

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-532278

(P2015-532278A)

(43) 公表日 平成27年11月9日(2015.11.9)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|---------------------|-------------|
| C07K 16/28 (2006.01) | C O 7 K 16/28 Z N A | 4 B O 2 4 |
| C12P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P 21/08 | 4 B O 6 4 |
| C12N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | 4 C O 8 5 |
| A61K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 D | 4 H O 4 5 |
| A61P 35/02 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 N | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く | | |

(21) 出願番号 特願2015-534421 (P2015-534421)
 (86) (22) 出願日 平成25年9月27日 (2013. 9. 27)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年5月25日 (2015. 5. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/NL2013/050693
 (87) 国際公開番号 W02014/051433
 (87) 国際公開日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3)
 (31) 優先権主張番号 61/706, 543
 (32) 優先日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/834, 915
 (32) 優先日 平成25年6月14日 (2013. 6. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510340757
 メルス・ペー・フェー
 オランダ・NL-3584・セーハー・ユ
 トレヒト・パドゥアラーン・8 (ポストフ
 ァーク・133)
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 T細胞エンゲージャーとしての二重特異性 I g G抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗体の1つのアームが免疫エフェクター細胞上のエピトープに結合するのに対して、他のアームがCLEC12A又はその機能的等価物を標的とする、ヒトIgG二重特異性抗体を提供する。MDS、CML又はAMLなどの悪性腫瘍に対するこれらの抗体の薬学的使用も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識する1つのアーム、及びCLEC12A又は前記機能的等価物を発現する異常細胞に免疫エフェクター細胞を動員することができる免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識する第2のアームを含む、二重特異性IgG抗体。

【請求項 2】

前記免疫エフェクター細胞がT細胞を含む、請求項1に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 3】

前記免疫エフェクター細胞上の前記抗原がCD3である、請求項1又は2に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 4】

CD3 を特異的に認識する、請求項3に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 5】

両アームが共通軽鎖を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体

。

【請求項 6】

前記共通軽鎖が生殖系列軽鎖、好ましくは再配列生殖系列ヒトカップ軽鎖IgV 1-39*01 /IGJ 1*01である、請求項1から5のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 7】

ヒトIgG1である、請求項1から6のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 8】

CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、SGYTFTSYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR1配列、及びIINPSGGGSと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR2配列、及びGTTGDWFDYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR3配列を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 9】

CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMG I I NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCAK GTTGD WFDYWGQGLTVTVSSと少なくとも90%同一である配列からなる可変重鎖配列を含む、請求項8に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 10】

CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、SGYTFTSYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR1配列、及びIINPSGGGSと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR2配列、及びGNYGDEFDYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR3配列を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 11】

CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMG I I NPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARGNYGD EFDYWGQGLTVTVSSと少なくとも90%同一である配列からなる可変重鎖配列を含む、請求項10に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 12】

CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、SGYTFTGYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR1配列、及びWINPNSGGと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR2配列、及びDGYFADAFDYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR3配列を含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 13】

CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSK ASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMG I I NPSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTS I STAYMEL S R L R S D D TAVYYC A R D G Y F A DAFDYWGQGLTVTVSSと少なくとも90%同一である配列からなる可変重鎖配列を含む、請求項12に記載の二重特異性IgG抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

CD3を特異的に認識する第2のアームが、配列SYGMHからなる重鎖CDR1配列、及び配列IIWYSGSKKNYADSVKGからなる重鎖CDR2配列、及び配列GTGYNWFDLPからなる重鎖CDR3配列を含む、請求項3から13のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 15】

CD3を特異的に認識する第2のアームが、配列QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGTTLVTVSSからなる可変重鎖配列を含む、請求項14に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 16】

第1及び第2のアームが、RASQSISSYLNと少なくとも90%同一である配列からなる軽鎖CDR1配列、及びAASSLQSと少なくとも90%同一である配列からなる軽鎖CDR2配列、及びQQSYSTPTと少なくとも90%同一である配列からなる軽鎖CDR3をさらに含む、請求項1から15のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 17】

第1及び第2のアームが、DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKと少なくとも90%同一である配列からなる可変軽鎖配列を含む、請求項16に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 18】

前記二重特異性IgG抗体とFc受容体との相互作用が著しく減少するように、前記二重特異性IgG抗体が突然変異CH2及び/又は下部ヒンジドメインを有する、請求項1から17のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 19】

前記突然変異CH2及び/又は下部ヒンジドメインが、235及び/又は236位(Kabatによるナンバリング)のアミノ酸における少なくとも1つの置換を含む、請求項18に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 20】

前記突然変異CH2及び/又は下部ヒンジドメインが置換L235G及び/又はG236R、好ましくはL235G及びG236Rを含む、請求項18又は19に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 21】

単一細胞から請求項1から20のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体を産生する方法であって、前記二重特異性IgG抗体が、界面を形成することができる2つのCH3ドメインを含み、前記方法が、

a)CLEC12Aを特異的に認識し、第1のCH3ドメインを含むIgG重鎖をコードする第1の核酸配列、及びb)免疫エフェクター細胞上の抗原、好ましくはCD3を特異的に認識し、第2のCH3ドメインを含む、IgG重鎖をコードする第2の核酸配列を有する細胞を提供する工程を含み、前記核酸配列が前記第1及び第2のCH3ドメインの選択的な対合の手段を備え、前記方法が、前記細胞を培養し、前記2つの核酸配列を発現させ、培養から前記二重特異性IgG抗体を収集する工程をさらに含む、方法。

【請求項 22】

前記細胞が共通軽鎖、好ましくは再配列生殖系列ヒトカップ軽鎖IgV_H1-39*01/IGJ_H1*01をコードする第3の核酸配列を有する、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記第1のCH3ドメインがアミノ酸置換L351K及びT366K(Kabatによるナンバリング)を含み、前記第2のCH3ドメインがアミノ酸置換L351D及びL368Eを含み、前記方法が、前記細胞を培養し、前記核酸配列を発現させ、培養から前記二重特異性抗体を収集する工程をさらに含む、二重特異性IgG抗体を産生するための請求項21又は22に記載の方法。

【請求項 24】

請求項21から23のいずれか一項に記載の方法により得ることが可能な抗体。

【請求項 25】

請求項1から20又は24のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体及び薬学的に許容され

る担体を含む医薬組成物。

【請求項 26】

骨髄異形成症候群(MDS)、慢性骨髄性白血病(CML)又は好ましくは急性骨髄性白血病(AML)の治療における医薬品として使用するための、請求項1から20又は24のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体。

【請求項 27】

骨髄異形成症候群(MDS)、慢性骨髄性白血病(CML)又は好ましくは急性骨髄性白血病(AML)の治療又は予防用の医薬の調製における、請求項1から20又は24のいずれか一項に記載の二重特異性IgG抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体工学の分野に関する。特に、本発明は、異常な細胞が関与する疾患の治療のための治療用(ヒト)抗体の分野に関する。さらにとりわけ、本発明は、腫瘍の治療用の二重特異性抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

実験室においては、二重特異性抗体は、免疫エフェクター細胞の腫瘍細胞へのリターゲティングのために広く使用されてきた。この場合、1つの結合部位は、腫瘍関連抗原(TAA)及び例えば、T細胞上のCD3などのエフェクター細胞上のトリガー分子に対する第2の抗原に向けられる(Kontermann、MABS 2012(4) 182~197頁、Chames及びBaty、MABS 2009(1) 539~547頁、Mooreら、Blood 2011(117) 4542~4551頁)。CD3及び腫瘍関連抗原を標的とする最初の二重特異性抗体は、げっ歯類性(rodent nature)であり、ハイブリッドハイブリドームを用いて産生された(Liuら、1985 PNAS 82:8648頁、Staerzら、1986 PNAS 83:1453頁、Lanzavecchiaら、1987、Eur. J. Imm. 17:105頁)。これらのハイブリッドハイブリドームでは、Ig重鎖及び軽鎖の再集合が、重鎖及び軽鎖誤対合に起因する単一特異性及び非機能性二重特異性抗体のはるかにより大きいプール内における二重特異性の機能性抗体分子をもたらした。それらの二重特異性のため、これらの機能性二重特異性抗体は、マウス及びヒト細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を標的細胞に架橋させ、関連抗原を示す腫瘍細胞の溶解をもたらす細胞傷害機能を誘発することができた。しかし、ポリクローナル休止ヒトT細胞による腫瘍細胞溶解のCD3xTAA二重特異性IgG媒介性誘導は、添加した外因性IL-2又は抗CD28 mAbによる共刺激がもたらされない限り達成させることができなかった。これは、IL-2の併用投与によってのみ休止ヒトTリンパ球によるCD19陽性REH B-ALL腫瘍細胞株の溶解を誘導することができたハイブリッドラットIgG2b/マウスIgG1 CD3xCD19二重特異性分子により例示される(Haagenら、1995 Blood 85:3208頁)。Zeidlerらは、ラットIgG2b/マウスIgG2a CD3xEpcam分子を用いて、外因性IL-2を添加せずに末梢血単核細胞(PBMC)及び腫瘍細胞の両方を含む混合培養中でEpcam陽性腫瘍細胞の二重特異性IgG誘導性溶解を達成することができたことを示した(Zeidlerら、1999 J. Immunol. 163:1246頁)。著者らは、抗体の「第3の」アームであるFc領域がPBMC画分中に存在するFc受容体陽性補助細胞との相互作用によりこの効果をもたらしていることを主張した。特に、強い活性化潜在能力は、他の報告された組合せ(例えば、マウスIgG2a/マウスIgG1又はラットIgG2b/マウスIgG1)と対照的に、Fc受容体陽性補助細胞に結合するだけでなく、それを活性化もするハイブリッドサブクラスの組合せマウスIgG2a/ラットIgG2bと関連付けられた。カツマキソマブとしても公知である、このいわゆる triomAb CD3xEpcam二重特異性抗体は、臨床開発され、ヨーロッパにおいて上皮起源の腹部腫瘍の待機的治療用に登録された。この二重特異性抗体は臨床有効性を示したが、そのげっ歯類性は、反復投与により抗生成物免疫応答を誘導し、したがって、この型の広範囲に及ぶ適用を妨げる。

【0003】

ハイブリッドげっ歯類 triomAb型に関連する製造上の問題及び免疫原性の問題の両方を解決するために、代替CD3xTAA型が探求された。そのような型は、全長ヒトIgG分子から逸

10

20

30

40

50

脱している、しばしば免疫グロブリン様分子であり、macrogenics.com/Platforms-DART.htmlにおけるMacrogenicsワールドワイドウェブにより開発されているDual-Affinity Re-Targeting(DART(商標))分子、Micromet、現在Amgenにより開発されたBispecific T cell Engager(BiTE(登録商標))分子(Sheridan C、Nat Biotechnol. 2012(30):300~1頁)、Abbottにより開発されているDual Variable Domain -免疫グロブリン(DVD-Ig(商標))分子及びaffimed.com/tandab-recruitにおけるAffimedワールドワイドウェブにより開発されているTandAb(登録商標) RECRUIT分子などの分子を含む。これらの型の1つについてCD3xCD19ダイアボディを用いてCD19陽性腫瘍細胞を溶解するための末梢血リンパ球の成功したリターゲティングが末梢血Tリンパ球の事前の活性化を必要とし、現在は抗CD3抗体とヒトIL-2を用いていることが示された(Kipriyanovら、1998 Int. J. Can. 77:763頁)。2価単鎖Fv CD3xTAA BiTE(登録商標)型(Lofflerら、2000 Blood 95:2098頁)などの他の型は、休止T細胞の事前の活性化を必要とせず、抗原陽性腫瘍溶解をin vitroで極めて効果的に誘導することができる(Dreierら、Int. J. Canc. 100:690頁)。異なるTAAsを標的とするBiTE(登録商標)を用いた試験でBiTE(登録商標)型の強力な効力が抗原のサイズ及び特にTAA上のエピトープの腫瘍細胞膜までの距離に関連付けられることが明らかにされた(Bluemelら、2010 Cancer Immunol. Immunother. 59:1197頁)。細胞溶解性T細胞シナプスの効果的な形成がBiTE(登録商標)分子について示され、それがそれらの効力の構造的な基礎を構成すると説明され(Offnerら、Molecular Immunology 2006(43) 763~771頁)、それがまたBiTE(登録商標)型の小さいサイズに関連付けられると考えられている。サイズが重要ならば、完全なIgGのようなより大きい分子は、大きすぎて有効な細胞溶解性シナプスを形成できないことになる。CD3xCD19 BiTE(登録商標)、プリナツモマブは、難治性非ホジキンリンパ腫及び急性リンパ性白血病患者における顕著な臨床的有効性を示した(Bargouら、2008 Science 321:974頁)。CD3xCD19 BiTE(登録商標)は、in vitroで低レベルで非常に有効な腫瘍細胞溶解を示すが、患者へのこの二重特異性型(bispecific format)の投与は、重大な課題を伴う。それらのサイズが小さいため、BiTE(登録商標)は、循環から急速に除去され、したがって、患者への投与には持続注入が必要である。投与計画では2カ月以上の総期間を有するので、この治療法は、患者の生活の質に重大な影響を及ぼす。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

- 【特許文献1】国際公開第2008/027236号
- 【特許文献2】国際公開第2010/108127号
- 【特許文献3】国際公開第2004/009618号
- 【特許文献4】国際公開第2009/157771号
- 【特許文献5】米国特許仮出願第61/635935号
- 【特許文献6】米国特許出願公開第13/866747号
- 【特許文献7】PCT出願番号PCT/NL2013/050294
- 【特許文献8】国際公開第2005/118635号
- 【特許文献9】国際公開第2005/000894号
- 【特許文献10】国際公開第2009/089004号
- 【特許文献11】同時係属米国仮出願第61/539116号

【非特許文献】

【0005】

- 【非特許文献1】Kontermann、MABS 2012(4) 182~197頁
- 【非特許文献2】Chames及びBaty、MABS 2009(1) 539~547頁
- 【非特許文献3】Mooreら、Blood 2011(117) 4542~4551頁
- 【非特許文献4】Liuら、1985 PNAS 82:8648頁
- 【非特許文献5】Staerzら、1986 PNAS 83:1453頁
- 【非特許文献6】Lanzavecchiaら、1987、Eur. J. Imm. 17:105頁
- 【非特許文献7】Haagenら、1995 Blood 85:3208頁

- 【非特許文献 8】 Zeidler R、1999 J. Immunol. 163:1246頁
- 【非特許文献 9】 Sheridan C、Nat Biotechnol. 2012(30):300～1頁
- 【非特許文献 10】 Kipriyanov R、1998 Int. J. Can. 77:763頁
- 【非特許文献 11】 Loffler R、2000 Blood 95:2098頁
- 【非特許文献 12】 Dreier R、Int. J. Canc. 100:690頁
- 【非特許文献 13】 Bluemel R、2010 Cancer Immunol. Immunother. 59:1197頁
- 【非特許文献 14】 Offner R、Molecular Immunology 2006(43) 763～771頁
- 【非特許文献 15】 Bargou R、2008 Science 321:974頁
- 【非特許文献 16】 Cui R、JBC 2012 (287) 28206～28214頁
- 【非特許文献 17】 Kontermann、MABS 2012(4) 182～197頁 10
- 【非特許文献 18】 Chames及びBaty、MABS 2009(1) 539～547頁
- 【非特許文献 19】 Moore R、blood 2011(117) 4542～4551頁
- 【非特許文献 20】 Loffler R、2000 Blood 95:2098頁
- 【非特許文献 21】 Zeidler R、J. Immunol. 163:1246頁
- 【非特許文献 22】 Cancer Cell 20、472～486頁、2011年10月
- 【非特許文献 23】 A. B. Bakker R、Cancer Res 2004、64、8443～50頁
- 【非特許文献 24】 Van Rhenen R、2007 Blood 110:2659頁
- 【非特許文献 25】 Moshaver R、2008 Stem Cells 26:3059頁
- 【非特許文献 26】 A. S. Marshall R、J Biol Chem 2004、279、14792～802頁
- 【非特許文献 27】 Y. Han R、Blood 2004、104、2858～66頁 20
- 【非特許文献 28】 C. H. Chen R、Blood 2006、107、1459～67頁
- 【非特許文献 29】 Bakker R、Cancer Res 2004、64、8443～50頁
- 【非特許文献 30】 Shields RL R、JBC 2001(276) 6591～6604頁
- 【非特許文献 31】 Armour R、Mol. Immunol. 2003(40) 585～593頁
- 【非特許文献 32】 Oganessian R、Biol. Crystall. 2008(D64) 700頁
- 【非特許文献 33】 Gunasekaran R、JBC 2010(285) 19637～19646頁
- 【非特許文献 34】 De Wildt RM R、J. Mol. Biol. 1999(285) 895～90頁
- 【非特許文献 35】 De Kruif R、J. Mol. Biol. 2009(387) 548～58頁
- 【非特許文献 36】 Liesveld R、1988、J. Immunol. 140(5)、1527～1533頁
- 【非特許文献 37】 De Kruif R、1995、J. Mol. Biol. 248(1) 97～105頁 30
- 【非特許文献 38】 De Kruif R、Biotechnol Bioeng. 2010 (106) 741～50頁
- 【非特許文献 39】 Norde R、Blood 2009(113) 2312頁
- 【非特許文献 40】 Suntharalingam R、2006、New England J Med 355(10)、1018～1028頁

【非特許文献 41】 Chatenoud R、1990、Transplantation 49(4)、697～702頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、持続注入の必要がなく、免疫原性を伴わない、静脈内投与での長い循環半減期と限定的な副作用のみとを併せ持つ、異常細胞を根絶するのに有効な全長二重特異性 T細胞会合IgG分子の必要性が依然としてある。 40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、AMLの治療用の完全ヒトIgG二重特異性全長抗体を述べる。該抗体の1つのアームは、免疫エフェクター細胞上のエピトープ、好ましくはCD3に結合するが、他のアームは、新規及び再発AML患者の90～95%で発現する骨髓系細胞特異的表面標的であるCLEC12Aを標的とする。CLEC12Aは、AM白血病幹細胞上に発現するが、正常造血細胞上には発現しない。CD33と異なり、CLEC12Aは、赤血球前駆細胞又は巨核球上に発現せず、したがって、本発明のCD3xCLEC12A二重特異性IgG1抗体は、血小板又は赤血球の枯渇を誘導しないはずである。骨髓細胞コロニーを用いた実験で、正常骨髓におけるCLEC12A+細胞の枯渇は、 50

血小板又は赤血球を生じさせる骨髄細胞系列に影響を及ぼさないことが示された。本発明によるCD3xCLEC12A二重特異性IgG1抗体は、好ましい実施形態において、PBMC内のT細胞とFc R発現細胞との会合に起因する非特異的免疫活性化を減少させるために修飾Fc領域を含む。従来技術におけるtriomAb二重特異性抗体に関して記載されてデータに基づいて、完全ヒトIgG1型のCD3xTAA二重特異性IgGが、T細胞の事前の活性化の必要なしに休止末梢血リンパ球における溶解性抗腫瘍活性を誘導することができることは、非常に疑問に思われた。さらに、BiTE(登録商標)型に関する入手可能なデータから、全長IgG分子は、腫瘍細胞とエフェクター細胞との間の細胞溶解性シナプスを形成するには大きすぎることを示唆された。驚くべきことに、我々は、完全ヒトCD3xCLEC12A二重特異性全長IgG1抗体が *in vitro*でCLEC12A陽性HL60 AML腫瘍細胞の非常に効果的なT細胞媒介性溶解を誘導することができたことを示した。実際、T細胞の事前の活性化の必要なしにPBMCから精製した休止Tリンパ球により効果的な溶解が媒介された。さらに、我々は、この溶解活性がHL60細胞上に存在するFc Rとの相互作用に必ずしも依存しないことを示した。その理由は、アッセイをヒト血清含有培地中で実施した場合にこの溶解活性が過剰のヒトIgGの存在によって影響されなかったからである。全長ヒトIgG1二重特異性T細胞エンゲージャー抗体がT細胞の事前の活性化の必要又は活性Fc R相互作用の必要なしに効果的な腫瘍細胞溶解をもたらすことは、これが初めてである。効果的な溶解は、BiTE(登録商標)分子と比較したときにIgG1の比較的大きいサイズにもかかわらず達成される。注目すべきことに、Fc受容体相互作用をさらに減少させるためにCH2/下部ヒンジ突然変異をCD3xCLEC12A二重特異性IgG1分子に導入した場合、これが免疫エフェクター細胞による効果的な腫瘍細胞溶解をもたらした。二重特異性ヒトIgG1 T細胞エンゲージャー抗体は、ハイブリッドサブクラス組合せマウスIgG2a/ラットIgG2bを用いる現在のIgGと比べて利点を有する。その理由は、ヒトIgG1は、免疫原性がより低く、したがって、反復療法に適用することができるからである。さらに、全長ヒトIgG1が循環から急速に除去されず、したがって、患者への投与が持続注入を必要とせず、これが患者に有益であるので、全長二重特異性ヒトIgG1 T細胞エンゲージャー抗体は、DART(商標)、TandAb(登録商標)又はBiTE(登録商標)などの免疫グロブリン/様分子と比べて利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】CLEC12A及び関連配列を示す図である。

【図2】モノクローナル二価CD3 IgG、二重特異性CD3xCLEC12 IgG、二重特異性CD3xイソタイプ対照IgG、モノクローナル二価CLEC12A IgG、モノクローナル二価イソタイプ対照IgGなどの様々な抗体によるT細胞の活性化を示す図である。

【図3】CD3xCLEC12A二重特異性IgG及び対照抗体によるHL60細胞の特異的溶解を示す図である。

【図4】CD3xCLEC12A二重特異性IgG及び対照抗体によるHL60細胞の特異的溶解(E:T比)を示す図である。

【図5】様々なCLEC12Aアーム及び固定CD3アームからなるいくつかのCD3xCLEC12A二重特異性IgG分子並びに対照抗体によるHL60細胞の特異的溶解を示す図である。

【図6】Fcサイレンシングと組み合わせたCD3xCLEC12A二重特異性IgGによるHL60細胞の特異的溶解を示す図である(DM=二重変異体;TM=三重変異体;WT=野生型、Fcサイレンシングなし)。

【図7】FcサイレンシングがFcRn結合に影響を及ぼさないことを示す図である。

【図8】T細胞増殖のCD3xCLEC12A bsAb標的の特異的誘導を示す図である。

【図9】健常ドナーと比較したAML患者のCD8+ T細胞コンパートメントを示す図である。

【図10】特異的CD3xCLEC12A DM-Fc誘導T細胞活性化及びAML患者T細胞によるHL60腫瘍細胞溶解を示す図である。

【図11】自己AML患者T細胞によるAML芽球の特異的溶解を示す図である。

【図12】患者T細胞による特異的単球溶解を示す図である。

【図13】Fcサイレンシングがパイスタンダー細胞サイトカイン放出を有意に排除するこ

10

20

30

40

50

とを示す図である。

【図14A】HPB-ALL細胞上のFACS染色性抗CD3抗体を示す図である。

【図14B】プレート結合IgG、FACSにより5日目に読み出されたCFSEにより標識されたT細胞を示す図である。

【図15】HL60細胞傷害性アッセイを示す図である。

【図16】HL60細胞上のFACS染色性抗CLEC12A抗体を示す図である。

【図17】HL60細胞傷害性アッセイを示す図である。

【図18】FACS解析を示す図である。

【図19】HL60細胞傷害性アッセイを示す図である。

【図20】CD3特異的及びCLEC12A特異的FabアームのVH配列、O12共通軽鎖のVL配列を示す図である。CDR配列は、太字で、下線が引かれている。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明は、二重特異性IgG抗体を提供し、前記IgG抗体は、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識する1つのアーム、及びCLEC12A又は前記機能的等価物を発現する異常細胞に免疫エフェクター細胞を動員することができる免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識する第2のアームを含む。

【0010】

本明細書で用いているように、「CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識する」という用語は、CLEC12A又は前記機能的等価物が前記抗体の近傍に存在する状況において、前記アームがCLEC12A又は前記機能的等価物を特異的に認識する能力を有することを意味する。同様に、「免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識する」という用語は、前記抗原が前記抗体の近傍に存在する場合に前記アームが前記抗原を特異的に認識する能力を有することを意味する。抗体によるそのような抗原認識は、抗体のランダムな非特異的付着と対立するものとしての、抗体の相補性領域並びにこれらの2つの構造が正確に結合すること(錠と鍵に類似した相互作用)を可能にする抗原及び抗体アームの両方の特異的な3次元構造によって一般的に媒介される。抗体は、一般的に抗原のエピトープを認識すること、及びそのようなエピトープは、他の化合物にも存在し得ることから、「CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識する」及び「免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識する」本発明による抗体は、そのような他の化合物が同じ種類のエピトープを含む場合、他の化合物も認識し得る。したがって、「CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識する」、「免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識する」及び「CD3を特異的に認識する」という用語は、同じ(種類の)エピトープを含む他の化合物への抗体の結合を排除しない。その代わりに、交差反応性が許容される。本発明による抗体は、一般的にCLEC12A(又はその機能的等価物)及び免疫エフェクター細胞上の抗原、好ましくはCD3に下
 20
 30
 40

【0011】

「抗体」という用語は、本明細書で用いているように、抗原上のエピトープに結合する1つ又は複数のドメインを含む、タンパク質の免疫グロブリンクラスに属するタンパク質性分子を意味し、そのようなドメインは、抗体の可変領域に由来する又は抗体の可変領域と配列相同性を共有する。治療用の抗体は、治療を受ける対象の天然抗体とできる限り近いことが好ましい(例えば、ヒト対象のヒト抗体)。抗体の結合は、特異性及び親和性により表すことができる。特異性は、どの抗原又はそのエピトープが結合ドメインによって特異的に結合されるかを決定するものである。親和性は、特定の抗原又はエピトープに結合する強さの尺度である。特異的結合又は「特異的に認識する」は、少なくとも $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 、より好ましくは $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、より好ましくは 1×10^{-9} より高い親和性(KD)を有する結合と定義される。一般的に、治療適用のための抗体は、 1×10^{-10} までの又はより高い親和性を有する。本発明の抗体は、一般的にヒトIgGサブクラスの二重特異性全長抗体である。好ましくは、本発明の抗体は、ヒトIgG1サブクラスの抗体である。
 40
 50

【0012】

本発明による「全長IgG」という用語は、本質的に完全なIgGを含むと定義されるが、それは、完全なIgGのすべての機能を必ずしも含まない。誤解を避けるために記すと、全長IgGは2つの重鎖と2つの軽鎖を含む。各鎖は、定常(C)及び可変(V)領域を含み、これらは、CH1、CH2、CH3、VH及びCL、VLと呼ばれるドメインに分類することができる。IgG抗体は、Fab部に含まれる可変領域ドメインを介して抗原に結合し、結合後に定常ドメイン、主としてFc部を介して免疫系の分子及び細胞と相互作用することができる。「可変領域ドメイン」、「可変領域」、「可変ドメイン」、「VH/VL対」、「VH/VL」、「Fab部」、「Fabアーム」、「Fab」又は「アーム」という用語は、本明細書で同義で用いる。本発明による全長抗体は、所望の特性をもたらす突然変異が存在し得るIgG分子を含む。そのような突然変異は、領域のいずれかの実質的な部分の欠失であるべきでない。しかし、結果として生じるIgG分子の結合特性を本質的に変化させることなしに、1つ又はいくつかのアミノ酸残基が欠失しているIgG分子は、「全長IgG」という用語に包含される。例えば、そのようなIgG分子は、好ましくは非CDR領域における1~10アミノ酸残基の1つ又は複数の欠失を有し得、欠失アミノ酸は、IgGの結合特異性に本質的なものではない。

10

【0013】

全長IgG抗体が好ましい。その理由は、それらの半減期が好ましく、免疫原性の理由のために完全自己(ヒト)分子に近い状態に留まることが必要であるためである。本発明によれば、二重特異性IgG抗体を用いる。好ましい実施形態において、二重特異性全長IgG抗体を用いる。IgG1は、ヒトにおけるその長い循環半減期に基づいて好ましい。ヒトにおける免疫原性を防ぐために、本発明による二重特異性IgG抗体は、ヒトIgG1であることが望ましい。「二重特異性」(bs)という用語は、抗体の1つのアームが第1の抗原に結合するのに対して、第2のアームが第2の抗原に結合し、前記第1及び第2の抗原が同一でないことを意味する。本発明によれば、前記第1及び第2の抗原は、実際に、2つの異なる細胞型上にある2つの異なる分子である。「[抗体の]1つのアーム」という用語は、好ましくは全長IgG抗体の1つのFab部を意味する。内因性免疫細胞を動員し、活性化することによって細胞傷害を媒介する二重特異性抗体は、新たなクラスの次世代抗体療法である。これは、1つの分子に標的細胞(すなわち、腫瘍細胞)及びエフェクター細胞(すなわち、T細胞、NK細胞及びマクロファージ)に対する抗原結合特異性を兼ね備えることによって達成することができる(Cuiら、JBC 2012 (287) 28206~28214頁、Kontermann、MABS 2012(4) 182~197頁、Chames及びBaty、MABS 2009(1) 539~547頁、Mooreら、blood 2011(117) 4542~4551頁、Lofflerら、2000 Blood 95:2098頁、Zeidlerら、J. Immunol. 163:1246頁)。本発明によれば、1つのアームが異常(腫瘍)細胞上のCLEC12A抗原に結合するのに対して、第2のアームが免疫エフェクター細胞上の抗原に結合する、二重特異性抗体を提供する。

20

30

【0014】

VHが第1の抗原を特異的に認識することができ、免疫グロブリン可変領域においてVHと対になるVLが第2の抗原を特異的に認識することができる、抗体も考えられる。得られるVH/VL対は、抗原1又は抗原2に結合する。例えば、国際公開第2008/027236号、国際公開第2010/108127号及びSchaeferら(Cancer Cell 20、472~486頁、2011年10月)に記載されている、そのようないわゆる「二種一体型抗体(two-in-one antibodies)」も、2つの異なる抗原に結合する能力を有するため「二重特異性抗体」という用語により包含される。1つの実施形態において、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するVHを用い、免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識するVLを用いる。或いは、本発明による抗体は、免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識するVH及びCLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するVLを含む。いずれにしても、結果として生じる抗体は、一般的に2つのVH/VL対を含み、各VH/VL対は、CLEC12A(又はその機能的等価物)又は免疫エフェクター細胞上の抗原に結合する。二種一体型抗体は、一般的に2つの類似抗原(AA若しくはBB;単一特異性二価)に結合するか、又は2つの異なる抗原(AB;二重特異性)に結合する。したがって、二種一体型抗体を本発明による治療適用に用いる場合、これらの抗体の一部は、2つのCLEC12A分子(若しくはその機能的等価物)又はCD3などの免疫エフェクター細胞上の2

40

50

つの抗原に結合するため、所望の作用を及ぼさない。投与された抗体の一部により治療の目的を達成することができるので、二種一体型抗体は、それにもかかわらず適切である。

【0015】

「CLEC12A」という用語は、本明細書で用いているように、CD34陰性又はCD34低発現幹細胞(サイドポピュレーション)を含む、急性骨髄性白血病(AML)における白血病芽球細胞上及び白血病幹細胞上に発現する抗原である、C型レクチン様分子1(CLL-1)としても公知である、C型レクチンファミリー12メンバーAを意味する(A. B. Bakkerら、Cancer Res 2004、64、8443~50頁、Van Rhenenら、2007 Blood 110:2659頁、Moshaverら、2008 Stem Cell 26:3059頁)。CLEC12Aの発現は、他の状態では造血系列、特に末梢血及び骨髄における骨髄系細胞、すなわち、顆粒球、単球及び樹状細胞前駆体に限定される。より重要なことに、CLEC12Aは、造血幹細胞上に存在しない。この発現プロファイルのため、CLEC12Aは、AMLにおける特に好ましい標的となっている。CLEC12Aの代替名としては、樹状細胞関連C型レクチン2(DCAL-2)、骨髄抑制C型レクチン様受容体(MICL)及びキラー細胞レクチン様受容体サブファミリー1メンバー1(KLRL1)などがある(Zhang W.ら、GenBank TM受託番号:A F247788、A. S. Marshallら、J Biol Chem 2004、279、14792~802頁、GenBank TM受託番号:AY498550、Y. Hanら、Blood 2004、104、2858~66頁、H. Floydら、GenBank TM受託番号:AY426759、C. H. Chenら、Blood 2006、107、1459~67頁)。これらの配列のアライメントを図1に示す。CLEC12Aの全長型は、ほとんどの他のアイソタイプに存在しない10アミノ酸のさらなる細胞内伸長を含む275アミノ酸残基を含み、厳密に骨髄発現プロファイル(表現発現及びmRNAレベル)を示す。「CLEC12A又はその機能的等価物」という用語は、Bakkerら、Cancer Res 2004、64、8443~50頁に記載されているように厳密な骨髄発現プロファイル(表現発現及びmRNAレベルの両方)を保持している上で言及しているすべての変異体及びそのアイソタイプを意味する。したがって、本発明は、1つのアームが、上述の10アミノ酸のさらなる細胞内伸長を欠く機能的等価物を含む、CLEC12Aの機能的等価物を特異的に認識する、二重特異性IgG抗体を含む。しかし、1つのアームがCLEC12Aの全長型を特異的に認識する本発明による二重特異性IgG抗体が好ましい。

【0016】

「異常細胞」という用語は、本明細書で用いているように、腫瘍細胞、より詳細には、骨髄異形成症候群(MDS)を引き起こす細胞などの前白血病細胞及び急性骨髄性白血病(AML)腫瘍細胞又は慢性骨髄性白血病(CML)細胞などの白血病細胞も含む血液起源の腫瘍細胞を含む。

【0017】

「免疫エフェクター細胞」又は「エフェクター細胞」という用語は、本明細書で用いているように、標的細胞の生存能力に影響を及ぼすように活性化させることができる哺乳類免疫系における細胞の自然レパートリー内の細胞を意味する。免疫エフェクター細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性T細胞を含むT細胞又はB細胞などのリンパ球系の細胞を含むが、単球又はマクロファージ、樹状細胞及び好中性顆粒球などの骨髄細胞系の細胞も免疫エフェクター細胞とみなすことができる。したがって、前記エフェクター細胞は、好ましくはNK細胞、T細胞、B細胞、単球、マクロファージ、樹状細胞及び好中性顆粒球である。本発明によれば、異常細胞へのエフェクター細胞の動員は、エフェクター細胞が、動員される先の異常細胞を直接殺滅する又はその殺滅を間接的に開始することができるようにエフェクター細胞が異常な標的細胞の近傍に移動させられることを意味する。非特異的相互作用を避けるために、本発明の二重特異性抗体が、体内の他の細胞と比較してこれらの免疫エフェクター細胞によって少なくとも過剰発現させられている免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識することが好ましい。免疫エフェクター細胞上に存在する標的抗原は、CD3、CD16、CD25、CD28、CD64、CD89、NKG2D及びNKp46を含み得る。好ましくは、免疫エフェクター細胞上の抗原は、T細胞上に発現するCD3又はその機能的等価物である(機能的等価物は、T細胞上の同様な分布及び同様な機能(種類であって、必ずしも量ではない)を有するCD3様分子である)。本明細書で用いているように、用語「CD3」はCD

3の機能的等価物をも含む。免疫エフェクター細胞上の最も好ましい抗原は、CD3 鎖である。この抗原は、異常細胞にT細胞を動員するのに非常に有効であることが示された。したがって、本発明による二重特異性IgG抗体は、好ましくはCD3 を特異的に認識する1つのアームを含む。

【0018】

したがって、本発明は、二重特異性全長IgG抗体を提供し、前記二重特異性抗体は、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識する1つのアーム、及びCLEC12A又は前記機能的等価物を発現する異常細胞に免疫エフェクター細胞を動員することができる免疫エフェクター細胞上の抗原を特異的に認識する第2のアームを含み、前記免疫エフェクター細胞は、T細胞を含む。他の好ましい実施形態において、本発明は、本発明による二重特異性全長IgG抗体を提供し、前記免疫エフェクター細胞上の前記抗原は、CD3又はその機能的等価物、好ましくはヒトCD3 である。他の実施形態において、本発明は、そのような二重特異性IgG CLEC12AxCD3抗体のF(ab)'2断片を提供する。

10

【0019】

両アームが共通軽鎖を含む、本発明による二重特異性IgG抗体を提供することが本発明の一態様である。本発明による「共通軽鎖」という用語は、抗体の結合特異性を維持しながら同一であり得る又はいくつかのアミノ酸配列の差を有し得る軽鎖を意味する。例えば、保存的アミノ酸の変化、重鎖と対をなすときに結合特異性に寄与しない又は部分的のみ寄与する領域におけるアミノ酸の変化などを導入し、試験することにより、同一でないが、機能的に等価である軽鎖を調製又は見出すことは、例えば、本明細書で用いているような共通軽鎖の定義の範囲内で可能である。「再配列」という用語の追加を有する又は有さない「共通軽鎖」、「共通VL」、「単一軽鎖」、「単一VL」という用語は、すべて本明細書で同義で用いる。異なる重鎖と結合して機能的抗原結合ドメインを有する抗体を形成することができるヒト軽鎖を共通軽鎖として使用することは、本発明の一態様である(国際公開第2004/009618号、国際公開第2009/157771号、Merchantら、1998、Nissimら、1994)。好ましくは、共通軽鎖は、生殖系列配列を有する。好ましい生殖系列配列は、ヒトレパートリーで頻繁に使用され、多くの異なるVH領域と対をなす優れた能力を有し、良好な熱力学的安定性、収率及び溶解度を有する。最も好ましい生殖系列軽鎖は、O12、好ましくは再配列生殖系列ヒトカップ軽鎖IgV_H1-39*01/IGJ1*01(imgt.orgにおけるIMGTデータベースワールドワイドウェブによる命名法)又はその断片若しくは誘導体である。再配列生殖系列ヒトカップ軽鎖IgV_H1-39*01/IGJ1*01、IGKV1-39/IGKJ1、huV_H1-39軽鎖又は約言すればhuV_H1-39という用語は、本明細書を通して同義で用いる。明らかに、当業者は、「共通」が、アミノ酸配列が同一でない軽鎖の機能的等価物も意味することを認識する。機能的結合領域の形成に実質的に影響しない突然変異(欠失、置換、付加)が存在する前記軽鎖の多くの変異体が存在する。

20

30

【0020】

特に好ましい実施形態において、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、SGYTFTSYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR1配列、及びIINPSGGGSと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR2配列、及びGTTGDWFDと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR3配列を含む、本発明による二重特異性IgG抗体を提供する。好ましくは、前記重鎖CDR1、2又は3配列は、列挙したCDR配列と少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%同一である配列からなる。一般的に、同じ種類の結合活性(種類であって、必ずしも量ではない)を保持しながら列挙したCDR配列の1、2又は3個のアミノ酸残基の変異が許容される。したがって、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、好ましくは列挙したCDR配列から3個以下、好ましくは2個以下、より好ましくは1個以下のアミノ酸が逸脱している配列を含む。特に好ましい実施形態において、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、列挙したCDR配列と同一である。列挙したCDR配列は、実施例で示すように、優れたCLEC12A結合特性を有するFabアーム4327のCDR配列である。Fabアーム4327の重鎖配列、したがって、CLEC12A特異抗体4327のVHを図20に示す。1つの好ましい実施形態において、本発明による二重特異性IgG抗体

40

50

は、抗体4327のこのVHと少なくとも90%同一である可変重鎖(VH)配列を含む。したがって、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、配列QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAKG TTGDWFDYWGGQGLTLVTVSと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%又は100%同一である配列からなるVH配列を含む、本発明による二重特異性IgG抗体をさらに提供する。実施例に示すように、上述のVH配列を、CD3を認識するFabアームのVH配列と一緒に(及び共通軽鎖と一緒に)含む本発明による二重特異性抗体は、CLEC12A陽性AML腫瘍細胞のT細胞媒介性溶解を誘導する優れた能力を有する。

【0021】

さらなる好ましい実施形態において、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、SGYTFTSYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR1配列、及びIINPSGGSTSYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR2配列、及びGNYGDEFDYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR3配列を含む、本発明による二重特異性IgG抗体を提供する。好ましくは、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、列挙したCDR配列と少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%同一である配列からなる。上述のように、一般的に、同じ種類の結合活性(種類であって、必ずしも量ではない)を保持しながら列挙したCDR配列の1、2又は3個のアミノ酸残基の変異が許容される。したがって、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、好ましくは列挙したCDR配列から3個以下、好ましくは2個以下、より好ましくは1個以下のアミノ酸が逸脱している配列を含む。特に好ましい実施形態において、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、列挙したCDR配列と同一である。列挙したCDR配列は、実施例で示すように、優れたCLEC12A結合特性を有する抗体4331のVH領域のCDR配列である。Fabアーム4331のVH配列も図20に示す。1つの好ましい実施形態において、本発明による二重特異性IgG抗体は、Fabアーム4331のこのVHと少なくとも90%同一であるVH配列を含む。したがって、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、配列EVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTSYMHWRQAPGQGLEWMGIIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGNYGDEFDYWGQGLTLVTVSSと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%又は100%同一である配列からなるVH配列を含む、本発明による二重特異性IgG抗体をさらに提供する。実施例に示すように、Fabアーム4331のVH配列を、CD3を認識するFabアームのVH配列と一緒に(共通軽鎖と一緒に)含む本発明による二重特異性抗体は、CLEC12A陽性AML腫瘍細胞のT細胞媒介性溶解を誘導する優れた能力を有する。

【0022】

他の好ましい実施形態は、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、SGYTFTGYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR1配列、及びWINPNSGGと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR2配列、及びDGYFADAFDYと少なくとも90%同一である配列からなる重鎖CDR3配列を含む、本発明による二重特異性IgG抗体を提供する。好ましくは、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、列挙したCDR配列と少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%同一である配列からなる。再び、一般的に、同じ種類の結合活性(種類であって、必ずしも量ではない)を保持しながら列挙したCDR配列の1、2又は3個のアミノ酸残基の変異が許容される。したがって、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、好ましくは列挙したCDR配列から3個以下、好ましくは2個以下、より好ましくは1個以下のアミノ酸が逸脱している配列を含む。特に好ましい実施形態において、前記重鎖CDR1、2及び3配列は、列挙したCDR配列と同一である。列挙したCDR配列は、実施例で示すように、優れたCLEC12A結合特性も有する抗体3918のVHのCDR配列である。抗体3918のVH配列も図20に示す。1つの好ましい実施形態において、本発明による二重特異性IgG抗体は、抗体3918のこのVHと少なくとも90%同一であるVH配列を含む。したがって、CLEC12A又はその機能的等価物を特異的に認識するアームが、配列QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGWIIINPSGGTNYAQKFQGRVTMTRDT

10

20

30

40

50

S1STAYMELSRLRSDDTAVYYCARDGYFADAFDYWGQGLTVTVSSと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%又は100%同一である配列からなるVH配列を含む、本発明による二重特異性IgG抗体をさらに提供する。実施例に示すように、Fabアーム3918のVH配列を、CD3を認識するFabアームのVH配列と一緒に(及び共通軽鎖と一緒に)含む本発明による二重特異性抗体もCLEC12A陽性AML腫瘍細胞のT細胞媒介性溶解を誘導する優れた能力を有する。

【0023】

さらなる好ましい実施形態において、第2のアームがCD3を特異的に認識し、配列SYGMHからなる重鎖CDR1配列、及び配列IIWYSGSKKNYADSVKGからなる重鎖CDR2配列、及び配列GTGYNWFDPからなる重鎖CDR3配列を含む、本発明者による二重特異性IgG抗体を提供する。好ましくは、前記CD3特異的アームは、配列QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGLTVTVSSからなるVH配列を含む。列挙したCDR配列及びVH配列は、抗体3896の配列である。これらの配列も図20に示す。Fabアーム3896のこれらのCD3特異的CDR配列及び/又は列挙したVH配列を含む重鎖が、本発明者による二重特異性IgG抗体に好ましい。その理由は、これらの配列が、CLEC12A陽性AML腫瘍細胞への十分な結合を同時に可能にしながら、CD3発現免疫細胞に対する最適な親和性を二重特異性抗体に与えるからである。理論に拘束されることを望むものでないが、二重特異性抗体の全体的な効果は、抗原1に対する1つのアームの親和性と抗原2に対する他のアームの親和性の複合効果によって決定されると考えられる。CLEC12A(又はその機能的等価物)及び免疫エフェクター細胞上の抗原(好ましくはCD3)に対する特異性を有する本発明の抗体については、CLEC12A陽性腫瘍細胞のT細胞媒介性溶解を効果的に誘導するために、CD3陽性免疫細胞及びCLEC12A発現腫瘍細胞に対する結合の最適化時期が好ましい。CLEC12A/CD3二重特異性抗体の親和性の間のバランスが最も重要であるという仮説が立てられる。CD3に対する親和性が著しくより高いことに対してCLEC12Aに対する親和性ははるかにより低いこと(すなわち、CD3に対する親和性が過度に高いこと)が、抗体がCD3発現T細胞に最初に結合する状況をもたらすと考えられる。そのような「二重特異性抗体負荷」T細胞は、それらのCD3をインターナライズする可能性があるか、又は組織に侵入し、それにより、CLEC12A陽性腫瘍細胞に遭遇する前に循環から出る可能性がある。これは、二重特異性抗体の治療効果を減少させることとなる。

【0024】

より好ましい作用機序において、CLEC12A陽性腫瘍細胞が最初に本発明による1つ又は複数の二重特異性抗体により結合され、その後T細胞が二重特異性抗体の自由CD3アームにより誘引され、その後のT細胞の活性化が起こる。或いは、CD3陽性T細胞とCLEC12A陽性腫瘍細胞が二重特異性抗体により本質的に同時に結合される。したがって、適切なバランスが達成される、すなわち、得られる二重特異性抗体がCLEC12AとCD3に本質的に同時に結合するか、又は二重特異性抗体がCLEC12A陽性腫瘍細胞に十分な程度に結合する傾向を持ち、その後、T細胞の活性化が起こり、腫瘍細胞が溶解するように、CLEC12A(又はその機能的等価物)及び免疫エフェクター細胞上の抗原(好ましくはCD3)の両方に対する親和性を選択又は調節することが好ましい。本発明によれば、CD3及びCLEC12Aに対する結合親和性の間のそのような優れたバランスは、Fabアーム3896(CD3に対して特異的である)のCDR配列を有するVH(又は全VH配列)をFabアーム4327又は4331又は3918又は3116(CLEC12Aに対して特異的である)のCDR配列を有するVH(又は全VH配列)と組み合わせることにより達成されることが好ましい。得られるそのような二重特異性抗体は、T細胞とCLEC12A陽性AML腫瘍細胞とが効率よく接合され、CLEC12A陽性AML腫瘍細胞のT細胞媒介性溶解が最適に誘導されるように、CD3及びCLEC12Aに対する結合親和性の間の好ましいバランスを示す。

【0025】

本明細書で前述したように、両アームが共通軽鎖可変ドメインを含む、本発明による二重特異性IgG抗体を好ましくは提供する。特に好ましい共通軽鎖は、012とも命名されている、ヒト再配列カッパ軽鎖IgV 1-39*01/IgJ 1*01である。012 VLのヌクレオチド及びアミノ酸配列も図20に示す。CDR配列は、太字で、下線が引かれている。したがって、012の

CDR配列を少なくとも含む共通軽鎖を含む本発明による二重特異性抗体が好ましい。したがって、本発明の1つの態様は、第1及び第2のアームが、RASQSISSYLNと少なくとも90%同一である配列からなる軽鎖CDR1配列、及びAASSLQSと少なくとも90%同一である配列からなる軽鎖CDR2配列、及びQQSYSTPPTと少なくとも90%同一である配列からなる軽鎖CDR3をさらに含む、本発明による二重特異性IgG抗体を提供する。好ましくは、前記軽鎖CDR1、2及び3配列は、列挙したCDR配列と少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%同一である配列からなる。再び、一般的に列挙したCDR配列の1、2又は3個のアミノ酸残基の変異が許容される。したがって、前記軽鎖CDR1、2及び3配列は、好ましくは列挙したCDR配列から3個以下、好ましくは2個以下、より好ましくは1個以下のアミノ酸が逸脱している配列を含む。特に好ましい実施形態において、前記軽鎖CDR1、2及び3配列は、列挙したCDR配列と同一である。1つの好ましい実施形態において、本発明による二重特異性IgG抗体は、O12 VL鎖と少なくとも90%同一であるVL配列を含む。したがって、第1及び第2のアームが配列DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIKと少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、より好ましくは少なくとも98%、より好ましくは少なくとも99%又は100%同一である配列からなるVL配列を含む、本発明による二重特異性IgG抗体をさらに提供する。

10

【0026】

「%同一」という用語は、2つの配列を整列させ、最大のパーセントの同一性を達成するために必要な場合にギャップを導入した後の参照配列における残基と同一である候補アミノ酸配列における残基の百分率と本明細書で定義される。整列の方法及びコンピュータプログラムは、当技術分野で周知である。候補配列がこの定義の範囲に含まれるかどうかを判断する目的のために用いる又は適応することができる1つのコンピュータプログラムは、1991年12月10日にWashington, D.C. 20559の米国著作権局における利用者向け文書化により保管された、Genentech, Inc.により創始された「Align 2」である。

20

【0027】

本発明による二重特異性全長IgG抗体は、定義により、2種の抗原結合部位を有するが、IgGのFc領域もFc受容体に対する第3の結合部位を含む。細胞がFc受容体と二重特異性抗体の標的の1つとの両方を有する場合、前記細胞の表面上のFc受容体と前記標的の架橋が起こる可能性があり、これが望ましくない効果をもたらす可能性がある。好ましい実施形態において、本発明は、前記二重特異性IgG抗体とFcガンマ(Fc γ)受容体との相互作用が著しく減少するように、前記二重特異性IgG抗体が突然変異下部ヒンジ及び/又はCH2ドメインを有する、本発明による二重特異性全長IgG抗体を提供する。本明細書で用いているように、「前記二重特異性IgG抗体とFcガンマ受容体との相互作用が著しく減少するように」という用語は、Fcガンマ受容体と相互作用する前記二重特異性IgG抗体の能力が、そのようなFcガンマ受容体が抗体の近傍に存在する場合に、減少することを意味する。したがって、本発明によれば、抗体の領域、好ましくは抗体の下部ヒンジ及び/又はCH2ドメインを突然変異させ(一般的にそれをコードする突然変異核酸配列を発現することにより)、それによりFc受容体と相互作用する能力を減弱させる。Fc受容体との相互作用が本質的に消失することが好ましい。Fc γ への結合に関与するヒトIgG1におけるアミノ酸残基は、以前にマッピングされた。改変された場合に、特定の受容体への結合のみを改善した又は1つのタイプの受容体への結合を改善し、同時に他のタイプへの結合を低減した残基に加え、1つ又は複数の受容体への結合を排除したいいくつかの残基が見いだされた(Shields RLら、JBC 2001(276) 6591~6604頁、Armourら、Mol. Immunol. 2003(40) 585~593頁)。さらなる好ましい実施形態において、前記突然変異下部ヒンジ及び/又はCH2ドメインは、235及び/又は236位(Kabatによるナンバリング)のアミノ酸における少なくとも1つの置換を含む。好ましくは、235及び236位のアミノ酸の両方が置換されている。実施例で、これらの部位における置換が二重特異性抗体と腫瘍細胞上に存在するFc受容体との相互作用を本質的に妨げることができることが示されている。特に、L235G及び/又はG236R置換がその目的のために非常に適切であることが示されている。したがって、前記突然変異CH2及び/又は

30

40

50

下部ヒンジドメインが置換L235G及び/又はG236Rを含む、本発明による二重特異性IgG抗体も本明細書で提供する。L235G及びG236Rの両方が置換されている。或いは、当業者は、置換234F、235E及び/又は331Sを含む下部ヒンジ及び/又はCH2ドメイン突然変異を導入することができる(Oganesyanら、Biol. Crystall. 2008(D64) 700頁)。好ましくは、3つの置換すべてをこの代替物に導入する。

【0028】

正規の米国特許出願第13/866747号及びPCT出願番号PCT/NL2013/050294 (参照により本明細書に組み込まれる)により続行された我々の米国特許仮出願第61/635935号において、我々は、単一細胞から二重特異性抗体を産生する方法及び手段を開示しており、それにより、単一特異性抗体の形成と比較して二重特異性抗体の形成に有利に働く手段を提供する。これらの方法は、本発明にも好都合に用いることができる。したがって、本発明は、単一細胞から本発明による二重特異性全長IgG抗体を産生する方法を提供し、前記二重特異性全長IgG抗体は、界面を形成することができる2つのCH3ドメインを含み、前記方法は、前記細胞中にa)ポリペプチド鎖を含む第1のCH3ドメインをコードする第1の核酸分子、b)ポリペプチド鎖を含む第2のCH3ドメインをコードする第2の核酸分子を提供するステップを含み、前記核酸分子は、ポリペプチドを含む前記第1及び第2のCH3ドメインの選択的な対合の手段を備え、前記方法は、前記宿主細胞を培養し、前記2つの核酸分子を発現させ、培養から前記二重特異性全長IgG抗体を収集する工程をさらに含む。前記第1及び第2の核酸分子は、同じベクター又は遺伝子送達ビヒクルの一部であり得、宿主細胞のゲノムの同じ部位に組み込むことができる。或いは、前記第1及び第2の核酸分子は、前記細胞に別個に提供する。

10

20

【0029】

好ましい実施形態は、単一細胞から本発明による全長二重特異性IgG抗体を産生する方法を提供し、前記二重特異性IgG抗体は、界面を形成することができる2つのCH3ドメインを含み、前記方法は、

a)CLEC12Aを特異的に認識し、第1のCH3ドメインを含むIgG重鎖をコードする第1の核酸配列、及びb)免疫エフェクター細胞上の抗原、好ましくはCD3を特異的に認識し、第2のCH3ドメインを含むIgG重鎖をコードする第2の核酸配列を有する細胞

を提供するステップを含み、前記核酸配列は、前記第1及び第2のCH3ドメインの選択的な対合の手段を備え、前記方法は、前記細胞を培養し、前記2つの核酸配列を発現させ、培養から前記二重特異性IgG抗体を収集する工程をさらに含む。特に好ましい実施形態において、前記細胞は、共通軽鎖をコードする第3の核酸配列も有する。好ましい共通軽鎖は、

30

上述のように、012、好ましくは再配列生殖系列ヒトカップ軽鎖IgV 1-39*01/IGJ 1*01である。二重特異性全長IgG分子のみを本質的に産生するための好ましい突然変異は、第1のCH3ドメインにおけるアミノ酸置換L351K及びT366K(Kabatによるナンバリング)並びに第2のCH3ドメインにおけるアミノ酸置換L351D及びL368Eであり、又は逆も同様である。したがって、前記第1のCH3ドメインがアミノ酸置換L351K及びT366K(Kabatによるナンバリング)を含み、前記第2のCH3ドメインがアミノ酸置換L351D及びL368Eを含む、二重特異性IgG抗体を産生するための本発明による方法をさらに提供し、前記方法は、前記細胞を培養し、前記核酸配列を発現させ、培養から前記二重特異性抗体を収集する工程をさらに含む。前記第1のCH3ドメインがアミノ酸置換L351D及びL368E (Kabatによるナンバリング)を含み、前記第2のCH3ドメインがアミノ酸置換L351K及びT366Kを含む、二重特異性IgG抗体を産生するための本発明による方法も提供し、前記方法は、前記細胞を培養し、前記核酸配列を発現させ、培養から前記二重特異性抗体を収集する工程をさらに含む。これらの方法により産生することができる抗体も本発明の一部である。

40

【0030】

本発明は、本発明による二重特異性IgG抗体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。本明細書で用いているように、そのような「薬学的に許容される担体」は、生理的に適合性である任意及びすべての溶媒、塩、分散媒体、コーティング、抗菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤などを含む。投与経路(例えば、静脈内、皮下、

50

関節内など)によって、活性化合物は、酸の作用及び化合物を不活性化する可能性がある他の自然条件から化合物を保護するための物質で被覆することができる。

【0031】

本発明による抗体及び医薬組成物は、様々な白血病及び骨髄起源の前白血病の治療だけでなく、B細胞リンパ腫の治療にも使用される。本発明により治療することができる疾患としては、AML、MDS及びCML並びにホジキンリンパ腫及びほとんどの非ホジキンリンパ腫などの骨髄性白血病又は前白血病などである。したがって、本発明は、骨髄異形成症候群(MDS)、慢性骨髄性白血病(CML)又は好ましくは急性骨髄性白血病(AML)の治療における医薬品として使用するための、本発明による二重特異性全長IgG抗体を提供する。骨髄異形成症候群(MDS)、慢性骨髄性白血病(CML)又は好ましくは急性骨髄性白血病(AML)の治療又は予防用の医薬の調製における、本発明による二重特異性IgG抗体の使用も提供する。

10

【0032】

患者に投与する本発明による抗体の量は、一般的に、治療効果を得るために十分な量を使用することを意味する、治療ウィンドウ内にあるが、量は、容認できない程度の副作用をもたらす閾値を超えない。所望の治療効果を得るために必要な抗体の量が低いほど、治療ウィンドウが一般的に大きくなる。したがって、低用量で十分な治療効果を発揮する本発明による抗体が好ましい。

【0033】

約30,000例の患者がヨーロッパ及び米国において急性骨髄性白血病(AML)と毎年診断されている。これらの患者の大多数は、60歳以上である。高齢は、AMLにおける転帰の主要な負の決定要因であり、集中治療を受けた高齢AML患者の長期生存率(5年時)は、約10%である。誘導化学療法で寛解を達成したほぼすべての患者において、疾患の進行が3年以内に認められる。現行の寛解後療法は、AMLを有する高齢患者においては、もしあるとしても限定的な有用性を示した。したがって、残りの抵抗性白血病のかなりの負荷が残り、薬物耐性白血病細胞の生存亜集団で再発が急速に発生する。完全寛解を誘導し、持続させる努力においてこれらの化学療法不応性AML腫瘍細胞を標的とするために、完全に異なる作用機序を有する新規なタイプの薬物が必要である。完全寛解(CR)は、高齢AML患者の50%以上及び若年患者の約80%で多くの集中化学療法の併用により達成することができるが、反応又は生存率の向上は、依然として主要な研究課題であった。AMLを有する高齢患者における65件の無作為化臨床試験(15110例の患者)の最近公表されたネットワークメタ解析において、修正調査的導入療法の大部分は、ダウノルビシン及びシタラピンを用いた従来の3+7導入療法と比較して同様又は悪いプロファイルを有する。このAMLの標準的な治療は高い罹患率及び死亡率に関係する。CRにある患者の大多数は、化学療法後の残存白血病幹細胞により再発する。さらなる用量増大は、容認できない毒性のため限定される。好ましくはより低い毒性の新たな治療法の差し迫った必要が特に高齢AML患者に生じている。

20

30

【0034】

化学療法不応性AMLの治療は、二重特異性抗体を用いて患者自身の免疫系のT細胞とAML腫瘍細胞を会合させることにより実現することができた。この方法で、患者の免疫系を強化し、AML腫瘍細胞を攻撃し、根絶するようにリターゲティングする。本発明は、AML腫瘍細胞溶解を効果的に誘導するCD3xCLEC12A二重特異性IgG抗体を提供する。したがって、CD3xCLEC12A二重特異性抗体は、AML患者の予後を改善するために白血病幹細胞を特異的に根絶する、より少ない副作用を伴う標的療法である。CLEC12Aは、白血病幹細胞(LSC)上に発現し、正常な造血幹細胞上には発現しないため、この抗原を対象とする療法(in vitroで示されたように)は、正常幹細胞に危害を与えないと同時にLSCを根絶する。この療法は、おそらくは、微小残存病変(MRD)の状況において最大の影響を有する。見込みは、MRDの根絶のため再発率が低下することである。したがって、この新たな治療法のAML患者に対する影響は、より良好な生活の質に関連する転帰の改善をもたらすより低い再発率を有する低毒性治療である。これらの全長IgG二重特異性抗体は、再発AML患者において臨床的に評価されている。臨床的有効性は、客観的反応基準としての骨髄におけるAML芽球の減少を用いて解析する。AML用の有効な二重特異性IgGは、現在のところ利用可能な治療法が存在

40

50

しない大患者階層に新規な治療選択肢を提供する。恒久的な寛解を達成する手段となることに加えて、この治療選択肢は、寛解時に適用する場合、AMLに治癒をもたらす可能性も有する。

【実施例】

【0035】

(実施例1)

候補CD3xCLEC12二重特異性IgG1の生成及び機能の特徴付け

二重特異性全長IgGを用いて免疫エフェクター細胞を異常細胞に標的化するという概念の妥当性の確認のために、CD3及びCLEC12A Fabアームが前述の抗体に由来した、候補CD3xCLEC12A二重特異性IgG1を生成した。CD3 Fabアームにおいては、国際公開第2005/118635号に開示されているCD3特異抗体の1つである抗CD3抗体15C3のVH領域を用い、このVHを「3056」と呼ぶ。CLEC12A Fabアームにおいては、国際公開第2005/000894号に開示されているCLEC12A特異抗体の1つであるscFv SC02-357のVH領域を用いた(以後「CLEC12Aベンチマーク[Fabアーム又は抗体]」)と命名した;或いはこのVHを「3116」と呼ぶ)。CD3アームのVH(3056)のヌクレオチド及びアミノ酸配列並びに候補3056x3116と呼ぶこの候補分子のCLEC12AアームのVH(3116)のヌクレオチド及びアミノ酸配列も図20に示す。共通VL(huV 1-39;012)のヌクレオチド及びアミノ酸配列も図20に示す。

10

【0036】

各VH領域を、再配列ヒトIGKV1-39/IGKJ1(huV 1-39)軽鎖とともに、二重特異性IgG1の産生のための当技術分野で公知の方法(Gunasekaranら、JBC 2010(285) 19637~19646頁、国際公開第2009/089004号を用いて発現ベクターにクローニングした。huV 1-39は、複数の重鎖と対合し、それにより、二重特異性分子の生成を促進する、多様な特異性を有する抗体を生じさせることができることが以前に示された(De Wildt RMら、J. Mol. Biol. 1999(285) 895~901頁、De Kruifら、J. Mol. Biol. 2009(387) 548~58頁、国際公開第2009/157771号)。

20

【0037】

最初に、候補3056x3116 CD3xCLEC12A二重特異性IgG1のHPB-ALL細胞上のCD3 への結合を、当技術分野で公知の標準的手順に従って実施したフローサイトメトリーにより示した(Table 1(表1))。細胞発現CD3 への結合は、CD3 / 又はCD3 / をトランスフェクトしたCHO細胞を用いて確認される。候補3056x3116二重特異性IgG1のCLEC12Aへの結合は、CLEC12A発現構築物をトランスフェクトしたCHO細胞、CD3単一特異性抗体(3056x3056)及びCLEC12A単一特異性抗体(3116 x3116)並びに対照とした無関連IgG1アイソタイプ対照mAbを用いて測定した。

30

【0038】

【表 1】

Table 1:フローサイトメトリーによる細胞発現 CD3 及び CLEC12A への結合

| IgG | HPB-ALL 細胞* | CLEC12A-トランスフェクト CHO 細胞* |
|-----------------------------|-------------|--------------------------|
| 候補 3056x3116 CD3xCLEC12A | 6216 | 5299 |
| CD3 | 6899 | 282 |
| CLEC12A | 199 | 4147 |
| アイソタイプ対照 | 34 | 289 |

*結果は、平均蛍光強度として示す。

10

20

【 0 0 3 9 】

CD3 / 及びCLEC12Aの細胞外ドメインに対する候補3056x3116二重特異性IgG1の親和性測定は、表面プラズモン共鳴(BIAcore)により行う。手短に述べると、遊離アミン化学を用いて精製組換え抗原をCM5センサーチップの表面に共有結合させる。すなわち、抗原をkAc緩衝液で10 µg/mlに希釈し、NHS/EDCで活性化されている表面に結合させる(製造業者の推奨により)。二重特異性抗体に存在するFabアームの親和性を測定するために、これらをヘブス緩衝生理食塩水(HBS)で100、50、20、10、1及び0.1nMに連続希釈し、CM5センサーチップの抗原結合表面上に高(30 µl/分)流量(再結合を防ぐため)で流す。フローセル1(FC1)を対照(ブランク)表面として用い、この表面から生じる応答(センサーグラム)を他のフローセル(FC)で測定される応答から差し引く。FC2及びFC3は、二重特異性抗体により認識される2種の抗原について使用し、3つすべての表面上の単一速度論的実験施行で両Fabアームの親和性を測定することができる。抗体を抗原結合表面上に流す場合に抗体の濃度が有意に変化しないので、二重特異性抗体の結合速度(濃度依存性である)がそれらが認識する2種の抗原について同時に測定される。したがって、各種二重特異性タンパク質の結合及び解離段階のセンサーグラムが得られる。BIA評価ソフトウェア及び1:1相互作用モデル(一価相互作用の)を用いる曲線当てはめを用いて、Fabアームの親和性を決定する。センサーチップの抗原被覆表面への二重特異性タンパク質の結合に障害が生じる場合(すなわち、低い応答及び/又は非常に速い解離速度をもたらす、非常に少量のタンパク質が結合する場合)、実験の構成を逆にし、遊離アミン化学を用いて二重特異性抗体をセンサーチップの表面に共有結合させ、組換え精製抗原を表面上に高(30 µl/分)流量で流して、当抗原に対するFabアームの親和性を測定する。

30

40

【 0 0 4 0 】

次に、候補3056x3116 CD3xCLEC12A二重特異性Igの機能性を試験した。最初に、健常ドナー休止T細胞を用いてT細胞刺激能力を検討した。手短に述べると、インフォームド・コンセントの後に健常ドナーから末梢血を得た。T細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)を濃縮するための標準密度勾配単離とそれに続く磁気ビーズを用いた負の選択(汎T細胞キット、Miltenyi Biotec社、カタログ番号130-091-155)により単離した。この精製戦略を用いて、T細胞をいわゆる「触られていない状態」(すなわち、抗体により染色されていない、いわゆる「休止T細胞」)にして、事前の活性化を制限した。精製休止T細胞をその後10%ウシ胎児血清(FBS)又は10%正常ヒト血清(HS)中で白血病由来HL60細胞株からの細胞とともに10:1

50

のエフェクター：標的細胞比で2日間インキュベートした。結果は、CD4陽性又はCD8陽性T細胞集団内のCD69陽性又はCD25陽性細胞の百分率として表した。

【0041】

二価CD3 IgG及びCD3xCLEC12A二重特異性IgGの両方が、CD4陽性及びCD8陽性T細胞上のT細胞活性化マーカーであるCD69及びCD25の上方制御を効率よく誘導した(図2)。HL60細胞上に存在するFc受容体をブロックしなかった(Liesveldら、1988、J. Immunol. 140(5)、1527~1533頁)FBSの存在下では、対照二重特異性分子であるCD3Xアイソタイプ対照IgGもT細胞活性化を誘導することが示された。この効果はHSの存在下で低減しなかったことから、CD3Xアイソタイプ対照IgGの一価CD3結合による観察されたT細胞活性化がFc架橋に依存していたことが示唆される。しかし、CD69及びCD25を上方制御する効力がHSの存在下で大部分は維持されていた(図2)ので、候補3056x3116 CD3xCLEC12A二重特異性IgGにより誘導されたT細胞の活性化は、Fc相互作用に部分的に依存するにすぎなかった。これにより、結合分子が他のFabアームとの結合の後にHL60標的細胞上のCLEC12A抗原に架橋した場合に、一価CD3結合の固有の効力がT細胞を活性化するのに十分であったことがわかった。

10

【0042】

候補3056x3116 CD3xCLEC12A二重特異性IgGによるT細胞の活性化の程度が標的細胞の溶解を誘導するのに十分であるかどうかを検討するために、このアッセイにおけるHL60細胞をカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシニミジルエステル(CFSE)で標識し、様々なエフェクター：標的細胞比でT細胞と共培養した。1、2又は3日後に、フローサイトメトリーにより生存CLEC陽性HL60細胞を定量した。結果は、PBSに関連する特異的溶解の百分率として表した。

20

【0043】

予想通り、CD3単一特異性二価IgGは、HL60細胞の休止T細胞媒介性殺滅を誘導した(図3)。驚くべきことに、CD3xCLEC12A二重特異性一価IgG及びCD3Xアイソタイプ対照もHL60細胞の休止T細胞媒介性殺滅を誘導した。アッセイを過剰のヒトIgGの非存在下で実施した場合、すなわち、HL60細胞上のFc受容体がブロックされなかった場合(FBS条件;図3)、これらの効果が最も顕著であった。驚くべきことに、過剰なヒトIgGの存在下(10%HS条件)でさえも、CD3xCLEC12A二重特異性IgGは、HL60細胞の殺滅に非常に有効であり、HL60溶解の誘導がFc受容体相互作用に依存しないことがわかる。3日目にCD3Xアイソタイプ対照によるHL60溶解も認められ、これは、延長されたインキュベーション期間での不完全なFcガンマ受容体遮断におそらく起因すると思われる。HL60標的細胞の殺滅は、異なるエフェクター：標的細胞比で異なる(図4)。

30

【0044】

結論として、この実施例で、CD3xCLEC12A二重特異性分子がT細胞媒介性腫瘍細胞溶解の強力な誘導因子であることが示され、異常細胞の効果的な殺滅のためのT細胞会合がCD3xCLEC12A全長IgG1二重特異性抗体によって媒介され得るといふ我々の仮説が確認されている。驚くべきことに、CD3xCLEC12A二重特異性IgGによって誘導される活性は、Fc受容体相互作用に依存しない。最終的な臨床候補に到達する目的でCD3xCLEC12A二重特異性全長IgGのパネルを拡大するために、CD3 Fabアーム及びCLEC12A Fabアームのパネルを生成する。CD3及びCLEC12A Fabアームの特異性及び機能性の妥当性確認は、本実施例で示す候補3056x3116 CD3xCLEC12A二重特異性IgGの各Fabを用いて他のアームを固定することにより行う。

40

【0045】

(実施例2)

CD3xCLEC12bsAbのCD3 Fabアームの生成及び特徴付け

実施例1でCD3xCLEC12A二重特異性分子がT細胞媒介性腫瘍細胞溶解の強力な誘導因子であり得ることが示された。したがって、そのような二重特異性分子のより大規模なパネルを生成するために、CD3パイNDER並びにCLEC12AパイNDERの別個のパネルを生成した。

【0046】

CD3パイNDERの生成のために、huV 1-39軽鎖(国際公開第2009/157771号)で及び(1)ア

50

ジュバントを含む若しくは含まない当技術分野で公知の担体分子(ヒトIgG-Fc若しくはHisタグなど)に結合させて融合させることができる単離CD3 / 若しくはCD3 / 、(2)CD3 / 若しくはCD3 / を発現する細胞又は(3) CD3 / 若しくはCD3 / をコードするDNA構築物又はこれらの戦略の組合せなどの様々な型でCD3 を含むヒト重鎖(HC)最少座で形質転換したマウスの免疫化によってCD3 特異的VH領域を生成する。ELISA及び/又はフローサイトメトリーにより測定される十分な抗原特異的力価を示す免疫化マウスから、Fabファージライブラリが生成している脾臓及び/又はリンパ節を採取する。或いは、VH領域配列は、大規模配列解析により脾臓及びリンパ節物質から直接得られる(同時係属米国仮出願第61/539116号)。

【0047】

抗原特異的Fabアームは、免疫化マウスからのファージライブラリから又はhuV 1-39軽鎖のVL領域及びヒトVH領域の集合を含む合成ファージディスプレイライブラリから選択される。合成ライブラリの生成のために、無作為化CDR3プライマーをDe Kruifら、1995、J. Mol. Biol. 248(1) 97~105頁に記載されているように用いた。これらのライブラリからのバクテリオファージは、担体分子(上記参照)と結合させることができる単離CD3 / タンパク質又はHPB-ALLなどのCD3 を発現する細胞又はCD3 / 若しくはCD3 / を発現するように形質転換した細胞に結合させるために、或いはこれらの戦略の組合せのために複数ラウンドで選択する。非結合ファージを除去し、結合ファージを酸性緩衝液を用いて、又は選択されるFabレパートリーを所望の特異性に導くために特異的エピトープに対する抗体を用いて、例えば、カニクイザルCD3 と交差反応性である抗体を用いて溶出する。次にこれらのファージを含む細菌の選択圧力下で増殖させたコンピテント細菌にトランスフェクトする。多数の生存細菌コロニーを採取した後、ファージを救済し、次の選択ラウンドに供する。

【0048】

選択を完了した後、残りのファージを、フローサイトメトリーにより細胞発現抗原への及びELISAにより単離抗原への結合についてスクリーニングする。結合に関する陽性対照として、当技術分野で公知である例えば、OKT-3のようなベンチマークCD3抗体を用いる。抗原発現細胞に対して特異的結合を示した本質的にすべてのファージからのヌクレオチド物質を、VH領域を増幅するためにコロニーPCRに、VH領域の配列を決定するために配列PCRにかける。得られる配列をそれらのHCDR3の独自性に基いてクラスター分類する。(限定的)体細胞高頻度突然変異が起こり得る、免疫化マウス由来の配列について、VH配列を独特のVDJの可能性に基づいてさらにグループに分類する(すなわち、異なるクラスターにおけるHCDR3が<2アミノ酸の差を含む場合、それらは、同じクラスターの一部とみなされ、ひとまとめにされる)。各クラスターから、クラスター当たり1つ又はいくつかのVH領域を、IgG単一特異性二価型での発現のためのベクターにhuV 1-39軽鎖とともにクローニングするために選択する。その後、単離抗原及び細胞発現抗原への特異的結合が確認されるVH領域をCD3xCLEC12A二重特異性型での発現のためのベクターにクローニングする。次いでこれらの特徴付けを行って、治療能を有する候補を選択する(以下の実施例参照)。

【0049】

(実施例3)

CD3xCLEC12bsAbのCLEC12 Fabアームの生成及び特徴付け

実施例1でCD3xCLEC12A二重特異性分子がT細胞媒介性腫瘍細胞溶解を誘導する効力を有することが示されたので、我々は次にそのような二重特異性分子のより大規模なパネルを構築することを望んだ。実施例2で述べたようなCD3バインダーのパネルに加えて、我々はCLEC12Aバインダーのパネルも生成した。

【0050】

手短に述べると、CLEC12A特異的Fabアームは、再配列ヒトIGKV1-39/IGKJ1 VL領域及びヒトVH領域の集合を含んでいたFab合成ファージディスプレイライブラリから選択した(De Kruifら、Biotechnol Bioeng. 2010 (106) 741~50頁)。これらのバンクからのバクテリオファージは、CLEC12Aへの結合のために2ラウンドで選択した。これは、表面に被覆した

10

20

30

40

50

Hisタグ(Sino Biological社、カタログ番号11896-H07H)に結合させたCLEC12Aの細胞外ドメイン(アミノ酸75~275)とのインキュベーションにより行った。非結合ファージを除去し、結合ファージを化学的に溶出し、ファージを含む細菌の選択圧力下で増殖させた細菌を感染させるために用いた。多数の生存細菌コロニーを採取した後、ファージを救済し、次のラウンドの選択及び増殖に供した。

【0051】

選択を完了した後、残りのファージをフローサイトメトリーによりHL60腫瘍細胞株上に発現するCLEC12Aへの結合についてスクリーニングする。結合に関する陽性対照として、CLEC12Aベンチマーク抗体を用いた。CLEC12A発現細胞に対して特異的結合を示した本質的にすべてのファージからのヌクレオチド物質を、VH領域を増幅するためにコロニーPCRに、VH領域の配列を決定するために配列PCRにかけた。得られた配列をそれらのHCDR3の独自性に基づいてクラスター分類する。各独特のHCDR3クラスターからのVH領域を、IgG単一特異性又は二重特異性型での発現のためのベクターに再配列ヒトIGKV1-39/IGKJ1 LCとともにクローニングした。

10

【0052】

独特のHCDR3配列を有する3種の選択したCLEC12A結合分子は、以下の特性(Table2(表2)及び示さないデータ)を含んでいた、IgG型の所望のプロファイルを示した。

CLEC12Aの単離細胞外ドメインへの特異的結合。

腫瘍細胞株上に発現したCLEC12Aへの特異的結合。

ヒトPBMC上の骨髄細胞系特異的発現パターンの確認。

20

【0053】

【表2】

Table 2: CLEC12A Fab アームの特徴付け

| Fab | CDR3 長 | 被覆 CLEC12A への結合* | CLEC12A 発現細胞へ の結合** | エピトープに 対する CLEC12A ベ ンチマークと の競合*** |
|-----------------------|--------|------------------------|---------------------------|--|
| CLEC12A ベンチマー ク | 9 | 1.422 | 1467 | - |
| 3918 | 10 | 1.253 | 899 | あり |
| 4327 | 9 | 1.307 | 1559 | なし |
| 4331 | 9 | 1.328 | 1106 | あり |

30

*ELISA で試験した、2µg/ml で被覆した CLEC12A の細胞外ドメイン(Sino Biological社)、光学濃度として示した結果(アイソタイプ対照バックグラウンドシグナル:0.127)

**最適化 IgG 濃度で HL60 細胞においてフローサイトメトリーにより試験した、平均蛍光強度として示した結果(アイソタイプ対照バックグラウンドシグナル:116)

***20µg/ml でベンチマーク IgG と対照して、Fab 型を用いて ELISA で試験した

40

【0054】

(実施例4)

CD3xCLEC12bsAbの機能性CLEC12 Fabアームの選択

実施例3で述べた選択したCLEC12 Fabアームをその後、新たなCD3 Fabアームを固定アーム

50

ムとして有する二重特異性IgG型において発現させた。「3896 CD3 IgG」又は約言して「3896」と呼ぶ、この新たなCD3 FabアームもhuV 1-39軽鎖を用いる。CD3特異的VH候補3896のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図20に示す。したがって、すべてが同じ3896抗CD3アームを有していたが、CLEC12Aアームが異なっていた(CLEC12Aベンチマークアーム又は候補CLEC12A Fabアーム4327、4331若しくは3918のいずれか1つ)、種々の二重特異性CD3xCLEC12A分子を発現させた。これらのCD3xCLEC12A二重特異性分子を、実施例1で述べた標的細胞溶解アッセイにおいて機能的に試験した。結果は、アイソタイプ対照に関連する特異的溶解の百分率として表した。すべての候補CLEC12A Fabアームは、二重特異性型でHL60標的細胞の用量依存的特異的溶解を示し、CLEC12AベンチマークFabアームを用いた場合と同様又はそれより良好であった速度論を示した(図5)。

10

【0055】

また、CD3xアイソタイプ対照bsAbは、同じ程度の特異的溶解に1対数単位高い濃度を必要としたが、用量依存的な標的細胞溶解を示した。HSの添加により過剰なヒトIgGが存在していたにもかかわらず、おそらくFc媒介性架橋により、この一価CD3 IgGの殺滅活性が依然として明らかであった。実施例7から明らかであるように、この標的非特異的溶解は、CH2エンジニアリングによりFc受容体相互作用をサイレンシングすることにより実際に完全に排除することができる。

【0056】

(実施例5)

AML T細胞及び/又はAML腫瘍細胞を用いたCD3xCLEC12産物候補の有効性

20

実施例1及び実施例4で、健常ドナー休止T細胞により媒介されるHL60標的細胞溶解を誘導することに関するCD3 Fabアーム3056若しくは3896を用い、且つCLEC12A Fabアーム候補4327、4331若しくは3918又はCLEC12AベンチマークFabアーム3116を用いたCD3xCLEC12A二重特異性IgGの効力が示された。本実施例では、CD3xCLEC12A二重特異性薬物の治療適用の主要な指標の1つである、AMLを有する患者に由来するT細胞を、CD3xCLEC12A二重特異性全長IgGによる刺激により腫瘍標的を殺滅するように刺激することができるかどうかを検討する。次に、患者由来のT細胞が、CD3xCLEC12A二重特異性全長IgGによる刺激により自己AML腫瘍細胞芽球を殺滅することができるかどうかを確認する。

【0057】

T細胞は、実施例1で述べた手順に従ってAML患者の末梢血から単離する。次いで患者由来の精製T細胞をCFSE標識HL60細胞とともにインキュベートし、実施例1で述べたように細胞溶解についてモニターする。

30

【0058】

さらに、同じ患者から単離したAML腫瘍芽球を用いてT細胞媒介性標的細胞溶解アッセイを実施する(Nordeら、Blood 2009(113) 2312頁)。単離芽球をCFSEで標識し、Nordeらに記載されているようにサイトカイン混合物の存在下で、且つCD3xCLEC12A二重特異性IgG又は対照の存在下で自己患者由来T細胞と共培養する。実施例1で述べたように標的細胞溶解をモニターする。

【0059】

(実施例6)

CD3xCLEC12A二重特異性IgGとの接触後のT細胞によるサイトカインの放出

40

T細胞刺激生物製剤を用いた、T細胞の過剰刺激は、サイトカイン放出症候群につながり売るので、重大なリスクである(Suntharalingamら、2006、New England J Med 355(10)、1018~1028頁、Chatenoudら、1990、Transplantation 49(4)、697~702頁)。CD3xCLEC12A二重特異性IgGにより誘導されるT細胞の刺激の程度を検討するために、T細胞及びFc受容体発現標的細胞との共培養中のT細胞サイトカインの誘導を試験した。

【0060】

手短に述べると、健常ドナー休止T細胞を実施例1で述べたように候補3056x3116 CD3xCLEC12A二重特異性IgG(1 µg/ml)又は対照の存在下でHL60標的細胞と共培養した。2日後に、上清の試料を採取し、ヒトCytokine Human 10-Plex Panel(Invitrogen社、カタログ番号L

50

HC0001)を用いて当技術分野で公知のようにルミネックス(Luminex)アッセイでサイトカイン産生レベルを測定した。このパネルは、10種の主要なTh1及びTh2サイトカインを対象とする。

【0061】

予期した通り、CD3単一特異性二価IgGは、サイトカイン放出症候群を主として促進すると考えられる、IFN、TNF及びIL-2の強度の産生を誘導した(Table 3(表3))。加えて、IL-4、IL-6、IL-8及びIL-10の産生がCD3 IgGのインキュベーションにより上昇した。これと対照的に、CD3xCLEC12A二重特異性IgGは、IL-8の産生のみをCD3 IgGと同様のレベルに誘導し、他のサイトカインは、二重特異性IgGによって有意に誘導されなかった。GM-CSFは、あらゆる条件で検出限界以下であった。

10

【0062】

【表3】

Table 3:T細胞による抗体誘導性サイトカイン放出

| サイトカイン | CD3 IgG | CD3xCLEC12A IgG | CD3X アイソタイプ対照 |
|--------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| IFN γ | 484.3 \pm 155.0 | 13.5 \pm 19.1 | 0.0 \pm 0.0 |
| TNF α | 85.8 \pm 23.1 | 14.5 \pm 1.4 | 4.6 \pm 1.1 |
| IL-2 | 285.6 \pm 325.5 | 3.4 \pm 0.8 | 1.7 \pm 0.6 |
| IL-4 | 23.6 \pm 3.7 | 10.2 \pm 0.2 | 7.3 \pm 1.3 |
| IL-6 | 9.0 \pm 1.8 | 3.7 \pm 0.3 | 2.3 \pm 0.0 |
| IL-8 | 1567.8 \pm 5.2 | 1280.1 \pm 118.4 | 359.6 \pm 183.6 |
| IL-10 | 531.5 \pm 224.0 | 21.1 \pm 3.0 | 3.7 \pm 4.0 |
| IL-1 β | 4.4 \pm 0.4 | 3.3 \pm 0.1 | 2.5 \pm 0.1 |
| IL-5 | 2.1 \pm 0.2 | 0.7 \pm 0.0 | 0.6 \pm 0.1 |

20

結果は、2人のドナーのpg/ml単位のサイトカインの平均濃度 \pm 標準偏差として示す。

30

【0063】

ここに示したデータは、各種CD3xCLEC12A二重特異性IgG分子の好ましい治療プロファイルを示唆している。その理由は、それらが、CD3 IgGで認められたようにT細胞が潜在的に有害な量の炎症促進性サイトカインを分泌することを誘発せずに標的細胞溶解を強力に誘導する(実施例1及び4)からである。

【0064】

(実施例7)

CD3xCLEC12A bsAbのin vitroでの有効性に対するFcサイレンシングの効果

40

実施例4で示したCD3Xアイソタイプ対照bsAbによる用量依存的標的細胞溶解は、bsAb Fc部分とHL60標的細胞上のFc受容体との相互作用に起因することが示唆された。そのような非特異的細胞溶解は、標的細胞上又はNK細胞などのバスター細胞上のFc受容体との相互作用によりin vivoでも起こり得るので、CH2/下部ヒンジ領域のエンジニアリングを用いて、bsAbのFc媒介性活性のサイレンシングを誘導した。

【0065】

このために、235G 236R二重突然変異(DM; DM-Fc)又は234F 235E 331S三重突然変異(TM; TM-Fc)を用いて2種のFc突然変異戦略を検討した。DM-Fc又はTM-Fcを有するCD3xCLEC12A bsAbs(3056x3116)を作製し、野生型Fcを有するbsAbと同じ強度でCLEC12A発現細胞に結合することをフローサイトメトリーにより確認した(データは示さず)。次に、これらのbsAb

50

s並びにCD3Xアイソタイプ対照bsAbの野生型、DM-Fc及びTM-Fc型をHL60標的細胞溶解アッセイにおいて試験した(実施例1及び4参照)。結果は、アイソタイプ対照に関連する特異的溶解の百分率として表した。

【0066】

DM又はTMによるFcサイレンシングは、CD3xCLEC12A bsAbにより誘導されるHL60細胞溶解の程度に全く影響を及ぼさなかったか、又は軽微な影響を及ぼしたにすぎなかった(図6)。しかし、CD3Xアイソタイプ対照bsAbについては、HL60細胞の溶解を誘導する効力がTMにより、またさらにDMにより有意に低下した。

【0067】

これは、CH2/下部ヒンジのエンジニアリングによるFcサイレンシングが、エフェクター細胞を効率的且つ特異的に動員し、正常Fc受容体発現補助細胞により媒介される可能な非特異的免疫活性化を減弱させる二重特異性CD3xCLEC12A IgG1型を創出することによる異常細胞の標的的特異的殺滅にさらに寄与することを実証するものである。

10

【0068】

(実施例8)

FcRn、CD16、CD32、CD64及びC1qへの結合に対するFcサイレンシングの効果

WT Fc又はサイレンスDM-Fc又はTM-Fcを有する候補3056x3116 CD3xCLEC12A bsAbのヒトFcRnへの結合をバイオレイヤー干渉法(Bio-Layer Interferometry)(BLI、Octet QK、Forte Bio社)により測定した。手短に述べると、精製CD3xCLEC12A WT Fc IgG1、DM-Fc IgG1又はTM-Fc IgG1を0.1Mリン酸緩衝液/0.002%Tween20含有1.0mg/ml BSA pH6.0(FcRn結合緩衝液)中50 µg/mlの濃度でProtein Lバイオセンサー(ForteBio社、カタログ番号18-5085)に室温で捕捉させた。その後、可溶性ヒトFcRn(Sino Biological Inc、CT009-H08H)をFcRn結合緩衝液中1 µg/mlの濃度で室温で加えた。Octet QK解析ソフトウェアを用いたデータ解析で、Protein LセンサーへのIgGの結合の標準化により、ヒトFcRnへのDM又はTMサイレンスFcを有するCD3xCLEC12A bsAbの後の結合が野生型Fcテイルを有するCD3xCLEC12A bsAbと同等であり(図7)、したがってFcサイレンシングがFcRn結合に影響を及ぼさなかったことが示された。

20

【0069】

サイレンスFcを有するCD3xCLEC12A bsAbのCD16、CD32及びCD64への結合をバイオレイヤー干渉法(BLI、Octet QK、ForteBio社)により測定する。プロトコルを約言すると、精製CD3xCLEC12A WT Fc IgG1、DM-Fc IgG1又はTM-Fc IgG1を1xKinetics緩衝液(ForteBio社18-5032)中50 µg/mlの濃度でProtein Lバイオセンサー(ForteBio社、カタログ番号18-5085)に室温で捕捉させる。その後組換えCD16(Sino Biological Inc、10389-H08H1)、CD32(Sino Biological Inc、10374-H08H)及びCD64(Sino Biological Inc、10256-H08H)タンパク質をKinetics緩衝液(ForteBio社18-5032)中1.0 µg/mlの濃度で室温で加える。bsAbへのFcRnの結合をOctet QK解析ソフトウェアを用いて解析する。

30

【0070】

サイレンスFcを有するCD3xCLEC12A bsAbのヒトC1qへの結合を捕捉ELISAにより測定する。この目的を達成するために、精製CD3xCLEC12A WT Fc IgG1、DM-Fc IgG1又はTM-Fc IgG1をPBS中25~0.012 µg/mlの濃度範囲でNunc-Immuno maxisorp F96プレート(Nunc社、439454)O/N上に4で被覆する。その後、ヒトC1q(Quidel社、A400)をELISA緩衝液(2%MILK/PBST)中2.0 µg/mlで加える。次いでヒツジ抗ヒトC1qポリクローナルIgG(Meridian社、K90020C)及びウサギ抗ヒツジHRPコンジュゲートポリクローナルIgG(Southern Biotech社、6150-05)を用いて複合体を視覚化する。最後に、TMB基質(BD51-2606KC/51-2607KC)を用いて結合を起こさせ、マイクロプレートリーダー(Multiskan EX、Thermo Electron Corporation)を用いてOD450を定量する。

40

【0071】

(実施例9)

CD3xCLEC12A二重特異性IgGのin vivoでの有効性の評価

CD3xCLEC12A二重特異性IgG1を用いたin vitro所見を確認し、拡張するためにルシフェ

50

ラーゼ発現HL60細胞(HL60(-Luc)細胞)を用いる動物異種移植試験を行う。より詳細には、これらの試験は、第1相臨床評価のための初回投与量の設定において考慮に入れることとなる、有効量における定常状態血漿濃度を測定するために実施する。この目的を達成するために、NOD/SCIDマウス(又は同等の免疫不全マウス)に、注射後2週間以内に大多数の動物における皮下HL60腫瘍の定着をもたらす量の生存HL60(-Luc)細胞を皮下注射する。HL60(Luc)接種と並行して、又は最初の腫瘍定着時に、 5×10^6 又は 1×10^7 ヒトPBMCを投与する。PBMC投与の初日並びに3、6及び9日後にCD3xCLEC12A二重特異性IgG又は対照単一特異性若しくは対照二重特異性IgGを数用量レベルで静脈内投与する。初期HL60(Luc)接種の1週間後に腫瘍の寸法を記録する。各群の腫瘍の寸法(腫瘍体積又は総生物発光として示す)の算術平均を時間に対してプロットする。

10

【0072】

(実施例10)

第1a/1b相試験における二重特異性全長IgG1抗体CD3xCLEC12Aの使用

最終リードCD3xCLEC12A二重特異性全長IgG1候補を用いて、GMPグレードの物質を製造し、AML患者において臨床的に評価する。最初に、製品候補の正式な非臨床安全性解析を行って、ヒト試験における安全な初回投与量を最初に設定する。この後、再発及び/又は不応性AML並びに集中治療に不適合の患者におけるオープンラベル多施設用量漸増第1a/1b相試験を実施して、i.v.投与によるCD3xCLEC12A二重特異性全長IgGの安全性及び耐容性を探索する。副次的エンドポイントは、薬物動態学的及び薬力学的特徴付け並びに予備的有效性解析を含む。全奏功率は、骨髄におけるAML芽球の減少の評価により評価する。第1a相では、単回/反復用量漸増により最大耐量(MTD)を評価する。中間PK解析の後、試験の第1b相部分は、MTDでの投与延長コホートを必要とする又は投与頻度のさらなる探索を必要とする。

20

【0073】

(実施例11)

T細胞の増殖を誘導するCD3xCLEC12A bsAbの能力

AML患者では、T細胞数は、診断時にAML芽球の量と比較して低い。T細胞は、T細胞の数の増加をもたらす活性化により増殖することは、周知である。さらに、実施例1で、我々はCD3xCLEC12A bsAbがT細胞を活性化することができ、T細胞媒介性腫瘍細胞溶解を誘導する効力を有することを示した。T細胞の増殖がエフェクターT細胞の数の増加をもたらすので、我々は、CD3xCLEC12A bsAbによる治療を受けるAML患者が、CD3xCLEC12A二重特異性分子媒介性のT細胞の活性化によるT細胞サブセットの拡大から恩恵を受けるという仮説を立てた。CD3xCLEC12A bsAbが*in vitro*でT細胞の増殖を誘導することを実証するために、休止T細胞を精製し、カルボキシフルオレセインニ酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)で標識し、CD3xCLEC12A bsAb又は対照Absの存在下で自己CLEC12A+単球とともに共培養した。CD3xCLEC12Aが非特異的なFcガンマの活性化を伴うことなくT細胞の増殖を誘導することを特に検討するために、実施例7及び8で述べた、DM-Fcテイルを有するCD3xCLEC12A bsAbsを用いた。対照として、CDxアイソタイプ対照WT-Fc bsAb、CDxアイソタイプ対照DM-Fc bsAb、WT-Fcを有するモノクローナルCD3及び無関連アイソタイプ対照(WT-FCを有するIgG)を含めた。健常ドナー末梢血からの単球及びT細胞を標準密度勾配単離により単離して、末梢血単核細胞(PBMC)を濃縮し、その後、CD14マイクロビーズ(ヒトCD14マイクロビーズ、Miltenyi Biotec社、カタログ番号130-050-201)を用いた単球のCD14正選択及び他の白血球に対する磁気ビーズ(汎T細胞単離キット、Miltenyi Biotec社、カタログ番号130-096-535)を用いた非接触T細胞の負選択を行った。汎T細胞単離キットは、T細胞の事前の活性化の可能性を回避しつつ休止(非接触)T細胞(すなわち、抗体により染色されていない)の単離を可能にする。

30

40

【0074】

CFSE標識精製休止T細胞を、その後、10%正常ヒト血清(HS)を含む培地中で精製単球及びbsAbsとともに5:1のエフェクター:標的細胞比で7日間インキュベートした。7日目にT細胞増殖について読み取るCFSEシグナルの低下をフローサイトメトリーにより測定した。結果

50

は、CD3+、CD3+CD4+又はCD3+CD8+T細胞当たりのCFSEシグナルをヒストグラムで表した。

【0075】

陽性対照CD3 WT-Fc Abは、T細胞増殖を誘導したのに対して、WT-Fcを有するアイソタイプ対照IgGは、T細胞増殖を誘導しなかった(図8)。予期した通り、CD3xアイソタイプ対照W T-Fc bsAbは、T細胞増殖を誘導したが、二価単一特異性抗CD3 IgG対照と比較したとき、より低い程度であった。対照的に、CD3xアイソタイプ対照DM-Fc bsAbは、そのサイレンスFcテイルのため、T細胞増殖を誘導しなかった。CD3xCLEC12A DM-Fc bsAbもCD3をCLEC12A抗原と特異的に架橋させることにより媒介された所望のT細胞増殖を誘導した。

【0076】

これは、CD3xCLEC12A bsAbが、先に示したようにT細胞媒介性腫瘍溶解の標的特異的誘導の能力があるだけでなく、T細胞の数の増加をもたらす標的特異的T細胞増殖も強力に誘導することができることを示すものである。さらに、これは、CH2/下部ヒンジエンジニアリングによるFcサイレンシングが、異常細胞の標的特異的殺滅に寄与するだけでなく、CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb IgGによるT細胞増殖の標的特異的誘導にも寄与することをさらに示すものである。

【0077】

(実施例12)

AML患者からの T_{EMRA} サブセットのCD3xCLEC12A誘導性拡大の評価

CD3xCLEC12 DM-Fc bsAbについてT細胞増殖の活性化が実証されたので、我々は、次にCD3xCLEC12 DM-Fc bsAbがAML患者におけるCD8+細胞傷害性T細胞コンパートメントの増殖を誘導することができるかどうかを検討することを望んだ。CD8+細胞傷害性T細胞は、腫瘍退縮を媒介する主要なエフェクターと認識されている(Sluijterら、2010)。CD8+ T細胞は、次の4つのサブセットに分けることができる。ナイーブ(CCR7+CD45RA+)、中心メモリー(T_{CM} 、CCR7+CD45RA-)、エフェクターメモリー(T_{EM} 、CCR7-CD45RA-)及びCD45RA+エフェクターメモリー(T_{EMRA} 、CCR7-CD45RA+)細胞。試験で、ナイーブ及びメモリーCD8+ T細胞サブセットがTCR刺激に反応して増殖し、分化する異なる能力を有することが示された(Gegina tら、2003)。

【0078】

最初に臨床的寛解状態にあるAML患者の末梢血中のCD8+コンパートメントを健常ドナーと比較して解析した。この目的を達成するために、標準密度勾配単離によりAML患者及び健常ドナーからの凍結末梢血試料からPBMCを単離した。次に、PBMCsをCCR7、CD3、CD4、CD8、CD45RA及びCD45RO抗体で染色して、フローサイトメトリーによりCD8+ T細胞サブセットについて分析した。結果は、総CD8+ T細胞コンパートメント内のサブセットの百分率として表した。

【0079】

以前に記載されたことと同様に、ナイーブCD8+ T細胞サブセットは、健常者のナイーブCD8+ T細胞サブセットと比較してAML患者の血液中で減少したのに対して、 T_{EMRA} コンパートメント(CCR7-CD45RA+)は、健常ドナーと比較してAML患者で増加したことが観察された(図9)。

【0080】

次に、AML患者T細胞コンパートメントの腫瘍標的特異的T細胞の増殖を試験するための実験を行う。より詳細には、これらの実験は、CD3xCLEC12A DM-Fc bsAbが、AML患者のナイーブCD8+ T細胞と比べてAML患者のT細胞増殖及びエフェクターT細胞サブセット(T_{EM} 及び T_{EMRA})の増殖を増大させ得るかどうかを判断するために行う。

【0081】

この目的を達成するために、臨床的寛解状態にあるAML患者からの休止T細胞を実施例11に従って精製する。0日目におけるCD8+ T細胞サブセットの組成は、CCR7、CD3、CD4、CD8、CD45RA及びCD45RO抗体によるPBMCの染色とそれに続くフローサイトメトリー分析により分析する。さらに、休止T細胞をCFSEで標識するか又は標識せず(実施例11で述べたCFSE標識)、対照又は試験抗体の存在下でHL60白血病細胞とE:T比5:1で7日間共培養する。CFSE標

10

20

30

40

50

識T細胞は、T細胞増殖の定量のために用いるのに対して、非標識T細胞は、増殖T細胞サブセットの百分率を測定するために用いる。CFSE標識及び非標識T細胞を1 µg/mlのPBS、アイソタイプ対照WT-Fc Ab、CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb、CD3xアイソタイプ対照DM-Fc bsAb及びWT-Fcを有するCD3モノクローナルAbとともにインキュベートする。7日後に、CFSE標識T細胞をCD3、CD4及びCD8抗体で染色し、FACS解析にかけて、絶対T細胞数及び細胞分裂の回数を測定し、一方、非標識CFSE T細胞をCCR7、CD3、CD4、CD8、CD45RA及びCD45RO抗体で染色して、フローサイトメトリーにより増殖CD8+ T細胞サブセットの組成を測定する。T細胞増殖は、T細胞サブセット当たりのCFSEシグナルとしてヒストグラムで表し、4種のCD8+ T細胞サブセットのサイズを総CD8+ T細胞コンパートメント内の百分率として表す。

【0082】

(実施例13)

AML患者T細胞媒介性腫瘍細胞溶解を誘導するCD3xCLEC12A bsAbの有効性

実施例1でCD3xCLEC12A bsAbが、健常ドナーからの休止T細胞によるCLEC12A陽性HL60細胞の殺滅を誘導することができることが実証された。次に我々は、AML患者T細胞の標的的特異的活性化を誘導するCD3xCLEC12A bsAbの能力及びHL60細胞のAML患者T細胞媒介性殺滅を誘導するその能力を検討した。

【0083】

T細胞は、実施例11で述べた汎T細胞単離キットを用いて臨床的寛解状態にあるAML患者(AML FAB分類AML-M1/M2、M4又はM5)の凍結末梢血から単離した。精製AML患者由来休止T細胞を、その後10%正常HSを添加した培地中でPBS、アイソタイプ対照WT-Fc Ab、CD3xCLEC12A DM-Fc、CD3xアイソタイプDM-Fc及び陽性対照CD3 WT-Fc Ab(すべての抗体が1 µg/mlの濃度)の存在下でCFSE標識HL60細胞とともに5:1のエフェクター:標的細胞比で2日間インキュベートした。2日の共培養の後に、CD3、CD4及びCD25についてフローサイトメトリーによりT細胞の活性化を測定した。これらの結果は、CD4+ T細胞当たりのCD25+細胞の百分率として表した。さらに、生存CFSE陽性HL60細胞をフローサイトメトリーにより定量した。結果は、IgGと比べた特異的溶解の百分率として表した。

【0084】

これらのデータにより、CD3xCLEC12A DM-Fc bsAbにより媒介された健常ドナー及びAML患者T細胞の抗原特異的活性化が同等であったことが示されている(図10A)。予期した通り、CD3xアイソタイプDM-Fc bsAbは、健常ドナーのT細胞活性化もAML患者由来のT細胞の活性化も誘導しなかった。AML患者由来のT細胞によるHL60細胞のCD3xCLEC12A DM-Fc bsAb媒介性溶解(68%HL60細胞溶解)が健常ドナーのT細胞によるそれ(69%HL60細胞溶解、図10B)と同等であったことが示された。予期した通り、CD3xアイソタイプ対照DM-Fc bsAbは、AML患者T細胞によるHL60細胞の殺滅も健常ドナーT細胞によるHL60細胞の殺滅も誘導しなかった。したがって、CD3xCLEC12A二重特異性分子は、これらのT細胞がAML患者由来か又は健常ドナー由来かにかかわらず、T細胞媒介性腫瘍細胞溶解の強力な誘導因子である。

【0085】

CD3xCLEC12A bsAbがAML患者T細胞によるHL60腫瘍細胞強力な溶解を誘導する能力を有することが示されたので、その後、AML T細胞の特異的活性化を標的にするCD3xCLEC12A bsAbの能力を評価した。さらに、AML患者由来自己T細胞による初代CLEC12A陽性AML芽球の溶解を誘導するCD3xCLEC12A bsAbの能力を確認した。最初に、フローサイトメトリー分析により測定した>70%の初代AML芽球を含む診断時のAML患者からの凍結保存骨髄細胞を解凍し、以前に記載された(Nordeら、2009)ように10%FCS、100ng/ml GM-CSF、100ng/ml G-CSF、50ng/ml IL-3、25ng/ml SCF及び20mg/ml Flt3Lを添加したIMDM培地中で一夜(0/N)培養した。0/N培養後、初代AML芽球をフローサイトメトリーによりCLEC12A、CD3、CD4、CD8、CD14、CD19、CD33、CD34、CD38、CD45及びCD117の表面発現について表現型を決定し、CFSEで標識した。患者が臨床的寛解を達成したときに採取した、休止自己患者由来T細胞を実施例11で述べた汎T細胞単離キットを用いて末梢血から単離した。その後、AML芽球を10%HSを含む培地中で5:1のE:T比で休止自己T細胞と2日間共培養した。試験した条件は、PBS、アイソタイプAb WT-Fc、CD3xCLEC12A DM-Fc、CD3xアイソタイプDM-Fc及び陽性対照CD3 WT

10

20

30

40

50

-Fc Ab(すべての抗体が1 µg/ml)を含んでいた。2日の共培養の後に、CD3、CD4、CD8及びCD25についてフローサイトメトリーによりT細胞の活性化を測定した。これらの結果は、CD4+又はCD8+AML T細胞当たりのCD25+細胞の百分率として表した。AML芽球溶解は、フローサイトメトリーによる生存CFSE⁺/CD45^{low}二重陽性AML芽球の定量により測定した。結果は、IgGと比べた特異的芽球溶解の百分率として表した。

【0086】

これらのデータから、CD3xCLEC12A DM-Fc bsAbが、モノクローナルCD3 WT-Fc陽性対照Abと同等のAML T細胞のAML芽球標的的特異的活性化を誘導する能力を有することが実証される(図11A/B)。さらに、これらのデータから、AML患者由来T細胞による自己AML芽球のCD3xCLEC12A bsAbにより誘導された強力な殺滅がモノクローナルCD3 WT-Fc陽性対照Abにより誘導された殺滅と同様に強力であることが実証される(図11C)。予期した通り、CD3xアイソタイプ対照DM-Fc AbによりAML芽球の殺滅が全く誘導されなかったか又はわずかに誘導された。このことから、CD3xCLEC12A bsAbにより媒介された観測されたAML芽球の殺滅が、主としてT細胞の抗原特異的活性化及びCLEC12A+AML腫瘍細胞の特異的溶解の結果であることがわかる。全体的にみて、本試験でCD3xCLEC12A bsAbがAML患者T細胞によるCLEC12A陽性腫瘍細胞の殺滅を効果的に誘導することができることが実証されている。

【0087】

(実施例14)

非特異的サイトカイン放出に対するFcサイレンシングの効果

実施例7及び8において、CH2/下部ヒンジのエンジニアリングによるFcサイレンシング(DM-Fc)を有するCD3xCLEC12A bsAb IgG1型が、Fcガンマ受容体に対する親和性の低下をもたらし、白血病由来HL60細胞株の非特異的Fc受容体媒介細胞傷害を排除したことが実証された。次に、DM-Fcサイレンシングを有するbsAb IgG1型が、NK細胞などのFc受容体陽性パイスタンダー細胞の存在下で非特異的Fc受容体媒介細胞傷害を排除したかどうかを検討した。本試験では、自己健常ドナー由来休止T細胞を、NK細胞などの他のFc受容体陽性パイスタンダー先天性細胞の存在下でCLEC12A陽性単球に対してリダイレクトした。この目的を達成するために、PBMCを、健常ドナーからのヘパリン加末梢血から密度勾配遠心分離により単離し、 1×10^6 細胞/mlの密度で平板培養した。10%FBSを含む培地中でPBS、アイソタイプ対照Ab、CD3xCLEC12A WT-Fc bsAb、CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb、CD3xアイソタイプ対照WT-Fc bsAb、CD3xアイソタイプ対照DM-Fc bsAb又はWT-Fcを有するCD3モノクローナルAbの存在下でPBMCを2日間培養した。2日の培養後、フローサイトメトリーによりCD14発現に基づいて生存単球を定量した。結果は、IgGと比べた特異的溶解の百分率として表した。

【0088】

CD3xCLEC12A二重特異性抗体については、DM-Fc領域の存在によるFcサイレンシングは、単球溶解に対する軽微な影響を及ぼしたにすぎなかったことが実証された(図12)。これと対照的に、CD3xアイソタイプ対照bsAbについては、DM-Fc領域の存在によるFcサイレンシングは、単球の非特異的溶解を有意に低減した。したがって、CD3xCLEC12A bsAbにおけるFcサイレンシングが標的的特異的殺滅にさらに寄与するものであり、CD3xCLEC12A DM-Fc bsAbがT細胞を特異的に動員し、正常Fc受容体発現補助細胞により媒介される非特異的免疫活性化を減弱させると結論される。

【0089】

次に、CD3xCLEC12A bsAbにおけるDM突然変異によるFcサイレンシングにより、補助細胞によってもたらされる抗体療法に伴う一般的臨床事象である、サイトカイン放出症候群(CRS)に関連することが公知である、サイトカインのFc受容体媒介放出が無くなるかどうかを問題にした。この目的を達成するために、図13に示す単球殺滅アッセイの上清中のサイトカインプロファイルを、製造業者の指示に従ってルミネックスプラットフォーム(Invitrogen社、LHC0001)のサイトカインヒト10プレックスパネルを用いて解析した。以下のヒトサイトカインのプロファイルを2日目上清において測定した。GM-CSF、IFN- γ 、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10及びTNF- α 。結果は、pg/ml単位で測定されたサイトカイン濃度である。GM-CSF、IL-4及びIL-5サイトカインのレベルは、このアッセイの

検出限界を下回っていた(データは示さず)。

【0090】

データから、両方がWT-Fcテイルを有するCD3xCLEC12A及びCD3xアイソタイプ対照bsAbは、IL-1、IL-6、TNF- α 、IL-10、IL-2及びIFN- γ の放出を誘導したことが示された(図13)。しかし、DM-Fcテイルを有する場合にCD3xCLEC12A及びCD3xアイソタイプ対照bsAbで、IL-8を除いて、これらのサイトカインのレベルが全く認められなかったか、又は非常に低いレベルが認められた。単球がIL-8の主な源であるので、高いIL-8レベルは、溶解単球から放出されると推測され、非特異的FcR媒介放出による結果ではない。bsAb IgG型におけるDM突然変異によるFcサイレンシングは、CRSに関連するIL-1b、IL-6、TNF- α 、IL-2及びIFN- γ サイトカインのFc受容体媒介放出を有意に消失させると結論される。全体的にみて、これらのデータから、CH2/下部ヒンジ領域におけるDM突然変異によるFcサイレンシングが、正常Fc受容体発現補助細胞により媒介される可能な非特異的免疫活性化及び炎症促進性サイトカインの関連する放出を減弱させることによりCD3xCLEC12A DM-bsAbによるエフェクター細胞の効果的な働き及び特異的動員の増強に寄与することが実証される。

【0091】

(実施例15)

全長二価モノクローナル抗CD3 IgGとしての候補3896の膜結合CD3への結合を、CD3発現HPB-ALL細胞を用いたFACS解析により全長二価モノクローナル抗CD3 IgGとしての候補3056と比較した。非関連ヒトIgG1をアイソタイプ対照IgGとした。フローサイトメトリーは、当技術分野で公知の標準的手順に従って実施した。図14Aに示すように、3896 CD3 IgGは、3056 CD3 IgGと同様に、HPB-ALL細胞上のCD3に用量依存的に結合した。

【0092】

次に、T細胞増殖を誘導する3896 CD3 IgGの能力をマウスOKT3 CD3抗体、3056 CD3 IgG及びアイソタイプ対照IgGと直接比較して試験した。手短に述べると、抗体を連続希釈し、96ウェル上に固定化した。非結合IgGの除去の後、CFSE標識T細胞を加え、37°Cでインキュベートした。5日目に、誘導されたT細胞増殖のレベルをフローサイトメトリーにより解析した。結果は、CFSE発現レベルの少なくとも2倍の低下を示す生存T細胞の百分率として表し、図14Bに示す。二価単一特異性抗体としての3896 CD3 IgGは、候補3056 CD3 IgG及びマウスOK T3と比較してT細胞増殖を誘導するのにさほど強力でなかったことが示された。これらのデータから、3056 CD3 IgGと比較したときの3896により誘導されるT細胞増殖の低いレベルは、フローサイトメトリーにより解析されたように低いCD3結合能力を反映していることが示唆される。このような結合の差があることは、T細胞とCLEC12A陽性AML腫瘍細胞が効率的に接合し、CLEC12A陽性AML腫瘍細胞のT細胞媒介性溶解が最適に誘導されるように、CD3及びCLEC12Aに対する結合親和力間の好ましいバランスを示す二重特異性抗体をもたらす、所望の親和性を有するアームを選択することが可能となる。

【0093】

CD3xCLEC12A二重特異性抗体型における新たな3896抗CD3アーム及び3056抗CD3アームの効力を対比して試験するために、実施例4の3896xCLEC12Aベンチマーク二重特異性抗体(候補3896x3116)及び実施例1の3056xCLEC12Aベンチマーク二重特異性抗体(候補3056x3116)を以前に記載されたHL60細胞傷害性アッセイにおいて直接比較した。結果は図15に示す。3896xCLEC12AベンチマークbsAbは、3056xCLEC12AベンチマークbsAbと同様な効力を有することが認められた。両二重特異性は、それらのCD3 Fabアームのみが異なっているが、CLEC12A Fabアームは同じであるので、3896 CD3 Fabアームの機能性は、CD3xCLEC12A二重特異性Abにおける3056 CD3 Fabアームの機能性と同様であると結論される。より低い濃度では候補3896x3116は、候補3056x3116より良好であることが認められる。上文で説明したように、それがより大きい治療ウィンドウを備えているので、これは好ましい。

【0094】

(実施例16)

実施例3で、CLEC12A特異的Fabアームのパネルをファージディスプレイライブラリから選択した。すべてのCLEC12A結合分子がhuVk1-39軽鎖を含んでいた。Fab3918、4327及び43

10

20

30

40

50

31の3種のCLEC12A結合分子を選択した。これらのFabを全長ヒトIgG1: 3918 CLEC12A IgG、4327 CLEC12A IgG及び4331 CLEC12A IgGと表した。3918 CLEC12A IgGのVH、4327 CLEC12A IgGのVH、4331 CLEC12A IgGのVH及び共通VL(IGKV1-39;012)のヌクレオチド及びアミノ酸配列を図20に示す。全長CLEC12A抗体をHL60細胞により発現されたCLEC12Aへの結合について試験した。

【0095】

膜結合CLEC12Aへの3918 CLEC12A IgG、4327 CLEC12A IgG及び4331 CLEC12A IgGの結合を、CLEC12A発現HL60細胞を用いたFACS解析によりCLEC12Aベンチマーク抗体(3116)と比較した。非関連ヒトIgG1をアイソタイプ対照IgGとした。フローサイトメトリーは、当技術分野で公知の標準的手順に従って実施した。図16に示すように、4327 CLEC12A IgGは、CLEC12Aベンチマーク抗体と同様にCLEC12Aに結合した。他の2種の抗体3918 CLEC12A IgG及び4331 CLEC12A IgGもHL60細胞上のCLEC12Aへの良好な用量依存的結合を示した。CLEC12Aへのそれらの結合は、CLEC12Aベンチマーク抗体と比べて多少低いように思われた。結論として、Fab3918、4327及び4331は、良好なCLEC12A結合アームである。

【0096】

(実施例17)

3896 CD3 Fabアーム及びCLEC12A Fabアーム3918、4327及び4331を含む二重特異性分子が機能しうるかどうかを試験した。このために、二重特異性抗体である3896xCLEC12Aベンチマーク、3896x3918、3896x4327及び3896x4331をもたらすために3896 CD3 FabアームのVH配列及びCLEC12Aベンチマーク抗体、3918 CLEC12A Fab、4327 CLEC12A Fab又は4331 CLEC12A FabのVH領域を、再配列huV_H1-39軽鎖とともに二重特異性IgG1の産生のための当技術分野で公知の方法(Gunasekaranら、国際公開第2009/089004号)を用いて発現ベクターにクローニングした。これらの二重特異性分子を以前に記載されたHL60細胞傷害性アッセイにおいて機能性について試験した。2人の健常ドナー(HD1及びHD2)からの休止T細胞を様々な濃度の二重特異性抗体の存在下でE:T比5:1で又は10%HSの存在下で48時間CFSE標識HL60細胞と共培養した。生存CFSE陽性HL60細胞を2日目にフローサイトメトリーにより定量した。図17における結果は、特異的溶解百分率として表す。ドナー1からのT細胞(HD1;図17上パネル)及びドナー2のT細胞(HD2;図17下パネル)を用いた2つの個別の実験について、すべての二重特異性抗体が、高濃度でインキュベートしたとき3896xCLEC12Aベンチマーク二重特異性抗体と同様に強力であることが示された。

【0097】

注目すべきことに、二重特異性抗体の特により低濃度で、3896x4327及び3896x4327二重特異性抗体は、3896xCLEC12Aベンチマーク二重特異性抗体より強力なことが確認された。したがって、これらの二重特異性抗体は、それらのCLEC12A Fabアームのみが異なるが、CD3 Fabアームは同じであるので、4327及び4327 CLEC12A Fabアームの機能性は、CLEC12AベンチマークFabアームと比較してより強力であると結論づけることができる。理論に拘束されることを望むものではないが、3896x4327及び3896x4327と3896xCLEC12Aベンチマーク二重特異性IgGとの間の観測された差は、これらの新規な抗CLEC12A Fabアームの結合親和力の差又はそれらが腫瘍細胞とCD3発現T細胞とのより効果的な架橋を可能にする異なるCLEC12Aエピトープを標的とする可能性があることを反映している可能性がある。

【0098】

(実施例18)

実施例2で、CLEC12Aベンチマーク抗体のFab型対Fab断片としてELISAで試験した場合、3918 CLEC12A Fabと4331 CLEC12A FabがCLEC12A上のエピトープへの結合について競合したことが示された。しかし、4327 CLEC12A Fabは、このアッセイで結合についてCLEC12AベンチマークIgGと競合しなかった(表2)。この実験では、4327 CLEC12A IgGの全長IgGがCLEC12Aへの結合についてCLEC12Aベンチマーク抗体と競合かどうかを試験した。手短に述べると、HL60細胞を氷上で50 µg/mlの一次抗体とともに20分間ブレインキュベートした。その後、オレゴングリーン(OG)標識(Invitrogen社、カタログ番号A10476)二次抗体を1 µg/mlで細胞と一次抗体に加えた(OG標識IgGの添加後の一次抗体の濃度は約45 µg/mlである)。

20分後に細胞を洗浄し、FACSにより解析した。

【0099】

結果を図18に示す。4327 CLEC12A IgGとCLEC12AベンチマークIgGがCLEC12Aへの結合について競合すると結論された。このことから、両IgGがCLEC12A抗原上の密接に関連したエピトープに結合するか、又はそれらが立体障害のため両IgGの同時の結合を可能にしない異なるエピトープに結合することが示唆される。

【0100】

(実施例19)

以前の実施例で、CLEC12A Fabアーム4327、4331、3918並びに3116が、CLEC12Aへの優れたバインダーであり、CD3xCLEC12A二重特異性型におけるT細胞媒介性殺滅の強力な誘導因子であることが実証された。今までのところ、二重特異性抗体は、免疫グロブリン重鎖ヘテロ二量体化を促進するための公知の方法(Gunasekaranら)を用いて得た。我々の同時係属米国及びPCT出願(米国正規出願番号:13/866747及びPCT/NL2013/050294、参照により本明細書に組み込まれる)において、我々は、単一細胞から二重特異性抗体を産生させるための方法及び手段を開示し、それにより、単一特異性抗体の形成よりも二重特異性抗体の形成に有利な手段を提供している。これらの方法は、本発明においても好都合に用いることができる。特に、本質的に唯一の二重特異性全長IgG分子を産生するための好ましい突然変異は、第1のCH3ドメインにおけるアミノ酸置換L351K及びT366K(Kabatによるナンバリング)(「KK変異型」重鎖)並びに第2のCH3ドメインにおけるアミノ酸置換K351D及びL368E(「DE変異型」重鎖)又は逆も同様である。DE変異型及びKK変異型が優先的に対合してヘテロ二量体(いわゆる「DEKK」二重特異性分子)を形成することが我々の同時係属US13/866747及びPCT/NL2013/050294出願において以前に示された。DE変異型重鎖(DEDEホモ二量体)又はKK変異型重鎖(KKKKホモ二量体)のホモ二量体化は、同じ重鎖間のCH3-CH3界面における荷電残基間の強い反発のためほとんど起こらない。CD3xCLEC12A二重特異性分子の効力がヘテロ二量体化のための公知の突然変異(Gunasekaran)又はDEKK突然変異による影響を受けないことを示すために、DE変異型及びKK変異型重鎖を用いて、CD3xCLEC12A二重特異性を調製するための異なる重鎖のヘテロ二量体化を促進した。さらにCH2/下部ヒンジ二重突然変異(L345G及びG236R;DM)をこれらのDE及びKK変異型重鎖に導入した。これらの得られた二重特異性分子のFcテイルを「DM DEKK」と呼ぶ。

【0101】

手短に述べると、3116、4327又は4331 CLEC12A FabアームのVH領域をDE変異型+DM重鎖を含む発現ベクターにクローニングし、一方、3056 CD3抗体のVH領域をKK変異型+DM重鎖を含む発現ベクターにクローニングし(米国正規出願番号:13/866747及びPCT/NL2013/050294)、これらの発現ベクターを、再配列ヒトIGKV1-39/IGKJ1(huV 1-39)軽鎖をコードする核酸分子と一緒に、宿主細胞が二重特異性抗体を発現し、産生するように宿主細胞に提供した。得られた3056x3116 DM DEKK、3056x4327 DM DEKK及び3056x4331 DM DEKK二重特異性抗体をその後、前述のようにHL60細胞傷害性アッセイにおいて効力について試験した。結果を図19に示す。すべての変異体が依然として効果的な腫瘍細胞溶解の能力があることが実証され、したがって、腫瘍細胞溶解を誘導する能力を維持しながらDM及びDEKK突然変異をCD3xCLEC12A二重特異性抗体のFc領域に導入することができると結論された。

【0102】

(参考文献)

10

20

30

40

Armour et al. Mol. Immunol. 2003 (40) 585-593

Bakker A.B. et al. Cancer Res 2004, 64, p8443-50

Bargou et al. 2008 Science 321:974

Bluemel et al. 2010 Cancer Immunol. Immunother. 59:1197

10

Chames and Baty, MABS 2009 (1) 539-547

Chatenoud et al. 1990, Transplantation 49(4), pages 697-702

Chen C.H. et al. Blood 2006, 107, p1459-67

20

Cui et al. JBC 2012 (287) 28206-28214

De Kruif et al. 1995, J Mol Biol 248(1), pages 97-105

De Kruif et al. J. Mol. Biol. 2009 (387) 548-58

De Kruif et al. Biotechnol Bioeng. 2010 (106)741-50

30

De Wildt RM et al. J. Mol. Biol. 1999 (285) 895-901;

Dreier et al. 2002 Int.J.Canc. 100:690

Geginat, J. et al. Blood, 2003. 101(11), p. 4260-6

Gunasekaran et al. JBC 2010 (285) 19637-19646

Haagen et al. 1995 Blood 85:3208

Han Y. et al. Blood 2004, 104, p2858-66

Kipriyanov et al. 1998 Int.J.Can. 77:763

10

Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197

Lanzavecchia et al. 1987, Eur.J.Imm. 17:105

Liu et al. 1985 PNAS 82: 8648

Liesveld et al. 1988, J. Immunol. 140(5), pages 1527-1533

20

Loffler et al. 2000 Blood 95:2098

Marshall A.S. et al. J Biol Chem 2004, 279, p14792-802

Merchant et al. Nature Biotechnology 1998 Volume 16, pp 677-681

30

Moore et al. Blood 2011 (117) 4542-4551

Moshaver et al. 2008 Stem Cells 26:3059

Nissim et al. The EMBO Journal vol.13 no.3 pp.692 - 698. 1994

Norde W.J. et al. Blood 2009 (113) (10): p. 2312-23

40

Offner et al. *Molecular Immunology* 2006 (43) 763–771

Oganesyan et al. *Biol. Crystall.* 2008(D64)700

Schaefer et al (*Cancer Cell* 20, 472-486, October 2011

Sheridan C, *Nat Biotechnol.* 2012 (30):300-1

10

Staerz et al. 1986 *PNAS* 83:1453

Shields RL et al. *JBC* 2001 (276) 6591-6604

Sluijter, B.J., et al. *Clin Immunol*, 2010. 137(2), p. 221-33

Suntharalingam et al. 2006, *New England J Med* 355(10), pages 1018-1028

20

Van Rhenen et al. 2007 *Blood* 110:2659

Zeidler et al. 1999 *J. Immunol.* 163:1246

WO2004/009618

WO2005/118635

30

WO2005/000894

WO2005/000894

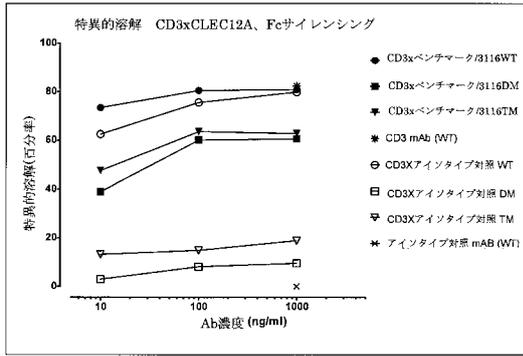
WO 2008/027236

WO2009/089004

WO2009/157771

WO 2010/108127

【 図 6 】



【 図 8 】

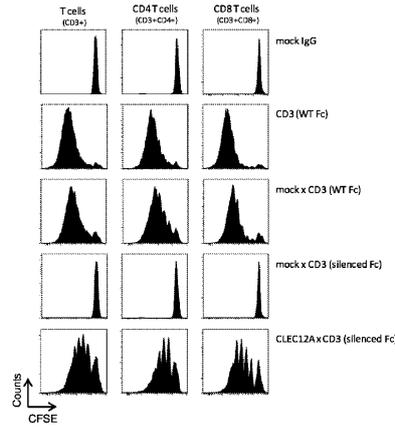
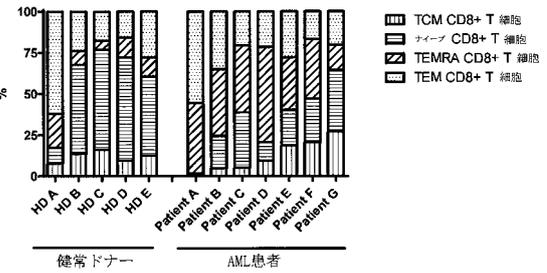
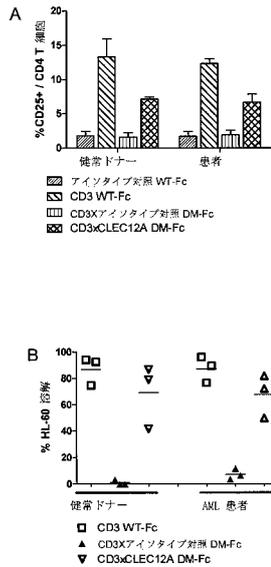


FIG. 8

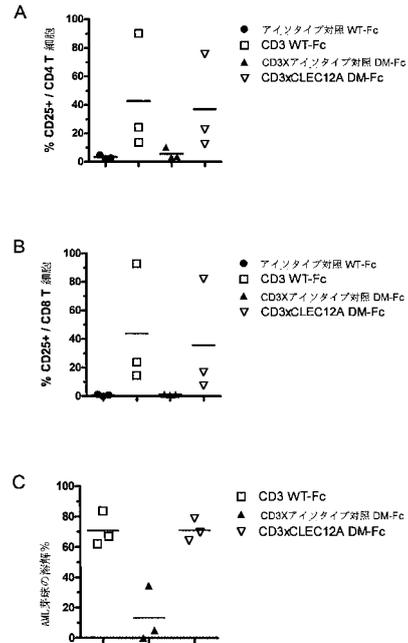
【 図 9 】



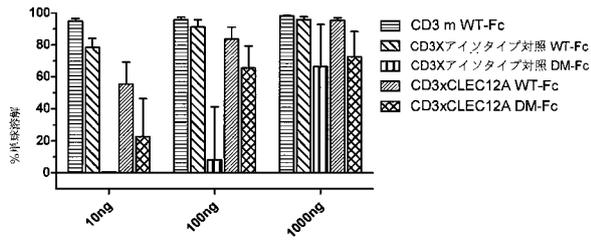
【 図 10 】



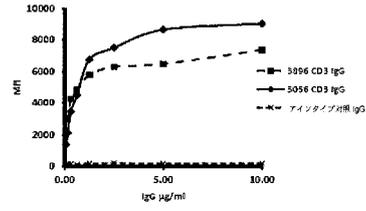
【 図 11 】



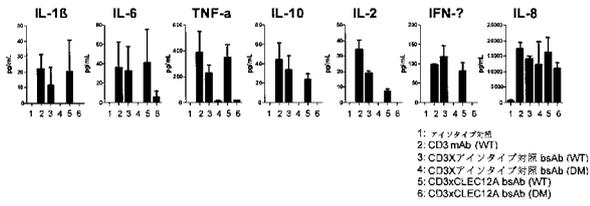
【 図 1 2 】



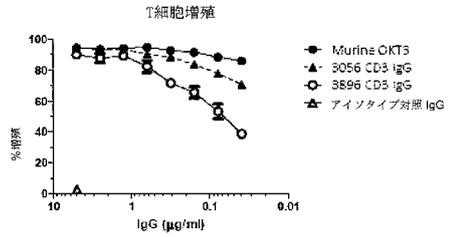
【 図 1 4 A 】



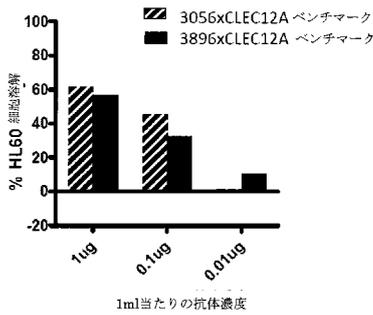
【 図 1 3 】



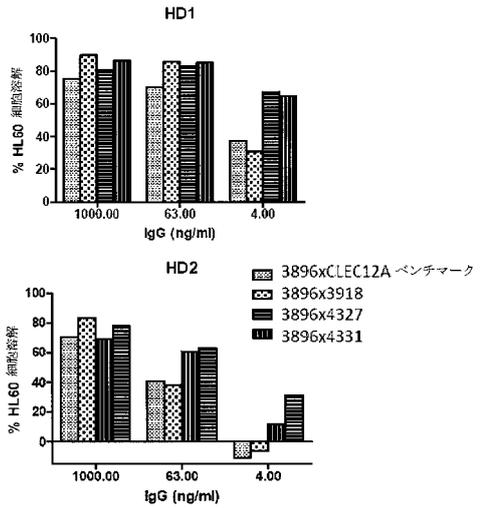
【 図 1 4 B 】



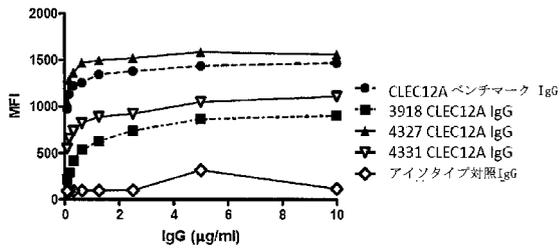
【 図 1 5 】



【 図 1 7 】

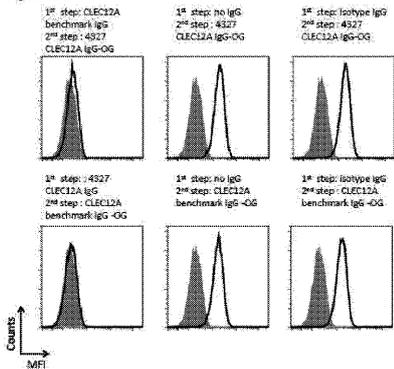


【 図 1 6 】

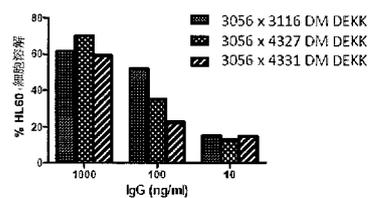


【 18 】

Figure 18



【 19 】



CLEC12A BENCHMARK (3116)

VH:

```

caggTgcagctgcaggaatctggaccggactggtcaagccagcagagacactgacctgctgg
tgtccggcgagcatcagcagcagcaatgggtggtctgggtccagaccgccctggcaaggcctgga
atggatcggcagatctaccacagcggcagccagcactacaaccagcagctgaagtcagagatgacccatc
agcgtggacaagagccagcagccagctcagcctgaagctgagcagcgtgacagccgcagataccgcctgtc
actactggccaaagtgtccaccggcgctctttccgactactggggccagggcaccctggtcacgctctc
cagt

```

```

VQLVQSGPGLVKPSETLSLTCVVSQGSISSESNVSWVWVQPPCKGLEWITGTYHSGSPDYNPNSLKRVTI
SVKSRNDFSLRLSRSDTAVYICARQGYEADAFDYNWQQTLLTVSS

```

VL:

O12

3918

VH:

```

caggTgcagctggtgcagctctgggctgaggtgaaagaccctggggcctcagtgaaagttctcctgcaagg
ctctcggatacaccctccagcgtactactacagcctaggtggcagaccgccctggcaaggcctgagtg
gatgggatggatcaaccctagtggtggtagcacaagctaccgacagaagttccaggcagggtccagatg
accagggacagctccatcagcagcagctacatggaactgagcagcctgagatctgacgacagcccgctg
atcactgtgcaagagatggttacttcgctgagcctctgattattggggccaaggtaccctggtcacgctc
ctccagt

```

```

VQLVQSGAEVRRKPGASVKVSKASQYTFYGMHWVRAQAPGQGLEWMCINPDSGGITNYAQRFCQRRVIM
TRDTSISYVMELSSLRSDTAVYICARQGYEADAFDYNWQQTLLTVSS

```

VL:

O12

4327

VH:

```

caggTgcagctggtgcagctctgggctgaggtgaaagaccctggggcctcagtgaaagttctcctgcaagg
catcggatacaccctccagcgtactactacagcctaggtggcagaccgccctggcaaggcctgagtg
gatgggaataatcaaccctagtggtggtagcacaagctaccgacagaagttccaggcagagatcaccatg
accagggacagctccagcagcagctctacatggaactgacagcctgagatctgagggacaagcccgctg
atcactgtgcaagggcactactggtgatggttgactactggggccaaggtaccctggtcacgctctc
cagt

```

```

VQLVQSGAEVRRKPGASVKVSKASQYTFYGMHWVRAQAPGQGLEWMCINPDSGGITNYAQRFCQRRVIM
TRDTSISYVMELSSLRSDTAVYICARQGYEADAFDYNWQQTLLTVSS

```

【 20 】

Figure 20

3056

VH (VD):

```

caggTgcagctggtgcagctctggggcgaggtggtgcagccggcagaaagcctgagactgagctgagctgg
ccagcggctcaccctccagcagctaccgcatcactgggtccgccagaccctggcaaggcctggaatg
ggtggcggcactctggtagcaagccggcagcagggactaccgcaagcagctgaaaggccggtccaccatc
agccgggacaacagcagcagaaaccctgtaccctgcagatgaaacagcctcggccgaggaacccgcgtg
actactgtaccggggcagccagctacaattggttcgacccttggggccaagggcaccctggtcacgctctc
cagt

```

```

VQLVQSGGGVVQPSRLRLSCVASGTFSSYGMHWVRAQAPGKLEWVAIIVYNGRQDYADSVKGRFTI
SRDSKNILYLQMSLRAEDTAVYICRGTGYNMFDEWQQTLLTVSS

```

VL/O12 (VI):

```

Gcactccagatgaccagctctccatctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttccgggca
agtcagcggcactagcagctactcaattggatccagcagaaaccagggaaagccctcagctcctgactctgct
gcatccagttgcaaatggggtcccatcaaggtccagtggaagtgatctgggacagatccactcaccatc
agcagctcgaaccctgagatcttgcactactactctcaacagagttacagtcaccctccaagcttcggcca
gggaccaaggtggagatcaaac

```

```

DIQMTQSPFSSLSASVGRVITLCRAAQGISSTYIMHWYQKPKAPKLLIYASSTLQSCVFSRFRSGSGSCID
FILTISSLQPEDFATYYCQGYSTFPFFGGGTRKVEIK

```

3896

VH:

```

caggTgcagctggtggaactctggggcgaggtggtgcagccggcagaaagcctgagactgagctgagctgg
ccagcggctcaccctccagcagctaccgcatcactgggtccgccagaccctggcaaggcctggaatg
ggtggcactcactctggtagcagccagcagaaagactaccgcaagcagctgaaaggccggtccaccatc
agccgggacaacagcagcagaaaccctgtaccctgcagatgaaacagcctcggccgaggaacccgcgtg
actactgtaccggggcagccagctacaattggttcgacccttggggccaagggcaccctggtcacgctctc
cagt

```

```

VQLVQSGGGVVQPSRLRLSCAASGTFRBYGMHWVRAQAPGKLEWVAIIVYSGKKNYADSVKGRFTI
SRDSKNILYLQMSLRAEDTAVYICARQGYNMFDEWQQTLLTVSS

```

VL:

O12

VL:

O12

4331

VH:

```

gaggtccagctggtgcagctctgggctgaggtgaaagaccctggggcctcagtgaaagttctcctgcaagg
catcggatacaccctccagcgtactactatgcaactgggtggcagaccctggcaaggcctgagtg
gatgggaataatcaaccctagtggtggtagcacaagctaccgcaagcagttccaggcagagatcaccatg
accagggacaacagcagcagaaaccctgtaccctgcagatgaaacagcctcggccgaggaacccgcgtg
atcactgtgcaagggcgaatctggtgatgattgactactggggccaaggtaccctggtcacgctctc
cagt

```

```

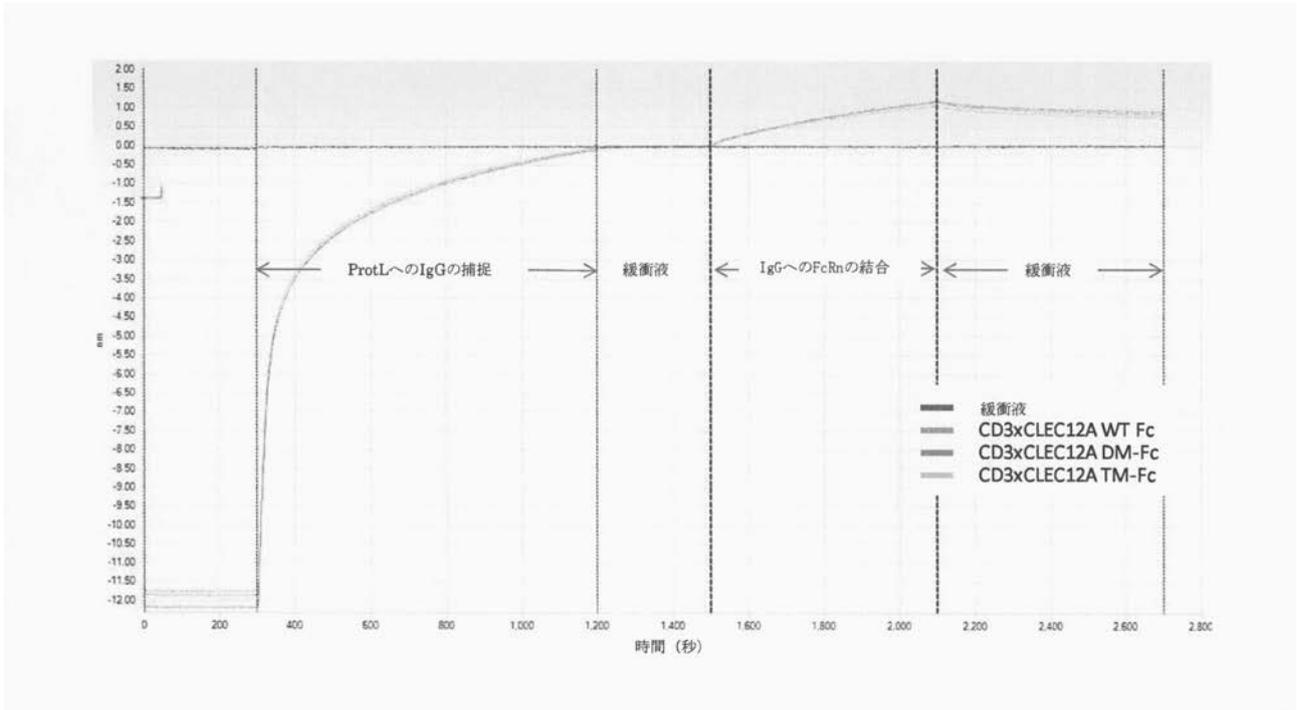
EVQLVQSGAEVRRKPGASVKVSKASQYTFYGMHWVRAQAPGQGLEWMCINPDSGGITNYAQRFCQRRVIM
TRDTSISYVMELSSLRSDTAVYICARQGYEADAFDYNWQQTLLTVSS

```

VL:

O12

【 図 7 】



【 配列表 】

201553227800001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/NL2013/050693 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 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 A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, 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 | BAEUERLE PATRICK A ET AL: "Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy", CANCER RESEARCH, AACR, US PHILADELPHIA, PA, vol. 69, no. 12, 15 June 2009 (2009-06-15), pages 4941-4944, XP002665118, ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0547 [retrieved on 2009-06-09] page 4941 - right-hand column ----- -/-- | 1-27 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 7 January 2014 | | 16/01/2014 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Wagner, René |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2013/050693

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | X. ZHAO ET AL: "Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia", HAEMATOLOGICA, vol. 95, no. 1, 31 July 2009 (2009-07-31), pages 71-78, XP055094666, ISSN: 0390-6078, DOI: 10.3324/haematol.2009.009811 page 74 - left-hand column table 1 | 1-27 |
| Y | WO 2004/009618 A2 (CRUCCELL HOLLAND BV [NL]; VAN BERKEL PATRICK HENDRIKUS C [NL]; BRUS RON) 29 January 2004 (2004-01-29) claims 1-4 | 5,6 |
| Y | WO 2005/118635 A2 (NOVIMMUNE SA [CH]; MACH BERNARD [CH]; DEAN YANN [FR]; KOSCO-VILBOIS MA) 15 December 2005 (2005-12-15) figures 4a, 4b | 14,15 |
| X | WO 2009/051974 A1 (NUVELO INC [US]; ABO ARIE [US]; KORVER WOUTER [US]) 23 April 2009 (2009-04-23) example 6 | 1-27 |
| Y | WO 2011/028952 A1 (XENCOR INC [US]; LAZAR GREGORY A; MOORE GREGORY L) 10 March 2011 (2011-03-10) paragraph [0149] paragraph [0134] | 18-20, 22-24 |
| X,P | N.N.: "Press Release Merus Presents Preclinical Data on its Novel Bispecific Antibody MCLA---117 at EHA 2013 --- Clinical Candidate Designed for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML) ---", 17 June 2013 (2013-06-17), XP055094670, Retrieved from the Internet: URL: http://www.merus.nl/uploads/docs/Merus_PR_EHA_17_June_2013_final_clean.pdf [retrieved on 2014-01-02] the whole document | 1-27 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/NL2013/050693

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X,P | <p>N.N.: "Merus Press release", Merus B.V.</p> <p>7 January 2013 (2013-01-07), XP055094673, DOI: 10.1093/annonc/mdq179 Retrieved from the Internet: URL:http://www.merus.nl/uploads/images/archive/20130107_Merus_PR_first_candidate_FINAL.pdf [retrieved on 2014-01-02] the whole document</p> <p>-----</p> | 1-27 |
| A | <p>ANNA VAN RHENEN ET AL: "The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 7, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 2659-2666, XP002632479, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2007-03-083048 [retrieved on 2007-07-03] the whole document</p> <p>-----</p> | 1-27 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/NL2013/050693

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| WO 2004009618 | A2 | 29-01-2004 | AT 514717 T 15-07-2011 |
| | | | AU 2003250074 A1 09-02-2004 |
| | | | AU 2010249150 A1 23-12-2010 |
| | | | CA 2492377 A1 29-01-2004 |
| | | | CN 1668636 A 14-09-2005 |
| | | | CN 101537180 A 23-09-2009 |
| | | | DK 1523496 T3 17-10-2011 |
| | | | EP 1523496 A2 20-04-2005 |
| | | | EP 2314629 A1 27-04-2011 |
| | | | ES 2368733 T3 21-11-2011 |
| | | | HK 1070902 A1 07-10-2011 |
| | | | JP 4836451 B2 14-12-2011 |
| | | | JP 2006515503 A 01-06-2006 |
| | | | JP 2011177193 A 15-09-2011 |
| | | | NZ 537277 A 30-04-2008 |
| | | | PT 1523496 E 29-09-2011 |
| | | | SI 1523496 T1 30-11-2011 |
| | | | US 2005170398 A1 04-08-2005 |
| | | | US 2007054362 A1 08-03-2007 |
| | | | US 2007077624 A1 05-04-2007 |
| | | | US 2009263864 A1 22-10-2009 |
| | | | US 2011177073 A1 21-07-2011 |
| | | | US 2013243773 A1 19-09-2013 |
| WO 2004009618 A2 29-01-2004 | | | |
| WO 2005118635 | A2 | 15-12-2005 | AU 2005250499 A1 15-12-2005 |
| | | | BR PI0511782 A 15-01-2008 |
| | | | CA 2569509 A1 15-12-2005 |
| | | | EA 200602276 A1 29-06-2007 |
| | | | EP 1753783 A2 21-02-2007 |
| | | | JP 5139800 B2 06-02-2013 |
| | | | JP 2008503449 A 07-02-2008 |
| | | | JP 2012211154 A 01-11-2012 |
| | | | KR 20070038495 A 10-04-2007 |
| | | | SG 155883 A1 29-10-2009 |
| | | | SG 188175 A1 28-03-2013 |
| | | | US 2006177896 A1 10-08-2006 |
| | | | US 2010183554 A1 22-07-2010 |
| | | | WO 2005118635 A2 15-12-2005 |
| | | | WO 2009051974 |
| US 2010285037 A1 11-11-2010 | | | |
| WO 2009051974 A1 23-04-2009 | | | |
| WO 2011028952 | A1 | 10-03-2011 | US 2011054151 A1 03-03-2011 |
| | | | WO 2011028952 A1 10-03-2011 |

フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 35/02

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

(72) 発明者 アレクサンダー・ベルトホルト・ヘンドリック・バッカー
オランダ・3584・セーハー・ユトレヒト・パドゥアラーン・8・(ポストファーク・133)
内

(72) 発明者 ピーテル・フォッコ・ヴァン・ロー
オランダ・3584・セーハー・ユトレヒト・パドゥアラーン・8・(ポストファーク・133)
内

(72) 発明者 トン・ログテンベルク
オランダ・3584・セーハー・ユトレヒト・パドゥアラーン・8・(ポストファーク・133)
内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 DA05 DA06 EA04 GA11 HA08
4B064 AG26 CA02 CA12 CA19 CC24 DA01
4C085 AA13 AA14 BB31 DD62 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA09 CA40 DA75 EA20 FA74