

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7071329号

(P7071329)

(45)発行日 令和4年5月18日(2022.5.18)

(24)登録日 令和4年5月10日(2022.5.10)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 15 (全93頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-502257(P2019-502257)

(86)(22)出願日 平成29年7月17日(2017.7.17)

(65)公表番号 特表2019-531701(P2019-531701  
A)

(43)公表日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/068020

(87)国際公開番号 WO2018/015340

(87)国際公開日 平成30年1月25日(2018.1.25)

審査請求日 令和2年7月10日(2020.7.10)

(31)優先権主張番号 16305923.1

(32)優先日 平成28年7月18日(2016.7.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 504456798

サノフィ

S A N O F I

フランス国、エフ 7 5 0 0 8 ・パリ、  
リュ・ラ・ボエティ・5 45 4 rue La Bo e t i e ,  
F - 7 5 0 0 8 P a r i s , F r a n  
c e

(74)代理人 100127926

弁理士 結田 純次

(74)代理人 100140132

弁理士 竹林 則幸

(72)発明者 ヤーナ・アルブレヒト

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフ  
ルト・アム・マイン・サノフィ・アベン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 3 および C D 1 2 3 に特異的に結合する二重特異性抗体様結合タンパク質

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

2つの抗原結合部位を形成する2つのポリペプチド鎖を含む、ヒトC D 3 およびヒトC D 1 2 3 に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、1つのポリペプチド鎖は、式[ I V ]:

$$V_{D1} - L_1 - V_{D2} - L_2 - C_L - L_5 - F_{c2} [I V]$$

によって表される構造を有し、1つのポリペプチド鎖は、式[ I I I ]:

$$V_{D3} - L_3 - V_{D4} - L_4 - C_{H1} - F_c [I I I]$$

によって表される構造を有し、ここで:

a) 式[ I V ]の前記ポリペプチドは:

( i )

配列番号 5 4 の配列の  $V_{D1}$ 、

配列番号 5 6 の配列の  $L_1$ 、

配列番号 1 0 の配列の  $V_{D2}$ 、

配列番号 5 6 の配列の  $L_2$ 、

配列番号 1 8 の配列の  $C_L$ 、

0個のアミノ酸からなる  $L_5$ 、および

配列番号 7 0 の配列からなる  $F_{c2}$

を含み、

ここで  $X_1$  は Y であり、 $X_2$  は S であり、 $X_3$  は T であり、 $X_4$  は L であり、 $X_5$  は Y であり

、 $X_6$ はHであり、 $X_7$ はYであるか、もしくは  
 ここで $X_1$ はYであり、 $X_2$ はCであり、 $X_3$ はWであり、 $X_4$ はLであり、 $X_5$ はYであり  
 、 $X_6$ はHであり、 $X_7$ はYであるか、もしくは  
 ここで $X_1$ はYであり、 $X_2$ はCであり、 $X_3$ はWであり、 $X_4$ はLであり、 $X_5$ はYであり  
 、 $X_6$ はRであり、 $X_7$ はFである、配列番号71のアミノ酸配列、

または

( i i )

配列番号54の配列のVD1の配列番号48、「WAS」および配列番号49の配列の3つのCDRが不変であり、

配列番号10の配列のVD2の配列番号11、「KVS」および配列番号8の配列の3つのCDRが不変であり、

配列番号71におけるアミノ酸 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ および $X_7$ は上記のa)

( i )で定義された通りである、配列番号71に少なくとも90%同一な配列からなり；

b)式[ III ]の前記ポリペプチドは：

( i )

配列番号9の配列のVD3、

0個のアミノ酸からなるL3、

配列番号52の配列のVD4、

0個のアミノ酸からなるL4、

配列番号19の配列のCH1、および

配列番号68の配列からなるFc、

を含み、ここで $X_1$ はYもしくはCであり、 $X_2$ はSもしくはCであり、 $X_3$ はT、SもしくはWであり、 $X_4$ はAもしくはLであり、 $X_5$ はVもしくはYであり、 $X_6$ はHもしくはRであり、 $X_7$ はYもしくはFである、配列番号67のアミノ酸配列、

または

( i i )

配列番号52の配列のVD4の配列番号50、配列番号53、および配列番号51の配列の3つのCDRが不変であり、

配列番号9の配列のVD3の配列番号5、配列番号6、配列番号7の配列の3つのCDRが不変であり、

配列番号67のアミノ酸 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ および $X_7$ は上記のb)( i )

で定義された通りである、配列番号67に少なくとも90%同一な配列

からなり、ここで式[ IV ]のポリペプチドおよび式[ III ]のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖 - 重鎖対を形成する、前記抗体様結合タンパク質。

【請求項2】

式[ III ]のポリペプチドが、配列番号68の配列のFcを含み、ここで

$X_1$ はYであり、 $X_2$ はSであり、 $X_3$ はTであり、 $X_4$ はLであり、 $X_5$ はYであるか、または

$X_1$ はCであり、 $X_2$ はSであり、 $X_3$ はSであり、 $X_4$ はAであり、 $X_5$ はVであり、

$X_6$ はHであり、 $X_7$ はYであるか、または

$X_6$ はRであり、 $X_7$ はFである、請求項1に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項3】

a)式[ IV ]のポリペプチドが、配列番号81または配列番号81に少なくとも90%同一な配列のFcドメイン(Fc2)を含み、

式[ III ]のポリペプチドが、配列番号60または配列番号60に少なくとも90%同一な配列のFcドメインを含むか、または

b)式[ IV ]のポリペプチドが、配列番号73または配列番号73に少なくとも90%同一な配列のFcドメイン(Fc2)を含み、

式[ III ]のポリペプチドが、配列番号75または配列番号75に少なくとも90%同一な配列のFcドメインを含むか、または

c) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 77 または配列番号 77 に少なくとも 90% 同一な配列の F<sub>c</sub>ドメイン ( F<sub>c2</sub> ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 75 または配列番号 75 に少なくとも 90% 同一な配列の F<sub>c</sub>ドメインを含むか、または

d) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 77 または配列番号 77 に少なくとも 90% 同一な配列の F<sub>c</sub>ドメイン ( F<sub>c2</sub> ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 79 または配列番号 79 に少なくとも 90% 同一な配列の F<sub>c</sub>ドメインを含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項 4】

a) 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 80 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 54 の配列の V<sub>D1</sub> の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D2</sub> の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 80 のアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 80 に少なくとも 90% 同一な配列からなり；

式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 59 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 52 の配列の V<sub>D4</sub> の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D3</sub> の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 59 のアミノ酸位置 473、492、531、559、560、478、490 が不変である、配列番号 59 に少なくとも 90% 同一な配列からなり；または

b) 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 72 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 54 の配列の V<sub>D1</sub> の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D2</sub> の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 72 のアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 72 に少なくとも 90% 同一な配列からなり；

式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 74 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 52 の配列の V<sub>D4</sub> の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D3</sub> の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 74 のアミノ酸位置 473、492、531、559、560、478、490 が不変である、配列番号 74 に少なくとも 90% 同一な配列からなり；または

c) 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 76 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 54 の配列の V<sub>D1</sub> の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D2</sub> の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 76 におけるアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 76 に少なくとも 90% 同一な配列からなり；

式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 74 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 52 の配列の V<sub>D4</sub> の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D3</sub> の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 74 のアミノ酸位置 473、492、531、559、560、478、490 が不変である、配列番号 74 に少なくとも 90% 同一な配列からなり；または

d) 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 76 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 54 の配列の V<sub>D1</sub> の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D2</sub> の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 76 におけるアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 76 に少なくとも 90%

10

20

30

40

50

0 % 同一な配列からなり；

式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 7 8 のアミノ酸配列、もしくは配列番号 5 2 の配列の V<sub>D</sub>4 の配列番号 5 0、配列番号 5 3、および配列番号 5 1 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub>3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 7 8 のアミノ酸位置 4 7 3、4 9 2、5 3 1、5 5 9、5 6 0、4 7 8、4 9 0 が不変である、配列番号 7 8 に少なくとも 9 0 % 同一な配列からなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項 5】

a.) 配列番号 8 0 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド；および配列番号 5 9 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、

10

b.) 配列番号 7 2 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド、および配列番号 7 4 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、

c.) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド；および配列番号 7 4 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、または

d.) 配列番号 7 6 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド；および配列番号 7 8 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド

を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項 6】

2 つの抗原結合部位を形成する 3 つのポリペプチド鎖を含む、ヒト C D 3 およびヒト C D 1 2 3 に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、

20

第 1 のポリペプチドは、式 [ I ]：

V<sub>D</sub>1 - L<sub>1</sub> - V<sub>D</sub>2 - L<sub>2</sub> - C<sub>L</sub> [ I ]

によって表される構造を有し、

第 2 のポリペプチド鎖は、式 [ I I I ]：

V<sub>D</sub>3 - L<sub>3</sub> - V<sub>D</sub>4 - L<sub>4</sub> - C<sub>H</sub>1 - F<sub>C</sub> [ I I I ]；

によって表される構造を有し、

第 3 のポリペプチド F<sub>C</sub>3 は、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリンの C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3 免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；

ここで、

c.) 式 [ I ] の前記ポリペプチドは：

30

( i i i )

配列番号 5 4 の配列の V<sub>D</sub>1、

配列番号 5 6 の配列の L<sub>1</sub>、

配列番号 1 0 の配列の V<sub>D</sub>2、

配列番号 5 6 の配列の L<sub>2</sub>、

配列番号 1 8 の配列の C<sub>L</sub>

を含む配列番号 5 5 のアミノ酸配列、

または

( i v )

配列番号 5 4 の配列の V<sub>D</sub>1 の配列番号 4 8、「W A S」および配列番号 4 9 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

40

配列番号 1 0 の配列の V<sub>D</sub>2 の配列番号 1 1、「K V S」および配列番号 8 の配列の 3 つの C D R が不変である、配列番号 5 5 に少なくとも 9 0 % 同一な配列

からなり；

d.) 式 [ I I I ] の前記ポリペプチドが：

( i i i )

配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub>3、

0 個のアミノ酸からなる L<sub>3</sub>、

配列番号 5 2 の配列の V<sub>D</sub>4、

0 個のアミノ酸からなる L<sub>4</sub>、

50

配列番号 19 の配列の C H 1、および

配列番号 68 の配列の F<sub>c</sub>

を含み、ここで X<sub>1</sub>は Y であり、X<sub>2</sub>は C であり、X<sub>3</sub>は W であり、X<sub>4</sub>は L であり、X<sub>5</sub>は Y であり、X<sub>6</sub>は H であり、X<sub>7</sub>は Y であるか、もしくは X<sub>6</sub>は R であり、X<sub>7</sub>は F である、配列番号 67 のアミノ酸配列、

または

( i v )

配列番号 52 の配列の V<sub>D4</sub>の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

配列番号 9 の配列の V<sub>D3</sub>の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

アミノ酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>および X<sub>7</sub>は上記の b ) ( i ) で定義された通りである、配列番号 67 に少なくとも 90 % 同一な配列からなり、

ここで：

- 式 [ I ] のポリペプチドおよび式 [ I I I ] のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖-重鎖対を形成し、

- 式 [ I I I ] のポリペプチドは、その F<sub>c</sub>ドメインを介して第 3 のポリペプチドとヘテロ二量体化しており、

- 前記第 3 のポリペプチド F<sub>c3</sub>は、配列番号 69 または配列番号 69 に少なくとも 90 % 同一な配列からなり、ここで配列番号 69 のアミノ酸位置 129、146、148、187、215、216 が不変である、前記抗体様結合タンパク質。

【請求項 7】

- 配列番号 55 からなる式 [ I ] の 1 つのポリペプチド、
- 配列番号 65 からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、および
- 配列番号 69 からなる F<sub>c3</sub>

を含む、請求項 6 に記載の抗体様結合タンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体様結合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 9】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体様結合タンパク質または請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

がんの処置に使用するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体様結合タンパク質または請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

がんが、血液がんである、請求項 9 に記載の使用のための抗体様結合タンパク質または医薬組成物。

【請求項 12】

疾患または障害の処置または予防に使用するための請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体様結合タンパク質または請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体様結合タンパク質をコードする配列を含む単離された核酸。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の核酸によって形質転換された宿主細胞。

【請求項 15】

a) 請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の少なくとも 1 つの抗体様結合タンパク質、

b) 場合により、包装材料、および

c) 場合により、前記抗体様結合タンパク質はがんを処置するのに、またはがんの処置に

10

20

30

40

50

使用するのに有効であることを示す、前記包装材料内に含有されるラベルまたは添付文書を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD3およびCD123に特異的に結合する抗体様結合タンパク質に関する。本発明はまた、前記抗体様結合タンパク質を含む医薬組成物、ならびにがんを処置するための前記医薬組成物および抗体様結合タンパク質の使用にも関する。本発明はさらに、前記抗体様結合タンパク質をコードする配列を含む、単離された核酸、ベクターおよび宿主細胞に関する。

10

【背景技術】

【0002】

二重特異性抗体の第1世代は、20年以上前に開発された。それ以来、いくつかの臨床研究によって、がん細胞表面抗原を標的化するように操作された二重特異性抗体が試験されてきた。この抗がん融合タンパク質のグループは、抗がん活性を達成するために、標的化されたがん細胞の近接に免疫学的なエフェクター細胞を局在化する2つまたはそれより多くの機能性ドメインを含有する。

【0003】

二重特異性抗体技術が開発されたことから、一方の一本鎖可変領域(scFv)は標的化細胞と結合し他方はT細胞表面上のCD3と結合する2つの抗体のscFvのみを(Fcアミノ酸セグメントは包含させずに)フレキシブルリンカーで接続することによって、二重特異性T細胞エンゲージャー(bispecific T-cell engager)(BiTE)と命名された融合タンパク質の様々なグループが生成された。BiTEの1つであるブリナツモマブは、CD19×CD3二重特異性結合活性を有し、B細胞系統急性リンパ芽球性白血病において微小残存病変を有する患者のフェーズII臨床試験において有望な結果を示した。

20

【0004】

CD123(インターロイキン-3受容体アルファ鎖IL-3R)は、様々な血液学的腫瘍で過剰発現される腫瘍抗原である。AML芽球の大部分が表面CD123を発現し、この発現はAMLのサブタイプで異なっていない。診断時においてAMLにおけるCD123発現が多いほど、より不良な予後に関連することが報告されている。CD123は白血病幹細胞(LSC)で発現されることが報告されている。AMLが、DNA損傷性の化学療法に静止状態であり比較的耐性を有することが示されているこれらの白血病幹細胞(LSC)に起因することを示唆する証拠が増えつつある。したがって、造血幹細胞(HSC)と比較してLSCでCD123の発現が増加することは、AML-LSCを治療的に標的化するための機会を提供する。

30

【0005】

モノクローナル抗体(MAb)7G3は、CD123に対して発現したものであるが、これまでに、白血病細胞株および初代細胞の両方のIL-3が媒介する増殖および活性化を阻害することが示されている(特許文献1)。しかしながら、CD123の標的化がAML-LSCを機能的に損なうことができるかどうかは未だ明らかになっていない。

40

【0006】

本発明者らにより本明細書で示されるように、CD123×CD3抗体様結合タンパク質の使用は、腫瘍細胞を致死させる。

【0007】

CD123×CD3二重特異性結合活性を有する二重特異性抗体様結合タンパク質を産生するという概念はすでに提唱されており、特許文献2に記載されている。

【0008】

さらに、2014年に、MacroGenics製のCD123×CD3二重親和性再標的化(DART; Dual Affinity Re-Targeting)二重特異性抗

50

体ベースの分子がフェーズⅠ臨床試験に入った。

【 0 0 0 9 】

しかしながら、本発明者らによって示された通り、MacroGenics製のCD123×CD3二重親和性再標的化(DART)二重特異性抗体ベースの分子は、例えば、標的細胞の非存在下で、CD4+発現T細胞の82%およびCD8+発現T細胞の83%の活性化を示す。T細胞の不適切な活性化は、サイトカイン放出症候群などの重度の副作用を引き起こす可能性がある。サイトカイン放出症候群は、重度の感染で見出されるものに類似した、ある種の全身性の炎症性応答を生じる、活性化されたT細胞によるサイトカインの放出を指し、低血圧、発熱および悪寒を特徴とする。例えば抗CD3抗体のOKT3に関して、サイトカイン放出症候群に起因する死亡が報告されている。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 0 】

【文献】米国特許第6,177,078号

WO2013/173820号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質は、本特許出願の優先権の出願日の時点で未公開の特許出願PCT/EP2016/051386号に記載されている(欧州特許条約第54(3)条)。したがって、これらの二重特異性抗体技術における前進にもかかわらず、追加のがん治療薬、特に、直接的または間接的のいずれかでがん細胞を効率的に標的化し致死させるがん治療薬が未だ求められている。さらに、所望の生物活性、優れた代謝、薬物動態学および安全性プロファイルを有し、さらに産業的实施に見合った大きい規模での製造も可能な新しい抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質を開発する必要がある。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

したがって、本発明の状況下で、本発明者らは、RF突然変異およびノブ-イントゥー-ホール突然変異などの突然変異を含有する抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質の数々のバリエーションを開発し、それによって発現中の前記抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質の凝集を低減することに成功した。凝集体の量を低減することによって、発現および精製中における抗体様結合タンパク質のヘテロ二量体の量の増加を達成でき、したがって精製された抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質の収量を増加させることができる。

30

【 0 0 1 3 】

したがって本発明は、発現および/または精製中の凝集の低減をもたらす突然変異を含む抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質に言及する。前記抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質は、CD123を発現する標的細胞、例えばTHP-1細胞の非存在下で低いT細胞活性化能力を有するが、CD123を発現する標的細胞、例えばTHP-1細胞の存在下で高いT細胞活性化能力を有する。

40

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

抗CD3抗体

「CD3」は、T細胞上で多分子のT細胞受容体複合体の一部として発現され、少なくとも3つの異なる鎖CD3、CD3およびCD3からなる抗原を意味する。CD3およびCD3は、ヒトCD3に低い配列同一性および/または類似性を有する(類似性および同一性は20%未満である)。CD3およびCDR3は、一緒になって、複合体、いわゆる「CD3 / -複合体」を形成することができる。CD3はまた、CDR3との複合体、いわゆる「CD3 / -複合体」も形成する。例えば固定された

50

抗CD3 - 抗体によるT細胞上でのCD3のクラスタリングは、T細胞受容体の係合に類似した、ただしそのクローンに典型的な特異性から独立したT細胞活性化を引き起こす。「CD3」は、3つのドメイン、すなわち細胞内ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインを含む。

#### 【0015】

ほとんどの従来技術の抗CD3抗体は、CD3鎖を認識する。このような従来技術の抗CD3抗体の1つは、OKT3である。従来技術は、例えば抗体分子OKT3を採用することによる、抗体分子を採用するT細胞活性化事象を例示している。抗CD3抗体およびそのバリエーションは、従来技術(US 4,361,549; US 4,361,549; US 5,885,573; US 5,929,212; およびWO 98/52975またはUS 5,955,358)に記載されている。OKT3はさらに、同種移植片拒絶反応を処置するための臨床移植において有力な免疫抑制剤として使用されてきた(Thistlethwaite 1984、Transplantation 38、695~701; Woodle 1991、Transplantation 51、1207~1212; Choi 2001、Eur. J. Immunol. 31(1)、94~106)。

10

#### 【0016】

この療法の主な欠点は、T細胞とFcRを有する細胞との間の架橋およびヒト抗マウス抗体(HAMA)応答に起因するサイトカイン放出で証明されたT細胞活性化である。これらの副作用を低減するために、US 5,929,212; US 5,885,573などの数々の公報で、例えばOKT3のヒト化などの変更が記載されている。一方で、OKT3または他の抗CD3抗体は、T細胞の活性化および増殖を刺激するために免疫強化剤として使用することができる(US 6,406,696、Bluestone; US 6,143,297、Bluestone; US 6,113,901、Bluestone; Yannelly 1990、J. Immunol. Meth. 1、91~100)。また抗CD3抗体は、T細胞増殖を誘導するための抗CD28抗体と組み合わせて使用される薬剤としても記載されている(US 6,352,694)。OKT3はさらに、それ自体で、または二重特異性抗体の構成要素として、細胞傷害性T細胞を腫瘍細胞またはウイルス感染細胞に標的化するために使用されてきた(Nitta 1990、Lancet 335、368~376; Sanna、1995、Bio/Technology 13、1221~1224; WO 99/54440)。

20

30

#### 【0017】

これまでのT細胞を動員するための薬剤として抗体を使用するアプローチは、数々の発見によって妨げられてきた。第一に、T細胞に高い結合親和性を有する天然または操作された抗体は、それらが結合するT細胞を活性化しないことが多い。第二に、T細胞に低い結合親和性を有する天然または操作された抗体はまた、T細胞媒介細胞溶解を開始させるそれらの能力に関して非効果的であることが多い。

#### 【0018】

シグナルペプチドを含む全長ヒトCD3タンパク質の参照配列は、Uniprotデータベースから受託番号P07766(2014年12月12日に利用可能)で入手可能であり、本明細書では配列番号1に包含される。

40

#### 【0019】

シグナルペプチドを含む全長カニクイザル(Macaca fascicularis)CD3タンパク質の参照配列は、Uniprotデータベースから受託番号Q95LI5で入手可能であり(2014年12月12日に利用可能)、本明細書では配列番号2に包含される。

#### 【0020】

本発明者らによってゲノムDNAからクローニングされた成熟ヒトCD3 Hisタグ付きFc融合タンパク質の配列は、配列番号3で開示される。前記成熟ヒトCD3 Hisタグ付きFc融合タンパク質は、全長ヒトCD3タンパク質のアミノ酸23から126を含み、したがってヒトCD3の細胞外ドメインを含む。

50



## 【 0 0 2 1 】

本発明者らによってゲノムDNAからクローニングされた成熟カニクイザルCD3 Fc融合タンパク質の配列は、配列番号4で開示される。前記成熟カニクイザルCD3 Fc融合タンパク質は、全長カニクイザルCD3 タンパク質のアミノ酸23から117を含み、したがって、野生型配列のアミノ酸位置57と比較してアミノ酸位置35に1つのアラニンからバリンへの交換を含有する、ヒトまたはカニクイザルCD3 の細胞外ドメインを含む。

## 【 0 0 2 2 】

ヒトおよびカニクイザルCD3 のドメイン構成は、以下に示す通りである(Uniprot P07766配列(ヒト)およびUniprot Q95LI5配列(カニクイザル)に基づく)：

## 【表1】

CD3ε ドメイン	配列番号1における位置 (ヒト)	配列番号2における位置 (カニクイザル)
細胞外	23 - 126	22 - 117
膜貫通ドメイン	127 - 152	118 - 138
細胞質内	153 - 207	139 - 198

## 【 0 0 2 3 】

したがって、ヒトCD3 の細胞外ドメインは、配列番号1の位置23～126におけるアミノ酸からなり、カニクイザルCD3 の細胞外ドメインは、配列番号2の位置22～117におけるアミノ酸からなる。

## 【 0 0 2 4 】

ヒト化抗CD3抗体「hz20G6」は、その重鎖および軽鎖可変ドメインの配列が「hz20G6×hz7G3」抗体様結合タンパク質の場面で使用されており、

- 配列番号5の配列のCDR1-H、配列番号6の配列のCDR2-H、および配列番号7の配列のCDR3-Hを含む、配列

## 【化1】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAAS**GFTFTK**AWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKD  
**KSNSYATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYW**  
 GQGTLVTVSS

(配列番号9、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、および

- 配列番号11の配列のCDR1-H、配列「KVS」のCDR2-H、および配列番号8の配列のCDR3-Hを含む、配列

## 【化2】

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSS**QSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKV**  
**SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**

(配列番号10、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメインを含む。

## 【 0 0 2 5 】

本発明の場面で使用されるヒト化抗CD3抗体「hz20G6」は、ヒトおよびカニクイザルCD3 タンパク質の両方に高親和性を呈示するが、標的細胞の非存在下で低いT細胞

活性化を有する。

【0026】

抗CD3抗体「hz20G6」は、特に、ヒトCD3の、またはヒトおよびカニクイザルの両方のCD3の細胞外ドメインに結合する。より具体的には、抗体は、CD3に結合する。より具体的には、抗CD3抗体は、ヒトおよびカニクイザルのCD3の細胞外ドメインに結合する。抗CD3抗体は、複合体、例えばCD3 / 複合体の形態で存在する場合、または単離された形態で発現されるかどうかに関係なく、単一のタンパク質として存在する場合、または例えばT細胞中に存在する場合のように可溶性細胞外ドメインまたは全長膜アンカー型CD3中に存在する場合、CD3に結合する。

【0027】

本発明の場面で使用される抗CD3抗体「hz20G6」は、ヒトCD3タンパク質の、またはヒトおよびカニクイザルの両方のCD3タンパク質の表面、特にCD3に特異的である。特に、本抗体は、上述のヒトおよびカニクイザルCD3および/またはCD3タンパク質の細胞外ドメインに結合しないか、またはそれらと有意に交差反応しない。

【0028】

本発明の場面で使用される抗CD3抗体「hz20G6」は、抗CD3抗体「20G6」のヒト化バージョンである。抗CD3抗体「20G6」は、どちらもBiacoreによって測定した場合、 $3.5 \times 10^4$  (1/Ms)の $k_a$ 、 $2.7 \times 10^{-4}$  (1/s)の $k_d$ を有し、結果としてヒトCD3 / 複合体に対して $7.7 \times 10^{-9}$  (M)の $K_D$ をもたらす、さらに、 $2.7 \times 10^4$  (1/Ms)の $k_a$ 、 $2.2 \times 10^{-4}$  (1/s)の $k_d$ を有し、結果としてカニクイザルCD3 / 複合体に対して $8.2 \times 10^{-9}$  (M)の $K_D$ をもたらす(データ示さず)。したがって抗CD3抗体「20G6」のヒトCD3への親和性に対するカニクイザルCD3への親和性の比率( $K_D$ (カニクイザル)/ $K_D$ (ヒト))は、1である。したがって抗CD3抗体「20G6」およびそれ由来の抗体様結合タンパク質は、サルで実行される毒物学的研究、すなわちヒトにおいて起こり得る有害作用を予測するために関連するサルで観察された毒性プロファイルで使用する事ができる。

【0029】

したがって、本発明の抗体様結合タンパク質の場面で使用される抗CD3抗体「20G6」のヒトCD3またはカニクイザルCD3、または両方への親和性( $K_D$ )は、10nMである。

【0030】

抗CD123抗体

「CD123」(表面抗原分類123)はまた、「インターロイキン3受容体、アルファ(IL3RA)」または「IL3R」、「IL3RX」、「IL3RY」、「IL3RAY」、「hIL-3Ra」としても公知であり、ヘテロ二量体サイトカイン受容体のインターロイキン3特異的サブユニットを意味する。機能的なインターロイキン3受容体は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)およびインターロイキン5(IL-5)のための受容体と共通である特異的なアルファ鎖(IL-3A; CD123)およびIL-3受容体ベータ鎖(0; CD131)を含むヘテロ二量体である。CD123は、IL-3結合に関与する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および約50個のアミノ酸の短い細胞質側尾部を含有する、約43kDaの推測の分子量を有するI型内在性膜貫通タンパク質である。細胞外ドメインは、2つの領域: その配列がGM-CSFおよびIL-5受容体アルファ鎖の等価な領域と類似性を示す約100個のアミノ酸のN末端領域; およびこのサイトカイン受容体ファミリーの他のメンバーに共通の4つの保存されたシステイン残基およびWSXWSモチーフを含有する膜貫通ドメインの近位にある領域で構成される。IL-3結合ドメインは、2つのIg様フォールディングドメインで構成された約200個のアミノ酸残基のサイトカイン受容体モチーフ(CRM)を含む。CD123の細胞外ドメインは、高度にグリコシル化されており、N-グリコシル化は、両方のリガンド結合および受容体シグナル伝達に必要である。タンパク質ファミリーは、3つの

10

20

30

40

50

メンバー：IL3RA (CD123A)、CSF2RAおよびIL5RAを集めている。全体構造は3つのメンバー間でよく保存されているが、配列相同性は極めて低い。これまでに、300アミノ酸長を有する1つのCD123のアイソフォームが、まだRNAレベルではあるが発見されており、これは、Getentryデータベースにおいて受託番号ACM24116.1でアクセス可能である。

#### 【0031】

シグナルペプチドを含む全長ヒトCD123タンパク質の参照配列は、NCBIデータベースから受託番号NP\_002174.1で、さらにUniprotから受託番号P26951で入手可能であり、本明細書において配列番号12で開示される(2014年12月14日に利用可能)。

#### 【0032】

シグナルペプチドを含む全長カニクイザルCD123タンパク質の参照配列は、GenBankデータベースから受託番号EHH61867.1で、さらにUniprotから受託番号G8F3K3で入手可能であり、本明細書において配列番号13で開示される(2014年12月14日に利用可能)。

#### 【0033】

本発明者らによってゲノムDNAからクローニングされた成熟ヒトCD123His-IITag付きFc融合タンパク質の配列は、配列番号14で開示される。前記成熟ヒトCD123Fc融合タンパク質は、全長ヒトCD123タンパク質のアミノ酸19から305を含み、したがってヒトCD123の細胞外ドメインを含む。

#### 【0034】

本発明者らによってcDNAからクローニングされた成熟カニクイザルCD123His-IITag付きFc融合タンパク質の配列は、配列番号15で開示される。前記成熟カニクイザルCD123Fc融合タンパク質は、全長カニクイザルCD123タンパク質のアミノ酸19から305を含み、したがってカニクイザルCD123の細胞外ドメインを含む。

#### 【0035】

ヒトおよびカニクイザルCD123のドメイン構成は、以下の通りである(NCBIデータベースにおいて受託番号NP\_002174.1(配列番号12)でアクセス可能なヒトCD123配列ベース、およびUniprotデータベースにおいて受託番号G8F3K3(配列番号13)でアクセス可能なカニクイザルCD123配列ベース)：

#### 【表2】

ヒトCD123 ドメイン	配列番号 12 における位置 (ヒト)	配列番号 13 における位置 (カニクイザル)
細胞外	19 - 305	19 - 305
膜貫通ドメイン	306 - 325	306 - 325
細胞質内	326 - 378	326 - 378

#### 【0036】

したがって、ヒトCD123の細胞外ドメインは、配列番号12の位置19～305におけるアミノ酸からなる。

#### 【0037】

CD123(インターロイキン-3受容体アルファ鎖IL-3R)は、様々な血液学的腫瘍で過剰発現される腫瘍抗原である。AML芽球の大部分が表面CD123を発現し、この発現はAMLのサブタイプによって異なっていない。診断時においてAMLにおけるCD123発現が多いほど、より不良な予後に関連することが報告されている。CD123発現は、脊髄形成異常、全身性肥満細胞症、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍(BPDC

10

20

30

40

50

N)、ALLおよびヘアリーセル白血病などの他の血液学的悪性腫瘍で報告されている。

【0038】

CD123は、AMLの白血病幹細胞で発現され、AMLが、DNA損傷性の化学療法に静止状態であり比較的耐性を有することが示されているこれらのLSCに起因することを示唆する証拠が増えつつある。LSCの持続性は、最初の寛解後の再発の基礎となっているという仮説が立てられており、したがってLSCの根絶は、治癒、さらには重要な治療目標にとっての必要条件とみなすことができる。

【0039】

モノクローナル抗体(MAb)7G3は、CD123に対して発生したものであるが、これまでに、白血病細胞株および初代細胞の両方のIL-3が媒介する増殖および活性化を阻害することが示されている(米国特許第6,177,078号)。特に、米国特許第6,177,078号は、抗IL-3受容体アルファ鎖(IL-3R、CD123)モノクローナル抗体7G3、およびIL-3RのN末端ドメイン、具体的にはアミノ酸残基19~49に結合する7G3の能力を開示している。米国特許第6,733,743号は、細胞を、抗体および細胞傷害性物質(化学療法剤、毒素またはアルファ放出放射線同位体から選択される)の組成物と接触させること、それにより組成物が、細胞死を引き起こすのに有効な量でCD123に選択的に結合することによって、CD123を発現するがCD131を有意に発現しない血液がん前駆細胞の機能を損なう方法を開示している。しかしながら、CD123の標的化がAML-LSCを機能的に損なうことができるかどうかは未だ明らかになっていない。

【0040】

ヒト化抗CD123抗体「hz7G3」は、その重鎖および軽鎖可変ドメインの配列が「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質の場面で使用されており、

- 配列番号50の配列のCDR1-H、配列番号53の配列のCDR2-H、および配列番号51の配列のCDR3-Hを含む、配列

【化3】

EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSG**YSF**TDYYMKWARQMPGKGLEWMGDI**IPSSGAT**  
FYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYY**CARSHLLRASWFAYWGQGT**TMV  
TVSS

(配列番号52、CDRは太字で示される)からなる重鎖可変ドメイン、および

- 配列番号48の配列のCDR1-L、配列「WAS」のCDR2-L、および配列番号49の配列のCDR3-Lを含む、配列

【化4】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESS**QSL**NSGN**QKN**YLTWYQQKPGQPPKPLIYW**AST**  
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC**QNDYSYP**YTFGQGTKLEIK

(配列番号54、CDRは太字で示される)からなる軽鎖可変ドメインを含む。

【0041】

ヒト化抗CD123抗体「hz7G3」は、可能性のある脱アミドの存在を回避するために、配列番号52の55位にNからSへの突然変異を含む。当業者に公知のように、抗体における脱アミド部位の存在は、抗体サンプルの不均質性を引き起こすことが公知であるため、好ましくは回避される。

【0042】

定義

本出願にわたり、用語「および/または」は、それが接続する事柄の1つまたはそれ以上が起こる可能性があることを含むものとして解釈される文法上の接続詞である。例えば、表現「このようなネイティブ配列のタンパク質は、標準的な組換え方法および/または合

成方法を使用して製造することができる」は、ネイティブ配列のタンパク質は、標準的な組換えおよび合成方法を使用して製造することができること、またはネイティブ配列のタンパク質は、標準的な組換え方法を使用して製造することができること、またはネイティブ配列のタンパク質は、合成方法を使用して製造することができることを示す。

【0043】

さらに、本出願にわたり、用語「含む」は、全ての具体的に述べられたフィーチャに加えて、任意選択の、追加の、特に明示されていないものも包含するとして解釈されることとする。本明細書で使用される場合、用語「含む」の使用はまた、具体的に述べられたフィーチャ以外フィーチャが存在しない（すなわち「からなる」）実施形態も開示する。さらに不定冠詞「1つの(a)」または「1つの(an)」は、複数形を排除しない。特定の測定値が互いに異なる従属項に列挙されているということだけでは、これらの測定値の組合せを有利に使用できないことを示すことにはならない。

10

【0044】

「抗体」は、「免疫グロブリン」とも称され、2つの重鎖がジスルフィド結合で互いに連結され、各重鎖がジスルフィド結合で軽鎖に連結された天然の抗体または従来の抗体であり得る。2つのタイプの軽鎖、すなわちラムダ( $\lambda$ )およびカッパ( $\kappa$ )がある。抗体分子の機能的な活性を決定する5つの主要な重鎖クラス(またはアイソタイプ): IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEがある。各鎖は、別個の配列ドメインを含有する。軽鎖は、2つのドメインまたは領域、すなわち可変ドメイン(VL)および定常ドメイン(CL)を包含する。重鎖は、4つのドメイン、すなわち可変ドメイン(VH)および3つの定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3、集合的にCHと称される)を包含する。軽(VL)および重(VH)鎖の両方の可変領域は、抗原への結合認識および特異性を決定する。軽(CL)および重(CH)鎖の定常領域ドメインは、重要な生物学的特性、例えば抗体鎖の会合、分泌、経胎盤の移動、相補結合、およびFc受容体(FcR)への結合を付与する。Fvフラグメントは、免疫グロブリンのFabフラグメントのN末端の一部であり、1つの軽鎖および1つの重鎖の可変部分からなる。抗体の特異性は、抗体結合部位と抗原決定基との構造的な相補性に存在する。抗体結合部位は、主として超可変または相補性決定領域(CDR)に由来する残基で構成される。場合によっては、非超可変またはフレームワーク領域(FR)に由来する残基も、全体的なドメイン構造、したがって結合部位に影響を与える。相補性決定領域またはCDRは、一緒になって、ネイティブ免疫グロブリン結合部位の天然Fv領域の結合親和性および特異性を定義するアミノ酸配列を指す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれCDR1-L、CDR2-L、CDR3-L、およびCDR1-H、CDR2-H、CDR3-Hと指定された3つのCDRをそれぞれ有する。したがって、従来の抗体抗原結合部位は、重鎖および軽鎖のV領域のそれぞれに由来するCDRのセットを含む6つのCDRを包含する。

20

30

【0045】

本発明の場面で、抗体または免疫グロブリンは、IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEである。

【0046】

「フレームワーク領域」(FR)は、CDR間に挿入されたアミノ酸配列、すなわち単一の種における様々な免疫グロブリンのなかでも比較的保存された、免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域の一部を指す。免疫グロブリンの軽鎖および重鎖は、それぞれFR1-L、FR2-L、FR3-L、FR4-L、およびFR1-H、FR2-H、FR3-H、FR4-Hと指定された4つのFRをそれぞれ有する。したがって、軽鎖可変ドメインは、それに従い(FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L)のように指定することができ、重鎖可変ドメインは、それに従い(FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H)のように指定することができる。

40

【0047】

50

C D Rのアミノ酸配列を知ることにより、当業者は、フレームワーク領域 F R 1 - L、F R 2 - L、F R 3 - L、F R 4 - Lおよび/または F R 1 - H、F R 2 - H、F R 3 - H、F R 4 - Hを容易に決定することができる。

【 0 0 4 8 】

「ヒトフレームワーク領域」は、本明細書で使用される場合、天然に存在するヒト抗体のフレームワーク領域と実質的に同一な（約 8 5 %、またはそれより高い、特に 9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 9 %または 1 0 0 %）フレームワーク領域である。

【 0 0 4 9 】

本発明の場面において、免疫グロブリン軽鎖または重鎖における C D R / F R の定義は、I M G T の定義（L e f r a n c e ら、D e v . C o m p . I m m u n o l .、2 0 0 3、2 7（1）：5 5 ~ 7 7；www . i m g t . o r g）に基づき決定されるものとする。

【 0 0 5 0 】

用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、従来の抗体およびそのフラグメントに加えて、単一ドメイン抗体およびそのフラグメント、特に単一ドメイン抗体の可変重鎖、ならびにキメラ、ヒト化、二重特異性または多重特異性抗体を意味する。

【 0 0 5 1 】

用語「ヒト化抗体」は、全体的または部分的に非ヒト起源であり、ヒトにおける免疫応答を回避または最小化するために、特に重鎖および軽鎖のフレームワーク領域中の特定のアミノ酸を置き換えるように改変されている抗体を指す。ヒト化抗体の定常ドメインは、ほとんどの場合、ヒト C H および C L ドメインである。

【 0 0 5 2 】

抗体配列のヒト化のための多数の方法が当技術分野において公知である；例えば A l m a g r o および F r a n s s o n による総論（2 0 0 8）F r o n t B i o s c i . 1 3：1 6 1 9 ~ 1 6 3 3 を参照されたい。1 つの一般的に使用される方法は、ドナー抗体、一般的にマウス抗体の C D R 配列を異なる特異性を有するヒト抗体のフレームワーク足場にグラフト化することを含む、C D R グラフティング、または抗体再形成（a n t i b o d y r e s h a p i n g）である。C D R グラフティングは結合特異性および親和性、したがって C D R グラフト化非ヒト抗体の生物活性を低減させることができるため、親抗体の結合特異性および親和性を保持するために、C D R グラフト化抗体の選択された位置に復帰突然変異を導入することができる。可能性のある復帰突然変異のための位置の同定は、文献および抗体データベースで入手可能な情報を使用して実行することができる。復帰突然変異の候補であるアミノ酸残基は、典型的には、抗体分子の表面に配置されているアミノ酸残基であるが、埋め込まれているかまたは表面露出の程度が低い残基は、通常変更されないと予想される。C D R グラフティングおよび復帰突然変異の代わりとなるヒト化技術は、非ヒト起源の表面に露出していない残基が保持され、一方で表面残基がヒト残基に変更されるリサーフェイシングである。別の代替技術は、「ガイド付き選択（g u i d e d s e l e c t i o n）」として公知であり（J e s p e r s e n ら、（1 9 9 4）B i o t e c h n o l o g y 1 2、8 9 9）、例えばマウスまたはラット抗体から親抗体のエピトープおよび結合特徴を保存する完全ヒト抗体を誘導するのに使用することができる。さらなるヒト化方法は、いわゆる 4 D ヒト化である。4 D ヒト化プロトコールは、特許出願 U S 2 0 1 1 0 0 2 7 2 6 6 号 A 1（W O 2 0 0 9 0 3 2 6 6 1 A 1）に記載されており、以下のラット抗体可変軽鎖（V L）および重鎖（V H）ドメインをヒト化するための 4 D ヒト化の適用で例示される。一例において、ラット抗体相同性モデルを、典型的には M O E ソフトウェア（v . 2 0 1 1 . 1 0 - C h e m i c a l C o m p u t i n g G r o u p、Q u e b e c、C a n a d a）を用いて、テンプレートとして P D B 構造（B e r m a n ら、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h、2 0 0 0、2 8：2 3 5 ~ 2 4 2）を使用して実行し、その後、M O E に実装された標準的手順を使用してエネルギーを最小化した。次いで分子動力学（M D）シミュレーションをラット抗体の最小化した 3 D 相同性モデル（M O E ソフトウェアでなされた）に実行し、例えば、L G C R / S D I によって設計された 7 つの代表的な軽鎖（v k 1、v k 2、v k 3、v k 4、v ラ

10

20

30

40

50

ムダ1、vラムダ2、vラムダ3)および7つの代表的な重鎖(vh1a、vh1b、vh2、vh3、vh4、vh5、vh6)由来のMOE内で利用可能な49種のヒトモデルと比較した。例えば、どちらも最良の疎水性、静電性の構成要素およびCDRの外側における配列同一性を有する鎖のカップリング(Vkx-Vhx)の1つのモデルを、「4Dヒト化」に選択した。ラット抗体可変ドメインと選択されたモデルとの2つ一組の会合の場合、配列を、典型的には対応する相同性モデルのアルファ炭素の最適な3Dの重ね合わせに基づき並べた。次いで不要なモチーフを検討し、突然変異させた。最終的に、得られたヒト化配列を、配列類似性に関して、例えばIEDBデータベース(<http://www.immuneepitope.org>; バージョン2012/01/30、ローカルアクセス可能)に対してBLAST処理して、その配列が、列挙された公知のBまたはT細胞エピトープをまったく含有しないことを確認した。

10

#### 【0053】

キメラ抗体の場合、ヒト化は、典型的には、可変領域配列のフレームワーク領域の改変を含む。

#### 【0054】

CDRの一部であるアミノ酸残基は、典型的にはヒト化に伴い変更されないと予想されるが、ある特定の場合では、個々のCDRアミノ酸残基を変更すること、例えばグリコシル化部位、脱アミド部位または望ましくないシステイン残基を除去することが望ましい場合がある。N-連結グリコシル化は、トリペプチド配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thr(式中Xは、Proを除くいずれかのアミノ酸であり得る)中のアスパラギン残基へのオリゴ糖鎖の付着によって起こる。N-グリコシル化部位の除去は、AsnまたはSer/Thr残基のいずれかを異なる残基に特に保存的置換によって突然変異させることによって達成することができる。アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミドは、pHおよび表面露出などの要因に応じて行うことができる。アスパラギン残基は、主として配列Asn-Gly中に存在する場合、特に脱アミドを受けやすく、それより低い程度ではあるがAsn-Alaなどの他のジペプチド配列中に存在する場合も脱アミドを受けやすい。したがって、このような脱アミド部位、特にAsn-GlyがCDR配列中に存在する場合、そのような部位を除去すること、典型的には、保存的置換によって関連する残基の1つを除去することが望ましい場合がある。関連する残基の1つを除去するためのCDR配列における置換も、本発明に包含されることが意図される。

20

30

#### 【0055】

(従来の)抗体の「フラグメント」は、無傷の抗体の一部、特に無傷の抗体の抗原結合領域または可変領域を含む。抗体フラグメントの例としては、Fv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、dsFv、(dsFv)<sub>2</sub>、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、ダイアボディ、抗体フラグメントから形成された二重特異性および多重特異性抗体が挙げられる。また従来の抗体のフラグメントも、単ドメイン抗体、例えば重鎖抗体またはVHHであり得る。

#### 【0056】

用語「Fab」は、約50,000の分子量および抗原結合活性を有する抗体フラグメントであって、IgGをプロテアーゼであるパパインで処理することによって得られたフラグメントのなかでも、H鎖のN末端側の約半分とL鎖全体とがジスルフィド結合を介して一緒に結合しているものを意味する。

40

#### 【0057】

用語「Fcドメイン」は、本発明の場面で使用される場合、ネイティブFcおよびFcバリエーションならびに上記で定義された配列を包含する。FcバリエーションおよびネイティブFc分子と同様に、用語「Fcドメイン」は、全抗体から消化により得られたかまたは他の手段によって産生されたかにかかわらず、単量体または多量体の形態の分子を包含する。

#### 【0058】

用語「ネイティブFc」は、本明細書で使用される場合、単量体または多量体の形態かどうかにかかわらず、抗体の消化によって得られた、または他の手段によって産生された非抗原結合フラグメントの配列を含む分子を指し、ヒンジ領域を含有していてもよい。ネイ

50

タイプFcの元の免疫グロブリンの源は、特にヒト起源であり、免疫グロブリンのいずれであってもよいが、IgG1およびIgG2が好ましい。ネイティブFc分子は、共有結合（すなわち、ジスルフィド結合）および非共有結合の会合によって二量体または多量体の形態に連結できる単量体ポリペプチドで構成される。ネイティブFc分子の単量体サブユニット間の分子間のジスルフィド結合の数は、クラス（例えば、IgG、IgA、およびIgE）またはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgA1、およびIgGA2）に応じて、1から4の範囲である。ネイティブFcの一例は、IgGのパイン消化により生じるジスルフィド結合した二量体である。用語「ネイティブFc」は、本明細書で使用される場合、単量体、二量体、および多量体の形態に対する総称である。

【0059】

用語「Fcバリエーション」は、本明細書で使用される場合、ネイティブFcから改変されているが、それでもなおサルベージ受容体であるFcRn（新生児のFc受容体）のための結合部位を含む分子または配列を指す。例示的なFcバリエーション、およびそれとサルベージ受容体との相互作用は、当技術分野において公知である。したがって、用語「Fcバリエーション」は、非ヒトネイティブFcからヒト化された分子または配列を含み得る。さらに、ネイティブFcは、除去することができる領域を含むが、これは、そのような領域が、本発明の抗体様結合タンパク質に必要なではない構造的な機能または生物活性を提供するためである。したがって、用語「Fcバリエーション」は、1つまたはそれ以上のネイティブFc部位または残基が欠如している分子もしくは配列、または（1）ジスルフィド結合形成、（2）選択された宿主細胞との不適合、（3）選択された宿主細胞中で発現されたときのN末端の不均質性、（4）グリコシル化、（5）相補物との相互作用、（6）サルベージ受容体以外のFc受容体への結合、または（7）抗体依存性細胞傷害（ADCC）に影響を与えるかまたはそれらに關与する1つまたはそれ以上のFc部位または残基が改変された分子もしくは配列を含む。

【0060】

用語「二重特異性抗体」または「BsAb」は、典型的には、単一分子内に2つの抗体の抗原結合部位を組み合わせた抗体を意味する。したがって、BsAbは、2つの異なる抗原と同時に結合することができる。例えばEP2050764A1に記載されるような所望の一連の結合特性およびエフェクター機能を有する抗体または抗体誘導体を設計する、改変する、産生するために、遺伝子工学が高い頻度で使用されてきた。

【0061】

用語「抗体様結合タンパク質」は、本明細書において、二重特異性抗体のように2つの異なる抗原に同時に結合することができるポリペプチドまたは結合タンパク質を指す。しかしながら、本明細書において定義される従来の抗体と異なり、抗体様結合タンパク質は、6つより多くのCDRを含む。本発明の抗体様結合タンパク質は、本明細書の以下で定義されるようなCODVフォーマットであり、本明細書において以下の「抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質」の章でさらに定義される通りである。

【0062】

「CODVフォーマット」は、本発明の場面において、二重特異性抗体または多重特異性抗体のクロスオーバー二重可変（cross-over dual variable；CODV）立体配置を指す。CODVフォーマットは、フォールディングおよび最大の結合親和性を保持しながらの可変ドメインの交換可能性をもたらす。

【0063】

これまでに、CODVフォーマットは、国際特許出願WO2012/135345に記載され、さらにSteinmetzら（MAbs、2016年7月；8（5）：867～78）によっても記載されている。

【0064】

用語「リンカー」は、本明細書で使用される場合、軽鎖および重鎖のドメインがクロスオーバー二重可変領域を有する免疫グロブリンにフォールディングされるのに十分な移動度を提供するために、免疫グロブリンドメイン間に挿入された1つまたはそれ以上のアミノ

10

20

30

40

50



酸残基を指す。一部の実施形態において、リンカーは、0個のアミノ酸からなり、これは、リンカーが存在しないことを意味する。リンカーは、可変ドメイン間のトランジション、または可変ドメインと定常ドメインとの間のトランジションのときにそれぞれ配列レベルで挿入される。接近したサイズの免疫グロブリンドメインはよく理解されているため、ドメイン間のトランジションは同定することができる。実験データによって実証された場合、またはモデリングまたは2次構造予測の技術によって仮定できる場合、ベータシートまたはアルファヘリックスなどの二次構造エレメントを形成しないペプチドストレッチを配置することによって、ドメイントランジションの正確な配置を決定することができる。本発明の場面で記載されるリンカーは、リンカーL<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>およびL<sub>5</sub>である。L<sub>1</sub>は、N末端VD<sub>1</sub>ドメインとVD<sub>2</sub>ドメインとの間に配置され；L<sub>2</sub>は、VD<sub>2</sub>とC末端CLドメインとの間に配置される。リンカーL<sub>3</sub>およびL<sub>4</sub>は、抗体様タンパク質の式[III]に従って定義されたポリペプチド上に配置される。より正確に言えば、L<sub>3</sub>は、N末端VD<sub>3</sub>とVD<sub>4</sub>ドメインとの間に配置され、L<sub>4</sub>は、VD<sub>4</sub>とC末端CH<sub>1</sub>-Fcドメインとの間に配置される。L<sub>5</sub>は、CLとN末端Fc<sub>2</sub>との間に配置される。リンカーL<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>およびL<sub>5</sub>は、独立しているが、一部の実施形態において、これらは同じ配列および/または長さを有する。リンカーL<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、L<sub>4</sub>およびL<sub>5</sub>は、本明細書の上記で本発明の抗体様結合タンパク質の場面において定義された通りである。本発明の抗体様結合タンパク質のバリエーションに存在し得る代替のリンカーは、「抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質のバリエーション」の章でさらに記載される。

#### 【0065】

「RF突然変異」は、一般的に、アミノ酸HYのFcドメインのCH<sub>3</sub>ドメインにおけるRFへの突然変異を指し、例えば、Jendeborg, L.ら(1997、J. Immunological Meth., 201: 25~34)に記載されているような、CH<sub>3</sub>ドメインにおける突然変異H435RおよびY436Fであり、プロテインAへの結合が無効になることから精製目的で有利であることが記載されている。

#### 【0066】

本発明の場面において、RF突然変異は、例えば、配列番号67、68、71または70のX<sub>6</sub>位およびX<sub>7</sub>位を指し、この場合、RF突然変異は、X<sub>6</sub>がアミノ酸Rであり、X<sub>7</sub>がアミノ酸Fである場合に存在する。一例において、RF突然変異は、本明細書における以下の「抗体様結合タンパク質」の章でさらに記載されるように、配列番号69のFcスタンプ(Fc<sub>3</sub>) (抗体様結合タンパク質CODV-Fab-OL1-ノブxホール-RFのFc<sub>3</sub>)の215~216位におけるアミノ酸HYのRFでの置換、または配列番号79の配列のFc領域(抗体様結合タンパク質CODV-Fab-TL1-ノブxホール-RFのFc領域)の220~221位におけるHYのRFへの突然変異を指す。

#### 【0067】

「ノブ-イントゥー-ホール」またはいわゆる「ノブ-イントゥー-ホール」技術は、ヘテロ多量体形成を促進するための、どちらもCH<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>境界中にある突然変異Y349C、T366S、L368AおよびY407V(ホール)、ならびにS354CおよびT366W(ノブ)を指し、とりわけ参照により本明細書に組み入れられる特許US5731168およびUS8216805に記載されている。

#### 【0068】

本発明の場面において、「ノブ」突然変異は例えば、例えば配列番号66または62のX<sub>2</sub>位およびX<sub>3</sub>位を指し、この場合、ノブ突然変異は、X<sub>2</sub>がCであり、X<sub>3</sub>がWである場合に存在する。一例において、ノブ突然変異は、配列番号66のFc(抗体様結合タンパク質CODV-Fab-OL1a「hz20G6xhz7G3」およびCODV-Fab-OL1-ノブxホール-RFのFc)における置換S139CおよびT151Wを指す。本発明の場面において、「ホール」突然変異は例えば、例えば配列番号75のX<sub>1</sub>位、X<sub>3</sub>位、X<sub>4</sub>位およびX<sub>5</sub>位を指し、この場合、「ホール」突然変異は、X<sub>1</sub>がCであり、X<sub>3</sub>がSであり、X<sub>4</sub>がAであり、X<sub>5</sub>がVである場合に存在する。一例において、

ホール突然変異は、配列番号75のF<sub>c</sub>（抗体様結合タンパク質C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - R F x ホールおよびC O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホールのF<sub>c</sub>）における置換Y 1 3 4 C、T 1 5 1 S、L 1 5 3 A、Y 1 9 2 Vを指す。

【0069】

「L A L A 突然変異」は、F<sub>c</sub>エフェクター機能を壊滅する二重突然変異L 2 3 4 AおよびL 2 3 5 Aを指す。F<sub>c</sub>二重突然変異体L 2 3 4 AおよびL 2 3 5 Aは、F<sub>c</sub> RまたはC 1 qと結合せず、I g G 1サブクラスのF<sub>c</sub>ドメインのA D C CおよびC D C機能の両方が壊滅される（H e z a r e h, M.ら、J V i r o l. 2001年12月; 75 (24): 12161 ~ 12168）。

【0070】

しかしながら、本発明の場面において、二重突然変異L 2 3 4 AおよびL 2 3 5 Aに言及される場合、対応する位置は、本明細書で定義されるように、F<sub>c</sub>ドメイン中で異なってもよい。しかしながら、当業者は、F<sub>c</sub>ドメイン（すなわち式[ I I I ]におけるF<sub>c</sub>、式[ I V ]におけるF<sub>c</sub>2および/またはF<sub>c</sub>3）中の対応する位置を容易に同定することができる。一例において、二重突然変異L 2 3 4 AおよびL 2 3 5 Aは、配列番号60の配列のF<sub>c</sub>の二重突然変異L 1 9 AおよびL 2 0 A、または言い換えれば、配列番号59のC O D V - F a b - T L 1 - R Fの式[ I V ]のポリペプチド中の突然変異L 3 5 9 AおよびL 3 5 8 Aに対応する。

【0071】

「精製された」および「単離された」は、ポリペプチド（すなわち本発明の抗体）またはヌクレオチド配列に対して言及される場合、示された分子が、同じタイプの他の生物学的な巨大分子の実質的な非存在下で存在することを意味する。用語「精製された」は、本明細書で使用される場合、特に、同じタイプの生物学的な巨大分子の少なくとも75重量%、85重量%、95重量%、または98重量%が存在することを意味する。特定のポリペプチドをコードする「単離された」核酸分子は、対象ポリペプチドをコードしない他の核酸分子を実質的に含まない核酸分子を指す；しかしながら、このような分子は、組成物の基礎的な特徴に有害な影響を与えない一部の追加の塩基または部分を包含していてもよい。

【0072】

用語「抗原」または「標的抗原」は、本明細書で使用される場合、抗体または抗体様結合タンパク質と結合することが可能な分子または分子の一部を指す。この用語はさらに、その抗原のエピトープに結合することが可能な抗体を産生させる動物で使うことが可能な分子または分子の一部を指す。標的抗原は、1つまたはそれ以上のエピトープを有していてもよい。抗体または抗体様結合タンパク質によって認識される各標的抗原に関して、抗体様結合タンパク質は、標的抗原を認識する無傷の抗体と競合することが可能である。

【0073】

「親和性」は、理論上、全抗体と抗原との平衡な会合によって定義される。親和性は、例えば半最大有効濃度（E C 5 0）または平衡解離定数（K D）で表すことができる。

【0074】

「半最大有効濃度」は、「E C 5 0」とも称され、特定された曝露時間後にベースラインから最大までの半分の応答を誘導する、薬物、抗体または毒性物質の濃度を指す。E C 5 0と親和性は反比例しており、E C 5 0値が低いほど抗体の親和性はより高くなる。

【0075】

「K D」は、平衡解離定数であり、抗体とその抗原とのk o f f / k o nの比率である。K Dと親和性は反比例する。K D値は、抗体濃度に関し、K D値が低いほど、抗体の親和性はより高くなる。親和性は、表面プラズモン共鳴で会合および解離速度を測定すること、または免疫化学アッセイ（E L I S A、フローサイトメトリー）でE C 5 0を測定することなどの様々な公知の方法によって実験的に査定することができる。酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）は、固相酵素免疫検査法を使用して、液体サンプルまたは湿潤したサンプル中の物質、通常は抗原の存在を検出する生化学的アッセイである。サンプルからの抗原を、表面に付着させる。次いでさらなる特異的な抗体を、それが抗原に結合できる

10

20

30

40

50

ように表面上に適用する。この抗体を酵素に連結させて、最終工程で、酵素の基質を含有する物質を添加する。それに続く反応により、検出可能なシグナル、最も一般的には基質における色の変化が生じる。フローサイトメトリーは、各細胞の特異的な光散乱および蛍光特徴または特異的な蛍光標識に基づき、生物学的な細胞のヘテロジニアスな混合物を単一細胞レベルで分析するための方法を提供する。これらのアッセイにおいて、EC<sub>50</sub>は、抗原の規定濃度でELISA（酵素結合免疫吸着測定法）によって、または抗原を発現する細胞の規定濃度でフローサイトメトリーによって、いくつかの特定された曝露時間の後にベースラインから最大までの半分の応答を誘導する抗体の濃度である。表面プラズモン共鳴は、標識を用いない方法であり、センサー表面に固定された「リガンド」分子への可溶性相中の分子（「分析物」）の結合が直接測定される。センサーデバイスで、リガンドの結合は、表面プラズモンと称される光学現象によってモニターされる。特に、「分析物」分子が「リガンド」分子から解離すると、SPRシグナル（共鳴単位、RUで表される）の減少が観察される。会合（「オンレート」、 $k_a$ ）および解離速度（「オフレート」、 $k_d$ ）は、会合および解離中に得られたシグナルから得られ、それから平衡解離定数（「結合定数」、 $K_D$ ）を計算することができる。共鳴単位（RU）で示されたシグナルは、分析物中に存在するリガンドのサイズに依存するが、実験条件が同じである場合、すなわち同じ条件でリガンドが同じ分子である場合では、得られたRUは、親和性を示すことができ、ここで得られたRUでのシグナルが高いほど、より多くの結合が起こっている。

10

**【0076】**

抗原1（Ag1）に結合するモノクローナル抗体は、EC<sub>50</sub>が両方の抗原の類似の範囲内である場合、抗原2（Ag2）に対して「交差反応性」を有する。本出願において、Ag1に結合するモノクローナル抗体は、Ag1の親和性に対するAg2の親和性の比率が等しいかまたは10未満（特に5、2、1または0.5）である場合、Ag2に対して交差反応性を有し、親和性は、両方の抗原で同じ方法により測定される。

20

**【0077】**

Ag1に結合するモノクローナル抗体は、2つの抗原への親和性が非常に異なっている場合、Ag2に「有意な交差反応性」を有さない。Ag2への親和性は、結合応答が低すぎる場合、測定できないことがある。本出願において、Ag1に結合するモノクローナル抗体は、同じ実験設定および同じ抗体濃度でモノクローナル抗体のAg2に対する結合応答が同じモノクローナル抗体のAg1に対する結合応答の5%未満である場合、Ag2に対して有意な交差反応性を有さない。実際には、使用される抗体濃度は、Ag1で達成された飽和プラトーに達するのに必要なEC<sub>50</sub>または濃度であり得る。

30

**【0078】**

「特異性」は、本明細書で使用される場合、抗体が結合する標的ペプチド配列（「エピートープ」）を、密接に関連した高度に相同なペプチド配列から識別する抗体の能力を意味する。

**【0079】**

モノクローナル抗体は、Ag2に有意な交差反応性を有さない場合、Ag1に「特異的に結合する」。

**【0080】**

用語「T細胞の活性化」または「T細胞活性化」は、本明細書において、細胞傷害性の顆粒の融合、一過性のサイトカイン放出、および増殖を含むCD3シグナル伝達を開始させることを指す。本発明の抗体様結合タンパク質はCD3を標的化し、標的細胞の存在下でT細胞を活性化する；この活性はまた、「T細胞係合作用（T-cell engaging effect）」とも称される。T細胞係合作用は、標的細胞において細胞傷害性を誘導する。

40

**【0081】**

当業者に公知のように、T細胞の活性化は、CD69およびCD25などの表面マーカーの発現を誘導する。したがってT細胞の活性化は、CD4+/CD25+、CD4+/CD69+、CD8+/CD25+、またはCD8+/CD69+ T細胞の発現を検出および測定することによって測定することができる。T細胞活性化を測定する方法は、当業者

50

に公知である。

【 0 0 8 2 】

T細胞活性化を測定する方法は、実施例の章（実施例 2 . 9 ）でさらに開示される。したがって、本発明の場面において、T細胞活性化は、CD 6 9 を発現する細胞のパーセンテージとして細胞総数に対する％で、またはCD 4 およびCD 6 9 を発現する細胞のパーセンテージとして細胞総数に対する％で、またはCD 8 およびCD 6 9 を発現する細胞のパーセンテージとして細胞総数に対する％でのいずれかで測定される。

【 0 0 8 3 】

「低いT細胞活性化」は、本発明の抗体様結合タンパク質の場面において、2 0 % 未満、1 8 % 未満、1 6 % 未満、1 4 % 未満、1 2 % 未満、1 0 % 未満のT細胞活性化を指す。

10

【 0 0 8 4 】

「標的細胞」は、本明細書において、第 2 の抗原を発現する細胞を指し、一例において、標的細胞は、本明細書において、CD 1 2 3 を発現する細胞、例えばTHP - 1 細胞を指す。

【 0 0 8 5 】

「高いT細胞活性化」は、本明細書において、5 0 % より高い、5 5 % より高い、6 0 % より高い、6 2 % より高い、6 4 % より高い、6 6 % より高い、6 8 % より高い、7 0 % より高いT細胞活性化を指す。「細胞傷害性」は、本明細書において、化合物の、例えば本発明の抗体様結合タンパク質の、細胞にとって毒性である性質を指す。細胞傷害性は、様々な作用メカニズムにより誘導され、細胞媒介細胞傷害性、アポトーシス、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）または補体依存性細胞傷害（CDC）に分けることができる。

20

【 0 0 8 6 】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」は、免疫系のエフェクター細胞が活発に標的細胞を溶解させ、その膜表面抗原が特異的な抗体または本発明の抗体様結合タンパク質と結合する、細胞媒介免疫防御のメカニズムを指す。

【 0 0 8 7 】

「補体依存性細胞傷害」または「CDC」は、本発明の場面において、補体系タンパク質の存在下における標的細胞の溶解を指す。

【 0 0 8 8 】

「細胞媒介細胞傷害性」は、エフェクターリンパ球、例えば細胞傷害性Tリンパ球またはナチュラルキラー細胞による標的細胞の細胞崩壊を指し、したがってT細胞媒介細胞傷害性とNK細胞細胞傷害性に区別することができる。

30

【 0 0 8 9 】

「ドメイン」は、一般的に配列相同性に基つき定義されるタンパク質のあらゆる領域であってもよく、しばしば特異的な構造的または機能的な実体に関する。

【 0 0 9 0 】

「組換え」分子は、組換え手段によって製造された、発現された、作り出された、または単離された分子である。

【 0 0 9 1 】

用語「遺伝子」は、1 つまたはそれ以上のタンパク質または酵素の全てまたは一部を含む特定のアミノ酸配列をコードするかまたはそれに対応するDNA配列を意味し、例えば遺伝子が発現される条件を決定するプロモーター配列などの調節DNA配列を包含する場合もあるし、または包含しない場合もある。一部の遺伝子は構造遺伝子ではなく、DNAからRNAに転写されるが、アミノ酸配列に翻訳されない。他の遺伝子は、構造遺伝子のレギュレーターとして、またはDNA転写のレギュレーターとして機能し得る。特に、遺伝子という用語は、タンパク質をコードするゲノム配列、すなわちレギュレーター、プロモーター、イントロンおよびエクソン配列を含む配列に対して用いられる場合もある。

40

【 0 0 9 2 】

「参照配列に少なくとも 8 5 % 同一な」配列は、その全長において、参照配列の全長と、

50

８５％、またはそれより高い、特に９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％の配列同一性を有する配列である。

#### 【００９３】

本出願の場面において、「同一性のパーセンテージ」は、グローバルペアワイズアライメントを使用して計算される（すなわち２つの配列がそれらの全長で比較される）。２つまたはそれより多くの配列の同一性を比較するための方法は当技術分野において周知である。例えば「ニードル」プログラムを使用してもよく、これは、ニードルマン・ウンシュのグローバルアライメントのアルゴリズム（NeedlemanおよびWunsch、1970 J. Mol. Biol. 48: 443~453）を使用して、２つの配列の最適なアライメント（ギャップを包含する）をそれらの全長を考慮して発見するものである。ニードルプログラムは、例えばワールドワイドウェブサイトebi.ac.ukで利用可能である。２つのポリペプチド間の同一性のパーセンテージは、本発明に従って、EMBOSS：ニードル（グローバル）プログラムを、１０．０に等しい「ギャップオープン」パラメーター、０．５に等しい「ギャップ伸長」パラメーター、およびBlosum62マトリックスを使用して計算される。

10

#### 【００９４】

参照配列に「少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一な」アミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列と比較して欠失、挿入および／または置換などの突然変異を含んでいてもよい。置換の場合、参照配列に少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％または９９％同一なアミノ酸配列からなるタンパク質は、参照配列とは別の種由来の相同配列に対応していてもよい。

20

#### 【００９５】

「アミノ酸置換」は、保存的であってもよいし、または非保存的であってもよい。好ましくは、置換は、１つのアミノ酸が類似の構造的および／または化学特性を有する別のアミノ酸で置換されている保存的置換である。置換は、好ましくは、以下の表に示される保存的置換に対応する。

#### 【００９６】

#### 【表３】

保存的置換	アミノ酸のタイプ
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	脂肪族疎水性側鎖を有するアミノ酸
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	非荷電性であるが極性の側鎖を有するアミノ酸
Asp, Glu	酸性側鎖を有するアミノ酸
Lys, Arg, His	塩基性側鎖を有するアミノ酸
Gly	中性側鎖

30

40

#### 【００９７】

用語「ベクター」、「クローニングベクター」および「発現ベクター」は、宿主を形質転換させ、導入された配列の発現（例えば転写および翻訳）を促進するように、DNAまたはRNA配列（例えば外来遺伝子）を宿主細胞に導入することができる運搬体を意味する。

#### 【００９８】

用語「形質転換」は、宿主細胞が導入された遺伝子または配列を発現して、所望の物質、典型的には導入された遺伝子または配列によってコードされたタンパク質または酵素を産

50

生するように、宿主細胞に「外来」（すなわち外因性）遺伝子、DNAまたはRNA配列を導入することを意味する。導入されたDNAまたはRNAを受け入れ、それを発現する宿主細胞は、「形質転換されている」。

【0099】

用語「発現系」は、例えばベクターによって運搬され宿主細胞に導入された外来DNAによってコードされたタンパク質の発現に好適な条件下にある宿主細胞および適合性ベクターを意味する。

【0100】

用語「医薬組成物」または「治療用組成物」は、本明細書で使用される場合、患者に適切に投与されたときに所望の治療作用を誘導することが可能な化合物または組成物を指す。

10

【0101】

「薬学的に」または「薬学的に許容される」は、必要に応じて、哺乳動物、特にヒトに投与されたときに、有害な、アレルギー性の、または他の不都合な反応を起こさない分子の実体および組成物を指す。「薬学的に許容される担体」または賦形剤は、非毒性の固体、半固体または液体の増量剤、希釈剤、封入材料またはあらゆるタイプの調合助剤を指す。

【0102】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、哺乳動物、例えばげっ歯類、ネコ、イヌ、および霊長類を意味する。特に、本発明に係る対象は、ヒトである。

【0103】

用語「対象」または「個体」は、同義的に使用され、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物であり得る。例えば、対象は、コウモリ；フェレット；ウサギ；ネコ科動物（ネコ）；イヌ科動物（イヌ）；霊長類（サル）、ウマ科動物（ウマ）；ヒト、例えばヒト、女性および子供などである。

20

【0104】

本発明の場面において、用語「処置する」または「処置」は、治療的使用（すなわち所与の疾患を有する対象に対する）を指し、このような障害または状態の1つまたはそれ以上の症状を、回復させること、軽減すること、その進行を妨げることを意味する。したがって、処置は、疾患の完治をもたらす処置だけでなく、疾患の進行を遅延させる、および/または対象の生存を延長する処置も指す。

【0105】

「予防する」は、予防的使用（すなわち所与の疾患を発症させやすい対象に対する）を意味する。

30

【0106】

用語「処置が必要な」は、すでに障害を有する対象、加えて、障害を予防しようとする対象を指す。

【0107】

抗体様結合タンパク質またはその医薬組成物の「治療有効量」は、あらゆる薬物療法に適用可能な適度なベネフィット/リスク比で前記がん疾患を処置するのに十分な抗体様結合タンパク質の量を意味する。しかしながら、本発明のポリペプチドおよび組成物の合計の1日使用量は、主治医により確実な医療的判断の範囲内で決定されることが理解されるものとする。いずれか特定の患者にとっての具体的な治療有効用量レベルは、処置される障害および障害の重症度；採用される具体的なポリペプチドの活性；採用される具体的な組成物、患者の年齢、体重、全身の健康状態、性別および食物；採用される具体的なポリペプチドの投与の時間、投与経路、および排出の頻度；処置の持続時間；採用される具体的なポリペプチドと組み合わせ、またはそれと同時に使用される薬物；ならびに医療分野において周知の同様な要因因子などの様々な要因に依存すると予想される。例えば、所望の治療作用を達成するのに必要な用量より低いレベルで化合物の用量を開始し、所望の作用が達成されるまで投薬量を徐々に増やすことが、当技術分野の技術範囲内で周知である。

40

【0108】

「再発」は、完全寛解後のAML再発と定義される。

50

## 【0109】

「完全寛解」または「CR」は、以下のように定義される：正常値の好中球（ $> 1.0 \times 10^9 / L$ ）、 $10 g / dL$ のヘモグロビンレベルおよび血小板数（ $> 100 \times 10^9 / L$ ）、ならびに赤血球輸血を必要としないこと；骨髓検査において、芽細胞が5%未満、芽球のクラスター化または集合がないこと、およびアウエル小体がないこと；ならびに血液細胞の正常な成熟（形態学；骨髓造影像）、および髓外性白血病がないこと。

## 【0110】

「白血病幹細胞（LSC）」は、正常幹細胞に関連する特徴、すなわち自己再生能および複数の系統に発達する能力を有するがん細胞である。このような細胞は、AMLなどの血液がんにおいて別個の集団として残存することが提唱されている。AML患者に存在するLCSは、いわゆる「AML-LCS」である。

10

## 【0111】

「急性骨髓性白血病（AML）」は、ヘテロジニアスで未分化の骨髓性芽球の増殖が増大することで臨床的に発症するクローン性の障害である。白血病の階層は、LSCの小集団（AML-LCS）によって維持されており、これは、明確な自己再生能を有し、白血病前駆細胞に分化することができる。これらの前駆細胞は、診断および再発時に患者において容易に検出可能な膨大な数の白血病性芽球を生成し、最終的には死に至る。AML-LSCは、一般的に休止状態の細胞として報告されており、これは迅速に分割するクローン産生性の前駆細胞とは対照的である。このAML-LSCの特性は、増殖中の細胞を標的化する従来の化学療法剤の効果をより少なくすることから、これが、高い比率のAML患者が完全寛解になるがほぼ必ず再発し、4年より長く生存した成人の $< 30\%$ が再発するという現状の説明になる可能性がある。加えて、微小残存病変の出現および低い生存率は、AML患者において診断時にLSC頻度が高いことが原因であった。結果として、長期にわたるAML（および同様に上述した他の血液がんの状態）の管理のために、LSCを特異的になくすような新しい処置を開発することが不可避である。AML芽球およびCD34+ / CD38 AML-LSCにおいて、正常な造血細胞に比べてCD123が過剰発現されることが報告されている。

20

## 【0112】

抗CD3 / 抗CD123抗体様結合タンパク質

簡潔化の目的で、本出願にわたり、「抗CD3 / 抗CD123抗体様結合タンパク質」または「本発明の抗CD3 / 抗CD123抗体様結合タンパク質」は、「抗体様結合タンパク質」または「本発明の抗体様結合タンパク質」と称する場合がある。

30

## 【0113】

これらの抗体様結合タンパク質は、CODV設計を有する。

## 【0114】

したがって、一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、参照により本明細書に組み入れられる国際特許出願WO2012 / 135345でこれまでに記載されたようなCODVフォーマットである。

## 【0115】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、国際特許出願WO2012 / 135345でこれまでに記載されたような、軽鎖が追加のFcドメインで延長されたCODVフォーマットである。各軽鎖および重鎖は、Fcドメインを含む。このような本発明の抗体様結合タンパク質は、CODV-Fab-TL1「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質である。

40

## 【0116】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、国際特許出願WO2012 / 135345でこれまでに記載されたような、追加のFcドメインを有するCODVフォーマットである。重鎖は、Fcドメインを含むが、軽鎖を含まない。このような本発明の抗体様結合タンパク質は、CODV-Fab-OL1「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質である。

50

## 【 0 1 1 7 】

一実施形態において、本発明は、2つの抗原結合部位を形成する2つのポリペプチド鎖を含む、ヒトCD3 およびヒトCD123に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、1つのポリペプチド鎖は、式[ I ]：

$V_{D1} - L_1 - V_{D2} - L_2 - C_L$  [ I ]

によって表される構造を有し、1つのポリペプチド鎖は、式[ I I I ]：

$V_{D3} - L_3 - V_{D4} - L_4 - C_{H1} - F_c$  [ I I I ]

によって表される構造を有し、ここで：

a) 式[ I ]の1つのポリペプチドが、配列番号54の配列の $V_{D1}$ 、配列番号56の配列の $L_1$ 、配列番号10の配列の $V_{D2}$ 、配列番号56の配列の $L_2$ 、配列番号18の配列の $C_L$ を含む配列番号55のアミノ酸配列、または配列番号54の配列の $V_{D1}$ の配列番号48、「W A S」および配列番号49の配列の3つのCDR、ならびに配列番号10の配列の $V_{D2}$ の配列番号11、「K V S」および配列番号8の配列の3つのCDRが不変である、配列番号55に少なくとも85%同一な配列からなり；

b) 式[ I I I ]の1つのポリペプチドが、配列番号9の配列の $V_{D3}$ 、0個のアミノ酸からなる $L_3$ 、配列番号52の配列の $V_{D4}$ 、0個のアミノ酸からなる $L_4$ 、配列番号19の配列の $C_{H1}$ 、および配列番号68の配列の $F_c$ を含み、ここで $X_1$ はYもしくはCであり、 $X_2$ はSもしくはCであり、 $X_3$ はT、SもしくはWであり、 $X_4$ はAもしくはLであり、 $X_5$ はVもしくはYであり、 $X_6$ はHもしくはRであり、 $X_7$ はYもしくはFである、配列番号67のアミノ酸配列、または

配列番号52の配列の $V_{D4}$ の配列番号50、配列番号53、および配列番号51の配列の3つのCDR、ならびに配列番号9の配列の $V_{D3}$ の配列番号5、配列番号6、配列番号7の配列の3つのCDRが不変である、配列番号67に少なくとも85%同一な配列からなり、前記アミノ酸 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ および $X_7$ は上記で定義された通りであり、

ここで式[ I ]のポリペプチドおよび式[ I I I ]のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖 - 重鎖対を形成する、抗体様結合タンパク質を指す。

## 【 0 1 1 8 】

一実施形態において、本明細書の上記で定義される抗体様結合タンパク質は、式[ I I I ]のポリペプチドが、配列番号9の配列の $V_{D3}$ 、0個のアミノ酸からなる $L_3$ 、配列番号52の配列の $V_{D4}$ 、0個のアミノ酸からなる $L_4$ 、配列番号19の配列の $C_{H1}$ 、および配列番号68の配列の $F_c$ を含み、ここで $X_1$ はYであり、 $X_2$ はSであり、 $X_3$ はTであり、 $X_4$ はLであり、 $X_5$ はYであり、 $X_6$ はHであり、 $X_7$ はYである、配列番号67のアミノ酸配列からなる抗体様結合タンパク質を含まず、および/または

本明細書の上記で定義される抗体様結合タンパク質は、式[ I I I ]のポリペプチドが、配列番号9の配列の $V_{D3}$ 、0個のアミノ酸からなる $L_3$ 、配列番号52の配列の $V_{D4}$ 、0個のアミノ酸からなる $L_4$ 、配列番号19の配列の $C_{H1}$ 、および配列番号68の配列の $F_c$ を含み、ここで $X_1$ はYであり、 $X_2$ はCであり、 $X_3$ はWであり、 $X_4$ はLであり、 $X_5$ はYであり、 $X_6$ はHであり、 $X_7$ はYであるか、または $X_6$ はRであり、 $X_7$ はFである、配列番号67のアミノ酸配列からなる抗体様結合タンパク質を含まない。

## 【 0 1 1 9 】

したがって、一実施形態において、本明細書の上記で定義される抗体様結合タンパク質は、式[ I I I ]のポリペプチドが配列番号59のアミノ酸配列からなる抗体様結合タンパク質を含まず、および/または

本明細書の上記で定義される抗体様結合タンパク質は、式[ I I I ]のポリペプチドが配列番号61または配列番号65のアミノ酸配列からなる抗体様結合タンパク質を含まない。

## 【 0 1 2 0 】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は：

a) 配列番号57のアミノ酸配列からなる式[ I V ]の1つのポリペプチド；および



配列番号 59 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、ならびに / または

b) 配列番号 55 のアミノ酸配列からなる式 [ I ] の 1 つのポリペプチド ; ならびに配列番号 61 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、および配列番号 63 のポリペプチド F<sub>c</sub> スタンブ ( F<sub>c</sub> 3 ) ; ならびに / または

c) 配列番号 55 のアミノ酸配列からなる式 [ I ] の 1 つのポリペプチド ; ならびに配列番号 65 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、および配列番号 64 のポリペプチド F<sub>c</sub> スタンブ ( F<sub>c</sub> 3 )

を含まない。

【 0 1 2 1 】

抗体様結合タンパク質は、いわゆる「 h z 2 0 G 6 × h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質であり、これはなぜなら、ポリペプチド [ I ] が、ヒト化抗 C D 1 2 3 抗体「 7 G 3 」(「 h z 7 G 3 」とも称される) およびヒト化抗 C D 3 抗体「 2 0 G 6 」(「 h z 2 0 G 6 」とも称される) それぞれの軽鎖の可変ドメインである V<sub>D</sub> 1 および V<sub>D</sub> 2 を含み、ポリペプチド [ I I I ] が、ヒト化抗 C D 3 抗体「 2 0 G 6 」(「 h z 2 0 G 6 」とも称される) およびヒト化抗 C D 1 2 3 抗体「 7 G 3 」(「 h z 7 G 3 」とも称される) それぞれの重鎖の可変ドメインである V<sub>D</sub> 3 および V<sub>D</sub> 4 を含むためである。

【 0 1 2 2 】

より具体的には、抗体様結合タンパク質は、いわゆる「 h z 2 0 G 6 × h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質であり、これはなぜなら、式 [ I ] によって表される構造を有するポリペプチド鎖は、ヒト化抗 C D 1 2 3 抗体「 7 G 3 」(「 h z 7 G 3 」とも称される) の軽鎖可変ドメインである配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub> 1、およびヒト化抗 C D 3 抗体「 2 0 G 6 」の軽鎖可変ドメインアミノ酸配列 V<sub>L</sub> 1 c である配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub> 2 を含み、式 [ I I I ] によって表される構造を有するポリペプチド鎖は、ヒト化抗 C D 3 抗体「 2 0 G 6 」の重鎖可変ドメインバリエーション V<sub>H</sub> 1 d である配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3、およびヒト化抗 C D 1 2 3 抗体「 7 G 3 」(「 h z 7 G 3 」とも称される) のバリエーション重鎖可変ドメインである配列番号 52 の配列の V<sub>D</sub> 4 を含むためである。

【 0 1 2 3 】

上記で定義された通り、式 [ I I I ] によって表される構造を有するポリペプチド鎖は、配列番号 68 の配列の F<sub>c</sub> を含み、ここで X<sub>1</sub> は Y または C であり、X<sub>2</sub> は S または C であり、X<sub>3</sub> は T、S または W であり、X<sub>4</sub> は A または L であり、X<sub>5</sub> は V または Y であり、X<sub>6</sub> は H または R であり、X<sub>7</sub> は Y または F である。

【 0 1 2 4 】

当業者であれば、

- X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は T であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y である配列番号 68 の F<sub>c</sub> の配列は、配列番号 60 のいわゆる野生型 F<sub>c</sub> 配列であること、および

- X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は T であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である配列番号 68 の F<sub>c</sub> の配列は、R F 突然変異を含む F<sub>c</sub> 配列であること、および

- X<sub>1</sub> は C であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は S であり、X<sub>4</sub> は A であり、X<sub>5</sub> は V であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y である配列番号 68 の F<sub>c</sub> の配列は、本明細書の上記の「定義」の章で定義されるようなホール突然変異を含む F<sub>c</sub> 配列であり、配列番号 75 の F<sub>c</sub> ドメインを生じること、および

- X<sub>1</sub> は C であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は S であり、X<sub>4</sub> は A であり、X<sub>5</sub> は V であり、X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である配列番号 68 の F<sub>c</sub> の配列は、すでに本明細書の上記で定義されるようなホール突然変異および R F 突然変異を含む F<sub>c</sub> 配列であり、配列番号 79 の F<sub>c</sub> ドメインを生じること、および

- X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は C であり、X<sub>3</sub> は W であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y である配列番号 68 の F<sub>c</sub> の配列は、すでに本明細書の上

10

20

30

40

50

記の「定義」の章で定義されるようなノブ突然変異を含む F<sub>c</sub> 配列であり、配列番号 66 の F<sub>c</sub> ドメインを生じること、および

- X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は C であり、X<sub>3</sub> は W であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である配列番号 68 の F<sub>c</sub> の配列は、すでに本明細書の上記の「定義」の章で定義されるようなノブ突然変異および R F 突然変異を含む F<sub>c</sub> 配列であり、配列番号 62 の F<sub>c</sub> ドメインを生じることが理解していると予想される。

#### 【0125】

F<sub>c</sub> ドメインのいずれかにおいて、すなわち配列番号 68 の F<sub>c</sub> および F<sub>c</sub> および配列番号 70 の F<sub>c</sub> 2 ドメイン（本明細書の以下では、配列番号 70 の F<sub>c</sub> 2 ドメインが導入される）において、X<sub>1</sub> は Y または C であり、X<sub>2</sub> は S または C であり、X<sub>3</sub> は T、S または W であり、X<sub>4</sub> は A または L であり、X<sub>5</sub> は V または Y であり、X<sub>6</sub> は H または R であり、X<sub>7</sub> は Y または F であるという一般的な定義は、X<sub>1</sub> は Y または C であり、X<sub>2</sub> は S または C であり、X<sub>3</sub> は T、S または W であり、X<sub>4</sub> は A または L であり、X<sub>5</sub> は V または Y であり、X<sub>6</sub> は H または R であり、X<sub>7</sub> は Y または F である全ての実施形態において、以下

- X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は T であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y である定義（野生型に対応）、または

- X<sub>1</sub> は C であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は S であり、X<sub>4</sub> は A であり、X<sub>5</sub> は V である定義（「ホール」突然変異に対応）、または

- X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は C であり、X<sub>3</sub> は W であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y である定義（「ノブ」突然変異に対応）、および

- X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y である定義（野生型に対応する）、または

- X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である定義（「R F」突然変異に対応）

に従って置き換えることができることがさらに理解されると予想される。

#### 【0126】

したがって、さらなる例証のために、一実施形態において、本発明は、2つの抗原結合部位を形成する2つのポリペプチド鎖を含む、ヒト C D 3 およびヒト C D 1 2 3 に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、1つのポリペプチド鎖は、式 [I] :

V D 1 - L 1 - V D 2 - L 2 - C L [I]

によって表される構造を有し、1つのポリペプチド鎖は、式 [III] :

V D 3 - L 3 - V D 4 - L 4 - C H 1 - F c [III]

によって表される構造を有し、ここで :

a) 式 [I] の1つのポリペプチドが、配列番号 54 の配列の V D 1、配列番号 56 の配列の L 1、配列番号 10 の配列の V D 2、配列番号 56 の配列の L 2、配列番号 18 の配列の C L を含む配列番号 55 のアミノ酸配列、または配列番号 54 の配列の V D 1 の配列番号 48、「W A S」および配列番号 49 の配列の3つの C D R、ならびに配列番号 10 の配列の V D 2 の配列番号 11、「K V S」および配列番号 8 の配列の3つの C D R が不変である、配列番号 55 に少なくとも 85 % 同一な配列からなり ;

b) 式 [III] の1つのポリペプチドが、配列番号 9 の配列の V D 3、0 個のアミノ酸からなる L 3、配列番号 52 の配列の V D 4、0 個のアミノ酸からなる L 4、配列番号 19 の配列の C H 1、および配列番号 68 の配列の F c を含み、ここで

X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は T であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であるか、もしくは

X<sub>1</sub> は C であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は S であり、X<sub>4</sub> は A であり、X<sub>5</sub> は V であるか、もしくは

X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は C であり、X<sub>3</sub> は W であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y であるか、もしくは

X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である、配列番号 67 のアミノ酸配列、または

配列番号 52 の配列の V D 4 の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列

の3つのCDR、ならびに配列番号9の配列のVD3の配列番号5、配列番号6、配列番号7の配列の3つのCDRが不変であり、前記アミノ酸X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>およびX<sub>7</sub>は上記で定義された通りである、配列番号67に少なくとも85%同一な配列

からなり、ここで式[ I ]のポリペプチドおよび式[ I I I ]のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖 - 重鎖対を形成する、抗体様結合タンパク質を指す。

【0127】

さらなる実施形態において、第2のFcドメイン(Fc<sub>2</sub>と称される)は、抗体様結合タンパク質CODV-Fabの式[ I ]のポリペプチドに付加される。

【0128】

したがって、一実施形態において、式[ I ]のポリペプチドは、Fcドメイン(Fc<sub>2</sub>)をさらに含む。同じ実施形態において、リンカーL<sub>5</sub>が、CLと式[ I ]のポリペプチド鎖のFc<sub>2</sub>ドメインとの間に存在し、式[ I V ]のポリペプチド鎖が生じる。

【0129】

1つの特定の実施形態において、式[ I ]のポリペプチドは、X<sub>1</sub>はYまたはCであり、X<sub>2</sub>はSまたはCであり、X<sub>3</sub>はT、SまたはWであり、X<sub>4</sub>はAまたはLであり、X<sub>5</sub>はVまたはYであり、X<sub>6</sub>はHまたはRであり、X<sub>7</sub>はYまたはFである配列番号70のFc<sub>2</sub>ドメインをさらに含む。

【0130】

したがって、本発明はさらに、2つの抗原結合部位を形成する2つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質であって、1つのポリペプチド鎖は、式[ I V ]：

VD1-L1-VD2-L2-CL-L5-Fc<sub>2</sub>[ I V ]

によって表される構造を有し、1つのポリペプチド鎖は、式[ I I I ]：

VD3-L3-VD4-L4-CH1-Fc [ I I I ]

によって表される構造を有し、ここで：

a) 式[ I V ]の1つのポリペプチドが、式[ I ]によって表されるポリペプチド鎖に関して上記で定義された通りのVD1、L1、VD2、L2およびCL、ならびに0個のアミノ酸からなるL<sub>5</sub>、ならびに配列番号70の配列のFc<sub>2</sub>を含み、ここでX<sub>1</sub>はYもしくはCであり、X<sub>2</sub>はSもしくはCであり、X<sub>3</sub>はT、SもしくはWであり、X<sub>4</sub>はAもしくはLであり、X<sub>5</sub>はVもしくはYであり、X<sub>6</sub>はHもしくはRであり、X<sub>7</sub>はYもしくはFである、配列番号71のアミノ酸配列、または

配列番号54の配列のVD1の配列番号48、「WAS」および配列番号49の配列の3つのCDR、ならびに配列番号10の配列のVD2の配列番号11、「KVS」および配列番号8の配列の3つのCDRが不変であり、式[ I V ]によって表される前記ポリペプチド鎖中の配列番号71の前記アミノ酸X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>およびX<sub>7</sub>は上記で定義された通りである、配列番号71に少なくとも85%同一な配列からなり；

b) 式[ I I I ]の1つのポリペプチドが、配列番号9の配列のVD3、0個のアミノ酸からなるL<sub>3</sub>、配列番号52の配列のVD4、0個のアミノ酸からなるL<sub>4</sub>、配列番号19の配列のCH1、および配列番号68の配列のFcを含み、ここでX<sub>1</sub>はYもしくはCであり、X<sub>2</sub>はSもしくはCであり、X<sub>3</sub>はT、SもしくはWであり、X<sub>4</sub>はAもしくはLであり、X<sub>5</sub>はVもしくはYであり、X<sub>6</sub>はHまたはRであり、X<sub>7</sub>はYもしくはFである、配列番号67のアミノ酸配列、または

配列番号52の配列のVD4の配列番号50、配列番号53、および配列番号51の配列の3つのCDR、ならびに配列番号9の配列のVD3の配列番号5、配列番号6、配列番号7の配列の3つのCDRが不変であり、配列番号67における前記アミノ酸X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>およびX<sub>7</sub>は上記で定義された通りである、配列番号67に少なくとも85%同一な配列

からなり、ここで式[ I V ]のポリペプチドおよび式[ I I I ]のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖 - 重鎖対を形成する、抗体様結合タンパク質を指す。

【0131】

10

20

30

40

50

このC O D Vフォーマットは、式 [ I I I ] および [ I V ] によって表されるポリペプチド鎖がそれぞれそれぞれの F c 2 および F c 領域を介して二量体化しているものであり、本明細書ではC O D V - F a b - T L と称される。

#### 【 0 1 3 2 】

関連する実施形態において、本明細書の上記で定義される抗体様結合タンパク質は、

a ) 式 [ I V ] のポリペプチドが、式 [ I ] によって表されるポリペプチド鎖に関して上記で定義された通りの V D 1、L 1、V D 2、L 2 および C L、ならびに 0 個のアミノ酸からなる L 5、ならびに配列番号 7 0 の配列の F c 2 を含み、ここで X 1 は Y であり、X 2 は S であり、X 3 は T であり、X 4 は L であり、X 5 は Y であり、X 6 は R であり、X 7 は F である、配列番号 7 1 のアミノ酸配列からなり、

10

b ) 式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 9 の配列の V D 3、0 個のアミノ酸からなる L 3、配列番号 5 2 の配列の V D 4、0 個のアミノ酸からなる L 4、配列番号 1 9 の配列の C H 1、および配列番号 6 8 の配列の F c を含み、ここで X 1 は Y であり、X 2 は S であり、X 3 は T であり、X 4 は L であり、X 5 は Y であり、X 6 は H であり、X 7 は Y である、配列番号 6 7 のアミノ酸配列からなる、抗体様結合タンパク質を含まない。

#### 【 0 1 3 3 】

したがって、一実施形態において、本明細書の上記で定義される抗体様結合タンパク質は、

a ) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 5 7 のアミノ酸配列からなる抗体様結合タンパク質、および

b ) 式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 5 9 のアミノ酸配列からなる抗体様結合タンパク質を含まない。

20

#### 【 0 1 3 4 】

さらなる関連する実施形態において、本発明は、2つの抗原結合部位を形成する2つのポリペプチド鎖を含む、ヒト C D 3 およびヒト C D 1 2 3 に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、1つのポリペプチド鎖は、式 [ I V ] :

V D 1 - L 1 - V D 2 - L 2 - C L - L 5 - F c 2 [ I V ]

によって表される構造を有し、1つのポリペプチド鎖は、式 [ I I I ] :

V D 3 - L 3 - V D 4 - L 4 - C H 1 - F c [ I I I ]

によって表される構造を有し、ここで :

30

a ) 式 [ I V ] の前記ポリペプチドは :

( i )

- ・配列番号 5 4 の配列の V D 1、
- ・配列番号 5 6 の配列の L 1、
- ・配列番号 1 0 の配列の V D 2、
- ・配列番号 5 6 の配列の L 2、
- ・配列番号 1 8 の配列の C L、
- ・0 個のアミノ酸からなる L 5、および
- ・配列番号 7 0 の配列からなる F c 2

を含み、

40

・ここで X 1 は Y であり、X 2 は S であり、X 3 は T であり、X 4 は L であり、X 5 は Y であり、X 6 は H であり、X 7 は Y であるか、または

・ここで X 1 は Y であり、X 2 は C であり、X 3 は W であり、X 4 は L であり、X 5 は Y であり、X 6 は H であり、X 7 は Y であるか、または

・ここで X 1 は Y であり、X 2 は C であり、X 3 は W であり、X 4 は L であり、X 5 は Y であり、X 6 は R であり、X 7 は F である、配列番号 7 1 のアミノ酸配列、

または

( i i )

・配列番号 5 4 の配列の V D 1 の配列番号 4 8、「W A S」および配列番号 4 9 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

50

・配列番号 10 の配列の V D 2 の配列番号 11、「K V S」および配列番号 8 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

・配列番号 71 におけるアミノ酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub> および X<sub>7</sub> は上記の a) (i) で定義された通りである、配列番号 71 に少なくとも 85 % 同一な配列からなり、

b) 式 [ I I I ] の前記ポリペプチドは：

( i )

- ・配列番号 9 の配列の V D 3、
- ・0 個のアミノ酸からなる L<sub>3</sub>、
- ・配列番号 52 の配列の V D 4、
- ・0 個のアミノ酸からなる L<sub>4</sub>、
- ・配列番号 19 の配列の C H 1、および
- ・配列番号 68 の配列からなる F<sub>c</sub>

を含み、ここで X<sub>1</sub> は Y もしくは C であり、X<sub>2</sub> は S もしくは C であり、X<sub>3</sub> は T、S もしくは W であり、X<sub>4</sub> は A もしくは L であり、X<sub>5</sub> は V もしくは Y であり、X<sub>6</sub> は H もしくは R であり、X<sub>7</sub> は Y もしくは F である、配列番号 67 のアミノ酸配列、

または

( i i )

・配列番号 52 の配列の V D 4 の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

・配列番号 9 の配列の V D 3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

・配列番号 67 のアミノ酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub> および X<sub>7</sub> は上記の b) (i) で定義された通りである、配列番号 67 に少なくとも 85 % 同一な配列

からなり、ここで式 [ I V ] のポリペプチドおよび式 [ I I I ] のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖 - 重鎖対を形成する、抗体様結合タンパク質を指す。

【 0 1 3 5 】

さらなる関連する実施形態において、本発明は、2 つの抗原結合部位を形成する 2 つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質であって、1 つのポリペプチド鎖は、式 [ I V ]：

V D 1 - L<sub>1</sub> - V D 2 - L<sub>2</sub> - C L - L<sub>5</sub> - F<sub>c</sub> 2 [ I V ]

によって表される構造を有し、1 つのポリペプチド鎖は、式 [ I I I ]：

V D 3 - L<sub>3</sub> - V D 4 - L<sub>4</sub> - C H 1 - F<sub>c</sub> [ I I I ]

によって表される構造を有し、ここで：

a) 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドは、上記で定義された通りの V D 1、L<sub>1</sub>、V D 2、L<sub>2</sub> および C L、ならびに 0 個のアミノ酸からなる L<sub>5</sub>、ならびに配列番号 70 の配列の F<sub>c</sub> 2 を含み、ここで

X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は T であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y であるか、もしくは

X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は C であり、X<sub>3</sub> は W であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y であるか、もしくは

X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は C であり、X<sub>3</sub> は W であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である、配列番号 71 のアミノ酸配列、または

配列番号 54 の配列の V D 1 の配列番号 48、「W A S」および配列番号 49 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 10 の配列の V D 2 の配列番号 11、「K V S」および配列番号 8 の配列の 3 つの C D R が不変であり、配列番号 71 の前記アミノ酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub> および X<sub>7</sub> は上記で定義された通りである、配列番号 71 に少なくとも 85 % 同一な配列からなり、

b) 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 9 の配列の V D 3、0 個のアミノ酸からなる L<sub>3</sub>、配列番号 52 の配列の V D 4、0 個のアミノ酸からなる L<sub>4</sub>、配列番号 1

10

20

30

40

50

9の配列のC<sub>H</sub>1、および配列番号68の配列のF<sub>c</sub>を含み、ここでX<sub>1</sub>はYもしくはCであり、X<sub>2</sub>はSもしくはCであり、X<sub>3</sub>はT、SもしくはWであり、X<sub>4</sub>はAもしくはLであり、X<sub>5</sub>はVもしくはYであり、X<sub>6</sub>はHもしくはRであり、X<sub>7</sub>はYもしくはFである、配列番号67のアミノ酸配列、または

配列番号52の配列のV<sub>D</sub>4の配列番号50、配列番号53、および配列番号51の配列の3つのC<sub>D</sub>R、ならびに配列番号9の配列のV<sub>D</sub>3の配列番号5、配列番号6、配列番号7の配列の3つのC<sub>D</sub>Rが不変であり、前記配列番号67のアミノ酸X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>およびX<sub>7</sub>は上記で定義された通りである、配列番号67に少なくとも85%同一な配列

からなり、ここで式[IV]のポリペプチドおよび式[III]のポリペプチドは、クロソオーバー軽鎖-重鎖対を形成する、抗体様結合タンパク質を指す。

10

#### 【0136】

当業者であれば、一方のF<sub>c</sub>ドメインが野生型配列であるかまたはノブ突然変異を有する場合、他方のF<sub>c</sub>ドメインは、野生型であるかまたはホール突然変異を有するかのいずれかであることを理解していると予想される。

#### 【0137】

したがって、1つのさらなる関連する実施形態において、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、

a) 式[IV]の1つのポリペプチドであって、上記で定義された通りのV<sub>D</sub>1、L<sub>1</sub>、V<sub>D</sub>2、L<sub>2</sub>およびC<sub>L</sub>、ならびに0個のアミノ酸からなるL<sub>5</sub>、ならびに配列番号70の配列のF<sub>c</sub>2を含む配列番号71のアミノ酸配列からなり、ここで

20

X<sub>1</sub>はYであり、X<sub>2</sub>はSであり、X<sub>3</sub>はTであり、X<sub>4</sub>はLであり、X<sub>5</sub>はYであり、X<sub>6</sub>はHであり、X<sub>7</sub>はYであるか、または

X<sub>1</sub>はYであり、X<sub>2</sub>はCであり、X<sub>3</sub>はWであり、X<sub>4</sub>はLであり、X<sub>5</sub>はYであり、X<sub>6</sub>はHであり、X<sub>7</sub>はYであるか、または

X<sub>1</sub>はYであり、X<sub>2</sub>はCであり、X<sub>3</sub>はWであり、X<sub>4</sub>はLであり、X<sub>5</sub>はYであり、X<sub>6</sub>はRであり、X<sub>7</sub>はFである、ポリペプチド、および

b) 式[III]の1つのポリペプチドであって、配列番号9の配列のV<sub>D</sub>3、0個のアミノ酸からなるL<sub>3</sub>、配列番号52の配列のV<sub>D</sub>4、0個のアミノ酸からなるL<sub>4</sub>、配列番号19の配列のC<sub>H</sub>1、および配列番号68の配列のF<sub>c</sub>を含む配列番号67のアミノ酸配列からなり、ここで

30

X<sub>1</sub>はYであり、X<sub>2</sub>はSであり、X<sub>3</sub>はTであり、X<sub>4</sub>はLであり、X<sub>5</sub>はYであるか、または

X<sub>1</sub>はCであり、X<sub>2</sub>はSであり、X<sub>3</sub>はSであり、X<sub>4</sub>はAであり、X<sub>5</sub>はVであり、X<sub>6</sub>はHであり、X<sub>7</sub>はYであるか、または

X<sub>6</sub>はRであり、X<sub>7</sub>はFである、ポリペプチドを含む。

#### 【0138】

したがって、1つの特定の実施形態において、本発明はさらに、2つの抗原結合部位を形成する2つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質であって、1つのポリペプチド鎖は、式[IV]：

40

V<sub>D</sub>1 - L<sub>1</sub> - V<sub>D</sub>2 - L<sub>2</sub> - C<sub>L</sub> - L<sub>5</sub> - F<sub>c</sub>2 [IV]

によって表される構造を有し、1つのポリペプチド鎖は、式[III]：

V<sub>D</sub>3 - L<sub>3</sub> - V<sub>D</sub>4 - L<sub>4</sub> - C<sub>H</sub>1 - F<sub>c</sub> [III]

によって表される構造を有し、ここで：

a) 式[IV]の1つのポリペプチドが、式[I]によって表されるポリペプチド鎖に関して上記で定義された通りのV<sub>D</sub>1、L<sub>1</sub>、V<sub>D</sub>2、L<sub>2</sub>およびC<sub>L</sub>、ならびに0個のアミノ酸からなるL<sub>5</sub>、ならびに配列番号70の配列のF<sub>c</sub>2を含み、ここで

X<sub>1</sub>はYであり、X<sub>2</sub>はCであり、X<sub>3</sub>はWであり、X<sub>4</sub>はLであり、X<sub>5</sub>はYであり、X<sub>6</sub>はHであり、X<sub>7</sub>はYであるか、もしくはX<sub>6</sub>はRであり、X<sub>7</sub>はFである、配列番

50

号 7 1 のアミノ酸配列、または

配列番号 5 4 の配列の V<sub>D</sub> 1 の配列番号 4 8、「W A S」および配列番号 4 9 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 1 0 の配列の V<sub>D</sub> 2 の配列番号 1 1、「K V S」および配列番号 8 の配列の 3 つの C D R が不変であり、式 [ I V ] によって表される前記ポリペプチド鎖中の配列番号 7 0 における前記アミノ酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub> および X<sub>7</sub> は上記で定義された通りである、配列番号 7 1 に少なくとも 8 5 % 同一な配列からなり；

b) 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドが、配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3、0 個のアミノ酸からなる L<sub>3</sub>、配列番号 5 2 の配列の V<sub>D</sub> 4、0 個のアミノ酸からなる L<sub>4</sub>、配列番号 1 9 の配列の C H 1、および配列番号 6 8 の配列の F<sub>c</sub> を含み、ここで

X<sub>1</sub> は C であり、X<sub>2</sub> は S であり、X<sub>3</sub> は S であり、X<sub>4</sub> は A であり、X<sub>5</sub> は V であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y であるか、もしくは X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である、配列番号 6 7 のアミノ酸配列、または

配列番号 5 2 の配列の V<sub>D</sub> 4 の配列番号 5 0、配列番号 5 3、および配列番号 5 1 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R が不変であり、配列番号 6 7 における前記アミノ酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub> および X<sub>7</sub> は上記で定義された通りである、配列番号 6 7 に少なくとも 8 5 % 同一な配列

からなり、ここで式 [ I V ] のポリペプチドおよび式 [ I I I ] のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖 - 重鎖対を形成する、抗体様結合タンパク質を指す。

#### 【 0 1 3 9 】

したがって、一実施形態において、抗体様結合タンパク質は、以下を含む：

a) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 8 1 または配列番号 8 1 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 6 0 または配列番号 6 0 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメインを含むこと、または

b) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 3 または配列番号 7 3 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 5 または配列番号 7 5 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメインを含むこと、または

c) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 7 または配列番号 7 7 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 5 または配列番号 7 5 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメインを含むこと、または

d) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 7 または配列番号 7 7 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 9 または配列番号 7 9 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメインを含むこと。

#### 【 0 1 4 0 】

したがって、1 つのさらなる実施形態において、抗体様結合タンパク質は、以下を含む：

i) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 3 または配列番号 7 3 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 5 または配列番号 7 5 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメインを含むこと、または

i i) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 7 または配列番号 7 7 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、

式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 9 または配列番号 7 9 に少なくとも 8 5 % 同一な配列の F<sub>c</sub> ドメインを含むこと。

#### 【 0 1 4 1 】

さらなる実施形態において、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、

a) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 8 1 の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 6 0 の F<sub>c</sub> ドメインを含む抗体様結合タンパク質、または

b) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 3 の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 5 の F<sub>c</sub> ドメインを含む抗体様結合タンパク質、または

c) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 7 の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 5 の F<sub>c</sub> ドメインを含む抗体様結合タンパク質、または

d) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 7 の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 9 の F<sub>c</sub> ドメインを含む抗体様結合タンパク質からなる群から選択される。

10

#### 【 0 1 4 2 】

さらなる実施形態において、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、

i) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 3 の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 5 の F<sub>c</sub> ドメインを含む抗体様結合タンパク質、または

ii) 式 [ I V ] のポリペプチドが、配列番号 7 7 の F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub> 2 ) を含み、式 [ I I I ] のポリペプチドが、配列番号 7 9 の F<sub>c</sub> ドメインを含む抗体様結合タンパク質からなる群から選択される。

20

#### 【 0 1 4 3 】

さらなる実施形態において、抗体様結合分子は：

a) 配列番号 8 0 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 5 4 の配列の V<sub>D</sub> 1 の配列番号 4 8、「W A S」および配列番号 4 9 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 1 0 の配列の V<sub>D</sub> 2 の配列番号 1 1、「K V S」および配列番号 8 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 8 0 のアミノ酸位置 4 8 1、4 8 6、4 9 8、5 0 0、5 3 9、5 6 7、5 6 8 が不変である、配列番号 8 0 に少なくとも 8 5 % 同一な配列

からなる、式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド；ならびに

配列番号 5 9 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 5 2 の配列の V<sub>D</sub> 4 の配列番号 5 0、配列番号 5 3、および配列番号 5 1 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 5 9 のアミノ酸位置 4 7 3、4 9 2、5 3 1、5 5 9、5 6 0、4 7 8、4 9 0 が不変である、配列番号 5 9 に少なくとも 8 5 % 同一な配列

30

からなる、式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド；または

b) 配列番号 7 2 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 5 4 の配列の V<sub>D</sub> 1 の配列番号 4 8、「W A S」および配列番号 4 9 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 1 0 の配列の V<sub>D</sub> 2 の配列番号 1 1、「K V S」および配列番号 8 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 7 2 のアミノ酸位置 4 8 1、4 8 6、4 9 8、5 0 0、5 3 9、5 6 7、5 6 8 が不変である、配列番号 7 2 に少なくとも 8 5 % 同一な配列

40

からなる、式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド；ならびに

配列番号 7 4 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 5 2 の配列の V<sub>D</sub> 4 の配列番号 5 0、配列番号 5 3、および配列番号 5 1 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 7 4 のアミノ酸位置 4 7 3、4 9 2、5 3 1、5 5 9、5 6 0、4 7 8、4 9 0 が不変である、配列番号 7 4 に少なくとも 8 5 % 同一な配列

からなる、式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド；または

50



c) 配列番号 76 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub>1 の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub>2 の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 76 におけるアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 76 に少なくとも 85% 同一な配列

からなる、式 [IV] の 1 つのポリペプチド；ならびに

配列番号 74 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 52 の配列の V<sub>D</sub>4 の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub>3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 74 のアミノ酸位置 473、492、531、559、560、478、490 が不変である、配列番号 74 に少なくとも 85% 同一な配列

からなる、式 [III] の 1 つのポリペプチド；または

d) 配列番号 76 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub>1 の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub>2 の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 76 におけるアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 76 に少なくとも 85% 同一な配列からなる、式 [IV] の 1 つのポリペプチド；ならびに

配列番号 78 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 52 の配列の V<sub>D</sub>4 の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub>3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 78 のアミノ酸位置 473、492、531、559、560、478、490 が不変である、配列番号 78 に少なくとも 85% 同一な配列

からなる、式 [III] の 1 つのポリペプチド

を含む。

【0144】

さらなる実施形態において、抗体様結合分子は：

i) 配列番号 72 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub>1 の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub>2 の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 72 のアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 72 に少なくとも 85% 同一な配列

からなる、式 [IV] の 1 つのポリペプチド；ならびに

配列番号 74 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 52 の配列の V<sub>D</sub>4 の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub>3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 74 のアミノ酸位置 473、492、531、559、560、478、490 が不変である、配列番号 74 に少なくとも 85% 同一な配列

からなる、式 [III] の 1 つのポリペプチド；または

ii) 配列番号 76 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub>1 の配列番号 48、「WAS」および配列番号 49 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub>2 の配列番号 11、「KVS」および配列番号 8 の配列の 3 つの CDR、ならびに配列番号 76 におけるアミノ酸位置 481、486、498、500、539、567、568 が不変である、配列番号 76 に少なくとも 85% 同一な配列

10

20

30

40

50

からなる、式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド ; ならびに

配列番号 78 のアミノ酸配列、もしくは

配列番号 52 の配列の V D 4 の配列番号 50、配列番号 53、および配列番号 51 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 9 の配列の V D 3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R、ならびに配列番号 78 のアミノ酸位置 473、492、531、559、560、478、490 が不変である、配列番号 78 に少なくとも 85 % 同一な配列

からなる、式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド

を含む。

【 0 1 4 5 】

さらなる実施形態において、抗体様結合タンパク質は :

i ) 配列番号 80 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド ; および

配列番号 59 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、

i i ) 配列番号 72 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド、および

配列番号 74 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、

i i i ) 配列番号 76 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド ; および

配列番号 74 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、ならびに

i v ) 配列番号 76 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド ; および

配列番号 78 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド

を含む。

【 0 1 4 6 】

さらなる実施形態において、抗体様結合タンパク質は :

a ) 配列番号 72 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド、および

配列番号 74 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、

b ) 配列番号 76 のアミノ酸配列からなる式 [ I V ] の 1 つのポリペプチド ; および

配列番号 78 のアミノ酸配列からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド

を含む。

【 0 1 4 7 】

一実施形態において、本明細書の上記で定義される式 [ I ] によって表される構造を有する 1 つのポリペプチド鎖および式 [ I I I ] によって表される構造を有する 1 つのポリペプチドを含む抗体様結合タンパク質は、F<sub>c</sub>ドメイン (と称される F<sub>c</sub>3) を含む第 3 のポリペプチド鎖をさらに含む。

【 0 1 4 8 】

当業者であれば、式 [ I I I ] によって表される構造を有する第 2 のポリペプチドは第 1 の F<sub>c</sub>ドメインを含むため、前記 F<sub>c</sub>3ドメインは、第 2 の F<sub>c</sub>ドメインと称される場合もあることを理解していると予想される。

【 0 1 4 9 】

したがって、一実施形態において、本発明は、2 つの抗原結合部位を形成する 3 つのポリペプチド鎖を含む、ヒト C D 3 およびヒト C D 1 2 3 に特異的に結合する抗体様結合タンパク質であって、

第 1 のポリペプチドは、式 [ I ] :

V D 1 - L 1 - V D 2 - L 2 - C L [ I ]

によって表される構造を有し、

第 2 のポリペプチド鎖は、式 [ I I I ] :

V D 3 - L 3 - V D 4 - L 4 - C H 1 - F c [ I I I ] ;

によって表される構造を有し、

第 3 のポリペプチド F<sub>c</sub>3 は、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリンの C H 2、C H 3 免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり ;

ここで、

a ) 式 [ I ] の前記ポリペプチドは、

10

20

30

40

50

( i )

- ・配列番号 5 4 の配列の V D 1、
- ・配列番号 5 6 の配列の L 1、
- ・配列番号 1 0 の配列の V D 2、
- ・配列番号 5 6 の配列の L 2、
- ・配列番号 1 8 の配列の C L

を含む配列番号 5 5 のアミノ酸配列、

または

( i i )

- ・配列番号 5 4 の配列の V D 1 の配列番号 4 8、「W A S」および配列番号 4 9 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

10

- ・配列番号 1 0 の配列の V D 2 の配列番号 1 1、「K V S」および配列番号 8 の配列の 3 つの C D R が不変である、配列番号 5 5 に少なくとも 8 5 % 同一な配列

からなり；

b ) 式 [ I I I ] の前記ポリペプチドは、

( i )

- ・配列番号 9 の配列の V D 3、
- ・ 0 個のアミノ酸からなる L 3、
- ・配列番号 5 2 の配列の V D 4、
- ・ 0 個のアミノ酸からなる L 4、
- ・配列番号 1 9 の配列の C H 1、および
- ・配列番号 6 8 の配列の F c

20

を含み、ここで X<sub>1</sub> は Y であり、X<sub>2</sub> は C であり、X<sub>3</sub> は W であり、X<sub>4</sub> は L であり、X<sub>5</sub> は Y であり、X<sub>6</sub> は H であり、X<sub>7</sub> は Y であるか、もしくは X<sub>6</sub> は R であり、X<sub>7</sub> は F である、

配列番号 6 7 のアミノ酸配列、

または

( i i )

- ・配列番号 5 2 の配列の V D 4 の配列番号 5 0、配列番号 5 3、および配列番号 5 1 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

30

- ・配列番号 9 の配列の V D 3 の配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7 の配列の 3 つの C D R が不変であり、

- ・アミノ酸 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub> および X<sub>7</sub> は上記の b ) ( i ) で定義された通りである、配列番号 6 7 に少なくとも 8 5 % 同一な配列

からなり、ここで：

- 式 [ I ] のポリペプチドおよび式 [ I I I ] のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖 - 重鎖対を形成し、

- 式 [ I I I ] のポリペプチドは、その F c ドメインを介して第 3 のポリペプチドとヘテロ二量体化しており、

- 前記第 3 のポリペプチド F c 3 は、配列番号 6 9 または配列番号 6 9 に少なくとも 8 5 % 同一な配列からなり、ここで配列番号 6 9 のアミノ酸位置 1 2 9、1 4 6、1 4 8、1 8 7、2 1 5、2 1 6 が不変である、抗体様結合タンパク質を指す。

40

【 0 1 5 0 】

したがって、一実施形態において、本発明は、2 つの抗原結合部位を形成する 3 つのポリペプチド鎖を含む抗体様結合タンパク質であって、

第 1 のポリペプチドは、式 [ I ]：

V D 1 - L 1 - V D 2 - L 2 - C L [ I ]

によって表される構造を有し、第 2 のポリペプチド鎖は、式 [ I I I ]：

V D 3 - L 3 - V D 4 - L 4 - C H 1 - F c [ I I I ]；

によって表される構造を有し、第 3 のポリペプチド F c 3 (「F c スタンプ」とも称され

50

る)は、免疫グロブリンヒンジ領域および免疫グロブリンのC<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3免疫グロブリン重鎖定常ドメインであり；

ここで、

a)式[ I ]の1つのポリペプチドが、配列番号54の配列のV<sub>D</sub>1、配列番号56の配列のL<sub>1</sub>、配列番号10の配列のV<sub>D</sub>2、配列番号56の配列のL<sub>2</sub>、配列番号18の配列のC<sub>L</sub>を含む配列番号55のアミノ酸配列、または配列番号54の配列のV<sub>D</sub>1の配列番号48、「WAS」および配列番号49の配列の3つのCDR、ならびに配列番号10の配列のV<sub>D</sub>2の配列番号11、「KVS」および配列番号8の配列の3つのCDRが不変である、配列番号55に少なくとも85%同一な配列からなり；

10

b)式[ I I I ]の1つのポリペプチドが、配列番号9の配列のV<sub>D</sub>3、0個のアミノ酸からなるL<sub>3</sub>、配列番号52の配列のV<sub>D</sub>4、0個のアミノ酸からなるL<sub>4</sub>、配列番号19の配列のC<sub>H</sub>1、および配列番号68の配列のF<sub>C</sub>を含み、ここで、X<sub>1</sub>はYであり、X<sub>2</sub>はCであり、X<sub>3</sub>はWであり、X<sub>4</sub>はLであり、X<sub>5</sub>はYであり、X<sub>6</sub>はHであり、X<sub>7</sub>はYであるか、またはX<sub>6</sub>はRであり、X<sub>7</sub>はFである、配列番号67のアミノ酸配列、または

配列番号52の配列のV<sub>D</sub>4の配列番号50、配列番号53、および配列番号51の配列の3つのCDR、ならびに配列番号9の配列のV<sub>D</sub>3の配列番号5、配列番号6、配列番号7の配列の3つのCDRが不変であり、前記アミノ酸X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>5</sub>、X<sub>6</sub>およびX<sub>7</sub>は上記で定義された通りである、配列番号67に少なくとも85%同一な配列

20

からなり、ここで式[ I ]のポリペプチドおよび式[ I I I ]のポリペプチドは、クロスオーバー軽鎖-重鎖対を形成し、

ここで式[ I I I ]のポリペプチドが、そのF<sub>C</sub>ドメインを介して第3のポリペプチドとヘテロ二量体化する、抗体様結合タンパク質を指す。

#### 【0151】

したがって、前記実施形態において、いわゆる「F<sub>C</sub>スタンプ」(F<sub>C</sub>3)は、式[ I I I ]のポリペプチドのF<sub>C</sub>領域とヘテロ二量体化する。このCODVフォーマットは、本明細書においてCODV-Fab-OLと称される。このコンストラクトは、CODV-Fabが凝集体を形成することを回避する。

30

#### 【0152】

したがって、1つの特定の実施形態において、上記で定義された抗体様結合タンパク質のF<sub>C</sub>3ドメインは、配列番号69からなる。

#### 【0153】

関連する実施形態において、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、

- 配列番号55からなる、または配列番号54の配列のV<sub>D</sub>1の配列番号48、「WAS」および配列番号49の配列の3つのCDR、ならびに配列番号10の配列のV<sub>D</sub>2の配列番号11、「KVS」および配列番号8の配列の3つのCDRが不変である、配列番号55に少なくとも85%同一な配列からなる、式[ I ]のポリペプチド；および

40

配列番号66の配列のF<sub>C</sub>ドメインを含む式[ I I I ]のポリペプチド、または配列番号52の配列のV<sub>D</sub>4の配列番号50、配列番号53、および配列番号51の配列の3つのCDR、ならびに配列番号9の配列のV<sub>D</sub>3の配列番号5、配列番号6、配列番号7の配列の3つのCDR、ならびに配列番号66のアミノ酸位置473、492、531、539、560、478、490が不変である、配列番号59に少なくとも85%同一な配列；および

- 配列番号69または配列番号69に少なくとも85%同一な配列からなり、配列番号69のアミノ酸位置129、146、148、187、215、216が不変である、F<sub>C</sub>スタンプ(F<sub>C</sub>3)を含む。

#### 【0154】

50

さらなる関連する実施形態において、抗体様結合タンパク質は、

- 配列番号 55 からなる式 [ I ] の 1 つのポリペプチド、
- 配列番号 65 からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、および
- 配列番号 69 または配列番号 69 に少なくとも 85 % 同一な配列からなり、配列番号 69 のアミノ酸位置 129、146、148、187、215、216 が不変である、F<sub>c</sub> スタンブ ( F<sub>c</sub> 3 )

を含む。

#### 【 0 1 5 5 】

さらなる関連する実施形態において、抗体様結合タンパク質は、

- 配列番号 55 からなる式 [ I ] の 1 つのポリペプチド、
- 配列番号 65 からなる式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、および
- 配列番号 69 または配列番号 69 に少なくとも 85 % 同一な配列からなる F<sub>c</sub> スタンブ ( F<sub>c</sub> 3 )

を含む。

#### 【 0 1 5 6 】

一部の実施形態において、抗体様結合タンパク質が、2つの F<sub>c</sub> ドメインを含有する場合、すなわち C O D V - F a b - T L 1 抗体様結合タンパク質 ( F<sub>c</sub> および F<sub>c</sub> 2 )、および C O D V - F a b - O L 1 抗体様結合タンパク質 ( F<sub>c</sub> および F<sub>c</sub> 3 ) の形態である場合、2つの F<sub>c</sub> ドメインは、同じ免疫グロブリンアイソタイプまたはアイソタイプサブクラスに属する。したがって、一部の実施形態において、C O D V - F a b - T L 1 の F<sub>c</sub> および F<sub>c</sub> 2 の両方、または C O D V - F a b - O L 1 の F<sub>c</sub> および F<sub>c</sub> 3 の両方が、I g G 1 サブクラスに属するか、または I g G 2 サブクラスに属するか、または I g G 3 サブクラスに属するか、または I g G 4 サブクラスに属する。

#### 【 0 1 5 7 】

C O D V - F a b - T L 1 「 h z 2 0 G 6 x 7 G 3 」抗体様結合タンパク質において、F<sub>c</sub> 配列および F<sub>c</sub> 2 配列は、I g G 1 骨格由来である。これらの C O D V - F a b - T L 1 バリエーションは、式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドおよび式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドを含有するかまたはそれからなる。本明細書に記載される全ての抗体様結合タンパク質は、エフェクター機能を有さない。これは、抗体様結合タンパク質が、I g G 1 サブクラスの 1 つまたはそれ以上の F<sub>c</sub> ドメイン (すなわち式 [ I I I ] において F<sub>c</sub>、式 [ I V ] において F<sub>c</sub> 2 および / または F<sub>c</sub> 3 ) を含有する場合、I g G 1 骨格の前記 1 つまたはそれ以上の F<sub>c</sub> ドメインは、F<sub>c</sub> エフェクター機能を壊滅する二重突然変異 L 2 3 4 A および L 2 3 5 A (いわゆる「L A L A 突然変異」) を含有することを意味する。

#### 【 0 1 5 8 】

上述したように、本発明の抗体様タンパク質の全ての F<sub>c</sub> ドメインは、二重突然変異 L 2 3 4 A および L 2 3 5 A を含有することから、前記突然変異は、本発明の抗体様タンパク質を含む文脈でさらに述べられることはないし、本発明の抗体様タンパク質の配列においてさらに示されることもない。

#### 【 0 1 5 9 】

一部の実施形態において、F<sub>c</sub> 領域は、本明細書の上記で定義された R F および / または「ノブ - イントゥー - ホール」突然変異をさらに含む。

#### 【 0 1 6 0 】

本発明の一実施形態によれば、式 [ I ] または式 [ I V ] のポリペプチドの V<sub>D</sub> 1 および V<sub>D</sub> 2 はどちらも、軽鎖の可変ドメイン、または重鎖の可変ドメインのいずれかであり、ポリペプチド [ I I I ] の V<sub>D</sub> 3 および V<sub>D</sub> 4 はどちらも、重鎖または軽鎖の可変ドメインである。この交換可能性はまた、「スワップ可能性」とも称され、したがって本発明の抗体様結合タンパク質のクロスオーバー二重可変 ( C O D V ) 立体配置を決定する。上記の定義に従って、V<sub>D</sub> 1 および V<sub>D</sub> 4 は、第 1 の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の可変ドメインであり、V<sub>D</sub> 2 および V<sub>D</sub> 3 は、第 2 の免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の可変ドメインであることから、V<sub>D</sub> 1 および V<sub>D</sub> 4 は、同源のドメインとみなされることにな

10

20

30

40

50

り、 $V_{D2}$  および  $V_{D3}$  も同様である。

【0161】

したがって、用語「クロスオーバー」は、その同源の可変ドメインである式 [III] のポリペプチドの  $V_{D4}$  または  $V_{D3}$  に対する、式 [I] または式 [IV] のポリペプチドの  $V_{D1}$  または  $V_{D2}$  のスワップされたアライメントを指す。1つの特定の実施形態において、 $V_{D1}$  および  $V_{D2}$  は軽鎖可変ドメインであり、 $V_{D3}$  および  $V_{D4}$  は重鎖可変ドメインである。

【0162】

本発明の場面において、数々の抗 CD3 / 抗 CD123 抗体様結合タンパク質、いわゆる「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質を生成し、特に：

CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、  
 CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、  
 CODV - Fab - TL1、  
 CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール、  
 CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RF GSなし  
 を生成した。

【0163】

1つの特定の実施形態において、本発明は、CODV - Fab - TL1 抗体様結合タンパク質 CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF および CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール、より具体的には、CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF に言及する。これらの抗体様結合タンパク質は全て、ノブ - イントゥー - ホール突然変異を含有し、ここでノブ突然変異は、軽鎖の、すなわちポリペプチド IV の  $F_c$  領域に配置され、ホール突然変異は、重鎖、すなわちポリペプチド III に配置される。前記抗体様結合タンパク質は、RF 突然変異をさらに含んでもよい。本明細書の上記で述べられた通り、ノブ - イントゥー - ホール突然変異は、抗体様結合タンパク質のヘテロ二量体の量を増加させる。

【0164】

いわゆる CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール「hz20G6xhz7G3」抗体様結合タンパク質は：

- 式 [IV] の1つのポリペプチドであって、配列番号54の配列の  $V_{D1}$ 、配列番号56の配列の  $L_1$ 、配列番号10の配列の  $V_{D2}$ 、配列番号56の配列の  $L_2$ 、配列番号18の配列の  $C_L$ 、0個のアミノ酸を含有する  $L_5$ 、および配列番号73の配列の  $F_c2$  (下線で示される) を含むアミノ酸配列

【化5】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
 RESGVPDFRFGSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGKLEIKGGSGS  
SGSGGDIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
 KVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGGTQYPFTFGSGTKVEIKG  
SGSGSGSGGRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
 GNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
 GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
 DSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG

(配列番号72、リンカーは太字と下線で示される) であるポリペプチド、および

- 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の  $V_D 3$ 、0 個のアミノ酸である  $L_3$ 、配列番号 52 の配列の  $V_D 4$  (イタリックで)、0 個のアミノ酸である  $L_4$ 、配列番号 19 の配列の  $C_H 1$ 、および  $F_c$  (下線で示される) の配列番号 75 の配列を含むアミノ酸配列

【化 6】

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQGTL  
VTVSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIP  
SSGATFYNQKFKGQVTISADKSI STTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGG  
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPEAAGGPGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF  
LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

(配列番号 74) であるポリペプチドを含む。

20

【0165】

前記抗体様結合タンパク質は、CODV - Fab - TL のフォーマットであり、すなわち、式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドおよび式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドを含有するかまたはそれからなる。

【0166】

配列番号 58 の配列の式 [ I V ] のポリペプチドの  $F_c 2$  配列は、アミノ酸位置 116 および 117 (上記において太字) に RF 突然変異を含有する。

【0167】

さらに、その  $F_c$  および  $F_c 2$  配列は、「ノブ - イントゥー - ホール」技術に従って操作されており、 $F_c 2$  ドメインは、これまでにノブ突然変異として記載された配列番号 73 における S134C および T146W 突然変異をさらに含有し (太字で示される)、 $F_c$  は、これまでにホール突然変異として記載された配列番号 75 における Y134C、T151S、L153A、Y192V をさらに含有する。

30

【0168】

いわゆる CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF 「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質は：

- 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 54 の配列の  $V_D 1$ 、配列番号 56 の配列の  $L_1$ 、配列番号 10 の配列の  $V_D 2$ 、配列番号 56 の配列の  $L_2$ 、配列番号 18 の配列の  $C_L$ 、0 個のアミノ酸を含有する  $L_5$ 、および配列番号 77 の配列の  $F_c 2$  (下線で示される) を含むアミノ酸配列

40

## 【化 7】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GSGSGS**  
**SGSGGG**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
 KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**G**  
**GSGSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
 GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

(配列番号 76、リンカーは太字と下線で示される)である、ポリペプチド; および  
 - 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3、0 個のア  
 ミノ酸である L<sub>3</sub>、配列番号 52 の配列の V<sub>D</sub> 4 (イタリックで)、0 個のアミノ酸であ  
 る L<sub>4</sub>、配列番号 19 の配列の C<sub>H</sub> 1、および配列番号 79 の配列の F<sub>C</sub> (下線で示され  
 る)を含むアミノ酸配列

20

## 【化 8】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
 YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGGQTL  
 VTVSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIP  
 SSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGG  
 GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF  
LVSCLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFYTKQSLSLSPG

30

(配列番号 78)である、ポリペプチド  
 を含む。

## 【0169】

式 [ I V ] のポリペプチドの F<sub>C</sub> 2 配列は、その配列番号 77 の配列における S<sub>134C</sub>  
 および T<sub>146W</sub> 突然変異を含有する。式 [ I I I ] のポリペプチドの F<sub>C</sub> 配列は、その  
 配列番号 79 の配列に、突然変異 Y<sub>134C</sub>、T<sub>151S</sub>、L<sub>153A</sub>、Y<sub>192V</sub> (ホ  
 ール突然変異) および R<sub>F</sub> 突然変異を含有する。

40

## 【0170】

いわゆる C O D V - F a b - T L 1 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」 抗体様結合タンパク質  
 は:

- 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub> 1、配列番号  
 56 の配列の L<sub>1</sub>、配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub> 2、配列番号 56 の配列の L<sub>2</sub>、配列番号  
 18 の配列の C<sub>L</sub>、0 個のアミノ酸を含有する L<sub>5</sub>、および配列番号 81 の配列の F<sub>C</sub> 2  
 (下線で示される)を含むアミノ酸配列

50



## 【化 9】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGSGS**  
**SGSGG**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
 KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**G**  
**SGSGSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
 GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**D**  
**KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD**  
**GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK**  
**GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD**  
**SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

10

(配列番号 80、リンカーは太字と下線で示される)である、ポリペプチド; および  
 - 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3、0 個のア  
 ミノ酸である L<sub>3</sub>、配列番号 52 の配列の V<sub>D</sub> 4 (イタリックで)、0 個のアミノ酸であ  
 る L<sub>4</sub>、配列番号 19 の配列の C<sub>H</sub> 1、および配列番号 60 の配列の F<sub>C</sub> (下線で示され  
 る)を含むアミノ酸配列

## 【化 10】

20

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
 YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGGQTL  
 VTVSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIP  
 SSGATFYNQKFKGQVTISADKSI**STTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGQ**  
**GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH**  
**TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV**EPKSCDKTHTCPP****  
**CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA**  
**KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP**  
**QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF**  
**LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

30

(配列番号 59) である、ポリペプチド  
 を含む。

## 【0171】

いわゆる CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール「hz 20 G 6 x hz 7 G 3」抗体様  
 結合タンパク質は:

- 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub> 1、配列番号  
 56 の配列の L<sub>1</sub>、配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub> 2、配列番号 56 の配列の L<sub>2</sub>、配列番号  
 18 の配列の C<sub>L</sub>、0 個のアミノ酸を含有する L<sub>5</sub>、および配列番号 77 の配列の F<sub>C</sub> 2  
 (下線で示される)を含むアミノ酸配列

40

## 【化 1 1】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLSQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIK**GGSGS**  
**SGSGG**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
 KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**G**  
**SGSGSGSGG**RVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
 GNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 DKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
 DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
 KGQPREPQVYTLPP**C**RDELTKNQVSL**W**CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV  
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN**HY**TQKSLSLSPG

10

(配列番号 7 6、リンカーは太字と下線で示される)である、ポリペプチド; および  
 - 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3、0 個のア  
 ミノ酸である L<sub>3</sub>、配列番号 5 2 の配列の V<sub>D</sub> 4 (イタリックで)、0 個のアミノ酸であ  
 る L<sub>4</sub>、配列番号 1 9 の配列の C<sub>H</sub> 1、および配列番号 7 5 の配列の F<sub>C</sub> (下線で示され  
 る)を含むアミノ酸配列

20

## 【化 1 2】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVWRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
 YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGGGTL  
 VTVSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGSYSTFDYYMKWARQMPGKGLEWMGDIIP  
 SSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYICARSHLLRASWFAYWGQ  
 GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPP  
 CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKKGQPREP  
 QV**CT**LPPSRDELTKNQVSL**SC**AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF  
 L**V**SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN**HY**TQKSLSLSPG

30

(配列番号 7 4)である、ポリペプチド  
 を含む。

## 【0 1 7 2】

式 [ I V ] のポリペプチドの F<sub>C</sub> 2 配列は、その配列番号 7 7 の配列における S 1 3 4 C  
 および T 1 4 6 W 突然変異を含有する。ポリペプチド I I I の F<sub>C</sub> ドメインは、配列番号  
 7 5 においてホール突然変異 Y 1 3 4 C、T 1 5 1 S、L 1 5 3 A、Y 1 9 2 V を含有す  
 る。

40

## 【0 1 7 3】

新たに開発された分子である C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F G S なし  
 (w o G S) は、C O D V - F a b - O L 1 a と比較して、F<sub>C</sub> スタンプ (F<sub>C</sub> 3) の N  
 末端に配置されたアミノ酸「G S」を含まない。

## 【0 1 7 4】

タンパク質 C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F G S なし (w o G S) は、  
 精製が簡単であり、プロテイン A 精製の後に多量のヘテロ二量体を有する (すなわち、図  
 4 では 8 8 % のヘテロ二量体が表示されている)。

50

## 【 0 1 7 5 】

いわゆる C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F G S なし「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質は：

- 式 [ I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 5 4 の配列の V D 1、配列番号 5 6 の配列の L 1、配列番号 1 0 の配列の V D 2、配列番号 5 6 の配列の L 2、および配列番号 1 8 の配列の C L を含むアミノ酸配列

## 【 化 1 3 】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK**GGSGS**  
**SGSGG**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**G**  
**SGSSSGSGG**RRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

( 配列番号 5 5 ) である、ポリペプチド；

- 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の V D 3、0 個のアミノ酸である L 3、配列番号 5 2 の配列の V D 4 ( イタリックと下線で示される )、0 個のアミノ酸である L 4、配列番号 1 9 の配列の C H 1、および配列番号 6 6 の配列の F c ( 下線で示される ) を含むアミノ酸配列：

20

## 【 化 1 4 】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQGT  
LTVTSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMDIIP  
SSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGQ  
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV**EPKSCDKTHTCPP**  
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

( 配列番号 6 5 ) である、ポリペプチド  
を含み、

- ここでいわゆる C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F G S なし「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質は、式 [ I I I ] のポリペプチドの F c 領域とヘテロ二量体化するアミノ酸配列：

40

## 【 化 1 5 】

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQV**CT**LPPSRDELTKNQVSL**SC**AVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFL**V**SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**RFT**QKSLSLSPG

( 配列番号 6 9 ) の F c スタンプ ( F c 3 ) をさらに含む。

## 【 0 1 7 6 】

50

配列番号 66 の配列の F<sub>c</sub> は、220 ~ 221 位に H Y 残基（上記において太字）およびノブ突然変異 S 139 C および T 151 W を含み、一方で配列番号 69 の配列の F<sub>c</sub> スタンプは、217 ~ 218 位に R F 残基（上記において太字）およびホール突然変異 Y 131 C、T 148 S、L 150 A および Y 189 V を含む。

【0177】

抗 C D 3 / 抗 C D 1 2 3 抗体様結合タンパク質、いわゆる「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」

抗体様結合タンパク質：

C O D V - F a b - T L 1 - R F、

C O D V - F a b - O L 1 および

C O D V - F a b - O L 1 a

10

は、本特許出願の優先権の出願日の時点で未公開の特許出願 P C T / E P 2 0 1 6 / 0 5 1 3 8 6 号に記載されている（欧州特許条約第 5 4（3）条）。

【0178】

いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - R F「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質は、これまでに、本特許出願の優先権の出願日の時点で未公開の特許出願 P C T / E P 2 0 1 6 / 0 5 1 3 8 6 号で C O D V - F a b - T L 1 という名称で記載されており（欧州特許条約第 5 4（3）条）：

- 式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub> 1、配列番号 56 の配列の L<sub>1</sub>、配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub> 2、配列番号 56 の配列の L<sub>2</sub>、配列番号 18 の配列の C<sub>L</sub>、0 個のアミノ酸を含有する L<sub>5</sub>、および配列番号 58 の配列の F<sub>c</sub> 2（下線で示される）を含むアミノ酸配列

20

【化 16】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIK**GGSGS**  
**SGSGG**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**G**  
**SGSGSGSGG**RRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC**D**  
**KTH**TCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD  
**GVEVHNA**TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK  
**GQPREPQVY**TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD  
**SDGSFFLYSK**LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**RFTQKSLSLSPG**

30

（配列番号 57、リンカーは太字と下線で示される）である、ポリペプチド；および

- 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の V<sub>D</sub> 3、0 個のアミノ酸である L<sub>3</sub>、配列番号 52 の配列の V<sub>D</sub> 4（イタリックで）、0 個のアミノ酸である L<sub>4</sub>、配列番号 19 の配列の C<sub>H</sub> 1、および配列番号 60 の配列の F<sub>c</sub>（下線で示される）を含むアミノ酸配列

40

## 【化 17】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
 YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQGT  
 LTVTSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIP  
 SSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGG  
 GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

(配列番号 59) である、ポリペプチドを含む。

## 【0179】

前記抗体様結合タンパク質は、C O D V - F a b - T L のフォーマットであり、すなわち、式 [ I V ] の 1 つのポリペプチドおよび式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドを含有するかまたはそれからなる。配列番号 58 の配列の式 [ I V ] のポリペプチドの F c 2 配列はさらに、116 および 117 位に、H Y 残基の代わりに R F 残基 ( 上記において太字 ) が含有されるように設計されているが、そうでなければ F c 領域の 116 および 117 位に H Y 残基が存在していたと予想される。H Y から R F への突然変異 ( すなわち、J e n d e b e r g , L . ら . 1997、J . I m m u n o l o g i c a l M e t h . , 201 : 25 ~ 34 によって説明されているような、C H 3 ドメインにおける H 435 R および Y 436 F ) は、プロテイン A への結合を壊滅させるため、精製目的にとって有利である。

20

## 【0180】

いわゆる C O D V - F a b - O L 1 「 h z 20 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質はこれまでに、本特許出願の優先権の出願日の時点で未公開の特許出願 P C T / E P 2016 / 051386 号に記載されており ( 欧州特許条約第 54 ( 3 ) 条 ) :

30

- 式 [ I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 54 の配列の V D 1、配列番号 56 の配列の L 1、配列番号 10 の配列の V D 2、配列番号 56 の配列の L 2、および配列番号 18 の配列の C L を含むアミノ酸配列

## 【化 18】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLSNGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
 RESGVLPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKEIK**GGSGS**  
**SGSGG**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
 KVSNRFGVLPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**G**  
**SGSGSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
 GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

( 配列番号 55、リンカーは太字と下線で示される ) である、ポリペプチド ; および  
 - 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の V D 3、0 個のアミノ酸である L 3、配列番号 52 の配列の V D 4 ( イタリックと下線で示される )、0 個のアミノ酸である L 4、配列番号 19 の配列の C H 1、および配列番号 62 の配列の F c ( 下線で示される ) を含むアミノ酸配列

50

## 【化 19】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
 YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQGT  
LVTVSSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIP  
SSGATFYNQKFKGQVTISADKSIISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGQ  
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG

10

(配列番号 61) である、ポリペプチド  
 を含み、

ここでいわゆる C O D V - F a b - O L 1 「h z 2 0 G 6 × h z 7 G 3」抗体様結合タン  
 パク質は、式 [ I I I ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> 領域とヘテロ二量体化するアミノ酸配列：  
 【化 20】

20

GSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  
 PVLDSGGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

(配列番号 63) の F<sub>c</sub> スタンブ (F<sub>c</sub> 3) をさらに含む。

## 【0181】

前記抗体様結合タンパク質は、C O D V - F a b - O L のフォーマットであり、すなわち  
 、式 [ I ] の 1 つのポリペプチド、式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチド、および 1 つの F<sub>c</sub>  
 スタンブを含有するかまたはそれからなる。その F<sub>c</sub> および F<sub>c</sub> 3 配列は、「ノブ - イ  
 ントゥー - ホール」技術に従って操作されており、F<sub>c</sub> ドメインは、これまでにノブ突然  
 変異として記載された配列番号 62 における S 1 3 9 C および T 1 5 1 W 突然変異をさら  
 に含有し (太字で示される)、F<sub>c</sub> 3 は、これまでにホール突然変異として記載された配  
 列番号 63 における Y 1 3 1 C、T 1 4 8 S、L 1 5 0 A および Y 1 8 9 V をさらに含有  
 する。配列番号 62 の配列の F<sub>c</sub> 配列はさらに、220 ~ 221 位に R F 突然変異 (上記  
 において太字) が含有されるように設計されている。

30

## 【0182】

いわゆる C O D V - F a b - O L 1 a 「h z 2 0 G 6 × h z 7 G 3」抗体様結合タンパク  
 質は、これまでに、本特許出願の優先権の出願日の時点で未公開の特許出願 P C T / E P  
 2 0 1 6 / 0 5 1 3 8 6 号に記載されており (欧州特許条約第 54 (3) 条)：

40

- 式 [ I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 54 の配列の V<sub>D</sub> 1、配列番号 5  
 6 の配列の L<sub>1</sub>、配列番号 10 の配列の V<sub>D</sub> 2、配列番号 56 の配列の L<sub>2</sub>、および配列  
 番号 310 の配列の C<sub>L</sub> を含むアミノ酸配列

50

## 【化 2 1】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST  
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGKLEIK**GGSGS**  
**SGSGG**DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIY  
 KVSNRFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIK**G**  
**SGSSSGSGG**RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS  
 GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

(配列番号 55) である、ポリペプチド；

- 式 [ I I I ] の 1 つのポリペプチドであって、配列番号 9 の配列の  $V_D3$ 、0 個のアミノ酸である  $L_3$ 、配列番号 52 の配列の  $V_D4$  (イタリックと下線で示される)、0 個のアミノ酸である  $L_4$ 、配列番号 19 の配列の  $C_H1$ 、および配列番号 66 の配列の  $F_c$  (下線で示される) を含むアミノ酸配列：

## 【化 2 2】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVWRQAPGKQLEWVAQIKDKSNS  
 YATYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQGT  
 LTVTSSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIP  
SSGATFYNQKFKGQVTISADKSISTTYLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGO  
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH  
 TFPVAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
 CPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF  
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

30

(配列番号 65) である、ポリペプチド

を含み、

- ここでいわゆる C O D V - F a b - O L 1 a 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質は、式 [ I I I ] のポリペプチドの  $F_c$  領域とヘテロ二量体化するアミノ酸配列：

## 【化 2 3】

GSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW  
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
 KAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
 PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHN**RFT**QKSLSLSPG

40

(配列番号 64) の  $F_c$  スタンプ ( $F_c3$ ) をさらに含む。

## 【0183】

配列番号 66 の配列の  $F_c$  は、220 ~ 221 位に H Y 残基 (上記において太字) およびノブ突然変異 S 139 C および T 151 W を含み、一方で配列番号 64 の配列の  $F_c$  スタンプは、217 ~ 218 位に R F 残基 (上記において太字) およびホール突然変異 Y 131 C、T 148 S、L 150 A および Y 189 V を含む。

## 【0184】

本発明者らは、抗体様結合タンパク質 C O D V - F a b - T L 1 - R F の数々の代替分子

50

、例えば C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - R F x ホール、C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F、C O D V - F a b - T L 1 および C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホールを開発した。さらに本発明者らは、抗体様結合タンパク質 C O D V - F a b - O L 1 および C O D V - F a b - O L 1 a の代替として、抗体様結合タンパク質 C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F a s を開発した。

【 0 1 8 5 】

これらの C O D V - F a b - T L 1 バリエーションは、精製を簡単にする、凝集を低減する、したがって本発明の抗体様結合タンパク質のヘテロ二量体の収量を増加させるために、ノブ - イントゥー - ホール突然変異および / または R F 突然変異を含有する。プロテイン A 精製の後に得られた抗体様結合タンパク質は、例えば、C O D V - F a b - T L 1 - R F の場合、52% のヘテロ二量体を含有し、C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - R F x ホールの場合、72 から 85 % のヘテロ二量体を含有し、C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F の場合、55 % のヘテロ二量体を含有し、C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F の場合、88 % のヘテロ二量体を含有する。さらに、抗体様結合タンパク質の融点は、56 ~ 57 で非常に類似していることが見出された ( 実施例 2 . 7 . 1 ) 。

【 0 1 8 6 】

本明細書の上記で述べられた通り、本発明の抗体様結合タンパク質は、C D 3 および C D 1 2 3 に結合する。

【 0 1 8 7 】

したがって、本発明の一態様において、本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒト C D 3 に結合する。別の実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質はさらに、カニクイザル C D 3 に結合する。特に、本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒト C D 3 の、またはヒトおよびカニクイザルの両方の C D 3 の細胞外ドメインに結合する。より具体的には、抗体は、C D 3 に結合する。より具体的には、抗体様結合タンパク質は、ヒトの、またはヒトおよびカニクイザルの C D 3 の細胞外ドメインに結合する。抗体様結合タンパク質は、複合体、例えば C D 3 / 複合体の形態で存在する場合、または単離された形態で発現されるかどうかに関係なく、単一のタンパク質として存在する場合、または例えば T 細胞中に存在する場合のように可溶性細胞外ドメインまたは全長膜アンカー型 C D 3 中に存在する場合、C D 3 に結合する。本発明に係る抗体様結合タンパク質は、ヒト C D 3 タンパク質の、またはヒトおよびカニクイザルの両方の C D 3 タンパク質の表面、特に C D 3 に特異的である。

【 0 1 8 8 】

本発明に係る抗体様結合の、ヒト C D 3 の親和性に対するカニクイザル C D 3 の親和性の比率 (  $K_D$  (カニクイザル) /  $K_D$  (ヒト) ) は、10、特に 6、5、4、3、2、1 または 0.5 である。したがって、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、サルで実行される毒物学的な研究、すなわちヒトにおいて起こり得る有害作用を予測するために関連するサルで観察された毒性プロファイルで使用する事ができる。

【 0 1 8 9 】

さらに、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、ヒト C D 3 もしくはカニクイザル C D 3 または両方への親和性 (  $K_D$  ) を有し、その親和性は、50 nM、40 nM、または 30 nM、例えば 20 nM であり、例えば、0.1 nM から 30 nM、特に 0.4 nM から 25 nM、または 10 nM から 25 nM の親和性である。

【 0 1 9 0 】

本発明のさらなる態様において、抗体様結合タンパク質は、ヒト C D 1 2 3 に結合する。別の実施形態において、抗体様結合タンパク質はさらに、カニクイザル C D 1 2 3 に結合する。特に、本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒト C D 1 2 3 の、またはヒトおよびカニクイザル C D 1 2 3 の両方の細胞外ドメインに結合する。より具体的には、抗体様結合タンパク質は、C D 1 2 3 の遠位部分に結合し、例えば、配列番号 12 のアミノ酸配列のヒト C D 1 2 3 の 19 位から開始して 49 位までのアミノ酸に結合する。抗体様結合タンパク質は、単離された形態で発現されるかどうかに関係なく、C D 1 2 3 に結合するか、

10

20

30

40

50



または可溶性細胞外ドメインまたは全長膜アンカー型CD123中に存在し、例えば、CD123を発現する細胞、例えばAML細胞またはCD123でトランスフェクトされた細胞中に存在する。本発明に係る抗体様結合タンパク質は、それらの表面にヒトまたはヒトおよびカニクイザルのCD123タンパク質を発現する細胞、例えばCD123を発現するがん細胞に特異的である。

【0191】

したがって、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、ヒトCD123もしくはカニクイザルCD123または両方への親和性(K<sub>D</sub>)を有し、その親和性は、20nM、15nM、または10nM、例えば5nMであり、例えば0.01nMから5nM、具体的には0.01nMから2nM、より具体的には0.05nMから2nMの親和性である。

10

【0192】

一実施形態において、抗体様結合タンパク質は、CD123の機能を阻害することが可能である。

【0193】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、50から70、好ましくは、50から65、より好ましくは、55から60の熱変性温度を有する。熱変性温度を測定する方法は当業者に公知であり、示差走査蛍光測定法(DSF)などがある。当業者に公知のように、これらの実験に使用される実験条件、例えば使用される緩衝液、タンパク質濃度は、結果に強く影響を与える可能性がある。したがって、一例において、50から70、好ましくは、50から65、より好ましくは、55から60の変性温度は、例えば実施例(実施例2.7.1)で例示されるような白色のセミスカート96-ウェルプレート(BIORAD)中における、典型的にはD-PBS緩衝液(Invitrogen)で例えば0.2μg/μlの最終濃度に希釈された、典型的にはD-PBS中のSYPRO-オレンジ色素の4×濃縮溶液(Invitrogen、DMSO中の5000×ストック)を包含する抗体様結合タンパク質に対して言及される。

20

【0194】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、標的細胞の非存在下で、20%未満、18%未満、16%未満、14%未満、12%未満、10%未満のT細胞活性化を有する。

【0195】

30

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、標的細胞の存在下で、55%より高い、60%より高い、62%より高い、64%より高い、66%より高い、68%より高い、70%より高いT細胞活性化を有する。

【0196】

本発明の抗体様結合タンパク質は、T細胞係合作用を有する。このT細胞係合作用は、標的細胞を発現するCD123において細胞傷害性を誘導する。

【0197】

本発明の抗体様結合タンパク質の標的細胞は、CD123を発現する細胞、例えばCD123を発現するがん細胞、例えばTHP-1またはTF-1である。

【0198】

40

したがって、一実施形態において、本発明に係る抗体様結合タンパク質は、インビトロで初代T細胞を係合し、標的細胞を溶解させることができ、(EC<sub>50</sub>)は、40pM、35pM、20pM、10pM、5pM、例えば2pMである。

【0199】

一実施形態において、細胞傷害性は、本明細書において、細胞媒介細胞傷害性、例えばT細胞媒介細胞傷害性を指す。

【0200】

さらに、一実施形態において、細胞媒介細胞傷害性は、T細胞による細胞媒介細胞傷害性を指す。

【0201】

50

したがって、本発明の抗体様結合タンパク質は、T細胞によって媒介される、CD123を発現する標的細胞における細胞媒介細胞傷害性を誘導する。

【0202】

細胞傷害性を測定する方法は当業者に公知であり、例えば、51-クロム(Cr)放出アッセイ、ヨウ化プロピジウム、7-AAD、および当業者に公知の他の染料などの標的細胞の生/死細胞染色、フローサイトメトリーまたはELISAによる、グランザイムおよびパーフォリンなどのT細胞によって放出される溶解性分子の検出、細胞細胞傷害性および細胞崩壊のバイオマーカーとしての、傷害を受けた細胞から培地中に放出された乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の検出、CD107aの細胞表面動員の検出、アポトーシス性の標的細胞のアネキシンV(カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質)染色、および例えば活性化されたカスパーゼ-3(CASP3)の検出を使用することなどが挙げられる。さらに、当業者は、選択された試験に基づいて、さらに実験の組み立てに基づいて、細胞傷害性の異なるメカニズムを区別することができる。

10

【0203】

一例において、細胞媒介細胞傷害性は、例えば実施例1.8に記載されるように、例えば標的細胞を標識するのにCFSEを使用し、死んだ細胞を標識するのに7-AADを使用して測定することができる。

【0204】

抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質のバリエーション

本明細書に記載される抗体様結合タンパク質のバリエーションが企図され、本明細書の上記で定義された抗体様結合タンパク質の定義で行われたように、明示的に表現「参照配列と少なくとも85%同一な」の使用で言及される。当業者であれば認識していると予想されるが、参照配列は、式[I]、[III]または[IV]のポリペプチドであり、「参照配列に少なくとも85%同一な」バリエーションは、抗体「hz20G6」および「hz7G3」のCDR、ならびに異なるFc領域におけるRF突然変異、ノブ突然変異およびホール突然変異に対応するアミノ酸位置が不変になるような方法で定義される。

20

【0205】

したがって、参照配列と比較した欠失、挿入および/または置換は、ループ領域L1、L2、L3、L4および場合によりL5、フレームワーク領域(FR)、CLおよびCH1ならびにFc領域のいずれに導入されてもよいことがさらに当業者によって理解されると予想される。フレームワーク領域(FR)は上記の「定義」の章で定義された通りであり、CDR間に挿入されたアミノ酸配列を指す。CDRは定義されているため、当業者は、フレームワーク領域を容易に配置することができる。

30

【0206】

本発明の抗体様結合タンパク質のCHドメインは、ヒト免疫グロブリンの重鎖に属するあらゆるCH領域であってもよいが、IgGクラスに属するものが好適であり、IgGクラスに属するサブクラスのいずれか1つ、例えばIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4も使用することができる。また、本発明の抗体様結合タンパク質のCLは、ヒト免疫グロブリン軽鎖に属するあらゆる領域であってもよく、カッパクラスまたはラムダクラスに属するものを使用することができる。

40

【0207】

したがって、本明細書の上記で定義されるようなCHまたはCL領域は、別のサブクラスの免疫グロブリン由来のCHまたはCLドメインによって置換されていてもよいことが当業者によって理解されると予想される。

【0208】

本明細書において定義されるようにバリエーションを作り出すためのさらなる指針に関して、リンカー領域L1、L2、L3、L4およびL5に関する一部の例を記載する。

【0209】

一例において、L3の長さは、L1の長さ少なくとも2倍である。さらなる例において、L4の長さは、L2の長さの少なくとも2倍である。一部の例において、L1の長さは、

50

L<sub>3</sub>の長さの少なくとも2倍である。他の例において、L<sub>2</sub>の長さは、L<sub>4</sub>の長さの少なくとも2倍である。

【0210】

一例において、リンカーL<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>およびL<sub>4</sub>は、0から20個のアミノ酸を含む。一実施形態において、L<sub>5</sub>は、0から10個のアミノ酸を含む。

【0211】

一部の例において、L<sub>1</sub>は、長さが3から12個のアミノ酸残基であり、L<sub>2</sub>は、長さが3から14個のアミノ酸残基であり、L<sub>3</sub>は、長さが1から8個のアミノ酸残基であり、L<sub>4</sub>は、長さが1から3個のアミノ酸残基である。他の例において、L<sub>1</sub>は、長さが5から10個のアミノ酸残基であり、L<sub>2</sub>は、長さが5から8個のアミノ酸残基であり、L<sub>3</sub>は、長さが1から5個のアミノ酸残基であり、L<sub>4</sub>は、長さが1から2個のアミノ酸残基である。さらなる例において、L<sub>1</sub>は、長さが7個のアミノ酸残基であり、L<sub>2</sub>は、長さが5個のアミノ酸残基であり、L<sub>3</sub>は、長さが1個のアミノ酸残基であり、L<sub>4</sub>は、長さが2個のアミノ酸残基である。

10

【0212】

一部の例において、L<sub>1</sub>は、長さが1から3個のアミノ酸残基であり、L<sub>2</sub>は、長さが1から4個のアミノ酸残基であり、L<sub>3</sub>は、長さが2から15個のアミノ酸残基であり、L<sub>4</sub>は、長さが2から15個のアミノ酸残基である。他の例において、L<sub>1</sub>は、長さが1から2個のアミノ酸残基であり、L<sub>2</sub>は、長さが1から2個のアミノ酸残基であり、L<sub>3</sub>は、長さが4から12個のアミノ酸残基であり、L<sub>4</sub>は、長さが2から12個のアミノ酸残基である。好ましい例において、L<sub>1</sub>は、長さが1個のアミノ酸残基であり、L<sub>2</sub>は、長さが2個のアミノ酸残基であり、L<sub>3</sub>は、長さが7個のアミノ酸残基であり、L<sub>4</sub>は、長さが5個のアミノ酸残基である。

20

【0213】

一部の例においてL<sub>1</sub>、L<sub>3</sub>、またはL<sub>4</sub>は、ゼロに等しくてもよい。しかしながら、L<sub>3</sub>またはL<sub>4</sub>がゼロに等しい抗体様結合タンパク質において、可変領域と定常領域の間または他の鎖の二重可変ドメイン間の対応するトランジションリンカーは、ゼロであってはならない。一部の例において、L<sub>1</sub>はゼロに等しく、L<sub>3</sub>は2個またはそれ以上のアミノ酸残基であるか、L<sub>3</sub>はゼロに等しく、L<sub>1</sub>は1に等しいかまたはそれ以上のアミノ酸残基であるか、またはL<sub>4</sub>は0に等しく、L<sub>2</sub>は3個またはそれ以上のアミノ酸残基である。

30

【0214】

一部の例において、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、およびL<sub>4</sub>からなる群から選択されるリンカーの少なくとも1つは、少なくとも1つのシステイン残基を含有する。

【0215】

本発明の抗体様結合タンパク質のバリエーションに使用可能な好適なリンカーの例としては、単一のグリシン、スレオニンまたはセリン残基；ジペプチド、例えば、ジグリシンペプチド、ヒスチジン-スレオニンペプチドまたはグリシン-セリンジペプチドなど；3つのグリシンを有するトリペプチド、トリペプチドThr-His-Thr、トリペプチドGly-Gly-Ser；4つのグリシン残基を有するペプチド；5つのグリシン残基を有するペプチド；6つのグリシン残基を有するペプチド；7つのグリシン残基を有するペプチド；8つのグリシン残基を有するペプチドが挙げられる。アミノ酸残基の他の組合せ、例えば、ペプチドGly-Gly-Gly-Ser（配列番号27）、ペプチドGly-Gly-Gly-Ser（配列番号20）、ペプチドSer-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号28）、ペプチドGly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号29）、ペプチドGly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号30）、ペプチドGly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号31）、およびペプチドGly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号21）などを使用してもよい。他の好適なリンカーとしては、単一のSer、およびVal残基；ジペプチドArg-Thr、Gln-Pro、Ser-Ser、Thr-L

40

50

ys、およびSer - Leu; Lys - Thr - His - Thr (配列番号32); Lys - Thr - His - Thr - Ser (配列番号33); Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser (配列番号34); Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro (配列番号35); Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro (配列番号36); Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro (配列番号37); Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser (配列番号38); Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser (配列番号39); Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro (配列番号40); Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro (配列番号41); Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly (配列番号42); Gly - Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly (配列番号43); Gly - Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly - Gly (配列番号44); Gly - Gly - Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly - Gly (配列番号45); Gly - Gly - Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly - Gly - Gly (配列番号46); Gly - Gly - Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly - Gly - Gly (配列番号47); Thr - Val - Ala - Ala - Pro (配列番号22)、Gln - Pro - Lys - Ala - Ala (配列番号23)、Gln - Arg - Ile - Glu - Gly (配列番号24); Ala - Ser - Thr - Lys - Gly - Pro - Ser (配列番号25)、Arg - Thr - Val - Ala - Ala - Pro - Ser (配列番号26)、Gly - Gln - Pro - Lys - Ala - Ala - Pro (配列番号16)、Thr - Lys - Gly - Pro - Ser (配列番号17)、His - Ile - Asp - Ser - Pro - Asn - Lys (配列番号351)、およびGly - Gly - Ser - Gly - Ser - Ser - Gly - Ser - Gly - Gly (配列番号56)が挙げられる。上記で列挙した例は、どのような形でも本発明の範囲を限定することを意図しておらず、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、リシン、アルギニン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、グリシン、およびプロリンからなる群から選択されるランダムに選択されたアミノ酸を含むリンカーは、本発明の抗体様結合タンパク質において好適であることが示されている。

#### 【0216】

リンカーにおけるアミノ酸残基の同一性および配列は、リンカーにおいて達成するのに必要な二次構造エレメントのタイプに応じて変更することができる。例えば、グリシン、セリン、およびアラニンは、最大のフレキシビリティを有するリンカーにとって最良である。より高い硬く伸長したリンカーが必要な場合、グリシン、プロリン、スレオニン、およびセリンの一部の組合せが有用である。所望の特性における必要に応じてより大きいペプチドリンカーを構築するために、他のアミノ酸残基と組み合わせたあらゆるアミノ酸残基もリンカーとみなすことができる。

#### 【0217】

一例において、リンカーL<sub>1</sub>は、配列Gly - Gln - Pro - Lys - Ala - Ala - Pro (配列番号16)を有し、リンカーL<sub>2</sub>は、配列Thr - Lys - Gly - Pro - Ser (配列番号17)を有し、リンカーL<sub>3</sub>は、配列「S」を有し、リンカーL<sub>4</sub>は、配列「RT」を有する。

#### 【0218】

さらなる例において、リンカーL<sub>1</sub>、L<sub>2</sub>、L<sub>3</sub>、およびL<sub>4</sub>の配列は、スレオニン；ジペプチド、例えばヒスチジン-スレオニンペプチド；トリペプチドThr-His-Thr、Lys-Thr-His-Thr（配列番号32）；Lys-Thr-His-Thr-Ser（配列番号33）；Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser（配列番号34）；Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro（配列番号35）；Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro（配列番号36）；Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro（配列番号37）；Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser（配列番号38）；Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser（配列番号39）；Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro（配列番号40）；Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro（配列番号41）；Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly（配列番号42）；Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly（配列番号43）；Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly（配列番号44）；Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly（配列番号45）；Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly（配列番号46）およびGly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly（配列番号47）からなる群から選択される。

一例において、リンカーL<sub>5</sub>の配列は、単一のセリン残基、ジペプチド、例えばグリシン-セリンジペプチド；トリペプチドGly-Gly-Ser、ペプチドGly-Gly-Gly-Ser（配列番号27）、ペプチドGly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号20）、ペプチドSer-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号28）、ペプチドGly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号29）、ペプチドGly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号30）、ペプチドGly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号31）、ペプチドGly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号21）、およびペプチドGly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly（配列番号56）からなる群から選択される。

#### 【0219】

「参照配列に少なくとも85%同一な」配列を産生するために抗体様結合タンパク質に適用可能なさらなる改変は、本明細書において以下の「本発明の抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質の改変」の章に記載される。

#### 【0220】

本発明の抗CD3/抗CD123抗体様結合タンパク質の改変

本明細書に記載される抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列改変が企図される。例えば、抗体様結合タンパク質の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。例えば、ヒト化抗体が、非ヒト動物由来の抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>におけるCDRのみをヒト抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>のFRに単にグラフト化することによって産生される場合、抗原結合活性は、非ヒト動物由来の元の抗体の活性と比較して低減される可能性があることが公知である。CDR中だけでなくFR中における非ヒト抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>の数々のアミノ酸残基が、抗原結合活性に直接的または間接的に関連する可能性があると考えられている。したがって、これらのアミノ酸残基をヒト抗体のV<sub>H</sub>およびV

10

20

30

40

50

LのFR由来の異なるアミノ酸残基で置換することは、結合活性を低減させると予想される。この問題を解決するために、非ヒトCDRでグラフト化されたヒト抗体において、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列のなかから、抗体の結合に直接関連する、またはCDRのアミノ酸残基と相互作用する、または抗体の3次元構造を維持する、および抗原への結合に直接関連するアミノ酸残基を同定する試みがなされてきた。同定されたアミノ酸を、非ヒト動物由来の元の抗体のアミノ酸残基で置き換えることによって、低減された抗原結合活性を増加させることができた。本発明の抗体様結合タンパク質は、ヒト化抗体の可変領域「20G6」およびヒト化抗体の可変領域「7G3」を含み、したがって本明細書で述べられた考察は、等しく本発明の抗体様結合タンパク質に適用される。

#### 【0221】

改変および変化は、本発明の抗体様結合タンパク質の構造中に、さらにそれらをコードするDNA配列中になすことができ、それでもなお所望の特徴を有する機能的な抗体様結合タンパク質またはポリペプチドが生じる。

#### 【0222】

ポリペプチドのアミノ配列を変化させることにおいて、アミノ酸の疎水性指標を考慮に入れてもよい。タンパク質に相互作用の生物学的機能を付与することにおける疎水性アミノ酸指標の重要性は、当技術分野において一般的に理解されている。アミノ酸の相対的な疎水性特徴は、生じるタンパク質2次構造に寄与し、これが順に、タンパク質と他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を定義することが認められている。各アミノ酸は、それらの疎水性および電荷特徴に基づき割り当てられた疎水性指標を有し、以下の通りである：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン/シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リシン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)。

#### 【0223】

本発明のさらなる目的はまた、本発明の抗体様結合タンパク質のポリペプチドの機能保存的バリエーションも包含する。

#### 【0224】

例えば、タンパク質構造中で、特定のアミノ酸を、明らかな活性の損失を起こすことなく、他のアミノ酸で置換することもできる。タンパク質の相互作用能力および性質はその生物学的な機能活性を定義するため、タンパク質配列に、当然ながらそのDNAコード配列にも特定のアミノ酸置換をなすことができ、それにもかかわらず類似の特性を有するタンパク質が得られる。したがって、本発明の抗体配列、または前記ポリペプチドをコードする対応するDNA配列に、それらの生物活性の明らかな損失を起こすことなく様々な変化をなし得ることが企図される。

#### 【0225】

特定のアミノ酸が、類似の疎水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸で置換されていてもよく、それでもなお類似の生物活性を有するタンパク質が生じ、すなわちそれでもなお生物学的な機能的に同等なタンパク質が得られることが当技術分野において公知である。また、本発明の抗体様結合タンパク質において、抗原への結合の有意な損失を起こすことなく置換できる全てのアミノ酸を同定するために、アラニンスキニングアプローチなどの十分に確立された技術を使用することも可能である。このような残基は、抗原結合または抗体構造の維持に関与しないため、中性として認定することができる。これらの中性位置の1つまたはそれ以上は、アラニンで置換してもよいし、または本発明の抗体様結合タンパク質の主要な特徴を変化させない可能性がある別のアミノ酸で置換してもよい。

#### 【0226】

したがって、上記で概説したように、アミノ酸置換は一般的に、アミノ酸側鎖置換基の相

10

20

30

40

50

対的な類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。考慮される様々な前述の特徴をもつ例示的な置換は当業者周知であり、例えば、アルギニンおよびリシン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシンが挙げられる。

#### 【0227】

また、例えば抗体の抗原依存性細胞媒介細胞傷害性（ADCC）および／または補体依存性細胞傷害（CDC）が強化または低減されるように、本発明の抗体様結合タンパク質を、エフェクター機能に関して改変することも望ましい場合がある。これは、抗体のF<sub>c</sub>領域に、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を導入することによって達成することができ、このようなF<sub>c</sub>領域はまた、本発明の抗体様結合タンパク質の文脈ではF<sub>c</sub>-バリエーションとも称される。代替として、またはそれに加えて、F<sub>c</sub>領域にシステイン残基が導入されてもよく、それにより、この領域において、鎖間のジスルフィド結合形成が可能になる。このように生成されたホモ二量体抗体は、改善または低減された内在化能力および／または増加した補体媒介細胞致死および／または抗体依存性細胞傷害（ADCC）を有していてもよい（Caron P C. ら. 1992；および Shopes B. 1992）。

#### 【0228】

抗体様結合タンパク質の元のグリコシル化パターンを変更するために、本発明の抗体様結合タンパク質の別のタイプのアミノ酸改変が有用な場合があり、すなわち、抗体様結合タンパク質に見出される1つまたはそれ以上の炭水化物部分を欠失させること、および／または抗体様結合タンパク質中に存在しない1つまたはそれ以上のグリコシル化部位を付加することによるアミノ酸改変が有用な場合がある。トリペプチド配列であるアスパラギン-X-セリン、およびアスパラギン-X-スレオニン（式中Xはプロリンを除くあらゆるアミノ酸である）のいずれかの存在が、可能性のあるグリコシル化部位を作り出す。抗体様結合タンパク質へのグリコシル化部位の付加または欠失は、上述したトリペプチド配列の1つまたはそれ以上を含有するように（N-結合型グリコシル化部位の場合）アミノ酸配列を変更することによってうまく達成される。

#### 【0229】

別のタイプの改変は、インシリコまたは実験的のいずれかで同定された配列の除去を含むが、その結果として、抗体様結合タンパク質調製物の分解産物または不均質性を引き起こす可能性がある。例として、アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミドは、pHおよび表面露出などの要因に応じて起こる可能性がある。アスパラギン残基は、主に配列Asn-Gly中に存在する場合、特に脱アミドを受けやすく、それより程度は低いがAsn-Alaなどの他のジペプチド配列でも脱アミドを受けやすい。したがって、このような脱アミド部位、特にAsn-Glyが本発明の抗体様結合タンパク質中に存在する場合、典型的には関連する残基の一方を除去する保存的置換によって、その部位を除去することが望ましい場合がある。このような関連する残基の1つまたはそれ以上を除去するための配列中の置換も、本発明に包含されることが意図される。

#### 【0230】

別のタイプ共有結合の改変は、配糖体を抗体様結合タンパク質に化学的または酵素的にカップリングすることを含む。これらの手順は、それらがN-またはO結合型グリコシル化のグリコシル化性能を有する宿主細胞における抗体様結合タンパク質の産生を必要としない点で有利である。使用されるカップリング様式に応じて、糖を、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離のカルボキシル基、（c）遊離のスルフヒドリル基、例えばシステインのスルフヒドリル基、（d）遊離のヒドロキシル基、例えばセリン、スレオニン、またはヒドロキシプロリンのヒドロキシル基、（e）芳香族残基、例えばフェニルアラニン、チロシン、またはトリプトファンの芳香族残基、または（f）グルタミンのアミド基に付着させることができる。例えば、このような方法は、WO 87/05330に記載されている。

#### 【0231】

抗体様結合タンパク質に存在するあらゆる炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に

10

20

30

40

50

達成することができる。化学的な脱グリコシルは、化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または等価な化合物への抗体様結合タンパク質の曝露を必要とする。この処理は、連結糖（N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたは全ての糖の切断を引き起こすが、抗体は無傷のまま残る。化学的な脱グリコシルは、S o j a h r H . ら（1987）およびE d g e , A S . ら（1981）によって記載されている。抗体の炭水化物部分の酵素的切断は、T h o t a k u r a , N R . ら（1987）によって記載されるような様々なエンドおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成することができる。

#### 【0232】

抗体様結合タンパク質の別のタイプの共有結合の改変は、米国特許第4,640,835号；4,496,689号；4,301,144号；4,670,417号；4,791,192号または4,179,337号に記載の方式で、様々な非タンパク質様ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンの1つに抗体を連結することを含む。

#### 【0233】

核酸、ベクターおよび組換え宿主細胞

本発明のさらなる目的は、上記で定義された抗体様結合タンパク質をコードする配列を含むかまたはそれからなる核酸配列に関する。

#### 【0234】

典型的には、前記核酸は、DNAまたはRNA分子であり、これらは、あらゆる好適なベクター、例えばプラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージまたはウイルスベクターに含めることができる。

#### 【0235】

したがって、本発明のさらなる目的は、本発明の核酸を含むベクターに関する。

#### 【0236】

このようなベクターは、対象に投与されたら前記ポリペプチドの発現を引き起こすかまたはそれを指示するための、調節エレメント、例えばプロモーター、エンハンサー、ターミネーターなどを含んでいてもよい。動物細胞のための発現ベクターに使用されるプロモーターおよびエンハンサーの例としては、SV40の初期プロモーターおよびエンハンサー（Mizukami T. ら、1987）、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターおよびエンハンサー（Kuwana Y. ら、1987）、免疫グロブリンH鎖のプロモーター（Mason J. O. ら、1985）およびエンハンサー（Gillies S. D. ら、1983）などが挙げられる。

#### 【0237】

ヒト抗体C領域をコードする遺伝子を挿入して発現させることができる限り、動物細胞のためのあらゆる発現ベクターを使用することができる。好適なベクターの例としては、pAGE107（Miyaji H. ら、1990）、pAGE103（Mizukami T. ら、1987）、pHSG274（Brady G. ら、1984）、pKCR（O'Harre K. ら、1981）、pSG1ベータd2-4-（Miyaji H. ら、1990）などが挙げられる。プラスミドの他の例としては、複製起点を含む複製プラスミド、または組込プラスミド、例えばpUC、pcDNA、pBRなどが挙げられる。

#### 【0238】

ウイルスベクターの他の例としては、アデノウイルス、レトロウイルスの、ヘルペスウイルスおよびAAVベクターが挙げられる。このような組換えウイルスは、当技術分野において公知の技術によって、例えばパッケージング細胞をトランスフェクトすることによって、またはヘルパープラスミドまたはウイルスとの一過性トランスフェクションによって産生することができる。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例としては、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞などが挙げられる。このような複製欠損組換えウイルスを産生するための詳細なプロトコルは、例えばWO95/14785、WO96/22378、US5,882,877、US6,013,516、

10

20

30

40

50



US 4, 861, 719、US 5, 278, 056およびWO 94 / 19478で見出すことができる。

【0239】

本発明のさらなる目的は、本発明に係る核酸および／またはベクターによってトランスフェクトされた、それに感染した、またはそれで形質転換された細胞に関する。

【0240】

本発明の核酸は、好適な発現系で本発明の組換え抗体を産生するのに使用することができる。

【0241】

一般的な発現系としては、大腸菌 (*E. coli*) 宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳類宿主細胞およびベクターが挙げられる。宿主細胞の他の例としては、これらに限定されないが、原核細胞 (例えば細菌) および真核細胞 (例えば酵母細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞など) が挙げられる。具体的な例としては、大腸菌、クルイペロマイセス属またはサッカロマイセス属の酵母、哺乳類細胞株 (例えば、Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など)、同様に、初代または確立された哺乳類細胞培養 (例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経系細胞、脂肪細胞などから産生された) が挙げられる。また例としては、マウス SP2 / 0 - Ag 14 細胞 (ATCC CRL 1581)、マウス P3 X 63 - Ag 8.653 細胞 (ATCC CRL 1580)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (以下「DHFR 遺伝子」と称される) が欠失した CHO 細胞 (Ur laub G ら; 1980)、ラット YB2 / 3HL.P2.G11.16Ag.20 細胞 (ATCC CRL 1662、以下「YB2 / 0 細胞」と称される) など挙げられる。YB2 / 0 細胞が、この細胞中で発現されるとキメラまたはヒト化抗体の ADC 活性が強化されるため好ましい。

【0242】

特に、本発明の抗体様結合タンパク質の発現に関して、発現ベクターは、抗体重鎖をコードする遺伝子と抗体軽鎖をコードする遺伝子とが別個のベクターに存在するタイプ、または両方の遺伝子が同じベクターに存在するタイプ (タンデムタイプ) のどちらでもよい。抗体様結合タンパク質発現ベクター構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、および動物細胞における抗体 H 鎖と L 鎖との発現レベル間のバランスの観点で、タンデムタイプのヒト化抗体発現ベクターが好ましい (Shi t a r a K ら. J Immunol Methods. 1994 年 1 月 3 日; 167 (1~2): 271~8)。タンデムタイプのヒト化抗体発現ベクターの例としては、pKANTEX93 (WO 97 / 10354)、pEE18 などが挙げられる。

【0243】

また本発明は、本発明に係る抗体様結合タンパク質を発現する組換え宿主細胞を産生する方法であって、(i) インビトロまたはエキスピボで上述したような組換え核酸またはベクターをコンピテント宿主細胞に導入すること、(ii) 得られた組換え宿主細胞をインビトロまたはエキスピボで培養すること、および (iii)、場合により、前記抗体を発現および／または分泌する細胞を選択することからなる工程を含む、前記方法にも関する。

【0244】

このような組換え宿主細胞は、本発明の少なくとも 1 つの抗体様結合タンパク質の産生に使用することができる。

【0245】

本発明の抗 CD3 / 抗 CD123 抗体様結合タンパク質を産生する方法

本発明の一実施形態は、本明細書の上記の「抗 CD3 / 抗 CD123 抗体様結合タンパク質」の章で定義された抗体様結合タンパク質を作製するための方法を提供する。

【0246】

本発明の抗体様結合タンパク質は、当技術分野において公知のあらゆる技術、例えば、これらに限定されないが、あらゆる化学的、生物学的、遺伝学的または酵素による技術など

10

20

30

40

50

を単独で、または組合せのいずれかで用いることによって產生することができる。

【0247】

所望の配列のアミノ酸配列を知ること、当業者は、ポリペプチド產生のための標準的な技術によって前記抗体または免疫グロブリン鎖を容易に產生することができる。例えば、当業者は、周知の固相方法を使用して、特に、市販のペプチド合成装置（例えばApplied Biosystems、Foster City、Californiaによって製造されたもの）を製造業者の説明書に従って使用して合成することができる。代替として、本発明の抗体、免疫グロブリン鎖および抗体様結合タンパク質は、当技術分野において周知の組換えDNA技術によって合成することができる。例えば、これらのフラグメントは、所望の（ポリ）ペプチドをコードするDNA配列を発現ベクターに取り込み、この

10

ようなベクターを所望のポリペプチドを発現すると予想される好適な真核性または原核性宿主に導入した後、DNA発現生成物として得ることができ、このような生成物は、後で周知の技術を使用して単離することができる。

【0248】

特に、本発明はさらに、本発明の抗体様結合タンパク質を產生する方法であって、（i）本発明に係る形質転換宿主細胞を培養すること；（ii）前記抗体様結合タンパク質または対応するポリペプチドを発現させること；および（iii）発現された抗体様結合タンパク質またはポリペプチドを回収することからなる工程を含む、前記方法に関する。

【0249】

本発明の抗体様結合タンパク質は、好適には、従来の免疫グロブリン精製手順、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーなどによって、培養培地から分離される。

20

【0250】

一実施形態において、発現された抗体様結合タンパク質またはポリペプチドを回収することは、本明細書において、プロテインAクロマトグラフィー、カップ選択クロマトグラフィー、および/またはサイズ排除クロマトグラフィーを実行すること、好ましくはプロテインAクロマトグラフィーおよび/またはサイズ排除クロマトグラフィーを実行すること、より好ましくはプロテインAクロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを実行することを指す。

30

【0251】

本発明の抗体様結合タンパク質を產生するための方法は、従来の組換えDNAおよび遺伝子トランスフェクション技術を含み、これらは当技術分野において周知である（Morrisson S L.ら、（1984）ならびに特許文書US 5,202,238；およびUS 5,204,244を参照）。

【0252】

従来の組換えDNAおよび遺伝子トランスフェクション技術に基づきヒト化抗体を產生するための方法は、当技術分野において周知であり（例えば、Riechmann L.ら、1988；Neuberger M S.ら、1985を参照）、抗体様結合タンパク質の產生と同様に、容易な移行が可能である。

40

【0253】

一例において、本明細書において以下の2.5章で記載されるように、典型的には、例えば、F17血清非含有懸濁液媒体（Invitrogen）中で成長するFree Style HEK293細胞を、等しい比率の軽鎖および重鎖プラスミドでトランスフェクトし、この場合、CODV-Fab-TL1抗体様結合タンパク質において、抗体情報は、典型的には1つの軽鎖および1つの重鎖にコードされていたが、それに対してCODV-Fab-OL1抗体様結合タンパク質、例えばCODV-Fab-OL1-ノブxホール-RF GSなしの場合、例えば、製造業者により説明されたようなポリエチレンイミントランスフェクション試薬を使用して、1つの軽鎖および2つの重鎖プラスミドがトランスフェクトされた。

50

## 【0254】

典型的には、細胞を、Kuhner ISF1-X振盪インキュベーター中、110rpmで8%CO<sub>2</sub>と共に37℃で培養した。例えば7日の培養後、遠心分離によって細胞を除去し、典型的には10%Vol/Volの1MトリスHCl、pH8.0を添加し、例えば0.2μMのボルトトップフィルターを介して上清をろ過して、粒子を除去した。CODV-Fab-TL1抗体様結合タンパク質、加えてCODV-Fab-OL1抗体様結合タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィーによって、典型的にはプロテインAカラム(HiTrapプロテインA HPカラム、GE Life Sciences)で精製した。例えば0.1Mのクエン酸塩、pH3.0を用いてカラムから溶出させた後、典型的には、CODV-Fabコンストラクトを、例えば、典型的にはPBS中に配合されたHiPrep26/10脱塩カラム(Gibco 14190-136)を使用して脱塩した。

10

## 【0255】

凝集体から単量体を分離するために、典型的には、両方のコンストラクト、すなわちCODV-Fab-TL1抗体様結合タンパク質およびCODV-Fab-OL1抗体様結合タンパク質のための、例えばPBS中での高分解能の精留工程(Gibco 14190-136)を、典型的にはHiLoad Superdex 200 26/60 320mlカラム(GE Healthcare カタログ番号:29-9893-36)を使用して実行した。単量体の画分をプールし、Vivaspin 20遠心分離カラム(VS2002 Sartorius Stedim biotech)を使用して例えば1mg/mlまで濃縮し、典型的には0.22μmの膜(Millex (登録商標)シリンジフィルターSLGV033RS)を使用してろ過した。

20

## 【0256】

医薬組成物

本発明の抗体様結合タンパク質は、治療用組成物を形成するために、薬学的に許容される賦形剤、および場合により持続放出マトリックス、例えば生分解性ポリマーと組み合わせてもよい。

## 【0257】

したがって、本発明の別の目的は、本発明の抗体様結合タンパク質および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に関する。

30

## 【0258】

本発明はまた、医薬として使用するための、本発明に係る抗体様結合タンパク質にも関する。本発明はまた、医薬として使用するための、本発明の医薬組成物にも関する。

## 【0259】

このような治療用組成物または医薬組成物は、投与様式との適性に応じて選択された薬学的または生理学的に許容される調合剤と混和した状態の、治療有効量の抗体様結合タンパク質またはそれらの薬物コンジュゲートを含んでいてもよい。

## 【0260】

本明細書で使用される場合、薬学的に許容される担体としては、生理学的に適合するありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤および抗真菌剤などが挙げられる。好適な担体、希釈剤および/または賦形剤の例としては、水、アミノ酸、塩類溶液、リン酸緩衝塩類溶液、デキストロース、グリセロール、エタノールなどの1つまたはそれ以上、加えてそれらの組合せが挙げられる。多くの場合において、組成物および調合物中に、等張剤、例えば糖、多価アルコール、または塩化ナトリウムを包含することが好ましいと予想され、さらに、抗酸化剤、例えばトリプタミンおよび安定化剤、例えばTween 20を含有していてもよい。

40

## 【0261】

医薬組成物の形態、投与経路、投薬量およびレジメンは、通常、処置しようとする状態、疾患の重症度、患者の年齢、体重、および性別などによって決まる。

## 【0262】

50

本発明の医薬組成物は、局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下または眼球内投与などのために製剤化することができる。

【0263】

特に、医薬組成物は、注射可能な調合物のために薬学的に許容されるビヒクルを含有する。これらは、特に、等張の滅菌された塩類溶液（リン酸一ナトリウムもしくはリン酸二ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムもしくは塩化マグネシウムなど、またはこのような塩の混合物）であってもよいし、または場合に応じて滅菌水または生理的塩類溶液を添加すると注射用溶液の構成が可能な、乾燥組成物、特に凍結乾燥組成物であってもよい。

【0264】

投与に使用される用量は、様々なパラメーターに応じて、特に、使用される投与様式、関連する病理学、または代替として処置の所望の持続時間に応じて適合させることができる。

【0265】

医薬組成物を製造するために、有効量の本発明の抗体またはイムノコンジュゲートは、薬学的に許容される担体または水性媒体に溶解または分散させることができる。

【0266】

注射可能な使用に好適な剤形としては、滅菌水溶液または分散液；ゴマ油、落花生油または水性プロピレングリコールを包含する調合物；および滅菌注射用溶液または分散液の即時製造のための滅菌粉末が挙げられる。いずれのケースにおいても、剤形は、滅菌されていなければならない、さらに、簡単にシリンジ操作できる程度の流動性を有していなければならない。剤形は、製造および貯蔵条件下で安定でなければならない、さらに、微生物、例えば細菌および真菌の汚染作用から保護されていなければならない。

【0267】

遊離塩基または薬理学的に許容できる塩としての活性化合物の溶液は、好適には界面活性剤、例えばヒドロキシプロピルセルロースと混合された水中で製造することができる。また分散液も、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、さらには油中で製造することができる。通常の貯蔵および使用条件下で、これらの調製物は、微生物の成長を防ぐための保存剤を含有する。

【0268】

本発明の抗体様結合タンパク質は、中性または塩の形態で組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩（タンパク質の遊離のアミノ基と形成される）が挙げられ、酸付加塩は、例えば塩化水素酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される。遊離のカルボキシル基と形成された塩は、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、グリシン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導することもできる。

【0269】

担体はまた、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの好適な混合物、および植物性油を含有する溶媒または分散媒であってもよい。適切な流動性は、例えば、コーティング、例えばレシチンの使用によって、分散液のケースでは必要な粒度の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の予防は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって達成することができる。多くの場合において、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを包含することが好ましいと予想される。注射用組成物の持続性の吸収は、吸収を遅らせる物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物中で使用することによって達成することができる。

【0270】

滅菌注射用溶液は、適切な溶媒中に、必要に応じて上記で列挙された様々な他の成分と共に、活性化合物を必要な量で取り込み、続いて過滅菌することによって製造される。一

10

20

30

40

50

般的に、分散液は、基本の分散媒および上記で列挙されたものから必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに、様々な滅菌した活性成分を取り込むことによって製造される。滅菌注射用溶液を製造するための滅菌粉末のケースにおいて、好ましい製造方法は、活性成分に加えてあらゆる追加の所望の成分の予め滅菌ろ過した溶液からそれらの粉末をもたらす、真空乾燥および凍結乾燥技術である。

【0271】

直接の注射のための、さらに濃縮された、または高度に濃縮された溶液の製造も企図され、その場合、極めて迅速な浸透、小さい腫瘍領域への高濃度の活性薬剤の送達をもたらすために、溶媒としてDMSOを使用することが想定される。

【0272】

調合されたら、投薬調合物に適合した方式で、さらに治療上有効になるような量で溶液が投与されると予想される。調合物は、上述したタイプの注射用溶液などの様々な剤形で容易に投与されるが、薬物放出カプセルなども採用することができる。

【0273】

水溶液での非経口投与の場合、例えば、このような溶液は、必要に応じて、好適には緩衝化され、最初に液体希釈剤が十分な塩類溶液またはグルコースで等張にされると予想される。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下および腹膜内投与にとって特に好適である。これに関して、採用できる滅菌水性媒体は、本発明の開示の観点において当業者に公知であると予想される。例えば、1回分の投薬量を1mlの等張NaCl溶液中に溶解させて、1000mlの皮下注入用流体に添加するか、または提示された注入部位に注射するかのいずれでもよい(例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035~1038頁および1570~1580頁を参照)。処置される対象の状態に応じて、投薬量を必然的に多少変更することが予想される。いずれの場合においても、投与に関わる人が個々の対象に対して適切な用量を決定することになる。

【0274】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、1用量当たり約0.01から100ミリグラムほどが含まれるように治療混合物中に配合される。

【0275】

非経口投与、例えば静脈内または筋肉内注射のために製剤化された抗体様結合タンパク質に加えて、他の薬学的に許容される形態としては、例えば錠剤または他の経口投与のための固体；徐放性カプセル；および現在使用される他のあらゆる形態が挙げられる。

【0276】

ある特定の実施形態において、抗CD3抗体、抗CD123抗体または抗体様結合タンパク質などのポリペプチドを宿主細胞に導入するために、リポソームおよび/またはナノ粒子の使用が企図される。リポソームおよび/またはナノ粒子の形成および使用は、当業者に公知である。

【0277】

ナノカプセルは、一般的に、安定で再現可能な方法で化合物を閉じ込めることができる。細胞内にポリマーが過剰蓄積することによる副作用を回避するために、このような超微細な粒子(およそ0.1μmのサイズを有する)は、一般的に、インビボで分解可能なポリマーを使用して設計される。これらの必要条件を満たす生分解性ポリアルキル-シアノアクリレートナノ粒子が、本発明で使用するのに企図され、このような粒子は容易に作製することができる。

【0278】

リポソームは、水性媒体中に分散されると自発的に多層の同軸の二重層小胞(多層小胞(MLV))とも称される)を形成するリン脂質から形成される。MLVは、一般的に、25nmから4μmの直径を有する。MLVを超音波破碎すると、コアに水溶液を含有する200から500の範囲の直径を有する小型単層小胞(SUV)の形成が起こる。リポソームの物理特性は、pH、イオン強度および2価カチオンの存在によって決まる。

10

20

30

40

50

## 【0279】

医薬組成物は、製剤化されたら、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体として、または脱水粉末または凍結乾燥粉末として滅菌バイアル中で貯蔵することができる。このような調合物は、すぐ使用できる形態、または投与前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥された）のいずれかで貯蔵することができる。

## 【0280】

治療方法および使用

本発明者らは、インビボで、本発明の数々の二重特異性化合物、例えば h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 C O D V - F a b - T L 1 および h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 C O D V - F a b - O L 1 に関して、C D 1 2 3 陽性腫瘍細胞株モデルに対する T 細胞媒介性細胞傷害を示した。さらに本発明者らは、腫瘍細胞の細胞傷害性を引き起こす標的細胞の存在下で T 細胞を活性化する数々の本発明の二重特異性化合物の能力を実証した。本発明者らはさらに、T 細胞活性化の非存在下、標的細胞の非存在における、T 細胞の低い活性化を実証した。

10

## 【0281】

したがって、一実施形態において、本発明は、疾患または障害を処置または予防する方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の、上記の「医薬組成物」の章で定義された本発明の抗体様結合タンパク質または医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。

## 【0282】

本発明はさらに、対象において疾患または障害を処置または予防するための医薬の製造のための、本発明の抗体様結合タンパク質または医薬組成物の使用に言及する。一実施形態において、本発明は、対象において疾患または障害を処置または予防するための、抗体様結合タンパク質または医薬組成物の使用に言及する。

20

## 【0283】

一実施形態において、「対象」は、ヒトを指す。

## 【0284】

一実施形態において、「疾患」または「障害」は、本発明の抗体様結合タンパク質での処置によって利益を得ると予想されるあらゆる状態である。一実施形態において、これには、対象を問題の障害に罹りやすくする病理学的な状態を含めた、慢性および急性の障害または疾患が包含される。

30

## 【0285】

別の実施形態において、障害は、がんを指す。

## 【0286】

さらなる実施形態において、がんは、血液がん、特に C D 1 2 3 発現に関連する血液がんに関する。

## 【0287】

一実施形態において、がん細胞による C D 1 2 3 の発現は、例えば抗 C D 1 2 3 抗体を使用することによって容易にアッセイされる。抗 C D 1 2 3 抗体を使用して C D 1 2 3 を発現するがんを同定する方法は、当業者に公知である。

## 【0288】

「C D 1 2 3 発現に関連する血液がん」としては、白血病（例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病および骨髄異形成症候群）および悪性のリンパ増殖性状態、芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（B P D C N）、全身性肥満細胞症、例えばリンパ腫など（例えば多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、ならびに小細胞および大細胞型濾胞性リンパ腫）が挙げられる。

40

## 【0289】

上記の「定義」の章に記載したように、L S C は、C D 1 2 3 を発現する。

## 【0290】

したがって、関連する実施形態において、がんは、白血病幹細胞に関連する血液がんを指

50

す。

【 0 2 9 1 】

本発明に従って処置しようとする白血病幹細胞（ L S C ）に関連する血液がん状態としては、白血病（例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、および骨髄異形成症候群）および悪性のリンパ増殖性状態、例えばリンパ腫など（例えば多発性骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、ならびに小細胞および大細胞型濾胞性リンパ腫）が挙げられる。

【 0 2 9 2 】

本発明の一態様において、血液がんは、急性骨髄性白血病（ A M L ）である。

【 0 2 9 3 】

一実施形態において、対象は、 A M L に罹っていると診断されている。

【 0 2 9 4 】

さらなる実施形態において、対象は、すでに完全寛解まで化学療法で処置されているが再発している。

【 0 2 9 5 】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質は、単独で、またはあらゆる好適な成長阻害剤と組み合わせて使用される。

【 0 2 9 6 】

一実施形態において、本発明の抗体様結合タンパク質での処置の効能は、例えばがんのマウスモデルで、さらに処置された群と対照群との間での例えば腫瘍体積の変化を測定することによって、インビボで容易にアッセイされる。

【 0 2 9 7 】

キット

最終的に、本発明はまた、本発明の少なくとも 1 つの抗体様結合タンパク質を含むキットも提供する。

【 0 2 9 8 】

一実施形態において、キットは、

a ) 本明細書の上記の「抗 C D 3 / 抗 C D 1 2 3 抗体様結合タンパク質」の章で定義されるような、少なくとも 1 つの本発明の抗体様結合タンパク質、

b ) 場合により、包装材、および

c ) 場合により、前記抗体様結合タンパク質はがんを処置するのに、またはがんの処置に使用するのに有効であることを示す、前記包装材内に含有されるラベルまたは添付文書を含む。

【 0 2 9 9 】

関連する実施形態において、少なくとも 1 つの本発明の抗体様結合タンパク質は、単一のおよび / または複数に仕切られたプレフィルドシリンジ（例えば、液体シリンジおよびリオシリンジ（ l y o s y r i n g e ））に含有される。

【 0 3 0 0 】

一実施形態において、本発明は、単回用量の投与単位を生産するキットを包含する。

【 0 3 0 1 】

したがって、一実施形態において、本発明のキットの a ) で述べられたような少なくとも 1 つの本発明の抗体様結合タンパク質は、第 1 の容器に含有された本発明の乾燥させた抗体様結合タンパク質である。次いでキットは、水性製剤を有する第 2 の容器をさらに含有する。

【 0 3 0 2 】

したがって、一実施形態において、キットは、

a ) 本明細書の上記の「抗 C D 3 / 抗 C D 1 2 3 抗体様結合タンパク質」の章で定義されるような、少なくとも 1 つの本発明の乾燥させた抗体様結合タンパク質を含む第 1 の容器、

b ) 水性製剤を含む第 2 の容器；

c ) 場合により、包装材、および

10

20

30

40

50

d) 場合により、前記抗体様結合タンパク質はがんを処置するのに、またはがんの処置に使用するのに有効であることを示す、前記包装材料内に含有されるラベルまたは添付文書を含む。

【0303】

水性製剤は、典型的には、本明細書の上記の「医薬組成物」の章で定義されるような薬学的に許容される担体を含む水溶液である。

【0304】

関連する実施形態において、「第1の容器」および「第2の」容器は、複数の仕切られたプレフィルドシリンジ（例えば、分散シリンジ）の区画を指す。

【0305】

ここで、以下の図面および実施例を参照しながら本発明をより詳細に説明する。本明細書において引用された全ての文献および特許文書は、参照により本明細書に組み入れられる。前述の記載において本発明を例示し詳細に説明したが、実施例は、説明的または例示的なものであり、限定的ではないとみなされるものとする。

【0306】

配列の簡単な説明

配列番号1は、UniProtデータベースから受託番号P07766で入手可能な、シグナルペプチドを含む全長ヒトCD3 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0307】

配列番号2は、UniProtデータベースから受託番号Q95LI5で入手可能な、シグナルペプチドを含む全長カニクイザルCD3 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0308】

配列番号3は、全長野生型ヒトCD3 タンパク質のアミノ酸23から126を含む、成熟ヒトCD3 Hisタグ付きFc-融合体のアミノ酸配列を示す。

【0309】

配列番号4は、野生型配列のアミノ酸位置57と比較してアミノ酸位置35に1つのAlaからValへの交換を含有する全長野生型カニクイザルCD3 タンパク質（配列番号2）のアミノ酸23から117を含む成熟カニクイザルCD3 Fc-融合体のアミノ酸配列を示す。

【0310】

配列番号5、6および7は、いわゆる「hz20G6」抗体のCDR1-H、CDR2-HおよびCDR3-Hのアミノ酸配列を示す。

【0311】

配列番号8は、いわゆる「hz20G6」抗体のCDR3-Lのアミノ酸配列を示す。

【0312】

配列番号9は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVHバリエーションであるアミノ酸配列VH1dを示す。

【0313】

配列番号10は、ヒト化「20G6」抗CD3抗体のVLバリエーションであるアミノ酸配列VL1cを示す。

【0314】

配列番号11は、配列番号10のヒト化「20G6」抗CD3抗体のVL1cバリエーションのCDR1-Lのアミノ酸配列を示す。

【0315】

配列番号12は、NCBIデータベースからNP\_002174.1で、およびUniProtデータベースからP26951で入手可能なものとしての、シグナルペプチドを含む全長ヒトCD123タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0316】

配列番号13は、GenBankデータベースからEHH61867.1で、およびUniProtデータベースからG8F3K3で入手可能なものとしての、シグナルペプチド

10

20

30

40

50



を含む全長カニクイザルCD123タンパク質のアミノ酸配列を示す。

【0317】

配列番号14は、全長ヒトCD123タンパク質（配列番号12）のアミノ酸22から305を含む、成熟ヒトCD123His - IIタグ付きFc - 融合体のアミノ酸配列を示す。

【0318】

配列番号15は、全長カニクイザルCD123タンパク質（配列番号13）のアミノ酸22から305を含む、成熟カニクイザルCD123His - IIタグ付きFc - 融合体のアミノ酸配列を示す。

【0319】

配列番号16は、いわゆるCODV - Fab「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質のリンカーL1のアミノ酸配列を示す。

【0320】

配列番号17は、いわゆるCODV - Fab「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質のリンカーL2のアミノ酸配列を示す。

【0321】

配列番号18は、いわゆるCODV - Fab「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列CLを示す。

【0322】

配列番号19は、いわゆるCODV - Fab「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質のアミノ酸配列CH1を示す。

【0323】

配列番号20は、リンカー配列（Gly - Gly - Gly - Gly - Ser）のアミノ酸配列を示す。

【0324】

配列番号21は、リンカー配列（Gly - Gly - Gly - Gly - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Ser）のアミノ酸配列を示す。

【0325】

配列番号22は、リンカー配列（Thr - Val - Ala - Ala - Pro）のアミノ酸配列を示す。

【0326】

配列番号23は、リンカー配列（Gln - Pro - Lys - Ala - Ala）のアミノ酸配列を示す。

【0327】

配列番号24は、リンカー配列（Gln - Arg - Ile - Glu - Gly）のアミノ酸配列を示す。

【0328】

配列番号25は、リンカー配列（Ala - Ser - Thr - Lys - Gly - Pro - Ser）のアミノ酸配列を示す。

【0329】

配列番号26は、リンカー配列（Ala - Ser - Thr - Lys - Gly - Pro - Ser）のアミノ酸配列を示す。

【0330】

配列番号27は、リンカー配列（Gly - Gly - Gly - Ser）のアミノ酸配列を示す。

【0331】

配列番号28は、リンカー配列（Ser - Gly - Gly - Gly - Ser）のアミノ酸配列を示す。

【0332】

配列番号29は、リンカー配列（Gly - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - S

10

20

30

40

50

er) のアミノ酸配列を示す。

【0333】

配列番号30は、リンカー配列 (Gly - Gly - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Ser) のアミノ酸配列を示す。

【0334】

配列番号31は、リンカー配列 (Gly - Gly - Gly - Ser - Gly - Gly - Gly - Gly - Ser) のアミノ酸配列を示す。

【0335】

配列番号32は、リンカー配列 (Lys - Thr - His - Thr) のアミノ酸配列を示す。

10

【0336】

配列番号33は、リンカー配列 (Lys - Thr - His - Thr - Ser) のアミノ酸配列を示す。

【0337】

配列番号34は、リンカー配列 (Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser) のアミノ酸配列を示す。

【0338】

配列番号35は、リンカー配列 (Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro) のアミノ酸配列を示す。

【0339】

20

配列番号36は、リンカー配列 (Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro) のアミノ酸配列を示す。

【0340】

配列番号37は、リンカー配列 (Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro) のアミノ酸配列を示す。

【0341】

配列番号38は、リンカー配列 (Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser) のアミノ酸配列を示す。

【0342】

配列番号39は、リンカー配列 (Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser) のアミノ酸配列を示す。

30

【0343】

配列番号40は、リンカー配列 (Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro) のアミノ酸配列を示す。

【0344】

配列番号41は、リンカー配列 (Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro) のアミノ酸配列を示す。

【0345】

配列番号42は、リンカー配列 (Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly) のアミノ酸配列を示す。

40

【0346】

配列番号43は、リンカー配列 (Gly - Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly) のアミノ酸配列を示す。

【0347】

配列番号44は、リンカー配列 (Gly - Glu - Pro - Lys - Ser - Asp - Lys - Thr - His - Thr - Ser - Pro - Pro - Ser - Pro - Gly - Gly) のアミノ酸配列を示す。

50

## 【 0 3 4 8 】

配列番号 4 5 は、リンカー配列 ( G l y - G l y - G l u - P r o - L y s - S e r - A s p - L y s - T h r - H i s - T h r - S e r - P r o - P r o - S e r - P r o - G l y - G l y ) のアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 4 9 】

配列番号 4 6 は、リンカー配列 ( G l y - G l y - G l u - P r o - L y s - S e r - A s p - L y s - T h r - H i s - T h r - S e r - P r o - P r o - S e r - P r o - G l y - G l y - G l y ) のアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 5 0 】

配列番号 4 7 は、リンカー配列 ( G l y - G l y - G l y - G l u - P r o - L y s - S e r - A s p - L y s - T h r - H i s - T h r - S e r - P r o - P r o - S e r - P r o - G l y - G l y - G l y ) のアミノ酸配列を示す。

10

## 【 0 3 5 1 】

配列番号 4 8 および 4 9 は、いわゆる「 h z 7 G 3 」抗体の C D R 1 - L および C D R 3 - L のアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 5 2 】

配列番号 5 0 および 5 1 は、配列番号 5 2 のいわゆるヒト化「 7 G 3 」抗体の C D R 1 - H および C D R 3 - H のアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 5 3 】

配列番号 5 2 は、いわゆるヒト化「 7 G 3 」抗体の重鎖可変ドメインのさらなるバリエーションのアミノ酸配列を示す。

20

## 【 0 3 5 4 】

配列番号 5 3 は、配列番号 5 2 のいわゆるヒト化「 7 G 3 」抗体の 1 つの C D R 2 - H のアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 5 5 】

配列番号 5 4 は、いわゆるヒト化「 7 G 3 」抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 5 6 】

配列番号 5 5 は、いわゆる C O D V - F a b - O L 1 および C O D V - F a b - O L 1 a および C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F G S なし ( w o G S ) 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質の式 [ I ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

30

## 【 0 3 5 7 】

配列番号 5 6 は、リンカー配列 ( G l y - G l y - S e r - G l y - S e r - S e r - G l y - S e r - G l y - G l y ) のアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 5 8 】

配列番号 5 7 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - R F 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質の式 [ I V ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 5 9 】

配列番号 5 8 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - R F 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質の F c 2 領域のアミノ酸配列を示す。

40

## 【 0 3 6 0 】

配列番号 5 9 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - R F および C O D V - F a b - T L 1 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」抗体様結合タンパク質の式 [ I I I ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 6 1 】

配列番号 6 0 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - R F および C O D V - F a b - T L 1 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」の式 [ I I I ] のポリペプチドの F c 領域のアミノ酸配列を示す。

## 【 0 3 6 2 】

50

配列番号 61 は、いわゆる CODV - Fab - OL1「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の式 [ I I I ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 0363 】

配列番号 62 は、いわゆる CODV - Fab - OL1「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の F<sub>c</sub> 領域のアミノ酸配列を示す。

【 0364 】

配列番号 63 は、いわゆる CODV - Fab - OL1「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の F<sub>c</sub> スタンブ ( F<sub>c</sub>3 ) のアミノ酸配列を示す。

【 0365 】

配列番号 64 は、いわゆる CODV - Fab - OL1a「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の F<sub>c</sub> スタンブ ( F<sub>c</sub>3 ) のアミノ酸配列を示す。

10

【 0366 】

配列番号 65 は、いわゆる CODV - Fab - OL1a および CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RF GS なし「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の式 [ I I I ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 0367 】

配列番号 66 は、いわゆる CODV - Fab - OL1a および CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RF wo GS「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の式 [ I I I ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> ドメインのアミノ酸配列を示す。

【 0368 】

20

配列番号 67 は、いわゆる本発明の抗体様結合タンパク質 ( すなわち CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール、CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RF GS なし ( wo GS ) ) の式 [ I I I ] のポリペプチドの一般化されたアミノ酸配列を示す。

【 0369 】

配列番号 68 は、いわゆる本発明の抗体様結合タンパク質 ( すなわち CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール、CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RF GS なし ( wo GS ) ) の式 [ I I I ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> ドメインの一般化されたアミノ酸配列を示す。

30

【 0370 】

配列番号 69 は、いわゆる CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RF GS なし ( wo GS )「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の F<sub>c</sub> スタンブ ( F<sub>c</sub>3 ) のアミノ酸配列を示す。

【 0371 】

配列番号 70 は、いわゆる抗体様結合タンパク質 CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホールの式 [ I V ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> ドメイン ( F<sub>c</sub>2 ) の一般化されたアミノ酸配列を示す。

40

【 0372 】

配列番号 71 は、いわゆる抗体様結合タンパク質 CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホールの式 [ I V ] のポリペプチドの一般化されたアミノ酸配列を示す。

【 0373 】

配列番号 72 は、いわゆる CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール「hz20G6 x hz7G3」抗体様結合タンパク質の式 [ I V ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 0374 】

50

配列番号 73 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - R F x ホール「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I V ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> 2 のアミノ酸配列を示す。

【 0 3 7 5 】

配列番号 74 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - R F x ホールおよび C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - x ホール「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I I I ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 0 3 7 6 】

配列番号 75 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - R F x ホールおよび C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - x ホール「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の F<sub>c</sub> の式 [ I I I ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

10

【 0 3 7 7 】

配列番号 76 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F および C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - x ホール「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I V ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 0 3 7 8 】

配列番号 77 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F および C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I V ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> 2 ドメインのアミノ酸配列を示す。

【 0 3 7 9 】

20

配列番号 78 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I I I ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

【 0 3 8 0 】

配列番号 79 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I I I ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> のアミノ酸配列を示す。

【 0 3 8 1 】

配列番号 80 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I V ] のポリペプチドのアミノ酸配列を示す。

30

【 0 3 8 2 】

配列番号 81 は、いわゆる C O D V - F a b - T L 1「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」抗体様結合タンパク質の式 [ I V ] のポリペプチドの F<sub>c</sub> 2 ドメインのアミノ酸配列を示す。

【 0 3 8 3 】

配列番号 82 は、W O 2 0 1 5 0 2 6 8 9 2 で示されたような配列番号 1 のアミノ酸配列を示す。

【 0 3 8 4 】

配列番号 83 は、W O 2 0 1 5 0 2 6 8 9 2 で示されたような配列番号 3 のアミノ酸配列を示す。

【 0 3 8 5 】

40

配列番号 84 は、S t r e p タグのアミノ酸配列を示す。

【 0 3 8 6 】

配列番号 85 は、H i s タグのアミノ酸配列を示す。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 3 8 7 】

【 図 1 】 A ) C O D V - F a b - T L 1 - R F の概略図、 B ) S D S - ゲル、 C ) S E C プロファイル ( 1 7 8 , 1 7 m L におけるピークは、ヘテロ二量体画分を表す ) 。プロテイン A 後の収量 = 1 2 m g / L 、 5 2 % のヘテロ二量体を示す図である。

【 図 2 】 A ) C O D V - F a b - T L 1 - ノブ - R F x ホールの概略図、 B ) S D S - ゲル、 C ) S E C プロファイル ( 1 7 7 , 9 0 m L におけるピークは、ヘテロ二量体画分を

50

表す)。プロテインA後の収量 = 20 mg / L、85%のヘテロ二量体を示す図である。

【図3】A) CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RFの概略図、B) SDS - ゲル、C) SECプロファイル(180, 54 mLにおけるピークは、ヘテロ二量体画分を表す)。プロテインA後の収量 = 9 mg / L、55%のヘテロ二量体を示す図である。

【図4】CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RF\_\_woGS (GSなし)、B) SDS - ゲル、C) SECプロファイル(180, 59 mLにおけるピークは、ヘテロ二量体画分を表す)の概略図を示す図である。プロテインA後の収量 = 5 mg / L、88%のヘテロ二量体。

【図5】本発明の抗体結合タンパク質の安定性を実証するグラフである。加速ストレス条件後の凝集の性質(2週間、40 )をSECによって査定した。比較における、-80

または4 で貯蔵された同じタンパク質のSECプロファイル。A) CODV - Fab - TL1 - RFB) CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホールC) CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RFD) CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RFwoGS。

【図6】ヒトT細胞の存在下における完全ヒトCODV - Fab - TL1 - RF「hz20G6 x hz7G3」IVQ3dは、全ての試験された用量で全身におけるMolm13腫瘍成長を阻害することを示す図である。

【図7】ヒトT細胞の存在下における完全ヒトCODV - Fab - TL1 - RF「hz20G6 x hz7G3」IVQ3dは、全ての試験された用量で長骨における腫瘍退縮に関連する。

【図8】ヒトT細胞の存在下における完全ヒトCODV - Fab - TL1 - RF「hz20G6 x hz7G3」IVQ3dは、全ての試験された用量で全身におけるMolm13腫瘍成長を阻害することを示す図である。

【図9】ヒトT細胞の存在下における完全ヒトCODV - Fab - TL1 - RF「hz20G6 x hz7G3」IVQ3dは、全ての試験された用量で長骨における腫瘍退縮に関連する。

【図10】CODV - Fab - TLおよびCODV - Fab - OLの構造の図表示である(LALA突然変異(IgG1骨格のFcが使用される場合)およびノブ - イントウ - ホール突然変異をさらに示す)。

【図11】抗体様結合タンパク質CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1、CODV - Fab - TL1 - RF、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホールおよびそれらの一般化されたアミノ酸配列を表す配列番号70の、式[IV]のポリペプチドのFcドメイン(Fc2)の配列アライメントを示す図である。抗体様結合タンパク質CODV - Fab - TL1 - RFは、PCT/EP2016/051386に記載されている。このアライメントから、CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホールの式[IV]のポリペプチドのFcドメイン(Fc2)は、「ノブ」突然変異の存在のために、抗体様結合タンパク質CODV - Fab - TL1 - RFの式[IV]のポリペプチドのFcドメイン(Fc2)と区別され、CODV - Fab - TL1の式[IV]のポリペプチドのFcドメイン(Fc2)は、RF突然変異の非存在のために、抗体様結合タンパク質CODV - Fab - TL1 - RFの式[IV]のポリペプチドのFcドメイン(Fc2)とは異なることがわかる。

【図12】抗体様結合タンパク質CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1、CODV - Fab - TL1 - RF、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホールおよびそれらの一般化されたアミノ酸配列を表す配列番号68の、式[III]のポリペプチドのFcドメインの配列アライメントを示す図である。このアライメントから、CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF x ホール、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF、CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホールの式[III]のポリペプチドのFcドメインは、「ホール」

10

20

30

40

50

突然変異の存在のために抗体様結合タンパク質 CODV - Fab - TL1 - RF と区別されることがわかる。

【図13】抗体様結合タンパク質 CODV - Fab - OL1、CODV - Fab - OL1a、CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RFw o G S の式 [ I I I ] のポリペプチドのFcドメインの配列アライメントを示す図である。

【図14】抗体様結合タンパク質 CODV - Fab - OL1、CODV - Fab - OL1a、CODV - Fab - OL1 - ノブ x ホール - RFw o G S の式 [ I I I ] のポリペプチドのFc<sub>3</sub>ドメインの配列アライメントを示す図である。抗体様結合タンパク質 CODV - Fab - OL1 および CODV - Fab - OL1a は、PCT / EP 2016 / 051386 に記載されている。このアライメントから、CODV - Fab - OL1 - ノブ x

10

ホール - RF 「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」I V Q 3 d は、全ての試験された用量で全身におけるM o l m 1 3 腫瘍成長を阻害することを示す図である。

【図16】ヒトT細胞の存在下における完全ヒト CODV - Fab - TL1 - ノブ x ホール - RF 「h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3」I V Q 3 d は、全ての試験された用量で長骨における腫瘍退縮に関連することを示す図である。

【0388】

20

以下の実施例で示されるように、これらの抗CD3 / 抗CD123抗体様結合タンパク質は、精製の簡易化ならびに発現および精製中の凝集の低減をもたらし、したがって、CD123を発現する標的細胞、例えばTHP - 1細胞の非存在下で低いT細胞活性化を有するが、CD123を発現する標的細胞、例えばTHP - 1細胞の存在下で高いT細胞活性化を有しながら、ヘテロ二量体の量を増加させる突然変異を含む。

【実施例】

【0389】

実施例1 : h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 CODV - Fab - TL1 - RF、h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 CODV - Fab - OL1 および DART

1.1 CD123 x CD3 CODV または DART のT細胞を活性化する作用

30

安全性の読み出しとしてのT細胞の活性化状態に対する抗体様結合タンパク質の作用を、2.9に記載したように、初代ヒトT細胞の表面における活性化マーカーCD25およびCD69の発現のフローサイトメトリーベースの検出によって分析した。比較には、WO2015026892において、互いにジスルフィド結合による共有結合で結合した配列番号82の配列の第1のポリペプチド鎖(WO2015026892に示された配列番号1)および配列番号83の配列の第2のポリペプチド鎖(WO2015026892に示された配列番号3)を含むと記載されたDARTフォーマットの単鎖CD123 x CD3二重特異性ダイアボディ(本明細書では「MGD006」と称される)を用いた。CODVを単離されたT細胞単独と共にインキュベートしたところ、後期活性化マーカーCD25の発現における有意な増加は、CD4陽性およびCD8陽性T細胞の表面において検出

40

【0390】

【表 4】

表 1:フローサイトメトリーベースのアッセイにおいて CD69 発現レベルによって検出された T 細胞の活性化状態に対する二重特異性 CD123×CD3CODV または DART の作用。T 細胞のみを用いたアッセイにおける 100nM の抗体濃度での活性化された CD8 および CD4T 細胞の平均パーセンテージを提示する。

二重特異性分子	安全性-標的細胞なしでの T 細胞活性化 n=3					
	CD4+/CD69+ %活性化 PBS への正規化 C=100nM 平均±SEM			CD8+/CD69+ %活性化 PBS への正規化 C=100nM 平均±SEM		
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	18	+/-	4	15	+/-	2
CODV-Fab-OL1 "hz20G6xhz7G3"	6	+/-	2	9	+/-	2
単鎖抗体 DART フォーマット MGD006	82	+/-	9	83	+/-	4

【 0 3 9 1 】

表 1 に示される結果によれば、単鎖抗体 (DART) が、試験された条件下で、標的細胞の非存在下でより有意に高い T 細胞活性化を引き起こすことが示される。

【 0 3 9 2 】

【表 5】

表 2:フローサイトメトリーベースのアッセイにおいて CD69 発現レベルによって検出された T 細胞の活性化状態に対する、CODV 分子および単鎖 DART を含有する二重特異性完全ヒト化 7G3 の作用。活性化された CD8 および CD4T 細胞の代表的な試験の EC50 値を示す。THP-1 標的細胞および初代 T 細胞のコインキュベーションを用いてアッセイを実行した。

二重特異性分子	活性-THP-1 標的細胞を用いた T 細胞活性化	
	CD4+T 細胞 (%CD69+細胞) EC50 (pM) n=1-6	CD8+T 細胞 (%CD69+細胞) EC50 (pM) n=1-6
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	3.2	9.9
CODV-Fab-OL1 "hz20G6xhz7G3"	1.0	3.3
単鎖抗体 DART フォーマット MGD006	1.0	3.5

【 0 3 9 3 】

CODV-Fab-TL1-RF「hz20G6xhz7G3」、CODV-Fab-OL1「hz20G6xhz7G3」および単鎖 DART MGD006 の細胞傷害作用を査定した。各二重特異性コンストラクトの CD3 / - 複合体および CD123 への親和性を、Biacore によって測定した。さらに、細胞傷害アッセイを、2.8 に記載



されたようにして実行した（表 3）。

【 0 3 9 4 】

【表 6】

表 3:二重特異性 CD123×CD3CODV 分子および DART(MGD006)の親和性および活性

二重特異性分子	KD (CD3e/d) [nM]	KD (CD123) [nM]	細胞傷害アッセイ (THP 細胞) EC50 [pM] n= 3
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	11	0.2	1.0+/-0.1
CODV-Fab-OL1 "hz20G6xhz7G3"	15	0.4	0.9+/-0.1
単鎖抗体 DART フォーマット MGD006	9	0.2	0.3+/-0.04

10

【 0 3 9 5 】

分子が標的細胞の存在下（所望）および非存在下（不要）で T 細胞活性化を開始させる可能性を査定するために、新しいアッセイを実行した。384 ウェルプレートで、2 g / L（11 mM）グルコース、G l u t a M A X、25 mM の H E P E S を含む R P M I 1640 中、37 °C および 5 % C O 2 で、1 : 3 のエフェクター対標的の比率で、N F A T - R E - l u c 2 J u r k a t 細胞（P r o m e g a 番号 C S 1 7 6 4 0 1）を T H P - 1 標的細胞と共にインキュベートした。5 時間後、インキュベーションを止め、発光マイクロプレートリーダーで B i o - G l o ールシフェラーゼアッセイシステム、P r o m e g a 番号 G 7 9 4 0 を使用して発光を測定した。

20

【 0 3 9 6 】

【表 7】

表 4:Jurkat-NFAT-Luc-レポーター細胞株で測定された CD123×CD3CODV 分子および MGD006 により誘導された T 細胞活性化。

30

二重特異性分子	THP1 細胞あり EC50 (pM) n= 3	標的細胞なし 標的細胞を用いたアッセイに おける最大活性化に対する Cmax での活性化(%) n= 3
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	444±0.2	0.4±0.3
CODV-Fab-OL1 "hz20G6xhz7G3"	320±0.2	0.4±0.3
単鎖抗体 DART フォーマット MGD006	370±0.2	25.1±9.9

40

【 0 3 9 7 】

表 4 に示される結果から、全ての抗体様結合タンパク質が、標的細胞の存在下において n M より低い E C 5 0 値でレポーター細胞活性化を誘導することが示される。T 細胞係合アプローチのために、T 細胞活性化は標的細胞の存在に制限されるべきである。これは、標的細胞の非存在下で有意な発光シグナルがないため、C O D V 分子の場合でみられる。対

50

照的に、単鎖 DART 分子は、標的細胞の非存在下で、より高いレポーター細胞株活性化を誘導する。これらの結果は、初代 T 細胞で得られた結果と一致する。

#### 【0398】

1.2 インビボにおける CD123 × CD3 二重特異性 CODV - Fab - T L 1 - R F および CD123 × CD3 二重特異性 DART の抗腫瘍活性

材料および方法

全血からのヒト PBMC および T 細胞の単離

PBMC を、フィコール勾配遠心分離を用いて健康なヒトドナーの全血から単離した。全血を滅菌リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) で 1 : 1 に希釈した。次いで、35 mL の希釈した血液の 2 つ分を、15 mL のフィコールバック存在下で 2 本の 50 mL ファルコンチューブに入れた。チューブを、室温、200 g で 40 分ブレーキをかけずに遠心分離した。2 つの軟膜層を回収し、6 本の 50 mL ファルコンチューブに 45 mL の滅菌 PBS と共に入れ、室温で 10 分間、100 g で 3 回、ブレーキをかけずに遠心分離した (各遠心分離の間に、上清を捨て、45 mL の PBS を添加した)。最後の遠心分離の後、50 mL ファルコンチューブ中で 2 つのペレットを一緒にして、PBS で最終容量を 50 mL にした。合計の生存可能な PBMC の数は、Vice ll の計数によって定義された。次いでペレットを、Myltenyi Biotech (130-091-221) からの Automacs ランニング緩衝液中に回収し、Myltenyi Biotech からの陰性選択キット (130-091-156) および Automacs を製造業者の説明書に従って使用して、T 細胞を PBMC から単離した。精製された T 細胞を回収し、Xviv o - 15 5 % H I S + pen i - strept o 1 × 培地中の培養物に細胞  $2.5 \times 10^6$  個 / mL の濃度で入れた。

#### 【0399】

ヒト T 細胞増幅

ヒト濃縮 T 細胞集団を活性化し、Myltenyi Biotech からの T 細胞活性化 / 増殖キット (130-091-441) を使用してインビトロで 14 日間増殖させた。

#### 【0400】

インビボでの投与のためのヒト T 細胞調製物

細胞および細胞培養培地を 400 g で 10 分遠心分離した。滅菌 PBS 中にペレットを細胞  $2 \times 10^6$  個 / mL の濃度で回収した。増幅された T 細胞からの活性化ビーズの除去を、Myltenyi Biotech からの MAC s i M A G セパレーター (130-092-168) を製造業者の説明書に従って使用して実行した。濃縮された T 細胞集団を Vice ll 計数によって計数し、50 mL ファルコンチューブ中の 25 mL の滅菌 PBS 中に回収した。室温、400 g で 10 分間の遠心分離工程後、十分な体積の滅菌 PBS 中に細胞ペレットを回収して、細胞  $5 \times 10^6$  個 / mL の最終濃度を得た。

#### 【0401】

腫瘍モデル

CD123 を発現する Molm - 13 ヒト急性骨髄性白血病細胞を、ライプニッツ研究所 DSMZ - ドイツ微生物細胞培養コレクション (Leibniz - institut DSMZ - German collection of microorganisms and cell cultures) (DSMZ Braunschweig, Germany) から得た。RPMI 1640 GlutaMAX 培地 (ウシ胎児血清 20 % を入れて完成させた) 中での培養 (37 °C、5 % CO<sub>2</sub>、95 % 湿度) で、細胞を成長させた。Molm - 13 細胞を、複製能がないレンチウイルスによって運搬されたルシフェラーゼベクター (SV40 - PGL4 - Puro、すなわちルシフェラーゼ 2 に連結したシミアンウイルス 40 プロモーターおよびピューロマイシン耐性カセット配列からなるルシフェラーゼベクター) に感染させた。

#### 【0402】

Molm13 - luc + 腫瘍細胞を、NOD . C g - Pr k d c s c i d Il2 r g t m1W j I / S z J NSG マウス (動物 1 匹当たり 200 μL の PBS 懸濁液中  $10^6$  個 / mL の濃度で注入)

+ 6 個の細胞)に静脈内 (IV) 注射した。24 時間後、同じマウスに 0.2 mL の滅菌 PBS の体積で  $1.0 \times 10^7$  個のヒト T 細胞を腹腔内 (IP) 投与した。

#### 【0403】

腫瘍埋め込み後 3 日目におけるベースラインの生物発光イメージングを、IVIS 100 イメージャー (PerkinElmer、Waltham、MA、USA) を Living Image 3.2 捕捉ソフトウェア (Perkin-Elmer、Waltham、MA、USA) と共に使用して実行した。動物に、イメージングの 15 分前に、ビートルルシフェリンカリウム塩 (バッチ 316019、Promega、Lyon、France) の PBS 中の  $120 \text{ mg/kg}$  溶液を IP 注射した。マウスを、イメージングの 5 分前に、ketamine (登録商標) / ketamine (登録商標) ( $120 \text{ mg/kg}$ ;  $6 \text{ mg/kg}$  IM、 $5 \text{ ml/kg}$ ) で麻酔した。

#### 【0404】

CODV-Fab-TL1-RF「hz20G6xhz7G3」および CD123×CD3 二重特異性 DART 競合物 (単鎖抗体である DART フォーマットの MGD006、または本明細書において「DART ツール」と称される近い類似体) または静脈内経路 (IV) による PBS 処置を、表 5 で概説したように、腫瘍埋め込み後 4 日目に、すでに骨で検出可能な確立された腫瘍に開始した。

#### 【0405】

#### 【表 8】

表 5:CD123×CD3 二重特異性 CODV-Fab-TL1-RF の静脈内(IV)評価研究の設計

処置群	用量(nmol/Kg)	体積/注射経路	スケジュール	動物の数
対照	-	-	-	7
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	1.3	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	7
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	0.13	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	8
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	0.013	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	6
単鎖抗体 DART フォーマット MGD006	1.3	0.2ml IV	Qd (4-13)	7

#### 【0406】

データ収集および効能の基準

療法の影響を追跡するために、動物の体重を 3 日目からアッセイの最後までモニターした。連続した 3 日間で 20% の体重減少または 15% の体重減少をもたらした、または 10% またはそれより多くの薬物に関連する死を引き起こした投薬量を、過剰に毒性の投薬量とみなした。動物の体重は腫瘍の重量を含んでいた。

#### 【0407】

非侵襲的な生物発光イメージング (BLI) によって腫瘍量を追跡した。腫瘍埋め込み後 3 日目に、処置開始の 24 時間前にベースライン BLI を実行した。動物を、全身生物発光シグナルに基づく異なる群に分けた。腫瘍の埋め込み後の 7、10 および 14 日目に、BLI シグナル測定によって、全身および後肢の長骨における腫瘍成長を追跡した。長骨のシグナルを、セグメンテーションによって測定したが、すぐ近くの局所領域的なシグナル (例えば後続のタイムポイントの軟部組織における残留シグナル) によって影響を受ける可能性があった。処置群を、Molm13-luc + 播種性腫瘍およびヒト T 細胞を有する対照動物と比較した。

#### 【0408】

一次効能評価項目は、処置された群と対照群とにおける腫瘍シグナルのベースラインから

の変化の比率 (  $dT / dC$  )、一部腫瘍退縮 (  $PR$  ) の数および完全腫瘍退縮 (  $CR$  ) の数であった。

【 0 4 0 9 】

時間に対する生物発光シグナル曲線 ( フォトン / 秒で表される ) に基づく腫瘍成長を、各処置群の各動物につきモニターし、全身および骨のセグメント化シグナルの両方に関して中央値曲線  $\pm$   $MAD$  として示した。1 回目の処置の日 ( 分類日 ) の腫瘍シグナルを、特定された観察日の腫瘍シグナルから引くことによって、腫瘍生物発光シグナルの変化を対照 (  $C$  ) または処置 (  $T$  ) 動物それぞれにつき毎日計算した。中央値  $T$  は、処置群で計算され、中央値  $C$  は、対照群で計算される。

【 0 4 1 0 】

次いで比率  $T / C$  を計算し、パーセンテージとして表す：

$dT / dC = [ ( \text{観察日の中央値 } T - 3 \text{ 日目の中央値 } T ) / ( \text{観察日の中央値 } C - 3 \text{ 日目の中央値 } C ) ] \times 100$ 。

【 0 4 1 1 】

用量は、実験の最後 ( 14 日目 ) における  $dT / dC$  が 42 % より低い場合、治療活性を有するとみなされ、 $dT / dC$  が 10 % より低い場合、非常に活性であるとみなされる。

【 0 4 1 2 】

腫瘍退縮パーセントは、特定された観察日の処置群における腫瘍シグナルの、その 1 日目の処置におけるシグナルと比較した減少の % と定義される。具体的なタイムポイントで、各動物につき、退縮 % は、以下のように計算される：

【 数 1 】

$$\text{退縮 \% (t における)} = \frac{\text{シグナル}_{t_0} - \text{シグナル}_t}{\text{シグナル}_{t_0}} \times 100$$

【 0 4 1 3 】

ルシフェリンの反応速度および起こり得る  $IP$  注射のミスに起因するシグナル変動のリスクを考慮して、動物ごとのシグナル退縮は、少なくとも 2 つの連続したタイムポイントで観察された場合のみ真の腫瘍退縮とみなされる。

【 0 4 1 4 】

部分退縮 (  $PR$  ) : 2 つの連続したタイムポイントで腫瘍シグナルが処置の開始時のシグナル未満に減少し、一方のみがベースラインシグナルの 50 % より優れている場合、退縮は、部分的と定義される。

【 0 4 1 5 】

完全退縮 (  $CR$  ) : 2 つの連続したタイムポイントで腫瘍シグナルが処置開始時のシグナルより 50 % より大きく減少する場合、退縮は、完全と定義される。

【 0 4 1 6 】

統計的分析

$IV$  経路の化合物の評価

1 日当たり繰り返しの測定を用いた二元配置  $anova$  に続きペアワイズ多重比較のためのボンフェローニ - ホルムの補正を使用して、各処置群の個々の生物発光シグナルを他のものと比較した： $p > 0.05$  :  $NS$ 、 $0.05 > p > 0.01$  : \*、 $p < 0.01$  : \*。 $*$ 。統計的分析は、全身の生物発光シグナルと長骨の生物発光シグナルの両方に対して実行される。

【 0 4 1 7 】

結果

$CD123 \times CD3$  二重特異性  $CODV - Fab - T L 1 - R F$  「  $h z 20 G 6 \times h z 7 G 3$  」  $IV$

ヒト  $T$  細胞の存在下における完全ヒト  $CODV - Fab - T L 1 - R F$  「  $h z 20 G 6 \times$

10

20

30

40

50

h z 7 G 3」 I V Q 3 d は、全ての試験された用量で M o l m 1 3 腫瘍成長を阻害し ( 1 . 3、0 . 1 3 および 0 . 0 1 3 n m o l / K g Q 3 d )、d T / d C は、全身でそれぞれ 2 0 %、1 4 % および 3 8 % であり ( 図 6 および 8 )、全ての試験された用量で長骨における腫瘍退縮と関連しており、それぞれ 4 / 7 が C R、6 / 8 が C R、2 / 6 が C R であった ( 図 7 および 9 )。

#### 【 0 4 1 8 】

全身および骨において、完全ヒト C O D V - F a b - T L 1 - R F 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」の最大反応が 0 . 1 3 n m o l / k g Q 3 d で得られた。この用量で、活性は、D A R T 1 . 3 n m o l / k g I V Q d と統計学的に異なっていなかった ( 全身において d T / d C 2 9 %、1 / 7 C R、長骨において 1 / 7 P R )。データは、最後の組織病理学分析 ( 示されていない ) によって確認された。

10

#### 【 0 4 1 9 】

全身と長骨とで観察された差は、I V 注射後の、卵巣および腹部の脂肪における残留した腫瘍の成長とそれに続く髄外の腫瘍播種に関連する。

#### 【 0 4 2 0 】

1 . 3 インピボにおける C D 1 2 3 x C D 3 二重特異性 C O D V - F a b - T L 1 - R F および C D 1 2 3 x C D 3 二重特異性 C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F の抗腫瘍活性

材料および方法

ヒト T 細胞の単離および増幅は段落 1 . 2 に記載された通りである。

20

#### 【 0 4 2 1 】

腫瘍モデル

腫瘍モデルは段落 1 . 2 に記載した通りである。C O D V - F a b - T L 1 - R F 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」および C O D V - F a b - T L 1 - ノブ x ホール - R F 「 h z 2 0 G 6 x h z 7 G 3 」または静脈内経路 ( I V ) による P B S 処置を、表 6 で概説したように、腫瘍埋め込み後 4 日目に、すでに骨で検出可能な確立された腫瘍に開始した。

#### 【 0 4 2 2 】

統計的分析

I V 経路の化合物評価は、段落 1 . 2 に記載された通りである。

#### 【 0 4 2 3 】

30

#### 【 表 9 】

表 6:CD123×CD3 二重特異性 CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF の静脈内(IV)評価研究の設計

処置群	用量(nmol/Kg)	体積/注射経路	スケジュール	動物の数
対照	-	-	-	10
CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF "hz20G6xhz7G3"	1.3	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	8
CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF "hz20G6xhz7G3"	0.13	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	8
CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF "hz20G6xhz7G3"	0.013	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	6
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	1.3	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	8
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	0.13	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	7
CODV-Fab-TL1-RF "hz20G6xhz7G3"	0.013	0.2ml IV	Q3d (4,7,10)	7

40

#### 【 0 4 2 4 】

結果

50

CD123 × CD3 二重特異性 CODV - Fab - TL1 - ノブ × ホール - RF「hz20G6 × hz7G3」IV

ヒトT細胞の存在下における完全ヒト CODV - Fab - TL1 - ノブ × ホール - RF「hz20G6 × hz7G3」IV Q3d は、全ての試験された用量で Mol m13 腫瘍成長を阻害し（1.3、0.13 および 0.013 nmol / Kg Q3d）、T / C は、全身でそれぞれ 7%、5% および 15% であり、全ての試験された用量で長骨における腫瘍退縮と関連しており、それぞれ 5 / 8 が CR、8 / 8 が CR、4 / 6 が CR であった（図15および16）。

#### 【0425】

全身および骨において、完全ヒト CODV - Fab - TL1 - ノブ × ホール - RF「hz20G6 × hz7G3」の最大反応が 0.13 nmol / kg Q3d で得られた。

10

#### 【0426】

CD123 × CD3 二重特異性 CODV - Fab - TL1 - RF「hz20G6 × hz7G3」IV

ヒトT細胞の存在下における完全ヒト CODV - Fab - TL1 - RF「hz20G6 × hz7G3」IV Q3d は、全ての試験された用量で Mol m13 腫瘍成長を阻害し（1.3、0.13 および 0.013 nmol / Kg Q3d）、T / C は、全身でそれぞれ 12%、6% および 4% であり、全ての試験された用量で長骨における腫瘍退縮と関連しており、それぞれ 8 / 8 が CR、5 / 7 が CR、7 / 7 が CR であった（図15および16）。

20

#### 【0427】

全ての試験された用量で、CD123 × CD3 二重特異性 CODV - Fab - TL1 - ノブ × ホール - RF「hz20G6 × hz7G3」活性は、CODV - Fab - TL1 - RF「hz20G6 × hz7G3」と統計学的に異なっていなかった。データは、最後の組織病理学分析によって確認された。

#### 【0428】

全身と長骨とで観察された差は、IV注射後の、卵巣および腹部の脂肪における残留した腫瘍の成長とそれに続く髄外の腫瘍播種に関連する。

#### 【0429】

実施例2：hz20G6 × hz7G3 CODV - Fab - TL1、hz20G6 × hz7G3 CODV - Fab - OL1 のバリエーション

30

2.1 hCD3 / - hFc 融合発現プラスミド（CD3ed - Fc）の構築  
cDNA を含有するプラスミドをテンプレートとして使用して、ヒトおよびカニクイザル CD3 および CD 融合タンパク質を、本明細書の以下で詳細に説明したようにして、リーディングフレーム中に、ヒンジ領域、ヒト免疫グロブリン IgG の CH2 および CH3 ドメインを包含し、加えて任意選択のタンデム精製のための 8 × His または Strept - II タグを有する重鎖定常領域と共に生成した。

#### 【0430】

ヒトゲノムDNAをテンプレートとして使用して、シグナル配列を包含するヒトCD3 およびヒトCD サブユニット細胞外ドメインを増幅した。得られた増幅、切断、精製されたPCR産物を、ライゲーションPCRによって組み合わせ、哺乳類発現ベクターpXLに、NheIおよびHindIII部位を使用した注入方法によってライゲートした。各サブユニットを、1つのプラスミドにクローニングした。得られた成熟ヒトCD3 His タグ付きFc融合タンパク質の配列は、本明細書において配列番号3で開示される。配列番号3のアミノ酸1から104は、野生型全長ヒトCD3（本明細書において配列番号1で開示された、UniProtデータベースから受託番号P07766で入手可能）タンパク質のアミノ酸23から126、したがってヒトCD3の細胞外ドメインに対応する。

40

#### 【0431】

カニクイザル（cynomolgus monkey）のゲノムDNAをテンプレートと

50

して使用して、シグナル配列を包含するカニクイザルCD3 およびCD3 細胞外ドメインを増幅した。得られた増幅、切断、精製されたPCR産物を、ライゲーションPCRによって組み合わせ、哺乳類発現ベクターpXLに、NheIおよびHindIIIを使用した注入方法によってライゲートした。各サブユニットを、1つのプラスミドにクローニングした。成熟カニクイザルCD3 Fc融合タンパク質に関して得られた配列は、配列番号4で開示される。配列番号3のアミノ酸1から95は、全長カニクイザルCD3タンパク質のアミノ酸23から117に対応し、したがって、野生型全長カニクイザルCD3の細胞外ドメインを含む(本明細書において配列番号2で開示された、UniProtデータベースから受託番号Q95LI5で入手可能)。クローニングされた融合タンパク質は、野生型配列のアミノ酸位置57と比較してアミノ酸位置35に1つのアラニンからバリンへの交換をさらに含有する。

10

#### 【0432】

#### 2.2 ヒトおよびカニクイザルCD3 / -Fcの発現および精製

F17血清非含有懸濁培養液(Life)中で成長するFreestyle HEK293細胞を、発現プラスミドで一時的にトランスフェクトした。CD3 およびCD3 細胞外ドメイン(ECD)サブユニットを示す両方のプラスミドのコトランスフェクションを、Cellfectinトランスフェクション試薬(Life)を使用して実行した。細胞を37で7日間培養した。組換えタンパク質を含有する培養上清を遠心分離によって回収し、ろ過(0.22 μm)によって透明化した。

#### 【0433】

精製のために、Fc融合タンパク質バリエーションをプロテインAマトリックス(GE)上で捕獲し、pHのシフトによって溶出させた。Superdex 200(GE)を使用したサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)と最終的な限外ろ過濃縮工程によってタンパク質を洗練させた後、タンパク質をさらなるアッセイに使用した。

20

#### 【0434】

ヒトヘテロ二量体をプロテインAで捕獲して脱塩した後にHis-Trapカラム(GE)上にさらに適用した。溶出したタンパク質をストレプトアビジンカラム(GE)に適用し、d-デスチオビオチンで溶出させ、その後、最終的にSuperdex 200(GE)を使用したSECによって洗練させた。この戦略を使用して、ホモ二量体からヘテロ二量体を単離した。

30

#### 【0435】

#### 2.3 CD123(IL3RA)-hFc融合発現プラスミド(CD123-Fc-His)の構築

cDNAを含有するプラスミドをテンプレートとして使用して、リーディングフレーム中に、重鎖定常領域、ヒンジ領域、ヒト免疫グロブリンIgGのCH2およびCH3ドメインを有し、追加でヘキサヒスチジンタグを有するヒトCD123融合タンパク質を生成した。

#### 【0436】

ヒトゲノムDNAをテンプレートとして使用して、シグナル配列を包含するヒトCD123(IL3RA)細胞外ドメインを増幅した。得られた増幅、切断、精製されたPCR産物を、ライゲーションPCRによって組み合わせ、哺乳類発現ベクターpXLに、NheIおよびHindIII部位を使用した注入方法によってライゲートした。得られた成熟ヒトCD123His-IIタグ付きFc融合タンパク質の配列は、配列番号14で開示される。アミノ酸1から284は、全長野生型ヒトCD123タンパク質(本明細書において配列番号12で開示され、NCBIデータベースから受託番号NP\_002174.1で入手可能)のアミノ酸22から305、したがってヒトCD123の細胞外ドメインに対応する。

40

#### 【0437】

#### 2.4 ヒトCD123-Fc-Hisの発現および精製

F17血清非含有懸濁培養液(Life)中で成長するFreestyle HEK293

50

細胞を、発現プラスミドで一時的にトランスフェクトした。トランスフェクションを、C e l l f e c t i n トランスフェクション試薬 ( L i f e ) を使用して実行した。細胞を 37 で7日間培養した。組換えタンパク質を含有する培養上清を遠心分離によって回収し、ろ過 ( 0 . 22 μ m ) によって透明化した。

【 0 4 3 8 】

精製のために、F c 融合タンパク質バリエーションをプロテインAマトリックス ( G E ) 上で捕獲し、p H のシフトによって溶出させた。S u p e r d e x 200 ( G E ) を使用した P B S 中の S E C と最終的な限外ろ過濃縮工程によってタンパク質を洗練させた後、タンパク質をさらなるアッセイに使用した。

【 0 4 3 9 】

本発明のポリペプチドのそれぞれ、例えば 2 . 1 章から 2 . 4 章に記載されるものは、H i s - タグまたは S t r e p タグなどのタグを含んでいてもよく、このようなものとして、タグは、例えば精製をより簡単にすることができる。タグは、例えば、H i s タグ ( H H H H H H 、また配列番号 8 5 ) または S t r e p - I I タグ ( W S H P Q F E K 、また配列番号 8 4 ) に相当していてもよく、これらの 2 つのタグは互いに置き換え可能である。代替として、本発明のポリペプチドは、いかなるタグも含まない。本明細書に記載されるあらゆるポリペプチドのタグを有さない形態とタグを有する形態はどちらも、本発明の範囲内に含まれる。一実施形態において、本発明のポリペプチドは、それらの分泌をより簡単におよび / またはより効率的にするシグナルペプチドおよび / またはプロペプチドを含む。代替として、本発明のポリペプチドは、成熟ポリペプチド、すなわちシグナルペプチドおよびプロペプチドを欠いたポリペプチドに相当する。本明細書に記載されるあらゆるポリペプチドの成熟および全長形態はどちらも、本発明の範囲内に含まれる。

【 0 4 4 0 】

2 . 5 C O D V 抗体様結合タンパク質の発現および精製

モノクローナル抗体「h z 20 G 6」および「h z 7 G 3」の配列を使用した二重特異性 C D 3 × C D 1 2 3 C O D V 抗体様結合タンパク質を、発現させ精製した。

【 0 4 4 1 】

F 1 7 血清非含有懸濁培地 ( I n v i t r o g e n ) 中で成長する F r e e S t y l e H E K 2 9 3 細胞を、等しい比率の軽鎖および重鎖プラスミドでトランスフェクトした。C O D V - F a b - T L 1 抗体様結合タンパク質について、抗体情報は 1 つの軽鎖および 1 つの重鎖にコードされており ( 図 1 ~ 3 ) 、それに対して、C O D V - F a b - O L 1 抗体様結合タンパク質、例えば C O D V - F a b - O L 1 - ノブ x ホール - R F G S なし ( 図 4 ) について、1 つの軽鎖および 2 つの重鎖プラスミドを、ポリエチレンイミントランスフェクション試薬を製造業者の説明の通りに使用してトランスフェクトした。細胞を、37 で、110 r p m の K u h n e r I S F 1 - X 振盪インキュベーター中、8 % C O 2 で培養した。7 日の培養後、遠心分離によって細胞を除去し、10 % V o l / V o l の 1 M トリス H C l 、p H 8 . 0 を添加し、0 . 2 μ M ボトルトップフィルターを介して上清をろ過して、粒子を除去した。全ての C O D V 分子、C O D V - F a b - T L 1 抗体様結合タンパク質、加えて C O D V - F a b - O L 1 抗体様結合タンパク質を、アフィニティークロマトグラフィーによって、プロテインAカラム ( H i T r a p プロテインA H P カラム、G E L i f e S c i e n c e s ) で精製した。0 . 1 M のクエン酸塩、p H 3 . 0 を用いてカラムから溶出させた後、C O D V コンストラクトを、P B S 中に配合された H i P r e p 2 6 / 10 脱塩カラム ( G i b c o 14190 - 136 ) を使用して脱塩した。

【 0 4 4 2 】

凝集体から単量体を分離するために、両方のコンストラクト、すなわち C O D V - F a b - T L 1 抗体様結合タンパク質および C O D V - F a b - O L 1 抗体様結合タンパク質のための、P B S 中での高分解能の精留工程 ( G i b c o 14190 - 136 ) を、H i L o a d S u p e r d e x 200 26 / 60 320 m l カラム ( G E H e a l t h c a r e カタログ番号 : 29 - 9893 - 36 ) を使用して実行した。単量体の画分を

10

20

30

40

50



プールし、Vivaspin 20遠心分離カラム (VS2002 Sartorius Stedim biotech) を使用して1mg/mlまで濃縮し、0.22 μmの膜 (Millex (登録商標) シリンジフィルターSLGV033RS) を使用してろ過した。

#### 【0443】

タンパク質濃度を、280nmにおける吸光度測定によって決定した。各バッチを、還元および非還元条件下でSDS-PAGEによって分析して、各サブユニットおよび単量体の純度および分子量を決定した。

#### 【0444】

Charles riverからのEndosafe-PTSシステムを用いて定量的なLALアッセイを実行して、内毒素非含有のサンプルを確認した。

#### 【0445】

#### 【表10】

表6:様々なCODV抗体様結合タンパク質のタンパク質収量

	CODV-Fab-TL1-RF	CODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホール	CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF	CODV-Fab-OL1-ノブ×ホール-RF_woGS
収量[mg/L]	12mg/L	20mg/L	9mg/L	5mg/L
Prep. SEC ヘテロ二量体 [%]	52%	85%	55%	88%

#### 【0446】

CODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホールの発現は、CODV-Fab-TL1-RFと比較して、より高い収量でより多くの量の正しいヘテロ二量体画分をもたらした。驚くべきことに、CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RFの場合でみられるように、RF突然変異の位置の変化が、この陽性作用を逆転させた。CODV-Fab-OL1-ノブ×ホール-RF\_woGSの立体配置は、ヘテロ二量体画分の量に陽性作用を与えたが、収量には影響を与えなかった(表6)。

#### 【0447】

2.6 SPRを使用したCD3×CD123 CODV抗体様結合タンパク質のヒトCD3 / およびヒトCD123に対する親和性の査定  
CODV抗体様結合タンパク質のヒトCD3 / およびヒトCD123に対する結合親和性を、アッセイ緩衝液としてHBS-EP (GE Healthcare) を用いたBiacore 3000またはBiacore T200機器 (GE Healthcare) を使用した表面プラズモン共鳴 (SPR) によって測定した。CD3 / -FcまたはCD123-Fc-His融合タンパク質の捕獲は、His捕獲キット (GE Healthcare) を使用して達成された。捕獲抗体を、アミンカップリングキット (BR-100-50, GE Healthcare) を使用して、CM5チップ (GE Healthcare) におよそ12,000 RUまでカップリングした。CD3 / -FcまたはCD123-Fc-His融合タンパク質を10 μl / 分で捕獲して、30 RUのRmax値を得た。CODV抗体様結合タンパク質との結合反応速度を30 μl / 分で測定した。アッセイ緩衝液での3から200 nMのCODV抗体様結合タンパク質の2倍希釈液を使用した。二重の参照のために2連の緩衝液ブランクと共に、全てのFab濃度を2連で試行した。10 mMグリシン、pH 1.5を30 μl / 分で1分間の注入することにより捕獲表面の再生を実行した。データ分析のために、BIAevaluationソフトウェア (GE Healthcare) を使用した。物質移動を用いた1:1のラング

ミュアモデルを使用して、データを全体的にフィッティングした。

【 0 4 4 8 】

【 表 1 1 】

表 7:SPR データ(huCD3εδ/huCD123)

抗原	コンストラクト	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)	カイ 2
huCD3εδ	CODV-Fab-TL1-RF	4,95E+04	8,81E-04	36,7	1,78E-08	0,03
	CODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホール	6,56E+04	8,98E-04	47,2	1,37E-08	0,12
	CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF	6,71E+04	7,97E-04	56,4	1,19E-08	0,17
	CODV-Fab-OL1-ノブ×ホール-RF wo GS	4,43E+04	8,23E-04	42,7	1,86E-08	0,07
huCD123	CODV-Fab-TL1-RF	3,08E+05	1,04E-04	15,1	3,39E-10	0,03
	CODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホール	4,74E+05	1,02E-04	35,4	2,15E-10	0,41
	CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF	4,37E+05	8,42E-05	37,9	1,93E-10	0,40
	CODV-Fab-OL1-ノブ×ホール-RF wo GS	2,01E+05	1,23E-04	14,7	6,13E-10	0,06

【 0 4 4 9 】

異なるCD3×CD123 CODV、いわゆるCODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホール、CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF”、CODV-FabOL1-ノブ×ホール-RF wo GSで得られたhuCD3 およびhuCD123への結合反応速度は、全ての試験されたコンストラクトで類似している。

【 0 4 5 0 】

2.7 CD3×CD123 CODV抗体様結合タンパク質の安定性の査定

2.7.1 示差走査蛍光測定法(DSF)によって測定された熱安定性

示差走査蛍光測定法(DSF)を使用して融点 $T_m$ を決定した。白色のセミスカート96-ウェルプレート(BIORAD)中で、D-PBS中のSYPRO-オレンジ色素の4×濃縮溶液(Invitrogen、DMSO中の5000×ストック)を包含する0.2 μg/μlの最終濃度に、サンプルをD-PBS緩衝液(Invitrogen)で希釈した。全ての測定を、MyiQ2リアルタイムPCR機器(BIORAD)を使用して2連で行った。iQ5ソフトウェアv2.1(BIORAD)で融解曲線の負の一次関数曲線(-d(RFU)/dT)を作成した。次いで $T_m$ 決定とデータの図式的な表示のためにデータをExcelにエクスポートした。56~57 で全ての試験したCODVコンストラクトの融点(表8)は非常に類似していることが見出された。

【 0 4 5 1 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 2】

表 8:DSF データ

コンストラクト	Tm (°C)
CODV-Fab-TL1-RF	57
CODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホール	56
CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF	56
CODV-Fab-OL1-ノブ×ホール-RF_wo GS	57

10

## 【0 4 5 2】

## 2.7.2 加速温度ストレスにおける安定性

加速温度ストレス下でのCODVコンストラクトの安定性を査定するために、タンパク質を、0.5 mLの安全ロックチューブ（エッペンドルフBIOPLUR）中で、D-PBS緩衝液中1 mg/mLで、40℃で2週間インキュベートした。対照サンプルを、-80℃および4℃で同じ期間維持した。ストレス処理後、BioSECcurity HPLCシステム（PSS Polymer）を用いた分析サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって、サンプルを凝集体含量に関して分析した。5 µLのタンパク質溶液を使用して、ランニング緩衝液として250 mMのNaCl、100 mMのリン酸Na、pH 6.7を0.25 mL/分で用いたTSKゲルSW-タイプガードカラム（4 µm、4,6 × 35 mm、東ソーバイオサイエンス）を備えたTSKゲルSuper SW3000カラム（4 µm、4,6 × 300 mm、東ソーバイオサイエンス）で、クロマトグラフィーを行った。データをWinGPCソフトウェア（PSS Polymer）を用いて分析した。加速温度ストレス後に分析された全てのCODVコンストラクトは、対照サンプルと比較して凝集体含量の増加を示した（図5）。ストレス後の凝集体含量は、CODV-Fab-TL1-RF（PB05126）では6%、CODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホールでは4.1%、CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RFでは6.6%、CODV-Fab-OL1-ノブ×ホール-RF\_wo GSでは3.4%であった。

20

## 【0 4 5 3】

## 2.8 CODV CD123 × CD3によって媒介されたTHP-1細胞に対する細胞傷害作用

CODV CD123 × CD3のT細胞係合作用を、フローサイトメトリーベースの細胞傷害アッセイによって分析した。

## 【0 4 5 4】

エフェクター細胞は、健康なドナーの全血から単離した初代T細胞であった。THP-1細胞を、CD123を発現する標的細胞として使用した。末梢血単核細胞（PBMC）を、EDTAで処置された健康なドナーの200 mLの末梢血液からフィコール比重遠心分離によって単離した。15 mLのHistopaque（Sigma-Aldrich）を、50 mLのLeucosepチューブ（Greiner bio-one）に事前にローディングした。血液をautoMACSリンス緩衝液+1%BSA（Miltenyi Biotec）で希釈し、合計10個の用意されたチューブの膜にローディングした。チューブを、1000 × gで10分間ブレーキをかけずに遠心分離した。PBMCを収集し、autoMACSリンス緩衝液+1%BSAで3回洗浄した。最終的に、autoMACSpro技術によって、汎用T細胞単離キット（Miltenyi Biotec）を製造業者の説明書に従って使用してTリンパ球を単離するために、PBMCをautoMACSランニング緩衝液（Miltenyi Biotec）に再懸濁した。分離されたT細胞の純度を、ヒト用の7色免疫表現型検査キット（7-Color Immunophenotyping Kit）（Miltenyi Biotec）を使用したMACSQuantフローサイトメトリーによって分析した。

40

50

## 【0455】

標的細胞（すなわちTHP-1細胞株）を、1mlのRPMI+GlutaMAXI+10%FCS（Invitrogen）中の1μMのCFSEを用いて、37℃で15分間染色した。2.5E4個の標的細胞を、96-ウェルのU底懸濁培養プレート（Greiner bio-one）に、培地50μl/ウェルでシーディングした。

## 【0456】

単離された初代ヒトTリンパ球をRPMI+GlutaMAXI+10%FCSに再懸濁し、示されたエフェクター対標的の比率（一般的にE:T=10:1）で、標的細胞に50μl/ウェルで添加した。

## 【0457】

二重特異性抗体様結合タンパク質を、1mlのRPMI+GlutaMAXI+10%FCS（Invitrogen）またはPBSで連続的に1:3に希釈し、それぞれ5μlを、3000ng/mlまでの最終的な最大濃度で細胞に添加した。アッセイを、5%CO<sub>2</sub>、37℃で20時間インキュベートした。

## 【0458】

死んだ標的細胞を検出するために、全ての細胞を7-AADで染色した。したがって、FBSを含む染料緩衝液（BD Pharmingen）で希釈した5μg/mlの7-AADを各ウェルに添加し、暗所で、4℃で30分までインキュベートした。それぞれMACSQuant（Miltenyi Biotec）またはLSRIIもしくはVerse（両方ともBD）フローサイトメーターを使用して細胞を測定した。FlowJoソフトウェア（Tree Star, Inc.）を使用してさらなるデータ分析を実行した。読み出しは、CFSEおよび7-AADの二重陽性細胞のパーセンテージであった。XLFit（Algorithm 205）によって曲線を計算した。

## 【0459】

表9で示されるように、二重特異性抗体様結合タンパク質は、インビトロで初代T細胞を係合し、THP-1標的細胞を溶解させることができた。20時間のコインキュベーション後、抗体濃度依存性の死んだ標的細胞の増加を検出することができた。ここで示された抗体様結合タンパク質に関して、0.8から1.2pMの間の範囲のEC50値が計算された。

## 【0460】

## 【表13】

**表9:フローサイトメトリーベースの細胞傷害アッセイで検出された二重特異性CODV CD123×CD3のT細胞係合作用。曲線から計算された平均EC50値を提示する**

コンストラクト	EC50 (pM) 幾何平均	EC50 (pM) 標準誤差	数
CODV-Fab-TL1-RF	0,8	0,1	34
CODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホール	0,8	0,2	4
CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RF	1,1	0,3	4
CODV-Fab-OL1-ノブ×ホール-RF wo GS	1,2	0,2	12

## 【0461】

CODV-Fab-TL1-ノブ×ホール-RFまたはCODV-Fab-TL1-ノブ-RF×ホールにおける骨格の突然変異の導入は、CODV-Fab-TL1-RFと比較して、これらの分子に関する機能的なパラメーターを変更しないことから、これらのC

ODV 改変は、T 細胞係合における活性のいかなる損失も引き起こさないことが示される。

【0462】

2.9 標的細胞の存在下（活性の読み出し）および非存在下（安全性の読み出し）における T 細胞活性化に対する CD123 × CD3 CODV 抗体様結合タンパク質の作用  
活性または安全性の読み出しとしての T 細胞の活性化状態に対する二重特異性抗体様結合タンパク質の作用を、標的細胞の存在下（条件は 2.8. を参照）または非存在下のいずれかにおける、初代ヒト T 細胞の表面における活性化マーカー CD25 および CD69 の発現のフローサイトメトリーベースの検出によって分析した。単離された初代ヒト T リンパ球を、RPMI + GlutaMAX I (Gibco) + 10% FCS (Invitrogen) に再懸濁し、2.5E5 個の細胞を、96 - ウェルの U 底懸濁培養プレート (Greiner bio-one) に 50 μl / ウェルでシーディングした。

10

【0463】

どちらの T 細胞も排他的に試験し、ウェルを 50 μl の RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS で充填するか、または標的細胞（すなわち THP-1 細胞株）を 50 μl の RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS 中細胞 2.5E4 個 / ウェルで添加した。

【0464】

二重特異性抗体様結合タンパク質を、RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS または PBS で連続的に 1 : 3 または 1 : 10 に希釈し、それぞれ 5 μl を、30000 ng / ml までの最終的な最大濃度で細胞に添加した。アッセイを、5% CO<sub>2</sub>、37 °C で 20 時間インキュベートした。

20

【0465】

インキュベーション時間後、細胞を遠沈させ、ウェル 1 つ当たり、FBS (BD Pharmingen) を含む、続いて標識抗体：CD4 - PE、CD8 - APC - Cy7、CD25 - APC、CD69 - PE - Cy7 を含む 100 μl の染料緩衝液中で 4 °C で 15 分間染色した。

【0466】

蛍光マイナスイオン (FMO; Fluorescence Minus One) 対照として、活性化された T 細胞を上記のようにして染色し、ただし 1 つのチューブにおいて CD25 をそのアイソタイプ (アイソタイプ APC - IgG1k) で置き換え、第 2 のチューブにおいて CD69 をそのアイソタイプ (アイソタイプ PE - Cy7 - IgG1k) で置き換えた。

30

【0467】

細胞を染色後に 2 回洗浄し、FBS を含む 150 μl の染料緩衝液に再懸濁し、LSRII (BD) フローサイトメーターを使用して 10000 個の細胞を測定した。FlowJo ソフトウェア (Tree Star, Inc.) を使用してさらなるデータ分析を実行した。読み出しは、CD4 陽性 CD25 陽性、CD4 陽性 CD69 陽性、CD8 陽性 CD25 陽性、および CD8 陽性 CD69 陽性 T 細胞のパーセンテージであった。FMO 対照に従ってゲートを設定した。

【0468】

表 10 は、標的細胞の存在下（活性の読み出し）における T 細胞活性化の結果を示す。標的細胞の発現の EC50 値は、細胞傷害アッセイで観察された EC50 値に非常に類似している。CODV - Fab - TL1 - ノブ - RF × ホールまたは CODV - Fab - TL1 - ノブ × ホール - RF における骨格への突然変異の導入は、CODV - Fab - TL1 - RF と比較して、この分子に関する機能的なパラメーターを変更しないことから、これらの CODV - Fab 改変は標的アプローチに適合することが示される。

40

【0469】

## 【表 1 4】

表 10:THP-1 標的細胞を用いた T 細胞活性化(EC50)

コンストラクト	活性 -CD4+/CD69+ EC50 (pM) 幾何平均	活性 -CD4+/CD69+ EC50 (pM) 標準誤差	活性 -CD8+/CD69+ EC50 (pM) 幾何平均	活性 -CD8+/CD69+ EC50 (pM) 標準誤差	数
CODV-Fab-TL1-RF	0,5	0,2	0,7	0,3	10
CODV-Fab-TL1-ノブ-RF ×ホール	0,7	0,1	1,2	0,1	4
CODV-Fab-TL1-ノブ× ホール-RF	0,9	0,3	1,6	0,5	4
CODV-Fab-OL1-ノブ× ホール-RF wo GS	0,9	0,2	1,3	0,3	4

10

## 【0 4 7 0】

表 1 0 および 1 1 は、高濃度 (1 0 0 n M、E C 5 0 より 5 1 o g 高い) の C D 4 + (表 1 1) および C D 8 + (表 1 2) T 細胞に対する二重特異性抗体における、標的細胞の非存在下 (安全性の読み出し) および存在下 (活性の読み出し) での T 細胞活性化の結果 (C D 6 9 発現に基づく) を示す。標的細胞の非存在下で極めてわずかなパーセンテージの T 細胞が C D 6 9 陽性になるが、分子間で、または C D 4 + および C D 8 + T 細胞間で大きな差はない。表 1 0 にも示されるように、全ての C O D V が、標的細胞の存在下で C D 4 + および C D 8 + T 細胞の活性化を誘導する。したがって、C O D V 分子における骨格への突然変異の導入は、標的細胞の非存在下で T 細胞活性化に関する不要な作用を誘導しない。

20

## 【0 4 7 1】

## 【表 1 5】

表 11:最大の T 細胞活性化±THP-1 標的細胞(CD4+)

コンストラクト	安全性- CD4+/CD69+ %活性化 C=100nM 平均	安全性- CD4+/CD69+ %活性化 C=100nM 標準誤差	安全性 - 数	活性- CD4+/CD69+ %活性化 C=100nM 平均	活性- CD4+/CD69+ %活性化 C=100nM 標準誤差	活性- 数
CODV-Fab-TL1-RF	13	3,6	12	75	5,0	10
CODV-Fab-TL1- ノブ-RF×ホール	6	1,9	4	63	5,8	4
CODV-Fab-TL1- ノブ×ホール-RF	6	1,5	4	64	5,8	4
CODV-Fab-OL1- ノブ×ホール-RF wo GS	7	1,3	4	57	9,7	4

30

40

## 【0 4 7 2】

50

【表 1 6】

表 12:最大の T 細胞活性化±THP-1 標的細胞(CD8+)

コンストラクト	安全性- CD8+/CD69+ %活性化 C=100nM 平均	安全性- CD8+/CD69+ %活性化 C=100nM 標準誤差	安全性 - 数	活性- CD8+/CD69+ %活性化 C=100nM 平均	活性- CD8+/CD69+ %活性化 C=100nM 標準誤差	活性 - 数
CODV-Fab-TL1-RF	17	2,9	12	78	4,3	10
CODV-Fab-TL1- ノブ-RF×ホール	9	3,2	4	68	5,9	4
CODV-Fab-TL1- ノブ×ホール-RF	9	2,6	4	70	6,0	4
CODV-Fab-OL1- ノブ×ホール-RF wo GS	12	3,4	4	64	6,4	4

10

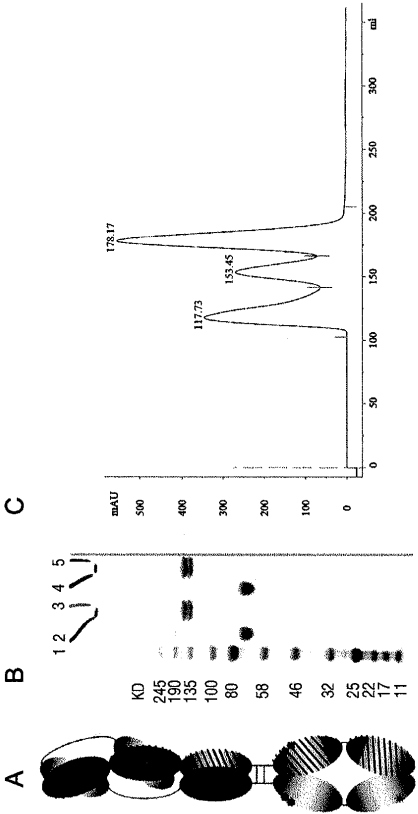
20

30

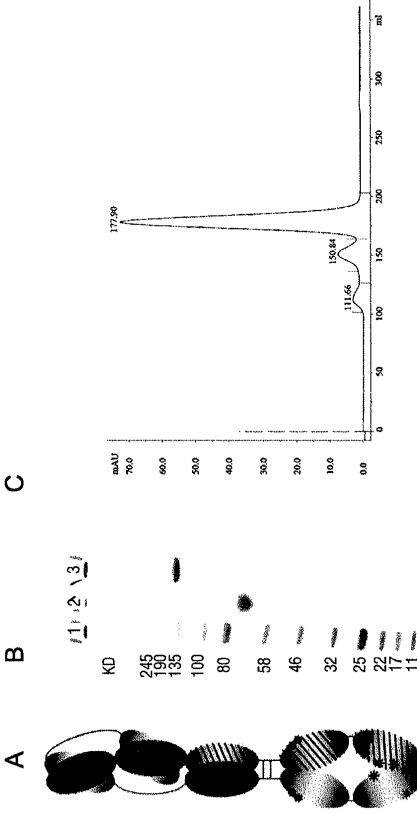
40

50

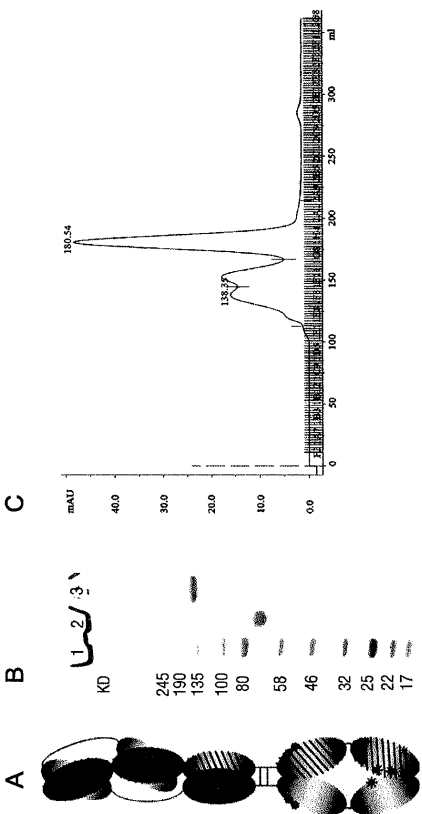
【図面】  
【図 1】



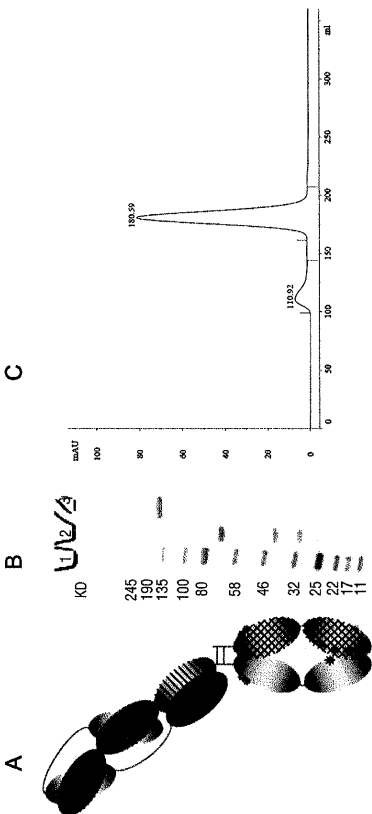
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

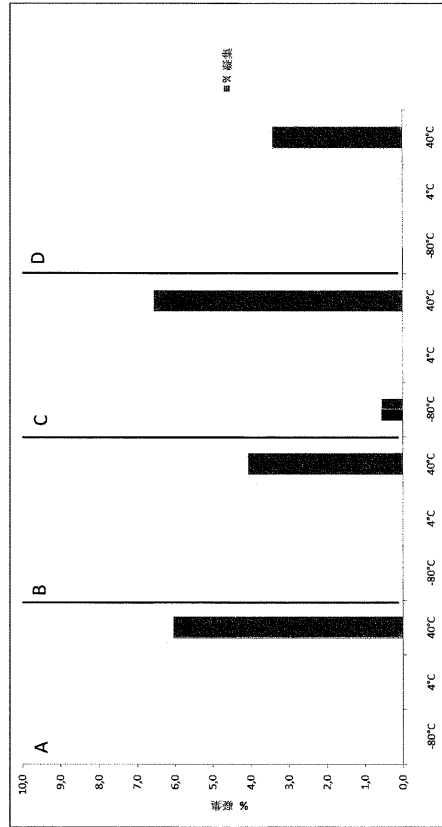
30

40

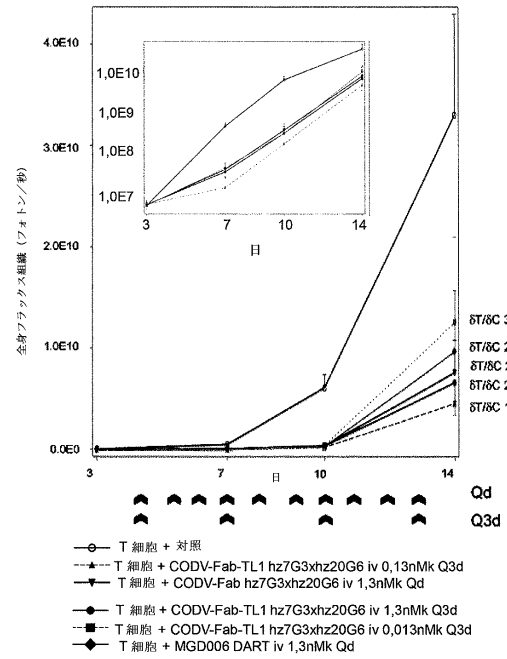
50



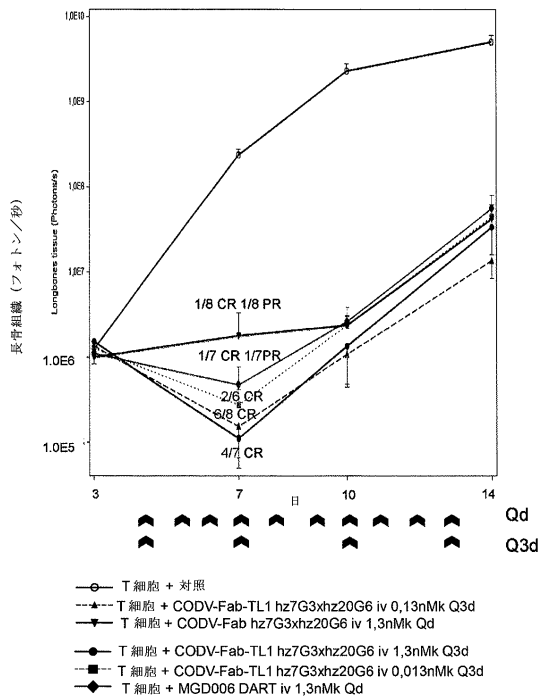
【図 5】



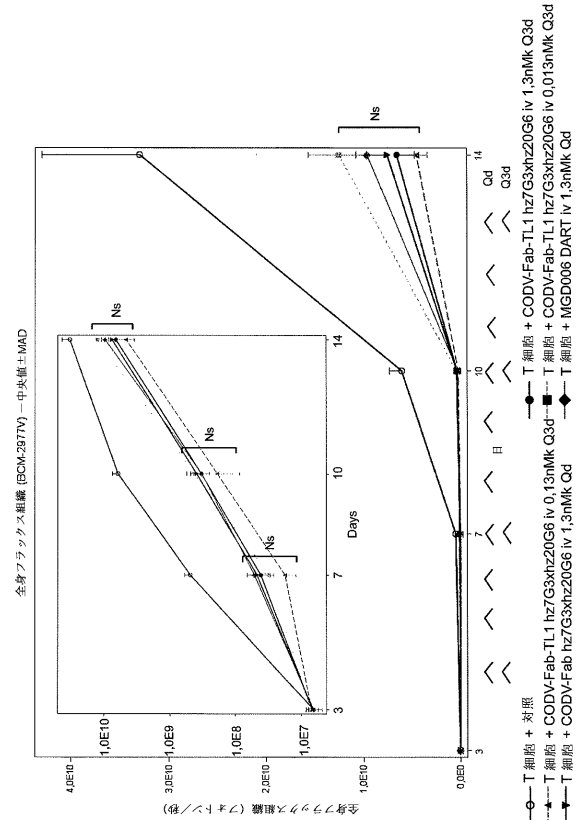
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

30

40

50

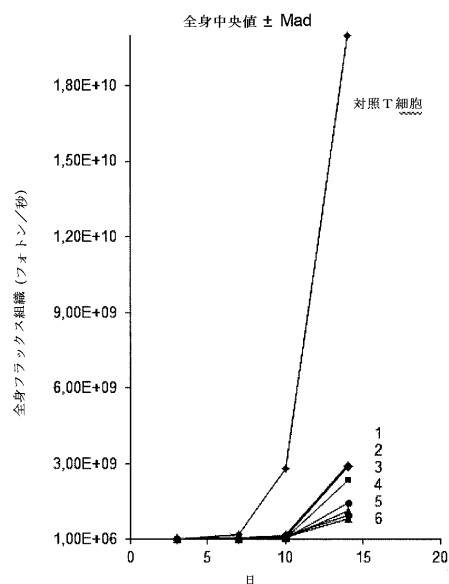


【 図 1 3 】

[illegible]

CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011-ノブX-Nal- $\text{RF}_2\text{Fc}$ \_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011-ノブX-Nal- $\text{RF}_2\text{Fc}$ \_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011-ノブX-Nal- $\text{RF}_2\text{Fc}$ \_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011-ノブX-Nal- $\text{RF}_2\text{Fc}$ \_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011a\_Fc\_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011-ノブX-Nal- $\text{RF}_2\text{Fc}$ \_of\_ポリスチレンIII  
 CDDV-Fab-011-ノブX-Nal- $\text{RF}_2\text{Fc}$ \_of\_ポリスチレンIII

【 図 1 5 】



- 1: CODV-Fab-TL1- ノブ X ホール -RF 0.013 nmol/kg iv
- 2: CODV-Fab-TL1-RF 1.3 nmol/kg iv
- 3: CODV-Fab-TL1- ノブ X ホール -RF 1.3 nmol/kg iv
- 4: CODV-Fab-TL1-RF 0.13 nmol/kg iv
- 5: CODV-Fab-TL1- ノブ X ホール -RF 0.13 nmol/kg iv
- 6: CODV-Fab-TL1-RF 0.013 nmol/kg iv

【 図 1 4 】

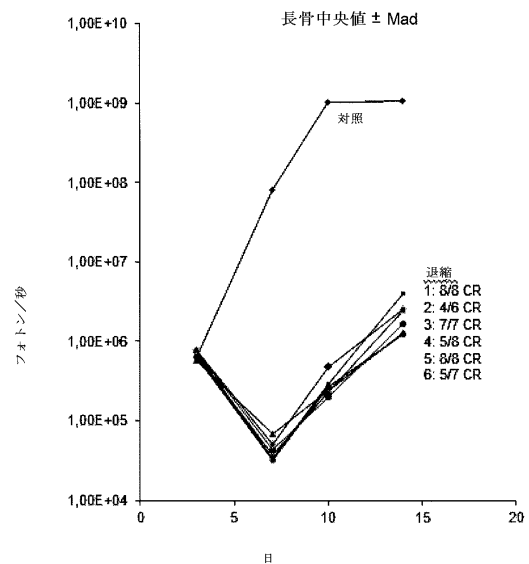
```

GSDKTHI CFCPCAPFAAGGSPVFLFP KKROTLIMSTRTEVTCVWDVDSHEDPEVFNYU
GSDKTHI CFCPCAPFAAGGSPVFLFP KKROTLIMSTRTEVTCVWDVDSHEDPEVFNYU
-----DKTHI CFCPCAPFAAGGSPVFLFP KKROTLIMSTRTEVTCVWDVDSHEDPEVFNYU
*****
VGVGYEHMAKTRIFREQYVNSTYTRVWSVLTVLHQDLNGKEYKCKNS'KEALP'AP'LEKTLISK
VGVGYEHMAKTRIFREQYVNSTYTRVWSVLTVLHQDLNGKEYKCKNS'KEALP'AP'LEKTLISK
VGVGYEHMAKTRIFREQYVNSTYTRVWSVLTVLHQDLNGKEYKCKNS'KEALP'AP'LEKTLISK
VGVGYEHMAKTRIFREQYVNSTYTRVWSVLTVLHQDLNGKEYKCKNS'KEALP'AP'LEKTLISK
*****
AKGQPOPE POWTLTPPSRDELTKNOVSI'CSGVKGFYI' SDI'AVENE' SNGQPEINVKVITP'PVL
AKGQPOPE POWTLTPPSRDELTKNOVSI'CSGVKGFYI' SDI'AVENE' SNGQPEINVKVITP'PVL
AKGQPOPE POWTLTPPSRDELTKNOVSI'CSGVKGFYI' SDI'AVENE' SNGQPEINVKVITP'PVL
AKGQPOPE POWTLTPPSRDELTKNOVSI'CSGVKGFYI' SDI'AVENE' SNGQPEINVKVITP'PVL
*****
DSDSGSFFI'LVSKL'TOKS'RNOOGWNTFS'CSYWEALHWHYTKSLSLIS'PG
DSDSGSFFI'LVSKL'TOKS'RNOOGWNTFS'CSYWEALHWHYTKSLSLIS'PG
DSDSGSFFI'LVSKL'TOKS'RNOOGWNTFS'CSYWEALHWHYTKSLSLIS'PG
DSDSGSFFI'LVSKL'TOKS'RNOOGWNTFS'CSYWEALHWHYTKSLSLIS'PG
*****

```

CODV-Fab-011\_Fc3  
 CODV-Fab-011a\_Fc3  
 CODV-Fab-011- $\gamma$ X $\mu$ - $\kappa$ -RF\_Fc3  
 CODV-Fab-011\_Fc3  
 CODV-Fab-011a\_Fc3  
 CODV-Fab-011- $\gamma$ X $\mu$ - $\kappa$ -RF\_Fc3  
 CODV-Fab-011\_Fc3  
 CODV-Fab-011a\_Fc3  
 CODV-Fab-011- $\gamma$ X $\mu$ - $\kappa$ -RF\_Fc3  
 CODV-Fab-011\_Fc3  
 CODV-Fab-011a\_Fc3  
 CODV-Fab-011- $\gamma$ X $\mu$ - $\kappa$ -RF\_Fc3

【 図 1 6 】



- 1: CODV-Fab-TL1-RF 1.3 nmol/kg iv
- 2: CODV-Fab-TL1-ノブ x ホール-RF 0.013 nmol/kg iv
- 3: CODV-Fab-TL1-RF 0.013 nmol/kg iv
- 4: CODV-Fab-TL1-ノブ x ホール-RF 1.3 nmol/kg iv
- 5: CODV-Fab-TL1-RF 0.13 nmol/kg iv
- 6: CODV-Fab-TL1-ノブ x ホール-RF 0.13 nmol/kg iv

【配列表】

0007071329000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
		C 0 7 K	16/28	

ティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 クリスティアン・バイル

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 ヨーヘン・ベニンガ

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 カチャ・クロール

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 クリスティアン・ランゲ

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 ヴルフ・ディルク・ロイシュナー

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 エルコーレ・ラオ

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 マーリオン・シュナイダー

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 ペーター・ヴォネロー

ドイツ連邦共和国 6 5 9 2 6 フランクフルト・アム・マイン・サノフィ・アベンティス・ドイチュラント・ゲー・エム・ペー・ハー・

(72)発明者 ステファヌ・ギュリフ

フランス国 7 5 0 0 8 パリ・リュ・ラ・ボエティ 5 4・パテント・デパートメント・サノフィ

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 特表 2 0 1 7 - 5 2 9 8 3 8 ( J P , A )

特表 2 0 1 4 - 5 1 1 6 8 4 ( J P , A )

特表 2 0 1 4 - 5 2 9 4 0 2 ( J P , A )

MABS, 2016年, Vol.8, No.5, p867-878, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4968095/>参照

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 9 0

C 1 2 N 1 / 0 0 - 3 8

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 4 6

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 4 4

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )