

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6400470号
(P6400470)

(45) 発行日 平成30年10月3日(2018. 10. 3)

(24) 登録日 平成30年9月14日(2018. 9. 14)

(51) Int.Cl.

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 15/63 (2006. 01)

C 1 2 N 15/63 Z

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

請求項の数 42 (全 102 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-511496 (P2014-511496)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月16日(2012. 5. 16)
 (65) 公表番号 特表2014-519322 (P2014-519322A)
 (43) 公表日 平成26年8月14日(2014. 8. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/038177
 (87) 国際公開番号 W02012/158818
 (87) 国際公開日 平成24年11月22日(2012. 11. 22)
 審査請求日 平成27年5月15日(2015. 5. 15)
 (31) 優先権主張番号 61/486, 690
 (32) 優先日 平成23年5月16日(2011. 5. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 515257715
 ジェネロン (シャンハイ) コーポレイショ
 ン リミテッド
 中華人民共和国 201203, シャンハ
 イ, ツァンジャン ハイテク パーク,
 ハ レイ ロード 1011, スイー
 ト 307
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重特異性 F a b 融合タンパク質および使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 3 イプシロンの N 末端に結合する F a b 断片；前記 F a b 断片の免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) の N 末端へと連結された融合部分 A；および前記 F a b 断片の免疫グロブリン重鎖可変領域 (V H) の N 末端へと連結された融合部分 B を含む多重特異性 F a b 融合タンパク質であって、前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインおよび前記第 2 の結合ドメインのそれぞれが、細胞表面抗原に結合し、前記第 1 の結合ドメインおよび前記第 2 の結合ドメインが、抗体の抗原結合断片であり、ここで

a. 前記 F a b 断片が、

i. 配列番号 26 ~ 28 にそれぞれ示される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 のアミノ酸配列を含む V L と、免疫グロブリン軽鎖定常領域 (C L) とを含む第 1 のポリペプチドと；

i i. 配列番号 23 ~ 25 にそれぞれ示される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 のアミノ酸配列を含む V H と、免疫グロブリン重鎖定常領域 1 (C H 1) とを含む第 2 のポリペプチドと

を含み、前記 C L 領域と前記 C H 1 領域とが場合によってジスルフィド結合によって接合され；

b. 前記融合部分 A の C 末端が、前記 V L ドメインの N 末端側の終端部へと共有結合的に連結され；

10

20

c. 前記融合部分 B の C 末端が、前記 V H ドメインの N 末端側の終端部へと共有結合的に連結され；

d. 場合によって、第 1 のリンカーが、前記融合部分 A と前記 V L ドメインとの間に位置し；かつ

e. 場合によって、第 2 のリンカーが、前記融合部分 B と前記 V H ドメインとの間に位置する、多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 2】

前記 F a b 断片が、C D 3 イプシロンのアミノ酸 1 ～ 2 7 内のエピトープに結合する、請求項 1 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 3】

前記 F a b 断片が、非ヒト霊長動物 C D 3 イプシロンと交差反応する、請求項 1 または請求項 2 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 4】

前記融合部分 A と前記 V L ドメインとの間に位置する第 1 のリンカーまたは前記融合部分 B と前記 V H ドメインとの間に位置する第 2 のリンカーを含まない、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 5】

前記融合部分 A と前記 V L ドメインとの間に位置する第 1 のリンカー、および前記融合部分 B と前記 V H ドメインとの間に位置する第 2 のリンカーを含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 6】

前記 V H が、配列番号 3 4、3 8、4 2、4 6、5 0、および 5 4 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 7】

前記 V L が、配列番号 5 6、5 8、6 2、6 6、および 7 0 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 8】

前記融合部分 A および前記融合部分 B の配列が同一である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 9】

前記融合部分 A と前記融合部分 B とが、異なる配列を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 1 0】

前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、同じ細胞表面抗原に結合する、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 1 1】

前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、F c γ R I I b、C D 2 8、C T L A - 4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L 受容体 1、T R A I L 受容体 2、C D 2 8、C E A、P S M A、B C M A、C A I X、c M e t、E G F R 1、H e r 2 / n e u、E r b B 3、E p C A M、葉酸受容体、エフリン受容体、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 0、C D 3 3、C D 4 0、C D 3 7、C D 3 8、および C D 1 3 8 の群より選択される標的に結合する、請求項 1 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 1 2】

前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、異なる細胞表面抗原に結合する、請求項 1 ～ 7 および 9 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 1 3】

前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、F c γ R I I b、C D 2 8、

10

20

30

40

50

CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LT β R、TLR、TRAIL受容体1、TRAIL受容体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EPCAM、葉酸受容体、エフリン受容体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38、およびCD138からなる群より選択される異なる標的に結合する、請求項12に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項14】

前記第1の結合ドメインと前記第2の結合ドメインとが、同じエピトープに結合する、請求項10または請求項11に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項15】

前記第1の結合ドメインと前記第2の結合ドメインとが、異なるエピトープに結合する、請求項10または請求項11に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項16】

前記免疫グロブリン重鎖が、IgG抗体に由来する、請求項1～15のいずれか一項に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項17】

前記IgG抗体のアイソタイプが、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4から選択される、請求項16に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項18】

前記免疫グロブリン軽鎖のVLおよびCLが、免疫グロブリンカッパ軽鎖および免疫グロブリンラムダ軽鎖から選択される、請求項1～17のいずれか一項に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項19】

前記第1のリンカーおよび前記第2のリンカーが、1～20アミノ酸の長さである、請求項5～18のいずれか一項に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項20】

前記第1のリンカーおよび前記第2のリンカーが、GlyArgAlaを含む、請求項19に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項21】

前記第1のリンカーおよび前記第2のリンカーが、2～20アミノ酸の長さのグリシン-セリンポリマーを含む、請求項19に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項22】

前記第1のリンカーおよび前記第2のリンカーが、グリシンポリマー、グリシン-セリンポリマー、グリシン-アラニンポリマー、またはアラニン-セリンポリマーを含む、請求項5～19のいずれか一項に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項23】

前記グリシン-セリンポリマーが、(GS)_n、(SGGS)_n、および(GGGS)_nからなる群から選択され、ここで、nは、少なくとも1つの整数である、請求項22に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項24】

前記第1のリンカーおよび前記第2のリンカーが、配列番号125～132からなる群から選択される配列またはその配列の整数の繰り返しを有するグリシン-セリンポリマーを含む、請求項22に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項25】

前記Fabがヒト化されている、請求項1～24のいずれか一項に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

【請求項26】

前記第1の結合ドメインおよび前記第2の結合ドメインが、配列番号78、88、および94に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つから選択される、請求項11に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

前記抗原結合断片が、s c F vである、請求項 1 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 28】

前記抗原結合断片がヒト化されている、請求項 1 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 29】

前記抗原結合断片が、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、またはウサギモノクローナル抗体に由来する、請求項 1 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

10

【請求項 30】

前記抗原結合断片が、完全ヒト抗体に由来する、請求項 1 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 31】

前記完全ヒト抗体が、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスから生成される、請求項 3 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 32】

前記抗原結合断片が、1) 配列番号 1 3 9 ～ 1 4 4 のそれぞれに示される V H C D R および V L C D R を含むか；2) 配列番号 1 4 5 ～ 1 5 0 のそれぞれに示される V H C D R および V L C D R を含むか；3) 配列番号 7 8、8 8、および 9 4 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列に示される s c F v 内に存在する V H を含むか；4) 配列番号 7 8、8 8、および 9 4 のうちのいずれか 1 つのアミノ酸配列に示される s c F v 内に存在する V L を含むか；または 5) 配列番号 7 8、8 8、および 9 4 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される s c F v を含む、請求項 1 ～ 2 8 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

20

【請求項 33】

前記 C L 領域が、ノブ変異またはホール変異を含み、前記 C H 1 領域が、前記 C L 領域と前記 C H 1 領域とが安定的に相互作用するように、対応するノブ変異またはホール変異を含む、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

30

【請求項 34】

配列番号 8 4、9 0、9 6、および 1 0 0 から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ；ならびに配列番号 3 2、6 0、6 4、6 8、および 7 2 から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 35】

配列番号 8 6、9 2、9 8、および 1 0 2 から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つ；ならびに配列番号 3 0、3 6、4 0、4 4、4 8、および 5 2 から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【請求項 36】

前記 C L 領域と前記 C H 1 領域とが、ジスルフィド結合により接合されている、請求項 3 4 または請求項 3 5 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

40

【請求項 37】

請求項 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

【請求項 38】

請求項 3 7 に記載の単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 39】

請求項 3 8 に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

【請求項 40】

50

請求項 3 9 に記載の宿主細胞を、単離ポリヌクレオチドが、コードされた多重特異性 F a b 融合タンパク質を発現する条件下で培養することにより、前記多重特異性 F a b 融合タンパク質を発現させる方法。

【請求項 4 1】

請求項 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 4 2】

がんを有するか、またはがんを有することが疑われる被験体を処置するための請求項 4 1 に記載の医薬組成物であって、前記がんは、前記多重特異性 F a b 融合タンパク質が結合しうる抗原と関連する、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願との相互参照

この出願は、2 0 1 1 年 5 月 1 6 日に提出された米国仮出願第 6 1 / 4 8 6 , 6 9 0 号（この出願は、その全体が参考として本明細書に援用される）に対する優先権を主張する。

【0 0 0 2】

配列表に関する言明

本出願と関連する配列表は、紙原稿ではなく、テキストデータのフォーマットで提示され、参照により本明細書に組み込まれる。配列表を含有するテキストファイルの名称は、F A B N _ 0 0 1 _ 0 2 W O _ S T 2 5 . t x t である。このテキストファイルは、1 8 8 K B であり、2 0 1 2 年 5 月 1 6 日に作成され、E F S - W e b を介して電子データとして提出される。

【0 0 0 3】

本開示は一般に、多重特異性 F a b 融合タンパク質（M S F P）に関する。特に、本開示の M S F P は、両方の N 末端を切断可能または切断不可能なリンカーにより融合部分へと融合させた抗体の F a b 断片を含む。M S F P の F a b 断片はとりわけ、天然の細胞表面の標的抗原のほか、同じ抗原の特定の可溶性形態にも結合する。融合部分の一方または両方はとりわけ、細胞表面上の標的抗原に結合する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

従来の免疫グロブリン G（I g G）は、2 つの同一な免疫グロブリン重鎖および 2 つの同一な免疫グロブリン軽鎖を含む四量体分子である。I g G 重鎖は、N 末端における可変領域に続き、第 1 の定常領域（C H 1）、ヒンジ、および 2 つのさらなる定常領域（C H 2 C H 3）を有する。I g G 軽鎖は、2 つのドメイン：N 末端の可変領域と C 末端の定常領域とを含む。重鎖可変領域（V H）は、軽鎖可変領域（V L）と相互作用して、最小限の抗原結合領域である F v を構成する。抗原結合領域は、重鎖の第 1 の定常領域（C H 1）と軽鎖の定常領域（C L）との間の相互作用により安定化し、2 つの定常領域の間のジスルフィド結合の形成によりさらに安定化する（F a b 断片を形成する）。C H 2 C H 3 ドメインのホモ二量体化（F c を形成する）により、かつ、その結果としてのヒンジにおけるジスルフィド結合の形成により、I g G 構造は安定化する。したがって I g G は、互いとの配向性および F c ドメインとの配向性において比較的可撓性の 2 つの抗原結合 F a b アームを有する。加えて、結合領域（抗原と直接的に相互作用する）は、それを越えてはさらなる構造を伴わない N 末端に配置されている。推測する限りでは、この構造特色により、立体障害に由来する干渉を最小限とする、抗体の抗原との相互作用が容易となる。この特性はとりわけ、細胞膜複合体に極めて近接して配置されることが多い細胞表面抗原への結合にとって重要である。

【0 0 0 5】

近年では、全長モノクローナル抗体が、がん、自己免疫性疾患、および炎症性疾患、な

10

20

30

40

50

らびに他のヒト疾患を処置するのに用いられて成功している（非特許文献1）。天然では、免疫グロブリンの5つの異なる種類（I g A、I g D、I g G、I g M、およびI g E）が存在するが、結合アフィニティーおよび結合特異性の高さ、バイオアベイラビリティーの大きさ、循環における血清中半減期の長さ、潜在的なエフェクター機能の可能性、および産業規模の製造可能性を含めた好適な特性のために、I g Gが、ヒト用治療剤に最も適するモダリティーを表す。

【0006】

現在のところ世界中の薬物規制機関により腫瘍学環境における臨床的使用について承認されているモノクローナル抗体（非コンジュゲート抗体またはネイキッド抗体）は一般に、以下の機構のうちの1つまたはこれらの組合せにより作用する：1）細胞成長のためのシグナル伝達の遮断、2）がん細胞への血液供給の遮断、3）細胞アポトーシスの直接的な媒介、4）抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）、抗体依存性細胞食作用（ADCP）、および補体依存性細胞傷害作用（CDC）などの免疫エフェクター機能の誘発、ならびに5）腫瘍に対する獲得免疫の促進。

【0007】

モノクローナル抗体療法は、臨床における生存の利益を裏付けている。しかし、がん患者における全体的な奏効率は低く、生存の利益は、化学療法と比較して周縁的（数カ月間）である。頑健な臨床的抗がん活性の欠如の根本的な理由が完全に理解されているわけではないが、研究は、がん細胞がしばしば、補完的なシグナル伝達経路を迅速に発生させて細胞死を免れることを示唆している。また、強力ながん誘発細胞と考えられるがん幹細胞（CSC）も、細胞増殖における活性はそれほど小さくなく、したがって、成長シグナルの欠如をより良好に維持する傾向がある。

【0008】

近年、ADCCが抗がん抗体の臨床的有効性において重要な役割を果たすことが裏付けられた。抗体のFcは、多数の形態：FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIa、およびFcγRIIIbが認められるFcガンマ受容体に結合する。Fcドメインはとりわけ、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、および好中球において発現するFcγRIIIaに対するアフィニティーが高い。FcのFcγRIIIaへの結合は、NK細胞を活性化し、次いで、これにより、近傍のがん細胞が破壊される。

【0009】

Asn297グリカン構造におけるフコシル化を低減するかまたは消失させるタンパク質の操作（CH2領域内の多様なアミノ酸変異を伴う）または作製用宿主細胞（CHO）系の操作を介してFcγRに対する結合特性の活性化を増強した操作抗体が、前臨床研究において生物学的活性の改善について調べられて成功している。エフェクター機能の増強を含有するI g G抗体は、現在のところ、有効性の改善を目標とする臨床試験にかけられている。現在入手可能な臨床データは、これらの抗体が極めて有望であることを示す。

【0010】

別の抗がん治療法は、T細胞を使用することである。T細胞は、新たに生じたがん細胞を求めて体内を巡回し、それらを効果的かつ速やかに消失させることにより、一生を通じてがんに対する防御をもたらす。がん処置においてT細胞免疫を利用して奏効する治療法には、1）FDAで承認されているProleukin（組換えIL-2）の転移性黒色腫および転移性腎臓がんに対する使用；2）FDAで承認されているPROVENGE（登録商標）（Sipuleucel-T）の無症候性転移性ホルモン不応性前立腺がんに対する使用が含まれる。PROVENGE（登録商標）とは、ex vivoにおいて前立腺がん特異的細胞傷害性T細胞を活性化する樹状細胞ワクチンであり、次いで、これらの傷害性T細胞を患者へと再注入する；3）FDAは、進行性黒色腫に対するイピリムマブ（T細胞阻害性シグナル伝達経路を阻害することによりT細胞を活性化する抗CTLA-4抗体）の使用を承認している。

【0011】

T細胞は、Fcガンマ受容体 (FcγR) を発現させないため、抗腫瘍抗体の抗体では、細胞傷害性T細胞を直接的、効果的に活性化することができない。腫瘍を殺滅する目的でT細胞を活性化することに向けた多くの有望な方法のうちの1つは、二重特異性抗体 (bsAb) を用いて、T細胞を腫瘍細胞へと直接的に近接させる結果として、T細胞の活性化および腫瘍細胞の殺滅をもたらすことである。CD28およびCD137 (4-1BB) は、二重特異性のターゲティング法において使用される2つの強力なT細胞共刺激性受容体である。例には、CD28×NG2 (非特許文献2)、CD28×CD20 (非特許文献3)、および4-1BB×CD20 (非特許文献4) が含まれる。また、T活性化を誘発することが可能な他のT細胞表面標的も、二重特異性抗体を用いてそれらを腫瘍細胞へとリターゲティングするのに用いられている。過去には、多様な二重特異性抗体および多重特異性抗体のフォーマットが開発されており、近年になってこれらが総説されている (MullerおよびKontermann、BioDrugs、24巻: 89~98頁、2010年; ChamesおよびBaty、mAbs、1巻: 539~47頁、2009年; DeyevおよびLebedenko、BioEssays、30巻: 904~918頁、2008年)。これらのフォーマットは、以下の3つの大きな類型へと分けられる: 1) クアドローマ法 (Staerzら、PNAS、83巻: 1453~7頁、1986年)、KIH (knob and hole) 法 (Nat Biotechnol、16巻: 677~81頁; J. Biol. Chem.、285巻: 19637~46頁、2010年)、鎖交換操作ドメインによる「SEED」法 (Davisら、PEDS、23巻: 195~202頁、2010年)、IgGの重鎖または軽鎖のC末端への融合 (ColomaおよびMorrison、Nat. Biotechnol.、15巻: 159~63頁、1997年; Shenら、J. Immunol. Methods、318巻: 65~74頁、2007年; Orcuttら、PEDS、23巻: 221~8頁、2010年; Dongら、J. Biol. Chem.、286巻: 4703~17頁、2011年、Lazarら、特許出願第US20110054151号)、IgGの重鎖または軽鎖のN末端への融合 (Shenら、J. Biol. Chem.、281巻: 10706~17頁、2006年; Wuら、Nat. Biotechnol.、25巻: 1290~7頁、2007年) を含めた、Fcのヘテロ二量体化または重鎖もしくは軽鎖への共有結合的な融合に基づく、IgG様二重特異性分子; 2) Fcの融合による二重特異性抗体 (Mabryら、PEDS、23巻: 115~127頁、2010年; Millerら、PEDS、23巻: 549~557頁、2010年); 3) ダイアボディー (Db) (Holligerら、PNAS、90巻: 6444~8頁、1993年)、ジスルフィド結合で連結されたダイアボディー (また、二重アフィニティーリターゲティングまたはDARTとしても公知) (Johnsonら、J. Mol. Biol.、399巻: 436~49頁、2010年)、単鎖ダイアボディー (scDb) (Altら、FEBS Letters、454巻: 90~4頁、1999年)、タンデムダイアボディー (tandAb) (Kipriyanovら、J. Mol. Biol.、293巻: 41~56頁、1999年)、タンデム単鎖Fv (taFv) (Mackら、PNAS、92巻: 7021~5頁、1995年) を含め、融合または非共有結合的会合を介する、抗体の可変領域だけによる分子; ならびに4) バイボディーおよびトリボディー (Schoonjansら、J. Immunol.、165巻: 7050~7頁、2000年; Biotechnol SAのウェブサイト: <http://www.biotechnol.com>)、単ドメイン抗体 (特許出願第US2010/0239582 A1号) とのFab融合体、およびFab'2融合体 (米国特許第US5,959,083号) を含めた、Fabベースの融合分子。

【0012】

二重特異性抗体の分野における最近20年間にわたる努力は、臨床的に成果をもたらした。欧州では、2009年に、カツマキソマブ (Cantomaxomab) (REMOVAB (登録商標); 抗CD3、抗EpCAM三機能抗体) が、症候性悪性腹水症用に承認された。しかし、二重特異性抗体は、強力な腫瘍細胞殺滅の可能性を裏付ける一方

10

20

30

40

50

で、全身性の免疫活性化、免疫原性（抗薬物抗体応答）を含めた重度の副作用、およびこれらの分子の一般的な製造可能性の低さが依然として変わらず、このクラスの薬物が広範に適用されることを大きく妨げている。近年になって、抗CD19-scFv-抗CD3-scFv融合体（ブリナツモマブ）を使用する、二重特異性T細胞係合剤またはBiTEと称する二重特異性抗体法のプラットフォームが、前臨床試験および臨床試験（tests）（Bargouら、Science（2008年）、321巻：974～7頁）において裏付けられたその傑出した効力のために、多大な関心を惹いた。特に、非ホジキンリンパ腫を伴う患者は、腫瘍の退縮を示し、場合によっては、ブリナツモマブ投与の臨床試験（trial）期間中に完全寛解を示した。しかし、ブリナツモマブは、言語能力の喪失および見当識障害を症状とする中枢神経系の副作用を含めた重度の副作用を引き起こした。薬物の投与を停止すると、症状は一過性であり、可逆性であった。部分的なT活性化および細胞におけるT再分布を引き起こす、薬物のCD3（T細胞上の）への直接的な結合が仮定された（特許出願第US2010/0150918A1号）。再分布したT細胞のうちの一部は、脳の微小血管へと付着し、内皮細胞を部分的に活性化し、脳内の微小血管の透過性の増強をもたらした。臨床試験では、T細胞に対するB細胞比が大きい患者における副作用の発生率は、この比が小さい患者の場合より低いことが観察された。また、異なるCD3結合抗体断片を用いることにより、サルにおけるT細胞再分布を緩和または回避しうることも報告されている。これらの観察は、CD3上の結合エピトープに合せた抗体のCD3への結合、および結果としてもたらされる部分的なT細胞の活性化が、この重度のCNS副作用の直接的な原因でありうることを強く示唆する。

10

20

【0013】

CD19×CD3二重特異性scFv-scFv融合体の別の欠点は、この薬物が、その短い半減期および皮下投与に対する不適合性に起因して、毎日の静脈内注入（i.v.）による薬物送達を要請することである。加えて、scFv-scFv融合タンパク質は、凝集する傾向を有する。したがって、BiTE分子は、高度に複雑な抗体操作の熟練を要請し、それらを安定的で製造可能とするには労力を要する。

【先行技術文献】**【非特許文献】****【0014】**

【非特許文献1】Nelson、Nat. review、Drug Discover y（2010年）9巻：767～74頁

30

【非特許文献2】Grosse-Hovestら、Eur J Immunol（2003年）33巻：1334～40頁

【非特許文献3】Otzら、Leukemia（2009年）23巻：71～7頁

【非特許文献4】Liuら、J Immunother（2010年）33巻：500～9頁

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0015】**

FcγRまたはCD3を発現させる免疫細胞を係合させる抗体薬物の抗がん活性は、臨床的な概念実証をもたらした。しかし、現行の二重特異性抗体フォーマットの短所は、良好な有効性プロファイルおよび安全性プロファイルによりがん患者を処置するためのこれらの薬物の広範な適用にとって、依然として難題である。したがって、生成物の有効性、安定性、安全性、および製造可能性についてのプロファイルを改善した新たな二重特異性分子のデザインが、依然として火急に必要とされている。

40

【0016】

さらなる背景の情報についての参考文献には、ColomaおよびMorrison、Nat. Biotechnol.、15巻：159～63頁、1997年；Kontermann、Acta Pharmacol. Sin.、26巻、1～9頁、2005年；MarvinおよびZhu；Acta Pharmacol. Sin.、26巻、

50

649～658頁、2005年；Shenら、J. Immunol. Methods、318巻：65～74頁、2007年；Shenら、JBC、281巻：10706～10714頁、2006年；Wuら、Nat. Biotechnol.、25巻、1290～1297頁、2007年；Orcutt、Prot PEDS、23巻：221～8頁、2010年；Mabry、PEDS、23巻、3号、115～127頁、2010年；Schoonjans、The Journal of Immunology、2000年、165巻：7050～7057頁；Michaelson、mAbs、1巻：2号、128～141頁；2009年；Robinsonら、British Journal of Cancer（2008年）、99巻、1415～1425頁が含まれる。

10

【課題を解決するための手段】

【0017】

本開示の一態様は、標的抗原に結合するFab断片；Fab断片のVLのN末端においてカップリングさせた第1の融合部分；および／またはFab断片のVHのN末端においてカップリングさせた第2の融合部分を含む多重特異性Fab融合タンパク質を提供する。多重特異性Fab融合タンパク質の一実施形態では、第1の融合部分および第2の融合部分の非存在下におけるFab断片のFab標的抗原への結合が、同一のFab断片のFab標的への結合と比較して50%～90%の間だけ低減される。

【0018】

本開示の一態様は、a) 標的抗原に結合するFab断片であって、i) 免疫グロブリン軽鎖可変領域（VL）および免疫グロブリン軽鎖定常領域（CL）；ならびにii) 免疫グロブリン重鎖可変領域（VH）および免疫グロブリン重鎖定常領域1（CH1）を含み；CL領域およびCH1領域が、場合によって、ジスルフィド結合により接合されているFab断片と；b) 融合部分AのC末端が、VHドメインのN末端側の終端部へと共有結合的に連結された融合部分A；もしくはc) 融合部分BのC末端が、VLドメインのN末端側の終端部へと共有結合的に連結された融合部分B；またはbおよびcの両方と；d) 場合によって、融合部分AとVHドメインとの間に位置する第1のリンカーと；e) 場合によって、融合部分BとVLドメインとの間に位置する第2のリンカーとを含む多重特異性Fab融合タンパク質を提供する。MSFPの一実施形態では、融合部分Aが、結合ドメインを含み、かつ／または融合部分Bが、結合ドメインを含む。融合部分Aと融合部分Bとは、配列が同一の場合もあり、異なる配列を含む場合もある。

20

30

【0019】

本開示の多重特異性Fab融合タンパク質のなおさらなる実施形態では、融合部分Aが、第1の結合ドメインを含み、融合部分Bが、第2の結合ドメインを含み、ここで、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとが、同じ細胞表面抗原に結合する。一実施形態では、融合部分Aが、第1の結合ドメインを含み、融合部分Bが、第2の結合ドメインを含み、ここで、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとが、異なる細胞表面抗原に結合する。特定の実施形態では、融合部分Aが、第1の結合ドメインを含み、融合部分Bが、第2の結合ドメインを含み、ここで、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとが、同じエピトープまたは異なるエピトープに結合する。

40

【0020】

本開示の多重特異性Fab融合タンパク質の一実施形態では、Fab断片が、細胞表面の標的抗原に結合する。特定の実施形態では、融合部分Aが、結合ドメインを含み、Fab断片が、この結合ドメインと同じ細胞表面抗原に結合する。別の実施形態では、融合部分Bが、結合ドメインを含み、Fab断片が、この結合ドメインと同じ細胞表面抗原に結合する。

【0021】

本明細書で記載される多重特異性Fab融合タンパク質の特定の実施形態では、Fab断片の抗原への結合が、融合部分Aおよび融合部分Bにより引き起こされる立体障害により阻害される。一部の実施形態では、この立体障害の結果として、Fab断片の抗原への

50

検出可能な結合がもたらされない。他の実施形態では、融合部分Aおよび融合部分Bの非存在下におけるF a b断片のその標的への結合が、同一のF a b断片のその標的への結合と比較して50%～90%の間だけ低減される。

【0022】

本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質の一実施形態では、第1のリンカーおよび第2のリンカーが、切断可能である。さらなる実施形態では、第1のリンカーが切断されたとき、F a b断片の抗原への結合が、検出可能である。別の実施形態では、第2のリンカーが切断されたとき、F a b断片の抗原への結合が、検出可能である。なおさらなる実施形態では、第1のリンカーおよび第2のリンカーの両方が切断されたとき、F a b断片の抗原への結合が、検出可能である。

10

【0023】

本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質の別の実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域の種類が、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ から選択される。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、I g G抗体に由来し、さらなる実施形態では、I g G抗体のアイソタイプが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4から選択される。

【0024】

本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質の別の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖のV LおよびC Lが、免疫グロブリンカッパ軽鎖および免疫グロブリンラムダ軽鎖から選択される。

【0025】

20

一実施形態では、融合部分Aが、s c F vの抗原結合ドメインを含む第1の結合ドメインを含む。本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質の一実施形態では、融合タンパク質が、第1のリンカーまたは第2のリンカーを含まない。この点において、一部の実施形態では、融合部分Aが、1つ～3つのC末端のアミノ酸残基を欠失しているか；または融合部分Bが、1つ～3つのC末端のアミノ酸残基を欠失しているか；または融合部分Aおよび融合部分Bの両方が、1つ～3つのC末端のアミノ酸残基を欠失している。本明細書で記載されるM S F Pのさらなる実施形態であって、第1のリンカーまたは第2のリンカーを存在させない実施形態では、F a b V HのN末端側の終端部が、1つ～3つのアミノ酸残基を欠失している場合もあり；F a b V LのN末端側の終端部が、1つ～3つのアミノ酸残基を欠失している場合もあり；V HのN末端側の終端部およびV LのN末端側の終端部の両方が、1つ～3つのアミノ酸残基を欠失している場合もある。本明細書で記載されるM S F Pのさらなる実施形態であって、第1のリンカーまたは第2のリンカーを存在させない実施形態では、融合部分Aおよび融合部分Bが、1つ～3つのC末端のアミノ酸残基を欠失している場合があり；F a b V HのN末端側の終端部およびF a b V LのN末端側の終端部の両方が、1つ～3つのアミノ酸残基を欠失している場合がある。なおさらなる実施形態では、本明細書で記載されるM S F Pが、リンカーと欠失との任意の組合せを含有する。

30

【0026】

本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質またはそのホモ二量体の一実施形態では、第1のリンカーが、プロテアーゼによって切断できない配列を含み、かつ／または第2のリンカーが、プロテアーゼによって切断可能な配列を含む。本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質またはこれを含むホモ二量体の別の実施形態では、第1のリンカーが、プロテアーゼによって切断可能な配列を含み、かつ／または第2のリンカーが、切断できない配列を含む。特定の実施形態では、第1のリンカーと第2のリンカーとが、同じプロテアーゼにより切断できるプロテアーゼによって切断可能な配列を含む。他の実施形態では、第1のリンカーと第2のリンカーとが、異なるプロテアーゼにより切断できるプロテアーゼによって切断可能な配列を含む。関連する実施形態では、プロテアーゼによって切断可能な配列が、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、またはマトリックスメタロプロテアーゼ(M M P)により切断可能な配列を含む。特定の実施形態では、プロテアーゼによって切断可能な配列が、M

40

50

M Pによって切断可能な配列である。この点において、前記マトリックスメタロプロテアーゼによって切断可能な配列は、マトリックスメタロプロテアーゼ1 (M M P-1)、マトリックスメタロプロテアーゼ2 (M M P-2)、マトリックスメタロプロテアーゼ9 (M M P-9)、またはマトリックスメタロプロテアーゼ14 (M M P-14)により切断可能な配列でありうる。

【0027】

本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質の別の実施形態では、第1のリンカーが、1~10アミノ酸の長さであるか、または1~20アミノ酸の長さである。一部の実施形態では、第2のリンカーが、プロテアーゼによって切断できない配列を含むか、またはプロテアーゼによって切断可能な配列を含む。この点において、プロテアーゼによって切断可能な配列は、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、またはマトリックスメタロプロテアーゼ(M M P)により切断可能な配列でありうる。特定の実施形態では、プロテアーゼによって切断可能な配列が、M M Pによって切断可能な配列であり、この点において、マトリックスメタロプロテアーゼ1 (M M P-1)、マトリックスメタロプロテアーゼ2 (M M P-2)、マトリックスメタロプロテアーゼ9 (M M P-9)、またはマトリックスメタロプロテアーゼ14 (M M P-14)により切断可能な配列から選択されるM M Pによって切断可能な配列でありうる。特定の実施形態では、第2のリンカーが、1~10アミノ酸の長さであるか、または1~20アミノ酸の長さである。

【0028】

本開示の別の態様では、多重特異性F a b融合タンパク質が、a) 標的抗原に結合するF a b断片であって、i) 免疫グロブリン軽鎖可変領域(V L)および免疫グロブリン軽鎖定常領域(C L)；ならびにi i) 免疫グロブリン重鎖可変領域(V H)および免疫グロブリン重鎖定常領域1 (C H1)を含み；C L領域およびC H1領域が、場合によって、ジスルフィド結合により接合されているF a b断片と；b) 融合部分AのC末端が、V HドメインのN末端側の終端部へと共有結合的に連結された融合部分A；c) 融合部分BのC末端が、V LドメインのN末端側の終端部へと共有結合的に連結された融合部分Bと；d) 場合によって、融合部分AとV Hドメインとの間に位置する第1のリンカーと；e) 場合によって、融合部分BとV Lドメインとの間に位置する第2のリンカーとを含み；ここで、融合部分Aが、結合ドメインを含み、かつ／または融合部分Bが、結合ドメインを含み、さらに、結合ドメインの一方または両方が、細胞表面抗原に結合する。特定の実施形態では、細胞表面抗原が、腫瘍抗原である。特定の実施形態では、結合ドメインのうちの1つ(例えば、融合部分Aまたは融合部分Bのうちの1つ)が、ヒト血清アルブミンに結合する。

【0029】

本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質の別の実施形態では、F a bが、F c γ R I、F c γ R I I a、F c γ R I I b、F c γ R I I I a、F c γ R I I I a、N K G 2 D、C D 3、C D 2 5、C D 2 8、C T L A-4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L受容体1、T R A I L受容体2、E G F R、H e r 2/neu、E r b B 3、C D 2 5、およびC D 2 8の群より選択される標的抗原に結合する。具体的な実施形態では、F a bが、C D 3に結合する。別の実施形態では、F a bが、T細胞受容体に結合する。F a bは、ヒト化することができる。特定の実施形態では、ヒト化F a bが、O K T 3、U C H T-1、またはS P 3 4に由来する。一実施形態では、F a bが、一部の実施形態では、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスから生成させた完全ヒト抗体に由来する。

【0030】

本明細書で記載される多重特異性F a b融合タンパク質の一実施形態では、融合部分Aが、第1の結合ドメインを含み、融合部分Bが、第2の結合ドメインを含み、ここで、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとが、同じ細胞表面抗原に結合し、ここで、第1

の結合ドメインおよび第2の結合ドメインが、FcγRIIb、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LTβR、TLR、TRAIL受容体1、TRAIL受容体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、葉酸受容体、エフリン受容体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38、およびCD138の群より選択される標的に結合する。

【0031】

本明細書で記載される多重特異性Fab融合タンパク質のさらなる実施形態では、融合部分Aが、第1の結合ドメインを含み、融合部分Bが、第2の結合ドメインを含み、ここで、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとが、異なる細胞表面抗原に結合し、ここで、第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインが、FcγRIIb、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LTβR、TLR、TRAIL受容体1、TRAIL受容体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、ErbB3、EpCAM、葉酸受容体、エフリン受容体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38、およびCD138の群より選択される異なる標的に結合する。

【0032】

多重特異性Fab融合タンパク質の特定の実施形態では、第1の結合ドメインおよび/または第2の結合ドメインが、抗体の抗原結合断片である。この点において、この抗原結合断片は、scFv、CDR、Fv、免疫グロブリンVLドメイン、免疫グロブリンVHドメイン、免疫グロブリンVLドメインおよびVHドメイン、Fab、ラクダ科動物VHH、dAb（ドメイン抗体）からなる群より選択することができる。特定の実施形態では、抗原結合断片が、ヒト化されており、他の実施形態では、抗原結合断片が、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、またはウサギモノクローナル抗体に由来する。一部の実施形態では、抗原結合断片が、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスから生成させうる完全ヒト抗体に由来する。

【0033】

さらなる実施形態では、本明細書で記載されるMSFPの第1の結合ドメインおよび/または第2の結合ドメインが、フィブロネクチン3ドメイン（Fn3）、アンキリン（ankryin）反復配列、およびアドネクチン（Adnectin）からなる群より選択される。

【0034】

本明細書で記載される多重特異性Fab融合タンパク質の一実施形態では、第1のリンカーおよび/または第2のリンカーが、配列番号133（PLGLAG）に示されるアミノ酸配列を含む。

【0035】

本開示の一態様は、本明細書で記載される多重特異性Fab融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチドと、この単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクターと、このようなベクターを含む単離宿主細胞とを提供する。

【0036】

本開示の別の態様は、本明細書で記載される多重特異性Fab融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、単離ポリヌクレオチドがこのコードされた多重特異性Fab融合タンパク質を発現する条件下で培養することにより、多重特異性Fab融合タンパク質を発現させる方法を提供する。

【0037】

本開示のさらなる態様は、本明細書で記載される1または複数の多重特異性Fab融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を提供する。

【0038】

本開示の別の態様は、状態を処置する方法であって、本明細書で記載される1または複

10

20

30

40

50

数の多重特異性 F a b 融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む有効量の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップを含み、状態が、多重特異性 F a b 融合タンパク質が結合しうる抗原と関連する方法を提供する。

【0039】

本明細書で記載される多重特異性 F a b 融合タンパク質のさらなる実施形態では、融合部分 A と融合部分 B とが、二量体化しない。

【0040】

本開示の別の態様は、C D 3 イプシロンの N 末端に結合する F a b 断片；F a b 断片の V L の N 末端へと連結された融合部分 A；もしくは F a b 断片の V H の N 末端へと連結された融合部分 B；または F a b 断片の V L の N 末端へと連結された融合部分 A および F a b 断片の V H の N 末端へと連結された融合部分 B の両方を含む多重特異性 F a b 融合タンパク質を提供する。一実施形態では、F a b 断片が、C D 3 イプシロンのアミノ酸 1 ～ 2 7 内のエピトープに結合する。さらなる実施形態では、F a b 断片が、非ヒト霊長動物 C D 3 イプシロンと交差反応する。

【0041】

本明細書で開示される多重特異性 F a b 融合タンパク質の一実施形態では、a. F a b 断片が、i. 配列番号 2 6 ～ 2 8 に示される C D R 1、C D R 2、および C D R 3 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V L) および免疫グロブリン軽鎖定常領域 (C L)；ならびに i i. 配列番号 2 3 ～ 2 5 に示される C D R 1、C D R 2、および C D R 3 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域 (V H) および免疫グロブリン重鎖定常領域 1 (C H 1) を含み；ここで、C L 領域および C H 1 領域が、場合によって、ジスルフィド結合により接合されており；b. 融合部分 A の C 末端が、V H ドメインの N 末端側の終端部へと共有結合的に連結されるか；もしくは c. 融合部分 B の C 末端が、V L ドメインの N 末端側の終端部へと共有結合的に連結されるか；または d. b および c の両方であり；e. 場合によって、第 1 のリンカーが、融合部分 A と V H ドメインとの間に位置し；f. 場合によって、第 2 のリンカーが、融合部分 B と V L ドメインとの間に位置する。一実施形態では、V H が、配列番号 3 4、3 8、4 2、4 6、5 0、および 5 4 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される。別の実施形態では、V L が、配列番号 5 6、5 8、6 2、6 6、および 7 0 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される。別の実施形態では、融合部分 A が、結合ドメインを含み、かつ／または融合部分 B が、結合ドメインを含む。一実施形態では、融合部分 A の配列と、融合部分 B の配列とが、同一である。なお別の実施形態では、融合部分 A と融合部分 B とが、異なる配列を含む。具体的な一実施形態では、融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、ここで、第 1 の結合ドメインと第 2 の結合ドメインとが、同じ細胞表面抗原に結合する。特定の実施形態では、融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、ここで、第 1 の結合ドメインと第 2 の結合ドメインとが、異なる細胞表面抗原に結合する。他の実施形態では、融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、ここで、第 1 の結合ドメインと第 2 の結合ドメインとが、同じエピトープに結合する。別の実施形態では、融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、ここで、第 1 の結合ドメインと第 2 の結合ドメインとが、異なるエピトープに結合する。

【0042】

本明細書で開示される多重特異性 F a b 融合タンパク質の一実施形態では、F a b 断片の C D 3 への結合が、融合部分 A および融合部分 B により引き起こされる立体障害により阻害される。この点において、この立体障害の結果として、第 1 の結合ドメインおよび第 2 の結合ドメインの、細胞表面抗原への結合の非存在下では、F a b 断片の C D 3 への検出可能な結合がもたらされない。別の実施形態では、F a b 断片の C D 3 への結合が、第 1 の結合ドメインおよび第 2 の結合ドメインの、細胞表面抗原への結合の非存在下では、第 1 の結合ドメインおよび第 2 の結合ドメインの、細胞表面抗原への結合の存在下にお

る F a b 断片の C D 3 への結合と比較して 5 0 % ~ 9 0 % の間だけ低減される。さらなる実施形態では、F a b 断片の C D 3 への結合が、融合部分 A および融合部分 B を有さない同一の F a b 断片の結合と比較して 5 0 % ~ 9 0 % の間だけ低減される。

【0043】

本明細書で開示される多重特異性 F a b 融合タンパク質の別の実施形態では、免疫グロブリン重鎖定常領域の種類が、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ から選択される。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖が、I g G 抗体に由来する。さらなる実施形態では、I g G 抗体のアイソタイプが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 から選択される。別の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖の V L および C L が、免疫グロブリンカップ軽鎖および免疫グロブリンラムダ軽鎖から選択される。

10

【0044】

本明細書で開示される多重特異性 F a b 融合タンパク質の一実施形態では、融合部分 A が、s c F v の抗原結合ドメインを含む第 1 の結合ドメインを含む。

【0045】

多重特異性 F a b 融合タンパク質の別の実施形態では、第 1 のリンカーおよび第 2 のリンカーが、1 ~ 2 0 アミノ酸の長さである。具体的な一実施形態では、第 1 のリンカーおよび／または第 2 のリンカーが、G l y A r g A l a を含む。

【0046】

本明細書で開示される多重特異性 F a b 融合タンパク質の一実施形態では、F a b が、ヒト化されている。

20

【0047】

本明細書で開示される多重特異性 F a b 融合タンパク質のなお別の実施形態では、第 1 の結合ドメインおよび第 2 の結合ドメインが、F c γ R I I b、C D 2 8、C T L A - 4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L 受容体 1、T R A I L 受容体 2、C D 2 8、C E A、P S M A、B C M A、C A I X、c M e t、E G F R 1、H e r 2 / n e u、E r b B 3、E p C A M、葉酸受容体、エフリン受容体、T R A I L 受容体 2、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 0、C D 3 3、C D 4 0、C D 3 7、C D 3 8、および C D 1 3 8 の群より選択される標的に結合する。一実施形態では、第 1 の結合ドメインおよび第 2 の結合ドメインが、配列番号 7 8、8 8、および 9 4 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される。

30

【0048】

別の実施形態では、第 1 の結合ドメインおよび第 2 の結合ドメインが、F c γ R I I b、C D 2 8、C T L A - 4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L 受容体 1、T R A I L 受容体 2、C D 2 8、C E A、P S M A、B C M A、C A I X、c M e t、E G F R 1、H e r 2 / n e u、E r b B 3、E p C A M、葉酸受容体、エフリン受容体、T R A I L 受容体 2、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 0、C D 3 3、C D 4 0、C D 3 7、C D 3 8、および C D 1 3 8 からなる群より選択される異なる標的に結合する。

【0049】

一実施形態では、第 1 の結合ドメインおよび／または第 2 の結合ドメインが、抗体の抗原結合断片である。別の実施形態では、抗原結合断片が、s c F v、C D R、F v、免疫グロブリン V L ドメイン、免疫グロブリン V H ドメイン、免疫グロブリン V L ドメインおよび V H ドメイン、F a b、ラクダ科動物 V H H、d A b からなる群より選択される。なおさらなる実施形態では、抗原結合断片が、ヒト化されている。他の実施形態では、抗原結合断片が、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、またはウサギモノクローナル抗体に由来し、抗原結合断片はまた、完全ヒト抗体にも由来しうる。この点では、完全ヒト抗体を、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスから生成させる。

40

【0050】

一実施形態では、抗原結合断片が、1) 配列番号 1 3 9 ~ 1 4 4 のそれぞれに示される

50

VHCDRおよびVLCDRを含むか；2）配列番号145～150のそれぞれに示されるVHCDRおよびVLCDRを含むか；3）配列番号78、88、および94のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に示されるscFv内に存在するVHを含むか；4）配列番号78、88、および94のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に示されるscFv内に存在するVLを含むか；または5）配列番号78、88、および94に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つから選択されるScFvを含む。

【0051】

多重特異性Fab融合タンパク質の特定の実施形態では、CL領域が、ノブ変異またはホール変異を含み、CH1領域が、CL領域とCH1領域とが安定的に相互作用するように、対応するノブ変異またはホール変異を含む。

10

【0052】

別の実施形態では、本明細書で開示される多重特異性Fab融合タンパク質が、配列番号84、90、96、および100から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ；ならびに配列番号32、60、64、68、および72から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む。さらなる実施形態では、本開示の多重特異性Fab融合タンパク質が、配列番号86、92、98、および102から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ；ならびに配列番号30、36、40、44、48、および52から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む。特定の実施形態では、CL領域とCH1領域とが、ジスルフィド結合により接合されている。

【0053】

20

本開示の別の態様は、本明細書で開示される多重特異性Fab融合タンパク質のうちのいずれかをコードする単離ポリヌクレオチドと、この単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクターとを提供する。本開示はまた、このようなベクターを含む単離宿主細胞も提供する。本開示はまた、宿主細胞を、単離ポリヌクレオチドがこのコードされた多重特異性Fab融合タンパク質を発現する条件下で培養することにより、多重特異性Fab融合タンパク質を発現させる方法も提供する。

【0054】

本開示はまた、本明細書で記載される多重特異性Fab融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物も提供する。

【0055】

30

本開示の別の態様は、がんを処置する方法であって、本明細書で記載される多重特異性Fab融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む有効量の医薬組成物を、がんを有するか、またはがんを有することが疑われる被験体に投与するステップを含み、がんが、多重特異性Fab融合タンパク質が結合しうる抗原と関連する方法を提供する。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

CD3イプシロンのN末端に結合するFab断片；前記Fab断片のVLのN末端へと連結された融合部分A；もしくは前記Fab断片のVHのN末端へと連結された融合部分B；または前記Fab断片のVLのN末端へと連結された融合部分Aおよび前記Fab断片のVHのN末端へと連結された融合部分Bの両方を含む多重特異性Fab融合タンパク質。

40

(項目2)

前記Fab断片が、CD3イプシロンのアミノ酸1～27内のエピトープに結合する、項目1に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目3)

前記Fab断片が、非ヒト霊長動物CD3イプシロンと交差反応する、項目1または項目2に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目4)

a. 前記Fab断片が、

i. 配列番号26～28に示されるCDR1、CDR2、およびCDR3のアミノ酸

50

配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域（V L）および免疫グロブリン軽鎖定常領域（C L）；ならびに

i i. 配列番号 2 3～2 5 に示される C D R 1、C D R 2、および C D R 3 のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域（V H）および免疫グロブリン重鎖定常領域 1（C H 1）を含み；

前記 C L 領域および C H 1 領域が、場合によって、ジスルフィド結合により接合され；

b. 前記融合部分 A の C 末端が、前記 V H ドメインの N 末端側の終端部へと共有結合的に連結されるか；もしくは

c. 前記融合部分 B の C 末端が、前記 V L ドメインの N 末端側の終端部へと共有結合的に連結されるか；または

d. b および c の両方であり；

e. 場合によって、第 1 のリンカーが、前記融合部分 A と前記 V H ドメインとの間に位置し；かつ

f. 場合によって、第 2 のリンカーが、前記融合部分 B と前記 V L ドメインとの間に位置する、項目 1 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 5）

前記 V H が、配列番号 3 4、3 8、4 2、4 6、5 0、および 5 4 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 6）

V L が、配列番号 5 6、5 8、6 2、6 6、および 7 0 に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか 1 つから選択される、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 7）

前記融合部分 A が、結合ドメインを含む、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 8）

前記融合部分 B が、結合ドメインを含む、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 9）

前記融合部分 A および前記融合部分 B の配列が同一である、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 1 0）

前記融合部分 A と前記融合部分 B とが、異なる配列を含む、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 1 1）

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、同じ細胞表面抗原に結合する、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 1 2）

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、異なる細胞表面抗原に結合する、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 1 3）

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、同じエピトープに結合する、項目 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

（項目 1 4）

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、異なるエピトープに

10

20

30

40

50

結合する、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目15)

前記F a b断片のC D 3への結合が、前記融合部分Aおよび前記融合部分Bにより引き起こされる立体障害により阻害される、項目11に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目16)

前記立体障害の結果として、前記第1の結合ドメインおよび前記第2の結合ドメインの、前記細胞表面抗原への結合の非存在下では、前記F a b断片のC D 3への検出可能な結合がもたらされない、項目15に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目17)

前記F a b断片のC D 3への前記結合が、前記第1の結合ドメインおよび前記第2の結合ドメインの、前記細胞表面抗原への結合の非存在下では、前記第1の結合ドメインおよび前記第2の結合ドメインの、前記細胞表面抗原への結合の存在下における前記F a b断片のC D 3への前記結合と比較して50%~90%の間だけ低減される、項目15に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目18)

前記F a b断片のC D 3への前記結合が、前記融合部分Aおよび前記融合部分Bを有さない同一のF a b断片の結合と比較して50%~90%の間だけ低減される、項目15に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目19)

前記免疫グロブリン重鎖定常領域の種類が、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ から選択される、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目20)

前記免疫グロブリン重鎖が、I g G抗体に由来する、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目21)

前記I g G抗体のアイソタイプが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4から選択される、項目20に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目22)

前記免疫グロブリン軽鎖のV LおよびC Lが、免疫グロブリンカップ軽鎖および免疫グロブリンラムダ軽鎖から選択される、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目23)

前記融合部分Aが、s c F vの抗原結合ドメインを含む第1の結合ドメインを含む、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目24)

前記第1のリンカーおよび前記第2のリンカーが、1~20アミノ酸の長さである、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目25)

前記第1のリンカーおよび前記第2のリンカーが、G l y A r g A l aを含む、項目24に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目26)

前記F a bがヒト化されている、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目27)

前記第1の結合ドメインおよび前記第2の結合ドメインが、F c γ R I I b、C D 2 8、C T L A - 4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L受容体1、T R A I L受容体2、C D 2 8、C E A、P S M A、B C M A、C A I X、c M e t、E G F R 1、H e r 2 / n e u、E r b B 3、E p C A M、葉酸受容体、エフリン受容体、T R A I L受容体2、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 0、C D 3 3、C D 4 0、C D 3 7、C D 3 8、およびC D 1 3 8の群より選択される標的に結合する、項目11に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

10

20

30

40

50

(項目 28)

前記第1の結合ドメインおよび前記第2の結合ドメインが、配列番号78、88、および94に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つから選択される、項目27に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目 29)

前記第1の結合ドメインおよび前記第2の結合ドメインが、FcγRIIb、CD28、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LTβR、TLR、TRAIL受容体1、TRAIL受容体2、CD28、CEA、PSMA、BCMA、CAIX、cMet、EGFR1、Her2/neu、Erbb3、EpCAM、葉酸受容体、エフリン受容体、TRAIL受容体2、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38、およびCD138からなる群より選択される異なる標的に結合する、項目12に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

10

(項目 30)

前記第1の結合ドメインおよび/または前記第2の結合ドメインが、抗体の抗原結合断片である、項目7または項目8に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目 31)

前記抗原結合断片が、scFv、CDR、Fv、免疫グロブリンVLドメイン、免疫グロブリンVHドメイン、免疫グロブリンVLドメインおよびVHドメイン、Fab、ラクダ科動物VHH、dAbからなる群より選択される、項目30に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

20

(項目 32)

前記抗原結合断片がヒト化されている、項目30に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目 33)

前記抗原結合断片が、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、またはウサギモノクローナル抗体に由来する、項目30に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目 34)

前記抗原結合断片が、完全ヒト抗体に由来する、項目30に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

30

(項目 35)

前記完全ヒト抗体が、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスから生成される、項目34に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目 36)

前記抗原結合断片が、1)配列番号139~144のそれぞれに示されるVHCDRおよびVLCDRを含むか；2)配列番号145~150のそれぞれに示されるVHCDRおよびVLCDRを含むか；3)配列番号78、88、および94のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に示されるscFv内に存在するVHを含むか；4)配列番号78、88、および94のうちのいずれか1つのアミノ酸配列に示されるscFv内に存在するVLを含むか；または5)配列番号78、88、および94に示されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つから選択されるscFvを含む、項目30に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

40

(項目 37)

前記CL領域が、ノブ変異またはホール変異を含み、前記CH1領域が、前記CL領域と前記CH1領域とが安定的に相互作用するように、対応するノブ変異またはホール変異を含む、項目4に記載の多重特異性Fab融合タンパク質。

(項目 38)

配列番号84、90、96、および100から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ；ならびに配列番号32、60、64、68、および72から選択されるアミノ酸

50

配列のうちのいずれか1つを含む、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目39)

配列番号86、92、98、および102から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ；ならびに配列番号30、36、40、44、48、および52から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目40)

前記C L領域と前記C H 1領域とが、ジスルフィド結合により接合されている、項目38または項目39に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目41)

項目1から37のいずれか一項に記載の多重特異性F a b融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

(項目42)

項目41に記載の単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

(項目43)

項目42に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

(項目44)

項目43に記載の宿主細胞を、単離ポリヌクレオチドが、コードされた多重特異性F a b融合タンパク質を発現する条件下で培養することにより、前記多重特異性F a b融合タンパク質を発現させる方法。

(項目45)

項目1から40のいずれか一項に記載の多重特異性F a b融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

(項目46)

がんを処置するための方法であって、有効量の、項目45に記載の医薬組成物を、前記がんを有するか、または前記がんを有することが疑われる被験体に投与するステップを含み、前記がんは、前記多重特異性F a b融合タンパク質が結合しうる抗原に関連する、方法。

(項目47)

前記第1のリンカーまたは前記第2のリンカーを含まない、項目4に記載の多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目48)

a. 標的抗原に結合するF a b断片であって、
i. 免疫グロブリン軽鎖可変領域(V L)および免疫グロブリン軽鎖定常領域(C L)；ならびに

i i. 免疫グロブリン重鎖可変領域(V H)および免疫グロブリン重鎖定常領域1(C H 1)を含み；

前記C L領域およびC H 1領域が、場合によって、ジスルフィド結合により接合されている、F a b断片と；

b. 融合部分Aであって、前記融合部分AのC末端が、前記V HドメインのN末端側の終端部へと共有結合的に連結される、融合部分A；もしくは

c. 融合部分Bであって、前記融合部分BのC末端が、前記V LドメインのN末端側の終端部へと共有結合的に連結される、融合部分B；または

d. bおよびcの両方と；

e. 場合によって、前記融合部分Aと前記V Hドメインとの間に位置する第1のリンカーと；

f. 場合によって、前記融合部分Bと前記V Lドメインとの間に位置する第2のリンカーと

を含む、多重特異性F a b融合タンパク質。

(項目49)

10

20

30

40

50

前記融合部分 A が、結合ドメインを含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 0)

前記融合部分 B が、結合ドメインを含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 1)

前記融合部分 A および前記融合部分 B の配列が同一である、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 2)

前記融合部分 A と前記融合部分 B とが、異なる配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 3)

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、同じ細胞表面抗原に結合する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 4)

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、異なる細胞表面抗原に結合する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 5)

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、同じエピトープに結合する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 6)

前記融合部分 A が、第 1 の結合ドメインを含み、前記融合部分 B が、第 2 の結合ドメインを含み、前記第 1 の結合ドメインと前記第 2 の結合ドメインとが、異なるエピトープに結合する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 7)

前記 F a b 断片が、細胞表面の標的抗原に結合する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 8)

前記融合部分 A が、結合ドメインを含み、前記 F a b 断片が、前記結合ドメインと同じ細胞表面抗原に結合する、項目 5 7 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 5 9)

前記融合部分 B が、結合ドメインを含み、前記 F a b 断片が、前記結合ドメインと同じ細胞表面抗原に結合する、項目 5 7 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 6 0)

前記 F a b 断片の前記抗原への結合が、前記融合部分 A および前記融合部分 B により引き起こされる立体障害により阻害される、項目 5 3 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 6 1)

前記立体障害の結果として、前記第 1 の結合ドメインおよび前記第 2 の結合ドメインの、前記細胞表面抗原への結合の非存在下では、前記 F a b 断片の前記抗原への検出可能な結合がもたらされない、項目 6 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 6 2)

前記 F a b 断片の前記 F a b 標的への前記結合が、前記第 1 の結合ドメインおよび前記第 2 の結合ドメインの、前記細胞表面抗原への結合の非存在下では、前記細胞表面抗原に対する前記第 1 の結合ドメインおよび前記第 2 の結合ドメインの存在下における同一の F a b 断片の前記 F a b 標的への結合と比較して 5 0 % ~ 9 0 % の間だけ低減される、項目 6 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

10

20

30

40

50

- (項目 6 3)
前記第 1 のリンカーおよび前記第 2 のリンカーが、切断可能である、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 6 4)
前記第 1 のリンカーが切断されたとき、前記 F a b 断片の前記抗原への結合が検出可能である、項目 6 3 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 6 5)
前記第 2 のリンカーが切断されたとき、前記 F a b 断片の前記抗原への結合が検出可能である、項目 6 3 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 6 6)
前記第 1 のリンカーおよび前記第 2 のリンカーの両方が切断されたとき、前記 F a b 断片の前記抗原への前記結合が検出可能である、項目 6 3 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 6 7)
前記免疫グロブリン重鎖定常領域の種類が、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ から選択される、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 6 8)
前記免疫グロブリン重鎖が、I g G 抗体に由来する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 6 9)
前記 I g G 抗体のアイソタイプが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 から選択される、項目 6 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 0)
前記免疫グロブリン軽鎖の V L および C L が、免疫グロブリンカッパ軽鎖および免疫グロブリンラムダ軽鎖から選択される、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 1)
前記融合部分 A が、s c F v の抗原結合ドメインを含む第 1 の結合ドメインを含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 2)
前記第 1 のリンカーが、プロテアーゼによって切断できない配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 3)
前記第 2 のリンカーが、プロテアーゼによって切断可能な配列を含む、項目 7 2 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 4)
前記第 1 のリンカーが、プロテアーゼによって切断可能な配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 5)
前記第 2 のリンカーが、切断できない配列を含む、項目 7 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 6)
前記第 2 のリンカーが、プロテアーゼによって切断可能な配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 7)
前記第 1 のリンカーと前記第 2 のリンカーとが、同じプロテアーゼにより切断できるプロテアーゼによって切断可能な配列を含む、項目 7 6 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。
- (項目 7 8)
前記第 1 のリンカーと前記第 2 のリンカーとが、異なるプロテアーゼにより切断できる

10

20

30

40

50

プロテアーゼによって切断可能な配列を含む、項目 7 6 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 7 9)

前記プロテアーゼによって切断可能な配列が、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、またはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) により切断可能な配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 0)

前記プロテアーゼによって切断可能な配列が、MMP によって切断可能な配列である、項目 7 9 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 1)

前記マトリックスメタロプロテアーゼによって切断可能な配列が、マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MMP-1)、マトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2)、マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9)、またはマトリックスメタロプロテアーゼ 14 (MMP-14) により切断可能な配列である、項目 8 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 2)

前記第 1 のリンカーが、1 ~ 10 アミノ酸の長さである、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 3)

前記第 1 のリンカーが、1 ~ 20 アミノ酸の長さである、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 4)

前記第 2 のリンカーが、プロテアーゼによって切断できない配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 5)

前記第 2 のリンカーが、プロテアーゼによって切断可能な配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 6)

前記プロテアーゼによって切断可能な配列が、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、またはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) により切断可能な配列である、項目 8 5 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 7)

前記プロテアーゼによって切断可能な配列が、MMP によって切断可能な配列である、項目 8 6 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 8)

前記マトリックスメタロプロテアーゼによって切断可能な配列が、マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MMP-1)、マトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP-2)、マトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9)、またはマトリックスメタロプロテアーゼ 14 (MMP-14) によって切断可能な配列である、項目 8 7 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 8 9)

前記第 2 のリンカーが、1 ~ 10 アミノ酸の長さである、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 0)

前記第 2 のリンカーが、1 ~ 20 アミノ酸の長さである、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 1)

前記結合ドメインが、細胞表面抗原に結合する、項目 4 9 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 2)

10

20

30

40

50

前記細胞表面抗原が、腫瘍抗原である、項目 9 1 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 3)

前記結合ドメインが、細胞表面抗原に結合する、項目 5 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 4)

前記細胞表面抗原が、腫瘍抗原である、項目 9 1 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 5)

前記結合ドメインが、ヒト血清アルブミンに結合する、項目 4 9 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 6)

前記結合ドメインが、ヒト血清アルブミンに結合する、項目 5 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 7)

前記 F a b が、F c γ R I、F c γ R I I a、F c γ R I I b、F c γ R I I I a、F c γ R I I I a、N K G 2 D、C D 3、C D 2 5、C D 2 8、C T L A - 4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L 受容体 1、T R A I L 受容体 2、E G F R、H e r 2 / n e u、E r b B 3、C D 2 5、および C D 2 8 の群より選択される標的抗原に結合する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 8)

前記 F a b が、C D 3 に結合する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 9 9)

前記 F a b が、ヒト化されている、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 0)

前記ヒト化 F a b が、U C H T - 1 または S P 3 4 に由来する、項目 9 9 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 1)

前記 F a b が、完全ヒト抗体に由来する、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 2)

前記完全ヒト抗体が、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスから生成される、項目 1 0 1 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 3)

前記第 1 の結合ドメインおよび前記第 2 の結合ドメインが、F c γ R I I b、C D 2 8、C T L A - 4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L 受容体 1、T R A I L 受容体 2、C D 2 8、C E A、P S M A、B C M A、C A I X、c M e t、E G F R 1、H e r 2 / n e u、E r b B 3、E p C A M、葉酸受容体、エフリン受容体、テール受容体 2、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 0、C D 3 3、C D 4 0、C D 3 7、C D 3 8、および C D 1 3 8 の群より選択される標的に結合する、項目 5 3 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 4)

前記第 1 の結合ドメインおよび前記第 2 の結合ドメインが、F c γ R I I b、C D 2 8、C T L A - 4、F A S、F G F R 1、F G F R 2、F G F R 3、F G F R 4、G I T R、L T β R、T L R、T R A I L 受容体 1、T R A I L 受容体 2、C D 2 8、C E A、P S M A、B C M A、C A I X、c M e t、E G F R 1、H e r 2 / n e u、E r b B 3、

10

20

30

40

50

E p C A M、葉酸受容体、エフリン受容体、テール受容体 2、C D 1 9、C D 2 0、C D 3 0、C D 3 3、C D 4 0、C D 3 7、C D 3 8、および C D 1 3 8 の群より選択される異なる標的に結合する、項目 5 4 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 5)

前記第 1 の結合ドメインおよび／または前記第 2 の結合ドメインが、抗体の抗原結合断片である、項目 4 9 または項目 5 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 6)

前記抗原結合断片が、s c F v、C D R、F v、免疫グロブリン V L ドメイン、免疫グロブリン V H ドメイン、免疫グロブリン V L ドメインおよび V H ドメイン、F a b、ラクダ科動物 V H H、d A b からなる群より選択される、項目 1 0 5 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

10

(項目 1 0 7)

前記第 1 の結合ドメインおよび／または前記第 2 の結合ドメインが、フィブロネクチン 3 ドメイン (F n 3)、アンキリン反復配列、およびアドネクチンからなる群より選択される、項目 4 9 または項目 5 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 8)

前記抗原結合断片が、ヒト化されている、項目 1 0 5 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 0 9)

前記抗原結合断片が、マウスモノクローナル抗体、ラットモノクローナル抗体、またはウサギモノクローナル抗体に由来する、項目 1 0 5 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

20

(項目 1 1 0)

前記抗原結合断片が、完全ヒト抗体に由来する、項目 1 0 5 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 1 1)

前記完全ヒト抗体が、ファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、またはヒト抗体遺伝子トランスジェニックマウスから生成される、項目 1 1 0 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 1 2)

前記第 1 のリンカーおよび／または前記第 2 のリンカーが、配列番号 1 3 3 (P L G L A G) に示されるアミノ酸配列を含む、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

30

(項目 1 1 3)

項目 4 8 から 1 1 2 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質をコードする単離ポリヌクレオチド。

(項目 1 1 4)

項目 1 1 3 に記載の単離ポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

(項目 1 1 5)

項目 1 1 4 に記載のベクターを含む単離宿主細胞。

40

(項目 1 1 6)

項目 1 1 5 に記載の宿主細胞を、単離ポリヌクレオチドが、コードされた多重特異性 F a b 融合タンパク質を発現する条件下で培養することにより、前記多重特異性 F a b 融合タンパク質を発現させる方法。

(項目 1 1 7)

項目 4 8 から 1 1 2 のいずれか一項に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

(項目 1 1 8)

状態を処置する方法であって、有効量の、項目 1 1 7 に記載の医薬組成物を、状態の処置を必要とする被験体に投与するステップを含み、前記状態が、多重特異性 F a b 融合タ

50

ンパク質が結合しうる抗原と関連する、方法。

(項目 1 1 9)

前記第 1 のリンカーまたは前記第 2 のリンカーを含まない、項目 4 8 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 2 0)

前記融合部分 A が、1 つ～3 つの C 末端のアミノ酸残基を欠失しているか；または前記融合部分 B が、1 つ～3 つの C 末端のアミノ酸残基を欠失しているか；または前記融合部分 A および前記融合部分 B の両方が、1 つ～3 つの C 末端のアミノ酸残基を欠失している、項目 1 1 9 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 2 1)

前記 V H の N 末端側の終端部が、1 つ～3 つのアミノ酸残基を欠失しているか；または前記 V L の N 末端側の終端部が、1 つ～3 つのアミノ酸残基を欠失しているか；または前記 V H の N 末端側の終端部および前記 V L の N 末端側の終端部の両方が、1 つ～3 つのアミノ酸残基を欠失している、項目 1 1 9 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 2 2)

前記融合部分 A および前記融合部分 B の両方が、1 つ～3 つの C 末端のアミノ酸残基を欠失し；前記 V H の N 末端側の終端部および前記 V L の N 末端側の終端部の両方が、1 つ～3 つのアミノ酸残基を欠失している、項目 1 1 9 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 2 3)

標的抗原に結合する F a b 断片；前記 F a b 断片の V L の N 末端においてカップリングさせた第 1 の融合部分；および前記 F a b 断片の V H の N 末端においてカップリングさせた第 2 の融合部分を含む、多重特異性 F a b 融合タンパク質。

(項目 1 2 4)

前記 F a b 断片の前記 F a b 標的抗原への結合が、前記第 1 の融合部分および第 2 の融合部分の非存在下では、同一の F a b 断片の前記 F a b 標的への結合と比較して 7 0 % ～ 9 0 % の間だけ低減される、項目 1 2 3 に記載の多重特異性 F a b 融合タンパク質。

【図面の簡単な説明】

【0 0 5 6】

【図 1】図 1 は、多重特異性 F a b 融合タンパク質 (M S F P) を描示する概略図である。単ドメインタンパク質またはマルチドメインタンパク質である融合部分 A および融合部分 B は、プロテアーゼにより切断可能または切断不可能なリンカー配列を介して F a b 断片の N 末端側の終端部へと共有結合的に融合されている。融合部分 A および融合部分 B は、抗原特異的結合能を有する場合もあり、抗原特異的結合能を有さない場合もある。

【図 2】図 2 は、M S F P 内の融合部分の異なる立体配座、および F a b の、細胞表面標的または標的の可溶性形態に対する結合アフィニティーの相対強度を描示する概略図である。図の下パネルは、M S F P 内の融合部分の立体配座の可撓性を示す。

【図 3】図 3 は、異なる融合フォーマットによる F a b の、可溶性標的および細胞表面標的に対する結合特性を例示する概略図である。A は、F a b の構造、N 末端のうちの一方において単一の融合部分を伴う F a b 融合タンパク質、および F a b の N 末端の両方において融合部分を伴う F a b 融合タンパク質を示す図であり；B は、その可溶性標的への結合が可能な 3 つの F a b 融合フォーマット全てによる F a b を描示する概略図であり；C は、F a b の N 末端において融合体を伴わない F a b ドメインおよび単一の融合部分を伴う F a b ドメインは、細胞表面上でその標的に結合しうるが、H 鎖および L 鎖の両方の N 末端において融合体を伴う F a b ドメインは、もはや立体障害に起因して細胞表面上に存在するその標的に結合することが可能でないことを描示する概略図である。

【図 4】図 4 は、M S F P が T 細胞へと結合するのに必要な状態を描示する概略図である。A は、H 鎖および L 鎖の両方の N 末端において抗腫瘍抗体の細胞表面標的結合部分を伴う M S F P が、腫瘍会合抗原 (T A A) を介して腫瘍細胞に結合しうるが、T 細胞上の C D 3 には結合しないことを示す図であり (アフィニティーの劇的な低減のため；図 3 C を

10

20

30

40

50

参照されたい) ; Bは、T細胞上のCD3に対する結合アフィニティーの低いMSFP分子が、腫瘍細胞とT細胞とを、アビディティー効果により効果的に係合させる場合を示す図である。代表的なMSFP分子は、TAA結合を介して腫瘍細胞上で集塊をなし、CD3結合アームがアビディティーを介してT細胞に結合する結果として、腫瘍細胞とT細胞との架橋形成をもたらす。

【図5】図5は、抗腫瘍細胞の単一の細胞表面標的結合部分を伴うFab融合体（またはH鎖およびL鎖の両方における、Fab融合体由来する単一アームの切断産物）が、腫瘍細胞およびT細胞の両方で標的に結合する結果として、2つの細胞型の架橋形成をもたらすことを描示する概略図である。

【図6】図6Aは、融合部分としての2つの単鎖Fv (scFv) ドメインを示す、Fab_eの概略図である。Fab_eとは、Fabの結合標的が、T細胞上のCD3イプシロン鎖もしくはT細胞受容体、NK細胞上のNKGD2、またはNK上、単球系細胞上、およびマクロファージ上のFcガンマ受容体など、免疫細胞表面のエフェクター分子であるMSFPを指す。2つのscFvドメインは、同じ特異性を有する場合もあり、異なる特異性を有する場合もある。図6Bは、一次配列内のタンパク質ドメインおよび鎖間ジスルフィド結合の概略図である。CHとCLとの間の鎖間ジスルフィド結合は、任意選択である。scFvの立体構成は、VH-VLの場合もあり、VL-VHの場合もあり、scFv1内およびscFv2内のVHの立体構成とVLの立体構成とは、同じ場合もあり、異なる場合もある。

【図7】図7Aは、融合部分としての2つの単鎖Fv (scFv) ドメインを示すFab_e-albuminの概略図である。Fab_e-albuminとは、Fab_eの特定の種類であって、1つのscFvがヒトアルブミンに対する結合特異性を有し、第2のscFvが腫瘍細胞の表面抗原(TAA)に対する結合特異性を有する種類を指す。図7Bは、一次配列内のタンパク質ドメインおよび鎖間ジスルフィド結合の概略図である。scFvの立体構成は、VH-VLの場合もあり、VL-VHの場合もあり、scFv1およびscFv2内のVHの立体構成とVLの立体構成とは、同じ場合もあり、異なる場合もある。

【図8】図8は、マウス抗ヒトCD3抗体である1F3およびヒト化1F3抗体であるhu-1F3についての、4~20%のトリスグリシンによるSDS-PAGE (ポリアクリルアミドゲル解析) (Invitrogen) を示す図である。ゲルは、Simply Blue試薬 (Invitrogen) を用いて染色した。「NR」とは、非還元条件下であり、「R」とは、5%のメルカプトエタノールを伴う還元条件下である。タンパク質バンドは、両方の抗体が、通常サイズの無傷IgGであるIgGHC、およびIgGLCを有することを示す。

【図9】図9は、マウス抗CD3抗体であるmu-1F3およびヒト化抗CD3抗体であるhu-1F3による、還元して変性させた組換えCD3類縁タンパク質の検出を示す図である。表示された抗原100ngを4~20%のトリスグリシンゲル上で泳動させ、ニトロセルロース膜へと転写した。1ug/mlのビオチニル化mu-1F3 IgG (A) およびビオチニル化hu-1F3 IgGを用いて、ニトロセルロース膜と共にインキュベートした後、ストレプトアビジン/HRPを伴うインキュベーションを行った。検出は、ECL試薬により行った。Fc (K-H) とは、「KIH」法によるヘテロ二量体化Fc変異体を表す。CD3イプシロンアミノ酸1~27。Fcとは、CD3イプシロンのN末端 (配列番号18を参照されたい) におけるヒトFcとのペプチド融合体である。対照ペプチドは、CD3イプシロンアミノ酸1~27と同じアミノ酸組成を有するが、最初の16アミノ酸 (配列番号20を参照されたい) の配列順序が逆である。マウス抗CD3

IgGは、ヒト分子種およびカニクイザル分子種の変性CD3イプシロン鎖のほか、ヒトCD3イプシロンのN末端のアミノ酸1~27も認識することが可能であった。最初の16残基についてアミノ酸配列の順序が逆であるペプチドが、マウス1F3 IgGにより認識されなかったことから、陽性バンドが特異的であることが示唆される。ヒト化1F3抗体であるhu-1F3 IgGが、同じパネルの抗原の認識について極めて類似するパターンを示したことから、この抗体がマウス1F3親抗体と類似する特異性およびエビ

10

20

30

40

50

トープを有することが示される。

【図10】図10は、マウス抗ヒトCD3抗体であるmu-1F3およびそのヒト化形であるhu-1F3によるヒトPBMCへの結合についてのフローサイトメトリー解析を示す図である。FACS染色は、ビオチニル化IgGの後、ストレプトアビジン-PEコンジュゲートを用いる第2のステップを用いて行った。mu-1F3 IgGとhu-1F3 IgGとは、類似する細胞染色パターン：ヒトPBMC中の主要な細胞であるT細胞について大きなシフト（2～3 log）を発生させた。マウスFc（mu-1F3内の）は、ヒトFcガンマ受容体への結合活性を欠くことが公知である。したがって、シフトの小さな細胞集団（0～1 log）におけるわずかな差違は、hu-1F3 IgG（ヒトIgG2 Fc）の、PBMC調製物中のFcガンマ受容体発現細胞への、アフィニティの低い結合に起因する可能性が高い。FACSは、FACSCalibur測定器（BD Bioscience）を用いて行った。

10

【図11】図11は、mu-1F3 IgGおよびhu-1F3 IgGの、組換えCD3イプシロン類縁タンパク質への結合についてのELISA研究を示す図である。1 ug/mlの表示されたタンパク質抗原50 ul（ウェル1個当たり）を、MaxiSorp ELISAプレート上にコーティングした。ビオチニル化mu-1F3 IgGおよびビオチニル化hu-1F3 IgG（4%のミルクTBS-0.05%Tween 20中に0.5 ug/ml）を添加して、固定化抗原に結合させた後、ストレプトアビジン/HRPコンジュゲートを添加した。ABTSを発色のために用い、405 nmで吸光度を測定した。対照ペプチド（配列番号20を参照されたい）によるFc融合体についてのELISAは、いずれの抗体についても陰性である（データは示さない）。結果により、マウス親抗体であるmu-1F3とヒト化形であるhu-1F3とによる異なる抗原形態に対する結合パターンが極めて類似すると示されたことから、特異性およびエピトープがヒト化抗体についても保持されることが示唆される。

20

【図12】図12は、Fabフォーマットのヒト化1F3抗体が、Jurkat細胞上のCD3を認識することを示す図である。2 ug/mlの濃度のHisタグづけしたFabタンパク質を、Jurkat細胞、マウス抗Hisタグ抗体に続き、抗マウス-PEコンジュゲートと共にインキュベートした。FACSは、FACSCalibur測定器（BD Biosciences）上で行った。

【図13-1】図13は、ヒト化抗CD3抗体の、組換えヒトCD3イプシロン/デルタFc（K-H）ヘテロ二量体への結合（パネルAおよびB）；ヒト化抗CD3抗体の、組換えヒトCD3イプシロンN末端アミノ酸1～27ペプチドFc融合体への結合（パネルCおよびD）；ヒト化抗CD3抗体の、組換えカニクイザルCD3イプシロン/デルタFc（K+L）ヘテロ二量体への結合（パネルEおよびF）についてのELISAを示す図である。FdのC末端でヒト化Fabタンパク質にHis6タグづけし、96ウェルプレート固定化抗原へと結合したFabは、HRPとコンジュゲートした抗His6タグマウス抗体を用いて検出した。ABTSを基質として用い、405 nmにおける吸収を測定した。

30

【図13-2】図13は、ヒト化抗CD3抗体の、組換えヒトCD3イプシロン/デルタFc（K-H）ヘテロ二量体への結合（パネルAおよびB）；ヒト化抗CD3抗体の、組換えヒトCD3イプシロンN末端アミノ酸1～27ペプチドFc融合体への結合（パネルCおよびD）；ヒト化抗CD3抗体の、組換えカニクイザルCD3イプシロン/デルタFc（K+L）ヘテロ二量体への結合（パネルEおよびF）についてのELISAを示す図である。FdのC末端でヒト化Fabタンパク質にHis6タグづけし、96ウェルプレート固定化抗原へと結合したFabは、HRPとコンジュゲートした抗His6タグマウス抗体を用いて検出した。ABTSを基質として用い、405 nmにおける吸収を測定した。

40

【図14】図14は、EpCAM×CD3 Fab融合タンパク質（MSFP）の、ヒトCD3を発現させるJurkat細胞への結合を、FACS解析を用いて示す図である。Jurkatへと結合したビオチニル化FabおよびFab融合体は、ストレプトアビジ

50

ン－P Eコンジュゲートにより検出した。O K T 3 F a bは、J u r k a t上のC D 3への結合を示したが、抗E p C A M s c F vの、L C単独またはH CおよびL Cの両方への融合は、O K T 3 F a b部分のC D 3への結合能力を完全に消失させた。ヒト化抗C D 3抗体のF a bであるh u－1 F 3は、J u r k a t細胞上のC D 3に結合することが可能である。O K T 3 F a b融合タンパク質とは異なり、抗E p C A M s c F vをh u－1 F 3 L CのN末端へと融合させたところ、h u－1 F 3 F a bと同様のレベルの結合活性が保持されたのに対し、抗E p C A M s c F vを、h u－1 F 3 F a bのL CおよびH Cへと同時的に融合させると、J u r k a t細胞上のC D 3への正の結合が示されたが、低レベルでの結合であった。

【図15】図15は、E p C A M×C D 3 M S F PのヒトP B M Cへの結合を、F A C S解析を用いて示す図である。J u r k a t細胞へと結合したビオチニル化F a bおよびF a b融合体は、ストレプトアビジン－P Eコンジュゲートにより検出した。A) O K T 3 F a bの、C D 3を発現させるP B M C (T細胞)への結合を示す図である。抗E p C A M s c F vをH CおよびL Cの両方へと融合させたところ、O K T 3 F a b部分の、C D 3に対する結合能力は完全に消失した。B) ヒト化抗C D 3抗体のF a bであるh u－1 F 3. 1は、P B M C調製物中のT細胞上のC D 3に結合することが可能なことを示す図である。O K T 3 F a b融合タンパク質とは異なり、抗E p C A M×h u－1 F 3. 1 F a bを、F a bのL CおよびH Cへと同時的に融合させたところ、J u r k a t細胞上のC D 3への正の結合が示されたが、結合レベルは、低レベルである。

【図16】図16は、A) O K T 3 F a bおよびE p C A M 1. 1×O K T 3二重特異性F a b融合タンパク質が、組換えカニクイザルC D 3イプシロン／デルタヘテロ二量体F cタンパク質に対する結合活性を有さず；B) O K T 3 F a bおよび二重特異性融合体が、組換えヒトC D 3イプシロンN末端のペプチド（アミノ酸1～27、F c融合体）に対する結合活性を有さないことを示したE L I S A結合アッセイを示す図である。F a bおよびF a b融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合させたビオチニル化抗体は、ストレプトアビジン－H R Pコンジュゲートの後、検出用のA B T S基質を用いて検出した。

【図17】図17は、h u－1 F 3 F a bおよびE p C A M 1. 1×h u－1 F 3. 1二重特異性F a b融合タンパク質（M S F P；F a b e）が、A) 組換えカニクイザルC D 3イプシロン／デルタF c（K+H）ヘテロ二量体タンパク質に対する正の結合活性；およびB) 組換えヒトC D 3イプシロンN末端のペプチド（アミノ酸1～27、F c融合体）に対する正の結合活性を有することを示したE L I S A結合アッセイを示す図である。F a bおよびF a b融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合させたビオチン抗体は、ストレプトアビジン－H R Pコンジュゲートの後、検出用基質としてA B T Sを用いて検出した。

【図18】図18は、h u－1 F 3 F a bおよびE p C A M 1. 2×h u－1 F 3. 1 M S F Pが、A) 組換えカニクイザルC D 3イプシロン／デルタF c（K+H）ヘテロ二量体タンパク質に対する正の結合活性；およびB) 組換えヒトC D 3イプシロンN末端のペプチド（アミノ酸1～27、F c融合体）に対する正の結合活性を有することを示したE L I S A結合アッセイを示す図である。F a bおよびF a b融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合させた標識融合タンパク質は、ストレプトアビジン－H R Pコンジュゲートの後、検出用基質としてA B T Sを用いて検出した。

【図19】図19は、h u－1 F 3. 1 F a bおよびE p C A M 2. 2×h u－1 F 3 M S F Pが、A) 組換えカニクイザルC D 3イプシロン／デルタF c（K+H）ヘテロ二量体タンパク質に対する正の結合活性；およびB) 組換えヒトC D 3イプシロンN末端のペプチド（アミノ酸1～27、F c融合体）に対する正の結合活性を有することを示したE L I S A結合アッセイを示す図である。F a bおよびF a b融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合させたビオチン標識融合タンパク質は、ストレプトアビジン－H R Pコンジュゲートの後、検出用のA B T S基質を用

10

20

30

40

50

いて検出した。

【図20-1】図20は、E p C A M × C D 3 M S F P の、全長ヒト E p C A M (h u - E p C A M - F L) 標的を細胞表面上で安定的に発現させる C H O 細胞への結合を、F A C S 解析により示す図である。抗 C D 3 F a b は、予測される通り、同じ C H O 細胞への結合を示さない。E p C A M × C D 3 M S F P は、C H O 細胞上で発現させた E p C A M への正の結合を示す。

【図20-2】図20は、E p C A M × C D 3 M S F P の、全長ヒト E p C A M (h u - E p C A M - F L) 標的を細胞表面上で安定的に発現させる C H O 細胞への結合を、F A C S 解析により示す図である。抗 C D 3 F a b は、予測される通り、同じ C H O 細胞への結合を示さない。E p C A M × C D 3 M S F P は、C H O 細胞上で発現させた E p C A M への正の結合を示す。

10

【図21-1】図21は、E p C A M × C D 3 M S F P により腫瘍標的依存的な様式で方向付けを変化させた P B M C (T 細胞) を媒介する細胞殺滅活性を検出するための F A C S ベースのアッセイを示す図である。このアッセイでは、標的細胞(ヒト E p C A M - F L を細胞表面上で安定的に発現させる C H O 細胞; A、B、D) および対照細胞(C H O だけ; C) を、アッセイの前に P K H - 2 6 蛍光色素(S i g m a、製品の指示書に従う) で標識した。細胞殺滅アッセイの終了時に、T O - P R O - 三ヨウ化物(T P 3、I n v i t r o g e n) を用いて死滅細胞を同定した。このアッセイでは、標的死滅細胞を右上四分図(P K H - 2 6 陽性、T P 3 陽性) 中のカウントから同定し、標的生細胞を左上四分図(P K H - 2 6 陽性、T P 3 陰性) から同定した。A) E p C A M を発現させる C H O 細胞であって、E p C A M 2 . 2 × C D 3 M S F P を伴うが、P B M C を伴わずにインキュベートされた(20時間にわたり) C H O 細胞の死滅細胞(P K H - 2 6 標識 T P 3 陽性細胞) が、約 1 . 4 % であったことを示す図であり; B) E p C A M を発現させる C H O 細胞であって、P B M C を伴うが、M S F P を伴わずにインキュベートされた(20時間にわたり) C H O 細胞の死滅細胞が、P K H - 2 6 標識集団中約 1 4 % であった(P B M C の非特異的殺滅活性) ことを示す図であり; C) E p C A M を発現させない C H O 細胞であって、P B M C および E p C A M 2 . 2 × C D 3 M S F P と共にインキュベートされた(20時間にわたり) C H O 細胞の死滅細胞が、約 1 4 % であった(P B M C の非特異的殺滅活性) ことを示す図であり; D) E p C A M を発現させる C H O 細胞であって、P B M C および例示的な E p C A M × C D 3 M S F P と共にインキュベートされた(20時間にわたり) C H O 細胞の死滅細胞カウントが、約 6 4 % であったことを示す図である。E p C A M 2 . 2 × C D 3 M S F P の腫瘍細胞標的依存的な殺滅活性は、約 5 0 % である(C と D とまたは B と D とを比較して)。

20

30

【図21-2】図21は、E p C A M × C D 3 M S F P により腫瘍標的依存的な様式で方向付けを変化させた P B M C (T 細胞) を媒介する細胞殺滅活性を検出するための F A C S ベースのアッセイを示す図である。このアッセイでは、標的細胞(ヒト E p C A M - F L を細胞表面上で安定的に発現させる C H O 細胞; A、B、D) および対照細胞(C H O だけ; C) を、アッセイの前に P K H - 2 6 蛍光色素(S i g m a、製品の指示書に従う) で標識した。細胞殺滅アッセイの終了時に、T O - P R O - 三ヨウ化物(T P 3、I n v i t r o g e n) を用いて死滅細胞を同定した。このアッセイでは、標的死滅細胞を右上四分図(P K H - 2 6 陽性、T P 3 陽性) 中のカウントから同定し、標的生細胞を左上四分図(P K H - 2 6 陽性、T P 3 陰性) から同定した。A) E p C A M を発現させる C H O 細胞であって、E p C A M 2 . 2 × C D 3 M S F P を伴うが、P B M C を伴わずにインキュベートされた(20時間にわたり) C H O 細胞の死滅細胞(P K H - 2 6 標識 T P 3 陽性細胞) が、約 1 . 4 % であったことを示す図であり; B) E p C A M を発現させる C H O 細胞であって、P B M C を伴うが、M S F P を伴わずにインキュベートされた(20時間にわたり) C H O 細胞の死滅細胞が、P K H - 2 6 標識集団中約 1 4 % であった(P B M C の非特異的殺滅活性) ことを示す図であり; C) E p C A M を発現させない C H O 細胞であって、P B M C および E p C A M 2 . 2 × C D 3 M S F P と共にインキュベートされた(20時間にわたり) C H O 細胞の死滅細胞が、約 1 4 % であった(P B

40

50

MCの非特異的殺滅活性)ことを示す図であり;D)EpCAMを発現させるCHO細胞であって、PBMCおよび例示的なEpCAM×CD3 MSFPと共にインキュベートされた(20時間にわたり)CHO細胞の死滅細胞カウントが、約64%であったことを示す図である。EpCAM2.2×CD3 MSFPの腫瘍細胞標的依存的な殺滅活性は、約50%である(CとDとまたはBとDとを比較して)。

【図22-1】図22は、MSFPの、方向付けを変化させたT細胞による、EpCAMを発現させるCHO細胞に対する細胞溶解活性を、図18において記載されるFACSアッセイを用いて示す図である。A)OKT3 FabおよびそのMSFPが、方向付けを変化させた著明な細胞溶解活性を欠くことを示す図である。hu-1F3.1 Fabが、標的細胞に対する活性を示さなかったのに対し、B)EpCAM1.1×hu-1F3.1 MSFPは、高レベルの活性を示し、MSFPが60pMであっても高い活性レベルを維持したことを示す図であり;C)EpCAM1.2×hu-1F3.1 MSFPによる用量依存的な活性が検出されたことを示す図であり;D)EpCAM2.2 scFvの、hu-1F3.1 Fabとの単一融合体について、用量依存的な細胞溶解活性が検出されたことを示す図である。EpCAM2.2 scFvの、hu-1F3.1 FabのHCおよびLCの両方との二重融合体については、最大で50%の細胞集団の殺滅が観察され、その濃度が60pMという低濃度のときも、高い活性レベル(約40%)を維持した。殺滅活性百分率は、対照アッセイ(EpCAM-CHO+PBMC+MSFPなし)における死滅細胞の百分率を、試料アッセイにおける死滅細胞の百分率から減じることにより計算した。

【図22-2】図22は、MSFPの、方向付けを変化させたT細胞による、EpCAMを発現させるCHO細胞に対する細胞溶解活性を、図18において記載されるFACSアッセイを用いて示す図である。A)OKT3 FabおよびそのMSFPが、方向付けを変化させた著明な細胞溶解活性を欠くことを示す図である。hu-1F3.1 Fabが、標的細胞に対する活性を示さなかったのに対し、B)EpCAM1.1×hu-1F3.1 MSFPは、高レベルの活性を示し、MSFPが60pMであっても高い活性レベルを維持したことを示す図であり;C)EpCAM1.2×hu-1F3.1 MSFPによる用量依存的な活性が検出されたことを示す図であり;D)EpCAM2.2 scFvの、hu-1F3.1 Fabとの単一融合体について、用量依存的な細胞溶解活性が検出されたことを示す図である。EpCAM2.2 scFvの、hu-1F3.1 FabのHCおよびLCの両方との二重融合体については、最大で50%の細胞集団の殺滅が観察され、その濃度が60pMという低濃度のときも、高い活性レベル(約40%)を維持した。殺滅活性百分率は、対照アッセイ(EpCAM-CHO+PBMC+MSFPなし)における死滅細胞の百分率を、試料アッセイにおける死滅細胞の百分率から減じることにより計算した。

【図23】図23は、EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1 MSFPによるT細胞の活性化(PBMC中の)が、腫瘍標的依存的であることを示す図である。A)EpCAMを発現させないCHOの存在下において、EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1(30nM)と共にインキュベートされたPBMCが、FACS解析によるCD69の発現を介して測定される、基底レベルのT細胞の活性化を結果としてもたらしたことを示す図であり;B)EpCAMを発現させないCHOの存在下において、EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1と共にインキュベートされた(30nM、16時間)PBMCが、FACSアッセイにより検出されるCD69の発現を介して測定される、T細胞の活性化の著明な増大を結果としてもたらしたことを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0057】

本開示は、多重特異性Fab融合タンパク質(MSFP)に関する。特に、本開示のMSFPは、特定の対象の標的抗原(例えば、CD3、T細胞受容体、NKG2D、またはFcγR)に結合するFab断片を含み、1つまたは2つの融合部分であって、1つのさらなる標的抗原、または、一部の実施形態では、2つのさらなる標的抗原(例えば、血清

アルブミンタンパク質、腫瘍抗原、または他の疾患関連抗原）に結合する融合部分も有する。

【0058】

有効性、安全性、医薬物質の製造に関連する経費、および薬物投与の経路を含めたがん処置の有効性は、以下の属性のうちの大半または全てを保有する斬新な薬物を開発することにより劇的に改善されることが想定される。

【0059】

1. 二価の腫瘍会合抗原 (TAA) 結合分子を用いる、正常細胞を上回って腫瘍細胞をターゲティングするための選択性の増強。抗体と抗原との相互作用についてのエネルギー論は通常、アフィニティーおよびアビディティーという用語により表現される。アビディティーは、抗原結合ドメインと抗原との単一位点間の相互作用の強度について記載するのに用いられる用語であるアフィニティーとは異なる。アビディティーとはそれ自体、アフィニティーの組合せによる相乗作用的強度である。抗体の腫瘍細胞への結合は、内因性の結合アフィニティー、抗体上に存在する結合部位の数 (価数)、および細胞上における標的抗原の密度に依存する (Reynolds、Biochemistry、18巻: 264~9頁、1979年)。一価抗体を用いる場合、結合強度の測定値は、アフィニティーに関連する。二価抗体または多価抗体を細胞の結合に用いる場合は通常、アビディティーが測定される。通常は抗原濃度が高いほど、アビディティーも高くなる。腫瘍細胞が多ければ、TAAは、腫瘍細胞表面上において過剰発現することが公知である。2つの抗腫瘍抗体の標的結合ドメインを伴うMSFPは、これもまた同じ標的を発現させる正常組織細胞への結合より、TAAを過剰発現させる腫瘍細胞への結合を選択的に強めることが可能である。アビディティー原理に基づき、Adamsらは、二価の抗her2/neu抗体断片を用いることにより、腫瘍塊中の蓄積が、同じ抗体断片の対応する一価形を用いる場合の3倍改善されることを裏付けるのに成功した (Adamsら、Clin Cancer Res、12巻: 1599~1605頁、2006年)。腫瘍ターゲティングに関しては、抗体のアフィニティーが高くなると、腫瘍塊の縁辺部における蓄積が結果としてもたらされることが通常であるのに対し、アビディティー効果が高くなると、抗体の腫瘍内へのより深い浸透がもたらされる。

【0060】

2. 二重特異性抗体を用いる、正常細胞を上回る腫瘍細胞のターゲティングにおける選択性の増強。二重特異性試薬を、正常細胞を上回っていっそう選択的に腫瘍細胞に結合し、これらを死滅させ、単一特異性試薬を上回って有効性および安全性を究極的に増大させるそれらの目標に向けてデザインすることができる (Changら、Mol Cancer Ther、1巻: 553頁、2002年; KipriyanovおよびLe Gall、Curr Opin Drug Discov Devel、7巻: 233頁、2004年)。腫瘍細胞における両方の抗原の存在、および各抗原結合アームの適正なアフィニティーの注意深いデザインに対する要請が、この手法の極めて重要な側面である。例えば、MM-111とは、her2アームを用いて薬物をがん細胞へとターゲティングし、抗her3アームを用いてがん細胞におけるher3受容体のヘテロ二量体化およびシグナル伝達を阻害するようにデザインされた抗Her2およびHer3二重特異性融合タンパク質である (Robinsonら、British Journal of Cancer、99巻、1415~1425頁、2008年)。MM-111をデザインするために重要だと考えられる側面には、1) 組織における比較的限局的なHer2の発現パターン、およびがん細胞によるHer2の過剰発現、2) 組織における広域的なHer3の発現、ならびにがん細胞の増殖および生存におけるHer3によるシグナル伝達の大きな重要性、3) Her2への結合アフィニティーの高さ (1.1nM) およびHer3への結合アフィニティーの低さ (160nM) が含まれる。in vitroにおける結合アッセイでは、MM-111が、Her2/Her3二重陽性細胞に対して、Her2単一陽性細胞に対する結合の最大9.7倍の結合を顕示する一方、1μMの高濃度でもHer3単一陽性細胞への検出可能な結合は認められなかった (Robinsonら、Briti

10

20

30

40

50

sh Journal of Cancer、99巻、1415～1425頁、2008年）。

【0061】

したがって、本開示は、本明細書でさらに記載されるこれらの利点および他の利点を提供する。特に、本開示のMSFPは、以下が含まれるがこれらに限定されない異なる利点を提供する：1) Fabを融合部分へと結合させると、MSFPは、主要なFab標的に結合しないか、またはこれらへの結合を低減した。例えば、Fabを融合部分Aおよび融合部分Bへと結合させると、特に、融合部分がそれらの標的と係合していない場合、抗CD3 Fabを含むMSFPは、CD3に結合しないか、またはCD3への結合を著明に低減した。これは、望まれない副作用（例えば、腫瘍細胞またはFab標的抗原を発現させる他の細胞への結合前におけるT細胞の望まれない全体的活性化）を低下させる。2) 二価結合または二重特異性結合は、MSFPの腫瘍に対する選択性を、正常細胞と対比して増強する。3) MSFPは比較的大型（約75～100kD）であり、これにより、急速な腎クリアランス（腎クリアランスの濾過の閾値サイズは70kDである）を回避するが、通常の抗体（150kD）より小型であり、これにより、腫瘍組織への浸透の改善が可能となる。5) 一部のMSFPが血清アルブミンに結合する能力は、循環中半減期を劇的に延長する。6) MSFPの構造は、scFvだけを有する融合タンパク質より安定的となる傾向がある。

10

【0062】

特定の実施形態では、本開示のMSFPが、特異的標的抗原（例えば、腫瘍抗原）への結合に関して二価であり、融合部分を介して標的の腫瘍抗原に結合し、Fabの結合ドメインを介して第2の標的抗原（例えば、CD3、T細胞受容体、NKGD2D、またはFcγR）に結合する点で二重特異性であり、例えば、特定の標的抗原を発現させる細胞に対する免疫系の活性化を介してそれらの有効性を増強する。

20

【0063】

本開示の例示的なMSFPは、抗CD3 Fabを含む。しかし、本明細書では、他のFab標的もととりわけ想定される。今日、抗CD3 Fabに関して、TCR複合体を指向するタンパク質分子はまた、T細胞の活性化と併せて、T細胞シグナルも誘導し、その結果として、サイトカインストームをもたらすが、これは、重度の副作用を結果としてもたらす場合もあり、架橋形成の非存在下にある細胞に対してはほとんど効果を及ぼさない場合もある。本MSFPは、まず第2の標的抗原、例えば、腫瘍抗原に結合し、これにより、T細胞を活性化しない限りは、TCR（CD3）への結合およびその活性化を阻害する利点をもたらす。これは、所望の標的細胞（例えば、腫瘍細胞標的）の非存在下における望まれないサイトカインストームおよび望まれないT細胞の活性化を大幅に低減する。

30

【0064】

以下の記載は、本開示の多様な実施形態を例示することだけを意図するものである。それ自体、考察される特定の改変は、限定的であることを意図しない。当業者には、本明細書で示される対象物の精神または範囲から逸脱しない限りにおいて、多様な同等物、変化、および改変をもたらすことが明らかであろうし、本明細書には、このような同等な実施形態が包含されることが理解される。

40

【0065】

とりわけ別段であることが示されない限り、本発明の実施は、当技術分野の範囲内にあるウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学、および組換えDNA法の従来の方法であって、それらの多くが例示を目的として以下で記載される方法を使用する。このような技法は、文献において完全に説明されている。例えば、「Current Protocols in Molecular Biology」または「Current Protocols in Immunology」、John Wiley & Sons、New York、N. Y.（2009年）；Ausubelら、「Short Protocols in Molecular Biology」、3版、Wiley & Sons、1995年；SambrookおよびRussell、「Molecular

50

Cloning: A Laboratory Manual」(3版、2001年); Maniatisら、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(1982年); 「DNA Cloning: A Practical Approach」、IおよびII巻(D. Glover編); 「Oligonucleotide Synthesis」(N. Gait編、1984年); 「Nucleic Acid Hybridization」(B. HamesおよびS. Higgins編、1985年); 「Transcription and Translation」(B. HamesおよびS. Higgins編、1984年); 「Animal Cell Culture」(R. Freshney編、1986年); Perbal、「A Practical Guide to Molecular Cloning」(1984年)などの参考文献を参照されたい。

10

【0066】

内容により別段であることが明確に規定されない限り、本明細書および付属の特許請求の範囲で用いられる単数形の「ある(a)」、「ある(an)」、および「その」は、複数の指示物を包含する。

【0067】

本明細書の全体において、文脈により別段に要請されない限り、「～を含む(comprise)」という語、または「～を含む(comprises)」もしくは「～を含む(comprising)」などの変化形は、言明された要素もしくは整数または要素もしくは整数の群の包含は含意するが、他の任意の要素もしくは整数または要素もしくは整数の群の除外は含意しないと理解されたい。

20

【0068】

別段に明示的に言明されない限り、本明細書で記載される各実施形態は、変更すべき部分を変更して、他のあらゆる実施形態にも適用されるものとする。

【0069】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換(例えば、電気穿孔、リポフェクション)のための標準的な技法を用いることができる。酵素反応および精製技法は、製造元の仕様に従い実施することもでき、当技術分野において一般的に達成される通りに実施することもでき、本明細書で記載される通りに実施することもできる。これらの技法および手順ならびに関連する技法および手順は一般に、当技術分野において周知の従来の方法に従い実施することができ、本明細書全体で引用されて論じられる、多様な一般的参考文献およびより特殊な参考文献において記載される通りに実施することができる。特定の定義を提示しない限り、本明細書で記載される分子生物学、分析化学、有機合成化学、ならびに創薬化学および製薬化学との関連で用いられる用語法ならびにこれらの実験室における手順および技法は、周知の手順および技法であり、当技術分野において一般的に用いられている。標準的な技法は、組換え法、分子生物学法、微生物学法、化学合成法、化学的分析法、医薬としての調製、処方、および送達、ならびに患者の処置に用いることができる。

30

【0070】

本明細書で用いられるポリペプチドの「C末端」とは、ポリペプチドの最後のアミノ酸残基であって、そのアミン基を供与して、その隣接するアミノ酸残基のカルボキシル基とペプチド結合を形成するアミノ酸残基を指す。本明細書で用いられるポリペプチドの「N末端」とは、ポリペプチドの最初のアミノ酸であって、そのカルボキシル基を供与して、その隣接するアミノ酸残基のアミン基とペプチド結合を形成するアミノ酸を指す。

40

【0071】

本明細書で用いられる「共有結合的連結」という用語は、1もしくは複数の化学結合を介する直接的な連結、または1もしくは複数のリンカーを介する間接的な連結を指す。

【0072】

任意の適切な化学結合を用いて、限定せずに述べると、ペプチド結合およびジスルフィド結合などの共有結合的結合、水素結合、疎水性結合、イオン結合、およびファンデルワ

50

ールス結合などの非共有結合が含まれる、直接的な連結を作製することができる。

【0073】

本明細書では、「共有結合的結合」が、1または複数の電子を共有する2つの原子の間の安定的な会合を指す。限定せずに述べると、共有結合的結合の例には、ペプチド結合およびジスルフィド結合が含まれる。本明細書で用いられる「ペプチド結合」とは、アミノ酸のカルボキシル基と隣接するアミノ酸のアミン基との間で形成される共有結合的結合を指す。本明細書で用いられる「ジスルフィド結合」とは、2つの硫黄原子の間に形成される共有結合的結合を指す。ジスルフィド結合は、2つのチオール基の酸化から形成される。特定の実施形態では、共有結合的連結が、共有結合的結合を介する直接的な連結である。特定の実施形態では、共有結合的連結が、ペプチド結合またはジスルフィド結合を介する直接的な連結である。

10

【0074】

本明細書では、「非共有結合」が、電子の共有を伴わない2つの分子または2つの化学基の間の誘引的相互作用を指す。限定せずに述べると、非共有結合の例には、水素結合、疎水性結合、イオン結合、およびファンデルワールス結合が含まれる。本明細書では、「水素結合」が、第1の分子／基の水素原子と、第2の分子／基の電気陰性原子との間の引力を指す。本明細書では、「疎水性結合」が、疎水性または非極性の分子／基を、水性環境内で併せて凝集または会合させる力を指す。本明細書では、「イオン結合」が、陽イオンと陰イオンとの間の誘引を指す。本明細書では、「ファンデルワールス結合」が、電子の分布が瞬間的にランダムな摂動を示す、2つの隣接する分子／基の間の非特異的引力を指す。特定の実施形態では、共有結合的連結が、非共有結合を介する直接的な連結である。特定の実施形態では、共有結合的連結が、水素結合、疎水性結合、イオン結合、またはファンデルワールス結合を介する直接的な連結である。

20

【0075】

結合ドメイン（またはこれによる融合タンパク質）は、それが、例えば、約 10^5 M^{-1} 以上のアフィニティーまたは K_a （すなわち、 $1/\text{M}$ を単位とする、特定の結合相互作用の平衡会合定数）で標的分子に結合またはこれと会合する場合に、標的分子へと「特異的に結合する」。特定の実施形態では、結合ドメイン（またはこれによる融合タンパク質）が、約 10^6 M^{-1} 、 10^7 M^{-1} 、 10^8 M^{-1} 、 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 、 10^{12} M^{-1} 、または 10^{13} M^{-1} 以上の K_a で標的に結合する。「高アフィニティー」の結合ドメイン（またはこれによる単鎖融合タンパク質）とは、 K_a が少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、少なくとも 10^{13} M^{-1} 以上の結合ドメインを指す。代替的に、アフィニティーは、単位を M とする（例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 以下の）、特定の結合相互作用の平衡解離定数（ K_d ）として定義することもできる。本開示に従う結合ドメインポリペプチドおよび融合タンパク質のアフィニティーは、従来の技法（例えば、Scatchardら（1949年）、Ann. N. Y. Acad. Sci.、51巻：660頁；および米国特許第5,283,173号；同第5,468,614号、または同等の文献を参照されたい）を用いて容易に決定することができる。

30

40

【0076】

本明細書で用いられる「誘導体」とは、化学的または生物学的に修飾された化合物（例えば、タンパク質）の変化形であって、親化合物と構造的に類似し（実測的にまたは理論的に）、この親化合物から誘導可能な変化形を指す。

【0077】

「立体障害」という用語は、それらのサイズまたは空間的配置から結果として生じる、分子の間の結合相互作用の防止または遅延を指す。

【0078】

「アビディティー」という用語は、組合せによる複数の結合相互作用の強度について記載するのに用いられる用語である。アビディティーは、単一の結合の強度について記載す

50

るのに用いられる用語であるアフィニティーと異なる。抗体に関して、アビディティーとは、複数の抗原結合部位が、同時に標的と相互作用する、抗体の相互作用を指す。個別には、各結合相互作用を容易に破壊しうるが、多くの結合相互作用が同時に存在すると、一過性の単一部位間の非結合では分子の拡散が不可能となり、この部位の結合が保持される可能性が高い。全体的な効果は、抗原の抗体への相乗作用的で強力な結合である。

【0079】

多重特異性 F a b 融合タンパク質

本開示は、F a b 断片（例えば、 $\text{NH}_2 - \text{VL} - \text{CL} - \text{S} - \text{S} - \text{CH1} - \text{VH} - \text{NH}_2$ の基本構造を有する）であって、その VL の N 末端側の終端部に第 1 の融合部分を接合させ、かつ／または VH の N 末端側の終端部に第 2 の融合部分を接合させた F a b 断片を含む多重特異性 F a b 融合タンパク質（MSFP；図中ではまた、F a b が、CD3 イプシロン鎖、T 細胞受容体、NK G 2 D、または F c γ R などの免疫エフェクター分子に結合する、F a b e ととも称する）を提供する。融合部分と VH および VL との間には、場合によって、プロテアーゼにより切断可能なリンカーが存在しうる。この一般的なフォーマットが、以下でさらに記載される通りに用いられる融合部分に応じて、より複雑なホモ二量体多重特異性 F a b 融合タンパク質複合体を構築するためにその上に立脚しうる基本構造である。

【0080】

本出願以前に、F a b の重鎖および軽鎖の両方の N 末端側の終端部において融合部分を有する F a b ベースの融合体について記載されたことはなかった。当業者により理解される通り、このような融合体であれば、F a b の結合アフィニティーを大きく損ない、したがって、それらを実際上有用でなくするであろう。（1 または複数の）結合ドメインを F a b の N 末端へ融合させると結合が低減されるというこの一般的な概念は、MSFP においても観察された。例えば、OKT3 抗 CD3 F a b の N 末端への融合は、F a b の標的への結合を著明に低減し、二重特異性 F a b 融合タンパク質の生物学的活性のほぼ完全な喪失を結果としてもたらした。しかし、抗原結合ドメインの、hu-1 F 3.1 ヒト化抗 CD3 F a b の N 末端への融合が、場合によって、F a b の標的への結合の著明な喪失を結果としてもたらさなかったことは驚くべきことである。一部の 경우에는、細胞表面標的への結合の喪失が、可溶性タンパク質標的に対する場合よりいっそう著明であった。他の一部の 경우에는、結合の喪失が、生物学的活性の喪失を結果としてもたらさなかった。これに対し、T 細胞上の CD3 に対する結合アフィニティーを低下させた MSFP は、生物学的活性を上昇させうる。これは驚くべきことであり、少なくとも以下の 2 つの因子であるがこれらに限定されない因子の重要性を裏付ける：1) 腫瘍細胞への結合が高度（融合部分 A および B の結合ドメインを用いる）であると、MSFP は、F a b 部分の T 細胞への結合の低アフィニティーを克服する高アビディティーを呈示し、したがって、殺滅を誘導すること；2) OKT3 F a b 融合タンパク質の挙動が、抗 CD3 抗体である 1 F 3 に由来する MSFP と完全に異なったのは、それらが高度に抗体依存的、したがって、エピトープ依存的なためであること。1 F 3 およびそのヒト化変異体により認識される CD3 イプシロンエピトープへと結合する抗体に由来する F a b 断片により作製された本開示における MSFP は、多くの固有な特色を保有し、これらの特色を使用して、薬物の安全性、有効性、および製造可能性において所望の属性を伴うヒト用治療剤を開発することができる。本明細書で記載される通り、この特性は、本開示の MSFP において、MSFP が適切な環境に置かれる（例えば、腫瘍の近傍に置かれる）まで、F a b の結合を遮蔽するのに用いられると有利である。

【0081】

以下の節では、MSFP の特異的な構造的構成要素がより詳細に記載される。以下の「多重特異性 F a b 融合タンパク質の機能」と題する節では、MSFP の機能がより詳細に記載される。

【0082】

F a b 断片

上記で言及した通り、本明細書で開示される多重特異性 F a b 融合タンパク質は、それらのコアにおいて F a b 断片を含む。当業者により理解される通り、F a b 断片とは、抗体の抗原結合断片である。F a b は、免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖の 1 つの定常領域と 1 つの変換領域とからなる。重鎖定常領域および重鎖変換領域は、軽鎖変換領域および軽鎖定常領域とヘテロ二量体化し、重鎖定常領域と軽鎖定常領域との間のジスルフィド結合により、通常共有結合的に連結される（例えば、図 1 の概略図を参照されたい）。したがって、本明細書で抗体に関して用いられる「F a b」とは一般に、単一の重鎖の変換領域および第 1 の定常領域へとジスルフィド結合により結合させた単一の軽鎖（変換領域および定常領域の両方）からなる抗体の部分の部分を指す。

【0083】

当業者により認識される通り、重鎖と軽鎖との間のジスルフィド結合は、機能にとって好ましいが、不可欠なわけではない（O r c u t t ら（2010年）、P E D S、23巻：221～228頁）。したがって、特定の実施形態では、本発明の F a b 断片が、ジスルフィド結合を含まない場合もある。この点において、重鎖および軽鎖を、ジスルフィド結合に対する必要を伴わずに安定的に相互作用するような様式で操作することができる。例えば、特定の実施形態では、重鎖または軽鎖を操作して、システイン残基を除去することができ、この場合、重鎖および軽鎖は、F a b としてやはり安定的に相互作用および機能する。一実施形態では、重鎖と軽鎖との間の安定的な相互作用を容易とするように変異を施す。例えば、「K I H」操作戦略を用いて、F a b の重鎖と軽鎖との間の二量体化を容易とすることができる（例えば、1996年、P r o t e i n E n g i n e e r i n g、9巻：617～621頁を参照されたい）。この戦略を用いて、相互作用ドメイン間のインターフェースにおける小型のアミノ酸側鎖を、大型のアミノ酸側鎖で置きかえることにより「ノブ」を創出する。対応する「ホール」は、大型の側鎖を小型の側鎖で置きかえることにより、相互作用分子間のインターフェースにおいて作製する。したがって、本明細書における使用のためにはまた、例えば、C H 1 および／または C L の定常ドメインにおけるアミノ酸変化、ジスルフィド結合の除去、または精製のためのタグの付加など、特定の目的のためにデザインされた変異体の F a b 断片も想定される。

【0084】

別の実施形態では、F a b 断片内の可変領域および定常領域の立体構成が、天然の F a b において見出される立体構成と異なりうる。言い換えれば、一実施形態では、可変領域と定常領域との配向性が、一方の鎖では V H - C L であり、別の鎖では V L - C H 1 である（S h a e f e r ら（2011年）、P N A S、108巻：111870～92頁）。このような修飾 F a b 断片は、それらの特定の標的抗原に結合するようにやはり機能し、本発明の M S F P における使用のために想定される。したがって、この点では、F a b を構成する可変領域および定常領域が、モジュール的であると考えられる。

【0085】

特定の実施形態では、本開示の F a b 断片が、モノクローナル抗体に由来し、I g A、I g M、I g D、I g G、I g E、ならびに I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 などのこれらの亜型を含めた任意の種類に由来しうる。軽鎖ドメインは、カッパ鎖に由来する場合もあり、ラムダ鎖に由来する場合もある。本明細書における使用のための F a b 断片は、組換えにより作製することができる。

【0086】

当技術分野で周知の通り、抗体とは、免疫グロブリン分子の変換領域内に配置される少なくとも 1 つのエピトープ認識部位を介して、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的への特異的結合が可能な免疫グロブリン分子である。本明細書で用いられる通り、この用語は、無傷のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体だけでなく、ヒト化抗体、キメラ抗体、および要請される特異性を有する抗原結合部位または抗原結合断片（エピトープ認識部位）を含む、他の任意の修飾された免疫グロブリン分子の立体構成も包摂する。

【0087】

本明細書で開示される F a b 断片は、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域（V H および V L）を含む抗原結合部分を含む。より具体的には、本明細書で用いられる「抗原結合部分」という用語が、C D 3 分子など、対象の標的抗原に結合する免疫グロブリン重鎖および／または軽鎖の少なくとも 1 つの C D R を含有するポリペプチド断片を指す。この点において、本明細書で記載される多重特異性 F a b 融合タンパク質の抗原結合部分は、対象の標的抗原に結合する親抗体の V H 配列および V L 配列の 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ、または 6 つ全ての C D R を含みうる。特定の実施形態では、M S F P の F a b 断片の抗原結合部分が、C D 3 に結合する。

【0088】

特定の実施形態では、本明細書で記載される M S F P の特異的 V H および／または特異的 V L を用いて、相補的な可変領域のライブラリーをスクリーニングして、対象の標的抗原に対するアフィニティーの増大など、所望の特性を伴う V H／V L を同定することができる。このような方法は、例えば、P o r t o l a n o ら、J. I m m u n o l.（1993 年）、150 巻：880～887 頁；C l a r k s o n ら、N a t u r e（1991 年）、352 巻：624～628 頁に記載されている。

【0089】

また、他の方法を用いて C D R をミックスアンドマッチさせて、所望の結合活性（M S F P の融合部分内に存在する他の結合ドメインについての、C D 3 または本明細書で記載される他の対象の標的抗原への結合など）を有する F a b を同定することもできる。例えば、K l i m k a ら、B r i t i s h J o u r n a l o f C a n c e r（2000 年）、83 巻：252～260 頁は、マウス V L と、C D R 3 および F R 4 をマウス V H から保持したヒト V H ライブラリーとを用いるスクリーニング工程について記載している。抗体を得た後、V H をヒト V L ライブラリーに照らしてスクリーニングして、抗原に結合する抗体を得た。B e i b o e r ら、J. M o l. B i o l.（2000 年）、296 巻：833～849 頁は、マウス重鎖の全体とヒト軽鎖ライブラリーとを用いるスクリーニング工程について記載している。抗体を得た後、1 つの V L を、マウスの C D R 3 を保持したヒト V H ライブラリーと組み合わせた。抗原に結合することが可能な抗体を得た。R a d e r ら、P N A S（1998 年）、95 巻：8910～8915 頁は、上記の B e i b o e r らの工程と同様の工程について記載している。

【0090】

当技術分野では、記載されたばかりのこれらの技法が、それら自体において、それら自体について、それら自体として公知である。しかし、当業者は、当技術分野の日常的な方法を用いて、本明細書で記載される本開示の複数の実施形態に従い、抗体の抗原結合断片を得るのに、このような技法を用いることが可能である。

【0091】

本明細書ではまた、標的抗原（例えば、融合部分の結合ドメインの標的について本明細書の別の個所で記載される、C D 3 または任意の標的抗原）に特異的な抗体の抗原結合ドメインを得る方法であって、本明細書で示される V H ドメインのアミノ酸配列に 1 または複数のアミノ酸を付加、欠失、置換、または挿入することにより、この V H ドメインのアミノ酸配列の変異体である V H ドメインをもたらす、場合によっては、このようにしてもたらされた V H ドメインを、1 または複数の V L ドメインと組み合わせ、V H ドメインまたは V H／V L の 1 もしくは複数の組合せを調べて、対象の標的抗原（例えば、C D 3）に特異的であり、場合によって、1 または複数の所望の特性も伴う、特異的結合メンバーまたは抗体の抗原結合ドメインを同定するステップを含む方法も開示される。V L ドメインは、本明細書で実質的に示されるアミノ酸配列を有しうる。類似の方法であって、本明細書で開示される V L ドメインの 1 または複数の配列変異体を、1 または複数の V H ドメインと組み合わせる方法も使用することができる。

【0092】

抗体またはポリペプチドに「特異的に結合する」か、または「優先的に結合する」（本明細書では互換的に用いられる）エピトープとは、当技術分野において十分に理解された

10

20

30

40

50

用語であり、当技術分野ではまた、このような特異的または優先的な結合を決定する方法も周知である。分子は、それが、特定の細胞または物質と、代替的な細胞または物質との場合より高頻度で、迅速に、長い持続時間にわたり、かつ／または大きなアフィニティーで反応または会合する場合、「特異的結合」または「優先的結合」を呈示するという。抗体、またはその Fab もしくは scFv は、それが、他の物質に結合する場合より大きなアフィニティー、アビディティーで、容易に、かつ／または長い持続時間にわたり結合する場合、標的に「特異的に結合する」か、または「優先的に結合する」。例えば、CD3 エピトープに特異的または優先的に結合する抗体とは、1つのCD3 エピトープに、他のCD3 エピトープまたはCD3 以外のエピトープに結合する場合より大きなアフィニティー、アビディティーで、容易に、かつ／または長い持続時間にわたり結合する抗体である。また、この定義を読み解くことにより、例えば、第1の標的に特異的または優先的に結合する抗体（または部分もしくはエピトープ）が、第2の標的に特異的または優先的に結合する場合もあり、結合しない場合もあることも理解される。それ自体、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも排他的結合を要請するわけではない（排他的結合を包含しうるが）。一般に、結合に対する言及は、優先的結合を意味するが、必ずしもそうであるわけではない。

【0093】

免疫的結合とは一般に、免疫グロブリン分子と、この免疫グロブリンがそれに対して特異的である抗原との間で、例えば、例示として述べるものであり、限定として述べるものではないが、静電引力もしくは静電斥力、イオン性引力もしくはイオン性斥力、親水性引力もしくは親水性斥力、および／または疎水性引力もしくは疎水性斥力、立体斥力、水素結合、ファンデルワールス力、ならびに他の相互作用の結果として生じる種類の非共有結合的相互作用を指す。免疫的結合による相互作用の強度またはアフィニティーは、この相互作用の解離定数 (K_d) であって、低値の K_d が大きなアフィニティーを表す K_D との関連で表すことができる。選択したポリペプチドの免疫的結合特性は、当技術分野で周知の方法を用いて定量化することができる。このような一方法は、抗原結合部位／抗原の複合体形成および解離の速度であって、複合体パートナーの濃度、相互作用のアフィニティー、およびいずれの方向の速度にも同等に影響を及ぼす幾何学的パラメータに依存する速度を測定するステップを伴う。こうして、「オン速度定数」 (k_{on}) および「オフ速度定数」 (k_{off}) のいずれも、濃度ならびに会合速度および解離速度の実測値を計算することにより決定することができる。したがって、 k_{off}/k_{on} の比は、解離定数 K_D と同等である。一般に、Daviesら (1990年)、Annual Rev. Biochem.、59巻：439～473頁を参照されたい。

【0094】

「抗原」という用語は、Fab断片の抗原結合部分などの選択的結合剤による結合が可能であり、加えて、動物において、この抗原のエピトープへの結合が可能な抗体を作製するのに用いることが可能な分子または分子の部分の部分を指す。抗原は、1または複数のエピトープを有しうる。

【0095】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンまたはT細胞受容体への特異的結合が可能な任意の決定基、特定の実施形態では、ポリペプチド決定基を包含する。エピトープとは、抗体またはその抗原結合断片が結合する抗原の領域である。特定の実施形態では、エピトープ決定基に、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニルなど、化学的に活性な表面分子集団が含まれ、特定の実施形態では、特定の三次元構造特徴および／または特定の電荷特徴を有しうる。特定の実施形態では、MSFPが、タンパク質および／または高分子の複合混合物中でその標的抗原を優先的に認識する場合に、抗原に特異的に結合するという。MSFPは、平衡解離定数が $\leq 10^{-5}$ 、 10^{-6} または 10^{-7} M である場合に、抗原に特異的に結合するという。一部の実施形態では、平衡解離定数が $\leq 10^{-8}$ M または $\leq 10^{-9}$ M でありうる。一部のさらなる実施形態では、平衡解離定数が $\leq 10^{-10}$ M または $\leq 10^{-11}$ M でありうる。

【0096】

特定の実施形態では、本明細書で記載される Fab 断片の抗原結合部分は、重鎖 CDR および軽鎖 CDR のセットであって、CDR に対する支持体をもたらし、互いと比べた CDR の空間関係を規定する、重鎖フレームワーク領域および軽鎖フレームワーク領域 (FR) のセットのそれぞれの間に散在する CDR セットを包含する。本明細書で用いられる「CDR セット」という用語は、重鎖 V 領域または軽鎖 V 領域 3 つずつの超可変領域を指す。重鎖または軽鎖の N 末端から順に、これらの領域を、それぞれ「CDR 1」、「CDR 2」、および「CDR 3」と称する。したがって、抗原結合部位は、重鎖 V 領域および軽鎖 V 領域の各々に由来する CDR セットを含む 6 つの CDR を包含する。本明細書では、単一の CDR (例えば、CDR 1、CDR 2、または CDR 3) を含むポリペプチドを「分子的認識単位」と称する。多数の抗原-抗体複合体の結晶構造解析により、CDR のアミノ酸残基は、結合した抗原との広範な接触であって、抗原との最も広範な接触が重鎖 CDR 3 との接触である抗原との接触を形成することが裏付けられている。したがって、分子的認識単位は、抗原結合部位の特異性の主要な一因をなす。

10

【0097】

本明細書で用いられる「FR セット」という用語は、重鎖 V 領域または軽鎖 V 領域の CDR セットの CDR を枠づける、4 つの挟み込むアミノ酸配列を指す。一部の FR 残基は、結合した抗原に接触しうるが、FR、特に、CDR に直接隣接する FR 残基は、V 領域を抗原結合部位へとフォールドさせる主要な一因をなす。FR 内では、特定のアミノ酸残基および特定の構造特色が極めて高度に保存される。この点において、全ての V 領域配列は、約 90 アミノ酸残基の内部ジスルフィドループを含有する。V 領域が結合部位へとフォールドすると、CDR は、抗原結合表面を形成する突出ループモチーフとして提示される。一般に、CDR ループが特定の「カノニカル」構造 (CDR の正確なアミノ酸配列に関わらず) へとフォールドする形状に影響を及ぼす、FR の保存的構造領域が存在することが認知されている。さらに、特定の FR 残基は、抗体の重鎖と軽鎖との相互作用を安定化させる非共有結合的なドメイン間接触に関与することも公知である。

20

【0098】

免疫グロブリン可変領域の構造および位置は、Kabat, E. A. ら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、4 版、US Department of Health and Human Services、1987 年、および現在ではインターネット (immunome.nwu.edu) で入手可能なその改定版を参照することにより決定することができる。

30

【0099】

「モノクローナル抗体」とは、均一な抗体集団であって、エпитオプの選択的結合に関与するアミノ酸 (自然発生のアミノ酸および非自然発生のアミノ酸) を含む抗体集団を指す。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一のエпитオプを指向する。「モノクローナル抗体」という用語は、無傷のモノクローナル抗体および全長モノクローナル抗体だけでなく、また、それらの断片 (Fab 断片、Fab' 断片、F(ab')₂ 断片、Fv 断片など)、単鎖 (scFv) 抗体、それらの変異体、抗原結合部分を含む融合タンパク質、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ならびにエпитオプに結合するのに要請される特異性および能力を有する抗原結合断片 (エпитオプ認識部位) を含む免疫グロブリン分子の他の任意の修飾された立体構成も包摂する。抗体の供給源または抗体が作製される様式 (例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、トランスジェニック動物などによる) に関して限定することは意図しない。この用語は、完全免疫グロブリンのほか、「抗体」の定義下における上記の断片なども包含する。

40

【0100】

タンパク質分解酵素であるパパインは、IgG 分子を優先的に切断して、複数の断片であって、これらのうちの 2 つ (Fab 断片) の各々が、無傷の抗原結合部位を包含する共有結合的ヘテロ二量体を含む断片をもたらす。酵素であるペプシンは、IgG 分子を切断

50

して、複数の断片であって、両方の抗原結合部位を含む $F(ab')_2$ 断片を含めた断片をもたらすことが可能である。本発明の特定の実施形態に従って用いられる Fv 断片は、 IgM の優先的なタンパク質分解的切断により作製しうるが、まれな場合には、 IgG 免疫グロブリン分子または IgA 免疫グロブリン分子の優先的なタンパク質分解的切断により作製することもできる。しかし、 Fv 断片は、より一般的には、当技術分野において公知の組換え法を用いて誘導される。 Fv 断片は、天然抗体分子の抗原認識能および抗原結合能の大半を保持する抗原結合部位を含めた、非共有結合的 $V_H::V_L$ ヘテロ二量体を包含する (Inbar ら (1972 年)、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、69 巻: 2659~2662 頁; Hochman ら (1976 年)、Biochem、15 巻: 2706~2710 頁; および Ehrlich ら (1980 年)、Biochem、19 巻: 4091~4096 頁)。

【0101】

本開示の具体的な一実施形態では、 Fab 断片が、 $CD3$ に結合する。「 T 細胞受容体」(TCR) とは、 T 細胞の表面において見出される分子であって、 $CD3$ と共に、一般に主要組織適合性複合体 (MHC) 分子へと結合した抗原を認識する一因となる分子である。大半の T 細胞では、 TCR が、高度に可変的な α 鎖と β 鎖との、ジスルフィド連結されたヘテロ二量体からなる。他の T 細胞では、可変的な γ 鎖および δ 鎖からなる代替的な受容体が発現する。 TCR の各鎖は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、1 つの N 末端免疫グロブリン可変領域、1 つの免疫グロブリン定常領域、膜貫通領域、および C 末端側の終端部における短い細胞質テールを保有する (Abbas および Lichtman、*Cellular and Molecular Immunology* (5 版)、版元: Saunders, Philadelphia、2003 年; Janeway ら、*Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*、4 版、Current Biology Publications、148、149、および 172 頁、1999 年を参照されたい)。本開示において用いられる TCR は、ヒト、マウス、ラット、または他の哺乳動物を含めた多様な動物種に由来しうる。

【0102】

「抗 $TCR Fab$ 」または「抗 $TCR Fab_e$ 」とは、 Fab 、またはとりわけ、 TCR 分子もしくはその個別の鎖 (例えば、 $TCR\alpha$ 鎖、 $TCR\beta$ 鎖、 $TCR\gamma$ 鎖、または $TCR\delta$ 鎖) のうちの 1 つに結合する Fab を含む $MSFP$ を指す。特定の実施形態では、抗 $TCR Fab$ は、 $TCR\alpha$ 、 $TCR\beta$ 、またはこれらの両方に結合する。

【0103】

当技術分野では、「 $CD3$ 」が、6 本鎖の多重タンパク質複合体として公知である (Abbas および Lichtman、2003 年; Janeway ら、172 および 178 頁、1999 年を参照されたい)。哺乳動物では、複合体が、 $CD3\gamma$ 鎖、 $CD3\delta$ 鎖、2 つの $CD3\epsilon$ 鎖、および $CD3\zeta$ 鎖のホモ二量体を含む。 $CD3\gamma$ 鎖、 $CD3\delta$ 鎖、および $CD3\epsilon$ 鎖は、単一の免疫グロブリンドメインを含有する免疫グロブリンスーパーファミリーのうちの、類縁性の高い細胞表面タンパク質である。 $CD3\gamma$ 鎖、 $CD3\delta$ 鎖、および $CD3\epsilon$ 鎖の膜貫通領域は、負に帯電しており、これは、これらの鎖が、正に帯電した T 細胞受容体鎖と会合することを可能とする特徴である。 $CD3\gamma$ 鎖、 $CD3\delta$ 鎖、および $CD3\epsilon$ 鎖の各々の細胞内テールが、免疫受容体活性化チロシンモチーフまたは $ITAM$ として公知の単一の保存的モチーフを含有するのに対し、各 $CD3\zeta$ 鎖は、3 つの保存的モチーフを含有する。理論に拘束されることを望まないが、 $ITAM$ は、 TCR 複合体のシグナル伝達能にとって重要であると考えられている。本開示において用いられる $CD3$ は、ヒト、マウス、ラット、または他の哺乳動物を含めた多様な動物種に由来しうる。

【0104】

本明細書で用いられる「抗 $CD3 Fab$ 」とは、とりわけ、個別の $CD3$ 鎖 (例えば、 $CD3\gamma$ 鎖、 $CD3\delta$ 鎖、 $CD3\epsilon$ 鎖)、または 2 つ以上の個別の $CD3$ 鎖から形成さ

れる複合体（例えば、複数のCD3 ϵ 鎖の複合体、CD3 γ 鎖とCD3 ϵ 鎖との複合体、CD3 δ 鎖とCD3 ϵ 鎖との複合体）に結合するFabを指す。特定の実施形態では、抗CD3 Fabが、とりわけ、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、またはこれらの任意の組合せに結合し、特定の実施形態では、CD3 ϵ に結合する。一実施形態では、抗CD3 Fabが、CD3イプシロンのN末端に結合する。具体的な一実施形態では、抗CD3 Fabが、CD3イプシロンのアミノ酸1～27に結合する。

【0105】

本明細書で用いられる「TCR複合体」とは、CD3のTCRとの会合により形成される複合体を指す。例えば、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖のホモ二量体、TCR α 鎖、およびTCR β 鎖からなりうる。代替的に、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖のホモ二量体、TCR γ 鎖、およびTCR δ 鎖からなりうる。

10

【0106】

本明細書で用いられる「TCR複体の構成要素」とは、TCR鎖（すなわち、TCR α 、TCR β 、TCR γ 、またはTCR δ ）、CD3鎖（すなわち、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、またはCD3 ζ ）、または2つ以上のTCR鎖もしくはCD3鎖により形成される複合体（例えば、TCR α とTCR β との複合体、TCR γ とTCR δ との複合体、CD3 ϵ とCD3 δ との複合体、CD3 γ とCD3 ϵ との複合体、またはTCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、および2つのCD3 ϵ 鎖によるTCR垂複合体）を指す。

【0107】

20

背景として述べると、TCR複合体は一般に、MHC分子へと結合した抗原に対するT細胞応答を誘発する一因となる。ペプチド：MHCリガンドの、TCRおよび共受容体（すなわち、CD4またはCD8）への結合により、TCR複合体、共受容体、およびCD45チロシンホスファターゼが結び合わされると考えられる。これは、CD45が、阻害性リン酸基を除去し、これにより、Lckタンパク質キナーゼおよびFynタンパク質キナーゼを活性化することを可能とする。これらのタンパク質キナーゼの活性化により、CD3 ζ 鎖上におけるITAMのリン酸化がもたらされ、これにより、これらの鎖が細胞質性チロシンキナーゼであるZAP-70に結合することが可能となる。結合したZAP-70の、その後のリン酸化による活性化により、3つのシグナル伝達経路であって、そのうちの2つがPLC- γ のリン酸化および活性化により誘発されるシグナル伝達経路が始動し、次いで、これにより、ホスファチジルイノシトールリン酸（PIP）が、ジアシルグリセロール（DAG）およびイノシトール三リン酸（IP3）へと切断される。DAGによるタンパク質キナーゼCの活性化により、転写因子NFkBの活性化がもたらされる。IP3の作用の結果としての細胞内遊離Ca²⁺の突然の増大により、転写因子NFAT（活性化T細胞の核因子）が細胞質から核へと移行することを可能とする細胞質ホスファターゼであるカルシニューリンが活性化される。NFATの完全な転写活性にはまた、転写因子のAP-1ファミリーのメンバーも要請され、転写調節因子のFosファミリーのメンバーとJunファミリーのメンバーとの二量体も要請される。

30

【0108】

活性化ZAP-70により誘発される第3のシグナル伝達経路は、Rasの活性化およびその後におけるMAPキナーゼカスケードの活性化である。これは、最終的にFosの活性化に至り、よって、AP-1転写因子の活性化に至る。NFkB、NFAT、およびAP-1は併せて、T細胞染色体に作用し、結果として、T細胞の分化、増殖、およびエフェクター作用をもたらす新たな遺伝子転写を誘発する。Janewayら、178頁、1999年を参照されたい。

40

【0109】

特定の実施形態では、Fabが、とりわけ、個別のヒトCD3鎖（例えば、ヒトCD3 γ 鎖、ヒトCD3 δ 鎖、およびヒトCD3 ϵ 鎖）、または個別のヒトCD3鎖のうちの2つ以上の組合せ（例えば、ヒトCD3 γ とヒトCD3 ϵ との複合体、またはヒトCD3 δ とヒトCD3 ϵ との複合体）に結合する。特定の好ましい実施形態では、Fabが、とり

50

わけ、ヒトCD3 ϵ 鎖に結合する。

【0110】

特定の他の実施形態では、本開示のFabが、とりわけ、TCR α 、TCR β 、またはTCR α およびTCR β から形成されるヘテロ二量体に結合する。特定の実施形態では、Fabが、とりわけ、ヒトTCR α 、ヒトTCR β 、またはヒトTCR α およびヒトTCR β から形成されるヘテロ二量体のうちの1または複数に結合する。

【0111】

特定の実施形態では、本開示のFabが、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、CD3 ϵ 鎖、TCR α 鎖、もしくはTCR β 鎖、またはこれらの任意の組合せに由来する複合体形態など、1または複数のTCR鎖を伴う1または複数のCD3鎖に由来する複合体形態に結合する。他の実施形態では、本開示のFabが、1つのCD3 γ 鎖、1つのCD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、1つのTCR α 鎖、および1つのTCR β 鎖に由来する複合体形態に結合する。さらなる実施形態では、本開示のFabが、ヒトCD3 γ 鎖、ヒトCD3 δ 鎖、ヒトCD3 ϵ 、ヒトTCR α 鎖、もしくはヒトTCR β 鎖、またはこれらの任意の組合せに由来する複合体形態など、1または複数のヒトTCR鎖を伴う1または複数のヒトCD3鎖に由来する複合体形態に結合する。特定の実施形態では、本開示のFabが、1つのヒトCD3 γ 鎖、1つのヒトCD3 δ 鎖、2つのヒトCD3 ϵ 鎖、1つのヒトTCR α 鎖、および1つのヒトTCR β 鎖に由来する複合体形態に結合する。

【0112】

本開示のFabは、本明細書で記載される通りに発生させることもでき、当技術分野で公知の（例えば、米国特許第6,291,161号；同第6,291,158号を参照されたい）多様な方法により発生させることもできる。Fabの供給源には、ヒト、ラクダ科動物（ラクダ、ヒトコブラクダ、またはラマに由来する；Hamers-Castermanら（1993年）、Nature、363巻：446頁；およびNguyenら（1998年）、J. Mol. Biol.、275巻：413頁）、サメ（Rouxら（1998年）、Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)、95巻：11804頁）、魚類（Nguyenら（2002年）、Immunogenetics、54巻：39頁）、齧歯動物、鳥類、またはヒツジを含めた多様な種に由来するモノクローナル抗体の核酸配列（ファージライブラリー内で抗体、Fv、scFv、またはFabなどとしてフォーマットしうる）が含まれる。

【0113】

とりわけ、変性形態にあるヒトCD3（ウェスタンブロットまたはドットブロット）および天然形態形態にあるヒトCD3（T細胞上の）に結合するSP34マウスモノクローナル抗体など、サルCD3との交差反応性を伴う抗ヒトCD3抗体が特に所望される（Pressano, S.、The EMBO J.、4巻：337～344頁、1985年；Alarcon, B.、EMBO J.、10巻：903～912頁、1991年）。SP34マウスモノクローナル抗体はまた、CD3 ϵ を単独でトランスフェクトしたCOS細胞のほか、CD3 ϵ/γ 二重形質転換細胞またはCD3 ϵ/δ 二重形質転換細胞にも結合する（Salmeron, A.ら、J. Immunol.、147巻：3047～52頁、1991年）。SP34抗体はまた、非ヒト霊長動物にも交差反応する（Yoshino, N.ら、Exp. Anim.、49巻：97～110頁、2000年；Conrad, ML.ら、Cytometry 71A巻：925～33頁、2007年）。加えて、SP34は、架橋されるとT細胞も活性化する（Yangら、J. Immunol.、137巻：1097～1100頁、1986年）。サルCD3との交差反応性は、毒性研究を、チンパンジーにおいてでもなく、サロゲート分子を用いてでもなく、非ヒト霊長動物において、臨床候補物質を直接的に用いて実行することを可能とするので重要である。したがって、本開示のMSFP中のこのような交差反応性抗CD3 Fabを用いる毒性研究は、関与性の高い安全性評価を提供する。

【0114】

他の例示的な抗CD3抗体には、Cris-7モノクローナル抗体（Reinherz

10

20

30

40

50

, E. L. ら (編)、「Leukocyte typing II.」、Springer Verlag、New York、(1986年)、BC3モノクローナル抗体 (Anasetti ら (1990年)、J. Exp. Med.、172巻:1691頁)、OKT3 (Ortho multicenter Transplant Study Group (1985年)、N. Engl. J. Med.、313巻:337頁)、およびOKT3 a-la-a-la (Herold ら (2003年)、J. Clin. Invest.、11巻:409頁)などのその誘導体、ビジリズマブ (Carpenter ら (2002年)、Blood、99巻:2712頁)、ならびに145-2C11モノクローナル抗体 (Hirsch ら (1988年)、J. Immunol.、140巻:3766頁)が含まれる。本明細書において使用が想定されるさらなるCD3結合分子には、UCHT-1 (Beverley, PCおよびCallard, R. E. (1981年)、Eur. J. Immunol. 11巻:329~334頁)、およびWO2004/106380;WO2010/037838;WO2008/119567;WO2007/042261;WO2010/0150918において記載されるCD3結合分子が含まれる。

10

【0115】

例示的な抗TCR抗体は、H57モノクローナル抗体 (Lavasanian ら (2007年)、Scandinavian Journal of Immunology、65巻:39~47頁)である。

【0116】

20

特定の実施形態では、Fabは、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIa、NKG2D、CD25、CD28、CD137、CTLA-4、FAS、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、GITR、LTβR、TLR、TRAIL受容体1、TRAIL受容体2、EGFR、Her2/neu、およびErbB3が含まれるがこれらに限定されない他の細胞表面標的に結合する。

【0117】

Fab断片の抗原結合断片配列 (例えば、重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列)は、公表されたデータベースによるか、またはTCRの構成要素であるCD3鎖を用いてハイブリドーマを発生させるための従来の戦略を用いても入手可能であり、他のFabの結合標的を、簡便な系 (例えば、マウス、HuMAbマウス (R)、TCマウス (TM)、KM-マウス (R)、ラマ、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなど)における免疫原として用いて、本明細書における使用のためのFabを発生させることもできる。当業者により理解される通り、Fab断片は、ファージディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、リボソームディスプレイ法、およびmRNAディスプレイ法などの抗体ディスプレイ法;SLAM法などのB細胞培養法;または免疫化された動物被験体または免疫化されたヒト被験体から単離されたB細胞またはプラズマB細胞に対するハイスループットの遺伝子配列決定法の使用を含め、当技術分野で公知の多様な技法を用いて生成させることができる。

30

【0118】

本開示のMSFPにおける使用のための例示的なFabには、VH、Fd、HC、VL、およびLCのアミノ酸配列、ならびに配列番号23~28に示されるCDRなど、それらのCDRを含め、配列番号29~76に示されるそれらをコードするポリヌクレオチドが含まれる。

40

【0119】

融合部分

本明細書で記載されるMSFPの融合部分は、MSFPにさらなる結合特異性および/または機能的属性 (例えば、血清半減期の延長、ADCC、または他の免疫活性化カスケードの活性化)をもたらすだけでなく、特にFabの、細胞表面における標的、とりわけ、細胞膜に近接し、したがって、接触可能性が限局的なFab標的抗原 (CD3など)への結合が意図される (例えば、腫瘍細胞の存在下において) 場合/ときを除いて、Fab

50

のその標的抗原への結合を著明に低減する立体障害も創出する。これは、F a b断片のC末端においてさらなる結合ドメインに融合するT R I B O D I E S（商標）などの他のF a b融合タンパク質と直接的な対照をなす。（例えば、J o u r n a l o f I m m u n o l o g y、2000年、165巻：7050～7057頁を参照されたい）。

【0120】

さらに、単一のM S F P内では、第1の融合部分と第2の融合部分とが二量体化することを意図しない。これにより、本開示のM S F Pが、W O 2 0 0 8 / 0 2 4 1 8 8およびW O 2 0 0 9 / 1 4 9 1 8 5において記載されている融合タンパク質など、他の公知の融合タンパク質から識別される。W O 2 0 0 8 / 0 2 4 1 8 8およびW O 2 0 0 9 / 1 4 9 1 8 5の公報において記載される構築物は、V H 1－V H 2－C H 1－ヒンジ－C H 2－C H 3およびV L 1－V L 2－C Lの一般的なフォーマットを有することにより異なる。この構築物では、V H 1とV L 1とが二量体化して、さらなる抗原結合部位を形成する。これは、例えば、図7Bにおいて示されている、本明細書で記載されるM S F Pのフォーマットと異なる。本開示のM S F Pでは、第1の融合部分と第2の融合部分とが会合して、単一の抗原結合部位を形成するわけではない。本明細書の別の個所で記載される本M S F Pのさらなる識別特徴は、細胞表面標的などの標的上でM S F Pが集塊をなさない場合、融合部分により、F a bのその標的に対する結合アフィニティーが低減されることである。これに対し、W O 2 0 0 8 / 0 2 4 1 8 8およびW O 2 0 0 9 / 1 4 9 1 8 5において記載されるタンパク質は、抗体の結合標的に対する結合アフィニティーの低減を呈示しない。

【0121】

本開示のM S F Pの融合部分は、結合ドメイン、1もしくは複数の機能的ドメイン、またはこれらの組合せを含む。図1に描示される通り、一実施形態では、本開示のM S F Pが、図1で融合部分Aおよび融合部分Bとして示される2つの融合部分を含む。本明細書ではまた、融合部分が、第1の融合部分および第2の融合部分、または一方を他方から識別する類似の表現としても言及される。例示的な融合部分は、配列番号77、87、および93に示されるポリヌクレオチドによりコードされる、配列番号78、88、および94に示されるアミノ酸配列、またはそれらのC D R、V HもしくはV Lを含む（例えば、配列番号139～150を参照されたい）。

【0122】

特定の実施形態では、第1の融合部分と第2の融合部分とが同一である。さらなる実施形態では、融合部分の両方が、同一な結合ドメインを含むが、他の点では、機能的ドメインを有するかまたはこれを欠くことにより異なる。別の実施形態では、第1の融合部分が、第1の標的抗原に結合する第1の結合ドメインを含み、第2の融合部分が、第2の標的抗原に結合する第2の結合ドメインを含む。

【0123】

特定の実施形態では、第1の融合部分および第2の融合部分の各々が結合ドメインを含み、これらをそれぞれ、第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインと称することができる。特定の実施形態では、第1の結合ドメインが、第2の結合ドメインと同じ標的に結合する。この点において、特定の実施形態では、標的が少なくとも1つの類似性を共有し、限定せずに述べると、例えば、標的は、両方のタンパク質、ポリヌクレオチド、もしくは脂質を含む；標的は、異なるスプライス形態でありうるが、同じタンパク質である；または、特定の実施形態では、標的は、グリコシル化などの修飾は異なりうるが、同じアミノ酸配列を有するという意味で、第1の結合ドメインが、第2の結合ドメインと同じ標的に結合しうる。特定の実施形態では、第1の結合ドメインが、第2の結合ドメインと同じ標的に結合するが、同じ標的の異なるエピトープに結合する。特定の実施形態では、第1の結合ドメインと第2の結合ドメインとが、異なる標的に結合する。

【0124】

別の実施形態では、第1の融合部分が第1の結合ドメインを含み、第2の融合部分が第2の結合ドメインを含み、第1の結合ドメインと、第2の結合ドメインとは、同じ標的

子に結合するが、フォーマットが異なる（例えば、第1の結合ドメインが、細胞表面受容体に結合する s c F vであり、第2の結合ドメインが、この受容体のリガンドであるか；または、同様に、第1の結合ドメインが、リガンドに結合する s c F vであり、第2の結合ドメインが、リガンドの受容体の細胞外ドメインである）。

【0125】

結合ドメイン

上記で言及した通り、特定の実施形態では、第1の融合部分および／または第2の融合部分が、結合ドメインを含む。本開示に従う「結合ドメイン」または「結合領域」は、例えば、とりわけ、生物学的分子（例えば、細胞表面受容体もしくは腫瘍タンパク質、またはこれらの構成要素）を認識し、これに結合する能力を保有する任意のタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチドでありうる。結合ドメインには、任意の自然発生であるか、合成であるか、半合成であるか、または組換えにより作製された対象の生物学的分子に対する結合パートナーが含まれる。例えば、本明細書でさらに記載される通り、結合ドメインは、抗体の軽鎖可変領域および重鎖可変領域領域であることが可能であり、軽鎖可変領域および重鎖可変領域領域を併せて単鎖でいずれかの配向性（例えば、V L－V HまたはV H－V L）で接合することができる。とりわけ、特定の標的と結合する本開示の結合ドメインを同定するための、ウェスタンブロット、E L I S A、フローサイトメトリー、または表面プラズモン共鳴解析（例えば、B I A C O R E（商標）解析を用いて）を含めた、多様なアッセイが公知である。

【0126】

本明細書の以下では、例示的な結合ドメインがさらに記載される。特定の実施形態では、標的分子が、受容体または腫瘍抗原などの細胞表面発現タンパク質でありうる。別の実施形態では、本明細書で有用な結合ドメインが結合する標的分子が、サイトカイン、アルブミン、または他の血清タンパク質などの可溶性抗原である。例示的な結合ドメインには、s c F vなど、免疫グロブリンの抗原結合ドメイン、s c T C R、受容体の細胞外ドメイン、細胞表面分子／受容体のリガンド、またはその受容体結合ドメイン、および腫瘍結合タンパク質が含まれる。特定の実施形態では、抗原結合ドメインが、s c F v、V H、V L、ドメイン抗体変異体（d A b）、ラクダ科動物抗体（V H H）、フィブロネクチン3ドメイン変異体、アンキリン反復配列変異体、および他の足場タンパク質に由来する他の抗原特異的結合ドメインでありうる。

【0127】

したがって、特定の実施形態では、結合ドメインが、抗体に由来する結合ドメインを含むが、抗体以外に由来する結合ドメインでもありうる。抗体に由来する結合ドメインは、抗体の断片の場合もあり、抗体の1または複数の断片であって、抗原との結合に関与する断片の遺伝子操作された産物の場合もある。限定せずに述べると、例には、相補性決定領域（C D R）、可変領域（F v）、重鎖可変領域（V H）、軽鎖可変領域（V L）、重鎖、軽鎖、単鎖可変領域（s c F v）、F a b、単ドメインラクダ抗体（ラクダ科動物V H H）、および単ドメイン抗体（d A b）が含まれる。

【0128】

当業者により理解され、本明細書の別の個所で記載される通り、完全抗体は、2つの重鎖および2つの軽鎖を含む。各重鎖が、可変領域、ならびに第1の定常領域、第2の定常領域、および第3の定常領域からなるのに対し、各軽鎖は、可変領域および定常領域からなる。哺乳動物の重鎖は、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ として分類されており、哺乳動物の軽鎖は、 λ または κ として分類されている。 α 重鎖、 δ 重鎖、 ϵ 重鎖、 γ 重鎖、および μ 重鎖を含む免疫グロブリンは、免疫グロブリン（I g）A、I g D、I g E、I g G、およびI g Mとして分類されている。完全抗体は、「Y」字型を形成する。Y字型のステム部分は、併せて結合した2つの重鎖の第2の定常領域および第3の定常領域（I g EおよびI g Mの場合は、第4の定常領域）からなり、ヒンジ内にジスルフィド結合（鎖間）が形成される。 γ 重鎖、 α 重鎖、および δ 重鎖は、3つのタンデムの（直列の）I gドメインと、可撓性を付加するためのヒンジ領域とからなる定常領域を有し、 μ 重鎖および ϵ 重

鎖は、4つの免疫グロブリンドメインからなる定常領域を有する。第2の定常領域および第3の定常領域は、それぞれ、「CH2ドメイン」および「CH3ドメイン」と称する。Y字型の各アームには、単一の軽鎖の可変領域および定常領域へと結合した単一の重鎖の可変領域および第1の定常領域が含まれる。軽鎖および重鎖の可変領域は、抗原の結合の一因となる。

【0129】

抗体に関する「相補性決定領域」または「CDR」とは、抗体の重鎖または軽鎖の可変領域内の高度に可変的なループを指す。CDRは、抗原の立体配座と相互作用することが可能であり、抗原への結合を大部分決定しうる（一部のフレームワーク領域は結合に関与することが公知であるが）。重鎖可変領域および軽鎖可変領域は各々、3つずつのCDRを含有する。CDRは、Kabatra (Wu, TTおよびKabata, E. A., J Exp Med., 132巻(2号): 211~50頁、(1970年); Borden, P. およびKabata, E. A., PNAS, 84巻: 2440~2443頁(1987年); Kabata, E. A. ら、「Sequences of proteins of immunological interest」、DIANE Publishing刊、1992年)に従い、配列により、またはChoithiaら(Choithia, C. およびLesk, A. M., J Mol. Biol., 196巻(4号): 901~917頁(1987年)、Choithia, C. ら、Nature, 342巻: 877~883頁(1989年))に従い、構造によるなど、従来の方法により規定または同定することができる。

【0130】

抗体に関する「重鎖可変領域」または「VH」とは、フレームワーク領域として公知の挟み込む連なりであって、CDRよりいっそう高度に保存的であり、CDRを支持する足場を形成する連なりの間に散在する、3つのCDRを含有する重鎖の断片を指す。

【0131】

抗体に関する「軽鎖可変領域」または「VL」とは、フレームワーク領域の間に散在する、3つのCDRを含有する軽鎖の断片を指す。

【0132】

抗体に関する「Fv」とは、完全な抗原結合部位を保有する抗体最小の断片を指す。Fv断片は、単一の重鎖の可変領域へと結合させた単一の軽鎖の可変領域からなる。

【0133】

抗体に関する「単鎖Fv抗体」または「scFv」とは、互いへと直接的に、またはペプチドによるリンカー配列を介して接合されている軽鎖可変領域および重鎖可変領域からなる操作抗体を指す。

【0134】

本明細書で用いられる「単ドメインラクダ抗体」または「ラクダ科動物VHH」とは、重鎖抗体の公知で最小の抗原結合単位を指す(Kocher-Nolteら、FASEB J., 21巻: 3490~3498頁(2007年))。「重鎖抗体」または「ラクダ科動物抗体」とは、2つのVHドメインを含有するが軽鎖は含有しない抗体を指す(Riechmann L. ら、J. Immunol. Methods, 231巻: 25~38頁(1999年); WO94/04678; WO94/25591; 米国特許第6,005,079号)。

【0135】

「単ドメイン抗体」または「dAb」とは、抗体重鎖の可変領域(VHドメイン)または抗体軽鎖の可変領域(VLドメイン)からなる抗体断片を指す(Holt, L. ら、Trends in Biotechnology, 21巻(11号): 484~490頁)。

【0136】

本明細書で用いられる「ジスルフィド結合」という用語は、1または複数のジスルフィド結合を介する重鎖断片と軽鎖断片との結合を指す。1または複数のジスルフィド結合は

、2つの断片内のチオール基を連結することにより、2つの断片の間に形成することができる。特定の実施形態では、1または複数のジスルフィド結合を、重鎖断片内および軽鎖断片内それぞれの1または複数のシステイン残基の間に形成することができる。

【0137】

「可変領域連結配列」とは、重鎖可変領域を軽鎖可変領域へと接合し、結果として得られるポリペプチドが、同じ軽鎖可変領域および重鎖可変領域を含む抗体と同じ標的分子に対して特異的結合アフィニティを保持するように、2つの結合サブドメインの相互作用と適合可能なスパーサー機能をもたらすアミノ酸配列である。特定の実施形態では、結合ドメインを免疫グロブリンのCH2領域ポリペプチドまたはCH3領域ポリペプチドへと連結するのに有用なヒンジを、可変領域連結配列として用いることができる（ヒンジのさらなる考察については、本明細書の別の個所を参照されたい）。

10

【0138】

特定の実施形態では、結合ドメインが、抗体以外の構成要素を含む。抗原に結合する抗体以外の構成要素は、例えば、タンパク質間相互作用、タンパク質-脂質間相互作用、タンパク質-ポリヌクレオチド間相互作用、タンパク質-糖間相互作用、またはリガンド結合に関与するタンパク質ドメインなど、対象の標的抗原を認識し、これに結合することが可能な、任意の適切なタンパク質ドメインまたは構成要素でありうる。限定せずに述べると、適切な抗体以外の構成要素の例には、フィブロネクチン3ドメイン（Fn3）、アンキリン反復配列、およびアドネクチンが含まれる。

【0139】

20

本開示の結合ドメインの代替的な供給源には、ランダムペプチドライブラリーをコードする配列、またはフィブリノーゲンドメイン（例えば、Weiselら（1985年）、Science、230巻：1388頁を参照されたい）、クニツドメイン（例えば、米国特許第6,423,498号を参照されたい）、リポカリンドメイン（例えば、WO2006/095164を参照されたい）、V様ドメイン（例えば、米国特許出願公開第2007/0065431号を参照されたい）、C型レクチンドメイン（ZelenskyおよびGready（2005年）、FEBS J.、272巻：6179頁）、またはFcab（商標）（例えば、PCT特許出願公開第WO2007/098934号；同第WO2006/072620号を参照されたい）など、代替的な抗体以外の足場のループ領域における操作されたアミノ酸の多様性をコードする配列が含まれる。

30

【0140】

特定の実施形態では、結合ドメインが、Fn3ドメインを含む。本明細書で用いられる「フィブロネクチン3ドメイン」または「Fn3」とは、生物学的分子への結合に関与するフィブロネクチンにおける自律的なフォールディング単位を指す（Calaycay, J.ら、J. Biol. Chem.、260巻（22号）：12136～41頁（1985年）；Koide, A.ら、J. Mol. Biol.、284巻（4号）：1141～1151頁（1998年）；Bloom, L.ら、Drug Discovery Today、14巻（19～20号）：949～955頁（2009年））。Fn3ドメインは、多様なタンパク質において見出すことができ、Fn3ドメインの異なる反復配列が、DNAおよびタンパク質などの生物学的分子に対する結合部位を含有することが見出される。

40

【0141】

特定の実施形態では、結合ドメインが、アドネクチンを含む。本明細書で用いられる「アドネクチン」とは、Fn3ドメインに基づく遺伝子操作されたタンパク質を指す（Koide, A.ら、Methods Mol. Biol.、352巻：95～109頁（2007年））。アドネクチン中のFn3ドメインは、抗体の可変領域の3つのCDRを模倣する3つのループを含有し、異なる標的分子への特異的結合に応じて遺伝子的に調整することができる。

【0142】

特定の実施形態では、結合ドメインが、アンキリン反復配列を含む。本明細書で用いら

50

れる「アンキリン反復配列」とは、赤血球のアンキリン中に見出される33アミノ酸残基の反復配列を含有するタンパク質の構成要素を指す(Davis, L. H. ら、J. Biol. Chem.、266巻(17号):11163~11169頁(1991年))。アンキリン反復配列は、機能が異なる大多数のタンパク質において生じる最も一般的なタンパク質間相互作用の構造のうちの1つとして公知である。

【0143】

図中で描示される通り、scFvは、特に例示的な結合ドメインである。融合部分の結合ドメインとして用いられるscFvは、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIb、CD28、CD137、CTLA-4、FAS、線維芽細胞成長因子受容体1(FGFR1)、FGFR2、FGFR3、FGFR4、グルココルチコイド誘導型TNFR関連(GITR)タンパク質、リンホトキシン-β受容体(LTβR)、tol1様受容体(TLR)、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導性リガンド受容体1(TRAIL受容体1)およびTRAIL受容体2、がん胎児性抗原(CEA)、前立腺特異性膜抗原(PSMA)タンパク質、前立腺幹細胞抗原(PSCA)タンパク質、B細胞成熟抗原(BCMA; また、ヒト腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー17(TNFRSF17)、およびCD269としても公知)、腫瘍会合タンパク質炭酸脱水酵素IX(CAIX)、肝細胞成長因子受容体(HGFR)、上皮成長因子受容体1(EGFR1)、ヒト上皮成長因子受容体2(Her2/neu; Erb2)、ErbB3、上皮細胞接着分子(EpCAM)、葉酸受容体、エフリン受容体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38、およびCD138が含まれるがこれらに限定されない多様な標的分子のうちのいずれにも結合しうる。

【0144】

特定の実施形態では、結合ドメインが、腫瘍抗原に結合する。限定せずに述べると、例示的な腫瘍抗原標的分子には、p53、cMet、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、BAGE、DAM-6、DAM-10、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-8、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7B、NA88-A、NY-ESO-1、BRCA1、BRCA2、MART-1、MC1R、Gp100、PSA、PSM、チロシナーゼ、ウィルムス腫瘍抗原(WT1)、TRP-1、TRP-2、ART-4、CAMEL、CEA、Cyp-B、Her2/neu、hTERT、hTRT、iCE、MUC1、MUC2、PRAME、P15、RU1、RU2、SART-1、SART-3、WT1、AFP、β-カテニン/m、カスパーゼ8/m、CEA、CDK-4/m、ELF2M、GnT-V、G250、HSP70-2m、HST-2、KIAA0205、MUM-1、MUM-2、MUM-3、ミオシン/m、RAGE、SART-2、TRP-2/INT2、707-AP、アネキシンII、CDC27/m、TPI/mbcra1、ETV6/AML、LDLR/FUT、Pml/RARα、およびTEL/AML1が含まれる。当業者には、これらの腫瘍タンパク質および他の腫瘍タンパク質が公知である。

【0145】

本開示のMSFPの融合部分において有用な他の結合ドメインには、細胞表面受容体に結合するリガンドが含まれる。例示的なリガンドには、CD28、CD137、CTLA-4、FAS、線維芽細胞成長因子受容体1(FGFR1)、FGFR2、FGFR3、FGFR4、グルココルチコイド誘導型TNFR関連(GITR)タンパク質、リンホトキシン-β受容体(LTβR)、tol1様受容体(TLR)、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導性リガンド受容体1(TRAIL受容体1)およびTRAIL受容体2、がん胎児性抗原(CEA)、前立腺特異性膜抗原(PSMA)タンパク質、前立腺幹細胞抗原(PSMA)タンパク質、B細胞成熟抗原(BCMA; また、ヒト腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー17(TNFRSF17)、およびCD269としても公知)、腫瘍会合タンパク質炭酸脱水酵素IX(CAIX)、肝細胞成長因子受容体(H

GFR)、上皮成長因子受容体1 (EGFR1)、ヒト上皮成長因子受容体2 (Her2/neu; ErbB2)、ErbB3、上皮細胞接着分子 (EpCAM)、葉酸受容体、エフリン受容体、CD19、CD20、CD30、CD33、CD40、CD37、CD38、およびCD138など、細胞表面受容体に対するリガンドが含まれるがこれらに限定されない。

【0146】

一実施形態では、結合ドメインが、血清アルブミンに結合する。ヒト血清アルブミンへの結合は、タンパク質による薬物の半減期 ($t_{1/2}$) を数日間またはなお長い期間へ延長する可能性をもたらす。先行技術では、血清アルブミンへの結合または血清アルブミンへの融合により、治療用分子の半減期を著明に延長しうることが公知である。特定の実施形態では、ヒト血清アルブミンに結合する結合ドメインが、非ヒト霊長動物のオルソログと交差反応し、ヒトにおける処置に対していっそう関与性でありうる前臨床動物毒性研究における薬物の半減期の推定を可能としうる。

10

【0147】

特定の実施形態では、結合ドメインが、とりわけ、疾患状態と関連する抗原標的に結合する。疾患状態には、生理学的状態、病理学的状態、および美容学的状態が含まれうる。限定せずに述べると、例示的な状態の例には、がん、炎症性障害、同種移植片移植、I型糖尿病、II型糖尿病、および多発性硬化症が含まれる。

【0148】

特定の実施形態では、抗原標的は、状態と負に関連する。特定の実施形態では、結合ドメインを含むMSFPが抗原標的に結合することにより、抗原標的の生物学的機能が不活化またはアンタゴナイズされ、これにより、状態が改善されうる。特定の実施形態では、結合ドメインを含むMSFPが抗原標的に結合することにより、抗原標的の生物学的機能が活性化またはアンタゴナイズされ、これにより、状態が改善されることになる。本明細書で記載されるMSFPはそれ自体、融合部分の標的抗原に関してアゴニスト分子の場合もあり、アンタゴニスト分子の場合もある。

20

【0149】

配列番号78、88、94 (アミノ酸) および配列番号77、87、93 (ポリヌクレオチド) には、例示的な結合ドメインが提示されるが、これらには、そのCDR、VH、およびVLも含まれる (例えば、配列番号139~150を参照されたい)。

30

【0150】

したがって、本明細書で記載される結合ドメインはとりわけ、任意の適切な抗原標的に結合しうる。言及される通り、限定せずに述べると、適切な抗原標的の例には、TNF受容体 (Shen, H. M. ら、FASEB J.、20巻 (10号) : 1589~98頁 (2006年))、cMet (Bottaro, D. P. ら、Science、251巻 (4995号) : 802~804頁 (1991年))、CD3 (Chetty, R. ら、J Pathol.、173巻 (4号) : 303~7頁 (1994年))、CD40 (Chatzigeorgiou A. ら、Biofactors.、35巻 (6号) : 474~83頁 (2009年))、DR3 (Meylan, F. ら、Immunity.、29巻 (1号) : 79~89頁 (2008年))、FcγR (Torkildsen, O. ら、Acta Neurol Scand Suppl.、183巻 : 61~3頁 (2006年))、NKG2D (Obeidy, P. ら、Int J Biochem Cell Biol.、41巻 (12号) : 2364~7頁 (2009年))、およびこれらの任意の誘導体が含まれる。

40

【0151】

特定の実施形態では、結合ドメインがとりわけ、単一の標的抗原に結合する。別の実施形態では、結合ドメインが、複数の抗原標的と交差反応性である。本明細書で用いられる「交差反応性」とは、結合ドメインがとりわけ、複数の抗原標的に結合しうることを指す。特定の実施形態では、第1の結合ドメインおよび/または第2の結合ドメインが、例えば、C型肝炎コアタンパク質および宿主由来GORタンパク質など、完全に異なる抗原標

50

的に対する交差反応性を有しうる。特定の実施形態では、第1の結合ドメインおよび／または第2の結合ドメインが、例えば、ヒト、マウス、または非ヒト霊長動物に由来するタンパク質に由来する抗原など、異なる種に由来する抗原標的に対する交差反応性を有しうる。

【0152】

融合部分A、B、およびFabの間の接合部

特定の実施形態では、融合部分Aおよび／または融合部分Bが、FabのVHまたはVLのN末端へと直接的に（すなわち、間にさらなるアミノ酸を付加することなく）連結される。他の実施形態では、融合部分Aおよび／または融合部分Bが、FabのVHまたはVLのN末端へと、リンカーを用いて（以下で記載されるさらなるアミノ酸を伴って）連結される。一部の実施形態では、Fab標的および細胞表面上のFab標的の周囲の空間（細胞表面上のFab標的への接触可能性）に応じて、所与の融合部分Aおよび／またはBのC末端から複数のアミノ酸（例えば、1つ～3つのアミノ酸または1～10のアミノ酸；例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸）を欠失させることが必要でありうる。

10

【0153】

他の実施形態では、Fabの重鎖および／または軽鎖のN末端から複数のアミノ酸（例えば、1つ～3つのアミノ酸または1～10のアミノ酸；例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸）を欠失させることが必要でありうる。なおさらなる実施形態では、融合部分のC末端から複数のアミノ酸（例えば、1つ～3つのアミノ酸または1～10のアミノ酸；例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸）を欠失させ、かつ、同時に、Fab鎖のN末端から複数のアミノ酸（例えば、1つ～3つのアミノ酸または1～10のアミノ酸；例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、または10のアミノ酸）を欠失させることが必要でありうる。融合部分Aと、融合部分Bと、Fab断片との間の接合部の長さおよび配列は、同じ場合もあり、異なる場合もある。

20

【0154】

融合部分とFab断片との間の接合部は、必要に応じて、欠失とリンカーとの組合せを用いる。したがって、当業者により理解される通り、Fabと融合部分との間の接合部は、当技術分野で公知であり、本明細書でも記載される方法を用いて、所望の機能性（例えば、結合アフィニティー）について調整し、調べることができる。

30

【0155】

リンカー

本開示のMSFPはまた、Fab断片のVHおよびVLと、融合部分AおよびBとの間に位置するリンカーも含む（例えば、図1を参照されたい）。そして、例示的なリンカーは、配列GlyArgAlaを含む。

【0156】

一実施形態では、融合部分とFabのVHまたはVLとの間のリンカーが、1～10アミノ酸の長さである。他の実施形態では、融合部分とFabのVHまたはVLとの間のリンカーが、1～20アミノ酸または20アミノ酸の長さである。この点において、リンカーは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20アミノ酸の長さでありうる。さらなる実施形態では、リンカーが、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30アミノ酸の長さでありうる。

40

【0157】

特定の実施形態では、本明細書で記載されるMSFPにおいて用いるのに適するリンカーが、可撓性リンカーである。適切なリンカーは、容易に選択することができ、4アミノ酸～10アミノ酸、5アミノ酸～9アミノ酸、6アミノ酸～8アミノ酸、または7アミノ酸～8アミノ酸を含めた1アミノ酸（例えば、Gly）～20アミノ酸、2アミノ酸～15アミノ酸、3アミノ酸～12アミノ酸など、適切な異なる長さのうちのいずれかである

50

ことが可能であり、1、2、3、4、5、6、または7アミノ酸でありうる。

【0158】

例示的な可撓性リンカーには、グリシンポリマー (G_n)、グリシン-セリンポリマー (例えば、 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (配列番号125)、および $(GGGS)_n$ (配列番号126) [配列中、 n は、少なくとも1つの整数である]を含めた)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、および当技術分野で公知の他の可撓性リンカーが含まれる。グリシンポリマーおよびグリシン-セリンポリマーは、比較的構造化されておらず、したがって、構成要素間の中性のテザーとして用いることが可能でありうる。グリシンは、アラニンよりもなおいっそう著明にファイブサイ空間に接近し、側鎖の長い残基より制約が小さい (Sch er a g a、Rev. C o m p u t a t i o n a l C h e m.、11173~142頁 (1992年)を参照されたい)。例示的な可撓性リンカーには、G l y - G l y - S e r - G l y (配列番号127)、G l y - G l y - S e r - G l y - G l y (配列番号128)、G l y - S e r - G l y - S e r - G l y (配列番号129)、G l y - S e r - G l y - G l y - G l y (配列番号130)、G l y - G l y - G l y - S e r - G l y (配列番号131)、G l y - S e r - S e r - S e r - G l y (配列番号132)などが含まれるがこれらに限定されない。当業者は、リンカーが、可撓性リンカーのほか、所望のMSFPの構造をもたらす可撓性の小さい構造を付与する1または複数の部分も包含しうるように、MSFPのデザインが、全面的に可撓性のリンカーを包含する場合もあり、部分的に可撓性のリンカーを包含する場合もあることを認識するであろう。

【0159】

特定の実施形態では、Fabと融合部分との間のリンカーが、安定的なリンカー (プロテアーゼ、とりわけ、MMPにより切断可能でない)である。特定の実施形態では、リンカーが、ペプチドリinkerである。特定の実施形態では、MSFPが、安定的なペプチドリinkerを含み、ペプチドリinkerのN末端が、融合部分のC末端へと共有結合的に連結され、ペプチドリinkerのC末端が抗原結合ドメインのN末端へと共有結合的に連結される。

【0160】

一実施形態では、リンカーが、切断可能なリンカーである。特に、FabのVHまたはVLと融合部分との間のリンカーは、プロテアーゼ基質の切断配列、例えば、MMP基質の切断配列を含む。基質内の周知のペプチド配列であるPLGLAG (配列番号133)は、大半のMMPにより切断されうる。MMPにより切断されうる基質配列は、広範に研究されている。例えば、配列PLGLAG (配列番号133)は、大半のMMPにより切断されうる。プロテアーゼ基質の切断配列とは、プロテアーゼ処理により切断されうるペプチド配列を指す。MMP基質配列とは、MMPとのインキュベーションにより切断されうるペプチド配列を指す。PLGLAG (配列番号133)は、一般に用いられるMMP基質の切断配列である (例えば、J i a n g、PNAS (2004年)、101巻: 17867~72頁; O l s o n、PNAS (2010年)、107巻: 4311~6頁を参照されたい)。別の実施形態では、プロテアーゼ切断部位が、MMP-2、MMP-9、またはこれらの組合せにより認識される。なお別の実施形態では、プロテアーゼ部位が、GPLGMLSQ (配列番号134)およびGPLGLWAQ (配列番号135)からなる群より選択される配列を含む。安定的なリンカーまたはプロテアーゼにより切断不可能なリンカーとは、公知のプロテアーゼ基質配列に属さず、したがって、プロテアーゼとインキュベートされても著明な切断産物形成をもたらさないリンカーペプチド配列を指す。

【0161】

一部の実施形態では、リンカーの切断基質 (または切断配列)に、プロテアーゼ、通常は細胞外プロテアーゼの基質として用いられうるアミノ酸配列が含まれうる。他の実施形態では、切断配列が、還元剤的作用により切断されうるジスルフィド結合を形成することが可能なシステイン-システイン対を含む。他の実施形態では、切断配列が、光分解されると切断される可能性がある基質を含む。

【0162】

切断基質は、切断基質が切断剤により切断される場合（例えば、リンカーの切断基質が、プロテアーゼにより切断される場合、および／またはシステイン-システイン間のジスルフィド結合が、還元剤への曝露による還元を介して破壊される場合）、または標的存在下で光誘導性光分解により切断される場合に、結果としてもたらされる切断産物が本明細書で記載される多様な機能的特性を有するように、リンカー内に位置する。

【0163】

リンカーの切断基質は、罹患組織内または融合部分の結合ドメインの対象の標的抗原を発現させる細胞の表面上で共局在化したプロテアーゼに基づき選択することができる。対象の標的がプロテアーゼと共局在化する多様な異なる状態が公知であるが、当技術分野では、この場合のプロテアーゼの基質も公知である。がんの例では、標的組織が、がん性の組織、特に、充実性腫瘍のがん性の組織である。多数のがん、例えば、充実性腫瘍における、公知の基質を有するプロテアーゼのレベルの増大については、文献において報告がなされている。例えば、La Roccaら、(2004年)、British J. of Cancer、90巻(7号):1414~1421頁を参照されたい。疾患の非限定的な例には、全ての種類のがん(乳がん、肺がん、結腸直腸がん、前立腺がん、頭頸部がん、膵臓がんなど)、関節リウマチ、クローン病、黒色腫、SLE、心血管損傷、虚血などが含まれる。さらに、VEGFなど抗血管新生性標的も公知である。腫瘍抗原に結合することが可能であるように、本開示のMSFPの融合部分の結合ドメインがそれ自体で選択される場合、リンカーに適する切断基質配列は、プロテアーゼにより切断可能なペプチド基質を含む配列であって、がん性の処置部位に存在し、特に、非がん性の組織と比較してがん処置部位において高レベルで存在する配列であろう。例示的な一実施形態では、MSFPの結合ドメインが、例えば、Her2に結合することが可能であり、切断基質配列は、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)基質である可能性があり、したがって、MMPにより切断可能である。他の実施形態では、MSFP内の融合部分の結合ドメインが、対象の標的に結合することが可能であり、リンカー内に存在する切断基質は、例えば、レグマイン、プラスミン、TMPRSS-3/4、MMP-9、MT1-MMP、カテプシン、カスパーゼ、ヒト好中球エラスターゼ、ベーターセクレターゼ、uPA、またはPSAでありうる。他の実施形態では、多発性硬化症または関節リウマチなど、がん以外の疾患における切断基質は、他の疾患特異的プロテアーゼにより切断される。

【0164】

非修飾リンカーまたは非切断リンカーは、Fab断片の、融合部分へのテザリングを可能としうる。リンカーが切断されると、本明細書の、例えば、図でさらに記載される通り、多様な機能を伴う複数の切断産物が結果としてもたらされる。

【0165】

MSFPのリンカー(例えば、FabのVHと第1の融合部分との間のリンカー、およびFabのVLと第2の融合部分との間のリンカー)は、同じ切断基質を含む場合もあり、異なる切断基質を含む場合もあり、例えば、第1のリンカーは、第1の切断基質を含むことが可能であり、第2のリンカーは、第2の切断基質を含むことが可能である。第1の切断基質と第2の切断基質とは、同じ酵素に対して異なる基質である(例えば、その同じ酵素に対して異なる結合アフィニティーを呈示する)場合もあり、異なる酵素に対する異なる基質の場合もあり、第1の切断基質が酵素基質であり、かつ、第2の切断基質が光分解基質である場合もあり、第1の切断基質が酵素基質であり、かつ第2の切断基質が還元基質であるなどの場合もある。

【0166】

酵素による特異的切断では、酵素と切断基質との間で接触がなされる。Fabを含むMSFPを、十分な酵素活性の存在下で、切断基質を有する第1のリンカーおよび第2のリンカーにより、第1の融合部分および第2の融合部分へとカップリングする場合、切断基質を切断することができる。十分な酵素活性は、切断基質を有するリンカーと接触させ、切断をもたらす酵素の能力を示しうる。酵素はMSFPの近傍に存在するが、他の細胞因

子または酵素のタンパク質修飾のため、切断することは不可能でありうるものが容易に想定されうる。

【0167】

例示的な基質には、以下の酵素またはプロテアーゼのうちの1または複数により切断可能な基質が含まれるがこれらに限定されない：ADAM10；カスパーゼ8、カテプシンS、MMP8、ADAM12、カスパーゼ9、FAP、MMP9、ADAM17、カスパーゼ10、グランザイムB、MMP-13、ADAMTS、カスパーゼ11、グアニジノベンゾアターゼ（GB）、MMP14、ADAMTS5、カスパーゼ12、ヘプシン、MT-SP1、BACE、カスパーゼ13、ヒト好中球エラスターゼ（HNE）、ネプリライシン、カスパーゼ、カスパーゼ14、レグマイン、NS3/4A、カスパーゼ1、カテプシン、マトリプターゼ2、プラスミン、カスパーゼ2、カテプシンA、メプリン、PSA、カスパーゼ3、カテプシンB、MMP1、PSMA、カスパーゼ4、カテプシンD、MMP2、TACE、カスパーゼ5、カテプシンE、MMP3、TMPRSS3/4、カスパーゼ6、カテプシンK、MMP7、uPA、カスパーゼ7、MT1-MMP。

10

【0168】

別の実施形態では、切断基質が、システイン対のジスルフィド結合であって、したがって、例えば、グルタチオン（GSH）、チオレドキシン、NADPH、フラビン、アスコルビン酸などの細胞性還元剤であり、充実性腫瘍組織またはこの周囲に大量に存在しうる細胞性還元剤などであるがこれらに限定されない還元剤により切断可能なジスルフィド結合を伴いうる。

20

【0169】

当技術分野では、本明細書の切断可能なリンカーにおいて用いるのに適する他のプロテアーゼ切断部位が公知であるか、またはTurkら、2001年、Nature Biotechnology、19巻、661～667頁により記載されている方法などの方法を用いて同定することができる。

【0170】

特定の実施形態では、リンカーが、ペプチドリinker、システイン残基などのチオール残基を含有するペプチドリinker、ポリマーリンカー、または化学リンカーでありうる。特定の実施形態では、MSFPが、リンカーの一方の末端が、融合部分のC末端へと共有結合的に連結され、リンカーの他方の末端が、Fab断片のVHまたはVLのN末端へと共有結合的に連結されたリンカーを含む。

30

【0171】

接合部のアミノ酸

特定の実施形態では、融合タンパク質の構築物デザインから結果として生じるアミノ酸残基（例えば、単鎖ポリペプチドをコードする核酸分子の構築時における制限酵素部位の使用から結果として生じるアミノ酸残基）など、結合ドメインとリンカーポリペプチドとの間など、MSFPの2つのドメインの間に1または少数のアミノ酸残基が存在しうる。本明細書で記載されるこのようなアミノ酸残基を、「接合部アミノ酸」もしくは「接合部アミノ酸残基」、または「ペプチドスペーサー」と称することができる。

【0172】

特定の例示的な実施形態では、ペプチドスペーサーが、1～5の間のアミノ酸、5～10の間のアミノ酸、5～25の間のアミノ酸、5～50の間のアミノ酸、10～25の間のアミノ酸、10～50の間のアミノ酸、10～100の間のアミノ酸、または任意の介在する範囲のアミノ酸である。他の例示的な実施形態では、ペプチドスペーサーが、約1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50以上の長さのアミノ酸を含む。

40

【0173】

このような接合部のアミノ酸は、MSFPのドメインのうちのいずれへも連結される。特定の実施形態では、接合部の（1または複数の）アミノ酸が、本明細書で規定されるヒンジまたはヒンジの一部である。特定の実施形態では、重鎖可変領域を軽鎖可変領域へと

50

接合するのに有用な可変領域連結配列を、ペプチドスペーサーとして用いることができる。

【0174】

例示的な一実施形態では、ペプチドスペーサー配列が、例えば、Gly残基、Asn残基、およびSer残基を含有する。また、ThrおよびAlaなど、他の中性に近いアミノ酸も、スペーサー配列内に組み入れることができる。

【0175】

スペーサーとして有用に使用しうる他のアミノ酸配列には、Marateaら、Gene, 40巻: 39~46頁(1985年); Murphyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83巻: 8258~8262頁(1986年); 米国特許第4,935,233号および米国特許第4,751,180号において開示されたアミノ酸配列が含まれる。

10

【0176】

他の例示的なスペーサーには、例えば、Glu-Gly-Lys-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Ser-Glu-Ser-Lys-Val-Asp(配列番号136)(Chaudharyら、1990年、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87巻: 1066~1070頁)およびLys-Glu-Ser-Gly-Ser-Val-Ser-Ser-Glu-Gln-Leu-Ala-Gln-Phe-Arg-Ser-Leu-Asp(配列番号137)(Birdら、1988年、Science, 242巻: 423~426頁)が含まれる。

20

【0177】

一部の実施形態では、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドが、不可欠でないN末端のアミノ酸領域であって、機能的ドメインを分離し、立体干渉を防止するのに用いる領域を有する場合は、スペーサー配列が要請されない。本開示のMSFPの2つのコード配列またはコードドメインは、接合部のアミノ酸を伴わずに直接的に融合させることもでき、例えば、1~3回にわたり反復される五量体であるGly-Gly-Gly-Gly-Ser(配列番号138)からなる可撓性のポリリンカーを用いることにより融合させることもできる。このようなスペーサーは、VHとVLとの間に挿入することにより単鎖抗体(scFv)を構築するのに用いられてきた(Birdら、1988年、Science, 242巻: 423~426頁; Hustonら、1988年、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 85巻: 5979~5883頁)。

30

【0178】

特定の実施形態では、ペプチドスペーサーが、単鎖抗体の可変領域を形成する2つのペーターシート間の正しい相互作用を可能とするようにデザインされる。

【0179】

任意の適切なリンカーを用いて、限定せずに述べると、ペプチドリinker、ポリマーリンカー、および化学的リンカーなどの間接的な連結をもたらすことができる。特定の実施形態では、共有結合的連結が、ペプチドリinkerを介する間接的な連結である。

【0180】

単一のMSFP内では、第1の融合部分と第2の融合部分とが二量体化しないことに注目されたい。これにより、本開示のMSFPが、WO2008/024188およびWO2009/149185において記載される融合タンパク質など、他の公知の融合タンパク質から識別される。これらの構築物は、VH1-VH2-CH1-ヒンジ-CH2-CH3およびVL1-VL2-CLの一般的なフォーマットを有することにより異なる。この構築物では、VH1とVL1とが二量体化して、さらなる抗原結合部位を形成する。本開示のMSFPでは、第1の融合部分と第2の融合部分とが会合して、単一の抗原結合部位を形成するわけではない。本明細書の別の個所で記載される本MSFPのさらなる識別特徴は、MSFPが集塊をなさない場合、融合部分により、Fabのその標的に対する結合アフィニティーが低減されることである。これに対し、WO2008/024188およびWO2009/149185において記載されるタンパク質は、抗体の結合標的に対

40

50

する結合アフィニティーの低減を呈示しない。

【0181】

例示的な本開示のMSFPは、配列番号84、90、96、および100から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ；ならびに配列番号32、60、64、68、および72から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む。さらに例示的な本開示のMSFPは、配列番号86、92、98、および102から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つ；ならびに配列番号30、36、40、44、48、および52から選択されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む。

【0182】

多重特異性Fab融合タンパク質の機能

本開示のMSFPは、薬物の安定性、特異性、選択性、効力、および安全性、ならびに薬物投与の簡便性を増強するように機能する。特定の実施形態では、融合部分をそのN末端へと融合させずに発現させた場合のFabが、可溶性の組換え形態（通常は受容体タンパク質、例えば、CD3など、T細胞受容体の構成要素の細胞外ドメイン）中のその標的抗原のほか、細胞表面上のその標的抗原に結合することが可能である。特定の実施形態では、融合部分をその重鎖および軽鎖両方のN末端へと融合させ、かつ、単量体形態で（非凝集形態で、または多量体形態ではなく）発現させた場合のFabの抗原結合断片が、融合部分の結合ドメインによる標的抗原への結合の非存在下における薬物の薬理学的濃度（処置される患者におけるポリペプチド濃度）で、細胞表面上に存在するその特異的抗原に結合しないか、またはこれに対する結合が低減されるか、またはこれに対してFab単独と同様のレベルの結合を示す。融合部分の結合ドメインによる標的抗原への結合の非存在下における細胞表面抗原への結合の欠如、または結合の大幅な低減は、抗原結合部位の周囲にデザインされた立体障害から結果として生じる、アフィニティーの劇的な低下により説明されうる。

【0183】

融合部分の結合ドメインによる標的抗原への結合の非存在下における、細胞表面抗原への結合の欠如またはこれへの結合の大幅な低減は、ヒト用治療剤としてのMSFPに所望されることができると考えることができる。MSFP単独の、例えば、T細胞への結合の欠如、またはこれへの結合の著明な低減（腫瘍標的細胞の非存在下における）が、1）望ましくない全身性のT細胞活性化を劇的に改善する、したがって、薬物の安全性プロファイルを劇的に改善し；2）皮下経路による薬物投与の実行可能性を劇的に改善し；3）血液循環中の高薬物濃度に対する薬物忍容性を劇的に増大させることに注目することは重要である。

【0184】

OKT3またはUCHT-1などの抗体による、立体配座エピトープを介するT細胞への結合が、部分的なシグナル伝達を行い、望まれないT細胞の活性化（サイトカインストームを引き起こす）またはT細胞アネルギー（結果として腫瘍細胞を死滅させることが不可能なT細胞をもたらす）をもたらすことに注目することは重要である。mu-1F3、hu-1F3、およびこれらの変異体がCD3の直鎖状エピトープへと結合することにより、CD3の架橋形成の非存在下でT細胞のシグナル伝達が誘導される可能性は低いと考えられる。この特性は、OKT3様の抗体およびUCHT-1様の抗体を用いるときに生じる全身性副作用を低減するのに有利でありうる。

【0185】

また、MSFP内の融合部分は、プロテアーゼにより切断されると、Fab抗原結合部位の周囲の立体障害が除去されるように、次いで、MSFPが、その（Fab）標的、特に、細胞表面において発現する標的抗原に高アフィニティーで結合しうるように機能し、したがって、リンカー内の切断基質配列における切断（これにより融合部分が放出される）の後、MSFPは、腫瘍細胞とT細胞との間のいっそう強力な架橋形成剤へと転換されることに注目することも重要である。

【0186】

さらに、融合部分の結合ドメインがその標的抗原に結合すると、MSFP分子は、腫瘍

10

20

30

40

50

細胞表面上で高度に濃縮され、T細胞上のF a b標的（例えば、C D 3）への高アフィニティーに基づく結合を創出することに注目することも重要である。したがって、融合部分の結合の存在下に限り、F a bの抗原結合断片は、その標的に結合することが可能であり、したがって、M S F Pが腫瘍細胞とT細胞との間の架橋形成剤として機能することが可能である。

【0187】

本開示のM S F Pの特性は、望まれない副作用を伴わずに、循環における比較的高用量のM S F Pを可能とする（例えば、循環中にあるとき、M S F Pは、F a b断片の標的抗原（例えば、C D 3）に結合しない）。これはまた、投与頻度の低減も可能とし、濃度勾配により駆動される拡散を介する組織への浸透も促進する。

10

【0188】

本開示のM S F Pの特性はまた、標的への接触を増強しうる皮下投与の可能性も可能とする。さらに、特定の実施形態では、M S F Pが、プロテアーゼ処理を伴わない架橋形成も許容するが、特定の具体的な実施形態では、プロテアーゼ処理の後、結合活性および腫瘍殺滅効力が劇的に増大する。

【0189】

一実施形態では、V HおよびV Lにより形成される抗原結合ドメイン（F v）が、C H 1とC Lとのヘテロ二量体化ドメインにより安定化され、C H 1とC Lとの間のジスルフィド結合または他の安定化相互作用（例えば、K I H（k n o b s / h o l e）相互作用）によりさらに安定化される。

20

【0190】

一実施形態では、M S F P内のF a bが、そのN末端における融合部分により、F a b標的抗原への結合（とりわけ、細胞表面の標的抗原に関する場合）が、統計学的に有意な様式で（すなわち、当業者に公知の適切な対照と比べて；例えば、そのN末端（V HおよびV Lの両方）において融合部分を伴わないフォーマットにおける同じF a bと比較して）低減されるように立体障害を受ける。さらなる実施形態では、M S F P内のF a bが、そのN末端における融合部分により立体障害を受け、そのため、所望の抗原への結合（とりわけ、細胞表面の標的抗原に関する場合）が、そのN末端（V HおよびV Lの両方）において融合部分を伴わないフォーマットにおける同じF a bと比較して少なくとも2分の1、3分の1、4分の1、5分の1、6分の1、7分の1、8分の1、9分の1、10分の1、11分の1、12分の1、13分の1、14分の1、15分の1、20分の1、30分の1、または100分の1、または1000分の1、または10、000分の1に低減される。

30

【0191】

特定の実施形態では、融合タンパク質フォーマット内のF a bの抗原結合ドメインの、F a bの細胞表面の標的抗原に対するアフィニティーが、500 nM未満である。さらなる実施形態では、融合タンパク質フォーマット（すなわち、M S F P）内のF a bの抗原結合ドメインのアフィニティーが、ヒトにおいて用いられる治療剤の濃度範囲においてF A C Sまたは他の結合の測定方法（例えば、細胞結合E L I S A）を用いて測定される、著明な検出可能な結合を顕示しない。一実施形態では、治療用濃度におけるF a b融合タンパク質が結合するF a bの標的細胞集団（例えば、C D 3 + 細胞）は、1%未満であろう（すなわち、融合部分の結合ドメインの標的抗原を発現させる細胞の非存在下で）。一実施形態では、治療用濃度におけるM S F Pが結合するF a bの標的細胞集団が、5%未満であろう。なお別の実施形態では、治療用濃度におけるM S F Pが結合するF a bの標的細胞集団が、10%未満であろう。

40

【0192】

腫瘍組織内に存在するプロテアーゼ、とりわけ、M M Pのレベルが上昇すると、リンカーのM M P基質の切断部位において切断産物が発生するであろう。リンカーのプロテアーゼの基質配列の切断は、F a bの抗原結合領域における立体障害の減殺を結果としてもたため、F a bの細胞表面標的への結合が完全に回復されるか、または少なくとも部分

50

的に回復される。回復された結合は、FACS法、細胞ベースのELISA法、または当業者に公知の他の細胞結合法を用いて裏付けることができる。

【0193】

「アフィニティーの劇的な低減」という用語は、Fabの抗原結合ドメインの結合の、FabのVHおよびVLのN末端が融合部分を含まない場合の結合と比較した少なくとも30%の低減を指す。限定せずに述べると、低減百分率は、例えば、30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、または約99%以上でありうる。当業者には、結合を検出するための方法が公知であり、FACS、細胞結合ELISA、または放射性同位元素で標識した抗体を用いる細胞結合を用いて実施することができる。

【0194】

本明細書で記載される本開示のMSFPにおける使用のための例示的なFabは、抗CD3 Fabである。この点において、MSFPは、融合部分の結合ドメインが腫瘍細胞抗原に結合すると、Fabが、通過するT細胞のCD3に結合することが可能となり、これにより、T細胞の方向付けを変え、それらを活性化して、腫瘍細胞を死滅させるように機能する。別の実施形態では、MSFP（本明細書ではまた、Fab断片がCD3などの免疫エフェクター分子に結合する場合に、Fabeとしても言及される）が、融合部分の（1または複数の）結合ドメインによる腫瘍抗原への結合を介して腫瘍細胞表面において集塊をなすと、アビディティー効果を呈示しうる。立体障害を受けたFabによる免疫細胞への見かけ上の結合自体も、アビディティーに起因して増大しうる。Fabe/MSFPはそれ自体、免疫細胞と腫瘍細胞とを架橋形成することが可能となり、これにより、抗腫瘍抗体の活性を媒介することが可能となる。

【0195】

特定の実施形態では、Fabのその標的抗原への結合または融合部分の結合剤のその標的抗原への結合が別個であれば、標的の活性化がもたらされない。しかし、結合が同時であれば、Fabの抗原標的および融合部分の結合ドメインの抗原標的は、シグナル伝達を発生させうる。例えば、MSFPは、例えば、CD3であるFabの抗原標的、および腫瘍表面抗原である融合部分の結合ドメインの抗原標的に結合しうる。MSFPが、CD3または腫瘍表面抗原へと別個に結合してもT細胞は活性化されないが、CD3と腫瘍表面抗原とがMSFPへと同時に結合する場合、および結合した複合体の複数のコピーが腫瘍細胞表面においてアンカリングされて集塊をなす場合、T細胞は、腫瘍表面抗原を保有するがん細胞の近傍で活性化し、したがって、T細胞の腫瘍殺滅効率を局所的に著明に増強し、サイトカインストームに起因する副作用を回避する。

【0196】

特定の実施形態では、Fabの抗原標的と融合部分の結合ドメインの抗原標的との組合せが、CD3および腫瘍表面抗原である可能性があり、この組合せが、T細胞による腫瘍殺滅効果を増強する。特定の実施形態では、Fabの抗原標的と融合部分の抗原標的との組合せが、FcγRおよび腫瘍表面抗原である可能性があり、この組合せが、FcγRを発現させる免疫細胞を誘導して、腫瘍細胞を死滅させる。特定の実施形態では、Fabの抗原標的と融合部分の抗原標的との組合せが、NKGD2および腫瘍細胞の表面抗原である可能性があり、この組合せが、ナチュラルキラー（NK）細胞を誘導して、腫瘍細胞を死滅させる。

【0197】

特定の実施形態では、第1の融合部分および第2の融合部分が、第1の標的抗原および第2の標的抗原に結合する結合ドメインを含む。このようにして、MSFPは、3つの異なる標的抗原（すなわち、Fab標的に加えた2つの異なる融合部分の標的）に結合する。したがって、特定の実施形態では、Fabの抗原標的が、CD3、TCR、FcγR、およびNKGD2からなる群より選択され、第1の融合部分および第2の融合部分の第1の結合ドメインおよび第2の結合ドメインが、がん細胞上で優先的に発現する2つの異なる抗原である。このような3つの異なる標的抗原を有するMSFPは、腫瘍細胞に対するターゲティングの特異性を増強し、融合部分の結合ドメインの標的抗原のうちの一方を発

現させる場合もあり、融合部分の結合ドメインの標的抗原の両方を低レベルで発現させる場合もある、正常細胞の殺滅を防止しうる。

【0198】

したがって、例示的な実施形態では、本開示のMSFPが、CD3ポリペプチドなど、TCRまたはこれらの構成要素に結合するFabの抗原結合断片を含む。上記で言及した通り、本開示のMSFPは、融合部分の結合ドメインが、それらの標的抗原に係合する場合、またはリンカーの切断イベントの後を除き、Fab標的抗原に結合しない。

【0199】

したがって、特定の実施形態では、融合部分の結合ドメインの標的抗原への係合の非存在下では、本開示のMSFPが、T細胞を活性化しないか、またはT細胞を活性化することが最小限である。MSFPは、それが、活性化T細胞の百分率の、少なくとも1つのin vitroアッセイまたはin vivoにおいてアッセイにおいて測定される、融合部分の結合ドメインの標的抗原（例えば、適切な腫瘍細胞／細胞系）を発現させる細胞の存在下におけるT細胞の活性化と比較して、統計学的に有意な増大を引き起こさない場合、「T細胞を活性化しないか、またはT細胞を活性化することが最小限もしくは名目的である」。当技術分野では、このようなアッセイが公知であり、限定せずに述べると、増殖アッセイ、CTLクロム放出アッセイ（例えば、Lavieら、（2000年）、International Immunology、12巻（4号）：479～486頁を参照されたい）、ELISPOTアッセイ、細胞内サイトカイン染色アッセイ、および、例えば、「Current Protocols in Immunology」、John Wiley & Sons、New York、N. Y.（2009年）において記載される他のアッセイが含まれる。特定の実施形態では、T細胞の活性化が、in vitroにおけるプライミングによるT細胞活性化アッセイを用いて測定される。また、本明細書の例で記載されるアッセイも参照されたい。

【0200】

したがって、関連する態様では、本開示は、TCR複合体またはこれらの構成要素に特異的に結合するFabを含むMSFPにより誘導されるT細胞の活性化を検出するための方法であって、（a）抗原またはマイトジェンでプライミングされたT細胞を供給するステップと、（b）ステップ（a）のプライミングされたT細胞を、TCR複合体またはこれらの構成要素に特異的に結合するFabを含むMSFPで処置するステップと、（c）プライミングされたT細胞であって、ステップ（b）で処置されたT細胞の活性化を検出するステップとを含む方法を提供する。

【0201】

本明細書で用いられる「マイトジェン」という用語は、特異性またはクローンの由来が異なるリンパ球において有糸分裂を誘導する化学物質を指す。T細胞をプライミングするのに用いる例示的なマイトジェンには、フィトヘマグルチニン（PHA）、コンカナバリンA（ConA）、リポ多糖（LPS）、ブタクサマイトジェン（PWM）、およびホルボールミリステート酢酸塩（PMA）が含まれる。また、抗原をロードしたビーズまたはPBMCも、T細胞をプライミングするのに用いることができる。

【0202】

本明細書で提示される、T細胞の活性化を検出するための方法の特定の実施形態では、TCR複合体またはこれらの構成要素に特異的に結合するFabを含むMSFPが、腫瘍抗原に結合する1または複数の結合ドメインを含む1または複数の融合部分を含む。

【0203】

T細胞の活性化は、CD25、CD40リガンド、およびCD69など、当技術分野で公知の活性化マーカーの発現を測定することにより検出することができる。活性化T細胞はまた、CFSE標識化アッセイおよびチミジン取込みアッセイなどの細胞増殖アッセイ（Adams（1969年）、Exp. Cell Res.、56巻：55頁）によっても検出することができる。T細胞のエフェクター機能（例えば、細胞殺滅効果または細胞殺滅機能）は、例えば、クロム放出アッセイまたは蛍光色素（例えば、TP3）を用い

るFACSベースのアッセイにより測定することができる。関連する態様では、T細胞の活性化および細胞溶解活性を、T細胞と腫瘍細胞との間の溶解シナプス形成により測定することができる。グランザイムおよびパーフォリン (p o r f o r i n) などのエフェクター分子は、細胞溶解シナプスにおいて検出することができる。

【0204】

別の関連する態様では、T細胞の活性化を、サイトカインの放出により測定することができる。TCR複合体またはこれらの構成要素に特異的に結合するFabを含むMSFPにより誘導されるサイトカインの放出を検出するための方法は、(a) プライミングされたT細胞を供給するステップと、(b) ステップ(a)のプライミングされたT細胞を、TCR複合体またはこれらの構成要素に特異的に結合するFabを含むMSFPで処置するステップと、(c) プライミングされたT細胞であって、ステップ(b)で処置されたT細胞からのサイトカインの放出を検出するステップとを含む。具体的な実施形態では、MSFPの第1の融合部分および／または第2の融合部分において存在する結合ドメインが結合する標的の腫瘍抗原を発現させる、適切ながん細胞または細胞系の存在下または非存在下で実験を実行する。

【0205】

本明細書で提示されるサイトカインの放出を検出するための方法の特定の実施形態では、TCR複合体またはこれらの構成要素に特異的に結合するFabを含むMSFPが、腫瘍標的抗原に結合する結合ドメインを含む融合部分をさらに含むMSFPである。

【0206】

さらなる好ましい実施形態では、本開示のMSFPが、サイトカインストームを誘導しないか、または毒性の副作用を誘導するのに十分なサイトカインの放出を誘導しない。MSFPは、それが、第2の標的細胞（例えば、融合部分の結合ドメインが結合する抗原を発現させる腫瘍細胞）または適切なリンカー切断剤（プロテアーゼなど）の非存在下では、IFN γ を含めた少なくとも1つのサイトカインの量の統計学的に有意な増大を引き起こさないならば、「サイトカインストームを誘導しない」（また、「検出不可能な、名目的な、または最小限のサイトカインの放出の誘導」または「検出可能なサイトカインの放出を誘導しないか、または検出可能なサイトカインの放出の誘導が最小限である」とも称する）。当技術分野で公知であるか、または本明細書で提示される少なくとも1つのin vitroアッセイまたはin vivoアッセイにおいて、適切な第2の標的細胞またはリンカー切断剤の存在下で処置される細胞から放出される量と比較して、第2の標的細胞（例えば、適切ながん細胞系）または適切なリンカー切断剤の非存在下で処置される細胞から放出される、特定の実施形態では、IFN γ およびTNF α またはIL-6およびTNF α を含めた少なくとも2つのサイトカインの量；一実施形態では、IL-6、IFN γ 、およびTNF α を含めた3つのサイトカインの量；別の実施形態では、IL-2、IL-6、IFN γ 、およびTNF α を含めた4つのサイトカインの量；ならびになおさらなる実施形態では、IL-2、IL-6、IL-10、IFN γ 、およびTNF α を含めた少なくとも5つのサイトカインの量の統計学的に有意な増大を引き起こさない場合も、MSFPは「サイトカインストームを誘導しない」。臨床的に、サイトカイン放出症候群は、発熱、悪寒、発疹、悪心の特徴とし、場合によって、IFN γ のほか、IL-2、IL-6、およびTNF α など、特定のサイトカインの最大限の放出と並行する呼吸困難および頻脈の特徴とする。in vitroにおいてアッセイまたはin vivoにおいて放出について調べるサイトカインには、G-CSF、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17、IP-10、KC、MCP1、IFN γ 、およびTNF α が含まれ、別の実施形態では、IL-2、IL-6、IL-10、IFN γ 、およびTNF α が含まれる。

【0207】

さらなる実施形態では、本開示のMSFPが、T細胞などの細胞内でカルシウムフラックスの増大を引き起こす。MSFPは、適切な第2の標的細胞（例えば、がん細胞）またはリンカー切断剤の存在下でT細胞を活性化するように用いられるとき、当技術分野で公

10

20

30

40

50

知であるか、または本明細書で提示される *in vitro* アッセイにおいて測定される、処置された細胞の、適切な第2の標的細胞またはリンカー切断剤の非存在下で処置された細胞と比較した、統計学的に有意に急速な（処置の好ましくは300秒以内、より好ましくは200秒以内であり、最も好ましくは100秒以内における）カルシウムフラックスの増大を引き起こすならば、「カルシウムの増大」を引き起こす。

【0208】

さらなる実施形態では、本開示のMSFPが、TCRによるシグナル伝達経路内の分子のリン酸化を誘導する。「TCRによるシグナル伝達経路」とは、ペプチド：MHCリガンドのTCRおよびその共受容体（CD4またはCD8）への結合を介して誘発されるシグナル伝達経路を指す。「TCRによるシグナル伝達経路内の分子」とは、そのリン酸化状態（例えば、その分子がリン酸化されているかどうか）、別の分子に対するその結合アフィニティー、またはその酵素活性が、ペプチド：MHCリガンドの、TCRおよびその共受容体への結合に由来するシグナルに応答して変化した分子など、TCRによるシグナル伝達経路に直接的に関与する分子を指す。例示的なTCRによるシグナル伝達経路内の分子には、TCR複合体またはその構成要素（例えば、CD3ζ鎖）、ZAP-70、Fyn、Lck、ホスホリパーゼc-γ、タンパク質キナーゼC、転写因子NFκB、ホスファターゼ（phosphatase）であるカルシニューリン、転写因子NFAT、グアニンヌクレオチド交換因子（GEF）、Ras、MAPキナーゼキナーゼキナーゼ（MAPKKK）、MAPキナーゼキナーゼ（MAPKK）、MAPキナーゼ（ERK1/2）、およびFosが含まれる。

【0209】

本開示のMSFPは、それが、当技術分野で公知の *in vitro* アッセイまたは *in vivo* アッセイまたは受容体シグナル伝達アッセイにおいて、適切な第2の標的抗原もしくはこのような抗原を発現させる細胞（例えば、融合部分の結合ドメインが結合する腫瘍抗原を発現させるがん細胞）またはリンカー切断剤の存在下に限り、統計学的に有意な、TCRによるシグナル伝達経路内の分子（例えば、CD3ζ鎖、ZAP-70、およびERK1/2）のリン酸化の増大を引き起こすならば、「TCRによるシグナル伝達経路内の分子のリン酸化を誘導する」。当技術分野で公知の受容体シグナル伝達アッセイの大半からの結果は、ウェスタンブロットまたは蛍光顕微鏡などの免疫組織化学法を用いて決定される。

【0210】

同様に、本開示のMSFPは、T細胞による、融合部分の結合ドメインの標的抗原を発現させる腫瘍細胞など、第2の標的細胞の殺滅も誘導する。このような細胞殺滅は、クロム放出アッセイを含めた当技術分野で公知の多様なアッセイを用いて測定することができる。

【0211】

本開示のMSFPの特異性および機能は、MSFPを適切な被験試料と接触させ、特定の実施形態では、MSFPを、リンカー内の切断認識部位に特異的であると考えられる適切なプロテアーゼで処理し、これを切断産物についてアッセイすることにより調べることができる。プロテアーゼは、例えば、がん細胞から単離することもでき、組換えにより、例えば、Darketら（J. Biol. Chem.、254巻：2307～2312頁（1988年））における手順に従い調製することもできる。切断産物は、例えば、サイズ、抗原性、または活性に基づき同定することができる。MSFPの毒性は、MSFPおよびその切断産物を、*in vitro* における細胞傷害作用アッセイ、増殖アッセイ、結合アッセイ、または当業者に公知の他の適切なアッセイにかけることにより精査することができる。切断産物の毒性は、リボソーム不活化アッセイを用いて決定することができる（Westbyら、Bioconjugate Chem.、3巻：377～382頁（1992年））。切断産物のタンパク質の合成に対する効果は、*in vitro* における翻訳についての標準化アッセイであって、例えば、リボソームおよびmRNA鋳型およびアミノ酸など、多様で不可欠な共因子の供給源としての網状赤血球溶解物による

調製物からなる、規定が部分的な無細胞系を使用するアッセイにおいて測定することができる。混合物中で放射性標識されたアミノ酸を用いることにより、遊離アミノ酸前駆体のトリクロロ酢酸沈殿性タンパク質への組込みの定量化が可能となる。ウサギ網状赤血球の溶解物を用いると簡便である（O' H a r e、F E B S L e t t.、273巻：200～204頁（1990年））。

【0212】

本発明のMSFPががん細胞を破壊する能力、および／またはT細胞を活性化する能力は、がん細胞系、T細胞系、または単離PBMCもしくは単離T細胞を用いて、*in vitro*において容易に調べることができる。本開示のMSFPの効果は、例えば、がん細胞の選択的溶解を裏付けることにより決定することができる。加えて、プロテアーゼの特異性は、単独でまたはプロテアーゼ特異的阻害剤の存在下で本開示のMSFPを用いて細胞増殖の阻害を比較することにより調べることができる。このようなプロテアーゼ阻害剤には、MMP-2/MMP-9阻害剤であるGM1489、GM6001、およびGI-1～GI-IVが含まれる。

【0213】

毒性はまた、細胞生存率に基づいても測定することができ、例えば、MSFPへと曝露された正常な細胞培養物の生存率とがん性の細胞培養物の生存率とを比較することができる。細胞生存率は、トリパングルー排除アッセイなど、公知の技法により評価することができる。毒性はまた、細胞の溶解に基づいても測定することができ、例えば、MSFPへと曝露された正常な細胞培養物の溶解とがん性の細胞培養物の溶解とを比較することができる。細胞溶解は、クロム（Cr）放出アッセイまたは死滅細胞指示色素（ヨウ化プロピジウム、TO-PRO-3ヨウ化物）など、公知の技法により評価することができる。

【0214】

ポリペプチド

本開示は、MSFPポリペプチドおよびそれらの断片を提供する。配列番号23～102および109～150では、例示的なポリペプチド、およびそれらをコードするポリヌクレオチドが提示される。「ポリペプチド」、「タンパク質」、および「ペプチド」、ならびに「糖タンパク質」という用語は互換的に用いられ、いかなる特定の長さにも限定されないアミノ酸のポリマーを意味する。これらの用語は、ミリスチル化、硫酸化、グリコシル化、リン酸化、およびシグナル配列の付加または欠失などの修飾を除外しない。「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、1または複数のアミノ酸鎖であって、各鎖が、ペプチド結合により共有結合的に連結されたアミノ酸を含み、前記ポリペプチドまたはタンパク質が、ペプチド結合により非共有結合的および／または共有結合的に併せて連結された複数の鎖であり、天然タンパク質、すなわち、自然発生細胞、および、とりわけ、非組換え細胞により産生されたタンパク質、または遺伝子操作された細胞もしくは組換え細胞により産生されたタンパク質の配列を有する複数の鎖を含むことが可能であり、天然タンパク質のアミノ酸配列を有する分子、あるいは天然配列からの1もしくは複数のアミノ酸の欠失、天然配列への1もしくは複数のアミノ酸の付加、および／または天然配列の1もしくは複数のアミノ酸に対する置換を有する分子を含むアミノ酸鎖を意味する。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語はとりわけ、本開示のMSFPおよびその二量体、あるいは本明細書で開示されるMSFPからの1もしくは複数のアミノ酸の欠失、本明細書で開示されるMSFPへの1もしくは複数のアミノ酸の付加、および／または本明細書で開示されるMSFPの1もしくは複数のアミノ酸に対する置換を有する配列を包摂する。したがって、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、1つのアミノ酸鎖（「単量体」と称する）または複数のアミノ酸鎖（「多量体」と称する）を含むうる。

【0215】

本明細書で言及される「単離タンパク質」という用語は、対象タンパク質が、（1）天然では共に見出されることが典型的な他の少なくとも一部のタンパク質を含まないか、（2）同じ供給源に由来する、例えば、同じ種に由来する他のタンパク質を本質的に含まな

いか、(3)異なる種に由来する細胞を介して発現するか、(4)天然では会合しているポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、もしくは他の物質のうちの少なくとも約50パーセントから分離されているか、(5)天然では「単離タンパク質」が会合しているタンパク質の部分と会合(共有結合的相互作用または非共有結合的相互作用により)していないか、(6)天然では会合していないポリペプチドと作動可能に会合(共有結合的相互作用または非共有結合的相互作用により)しているか、または(7)天然では発生しないことを意味する。このような単離タンパク質は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、もしくは、おそらくは合成由来の、他のRNA、またはこれらの任意の組合せによりコードされる。特定の実施形態では、単離タンパク質が、その天然の環境において見出されるタンパク質もしくはポリペプチドまたは他の夾雑物であって、その使用(治療的、診断的、予防的、研究的、または他の形の)に干渉するタンパク質もしくはポリペプチドまたは他の夾雑物を実質的に含まない。

10

【0216】

「ポリペプチド断片」という用語は、単量体の場合もあり、多量体の場合もあるポリペプチドであって、自然発生のポリペプチドまたは組換えにより作製したポリペプチドのアミノ末端の欠失、カルボキシル末端の欠失、および／または内部の欠失もしくは置換を有するポリペプチドを指す。特定の実施形態では、ポリペプチド断片が、少なくとも5〜約500アミノ酸の長さのアミノ酸鎖を含みうる。特定の実施形態では、断片が、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、150、200、250、300、350、400、または450アミノ酸の長さであることが察知されるであろう。特に有用なポリペプチド断片は、抗体の抗原結合ドメインまたは抗原結合断片を含めた機能的ドメインを包含する。抗CD3抗体または他の抗体の場合、有用な断片には、CDR領域、とりわけ、重鎖または軽鎖のCDR3領域、重鎖または軽鎖の可変領域、抗体鎖の部分または2つのCDRを含めたそのちょうど可変領域などが含まれるがこれらに限定されない。

20

【0217】

ポリペプチドは、タンパク質のN末端側の終端部において、シグナル(またはリーダー)配列を含み、これは、翻訳と同時のタンパク質の転移、または翻訳後におけるタンパク質の転移を方向付ける。ポリペプチドはまた、インフレームで融合させることもでき、リンカーまたはポリペプチドの合成、精製、もしくは同定を容易にするための他の配列(例えば、ポリHis)、またはポリペプチドの固体支持体への結合を増強するための他の配列へとコンジュゲートすることもできる。

30

【0218】

本明細書で記載されるMSFPのアミノ酸配列の(1または複数の)修飾が想定される。例えば、MSFPの結合アフィニティーおよび／または他の生物学的特性を改善することが所望でありうる。例えば、MSFまたはその結合ドメインもしくはFabのアミノ酸配列の変異体は、適切なヌクレオチド変化を、MSFPまたはそのドメインをコードするポリヌクレオチドへと導入することにより調製することもでき、ペプチド合成により調製することもできる。このような修飾には、例えば、MSFPのアミノ酸配列内からの残基の欠失、および／またはMSFPのアミノ酸配列内への残基の挿入および／またはMSFPのアミノ酸配列内の残基の置換が含まれる。最終的な構築物が、結合ドメインまたはFabによる対象の標的抗原への特異的結合など、所望の特徴を保有する条件で、欠失、挿入、および置換の任意の組合せを施して、最終的なMSFPに到達することができる。アミノ酸変化また、グリコシル化部位の数または位置の変化など、MSFPの翻訳後プロセスも改変しうる。本発明のポリペプチドのための上記の変異および修飾のうちのいずれも、本発明の抗体に組み入れることができる。

40

【0219】

50

本開示は、本明細書で開示されるM S F Pの変異体を提供する。特定の実施形態では、このような変異体のM S F Pが、変異体の結合ドメイン、またはそのF a b断片、または抗原結合断片、またはそれらのC D Rを含み、本明細書でとりわけ示される任意のこのような配列を含めた所与の基準配列または野生型配列の少なくとも約50%、少なくとも約70%の強さで対象の標的に結合し、特定の実施形態では、少なくとも約90%の強さで結合する。さらなる実施形態では、このような変異体が、標的抗原に、本明細書で示される基準配列または野生型配列より大きなアフィニティーで結合する、例えば、これらの変異体は、例えば、とりわけ、本明細書で示される基準配列の、定量的に少なくとも約105%、106%、107%、108%、109%、または110%の強さで結合する。

【0220】

特定の実施形態では、本開示は、本明細書で開示されるM S F Pの変異体であって、V HとV Lとの間のジスルフィド結合に関して修飾されたF a bを含む変異体を提供する。当業者により認識される通り、特定の実施形態では、本発明のM S F Pにおいて用いられるF a b断片が、ジスルフィド結合を含まない場合もある。この点において、重鎖および軽鎖を、ジスルフィド結合に対する必要を伴わずに安定的に相互作用するような様式で操作することができる。例えば、特定の実施形態では、重鎖または軽鎖を操作して、システイン残基を除去することができ、この場合、重鎖および軽鎖は、F a bとしてやはり安定的に相互作用および機能する。一実施形態では、重鎖と軽鎖との間の安定的な相互作用を容易とするように変異を施す。例えば、「K I H」操作戦略を用いて、F a bの重鎖と軽鎖との間の二量体化を容易とすることができる（例えば、1996年、Protein Engineering、9巻：617～621頁を参照されたい）。したがってまた、本明細書における使用のために、例えば、ジスルフィド結合の除去、精製のためのタグの付加など、特定の目的のためにデザインされた変異体のF a b断片も想定される。

【0221】

具体的な実施形態では、対象のM S F Pが、本明細書で記載されるM S F Pと少なくとも80%同一な、少なくとも95%同一な、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも98%、または99%同一なアミノ酸配列を有しうる。

【0222】

代表的なポリペプチドの三次元構造の決定は、選択された天然または非天然のアミノ酸による1または複数のアミノ酸の置換、付加、欠失、または挿入を、このようにして誘導される構造的変異体の本明細書で開示される分子種の空間充填特性を保持するかどうかを決定する目的で事実上モデル化しうるように、日常的な方法を介して行うことができる。例えば、Donateら、1994年、Prot. Sci.、3巻：2378頁；Bradleyら、Science、309巻：1868～1871頁（2005年）；Schueler-Furmanら、Science、310巻：638頁（2005年）；Dietzら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、103巻：1244頁（2006年）；Dodsonら、Nature、450巻：176頁（2007年）；Qianら、Nature、450巻：259頁（2007年）；Ramanら、Science、327巻：1014～1018頁（2010年）を参照されたい。これらの実施形態および関連する実施形態のために用いるコンピュータアルゴリズムの一部のさらなる非限定的な例には、3D画像およびビルトインスクリプト記述を用いて生体高分子系を表示、動画表示、および解析するための分子画像化プログラムであるVMD (ks.uiuc.edu/study/vmd/におけるTheoretical and Computational Biophysics Group、University of Illinois at Urbana-Champaignのウェブサイトを参照されたい)が含まれる。当技術分野では、他の多くのコンピュータプログラムが公知であり、当業者に利用可能であり、エネルギーを最小化した立体配座の空間充填モデル（ファンデルワールス半径）から原子の大きさを決定することを可能とする：異なる化学基に対するアフィニティーが高い領域であって、これにより、結合を増強された領域を決定しようとするGRID；アライメントを数学的に計算するモンテカルロ探索；ならび

に力の場の計算および解析を評価するCHARMM (Brooksら(1983年)、J. Comput. Chem.、4巻:187~217頁)およびAMBER (Weinerら(1981年)、J. Comput. Chem.、106巻:765頁)(また、Eisenfieldら(1991年)、Am. J. Physiol. 261巻:C376~386頁;Lybrand(1991年)、J. Pharm. Belg.、46巻:49~54頁;Froimowitz(1990年)、Biotechniques、8巻:640~644頁;Burbamら(1990年)、Proteins、7巻:99~111頁;Pedersen(1985年)、Environ. Health Perspect.、61巻:185~190頁;およびKiniiら(1991年)、J. Biomol. Struct. Dyn.、9巻:475~488頁も参照されたい)。また、Schroedinger (Munich、Germany)製のプログラムなど、多様で適切な計算用コンピュータプログラムも市販されている。

10

【0223】

多重特異性Fab融合タンパク質／ベクター／宿主細胞をコードするポリヌクレオチドおよび多重特異性Fab融合タンパク質を作製する方法

特定の実施形態では、本開示は、本明細書で記載されるポリペプチドによるMSFPをコードする単離核酸をさらにもたらし。例示的なポリヌクレオチド、ならびにこれによりコードされるポリペプチドおよびそれらの断片を、配列番号23~102および109~150に提示する。核酸は、DNAおよびRNAを包含する。これらの実施形態および関連する実施形態は、本明細書で記載されるMSFPをコードするポリヌクレオチドを包含しう。本明細書で用いられる「単離ポリヌクレオチド」という用語は、ゲノム由来、cDNA由来、もしくは合成由来、またはこれらの一部の組合せであるポリヌクレオチドであって、その由来により、(1)その単離ポリヌクレオチドが天然において見出されるポリヌクレオチドの全部もしくは一部と会合していないか、(2)天然ではそれが連結されないポリヌクレオチドに連結されているか、または(3)天然でより長大な配列の一部としては生じないポリヌクレオチドを意味するものとする。

20

【0224】

「作動可能に連結された」という用語は、この用語が適用される構成要素が、適切な条件下でそれらがそれらの固有の機能を果たすことを可能とする関係にあることを意味する。例えば、タンパク質コード配列に「作動可能に連結された」転写制御配列は、タンパク質コード配列の発現を、制御配列の転写活性と適合可能な条件下で達成するように、タンパク質コード配列にライゲーションされる。

30

【0225】

本明細書で用いられる「制御配列」という用語は、それらがライゲーションされるかまたは作動可能に連結されるコード配列の発現、プロセッシング、または細胞内局在化に影響を及ぼしうるポリヌクレオチド配列を指す。このような制御配列の性質は、宿主生物に依存しう。具体的な実施形態では、原核生物の転写制御配列が、プロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を包含しう。他の具体的な実施形態では、真核生物の転写制御配列が、転写因子、転写エンハンサー配列、転写終結配列、およびポリアデニル化配列の1または複数の認識部位を含むプロモーターを包含しう。特定の実施形態では、「制御配列」が、リーダー配列および／または融合パートナー配列を包含しう。

40

【0226】

本明細書で言及される「ポリヌクレオチド」という用語は、一本鎖または二本鎖の核酸ポリマーを意味する。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチドの場合もあり、デオキシリボヌクレオチドの場合もあり、ヌクレオチドのいずれかの種類の修飾形態の場合もある。前記修飾には、プロモウリジン修飾などの塩基修飾、アラビノシド修飾および2', 3'-ジデオキシリボース修飾などのリボース修飾、ならびにホスホロチオエート修飾、ホスホロジチオエート修飾、ホスホロセレノエート修飾、ホスホロセレノエート修飾、ホスホロアニロチオエート修飾、ホスホルアニラデート修飾、およびホスホルアミデート(phosphoramidate)修飾などの

50

ヌクレオチド間連結修飾が含まれる。「ポリヌクレオチド」という用語は、とりわけ、DNAの一本鎖形態および二本鎖形態を包含する。

【0227】

「自然発生のヌクレオチド」という用語は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを包含する。「修飾ヌクレオチド」という用語は、糖基などが修飾または置換されたヌクレオチドを包含する。「オリゴヌクレオチド連結」という用語は、ホスホロチオエート連結、ホスホロジチオエート連結、ホスホロセレノエート連結、ホスホロジセレノエート連結、ホスホロアニロチオエート連結、ホスホルアニラデート連結、ホスホルアミデート連結などのオリゴヌクレオチド連結を包含する。例えば、それらの開示が任意の目的で参照により本明細書に組み込まれる、LaPlancherら、1986年、Nucleic Acids Res.、14巻：9081頁；Steckら、1984年、J. Am. Chem. Soc.、106巻：6077頁；Steinら、1988年、Nucleic Acids Res.、16巻：3209頁；Zonら、1991年、Anti-Cancer Drug Design、6巻：539頁；Zonら、1991年、「OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH」、87～108頁（F. Eckstein編）、Oxford University Press、Oxford England；Steckら、米国特許第5,151,510号；UhlmannおよびPeyman、1990年、Chemical Reviews、90巻：543頁を参照されたい。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドまたはそのハイブリダイゼーションの検出を可能とする検出可能な標識を包含する。

【0228】

他の関連する実施形態では、ポリヌクレオチド変異体が、本明細書で記載されるMSFPまたはそのドメインをコードするポリヌクレオチド配列との実質的な同一性を有する。例えば、ポリヌクレオチドは、本明細書で記載される方法（例えば、以下で記載される標準的なパラメータを用いるBLAST解析）を用いて、本明細書で記載されるMSFPまたはそのドメインをコードする配列など、基準のポリヌクレオチド配列と比較して、少なくとも70%の配列同一性、好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%以上の配列同一性を含むポリヌクレオチドでありうる。当業者は、コドンの縮重性、アミノ酸の類似性、リーディングフレームの位置決めなどを考慮することにより、これらの値を適切に補正して、2つのヌクレオチド配列によりコードされるタンパク質の対応する同一性を決定しうることを認識するであろう。

【0229】

ポリヌクレオチド変異体は、結合ドメインの結合アフィニティー、またはFabの結合アフィニティー、または変異体のポリヌクレオチドによりコードされるMSFPの機能が、とりわけ、本明細書で示されるポリヌクレオチド配列によりコードされる非修飾の基準タンパク質と比べて、好ましくは実質的に減殺されないように、1または複数の置換、付加、欠失および／または挿入を含有することが典型的である。

【0230】

他の特定の関連する実施形態では、ポリヌクレオチド断片が、本明細書で記載されるMSFPまたはそのドメインをコードする配列と同一であるかまたは相補的な配列の多様な長さの連続的な連なりを含むか、またはこれらから本質的になる可能性がある。例えば、本明細書で開示される結合ドメインまたはそのFabの抗原結合断片など、MSFPまたはそのドメインをコードする配列のうちの少なくとも約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、200、300、400、500または1000以上の連続的なヌクレオチドのほか、これらの間の全ての中間の長さの連

続的なヌクレオチドを含むか、またはこれらから本質的になるポリヌクレオチドが提供される。この文脈における「中間の長さ」とは、200～500を通した全ての整数；500～1,000を通した全ての整数を含め、50、51、52、53など；100、101、102、103など；150、151、152、153など、引例された値の間の任意の長さを意味することが容易に理解されるであろう。本明細書で記載されるポリヌクレオチド配列は、一方または両方の末端において、天然配列において見出されないさらなるヌクレオチドにより伸長させることができる。このさらなる配列は、本明細書で記載されるMSFPもしくはそのドメインをコードするポリヌクレオチドの片方の末端、または本明細書で記載されるMSFPもしくはそのドメインをコードするポリヌクレオチドの両方の末端における1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20ヌクレオチドからなる可能性がある。

10

【0231】

別の実施形態では、中程度～高度な厳密性の条件下で、本明細書で開示される結合ドメインもしくはそのFabの抗原結合断片、またはその断片、もしくはその相補的な配列など、MSFPまたはそのドメインをコードするポリヌクレオチド配列にハイブリダイズすることが可能なポリヌクレオチドが提供される。分子生物学の技術分野では、ハイブリダイゼーション法が周知である。例示を目的として述べると、本明細書で提示されるポリヌクレオチドの、他のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを調べるのに適する中程度に厳密な条件には、5倍濃度のSSC、0.5%のSDS、1.0mMのEDTA（pH8.0）による溶液中での前洗浄；50℃～60℃、5倍濃度のSSC中、一晩にわたるハイブリダイジングの後；0.1%のSDSを含有する2倍濃度のSSC、0.5倍濃度のSSC、および0.2倍濃度のSSCの各々による、65℃で20分間ずつ2回にわたる洗浄が含まれる。当業者は、ハイブリダイゼーションの厳密性が、ハイブリダイゼーション溶液の塩含量および／またはハイブリダイゼーションを実施する温度を変化させることなどにより容易に操作しうることを理解するであろう。別の実施形態では、例えば、適切な高度に厳密なハイブリダイゼーション条件に、ハイブリダイゼーション温度を、例えば、60℃～65℃または65℃～70℃へと上昇させることを例外として、上記の条件が含まれる。

20

【0232】

特定の実施形態では、上記のポリヌクレオチド、例えば、ポリヌクレオチド変異体、断片、およびハイブリダイズする配列が、結合ドメインまたはFab、例えば、CD3に結合するFabまたは腫瘍抗原標的に結合する結合ドメインなど、MSFPまたはそのドメインをコードする。他の実施形態では、このようなポリヌクレオチドが、CD3および／または腫瘍抗原に、とりわけ本明細書で示されるMSFP配列の少なくとも約50%、少なくとも約70%の強さで結合し、特定の実施形態では、少なくとも約90%の強さで結合するMSFPをコードする。さらなる実施形態では、このようなポリヌクレオチドが、MSFPまたはそのドメインであって、例えば、CD3および／または標的抗原に、本明細書で示されるMSFPまたはそのドメインより大きなアフィニティーで結合する、例えば、とりわけ、本明細書で示されるMSFPまたはそのドメインの配列の、定量的に少なくとも約105%、106%、107%、108%、109%、または110%の強さで結合するMSFPまたはそのドメインをコードする。

30

40

【0233】

本明細書の別の個所で記載される通り、代表的なポリペプチド（例えば、本明細書で提示される変異体のMSFP、例えば、本明細書で提示される結合ドメインおよびFabを有するMSFP）の三次元構造の決定は、選択された天然または非天然のアミノ酸による1または複数のアミノ酸の置換、付加、欠失、または挿入を、このようにして誘導される構造的変異体为本明細書で開示される分子種の空間充填特性を保持するかどうかを決定する目的で事実上モデル化しうるように、日常的な方法を介して行うことができる。当業者には、例えば、アフィニティーを維持するか、またはより良好なアフィニティーを達成するように、例えば、抗体またはその抗原結合断片内の適切なアミノ酸置換（またはこのア

50

ミノ酸配列をコードする適切なポリヌクレオチド)を決定するための多様なコンピュータプログラムが公知である。

【0234】

本明細書で記載されるポリヌクレオチドまたはそれらの断片は、コード配列それ自体の長さに関わらず、それらの全体的な長さを大幅に変化させうるように、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、複数のクローニング部位、他のコードセグメントなど、他のDNA配列と組み合わせることができる。したがって、ほぼ任意の長さの核酸断片であって、全長が調製の容易さおよび意図される組換えDNAプロトコールにおける使用により限定されることが好ましい核酸断片を用いることが想定される。例えば、全長が約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50塩基対の長さなど(全ての中間の長さを含めた)である例示的なポリヌクレオチドセグメントは、有用であると想定される。

10

【0235】

ポリヌクレオチド配列を比較する場合、下記の通りに対応が最大となるように整列させたときに、2つの配列におけるヌクレオチド配列が同じであれば、2つの配列を「同一である」という。2つの配列の間の比較は、典型的に、配列を比較域にわたり比較して、局所的な配列類似性の領域を同定および比較することにより実施した。本明細書で用いられる「比較域」とは、少なくとも約20、通常は30～約75、40～約50の連続的な位置のセグメントであって、配列を、同数の連続的な位置を有する基準配列と、これら2つの配列を最適に整列させた後で比較しうるセグメントを指す。

20

【0236】

比較のための最適な配列アライメントは、Lasergeneシリーズのバイオインフォマティックスソフトウェア(DNA STAR, Inc.、Madison, WI)におけるMegalignプログラムでデフォルトのパラメータを用いて実行することができる。このプログラムは、以下の参考文献において記載されている複数のアライメントスキームを統合する: Dayhoff, M. O. (1978年)、「A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships」、Dayhoff, M. O. (編)、「Atlas of Protein Sequence and Structure」、National Biomedical Research Foundation、Washington DC、5巻、増刊3号、345～358頁; Hein J.、「Unified Approach to Alignment and Phylogenesis」、626～645頁(1990年);「Methods in Enzymology」、183巻、Academic Press, Inc.、San Diego, CA; Higgins, D. G. および Sharp, P. M.、CABIOS、5巻: 151～153頁(1989年); Myers, E. W. および Muller W.、CABIOS、4巻: 11～17頁(1988年); Robinson, E. D.、Comb. Theor.、11巻: 105頁(1971年); Santou, N. Nes, M.、Mol. Biol. Evol.、4巻: 406～425頁(1987年); Sneath, P. H. A. および Sokal, R. R.、「Numerical Taxonomy - The Principles and Practice of Numerical Taxonomy」、Freeman Press、San Francisco, CA (1973年); Wilbur, W. J. および Lipman, D. J.、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80巻: 726～730頁(1983年)。

30

40

【0237】

代替的に、比較のための最適な配列アライメントは、SmithおよびWaterman、Add. APL. Math.、2巻: 482頁(1981年)による局所的な同一性アルゴリズムを介して実施することもでき、NeedlemanおよびWunsch、

50

J. Mol. Biol.、48巻：443頁（1970年）による同一性アライメントのアルゴリズムを介して実施することもでき、PearsonおよびLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、85巻：2444頁（1988年）による類似性の検索法を介して実施することもでき、これらのアルゴリズム（Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group（GCG）、575 Science Dr.、Madison、WIによるGAP、BESTFIT、BLAST、FASTA、およびTFASTA）をコンピュータに実装することにより実施することもでき、目視により実施することもできる。

【0238】

配列同一性および配列類似性のパーセントを決定するのに適するアルゴリズムの好ましい一例は、BLASTアルゴリズムおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、それぞれ、Altschulら、Nucl. Acids Res.、25巻：3389～3402頁（1977年）、およびAltschulら、J. Mol. Biol.、215巻：403～410頁（1990年）において記載されている。例えば、本明細書で記載されるパラメータによりBLASTおよびBLAST 2.0を用いて、2つ以上のポリヌクレオチド間における配列同一性のパーセントを決定することができる。BLAST解析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを介して公開されている。例示的な一例では、ヌクレオチド配列には、パラメータM（マッチする残基対に対するリワードスコア；常に>0）およびN（ミスマッチする残基に対するペナルティスコア；常に<0）を用いて累積スコアを計算することができる。各方向へのワードヒットの伸長は、累積アライメントスコアがその最大達成値から量Xだけ低下する場合；1もしくは複数の負のスコアをもたらす残基アライメントが累積するために、累積スコアがゼロ以下に低下する場合；またはいずれかの配列の末端に達した場合に停止させる。BLASTアルゴリズムのパラメータであるW、T、およびXは、アライメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列の場合）では、デフォルトとして、ワード長（W）11、期待値（E）10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス（HenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89巻：10915頁（1989年）を参照されたい）によるアライメント（B）50、期待値（E）10、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を用いる。

【0239】

特定の実施形態では、「配列同一性の百分率」が、最適に整列させた2つの配列を、少なくとも20の位置による比較域であって、ポリヌクレオチド配列の一部が、2つの配列の最適なアライメントのための基準配列（付加または欠失を含まない）と比較して20パーセント以下、通常は5～15パーセント、または10～12パーセントの付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含みうる比較域にわたり比較することにより決定する。百分率は、両方の配列で同一な核酸塩基が生じてマッチした位置数をもたらす位置数を決定し、マッチした位置数を基準配列における位置の総数（すなわち、比較域のサイズ）で除し、結果を100で乗じて配列同一性の百分率をもたらすことにより計算する。

【0240】

当業者は、遺伝子コードの縮重性の結果として、本明細書で記載されるMSFPをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することを察知するであろう。これらのポリヌクレオチドのうちの一部は、MSFP、例えば、CD3および／または腫瘍標的抗原に結合するMSFPをコードする天然のポリヌクレオチドまたは元のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列と最小限の配列同一性を保有する。にもかかわらず、本開示では、コドン使用の差違に起因して変化するポリヌクレオチドが明示的に想定される。特定の実施形態では、哺乳動物における発現のためにコドンを最適化した配列が、とりわけ想定される。

【0241】

したがって、本発明の別の実施形態では、本明細書で記載されるMSFPの変異体およ

10

20

30

40

50

び／または誘導体を調製するために、部位特異的変異誘発などの変異誘発法を使用することができる。この手法では、それらをコードする基底的なポリヌクレオチドの変異誘発を介して、ポリペプチド配列における特定の修飾を施すことができる。これらの技法は、配列変異体を調製して調べる簡便な手法、例えば、1または複数のヌクレオチド配列の変化をポリヌクレオチド内へと導入することにより、前出の検討事項のうちの1または複数を組み込む手法を提供する。

【0242】

部位特異的変異誘発は、特異的なオリゴヌクレオチド配列であって、所望の変異を有するDNA配列をコードするほか、横断される欠失接合部の両側において安定的な二重鎖を形成するのに十分なサイズおよび配列の複雑性を有するプライマー配列をもたらしのに十分な数の隣接するヌクレオチドもコードするオリゴヌクレオチド配列の使用を介する変異体の作製を可能とする。選択したポリヌクレオチド配列における変異を使用して、ポリヌクレオチドそれ自体の特性を改善するか、改変するか、低下させるか、修飾するか、もしくは他の形で変化させることもでき、かつ／またはコードされるポリペプチドの特性、活性、組成物、安定性、もしくは一次配列を改変することもできる。

【0243】

特定の実施形態では、本発明者らは、本明細書で開示されるMSFPまたはそのドメインをコードするポリヌクレオチド配列の変異誘発であって、結合ドメインもしくはそのFabの抗原結合断片の結合アフィニティー、または特定のFc領域の機能、またはFc領域の特定のFcγRに対するアフィニティーなど、コードされるポリペプチドの1または複数の特性を改変する変異誘発を想定する。当技術分野では、部位特異的変異誘発法が周知であり、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの両方の変異体を創出するのに広く用いられている。例えば、部位特異的変異誘発は、DNA分子の特定の部分を改変するのに用いられることが多い。このような実施形態では、典型的に約14～約25ヌクレオチドなどの長さを含むプライマーを使用し、配列接合部の両側において約5～約10残基を改変する。

【0244】

当業者により察知される通り、部位特異的変異誘発法では、一本鎖形態および二本鎖形態の両方で存在するファージベクターを使用することが多い。部位指向的変異誘発において有用な典型的ベクターには、M13ファージなどのベクターが含まれる。これらのファージは、市販品の入手が容易であり、当業者にはそれらの使用が一般に周知である。二本鎖プラスミドはまた、対象の遺伝子をプラスミドからファージへと導入するステップを削減させる部位指向的変異誘発でも日常的に使用されている。

【0245】

一般に、本明細書に従う部位指向的変異誘発は、まず所望のペプチドをコードするDNA配列をその配列内に包含する、一本鎖ベクターを得るか、または二本鎖ベクターの2つの鎖を溶離させることにより実施する。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成により調製する。次いで、変異保有鎖の合成を完結させるために、このプライマーを、一本鎖ベクターとアニールさせ、E. coliポリメラーゼIのKlenow断片などのDNA重合化酵素下に置く。こうして、一方の鎖が元の非変異配列をコードし、第2の鎖が所望の変異を保有するヘテロ二重鎖が形成される。次いで、このヘテロ二重鎖ベクターを用いて、E. coli細胞などの適切な細胞を形質転換し、変異配列の配置を保有する組換えベクターを包含するクローンを選択する。

【0246】

部位指向的変異誘発を用いて選択されるペプチドをコードするDNAセグメントの配列変異体を調製することにより、潜在的に有用な分子種を作製する手段がもたらされるが、ペプチドの配列変異体およびそれらをコードするDNA配列を得る他の方途も存在するので、これは、限定的であることを意味するわけではない。例えば、所望のペプチド配列をコードする組換えベクターを、ヒドロキシルアミンなどの変異誘発剤で処理して、配列変異体を得ることができる。これらの方法およびプロトコールに関する特定の詳細は、各

々がその目的で参照により本明細書に組み込まれる、Malloyら、1994年；Segal、1976年；ProkopおよびBajpai、1991年；Kuby、1994年；ならびにManiatisら、1982年の教示において見出される。

【0247】

本明細書で用いられる「オリゴヌクレオチド指向的変異誘発手順」という用語は、増幅など、特定の核酸分子の濃度のその初期濃度と比べた上昇、または検出可能なシグナル濃度の上昇を結果としてもたらす、鋳型依存的工程およびベクターを介する増殖を指す。本明細書で用いられる「オリゴヌクレオチド指向的変異誘発手順」という用語は、プライマー分子の鋳型依存的な伸長を伴う工程を指すことを意図する。鋳型依存的工程という用語は、RNA分子またはDNA分子の核酸合成であって、核酸の新たに合成される鎖の配列が、相補的な塩基対合についての周知の規則（例えば、Watson、1987年を参照されたい）により規定される核酸合成を指す。典型的に、ベクターを介する方法は、核酸断片のDNAベクターまたはRNAベクターへの導入、ベクターのクローン増幅、および増幅された核酸断片の回収を伴う。このような方法の例は、とりわけ、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第4,237,224号により提示されている。

10

【0248】

ポリペプチド変異体を作製するための別の手法では、米国特許第5,837,458号において記載される、再帰的配列組換えを用いることができる。この手法では、組換えおよびスクリーニングまたは選択の反復的サイクルを実施して、例えば、結合アフィニティを増大させた個別のポリヌクレオチドの変異体を「進化」させる。また、特定の実施形態では、本明細書で記載される少なくとも1つのポリヌクレオチドを含むプラスミド、ベクター、転写カセットまたは発現カセットの形態にある構築物も提供する。

20

【0249】

特定の実施形態では、単離ポリヌクレオチドをベクターへと挿入する。本明細書で用いられる「ベクター」という用語は、その中にタンパク質をコードするポリヌクレオチドを共有結合的に挿入して、タンパク質の発現および／またはポリヌクレオチドのクローニングを引き起こしうる媒体を指す。単離ポリヌクレオチドは、当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いて、ベクターへと挿入することができる。限定せずに述べると、例えば、ベクターを適切な制限酵素を用いて消化し、次いで、マッチする制限末端を有する単離ポリヌクレオチドとライゲーションすることができる。

30

【0250】

限定せずに述べると、適切なベクターの例には、プラスミド、ファージミド、コスミド、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC）、またはP1由来人工染色体（PAC）などの人工染色体、ラムダファージまたはM13ファージなどのバクテリオファージ、および動物ウイルスが含まれる。限定せずに述べると、ベクターとして有用な動物ウイルスの種類の例には、レトロウイルス（レンチウイルスを含めた）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、およびパポバウイルス（例えば、SV40）が含まれる。

40

【0251】

ポリペプチドを発現させるためには、ベクターを、宿主細胞へと導入して、宿主細胞におけるポリペプチドの発現を可能とすることができる。限定せずに述べると、発現ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択マーカー、およびシグナル配列を含め、発現を制御するための多様なエレメントを含有しうる。これらのエレメントは、当業者が必要に応じて、選択することができる。例えば、プロモーター配列は、ベクターによるポリヌクレオチドの転写を促進するように選択する。限定せずに述べると、適切なプロモーター配列には、T7プロモーター、T3プロモーター、SP6プロモーター、ベクターアクチンプロモーター、EF1aプロモーター、CMVプロモーター、およびSV40プロモーターが含まれる。エンハンサー配列は、ポリヌクレオチドの転写を

50

増強するように選択することができる。選択マーカーは、ベクターを挿入された宿主細胞の、ベクターを挿入されていない宿主細胞からの選択を可能とするように選択することができ、例えば、選択マーカーとは、抗生剤耐性を付与する遺伝子でありうる。シグナル配列は、発現させたポリペプチドが宿主細胞の外部へと輸送されることを可能とするように選択することができる。

【0252】

ベクターはまた、その細胞への侵入の一助となる物質であって、ウイルス粒子、リボソーム、またはタンパク質コーティングが含まれるがこれらに限定されない物質も包含する。

【0253】

ポリヌクレオチドをクローニングするためには、ベクターを、宿主細胞（単離宿主細胞）へと導入し、ベクター自体の複製を可能とし、これにより、その中に含有されたポリヌクレオチドのコピーを増幅することができる。クローニングベクターは、限定せずに述べると一般に、複製起点、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、および選択マーカーが含まれる配列構成要素を含有する。これらのエレメントは、必要に応じて、当業者により選択されうる。例えば、複製起点は、宿主細胞におけるベクターの自律的な複製を促進するように選択することができる。

【0254】

特定の実施形態では、本開示は、本明細書で提示されるベクターを含有する単離宿主細胞を提供する。ベクターを含有する宿主細胞は、ベクター内に含有されたポリヌクレオチドの発現またはクローニングにおいて有用でありうる。

【0255】

限定せずに述べると、適切な宿主細胞には、原核細胞、真菌細胞、酵母細胞、または哺乳動物細胞など、高等真核細胞が含まれうる。

【0256】

限定せずに述べると、この目的に適する原核細胞には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば、*Escherichia* 属、例えば、*E. coli*、*Enterobacter* 属、*Erwinia* 属、*Klebsiella* 属、*Proteus* 属、*Salmonella* 属、例えば、*Salmonella typhimurium*、*Serratia* 属、例えば、*Serratia marcescans*、および *Shigella* 属などの *Enterobacteriaceae* (*Enterobacteriaceae*) 科のほか、*B. subtilis* および *B. licheniformis* などの *Bacilli* 属、*P. aeruginosa* などの *Pseudomonas* 属、ならびに *Streptomyces* 属などの真正細菌が含まれる。

【0257】

当技術分野では、*E. coli* などの原核細胞における抗体および抗原結合断片の発現が十分に確立されている。総説には、例えば、Pluckthun, A., *Bio/Technology*, 9 巻: 545~551 頁 (1991 年) を参照されたい。当業者にはまた、培養物中の真核細胞における発現も、抗体またはそれらの抗原結合断片を作製するための選択肢として利用可能であり、近年の総説、例えば、Ref, M. E. (1993 年)、*Curr. Opinion Biotech.*, 4 巻: 573~576 頁; Trill, J. J. ら (1995 年)、*Curr. Opinion Biotech.*, 6 巻: 553~560 頁を参照されたい。

【0258】

限定せずに述べると、この目的に適する真菌細胞には、繊維状真菌および酵母が含まれる。真菌細胞の例示的な例には、*Saccharomyces cerevisiae*、パン酵母、*Schizosaccharomyces pombe*、例えば、*K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC 12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC 16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC 24, 178)、*K. waltii* (ATCC 56, 500)、*K. drosophilae* (AT

10

20

30

40

50

CC 36, 906)、*K. thermotolerans*、および*K. marxianus*などの*Kluyveromyces*属の宿主；*Yarrowia*属 (EP402, 226)；*Pichia pastoris* (EP183, 070)；*Candida*属；*Trichoderma reesia* (EP244, 234)；*Neurospora crassa*；*Schwanniomyces occidentalis*などの*Schwanniomyces*属；ならびに、例えば、*Neurospora*属、*Penicillium*属、*Tolypocladium*属、ならびに*A. nidulans*および*A. niger*などの*Aspergillus*属宿主などの繊維状真菌が含まれる。

【0259】

高等真核細胞、特に、多細胞生物に由来する高等真核細胞を、本明細書で提示されるグリコシル化されたポリペプチドの発現に用いることができる。限定せずに述べると、適切な高等真核細胞には、無脊椎動物細胞および昆虫細胞、ならびに脊椎動物細胞が含まれる。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス株および変異体、ならびに*Spodoptera frugiperda* (毛虫)、*Aedes aegypti* (蚊)、*Aedes albopictus* (蚊)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ)、および*Bombyx mori*などの宿主に由来する対応する許容状態の昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクション用の多様なウイルス株、例えば、*Autographa californica* NPVのK-1変異体および*Bombyx mori* NPVのBm-5株が市販されており、このようなウイルスを、本発明に従う、特に、*Spodoptera frugiperda*細胞をトランスフェクトするための本明細書のウイルスとして用いることができる。また、綿花、トウモロコシ、パレイショ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコによる植物細胞培養物も、宿主として使用することができる。脊椎動物細胞の例には、SV40 (COS-7；ATCC CRL 1651)により形質転換されるサル腎臓CV1系列；ヒト胎児由来腎臓系列 (細胞懸濁培養物中で増殖させるためにサブクロニングした293または293細胞；Grahamら、J. Gen. Virol.、36巻：59頁 (1977年))；ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK；ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR (CHO；Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77巻：4216頁 (1980年))；マウスセルトリ細胞 (TM4；Mather、Biol. Reprod.、23巻：243～251頁 (1980年))；サル腎臓細胞 (CV1；ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76；ATCC CRK-1587)；ヒト子宮頸がん細胞 (HELA；ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞 (MDCK；ATCC CCL 34)；バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A；ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138；ATCC CCL 75)；ヒト肝臓細胞 (Hep G2；HB 8065)；マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562；ATCC CCL 51)；TRI細胞 (Matherら、Annals N. Y. Acad. Sci.、383巻：44～68頁 (1982年))；MRC 5細胞；FS4細胞；およびヒト肝臓がん系列 (Hep G2) などの哺乳動物宿主細胞系が含まれる。

【0260】

ベクターは、限定せずに述べると、DEAE-デキストランを媒介する送達、リン酸カルシウム沈殿法、カチオン脂質を媒介する送達、リポソームを媒介するトランスフェクション、電気穿孔、微粒子銃、受容体を媒介する遺伝子送達、ポリリシン、ヒストン、キトサン、およびペプチドを媒介する送達が含まれる、当技術分野で公知の任意の適切な方法を用いて宿主細胞へと導入することができる。当技術分野では、対象のベクターを発現させるために細胞をトランスフェクションおよび形質転換するための標準的な方法が周知である。

【0261】

特定の実施形態では、宿主細胞が、第1のポリペプチドをコードする第1のベクターと

10

20

30

40

50

、第2のポリペプチドをコードする第2のベクターとを含む。特定の実施形態では、第1のベクターと第2のベクターとが、同じ場合もあり、同じでない場合もある。特定の実施形態では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとが、同じ場合もあり、同じでない場合もある。

【0262】

特定の実施形態では、第1のベクターと第2のベクターとを、同時に導入する場合もあり、同時には導入しない場合もある。特定の実施形態では、第1のベクターと第2のベクターとを、宿主細胞へと併せて導入することができる。特定の実施形態では、第1のベクターを第1の宿主細胞へと導入することができ、次いで、第2のベクターも導入することができる。特定の実施形態では、第1のベクターを宿主細胞へと導入し、次いで、これを

10

【0263】

特定の実施形態では、宿主細胞が、第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドをコードするベクターを含む。特定の実施形態では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとが、同じ場合もあり、同じでない場合もある。

【0264】

特定の実施形態では、本開示が、本明細書で提示されるポリペプチドを発現させる方法であって、ベクターを含有する宿主細胞を、ベクター内に挿入したポリヌクレオチドを発現させる条件下で培養するステップを含む方法を提供する。

20

【0265】

限定せずに述べると、ポリヌクレオチドを発現させるのに適する条件には、適切な培地、培養培地中に適切な宿主細胞の密度、必要な栄養物質の存在、補因子の存在、適切な温度および湿度、ならびに微生物夾雑物の非存在が含まれる。当業者は、必要に応じて、発現の目的に適する条件を選択することができる。

【0266】

特定の実施形態では、宿主細胞内で発現させたポリペプチドが、二量体を形成する可能性があり、したがって、本明細書で提示されるMSFP二量体またはポリペプチド複合体をもたらす。特定の実施形態では、宿主細胞内で発現させたポリペプチドが、ホモ二量体のポリペプチド複合体を形成する。宿主細胞が、第1のポリヌクレオチドおよび第2のポリヌクレオチドを発現させる特定の実施形態では、第1のポリヌクレオチドと第2のポリヌクレオチドとが、ヘテロ二量体のポリペプチド複合体を形成する。

30

【0267】

特定の実施形態では、ポリペプチド複合体が、宿主細胞内部で形成される。例えば、二量体は、関与性の酵素および／または共因子を一助として、宿主細胞内部で形成される。特定の実施形態では、ポリペプチド複合体が、細胞外へと分泌される。特定の実施形態では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとが、宿主細胞外へと分泌され、宿主細胞の外部で二量体を形成する。

【0268】

特定の実施形態では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを、適切な条件下で別個に発現させ、二量体化させることができる。例えば、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを適切な緩衝液中で組み合わせ、第1のタンパク質単量体と第2のタンパク質単量体とを、疎水性相互作用などの適切な相互作用を介して二量体化させることができる。別の例では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを、酵素および／または共因子を含有する適切な緩衝液中で組み合わせ、これにより、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの二量体化を促進することができる。別の例では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとを、適切な媒体内で組み合わせ、それらを、適切な試薬および／または触媒の存在下で互いと反応させることができる。

40

【0269】

発現させたポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体は、任意の適切な方法を用

50

いて回収することができる。ポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体は、細胞内、ペリプラズム空間内で発現させることもでき、細胞の外部の培地へと分泌させることもできる。ポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体を細胞内で発現させる場合は、ポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体を含有する宿主細胞を溶解させることができ、遠心分離または限外濾過を介して望まれない破砕物を除去することにより、ポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体をこの溶解物から単離することができる。ポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体を、E. coliのペリプラズム空間へと分泌させる場合は、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA、およびフェニルメチルスルホニルフロリド (PMSE) などの薬剤の存在下で約30分間にわたり細胞ペーストを融解させ、遠心分離により細胞破砕物を除去することができる (Carterら、Bio Technology、10巻:163~167頁(1992年))。ポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体を培地へと分泌させる場合は、細胞培養物の上清を回収し、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amincon限外濾過ユニットまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを用いて濃縮することができる。プロテアーゼ阻害剤および／または抗生物質を回収ステップおよび濃縮ステップへと組み入れて、タンパク質の分解および／または夾雑微生物の成長を阻害することができる。

【0270】

発現させたポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体は、限定せずに述べると、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、サイズ除外クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、イオン交換カラム上におけるイオン交換による画分化、エタノールによる沈殿、逆相HPLC、シリカ上におけるクロマトグラフィー、ヘパリンセファロース上におけるクロマトグラフィー、アニオン交換樹脂またはカチオン交換樹脂上におけるクロマトグラフィー (ポリアスパラギン酸カラムなど)、等電点電気泳動、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿 (総説については、Brunner, P. L.、「Protein purification」、Taylor & Francis刊、2007年; Janson, J. C.ら、「Protein purification: principles, high resolution methods and applications」、Wiley-VCH刊、1998年を参照されたい) など、適切な方法によりさらに精製することができる。

【0271】

特定の実施形態では、ポリペプチドおよび／またはポリペプチド二量体の複合体を、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。特定の実施形態では、プロテインAクロマトグラフィーまたはプロテインA/G (プロテインAとプロテインGとの融合タンパク質) クロマトグラフィーが、抗体のCH2ドメインおよび／またはCH3ドメインに由来する構成要素を含むポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体の精製に有用でありうる (Lindmarkら、J. Immunol. Meth.、62巻:1~13頁(1983年)); Zettlitz, K. A.、「Antibody Engineering」、V部、531~535頁、2010年)。特定の実施形態では、プロテインGクロマトグラフィーが、IgGγ3重鎖を含むポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体の精製に有用でありうる (Gussら、EMBO J.、5巻:1567~1575頁(1986年))。特定の実施形態では、プロテインLクロマトグラフィーが、κ軽鎖を含むポリペプチドおよび／またはポリペプチド複合体の精製に有用でありうる (Sudhir, P.、「Antigen engineering protocols」、26章、Humana Press刊、1995年; Nilsson, B. H. K.ら、J. Biol. Chem.、267巻、2234~2239頁(1992年))。アフィニティリガンドを接合させるマトリックスは、アガロースのことが極めて多いが、他のマトリックスも利用可能である。小孔が制御されたガラスまたはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンなど、力学的に安定的なマトリックスは、アガロースにより達成可能な流速および処理時間より早い流速および短い処理時間を可能とする。抗体がCH3ドメインを含む場合は、Bakerbond ABX樹脂 (J. T. B

10

20

30

40

50

aker、Phillipsburg、N. J.) が精製に有用である。

【0272】

任意の予備的な（1または複数の）精製ステップの後は、対象の抗体および夾雑物を含む混合物を、pHが約2.5～4.5の間の溶出緩衝液を用いて、好ましくは低塩濃度（例えば、約0～0.25Mの塩）で実施される、低pHの疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけることができる。

【0273】

医薬組成物および使用方法

本開示は、本明細書で記載されるMSFPを含む組成物、および多様な治療状況におけるこのような組成物の投与を提供する。

【0274】

純粋形態または適切な医薬組成物による、本明細書で記載されるMSFPの投与は、類似の有用性をもたらすのに許容される薬剤の投与方式のうちのいずれかを介して実行することができる。医薬組成物は、MSFPまたはMSFPを含有する組成物を、生理学的に許容される適切な担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせることにより調製することができる。錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、溶液、坐剤、注射、吸入剤、ゲル、マイクロスフェア、およびエアゾールなど、固体形態、半固体形態、液体形態、または気体形態の調製物へと調合することができる。加えて、他の医薬としての有効成分（本明細書の別の個所で記載される他の抗がん剤を含めた）、ならびに／または塩、緩衝剤、および安定化剤などの適切な賦形剤を組成物内に存在させることもできるが、必ずしもそうする必要はない。投与は、経口経路、非経口経路、鼻腔内経路、静脈内経路、皮内経路、皮下経路、または局所経路を含め、異なる多様な経路を介して達成することができる。好ましい投与方式は、処置または防止される状態の性質に依存する。投与後、がんを軽減するか、がんを阻害するか、がんの進行および／または転移を防止するかまたは遅延させる量を有効であると考えられる。

【0275】

特定の実施形態では、投与される量が、生存可能な腫瘍の量の統計学的に有意な減少、例えば、腫瘍塊の少なくとも50%の減少または走査寸法の改変（例えば、統計学的に有意な減少）により示される腫瘍の退縮を結果としてもたらすのに十分である。他の実施形態では、投与される量が、医療技術の当業者に公知の、臨床的に重要な疾患症状の軽減を結果としてもたらすのに十分である。

【0276】

処置の正確な用量および持続期間は、処置される疾患の関数であり、公知の試験プロトコルを用いて経験的に決定することもでき、当技術分野で公知のモデル系において組成物を調べ、そこから外挿することにより決定することもできる。また、比較臨床試験も実施することができる。用量はまた、緩和させる状態の重症度と共に変化する可能性もある。医薬組成物は一般に、望ましくない副作用を最小化しながら、治療的に有用な効果を果たすように調合および投与する。組成物は、一度に投与することもでき、時間間隔を置いて投与される多数回の小用量へと分割することもできる。任意の特定の被験体には、特定の用量レジメンを、個別の必要に従い、経時的に調整することができる。

【0277】

MSFPを含有する組成物は、単独で投与することもでき、放射線療法、化学療法、移植、免疫療法、ホルモン療法、光力学療法などなど、他の公知のがん処置と組み合わせて投与することもできる。組成物はまた、抗生剤と組み合わせても投与することができる。

【0278】

したがって、限定せずに述べると、これらの医薬組成物および類縁の医薬組成物を投与する典型的な経路には、経口経路、局所経路、経皮経路、吸入経路、非経口経路、舌下経路、口腔内経路、直腸内経路、膣内経路、および鼻腔内経路が含まれる。本明細書で用いられる非経口経路という用語には、皮下注射、静脈内注射法または静脈内注入法、筋肉内注射法または筋肉内注入法、胸骨内注射法または胸骨内注入法が含まれる。本発明の特定

10

20

30

40

50

の実施形態に従う医薬組成物は、組成物を患者へと投与したときに、その中に含有される有効成分がバイオアベイラビリティを示すことを可能とするように調合する。被験体または患者に投与される組成物は、1または複数の用量単位であって、例えば、錠剤が単一の用量単位の場合もあり、エアゾール形態における、本明細書で記載されるMSFPの容器が複数の用量単位を保持する場合もある用量単位の形態をとりうる。このような剤形を調製する実際の方法は公知であるか、または当業者に明らかであろう。例えば、Remington、「The Science and Practice of Pharmacy」、20版（Philadelphia College of Pharmacy and Science、2000年）を参照されたい。いずれにせよ、投与される組成物は、本明細書の教示に従う被験体の疾患または状態を処置するための、治療有効量の本開示のMSFPを含有する。

10

【0279】

医薬組成物は、固体形態の場合もあり、液体形態の場合もある。一実施形態では、組成物が、例えば、錠剤形態または粉末形態であるように、（1または複数の）担体が微粒子である。組成物が、例えば、吸入投与において有用な、例えば、経口油、注射用液、またはエアゾールである場合、（1または複数の）担体は液体でありうる。経口投与用に意図される場合、医薬組成物は、固体形態または液体形態であって、半固体形態、半液体形態、懸濁液形態、およびゲル形態も本明細書で固体または液体と考えられる形態の中に含まれる場合の固体形態または液体形態であることが好ましい。

20

【0280】

経口投与用の固体組成物として、医薬組成物を、粉末、顆粒、圧縮錠、丸薬、カプセル、チューインガム、ウェハーなどへと調合することができる。このような固体組成物は典型的に、1または複数の不活性の希釈剤または可食性の担体を含有する。加えて、以下のうちの1または複数の存在させることができる：カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、結晶セルロース、トラガカントガム、またはゼラチンなどの結合剤；デンプン、ラクトース、またはデキストリンなどの賦形剤；アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、Primogel、トウモロコシデンプンなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSterotexなどの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ香味剤などの香味剤；および着色剤。医薬組成物が、カプセル形態、例えば、ゼラチンカプセルの形態にある場合、それは、上記の種類の物質に加えて、ポリエチレングリコールまたは油など、液体の担体も含有しうる。

30

【0281】

医薬組成物は、液体、例えば、エリキシル剤、シロップ、溶液、エマルジョン、または懸濁液の形態でありうる。2つの例として述べると、液体は、経口投与用の場合もあり、注射による送達用の場合もある。経口投与用が意図される場合、好ましい組成物は、本化合物に加えて、甘味剤、防腐剤、色素／着色剤、および芳香増強剤のうちの1または複数も含有する。注射により投与することが意図される組成物では、界面活性剤、防腐剤、保湿剤、分散剤、懸濁剤、緩衝液、安定化剤、および等張剤のうちの1または複数を組み入れることができる。

40

【0282】

液体の医薬組成物は、それらが溶液であれ、懸濁液であれ、他の同様の形態であれ、以下の補助剤のうちの1または複数を含む：注射用水、食塩液、好ましくは生理食塩液、リンゲル溶液、等張性塩化ナトリウムなどの滅菌希釈剤、溶媒もしくは懸濁媒として用いる合成モノグリセリドもしくは合成ジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の溶媒；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミンテトラ酢酸などのキレート化剤；酢酸、クエン酸、またはリン酸などの緩衝剤、および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度を調整するための薬剤。非経口調製物は、アンプル、ディスポーザブルのシリンジ、またはガラス製もしくは

50

はプラスチック製の複数回投与用のバイアル内に封入することができる。生理食塩液は、好ましい補助剤である。注射用医薬組成物は、滅菌であることが好ましい。

【0283】

非経口投与用または経口投与用を意図される液体の医薬組成物は、適切な用量が得られるような量の、本明細書で開示されるMSFPを含有するものとする。この量は、組成物中に少なくとも0.01%のMSFPであることが典型的である。経口投与用が意図される場合、この量は、組成物重量の0.1～約70%で変化させることができる。特定の経口医薬組成物は、約4%～約75%の間のMSFPを含有する。特定の実施形態では、非経口投与単位が、希釈前の重量で0.01～10%の間のMSFPを含有するように、本発明に従う医薬組成物および医薬調製物を調製する。

10

【0284】

医薬組成物は、局所投与用を意図することができ、この場合、担体は、溶液基剤、エマルジョン基剤、軟膏基剤、またはゲル基剤を含むことが適切でありうる。基剤は、例えば、以下のうちの1または複数を含みうる：ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蝋、鉱物油、水およびアルコールなどの希釈剤、ならびに乳化剤および安定化剤。局所投与用の医薬組成物中には、増粘剤を存在させることができる。経皮投与用を意図する場合、組成物には、経皮パッチまたはイオントフォレーシス用デバイスが含まれうる。医薬組成物には、例えば、直腸内で溶解して薬物を放出する坐剤の形態における直腸内投与を意図することができる。直腸内投与用の組成物は、適切な非刺激性賦形剤としての油性基剤を含有しうる。限定せずに述べると、このような基剤には、ラノリン、ココアバター、およびポリエチレングリコールが含まれる。

20

【0285】

医薬組成物には、固体の投与単位または液体の投与単位の物理的形態を修飾する多様な物質を組み入れることができる。例えば、組成物には、有効成分の周囲にコーティングシェルを形成する物質を組み入れることができる。コーティングシェルを形成する物質は、典型的に不活性であり、例えば、糖、セラック、および他の腸溶性のコーティング剤から選択することができる。代替的に、有効成分をゼラチンカプセル内に包み込むこともできる。固体形態または液体形態の医薬組成物には、本発明の抗体に結合し、これにより化合物の送達の一助となる薬剤を組み入れることができる。この能力において作用しうる適切な薬剤には、他のモノクローナル抗体もしくはポリクローナル抗体、1もしくは複数のタンパク質、またはリポソームが含まれる。医薬組成物は、エアゾールとして投与しうる投与単位から本質的になる場合がある。エアゾールという用語は、コロイド性の系～加圧型パッケージからなる系の範囲にわたる多様な系を示すのに用いられる。送達は、液化ガスまたは圧縮ガスによる場合もあり、有効成分を分注する適切なポンプシステムによる場合もある。エアゾールは、（1または複数の）有効成分を送達するために、単相系で送達することもでき、二相系で送達することもでき、三相系で送達することもできる。エアゾールの送達には、併せてキットを形成しうる、必要な容器、アクチベーター、バルブ、部分容器などを組み入れることができる。当業者は、不要な実験を伴わずに、好ましいエアゾールを決定することができる。

30

【0286】

医薬組成物は、製薬技術分野で周知の方法により調製することができる。例えば、注射により投与することを意図される医薬組成物は、本明細書で記載されるMSFPと、場合によって、塩、緩衝剤、および／または安定化剤のうちの1または複数とを含む組成物を、溶液を形成するように滅菌蒸留水と組み合わせることにより調製することができる。界面活性剤を添加して、均一な溶液または懸濁液の形成を容易にすることができる。界面活性剤とは、水性送達系におけるMSFPの溶解または均一な懸濁を容易にするように、MSFP組成物と非共有結合的に相互作用する化合物である。

40

【0287】

組成物は、使用される特定の化合物（例えば、MSFP）の活性；化合物作用の代謝安定性および長さ；患者の年齢、体重、全般的な健康、性別、および食餌；投与方式および

50

投与期間；排泄速度；薬物の組合せ；特定の障害または状態の重症度；ならびに被験体が治療を受けているかどうかを含めた多様な因子に依存して変化する治療有効量で投与することができる。一般に、1日当たりの治療有効用量は、約0.001mg/kg（すなわち、0.07mg）～約100mg/kg（すなわち、7.0g）（70kgの哺乳動物の場合）であり、治療有効用量は、約0.01mg/kg（すなわち、0.7mg）～約50mg/kg（すなわち、3.5g）（70kgの哺乳動物の場合）であることが好ましく、治療有効用量は、約1mg/kg（すなわち、70mg）～約25mg/kg（すなわち、1.75g）（70kgの哺乳動物の場合）であることがより好ましい。

【0288】

本開示のMSFPを含む組成物はまた、1または複数の他の治療剤の投与と同時に投与することもでき、この前に投与することもでき、この後で投与することもできる。このような組合せ療法は、本発明の化合物および1または複数のさらなる活性薬剤を含有する単一の医薬処方物の投与のほか、本発明のMSFPおよびその固有の別個の医薬処方物における各活性薬剤を含む組成物の投与も包含しうる。例えば、本明細書で記載されるMSFPおよび他の活性薬剤は、錠剤またはカプセルなど、単一の経口投与組成物中で併せて患者に投与することもでき、各薬剤を別個の経口投与組成物により投与することもできる。同様に、本明細書で記載されるMSFPおよび他の活性薬剤は、生理食塩液または他の生理学的に許容される溶液など、単一の非経口投与組成物中で併せて患者に投与することもでき、各薬剤を別個の非経口投与処方物により投与することもできる。別個の投与処方物を用いる場合、MSFPおよび1または複数のさらなる活性薬剤を含む組成物は、本質的に同時に、すなわち、共時的に投与することもでき、別個に時間をずらして、すなわち、逐次的、かつ、任意の順序で投与することもでき、組合せ療法は、これら全てのレジメンを包含することが理解される。

【0289】

したがって、特定の実施形態ではまた、1または複数の他の治療剤と組み合わせた本開示のMSFP組成物の投与も想定される。当技術分野では、このような治療剤を、がん、炎症性障害、同種移植片移植、I型糖尿病、および多発性硬化症など、本明細書で記載される特定の疾患状態のための標準的な処置として許容することができる。想定される例示的な治療剤には、サイトカイン、成長因子、ステロイド、NSAID、DMARD、抗炎症剤、化学療法剤、放射性治療剤、または他の活性薬剤および補助薬剤が含まれる。

【0290】

特定の実施形態では、本明細書で開示されるMSFPを、任意の数の化学療法剤と共に投与することができる。化学療法剤の例には、チオテパおよびシクロホスファミド（CYTOSAN（商標））などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドローパ、カルボコン、メツレドローパ、およびウレドローパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド（triethylenethiophosphoramidate）、およびトリメチロールメラミン（trimethylolomelamine）を含めたエチレンイミンおよびメチルメラミン（methyllamelamines）；クロランブシル、クロルナファジン、シクロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピチン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどの窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア（nitrosureas）；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン（anthramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイ

シン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドル
 ビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノス
 タチン、ゾルビシンなどの抗生剤；メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-
 FU）などの代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメ
 レキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チ
 オグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カル
 モフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロク
 スウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタ
 ノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン；ア
 ミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤；フォリン酸（frolin
 ic acid）などの葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；ア
 ミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート；デ
 フォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルフロルニチン（elformithine）；酢酸
 エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチ
 ナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペ
 ントスタチン；フェンメトラジン（phenamet）；ピラルビシン；ポドフィリン酸
 （podophyllinic acid）；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；
 PSK. RTM. ；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリ
 アジクオン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン
 ；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；
 ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソ
 イド、例えば、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers
 Squibb Oncology, Princeton, N. J.）およびドセタキセ
 ル（TAXOTERE（登録商標）、Rhne-Poulenc Rorer, Ant
 ony, France）；クロランブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプト
 プリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類似体；ビン
 ブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミ
 トキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシ
 ド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；ト
 ポイソメラーゼ阻害剤であるRFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO
 ）；Targretin（商標）（ベキサロテン）、Panretin（商標）（アリ
 レチノイン）などのレチノイン酸誘導体；ONTAK（商標）（デニロイキンジフチトク
 ス）；エスペラミシン；カペシタビン；ならびに上記のうちのいずれかの薬学的に許容さ
 れる塩、酸、または誘導体が含まれる。この定義にはまた、例えば、タモキシフェン、ラ
 ロキシフェン、アロマターゼ阻害剤、4（5）-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシ
 フェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY 117018、オナプリストン、お
 よびトレミフェン（Fareston）を含めた抗エストロゲン剤；ならびにフルタミド
 、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン剤
 ；ならびに上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体など、腫瘍
 に対するホルモンの作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤も含まれる。

【0291】

他の多様な治療剤を、本明細書で記載されるMSFPと共に用いることができる。一実
 施形態では、MSFPを、抗炎症剤と共に投与する。抗炎症剤または抗炎症薬物には、ス
 テロイドおよびグルココルチコイド（ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、ヒド
 ロコルチゾン酢酸エステル、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロ
 ン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンを含めた）、アスピリン、イブプ
 ロフェン、ナプロキセンを含めた非ステロイド系抗炎症性薬物（NSAID）、メトトレ
 レキサート、スルファサラジン、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミド、および
 マイコフェノール酸が含まれるがこれらに限定されない。

【0292】

10

20

30

40

50

本明細書で記載されるMSFPを含む組成物は、がんおよび自己免疫性疾患および炎症性疾患が含まれるがこれらに限定されない、本明細書で記載される疾患に罹患する個体に投与することができる。ヒト疾患を処置するために *in vivo* で用いる場合は一般に、本明細書で記載されるMSFPを、投与前に医薬組成物へと組み込む。医薬組成物は、本明細書の別の個所で記載される通り、生理学的に許容される担体または賦形剤と組み合わせた、本明細書で記載されるMSFPのうちの1または複数を含む。医薬組成物を調製するには、有効量のMSFPのうちの1または複数、特定の投与方式に適することが当業者に公知である任意の医薬としての（1または複数の）担体または賦形剤と混合する。医薬としての担体は、液体の場合もあり、半液体の場合もあり、固体の場合もある。非経口適用、皮内適用、皮下適用、または局所適用に用いられる溶液または懸濁液には、例えば、滅菌希釈剤（水など）、生理食塩液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒；抗微生物剤（ベンジルアルコールおよびメチルパラベン、フェノールおよびクレゾール、水銀剤、クロロブタノール、メチルp-ヒドロキシ安息香酸エステルおよびプロピルp-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウム、ならびにベンゼトニウム塩化物など）；抗酸化剤（アスコルビン酸および亜硫酸水素ナトリウム；メチオニン、チオ硫酸ナトリウム、白金、カタラーゼ、クエン酸、システイン、チオグリセロール、チオグリコール酸、チオソルビトール、ブチル化ヒドロキシアニソール（*butylated hydroxanisol*）、ブチル化ヒドロキシトルエン、および／または没食子酸プロピルなど）；およびキレート化剤（エチレンジアミンテトラ酢酸（EDTA）など）；緩衝剤（酢酸、クエン酸、およびリン酸など）が含まれる。静脈内投与する場合、適切な担体には、生理学的生理食塩液またはリン酸緩衝生理食塩液（PBS）、ならびにグルコース、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、およびこれらの混合物などの増粘剤および可溶化剤を含有する溶液が含まれる。

10

20

【0293】

本明細書で記載されるMSFPを含む組成物は、徐放型処方物または徐放型コーティングなど、MSFPを体内からの急速な消失に対して保護する担体と共に調製することができる。このような担体には、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系、ならびにエチレンビニル酢酸、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、および当業者に公知である他の生体分解性ポリマー、生体適合性ポリマーなどの生体分解性ポリマー、生体適合性ポリマーなどであるがこれらに限定されない制御放出型処方物が含まれる。

30

【0294】

本MSFPは、多様ながんを処置するのに有用である。例えば、本発明の一実施形態は、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、白血病、形質細胞腫、肉腫、神経膠芽腫、胸腺腫、乳がん、前立腺がん、結腸直腸がん、腎臓がん、腎細胞がん、子宮がん、膵臓がん、食道がん、脳腫瘍、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、精巣がん、胃がん、食道がん、多発性骨髄腫、肝臓がん、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、および慢性リンパ性白血病（CLL）、または他のがんが含まれるがこれらに限定されないがんを、治療有効量の、本明細書で開示されるMSFPをがん患者へと投与することにより処置するための方法を提供する。投与後に、がんの進行および／または転移を、統計学的に有意な様式で（すなわち、当業者に公知の適切な対照と比べて）阻害するか、防止するか、またはこれを遅延させる量を有効と考える。

40

【0295】

別の実施形態は、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、白血病、形質細胞腫、肉腫、神経膠芽腫、胸腺腫、乳がん、前立腺がん、結腸直腸がん、腎臓がん、腎細胞がん、子宮がん、膵臓がん、食道がん、脳腫瘍、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、精巣がん、胃がん、食道がん、多発性骨髄腫、肝臓がん、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、および慢性リンパ性白血病（CLL）

50

L)、または他のがんが含まれるがこれらに限定されないがんの転移を、治療有効量（例えば、投与後に、がんの転移を、統計学的に有意な様式で、すなわち、当業者に公知の適切な対照と比べて、阻害するか、防止するか、またはこれを遅延させる量）の、本明細書で開示されるMSFPをがん患者へと投与することにより防止するための方法をもたらす。

【0296】

別の実施形態は、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、白血病、形質細胞腫、肉腫、神経膠芽腫、胸腺腫、乳がん、前立腺がん、結腸直腸がん、腎臓がん、腎細胞がん、子宮がん、膵臓がん、食道がん、脳腫瘍、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、精巣がん、胃がん、食道がん、多発性骨髄腫、肝臓がん、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、および慢性リンパ性白血病（CLL）、または他のがんが含まれるがこれらに限定されないがんを、治療有効量の、本明細書で開示されるMSFPをがん患者へと投与することにより防止するための方法をもたらす。

10

【0297】

別の実施形態は、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、白血病、形質細胞腫、肉腫、神経膠芽腫、胸腺腫、乳がん、前立腺がん、結腸直腸がん、腎臓がん、腎細胞がん、子宮がん、膵臓がん、食道がん、脳腫瘍、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、精巣がん、胃がん、食道がん、多発性骨髄腫、肝臓がん、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、および慢性リンパ性白血病（CLL）、または他のがんを、これらの疾患のうちの1または複数に罹患する患者に、治療有効量の、本明細書で開示されるMSFPを投与することにより、処置するか、その進行を阻害するか、またはこれを防止するための方法をもたらす。

20

【0298】

一態様では、本開示は、T細胞の活性化を方向付けるための方法であって、それを必要とする患者に、とりわけ、TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ またはこれらの組合せに結合するFabと、とりわけ、T細胞の活性化が所望される部位または細胞において、異なる標的、例えば、腫瘍特異的抗原または他の選り抜きの抗原に結合する結合ドメインとを含む融合部分を含む有効量のMSFPを投与するステップを含む方法を提供する。

30

【実施例】

【0299】

（実施例1）

ヒト化抗CD3抗体の生成

1) ハイブリドーマ細胞から全RNAを単離するステップ、2) ハイブリドーマの全RNAを逆転写（RT）させるステップ、および3) 特異的抗体遺伝子プライマーを用いて、HCおよびLCをPCR増幅するステップにより、確立された抗CD3ハイブリドーマから、重鎖および軽鎖の抗体遺伝子をクローニングした。RT-PCRは、37℃で2時間にわたり、M-muLV逆転写酵素（New England Biolabs）をoligo-dT₁₆プライマーと共に用いて実施した。抗体の重鎖遺伝子および軽鎖遺伝子を、HC5' : GAG ACA GAATTC GCCACC ATG GTG TTG GGG CTG AAG TG（配列番号103）、HC3' : GAG ACA GCGGCCGC CTA TTT ACC AGG GGA GCG AGA C（配列番号104）、およびLC5' : GAG ACA GAATTC GCCACC ATG GCC TGG ATT TCA CTT ATA C（配列番号105）、LC3' : GAG ACA GCGGCCGC TCA GGA ACA GTC AGC ACG GGA C（配列番号106）のプライマー対を用いてoligo-dT₁₆でプライミングした最初のcDNA鎖からPCR増幅した。5'プライマーは、抗体分泌シグナルへとアニールするようにデザインし、3'プライマーは、マウス抗体定常領域の3'末端へとアニールするようにデザインした。PCR産物を洗浄し、EcoRIおよびNot

40

50

Iで制限消化し、その後、293F一過性哺乳動物系においてDNA配列を決定し、組換えIgGを発現させるためのpcDNA3.3ベクターへとクローニングした。クローニングされた抗CD3抗体を、1F3と称する。配列番号23～25では、1F3 VHのCDR1、CDR2、およびCDR3のアミノ酸配列が提供される。配列番号26～28では、1F3 VLのCDR1、CDR2、およびCDR3のアミノ酸配列が提供される。

【0300】

1F3マウス抗体のヒト化には、従来のCDR移植法を用いた。特に、マウス1F3のアミノ酸配列を、ヒト生殖細胞系列配列(VBASE2; www.vbase2.org)に照らして整列させた。マウス1F3 VHは、ヒト生殖細胞系列セグメントのサブクラス3(VH3)と最も良好にマッチした。2つの代表的な生殖細胞系列セグメント、すなわち、VH3-23およびVH3-73を、マウス1F3 CDRが移植されるアクセプターとして選択した。VH3-23は、ヒト抗体において最も高頻度で見出されるVドメインであることが公知であり、比較的高い安定性を有する。VH3-73は、最も類似するHCDR2配列を有することから、類似するHCDR2構造およびHCDR2立体配座が示唆される。VLでは、最も良好にマッチしたヒト生殖細胞系列であるVLλ7aを、マウス1F3の軽鎖CDRのためのアクセプターとして選択した。初期のヒト化構築物の遺伝子は、Gblock法(Integrated DNA Technologies)により合成した。初期のヒト化構築物におけるさらなるアミノ酸変異は、オリゴヌクレオチドベースの部位指向変異誘発(Strategene)を用いて発生させた。

【0301】

以下の表1は、発生させた多様な重鎖可変領域および軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列についてまとめる。

【0302】

【表 1】

表 1: 1F3 および変異体の配列

構築物名	ヌクレオチド の配列番号	アミノ酸の配列 番号
mu-1F3 VHCDR1		23
mu-1F3 VHCDR2		24
mu-1F3 VHCDR3		25
mu-1F3 VLCDR1		26
mu-1F3 VLCDR2		27
mu-1F3 VLCDR3		28
hu-1F3-IgGHC	29	30
hu-1F3LC	31	32
hu-1F3-1VH	33	34
hu-1F3-1Fd	35	36
hu-1F3-2VH	37	38
hu-1F3-2Fd	39	40
hu-1F3-3VH	41	42
hu-1F3-3Fd	43	44
hu-1F3-4VH	45	46
hu-1F3-4Fd	47	48
hu-1F3-5VH	49	50
hu-1F3-5Fd	51	52
hu-1F3-11VH	53	54
hu-1F3-1VL	55	56
hu-1F3-2VL	57	58
hu-1F3-2LC	59	60
hu-1F3-3VL	61	62
hu-1F3-3LC	63	64
hu-1F3-4VL	65	66
hu-1F3-4LC	67	68
hu-1F3-5VL	69	70
hu-1F3-5LC	71	72
OKT3Fd	73	74
OKT3LC	75	76

多様なヒト化抗体／F a bは、以下の表 2 にまとめられる異なるヒト化 1 F 3 の V L と V H との対を用いて発生させた。

【 0 3 0 3 】

10

20

30

40

【表 2】

表 2: hu-1F3 IgG および Fab 変異体

ヒト化 VH	ヒト化 VL	
	hu-1F3-1VL	hu-1F3-2VL
hu-1F3-1VH	hu-1F3.1, hu-1F3 IgG	hu-1F3.6
hu-1F3-2VH	hu-1F3.2	hu-1F3.7
hu-1F3-3VH	hu-1F3.3	hu-1F3.8
hu-1F3-4VH	hu-1F3.4	hu-1F3.9
hu-1F3-5VH	hu-1F3.5	hu-1F3.10
hu-1F3-11VH		

10

(実施例 2)

腫瘍抗原 E p C A M タンパク質の生成

ヒト E p C A M (上皮細胞接着分子) および カニクイザル E p C A M の細胞外ドメインに対応する遺伝子を、ヒトおよびサル の c D N A ライブラリーから、制限部位を伴うプライマー (配列番号 107: N 末端プライマー: G C G T A T C C A T G G A T G G C G C C C C C G G C A G G T C、配列番号 108: C 末端プライマー: G C G T A T G C G G C C G C T T T T A G A C C C T G C A T T G A G) を P h u s i o n ポリメラーゼ (New E n g l a n d B i o l a b s) と共に用いて P C R 増幅した (98℃、1 分間; 98℃で 15 秒間、50℃で 20 秒間、および 72℃で 20 秒間を 30 サイクル; 72℃で 5 分間)。洗浄された P C R 産物 (F e r m e n t a s l i f e s c i e n c e s) を制限消化 (N c o I および N o t I) し、p c D N A 3.3 ベクター内のヒト F c 遺伝子の N 末端へとクローニングした。配列番号 1 および 5 では、ヒト E p C A M の細胞外ドメイン (E C D) および全長ポリヌクレオチド配列が提示され、配列番号 2 および 6 では、コードされるアミノ酸配列が提示される。配列番号 3 および 7 では、カニクイザル E p C A M E C D および全長ポリヌクレオチド配列が提示され、配列番号 4 および 8 では、コードされるアミノ酸配列が提示される。また、ヒト C D 3 イプシロン E C D、F c および カニクイザル C D 3 イプシロン E C D、F c ノブ変異体配列も生成させ、それぞれ、配列番号 9 および 11 (ポリヌクレオチド)、ならびにそれぞれ、配列番号 10 および 12 (アミノ酸) に提示する。ヒト C D 3 イプシロン E C D、F c および カニクイザル C D 3 イプシロン E C D、F c のホール変異体配列も生成させ、それぞれ、配列番号 13 および 15 (ポリヌクレオチド)、ならびにそれぞれ、配列番号 14 および 16 (アミノ酸) に提示する。当技術分野で公知の通り、ノブ変異体およびホール変異体は、ヘテロ二量体化を形成するのに用いられる (例えば、R i d g e w a y ら (1996 年)、P r o t e i n E n g i n e e r i n g、9 巻: 617~621 頁を参照されたい)。

20

30

40

【0304】

(実施例 3)

ヒト S c F v ファージディスプレイを用いる抗 E p C A M 抗体の生成

一般的なプロトコールは、「P h a g e d i s p l a y t e c h n o l o g y - a l a b o r a t o r y m a n u a l」(C a r l o s F. B a r b a s I I I、D e n n i s R. B u r t o n、J a m i e K. S c o t t、G r e g g J. S i l v e r m a n 編、2001 年、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s) において言及されている。ナイーブヒト s c F v ファージディスプレイライブラリー (V i v a B i o t e c h、S h a n g h a i、C h i n a) を、E p C A M 特異的抗体を単離するために用いた。ラウンド 1 のファージ選択の

50

ために以下のステップを使用した：1) 50 μ l のヒトナイーブ s c F v ライブラリーを、3 % の脱脂粉乳 / P B S (M P B S) 500 μ l でブロッキングした；2) ミルクでブロッキングしたファージを、5 μ g / ml の F c であらかじめコーティングした I m m u n o t u b e と共に、室温で30分間を2回繰り返してインキュベートする；3) F c タンパク質を、上記の枯渇させたファージへと、500 μ g / ml の最終濃度で添加し、室温でインキュベートして、抗 F c s c F v を提示するファージをさらに捕捉する；4) 上記のファージ溶液を、室温で1時間にわたり、h u E p C A M. F c でコーティングした (5 μ g / ml の濃度でコーティングし、M P B S でブロッキングした) I m m u n o t u b e と共にインキュベートする；5) この I m m u n o T u b e を、P B S T で3回にわたり洗浄した (0.1 % の T w e e n - 20 を含有する P B S) 後、P B S で3回にわたり洗浄した；6) 結合したファージを、調製されたばかりの100 mM のトリエチルアミン溶液500 μ l により、室温で10分間にわたり溶出させた；7) 溶出させたファージを用いて、37 $^{\circ}$ C で30分間にわたり静置し、30分間にわたり200 r p m で振とうしながら、対数中期の T G 1 細胞5 ml に感染させた；8) 溶出させたファージを再度感染させた T G 1 細胞を、4 % のブドウ糖および100 μ g / ml のアンピシリンを補充した2倍濃度の Y T 寒天による大型の N u n c スクエアプレート上、30 $^{\circ}$ C で一晩にわたり成長させた；9) 一晩にわたり成長させた T G 1 細胞をプレートから削り落とし、25 ml の2倍濃度の Y T 培地 (100 μ g / ml のアンピシリンおよび2 % のブドウ糖を添加) へと接種し、37 $^{\circ}$ C で O D 600 まで成長させた；10) ヘルパーファージ K O 7 を T G 1 培養物へと添加して、ファージをレスキューした (37 $^{\circ}$ C で30分間にわたり静置し、30分間にわたり振とうした)；11) 重複感染 T G 1 細胞を静かにペレット化させ、100 μ g / ml のアンピシリンおよび100 μ g / ml のカナマイシンを補充した2倍濃度の Y T 培地へと再懸濁させて、37 $^{\circ}$ C で一晩にわたり振とうした；12) 一晩にわたる培養物を遠心分離し、20 % の P E G 8000 1 / 5 容量を、ファージを含有する清明化させた上清へと添加し、室温で30分間にわたりインキュベートした；13) 50 ml の円錐管により3000 r p m で20分間にわたり遠心分離することにより、沈殿したファージをペレット化させた；14) ペレット化させたファージを、P B S 緩衝液中へと再懸濁させ、次の選択ラウンドにおいて用いる準備ができる。

【0305】

ラウンド2の選択は、上記と同じステップを用いて、カニクイザル E p C A M. F c について行った。ラウンド2の選択から溶出させたファージを、T G 1 細胞へと再導入し、単一のコロニーごとに、2倍濃度の Y T (100 μ g / ml のアンピシリンおよび2 % のブドウ糖) プレート上に播種した。単一のコロニーを96ウェルプレートへと採取し、2連のプレートを試料用のマスタープレートとして作製した。96ウェルプレート内の個別のクローンファージを、小容量用に調整した上記と類似するステップを用いて成長させた。清明化させたファージ上清 (96ウェルプレートの3000 r p m で5分間にわたる遠心分離により清明化させた) を、以下のステップを用いるヒト E p C A M. F c 抗原およびカニクイザル E p C A M. F c 抗原についての E L I S A 結合アッセイに用いた：1) ファージ溶液を5 % の M P B S 中1 : 5 に希釈し、室温で1時間にわたりインキュベートした；2) ファージ M P B S 溶液を、M P B S を用いてブロッキングしながら h u E p C A M. F c または c y n o E p C A M. F c であらかじめコーティングした96ウェル M a x i S o r p プレートへと移した；3) プレートを室温で1時間にわたりインキュベートした後、P B S T を用いて3回にわたり洗浄した；4) 1 / 1000 に希釈した抗 M 13 / H R P コンジュゲート100 μ l を、プレートへと添加し、室温で1時間にわたりインキュベートした；5) P B S T で3回にわたり洗浄した後、100 μ l の T M B ペルオキシダーゼ基質溶液をプレートへと添加し、暗所で20分間にわたりインキュベートした；6) 0.25 M の硫酸50 μ l を、プレート上の各ウェルへと添加し、基質の発光を停止させた；7) 吸光度をマイクロプレートリーダー上、450 nm で読取った。E p C A M 陽性結合剤を、マスタープレートに由来する E. c o l i 原液を用いて D N A 配列決定した。

【0306】

(実施例4)

完全ヒト抗EpCAM抗体の最適化

抗EpCAM抗体のVH遺伝子およびVL遺伝子を、Gblock法(Integrated DNA Technologies)を用いて合成した。GblockによるV遺伝子は、ファージディスプレイ法から単離されたV遺伝子、またはV遺伝子産物の発現および／もしくは安定性を改善するようにデザインされた変異を含有するV遺伝子と同一であった。変異のデザインは、主に最も良好にマッチした生殖細胞系列配列もしくは最も良好にマッチした生殖細胞系列のコンセンサス配列(VBASE2; www.vbase2.org)との配列比較に基づくか、または相同なVドメイン構造を検証することを介する。GblockによるVHおよびVLを、PCR法を用いてscFvフォーマットへとアSEMBルした。例えば、EpCAM1.1は、VL残基1～3(Kabatによる番号付け; Kabatら(1991年)、「Sequences of proteins of immunological interest」、5版)の、EpCAM1.0内の「HVI」から「QSV」へのアミノ酸変化を含有する。後者の配列は、ヒト生殖細胞系列配列に従い共通である(VBASE2; www.vbase2.org)。EpCAM1.2は、EpCAM1.1と比較して、VHの1、5、6位、およびVLの39位(Kabatによる番号付け)において変異を含有する。EpCAM2.2は、親クローンと比較して、VHの5、6、13、40、76、77、81、82位およびVLの2、8、39、58位(Kabatによる番号付け)において複数の変異を含有する。抗EpCAM抗体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、以下の表3にまとめる。

【0307】

10

20

【表 3】

表 3: 抗 EpCAM 抗体の構築物

構築物名	ヌクレオチド の配列番号	アミノ酸の 配列番号
EpCAM1.1scFv	77	78
EpCAM1.1-OKT3Fd	79	80
EpCAM1.1-OKT3LC	81	82
EpCAM1.1-hu-1F3.1Fd	83	84
EpCAM1.1-hu-1F3.1LC	85	86
EpCAM1.2scFv	87	88
EpCAM1.2-hu-1F3Fd	89	90
EpCAM1.2-hu-1F3.1LC	91	92
EpCAM2.2scFv	93	94
EpCAM2.2-hu-1F3Fd	95	96
EpCAM2.2-hu-1F3.1LC	97	98
EpCAM2.2-Δ-hu-1F3.1Fd*	99	100
EpCAM2.2-Δ-hu-1F3.1LC*	101	102
EpCAM1.1 VHCDR1		139
EpCAM1.1 VHCDR2		140
EpCAM1.1 VHCDR3		141
EpCAM1.1 VLCDR1		142
EpCAM1.1 VLCDR2		143
EpCAM1.1 VLCDR3		144
EpCAM1.2 VHCDR1		139
EpCAM1.2 VHCDR2		140
EpCAM1.2 VHCDR3		141
EpCAM1.2 VLCDR1		142
EpCAM1.2 VLCDR2		143
EpCAM1.2 VLCDR3		144
EpCAM2.2 VHCDR1		145
EpCAM2.2 VHCDR2		146
EpCAM2.2 VHCDR3		147
EpCAM2.2 VLCDR1		148
EpCAM2.2 VLCDR2		149
EpCAM2.2 VLCDR3		150

* Δは、リンカーの欠如を示す。

以下にまとめる通り、抗 EpCAM 抗体および hu-1F3.1 による構築物を用いて、多様な MSFP タンパク質を発生させた。以下の概要中の scFv とは、抗 EpCAM scFv を指す。His タグは、各 Fab 内の Fd 鎖の C 末端に接合するが、図解には示さない。

【0308】

【化 1】

- scFv-D(H)-hu-1F3.1 Fab
 - scFv-hu-1F3.1VH-CH1
 - hu-1F3.1-LC
- scFv-(H)-hu-1F3.1 Fab
 - scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1VH-CH1
 - hu-1F3.1-LC
- scFv-D(L)-hu-1F3.1 Fab
 - hu-1F3.1VH-CH1
 - scFv-hu-1F3.1-LC
- scFv-(L)-hu-1F3.1 Fab
 - hu-1F3.1VH-CH1
 - scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1-LC
- scFv-D(H+L)-hu-1F3.1 Fab
 - scFv-hu-1F3.1VH-CH1
 - scFvhu-1F3.1-LC
- scFv-(H+L)-hu-1F3.1 Fab
 - scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1VH-CH1
 - scFv-GlyArgAla-hu-1F3.1-LC

10

(実施例 5)

組換え I g G、F c 融合体タンパク質、F a b、および F a b 融合タンパク質の発現および精製

20

F a b 融合タンパク質を、p c D N A および H E K 2 9 3 F 細胞懸濁液 (I n v i t r o g e n) を使用する一過性哺乳動物発現系において発現させた。発現構築物は、細胞培養物の 1 / 1 0 の容量の F - 1 7 合成培地 (I n v i t r o g e n) 中であらかじめ形成された D N A と 2 5 k d のポリエチレンイミン (P E I) との複合体 (重量で 1 : 3 の比の、D N A の直鎖状の 2 5 k d P E I との複合体) を添加しながら、H E K 2 9 3 F 細胞 (I n v i t r o g e n) へとトランスフェクトした。振とうしながら 5 % の加湿した C O 2 によるインキュベーター内で成長させたトランスフェクト細胞に、トランスフェクションの 2 4 時間後、2 0 % の T N 1 (O r g a n o t e c h n i e S A、F r a n c e) 2 5 m l を供給した。培養物上清を、通常トランスフェクションの 5 日後に採取し、タンパク質を、プロテイン A カラム (ヒト I g G 用および F c タンパク質用)、プロテイン G カラム (マウス I g G 用)、または H i s T r a p カラム (h i s タグづけした F a b 用および h i s タグづけした F a b 融合体用) (G E H e a l t h c a r e) を介するアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。M W カットオフ 1 0 k D のスピ

30

【0309】

(実施例 6)

40

マウス I F 3 I g G およびヒト化 I F 3 I g G ならびに F a b の、C D 3 イプシロン類縁タンパク質への結合

ウェスタンブロット、E L I S A、およびフローサイトメトリー解析を用いて、マウス I F 3 抗体およびヒト I F 3 抗体ならびに F a b の結合について研究した。特に、以下の 4 つのタンパク質試料を、5 % のメルカプトエタノールを伴う S D S - P A G E 試料緩衝液中で調製した (試料 1) ヒト C D 3 イプシロン / デルタ、F c (K - H) ; 2) カニクイザル C D 3 イプシロン / デルタ、F c (K - H) ; 3) ヒト C D 3 イプシロンアミノ酸 1 ~ 2 7、F c ; および 4) 対照ペプチド、F c 融合体 (C D 3 イプシロンアミノ酸 1 ~ 2 7、F c における最初の 1 6 残基の逆アミノ酸配列)。「F c (K - H)」とは、「K I H」法による F c 変異体 (R i d g e w a y ら (1 9 9 6 年)、P r o t e i n E

50

ngineering、9巻：617～621頁）を指し示す。各試料につき100ng
ずつのタンパク質を、4～20%のトリス・グリシンゲル（Novex）上の各レーンに
ロードし、1倍濃度のSDSランニングバッファー（25mMのトリス、192mMのグ
リシン、0.1%のSDS、pH8.3）中、125Vで1時間にわたり試料を泳動させ
た。タンパク質バンドを、Novex転写モジュールを用いて、20%のメタノールを伴
う1倍濃度のSDSランニングバッファー中のニトロセルロース（NC）膜へと転写した
。NC膜は、5%の粉乳TBS-Tでブロッキングした後、室温で1時間にわたり、1u
g/mlのビオチニル化マウス1F3 IgGまたはビオチニル化hu-1F3 IgG
とのインキュベーションを行った。5分間ずつ3回にわたる洗浄の後、膜を、1：300
0に希釈したストレプトアビジン-HRPコンジュゲートと共に、1時間にわたりインキ
ュベートした。10分間ずつ3回にわたる洗浄の後、膜をECL試薬で現像し、シグナル
をKodak製フィルムへと曝露した。

10

【0310】

図9において示される通り、マウス1F3 IgGおよび1F3のヒト化形は、この抗
原パネルを、極めて類似する様式で認識した。とりわけ、1）マウス1F3 IgGおよ
びhu-1F3 IgGのいずれも、変性させたヒトCD3イプシロン／デルタおよびカ
ニクイザルCD3イプシロン／デルタに結合することが可能であり；2）いずれの抗体も
、CD3イプシロンのN末端のアミノ酸1～27（配列番号18）に対応するペプチド配
列を含有する変性Fc融合体タンパク質に結合することが可能であり；3）マウス1F3
IgGまたはhu-1F3 IgGのいずれも、対照ペプチド（配列番号20）とのFc
融合体タンパク質には結合しない。この実験からの結果は、1F3がCD3イプシロン
に対して特異的であり、エピトープが、イプシロンサブユニットのN末端部分内にあるこ
とを強く示唆する。また、フローサイトメトリー解析も、ヒト1F3抗体およびマウス1
F3抗体について、ヒトPBMCに対する類似の結合パターンを示した（図10を参照され
たい）。低蛍光の細胞集団のMFIにおいて小さなシフトが観察されたことは注目に値
する。マウスFcのヒトFcガンマ受容体への結合が、ヒトFcの結合と比較してはるか
に低減されることは周知である。したがって、図10に示される結果は、hu-1F3
IgG内のヒトFcが、PBMC調製物中のこの免疫細胞集団（T細胞以外の）上のFc
ガンマ受容体に結合し、小さなMFIシフトを引き起こしたことを示唆する。

20

【0311】

ELISA結合アッセイには、MaxiSorpプレートを用いた。50mMのNaH
CO₃中に1ug/mlの抗原50ulを用いて、プレートを4℃で一晩にわたりコーテ
ィングした後、ウェル1つ当たり200ulの5%の粉乳／TBS-0.05%のTwe
en 20（MTBS-T）とのインキュベーションを行った。抗体は通常5%のMTBS
-T中で希釈し、抗原でコーティングしたプレートへと移し、室温で静かに振とうしなが
ら1時間にわたりインキュベートした。ストレプトアビジン-HRP（ビオチニル化抗体
検出用）または抗hisタグ-HRPコンジュゲート（hisタグづけした抗体用）によ
り、結合した抗体を検出した。50mMクエン酸緩衝液中のABTS溶液を、マイクロプ
レートリーダー（Biotek）を用いるOD405の測定による検出に用いた。

30

【0312】

図11は、ビオチニル化マウス抗CD3抗体である1F3およびビオチニル化hu-1
F3 IgGの結合活性を示す。2つの抗体は、ヒトCD3イプシロン／デルタ「KIH
」Fcヘテロ二量体（Ridgewayら（1996年）、Protein Engin
eering、9巻：617～621頁）、カニクイザルCD3イプシロン／デルタ「K
IH」Fcヘテロ二量体、およびヒトCD3イプシロンN末端ペプチド（アミノ酸1～2
7）Fc融合体タンパク質への正の結合についての極めて類似するパターンを裏付けた。

40

【0313】

図13は、図11において記載した同じパネルの抗原への、抗hisタグ／HRPコン
ジュゲートおよびABTS基質により検出される10の代表的なヒト化Fabタンパク質
による結合を示す。hu-1F3.1 Fab、hu-1F3.2 Fab、hu-1F

50

3. 3 Fab、およびhu-1F3. 5 Fabからhu-1F3. 10 Fabについて、用量依存的な結合が観察された。Hu-1F3. 4 Fabの結合は、被験濃度範囲（5～8, 000 pM）においてもなお極めて低度である。Fabの、3つの抗原全てへの結合について、IgGと比較して僅かに低度なアフィニティーが判明した（図11）。Fabの一価の結合は、hu-1F3完全IgGの結合アフィニティー（図11における）と比較して低度な結合アフィニティーを説明しうる。

【0314】

10の代表的なヒト化Fabタンパク質のうちの5つ（hu-1F3. 1～hu-1F3. 5）を、CD3を発現させるJurkatヒトT細胞系への結合について調べた。図12において示される通り、ヒト化1F3 Fabは、Jurkat細胞に結合する。

【0315】

（実施例7）

EpCAM×CD3二重特異性Fab融合タンパク質の特徴付け

フローサイトメトリー解析およびELISAを用いて、EpCAM×CD3 Fab融合タンパク質を特徴付けた。詳細な材料および方法は、この例の末尾に記載する。

【0316】

FACSを用いる図14において示される通り、EpCAM×CD3 Fab融合タンパク質（MSFP）は、ヒトCD3を発現させるJurkat細胞に結合する。この実験では、Jurkat細胞へと結合したビオチニル化FabおよびFab融合体は、ストレプトアビジン-PEコンジュゲートにより検出した。OKT3 Fabは、Jurkat細胞上のCD3への結合を示したが、抗EpCAM scFvの、LC単独またはHCおよびLCの両方への融合は、OKT3 Fab部分のCD3への結合能力を完全に消失させた。ヒト化抗CD3抗体のFabであるhu-1F3は、Jurkat細胞上のCD3に結合することが可能であった。OKT3 Fab融合タンパク質とは異なり、抗EpCAM scFvをhu-1F3 LCのN末端へと融合させたところ、hu-1F3 Fabと同様のレベルの結合活性が保持されたのに対し、抗EpCAM scFvを、hu-1F3 FabのLCおよびHCへと同時に融合させると、Jurkat細胞上のCD3への正の結合が示されたが、低レベルでの結合であった。

【0317】

図15は、FACSにより示される、EpCAM×CD3 MSFPのヒトPBMCへの結合を示す。Jurkat細胞へと結合したビオチニル化FabおよびFab融合体は、ストレプトアビジン-PEコンジュゲートにより検出した。パネルAは、OKT3 Fabの、CD3を発現させるPBMC（T細胞）への結合を示す。抗EpCAM scFvをHCおよびLCの両方へと融合させたところ、OKT3 Fab部分の、CD3に対する結合能力は完全に消失した。パネルBは、ヒト化抗CD3抗体のFabであるhu-1F3. 1が、PBMC調製物中のT細胞上のCD3に結合することが可能なことを示す。OKT3 Fab融合タンパク質とは異なり、抗EpCAM×hu-1F3. 1 Fabを、FabのLCおよびHCへと同時に融合させたところ、Jurkat細胞上のCD3への正の結合が示されたが、結合レベルは、低レベルである。

【0318】

図16において示される通り、ELISA結合アッセイは、OKT3 FabおよびEpCAM1. 1×OKT3二重特異性Fab融合タンパク質は、組換えカニクイザルCD3イプシロン／デルタヘテロ二量体Fcタンパク質に対する結合活性を有さず；OKT3 Fabおよび二重特異性融合体は、組換えヒトCD3イプシロンN末端のペプチド（アミノ酸1～27. Fc融合体）に対する結合活性を有さないことを示した。OKT3は、サルCD3またはヒトCD3イプシロンのN末端に結合しないことが予測される。FabおよびFab融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合したビオチン抗体は、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲートの後、検出用のABTS基質を用いて検出した。

【0319】

図17は、 $hu-1F3$ FabおよびEpCAM1. $1 \times hu-1F3$. 1二重特異性Fab融合タンパク質(MSFP; Fab e)が、組換えカニクイザルCD3イプシロン/デルタヘテロ二量体Fcタンパク質(パネルA); および組換えヒトCD3イプシロンN末端のペプチド(アミノ酸1~27. Fc融合体)(パネルB)に結合することを裏付けるELISA結合の結果を示す。FabおよびFab融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合したビオチン抗体は、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲートの後、検出用のABTS基質を用いて検出した。

【0320】

図18において示される通り、ELISA結合アッセイは、 $hu-1F3$ FabおよびEpCAM1. $2 \times hu-1F3$. 1 MSFPが、組換えカニクイザルCD3イプシロン/デルタヘテロ二量体Fcタンパク質(パネルA); および組換えヒトCD3イプシロンN末端のペプチド(アミノ酸1~27. Fc融合体)(パネルB)に結合することを示した。FabおよびFab融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合させた標識融合タンパク質は、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲートの後、検出用のABTS基質を用いて検出した。

10

【0321】

図19において示される通り、ELISA結合アッセイは、 $hu-1F3$. 1 FabおよびEpCAM2. $2 \times hu-1F3$ MSFPが、組換えカニクイザルCD3イプシロン/デルタヘテロ二量体Fcタンパク質(パネルA); および組換えヒトCD3イプシロンN末端のペプチド(アミノ酸1~27. Fc融合体)(パネルB)に結合することを示した。FabおよびFab融合タンパク質をビオチニル化し、96ウェルプレート上に固定化した抗原へと結合させたビオチン標識融合タンパク質は、ストレプトアビジン-HRPコンジュゲートの後、検出用のABTS基質を用いて検出した。

20

【0322】

図20において示される通り、フローサイトメトリー解析は、EpCAM $\times$ CD3 MSFPの、全長ヒトEpCAM標的を細胞表面上で安定的に発現させるCHO細胞への結合を示した。抗CD3 Fabは、同じCHO細胞への結合を示さなかった。

【0323】

材料および方法：フローサイトメトリー解析(蛍光活性化細胞分取; FACS)を用いて、細胞への $1F3$ ベースのFab融合タンパク質(本明細書ではまた、Fab eとしても言及される; Fab融合タンパク質はまた一般に、MSFPとも称する)の結合を特徴付けた。一般に、細胞を、1%のBSA/PBS中、4℃で1時間にわたりブロッキングし、対象の抗体を、1%のBSA/PBSへと希釈し、4℃で1時間にわたるインキュベーションのために、ブロッキングした細胞へと添加した。1%BSA/PBSによる1回の洗浄の後、染色手順は、抗体または蛍光抗体コンジュゲートの利用可能性に応じて変化する。ある場合には、直接的な蛍光コンジュゲートを用いた。他の場合には、抗アフィニティータグ抗体(二次抗体)を用いて細胞と共にインキュベートした後、特定のフルオロフォアとコンジュゲートした抗種抗体を用いた。他の一部の実験では、蛍光コンジュゲートを伴う抗体(またはストレプトアビジンなど、他のアフィニティ試薬)を、二次抗体(第2の試薬)として直接的に用いた。図10、14、16、17、20A、および20Bでは、ビオチニル化抗体を用いて、細胞と共にインキュベートし、図12、15、18、19、および20C、および20Dでは、 his_6 タグづけする抗体を細胞とのインキュベーションに用いた後で、抗 his タグ抗体を用い、最終的な検出は、抗マウス-PEコンジュゲートを介する。

30

40

【0324】

(実施例8)

EpCAM $\times$ CD3二重特異性Fab融合タンパク質はT細胞を媒介する細胞殺滅活性の方向付けを変化させる

細胞殺滅アッセイを用いて、EpCAM $\times$ CD3二重特異性Fab融合タンパク質が、T細胞を媒介する標的細胞の殺滅の方向付けを変化させる能力を調べた。

50

【0325】

図21において示される通り、FACSベースのアッセイ（詳細はこの例の末尾に記載される）は、EpCAM×CD3二重特異性Fab融合タンパク質が、T細胞を媒介する標的細胞殺滅活性の方向付けを腫瘍標的依存的な様式で変化させることを裏付けた。このアッセイでは、標的細胞（ヒトEpCAM-FLを細胞表面上で安定的に発現させるCHO細胞（図21、パネルA、B、D）および対照細胞（CHOだけ、図21パネルC）を、アッセイの前にPKH-26蛍光色素で標識した。TP3（Invitrogen）を用いて、アッセイの完了時に死滅細胞を同定した。このアッセイでは、標的死滅細胞を右上四分図中のカウントから同定し、標的生細胞を左上四分図から同定した。EpCAMを発現させるCHO細胞であって、PBMCを伴わないが、二重特異性抗体を伴ってインキュベートされた（20時間にわたり）CHO細胞は、PKH-26標識集団（TP3陽性）中約1.4%の死滅細胞を示し（図21；パネルA）；EpCAMを発現させるCHO細胞であって、PBMCを伴うが、二重特異性抗体を伴わずにインキュベートされた（20時間にわたり）CHO細胞は、PKH-26標識集団中約14%の死滅細胞を示し（図21；パネルB）；EpCAMを発現させないCHO細胞であって、PBMCおよび二重特異性抗体と共にインキュベートされた（20時間にわたり）CHO細胞の死滅細胞は、約14%であり（図21；パネルC）；EpCAMを発現させるCHO細胞であって、PBMCおよび例示的な二重特異性Fab融合体と共にインキュベートされた（20時間にわたり）CHO細胞の死滅細胞カウントは、約64%であった（図21；パネルD）。

10

【0326】

図22は、上記の図21のパネルDにおいて多様な濃度のEpCAM×CD3二重特異性Fab融合体について記載した殺滅データをプロットする。OKT3 Fabおよび融合タンパク質は、方向付けを変化させた著明な細胞溶解活性を欠き（図22；パネルA）；hu-1F3.1 Fabが、標的細胞に対する活性を示さなかったのに対し、EpCAM1.1×hu-1F3.1 MSFPは、高レベルの活性を示し、融合タンパク質濃度が60pMであっても高い活性レベルを維持し（図22、パネルB）；EpCAM1.2×hu-1F3.1 MSFPによる用量依存的な活性が検出され（図22、パネルC）；EpCAM2.2 scFvのhu-1F3.1 Fabとの単一融合体について、用量依存的な細胞溶解活性が検出され（図22、パネルD）；EpCAM2.2 scFvのhu-1F3.1 FabのHCおよびLCの両方との二重融合体については、最大で50%の細胞集団の殺滅が観察され、その濃度が60pMという低濃度のときも、高い活性レベル（約40%）を維持した。殺滅活性百分率は、対照アッセイ（EpCAM-CHO+PBMC）における死滅細胞の百分率を、試料アッセイにおける死滅細胞の百分率から減じることにより計算した。

20

30

【0327】

図23は、EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1 MSFPによるT細胞の活性化が、腫瘍標的依存的であることを示す。パネルA) EpCAMを発現させないCHOの存在下において、EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1 (30nM)と共にインキュベートされたPBMCが、FACSアッセイにより検出される、CD69の発現を介して測定される基底レベルのT細胞の活性化を結果としてもたらしたことを示す図であり；パネルB) EpCAMを発現させないCHOの存在下において、EpCAM2.2-(H+L)-hu-1F3.1と共にインキュベートされた（30nM、16時間）PBMCが、FACSアッセイにより検出される、CD69の発現を介して測定されるT細胞の活性化の著明な増大を結果としてもたらしたことを示す図である。

40

【0328】

材料および方法：アッセイの前に、標的細胞をPKH-26色素（Sigma）（FL2におけるシグナルの検出）で標識した。アッセイにおいて死滅させた標的細胞は、TO-PRO-3（TP3）色素（Invitrogen）（FL4におけるシグナルの検出）を添加することにより同定した。PKH-26による標的細胞の標識化は、製造元の指示書に従い実施した。特に、2百万個の標的細胞を、無血清完全培地で洗浄し、0.5m

50

1の希釈剤C（製品キット中に提供されている）中で再懸濁させた。また、1 mMのPKH-26色素2 μ lも、0.5 mlの希釈液C中で希釈した。次いで、希釈した色素を標的細胞調製物へと添加し、室温で5分間にわたりインキュベートした。2 mlのウシ胎仔血清を混合物へと添加し、2分間にわたりインキュベートして、標識化反応を停止させた。標識した細胞を完全培地で3回にわたり洗浄し、使用のために完全培地中で再懸濁させた。標識した細胞をカウントし、生存率について点検した。細胞殺滅アッセイのために、完全培地中に100 μ lの標的細胞とPBMCとの混合物をFACSチューブへと添加した後、完全細胞培養培地中に100 μ lの抗体溶液を添加し、CO₂によるインキュベーター内で20時間にわたりインキュベートした。アッセイの終了時、FACSCaliburフローサイトメーター上でのFACSアッセイの直前に、10 μ MのTO-PRO-3（TP3）5 μ lを細胞へと添加した。PKH-26標識細胞は、2～3 log領域（FL2）に配置された。FL2シグナルがlog 20を超える細胞を、標的細胞と考えた。FL4シグナル（TP3）がlog 30を超える細胞を、死滅細胞と考えた。標的死滅細胞は右上四分図からカウントし、標的生細胞は左上四分図からカウントした（図21を参照されたい）。各試料につきのべ5,000回ずつの標的細胞イベントを収集した。細胞溶解活性は、対照アッセイ（EpCAMを発現させる標的細胞にPBMCを加える）の死滅細胞カウントを、試料アッセイ（EpCAMを発現させる標的細胞にPBMCおよび抗体薬物を加える）の死滅細胞カウントから減じ、標的細胞の合計カウント5,000で除することにより計算した。細胞溶解活性の百分率は、上記の活性に100を乗じることにより計算した。

10

20

【0329】

まとめると、上記の例は、1F3抗CD3 Fabを含む本開示のMSFPが、適切な腫瘍標的細胞（例えば、EpCAMを発現させる細胞）の存在下に限りT細胞による殺滅の方向付けを変化させるように機能することを裏付ける。驚くべきことに、抗EpCAM-OKT3 Fab融合タンパク質は、CD3を発現させるJurkat T細胞に結合することが可能でなかった。これは、1F3 Fabにより認識されるCD3イプシロンエピトープが、1F3 Fab融合タンパク質の機能に重要であることを示唆する。上記の例において記載したデータは、本開示のMSFPの、T細胞の動員を介する多数のがんの処置を含めた多様な治療状況における使用を支持する。

【0330】

上記の多様な実施形態を組み合わせ、さらなる実施形態を提供することができる。本明細書で言及され、かつ／または出願データシートで列挙される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許刊行物の全ては、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。多様な特許、出願、および公開の概念を使用して、なおさらなる実施形態を提供することが必要な場合は、実施形態の態様を改変することができる。

30

【0331】

上記で詳述した説明に照らして、これらの変化および他の変化を実施形態へと施すことができる。一般に、以下の特許請求の範囲では、用いられる用語が、これらの特許請求の範囲を、本明細書および特許請求の範囲において開示された特定の実施形態へと限定するとみなすべきではなく、このような特許請求の範囲が権利を付与される同等物の完全な範囲と共に可能な全ての実施形態を包含するとみなすべきである。したがって、特許請求の範囲は、本開示により限定されるものではない。

40

【図 1】

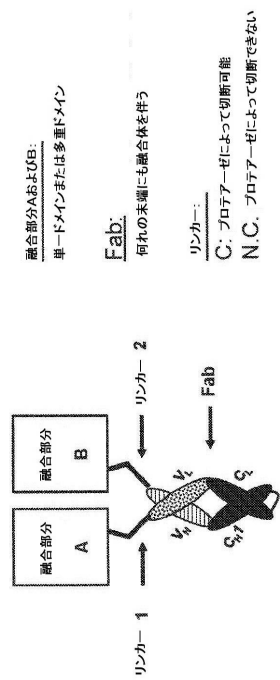


Figure 1

【図 2】

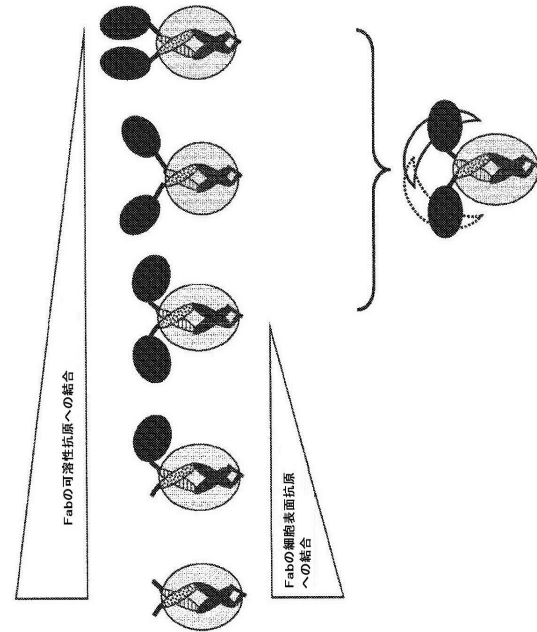


Figure 2

【図 3】

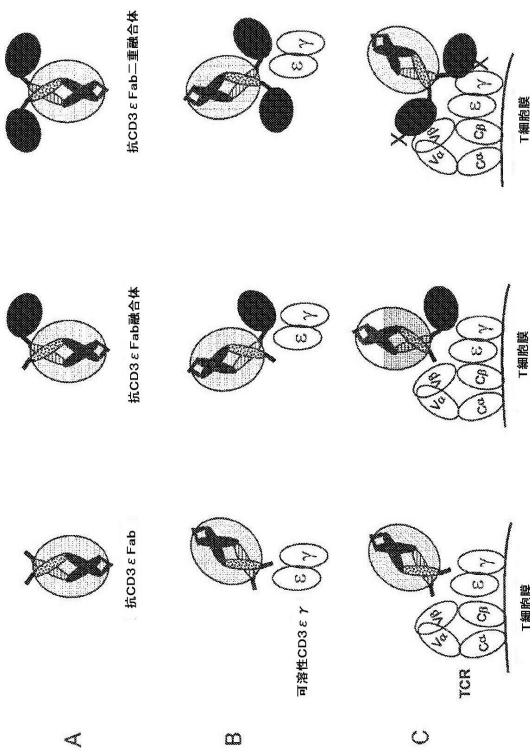


Figure 3

【図 4】

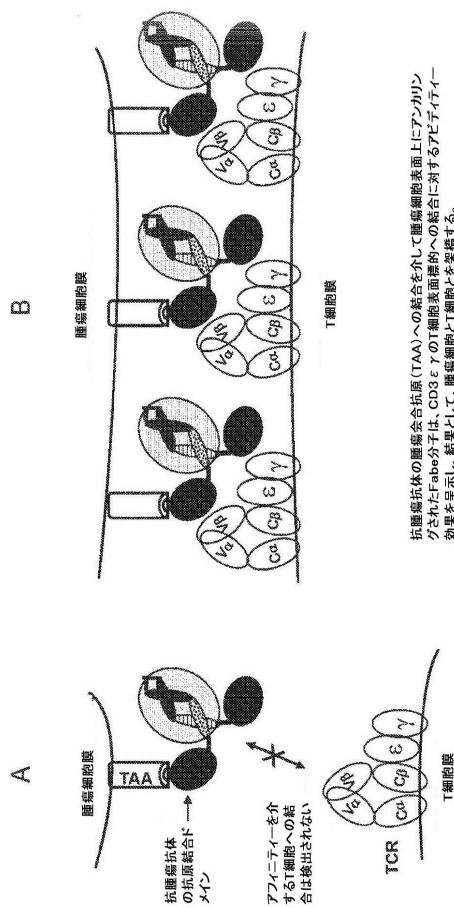
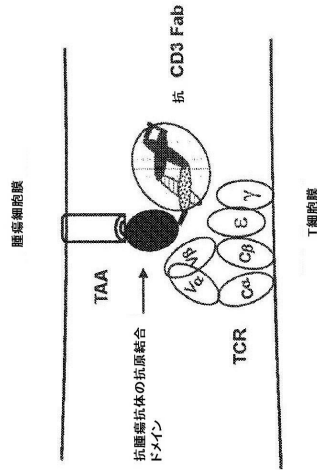


Figure 4

【図 5】



Fab融合タンパク質は、表面の腫瘍会合抗原 (TAA) およびT細胞表面標的、例えば、CD3εへ結合する結果として、腫瘍細胞とT細胞との接触形成をもたらす。

Figure 5

【図 6】

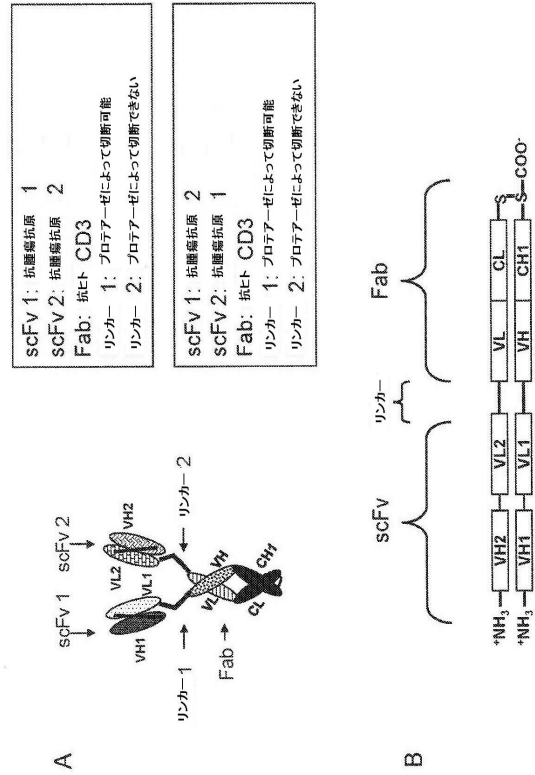


Figure 6

【図 7】

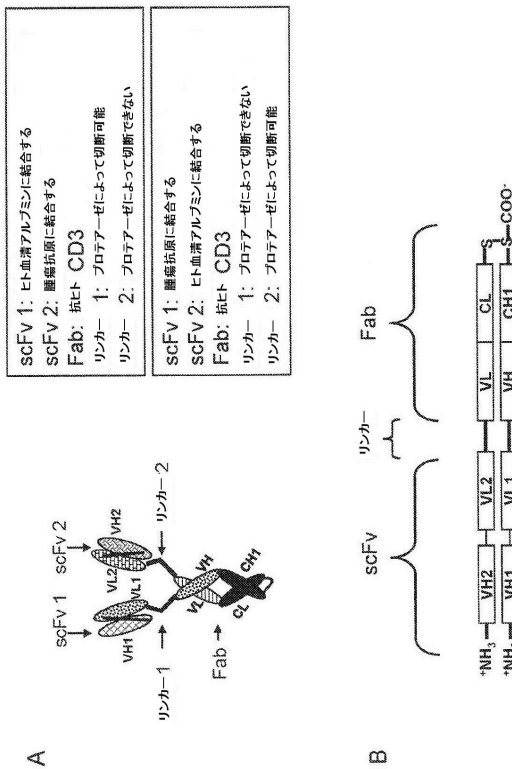
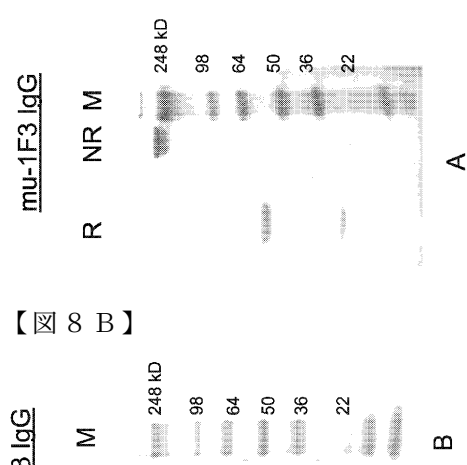
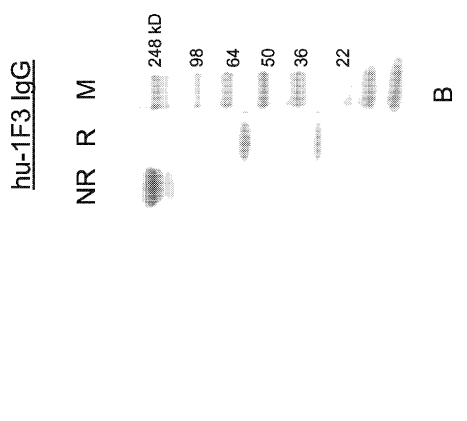


Figure 7

【図 8 A】



【図 8 B】



【図 9】

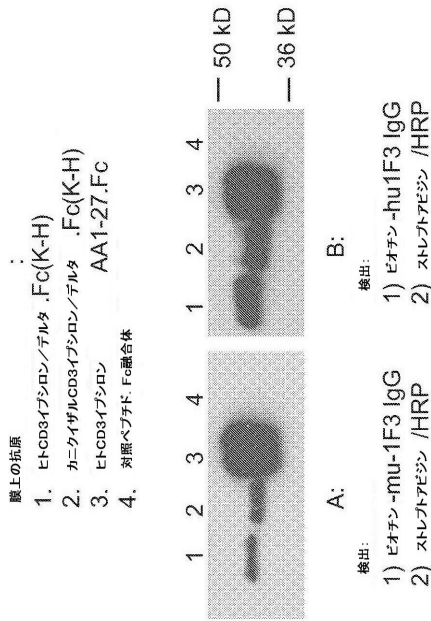


Figure 9

【図 10】

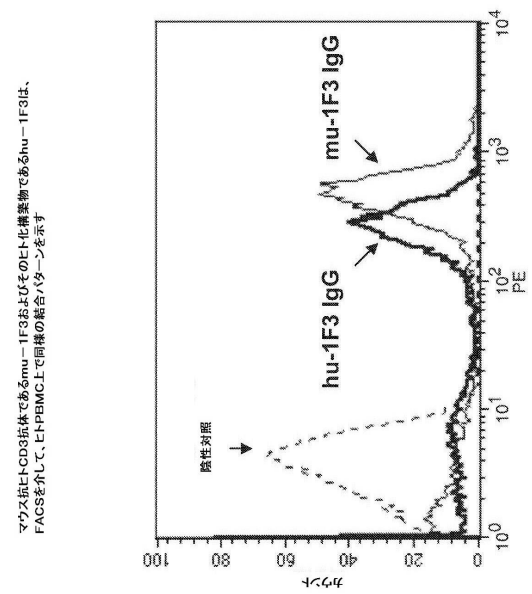


Figure 10

【図 1 1】

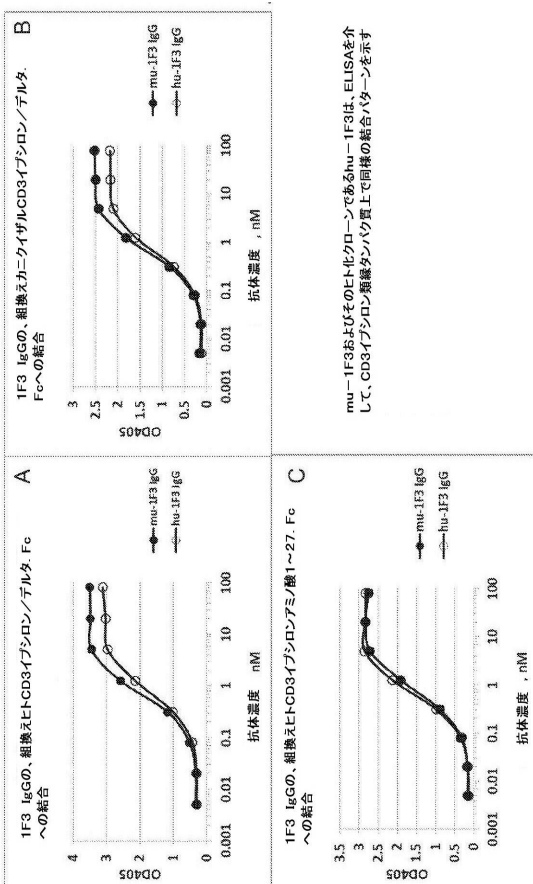


Figure 11

【図 1 2】

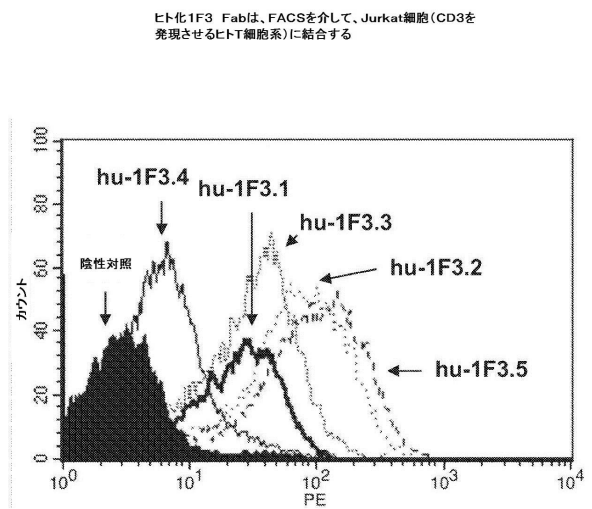


Figure 12

【図 13-1】

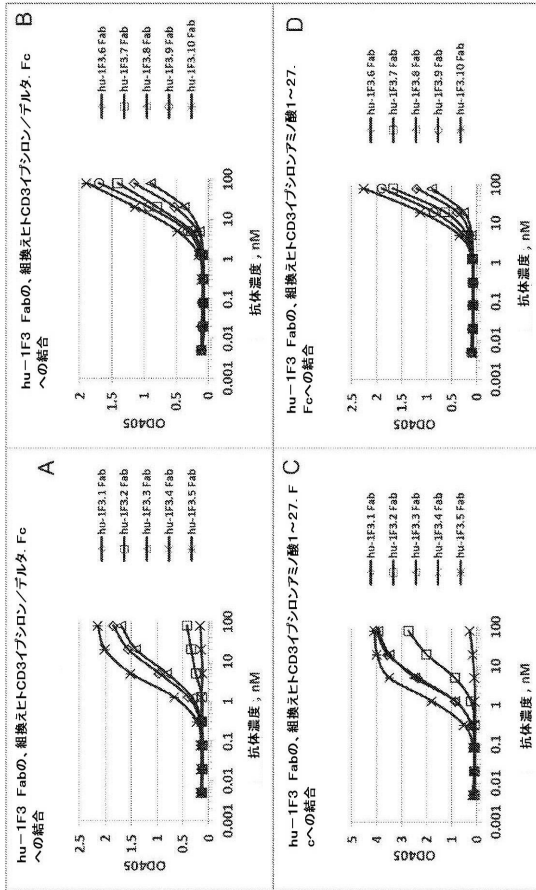


Figure 13

【図 13-2】

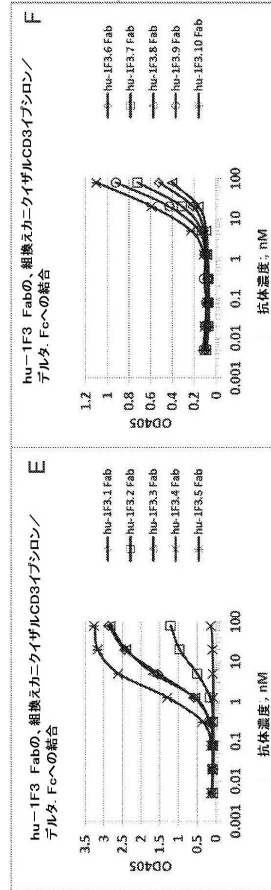


Figure 13 (続き)

【図 14】

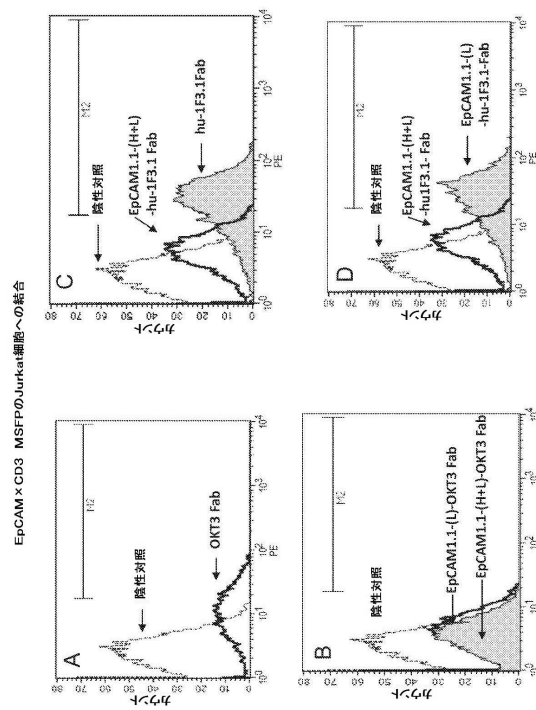


Figure 14

【図 15】

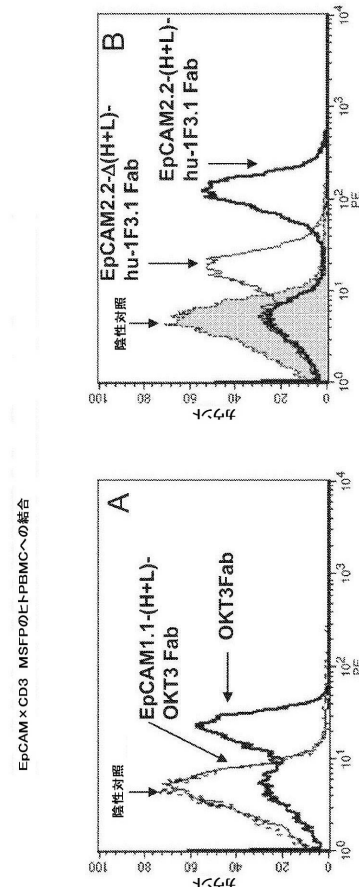


Figure 15

【図 16】

EpCAM1.1 × OKT3 MSFPの可溶性CD3類縁タンパク質への結合

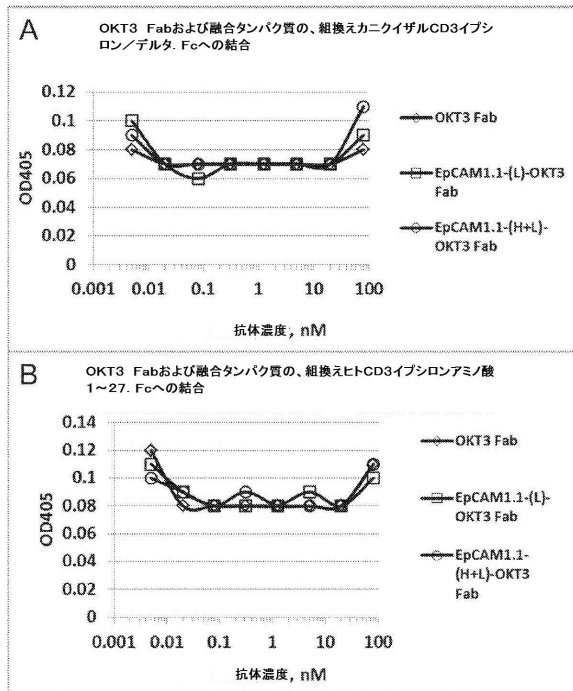


Figure 16

【図 17】

EpCAM1.1 × hu-1F3.1 MSFPの可溶性CD3類縁タンパク質への結合

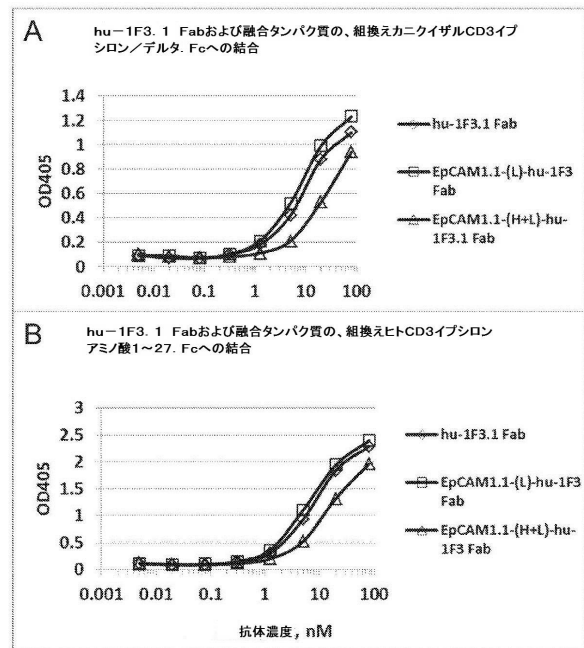


Figure 17

【図 18】

EpCAM1.2 × hu-1F3.1 MSFPの可溶性CD3類縁タンパク質への結合

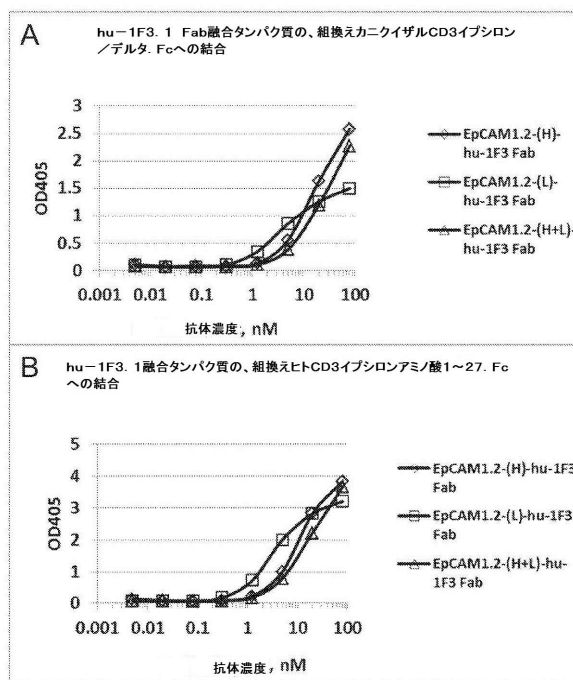


Figure 18

【図 19】

EpCAM2.2 × hu-1F3.1 MSFPの可溶性CD3類縁タンパク質への結合

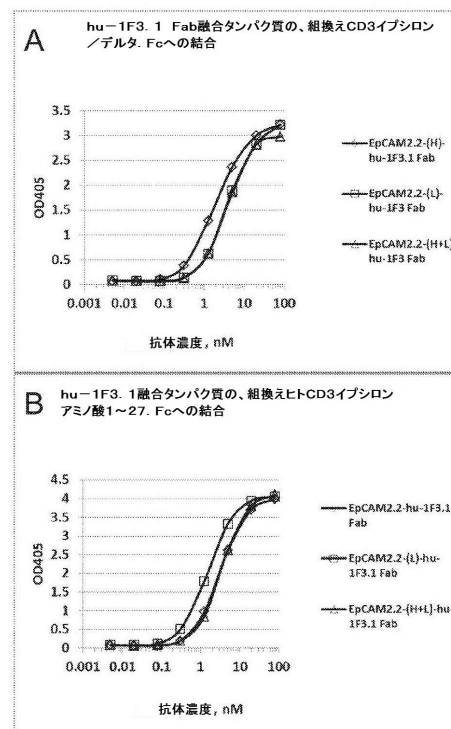


Figure 19

【図 20-1】

EpCAM×CD3 MSFPタンパク質の、EpCAMを発現するCHO細胞への結合

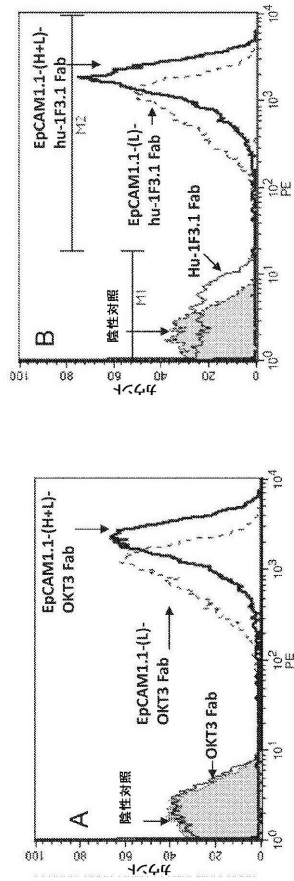


Figure 20

【図 20-2】

EpCAM×CD3 MSFPタンパク質の、EpCAMを発現するCHO細胞への結合

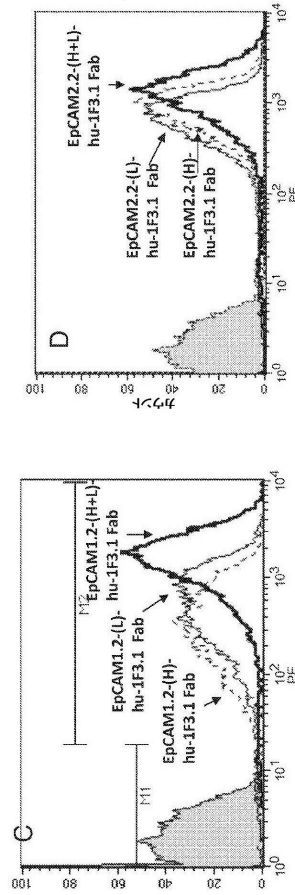


Figure 20 (続き)

【図 21-1】

FACS解析に基づく細胞傷害バイオアッセイ

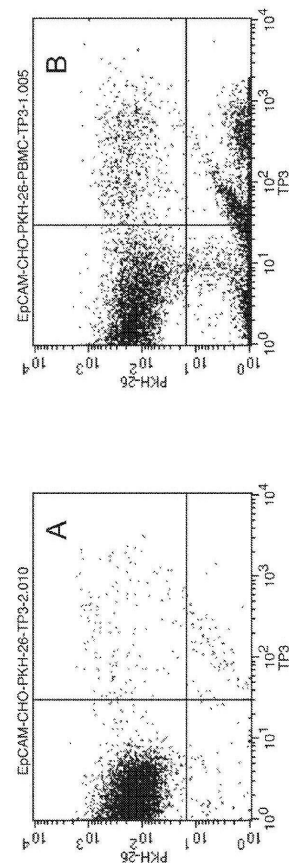


Figure 21

【図 21-2】

FACS解析に基づく細胞傷害バイオアッセイ

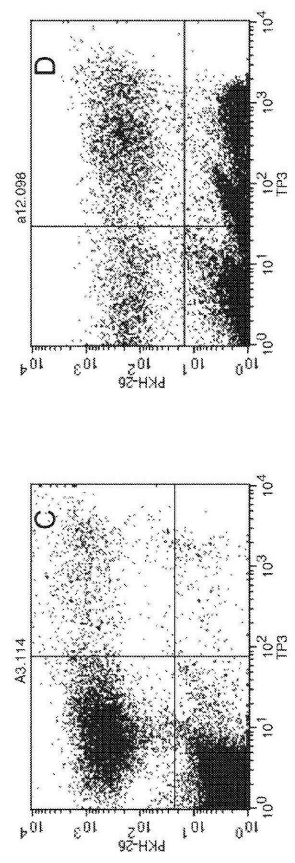


Figure 21 (続き)

【図 22-1】

EpCAM—CD3 MSFPIにより方向付けを変化させた、ヒトEpCAMを発現するCHO細胞の溶解

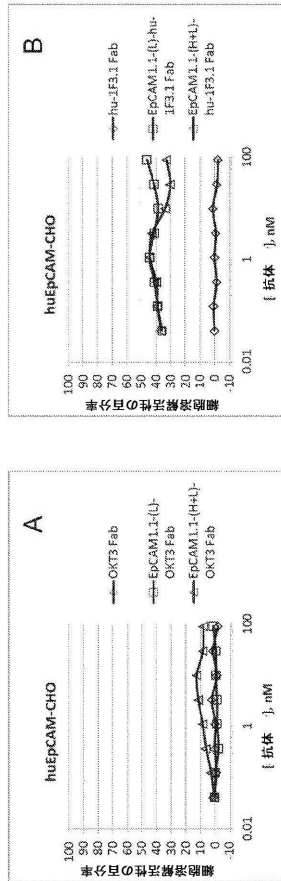


Figure 22

【図 22-2】

EpCAM—CD3 MSFPIにより方向付けを変化させた、ヒトEpCAMを発現するCHO細胞の溶解

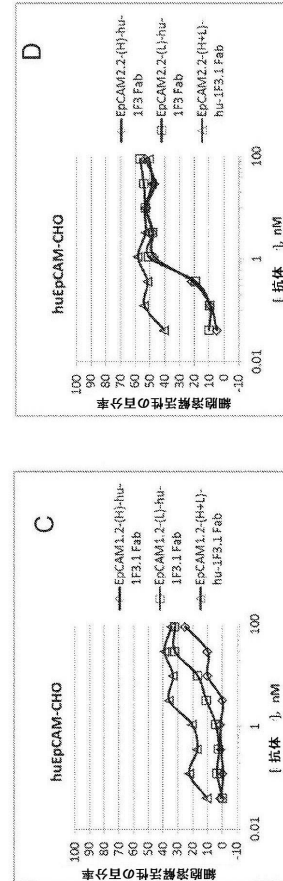


Figure 22 (続き)

【図 23】

EpCAM2.2×hu-1F3.1 MSFPIは、T細胞を、腫瘍標的依存的な様式で活性化する

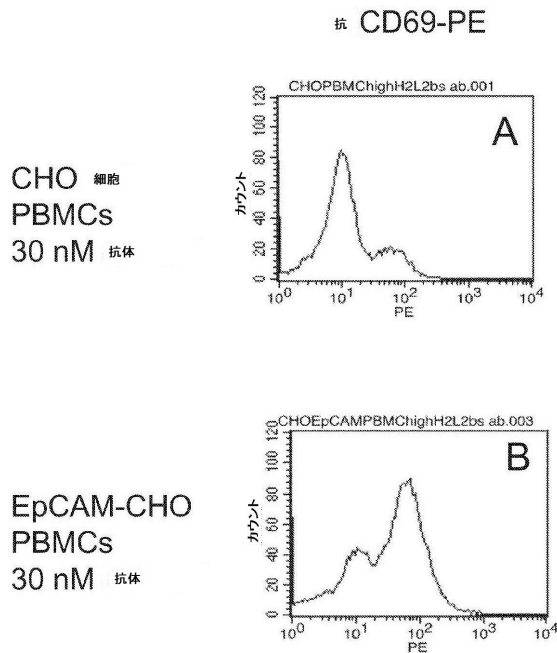


Figure 23

【配列表】

0006400470000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
A 6 1 K	9/64	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	P
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	47/50	(2017.01)	A 6 1 K	9/64	
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 3
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/50	
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
			C 1 2 P	21/02	C
			C 1 2 P	21/08	

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ゴウ, ホンシン

アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 0 6, ベルビュー, 1 5 1 エスティー アベニュー サ
ウスイースト 6 3 2 4

審査官 上村 直子

(56)参考文献 国際公開第99/037791 (WO, A1)

特表2010-524435 (JP, A)

特表2009-511521 (JP, A)

国際公開第2010/145792 (WO, A1)

特表2011-501671 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)

W P I D S / W P I X (S T N)