皮膚癌、扁平上皮癌、骨癌、及び腎臓癌が挙げられる。

【0307】

ある実施形態では、本開示は、治療有効量の本開示による抗原結合分子を対象に投与することを含む、疾患を有する対象又は個体を治療する方法における使用のための本開示によ

50

る抗原結合分子を提供する。ある実施形態では、方法はさらに、個体に治療有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を投与することを含む。治療を必要とする対象又は個体は通常、哺乳動物、より具体的にはヒトである。治療方法における使用のために、本開示による抗原結合分子は、良好な医療行為と一致する方法で製剤化、服用、及び投与されることになる。

【0308】

ある実施形態では、本開示は、癌を有する患者における腫瘍退縮の誘導のための方法であって、前記対象に治療有効量の本開示による抗原結合分子を投与することを含む方法を提供する。

【0309】

ある実施形態では、本開示は、癌を有する対象の生存を向上させるための方法であって、前記対象に治療有効量の本開示による抗原結合分子を投与することを含む方法を提供する。

【0310】

ある実施形態では、本開示は、癌を有する対象において免疫応答を誘発するか、刺激するか又は誘導するための方法であって、前記対象に治療有効量の本開示による抗原結合分子を投与することを含む方法を提供する。

【0311】

ある実施形態では、本開示は、癌を有する対象において抗癌免疫を増強するか又は誘導するための方法であって、前記対象に治療有効量の本開示による抗原結合分子を投与することを含む方法を提供する。

【0312】

医薬組成物

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子及び少なくとも1つの薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。医薬組成物はさらに、少なくとも1つの他の薬学的に活性な化合物を含んでもよい。本開示による医薬組成物は、目的の標的抗原と関連する疾患の診断、予防及び/又は治療において使用され得る。

【0313】

特に、本開示は、哺乳動物、より具体的にはヒトにおける予防的、治療的且つ/又は診断的使用に好適な本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を提供する。一般に、本開示による抗原結合分子は、少なくとも1つの本開示による抗原結合分子及び少なくとも1つの薬学的に許容される担体、希釈剤若しくは賦形剤及び/又はアジュバント、並びに任意に1つ以上のさらなる薬学的に活性な化合物を含む医薬組成物として製剤化され得る。そのような製剤は、経口、非経口、局所投与又は吸入による投与に好適であり得る。

【0314】

特に、本開示による抗原結合分子は、相乗効果が得られる場合があるか又は得られない場合がある結果として、目的の標的抗原が関与する疾患の予防及び/又は治療のために使用されるか又は使用され得る1つ以上の薬学的に活性な化合物との組合せにおいて使用され得る。そのような化合物、並びにそれらを投与するための経路、方法及び医薬製剤又は組成物の例は、臨床医にとって明らかであろう。ある実施形態では、本開示は、標的抗原の望まれない存在と特異的に関連する疾患の予防及び/又は治療における使用のための本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、薬剤としての使用のための本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を提供する。ある実施形態では、本開示は、自己免疫疾患、炎症性疾患、癌、血管疾患、感染性疾患、血栓症、心筋梗塞、及び/又は糖尿病の予防及び/又は治療における使用のための本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を提供する。

【0315】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を使用する必要とする対象における自己免疫疾患、炎症性疾患、癌、血管疾患、感染性疾患、血栓症、心筋梗塞及び/又は糖尿病の治療のための方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0316】

さらに、インビボでの投与に好適な形態において本開示による抗原結合分子を生成する方法であって、(a)本開示による方法によって抗原結合分子を得ること、及び(b)前記抗原結合分子を少なくとも1つの薬学的に許容される担体と製剤化することであって、それによって抗原結合分子の調製が、インビボでの投与のために製剤化されることを含む方法が提供される。

【0317】

本開示による医薬組成物は、薬学的に許容される担体中で溶解された治療有効量の本開示による1つ以上の抗原結合分子を含む。

【0318】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子又は本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物を含むキットを提供する。

10

【0319】

ある実施形態では、本開示は、本開示による抗原結合分子又は本開示による抗原結合分子を含む医薬組成物、及びそれを必要とする対象における癌の進行を治療するか若しくは遅らせるか又は腫瘍増殖を低減するか若しくは阻害するための本開示による結合分子の投与のための指示書を含む添付文書を含むキットを提供する。

【0320】

投与量

疾患の予防又は治療に関して、本開示による抗原結合分子の適切な投与量は、治療されることになる疾患の種類、投与経路、個体の体重、抗原結合分子の特定の種類、疾患の重症度及び経過、抗原結合分子が予防又は治療目的で投与されるかどうか、以前又は同時の治療介入、個体の臨床歴及び抗原結合分子に対する応答、並びに主治医の判断に依存することになる。本開示による抗原結合分子は、1回又は一連の治療にわたって患者に好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 15\text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$)の本開示による抗原結合分子は、例えば、1回以上の別々の投与によるか、又は持続注入によるかにかかわらず、個体への投与のための初回の投与量であり得る。1つの典型的な1日の投与量は、上述の因子に応じて、 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であり得る。数日以上におよぶ反復投与に関して、条件に応じて、治療は一般に、疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続されることになる。本開示による抗原結合分子のための1つの例示的な投与量は、 $0.005\text{mg}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。他の非限定的な例において、用量はまた、1回の投与当たり $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $200\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $350\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $\sim 1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重以上、及びそこから導かれる任意の範囲を含み得る。本明細書に列挙される数から導かれる範囲の非限定的な例において、 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重 $\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重、 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 $\sim 500\text{mg}/\text{kg}$ 体重などの範囲が、上記の数に基づいて投与され得る。したがって、 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ (又はその任意の組合せ)の1つ以上の用量が、個体に投与され得る。そのような用量は、例えば、1週毎又は3週毎 (例えば、個体が2から20、又は例えば、6用量の抗原結合分子を受容するように)に断続的に投与され得る。初回の高い負荷用量に続いて、1回以上のより低い用量が投与され得る。本開示による抗原結合分子は一般に、意図される目的を達するのに有効な治療量において使用されることになる。

20

30

40

【0321】

併用療法

本開示による抗原結合分子は、1つ以上の他の治療剤と組み合わせて投与され得る。「治療剤」は、そのような治療を必要とする個体における症状又は疾患を治療するために投与

50

される任意の薬剤を包含する。ある種の実施形態では、追加の治療剤は、免疫調節性薬剤、細胞分裂阻害剤、細胞接着の阻害剤、細胞傷害性薬剤、細胞アポトーシスの活性化剤、又はアポトーシス誘発因子に対する細胞の感受性を増大させる薬剤である。そのような他の治療剤は、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて好適に存在する。併用療法は、合わせた投与（2つ以上の治療剤が、同じ又は別々の組成物中に含まれる）、及び別々の投与を包含し、その場合、本開示による抗原結合分子の投与は、追加の治療剤の投与の前、それと同時、及び/又はその後に行われ得る。本開示による抗原結合分子は、放射線療法と組み合わせて使用され得る。

【0322】

配列

【0323】

【表2】

表2: ヒトCD3イプシロンの細胞外ドメインのアミノ酸配列

標的タンパク質	配列番号	[aa]
成熟ヒトCD3 イプシロン-ECD (1-118)	1	DGNEEMGGITQTPYKVISIGTTVILTCPPQYPGSEIL WQHNDKNIGGEDDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQS GYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

【0324】

【表3】

表3: CD3特異的抗体“SP34”のVH及びVLアミノ酸配列

抗体	鎖	配列番号	[aa]
SP34	VH	2	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRF TISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGN SYVSWFAYWGQGLTVTVSS
SP34	VL	3	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYAN WVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDK AALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL GQ

【0325】

【表4】

表4: CD3特異的抗体“I2C”のVH及びVLアミノ酸配列

抗体	鎖	配列番号	[aa]
I2C	VH	4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNS YISYWAYWGQGLTVTVSS
I2C	VL	5	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTV L

【0326】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5: CD3特異的抗体“Roche”のVH及びVLアミノ酸配列

抗体	鎖	配列番号	[aa]
Roche	VH	6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAM NWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVK GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRH GNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS
Roche	VL	7	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNY ANWVQEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGS LLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFG GGTKLTVLGQ

10

【0327】

【表 6】

表 6: HER2特異的抗体トラスツズマブのVH及びVLアミノ酸配列

抗体	鎖	配列番号	[aa]
トラスツズマブ	VH	8	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVK RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS
トラスツズマブ	VL	9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQ GTKVEIK

20

【0328】

【表 7】

表 7: ペプチドリンカーのアミノ酸配列

リンカー	配列番号	[aa]
(GGG) ₃ リンカー	10	GGSGGSGGS
CH1 _{短縮} リンカー	11	ASTKGP
CL _{短縮} リンカー	12	QPKAAP
ヒンジ _{短縮} リンカー	13	DKTHTCPPCP
組合せ (CH1 _{短縮} +ヒンジ _{短縮}) リンカー	14	ASTKGPDKTHTCPPCP
組合せ (CH1 _{短縮} +ヒンジ _{短縮}) リンカー	15	QPKAAPDKTHTCPPCP

30

40

【0329】

50

【表 8】

表 8: N末端に位置するIgGヒンジ由来リンカーを含むヘテロ二量体Fc領域サブユニットの
アミノ酸配列

リンカー + Fc領域 サブユニット	配列番号	[aa]
リンカー ^(ヒンジ) CH2 ^(AEASS) CH3 ^(ノブ)	16	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
リンカー ^(ヒンジ) CH2 ^(AEASS) CH3 ^(ノブ)	17	DKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【 0 3 3 0 】

20

30

40

50

【表 9】

表 9: HER2に対する二価の結合及びCD3に対する一価の結合を有する本開示に従い且つ
図1Bに示されるとおりの三価の二重特異性抗原結合分子(ジスルフィド安定化された
第2のFv領域を有しない)を形成するポリペプチドのアミノ酸配列

コンストラクト1 (トラスツズマブ / I2C)	配列 番号	[aa]
VH _(トラスツズマブ) - CH1 - リンカー _{(GGS)³} - VL _(I2C) - リンカー _(CL₂+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	18	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCGGSGGSG GSQTVVTEQPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS GNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGLKTLVVGQPKAAPDKHTHTCPPCPAP EAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSS IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSL WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
VH _(トラスツズマブ) - CH1 - リンカー _{(GGS)³} - VL _(I2C) - リンカー _(CH1+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホール)	19	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTY IHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRW GGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCGGSGGSG GSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNK YAMNWWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSAST KGPDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVC TLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VL _(トラスツズマブ) - CL ヒトIgGカッパ	20	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【 0 3 3 1 】

50

【表10】

表 10: HER2に対する二価の結合及びCD3に対する一価の結合を有する本開示に従い且つ 図1Bに示されるとおりの三価の二重特異性抗原結合分子(ジスルフィド安定化された 第2のFv領域を有する)を形成するポリペプチドのアミノ酸配列

コンストラクト2 (トラスツズマブ / I2C)	配列 番号	[aa]
VH _(トラスツズマブ) - CH1 - リンカー _{(GGS)³} - VL(G100C) _(I2C) - リンカー _(CL₂+ヒンジ) - - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ノブ)	21	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTAPRFGSL LGGKAAALTSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGCGTKLTVLQQPKAAPDKTHTCPPCP APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTL PPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK</p>
VH _(トラスツズマブ) - CH1 - リンカー _{(GGS)³} - VL(G44C) _(I2C) - リンカー _(CH1+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) - CH3 _(ホ-ル)	22	<p>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKCLEWVARIRSKYNMYATYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGGTLVTVSSAST KGPDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL VHNDWLNKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLVSCAKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK</p>
VL _(トラスツズマブ) - CL ヒトIgGカッパ	23	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNT AWAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWVKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>

【 0 3 3 2 】

【表 1 1】

表 11: HER2に対する二価の結合及びCD3に対する一価の結合を有する図1Bに示されるとおりの三価の二重特異性抗原結合分子(ジスルフィド安定化された第2のF_v領域を有しない)を形成するポリペプチドのアミノ酸配列

コンストラクト3 (トラスツズマブ / Roche)	配列 番号	[aa]
VH _(トラスツズマブ) -CH1-リンカー _{(GGS)³} - VL _(Roche) -リンカー _(CL2+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) -CH3 _(フブ)	24	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKSCGGSGGSGGSAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTTSNYANWV QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSL LGGKAALTLGSAQPEDEAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVLGQPKAAPDKHTHTCPPCPAP EAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
VH _(トラスツズマブ) -CH1-リンカー _{(GGS)³} - VL _(Roche) -リンカー _(CH1+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) -CH3 _(ホ-ル)	25	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVKPKSCGGSGGSGGSEVQLLESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWW RQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVK GRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSAS TKGPDKHTHTCPPCPAPEAEAGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIK KAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VL _(トラスツズマブ) -CL ヒトIgGカツパ	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSEQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【 0 3 3 3】

【表 1 2】

表 12: HER2に対する二価の結合及びCD3に対する一価の結合を有する図1Bに示されるとおりの三価の二重特異性抗原結合分子(ジスルフィド安定化された第2のFv領域を有しない)を形成するポリペプチドのアミノ酸配列

コンストラクト4 (トラスツズマブ / SP34)	配列 番号	[aa]
VH _(トラスツズマブ) -CH1-リンカー _{(GGS)3} - VL _(SP34) -リンカー _(CL_λ+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) -CH3 _(ノブ)	27	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSAVVTQES ALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWV QEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLI GDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSLWVF GGGTKLTVLGQPKAAPDKHTHTCPPCPAPEA EGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPCR EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP GK
VH _(トラスツズマブ) -CH1-リンカー _{(GGS)3} - VL _(SP34) -リンカー _(CH1+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) -CH3 _(ホール)	28	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCGGSGGSGGSEVQLVESG GGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWV RQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYCYC VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSAS TKGPKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKTIKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC KAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSLSC AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
VL _(トラスツズマブ) -CL ヒトIgGカッパ	29	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSEQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

【 0 3 3 4】

【表 1 3】

表 13: HER2に対する二価の結合及びCD3に対する一価の結合を有する図1Bに示されるとおりの三価の二重特異性抗原結合分子(ジスルフィド安定化された第2のFv領域を有しない)を形成するポリペプチドのアミノ酸配列

コンストラクト5 (トラスツズマブ / 陰性対照)	配列 番号	[aa]
VH _(トラスツズマブ) -CH1-リンカー _{(GGS)³} - VL _(陰性対照) -リンカー _(CL2+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) -CH3 _(フ)	30	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCGGSGGSGSDIELTQPPS VSVAPGQTARISCSGDNLPAYTVTWYQQKP GQAPVLIYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTA TLTISGTQAEDEADYICASWDPSSGVVFGG GTKLTVLGQPKAAPDKHTHTCPPCPAPEAEG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSP GK
VH _(トラスツズマブ) -CH1-リンカー _{(GGS)³} - VL _(陰性対照) -リンカー _(CH1+ヒンジ) - CH2 _(AEASS) -CH3 _(ホール)	31	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCGGSGGSGSQVQLQQSG PGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWSWI RQSPGRGLEWLGRIYYRSKWYNDYAVSVK SRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYC ARLDHRVHEDTVYPGMDVWGQGLTVTVSS ASTKGPDKHTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPSSIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
VL _(トラスツズマブ) -CL ヒトIgGカッパ	32	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNT AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRF SGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYT TPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSEQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【実施例】

【0335】

以下は、本開示による分子及び方法の例である。本明細書で提供される一般的な説明から、様々な他の実施形態が実践され得ることが理解される。

【0336】

標準的な方法を使用して、Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989において記載されるとおりにDNAを操作した。ヒト免疫

10

20

30

40

50

グロブリン軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、Kabat, E. A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242において与えられる。

【0337】

実施例1：三価の二重特異性抗原結合分子の調製、生成及び特徴付け

本明細書で例示されるとおりの抗原結合分子は、通常のヒトIgG1分子のFc領域と2つのFabアームの間に追加のFv領域(Fv2)を組み込んでいるアグリコシル化モノクローナルヒトIgG1鑄型抗体から構築された。そのような分子の基本構造は、図1Bにおいて提供される。

【0338】

2つのFabアームとFc領域の間の融合は、2つのFab重鎖のC末端と組み込まれた追加のFv領域の可変ドメイン(VH2及びVL2)のN末端の間のグリシン-セリンリンカー((GGS)3)(配列番号10)を使用することによって達成された。第2のFv領域(Fv2)の可変ドメインと2つのFc領域サブユニットの間の融合は、CLの最初の5アミノ酸残基(QPKAAP(配列番号12))又はCH1(ASTKGP(配列番号11))定常ドメイン及びヒトIgG1ヒンジ配列の部分(DKTHTCP(配列番号13))から構築されたペプチドリンカーを使用することによって達成された。ヒトIgG1ヒンジ配列の使用は、2つの利用されるペプチドリンカーの間の鎖間ジスルフィド架橋の形成を介してヘテロ二量体分子のさらなる安定化を可能にした。Fc領域は、「ノブ・イントゥ・ホール」技術に従って変異を各Fc領域サブユニットのCH3ドメインに導入することによって改変された。それによって、1つの変異されたCH3ドメインを含むポリペプチドは、相補的な様式で操作される他のCH3ドメインを含む他のポリペプチドとヘテロ二量体化させられる。

【0339】

下に例示される二重特異性三価コンストラクトにおいて、抗原結合分子の2つのFabアームに存在する2つのFab(Fab1及びFab2)は、二価の様式で癌関連標的HER2に特異的に結合するが、組み込まれた第2のFv領域(Fv2)は、一価の様式でヒトCD3イプシロンに特異的に結合する。

【0340】

HER2結合に関して、Baselga et al., 1998, Cancer Res 58(13):2825-2831)によって記載されるとおりの「トラスツズマブ」(ハーセプチン(登録商標))に由来するVH及びVLドメインをコードするヌクレオチド配列が使用された。トラスツズマブ及びその調製の方法は、米国特許第5,821,337号明細書に記載される。

【0341】

CD3結合に関して、以下のCD3抗体のVH及びVLドメインをコードする以下のヌクレオチド配列が使用された：

- ・SP34：Yoshino et al. (Exp. Anim. 49(2), 97-110, 2000)によって記載されるモノクローナル抗体
- ・I2C：国際公開第2008/119566号パンフレット(MICROMET AG)に記載されるモノクローナル抗体
- ・抗体「Roche」として本明細書で参照される国際公開第2016/020309号パンフレット(F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)に開示されるモノクローナルCD3抗体
- ・ニワトリリゾチームに関する特異性を有する内製の陰性対照抗体。

【0342】

本明細書に記載される実施例に従って作製される本開示により生成された二重特異性三価抗原結合分子(本明細書でコンストラクト1~5と呼ばれる)の個々の構成要素(Fab、リンカー、Fv領域、Fc領域など)の概説は、表3~13に記載される。

10

20

30

40

50

【 0 3 4 3 】

遺伝子合成

全ての核酸配列又は所望の遺伝子セグメントは、内製又は外部の提供者によって、適切な鋳型を使用するPCRによって作製されたか、又は適切な隣接領域（例えば、好適な制限酵素認識部位、リンカー配列）を有する線状DNAフラグメントとして遺伝子合成された。単一の制限エンドヌクレアーゼ切断部位に隣接する核酸配列又は遺伝子セグメントは、標準的な分子生物学の方法を使用して、それぞれの発現ベクター（例えば、哺乳動物IgG発現ベクター）又は配列決定ベクターにクローン化された。哺乳動物発現ベクターにおける使用が意図される時、全てのコンストラクトは、真核細胞における分泌のためのタンパク質を標的化するリーダーペプチドをコードする5'末端DNA配列とともに設計された。サブクローニングされた遺伝子フラグメントのDNA配列は、二本鎖によるDNAの配列決定によって確認された。

10

【 0 3 4 4 】

生成

コンストラクト1～5の発現に関して、指数関数的に増殖している真核HEK293細胞は、それぞれFc領域サブユニットを含む2つのポリペプチドと第1及び第2のFabの軽鎖を含むポリペプチドの1:1:2の比をもたらす、コンストラクトの全ての構成要素をコードする哺乳動物の2つのベクター発現系でトランスフェクトされた。

【 0 3 4 5 】

細胞培養液上清は、トランスフェクション後の6日目に収集され、標準的なプロテインAアフィニティークロマトグラフィー（MabSelect SURE GE Healthcare）にかけられた。緩衝液交換は、1xダルベッコPBS（pH7.2 | Invitrogen）に対して実施され、試料は滅菌濾過（0.2µm孔径）された。タンパク質濃度は、UV-分光光度法によって決定され、コンストラクトの純度は、CE-SDS（LabChip GXII Perkin Elmer USA）を使用して変性、還元及び非還元条件下で分析された。HP-SECは、天然状態においてIgG製剤を分析するために実施された。

20

【 0 3 4 6 】

生成結果

表14は、生成されたコンストラクトに関して得られた異なる製剤の収量及び最終単量体含量を要約している。一般に、コンストラクトを、29～75mg/Lの収量及び65～90%の単量体含量を有して記載される生成及び精製方法によって作製することができた。コンストラクト2における第2のFv領域のVHとVLドメインの間の安定化ジスルフィド架橋（VH-G44C/VL-G100C）の使用は、安定化ジスルフィド架橋を欠く対応するコンストラクト1と比較したとき、収量及び単量体含量の著しい減少をもたらした。

30

【 0 3 4 7 】

40

50

【表 1 4】

表 14: 収量及び最終単量体含量

コンストラクト		配列番号	体積 収量 [mg/L]	単量体 含量 [%]
コンストラクト 1	トラスツズマブ / I2C	18, 19, 20	62*	88*
コンストラクト 2	トラスツズマブ / I2C (VH-G44C/VL-G100C)	21, 22, 23	29	65
コンストラクト 3	トラスツズマブ / Roche	24, 25, 26	75	90
コンストラクト 4	トラスツズマブ / SP34	27, 28, 29	53	90
コンストラクト 5	トラスツズマブ / 陰性対照	30, 31, 32	69	90

*n=2 の平均

10

【0348】

実施例 2 : 細胞上で発現される CD 3 及び HER 2 に対する三価の二重特異性抗原結合分子の結合。

20

標的細胞 :

HER 2 に対する二価の結合及び CD 3 に対する一価の結合を有する二重特異性三価コンストラクト 1、3、4 及び 5 の HER 2 標的化の評価のために、以下の腫瘍細胞株が使用された : HER 2 陽性ヒト腺癌 SKOV - 3 [SKOV3] (ATCC (登録商標) HTB - 77 (商標)) 細胞株及び HER 2 陰性ヒト腺癌 MDA - MB - 468 (ATCC (登録商標) HTB - 132 (商標)) 細胞株。加えて、ヒト CD 3 陽性 T 細胞白血病細胞株、Jurkat (ATCC # TIB - 152) を使用して、ヒト CD 3 に対する結合を評価した。

【0349】

方法 :

30

Jurkat 又は SKOV - 3 細胞は再懸濁され、洗浄緩衝液 (カルシウム及びマグネシウム (Gibco, # 14040174) とともに 3% FBS 及び 0.02% ナトリウム酸が補充された DPBS) 中で計数された。ウェル当たり 6×10^4 個の細胞が、384 ウェル V 底プレート (Greiner bio-one, # 781280) 中に播種され、段階希釈されたコンストラクト (滴定範囲 500 nM ~ 0.5 nM) と氷上で 1 時間インキュベートされた。細胞は、洗浄緩衝液中で 2 回洗浄された。結合したコンストラクトは、ヒト F(ab')₂ フラグメント (Jackson Immuno Research, # 109 - 606 - 097) に対して向けられる Alexa Fluor 647 がコンジュゲートされた検出抗体を使用して検出された。コンストラクトの染色は、IntelliCyt iQue フローサイトメーターを使用して測定され、ForeCyt (バージョン 4.1.5379、IntelliCyt) ソフトウェアにおいて分析された。EC50 値は、Prism ソフトウェア (GraphPad Software Inc.、バージョン 5.04) における 4 パラメーター非線形回帰分析を使用して計算された。

40

【0350】

結果 :

実験の結果は、表 15 並びに図 3 A (Jurkat 細胞) 及び図 3 B (SKOV - 3 細胞) において要約され、二重特異性三価コンストラクト 1、3 及び 4 が、用量依存的な様式において細胞上で発現される HER 2 及び CD 3 に特異的に結合することを明らかにしている。さらに、HER 2 及び CD 3 陰性細胞株に対する結合は、試験されたコンストラクトについては観察できない (データは示さず)。陰性対照コンストラクト 5 は、いずれの

50

細胞株を使用しても結合活性を示さない。

【 0 3 5 1 】

【 表 1 5 】

表 15: HER2 発現 SKOV-3 細胞に対する HER2 x CD3 二重特異性コンストラクトの細胞結合

コンストラクト		配列番号	FACS EC ₅₀ [nM] SKOV-3
コンストラクト 1	トラスツズマブ / I2C	18, 19, 20	2.41
コンストラクト 3	トラスツズマブ / Roche	24, 25, 26	3.72
コンストラクト 4	トラスツズマブ / SP34	27, 28, 29	4.17
コンストラクト 5	トラスツズマブ / 陰性対照	30, 31, 32	3.96

10

【 0 3 5 2 】

実施例 3 : レポーター遺伝子アッセイ - NFAT レポーター遺伝子でトランスフェクトされた SKOV-3 及び Jurkat 細胞に対する三価の二重特異性抗原結合分子の試験標的及びエフェクター細胞 :

20

二重特異性三価コンストラクト 1、3、4 及び 5 の機能活性の評価に関して、NFAT レポーター遺伝子コンストラクトで一過的にトランスフェクトされた Jurkat 細胞 (ATCC # TIB-152) が、代替のエフェクター細胞として使用された。標的細胞として、以下の腫瘍細胞株が使用された : HER2 陽性ヒト腺癌 SKOV-3 [SKOV3] (ATCC (登録商標) HTB-77 (商標)) 細胞株及び HER2 陰性ヒト腺癌 MDA-MB-468 (ATCC (登録商標) HTB-132 (商標)) 細胞株。

【 0 3 5 3 】

以下の増殖培地が、細胞株の維持のために使用された : (a) Jurkat : 10% FCS (Sigma, # F7524) が補充された RPMI-1640 + L-グルタミン (Thermo Fisher, # 21875-034) ; (b) SKOV-3 : 10% FCS (Sigma # F7524) が補充された McCoy's 5a (Thermo Fisher, # 10938) (c) MDA-MB-468 : 1x GlutaMAX (商標) (Thermo Fisher, # 35050-061)、1x ピルビン酸ナトリウム (Thermo Fisher, # 11360-039) 及び 10% FCS (Sigma # F7524) が補充された DMEM-L-グルタミン (Thermo Fisher, # 10938)。

30

【 0 3 5 4 】

方法 :

40

SKOV-3 及び MDA-MB-468 細胞は、 4×10^5 細胞/ml の密度まで増殖培地中で希釈された。 $40,000$ 細胞に相当する $100 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液が、組織培養処理された 96 ウェルプレート (Corning, # 3917) の各ウェル中に播種され、加湿されたインキュベーター中において 37 及び 5% CO_2 で一晩インキュベートされた。Jurkat 細胞は、 2.5×10^5 細胞/ml の濃度まで増殖培地中で再懸濁された。トランスフェクション成分 pGL4.30 [luc2P/NFAT-RE/Hygro] レポーター遺伝子ベクター、OptiMEM-I 培地 (Life Technologies, # 31985-047) 及び TransIT-LT1 トランスフェクション試薬 (Mirus, # MIR2304) が、室温で 15 分間インキュベートされ、続いて Jurkat 細胞懸濁液に加えられ、加湿されたインキュベーター中において 37 及び 5

50

%CO₂で17時間インキュベートされた。Jurkat細胞は、収集され、1, 2E + 06細胞/mlの濃度で増殖培地中において再懸濁された。培地は、覆われた標的細胞から除去され、ウェル当たり60, 000細胞に相当する50µlのJurkat細胞懸濁液によって置き換えられた。コンストラクト1、3、4及び天然の対照コンストラクト5は、Jurkat増殖培地中で段階的に希釈された。50µlのコンストラクト希釈物が各ウェルに加えられて、31nM ~ 0.12nMの最終濃度範囲をもたらした。アッセイプレートは、加湿されたインキュベーター中において37℃及び5%CO₂で5時間インキュベートされた。Bright-Glo (商標) 試薬 (Promega、#E2620) は、製造業者の指示書に従って再構成された。アッセイプレート及び試薬は、室温で平衡化された。100µlのBright-Glo (商標) 試薬が、アッセイプレートの各ウェルに加えられ、混合された。発光は、Infinite M1000 Proプレートリーダー (Tecan) を使用して測定された。

10

【0355】

結果：

実験の結果は、表16並びに図4A (SKOV-3細胞) 及び図4B (MDA-MB-468細胞) において要約される。コンストラクト1、3、4は、0.7nM ~ 1.8nMの範囲のEC₅₀濃度を有してHER2発現標的細胞株SKOV-3の存在下で用量依存的なルシフェラーゼ活性を誘導する。コンストラクト1は、それぞれEC₅₀及び最大ルシフェラーゼ活性レベルによって示されるとおり最も高い有効性及び効力を示す。HER2陰性MDA-MB-468標的細胞の存在下で、コンストラクト1は、高濃度で弱いルシフェラーゼ活性を誘導する。コンストラクト3、4は、HER2の非存在下で不活性である。陰性対照コンストラクト5は、いずれの標的細胞株を使用しても活性を示さない。

20

【0356】

【表16】

表 16: SKOV-3 細胞の存在下での HER2 x CD3 二重特異性コンストラクトのルシフェラーゼ活性の誘導

コンストラクト		配列番号	EC ₅₀ [nM]
			SKOV-3
コンストラクト1	トラスツズマブ / I2C	18, 19, 20	0.71
コンストラクト3	トラスツズマブ / Roche	24, 25, 26	1.53
コンストラクト4	トラスツズマブ / SP34	27, 28, 29	1.75
コンストラクト5	トラスツズマブ / 陰性対照	30, 31, 32	活性なし

30

【0357】

実施例4：三価の二重特異性抗原結合分子によって媒介されるリダイレクトされたT細胞の細胞傷害性

二重特異性三価コンストラクト1、3、4及び5は、CD3及びHER2への結合時の腫瘍細胞のT細胞に媒介される死滅を誘導するそれらの潜在力について分析された。

【0358】

40

方法

健常ドナー由来のヒト全血が、Li-ヘパリン含有S-Monovette容器 (Sarstedt) 中に回収された。血液は50mlコニカルチューブに移され、2%ウシ胎仔血清 (Sigma、#F7524) 及び2mM EDTAを含有する等体積のPBSと混合された。希釈された血液は、15mlのBiocoll溶液 (Biochrom、#L6115) を含有するSepMate-50チューブ (StemCell Technologies、#86450) に移され、1200xgで10分間遠心分離された。上清が、50mlのコニカルチューブに移され、PBSで45mlに希釈され、300xgで8分間遠心分離された。上清は捨てられ、細胞ペレットは1mlのPBS中で再懸濁され、細胞はNeubauerチャンバーを使用して計数された。

50

【0359】

5,000個のHER2発現SKBR3細胞及びHER2陰性MDA-MB-468細胞が、培養培地(SKBR3:マッコイ5A培地(ThermoFisher、#2660)、10%FCS(Sigma、#F7524);MDA-MB-468:DMEM(ThermoFisher、#10938)、1xGlutaMAX(商標)(ThermoFisher、#35050-061)、1xピルビン酸ナトリウム(ThermoFisher、#11360-039)、10%FCS)中で懸濁され、黒色96ウェルアッセイプレート(Corning、#3340)に播種され、37及び5%CO₂で一晩インキュベートされた。全てがRPMI 1640 w/oフェノールレッド(Gibco、#32404-014)、GlutaMAX及び10%ウシ胎仔血清を含むアッセイ培地中で希釈されたCellToxGreen色素(Promega、#G8731)、100nMに希釈された二重特異性抗原結合分子及び100,000個の精製されたPBM Cが細胞に加えられ、37及び5%CO₂で48時間インキュベートされた。細胞傷害活性は、Tecan Infinite F500デバイスを使用して485nm励起及び535nm発光にて組み込まれたCellToxGreen蛍光を測定することによって評価された。

【0360】

結果:

実験の結果は、図5において示される。PBM Cとコンストラクト1、3及び4の共培養は、100nMの試験されたコンストラクト濃度でHER2発現SKBR3標的細胞の死滅を誘導する。HER2陰性MDA-MB-468細胞の非存在下において、試験されたコンストラクトのうちで細胞傷害活性を刺激するものはない。陰性対照コンストラクト5は、いずれの標的細胞株を使用しても活性を誘導しない。

【0361】

実施例5:親和性の判定

方法

ヒトCD3イプシロンとCD3に関する一価の特異性及びHER2に関する二価の特異性を有する抗原結合分子(コンストラクト1及び3)の間の相互作用の動力的特徴付けは、抗原結合分子捕捉形式において実施され、抗原は、溶液中の分析物としてアプライされた。大容量捕捉表面は、ビオチン化MabSelect Sureリガンド(非ビオチン化リガンド:GE Healthcare、28-4018-60)をいくつかのストレプトアビジンセンサー(fortebio、パート18-5021)上にローディングすることによって作製された。動力的実験の各サイクルは、捕捉工程(並行して使用されるいくつかのセンサー上の1つのリガンドの)に続く分析物結合工程(会合期、異なる分析物濃度及びアッセイ緩衝液、すなわち、ブランク減算については抗原濃度0)からなつた。結合の後、結合した抗原の解離がモニターされた(アッセイ緩衝液に曝されたセンサー)。各サイクルの最後に、結合したリガンド及び/又はリガンド-抗原複合体は、10mMグリシン/HCl pH1.5(GE Healthcare、BR100354)による20秒の2回の連続した再生工程によりセンサー表面から除去されたが、捕捉表面の完全性は維持された。

【0362】

捕捉されたりガンドによりセンサー上で記録されたシグナルは、結合の間抗原の代わりにアッセイ緩衝液に曝されたが、例えば、捕捉されたりガンドの解離の可能性を補正するために、抗原濃度がゼロではないセンサーグラムから差し引かれた。1000rpmの軌道振盪速度で、会合は300秒間、解離は300秒間記録された。0.05%(v/v)ポリソルベート20(Merck、8.22184.0500)及び0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン(Sigma、A7906)が補充されたDPBS(GIBCO、Ca²⁺なし、Mg²⁺なし;ThermoFisher Cat.No.14190)が、アッセイ緩衝液として使用された。リガンドの捕捉レベルは、およそ2nmに調整されて、hCD3e分析物によっておよそ0.3nmの飽和レベルRmaxに達した。いくつ

かの異なる分析物濃度が、動力学実験の間に分析のために使用された (p M A X _ h C D 3 e (1 - 1 1 8) _ F - c h L y s _ a v i ; アプライされたモル濃度 1 5 . 6 2 5 ~ 1 0 0 0 n M 、 2 倍の段階希釈系列) 。

【 0 3 6 3 】

センサーグラムは、データ分析ソフトウェア v 1 0 (O c t e t / f o r t e b i o) で評価された。全てのセンサーグラムは、1 : 1 結合モデルにフィッティングされて、k o n 及び k o f f 速度定数を決定し、これは K D 値を計算するために使用された。予測される 1 : 1 結合から逸脱している動力学プロファイルについては、センサーグラムは、一価の動力学への最適な近似を使用して評価され、結果は、「不均一な結合」の所見をつけて記された。これらの結果は、予測される一価の結合動力学に完全に従う動力学プロファイルより厳密ではないと考えられるが、K D についての十分な近似であると想定される。さらに、リガンドと C D 3 タンパク質のそれぞれの分子量を考慮して、得られたリガンドの捕捉レベルに外挿した飽和レベル (R m a x) を関連付け、観察される結合事象が予測される化学量論及び一価の結合で説明できるかどうかを評価した。

10

【 0 3 6 4 】

結果：ヒト C D 3 イプシロンに対する結合

実験の結果は、表 1 7 において要約される。観察される結合を使用して、飽和レベルの C D 3 を外挿し、リガンドの捕捉レベルに関連付けた。実験的飽和 R m a x は、C D 3 の完全に活性な一価抗体への一価の結合に関して理論的に予測される範囲 (1 0 0 ± 1 5 %) 内に見出された。

20

【 0 3 6 5 】

結果は、C D 3 に対する特異性を有する第 2 の F v 領域の相対的な位置が、使用される C D 3 に特異的な抗体の結合活性にとって好ましくないわけではないことを明らかにしている。

【 0 3 6 6 】

【表 1 7 】

表 17: ヒト CD3 イプシロンに対する一価の結合を有する二重特異性三価コンストラクト1及び
コンストラクト3の親和性

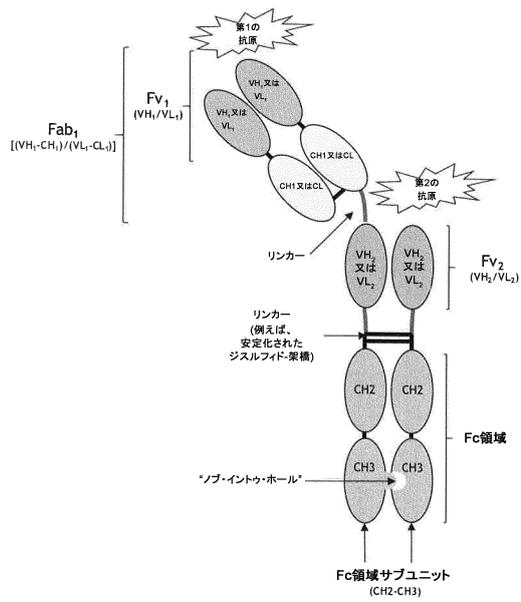
コンストラクト		配列番号	kon [1/Ms]	koff [1/s]	KD [nM]	所見
コンストラクト1	トラスツズマブ / I2C	18, 19, 20	4,57E+05	4,47E-04	1.0	わずかに不均一な結合
コンストラクト3	トラスツズマブ / Roche	24, 25, 26	5,19E+05	3,24E-03	6,2	-

30

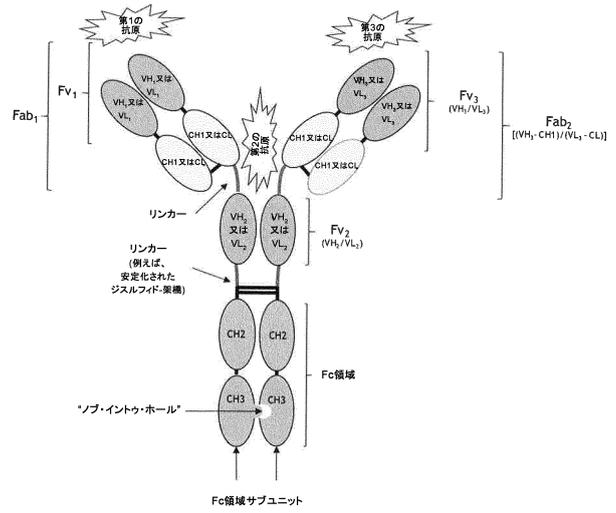
40

50

【 図 面 】
【 図 1 A 】



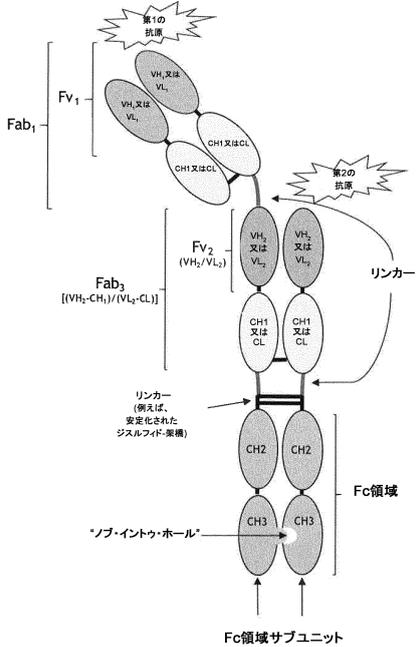
【 図 1 B 】



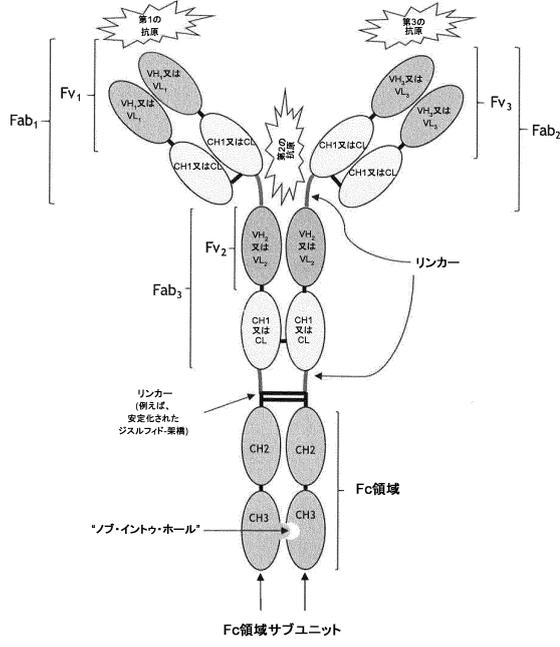
10

20

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】

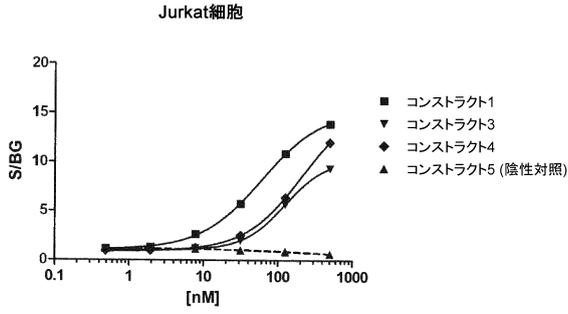


30

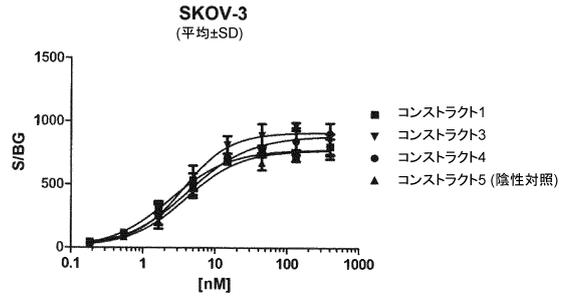
40

50

【 図 3 A 】

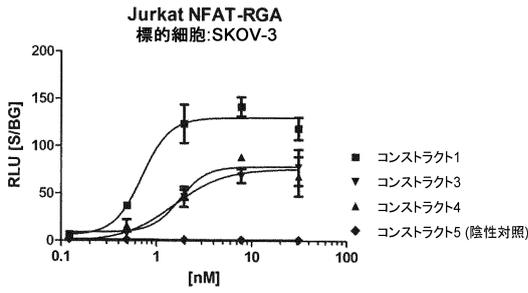


【 図 3 B 】

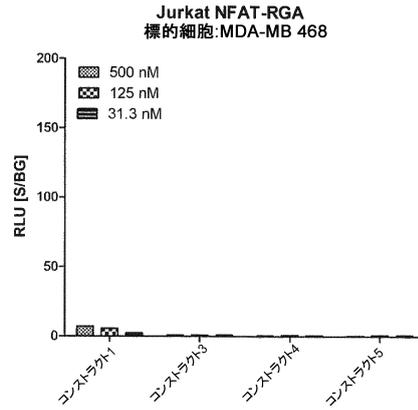


10

【 図 4 A 】

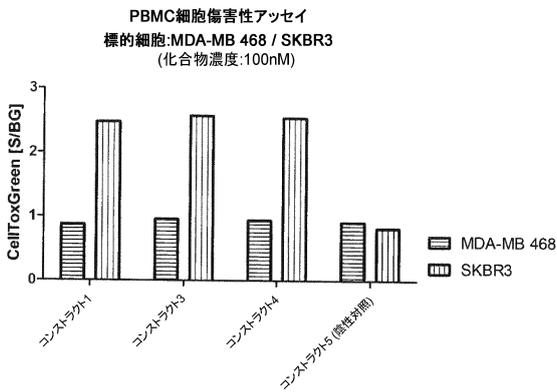


【 図 4 B 】



20

【 図 5 】



30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/083638

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K16/46	C07K16/32
		C07K16/28
		A61P35/00
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
C07K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2018/215834 A1 (DESJARLAIS JOHN [US] ET AL) 2 August 2018 (2018-08-02) the whole document in particular, pages 2 and 17 and figure 3 -----	1-15
Y	WO 2016/086189 A2 (XENCOR INC [US]) 2 June 2016 (2016-06-02) the whole document in particular, pages 2, 8, 10, 11 and figures 3C and 3D -----	1-15
Y	WO 2011/030107 A1 (UCB PHARMA SA [BE]; ADAMS RALPH [GB] ET AL.) 17 March 2011 (2011-03-17) the whole document in particular, pages 20., 41-42, 53, 54, 56 and figures 1B and 1C -----	1-15
	-/--	
<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		*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
E earlier application or patent but published on or after the international filing date		*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
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)		*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
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 February 2020		10/03/2020
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

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

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2019/083638

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MERCHANT A MARGARET ET AL: "An efficient route to human bispecific IgG", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, NEW YORK, vol. 16, no. 7, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 677-681, XP002141015, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT0798-677 the whole document in particular table 1 on page 678 -----	1-15
Y	WO 2015/150447 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 8 October 2015 (2015-10-08) the whole document in particular, pages 21-22 -----	1-15
Y	WO 2012/168199 A1 (NOVO NORDISK AS [DK]; ZAHN STEFAN [DK] ET AL.) 13 December 2012 (2012-12-13) the whole document in particular, pages 23-26 -----	12
Y	WO 2009/053368 A1 (MERCK SERONO SA [CH]; BOZZATO GIULIANO [CH] ET AL.) 30 April 2009 (2009-04-30) the whole document in particular, page 3 -----	12

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/083638

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2018215834	A1	02-08-2018	US 2014294833 A1 US 2018215834 A1	02-10-2014 02-08-2018

WO 2016086189	A2	02-06-2016	AU 2015353409 A1 AU 2017216517 A1 AU 2019201923 A1 BR 112017011092 A2 CA 2967426 A1 CL 2017001328 A1 CN 107207610 A EA 201791139 A1 EP 3223845 A2 GT 201700112 A JP 2017536829 A KR 20170084326 A PE 20171324 A1 PH 12017500968 A1 SG 11201704283P A TN 2017000223 A1 US 2016229924 A1 US 2017081420 A1 US 2018282432 A1 WO 2016086189 A2	15-06-2017 31-08-2017 11-04-2019 26-12-2017 02-06-2016 23-03-2018 26-09-2017 30-04-2018 04-10-2017 27-11-2018 14-12-2017 19-07-2017 11-09-2017 20-11-2017 29-06-2017 19-10-2018 11-08-2016 23-03-2017 04-10-2018 02-06-2016

WO 2011030107	A1	17-03-2011	EP 2475682 A1 ES 2667258 T3 US 2012283415 A1 US 2016333105 A1 WO 2011030107 A1	18-07-2012 10-05-2018 08-11-2012 17-11-2016 17-03-2011

WO 2015150447	A1	08-10-2015	AU 2015239546 A1 BR 112016020112 A2 CA 2939852 A1 CL 2016002455 A1 CN 106164095 A CR 20160450 A DK 3126395 T3 EA 201691991 A1 EP 3126395 A1 EP 3590968 A1 HR P20191704 T1 HU E045243 T2 JP 2017511139 A KR 20160138103 A LT 3126395 T PE 20161390 A1 PH 12016501763 A1 PL 3126395 T3 PT 3126395 T SG 11201608095Y A SI 3126395 T1 TW 201540728 A UA 117289 C2 US 2015315296 A1 WO 2015150447 A1	01-09-2016 16-01-2018 08-10-2015 11-08-2017 23-11-2016 19-12-2016 30-09-2019 28-04-2017 08-02-2017 08-01-2020 13-12-2019 30-12-2019 20-04-2017 02-12-2016 10-10-2019 28-12-2016 06-02-2017 31-12-2019 30-09-2019 28-10-2016 30-10-2019 01-11-2015 10-07-2018 05-11-2015 08-10-2015

WO 2012168199	A1	13-12-2012	AU 2012266487 A1 BR 112013031198 A2	21-11-2013 29-11-2016

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/083638

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CA 2838497 A1	13-12-2012
		CN 103596982 A	19-02-2014
		DK 2718322 T3	03-12-2018
		EP 2718322 A1	16-04-2014
		EP 3424953 A1	09-01-2019
		ES 2693647 T3	13-12-2018
		IL 229254 A	28-09-2017
		JP 6141834 B2	07-06-2017
		JP 6416177 B2	31-10-2018
		JP 2014523408 A	11-09-2014
		JP 2017081941 A	18-05-2017
		KR 20140036261 A	25-03-2014
		PL 2718322 T3	31-07-2019
		RU 2013155029 A	20-07-2015
		TW 201311724 A	16-03-2013
		US 2013004514 A1	03-01-2013
		US 2013295116 A1	07-11-2013
		US 2015044231 A1	12-02-2015
		US 2017073421 A1	16-03-2017
		US 2020017599 A1	16-01-2020
		WO 2012168199 A1	13-12-2012

WO 2009053368	A1	30-04-2009	AU 2008314697 A1
			EP 2203180 A1
			ES 2400107 T3
			IL 204948 A
			JP 5314033 B2
			JP 2011500073 A
			WO 2009053368 A1

10

20

30

40

50

フロントページの続き

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,N
E,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,K
G,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,N
I,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,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 4 7 7 , ロイトシュテッテナー シュトラーセ 5 6 ベー

(72)発明者 ゼバスティアン イェーガー

ドイツ連邦共和国 グレーフェルフینگ 8 2 1 6 6 , ヴュルムシュトラーセ 1 5

(72)発明者 シュテッフェン ルンツ

ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク 6 9 1 2 6 , ゲオルク - メヒターシュハイマー - シュトラーセ
2

(72)発明者 ヨハネス オーバン

ドイツ連邦共和国 ミュンヘン 8 1 3 7 3 , クラエラーシュトラーセ 3

F ターム (参考) 4C085 AA13 AA14 BB01 BB41 BB42 BB43 CC21 DD62 EE01 GG01
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 CA04 DA20 MA66 NA05 NA14 ZB02
ZB05 ZB09 ZB26 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26