

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-520586

(P2016-520586A)

(43) 公表日 平成28年7月14日(2016.7.14)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 07 K 16/46 (2006.01)	C 07 K 16/46	Z N A	4 B 06 4
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A	4 B 06 5
C 12 P 21/08 (2006.01)	C 12 P 21/08		4 C 07 6
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/10		4 C 08 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N	4 C 08 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 107 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-513093 (P2016-513093)	(71) 出願人	510214045 ザイムワークス、インコーポレイテッド カナダ国、ブリティッシュ コロンビア州 ブイ6エイチ 3ブイ9、バンクーバー , ウエスト 8番 アベニュー 540- 1385
(86) (22) 出願日	平成26年5月8日 (2014.5.8)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成27年12月16日 (2015.12.16)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2014/037401	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02014/182970	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成26年11月13日 (2014.11.13)		
(31) 優先権主張番号	61/821,197		
(32) 優先日	平成25年5月8日 (2013.5.8)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】二重特異性HER2およびHER3抗原結合性構築物

(57) 【要約】

本明細書に記載されるのは、単離された二重特異性抗原結合性構築物、例えば、抗体である。二重特異性抗原結合性構築物は、2つの抗原結合性ポリペプチド構築物、例えば、FabおよびscFvを含む。第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、HER2 (ヒト上皮増殖因子受容体2) の細胞外ドメイン4 (ECD4) と一価でかつ特異的に結合する; 第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、HER3 (ヒト上皮増殖因子受容体3) の細胞外ドメイン (ECD) と一価でかつ特異的に結合する。一方の抗原結合性ポリペプチド構築物はFab型であり、もう一方の抗原結合性ポリペプチド構築物はscFv型である。二重特異性抗原結合性構築物は、二量体化のためのCH3ドメインをそれぞれが有する2つのFcポリペプチドを有するFcを含む。各Fcポリペプチドは、抗原結合性ポリペプチド構築物の1つのC末端と、リンカーを伴ってまたは伴わずに連結されている。

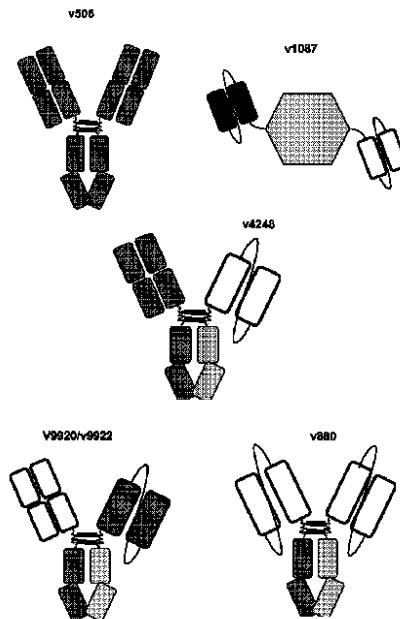


FIG. 33

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HER2(ヒト上皮増殖因子受容体2)の細胞外ドメイン4(ECD4)と一価でかつ特異的に結合する第1の抗原結合性ポリペプチド構築物；

HER3(ヒト上皮増殖因子受容体3)の細胞外ドメイン(ECD)と一価でかつ特異的に結合する第2の抗原結合性ポリペプチド構築物；

第1のCH3ドメインを含む第1のFcポリペプチドおよび第2のCH3ドメインを含む第2のFcポリペプチドを含み、第1のFcポリペプチドが第1の抗原結合性ポリペプチド構築物のC末端とリンカーを伴ってまたは伴わずに連結されており、第2のFcポリペプチドが第2の抗原結合性ポリペプチド構築物のC末端とリンカーを伴ってまたは伴わずに連結されている、Fcを含む、単離された二重特異性抗原結合性構築物であって、

第1の抗原結合性ポリペプチド構築物がFab型でありかつ第2の抗原結合性ポリペプチド構築物がscFv型であるか、または第1の抗原結合性ポリペプチド構築物がscFv型でありかつ第2の抗原結合性ポリペプチド構築物がFab型であり、かつ

HER2およびHER3を発現する細胞において、2つの第1の抗原結合性ポリペプチド構築物または2つの第2の抗原結合性ポリペプチド構築物を含む参照二価単一特異性抗体と比較して、より大きな最大結合(B_{max})を呈する、単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 2】

v4248からなる、請求項1記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 3】

i . 第1の抗原結合性ポリペプチド構築物が、v4248のVH1を含む第1のVHおよびv4248のVL1を含む第1のVLを含むFab型であり；

ii . 第2の抗原結合性ポリペプチド構築物が、v4248のVH2を含む第2のVHおよびv4248のVL2を含む第2のVLを含むscFv型をとる、請求項1記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 4】

第1の抗原結合性ポリペプチド構築物が、以下：

i . トラスツズマブの3つのVH CDR配列に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

ii . トラスツズマブの3つのVH CDR配列に対して100%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

iii . トラスツズマブの3つのVL CDR配列に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

iv . トラスツズマブの3つのVL CDR配列に対して100%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

v . トラスツズマブの6つのCDR配列に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む6つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

vi . トラスツズマブの6つのCDR配列に対して100%同一なアミノ酸配列を含む6つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

vii . トラスツズマブのVH配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドおよびトラスツズマブのVL配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドを含むポリペプチド構築物；

viii . トラスツズマブのVH配列に対して100%同一であるアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドおよびトラスツズマブのVL配列に対して100%同一であるアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドを含むポリペプチド構築物；ならびに

ix . HER2の4D5エピトープと結合するポリペプチド；

x . HER2 ECD4に対するトラスツズマブの結合を50%またはそれを上回って遮断するポリペプチド構築物

から選択される、請求項1記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 5】

10

20

30

40

50

第2の抗原結合性ポリペプチド構築物が、以下：

i . H3の3つのVH CDR配列に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

ii . H3の3つのVH CDR配列に対して100%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

iii . H3の3つのVL CDR配列に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

iv . H3の3つのVL CDR配列に対して100%同一なアミノ酸配列を含む3つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

v . H3の6つのCDR配列に対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を含む6つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；

vi . H3の6つのCDR配列に対して100%同一なアミノ酸配列を含む6つのCDR配列を含むポリペプチド構築物；
vii . H3のVH配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドおよびH3のVL配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドを含むポリペプチド構築物；

viii . H3のVH配列に対して少なくとも100%同一であるアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドおよびH3のVL配列に対して少なくとも100%同一であるアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドを含むポリペプチド構築物；

ix . HER3のECDに対する抗HER3 scFv H3の結合を50%またはそれを上回って遮断するポリペプチド構築物；ならびに

x . HER3のECDに対する結合をめぐってヘレグリンと競合するポリペプチド構築物から選択される、請求項1または請求項4記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 6】

第1の抗原結合性ポリペプチド構築物がFab型をとて第2の抗原結合性ポリペプチド構築物がscFv型をとる、請求項1～5のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 7】

第1の抗原結合性ポリペプチド構築物がscFv型をとて第2の抗原結合性ポリペプチド構築物がFab型をとる、請求項1、4または5記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 8】

第1の抗原結合性ポリペプチド構築物がscFv型をとて第2の抗原結合性ポリペプチド構築物がFab型をとり、かつ第2の抗原結合性ポリペプチド構築物が 定常軽鎖(CL)アミノ酸配列を含む、請求項1、4または5記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 9】

第1の抗原結合性ポリペプチド構築物がscFv型をとて第2の抗原結合性ポリペプチド構築物がFab型をとり、かつ第2の抗原結合性ポリペプチド構築物が CLアミノ酸配列を含む、請求項1、4または5記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 10】

scFv型をとる抗原結合性ポリペプチド構築物が、VH配列とVL配列との間へのジスルフィド結合の追加によって、またはscFvの表面疎水性を低下させることによって安定化されている、請求項1～9のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 11】

Fcが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgAおよびIgEを含む任意のクラス、またはIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4を含むIgGサブクラスのいずれか、またはそれらの組み合わせであるFcに由来する、請求項1～10のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 12】

少なくとも1つのCH3ドメインが、野生型ホモ二量体Fcと同等の安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進する少なくとも1つのアミノ酸改変を含む、請求項1～11のいずれか一

10

20

30

40

50

項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 1 3】

ヘテロ二量体Fcの二量体化したCH3ドメインが、示差走査熱量測定(DSC)による測定で、約68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77.5、78、79、80、81、82、83、84もしくは85またはそれよりも高い融解温度(T_m)を有する、請求項12記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 1 4】

二量体Fcが、產生された場合に約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98もしくは99%を上回る純度を有するヘテロ二量体形態である；またはFcが、発現された場合もしくは単細胞を介して発現された場合に約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98もしくは99%を上回る純度を有するヘテロ二量体形態である、請求項12または13のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

10

【請求項 1 5】

- i . 500nMもしくはそれ未満の解離定数(KD)でHER2と結合する；
- ii . 500nMもしくはそれ未満のKDでHER3と結合する；
- iii . HER3をより低活性のコンフォメーションにする；
- iv . 活性HER2-HER3ヘテロ二量体シグナル伝達を50～100%阻害する；
- v . EGFR-HER3ヘテロ二量体シグナル伝達を少なくとも50%阻害する；
- vi . HER3の、ヘレグリンにより刺激されるシグナル伝達を最大で100%遮断する；
- vii . 増殖因子の存在下もしくは非存在下における癌細胞の増殖を阻害する；
- viii . ヘレグリンの存在下における癌細胞の増殖を阻害する；
- ix . HER2および／もしくはHER3を発現する癌細胞による内部移行を受ける；
- x . HER2およびHER3を共発現する癌細胞において、参照二価单一特異性抗体と比較して内部移行の増大を示す；
- xi . 参照抗体と比較して、HER2および／もしくはHER3を発現する癌細胞に対するADCCの増大を媒介する；
- xii . HER2および／もしくはHER3を発現する乳癌細胞、卵巣癌細胞および胃癌細胞に対するADCCの増大を媒介する；

20

- xiii . HER2高発現、中発現もしくは低発現細胞、トリプルネガティブ乳癌細胞、エストロゲン受容体陽性乳癌細胞、およびトラスツズマブ抵抗性乳癌細胞から選択される、HER2および／もしくはHER3を発現する乳癌細胞に対するADCCの増大を媒介する；

30

- xiv . 癌を引き起こすことが知られている突然変異を含む、HER2および／もしくはHER3を発現する癌細胞に対するADCCの増大を媒介する；ならびに／または

xv . Fc RIIiaF、Fc RIIiaV、Fc RIIaH、Fc RIIaR、Fc RIibY、Fc RIA、およびC1qのうち1つもしくは複数と結合する、請求項1～14のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

40

【請求項 1 6】

アフコシル化されている、請求項1～15のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 1 7】

検出可能な標識または薬物とコンジュゲートされている、請求項1～16のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 1 8】

検出可能な標識が放射性化合物、蛍光性化合物、酵素、基質、エピトープタグまたは毒素である、請求項17記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 1 9】

薬物が毒素、化学療法剤、免疫調節薬、または放射性同位体である、請求項17記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項 2 0】

50

薬物が、メイタンシン、オーリスタチン、カリケアマイシン、またはそれらの誘導体から選択される、請求項17記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項21】

薬物が、DM1およびDM4から選択されるメイタンシンである、請求項17記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項22】

毒素が、SMCCリンカー（DM1）またはSPDBリンカー（DM4）によって、単離された二重特異性抗原結合性構築物とコンジュゲートされている、請求項21記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項23】

薬物-抗体比（DAR）が1.0～6.0または3.0～5.0または3.5～4.2である、請求項21～22のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物。

【請求項24】

請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物と、薬学的担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項25】

担体が、緩衝剤、抗酸化剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、糖質、脂質、キレート剤、安定化剤、または賦形剤を含む、請求項25記載の薬学的組成物。

【請求項26】

HER2およびHER3を発現する癌細胞の増殖を阻害する方法であって、癌細胞を、請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物の有効量と、癌細胞の増殖を阻害するのに十分な条件下で接触させる段階を含む、方法。

【請求項27】

癌細胞が乳癌細胞である、請求項26記載の方法。

【請求項28】

乳癌細胞が、HER2を3+で発現する乳癌細胞である、請求項27記載の方法。

【請求項29】

免疫組織化学による測定で乳癌細胞がHER2および／もしくはHER3を高レベルで発現するか、またはHER2および／もしくはHER3の遺伝子が該癌細胞において増幅されている、請求項27記載の方法。

【請求項30】

癌細胞における抗体依存性細胞性細胞傷害作用（ADCC）を誘導する方法であって、癌細胞を、請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物の有効量と、癌細胞におけるADCCを誘導するのに十分な条件下で接触させる段階を含む、方法。

【請求項31】

哺乳動物における、HER2およびHER3を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の増殖（growth）および／または増殖(proliferation)を阻害する方法であって、以下の段階を含む、方法：

請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物または請求項24もしくは25記載の薬学的組成物の有効量を哺乳動物に投与する段階であって、それによって、哺乳動物における、HER2およびHER3を発現する1つまたは複数の腫瘍細胞の増殖（growth）および／または増殖(proliferation)を阻害する、段階。

【請求項32】

哺乳動物における、HER2および／またはHER3の過剰発現によって特徴づけられる腫瘍を治療する方法であって、以下の段階を含む、方法：

請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物または請求項24もしくは25記載の薬学的組成物の有効量を哺乳動物に投与する段階であって、それによって、哺乳動物における、HER2および／またはHER3の過剰発現によって特徴づけられる腫瘍を治療する、段階。

【請求項33】

10

20

30

40

50

哺乳動物における、低レベルのHER2および／またはHER3を発現する腫瘍を治療する方法であって、以下の段階を含む、方法：

請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物または請求項24もしくは25記載の薬学的組成物の有効量を哺乳動物に投与する段階であって、それによって、哺乳動物における、低レベルのHER2および／またはHER3を発現する腫瘍を治療する、段階。

【請求項 3 4】

哺乳動物における、HER2およびHER3を共発現する腫瘍を治療する方法であって、以下の段階を含む、方法：

請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物または請求項24もしくは25記載の薬学的組成物の有効量を哺乳動物に投与する段階であって、それによって、哺乳動物における、HER2およびHER3を共発現する腫瘍を治療する、段階。 10

【請求項 3 5】

腫瘍が、乳癌、結腸直腸癌、肝癌、卵巣癌、脾癌、前立腺癌、胃癌、または肺癌腫瘍である、請求項31～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 6】

腫瘍が乳癌腫瘍である、請求項31～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 7】

乳癌が、基底細胞様乳癌、HER2リッチ(HER2-enriched)乳癌、ルミナルA乳癌、ルミナルB乳癌、または正常様トリプルネガティブ乳癌から選択されるトリプルネガティブ乳癌である、請求項36記載の方法。 20

【請求項 3 8】

腫瘍が、エストロゲン受容体陽性(ER+)BRCA関連乳癌、結腸直腸腺癌、肝臓の肝細胞癌、脾臓腺癌、前立腺腺癌、胃腺癌、または肺腺癌腫瘍である、請求項31～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項 3 9】

腫瘍が、トラスツズマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブエムタンシン(T-DM1)、およびそれらの組み合わせから選択される抗HER2抗体治療に対して不応性または抵抗性である、請求項31～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 0】

腫瘍が、抗HER3抗体、ラバチニブ、エルロチニブ、ゲフィニチブ、またはerbBファミリーシグナル伝達の他の小分子阻害薬に対して不応性または抵抗性である、請求項31～38のいずれか一項記載の方法。 30

【請求項 4 1】

腫瘍が化学療法に対して不応性である、請求項31～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 2】

腫瘍がHER2を1+、2+または3+のレベルで発現する、請求項31～41のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 3】

哺乳動物がヒトまたは非ヒト靈長動物である、請求項31～42のいずれか一項記載の方法。 40

【請求項 4 4】

腫瘍に対して細胞分裂抑制性であるかまたは腫瘍に対して細胞傷害性である、請求項31～43のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 5】

哺乳動物の全生存期間を増加させる、請求項31～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 6】

投与する段階が、静脈内注射、腹腔内注射、または皮下注射による、請求項31～45のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 7】

50

投与する段階が、初回負荷量と、その後の間隔を置いたより少量の維持量を含む、請求項31～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項 4 8】

負荷量が最大で最大耐量（MTD）であり、維持量が最大で10mg / kgであって間隔が7日間程度の短さである（DM1の場合のみ）、請求項47記載の方法。

【請求項 4 9】

二重特異性抗原結合性構築物または薬学的組成物が他の治療剤と組み合わせて投与される、請求項31～48のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 0】

他の治療剤が、ペルツズマブ、セツキシマブ、または有効量の抗エストロゲン薬（例えば、タモキシフェン、レトロゾール）、キナーゼ阻害薬（ラバチニブ、エルロチニブ）、mTOR阻害薬、もしくは化学療法剤（例えば、カペシタビンおよび／もしくはシスプラチン）から選択される、請求項49記載の方法。10

【請求項 5 1】

請求項1～15のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物を生産する方法であって、以下の段階を含む、方法：

二重特異性抗原結合性構築物を発現するのに適した条件下で宿主細胞を培養する段階であって、宿主細胞が請求項1～15のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物をコードするポリヌクレオチドを含む、段階、および

二重特異性抗体構築物を精製する段階。20

【請求項 5 2】

請求項1～15のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物の少なくとも1つのポリペプチドをコードする少なくとも1つの核酸配列を含む、1つの単離されたポリヌクレオチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセット。

【請求項 5 3】

1つのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットがcDNAである、請求項52記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5 4】

請求項1～15のいずれか一項記載の二重特異性抗原結合性構築物をコードする、1つの単離されたポリヌクレオチドまたは単離されたポリヌクレオチドのセット。30

【請求項 5 5】

請求項52～54のいずれか一項記載の1つのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうち、1つまたは複数を含む、1つのベクターまたはベクターのセット。

【請求項 5 6】

プラスミド、ウイルスベクター、非エピソーム性哺乳動物ベクター、発現ベクターおよび組換え発現ベクターからなる群より選択される、請求項52～54のいずれか一項記載の1つのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットのうち、1つまたは複数を含む、1つのベクターまたはベクターのセット。

【請求項 5 7】

請求項52～54のいずれか一項記載の1つのポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または請求項55もしくは56記載の1つのベクターもしくはベクターのセットを含む、単離された細胞。40

【請求項 5 8】

ハイブリドーマ、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはHEK293細胞である、請求項57記載の単離された細胞。

【請求項 5 9】

1つのポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドのセット、1つのベクター、またはベクターのセットによって安定的にトランスフェクトされた、請求項57または58記載の単離された細胞。

【請求項 6 0】

10

20

30

40

50

細胞におけるHER2およびHER3の二量体化を阻害する方法であって、以下の段階を含む、方法：

細胞を請求項1～23のいずれか一項記載の単離された二重特異性抗原結合性構築物の有効量と接触させる段階であって、それによって、細胞におけるHER2およびHER3の二量体化を阻害する、段階。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年5月8日に出願された米国仮出願第61 / 821,197号の恩典を主張し、それはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表

本出願は、EFS-Webを経由して提出される配列表を含み、かつそれとともに出願され、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。2014年5月8日に作成された前記ASCIIコピーの名称は24689PCT_sequencelisting.txtであり、サイズは137,000バイトである。

【0003】

発明の分野

本発明の分野は、例えばバイオセラピューティック(biotherapeutic)のために有用な、二重特異性HER2およびHER3抗原結合性構築物である。

【背景技術】

【0004】

関連技術の説明

ヒト上皮増殖因子受容体(HER、erbB)ファミリーはEGFR(HER1)、HER2(erbB2)、HER3(erbB3)およびHER4(erbB4)を含み、この受容体ファミリーの活性は正常組織の発生および維持を調節している。しかし、この受容体ファミリーの過剰発現および/またはその活性の異常調節はヒト腫瘍細胞の発生および増殖との関連が指摘されており、それ故にこのファミリーのメンバーは癌の治療用の治療用抗体の開発のための標的となってきた。例えば、トラスツズマブ(ハーセプチニン(Herceptin)(商標))およびペルツズマブ(パージェタ(Perjeta)(商標))は、ハーセプテスト(Herceptest)(商標)による測定でHER2を高レベルで発現する乳癌(HER2 3+)の治療のために開発された抗HER2抗体であり、一方、トラスツズマブのメイタンシンコンジュゲートであるT-DM1(カドサイラ(Kadcyla)(商標))も、これらの型の乳癌の治療のために開発されている。

【0005】

それらの各々のラベルに表示されているように、トラスツズマブ、ペルツズマブおよびT-DM1は、HER2 3+として特徴づけられた乳房腫瘍を有する患者のみを適応症とする。残念ながら、これらのHER2 3+乳癌を有するすべての患者が、単剤での、またはペルツズマブと併用したトラスツズマブに反応するわけではなく、現実にはトラスツズマブによる治療を受けた患者の大半が抗体に対して抵抗性を持つようになる(Wilken and Maihle (2010) ann. N.Y. Acad. Sci. 1210: 53-65(非特許文献1))。

【0006】

さらに最近では、erbBファミリーの他のメンバー、またはerbBファミリーメンバーの組み合わせが、治療用抗体の有望な標的として同定されている。例えば、HER2とHER3はコグネイト受容体ペアであり、HER2-HER3ヘテロ二量体は極めて分裂促進性が高い。HER2およびHER3と結合する単一特異性の二価抗体が同定されているが、これらはHER2-HER3ヘテロ二量体化を伴う生物現象を標的とするため、単一特異性標的指向では有効性が不十分な可能性がある。加えて、HER2およびHER3と結合する単一特異性の二価抗体は、正常組織上でもより低いレベルで発現されるため、患者に対するこれらの抗体の投与は、毒性または他の有害イベントを引き起こす恐れがある。

【0007】

10

20

30

40

50

HER2およびHER3と結合する、抗体ベースの二重特異性ポリペプチド治療物質が同定されており、さまざまな開発段階にある。具体的には、MM-111は二重特異性HER2-HER3結合性ポリペプチドであり、scFv型をとる抗HER2結合ドメインおよびscFv型をとる抗HER3結合ドメインがヒト血清アルブミン(HSA)スカフォールドと連結されたものを含む((McDonagh et al. (2012) Mol Cancer Ther 11:582-593(非特許文献2)、およびWO 2009 / 126920(特許文献1))。MM-111は現在、ハーセプチン(Herceptin)(商標)または化学療法薬との併用下で、HER2陽性(遺伝子増幅)癌の治療に関する初期臨床試験が行われている。ALMは、HER2およびHER3と結合する二重特異性単鎖scFvである(Robinson et al. (2008) British Journal of Cancer 99:1415-1425(非特許文献3)および米国特許第8,329,873号(特許文献2))。これらの抗体ベースのポリペプチドはいずれも天然抗体のFc部分を欠き、それ故に、抗体により誘導される免疫細胞傷害作用を媒介することができない。加えて、ALMがFc部分を欠くことは、体内での半減期が比較的短いポリペプチドが生じ、治療物質の有用性が制約されるという結果もたらす。

10

【0008】

乳癌細胞におけるヘレグリン誘導性(heregulin-induce)HER3シグナル伝達を誘導する、多価の二重特異性抗体が記載されている(Kang et al (2014) mAbs 6:2, 340353(非特許文献4))。例えば、Fcの一方の末端に2つの抗HER2 scFvを、Fcの第2の末端に2つの抗HER3 scFvを有する二量体Fcを含む四価抗体が記載されている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO 2009 / 126920

【特許文献2】米国特許第8,329,873号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Wilken and Maihle (2010) ann. N.Y. Acad. Sci. 1210: 53-65

【非特許文献2】McDonagh et al. (2012) Mol Cancer Ther 11:582-593

【非特許文献3】Robinson et al, (2008) British Journal of Cancer 99:1415-1425

【非特許文献4】Kang et al (2014) mAbs 6:2, 340353

30

【発明の概要】

【0011】

本明細書に記載されるのは、単離された二重特異性抗原結合性構築物、例えば抗体である。二重特異性抗原結合性構築物は、2つの抗原結合性ポリペプチド構築物、例えば、FabおよびscFvを含む。第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、HER2(ヒト上皮増殖因子受容体2)の細胞外ドメイン4(ECD4)と一価でかつ特異的に結合する; 第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、HER3(ヒト上皮増殖因子受容体3)の細胞外ドメイン(ECD)と一価でかつ特異的に結合する。一方の抗原結合性ポリペプチド構築物はFab型であり、もう一方の抗原結合性ポリペプチド構築物はscFv型である。二重特異性抗原結合性構築物は、二量体化のためのCH3ドメインをそれぞれが有する2つのFcポリペプチドを有するFcを含む。各Fcポリペプチドは、抗原結合性ポリペプチド構築物の1つのC末端と、リンカーを伴ってまたは伴わずに連結されている。単離された二重特異性抗原結合性構築物は、HER2およびHER3を発現する細胞において、2つの第1の抗原結合性ポリペプチド構築物または2つの第2の抗原結合性ポリペプチド構築物を含む参照二価单一特異性抗体と比較して、より大きな最大結合(B_{max})を呈する。

40

【0012】

いくつかの態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、抗HER2抗体トラスマズマブの抗原結合性ポリペプチド構築物、またはその変異体であり、例えば、トラスマズマブ(trasmuzutab)のCDRまたはその変異体を含む。いくつかの態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は抗HER3抗体H3のscFvであり、例えば、H3のCDRまたはその変異体を含む。

50

〔 0 0 1 3 〕

いくつかの態様において、Fcは、改変、例えばヘテロ二量体化機能ならびに／またはエフェクター機能、例えばADCC、ADCPおよびCDCなどを強化するための突然変異を含む。いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物はアフコシル化されている。

【 0 0 1 4 】

いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は分子標識とコンジュゲートされている。他の態様において、二重特異性抗原結合性構築物は薬物とコンジュゲートされており、例えば、メイタンシン、例えばDM1およびDM4とコンジュゲートされている。

【 0 0 1 5 】

二重特異性抗原結合性構築物をコードするポリヌクレオチド；二重特異性抗原結合性構築物を含む単離された細胞；および、二重特異性抗原結合性構築物の生産方法も同じく記載される。

【 0 0 1 6 】

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物を有する薬学的組成物、および本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物を用いる、例えば、癌、例えば乳癌の治療の方法も同じく記載される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 7 】

【図1】プロテインA精製後の例示的なbsAbのSDS-PAGE分析を示している。図1Aはv878のSDS-PAGE分析を示しており、図1Bはv879のSDS-PAGE分析を示しており、図Cはv880のSDS-PAGE分析を示している。

【図2】サイズ排除クロマトグラフィーによる例示的なbsAbの分析、およびLCMSの結果を示している。

【図3】図3Aは、変異体880がHER2と結合する能力を検討したSPRデータを示しており、図3Bは、HER3が、HER2が結合した変異体880と結合する能力を示している。

【図4】MALME-3M細胞に対する変異体880の結合を実証している。

【図5】図5Aおよび5Bは、SKOV-ATCC細胞に対する変異体880の結合を示しており、図5Cおよび5Dは、MALME-3M細胞に対する変異体880の結合を示している。

【図6】図6Aは、さまざまな対照がMDA-MB-231細胞におけるADCCを媒介する能力を示している；図6Bは、変異体880およびさらなる対照がMDA-MB-231細胞におけるADCCを媒介する能力を示している。

【図7】図7Aは、さまざまな対照がMCF-7細胞におけるADCCを媒介する能力を示している；図7Bは、変異体880およびさらなる対照がMCF-7細胞におけるADCCを媒介する能力を示している。

【図8】図8Aは、変異体880がMCF-7細胞におけるADCCを媒介する能力を示しており、図8Bは、対照変異体がMCF-7細胞におけるADCCを媒介する能力を示している。

【図9】図9Aは、さまざまな対照がSK-BR-3細胞におけるADCCを媒介する能力を示している；図9Bは、変異体880およびさらなる対照がSK-BR-3細胞におけるADCCを媒介する能力を示している。

【図10】本明細書に記載の例示的な抗HER2-HER3二重特異性抗体(bsAb)および対照の概要を提示している。ポリペプチドの配列(「_タンパク質(_protein)」)およびコードするポリヌクレオチドの配列(「_DNA」)は、配列表に以下のようにSEQ ID NOとともに記載されている：
 >CL#-2_DNA, (SEQ ID NO: 1)、>CL#-2_タンパク質, (SEQ ID NO: 2)、>CL#642_DNA, (SEQ ID NO: 3)、>CL#642_タンパク質, (SEQ ID NO: 4)、>CL#1011_DNA, (SEQ ID NO: 5)、>CL#1011_タンパク質, (SEQ ID NO: 6)、>CL#1015_DNA, (SEQ ID NO: 7)、>CL#1015_タンパク質, (SEQ ID NO: 8)、>CL#1059_DNA, (SEQ ID NO: 9)、>CL#1059_タンパク質, (SEQ ID NO: 10)、>CL#1069_DNA, (SEQ ID NO: 11)、>CL#1069_タンパク質, (SEQ ID NO: 12)、>CL#1070_DNA, (SEQ ID NO: 13)、>CL#1070_タンパク質, (SEQ ID NO: 14)、>CL#1071_DNA, (SEQ ID NO: 15)、>CL#1071_タンパク質, (SEQ ID NO: 16)、>CL#1_102_DNA, (SEQ ID NO: 17)、>CL#1102_タンパク質, (SEQ ID NO: 18)。

10

20

20

40

50

質, (SEQ ID NO : 18)、>CL#1811_DNA, (SEQ ID NO : 19)、>CL#1811_タンパク質, (SEQ ID NO : 20)、>CL#3041_DNA, (SEQ ID NO : 21)、>CL#3041_タンパク質, (SEQ ID NO : 22)、>CL#3057_DNA, (SEQ ID NO : 23)、>CL#3057_タンパク質, (SEQ ID NO : 24)、>CL#4553_DNA, (SEQ ID NO : 25)、>CL#4553_タンパク質, (SEQ ID NO : 26)、>CL#4560_DNA, (SEQ ID NO : 27)、>CL#4560_タンパク質, (SEQ ID NO : 28)、>CL#4561_DNA, (SEQ ID NO : 29)、>CL#4561_タンパク質, (SEQ ID NO : 30)、>CL#785-DNA, (SEQ ID NO : 31)、>CL#785, (SEQ ID NO : 32)、>CL#4371_DNA, (SEQ ID NO : 33)、>CL#4371_タンパク質, (SEQ ID NO : 34)、>CL#5244_DNA, (SEQ ID NO : 35)、>CL#5244_タンパク質, (SEQ ID NO : 36)、>CL#5259_DNA, (SEQ ID NO : 37)、>CL#5259_タンパク質, (SEQ ID NO : 38)、>CL#5454_DNA, (SEQ ID NO : 39)、>CL#5454_タンパク質, (SEQ ID NO : 40)、>CL#5466_DNA, (SEQ ID NO : 41)、>CL#5466_タンパク質, (SEQ ID NO : 42)、>CL#5474_DNA, (SEQ ID NO : 43)、>CL#5474_タンパク質, (SEQ ID NO : 44)、>CL#5476_DNA, (SEQ ID NO : 45)、>CL#5476_タンパク質, (SEQ ID NO : 46)、>CL#6577_DNA, GC (SEQ ID NO : 47)、>CL#6577_タンパク質, (SEQ ID NO : 48)。

10

【図11】図11Aは、v4248の50mL産生物に関し選択された比および段階収量を示している。図11Bは、v4248の誘導体の10mL発現物に関する上清力価を示している。

【図12】代表的な例示的分子の精製結果を示している。図12Aは、プロテインAで精製したv4248のSECクロマトグラム。図12Bは、v4248のヘテロ二量体の主ピークの、プロテインA後/SECドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後を示している。

20

【図13】ADCコンジュゲーションの種々の段階での例示的な分子のSECプロフィールを示している。図13Aは、DM1とのコンジュゲーションの前および後のv4248およびv6362のSECプロフィールを示している。図13Bは、SECによって精製したv6362のUPLC-SECを示している。

【図14】例示的な分子および対照のDSCサーモグラムを示している。図14AはbsAb v7186を示しており、図14BはbsAb v4248およびv6362を示している。

【図15】例示的なフコシル化/アフコシル化抗原結合性構築物のFc Rとの結合に関する解離定数(K_D)を提示している。

30

【図16】細胞株BT-474、SKOV3、JIMT1およびMDA-MB-231におけるv4248に関する代表的な結合曲線を示している。

30

【図17】SKOV3細胞におけるv4248およびv6362のFACS結合曲線を示している。

【図18】例示的なbsAbが、SK-BR-3細胞(図18A)、JIMT1細胞(図18B)、SKOV3細胞(図18C)およびMDA-MD-231細胞(図18D)におけるADCCを媒介する能力を示している。

40

【図19】ヒト乳癌細胞BT-474の生存度に対する例示的なbsAbおよび対照の効果を、非処理細胞と対比して示している。図19Aはヘレグリンの非存在下における生存度を示しており、一方、図19Bはヘレグリンの存在下における生存度を示している。

【図20】例示的なbsAbが、JIMT1細胞、SKOV3細胞およびBT-474細胞に内部移行する能力、ならびにそれらの表面と結合する能力を示している。図21Aは、選択されたbsAbが、BT-474細胞に内部移行する能力、およびその表面と結合する能力を示している；図21Bは、選択されたbsAbが、JIMT1細胞の内部に移行する能力、およびその表面と結合する能力を示している；図21Cは、選択されたbsAbが、SKOV3細胞に内部移行する能力、およびその表面と結合する能力を示している。

40

【図21】共焦点顕微鏡検査によって描出された、JIMT1細胞における例示的なbsAb v4248の内部移行を示している。

【図22】SKOV3細胞(図22A)、JIMT1細胞(図22B)およびMDA-MB-231細胞(図22C)における、例示的なbsADCs v6362および対照による増殖阻害を示している。

【図23】bsADCが、外因性増殖因子の存在下でHER2 3+細胞の増殖を阻害する能力を示している。

50

【図24】bsADCがHER2 3+胃癌細胞株NCI-N87の増殖を阻害する能力を示している。

【図25】 $1\mu M$ ドキソルビシンの存在下または非存在下で、iCells（商標）を非処理のままとするか（ctrl）または $100nM$ の抗体で処理した、心筋細胞毒性アッセイの結果を示している。増殖効果は、アラマーブルー（AlamarBlue）（商標）（図24A）およびスルホローダミンB（図24B）の両方によって測定した。

【図26】T226 PDXモデルにおけるv6362による腫瘍増殖の阻害を示している。

【図27】T226 PDXモデルにおけるマウスの生存性プロットを示している。

【図28】初期の抗HER2治療に反応しなかった動物群から切り替えた、T226 PDXモデルにおけるv6362による腫瘍増殖の退縮を示している。

【図29】HBCx-13b異種移植モデルにおける例示的なbsAbによる腫瘍増殖の阻害を示している。
10

【図30】悪液質を伴う乳癌（HBCx-5）患者由来の異種移植モデルにおけるv6362の抗腫瘍活性を示している。

【図31】HER2抗体抵抗性を獲得したHBCx-13b PDXモデルにおけるv6362の抗腫瘍活性を示している。

【図32】インビボでの血小板数に対するv6362の効果をv6246の効果と比較している。

【図33】本明細書に記載の選択された分子の略図を提示している。

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の詳細な説明

以下にさらに詳細に説明するように、本明細書に記載されるのは、二重特異性抗原結合性構築物、例えば二重特異性抗体である。二重特異性抗原結合性構築物は、HER2のECD4と結合する第1の抗原結合性ポリペプチド構築物、およびHER3のECDと特異的に結合する第2の抗原結合性ポリペプチド構築物を含む。抗原結合性構築物の一方はFc型をとり；もう一方はFab型をとる。二重特異性抗原結合性構築物は、二量体化のためのCH3ドメインをそれぞれが有する2つのFcポリペプチドを有するFcを含む。各Fcポリペプチドは、抗原結合性ポリペプチド構築物の1つのC末端と、リンカーを伴ってまたは伴わずに連結されている。単離された二重特異性抗原結合性構築物は、HER2およびHER3を発現する細胞において、2つの第1の抗原結合性ポリペプチド構築物または2つの第2の抗原結合性ポリペプチド構築物を含む参照二価単一特異性抗体と比較して、より大きな最大結合（Bmax）を呈する。
20

【0019】

定義

特許請求の範囲および明細書において用いられる用語は、別記しない限り、以下に明記される通りに定義される。

【0020】

本明細書で用いる場合、「単離された」とは、天然の細胞培養環境の構成要素から同定されて、分離および／または回収された作用物質、例えば、二重特異性抗原結合性構築物を意味する。その天然の環境の混入性構成要素は、構築物の診断的または治療的使用の妨げになると考えられる物質であり、これには酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質が含まれうる。
30

【0021】

二重特異性とは、2種類の抗原と結合する構築物のことを指す。

【0022】

抗原結合性ポリペプチド構築物とは、抗原と結合する二重特異性抗原結合性構築物の部分のことを指す。抗原結合性ポリペプチド構築物は、いくつかの型の任意のもの、例えば、scFvまたはFab（単鎖および二鎖の両方）型であってよい。

【0023】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用」および「ADCC」とは、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）が、標的細胞上の抗体を認識し、引き続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応のことを指す。
40

【0024】

「補体依存性細胞傷害作用」および「CDC」とは、補体の存在下における標的の溶解のことを指す。補体活性化経路は、補体系の第一成分(C1q)の、コグネイト抗原と複合体化した分子(例えば、抗体)との結合によって開始される。

【0025】

「抗体依存性細胞食作用」および「ADCP」とは、単球またはマクロファージにより媒介される食作用を介した標的細胞の破壊のことを指す。

【0026】

「癌」とは、調節下にない細胞増殖(cell growth/proliferation)によって典型的に特徴づけられる、哺乳動物における生理学的状態、例えば、乳癌などのことを指す。そのほかの例は本明細書に記載されている。10

【0027】

「治療」とは、治療される個体または細胞の自然経過を変更するための取り組みにおける臨床的介入のことを指し、これは予防的処置のために、または臨床的病態の経過中に行うことができる。

【0028】

「対象」という用語は、治療、観察または実験の対象である動物、いくつかの態様においては哺乳動物のことを指す。動物は、ヒト、伴侶動物(例えば、イヌ、ネコなど)、家畜(例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど)または実験動物(例えば、ラット、マウス、モルモットなど)であってよい。20

【0029】

「哺乳動物」という用語は、本明細書で用いる場合、ヒトおよび非ヒトの両方を含み、これにはヒト、非ヒト霊長動物、イヌ科動物、ネコ科動物、ネズミ科動物、ウシ属動物、ウマ科動物、およびブタ科動物が非限定的に含まれる。

【0030】

「有効量」という用語は、本明細書で用いる場合、詳述される方法の目標を達成する、例えば、治療される疾患、病状または障害の症状の1つまたは複数をある程度軽減すると考えられる、投与される構築物の量のことを指す。

【0031】

本明細書で用いる場合、「抗原決定基」という用語は、「抗原」および「エピトープ」と同義であり、抗原結合部分が結合して抗原結合部分-抗原複合体を形成する、ポリペプチド高分子上の部位(例えば、連続したひとつながりのアミノ酸、または非連続アミノ酸の異なる領域で作られる高次構造配置)のことを指す。その例には、HER2抗原およびHER3抗原が含まれる。30

【0032】

「特異的に結合する」、「特異的結合」または「選択的結合」とは、結合が抗原に対して選択的であり、望まれないかまたは非特異的な相互作用とは区別しうることを意味する。抗原結合部分が特異的抗原決定基と結合する能力は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)または当業者が精通している他の手法、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)法(BIAcore計測器で分析)(Liljeblad et al, Glyco J 17, 323-329 (2000))、および従来の結合アッセイ(Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002))を通じて測定することができる。1つの態様において、非関連タンパク質に対する抗原結合部分の結合の程度は、例えばSPRによる測定で、抗原に対する抗原結合部分の結合の約10%未満である。ある態様において、抗原と結合する抗原結合部分、またはその抗原結合部分を含む抗原結合分子は、1 μM未満、100nM未満、10nM未満、1nM未満、0.1nM未満、0.01nM未満または0.001nM未満の解離定数(K_D) (例えば、ほぼ $10^{-8}M$ またはそれ未満、例えば、ほぼ $10^{-8}M$ から $10^{-13}M$ まで、例えば、 $10^{-9}M$ から $10^{-13}M$ まで)を有する。40

【0033】

関心対象の抗原、例えば、HER2(ErbB2)抗原と「結合する」抗体とは、その抗原と十分な親和性で結合することができ、その結果、その抗体が、抗原を発現する細胞の標的化

、および／または細胞傷害性物質もしくは他の化学療法薬、例えばメイタンシノイドの標的指向送達において診断用および／または治療用物質として有用であるようなもののことである。抗体がErbB2と結合するものである場合、それは通常、他のErbB受容体とは対照的に、ErbB2と選好的に結合すると考えられ、EGFR、ErbB3またはErbB4などの他のタンパク質と顕著には交差反応しないものであってよい。そのような態様において、これらの非ErbB2タンパク質に対する抗体の結合の程度（例えば、内因性受容体に対する細胞表面結合）は、蛍光活性化細胞分取（FACS）分析または放射性免疫沈降（RIA）による判定で、10%未満であると考えられる。時には、抗ErbB2抗体は、例えば、Schecter et al. Nature 312:513 (1984) およびDrebin et al., Nature 312:545-548 (1984) に記載されているように、ラットneuタンパク質とは顕著には交差反応しないと考えられる。

10

【0034】

「親和性」とは、分子（例えば、受容体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、リガンド）との間の非共有結合性相互作用の総和の強さのことを指す。別記しない限り、本明細書で用いる場合、「結合親和性」とは、結合ペアのメンバー間（例えば、抗原結合部分と抗原、または受容体とそのリガンド）の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性のことを指す。分子Xのそのパートナーヨに対する親和性は、解離速度定数と会合速度定数（それぞれ k_{off} および k_{on} ）との比である解離定数（ K_D ）によって一般に表すことができる。したがって、速度定数の比が同じである限り、同等の親和性が異なる速度定数で構成されてもよい。親和性は、本明細書に記載のものを含む、当技術分野において公知の十分に確立された方法によって測定することができる。親和性を測定するための具体的な方法の1つには、表面プラズモン共鳴（SPR）がある。

20

【0035】

「HER受容体」は、ヒト上皮増殖因子受容体（HER）ファミリーに属する受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、これにはEGFR受容体、HER2受容体、HER3受容体、およびHER4受容体が含まれる。HER受容体は一般に、HERリガンドと結合しうる細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；および、リン酸化されるいくつかのチロシン残基を保有するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含むと考えられる。

【0036】

「ErbB2」および「HER2」という表現は、本明細書において互換的に用いられ、例えば、Semba et al., PNAS (USA) 82:6497-6501 (1985) およびYamamoto et al. Nature 319:230-234 (1986) (Genebank アクセッション番号X03363) に記載されたヒトHER2タンパク質のことを指す。「erbB2」および「neu」という用語は、ヒトErbB2タンパク質をコードする遺伝子のことを指す。p185またはp185neuとは、neu遺伝子のタンパク質産物のことを指す。好ましいHER2は、ネイティブな配列のヒトHER2である。

30

【0037】

HER2 ECD4とは、HER2の細胞外ドメインのことを指す。HER2の細胞外（ecto）ドメインは、ドメインI（ECD1、アミノ酸残基約1～195）、ドメインII（ECD2、アミノ酸残基約196～319）、ドメインIII（ECD3、アミノ酸残基約320～488）およびドメインIV（ECD4、アミノ酸残基約489～630）という4つのドメインを含む（残基の番号付けはシグナルペプチドを含まない）。Garrett et al. Mol. Cell. 11: 495-505 (2003), Cho et al. Nature 421: 756-760 (2003), Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004), Tse et al. Cancer Treat Rev. 2012 Apr;38(2):133-42 (2012), またはPlowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1746-1750 (1993) を参照。

40

【0038】

「ErbB3」および「HER3」とは、例えば、米国特許第5,183,884号および第5,480,968号、ならびにKraus et al. PNAS (USA) 86:9193-9197 (1989) に開示された受容体ポリペプチド、ならびに、それらのアミノ酸配列変異体を含む、それらの機能的誘導体のことを指す。HER3と結合する抗体の例は、米国特許第5,968,511号 (Akita and Sliwkowski) に記載されており、例えば、8B8抗体 (ATCC HB 12070) またはそのヒト化変異体がある。

50

【0039】

「HER3細胞外ドメイン」または「HER3 ECD」とは、その断片を含め、細胞の外側にあって細胞膜に係留されているか、または血液循環中にある、HER3のドメインのことを指す。1つの態様において、HER3の細胞外ドメインは4つのドメイン：ドメインI、ドメインII、ドメインIIIおよびドメインIVを含む。1つの態様において、HER3 ECDは、アミノ酸1～636（シグナルペプチドを含む番号付け）を含む。1つの態様において、HER3ドメインIIIは、アミノ酸328～532（シグナルペプチドを含む番号付け）を含む。

【0040】

「HERリガンド」または「ErbBリガンド」とは、HER受容体と結合する、および／またはそれを活性化するポリペプチドを意味する。本明細書において特に関心対象となるHERリガンドは、ネイティブな配列のヒトHERリガンド、例えば、上皮増殖因子（EGF）（Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621 (1972)）；トランスフォーミング増殖因子（TGF- α ）（Marquardt et al., Science 223:1079-1082 (1984)）；神経鞘腫由来増殖因子またはケラチノサイトオートクリン増殖因子としても知られるアンフィレギュリン（Shoyab et al. Science 243:1074-1076 (1989)；Kimura et al. Nature 348:257-260 (1990)；およびCook et al. Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557 (1991)）；ベータセルリン（Shing et al., Science 259:1604-1607 (1993)；およびSasada et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173 (1993)）；ヘパリン結合性上皮増殖因子（HB-EGF）（Higashiyama et al., Science 251:936-939 (1991)）；エピレギュリン（Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500 (1995)；およびKomurasaki et al. Oncogene 15:2841-2848 (1997)）；ヘレグリン（以下参照）；ニューレギュリン-2（NRG-2）（Carraway et al., Nature 387:512-516 (1997)）；ニューレギュリン-3（NRG-3）（Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567 (1997)）；ニューレギュリン-4（NRG-4）（Harari et al. Oncogene 18:2681-89 (1999) またはクリプト（CR-1）（Kannan et al. J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335 (1997)）などである。EGFRと結合するHERリガンドには、EGF、TGF- β 、アンフィレギュリン、ベータセルリン、HB-EGFおよびエピレギュリンが含まれる。HER3と結合するHERリガンドには、ヘレグリンが含まれる。HER4と結合しうるHERリガンドには、ベータセルリン、エピレギュリン、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4およびヘレグリンが含まれる。

【0041】

「ヘレグリン」（HRG）は、本明細書で用いられる場合、米国特許第5,641,869号またはMarchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)において開示されたヘレグリン遺伝子産物によってコードされるポリペプチドのことを指す。ヘレグリンの例には、ヘレグリン-1、ヘレグリン-2およびヘレグリン-3（Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992)；および米国特許第5,641,869号）；neu分化因子（NDF）（Peles et al. Cell 69: 205-216 (1992)）；アセチルコリン受容体誘導活性（ARIA）（Fallis et al. Cell 72:801-815 (1993)）；グリア増殖因子（GGF）（Marchionni et al., Nature, 362:312-318 (1993)）；感覚運動ニューロン由来因子（SMDF）（Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523-14532 (1995)）；-ヘレグリン（Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)）が含まれる。この用語には、ネイティブな配列のHRGポリペプチドの生物学的活性断片および／またはアミノ酸配列変異体、例えばそのEGF様ドメイン断片（例えば、HRG 1177-244）などが含まれる。ヘレグリンとは、ErbB2-ErbB3タンパク質複合体およびErbB2-ErbB4タンパク質複合体を活性化する（すなわち、複合体におけるチロシン残基のリン酸化を、それとの結合後に誘導する）ポリペプチドのことを指す。

【0042】

「HER活性化」または「HER2活性化」とは、任意の1つまたは複数のHER受容体またはHER2受容体の活性化またはリン酸化のことを指す。一般に、HER活性化はシグナル伝達（例えば、HER受容体または基質ポリペプチドにおけるチロシン残基をリン酸化するHER受容体の細胞内キナーゼドメインによって引き起こされる）をもたらす。HER活性化は、HERリガンドの、関心対象のHER受容体を含むHER二量体との結合によって媒介されうる。HERリガンドのHER二量体との結合により、二量体における1つまたは複数のHER受容体のキナーゼド

10

20

30

40

50

メインが活性化され、それによって、1つもしくは複数のHER受容体におけるチロシン残基のリン酸化、および/またはさらなる基質ポリペプチド、例えばAktもしくはMAPK細胞内キナーゼにおけるチロシン残基のリン酸化がもたらされる。

【0043】

二重特異性抗原結合性構築物、抗体および関連用語

本明細書に開示されるのは、二重特異性抗原結合性構築物、例えば、HER2およびHER3の両方と選択的に結合する抗体である。

【0044】

本明細書で用いる場合、「抗体」または「免疫グロブリン」とは、分析物（抗原）と特異的に結合してそれを認識する、1つまたは複数の免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされるポリペプチド、またはその断片のことを指す。認知されている免疫グロブリン遺伝子には、 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ および μ 定常領域遺伝子、ならびに多種多様な免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖はまたはのいずれかとして分類される。抗体または免疫グロブリンの「クラス」とは、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の型のことを指す。抗体にはIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMという5つの主要なクラスがあり、これらのうちいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2などにさらに分けることができる。免疫グロブリンの種々のクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ α 、 β 、 γ 、 δ および μ と呼ばれる。

10

【0045】

例示的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、2対のポリペプチド鎖で構成され、各対は1つの「軽」鎖（約25kD）および1つの「重」鎖（約50～70kD）を有する。各鎖のN末端ドメインは、抗原認識の主な原因となる約100～110またはそれを上回るアミノ酸の可変領域の範囲を定める。可変軽鎖（VL）および可変重鎖（VH）という用語は、それぞれこれらの軽鎖および重鎖ドメインのことを指す。IgG1重鎖は、N末端からC末端の順に、それぞれVHドメイン、CH1ドメイン、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。軽鎖は、N末端からC末端の順にVLドメインおよびCLドメインを含む。IgG1重鎖は、CH1ドメインとCH2ドメインとの間にヒンジを含む。ある態様において、免疫グロブリン構築物は、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgEからの少なくとも1つの免疫グロブリンドメインが治療用ポリペプチドと連結されたものを含む。いくつかの態様において、本明細書において提供される免疫グロブリン構築物に含まれる免疫グロブリンドメインは、免疫グロブリンを基にした構築物、例えばダイアボディまたはナノボディを含む。ある態様において、本明細書に記載の免疫グロブリン構築物は、ラクダ科動物抗体などの重鎖抗体からの少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。ある態様において、本明細書において提供される免疫グロブリン構築物は、哺乳動物抗体、例えばウシ属動物抗体、ヒト抗体、ラクダ科動物抗体、マウス抗体、または任意のキメラ抗体などからの少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。

20

30

【0046】

「Fab分子」とは、免疫グロブリンの重鎖のVHドメインおよびCH1ドメイン（「Fab重鎖」）ならびに軽鎖のVLドメインおよびCLドメイン（「Fab軽鎖」）からなるタンパク質のことを指す。ある態様において、Fab構築物におけるFab軽鎖およびFab重鎖はポリペプチド配列によって連結されて、単鎖Fab（scFab）を生じる。

40

【0047】

抗体の「Fab断片」（断片抗原結合とも称される）は、軽鎖の定常ドメイン（CL）および重鎖の第1の定常ドメイン（CH1）を、それぞれ軽鎖および重鎖上の可変ドメインVLおよびVHとともに含有する。可変ドメインは、抗原結合に関与する相補性決定ループ（CDR、超可変領域とも称される）を含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つまたは複数のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に少数の残基が加わっている点で、Fab断片とは異なる。

【0048】

本明細書における「Fc」または「Fcドメイン」または「Fc領域」または「Fc構築物」と

50

いう用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域の範囲を定めるために用いられる。この用語には、ネイティブ配列Fc領域および変異型Fc領域が含まれる。IgG重鎖のFc領域の境界は幾分異なることがあるが、ヒトIgG重鎖のFc領域は通常、Cys226から、またはPro230から重鎖のカルボキシル末端までにわたると定義される。しかし、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は存在しても存在しなくてもよい。本明細書において別記しない限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基の番号づけは、EUインデックスとも呼ばれる、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載された通りのEU付番方式による。

【0049】

10

「Fc領域」とは、本明細書で用いる場合、免疫グロブリン重鎖のC末端ポリペプチド配列を含む二量体複合体のことを一般に指す。C末端ポリペプチド配列は、インタクト抗体のパバイン消化によって入手可能なものである。Fc領域は、ネイティブなまたは変異型のFc配列を含みうる。免疫グロブリン重鎖のFc配列の境界は幾分異なることがあるが、ヒトIgG重鎖のFc領域は通常、ほぼCys226の位置にあるアミノ酸残基から、またはほぼPro230の位置から、Fc配列のカルボキシル末端までに及ぶと定義される。免疫グロブリンのFc配列は一般に、CH2ドメインおよびCH3ドメインという2つの定常ドメインを含み、かつ任意でCH4ドメインを含む。「Fcポリペプチド」とは、本明細書において、Fc領域を構成するポリペプチドのうちの1つを意味する。Fcポリペプチドは、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4サブタイプ、IgA、IgE、IgDまたはIgMといった、任意の適した免疫グロブリンから入手することができる。いくつかの態様において、Fcポリペプチドは、野生型ヒンジ配列の一部またはすべてを含む(一般にそのN末端に)。いくつかの態様において、Fcポリペプチドは機能的ヒンジ配列または野生型ヒンジ配列を含まない。

20

【0050】

融合された、または連結されたとは、構成要素(例えば、Fab分子およびFcドメインサブユニット)がペプチド結合によって、直接的に、または1つもしくは複数のペプチドリンクーを介して連結されていることを意味する。

30

【0051】

本明細書で用いる場合、「単鎖」という用語は、ペプチド結合によって線状に連結されたアミノ酸单量体を含む分子のことを指す。ある態様において、抗原結合部分の1つ、例えば、抗原結合性ポリペプチド構築物は、単鎖Fab分子、すなわち、Fab軽鎖およびFab重鎖がペプチドリンクーによって接続されて单一のペプチド鎖を形成しているFab分子である。1つの特定のそのような態様において、Fab軽鎖のC末端は単鎖Fab分子におけるFab重鎖のN末端と接続されている。ある他の態様において、抗原結合部分の1つは単鎖Fv分子(scFv)である。

40

【0052】

「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のVHドメインおよびVLドメインを含む。これらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。1つの態様において、Fvポリペプチドは、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするペプチドリンクーを、VHドメインとVLドメインとの間にさらに含む。scFvに関する概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。HER2抗体のscFv断片は、WO93 / 16185号；米国特許第5,571,894号；および米国特許第5,587,458号に記載されている。

50

【0053】

非ヒト(例えば、齧歯動物)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。多くの部分において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト靈長動物などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域由来の残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によ

っては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。その上、ヒト化抗体が、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含んでもよい。これらの改変は、抗体の性能をさらに精緻化するために加えられる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むと考えられ、ここで超可変ループのすべてまたは実質的にすべては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRのすべてまたは実質的にすべてはヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は任意で、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれも含むと考えられる。これ以上の詳細については、Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)を参照のこと。

10

【0054】

「フレームワーク」または「FR」とは、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基のことを指す。可変ドメインのFRは一般に、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3およびFR4からなる。したがって、HVR配列およびFR配列は一般に、VH(またはVL)において以下の順序で出現する：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0055】

「Fcドメインの第1および第2のサブユニットの会合を促進する改変」とは、Fcドメインサブユニットを含むポリペプチドが同一なポリペプチドと会合してホモ二量体を形成するのを減少させるかまたは防止する、Fcドメインサブユニットのペプチド配列または翻訳後改変の操作のことを指す。会合を促進する改変には、特に、本明細書で用いる場合、会合することが望まれる2つのFcドメインサブユニット(すなわち、Fcドメインの第1および第2のサブユニット)のそれぞれに対して加えられ、2つのFcドメインサブユニットの会合およびヘテロ二量体の形成を促進する別々の改変が含まれる。例えば、ある態様において、会合を促進する改変は、それらの会合が有利になるように、Fcドメインサブユニットの一方または両方の構造または電荷を変化させることができる。

20

【0056】

「エフェクター機能」という用語は、抗体のFc領域に起因する生物活性のことを指し、これは抗体アイソタイプによってさまざまである。抗体エフェクター機能の例には、以下のものが含まれる：C1q結合および補体依存性細胞傷害作用(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込み、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体のダウンレギュレーション、およびB細胞活性化)。

30

【0057】

「活性化Fc受容体」とは、抗体のFcドメインによる係合後に、受容体担持細胞を刺激してエフェクター機能を遂行させるシグナル伝達イベントを誘発するFc受容体のことである。ヒトの活性化Fc受容体には、Fc RIIIa(CD16a)、Fc RI(CD64)およびFc RIIa(CD32)が含まれる。

【0058】

「Fc受容体」および「FcR」という用語は、抗体のFc領域と結合する受容体を記述するために用いられる。例えば、FcRはネイティブな配列ヒトFcRであってよい。一般に、FcRはIgG抗体と結合するもの(受容体)であり、これにはFc RI、Fc RIIおよびFc RIIIサブクラスの受容体が、これらの受容体のアレル変異体および選択的スプライス形態を含めて含まれる。Fc RII受容体には、Fc RIIA(「活性化受容体」)およびFc RIIB(「阻害性受容体」)が含まれ、これらは主としてこれらの細胞質ドメインに違いのある類似のアミノ酸配列を有する。他のアイソタイプの免疫グロブリンも、ある特定のFcRによる結合を受けることができる(例えば、Janeway et al., Immuno Biology: the immune system in health and disease, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)を参照)。活性化Fc RIIAは、その細胞質ドメイン内に免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ(ITAM)を含む。阻害性受容体Fc RIIBは、その細胞質ドメイン内に免疫受容体チロシンベ

40

50

ース阻害モチーフ (ITIM) を含む (Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997) に概説されている)。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995) に概説されている。将来的に同定されるものを含め、他のFcRは、本明細書における「FcR」という用語の範囲に含まれる。この用語はまた、母体IgGの胎児への移入の原因となる新生児受容体FcRnも含む (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976); およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994))。

【0059】

FcおよびFc改変

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、Fcを含む。Fcは、二量体化のためのCH3ドメインをそれぞれが有する2つのFcポリペプチドを含む。各FcポリペプチドのN末端は、抗原結合性ポリペプチド構築物の1つのC末端と、リンカーを伴ってまたは伴わずに連結されている。

【0060】

1つの態様において、Fcは、IgG1 Fc構築物、およびIgG2 Fc構築物、IgG3 Fc構築物、またはIgG4 Fc構築物である。

【0061】

いくつかの態様において、少なくとも1つのCH3ドメインは、野生型ホモ二量体Fcと同等の安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を含む促進する少なくとも1つのアミノ酸改変を有する。例示的な改変は以下に記載されている。いくつかの態様において、ヘテロ二量体Fcの二量体化したCH3ドメインは、示差走査熱量測定 (DSC) による測定で、約68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77.5、78、79、80、81、82、83、84または85 またはそれよりも高い融解温度 (Tm) を有する。いくつかの態様において、二量体Fcは、産生された場合に約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98もしくは99%を上回る純度で形成されるヘテロ二量体である；またはFcは、発現されるかもしくは単細胞を介して発現された場合に約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98もしくは99%を上回る純度で形成されるヘテロ二量体である。

【0062】

いくつかの局面において、Fcは、C_{H3}配列の少なくとも1つに、1つまたは複数の改変を含む。いくつかの局面において、Fcは、C_{H2}配列の少なくとも1つに、1つまたは複数の改変を含む。

【0063】

いくつかの局面において、Fcは、2011年11月4日に出願された特許出願第PCT / CA2011 / 001238号、または2012年11月2日に出願されたPCT / CA2012 / 0507850号に記載されたFcであり、それぞれの開示内容はすべて、その全体があらゆる目的で参照により本明細書に組み入れられる。

【0064】

いくつかの局面において、本明細書に記載の構築物は、非対称性に改変された改変CH3ドメインを含むヘテロ二量体Fcを含む。ヘテロ二量体Fcは、2つの重鎖定常ドメインポリペプチド：第1の重鎖ポリペプチドおよび第2の重鎖ポリペプチドを含み、それらはFcが1つの第1の重鎖ポリペプチドおよび1つの第2の重鎖ポリペプチドを含むことを条件として互換的に用いることができる。一般に、第1の重鎖ポリペプチドは第1のCH3配列を含み、第2の重鎖ポリペプチドは第2のCH3配列を含む。

【0065】

非対称な様式で導入された1つまたは複数のアミノ酸改変を含む2つのCH3配列は、一般に、2つのCH3配列が二量体化した場合に、ホモ二量体ではなくヘテロ二量体Fcを生じる。本明細書で用いる場合、「非対称性アミノ酸改変」とは、第1のCH3配列上の特定の位置にあるアミノ酸が同じ位置にある第2のCH3配列上のアミノ酸とは異なり、かつ第1および第2のCH3配列が対合するとホモ二量体ではなくヘテロ二量体を選択的に形成する、あらゆる

10

20

30

40

50

改変のことを指す。このヘテロ二量体化は、各配列上の同じ各々のアミノ酸位置での2つのアミノ酸の一方のみの改変の結果であってもよく、または第1および第2のCH3配列のそれぞれの上の同じ各々の位置での各配列上の両方のアミノ酸の改変であってもよい。ヘテロ二量体Fcの第1および第2のCH3配列は、1つまたは複数の非対称性アミノ酸改変を含みうる。

【0066】

表X1は、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231～447に対応する、ヒトIgG1 Fc配列のアミノ酸配列を提示している。CH3配列は、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸341～447を含む。

【0067】

典型的には、Fcは、二量体化しうる2つの連続した重鎖配列（AおよびB）を含むことができる。いくつかの局面において、Fcの一方または両方の配列は、EU番号付けを用いて、以下の場所に1つまたは複数の突然変異または改変を有する：L351、F405、Y407、T366、K392、T394、T350、S400、および/またはN390。いくつかの局面において、Fcは、表Xに示された突然変異型配列を含む。いくつかの局面において、Fcは変異体1 A～Bの突然変異を含む。いくつかの局面において、Fcは変異体2 A～Bの突然変異を含む。いくつかの局面において、Fcは変異体3 A～Bの突然変異を含む。いくつかの局面において、Fcは変異体4 A～Bの突然変異を含む。いくつかの局面において、Fcは変異体5 A～Bの突然変異を含む。

10

【0068】

(表X) 例示的なFc配列およびCH3改変

ヒトIgG1 Fc配列231～447 (EU番号付け)	APELLGGPSVFLFPPPKDQLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPVKFNWWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVPLSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSPGK (SEQ ID NO:69)	
変異型IgG1 Fc配列(231～447)	鎖	突然変異
1	A	L351Y_F405A_Y407V
1	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
2	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
3	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
4	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
5	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

20

30

【0069】

第1および第2のCH3配列は、完全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231～447に関して、本明細書に記載の通りのアミノ酸突然変異を含みうる。1つの態様において、ヘテロ二量体Fcは、位置F405およびY407にアミノ酸改変を有する第1のCH3配列、ならびに位置T394にアミノ酸改変を有する第2のCH3配列を有する改変されたCH3ドメインを含む。1つの態様において、ヘテロ二量体Fcは、L351Y、F405AおよびY407Vから選択される1つまたは複数のアミノ酸改変を有する第1のCH3配列、ならびにT366L、T366I、K392L、K392MおよびT394Wから選択される1つまたは複数のアミノ酸改変を有する第2のCH3配列を有する改変されたCH3ドメインを含む。

40

【0070】

1つの態様において、ヘテロ二量体Fcは、位置L351、F405およびY407にアミノ酸改変を有する第1のCH3配列、ならびに位置T366、K392およびT394にアミノ酸改変を有する第2のCH3配列を有する改変されたCH3ドメインを含み、第1または第2のCH3配列の一方は位置Q347にアミノ酸改変をさらに含み、もう一方のCH3配列は位置K360にアミノ酸改変をさらに含む。別の態様において、ヘテロ二量体Fcは、位置L351、F405およびY407にアミノ酸改変を有する第1のCH3配列、ならびに位置T366、K392およびT394にアミノ酸改変を有する第2のCH3配列を有する改変されたCH3ドメインを含み、第1または第2のCH3配列の一方は位置Q347

50

にアミノ酸改変をさらに含み、もう一方のCH3配列は位置K360にアミノ酸改変をさらに含み、かつ前記CH3配列の一方または両方は、アミノ酸改変T350Vをさらに含む。

【0071】

1つの態様において、ヘテロ二量体Fcは、位置L351、F405およびY407にアミノ酸改変を有する第1のCH3配列、ならびに位置T366、K392およびT394にアミノ酸改変を有する第2のCH3配列を有する改変されたCH3ドメインを含み、前記第1および第2のCH3配列の一方はD399RまたはD399Kのアミノ酸改変をさらに含み、もう一方のCH3配列は、T411E、T411D、K409E、K409D、K392EおよびK392Dのうち1つまたは複数を含む。別の態様において、ヘテロ二量体Fcは、位置L351、F405およびY407にアミノ酸改変を有する第1のCH3配列、ならびに位置T366、K392およびT394にアミノ酸改変を有する第2のCH3配列を有する改変されたCH3ドメインを含み、前記第1および第2のCH3配列の一方はD399RまたはD399Kのアミノ酸改変をさらに含み、もう一方のCH3配列はT411E、T411D、K409E、K409D、K392EおよびK392Dのうち1つまたは複数を含み、かつ前記CH3配列の一方または両方は、アミノ酸改変T350Vをさらに含む。

10

【0072】

1つの態様において、ヘテロ二量体Fcは、位置L351、F405およびY407にアミノ酸改変を有する第1のCH3配列、ならびに位置T366、K392およびT394にアミノ酸改変を有する第2のCH3配列を有する改変されたCH3ドメインを含み、前記CH3配列の一方または両方はT350Vのアミノ酸改変をさらに含む。

20

【0073】

1つの態様において、ヘテロ二量体Fcは、以下のアミノ酸改変を含む改変されたCH3ドメインを含み、ここで「A」は第1のCH3配列に対するアミノ酸改変を表し、「B」は第2のCH3配列に対するアミノ酸改変を表す：A：L351Y_F405A_Y407V、B：T366L_K392M_T394W、A：L351Y_F405A_Y407V、B：T366L_K392L_T394W、A：T350V_L351Y_F405A_Y407V、B：T350V_T366L_K392M_T394W、A：T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V、および／またはB：T350V_T366L_N390R_K392M_T394W。

【0074】

1つまたは複数の非対称性アミノ酸改変はヘテロ二量体Fcの形成を促進することができる。このヘテロ二量体CH3ドメインは野生型ホモ二量体CH3ドメインと同等である安定性を有する。1つの態様において、1つまたは複数の非対称性アミノ酸改変は、ヘテロ二量体Fcドメインの形成を促進し、このヘテロ二量体Fcドメインは野生型ホモ二量体Fcドメインと同等である安定性を有する。1つの態様において、1つまたは複数の非対称性アミノ酸改変はヘテロ二量体Fcドメインの形成を促進し、このヘテロ二量体Fcドメインは、示差走査熱量測定試験における融解温度(T_m)を介して観察されるある安定性を有し、融解温度は、対応する対称性野生型ホモ二量体Fcドメインに関して観察されるものの4%以内である。いくつかの局面において、Fcは、野生型ホモ二量体Fcと同等の安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進する C_{H_3} 配列の少なくとも1つにおいて、1つまたは複数の改変を含む。

30

【0075】

1つの態様において、CH3ドメインの安定性は、CH3ドメインの融解温度を、例えば示差走査熱量測定(DSC)によって測定することによって評価することができる。すなわち、1つのさらなる態様において、CH3ドメインは約68%またはそれよりも高い融解温度を有する。別の態様において、CH3ドメインは約70%またはそれよりも高い融解温度を有する。別の態様において、CH3ドメインは約72%またはそれよりも高い融解温度を有する。別の態様において、CH3ドメインは約73%またはそれよりも高い融解温度を有する。別の態様において、CH3ドメインは約75%またはそれよりも高い融解温度を有する。別の態様において、CH3ドメインは約78%またはそれよりも高い融解温度を有する。いくつかの局面において、二量体化した C_{H_3} 配列は、約68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77.5、78、79、80、81、82、83、84もしくは85%またはそれよりも高い融解温度(T_m)を有する。

40

【0076】

50

いくつかの態様において、改変されたCH3配列を含むヘテロ二量体Fcは、発現産物におけるホモ二量体Fcと比較して少なくとも約75%の純度で形成されうる。別の態様において、ヘテロ二量体Fcは、約80%を上回る純度で形成される。別の態様において、ヘテロ二量体Fcは、約85%を上回る純度で形成される。別の態様において、ヘテロ二量体Fcは、約90%を上回る純度で形成される。別の態様において、ヘテロ二量体Fcは、約95%を上回る純度で形成される。別の態様において、ヘテロ二量体Fcは、約97%を上回る純度で形成される。いくつかの局面において、Fcは、発現された場合に約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99%を上回る純度で形成されるヘテロ二量体である。いくつかの局面において、Fcは、単細胞を介して発現された場合に約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または99%を上回る純度で形成されるヘテロ二量体である。

10

【0077】

ヘテロ二量体Fc型を促進するために単量体Fcポリペプチドを改変するためのそのほかの方法は、国際特許公開公報第WO 96 / 027011号（ノブ・イントゥー・ホール（knobs into holes））において、Gunasekaran et al. (Gunasekaran K. et al. (2010) J Biol Chem. 285, 19637-46, electrostatic design to achieve selective heterodimerization)において、Davis et al. (Davis, JH. et al. (2010) Prot Eng Des Sel ;23(4): 195-202, strand exchange engineered domain (SEED) technology)において、およびLabrijn et al [Efficient generation of stable bi-specific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Labrijn AF, Meesters JI, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van Berkel PH, van de Winkel JG, Schuurman J, Parren PW. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Mar 26;110(13):5145-50において記載されている。

20

【0078】

いくつかの態様において、本明細書に記載の単離された構築物は、抗原と結合する抗体構築物；ならびに、同じFcポリペプチドを含まない抗体構築物に比して安定性および製造の容易さといったより優れた生物物理学的特性を有する二量体Fcポリペプチド構築物を含む。異なるFc受容体に対する抗体Fcの親和性を選択的に変化させるための、Fcの重鎖配列におけるいくつかの突然変異が、当技術分野において公知である。いくつかの局面において、Fcは、Fc-受容体の選択的結合を促進するための1つまたは複数の改変を含む。

30

【0079】

エフェクター機能を改善するためのそのほかのFc改変

いくつかの態様においては、二重特異性抗原結合性構築物を、エフェクター機能を改善するために改変することができる。そのような改変は当技術分野において公知であり、アフコシル化、ならびに、ADCCのための活性化受容体、主としてFCGR3aおよびFCGRbに対する抗体のFc部分の親和性、およびCDCのためのC1qに対する親和性の遺伝子操作が含まれる。1つの態様において、エフェクター機能は、CDC、ADCC、ADCP、およびサイトカイン分泌からなる群より選択される1つまたは複数の機能である。1つの特定の態様において、エフェクター機能はADCCである。

40

【0080】

CH2改変およびFc Rの選択的結合

いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は、Fc Rの選択的結合を促進するための非対称性アミノ酸改変を有する変異型CH2ドメインを含む。いくつかの態様において、変異型CH2ドメインは、本明細書に記載の単離された一価抗体の分離および精製を可能にする。

【0081】

いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は、少なくとも1つのCH2ドメインのアミノ酸改変を伴うFcを含む。CH2ドメインは、表Xに示されている配列のアミノ酸231～340である。

50

【0082】

以下の表は、エフェクター機能の遺伝子操作に関して文献中で報告されている種々のデザインをまとめている。

【0083】

(表Y) エフェクター機能の遺伝子操作

参考文献	突然変異	効果
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	アフコシル化	増大した ADCC
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	増大した ADCC
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	増大した ADCC
Stavenhagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	増大した ADCC
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	増大した ADCC
Stewart, 2011	F243L	増大した ADCC
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	増大した ADCC
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	増大した ADCC
Lazar, 2006	S239D/I332E	増大した ADCC
Bowles, 2006	AME-D、特定されていない突然変異	増大した ADCC
Heider, 2011	37.1、開示されていない突然変異	増大した ADCC
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	増大した CDC

10

20

30

【0084】

S298A / E333A / K334A、S298A / E333A / K334A / K326A (Lu Y, Venies JM, Chiang N, et al. J Immunol Methods. 2011 Feb 28;65(1-2):132-41)。

【0085】

F243L / R292P / Y300L / V305I / P396L、F243L / R292P / Y300L / L235V / P396L (Stavenha gen JB, Gorlatov S, Tuailion N, et al. Cancer Res. 2007 Sep 15;67(18):8882-90 ; Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, et al. Breast Cancer Res. 2011 Nov 30;13(6):R1 23)。

【0086】

F243L (Stewart R, Thorn G, Levens M, et al. Protein Eng Des Sel. 2011 Sep;24(9):671-8.)、S298A / E333A / K334A (Shields RE, Namenuk AK, Hong K, et al. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6591-604)。

【0087】

S239D / I332E / A330L、S239D / I332E (Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Mar 14;103(11):4005-10)。

【0088】

S239D / S267E、S267E / L328F (Chu SY, Vostiar I, Karki S, et al. Mol Immunol. 2008 Sep;45(15):3926-33)。

【0089】

S239D / D265S / S298A / I332E、S239E / S298A / K326A / A327H、G237F / S298A / A330L / I332E、S239D / I332E / S298A、S239D / K326E / A330L / I332E / S298A、G236A / S239D / D270L / I332E、S239E / S267E / H268D、L234F / S267E / N325L、G237F / V266L / S267D、ならびに参照により本明細書に組み入れられるWO2011 / 120134号およびWO2011 / 120135号に列記されている他の突然変異。Therapeutic Antibody Engineering (William R. Strohl and Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 3 7 9, Oct 2012) は、283ページにある突然変異を列記している。

【0090】

40

50

Fc改変および新生児Fc受容体

1つの態様において、Fc領域は、新生児Fc受容体(FcRn)に対する結合親和性を示す。ある態様において、FcRn結合親和性はネイティブなIgG1 Fcのものと実質的に同程度である。いくつかの態様において、FcRnに対する実質的に同程度の結合は、本明細書に記載の構築物のFc領域が、FcRnに対するネイティブなIgG1 Fcドメインの結合親和性の約70%を上回る、またはいくつかの態様においては約80%を上回る、およびいくつかの特定の態様においては約90%を上回るものを示す場合に達成される。

【0091】

当技術分野において公知であるように、FcRnとの結合により、エンドサイトーシスを受けた抗体はエンドソームから血液循環中へと再利用される(Raghavan et al., 1996, Ann u Rev Cell Dev Biol 12:181-220; Ghetie et al., 2000, Annu Rev Immunol 18:739-766)。このプロセスは、完全長分子のサイズが大きいために腎臓濾過が妨げられることと相まって、1週間から3週間までの範囲にわたる好都合な抗体血清中半減期をもたらす。また、FcのFcRnとの結合は、抗体輸送にも重要な役割を果たす。

【0092】

Fc改変およびFc受容体親和性の低下

ある態様において、本明細書に記載の構築物のFc領域は、ネイティブなIgG1 Fc領域と比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下、および/またはエフェクター機能の低下を示す。1つのそのような態様において、Fc領域は、ネイティブなIgG1 Fc領域と比較して、50%未満、代替的には20%未満、代替的には10%未満、およびいくつかの態様においては5%未満の、Fc受容体に対する結合親和性、ならびに/またはネイティブなIgG1 Fc領域と比較して、50%未満、代替的には20%未満、代替的には10%未満、およびいくつかの態様においては5%未満のエフェクター機能を示す。

【0093】

1つの態様において、本明細書に記載の構築物のFc領域は、Fc受容体と実質的に結合せず、認知しうるエフェクター機能も誘導しない。ある1つの態様において、Fc受容体はFc受容体である。1つの態様において、Fc受容体は哺乳動物Fc受容体である。ある態様において、哺乳動物Fc受容体はヒトFc受容体である。1つの態様において、Fc受容体は活性化Fc受容体である。1つの具体的な態様において、Fc受容体は、活性化ヒトFc受容体、より具体的には、ヒトFc RIIia、Fc RIまたはFc RIIa、最も具体的にはヒトFc RIIiaである。

【0094】

Fcリンカー

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、本明細書に記載の2つの抗原結合性ポリペプチド構築物が、本明細書に記載のFcと機能的にカップリングされたものを含む。いくつかの局面において、Fcは、1つまたは複数のリンカーを伴ってまたは伴わずにカップリングされている。いくつかの局面において、Fcは抗原結合性ポリペプチド構築物と直接的にカップリングされている。いくつかの局面(aspect)において、Fcは、1つまたは複数のリンカーによって抗原結合性ポリペプチド構築物とカップリングされている。

【0095】

いくつかの局面において、1つまたは複数のリンカーは、1つまたは複数のポリペプチドリンカーである。いくつかの局面において、1つまたは複数のリンカーは、1つまたは複数の抗体ヒンジ領域を含む。いくつかの局面において、1つまたは複数のリンカーは、1つまたは複数のIgG1ヒンジ領域を含む。

【0096】

HER2およびHER3結合性の抗原結合性ポリペプチド構築物

記載された二重特異性抗原結合性構築物は、HER2のECD4と特異的に結合する第1の抗原結合性ポリペプチド構築物、およびHER3のECDと特異的に結合する第2の抗原結合性ポリペプチド構築物を含む。一方の抗原結合性ポリペプチド構築物はFab型をとる；もう一方の抗原結合性ポリペプチド構築物はscFv型をとる。

10

20

30

40

50

【0097】

抗原結合性ポリペプチド構築物の配列は、HER2またはHER3と結合する抗体の公知のFFab配列および／またはscFv配列を用いて基にすることができる。その例には、トラスツズマブ(HER2と結合)およびH3(HER3と結合)が含まれる。

【0098】

いくつかの態様において、scFvは、公知であるか新規であるかのいずれであれ、本発明における抗原結合性ポリペプチド構築物として用いるためにFab形式に変換することができる。scFv形式をFab形式に変換するための方法は、例えば、Zhou et al (2012) Mol Cancer Ther 11:1167-1476に記載されている。そこに記載された方法は参照により組み入れられる。

10

【0099】

いくつかの態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、構築物がHER2の4D5エピトープと結合する配列を有する。いくつかの態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、構築物がHER2 ECD4に対するトラスツズマブの結合を50%またはそれを上回って遮断する配列を有する。

【0100】

いくつかの態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、トラスツズマブの6つのCDRに対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有する6つのCDRを有する。他の態様において、CDRは、トラスツズマブの6つのCDRに対して少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、トラスツズマブの6つのCDRに対して100%同一なアミノ酸配列を含む6つのCDRを有する。他の態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、トラスツズマブのVH配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列、およびトラスツズマブのVL配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドを有する。いくつかの態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、トラスツズマブのVH配列に対して少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド、およびトラスツズマブのVL配列に対して少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドを有する。他の態様において、第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、トラスツズマブのVH配列に対して100%同一であるアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド、およびトラスツズマブのVL配列に対して100%同一であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドを有する。

20

30

【0101】

表A1は、トラスツズマブCDRのアミノ酸配列を提示している。

【0102】

(表A1) トラスツズマブCDRのアミノ酸配列

40

SEQ ID NO:	配列	説明
49	GFKNIKDT	トラスツズマブ重鎖 CDR1
50	YPTNG	トラスツズマブ重鎖 CDR2
51	WGGDGFYAMDY	トラスツズマブ重鎖 CDR3
52	RASQDVNTAVA	トラスツズマブ軽鎖 CDR1
53	SASFYLYS	トラスツズマブ軽鎖 CDR2
54	QQHYTTPPT	トラスツズマブ軽鎖 CDR3

50

【0103】

WO2012 / 143523号は、トラスツズマブのものと同じエピトープと結合するそのほかの抗体(すなわち、それらはECD4との結合をめぐってトラスツズマブと競合する)を記載して

いる；具体的には実施例14に記載された第1群がある。いくつかの態様において、本発明の第1の抗原結合性ポリペプチド構築物は、そこに記載されたFab / scFvの配列を含む。

【0104】

いくつかの態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、米国特許第7,332,580号に記載された通りのscFv H3の変異体である。いくつかの態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、H3の6つのCDRに対して少なくとも95%同一なアミノ酸配列を有する6つのCDRを有する。他の態様において、CDRは、H3の6つのCDRに対して少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する。いくつかの態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、H3の6つのCDRに対して100%同一なアミノ酸配列を含む6つのCDRを有する。他の態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、H3のVH配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列、およびH3のVL配列に対して少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む第2のポリペプチドを有する。いくつかの態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、H3のVH配列に対して少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド、およびH3のVL配列に対して少なくとも80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98または少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドを有する。他の態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、H3のVH配列に対して100%同一であるアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド、およびH3のVL配列に対して100%同一であるアミノ酸配列を有する第2のポリペプチドを有する。

10

20

30

【0105】

いくつかの態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、構築物が、HER3のE CDに対する抗HER3 scFv H3の結合を50%またはそれを上回って遮断する配列を有する。他の態様において、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は、構築物が、HER3のECDに対する結合をめぐってヘレグリンと競合する配列を有する。

【0106】

(表A2) scFv H3 CDR配列：

説明	配列	SEQ ID NO:
HER3.H3 VH CDR1	SYWMS	64
HER3.H3 VH CDR2	NINRDGSASYYVDSVKG	65
HER3.H3 VH CDR3	DRGVGYFDL	66
HER3.H3 VL CDR1	TGTSSDVGGYNFVS	67
HER3.H3 VL CDR2	DVSDRPS	68
HER3.H3 VL CDR3	SSYGSSSTHVI	63

【0107】

ヒト化HER2抗体には、参照により本明細書に明示的に組み入れられる米国特許第5,821,337号の表3に記載された通りの、huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7およびhuMAb4D5-8またはトラスツズマブ（ハーセブチン（HERCEPTIN）（登録商標））；ならびにヒト化520C9（WO93/21319号）が含まれる。

40

【0108】

本発明の二重特異性抗原結合性構築物は、HER2のエピトープ4D5と特異的に結合する抗原結合性ポリペプチド構築物を含む。「エピトープ4D5」は、抗体4D5（ATCC CRL 10463）およびトラスツズマブが結合する、HER2の細胞外ドメイン内の領域である。このエピトープはHER2の膜貫通ドメインの近く、かつHER2のドメインIV内にある。4D5エピトープと結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されたもののような慣行的な交差遮断アッセイを行うことができる。または、抗体がHER2の4D5エピトープと結

50

合するか否かを評価するために、エピトープマッピングを行うこともできる（例えば、残基約529から残基約625までを含む領域における任意の1つまたは複数の残基。米国特許公開第2006 / 0018899号の図1を参照）。

【0109】

二重特異性抗原結合性構築物のそのコグネイト抗原に対する親和性を高めることができることが望ましい場合には、当技術分野において公知の方法を用いて、抗原結合性ポリペプチド構築物のその抗原に対する親和性を高めることができる。そのような方法の例は、以下の参考文献に記載されている。Birtalan et al. (2008) JMB 377, 15 s 18-1528 ; Gerstner et al (2002) JMB 321, 851-862 ; Kelley et al. (1993) Biochem 32(27), 6828-6835 ; Li et al. (2010) JBC 285(6), 3865-3871、およびVajdos et al. (2002) JMB 320, 415-428。 10

【0110】

そのような方法の一例は、親和性成熟である。HER2抗原結合ドメインの親和性成熟のための1つの例示的な方法は、以下に記載されている。トラスツズマブ / HER2 (PDBコード1N8Z) 複合体およびペルツズマブ / HER2複合体 (PDBコード1S78) の構造を、モデル化に用いる。分子動力学 (MD) を使用して、水性環境におけるWT複合体の固有の動的性質を評価することができる。平均場法およびデッドエンド排除 (dead-end elimination) 法を柔軟な骨格とともに用いて、スクリーニングしようとする突然変異体に関してモデル構造を最適化および調製することができる。パッキングに続いて、接触密度、クラッシュスコア (clash score) 、疎水性および静電気学を含む、いくつかの特徴をスコア化する。一般化ボルン法によって、溶媒環境の影響に関して正確なモデル化を行い、タンパク質中の特定の位置の代替的な残基型への突然変異後の自由エネルギーの差を計算することが可能になる。接触密度およびクラッシュスコアは、有効なタンパク質パッキングの決定的な局面である相補性の尺度を与える。スクリーニング手順では、知識ベースのポテンシャル、ならびにペアワイス残基相互作用エネルギーおよびエントロピーの計算に依拠するカップリング分析スキームを使用する。HER2結合を強化することが知られている文献上の突然変異、およびそれらの組み合わせを、以下の表にまとめている。 20

【0111】

(表A3) トラスツズマブ-HER2系に関してHER2との結合を増大させることが知られているトラスツズマブ突然変異

突然変異	報告されている改善度
H_D102W (H_D98W)	3.2X
H_D102Y	3.1X
H_D102K	2.3X
H_D102T	2.2X
H_N55K	2.0X
H_N55T	1.9X
L_H91F	2.1X
L_D28R	1.9X

30

40

【0112】

単鎖Fab型をとる抗原結合性ポリペプチド構築物

いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は、単鎖Fab型またはscFabにあるFabを含む。この型の説明は当業者には周知であり、例えば、国際特許公開公報第WO2014 / 018572号；US2010 / 0256338号；およびUS20110293613号に記載がある。これらの参考文献によるscFabの設計、発現および使用に関する説明は、参照により組み入れられる。 40

【0113】

1つの態様において、Fab型をとる抗原結合性ポリペプチド構築物はscFab型をとり、表A4に見いだされる配列を含む。この表は、CH3ドメイン、CH2ドメイン、CH1ドメイン、VHド

50

メイン、CLドメインおよびVLドメインを含む。

【0114】

(表A4) 例示的なscFabの配列

SEQ ID NO	説明	配列(ポリペプチド)
	Tras-HH41-scmab-HetFc001a(HH41リンカーを伴うトラスツズマブscmab)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYLSSTLTLSKADYEHKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGSSADDAAKDAAKDDAKKDDAKKDGGGGGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKLEWVARIYPNGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRNGDGFYAMDYWGQQLTVTSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	Tras-GSE34-scmab-HetFc001a(GSE34リンカーを伴うトラスツズマブscmab)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYLSSTLTLSKADYEHKKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGGGSEGGGSEGGGSEGGSSEGGGGSEGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRTFISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRNGDGFYAMDYWGQGTIQLTVTSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	H3-HH41-scmab-HetFc001b(HH41リンカーを伴うH3 scmab)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQQHPGKAPKLMIDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSSYGSSTHVIFGGGTKVTLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVLCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECGGGGGGGSSADDAAKDAAKDDAKKDDAKKDGGGGGGQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESSYWMWSVRQAPGKLEWVANINRDGSASYYDSVKGRTFISRDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGVGYFDLWGRGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSGSEGGGGGGQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESSYWMWSVRQAPGKLEWVANINRDGSASYYDSVKGRTFISRDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGVGYFDLWRGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	H3-GSE34-scmab-HetFc001b(GSE34リンカーを伴うH3 scmab)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNFVSWYQQHPGKAPKLMIDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSSYGSSTHVIFGGGTKVTLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVLCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECGGGGGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGGGGQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTESSYWMWSVRQAPGKLEWVANINRDGSASYYDSVKGRTFISRDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGVGYFDLWGRGTLTVTSSASTKGPSVFPLAPSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTWSNNSALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKENWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLLCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

20

30

40

SEQ ID NO	説明	配列 (DNA)
	Tras-HH41-scmab-HetFc001a (HH41 リンカーを伴う ト拉斯ツズマブscmab)	<p>GATATTAGATGACCCAGAGCCCTTCTTCCCTGTCCGCTTCCGGAGATCGCGTGACTA TTACTTGTGAGCCTCTCAGGATGTAAACACCAGCGCTGGCTTGGTACCAAGCAGAACGCTGG AAAAGCTCAAAGCTGCTGATCTACAGTCATCATTCTGTATTCAAGGAGTCCAAAGCCGG TTTAGCGGCAGGCCGGTCTGGCACAGACTTCACTCTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCCGAGG ATTTTGCACACTTACTATTGCCAGCAGCACTATACCAACACCCCCTACATTGGCAGGGAAC TAAAGTGGAGATCAAGCCACCGTGGCGCTCTCTGTGCTTCAATTTCACCCAGTGAC GAACAGCTGAAGTCCGGCACAGCCTCTGTGGTCTGTGCTGAACAATTTCACCCAGGAG AAGCCAAAGTGCAGTGGAAAGGTGATAACGCTCTGCAAGAGTGGCAACAGCCAGGAGACG GACCGAACAGGACTCCAAAGATTCTACATATAGTCTGTCTAGTACACTGACTCTGAGCAAG GCAGACTACGAGAACGCAAAAGTGTATGCTGCAAGTCACTCATCAGGGCTGTCAAGCC CCGTGACCAAGTCCTCAATAGGGAGAGTGTGGAGGGAGTGGAGGGTCAGGAGCTC TGCAGACGATGCCAAGAAAGACGCAGCAAGAAAGATGACGCCAAGAAAGACGATGCTAAG AAAGATGGAGGAGGGAGCGAGGAGGGTCCGGAGAGGTGCAGCTGGTCAAGCGGAGGAG GACTGGTGCAGCCTGGAGGCTCTGCGGCTGAGTTGCGCTGACATCAGGCTTCAACATCAA AGACACCTACATTGAGGAGACAGGCCCGCAAGGGACTGGAGTGGTGCAGGAG ATCTATCTACCAATGGCTACACAAGATATGCCACAGCGTGAAGGGCGCTTCACTATT GCGCAGATACTTCAAGAACACCGCTACCTGCAAGTGAACAGCCTGCGAGCTGAAGATA AGCAGTGTACTATTGTAGCCGGTGGGCGCGATGGATTCTACGCAATGGACTACTGGGA CAGGGAACCTGGTACCGCTCAAGCGTAGCACTAAGGGCTTCCGTGTTTCACTGG CTCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGTGAAGGATTA CTTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGAACTCAGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCACT TTTCCCGCAGTGCTGAGTCAGCGGACTGTACTCCCTGCTCTGTGGTACCGTGCCTA GTTCAAGCCTGGGACCCAGACATATATCTGCAACCTGAATCACAAGCCATAACAAA AGTCGACAAGAAAGTGGAGCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATACCTGCCACCTGTCCG GCGCCAGAACTGCTGGAGGACCAAGCGTGTCCCTGTTCCACCAAGCCTAAAGACACCC TGATGATTCCCGGACTCTGAGGTACCTGCGTGGAGCTGCTACGAGCTGCTACGAGGACCC CGAAGTCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCCTGCAAGTGCATAATGCCAAGACACAA CGGGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGACAGTGTGACCAGG ACTGGCTGAATGGAGGAGTATAAGTAAAGTGAACAAAGCCCTGCCGCCCAAT CGAAAAAAACATCTAAAGCAAAGACAGCCTCCGAACCACAGGTCTACGCTTACCCCC CCATCAAGAGATGAACTGACAAAAAAATCAGGTCTCTGACATGCTGGTCAAGGATTCT ACCCTTCCGACATCCCGTGGAGTGGAAAGTAACGCCAGCCGAGAACAAATTACAAGAC CACACCCCTGTCTGGACTCTGATGGAGTTCGCTCTGGTCAAGCTGACCGTGCAT AAAAGCCGGTGGCAGCAGGGCAATGTGTTAGCTGCTCCGTATGCCACGAAGCCCTGCACA ATCACTACACACAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC</p>
	Tras-GSE34-scmab-HetFc001a (GSE34 リンカーを伴う ト拉斯ツズマブscmab)	<p>GATATTAGATGACTCAGAGCCCTCAAGCCTGTCCCGTCCGGAGATAGAGTACTA TTACTTGTAGAGCCTCACAGGATGTAAACACCAGCGCTGGCATGGTACCAAGCAGAACGCTGG CAAAGCTCAAAGCTGCTGATCTACTCCGATCTTCTGTATTCTGGGCTCCAAGTCCGG TTTAGTGGCTCAAAGCGGGACAGACTTCACTCTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCCGAGG ATTTTGCACACTTACTATTGCCAGCAGCACTATACCAACACCCCCTACATTGGACAGGGAC TAAAGTGGAGATCAAGCCACCGTGGCGCTCTCTGTGCTTCAATTTCACCCAGCGAC GAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTGCTGAACAATTTCACCCAGGAG AAGCCAAAGTGCAGTGGAAAGGTGATAACGCTCTGCAAGTCCGGCAATTCTCAGGAGAGTGT GACCGAACAGGACTCAAAGATAGCACAATTCCCTGCTAGTACACTGACTCTGCTAAG GCAGACTACGAGAACGCAAAAGTGTATGCTGCAAGTGCAGTCACTCATCAGGGCTGTCAAGCC CCGTGACCAAGAGCTTCAATAGGGAGAGTGTCCGGAGGAGATGGAGGAGGAAGTGA GGGAGGAGGCAGCGAAGGCCGGGATCTGAGGGAGGCCGAAGTGGAGGCGGAGGATCAGGC</p>

10

20

30

40

		GGAGGAACCGGAGAGGTGCAGCTCGAATCCGAGGAGACTGGTCAGCCTGGAGGGT CCCTGCGACTGTTGCGCAGGCCAGTGGTTAACATCAAAGACACCTACATTCTATTGGGT GAGACAGGCTCCCGGAAGGGACTCGAGTGGGTGCAAGGATCTATCCTACCAATGGATAC ACAAGATATGCCGACAGCGTAAAGGCCGTTACTATTCAAGCAGATACTAGAAGAAC CCGCCTACCTGCAGATGAATAGCCTGCGAGCGAAGATAACAGTGTGTACTATTGTC GTGGGGGGAGATGGATTCTACGAATGGATTATTGGGACAGGGAACCTGGTCACCGTC TCAAGCGTAGCACTAAGGGCCTCCGTGTTCACTGGCTCCCTAGTAATCCACCT CTGGAGGCACAGCTGCAGTGGATGTCGGTAAGGATTACTCCCTGAACCAGTCACAGT GAGTTGGAACTCAGGGCTCTGACAAGTGGACTCCATACTTTCCCGAGTGCAGTC AGCGGACTGTACTCCCTGCTCTGGTCACCGTGCCAGTTCAAGCCTGGCACCCAGA CATATATGCAACGTGAATCACAAGCCATAAATACAAAAGTCGACAAGAACAGTGGAGCC CAAGAGCTGTGATAAAACTCATACCTGCCACCTTGTCCGGCCAGAACAGTGTGGAGGA CCAAGCGTGTCTGTTCCACCAAGCCTAAAGACACCCCTGATGATTCCCGACTCCTG AGGTCACTCCGTGGCGTGGACTGTCAGCAGGACCCCGAAGTCAGTTCAACTGGTA CGTGGATGGCGTGAAGTGCATAATGCCAAGACAAACCCCGGGAGGAACAGTACAACCT ACCTATAGAGTCGTGAGTGTCTGACAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAAGGAGT ATAAGTGTAAAGTGAGAACAAAGCCCTGCCGCCCAATCGAAAAAAATCTAAAGC AAAAGGACAGCCTGCCGAACCACAGGTCTACGTCTACCCCCATCAAGAGATGAACTGACA AAAATCAGGTCTCTGACATGCCGGTCAAAGGATTCTACCCCTGACATGCCGTGG AGTGGGAAAGTAACGCCAGCCGAGAACAAATTACAAGACCACACCCCTGTCCTGGACTC TGATGGGAGTTGCTCTGGTGTCAAAGCTGACCGTCGATAAAAGCCGTGGCAGCAGGGC AATGTGTITAGCTGCTCCGTATGCCAGAAGCCCTGCACAATCACTACACACAGAAGTCCC TGAGCCTGAGCCCTGGC	10
	H3-HH41-scmab- HetFc001b (HH41 リンカーを伴う H3 scmab)	CAGAGCGCACTGACTCAGCCGCCCTCCGTGTCGGTCCCTGGGAGAGCATTACTATT CATGTAAGTGGAAACAAGGCTCCGATGTCGGCGGGTACAACATTGTGAGCTGGTATCAGCAGCA CCCAGGAAAGGCCCAAAACTGATGATCTACGACGTGTCGATAGGCCCTCTGGCGTCAGT GACCGCTTCAGCGGCAGCAAGTCTGGCAATACGCCAGTCTGATCATTCAGGCCCTGCAGG CAGACGATGAGGCCGATTACTATTGAGCTCTATGGGTCTAGTTCAACTCATGTGATCTT CGGAGGGGGACCAAGGTGACAGTCTGGGGCAGCCTAAAGCCGCTCAAGCGTGACACTG TTTCCCTCTAGCTCCGAGGAACCTGAGGAAACAAAGGCCACTCTGGTGTCTGATTTCCG ACTTCTACCCCTGGGCTGTGACCGTCGCTTGAAGGCAGATTCTAGTCCGTGAAAGCAGG AGTCGAGACCACAACTCTCAAGCAGAGAACACAAGTACGCCAGCTCAAGCTATCTG AGTCTGACACCAGAACAGTGGAAAGGCCACCGCAGTTACTCATGCCAAGTGACTCATGAGG GCTCTACTGTGGAAAAAACCGTCGCCACAGAACATGTCGGGAGGCTCTGGAGGAGCAG CGGGCTCTGCCGACATGCTAAGAACAGCTGCAAGAACAGATGCCAAAGAAC GATGCTAAGAACAGTGGAGGAGGCAGCGGAGGAGGCTCCGGACAGGTGAGCTGAGGAGT CTGGAGGGAGCTGGTCAAGCCTGGAGGATCTCTGCACTGAGTTGCGCCGCTTCAGGCTT CACCTTCTAGTCATACTGGATGAGCTGGGTGAGACAGGCCAGGCAAAGGCTGGAATGG GTCGCAAACATCAATAGGACGGAGCGCCTCTACTATGTTGAGCTGCAAGGGACGGT TTACCATAGCAGACGATGCCAAAACCTCTGATCTGCAAGAACAGCTGAGGAGC TGAGGACACAGCAGTGTACTATTGTGCTGGGATAGAGGCGTCGGATATTGATCTGTGG GGACGAGGAACCCCTGGTACCGCTCAAGCGTAGCAAGCTGACTGGGCTCTGACAAGTGAGTCC TGGCTCCCTCTAGTAAATCCACCTCTGGAGGACAGCTGACTGGGATGTCGGTGAAGGA TTACTCCCTGAACCAGTCACAGTGAGTTGGAACCTGAGGCTCTGACAAGTGAGTCC ACTTTCCCGCAGTCTGCACTGAGCAAGCGACTGACTCCCTGCTCTGTTGACCCGTGC CTAGTTCAAGCCTGGGACCCAGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATAC AAAAGTCGACAAGAACAGTGGAGGCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATACCTGCCACCTGT CCGGCGCCAGAACAGTGTGGAGGACCAAGCGTGTCTGTTCCACCAAGCTAAAGACA CCCTGATGATTCCGGACTCCTGAGGTACCTGCGTGGTGTGACGTTGTCACGAGGA CCCCGAAGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTCAAGTGCAATGCCAAGACCAAA	20

30

30

40

	CCCCGGGAGGAACAGTACAACCTACCTATAGAGTCGTGAGTGCCTGACAGTGCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCGCC AATCGAAAAAACAACTCTCTAAAGCAAAAGCACAGCCTCGCGAACACAGGTCTACGTGCTG CCCCCTAGCCGCGACGAACGTGACTAAAAATCAGGTCCTCTGCTGTGTCTGGTCAAAGGAT TCTACCCCTCCGACATGCCGTGGAGTGGAAAGTAACGGCCAGCCGAGAACAAATTACCT GACCTGGCCCCCTGTGCTGGACTCTGATGGAGTTCTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTC GATAAAAGCCGGTGGCAGCAGGCAATGTGTTCACTGCTGCCGTACAGCACGAAGCACTGC ACAACCATTACACTCAGAAGTCCCTGTCCCTGTACACCTGGC
H3-GSE34-scmab- HetFc001b (GSE34リンクーを伴う H3 scmab)	CAGAGCGCACTGACTCAGCCTGCTTCCGTCCGGAGCCCTGGCAGAGCATTAACATCT CATGCACAGCCTACCCATCCGATGTCGGCGGTACAACACTTTGTGAGTTGGTATCAGCAGCA CCCAGGCAAGGCACCCAAACTGATGATCTACGACGTGCTGATAGGCCCTCTGGGTCAGT GACCGTTAGCGCGTCCAAGTCTGGAAATACCGCTCCCTGATCATTCTGGGCTGCAGG CTGACGATGAGGAGGAGATACTATTGAGCTCTATGGATCTAGTCAACTCATGTGATCTT CGGAGGCGGGACCAAGGTGACAGTCCCTGGGCCAGCCTAAAGCCCTCCATCCGTGACACTG TTTCCCCCTAGCTCCGAGGAACGTGAGGCAACAAGGCTACTCTGGTGTCTGATTAGCG ACTTCTACCCCTGGCGCTGTGACCGTCCGATGGAAGGCCATTAGTCCCGTGAAGCAGG CGTCGAGGACACAACTCCTCAAGCAGGCAACAAAGTACGAGCCTCAAGCTATCTG TCCCTGACACCAGAACAGTGGAGTCTCACCGCAGTTACTCATGCCAAGTGAUTCATGAGG GCAGCACTGTGGAAAACCCTGCCCCACAGAGTGTCCCTGGAGGAGGAGGAGTGGAGG AGGGTCAGAGGGAGGGCGGGAGCGAAGGAGGCGGGTCCGAGGGAGGAGGAGTGGCAAGC GGGAGCGGAGGAGGGTCCGGACAGGTGAGCTGCAGGAGTCCGGAGGAGGACTGGTCAAGC CTGGAGGCTCTGGCAGTGAATTGCGCTGCATCACGCTTACCTTAGTTACTCATGGAT GAGCTGGGTGAGACAGGCCACAGGAAAGGACTGGAATGGGTCGCAAACATCAATAGGGAC GGAAGCGCCTCTACTATGTGGATTCCGTCAAGGGCGTTTACCATTTAGAGACGATG CCAAAACACTCACTGTATCTGAGATGAATAGCCTGCGAGCCGAAGACACAGCTGTGTA TTGTGCTGGGATAGAGCGTCCGCTATTGATCTGTGGGACGAGGAACCTGGTCACC GTCTCAAGCGCTAGCACTAAGGGCCTCCGTGTTCCACTGGCTCCCTCTAGTAAATCCA CCTCTGGAGGCACAGCTGCACTGGGATGTCTGGTGAAGGATTACTCCCTGAACCAGTCAC AGTGAGTTGAAACTCAGGGCTCTGACAAGTGGAGTCCATACTTCCCGCAGTGTGCA TCAAGCGGACTGTACTCCCTGCTCTGTGGTCAACCGTGCAGTCAAGCCTGGCACCC AGACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCAAATACAAAGTCGACAAGAAAGTGG GCCCAAGAGCTGTGATAAAACTCATACCTGCCACCTGTCCGGGCCAGAACACTGCTGG GGACCAAGCGTGTCCCTGTTCCACCAAGCCTAAAGACACCCGTATGATTCCCGACTC CTGAGGTACCTCGCTGGCTGGACGCTGTCTCACGAGGACCCGAAGTCAGTCAACTG GTACGTGGATGGCGTCAAGTGCATAATGCCAAGACCAAACCCCCGGAGGAACAGTACAAC TCTACCTATAGAGTCGTGAGTGCCTGACAGTGCACCAGGACTGGCTGAATGGGAGG AGTATAAGTGTAAAGTGAGCAACAAAGCCCTGCCGCCAACTGAAAAAAACATCTAA AGCAAAAGGACAGCCTCGCAACCACAGGTCTACGTGCTGCCCTAGCCGCGACGA ACTAAAAATCAGGTCTCTGTGTTCTGTGCTGGTCAAAGGATTCTACCCCTCCGACATGCC TGGAGTGGGAAAGTAACGGCCAGCCGAGAACAAATTACCTGACCTGGCCCTGTGCTGG CTCTGATGGGAGTTCTTCTGTATTCAAAGCTGACAGTCGATAAAAGCCGGTGGCAGCAG GGCAATGTGTTCACTGCTCCGTACAGCACGAAGCACTGCACAAACCATTACACTCAGAAGT CCCTGTCCCTGTACACCTGGC

【0115】

40

いくつかの態様において、単離された本発明の二重特異性抗原結合性構築物は、HER2と結合するscFv型をとる第1の抗原結合性ポリペプチド構築物、およびHER3と結合するFab型をとる第2の抗原結合性ポリペプチド構築物を含み、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は 定常軽鎖(CL)アミノ酸配列を含む。

【0116】

他の態様において、本発明の単離された二重特異性抗原結合性構築物は、HER2と結合するscFv型をとる第1の抗原結合性ポリペプチド構築物、およびHER3と結合するFab型をとる第2の抗原結合性ポリペプチド構築物を含み、第2の抗原結合性ポリペプチド構築物は CLアミノ酸配列を含む。

【0117】

50

(表A5) 例示的な 定常軽鎖および 定常軽鎖の配列 :

SEQ ID NO:	説明	配列
	κ定常軽鎖ポリペプチド	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	κ定常軽鎖ポリヌクレオチド	AGAACCGTGGCGGCCAGGTCTTCATTTCCTCCAGCAGCGACTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTCTACCCCTCGCAGGGCTAAAGTGCAGTGGAAAGGTCGATAACGCACTGCAGTCCGAAATTCTCAGGAGAGTGTGACTGAAACAGGACTCAAAGATAGCACCTATTCCCTGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAAAGTGTATGCTTGTGAAGTCACCCACCAGGGCTGAGTTACCCAGTCACAAATCATTCACACAGAGGGGAGTGC
	λ定常軽鎖ポリペプチド	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	λ定常軽鎖ポリヌクレオチド	GGGCAGCCTAAAGCGGGCGCCCTCTGTGACTCTGTTCCCCCTA GCTCCGAGGAACCTGCAGGCTAACAAAGGCAACTCTGGTGTGTCTGATTAGCGACTCTACCCAGGAGCTGTGACCGTCGCCTGGAAGGCTGATTCTAGTCCCCTGAAAGCAGGCCGTCGAGACCAACTCTAGTAAGCAGTCAAACAACAAGTACGCAGCCTCAAGCTATCTGTCTTGACACCCGAACAGTGGAAAAGTCACAGGTCAATATAGCTGCCAGGTGACTCACGAGGGCTCAACTGTGGAGAAAACCGTCGACCCAACCGAATGTTCC

【0118】

10

20

解離定数 (K_D) および B_{max}

「解離定数 (K_D)」という用語は、本明細書で用いる場合、特定の抗原-抗体相互作用の解離速度を指すことを意図している。 K_D は、「オフ速度 (k_{off})」とも呼ばれる解離の速度と、会合速度、または「オン速度 (k_{on})」との比である。したがって、 K_D は k_{off} / k_{on} に等しく、モル濃度 (M) として表現される。その結果、 K_D が小さいほど、結合の親和性は強くなる。このため、1mMの K_D は、1nMの K_D と比較して弱い結合親和性を示している。抗体に関する K_D 値は、当技術分野において十分に確立した方法を用いて決定することができる。抗体の K_D を決定するための1つの方法は、典型的にはBiacore (登録商標) システムなどのバイオセンサーシステムを用いる表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いることによる。

30

【0119】

抗体の結合特性は、さまざまな手法によって決定することができる。その1つは、フローサイトメトリー (FACS、蛍光活性化細胞分取法) による、抗原を発現する標的細胞に対する結合の測定である。典型的には、そのような実験では、標的細胞を種々の濃度の抗体とともにインキュベートして洗浄し、二次検出用抗体とともにインキュベートして洗浄した上で、フローサイトメーターで分析して、細胞上の検出シグナルの強さを表す蛍光強度中央値 (MFI) を測定し、それを統計して、細胞と結合した抗体の数と関連づける。抗体濃度とMFIデータとの関係を飽和結合式に適合させて、2つの重要な結合パラメーターである B_{max} および見かけの K_D を得る。

【0120】

40

B_{max} 、または最大結合とは、抗体の飽和濃度での細胞上の最大抗体結合レベルのことです。このパラメーターは、相対的比較のために任意単位MFIとして報告することもでき、または標準曲線を用いて、細胞と結合した抗体の数に対応する絶対値に変換することもできる。

【0121】

見かけの K_D 、または見かけの解離定数は、最大半値細胞結合が観察される抗体濃度を表す。明らかに、 K_D 値が小さいほど、最大細胞結合に達するために必要とされる抗体濃度は低くなり、それ故に抗体の親和性は高くなる。見かけの K_D は、細胞結合実験の条件、例えば細胞上で発現される受容体レベルの違いおよびインキュベーション条件などに依存し、それ故に見かけの K_D は一般に、SPRおよびITCなどの無細胞分子実験から決定される K_D 値と

50

は異なる。しかし、種々の方法の間には一般に良好な一致がみられる。

【0122】

溶解性および内部移行性の二重特異性抗原結合性構築物

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、これらの抗体が以下の有効性因子：a)二重特異性抗原結合性構築物が内部移行される能力、b)二重特異性抗原結合性構築物のB_{max}の増大、およびc)二重特異性抗原結合性構築物のアゴニズム／部分的アゴニズムの度合い、の間で示すバランスに応じて、二重特異性溶解性(BSP-L)抗体および二重特異性内部移行性(BSP-Int)抗体という2つのサブタイプに分類することができる。

【0123】

上述した有効性因子に関して、BSP-L抗体について最も重要な考慮事項は、単一特異性一価抗体または単一特異性二価抗体と比較して、B_{max}がより増していること、およびオフ速度が遅いことである(それ故に、BSP-Lによる標的細胞の修飾および抗体依存性細胞傷害作用はより高度となる)。理論上、BSP-L抗体は、OAA(1アーム抗体)またはFSA(フルサイズ抗体)と比較して、より増したB_{max}で標的細胞と結合する上、内部移行も示さないため、細胞上での抗体の最大修飾/蓄積が最大となる。理論上、BSP-Lは標的受容体のコグネイトリガンド活性化を遮断しないと考えられる。BSP-L抗体は、完全に中和性(コグネイトリガンド相互作用を両方の標的で遮断する)または部分的に中和性(コグネイトリガンド相互作用を、より広範囲に発現される標的受容体で遮断する)であってよいと考えられる。そのようなBSP-L抗体はFc R受容体および補体タンパク質と結合することができ、高い細胞表面濃度であることから免疫細胞ベースのエフェクター活性の誘導もより効果的である。BSP-L抗体はそれ故に、二重特異性抗原結合性構築物がADCC、ADCPまたはCDCなどのFcエフェクター機能を通じて標的細胞を死滅させるために用いられる適応症において有用である。BSP-Lは、理論上は、その標的に対するコグネイトリガンドの非存在下ではアゴニズムを示さず、予期される副作用プロフィールに応じて非中和性のことも中和性のこともある。ある度合いのアゴニズムおよび内部移行が観察される場合であっても、より増したB_{max}はこれらを克服して、OAAおよびFSAよりも依然としてより優れる、正味の有効な効果をもたらすと考えられる。

【0124】

上述した有効性因子に関して、BSP-Int抗体についてはB_{max}がより増大していること、および特に内部移行の度合いが、二重特異性抗原結合性構築物をBSP-Intカテゴリーに分類する上で鍵となる要因である。理論上、BSP-Int抗体は、OAAまたはFSAと比較して、より増大したB_{max}で標的細胞と結合し(それ故にBSP-Intによる標的細胞のより高度な修飾をもたらす)、効果的に内部移行を受けて、細胞増殖を全く誘導しないと考えられる。BSP-LならびにOAAおよびFSAと比較すると、B_{max}が高いことと、高い内部移行性が相まって、BSP-Intのより高い細胞内濃度がもたらされる。標的に対して提示されるアゴニズムの度合いはそれほど重要ではなく、BSP-Intがアゴニスト活性を欠くことが不可欠でもないが、これはBSP-Int抗体が、部分的に活性化された受容体を、往復しながらペイロードを細胞内に運ぶトロイの木馬(Trojan)として用いることによってこれを利用しうるためである。そのようなBSP-Int抗体は、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)の調製に用いるのに適しており、標的細胞への毒性薬物の送達が望まれる適応症の治療に用いることができる。この方式を用いることで、急性細胞死を引き起こす毒性の強いペイロードの送達によって、BSP-Intに付与されたある程度のアゴニスト活性を克服しうると考えられる。

【0125】

B_{max}の増大

本発明の単離された二重特異性抗原結合性構築物は、HER2およびHER3を発現する細胞において、2つの第1の抗原結合性ポリペプチド構築物(例えば、トラスツズマブ)または2つの第2の抗原結合性ポリペプチド構築物(例えば、H3)を含む参照二価単一特異性抗体と比較して、より大きな最大結合(B_{max})を呈する。いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は、参照二価単一特異性抗体のB_{max}の1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍または2.0倍であるB_{max}を呈する。

10

20

30

40

50

【0126】

B_{max}は、飽和抗体濃度で達成され、Kd（抗体のオン速度およびオフ速度）はB_{max}に寄与する。結合のオン速度が遅くてオフ速度が速い抗体は、オン速度が速くてオフ速度が遅い抗体と比較して、見かけのB_{max}が低い。

【0127】

本発明による抗原結合性構築物に関して、B_{max}とFSAとの最も明らかな分離は飽和濃度で起こり、この場合にはB_{max}はもはやFSAとともに長くはならない。非飽和濃度では有意性はより低い。1つの態様において、単一特異性二価抗原結合性構築物と比較した抗原結合性構築物のB_{max}およびKD / オン-オフ速度の増大は、標的細胞上の標的抗原発現のレベルとは独立している。1つの態様において、抗原結合性構築物がHER2と結合する抗原結合性ポリペプチド構築物を含む場合、単一特異性二価抗原結合性構築物と比較した抗原結合性構築物のB_{max}およびKD / オン-オフ速度の増大は、標的細胞上でのHER2発現のレベルとは独立している。

10

【0128】

本明細書に記載の単離された抗原結合性構築物のいくつかの態様において、前記抗原結合性構築物は、2つの抗原結合領域を伴う対応する単一特異性二価抗原結合性構築物と比較して、前記抗原を提示する標的細胞に対する結合密度およびB_{max}（最大結合）の増大を呈する。いくつかの態様において、結合密度およびB_{max}の前記増大は、対応する二価抗原結合性構築物の結合密度およびB_{max}の少なくとも約125%である。ある態様において、結合密度およびB_{max}の増大は、対応する二価抗原結合性構築物の結合密度およびB_{max}の少なくとも約150%である。いくつかの態様において、結合密度およびB_{max}の増大は、対応する二価抗原結合性構築物の結合密度およびB_{max}の少なくとも約200%である。いくつかの態様において、結合密度およびB_{max}の増大は、対応する二価抗原結合性構築物の結合密度およびB_{max}の約110%を上回る。

20

【0129】

ポリペプチドおよびポリヌクレオチド

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、少なくとも1つのポリペプチドを含む。本明細書に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも同じく記載される。

【0130】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基の重合体を指すために本明細書において互換的に用いられる。すなわち、ポリペプチドに向けられる記述は、ペプチドの記述およびタンパク質の記述にも等しく当てはまり、その逆も同様である。これらの用語は、天然のアミノ酸重合体、ならびに1つまたは複数のアミノ酸残基が天然にはコードされないアミノ酸であるアミノ酸重合体にも適用される。本明細書で用いる場合、これらの用語は、完全長タンパク質を含む任意の長さのアミノ酸鎖を範囲に含む。アミノ酸残基は共有結合性ペプチド結合によって連結されている。

30

【0131】

「アミノ酸」という用語は、天然および非天然のアミノ酸、ならびに、天然のアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体のことを指す。天然にコードされるアミノ酸は、20種の一般的なアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン）ならびにピロリジンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体とは、天然のアミノ酸と同じ基本的な化学構造、すなわち、炭素に水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基、例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムが結合したものを有する化合物のことを指す。そのような類似体は、改変されたR基（例えば、ノルロイシンなど）または改変されたペプチド骨格を有するが、天然のアミノ酸と同じ基本的な化学構造は保っている。アミノ酸への言及は、例えば、天然のタンパク質新生のL-アミノ酸；D-アミノ酸、化学的に改変されたアミノ酸、例えば、アミノ酸変異体および誘導体など；天然の非タ

40

50

ンパク質新生のアミノ酸、例えば -アラニン、オルニチンなど；ならびにアミノ酸に特徴的であることが当技術分野において公知の特性を有する化学合成された化合物を含む。非天然アミノ酸の例には、 -メチルアミノ酸（例えば、 -メチルアラニン）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（例えば、2-アミノ-ヒスチジン、 -ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン）、側鎖中に余分なメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、ならびに側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基によって置き換えられているアミノ酸（例えば、システイン酸）が非限定的に含まれる。合成された非ネイティブなアミノ酸、置換アミノ酸、または1つもしくは複数のD-アミノ酸を含む非天然アミノ酸を本発明のタンパク質に組み入れることは、いくつかの異なる意味で有益でありうる。D-アミノ酸を含有するペプチドなどは、L-アミノ酸を含有する対応物と比較して、インビトロまたはインビボでの安定性の増大を示す。したがって、D-アミノ酸を組み入れたペプチドなどの構築は、より高い細胞内安定性が所望されるかまたは必要とされる場合に特に有用でありうる。より具体的には、D-ペプチドなどは、内因性ペプチダーゼおよびプロテアーゼに対して抵抗性であり、それにより、分子の生物学的利用能の改善およびインビボでの寿命延長を、そのような特性が望ましい場合にもたらす。さらに、D-ペプチドなどは、Tヘルパー細胞に対する主要組織適合性複合体クラスII拘束性提示のための効率的なプロセシングを受けることができず、それ故に、生物体全体における体液性免疫応答を誘導する可能性も低い。

10

【0132】

アミノ酸は、それらの一般的に知られた三文字記号によって、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨している一文字記号のいずれかによって、本明細書において言及することができる。ヌクレオチドも同様に、一般的に認められている一文字コードによって言及することができる。

20

【0133】

また、抗原結合性構築物のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも本発明に含まれる。「ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド配列」という用語は、2つまたはそれを上回るヌクレオチド分子の連続したひとつながりのことを示すことを意図している。ヌクレオチド配列は、ゲノム、cDNA、RNA、半合成もしくは合成起源のもの、またはそれらの任意のそれらの任意の組み合わせのものであってよい。

30

【0134】

「核酸」という用語は、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはリボヌクレオチド、および一本鎖形態または二本鎖形態にある重合体のことを指す。具体的に限定されない限り、この用語はまた、参照核酸と類似の結合特性を有し、かつ天然のヌクレオチドと類似の様式で代謝される、天然ヌクレオチドの公知の類似体を含有する核酸も範囲に含む。具体的に別記しない限り、この用語はまた、PNA（ペプチド核酸）を含むオリゴヌクレオチド類似体、アンチセンス技術に用いられるDNAの類似体（ホスホロチオエート、ホスホロアミデートなど）のことも指す。別記しない限り、特定の核酸配列はまた、保存的に改変されたその変異体（縮重コドン置換体を非限定的に含む）および相補的配列、ならびに明示的に示されている配列も、暗黙的に範囲に含む。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの第3の位置が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基によって置換された配列を作製することによって達成することができる（Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991) ; Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985) ; Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994) ）。

40

【0135】

「保存的に改変された変異体」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に対して適用される。個々の核酸配列に関して、「保存的に改変された変異体」とは、同一もしくは本質的に同一なアミノ酸配列をコードする核酸のこと、または核酸がアミノ酸配列をコードしない場合には、本質的に同一な配列のことを指す。遺伝暗号の縮重性のために、多数の機能的に同一な核酸が、任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、

50

GCGおよびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。このため、コドンによってアラニンが指定されるあらゆる位置で、コードされるポリペプチドを変化させずに、そのコドンを対応する記載のコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸変種は「サイレント変種 (silent variation)」であり、これは保存的に改変された変種の一種である。あるポリペプチドをコードする本明細書中のあらゆる核酸配列は、その核酸のあらゆる可能なサイレント変種をも記述している。当業者は、核酸中の各コドン（通常はメチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常はトリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く）を改変して、機能的に同一な分子を得ることができると認識しているであろう。したがって、あるポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変種が、記載された各配列の中に内在する。

10

【0136】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされる配列中の単一のアミノ酸または低比率のアミノ酸を改変、付加または欠失させる、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の配列に対する個々の置換物、欠失物または付加物が、その改変によってあるアミノ酸の化学的に類似したアミノ酸による置換がもたらされる「保存的に改変された変異体」であることを認識しているであろう。機能的に類似したアミノ酸を提示している保存的置換の表は当業者には周知である。そのような保存的に改変された変異体は、本発明の多型変異体、種間相同体およびアレルに追加されるものであり、それらを除外しない。

【0137】

機能的に類似したアミノ酸を提示している保存的置換の表は当業者には周知である。以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換物であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A) 、グリシン (G) ; 2) アスパラギン酸 (D) 、グルタミン酸 (E) ; 3) アスパラギン (N) 、グルタミン (Q) ; 4) アルギニン (R) 、リジン (K) ; 5) イソロイシン (I) 、ロイシン (L) 、メチオニン (M) 、バリン (V) ; 6) フェニルアラニン (F) 、チロシン (Y) 、トリプトファン (W) ; 7) セリン (S) 、トレオニン (T) ; および [0139] 8) システイン (C) 、メチオニン (M) (例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993) を参照) 。

20

【0138】

2つまたはそれを上回る核酸またはポリペプチド配列の文脈において、「同一な」または「一致」度 (percent "identity") という用語は、同一である2つまたはそれを上回る配列または部分配列のことを指す。配列は、それらが、以下の配列比較アルゴリズム（または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）のうちの1つを用いるか、または手作業によるアライメントおよび目視評価による測定で、比較ウインドウまたは指示された領域にわたって最大の対応関係が得られるように比較およびアライメントを行った場合に、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドを有するパーセンテージ（すなわち、指定された領域にわたって約60%の同一性、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%の同一性）で有するならば、「実質的に同一」である。この定義はまた、被験配列の相補物のことも指す。同一性は、少なくとも約50アミノ酸もしくはヌクレオチドの長さの領域、または少なくとも75~100アミノ酸もしくはヌクレオチドの長さの領域にわたって、または指定のない場合にはポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列全体にわたって存在することができる。ヒト以外の種由来のホモログを含む、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチド配列またはその断片を有する標識化プローブを用いるストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でライプラリーをスクリーニングする段階、ならびに前記ポリヌクレオチド配列を含有する完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する段階を含むプロセスによって入手することができる。そのようなハイブリダイゼーション手法は、当業者に周知である。

30

【0139】

配列比較のためには、典型的には、1つの配列を、被験配列と比較するための参考配列として役立てる。配列比較アルゴリズムを用いる場合には、被験配列および参考配列をコンピュータに入力し、必要に応じて部分配列の座標を指定して、配列アルゴリズムプログ

40

50

ラムのパラメーターを指定する。デフォルトのプログラムパラメーターを用いることができ、または別のパラメーターを指定することもできる。続いて、配列比較アルゴリズムが、プログラムのパラメーターに基づいて、参照配列を基準として被験配列の配列一致度を算出する。

【0140】

「比較ウィンドウ」とは、本明細書で用いる場合、ある配列を同じ数の連続した位置を持つ参照配列と、2つの配列の最適なアラインメントを行った後に比較しうるような、20～600個、通常は約50～約200個、より一般的には約100～約150個からなる群より選択される数の連続した位置のうちいずれか1つのセグメントに対する言及を含む。比較のための配列のアラインメントの方法は当技術分野において周知である。比較のための配列の最適なアラインメントは、限定はされないが、Smith and Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482cの局所相同性アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444の類似性検索法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ・インプリメンテーション (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIのGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA) により、または手作業によるアラインメントおよび目視検査 (例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)を参照) によって、実施することができる。10

【0141】

配列一致度および配列類似度の決定のために適したアルゴリズムの一例には、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムがあり、これらはそれぞれ、Altschul et al. (1997) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402、およびAltschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410に記載されている。BLAST解析を行うためのソフトウェアは、ワールドワイドウェブのncbi.nlm.nih.gov.でアクセスしうるNational Center for Biotechnology Informationに公開されている。BLASTアルゴリズムのパラメーターであるW、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラムは(ヌクレオチド配列の場合)デフォルトとしてワード長(W)11、期待値(E)10、M=5、N=-4および両ストランドの比較を用いる。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムはデフォルトとしてワード長3および期待値(E)10、ならびにBLOSUM62スコアリング行列(Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915を参照)のアラインメント(B)50、期待値(E)10、M=5、N=-4および両ストランドの比較を用いる。BLASTアルゴリズムは典型的には、「低複雑度」のフィルターをオフにして行われる。20

【0142】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計分析も行う(例えば、Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787を参照)。BLASTアルゴリズムによって得られる類似性の尺度の1つは、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間に偶然に一致が生じる確率の目安を提供する、最小合計確率(P(N))である。例えば、被験核酸を参照核酸と比較した場合の最小合計確率が約0.2未満、または約0.01未満、または約0.001未満である場合、核酸は参照配列と類似しているとみなされる。30

【0143】

「～と選択的に(または特異的に)ハイブリダイズする」という語句は、特定のヌクレオチド配列が、複合混合物(全細胞またはライプラリーのDNAまたはRNAを非限定的に含む)中に存在する場合に、ストリン杰ントなハイブリダイゼーション条件下で、その配列に対してのみ分子が結合すること、二重鎖を形成すること、またはハイブリダイズすることを指す。40

【0144】

「ストリン杰ントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、当技術分野において公知であるような低イオン強度および高温の条件下での、DNA、RNA、もしくは他の核酸、またはそれらの組み合わせの配列のハイブリダイゼーションのことを指す。典型的には

10

20

30

40

50

、ストリンジエントな条件下では、プローブは、核酸の複合混合物（全細胞またはライブラリーのDNAもしくはRNAを非限定的に含む）中のその標的部分配列とはハイブリダイズするが、複合混合物中の他の配列とはハイブリダイズしない。ストリンジエントな条件は配列依存的であり、異なる環境においては異なると考えられる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範な手引きは、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993))に記載がある。

【0145】

本明細書で用いる場合、「遺伝子操作する、遺伝子操作された、遺伝子操作」という用語は、ペプチド骨格の任意の操作、または天然もしくは組換えポリペプチドもしくはその断片の翻訳後改変を含むとみなされる。遺伝子操作には、アミノ酸配列の、グリコシル化パターンの、または個々のアミノ酸側の鎖基の改変、ならびにこれらのアプローチの組み合わせが含まれる。遺伝子操作されたタンパク質は、標準的な分子生物学の手法によって発現されて產生される。

10

【0146】

「単離された核酸分子またはポリヌクレオチド」とは、そのネイティブな環境から取り出されている核酸分子、DNAまたはRNAのことを意図する。例えば、ベクター中に含有される、ポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、単離されていると見なされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞内に維持されている組換えポリヌクレオチドまたは溶液中にある精製された（部分的もしくは実質的に）ポリヌクレオチドが含まれる。単離されたポリヌクレオチドには、そのポリヌクレオチド分子を通常含有する細胞内に含有されるが、染色体外またはその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在するポリヌクレオチド分子が含まれる。単離されたRNA分子には、インビボまたはインビトロのRNA転写物、ならびにプラス鎖およびマイナス鎖の形態、および二本鎖形態が含まれる。本明細書に記載の単離されたポリヌクレオチドまたは核酸には、合成的に、例えばPCRまたは化学合成を介して生産されるそのような分子がさらに含まれる。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、ある態様において、調節エレメント、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターなどを含む。

20

【0147】

「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」という用語は、一般に、例えば、米国特許第4,683,195号に記載されているように、インビトロでの所望のヌクレオチド配列の増幅のための方法のことを指す。一般に、PCR法は、テンプレート核酸と選択的にハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチドプライマーを用いるプライマー伸長合成の反復サイクルを伴う。

30

【0148】

本発明の参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも、例えば95%「同一」なヌクレオチド配列を有する核酸またはポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列の各100ヌクレオチド当たりに最大5つまでの点突然変異を含みうることを除いて、そのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることを意図している。換言すれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るには、参照配列のヌクレオチドの最大5%までが欠失するか、もしくは別のヌクレオチドで置換されてもよく、または参照配列における全ヌクレオチドの最大5%までの数のヌクレオチドが参照配列中に挿入されてもよい。参照配列のこれらの変更は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端の位置または末端位置間の任意の場所に存在してもよく、参照配列の中のヌクレオチドの間に個々に、または参照配列内の1つもしくは複数の連続した群として分散してもよい。実際には、任意の特定のポリヌクレオチド配列が本発明のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるか否かは、公知のコンピュータープログラム、例えばポリペプチドに関して上記に考察したもの（例えば、ALIGN-2）を用いて従来通りに決定

40

50

することができる。

【0149】

ポリペプチドの誘導体または変異体は、誘導体または変異体のアミノ酸配列が元のペプチドからの100アミノ酸の配列に対して少なくとも50%の同一性を有する場合、そのペプチドと「相同性」を有する、または「相同である」と言われる。ある態様において、誘導体または変異体は、その誘導体と同数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片のものと少なくとも75%同じである。ある態様において、誘導体または変異体は、その誘導体と同数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片のものと少なくとも85%同じである。ある態様において、誘導体のアミノ酸配列は、その誘導体と同数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片のものと少なくとも90%同じである。いくつかの態様において、誘導体のアミノ酸配列は、誘導体と同数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片のものと少なくとも95%同じである。ある態様において、誘導体または変異体は、誘導体と同数のアミノ酸残基を有するペプチドまたはペプチドの断片のものと少なくとも99%同じである。

10

【0150】

「改变された」という用語は、本明細書で用いる場合、所与のポリペプチドに対して加えられる任意の変更、例えば、ポリペプチドの長さ、ポリペプチドのアミノ酸配列、化学構造、翻訳時改变または翻訳後改变に対する変化のことを指す。「(改变された)」形態という用語は、考察されているポリペプチドが任意で改变されること、すなわち、考察されているポリペプチドが改变されていてもよく、または改变されていなくてもよいことを意味する。

20

【0151】

「翻訳後に改变された」という用語は、天然または非天然のアミノ酸がポリペプチド鎖に組み込まれた後に、そのアミノ酸に対して生じるその任意の改变のことを指す。この用語は、あくまで例示に過ぎないが、インビボでの翻訳時改变、インビトロでの翻訳時改变（無細胞翻訳系などにおける）、インビボでの翻訳後改变、およびインビトロにおける翻訳後改变を範囲に含む。

30

【0152】

「リフォールディング」とは、本明細書で用いる場合、ポリペプチドを含むジスルフィド結合を、不適切に折りたたまれた状態または折りたたまれていない状態から、ジスルフィド結合に関してネイティブなまたは適切な折りたたみ高次構造に転換させる任意のプロセス、反応または方法を記述している。

【0153】

「コフォールディング(cofolding)」とは、本明細書で用いる場合、特に、互いに相互作用して、折りたたまれていないかまたは不適切に折りたたまれたポリペプチドの、ネイティブなポリペプチドまたは適切に折りたたまれたポリペプチドへの転換をもたらす、少なくとも2つの単量体ポリペプチドを使用するリフォールディングプロセス、反応または方法のことを指す。

【0154】

「二量体」または「ヘテロ二量体」とは、少なくとも第1の単量体ポリペプチドおよび第2の単量体ポリペプチドを含む分子のことである。ヘテロ二量体の場合、その単量体の一方は、もう一方の単量体とは少なくとも1つのアミノ酸残基に違いがある。ある態様において、二量体の集合は、表面領域の埋没によって主導される。いくつかの態様において、単量体ポリペプチドは、所望の二量体形成を有利にし、かつ／または他の所望されない標本の形成を不利にすることによって二量体形成を主導する静電相互作用および／または塩橋相互作用によって、互いに相互作用する。いくつかの態様において、単量体ポリペプチドは、所望の二量体形成を有利にし、かつ／または他の集合の型の形成を不利にすることによって所望の二量体形成を主導する疎水性相互作用によって、互いに相互作用する。ある態様において、単量体ポリペプチドは、共有結合形成によって互いに相互作用する。ある態様において、共有結合は、天然に存在するかまたは導入される、所望の二量体形成

40

50

を主導するシステインの間に形成される。本明細書に記載のある態様において、共有結合は単量体の間には形成されない。いくつかの態様において、ポリペプチドは、所望の二量体形成を有利にし、かつ／または他の所望されない態様の形成を不利にすることによって二量体形成を主導するパッキング／サイズ相補性／ノブ-イントゥー-ホール／突出部-空洞型の相互作用によって、互いに相互作用する。いくつかの態様において、ポリペプチドは、二量体形成を主導するカチオン-相互作用によって、互いに相互作用する。ある態様において、個々の単量体ポリペプチドは、溶液中では単離された単量体として存在することはできない。

【0155】

発現

10

また、宿主細胞におけるポリペプチドの発現を介して二重特異性抗原結合性構築物を生産する方法も本明細書に記載される。

【0156】

二重特異性抗原結合性構築物、例えば抗体を、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株において発現させうることが理解されよう。特定の抗体をコードする配列を用いて、適した哺乳動物宿主細胞を形質転換させることができる。形質転換は、例えば、ポリヌクレオチドをウイルス中（もしくはウイルスベクター）中にパッケージングした上で、宿主細胞にウイルス（もしくはベクター）による形質導入を行うこと、または米国特許第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号および第4,959,455号（これらの特許は参照により本明細書に組み入れられる）に例示されているような当技術分野において公知のトランスフェクション手順によるものを含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の公知の方法によって行うことができる。用いられる形質転換手順は、形質転換させようとする宿主に応じて異なる。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入するための方法は当技術分野において周知であり、これにはデキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム沈降、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔、リポソーム内へのポリヌクレオチドの封入、および核内へのDNAの直接微量注入が含まれる。

20

【0157】

発現のための宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は当技術分野において周知であり、これには、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、ヒト上皮腎臓293細胞、およびさまざまな他の細胞株を非限定的に含む、American Type Culture Collection（ATCC）から入手可能なものの中の不死化細胞株が含まれる。特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有し、構成性のManLAM結合特性を備える抗体を産生するかを判定することを通じて選択される。

30

【0158】

「発現カセット」という用語は、標的細胞における特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸エレメントを有する、組換え的にまたは合成的に作製されたポリヌクレオチドのことを指す。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス、または核酸断片に組み入れることができる。典型的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、配列の中でも特に、転写させようとする核酸配列およびプロモーターを含む。ある態様において、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合性分子またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

40

【0159】

「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、「発現構築物」と同義であり、それと機能的に結びついた特定の遺伝子を標的細胞に導入して、そこでのその発現を導くために用いられるDNA分子のことを指す。この用語には、自己複製性核酸構造としてのベクター、ならびにそれが導入されている宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターが含まれる。本発明の発現ベクターは発現カセットを含む。発現ベクターは、多量の安定なmRNAの転写を可能にする。ひとたび発現ベクターが標的細胞内に入ると、遺伝子によってコ

50

ードされるリボ核酸分子またはタンパク質が、細胞の転写および／または翻訳機構によって產生される。1つの態様において、本発明の発現ベクターは、本発明の二重特異性抗原結合性分子またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットを含む。

【0160】

「細胞」、「宿主細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」は、本明細書において互換的に用いられ、そのような用語はすべて、細胞の増殖または培養によって生じる子孫も含むと理解されるべきである。「形質転換」および「トランスフェクション」は、細胞中にDNAを導入するプロセスを指すために互換的に用いられる。

【0161】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養物」という用語は互換的に用いられ、外因性核酸が導入された細胞のことを、そのような細胞の子孫を含めて指す。宿主細胞には「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これらには、初代形質転換細胞およびそれらに由来する子孫が、継代数とは関係なく含まれる。ある態様において、子孫は核酸の内容の点で親細胞と完全に同一ではなく、突然変異を含んでもよい。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異型の子孫が、本明細書において含まれる。宿主細胞は、本発明の二重特異性抗原結合性分子を作製するために用いる任意の型の細胞系である。宿主細胞には、培養細胞、例えば、いくつか例を挙げると、哺乳動物培養細胞、例えばCHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髄腫細胞、P3X63マウス骨髄腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞またはハイブリドーマ細胞など、酵母細胞、昆虫細胞および植物細胞が含まれるが、トランシジェニック動物、トランシジェニック植物または培養植物組織もしくは動物組織に含まれる細胞も含まれる。

10

20

【0162】

「組換え宿主細胞」または「宿主細胞」とは、挿入のために用いられる方法、例えば、直接取り込み、形質導入、f交配、または組換え宿主細胞を作製するための当技術分野において公知の他の方法とは関係なく、外因性ポリヌクレオチドを含む細胞のことを指す。外因性ポリヌクレオチドは、非組み込みベクター、例えばプラスミドとして維持されてもよく、または代替的に、宿主ゲノム中に組み込まれてもよい。

30

【0163】

本明細書で用いる場合、「真核生物」という用語は、真核生物の系統学的領域に属する生物、例えば、動物（哺乳動物、昆虫、爬虫類、鳥類などを非限定的に含む）、纖毛虫類、植物（单子葉植物、双子葉植物、藻類等などを非限定的に含む）、菌類、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物などのことを指す。

40

【0164】

本明細書で用いる場合、「原核生物」という用語は、原核性生物のことを指す。例えば、非真核性生物は、真正細菌（大腸菌（*Escherichia coli*）、サーマス・サーモフィラス（*Thermus thermophilus*）、バチルス・ステアロサーキュラス（*Bacillus stearothermophilus*）、シュードモナス・フルオレセンス（*Pseudomonas fluorescens*）、シュードモナス・エルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）、シュードモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*）などを非限定的に含む）の系統学的領域、または古細菌（メタノコッカス・ジャナスキー（*Methanococcus jannaschii*）、メタノバクテリウム・サーモアウトロフィカム（*Methanobacterium thermoautotrophicum*）、ハロバクテリウム（*Halobacterium*）属）、例えばハロフェラックス・ボルカニ（*Haloferax volcanii*）およびハロバクテリウム属種NRC-1など、アーケオグロブス・フルギダス（*Archaeoglobus fulgidus*）、パイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）、パイロコッカス・ホリコシイ（*Pyrococcus horikoshii*）、エロビラム・ペルニクス（*Aeuryopyrum pernix*）などを非限定的に含む）の系統学的領域に属しうる。

【0165】

本明細書で用いる場合、「培地（medium）」または「培地（media）」という用語は、

50

細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真核宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、CHO細胞、原核宿主細胞、大腸菌、またはシュードモナス宿主細胞を含む任意の宿主細胞、および細胞含有物を支持または含有しうる任意の培養培地、溶液、固体、半固体または剛性支持体を含む。このため、この用語は、そこで宿主細胞が増殖した培地、例えば、増殖段階の前または後のいずれかの培地を含む、その中にタンパク質が分泌された培地を範囲に含みうる。この用語はまた、本明細書に記載の構築物が細胞内で産生され、その構築物を放出するように宿主細胞が溶解または崩壊される場合などにおける、宿主細胞溶解物を含む緩衝剤または試薬も範囲に含みうる。

【0166】

「実質的に精製された」という用語は、その天然に存在する環境、すなわちネイティブな細胞において、またはある態様における組換え生産された構築物の場合には宿主細胞において見られるような、タンパク質に通常付随するかまたは相互作用する成分を実質的もしくは本質的に含まない、本明細書に記載の構築物またはその変異体のことを指し、これは実質的に細胞物質を含まず、混入性タンパク質が（乾燥重量で）約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満であるタンパク質の調製物を含む。構築物またはその変異体が宿主細胞によって組換え生産される場合、ある態様におけるタンパク質は、細胞の乾燥重量の約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%もしくはそれ未満で存在する。構築物またはその変異体が宿主細胞によって組換え生産される場合、ある態様におけるタンパク質は、細胞の乾燥重量の約5g/L、約4g/L、約3g/L、約2g/L、約1g/L、約750mg/L、約500mg/L、約250mg/L、約100mg/L、約50mg/L、約10mg/L、または約1mg/Lもしくはそれ未満で培養培地中に存在する。ある態様において、本明細書に記載の方法によって産生される「実質的に精製された」構築物は、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SEC、およびキャピラリー電気泳動などの適切な方法による判定で、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%の純度水準、具体的には少なくとも約75%、80%、85%の純度水準、より具体的には少なくとも約90%の純度水準、少なくとも約95%の純度水準、少なくとも約99%またはそれを上回る純度水準を有する。

【0167】

抗原結合性構築物の組換え生産および合成生産の方法

ある態様において、記載される構築物は、酵母、細菌などの微生物、またはヒトもしくは動物細胞株からの分泌によって組換え分子として産生される。諸態様において、ポリペプチドは宿主細胞から分泌される。

【0168】

諸態様は、本明細書に記載の構築物を発現するように形質転換された細胞、例えば酵母細胞などを含む。形質転換された宿主細胞それ自体に加えて、栄養培地中のそれらの細胞の培養物、好ましくはモノクローナル（クローン的に均質な）培養物、またはモノクローナル培養物由来の培養物も提供される。ポリペプチドが分泌される場合、培地はポリペプチドを、細胞を伴って、またはそれらが濾過されるかもしくは遠心分離されていた場合には細胞を伴わずに含有すると考えられる。培地は、細胞を伴って、あるいはそれらが濾過されまたは遠心分離されていた場合には細胞を伴わずに、ポリペプチドを含有する。細菌（例えば、大腸菌および枯草菌 (*Bacillus subtilis*)）、酵母（例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、クルイベロミセス・ラクチス (*Kluyveromyces lactis*) およびピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)）、糸状真菌（例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*)）、植物細胞、動物細胞および昆虫細胞を含む、数多くの発現系が公知であり、用いることができる。

【0169】

本明細書に記載の抗原結合性構築物は、従来のやり方で、例えば、宿主染色体中または遊離プラスミド上に挿入されたコード配列から産生される。酵母は、通常の方法のいずれ

10

20

30

40

50

か、例えば電気穿孔により、所望のタンパク質のコード配列を用いて形質転換される。電気穿孔による酵母の形質転換のための方法は、Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182. に開示されている。

【0170】

形質転換に成功した細胞、すなわち本発明のDNA構築物を含有する細胞は、周知の手法によって同定することができる。例えば、発現構築物の導入によって生じた細胞を増殖させて、所望のポリペプチドを産生させることができる。細胞を採取し、溶解させて、Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503またはBerent et al. (1985) Biotech. 3, 208によって記載されたような方法を用いて、それらのDNA内容物をそのDNAの存在に関して検討することができる。または、上清中のタンパク質の存在を、抗体を用いて検出することもできる。

10

【0171】

有用な酵母プラスミドベクターには、pRS403-406およびpRS413-416が含まれ、それらは一般に入手可能である。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405およびpRS406は酵母組み込みプラスミド(YIp)であり、酵母選択マーカーHIS3、7RP1、LEU2、およびURA3を組み込む。プラスミドpRS413-416は、酵母動原体プラスミド(Ycp)である。

【0172】

相補的付着末端を介してDNAをベクターと機能的に結合させるために、種々の方法が開発されている。例えば、相補的ホモポリマー区域を、ベクターDNAに挿入されるDNAセグメントに付加することができる。続いて、ベクターおよびDNAセグメントが相補的ホモポリマー尾部間の水素結合によって連結されて、組換えDNA分子を形成する。

20

【0173】

1つまたは複数の制限部位を含む合成リンカーは、DNAセグメントをベクターと連結させる代替的な方法を提供する。エンドヌクレアーゼ制限消化によって生成されたDNAセグメントを、突出している一本鎖末端を3'5'-エキソヌクレアーゼ活性によって除去し、陥凹3'末端をポリマー形成活性によって充填する酵素である、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼIで処理する。

【0174】

このように、これらの活性の組み合わせによって、平滑末端DNAセグメントが生成される。続いて、この平滑末端セグメントを、平滑末端DNA分子の連結を触媒することができる酵素、例えばバクテリオファージT4DNAリガーゼなどの存在下において、モル過剰量のリンカー分子とインキュベートする。このため、この反応の生成物は、末端にポリマー性リンカー配列を保有するDNAセグメントである。続いて、これらのDNAセグメントを適切な制限酵素によって切断して、DNAセグメントのものと適合性のある末端を生成する酵素によって切断された発現ベクターと連結させる。

30

【0175】

種々の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む合成リンカーが、いくつかの販売元から市販されている。

【0176】

アルブミン、融合タンパク質を発現させるための宿主として、本発明の実施において有用であると考えられる酵母の例示的な属には、ピキア(Pichia)属(以前はハンゼヌラ(Hansenula)属として分類)、サッカロミセス(Saccharomyces)属、クリベロミセス(Kluyveromyces)属、アスペルギルス(Aspergillus)属、カンジダ(Candida)属、トルロプシス(Torulopsis)属、トルラスピラ(Torulaspora)属、シゾサッカロミセス(Schizosaccharomyces)属、シテロミセス(Citeromyces)属、パチソレン(Pachysolen)属、ザイゴサッカロミセス(Zygosaccharomyces)属、デバラロミセス(Debaromyces)属、トリコデルマ(Trichoderma)属、セファロスボリウム(Cephalosporium)属、フミコーラ(Humicola)属、ムコール(Mucor)属、ニューロスボラ(Neurospora)属、ヤロウイア(Yarrowia)属、メトシュニコウイア(Metschunikowia)属、ロドスボリジウム(Rhodospodium)属、ルコスボリジウム(Leucosporidium)属、ボトリオアスカス(Botryoascus)属。

40

50

属、スパリジオボラス (*Sporidiobolus*) 属、エンドミコプシス (*Endomycopsis*) 属などがある。好ましい属は、サッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、クルイベロミセス属、ピキア属、およびトルラスピラ属からなる群より選択されるものである。サッカロミセス属種の例には、*S. cerevisiae* (*S. cerevisiae*)、*S. italicus* (*S. italicus*) および*S. rouxii* (*S. rouxii*) がある。

【0177】

クルイベロミセス属種の例には、*K. fragilis* (*K. fragilis*)、*K. lactis* (*K. lactis*) および*K. marxianus* (*K. marxianus*) がある。適したトルラスピラ属種には、*T. delbrueckii* (*T. delbrueckii*) がある。ピキア (ハンゼヌラ) 属種の例には、*P. angusta* (*P. angusta*) (以前は*H. polymorpha* (*H. polymorpha*))、*P. anomala* (*P. anomala*) (以前は*H. anomala* (*H. anomala*)) および*P. pastoris* (*P. pastoris*) がある。*S. cerevisiae* の形質転換のための方法は、一般に、EP 251 744号、EP 258 067号およびWO 90/01063号に教示されており、それらはすべて参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0178】

本明細書に記載の抗原結合性構築タンパク質を含むベクター、宿主細胞、ならびに合成および組換えの手法による構築物タンパク質の生産が提供される。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルス、またはレトロウイルスベクターであってよい。レトロウイルスベクターは、複製能があつてもよく、または複製能欠損性でもよい。後者の場合には、ウイルス増殖は一般に、補完性のある宿主細胞においてのみ生じる。

20

【0179】

ある態様において、本明細書に記載の抗原結合性構築物をコードするポリヌクレオチドは、宿主内での増殖のための選択マーカーを含有するベクターと連結される。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿物などの沈殿物の中、または荷電脂質との複合体の中にある状態で導入される。ベクターがウイルスである場合、それは適切なパッケージング細胞株を用いてインビトロでパッケージングされ、続いて宿主細胞内に形質導入される。

【0180】

ある態様において、ポリヌクレオチドインサートは、適切なプロモーター、いくつか例を挙げると、ファージ PL プロモーター、大腸菌 lac、trp、phoA および rac プロモーター、SV40 初期および後期プロモーター、ならびにレトロウイルスLTRのプロモーターなどに機能的に連結される。他の適したプロモーターも当業者には公知であろう。発現構築物はさらに、転写開始、終結のための部位、および転写領域においては、翻訳のためのリボソーム結合部位を含む。構築物によって発現される転写物のコード部分は、好ましくは、翻訳されるポリペプチドの開始部に翻訳開始コドンを、その終端部に適切に位置する終止コドン (UAA、UGA、または UAG) を含む。

30

【0181】

示されるように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択マーカーを含む。そのようなマーカーには、真核細胞培養のためのジヒドロ葉酸レダクターゼ、G418、グルタミンシンターゼまたはネオマイシン耐性、ならびに大腸菌および他の細菌における培養のためのテトラサイクリン、カナマイシン、またはアンピシリン耐性遺伝子が含まれる。適切な宿主の代表的な例には、大腸菌細胞、ストレプトミセス細胞およびネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) 細胞などの細菌細胞；酵母細胞（例えば、サッカロミセス・セレビシエまたはピキア・パストリス (ATCC アクセッション番号 201178)）などの真菌細胞；ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2 および スポドプテラ (*Spodoptera*) Sf9 細胞などの昆虫細胞；CHO、COS、NSO、293、および Bowes 黒色腫細胞などの動物細胞；ならびに植物細胞が非限定的に含まれる。上記の宿主細胞のための適切な培養培地および条件は、当技術分野において公知である。

40

【0182】

細菌に用いるのに好ましいベクターには、QIAGEN, Inc. から入手可能な pQE70、pQE60 および pQE-9；pBluescript ベクター、ファージスクリプトベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18

50

A ; Stratagene Cloning Systems, Inc. から入手可能なpNH46A；ならびにPharmacia Biotech, Inc. から入手可能なptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5がある。好ましい真核生物ベクターには、Stratageneから入手可能なpWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG；ならびにPharmaciaから入手可能なpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVLがある。酵母系に用いるのに好ましい発現ベクターには、pYES2、pYD1、pTEF1 / Zeo、pYES2 / GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalpha、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K、およびPAO815（すべてInvitrogen, Carlsbad, CAから入手可能）が非限定的に含まれる。他の適したベクターも当業者には容易に明らかになるであろう。

【0183】

1つの態様において、本明細書に記載の抗原結合性構築物をコードするポリヌクレオチドは、原核細胞もしくは真核細胞の特定の区画への本発明のタンパク質の局在を導くか、および／または原核細胞もしくは真核細胞からの本発明のタンパク質の分泌を導くシグナル配列と融合される。例えば、大腸菌においては、タンパク質の発現を細胞膜周辺腔に導くことが望ましいことがある。ポリペプチドの発現を細菌の細胞膜周辺腔に導く目的で抗原結合性構築物が融合されるシグナル配列またはタンパク質（またはその断片）の例には、peIBシグナル配列、マルトース結合タンパク質（MBP）シグナル配列、MBP、ompAシグナル配列、周辺質大腸菌熱不安定性エンテロトキシンBサブユニットのシグナル配列、ならびにアルカリリフォスファターゼのシグナル配列が非限定的に含まれる。タンパク質の局在を導く融合タンパク質の構築のために、New England Biolabs. から入手可能なpMALシリーズのベクター（具体的にはpMAL-.rho.シリーズ）などのいくつかのベクターが市販されている。1つの具体的な態様において、本発明のポリヌクレオチドアルブミン融合タンパク質をpeIBペクチン酸アーチシグナル配列と融合させて、グラム陰性細菌におけるのようなポリペプチドの発現および精製の効率を高めることができる。米国特許第5,576,195号および同第5,846,818号を参照されたく、それらの内容はその全体が参考により本明細書に組み入れられる。

10

20

30

【0184】

哺乳動物細胞における分泌を導く目的で抗原結合性構築物と融合されるシグナルペプチドの例には、MPIF-1シグナル配列（例えば、GenBankアクセスション番号AAB51134のアミノ酸1～21）、スタンニオカルシンシグナル配列

(MLQNSAVLLLLVISASA)

、およびコンセンサスシグナル配列
(MPTWAWWLFLVLLALWAPARG)

が非限定的に含まれる。バキュロウイルス発現系とともに用いられる適したシグナル配列には、gp67シグナル配列（例えば、GenBankアクセスション番号AAA72759のアミノ酸1～19）がある。

40

【0185】

選択マーカーとしてグルタミンシナーゼ（GS）またはDHFRを用いるベクターは、それぞれメチオニンスルホキシミンまたはメトトレキサートという薬物の存在下で増幅される。グルタミンシナーゼを基にしたベクターの利点は、グルタミンシナーゼ陰性である細胞株（例えば、ネズミ骨髄腫細胞株、NSO）を利用しうることである。また、グルタミンシナーゼ発現系は、内因性遺伝子の働きを防止するために追加の阻害薬を与えることにより、グルタミンシナーゼ発現細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）においても機能しうる。グルタミンシナーゼ発現系およびその構成要素は、PCT公報：W087 / 04462号；W086 / 05807号；W089 / 10036号；W089 / 10404号；およびW091 / 06657号に詳述されており、これらの記載内容は参考により本明細書に組み入れられる。さらに、グルタミンシナーゼ発現ベクターは、Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, N.H.) からも入手可能である。マウス骨髄腫細胞におけるGS発現系を用いるモノクローナル抗体の発現および产生は、Bebbington et al., Bio/technology 10:169(1992)およびBiblia and Robinson Biotechnol. Prog. 11:1(1995)に記載されており、これらは参考により本明細書に組み入れられる。

50

【0186】

本明細書に記載の単離された抗原結合性構築物をコードする核酸を含む宿主細胞も、本明細書において提供される。ある態様において、本明細書に記載の宿主細胞において抗原結合性ポリペプチド構築物をコードする核酸およびFc構築物をコードする核酸は单一のベクター中に存在する。

【0187】

本明細書において提供されるのは、本明細書に記載の単離された抗原結合性構築物を調製する方法であって、(a)抗原結合性構築物をコードする核酸を含む宿主細胞を培養する段階；および(b)宿主細胞培養物から抗原結合性構築物を回収する段階、を含む方法である。

10

【0188】

同じく提供されるのは、本明細書に記載のベクター構築物を含有する宿主細胞、およびさらに、当技術分野において公知の手法を用いて1つまたは複数の異種制御領域（例えば、プロモーターおよび／またはエンハンサー）と機能的に結びつけられたヌクレオチド配列を含有する宿主細胞である。宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えば、ヒト由来細胞）などの高等真核細胞、もしくは酵母細胞などの下等真核細胞であってよく、または宿主細胞は細菌細胞などの原核細胞であってもよい。挿入された遺伝子配列の発現をモジュレートするか、または所望の特定の様式で遺伝子産物の改変およびプロセシングを行う宿主株を選択することができる。ある特定のプロモーターからの発現を、ある特定の誘導因子の存在下で高めることができる；それ故に、遺伝的に操作されたポリペプチドの発現を制御することができる。さらに、種々の宿主細胞が、タンパク質の翻訳および翻訳後のプロセシングおよび改変（例えば、リン酸化、切断）のための特徴および特定の機構を有する。適切な細胞系を選択して、発現される外来性タンパク質の所望の改変およびプロセシングを確実に行わせることができる。

20

【0189】

宿主細胞内への本発明の核酸および核酸構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、陽イオン脂質媒介トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染、または他の方法によって生じさせることができる。そのような方法は、Davis et al., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986)などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。本発明のポリペプチドは、組換えベクターを欠く宿主細胞によって実際に発現されうることを特に想定している。

30

【0190】

本明細書において考察されるベクター構築物を含有する宿主細胞を範囲に含むことに加えて、本発明はまた、内因性遺伝物質を欠失するかもしくは置き換える、かつ／または遺伝物質を含むように遺伝子操作された、脊椎動物起源、特に哺乳動物起源の、初代、二次、および不死化宿主細胞も範囲に含む。内因性ポリヌクレオチドと機能的に結びつけられた遺伝物質は、内因性ポリヌクレオチドを活性化し、変化させ、かつ／または増幅させることができる。

【0191】

加えて、当技術分野において公知の技術を用いて、異種ポリヌクレオチドおよび／または異種制御領域（例えば、プロモーターおよび／もしくはエンハンサー）を、相同組換えを介して、治療用タンパク質をコードする内因性ポリヌクレオチド配列と機能的に結びつけることができる（例えば、1997年6月24日に発行された米国特許第5,641,670号；国際特許出願公開第W096 / 29411号；国際特許出願公開第W094 / 12650号；Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989)；およびZijlstra et al., Nature 342:435-438 (1989)を参照されたく、これらのそれぞれの開示内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる）。

40

【0192】

本明細書に記載の抗原結合性構築物は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフ

50

イー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷相互作用クロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーなどの周知の方法によって、組換え細胞培養物から回収および精製することができる。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）が精製のために使用される。

【0193】

ある態様において、本発明の構築物タンパク質は、Q-セファロース、DEAEセファロース、poros HQ、poros DEAE、Toyopearl Q、Toyopearl QAE、Toyopearl DEAE、Resource / Source QおよびDEAE、Fractogel QおよびDEAEカラム上でのクロマトグラフィーを非限定的に含む、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製される。

10

【0194】

特定の態様において、本明細書に記載のタンパク質は、SP-セファロース、CMセファロース、poros HQ、poros CM、Toyopearl SP、Toyopearl CM、Resource / Source SおよびCM、Fractogel SおよびCMカラムならびにその等価物および同等物を非限定的に含む、陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて精製される。

【0195】

加えて、本明細書に記載の抗原結合性構築物を、当技術分野において公知の技術を用いて化学的に合成することもできる（例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N.Y and Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984) を参照）。例えば、ポリペプチドの断片に対応するポリペプチドを、ペプチド合成装置の使用によって合成することができる。さらに、必要に応じて、非古典的アミノ酸または化学アミノ酸類似体を、置換または付加としてポリペプチド配列中に導入することができる。非古典的アミノ酸には、一般的なアミノ酸のD-異性体、2,4ジアミノ酪酸、L-アミノイソ酪酸、4アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシリニアラニン、D-アラニン、フルオロ-アミノ酸、デザイナーアミノ酸、例えば、D-メチルアミノ酸、C-D-メチルアミノ酸、N-D-メチルアミノ酸、および一般的なアミノ酸類似体が非限定的に含まれる。さらに、アミノ酸は、D(右旋性)であってもL(左旋性)であってもよい。

20

【0196】

翻訳後改変

ある態様において、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、翻訳中または翻訳後に差異を伴って改変される。

【0197】

いくつかの態様において、改変は以下のうち少なくとも1つである：グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切斷、および抗体分子または他の細胞リガンドとの結合。いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄による特異的化学切斷；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；およびツニカマイシンの存在下における代謝合成を非限定的に含む、公知の手法によって化学的に改変される。

40

【0198】

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物のそのほかの翻訳後改変には、例えば、N結合型またはO結合型糖鎖、N末端またはC末端のプロセシング、アミノ酸骨格に対する化学部分の結びつけ、N結合型またはO結合型糖鎖の化学的改変、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加または欠失が含まれる。本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、タンパク質の検出および単離が可能になるように、検出可能な標識、例えば酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識によって改変され

50

る。ある態様において、適した酵素標識の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適した補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジンビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれ；適した蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが含まれ；発光物質の例にはルミノールが含まれ；生物発光物質の例にはルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが含まれ；適した放射性物質の例には、ヨウ素、炭素、イオウ、トリチウム、インジウム、テクネチウム、タリウム、ガリウム、パラジウム、モリブデン、キセノン、フッ素が含まれる。

【0199】

10

具体的な態様において、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、放射性金属イオンと会合する大環状キレート剤と結びつけられる。

【0200】

20

いくつかの態様において、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、天然のプロセス、例えば翻訳後プロセシングなどによって、または当技術分野において周知の化学的改変手法によって改変される。ある態様においては、同じ型の改変が、所与のポリペプチド中のいくつかの部位に同じ程度またはさまざまな程度で存在しうる。ある態様において、本明細書に記載の二重特異性抗原コンジュゲートからのポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝状であり、いくつかの態様においては、分枝を伴うかまたは伴わない環状である。環状、分枝状、および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後天然プロセスの結果であるか、または合成方法によって作製される。改変には、アセチル化、アシリ化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などの転移RNA媒介性のタンパク質へのアミノ酸付加、およびユビキチン化が含まれる（例えば、PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) ; POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983) ; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990) ; Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992) を参照）。

30

【0201】

ある態様において、本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は固体支持体と結びつけられ、これは本明細書に記載のアルブミン融合タンパク質による結合を受けるか、それと結合するかまたは会合するポリペプチドの免疫アッセイまたは精製のために特に有用である。そのような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが非限定的に含まれる。

40

【0202】

抗原結合性構築物は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／遮断基による誘導体化、タンパク質分解切斷、および抗体分子または他の細胞リガンドとの結合によって、翻訳中または翻訳後に差異を伴って改変されうる。数多くの化学的改変のうち任意のものを、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄による特異的化学切斷；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；およびツニカマイシンの存在下における代謝合成などを非限定的に含む、公知の手法によって行うことができる。

【0203】

本明細書の範囲に含まれるそのほかの翻訳後改変には、例えば、N結合型またはO結合型糖鎖、N末端またはC末端のプロセシング、アミノ酸骨格に対する化学部分の結びつけ、N

50

結合型またはO結合型糖鎖の化学的改変、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加または欠失が含まれる。

【0204】

抗原結合性構築物を、タンパク質の検出および単離が可能になるように、検出可能な標識、例えば酵素標識、蛍光標識、同位体標識または親和性標識によって改変することができる。

【0205】

適した酵素標識の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、¹⁰ -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適した補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジンビオチンおよびアビジン／ビオチンが含まれ；適した蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフイコエリトリンが含まれ；発光物質の例にはルミノールが含まれ；生物発光物質の例にはルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが含まれ；適した放射性物質の例には、ヨウ素、炭素、イオウ、トリチウム、インジウム、テクネチウム、タリウム、ガリウム、パラジウム、モリブデン、キセノン、フッ素が含まれる。

【0206】

具体的な態様において、抗原結合性構築物またはその断片もしくは変異体は、放射性金属イオンと会合する大環状キレート剤と結びつけられる。

【0207】

上述したように、本明細書に記載の抗原結合性構築物は、天然のプロセス、例えば翻訳後プロセシングなどによって、または当技術分野において周知の化学的改変手法によって改変される。同じ型の改変が、所与のポリペプチド中のいくつかの部位に同じ程度またはさまざまな程度で存在しうる。本明細書に記載のポリペプチドは、例えば、ユビキチン化の結果として分枝状であり、分枝を伴うかまたは伴わない環状である。環状、分枝状、および分枝環状ポリペプチドは、翻訳後天然プロセスの結果であるか、または合成方法によって作製される。改変には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合性架橋の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペグ化、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、ブレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などの転移RNA媒介性のタンパク質へのアミノ酸付加、およびユビキチン化が含まれる（例えば、PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993) ; POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983) ; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990) ; Rattan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992) を参照）。³⁰

【0208】

ある態様において、本明細書に記載の抗原結合性構築物は固体支持体と結びつけられ、これは本明細書に記載のアルブミン融合タンパク質による結合を受けるか、それと結合するかまたは会合するポリペプチドの免疫アッセイまたは精製のために特に有用である。そのような固体支持体には、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが非限定的に含まれる。⁴⁰

【0209】

また、ポリペプチドの可溶性、安定性および循環時間の増加、または免疫原性の低下などのさらなる利点をもたらしうる、抗原結合性構築物の化学的に改変された誘導体も本明細書において提供される（米国特許第4,179,337号を参照）。誘導体化のための化学部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、⁵⁰

カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどの水溶性ポリマーから選択してよい。タンパク質は、分子内のランダムな位置で、または分子内の所定の位置で改変することができ、または1つ、2つ、3つもしくはそれを上回る結びつけられた化学成分を含んでもよい。

【0210】

ポリマーは任意の分子量のものであってよく、分枝状であっても分枝状でなくてもよい。ポリエチレングリコールに関して、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造を容易にするために約1kDa～約100kDaである（「約」という用語は、ポリエチレングリコールの調製物において、一部の分子が記述される分子量よりも大きいか、または小さい重量であることを示す）。所望の治療プロフィール（例えば、所望の持続放出の持続期間、あるとすれば生物活性に対する効果、取り扱いの容易さ、抗原性の程度または欠如、および治療用タンパク質または類似体に対するポリエチレングリコールの他の公知の効果）に応じて、他のサイズを用いてもよい。例えば、ポリエチレングリコールは、約200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、105,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、または100,000kDaの平均分子量を有しうる。

10

【0211】

抗体薬物コンジュゲート

ある態様において、二重特異性抗原結合性構築物は、薬物、例えば、毒素、化学療法薬、免疫調節薬、または放射性同位体とコンジュゲートされる。ADC（抗体薬物コンジュゲート）を調製するいくつかの方法が当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第8,624,003（ポット法）、第8,163,888号（一段階）および第5,208,020号（二段階法）に記載されている。

20

【0212】

いくつかの態様において、薬物は、メイタンシン、オーリスタチン、カリケアマイシン、またはそれらの誘導体から選択される。他の態様において、薬物は、DM1およびDM4から選択されるメイタンシンである。

30

【0213】

いくつかの態様において、薬物は、SMCCリンカー（DM1）またはSPDBリンカー（DM4）によって、単離された二重特異性抗原結合性構築物とコンジュゲートされている。薬物-抗体比（DAR）は、例えば、1.0～6.0または3.0～5.0または3.5～4.2であってよい。

30

【0214】

いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は、細胞傷害性薬剤とコンジュゲートされている。「細胞傷害性薬剤」という用語は、本明細書で用いる場合、細胞の機能を阻害するかまたは妨げる、および／または細胞の破壊を引き起こす物質のことを指す。この用語は、放射性同位体（例えば、At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212、およびLuの放射性同位体）、化学療法薬、および毒素、例えば小分子毒素、または細菌、真菌、植物もしくは動物由来の酵素活性毒素に、それらの断片および／もしくは変異体を含めたものなどを含むことを意図している。

40

【0215】

抗体-薬物コンジュゲートの調製

ADCは、当業者に公知の有機化学反応、条件および試薬を用いて、いくつかの経路によって調製することができる：（1）抗体の求核基または求電子基と二価リンカー試薬との反応によって、共有結合を介して抗体-リンカー中間体Ab-Lを形成させ、その後に活性化薬物部分Dと反応させること；および（2）薬物部分の求核基または求電子基とリンカー試薬の反応によって、共有結合を介して薬物-リンカー中間体D-Lを形成させ、その後に抗体の求核基または求電子基と反応させること。コンジュゲーション方法（1）および（2）を

50

、種々の抗体、薬物部分およびリンカーとともに使用することにより、本明細書に記載の抗体-薬物コンジュゲートを調製することができる。

【0216】

ADCを調製する方法のいくつかの具体的な例が当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第8,624,003(ポット法)、第8,163,888号(一段階)および第5,208,020号(二段階法)に記載されている。

【0217】

抗体上の求核基には、以下のものが非限定的に含まれる：(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリジン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、および(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基またはアミノ基。アミン基、チオール基および水酸基は求核性であり、リンカー部分またはリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができ、これには(i)活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸エステル、および酸ハロゲン化物；(ii)アルキルハロゲン化物およびベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミドなど；(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル基およびマレイミド基、が含まれる。ある種の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばDTT(クリーランド試薬、ジチオトレイトール)またはTCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩；Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, Mass.)などによる処理によって、リンカー試薬とのコンジュゲーションに対する反応性を持たせることができる。すなわち、各システインのジスルフィド架橋により、理論上は2つの反応性チオール求核基が形成される。リジンと2-イミノチオラン(トラウト試薬)との反応を通じて抗体にさらなる求核基を導入して、アミンをチオールに変換させることもできる。

10

20

30

【0218】

また、抗体を改変して、リンカー試薬または薬物上の求核性置換基と反応しうる求電子部分を導入することによって、抗体-薬物コンジュゲートを生成させることもできる。グリコシル化抗体の糖を、例えば過ヨウ素酸酸化試薬によって酸化させ、リンカー試薬または薬物部分のアミン基と反応しうるアルデヒドまたはケトン基を形成させることもできる。得られたイミンシップ塩基基は安定な連結を形成することができ、またはこれを例えばボロヒドリド試薬によって還元させて安定なアミン結合を形成させることもできる。1つの態様において、グリコシル化抗体の糖質部分をガラクトースオキシダーゼまたはメタ過ヨウ素酸ナトリウムのいずれかと反応させることによって、薬物の適切な基と反応しうるカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基をタンパク質中に生じさせることもできる(Hermanson, G. T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p234-242)。別の態様において、N末端セリンまたはトレオニン残基を含むタンパク質をメタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応させて、最初のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成させることもできる(Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; 米国特許第5,362,852号)。そのようなアルデヒドを薬物部分またはリンカー求核試薬と反応させることができることもできる。

40

【0219】

同様に、薬物部分上の求核基には、(i)活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸エステル、および酸ハロゲン化物；(ii)アルキルハロゲン化物およびベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミドなど；(iii)アルデヒド、ケトン、カルボキシル基およびマレイミド基を含むリンカー部分およびリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成することができ、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリールヒドラジド基が、非限定的に含まれる。

【0220】

例えば、メイタンシンをMay-SSCH3に変換させることができ、これを遊離チオールであるMay-SHに還元させた上で、改変された抗体と反応させて(Chari et al (1992) *Cancer Research* 52:127-131)、ジスルフィドリンカーを有するメイタンシノイド-抗体イムノコ

50

ンジュゲートを生成させることができる。ジスルフィドリンクーを有する抗体-メイタンシノイドコンジュゲートが報告されている (WO 04 / 016801号 ; 米国特許第6,884,874号 ; US 2004 / 039176 A1号 ; WO 03 / 068144号 ; US 2004 / 001838 A1号 ; 米国特許第6,441,163号 ; 米国特許第5,208,020号 ; 米国特許第5,416,064号 ; WO 01 / 024763号)。ジスルフィドリンクーSPPは、リンクー試薬N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペントノエートを用いて構築される。本発明のADCは、SMCCリンクーおよびDM1メイタンシノイド薬物部分を含む。

【0221】

Ab-(SMCC-DM1)pの1つの態様において、平均pは1、2、3または4である (WO 2005 / 03799 10号)。ADCの別の態様はAb-(SIAB-DM1)pである。

【0222】

薬物は、抗体上のコンジュゲーション箇所と反応する基を有するか、またはそれを含むように改変される。例えば、薬物は、アルキル化（例えば、抗体の -アミノ基リジンまたはN末端で）、酸化された糖質の還元的アミノ化、ヒドロキシリル基とカルボキシリル基との間のエステル交換、アミノ基またはカルボキシリル基でのアミド化、およびチオールとのコンジュゲーションによって結びつけることができる。いくつかの態様において、抗体分子1つ当たりにコンジュゲートされる薬物部分の数pは、平均で1~8；1~7、1~6、1~5、1~4、1~3、または1~2の範囲にわたる。いくつかの態様において、pは平均で2~8、2~7、2~6、2~5、2~4、または2~3の範囲にわたる。他の態様において、pは平均で1、2、3、4、5、6、7、または8である。いくつかの態様において、pは平均で約1~約8；約1~約7、約1~約6、約1~約5、約1~約4、約1~約3、または約1~約2の範囲にわたる。いくつかの態様において、pは約2~約8、約2~約7、約2~約6、約2~約5、約2~約4、または約2~約3の範囲にわたる。コンジュゲーションのために用いられる化学反応の例については、例えば、Current Protocols in Protein Science (John Wiley & Sons, Inc.), Chapter 15 (Chemical Modifications of Proteins) (その開示内容はその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0223】

例えば、タンパク質の化学的活性化が遊離チオール基の形成をもたらす場合には、タンパク質をスルフヒドリル反応性作用物質とコンジュゲートさせることができる。1つの局面において、その作用物質は遊離チオール基に対して実質的に特異的なものである。そのような作用物質には、例えば、マレイミド、ハロアセトアミド（例えば、ヨード、プロモまたはクロロ）、ハロエステル（例えば、ヨード、プロモまたはクロロ）、ハロメチルケトン（例えば、ヨード、プロモまたはクロロ）、ベンジルハロゲン化物（例えば、ヨウ化物、臭化物または塩化物）、ビニルスルホンおよびピリジルチオが含まれる。

【0224】

コンジュゲート用リンクー

薬物はリンクーによって抗体と連結させることができる。mAbに対するリンクーの結びつけは、例えば、表面リジンを通じて、酸化された糖質に対する還元性カップリング、および鎖間ジスルフィド結合を還元することによって自由になったシステイン残基を通じて、といった種々のやり方で実現することができる。ヒドラゾンベースの結合、ジスルフィドベースの結合およびペプチドベースの結合を含む、種々のADC連結システムが当技術分野において公知である。

【0225】

適したリンクーには、例えば、切断可能なリンクーおよび切断不能なリンクーが含まれる。切断可能リンクーは典型的には、細胞内条件下での切断に対する感受性がある。適した切断可能リンクーには、例えば、細胞内プロテアーゼ、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼによって切断可能なペプチドリンクーが含まれる。例示的な態様において、リンクーは、ジペプチドリンクー、例えばバリン-シトルリン (val-cit) リンクー、フェニルアラニン-リジン (phe-lys) リンクーなど、またはマレイミドカプロン酸-バリン-シトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル (mc-Val-Cit-PABA) リンクー

10

20

30

40

50

である。別のリンカーには、スルホスクシンイミジル-4-[N-maleimidomethyl]シクロヘキサン-1-カルボキシレート (smcc) がある。スルホ-smccコンジュゲーションは、スルフヒドリル (チオール、-SH) と反応するマレイミド基を介して起こるが、一方、そのスルホ-NHSエステルは一級アミン (リジン、およびタンパク質またはペプチドのN末端に見られるような) に向かって反応する。さらに別のリンカーは、マレイミドカプロイル (mc) である。他の適したリンカーには、特定のpHまたはpH範囲で加水分解しうるリンカー、例えばヒドラゾンリンカーが含まれる。さらなる適した切断可能リンカーには、ジスルフィドリンカーが含まれる。このリンカーは、薬物を例えばmcリンカーなどから放出させる目的で細胞内で必ず分解されるような程度で、抗体と共有結合性に結合することができる。

【0226】

リンカーは、抗体との連結のための基を含むことができる。例えば、リンカーは、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシルまたはスルフヒドリル反応基 (例えば、マレイミド、ハロアセトアミド (例えば、ヨード、ブロモまたはクロロ)、ハロエステル (例えば、ヨード、ブロモまたはクロロ)、ハロメチルケトン (例えば、ヨード、ブロモまたはクロロ)、ベンジルハロゲン化物 (例えば、ヨウ化物、臭化物または塩化物)、ビニルスルホンおよびピリジルチオ) を含むことができる。全般については、Wong, *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*; CRC Press, Inc., Boca Raton, 1991を参照のこと。

【0227】

1つの態様において、抗体と薬物部分の共有結合性結びつけは、リンカーが2つの反応性官能基を有すること、すなわち、反応性の意味で二価であることを必要とする。2つまたはそれを上回る機能的または生物学的活性のある部分、例えばペプチド、核酸、薬物、毒素、抗体、ハプテンおよびレポーター基などを結びつけるのに有用な二価リンカー試薬は公知であり、諸方法がそれらの結果として生じるコンジュゲートとともに記載されている (Bioconjugate Techniques, Third Edition by Greg T. Hermanson, Academic Press 2013 ISBN-13: 978-0123822390)。

【0228】

別の態様において、リンカーを、溶解性または反応性をモジュレートする基によって置換してもよい。例えば、スルホネート置換基は試薬の水溶性を高めて、リンカー試薬と抗体もしくは薬物部分とのカップリング反応を助長することができるか、またはADCを調製するために使用される合成経路に応じて、Ab-LのDとの、もしくはD-LのAbとのカップリング反応を助長することができる。

【0229】

別の態様において、リンカーは、抗体上に存在する求電子基との反応性がある反応性官能基を有する。抗体上の有用な求電子基には、アルデヒド基およびケトンカルボニル基が非限定的に含まれる。リンカーの求核基のヘテロ原子は、抗体上の求電子基と反応して、抗体単位に対する共有結合を形成することができる。リンカー上の有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが非限定的に含まれる。抗体上の求電子基は、リンカーとの結合のための好都合な部位を提供する。

【0230】

リンカーは、1つまたは複数のアミノ酸単位を含むペプチド性であってもよい。ペプチドリンカー試薬は、Rainin Symphony Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tucson, Ariz.) またはModel 433 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) などの自動合成装置での、t-BOC化学 (Geiser et al "Automation of solid-phase peptide synthesis" in Macromolecular Sequencing and Synthesis, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218) およびFmoc / HBTU化学 (Fields, G. and Noble, R. (1990) "Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids", Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214) を含む、ペプチド化学の分野において周知である固相または液相合成方法 (E. Schroder and K. Lubke, The Peptides, volume 1, pp 76-136 (1965) Academic Press) によって調製することができる。

10

20

30

40

50

【0231】

明示的に想定している化合物には、以下の架橋試薬：BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SPDB、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、およびSVSB（スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート）、ならびにビス-マレイミド試薬：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)2およびBM(PEO)3を用いて調製されたADCが非限定的に含まれ、これらは、Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, 111. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, International +815-968-0747から販売されている。2003-2004 Applications Handbook and Catalogのページ467-498を参照のこと。

10

【0232】

ビス-マレイミド試薬は、抗体のシステイン残基の遊離チオール基が、チオール含有性の薬物部分、標識またはリンカー中間体に対して逐次的または同時の様式で結びつくことを可能にする。抗体、メイタンシノイド薬物部分またはリンカー中間体のチオール基との反応性があるマレイミド以外の他の官能基には、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルビリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート、およびイソチオシアネートが含まれる。

【0233】

有用なリンカー試薬を、Molecular Biosciences Inc. (Boulder, Colo.)などの他の販売元を介して入手すること、またはToki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Firestone et alに対する米国特許第6,214,345号；WO 02 / 088172号；US 2003130189号；US 2003096743号；WO 03 / 026577号；WO 03 / 043583号；およびWO 04 / 032828号に記載された手順に従って合成することもできる。

20

【0234】

リンカーは、分枝状の多官能性リンカー部分を通じて、複数の薬物部分を1つの抗体と共有結合性に結びつけるための樹状型リンカーであってもよい (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215 ; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768 ; King et al (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)。樹状リンカーは、薬物と抗体とのモル比、すなわち負荷量を増やすことができ、これはADCの効力と関連している。したがって、抗体が反応性システインチオール基を1つだけ保有する場合に、複数の薬物部分を樹状リンカーを介して結びつけることができる。

30

【0235】

薬物

薬物またはペイロードの例は、DM1（メイタンシン、N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカブト-1-オキソプロピル)-またはN2'-デアセチル-N2'-(3-メルカブト-1-オキソプロピル)-メイタンシン）、mc-MMAD（6-マレイミドカプロイル-モノメチルオーリスタチン-DまたはN-メチル-L-バリル-N-[(1S,2R)-2-メトキシ-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-[(1S)-2-フェニル-1-(2-チアゾリル)エチル]アミノ]プロピル]-1-ピロリジニル]-1-[(1S)-1-メチルプロピル]-4-オキソブチル]-N-メチル-(9CI)-L-バリンアミド）、mc-MMAF（マレイミドカプロイル-モノメチルオーリスタチンFまたはN-[6-(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)-1-オキソヘキシリル]-N-メチル-L-バリル-L-バリル-(3R,4S,5S)-3-メトキシ-5-メチル-4-(メチルアミノ)ヘプタノイル-(R, R,2S)-1-メトキシ-1-メチル-2-ピロリジンプロパノイル-L-フェニルアラニン）およびmc-Val-Cit-PABA-MMAE（6-マレイミドカプロイル-Val-Cit-(p-アミノベンジルオキシカルボニル)-モノメチルオーリスタチンEまたはN-[[4-[[N-[6-(2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-1-イル)-1-オキソヘキシリル]-L-バリル-N5-(アミノカルボニル)-L-オルニチル]アミノ]フェニル]メトキシ]カルボニル]-N-メチル-L-バリル-N-[(1S,2R)-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-3-[(1R,2S)-2-ヒドロキシ-1-メチル-2-フェニルエチル]アミノ]-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソプロピル]-1-ピロリジニル]-2-メトキシ-1-[(1S)-1-メチルプロピル]-4-オキソブチル]-N-メチル-L-バリンアミド）からなる群より選択される。DM1はチューブリン阻害薬メイタ

40

50

ンシンの誘導体であり、一方、MMAD、MMAEおよびMMAFはオーリスタチン誘導体である。

【0236】

メイタンシノイド薬物部分

いくつかの態様において、薬物はメイタンシノイドである。メイタンシン化合物は、マイクロチューブリンタンパク質であるチューブリンの重合阻害によって有糸分裂中の微小管の形成を阻害することによって、細胞増殖を阻害する (Remillard et al (1975) Science 189:1002-1005 ; 米国特許第5,208,020号)。メイタンシンおよびメイタンシノイドは非常に細胞傷害性が強いが、癌治療におけるそれらの臨床用途は、それらの腫瘍選択性の低さに主に起因するそれらの重度の全身副作用によって大いに制限されている。メイタンシンを用いた臨床試験は、中枢神経系および胃腸系に対する重篤な副作用が原因で中止された (Issel et al (1978) Can. Treatment. Rev. 5: 199-207)。

10

【0237】

メイタンシノイド薬物部分は、抗体-薬物コンジュゲートにおいて魅力的な薬物部分であるが、これには以下の理由がある：(i) 発酵または化学的改変、発酵産物の誘導体化によって調製するのが比較的行いやすい、(ii) 非ジスルフィド性リンカーを通じての抗体に対するコンジュゲーションに適した官能基を用いた誘導体化が可能である、(iii) 血漿中で安定である、および(iv) 種々の腫瘍細胞株に対して有効である。

【0238】

メイタンシノイド薬物部分として用いるのに適したメイタンシン化合物は当技術分野において周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離することもでき、遺伝子工学の手法を用いて作製することもでき (Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973を参照)、またはメイタンシノールおよびメイタンシノール類似体を公知の方法に従って合成的に調製することもできる。

20

【0239】

例示的なメイタンシノイド薬物部分には、改変された芳香族環を有するもの、例えば：C-19-デクロロ (米国特許第4,256,746号) (アンサマイトシンP2のリチウムアルミニウム水素化物の還元によって調製される)；C-20-ヒドロキシ (またはC-20-デメチル) +/- C-19-デクロロ (米国特許第4,361,650号および第4,307,016号) (ストレプトミセス属もしくはアクチノミセス (Actinomyces) 属を用いた脱メチル化、またはLAHを用いた脱塩素によって調製される)；およびC-20-デメトキシ、C-20-アシロキシ (-OCOR)、+/-デクロロ (米国特許第4,294,757号) (アシル塩化物を用いたアシル化により調製される)、ならびに他の位置に改変を有するものが含まれる。

30

【0240】

また、例示的なメイタンシノイド薬物部分には、改変を有するもの、例えば：H2SまたはP2S5を有するメイタンシノールの反応により調製されるC-9-SH (米国特許第4,424,219号)；C-14-アルコキシメチル (デメトキシ / CH₂OR) (米国特許第4,331,598号)；ノカルジア (Nocardia) 属から調製されるC-14-ヒドロキシメチルまたはアシロキシメチル (CH₂OHまたはCH₂OAc) (米国特許第4,450,254号)；ストレプトミセス属によるメイタンシノールの変換によって調製されるC-15-ヒドロキシ / アシロキシ (米国特許第4,364,866号)；トレウィア・ヌドロフローラ (Trewia nudiflora) から単離されるC-15-メトキシ (米国特許第4,313,946号および第4,315,929号)；ストレプトミセス属によるメイタンシノールの脱メチル化によって調製されるC-18-N-デメチル (米国特許第4,362,663号および第4,322,348号)；およびメイタンシノールの三塩化チタン / LAH還元によって調製される4,5-デオキシ (米国特許第4,371,533号) が含まれる。

40

【0241】

メイタンシン化合物上の多くの位置が、連結の型に応じて、結合位置として有用であることが知られている。例えば、エステル結合を形成させるには、ヒドロキシリル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルによって改変されたC-14位、ヒドロキシリル基によって改変されたC-15位およびヒドロキシリル基を有するC-20位は、すべて適する。

【0242】

50

メイタンシノイド薬物部分のすべての立体異性体、すなわち、Dのキラル炭素でのR配置およびS配置の任意の組み合わせを、本発明の化合物として想定している。ADCの態様は、DM1、DM3、DM4を含む（US20090202536号を参照）。

【0243】

DM3およびDM4のイオウ原子に隣接する炭素上のメチル基などのアルキル基によって付与される立体障害は、ADCの細胞内切断の速度に影響を及ぼす可能性がある（US 2004 / 0235840 A1号）。このため、可変アルキル単位（CR2）mは、インビトロおよびインビボでの効力、有効性および安全性／毒性に影響を及ぼす可能性がある。

【0244】

オーリスタチン

いくつかの態様において、薬物はオーリスタチン、例えばオーリスタチンE（当技術分野においてはドラスタチン-10の誘導体としても知られる）またはそれらの誘導体である。オーリスタチンは、例えば、アウリスタチンEとケト酸との間で形成されるエステルであってよい。例えば、アウリスタチンEは、パラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応して、それぞれAEBおよびAEVBを生成することができる。他の典型的なアウリスタチンには、AFP、MMAF、およびMMAEが含まれる。例示的なアウリスタチンの合成および構造は、米国特許第6,884,869号、第7,098,308号、第7,256,257号、第7,423,116号、第7,498,298号および第7,745,394号に記載されており、これらはそれぞれその全体があらゆる目的で参照により本明細書に組み入れられる。

【0245】

オーリスタチンは、微小管動態ならびに核分裂および細胞分裂に干渉すること、ならびに抗癌活性を有することが示されている。本発明のオーリスタチンはチューブリンと結合し、5T4を発現する細胞または細胞株に対して細胞傷害効果または細胞分裂抑制効果を発揮することができる。当技術分野には、オーリスタチンまたはその結果生じる抗体-薬物コンジュゲートが、所望の細胞または細胞株に対して細胞分裂抑制効果または細胞傷害効果を発揮するか否かを判定するために用いられる、いくつかの異なるアッセイがある。化合物がチューブリンと結合するか否かを判定するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47:965-976; およびHamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149を参照のこと。

【0246】

化学療法薬

いくつかの態様において、二重特異性抗原結合性構築物は化学療法薬とコンジュゲートされる。その例には、シスプラチンおよびラバチニブが非限定的に含まれる。「化学療法薬」とは、癌の治療において有用な化合物のことである。

【0247】

化学療法薬の例には、アルキル化剤、例えば、チオテバおよびシクロホスファミド（シトキサン（CYTOXAN）（商標））など；アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびビポスルファンなど；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）およびウレドーパ（uredopa）など；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ラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロールメラミン（trimethylololomelamine）を含む、エチレンイミンおよびメチロールメラミン（methylolamine）；ナイトロジェンマスターード、例えば、クロラムブシリ、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベンビシンノベムビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターードなど；ニトロソ尿素、例えば、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；抗生素質、例えば、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（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン（carabacin）、カミノマイシン、

10

20

30

40

50

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、ドキソルビシン、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、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、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；代謝拮抗薬、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU) など；葉酸類似体、例えば、デノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサートなど；プリン類似体、例えば、フルダラбин、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなど；ピリミジン類似体、例えば、アンシタбин、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シトシンアラビノシド、ジデオキシリジン、ドキシフルリジン、エノシタбин、フロクスウリジン、5-FUなど；アンドロゲン、例えば、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；抗副腎薬、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；葉酸補給剤、例えばフォリン酸など；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；ベストラブシリル；ビサントレン；エダトレキサート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エフロルニチン (elfornithine)；酢酸エリプチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；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；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK7；ラゾキサン；シゾフィラン (sizofiran)；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；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロフォスファミド；チオテパ；タキサン、例えば、パクリタキセル（タキソール (TAXOL)（登録商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）およびドセタキセル（タキソテール (TAXOTERE)（登録商標）、Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロランブシリル；ゲムシタбин；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチニンなど；ビンプラスチニン；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；ビンクリスチニン；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；アミノブテリン；ゼローダ；イバンドロン酸；CPT11；トポイソメラーゼ阻害薬RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタбин；および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が非限定的に含まれる。この定義にはまた、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン薬、例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターーゼ阻害性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、LY117018、オナプリストンおよびトレミフェン（フェアストン (Fareston)）を含む抗エストロゲン薬；ならびに抗アンドロゲン薬、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイブロリドおよびゴセレリンなど；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体も含まれる。

【0248】

治療の方法

ある態様において、本明細書に記載の構築物は、本明細書においてさらに詳細に説明する1つまたは複数の生物活性を試験するためのアッセイに用いられる。構築物が特定のアッセイにおいて活性を示す場合、抗原結合性構築物によって構成される抗原結合性構築物は、その生物活性と関連のある疾患に関係している可能性がある。このため、この構築物は、その関連疾患の治療に利用される。

【0249】

ある態様においては、疾患または障害を治療する方法であって、そのような治療、予防

10

20

30

40

50

または改善が望まれる患者に対して、本明細書に記載の抗原結合性構築物を、その疾患または障害を治療する、予防する、または改善するのに有効な量で投与する段階を含む方法が提供される。

【0250】

「障害」とは、本発明の抗体または方法を用いる治療によって利益を受けるであろうあらゆる病状のことを指す。これには、哺乳動物を当該の障害にかかりやすくする病的状態のものを含む、慢性および急性の障害または疾患が含まれる。本明細書において治療しようとする障害の非限定的な例には、悪性および良性腫瘍；非白血病およびリンパ系悪性腫瘍；神経細胞、グリア、星状細胞、視床下部ならびに他の腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性および胞胚腔の障害；ならびに炎症性、免疫性および他の血管新生関連障害が含まれる。10

【0251】

「治療」とは、治療される個体または細胞の自然経過を変更するための取り組みにおける臨床的介入のことを指し、これは予防的処置のために、または臨床的病態の経過中に行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発を予防すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患進行の速度を低下させること、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後改善が非限定的に含まれる。いくつかの態様において、本発明の抗体は、疾患または障害の発症を遅らせるために用いられる。1つの態様において、本発明の抗体および方法は、腫瘍退縮を生じさせる。1つの態様において、本発明の抗体および方法は、腫瘍／癌増殖の阻害を生じさせる。20

【0252】

本明細書で用いる場合、「治療」（およびその文法上の変形物、例えば「治療する」または「治療すること」など）とは、治療される個体または細胞の自然経過を変更するための取り組みにおける臨床的介入のことを指し、これは予防的処置のために、または臨床的病態の経過中に行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発を予防すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患進行の速度を低下させること、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後改善が非限定的に含まれる。いくつかの態様において、本明細書に記載の構築物は、疾患の発症を遅らせるか、または疾患の進行を緩徐にするために用いられる。30

「使用説明書」という用語は、治療用製品の市販パッケージ中に慣例的に含められる、そのような治療用製品の使用にかかる適応症、用途、投薬量、投与、併用療法、禁忌および／または警告に関する情報を含む説明書のことを指す。

【0253】

少なくとも抗体の断片または変異体を含む、本明細書に記載の抗原結合性構築物は、単独で、または他の種類の治療（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法および抗腫瘍薬）と組み合わせて投与することができる。一般に、患者のものと同じ種である種起源または種反応性（抗体の場合）の製品の投与が好ましい。したがって、1つの態様においては、ヒト抗体、断片誘導体、類似体、または核酸が、治療法または予防的処置のためにヒト患者に投与される。40

【0254】

癌の治療の方法

本明細書には、癌を治療するための医薬品の製造のための、本明細書に記載の抗原結合性構築物の使用が提供される。また、免疫系障害に対する医薬品の製造のための、本明細書に記載の抗原結合性構築物も提供される。ある態様においては、腫瘍の増殖を阻害するための医薬品の製造のための、本明細書に記載の抗原結合性構築物の使用がある。ある態様においては、腫瘍を縮小させるための医薬品の製造のための、本明細書に記載の抗原結合性構築物の使用がある。

【0255】

ある態様においては、乳癌、胃癌、脳悪性腫瘍、HER2、HER3、IGF1R、EGFRの機能不全

10

20

30

40

50

と関連する本質的に増殖性の疾患（癌）のうち少なくとも1つの治療のための、本明細書において提供される構築物の使用がある。ある態様において、本明細書において提供される構築物は、抗Her2二価抗体または抗Her3二価抗体に対して部分的に反応する患者の治療に用いられる。ある態様において、構築物は、単独で、または併用下で、トラスツズマブ、ペルツズマブ、またはTDM-1もしくは抗Her2もしくは抗Her3に対して反応しない患者の治療に用いられる。いくつかの態様において、患者はscFv Her2 / Her3に反応しない。いくつかの態様においては、進行したHer2増幅性ヘレグリン陽性乳癌を有する患者において、ハーセプチニンと組み合わせて、本明細書に記載の構築物が提供される。いくつかの態様においては、食道下部、胃食道（GE）接合部および胃のHER2発現性癌を有する患者において、ハーセプチニンと組み合わせて、本明細書に記載の構築物が提供される。ある態様においては、進行した不応性でHer2増幅性のヘレグリン陽性癌を有する患者に対する本明細書に記載の構築物が提供される。

【0256】

「癌」および「癌性」とは、調節下にない細胞増殖によって典型的に特徴づけられる、哺乳動物における生理学的状態のことを指すか、または記述している。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が非限定的に含まれる。そのような癌のより具体的な例には、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、肝細胞癌、胃腸癌、膵癌、神経膠芽細胞腫／神経膠腫（例えば、未分化星状細胞腫、多形性神経膠芽細胞腫、退形成乏突起神経膠腫、退形成性乏突起星細胞腫）、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺細胞腫、腎癌、肝癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝細胞腫、およびさまざまな型の頭頸部癌が含まれる。

【0257】

癌は、本明細書における抗ErbB抗体が癌と結合しうるようにErbB発現細胞を含むと考えられ、典型的にはErbB受容体の過剰発現によって特徴づけられると考えられる。1つの好ましい態様において、癌はErbB2発現細胞を含み、さらにより好ましくは、ErbB2受容体の過剰発現によって特徴づけられる細胞を含む。癌におけるErbB、例えば、ErbB2発現を判定するには、さまざまな診断／予後判定アッセイを利用することができる。1つの態様において、ErbB2過剰発現は、例えばハーセプテスト（HERCEPTEST）（登録商標）（Dako）を用いるIHCによって分析することができる。腫瘍生検試料からのパラフィン包埋組織切片をIHCアッセイに供して、以下の通りのErbB2タンパク質染色強度基準を与えることができる：スコア0では、染色が全く観察されないか、または膜染色が腫瘍細胞の10%未満でしか観察されない。

【0258】

スコア1+では、淡い／かろうじて認知しうる膜染色が、腫瘍細胞の10%超で検出される。細胞はその膜の一部でしか染色されていない。

【0259】

スコア2+では、弱い～中程度の完全な膜染色が、腫瘍細胞の10%超で観察される。

【0260】

スコア3+では、中程度～強い完全な膜染色が、腫瘍細胞の10%超で観察される。

【0261】

ErbB2過剰発現評価について、スコアが0または1+である腫瘍はErbB2を過剰発現しないと特徴づけることができ、一方、スコアが2+または3+である腫瘍はErbB2を過剰発現していると特徴づけることができる。

【0262】

代替的または追加的に、蛍光インサイチューハイブリダイゼーション（FISH）アッセイ、例えば、INFORM（商標）（Ventana, Ariz.）またはPATHVISION（商標）（Vysis, Ill.）などを、ホルマリン固定されてパラフィン包埋された腫瘍組織に対して実施して、腫瘍におけるErbB2の程度（存在するならば）を決定することもできる。IHCアッセイと比較して、her2遺伝子増幅を測定するFISHアッセイは、ハーセプチニン（登録商標）による治療に

10

20

30

40

50

対する患者の反応とより良く相関すると思われ、ハーセプチン（登録商標）治療、または本発明のイムノコンジュゲートによる治療によって利益を受ける可能性が高い患者を同定するための好ましいアッセイであると現時点ではみなされている。

【0263】

好ましくは、本発明のイムノコンジュゲート、および／またはそれらが結合するErbB、例えばErbB2もしくはEGFRタンパク質は、細胞による内部移行を受けて、それらが結合した癌細胞を死滅させるイムノコンジュゲートの治療有効性の増加をもたらす。1つの好ましい態様において、細胞傷害性薬剤（メイタンシノイド）は、癌細胞における核酸を標的とするか、またはそれに干渉する。

【0264】

本発明の治療は、コンジュゲートされていない抗ErbB抗体による治療に反応しないかまたはほとんど反応しない、ErbBを過剰発現する腫瘍を標的とする。そのような患者は、メイタンシノイド部分とコンジュゲートされていない抗ErbB抗体による過去の治療を受けていて、過去の治療は有意な改善をもたらさなかったか、または一過性の反応しかもたらさなかったのでもよい。しかし、いかなる特定の患者の、コンジュゲートされていない抗ErbB抗体による過去の治療も、本発明による治療の候補となる患者を同定するための必要条件ではない。当業者は、本発明のイムノコンジュゲートによる治療によって利益が得られると予想される患者を、公表されている臨床データ、および彼または彼女自身の経験に基づいて容易に同定することができる。（コンジュゲートされていない）抗ErbB抗体による過去の治療を伴うかまたは伴わない、哺乳動物、特にヒト患者の治療は、明確に本発明の範囲内にある。

10

20

30

40

40

50

【0265】

薬学的組成物

また、抗原結合性構築物と薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物も含まれる。

【0266】

「薬学的に許容される担体」とは、対象にとって毒性でない、薬学的組成物中の有効成分以外の成分のことを指す。薬学的に許容される担体には、緩衝剤、賦形剤、安定化剤、または保存料が非限定的に含まれる。

【0267】

「薬学的組成物」という用語は、その中に含有される構築物の生物活性を有効にさせるような形態にあって、製剤が投与される対象に対して許容されない毒性のあるさらなる構成要素を含有しない調製物のことを指す。

【0268】

また、薬学的組成物も本明細書において提供される。そのような組成物は、治療的有効量の化合物、および薬学的に許容される担体を含む。1つの具体的な態様において、「薬学的に許容される」という用語は、動物、より具体的にはヒトにおける使用に対して連邦政府もしくは州政府によって承認されているか、または米国薬局方もしくは他の一般に認知されている薬局方に記載されていることを意味する。「担体」という用語は、治療薬とともに投与される、希釈剤、補助剤、賦形剤または媒体のことを指す。そのような薬学的担体は、例えば落花生油、大豆油、鉱油、ゴマ油などといった、石油、動物、植物または合成起源のものを含む、水および油などの滅菌液体でありうる。薬学的組成物が静脈内投与される場合には、水が好ましい担体である。食塩溶液ならびに水性デキストロースおよびグリセロール水溶液も、液体担体として、特に注射用溶液に用いることができる。適した薬学的賦形剤には、デンブン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが含まれる。組成物は、所望に応じて、少量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含有してよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続放出製剤などの形態をとりうる。組成物を、トリグリセリドなどの従来の結合剤および担体とともに、座薬として製剤化してもよい。経口製

剤は、医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリソナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含みうる。適した薬学的担体の例は、E. W. Martinによる"Remington's Pharmaceutical Sciences"に記載されている。そのような組成物は、患者への適切な投与のための形態が得られるように、治療有効量の化合物を、好ましくは精製された形態で、適した量の担体とともに含有すると考えられる。製剤は、投与様式に適したものであるべきである。

【0269】

ある態様において、抗原結合性構築物を含む組成物は、ヒトへの静脈内投与に適合する薬学的組成物として、慣行的な手順に従って製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合には、組成物はまた、可溶化剤、および注射部位の痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔薬も含みうる。一般に、成分は、別々に、または単位剤形に一緒に混合されるかのいずれかで、例えば、活性薬剤の数量を示すアンプルまたは小袋といった密封容器内にある凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給される。組成物が注入によって投与される場合、これは、医薬品グレードの滅菌された水または食塩水を含有する注入ボトルによって分注されうる。組成物が注射によって投与される場合、成分を投与前に混合することができるように、注射用の滅菌水または食塩水のアンプルが提供されうる。

10

【0270】

ある態様において、本明細書に記載の組成物は、中性形態または塩形態として製剤化される。薬学的に許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものといった陰イオンとともに形成されるもの、およびナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものといった陽イオンとともに形成されるものが含まれる。

20

【0271】

本明細書で用いる場合、「モジュレートされた血清半減期」という用語は、本明細書に記載の抗原結合性構築物に含まれる抗原結合性ポリペプチドの血液循環中半減期の、そのネイティブ形態に比しての、正または負の変化を意味する。血清中半減期は、構築物の投与後のさまざまな時点で血液試料を採取して、各試料における分子の濃度を決定することによって測定される。血清中濃度と時間との相互関係により、血清中半減期を計算することができる。血清中半減期の増加は少なくとも約2倍であることが望ましいが、それよりも少ない増加も、例えば、良好な投薬レジメンを可能にするか、または毒性作用が避けられる場合には有用でありうる。いくつかの態様において、増加は少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍である。

30

【0272】

本明細書で用いる場合、「モジュレートされた治療半減期」という用語は、本明細書に記載の抗原結合性構築物に含まれる治療的有効量の抗原結合性ポリペプチドの半減期の、その改変されていない形態に比しての、正または負の変化を意味する。治療半減期は、投与後のさまざまな時点でその分子の薬物動態学的および/または薬力学的特性を測定することによって測定される。治療半減期の増加により、特定の有益な投薬レジメン、特定の有益な総用量が可能になるか、または望ましくない作用が避けられることが望ましい。いくつかの態様において、治療半減期の増加は、効力の増加、その標的にに対する改変された分子の結合性の増大もしくは低下、プロテアーゼなどの酵素による分子の破壊の増加もしくは減少、または改変されていない分子の作用の別のパラメーターもしくは機構の増大または低下、または分子の受容体媒介性排除の増加もしくは減少に起因する。

40

【0273】

投与

本明細書に記載の二重特異性抗原結合性構築物は、対象、例えばヒトに投与することができる。

【0274】

50

さまざまな送達系が公知であり、本明細書に記載の抗原結合性構築物製剤を投与するために用いることができ、これには例えば、リポソーム、マイクロ粒子、マイクロカプセル内への封入、化合物を発現しうる組換え細胞、受容体媒介性エンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)を参照）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などが含まれる。導入の方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路が非限定的に含まれる。化合物または組成物は、任意の好都合な経路、例えば、注入またはボーラス注射によって、上皮または皮膚粘膜の内層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜等）を通じての吸収によって投与することができ、他の生物活性物質と一緒に投与してもよい。投与は全身性であっても局所性であってもよい。加えて、ある態様においては、本明細書に記載の抗原結合性構築物組成物を、脳室内および髄腔内注射を含む任意の適した経路によって中枢神経系に導入することが望ましい；脳室内注射は、例えば、オンマヤ貯留槽などの貯留槽に取り付けられた脳室内カテーテルによって容易になる。例えば、吸入器またはネプライザー、およびエアロゾル化剤を有する製剤を用いることによって、肺内投与を使用することもできる。

10

【0275】

1つの具体的な態様においては、本明細書に記載の抗原結合性構築物または組成物を、治療が必要な場所に局所的に投与することができ望ましい；これは例えば、非限定的ではあるが、外科手術中の局所注入によって、局所適用、例えば、手術後の創傷包帯と併せて、注射によって、カテーテルを用いて、座薬を用いて、またはインプラントを用いて達成することができ、前記インプラントは、シラスティック膜などの膜、または纖維を含む、多孔質、無孔質またはゼラチン状の材料でできている。好ましくは、本発明の抗体を含むタンパク質を投与する場合には、タンパク質が吸収されない材料を使用するように注意を払わなければならない。

20

【0276】

別の態様において、抗原結合性構築物または組成物は、小胞内、特にリポソーム内にある状態で送達することができる（Langer, Science 249:1527-1533 (1990) ; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989) ; Lopez-Berestein, 同上, pp. 317-327 ; 全般については同上参照）。

30

【0277】

さらに別の態様において、抗原結合性構築物または組成物は、制御放出系の中にある状態で送達することができる。1つの態様において、ポンプを用いてもよい（Langer、前記 ; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987) ; Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980) ; Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)）。別の態様において、ポリマー材料を用いてもよい（Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974) ; Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984) ; Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)を参照 ; Levy et al., Science 228:190 (1985) ; During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989) ; Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989)も参照のこと）。さらに別の態様において、制御放出系は、治療標的、例えば脳の近位で行うことができ、それ故に、必要となるのは全身用量のごく一部のみである（例えば、Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照）。

40

【0278】

本明細書に記載の抗原結合性構築物をコードする核酸を含む1つの具体的な態様において、核酸は、それがコードするタンパク質の発現を促進するために、適切な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築してそれが細胞内に入るよう投与することによって、例えば、レトロウイルスベクターの使用によって（米国特許第4,980,286号参照）、または直接注射によって、またはマイクロ粒子の衝突を用いることによって（例えば、遺伝

50

子銃 ; Biolistic, Dupont)、または脂質もしくは細胞表面受容体もしくはransferrin receptor antibody (Biologics) 、または核内に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドと結合させてそれを投与すること (例えは、 Joliot et al , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991) を参照) などによって、インビポで投与することができる。または、核酸を相同組換えによって細胞内に導入し、発現のために宿主細胞DNAに組み込むこともできる。

【 0279 】

ある態様において、本明細書に記載の抗原結合性構築物は、重なり合わない結合性標的エピトープを有する他の一価抗体または多価抗体との組み合わせとして投与される。

【 0280 】

治療用タンパク質の異常な発現および / または活性と関連する疾患または障害の治療、阻害および予防に有効と考えられる本明細書に記載の組成物の量は、標準的な臨床的手法によって決定することができる。加えて、インビトロアッセイを任意に用いて、最適な投薬量の範囲の特定に役立ててもよい。製剤中に用いられる正確な用量は、投与の経路、および疾患または障害の重症度にも依存すると考えられ、臨床医の判断および各患者の状況に応じて決定されるべきである。有用用量は、インビトロまたは動物モデルの試験系から導き出された用量反応曲線から外挿される。

【 0281 】

抗原結合性構築物の試験

本明細書に記載の抗原結合性構築物または薬学的組成物は、ヒトに用いる前に、所望の治療的または予防処置的活性に関して、インビトロで、続いてインビポで試験される。例えは、化合物または薬学的組成物の治療的または予防処置的な有用性を実証するためのインビトロアッセイには、細胞株または患者組織試料に対する化合物の効果が含まれる。細胞株および / または組織試料に対する化合物または組成物の効果は、ロゼット形成アッセイおよび細胞溶解アッセイを非限定的に含む、当業者に公知の手法を利用して判定することができる。本発明によれば、特定の化合物の投与が適応となるか否かを判定するために用いるインビトロアッセイには、患者組織試料を培養下で増殖させ、抗原結合性構築物に曝露させるかまたはそれを別の様式で投与した上で、組織試料に対するそのような抗原結合性構築物の効果を観察する、インビトロ細胞培養アッセイが含まれる。

【 0282 】

二重特異性抗原結合性構築物の候補を、 HER2 および HER3 を発現する細胞、例えは乳癌細胞株を用いてアッセイすることができる。以下の表 A は、いくつかの代表的な乳癌細胞株上での HER2 および HER3 の発現レベルを記述している。

【 0283 】

(表 A 5) 関心対象の細胞株における選択された受容体の相対的発現レベル

細胞株	HER2	HER3	説明
SKBR3	高	中	HER2 3+ 乳癌
BT-474	高	中	HER2 3+ 乳癌
SKOV3	高	低	卵巣癌
MDA-MB-231	低	低/中	トリプルネガティブ乳癌
MCF7	低	中	エストロゲン受容体陽性乳癌
JIMT1	中	低	トラスツズマブ抵抗性乳癌
NCI-N87	高	低	胃癌

McDonagh et al Mol Cancer Ther. 2012 Mar;11(3):582-93

Subik et al. (2010) Breast Cancer: Basic Clinical Research:4; 35-41

Anido et al Clin Cancer Res. 2003 Apr;9(4):1274-83

10

20

30

40

50

Neve et al Cancer Cell 2006 10:515-527

Dragowska et al BMC Cancer 2011 11:420

Prang et a. (2005) British Journal of Cancer Research:92; 342-349

【0284】

例えば、増殖阻害性抗ErbB2抗体を同定するために、ErbB2を過剰発現する癌細胞の増殖を阻害する抗体に関してスクリーニングすることができる。1つの態様において、選択される増殖阻害性抗体は、約0.5～30 μg / mlの抗体濃度で、細胞培養下にあるSK-BR-3細胞の増殖を約20～100%、好ましくは約50～100%阻害することができる。そのような抗体を同定するために、米国特許第5,677,171号に記載されたSK-BR-3アッセイを行うことができる。このアッセイによれば、SK-BR-3細胞を、10%ウシ胎仔血清、グルタミンおよびペニシリンストレプトマイシンを加えた、F12培地とDMEM培地の1：1混合物中で増殖させる。SK-BR-3細胞を、35mm細胞培養皿中に20,000個ずつプレーティングする(2ml / 35mm培養皿)。培養皿1つ当たり0.5～30 μg / mlの抗ErbB2抗体を添加する。6日後に、COULTER(商標)細胞電子計数器を用いて細胞の数を算定して、非処理細胞と比較する。SK-BR-3細胞の増殖を約20～100%または約50～100%阻害する抗体を、増殖阻害性抗体として選択することができる。

10

【0285】

細胞死を誘導する抗体を選択するためには、例えば、PI、トリパンブルーまたは7AAD取り込みによって示される膜の完全性の喪失を、対照と対比して評価するとよい。好ましいアッセイは、BT474細胞を用いるPI取り込みアッセイである。このアッセイによれば、BT474細胞(American Type Culture Collection(Rockville, Md.)から入手可能である)を、10%熱非効化FBS(Hyclone)および2mM L-グルタミンを加えたダルベッコ変法イーグル培地(D-MEM)：ハムF-12培地(50:50)中で培養する。(したがって、本アッセイは補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で行われる)。BT474細胞を100×20mm培養皿に培養皿1つ当たり 3×10^6 個の密度で播種し、一晩置いて付着させる。続いて培地を取り除き、新鮮な培地のみ、または10 μg / mlの適切なモノクローナル抗体を含有する培地と交換する。細胞を3日間の期間にわたってインキュベートする。各処理の後に、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって剥離させる。続いて細胞を1200rpm、4°で5分間遠心処理して、ペレットを3mlの氷冷Ca2+結合緩衝液(10mM Hepes、pH 7.4、140mM NaCl、2.5mM CaCl₂)中に再懸濁させた上で、細胞塊の除去のために35mmの濾過蓋付き12×75チューブに等分する(チューブ1本当たり1ml、処理群当たりチューブ3本)。続いてチューブにPI(10 μg / ml)を加える。試料は、FACSCAN(商標)フローサイトメーターおよびFACS CONVERT(商標)CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析することができる。PI取り込みによる判定で統計的に有意なレベルの細胞死を誘導する抗体を、細胞死誘導性抗体として選択することができる。

20

【0286】

アポトーシスを誘導する抗体を選択するためには、BT474細胞を用いるアネキシン結合アッセイを利用可能である。前の段落に記載した通りに、BT474細胞を培養して、培養皿に播種する。続いて培地を取り除き、新鮮な培地のみ、または10 μg / mlのモノクローナル抗体を含有する培地と交換する。3日間のインキュベーション期間後に、単層をPBSで洗浄して、トリプシン処理によって剥離させる。続いて、細胞死アッセイに関して上に考察した通りに、細胞を遠心処理し、Ca2+結合緩衝液中に再懸濁させて、チューブに等分する。続いてチューブに標識アネキシン(例えば、アネキシンV-FTIC)(1 μg / ml)を加える。試料は、FACSCAN(商標)フローサイトメーターおよびFACS CONVERT(商標)CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析することができる。対照に比して統計的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体を、アポトーシス誘導性抗体として選択する。

30

【0287】

アネキシン結合アッセイに加えて、BT474細胞を用いるDNA染色アッセイも利用可能である。このアッセイを行うためには、前の2つの段落に記載した通りに関心対象の抗体で処

40

50

理したBT474細胞を、 $9\mu\text{g}/\text{ml}$ のHOECHST 33342（商標）とともに37℃で2時間インキュベートし、続いてEPICS ELITE（商標）フローサイトメーター（Coulter Corporation）により、MODFIT LT（商標）ソフトウェア（Verity Software House）を用いて分析する。非処理細胞（最大100%のアポトーシス細胞）の2倍またはそれを上回る（好ましくは3倍またはそれを上回る）アポトーシス細胞のパーセンテージの変化を誘導する抗体を、このアッセイを用いてアポトーシス誘発性抗体として選択することができる。

【0288】

ErbB受容体のリガンド活性化を遮断する抗体を同定するためには、ErbB受容体を発現する細胞に対するErbBリガンド結合を遮断する抗体の能力を（例えば、関心対象のErbB受容体がErbBヘテロオリゴマーを形成する別のErbB受容体とのコンジュゲーションにおいて）判定するとよい。例えば、ErbBヘテロオリゴマーのErbB受容体を天然に発現するかまたは発現するようにトランスフェクトされた細胞を、抗体とともにインキュベートして、続いて標識ErbBリガンドに曝露させることができる。続いて、抗ErbB2抗体が、ErbBヘテロオリゴマーにおけるErbB受容体に対するリガンド結合を遮断する能力を評価することができる。

10

【0289】

例えば、本質的には以下の実施例1に記載した通りに、MCF7乳房腫瘍細胞株に対するHRG結合の抗ErbB2抗体による阻害を、24ウェルプレート形式で、氷上で単層MCF7培養物を用いて行うことができる。抗ErbB2モノクローナル抗体を各ウェルに添加して、30分間インキュベートすることができる。125I標識rHRG 1177-224（25pm）を続いて添加して、インキュベーションを4~16時間続ける。関心対象の抗体に関して用量反応曲線を調製し、IC50値を算出することができる。1つの態様において、ErbB受容体のリガンド活性化を遮断する抗体は、このアッセイにおいてMCF7細胞に対するHRG結合を阻害することに関して約50nMまたはそれ未満、より好ましくは10nMまたはそれ未満のIC50を有すると考えられる。抗体がFab断片などの抗体断片である場合、このアッセイにおいてMCF7細胞に対するHRG結合を阻害することに関するIC50は、例えば、約100nMまたはそれ未満、より好ましくは50nMまたはそれ未満であってよい。

20

【0290】

代替的または追加的に、ErbBヘテロオリゴマーに存在するErbB受容体のErbBリガンドにより誘発されるチロシンリン酸化を抗ErbB2抗体が遮断する能力を評価することもできる。例えば、ErbB受容体を内因性に発現するかまたはそれを発現するようにトランスフェクトされた細胞を抗体とともにインキュベートし、続いて、抗ホスホチロシンモノクローナル抗体（任意で検出可能な標識とコンジュゲートされている）を用いて、ErbBリガンド依存性チロシンリン酸化活性に関してアッセイすることができる。米国特許第5,766,863号に記載されたキナーゼ受容体活性化アッセイを、ErbB受容体活性化および抗体によるその活性の遮断を判定するために利用することもできる。

30

【0291】

1つの態様において、MCF7細胞におけるHRG刺激によるp180チロシンリン酸化を阻害する抗体に関してスクリーニングすることもできる。例えば、MCF7細胞を24ウェルプレートにプレーティングして、ErbB2に対するモノクローナル抗体を各ウェルに添加し、室温で30分間インキュベートする；続いてrHRG 1177-244を各ウェルに最終濃度0.2nMで添加し、インキュベーションを8分間継続する。培地を各ウェルから吸引し、 $100\mu\text{l}$ のSDS試料緩衝液（5% SDS、25mM DTTおよび25mM Tris-HCl、pH 6.8）の添加によって反応を停止させる。各試料（ $25\mu\text{l}$ ）を4~12%勾配ゲル（Novex）上で電気泳動させ、続いてフッ化ポリビニリデン膜に電気的に移行させる。抗ホスホチロシン（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ）イムノプロットを現像し、Mrがほぼ180,000の、優位な反応バンドの強度を反射式デンシトメトリーによって定量する。選択された抗体は好ましくは、このアッセイにおいてHRG刺激によるp180チロシンリン酸化を、対照の約0~35%に有意に阻害すると考えられる。反射式デンシトメトリーによって判定された、HRG刺激によるp180チロシンリン酸化の阻害に関する用量反応曲線を調製し、関心対象の抗体に関するIC50を算出することができる。1つの態様において

40

50

、ErbB受容体のリガンド活性化を遮断する抗体は、このアッセイにおいて、HRG刺激によるp180チロシンリン酸化の阻害に関して、約50nMまたはそれ未満、より好ましくは10nMまたはそれ未満のIC50を有すると考えられる。抗体がFab断片などの抗体断片である場合、このアッセイにおいて、HRG刺激によるp180チロシンリン酸化の阻害に関するIC50は、例えば、約100nMまたはそれ未満、より好ましくは50nMまたはそれ未満であってよい。

【0292】

また、MDA-MB-175細胞に対する抗体の増殖阻害性効果を、例えば本質的には、Schaefer et al. Oncogene 15:1385-1394 (1997)に記載された通りに評価することもできる。このアッセイによれば、MDA-MB-175細胞を抗ErbB2モノクローナル抗体 (10 µg / mL) で4日間処理して、クリスタルバイオレットで染色する。抗ErbB2抗体とのインキュベーションにより、モノクローナル抗体2C4によって提示されるものと同程度の、この細胞株に対する増殖阻害効果が示される可能性がある。1つのさらなる態様において、外因性HRGはこの阻害を有意に逆行させないと考えられる。好ましくは、抗体は、外因性HRGの存在下および非存在下の両方において、MDA-MB-175細胞の細胞増殖を、モノクローナル抗体4D5を上回る程度で（かつ任意で、モノクローナル抗体7F3を上回る程度で）阻害することができる。

10

【0293】

1つの態様において、関心対象の抗ErbB2抗体は、ErbB2のErbB3とのヘレグリン依存性会合を、MCF7細胞およびSK-BR-3細胞の両方において、免疫共沈降実験における判定で、モノクローナル抗体4D5よりも実質的により効果的に、好ましくはモノクローナル抗体7F3よりも実質的により効果的に、遮断することができる。

20

【0294】

関心対象の抗体による結合を受けたErbB2上のエピトープと結合する抗体に関してスクリーニングするためには、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されたもののような慣行的な交差遮断アッセイを用いることができる。代替的または追加的に、当技術分野において公知の方法によってエピトープマッピングを行うこともできる（例えば、本明細書における図1Aおよび1Bを参照）。

【0295】

上記の細胞ベースアッセイで得られた結果を、続いて、動物、例えばマウスのモデルにおける試験、およびヒト臨床試験において追跡することができる。特に、ErbB2を過剰発現する腫瘍を抗体が治療する能力を持たないこと、または能力が限定的であることを、本出願における以下の実施例において記載されるようにトランスジェニックマウスモデルにおいて実証することができる。

30

【0296】

別様に定める場合を除き、本明細書において用いられる技術用語および科学用語はすべて、特許請求の対象物が属する当技術分野の当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中の用語に関して複数の定義が存在する事象では、この項における定義が優先する。

40

【0297】

URLまたは他のそのような識別子またはアドレスを参照する場合、そのような識別子は変化しうるし、インターネット上の特定情報は移り変わるが、しかしインターネット検索により等価の情報が見出されうると理解される。それを参照すると、このような情報の利用可能性および公的普及が立証される。

【0298】

本明細書における記述は、単に例示的および解説的なものであって、特許請求されるいかなる対象物をも限定するものではないと理解されるべきである。

【0299】

本出願において、単数形の使用は、別記しない限り、複数形を含む。

【0300】

50

アミノ酸は、それらの一般的に知られた三文字記号によって、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨している一文字記号のいずれかによって、本明細書において言及することができる。ヌクレオチドも同様に、一般的に認められている一文字コードによって言及することができる。本出願において、アミノ酸の名称および原子の名称（例えば、N、O、Cなど）は、Protein DataBank (PDB) (www.pdb.org) による定義の通りに用いられるが、これはIUPAC命名法 (IUPAC Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides (residue names, atom names etc.), Eur. J. Biochem., 138, 9-37 (1984)ならびにEur. J. Biochem., 152, 1 (1985)におけるそれらの修正に基づいている。

【0301】

10

本記述において、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、または整数範囲は、別記しない限り、列挙される範囲内の任意の整数の値を、そして適切な場合には、その分数（例えば、整数の10分の1および100分の1）を含むと理解されるべきである。本明細書で用いる場合、「約」は、別記しない限り、指示される範囲、値、配列または構造の±10%を意味する。

【0302】

20

「1つの(a)」および「1つの(an)」という用語は、本明細書で用いる場合、別記しない限り、またはその状況により指図されない限り、列記された構成要素のうちの「1つまたは複数」を指すと理解されるべきである。代替物（例えば、「または」）の使用は、代替物のうちの1つ、両方、またはそのいずれかの組み合わせを意味すると理解されるべきである。本明細書中で用いる場合、「含む(include)」および「含む(comprise)」という用語は、同義的に用いられる。さらに、本明細書中に記載される構造および置換基の種々の組み合わせから得られる個々の単鎖ポリペプチドまたは免疫グロブリン構築物は、各単鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体が個別に記述されるのと同程度に、本出願により開示されると理解されるべきである。したがって、個々の単鎖ポリペプチドまたはヘテロ二量体を形成するための特定の構成要素の選択は、本発明の開示の範囲内である。

【0303】

30

本明細書中で用いられる項の見出しあは、体系化の目的に過ぎず、記載される対象物を限定するよう意図されるべきでない。

【0304】

40

本明細書に記載される方法および組成物は、本明細書中に記載される特定の方法、プロトコール、細胞株、構築物および試薬に限定されず、そのため変化しうると理解されるべきである。本明細書において用いられる用語は、特定の態様を記載するために過ぎず、本明細書に記載される方法および組成物の範囲を限定することは意図されず、これは添付の特許請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。

【0305】

特許、特許出願、論文、書籍、マニュアルおよび学術論文を非限定的に含む、本出願において引用される文書または文書の部分はすべて、その全体があらゆる目的で参照により本明細書に明示的に組み入れられる。本明細書中で記述される刊行物および特許はすべて、例えば、本明細書中に記載される方法、組成物および化合物とともに用いられる刊行物中に記載される構築物および方法を記載し、開示する目的のために、それらの記載内容が参照により本明細書に組み入れられる。本明細書で考察される刊行物は、本出願の出願日前のその開示のために単に提供される。本明細書におけるいかなるものも、本発明者らが、先行の発明または任意の他の理由により、そのような開示に先行する権限がないことの承認であるとは解釈されない。

【実施例】

【0306】

以下の実施例は、本発明の実施を例示するために提供される。これらは、本発明の全範囲を制限することも、定めることも意図するものではない。

【0307】

50

実施例で用いた試薬は、商業的に入手可能であるか、または当技術分野において公知の商業的に入手可能な器具、方法もしくは試薬を用いて調製することができる。前述の実施例は、本発明のさまざまな態様および本発明の方法の実施を例示する。実施例は、本発明の多数の異なる態様の完全な説明を提供することを意図するものではない。したがって、上述の発明は、理解の明確さの目的で図解および例としてある程度詳細に記載されているが、当業者であれば、添付の特許請求の範囲の精神または範囲を逸脱することなく、多数の変更および修正がなされうることを理解するであろう。

【0308】

本明細書に記述されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、それぞれ個別の刊行物、特許、または特許出願が具体的かつ個別に参照により本明細書に組み入れられることが示されるのと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。10

【0309】

実施例1：例示的な二重特異性抗原結合性構築物（bsAb）および対照の説明

いくつかの例示的な二重特異性抗原結合性構築物、例えば、抗原結合性構築物および対照を、以下に説明する通りに設計した。

【0310】

1. 変異体878：鎖A上のHER2結合ドメインがECD1（B1D2）と結合するscFvであって、Fc領域が鎖Aにおいて突然変異L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である、一価抗HER2抗体。B1D2 scFvは国際特許公開公報第WO 2009 / 126920号および第WO2010 / 059315A1号に記載されており、トラスツズマブとは重なり合わないHER2上のエピトープと結合する。20

【0311】

2. 変異体879：鎖B上のHER3結合ドメインがscFv（H3）であって、Fc領域が鎖Aにおいて突然変異L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である、一価抗HER3抗体。H3 scFvは米国特許第7,332,580号に記載されている。

【0312】

3. 変異体880：HER2結合ドメインが鎖A上のB1D2 scFvであり、HER3結合ドメインが鎖B上のH3 scFvであって、Fc領域が鎖Aにおいて突然変異L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である、二重特異性抗HER2-HER3抗体。

【0313】

4. 変異体1040：鎖A上のHER2結合ドメインがトラスツズマブFabであって、Fc領域が、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392L_T394Wを有するヘテロ二量体である、一価抗HER2抗体；トラスツズマブはHER2の細胞外ドメイン4（ECD4）と結合する。30

【0314】

5. 変異体792：両方のHER2結合ドメインがトラスツズマブ由来のFabであり、Fc領域が鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392L_T394Wを有するヘテロ二量体である、二価抗HER2抗体。

【0315】

6. 変異体506：対照として、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞において產生されたトラスツズマブ。40

【0316】

実施例2：例示的なbsAbの一過性CHO発現、精製および収量

実施例1に記載された構築物を、以下の通りにCHO細胞において発現させて精製した。清澄化培養培地をMabSelect SuRe（商標）（GE Healthcare）プロテインAカラムにロードし、10カラム体積のPBS緩衝液、pH 7.2で洗浄した。抗原結合性構築物を10カラム体積のクエン酸緩衝液、pH 3.6で溶出させ、抗体を含有するプール画分をTRIS、pH 11で中和した。図1は、プロテインA精製後の、一価抗体対照変異体878（図1A）および変異体879（図1B）、ならびにbsAb変異体880（図1C）に関するSDS-PAGE分析の結果を示している。この図に示された3つのゲルにおいて、レーン1は発現された全タンパク質を表し、レーン2はフ

ロースルーパー画分を表し、レーン3は洗浄液、レーン4は精製された画分を表している。これらの結果は、一価対照抗体およびbsAb変異体880がCHO細胞において良好に発現されること、およびプロテインA精製後に約80%の純度に精製されることを示している。

【0317】

プロテインA抗体溶出液をゲル濾過(SEC)によってさらに精製した。ゲル濾過のために3.5mgの抗体混合物を1.5mLに濃縮して、Sephadex 200 HiLoad(商標)16/600 200pgカラム(GE Healthcare)に、AKTA Express FPLC(商標)を介して流速1mL/分でロードした。PBS緩衝液、pH 7.4を流速1mL/分で用いた。精製された抗体に対応する画分を収集し、ほぼ1mg/mLに濃縮して、-80°で保存した。精製されたタンパク質は、LCMSによって下記の通りに分析された。

10

【0318】

LCMS

bsAb変異体880の精製および収量を、上記の通りのプロテインA精製およびSEC精製後にLCMSによって試験した。

【0319】

ヘテロ二量体純度のLCMS分析

例示的なbsAbである変異体880の純度を、LCMSを標準的な条件下で用いて決定した。LCMSへのローディングの前に、PNGaseFによって抗体を脱グリコシル化した。液体クロマトグラフィーは、Agilent 1100 Series HPLCにて以下の条件下で実施した。

20

流速：分離ポストカラムでの1mL/分からMSへの100uL/分まで

溶媒：A = ddH₂O中の0.1%ギ酸、B = 65%アセトニトリル、25% THF、9.9% ddH₂O、0.1%ギ酸

カラム：2.1 × 30mm PorosR2

カラム温度：80°；溶媒も予熱

勾配：20% B(0~3分)、20~90% B(3~6分)、90~20% B(6~7分)、20% B(7~9分)

質量分析法(MS)を、引き続いて、次の条件下でLTQ-Orbitrap XL質量分析計にて実施した：

イオン化法：イオンマックスエレクトロスプレー

較正および調整方法：CsIの2mg/mL溶液を、10 μL/分の流速で注入する。Orbitrapを、続いて、Automatic Tune機能を使用してm/z 2211で調整する(観測される全体的なCsIイオン範囲：1690~2800)。

30

コーン電圧：40V

チューブレンズ：115V

FT分解能：7,500

スキヤン範囲 m/z 400~4000

スキヤン遅延：1.5分

【0320】

データの分子量プロファイルは、ThermoのPromassデコンボリューション(商標)ソフトウェアを用いて生成した。

40

【0321】

SECおよびLC-MSの結果を図2に示している。LC-MS分析により、プロテインA精製およびSEC精製後に、v879およびv880が100%のヘテロ二量体純度に精製されたこと、ならびにv878が79%のヘテロ二量体純度に精製され、鎖Bホモ二量体を20%含有することが示された。

【0322】

表1は、精製段階でのv880の収量を示している。

変異体	生産規模 (L)	プロテインA 後の力値 (mg/L)	SEC後の力値 (mg/L)
v880	0.5	31.6	6.6

【0323】

実施例3：BsAbは、SPRによる測定で、ヒトHER2およびHER3の両方と共に結合して結合することができる

例示的なbsAbである変異体880が、HER2およびHER3という両方の標的と結合する能力を、以下の通りにBIO-RADによるProteOn（商標）XPR36システムを用いるSPR（表面プラズモン共鳴）によって判定した。緩衝液（10mM Hepes pH 6.8）中のHER-2を、アミンカップリングを通じて3000 RUとなるまでCM5チップに固定化した。抗HER2抗体を含有する抗体形式にあるFc変異体を300 RUとなるまでHER-2表面に固定化した。泳動緩衝液および界面活性剤をpH6.8に維持した。精製された分析物Her3をこの泳動緩衝液中に希釈し、20～30 μL/分の流速で2分間注入した後、さらに4分間かけて解離させた。20nMで開始する各抗体の5つの2倍希釈物を三重反復試験にて分析した。センサグラムを1:1 Langmuir結合モデルに全体的に適合させた。すべての実験は室温で行った。

【0324】

結果は図3Aおよび図3Bに示されており、bsAb変異体880の両方の抗原結合ドメインがそれらのコグネイト抗原と共に結合（結合）しうることを示している。

【0325】

実施例4：BsAb抗体はHer2 / 3低発現性ヒト腫瘍細胞においてより高いB_{max}を示す

例示的なbsAbである変異体880がHER2 / 3低発現性細胞株と結合する能力を、細胞株MALME-3Mにおけるフローサイトメトリーによって決定した。FACS分析は下記の通りに実施した。

【0326】

変異体880ならびに対照一価変異体878および879、さらにはHER2に対する単一特異性二価対照（変異体876）およびHER3に対するもの（変異体877）の、MALME-3M細胞の表面に対する結合を、フローサイトメトリーによって決定した。細胞をPBSで洗浄して、10% FBSを含有するDMEM中に 1×10^5 個 / 100 μlで再懸濁させた。100 μlの細胞懸濁液を各微量遠心管に添加し、その後に10 μl / チューブの抗体変異体を添加した。チューブを回転装置上にて4度2時間インキュベートした。微量遠心管を室温にて2000RPMで2分間遠心し、細胞ペレットを500 μlの培地で洗浄した。各細胞ペレットを、蛍光色素標識二次抗体を培地中に2 μg / 試料で希釈したもの100 μl中に再懸濁させた。試料を繰り返して回転装置上にて4度1時間インキュベートした。インキュベーション後に、細胞を2000RPMで2分間遠心処理し、培地で洗浄した。細胞を500 μlの培地中に再懸濁させ、濾過して5 μlのヨウ化プロピジウム（PI）を含有するチューブに入れ、製造元の指示に従ってBD（商標）LSRIIフローサイトメーターで分析した。

【0327】

結果は図4に示されており、これは変異体880 bsAbが最も高いB_{max}および親和性（結合力）の増大を示し、一方、変異体878（一価HER2）は2番目に高いB_{max}を示したことを見ている。変異体880のB_{max}は、HER2+HER3に対する一価結合の総和であると考えられる。単一特異性二価対照HER2およびHER3抗体はより低いB_{max}を示す。

【0328】

実施例5：BsAbはHER2高発現性および低発現性のヒト腫瘍細胞においてより高いB_{max}を示す

例示的なbsAbである変異体880がHER2およびHER3受容体をさまざまな細胞密度で発現する細胞株と結合する能力を、細胞株SKOV-ATCCおよびMALME-3Mにおけるフローサイトメトリーによって決定した。表xxは、これらの細胞株におけるHER2およびHER3の相対発現レベ

10

20

30

40

50

ルを特定している。FACS分析は、実施例4に記載した通りに行つた。

【0329】

結果は図5に示されている。図5Aおよび5Bは、SKOV-ATCC細胞における結合データを示している。図5Cおよび5DにおけるMALME-3M細胞に関して示された結果は、実施例4に提示されたものと同様に反復試験データセットである。図5Aおよび5Cでは抗体濃度は線形スケールでプロットされており、図5Bおよび5Dでは同じデータが抗体濃度に関する対数スケールでプロットされている。この結果は、SKOV-ATCC細胞において二重特異性抗体変異体880の相加的効果が観察されたことを示している。このbsAbは高濃度では一価性に結合する（すなわち、Her2およびHer3に対して二価性に結合しない）ように思われた。MALME-3M細胞においては、二重特異性抗体の結合力効果が低濃度で観察された。このbsAbは高濃度で一価性に結合するように思われた。v880の場合、これらの結果は、相対的な受容体細胞密度は結合の結合力に影響を及ぼしうるが、細胞に対するv880結合のB_{max}には影響を及ぼさないことを示している。いずれの細胞株においても、v880は対照と比較してより優れたB_{max}を呈する。

【0330】

実施例6：bsAbは、HER2 / 3低発現性腫瘍細胞において対照よりも高度なヒトNK細胞媒介性ADCC活性を誘発する

例示的なbsAb変異体880がADCC媒介性細胞死滅を導く能力を、下記の方法に従って、ヒトトリプルネガティブ乳癌細胞株MDA-MB-231において評価した。

【0331】

概要：標的細胞を被験抗体（45 μg / mLから10倍ずつ濃度を下げる）とともに30分間ブレインキュベートした後に、エフェクター細胞をエフェクター / 標的細胞比5 : 1で添加して、37 / 5% CO₂インキュベーター内でインキュベーションをさらに6時間続けた。試料を、45ug / mlから10倍ずつ低下する8種の濃度で試験した。LDH放出を、LDHアッセイキットを用いて測定した。

【0332】

用量反応試験を、あらかじめ最適化したエフェクター / 標的 (E / T) 比 (5 : 1) で、さまざまな濃度の試料を用いて行った。最大半値有効濃度 (EC₅₀) 値を、GraphPad Prismによるシグモイド用量反応非線形回帰適合を用いて分析した。

【0333】

細胞は、マッコイ5A完全培地の中で37 / 5% CO₂にて維持し、ATCCからのプロトコールに従って、10% FBSを加えた適した培地により定期的に継代培養した。P10よりも少ない継代数の細胞をこのアッセイに使用した。試料をアッセイで使用する前に、1% FBSおよび1% Pen / strepを加えたフェノールレッド非含有MEM培地によって0.3 ~ 300nMの濃度に希釈した。

【0334】

ADCCアッセイ

MDA-MB-231標的細胞を、800rpmで3分間の遠心処理によって採取した。細胞をアッセイ培地で1回洗浄して遠心処理を行い、ペレットよりも上にある培地を完全に除去した。細胞をアッセイ培地で穏やかに懸濁させて、単細胞溶液を作製した。細胞の数は4倍細胞ストック (50 μlのアッセイ培地中に細胞10,000個) に調節した。続いて被験抗体を、上述した所望の濃度まで希釈した。

【0335】

標的細胞を、以下の通りにアッセイプレートに播種した。50 μlの4倍標的細胞ストックおよび50 μlの4倍試料希釈物を、96ウェルアッセイプレートのウェルに添加し、プレートを細胞培養インキュベータ内で、室温で30分間インキュベートした。エフェクター細胞 (NK92 / FcR 3a (158V / V)、100 μl、E / T = 5 : 1、すなわち、1ウェル当たり50,000個のエフェクター細胞) を添加して反応を開始し、交差振盪によって穏やかに混合した。

【0336】

Triton X-100をエフェクター細胞および抗体を有しない細胞対照に1%の最終濃度で添

10

20

30

40

50

加して、標的細胞を分解させ、これらの対照を最大溶解対照とした。ADCCアッセイ緩衝液（98% フェノールレッド非含有MEM培地、1% Pen / Strepおよび1% FBS）を、エフェクター細胞および抗体を有しない細胞対照に添加し、これを最小LDH放出対照とした。抗体の非存在下でエフェクター細胞とともにインキュベートした標的細胞は、両方の細胞を一緒にインキュベートした場合、非特異的LDH放出のバックグラウンド対照として設定した。プレートを37℃の5% CO₂インキュベーター内で6時間インキュベートした。細胞生存度は、LDHキット（Roche、カタログ番号11644793001）で分析した。吸光度データを、Flexstation 3にてOD492nmおよびOD650nmで読み取った。

【0337】

データ分析

10

細胞溶解のパーセンテージを、以下の式に従って計算した。

$$\text{細胞溶解率(%)} = 100 * (\text{実験データ} - (\text{E} + \text{T})) / (\text{最大放出} - \text{最小放出})。$$

データはGraphpad（v4.0）によって提示し、分析した。

【0338】

結果は図6に示されている。図6は、対照v792、v506、v1040、およびbsAb v880に関する結果を示している。これらの結果は、トリプルネガティブ細胞株MDA-MB-231において、二重特異性変異体880が二価抗HER2抗体v506および変異体792よりも優れた有効性を示すことを示している。

【0339】

実施例7：bsAb抗体は、低HER2 ER+乳房腫瘍細胞およびSK-BR-3細胞において、対照よりも高度なヒトNK細胞媒介性ADCC活性を示す

20

例示的なbsAb変異体880がADCC媒介性細胞死滅を導く能力を、HER2低発現性MCF7細胞株において、実施例6に記載した方法に従って評価した。

【0340】

結果は図7、8および9に示されている。図7において、v880はMCF7細胞におけるADCCを、対照抗体v792およびv506を上回る度合いで媒介することができている。図8に示されているように、v880は、MCF-7細胞（Her2 1+）において、二価対照抗体v876およびv877よりも有効である。高密度でHer2を発現する細胞株SK-BR-3では、v880は、図9に示されているように、対照抗体v792およびv506と同程度の様式でADCCを媒介する。これらの結果は、標的細胞に対する結合のための修飾の増大を呈する二重特異性抗体が、同じ抗原を標的とする単一特異性抗体と比較して、エフェクター活性の点で等しく有効であるかまたはより有効である可能性を示している。

30

【0341】

実施例8：さらなる例示的な二重特異性抗体および対照

いくつかのさらなる抗HER2-HER3二重特異性抗体（bsAb）および対照を設計して調製した。図10は、試験した抗HER2-HER3 bsAbおよび対照のDNA配列組成を列記しており、以下の表2は、被験抗体のエピトープおよび参照文献情報を提示している。

【0342】

（表2A）H3およびMM111 Abに関するエピトープおよび参照文献情報

40

抗体	抗原／エピトープ	参考文献
H3	HER3	US7332580B2
MM111	HER2 ECD1, HER3	US2009060721

【0343】

ヒトIgG1はJackson ImmunoResearch（West Grove, PA, Cat. No. 009-000-003）から購入した。

【0344】

v506、v792、v1040は、実施例1に記載した通りである。v506は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において対照として施設内で産生させた野生型トラスツズマブであり

50

、両方のHER2結合ドメインがFab型をとるトラスツズマブに由来し、Fcは野生型ホモ二量体である；抗原結合ドメインのエピトープはHER2のドメイン4である。

【0345】

v792はv506と類縁性であるが、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392L_T394Wを有するヘテロ二量体であるFc領域に違いがある。

【0346】

v1040は、HER2結合ドメインが鎖A上のトラスツズマブに由来するFabであって、Fc領域が鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392L_T394Wを有するヘテロ二量体である一価抗HER2抗体である；抗原結合ドメインのエピトープはHER2のドメイン4である。

10

【0347】

v4184は、CHO細胞において対照として施設内で產生させた野生型ペルツズマブであり、両方のHER2結合ドメインがFab型をとるペルツズマブに由来し、Fc領域は鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392L_T394Wを有するヘテロ二量体である；抗原結合ドメインのエピトープはHER2のドメイン2である。

【0348】

v4182は、HER2結合ドメインが鎖A上のペルツズマブに由来するFabであって、Fc領域が鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392L_T394Wを有するヘテロ二量体である一価抗HER2抗体である；抗原結合ドメインのエピトープはHER2のドメイン2である。

20

【0349】

v877は、結合アームとしての2つの同一なHER3結合性scFvがホモ二量体Fcと接続されている単一特異性二価抗体である。v879は、同じHER3結合性scFvを用いる単一特異性一価アーム抗体誘導体である。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

【0350】

v1087は、HER2およびHER3二重特異性結合分子であり、ヒト血清アルブミンのN末端に融合した抗HER3 scFv、およびC末端に融合した抗HER2 scFvを含む。

【0351】

v4248は、HER2結合アームがHER2のドメイン4と結合するFabであって、HER3結合アームがscFvである、抗HER2-HER3 bsAbである。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

30

【0352】

(表2B)v4248の配列

SEQ ID NO	説明	配列
6	4248 HC1 (抗 HER2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSSLGTQT YICNVNKHPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
55	4248 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWG GDGFYAMDYWGQGTLTVSS
49	CDR-H1 (Chothia)	GFKNIKDT
50	CDR-H2 (Chothia)	YPTNG
51	CDR-H3 (Chothia)	WGGDGFYAMDY
2	4248 LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKV DNAQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
56	4248 VL (抗HER2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQ GTKVEIK
52	CDR-L1 (Chothia)	RASQDVNTAVA
53	CDR-L2 (Chothia)	SASFYLS
54	CDR-L3 (Chothia)	QQHYTPPT
16	4248 HC2 (抗 HER3)	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYWMWSVRQAPGKGLEWVAN INRDGSASYYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDR GVGYFDLWGRGTLTVSSASTGGGGSGGGGSQALTQPAVGSP GQSITISCTGTSSDVGGINFVSWYQQHPGKAPKLMYDVSDRPSGVSDRF SGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSSYGSSTHIVFGGGTKVTVLGAA EPKSSDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRPEVTCVVVD VSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL LCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYMTWPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPGK
57	4248 VH	QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTSSYWMWSVRQAPGKGLEWVAN INRDGSASYYVDSVKGRFTISRDDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDR GVGYFDLWGRGTLTVSS
58	CDR-H1 (IMGT)	GFTFSSYW
59	CDR-H2 (IMGT)	INRDGSAS
60	CDR-H3 (IMGT)	ARDRGVGYFDL
61	4248 VL (抗 HER3)	QSALTQPAVGSPGQSQSITISCTGTSSDVGGINFVSWYQQHPGKAPKLMYDVSDRPSGVSDRFSGSKSGNTASLIISGLQADDEADYYCSSYGSSTHIVFGGGTKVTVL
62	CDR-L1 (IMGT)	SSDVGGYNF
	CDR-L2 (IMGT)	DVS
63	CDR-L3 (IMGT)	SSYGSSSTHVI

【0353】

v4248をさらに改変して、異なる安定化突然変異ならびに異なる分子形式を有する変異体であるv9918、v9919、v9920、v9921、v9922、v9923、v9924およびv10001を得た。v4248も改変して、HER2結合親和性が改変された変異体であるv9926およびv9927を得た。

【0354】

v9918は、v4248に由来する抗HER2-HER3 bsAbである。そのHER2結合アームはHER2のドメイン4と結合するFabであり、HER3結合アームは、V_H（残基44）とV_L（残基100）の間にジスルフィド架橋を保有するscFvである。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

【0355】

v9919は、v9918に由来する抗HER2-HER3 bsAbである。そのHER2結合アームはHER2のドメ

10

20

30

40

50

イン4と結合するFabであり、HER3結合アームは、V_H（残基44）とV_L（残基100）の間にジスルフィド架橋を保有し、かつV_L上にさらなるI90T突然変異を有するscFvである。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

【0356】

v9920は、v4248と類縁性のある抗HER2-HER3 bsAbである。そのHER2結合アームはHER2のドメイン4と結合するscFvであり、HER3結合アームはC_Lを保有するFabである。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

【0357】

v9921は、v9920に由来する抗HER2-HER3 bsAbである。そのHER2結合アームは、V_H（残基44）とV_L（残基100）の間にジスルフィド架橋を保有するscFvであって、HER2のドメイン4と結合し、HER3結合アームはC_Lを保有するFabである。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

【0358】

v9922は、v9920に由来する抗HER2-HER3 bsAbである。そのHER2結合アームはHER2のドメイン4と結合するscFvであり、HER3結合アームはCLを保有するFabである。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

【0359】

v9923は、v9922に由来する抗HER2-HER3 bsAbである。そのHER2結合アームは、V_H（残基44）とV_L（残基100）の間にジスルフィド架橋を保有するscFvであって、HER2のドメイン4と結合し、HER3結合アームはC_Lを保有するFabである。Fc領域は、鎖Aにおいて突然変異T350V_L351Y_F405A_Y407Vを、かつ鎖BにおいてT350V_T366L_K392M_T394Wを有するヘテロ二量体である。

【0360】

v7186、v7188およびv7190は、それぞれv4248、v1040およびv4182のアフコシル化誘導体である。これらの変異体は、シュードモナスGDP-6-デオキシ-D-リキソ-4-ヘキスロースレダクターゼをコードする余剰クローンのトランスフェクションにより、親抗体と同じやり方で作製した（実施例9参照）。

【0361】

v6246、v6249およびv6362は、それぞれv506、v6908およびv4248に由来する抗体薬物コンジュゲート（ADC）である。ネイキッド抗体を、薬物ペイロードであるメルタンシン（mertansine）（DM1）と、リンカーとして作用するスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）とともにコンジュゲートさせた（実施例11参照）。

【0362】

実施例9：抗HER2-HER3 bsAbおよび対照の発現および精製

以下の通りに、実施例8に記載された抗HER2-HER3 bsAbおよび対照をクローニングし、50mL培養物において発現させて、精製した。抗体重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を、ヒト／哺乳動物での発現のために最適化されたコドンを用いた遺伝子合成を介して構築した。最終的な遺伝子産物を哺乳動物発現ベクターpTT5（NRC-BRI、Canada）中にサブクローニングして、CHO細胞において発現させた（Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing CHO cells. Nucleic acids research 30, E9 (2002)）。

【0363】

指數的増殖期にあるCHO細胞に対して（ $1.5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 個 / mL）、1mg / mLの25kDaポリエチレンイミン水溶液（PEI、Polysciences）を、2.5 : 1のPEI : DNA比でトランスフェクトした（Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection

10

20

30

40

50

process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55(1):44-51 (2011)。ヘテロ二量体の形成を最適化するために、さまざまな比の重鎖DNAと軽鎖DNA、例えば、30% / 30% / 40%、40% / 20% / 40%、または20% / 40% / 40%をまず2mlの発現規模でトランスフェクトした。得られた発現プロフィールに基づいて、より大容量での生産のための適したDNA比を選択した。エフェクター媒介性機能を強化することが知られている、アフコシル化グリコシル化パターンを有する抗体に関しては、GDP-6-デオキシ-D-リキソ-4-ヘキスロースレダクターゼ (RMD) をコードする余剰クローニングを、存在するDNA全体の15%まで添加することにより、発現を同じ様式で行わせた。

【0364】

トランスフェクトされた細胞を5~6日後に採取し、培養培地を4000rpmでの遠心処理の後に収集し、0.45 μmのフィルターを用いて清澄化した。清澄化した培養培地をMabSelect SuRe (商標) (GE Healthcare) プロテインAカラムにロードして、10カラム体積のPBS緩衝液、pH 7.2で洗浄した。抗体を、10カラム体積のクエン酸緩衝液、pH3.6で溶出させ、抗体を含有するプール画分を、pH 11のTRISによって中和した。続いて、Econo-Pac 10DGカラム (Bio-Rad) を用いてタンパク質を脱塩した。

【0365】

タンパク質をゲルfiltrationによってさらに精製し、3.5mgの抗体混合物を1.5mLに濃縮して、Superdex 200 HiLoad 16 / 600 200pgカラム (GE Healthcare) に対して、AKTA Express F PLCを介して1mL / 分の流速でロードした。PBS緩衝液、pH 7.4を1mL / 分の流速で用いた。精製抗体に対応する分画を収集し、ほぼ1mg / mLに濃縮して、-80°で保存した。

【0366】

ヒト血清アルブミン融合タンパク質の精製のためには、AlbuPure (商標) 親和性樹脂を製造元の推奨に従って用いた。手短に述べると、採取した細胞培養上清を0.5M NaH₂PO₄によってpH 6に調整した。続いてタンパク質試料を、バッチ結合様式で、AlbuPure (商標) 樹脂に室温で60分間かけて結合させた。続いて樹脂を75mM NaPO₄ pH 6で洗浄し、続いて75mM NaPO₄ pH 7.8で洗浄した。最後に、タンパク質を、20mMオクタノン酸ナトリウムを加えたPBSで溶出させた。

【0367】

図11Aは、例示的なbsAb v4248の50mLでの生産のための、選択された比および段階収量を示している。図11Bは、v4248誘導体の10mLでの探索的発現に関する上清力価を示している。

【0368】

図12は、SDS-PAGEおよびSECによって評価した、例示的なbsAb v4248の精製結果を示している。

【0369】

選択されたDNA比を用いて発現させた場合に、いくつかの例示的なbsAbは依然として、プロテインA精製材料のSECクロマトグラムに見られるように、顕著な量のホモ二量体混入物または高分子量凝集物を示した (図12A)。しかし、v4248に関して示されているように、高純度産物画分をSEC精製段階で収集することができ、ヘテロ二量体の純度は、プロテインA後およびSEC SDS-PAGE後の推定では、典型的には80~95%に改善した (図12B)。この純度は高速液体クロマトグラフィー-サイズ排除クロマトグラフィー (UPLC-SEC) および質量分析によっても確かめられた (結果は提示せず)。

【0370】

これらの結果は、例示的なbsAb、およびアフコシル化バージョンのこれらのbsAbを、Ig Gプラットフォームに対して使用される標準的な手順を用いて発現させて精製することができる事を実証している。

【0371】

実施例10；例示的なbsAbの大規模生産（最大で25L）

例示的なbsAbであるv4248を、生産の拡張性および大規模製造性について評価するためには、一過性CHO細胞培養物において最大25Lとして発現させた。抗体の発現および精製は上

10

20

30

40

50

記の方法を用いて行った。

【0372】

典型的な25L産生物において、例示的なbsAbであるv4248のプロテインA精製およびSEC精製後の収量は10.8mg / Lであり、ヘテロ二量体純度は94%であった。より小規模な発現(50mLまたはそれ未満)と比較して、効率の損失もヘテロ二量体純度の違いも認められなかった。

【0373】

例示的なv4248の生産データにより、典型的なIgGプラットフォーム精製方法を適用し、良好な拡張性および大規模製造への適用性が実証された。

【0374】

実施例11：ADCを作製するための抗HER2-HER3 bsAbと毒性薬物ペイロードとのコンジュゲーション

例示的なbsAbであるv4248を、一段階手順を用いて、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)としてコンジュゲートさせた。

【0375】

コンジュゲーションは以下の通りに行った。まず、PD-10カラムを用いて、出発タンパク質試料の50mMリン酸カリウムpH 6.5、50mM NaClおよび2mM EDTAへの緩衝液交換を行い、10mg / mLに調整した。続いて、ジメチルアセトアミド(DMA)中に溶解させたSMCC-DM1の10mM溶液を、7.5モル等量のタンパク質試料に対して添加した。DMAを最終濃度10% v / vとなるまでさらに添加し、試料を短時間混合した。反応溶液を混合しながら25℃で一晩インキュベートした。コンジュゲートされていないタンパク質試料の割合を(疎水性相互作用クロマトグラフィー-高速液体クロマトグラフィー)HIC-HPLCによって決定することによって反応をモニターし、コンジュゲートされていない試料の量が5%未満となるまでSMC-C-DM1を少しずつの増分で添加した。続いて、PD-10カラムを用いて産物の20mMコハク酸ナトリウム、pH 5.0への緩衝液交換を行い、タンパク質濃度および薬物-抗体比(DAR)を、252nmおよび280nmでの吸光度に基づいて決定した。緩衝液を、最終組成が20mMコハク酸ナトリウム、6% w / vトレハロースおよび0.02% w / vポリソルベート20、pH 5.0となるように調整した。高分子量凝集物を同定するために高速液体クロマトグラフィー-サイズ排除クロマトグラフィー(HPLC-SEC)を行い、もしそれが総タンパク質含量の5%を上回る場合には、SECによって精製除去した。

【0376】

図13は、ADCコンジュゲーションの種々の段階での例示的なbsAbのSECプロフィールを示している。図13Aは、DM1とのコンジュゲーションの前および後のv4248およびv6362のSECプロフィールを示している。図13Bは、SECによって精製したv6362のUPLC-SECを示している。

【0377】

例示的なbsAbであるv4248は、2~150mgの出発タンパク質を用いる小規模および大規模のいずれにおいても、SMCC-DM1と良好にコンジュゲートされた。コンジュゲーション反応および精製作業(workup)後の初回総タンパク質回収率は、典型的には50~70%であった。v6362は典型的には高分子量(HMW)混入物を10~20%含有していたが、その後のSEC精製によって不純物はうまく除去され、純度およそ94%のbsADC試料が回収された。v6362の典型的なコンジュゲーションのDARは3.5~4.2であり、これはトラスツズマブ-DM1などの類似のADCに関して報告されているDARである3.5と同等であった。

【0378】

これらの結果は、例示的なbsAbが、一段階DM1コンジュゲーション手順を用いてADCとして誘導体化が成功したことを実証している。標準的な精製方法を用いたADCのその後の精製も成功した。このプロセスは規模拡大にも適用可能である。

【0379】

実施例12：抗HER2-HER3 bsAbおよびbsADCの安定性

抗体変異体の安定性を融解温度に基づいて評価するために、示差走査熱量測定(DSC)

10

20

30

40

50

を行った。

【0380】

手短に述べると、DSC分析は、MicroCal（商標）VP-Capillary DSC（GE Healthcare）において、PBS中に0.2～0.4mg/mlの濃度に調整した0.4mlの精製タンパク質を用いて行った。各DSC試行の開始時に、ベースラインを安定化するために緩衝液のみの注射を5回行い、各試料注射の前にも参照とするために1回の緩衝液注射を行った。各試料を、低フィードバック、8秒フィルター、5分間のpreTstat、および70psiの窒素圧を用いて、1時間に60／時の速度で20から100まで走査した。試料サーモグラムを参照とし、Origin 7ソフトウェアを用いて分析した。

【0381】

例示的な変異体v7186、4248および6362に関するサーモグラムを図14Aおよび図14Bに示している。v7186ならびにその対応する1アーム抗体（OAA）対照であるv7188およびv879に関するサーモグラムを用いて、構成ドメインの融解温度（T_m）を同定したところ、ピークが64、67および78にあり、それぞれCH2ドメイン、scFvドメインおよびFabドメインに対応する可能性が高いと考えられた。CH3ドメインの融解は、v7186の特定のヘテロ二量体Fcに存在する突然変異が理由で、60～70領域にある第1のピークの中に埋没したと推定される。

【0382】

bsAb v4248とその対応するbsADC v6362のサーモグラムの比較により、bsAbのコンジュゲーションがいかなる顕著な安定性損失ももたらさなかつたことが示されている。T_mは、v4248における68～80からv6362における66～78へとわずかに低下したように思われる。

【0383】

以上を総合すると、これらの結果は、個々の抗原結合ドメインを二重特異性抗体形式で組み合わせても、それらの固有の安定性に大きな影響を及ぼさないことを実証している。加えて、この二重特異性形式にある抗体を、安定性に大きな影響を及ぼさずに、毒素とコンジュゲートさせることもできる。

【0384】

実施例13：SPRによれば、例示的なbsAbはヒトFc Rと結合する

通常のbsAbおよびアフコシル化bsAbのFc R結合能力を実証するために、いくつかのヒトFc Rに対する例示的な抗体の結合親和性を、Bio-RadによるProteOn（商標）XPR36システムを用いる表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定した。

【0385】

HER2（10mM HEPES pH 6.8中）を、アミンカップリングを通じて、3000 RUに達するまでCM5チップに固定化した。その後に、例示的なHER2結合性抗体変異体をHER2表面上に300 RUで捕捉させた。泳動緩衝液および界面活性剤はpH 6.8に維持した。精製された分析物Fc Rをその泳動緩衝液中に希釈し、20～30μl / 分の流速で2分間注入した後、さらに4分間かけて解離させた。20nMで開始する各分析物の5つの2倍系列希釈物を三重反復試験にて分析した。センサグラムを1:1 Langmuir結合モデルに全体的に適合させた。すべての実験は室温で行った。結果は図15に示されている。

【0386】

試験した抗体-Fc R結合ペアにおいては、例示的なbsAbの解離定数（K_D）と単一特異性对照のそれとの間に大きな差（およそ2倍以内）はみられなかった。例えば、v4248およびv506のFc R 3aF K_Dはそれぞれ 3.2×10^{-7} および 6.7×10^{-7} であった。Fc R 3aVにおける結合親和性が3aFと比較しておよそ2倍の大きさであることが観察されたことは、文献データと一致する。他のFc RのK_Dも、文献中に報告されている値と同程度であった。

【0387】

アフコシル化v4248についても、同じ結合親和性の関係が観察された。さらに、通常の非アフコシル化bsAb v4248と比較したところ、Fc R 3aFおよび3aVに対する結合親和性はおよそ10倍に改善していたが、このことは文献データに基づいて予想されていた。

10

20

30

40

50

【0388】

以上を総合すると、これらの結果は、bsAb v4248が、WT IgG1 Fcを保有する抗体に類似したFc R結合親和性を示すことを実証している。このbsAbはこのため、エフェクター媒介性細胞傷害機能を媒介する点で、通常の抗体のものと等しい能力を持つと予想される。さらに、アフコシリ化bsAb v7186は、予想されたFc R 3aFおよび3aV結合親和性の増大も示しており、このことから、それに基づくエフェクター媒介機能の強化という結果につながることも予期される。

【0389】

実施例14：例示的なbsAbは、種々のレベルで標的抗原を発現するヒト腫瘍細胞において、单一特異性二価抗体よりも高度のBmaxを示した

HER2およびHER3をさまざまなレベルで発現する種々のヒト腫瘍細胞株に対する、例示的なbsAbであるv4248の結合を、フローサイトメトリーによって評価し、親である单一特異性二価抗体対照であるv506と比較した。試験した細胞株であるBT-474、SKOV3、JIMT1、MDA-MB-231およびMCF7の起源および受容体発現レベルは表A1に記載されている。

【0390】

細胞をPBSで洗浄し、DMEM中に 1×10^5 個 / 100 μlで再懸濁させた。細胞懸濁液 (100 μl) を微量遠心管に添加し、その後に、10 μlの抗体変異体を、ある範囲にわたる最終濃度で添加した。続いてチューブを回転装置上にて4℃で2時間インキュベートした。チューブを室温にて2000RPMで2分間遠心し、細胞ペレットを500 μlの培地で洗浄した。各細胞ペレットを、蛍光色素標識二次抗体を培地中に2 μg / 試料で希釈したもの100 μl中に再懸濁させた。試料を続けて回転装置上にて4℃で1時間インキュベートした。インキュベーション後に、細胞を2000rpmで2分間遠心処理して、培地で洗浄した。細胞を500 μlの培地中に再懸濁させて、(大きな細胞凝集塊を除くために) 濾過して5 μlのヨウ化プロピジウム(PI)を含有するチューブに入れ、製造元の指示に従ってBD(商標) LSR II フローサイトメーターで分析した。

【0391】

結合パラメーターである、細胞1個当たりに結合する抗体分子の数を表す最大結合(Bmax)、および半飽和抗体濃度を表す解離定数であるKDを、GraphPad Prismを用いたデータの曲線適合によって求めた。表3は、HER2およびHER3を種々のレベルで発現するいくつかのヒト腫瘍細胞株に対する、例示的なbsAbであるv4248の結合をまとめている。

【0392】

(表3) さまざまな細胞株に対するv4248の結合

	BT-474	SKOV3	JIMT1	MDA-MB-231
v506				
Bmax	34000	28700	6262	2930
KD	5.3	4.5	2.4	3.2
v4248				
Bmax	104000	39600	8390	5960
KD	36	14	13	24
Bmaxの差の倍数値	3.06	1.38	1.34	2.03

【0393】

Bmaxは任意単位の蛍光強度中央値(MFI)として報告されたが、これは計測器の設定が異なるれば異なる可能性がある。KDは、nM単位での見かけの解離定数である。

【0394】

図16は、HER2およびHER3を種々のレベルで発現するいくつかのヒト癌細胞株における、例示的なbsAbであるv4248の代表的なFACS結合曲線を示している。

10

20

30

40

50

【0395】

例示的なbsAbであるv4248は、単一特異性二価対照v506と比較して、BT-474細胞におけるBmaxの増大を示した。さらに、この細胞修飾特性の増大は、HER2およびHER3を種々のレベルで発現する種々のヒト腫瘍細胞において一貫して観察されたが、Bmaxの差の倍数値はある程度のばらつきを示した。例えば、HER2低発現性のMDA-MB-231において、v4248は、同じ抗HER2結合ドメインを有する単一特異性二価抗体v506と比較して有意に高いBmaxを実証した。bsAb v4248とv506との間でのBmaxの増大は、JIMT1およびSKOV3でも観察された。

【0396】

以上をまとめると、例示的なbsAbであるv4248は、HER2およびHER3標的受容体をさまざまなレベルで発現するいくつかのヒト腫瘍細胞株において、単一特異性二価抗体対照と比較して、より高度の細胞修飾を示した。細胞結合のレベルがより高いことにより、標的細胞のエフェクター媒介性死滅がさらによく増強されると予想される。

10

【0397】

実施例15：bsADCは親bsAbと同程度のヒト癌細胞結合を示す

標的抗原結合に対してコンジュゲーションの影響があるか否かを判定する目的で、bsADC v6362が細胞と結合する能力を評価した。実験は、実施例14に記載された通りに実施した。

20

【0398】

図17は、ヒト卵巣癌細胞SKOV3に対する、bsAb v4248およびその対応するbsADC v6362の結合を示している。

20

【0399】

SKOV3細胞において、v4248およびv6362は同程度のBmaxを有していたが、ADCの方がより高度の見かけの親和性を有していた。この結果は、bsAbのコンジュゲーションがその抗原結合能力に対して何ら有害な影響をもたらさず、bsADCがその起源であるbsAbと比較して、標的ヒト腫瘍細胞と等しく結合しうると予想されることを実証している。

30

【0400】

実施例16：例示的な抗HER2-HER3 bsAbは、抗HER2単一特異性二価抗体を上回る、ヒト腫瘍細胞のADCCの増大を呈した

下記の通りに、ヒト腫瘍細胞株SK-BR-3、JIMT1、SKOV3およびMDA-MB-231において、bsAb 4248および7186がADCCを媒介する能力を、単一特異性二価抗HER2対照抗体と比較して測定した。対照抗体ハーセプチニン（商標）はRocheから購入した。

30

【0401】

標的細胞（50 μl中に5,000個～10,000個）を96ウェルプレートの各ウェルに播種し、その翌日に抗体を、対数スケールで均等に分布する3pM～300nMの範囲にわたる最終濃度で添加した。30分間のインキュベーション後に、エフェクター細胞を種々のE:T比で添加した。ヒトPBMCエフェクター細胞の場合には、最終的なE:T比は25:1とした。ヒトFcR 3a (158V/V)を発現するエフェクターNK92細胞の場合には、E:T比は5:1または1:1とした。続いてプレートを交差振盪によって穏やかに混合し、インキュベーター内で37 / 5% CO₂で6時間インキュベートした。

40

【0402】

溶解した細胞のパーセンテージは、上清中に放出されたLDHの量をLDHキットおよびFlex station 3を用いて測定することによって決定した。492nmでの吸光度値はすべて、650nmでの値を用いてバックグラウンドを差し引いたものとした。結果の計算は以下に示す通りであり、Graphpad Prismにて用量反応曲線パラメーターを適合させた。

$$\text{細胞溶解率} (\%) = 100\% \times (\text{OD}_{\text{試料}} - \text{OD}_{\text{非特異}}) / (\text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}})$$

【0403】

式中、OD_{試料}は、バックグラウンドを差し引いた試料の値に対応する；OD_{非特異}は、他の処理を行わずに標的細胞をエフェクター細胞とともにインキュベートした時のLDHアッセイにおける読み取り値に対応する；OD_{max}は、溶解した標的細胞の最大量に対応する。この読み取り値は、1% Triton X-100を標的細胞に添加して、抗体とともに、ただしエフ

50

エクター細胞は伴わずにインキュベートすることによって得た；OD_{min}は、標的細胞をエフェクター細胞および抗体を伴わずにアッセイ緩衝液中でインキュベートした際の、溶解した標的細胞の最小量に対応する。

【0404】

このアッセイの結果は、図18A～Dに示されている。

【0405】

図18Aに示されているように、SK-BR-3細胞(HER2 3+)において、v4248は、対照抗体v506と比較して、同程度の有効性および効力を示した。

【0406】

図18Bは、JIMT1(HER2が中程度)細胞において、v4248がADCCを媒介する能力を、対照抗体v506と比較して示している。この結果により、HER2中発現細胞において、bsAb v4248は、単一特異性二価抗HER2対照よりも高度のADCC有効性を媒介しうることが実証された。効力はbsAbと対照との間で同程度であった。

【0407】

図18Cに示されているように、SKOV3細胞において、例示的なbsAbであるv4248は、単一特異性二価抗HER2対照であるv506と比較して、同程度の効力を示したが(最大半値の細胞溶解率(%)を媒介する抗体濃度を表すEC50に基づく)、最大細胞溶解率(%)は大幅により高度であった(およそ1.6倍)。

【0408】

アフコシル化の効果について調べたところ、完全アフコシル化bsAb v7186は、図18Dに示されているように、MDA-MB-231においてハーセプチン(商標)よりも1.5倍の最大細胞溶解率を示し、このことから、この例示的なbsAbをアフコシル化抗体として作製することで、標的癌細胞に対するそのADCC有効性および効力をさらに強化しうることが実証された(EC50の9倍の改善によって認められるように)。

【0409】

以上をまとめると、これらの結果は、bsAbが、ADCC細胞溶解の最大レベルを、親である単一特異性二価抗体のものを上回って増加させることを実証している。この増加は、細胞結合(すなわち、B_{max}または細胞修飾)の増大と一致する。さらに、bsAbをアフコシル化形態として作製することで、ADCCなどのエフェクター媒介性機能の有効性および効力をさらに増加させることができる。このデータは、bsAbが腫瘍細胞を死滅させる上で有効性の強化を媒介しうることを実証している。

【0410】

実施例17：例示的な抗HER2-HER3 bsAbはインビトロでのHER2 3+ヒト乳房腫瘍細胞の増殖を阻害する

例示的な抗HER2-HER3 bsAbが、HER2 3+ヒト乳癌細胞株BT-474の増殖を阻害する能力を、以下の通りに評価した。これらのbsAbがヘレグリンの増殖刺激効果を中和する能力を判定するために、外因性ヘレグリンの添加について試験した。

【0411】

96ウェルプレートの各ウェルに細胞4000個を播種した。5nMヘレグリンの非存在下または存在下において、抗体を最終濃度が最大で300nMとなるように添加した(抗体による1時間のプレインキュベーションを行った)。実験は三重反復試験として行った。増殖培地の最終アッセイ体積は200μLとし、96ウェルプレートを37℃で6日間インキュベートした。培地をプレートから取り除き、50μLのPBSを各ウェルに添加した。続いて細胞生存度を、スルホローダミンBにより、製造元の指示に従って検出した。吸光度をプレートリーダーによって読み取り、非処理対照と対比した細胞増殖のパーセンテージを算出した。

$$\text{細胞増殖率(%)} = 100\% \times (\text{RLU}_{\text{試料}}) / (\text{RLU}_{\text{非処置}})$$

【0412】

図19は、ヘレグリンの非存在下(A)および存在下(B)における、ヒト乳癌細胞BT-474の生存度に対する例示的なbsAbおよび対照の効果を、非処理細胞と対比して示している。

【0413】

10

20

30

40

50

HER2とHER3は細胞刺激の原因となるコグネイト受容体ペアを形成することから、bsAbがこれらの受容体と望まれない様式で架橋して、増殖促進性のシグナル伝達カスケードをもたらす可能性がある。

【0414】

実際に、例示的なbsAbは、BT-474細胞の生存度に対して大きく異なる効果を示している。v880の場合には、細胞生存度の36%の増加が観察され、これは癌細胞増殖を阻害すると報告されているMM-111とは著しく対照的であった。それらは同じHER2結合ドメインおよびHER3結合ドメインを有することから、v880の増殖刺激は、細胞表面上でHER2とHER3を架橋させる、その独特な様式に起因する可能性が高い。一方、v880と同じHER3結合ドメインを有するv4248は、およそ5~17%という軽微な増殖阻害を示した。これもまた、BT-474細胞の増殖を顕著に阻害したその対応する単一特異性抗HER2対照(v506およびv1040)とは異なる。これらの結果は、抗HER2-HER3 bsAbが明確に異なる増殖阻害プロフィールを示すことを強く示すものである。

10

【0415】

bsAbが、ヘレグリンにより刺激される細胞増殖を中和する能力についても調べた。非処理対照において、ヘレグリンはBT-474増殖をおよそ38%誘発した。BT-474細胞を抗体で処理した場合にも、種々の用量反応プロフィールが観察された。bsAb v880はヘレグリンにより刺激される細胞増殖を中和せず、他の単一特異性対照抗体も同様であった。対照的に、v4248はヘレグリンの刺激効果を11%までに著しく中和した。上記の場合と同様に、bsAbがヘレグリンを中和する能力はその組成からは明らかでない。

20

【0416】

以上をまとめると、例示的な抗HER2-HER3 bsAbは、癌細胞増殖に対して種々の増殖阻害/誘発効果を有する。

【0417】

実施例18；例示的なbsAbは、ヒト癌細胞株において、対照に比してより高度の内部移行を示し、提示される表面受容体のレベルを変化させた

種々の癌細胞株におけるbsAb取り込みのレベルを決定するために、内部移行アッセイを行った。抗体をヒト腫瘍細胞BT-474、JIMT1およびSKOV3とともにインキュベートすることによって誘導される標的受容体のアップレギュレーションまたはダウングリュレーションと関係する可能性がある、細胞表面結合のレベルの変化についても評価した。

30

【0418】

実験は、AlexaFluor(登録商標)488タンパク質標識キット(Invitrogen、カタログ番号10235)を製造元の指示に従って用いてbsAbを直接標識することを伴う、Schmidt, M. et al., Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalence, and stability. Cancer Immunol Immunother (2008) 57:18 79-1890によって報告された方法を基にした。

【0419】

手短に述べると、12ウェルプレートに細胞 1×10^5 個/ウェルを播種し、37°C/5% CO₂にて一晩インキュベートした。その翌日に、DMEM+10% FBS中にある標識抗体を所望の最終濃度(例えば、200nM)で添加し、プレートを37°C/5% CO₂にて24時間インキュベートした。暗所で培地を吸引し、500 μLのPBSでウェルを2回洗浄した。細胞を採取するために、細胞解離溶液(Sigma)を37°Cで添加した(250 μL)。細胞をペレット化し、抗Alexa Fluor 488、50 μg/mLのウサギIgG画分(Molecular Probes, A11094, ロット1214711)を伴うかまたは伴わずに、100 μLのDMEM+10% FBS中に再懸濁させて、氷上で30分間インキュベートした。分析の前に、300 μLの細胞懸濁液を濾過し、4 μLのヨウ化プロピジウムを添加した。試料はLSRIIフローサイトメーターを用いて分析した。場合によっては、t₀を概算する目的で、内部移行が何ら意味のある速度では起こらないと考えられる4で同時に並行的な細胞結合実験を行った。

40

【0420】

各bsAbに関して、細胞のMFIをFACSによって測定した。内部移行は、4または37°Cのい

50

ずれかでインキュベートして、結合した標識抗体を、抗Alexa Fluor 488抗体によって消光させるか(Q)または消光させずに(U)、比較することによって決定した。初期受容体レベル(S_i)、最終受容体レベル(S_f)および内部移行した抗体の量(I)を、以下の通りに算出した。

$$\text{消光効率} = QE = 1 - (Q_4 / U_4)$$

$$\text{初期表面受容体レベル} = S_i = U_4$$

$$\text{最終表面受容体レベル} = S_f = (U_{37} - Q_{37}) / QE$$

$$\text{抗体内部移行 / 蓄積} = I = U_{37} - S_f$$

【0421】

結果は、図20A) BT-474 ; B) JIMT1 ; およびC) SKOV3に示されている。

10

【0422】

試験したヒト癌細胞株において、例示的なbsAbであるv4248は、その対応する単一特異性二価抗HER2対照抗体であるv506と比較して、内部移行の増加を示した。加えて、v4248は、37℃での24時間の時点では、大幅により高度の細胞表面修飾を示した。BT-474およびJIMT1において、このより高度の細胞修飾は、24時間のインキュベーション期間にわたっての修飾の増加、ならびにv506の修飾の減少の寄与によるものである。

20

【0423】

以上をまとめると、多くの例示的なbsAb抗体が、対照と比較して有意により高度の内部移行を呈し、これはおそらく、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)としてのbsAbの効力および/または有効性の増大を意味すると考えられる。時間経過に伴う細胞修飾の増加は、ADCCなどの異なる作用機序を介した死滅または阻害に向けて癌細胞を標的化する有効性がより高いことも意味すると考えられる。これらの結果はbsADCを選択するための手段を与えるものであり、それは単一特異性の比較相手よりも高度なレベルの内部移行、ならびに好都合な増殖阻害特性および増殖因子中和特性を必要とすると考えられる。

20

【0424】

実施例19：トラスツズマブ抵抗性ヒト乳癌細胞株における例示的なbsAbであるv4248の細胞染色および局在

標的受容体を発現するJIMT1細胞における例示的なbsAbの内部移行を描出し、標的腫瘍細胞内の抗体局在の詳細を明らかにするために、共焦点顕微鏡検査を行った。

30

【0425】

標的細胞を、無血清DMEM中で、37℃ + 5% CO₂にて所定の持続時間にわたって、200nMの抗体とともにインキュベートした。細胞を無菌の温かいPBS(500 μl / ウェル)で穏やかに2回洗浄し、250 μlの10%ホルマリン/PBS溶液により、室温で10分間かけて固定した。固定された細胞をPBS(500 μl / ウェル)で3回洗浄し、0.2% Triton X-100を含有する250 μl / ウェルのPBSによる透過処理を5分間行った上で、500 μl / ウェルのPBSで3回洗浄した。細胞を500 μl / ウェルのPBS + 5%ヤギ血清により、室温で1時間かけてブロックした。ブロック用緩衝液を除去して、300 μl / ウェルの二次抗体(Alexa Fluor 488結合Affin iPure Fab断片ヤギ抗ヒトIgG(H+L) ; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. ; 109-547-003)を添加し、室温で1時間インキュベートした。細胞を500 μl / ウェルのPBSで3回洗浄し、続いて、固定された細胞を含むカバーグラスを、Prolong gold褪色防止用封入剤をDAPI(Life Technologies ; #P36931)とともに用いてスライド上にマウントした。60倍の個々の画像を、Olympus FV1000共焦点顕微鏡を用いて取得した。

40

【0426】

結果は図21に示されている。

【0427】

例示的なbsAbであるv4248は、試験したすべてのインキュベーション時間(1時間、3時間および24時間)で、JIMT1に対する顕著な結合を示した。抗体シグナルは細胞表面膜上に存在し、細胞質中の拡散した存在も見られた。小斑点も観察され、これは3時間の時点で最も顕著に認められた。対照的に、単一特異性二価抗HER2抗体対照であるv506は相対的に小さい膜シグナルを示したが、小斑点および細胞質中の拡散した存在は、初期である1

50

時間および3時間の時点において同じく顕著であった。24時間のインキュベーション後にはわずかなシグナルしか検出されなかった。

【0428】

これらの結果は、細胞における表面および内部での抗体の局在の増加がみられた、実施例18に記載された別の検出方法によるものとかなり一致している。複数の代替的なアッセイにおいて、例示的な分子により、癌細胞への細胞内部移行が実証された。

【0429】

実施例20：例示的なbsADCであるv6362は、ヒト腫瘍癌細胞の増殖を阻害する

bsADC v6362を用いるインビトロ増殖阻害アッセイを、癌細胞株SKOV3、JIMT1およびMDA-MB-231の死滅または増殖阻害におけるその効力および有効性を判定するために行った。
実施例17に記載された増殖阻害アッセイに関するものと同じ様式で、細胞を処理し、細胞生存度測定を行った。

10

【0430】

結果は、図22A（SKOV3細胞）、図22B（JIMT1細胞）および図22C（MDA-MB-231細胞）に示されている。

【0431】

SKOV3細胞およびJIMT1細胞において、bsADC v6362は、単一特異性二価対照ADCであるv6246とは区別不能であるように認められ、非特異的対照ADC v6249との比較では効力の有意な改善を呈した。MDA-MB-231細胞においては、bsADC v6362およびADC v6246の両方が、非特異的対照ADC v6249にかなり近い、同程度に弱い効力を示した。

20

【0432】

これらの結果は、v6362に活性があることを裏づけており、これはこのbsAbが内部移行を受けるという事実に一致する。さらに、v6362とv6246との類似性は、受容体のヘテロ二量体化が導かれる、ヘレグリンの非存在下で行われるアッセイ条件とも合致する。bsADC v6362は、外因性ヘレグリンの存在下では効力の強化を示し、v6246とは区別されると予想される。

【0433】

実施例21：bsADCによるHER2 3+ヒト乳癌細胞の増殖阻害は、細胞を外因性増殖因子によって刺激した場合にも低下しない

外因性増殖因子による刺激下で、ある種のヒト癌細胞はADCによる治療に対してより抵抗性になることがあり、これはインビトロでヘレグリンによって外因性に刺激したBT-474細胞でも同様である（Lewis Phillips et al, Clin Cancer Res 2014; 20: 456）。HER2 3+ヒト乳癌細胞BT-474における例示的なbsADCであるv6362の増殖阻害特性を、増殖因子の存在下および非存在下において評価した。

30

【0434】

増殖阻害アッセイは、実施例17に記載された通りに行った。手短に述べると、細胞を、増殖因子の非存在下または10nM EGFもしくは15nMヘレグリンの存在下において、さまざまな濃度のbsADCとともに5日間インキュベートした。

【0435】

図23は、外因性増殖因子の非存在下またはEGFもしくはヘレグリンの存在下における例示的なbsADCの用量反応を示している。

40

【0436】

BT-474において、bsADC v6362による増殖阻害の効力および有効性は、EGFまたはヘレグリンのいずれの添加によっても低下しなかった。このことは、BT-474においてヘレグリンの増殖刺激効果を中和する、対応するコンジュゲートされていないbsAb v4248の能力に一致する。

【0437】

これらの結果は、例示的なbsAbによる増殖阻害の効力および有効性が外因性増殖因子による刺激によって影響されないことを実証している。

【0438】

50

実施例22：例示的なbsAbおよびbsADCは、インビトロでのHER2 3+ヒト胃癌細胞の、ヘレグリンにより刺激される増殖を中和した

例示的な抗HER2-HER3 bsAbおよびbsADCが、HER2 3+ヒト胃細胞株に対する外因性ヘレグリンによる増殖誘発を中和する能力を、以下の通りに評価した。

【0439】

増殖阻害アッセイは、上記のものと同様に行った。NCI-N87細胞を、96ウェルプレート上に5000個／ウェルでプレーティングした。細胞をまず、1% BSAを含有する無血清培地中で6時間インキュベートし、続いて抗体を最終濃度100nMで添加し、15分間インキュベートした後に、5nMのヘレグリンを添加した。実験は三重反復試験として行った。96ウェルプレートを37℃で5日間インキュベートした。細胞生存度は、PrestoBlueを製造元の指示に従って用いることによって評価した。

10

【0440】

図24は、5nMヘレグリンの存在下における、例示的なbsAbであるv4248およびbsADCであるv6362の、HER2 3+胃癌細胞株NCI-N87における増殖阻害特性を示している。

【0441】

NCI-N87細胞は、5nMヘレグリンによって刺激した場合、細胞生存度の73%の増加を示した。この増殖刺激効果は抗HER2-HER3対照bsAb v1087によって中和され、ヘレグリン刺激効果は細胞生存度の56%の増加へと抑制された。単一特異性抗HER2対照であるv506は単独では細胞生存度を29%阻害し、これをv1087と併用した場合にもさらなる増殖阻害効果は示されなかった。一方、例示的なbsAbであるv4248もヘレグリンの増殖刺激効果を中和し、細胞生存度の誘発は19%に低下した。さらに、対応するbsADCであるv6362は、非処理ヘレグリン非含有対照と比較してさらに細胞生存度を70%阻害し、またはヘレグリンで刺激した非処理対照との比較では83%阻害した。

20

【0442】

これらの結果は、例示的なbsAbおよびbsADCが、ヘレグリンの増殖刺激効果を中和して、HER2 3+ 胃癌細胞NCI-N87などの種々のヒト癌細胞株の増殖を阻害しうることを実証している。このヘレグリン中和効果は対照抗HER2-HER3 bsAbによるものとはかなり異なっており、これはおそらく結合幾何形状およびエピトープの違いによると考えられる。

【0443】

実施例23：インビトロでのbsAbのヒト心筋細胞毒性アッセイ

30

臨床的には、トラスツズマブ治療に伴って症例の2~7%で心機能不全がみられる。心筋症のリスクは、治療を、単独でも心毒性があるドキソルビシンなどのアントラサイクリン化学療法と併用した場合に増大する。このため、同じくHER2を標的とするbsAbによって引き起こされる、より有害な恐れのある毒性作用を同定するために、心筋細胞に対する増殖阻害アッセイを行った。

【0444】

アッセイは、既に記載した増殖阻害アッセイのものに類似した様式で、iCell（商標）(CellularDynamics)において行った。手短に述べると、細胞を96ウェルプレートに20,000個／ウェルで播種し、48時間にわたり維持した。続いて細胞培地を維持培地と交換し、72時間にわたり維持した。細胞を、1μMドキソルビシンの存在下または非存在下において、100nMの例示的な変異体によって72時間処理した。細胞生存度は、AlamarBlueまたはスルホローダミンBを製造元の指示に従って用いて評価した。

40

【0445】

結果は図25に示されている。

【0446】

ドキソルビシンの非存在下では、例示的なbsAbであるv4248はiCells（商標）の生存度に対して有意な影響を及ぼさず、単一特異性対照抗体も同様であった。v1040に関するAlamarBlue（商標）アッセイにおけるiCell（商標）生存度の見かけの増加は、他の反復試験では観察されなかつたことに留意されたい（データは提示せず）。1μMドキソルビシンの存在下では、一般にiCell（商標）生存度のわずかな低下が見られ、これはスルホローダ

50

ミンB法における方が、AlamarBlue（商標）検出法（およそ10～15%）におけるよりも明らかであるように思われた。しかし、ドキソルビシンの存在下または非存在下におけるbsAb処理後のiCell（商標）生存度は、単一特異性対照抗体のものと有意差がなかった。

【0447】

例示的なbsAbであるv4248は、対照v506およびv1040と類似のプロフィールを示した。これらの結果は、試験したbsAbが、親単一特異性二価抗体および一価抗体と同等な毒性プロフィールを示すことを実証している。

【0448】

実施例24：トラスツズマブ抵抗性炎症性乳癌（T226）ヒト患者由来異種移植モデルにおける、抗Her2および抗Her3二重特異性抗体薬物コンジュゲート（bsADC）の抗腫瘍活性

10

このインビオ実験は、bsADCの腫瘍増殖阻害有効性を単一特異性抗体対照と比較して判定することを目的とした。トラスツズマブおよび化学療法に抵抗性のT226異種移植モデルを、炎症性表現型を有するHER2³⁺、HER3⁺、HRG⁺、EGFR⁺原発性乳癌から導き出して、例示的な抗HER2-HER3 bsADCの抗腫瘍有効性を評価するために用いた。

【0449】

雌性無胸腺ヌードマウスに対して、20mm³の腫瘍断片を皮下に挿入することによって腫瘍を接種した。腫瘍を、それらが平均体積100mm³に達するまでモニターした；続いて、動物を4つの治療群に無作為割り付けした：IgG対照（n=14）、v506；n=13、v6246；n=16、v6362；n=16。各群に対する投薬は以下の通りとした。

20

【0450】

A) IgG対照（v6908）について、試験第1日に15mg / kgの負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15、18、22および25日に10mg / kgの維持量を投与した。

【0451】

B) v506について、試験第1日に15mg / kgの負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15、18、22および25日に10mg / kgの維持量を投与した。

【0452】

C) v6246について、試験第1日および15日に5mg / kgを静脈内投与した。

【0453】

D) v6362について、試験第1日および15日に5mg / kgを静脈内投与した。

30

【0454】

実験期間中は週2回ずつ動物個体の体重を測定した。腫瘍体積は、治療期間中は週2回、経過観察期間中は週1回ずつ、キャリパーを用いて腫瘍直径を測定することによって評価した。式TV (mm³) = [長さ (mm) × 幅 (mm)²] / 2を用い、ここで長さおよび幅はそれぞれ、腫瘍の最長径および最短径である。

【0455】

この試験の結果を図26および27に示している。図26は、T226 PDXモデルにおける、例示的なbsAbによる腫瘍増殖の阻害を示している。図27は、腫瘍体積2000mm³を代用終了エンドポイントとして用いた、T226 PDXモデルにおけるマウスの生存性プロットを示している。

40

【0456】

v6362およびv6246は、v506およびIgG対照と比較して、より優れた腫瘍増殖阻害を明らかに示した。v6362は、トラスツズマブ抵抗性T226ヒト乳癌異種移植モデルにおいて、単一特異性抗HER2 v6246と比較して、より優れた腫瘍増殖阻害を誘導した（図26および表4）。

【0457】

v6362およびv6246は、v506およびIgG対照と比較して生存期間を延長させた。例示的なv6362は、v6246と比較して、より優れた生存性を誘導した。加えて、v6362では、著効（ベースラインよりも10%を上回る低下）を示す腫瘍の数の増加も伴ってみられ、それぞれ6個および1個であった（図27および表6）。2,000mm³を上回る腫瘍体積を代用生存エンドポイントとした。

50

【0458】

ベースラインに比しての体重の有意な減少は、v6246またはv6362のいずれの投薬後にも観察されなかった。

【0459】

以上をまとめると、この試験により、異種移植モデルにおけるbsADCの、類縁の単一特異性二価抗体薬物コンジュゲートと比較しての、より優れた腫瘍増殖阻害有効性が実証された。bsADCの投与はまた、代用測定値としての腫瘍体積エンドポイントカットオフに基づく、より優れた生存性も導いた。T226におけるbsADCの抗腫瘍有効性により、炎症性乳癌および／またはHER2+、HER3+、HRG+、EGFR+癌の治療における臨床的有用性の見込みがあることが示唆される。

10

【0460】

(表4) T226 PDXモデルにおける、腫瘍増殖阻害に関する第31日の統計値

第31日 トラスツズマブ報告の最終日	IgG (n=14)	v506 (n=13)	v6246 (n=16)	v6362 (n=16)
平均TV (mm ³) (ベースラインからの 変化率(%))	1797 (+1728%)	1611 (+1573)	422 (+332%)	216 (+122%)
% TGI (対 hIgG)	0%	11%	77%	88%
著効 (ベースラインよりも 10%を上回る退縮)	0/13	0/14	1/16	6/16
平均血清中濃度(μg/ml) (第7日)	na	128	15.26	39.5

20

TV：腫瘍体積

【0461】

(表5) T226 PDXモデルにおける、腫瘍増殖阻害に関する第58日の統計値

30

第58日 T-DM1報告の最終日	V6246	V6362
平均TV(mm ³) (ベースラインからの 変化率(%))	1679 (1616%)	897 (+1167%)
% TGI (対 v6246)	0%	47%
生存期間中央値 (日)	56.5	未決定

40

TV：腫瘍体積

【0462】

実施例25：HER2抗体抵抗性を獲得したT226 PDXモデルにおける、抗Her2および抗Her3二重特異性抗体薬物コンジュゲート(bsADC)の抗腫瘍活性

このインビボ実験は、抗HER2抵抗性を獲得したモデルにおけるbsADCの腫瘍増殖阻害有効性を判定することを目的とした。トラスツズマブおよび化学療法に抵抗性のT226異種移植モデルを、炎症性表現型を有するHER2³⁺、HER3⁺、HRG⁺、EGFR原発性乳癌から導き出して、例示的な抗HER2-HER3 bsADCの抗腫瘍有効性を評価するために用いた。

50

【0463】

雌性無胸腺ヌードマウスに対して、 20mm^3 の腫瘍断片を皮下に挿入することによって腫瘍を接種した。腫瘍を、それらが平均体積 100mm^3 に達するまでモニターした；続いて、動物を3つの治療群に無作為割り付けした：IgG対照（n = 14）、v506；n = 13、および抗HER2 mAb抵抗性獲得群。各群に対する投薬は以下の通りとした。

【0464】

A) IgG対照（v6908）について、試験第1日に $15\text{mg} / \text{kg}$ の負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15、18、22および25日に $10\text{mg} / \text{kg}$ の維持量を投与した。

【0465】

B) v506について、試験第1日に $15\text{mg} / \text{kg}$ の負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15、18、22および25日に $10\text{mg} / \text{kg}$ の維持量を投与した。

【0466】

C) HER2切り替え群に対しては、第1日に抗HER2療法を $15\text{mg} / \text{kg}$ の負荷量で静脈内投与し、第4、8、11および15日に $10\text{mg} / \text{kg}$ の維持量を投与した。腫瘍が治療法に対して反応しなくなった場合に、動物に対して第20、34、41、48および55日に用量 $10\text{mg} / \text{kg}$ のv6362を投与し、試験第27日に用量 $5\text{mg} / \text{kg}$ を投与した。

【0467】

実験期間中は週2回ずつ動物個体の体重を測定した。腫瘍体積は、治療期間中は週2回、経過観察期間中は週1回ずつ、キャリパーを用いて腫瘍直径を測定することによって評価した。式 $\text{TV} (\text{mm}^3) = [\text{長さ} (\text{mm}) \times \text{幅} (\text{mm})^2] / 2$ を用い、ここで長さおよび幅はそれぞれ、腫瘍の最長径および最短径である。

【0468】

この試験の結果を図28に示している。図28は、初期の抗HER2治療に反応しなかった動物群から切り替えたT226 PDXモデルにおける、例示的なbsAbによる腫瘍増殖の退縮を示している。

【0469】

v6362は、抗HER2療法に反応しなかった動物に投薬した場合に（投薬切り替え）、腫瘍退縮を明らかに示した。試験第62日の時点で、v6362を投与された群では、腫瘍体積が切り替え日から62%退縮し、一方、IgG対照またはv506を投与された動物は急速に進行し、第35日までに終了とした（図28）。

【0470】

以上をまとめると、この試験により、腫瘍がより初期の治療に反応せず、増殖が顕著に進行した場合に、bsADCが腫瘍退縮を引き起こしうることが実証された。T226におけるbsADCの抗腫瘍有効性により、従来の抗HER2抗体に反応しない、進行した炎症性乳癌および/またはHER2+、HER3+、HRG+、EGFR+癌の治療における臨床的有用性の見込みがあることが示唆される。

【0471】

（表6）抗HER2抵抗性を獲得したT226 PDXモデルにおける腫瘍退縮に関する統計値

	aHER2 - 第1日	aHER2 - 第20日	v6362 - 第62日
平均 TV (mm ³)	96	768	290
第1日のベースラインからの変化率(%)	+0%	+697%	+202%
第20日のベースラインからの変化率(%)	na	+0%	-62%

TV：腫瘍体積

【0472】

実施例26：浸潤性乳管癌（HBCx-13b）患者由来の異種移植モデルにおける、抗Her2および

10

20

30

40

50

抗Her3二重特異性抗体薬物コンジュゲート（bsADC）の抗腫瘍活性

このインビオ実験は、bsADCの腫瘍増殖阻害有効性を、単一特異性抗体対照と比較して判定することを目的とした。トラスツズマブおよび化学療法に抵抗性のHBCx-13b異種移植モデルを、浸潤性乳管癌のHER2³⁺、HER3+、HRG+転移性病変から導き出して、v6362の抗腫瘍有効性を評価するために用いた。

【0473】

雌性無胸腺ヌードマウスに対して、20mm³の腫瘍断片を皮下に挿入することによって腫瘍を接種した。腫瘍を、それらが平均体積100mm³に達するまでモニターした；続いて、動物を3つの治療群に無作為割り付けした：v506；n=7、v6246；n=7およびv6362；n=6。各群に対する投薬は以下の通りとした。

10

【0474】

A) v506について、試験第1日に15mg / kgの負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15、18、22および25日に10mg / kgの維持量を投与した。

【0475】

B) v6246について、試験第1日に10mg / kgの負荷量を静脈内投与し、試験第22日に5mg / kgの維持量を投与した。

【0476】

C) v6362について、試験第1日に10mg / kgの負荷量を静脈内投与し、試験第22日に5mg / kgの維持量を投与した。

20

【0477】

実験期間中は週2回ずつ動物個体の体重を測定した。腫瘍体積は、治療期間中は週2回、経過観察期間中は週1回ずつ、キャリパーを用いて腫瘍直径を測定することによって評価した。式TV (mm³) = [長さ (mm) × 幅 (mm)²] / 2を用い、ここで長さおよび幅はそれぞれ、腫瘍の最長径および最短径である。

【0478】

結果は図29に示されている。

【0479】

v6362およびv6246は、v506と比較して、より優れた腫瘍増殖阻害を明らかに示した。v6362は、抗v6246と比較して、より優れた腫瘍増殖阻害を誘導した。加えて、v6362では、著効（ベースラインよりも10%を上回る低下）を示す腫瘍の数の増加も伴ってみられ、試験終了時にそれぞれ4個および2個であった（図29および表7）。

30

【0480】

ベースラインに比しての体重の有意な減少は、v6246またはv6362のいずれの投薬後にも観察されなかった。

【0481】

以上をまとめると、この試験により、異種移植モデルにおけるbsADCの、類縁の単一特異性二価抗体薬物コンジュゲートと比較しての、より優れた腫瘍増殖阻害有効性が実証された。HBCx-13bにおけるbsADCの抗腫瘍有効性により、転移性浸潤性乳管癌および/またはHER2³⁺、HER3+、HRG+癌の治療における臨床的有用性の見込みがあることが示唆される。

40

【0482】

（表7）HBCx-13b PDXモデルにおける腫瘍増殖阻害に関する統計値：

第65日	v506 (n=7)	v6246 (n=7)	v6362 (n=6)
平均TV (mm ³) (ベースラインからの変化率(%))	1591 (+1449%)	538 (+419%)	224 (+112%)
% TGI	0%	77%	86%
著効 (ベースラインよりも10%を上回る退縮)	0	2/7	4/6

TV : 腫瘍体積

10

【 0 4 8 3 】

実施例27：悪液質を伴う乳癌 (HBCx-5) 患者由来の異種移植モデルにおける、抗Her2および抗Her3二重特異性抗体薬物コンジュゲート (bsADC) の抗腫瘍活性

このインビオ実験は、bsADCの腫瘍増殖阻害有効性を、単一特異性抗体対照と比較して判定することを目的とした。トラスツズマブおよび化学療法に抵抗性のHBCx-5異種移植モデルを、悪液質を伴うHER2³⁺、HER3⁺乳癌から導き出して、v6362の抗腫瘍有効性を評価するために用いた。

【 0 4 8 4 】

雌性無胸腺ヌードマウスに対して、20mm³の腫瘍断片を皮下に挿入することによって腫瘍を接種した。腫瘍を、それらが平均体積100mm³に達するまでモニターした；続いて、動物を3つの治療群に無作為割り付けした：IgG対照、n = 4；v506、n = 5；およびv6362；n = 7。各群に対する投薬は以下の通りとした。

20

【 0 4 8 5 】

IgG対照について、試験第1日に15mg / kgの負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15、18、22および25日に10mg / kgの維持量を投与した。

【 0 4 8 6 】

v506について、試験第1日に15mg / kgの負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15、18、22および25日に10mg / kgの維持量を投与した。

25

【 0 4 8 7 】

v6362について、試験第1日に10mg / kgを静脈内投与し、試験第15、22、29、36日を10mg / kgを投与した（半分は静脈内、半分は腹腔内に）。

30

【 0 4 8 8 】

実験期間中は週2回ずつ動物個体の体重を測定した。腫瘍体積は、治療期間中は週2回、経過観察期間中は週1回ずつ、キャリバーを用いて腫瘍直径を測定することによって評価した。式TV (mm³) = [長さ (mm) × 幅 (mm)²] / 2を用い、ここで長さおよび幅はそれぞれ、腫瘍の最長径および最短径である。

【 0 4 8 9 】

結果は図30および表8に示されている。

【 0 4 9 0 】

v6362は、IgG対照およびv506と比較して、より優れた腫瘍増殖阻害を明らかに示した。加えて、v6362では、v506と比較して、反応（対照の50%未満の腫瘍体積）を示す腫瘍の数の増加も伴ってみられ、試験第43日の時点でそれぞれ1個および6個であった（図30および表8）。

40

【 0 4 9 1 】

ベースラインに比しての体重の有意な減少は、v6362の投薬後には観察されなかった。

【 0 4 9 2 】

以上をまとめると、この試験により、異種移植モデルにおけるbsADCの、標準治療と比較しての、より優れた腫瘍増殖阻害有効性が実証された。HBCx-5におけるbsADCの抗腫瘍有効性により、悪液質を伴うHER2³⁺およびHER3⁺乳癌の治療における臨床的有用性の見込みがあることが示唆される。

50

【0493】

(表8) HBCx-5モデルにおける抗腫瘍活性

第43日	IgG	v6246	v6362
平均TV (mm ³) (ベースラインからの変化率(%))	922 (+585%)	815 (+531%)	235 (+73%)
% TGI	0%	12%	74%
レスポンダー (TVが対照の50%未満)	0/4	1/5	6/7
体重 - ベースラインからの変化率(%)	0%	+1%	+4%

TV：腫瘍体積

【0494】

実施例28：HER2抗体抵抗性を獲得したHBCx-13b PDXモデルにおける、抗Her2および抗Her3二重特異性抗体薬物コンジュゲート（bsADC）の抗腫瘍活性

このインビオ実験は、v6246に対する抵抗性を獲得したモデルにおけるbsADCの腫瘍増殖阻害有効性を判定することを目的とした。トラスツズマブおよび化学療法に抵抗性のHBCx-13b異種移植モデルを、浸潤性乳管癌のHER2³⁺、HER3⁺転移性病変から導き出して、v6362の抗腫瘍有効性を評価するために用いた。

【0495】

雌性無胸腺ヌードマウスに対して、20mm³の腫瘍断片を皮下に挿入することによって腫瘍を接種した。腫瘍を、それらが平均体積100mm³に達するまでモニターした；続いて、動物を2つの治療群に無作為割り付けした：IgG対照、n = 8；およびv6246、n = 10。後者は後にv6362に切り替えた。各群に対する投薬は以下の通りとした。

【0496】

IgG対照について、4週間にわたり週2回ずつ10mg / kgの用量を静脈内投与した。

【0497】

v6246について、試験第1日および第15日に1mg / kgの用量を静脈内投与した。

【0498】

続いて、v6246群をv6362に切り替えて、試験第29日および第43日に用量10mg / kgを投与した。

【0499】

実験期間中は週2回ずつ動物個体の体重を測定した。腫瘍体積は、治療期間中は週2回、経過観察期間中は週1回ずつ、キャリパーを用いて腫瘍直径を測定することによって評価した。式TV (mm³) = [長さ (mm) × 幅 (mm)²] / 2を用い、ここで長さおよび幅はそれぞれ、腫瘍の最長径および最短径である。

【0500】

結果は図31および表9に示されている。

【0501】

v6362は、v6246療法に反応しなかった動物に投薬した場合に（投薬切り替え）、腫瘍退縮を明らかに示した。試験第53日の時点で、v6362を投与された群では、腫瘍体積が切り替え日から9%退縮し、一方、IgG対照を投与された動物は急速に進行し、第43日までに終了とした（図31および表9）。

【0502】

以上をまとめると、この試験により、腫瘍がより初期の治療に反応せず、増殖が顕著に進行した場合に、bsADCが腫瘍退縮を引き起こしうることが実証された。HBCx-13bモデルにおけるbsADCの抗腫瘍有効性により、v6246に反応しない転移性浸潤性乳管癌の治療における臨床的有用性の見込みがあることが示唆される。

【0503】

10

20

30

40

50

(表9) HBCx-13bモデルにおける抗腫瘍活性

	V6246 第1日	V6246 第29日	V6362 第53日
平均TV(mm ³)	162	884	800
第1日のベースライン からの変化率(%)	+0%	+445%	+393%
第29日のベースライン からの変化率(%)	na	+0%	-9%

TV：腫瘍体積

【0504】

実施例29：T-DM1と比較した、抗HER2および抗HER3二重特異性抗体薬物コンジュゲート(b-sADC)のより優れた血小板数

このインビオ実験は、MDA-MB-231皮下腫瘍を保有する動物における血液循環中血小板数に対するv6362の効果を判定することを目的とした。

【0505】

トラスツズマブおよび化学療法に抵抗性のMDA-MB-231異種移植モデルを、トリプルネガティブ乳癌株(HER2⁰⁺、ER⁻、PR⁻)から導き出した。

【0506】

雌性無胸腺ヌードマウスに対して、MDA-MB-231細胞の懸濁液を右側腹部に皮下接種した。腫瘍を、それらが平均体積115mm³に達するまでモニターした；続いて、動物を3つの治療群に無作為割り付けした：IgG対照、n=12；v6246、n=12；およびv6362、n=12。各群に対する投薬は以下の通りとした。

【0507】

IgG対照について、試験第1日に15mg/kgの負荷量を静脈内投与し、試験第4、8、11、15日に10mg/kgの維持量を投与した。

【0508】

v6246について、試験第1、8および15日に10mg/kgを静脈内投与した。

【0509】

v6363について、試験第1、8および15日に10mg/kgを静脈内投与した。

【0510】

血小板定量のためには、第17日にすべての動物から血液0.25mlを採取して、K₂EDTAチューブに入れた。標準的な臨床的血液プロフィールを検査するまで血液を4℃に維持した。

【0511】

結果は図32および表10に示されている。

【0512】

v6362は血液循環中血小板数の有意な減少を示さず、一方、v6246は有意な減少を明らかに示した(図32)。v6246およびv6362の平均血清中濃度は、試験第7日の時点で等しかった(表10)。

【0513】

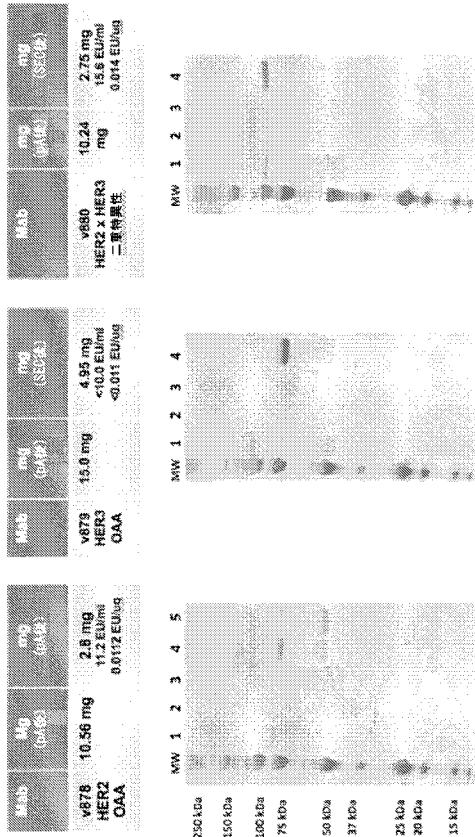
(表10) MDA-MB-231皮下腫瘍を保有する動物における血液循環中血小板数に対するv6362およびv6246の効果

		v6246	v6362
薬物曝露 (第7日)	平均血清中濃度 (μg/ml)	15	14

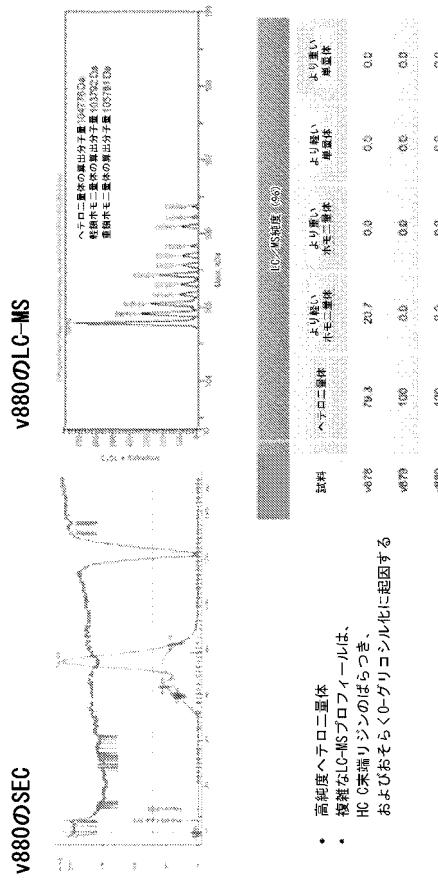
【0514】

以上をまとめると、この試験により、v6362がv6246と比較して血小板毒性を低下させうる可能性が実証された。

【図1】

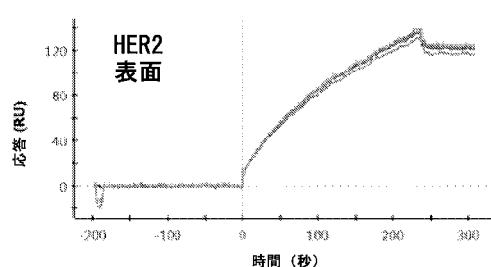


【図2】



【図3】

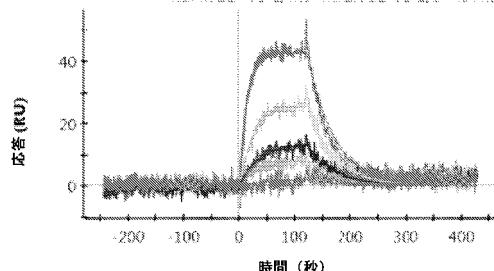
A v880はHER2表面と結合する



B



HER2が結合したv880に対するHER3結合

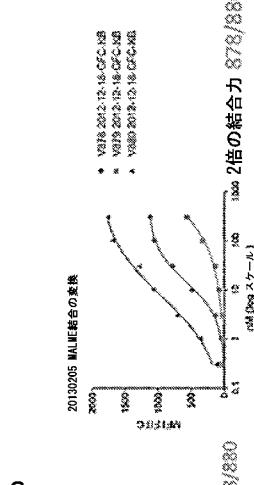


【図5】

A HER2=50K
HER3=50K

20130205 MAIE結合の変換

v878 - HER2 OAA
v879 - HER3 OAA
v880 - HER2xHER3 bsAb

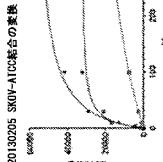


C

HER2=1M
HER3=15K

20130205 SKOV-AIC結合の変換

SKOV-AIC結合の変換



D

20130205 MAIE結合の変換

v878 2012-12-18-CFC-XB

v879 2012-12-18-CFC-XB

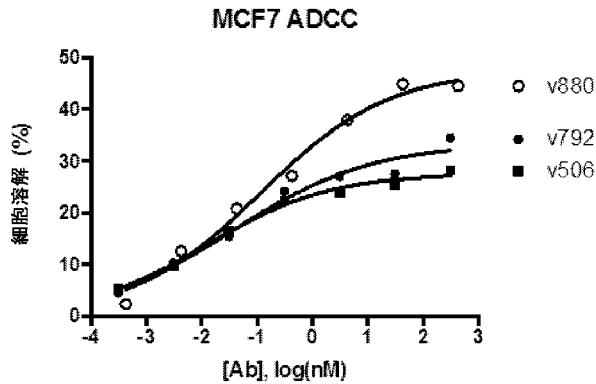
v880 2012-12-18-CFC-XB

結合力の増加なし

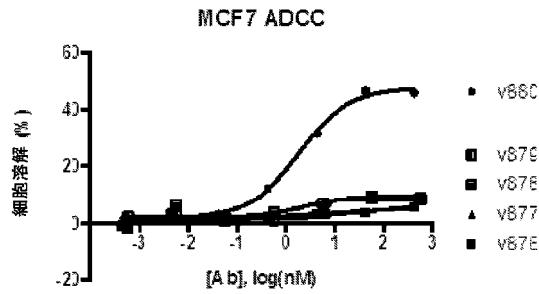
v878/v880

100倍

【図7】



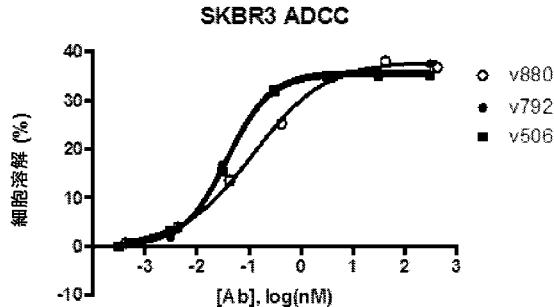
【図8】



	v792	v506	v880
範囲(溶解率%)	33.5	27.63	47.71
範囲 95%信頼区間	24.49 ~ 42.50	21.69 ~ 33.57	39.82 ~ 55.60
EC50 (nM)	0.03878	0.01262	0.1168
EC50 95%信頼区間	0.01166 ~ 0.1290	0.003385 ~ 0.04704	0.04414 ~ 0.3091

	v880	v876	v877	v878	v879
範囲(溶解率%)	45.85	約7.879	9.179	7.373	6.509
範囲 95%信頼区間	40.61 ~ 51.10	n/a	-73.75 ~ 92.11	3.179 ~ 11.57	3.249 ~ 9.769
EC50 (nM)	1.87	19.08	275.6	2.291	約6.792
EC50 95%信頼区間	1.140 ~ 3.067	0.0 ~ 4.314e+018	0.0 ~ 1.690e+024	0.1934 ~ 27.14	(極めて広範囲)

【図9】



【図10】

名前	変異体の名前	クローニングの名前	説明
Hs651	Hs651	CL #144	がんクローナルヒトHs651
Big51 : D61	CL #249	NA	がんクローナルヒトBig51 D61
Fak1 : Fak1	CL #647	NA	がんクローナルヒトFak1
EsAra-HET	CL #22	CL #1011	CL #22
EsAra-HET1	CL #246	NA	がん細胞由来のリクザイドのトランズフェクション
EsAra-HET1	CL #144	CL #4553	CL #144551
EsAra-HET1	CL #144	CL #4550	アフリカのトランズフェクション
Ok1 : ok1	CL #108	CL #4553	CL #45501
Ok1 : ok1	CL #184	CL #3652	アフリカのヒト-アフロラテンスマッシュ
Ok1 : ok1	CL #182	CL #3652	アフリカのヒト-アフロラテンスマッシュ
Ok1 : ok1	CL #677	CL #1056	アフリカのヒト-アフロラテンスマッシュ
Ok1 : ok1	CL #679	CL #1059	アフリカのヒト-アフロラテンスマッシュ
B1D-H3	CL #860	CL #1070	抗HER2-HER3 抗体
MM111	CL #187	CL #1102	抗HER2-HER3 抗体
trans-H3	CL #243	CL #1031	CL #1071
trans-H3 : Jhu5	CL #195	CL #1011	CL #1071
trans-H3 : DM1	CL #362	NA	CL #4551
trans-H3 : SS190T	CL #918	CL #4371	CL #4554
trans-H3 : SS190T	CL #920	CL #4371	CL #4546
trans-H3 : SS190T	CL #921	CL #6577	CL #4244
trans-H3 : SS190T	CL #922	CL #6577	CL #6250
trans-H3 : SS190T	CL #923	CL #6577	CL #57474
trans-H3 : SS190T	CL #923	CL #6577	CL #57475
xCL	CL #923	CL #6577	CL #57475

【図 1 1】

A)

変異体	DNA比: HC-A/HC-B/LC	プロテインA 後の濃度 (mg/ml)	プロテインA 後の量 (mg)	SEC後の濃度 (mg/ml)	SEC後の量 (mg)
4248	30%/30%/40%	1.1	4.4	0.8	0.4
4248	20%/40%/40%	0.76	3	0.84	0.378
4248	40%/20%/40%	1.13	4.52	0.62	0.234

B)

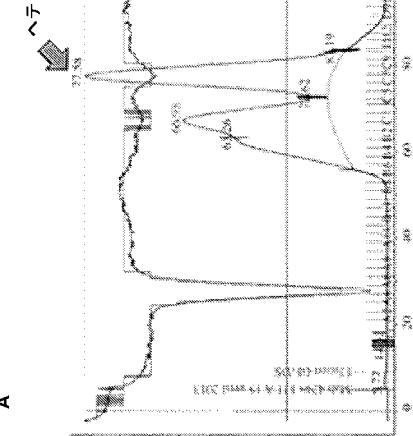
変異体	DNA比: HC-A/HC-B/LC	上清における 力値 (mg/L)
v9918	40:20:40	3.7
v9918	30:30:40	2.28
v9918	20:40:40	1.36
v9919	40:20:40	4.33
v9919	30:30:40	2.3
v9919	20:40:40	1.71
v9920	40:20:40	21.13
v9920	30:30:40	19.32
v9920	20:40:40	14.36
v9921	40:20:40	24.14
v9921	30:30:40	23.76
v9921	20:40:40	16.74
v9922	40:20:40	15
v9922	30:30:40	17.4
v9922	20:40:40	17.66
v9923	40:20:40	16.31
v9923	30:30:40	16.38
v9923	20:40:40	12.81

【図 1 2】

B

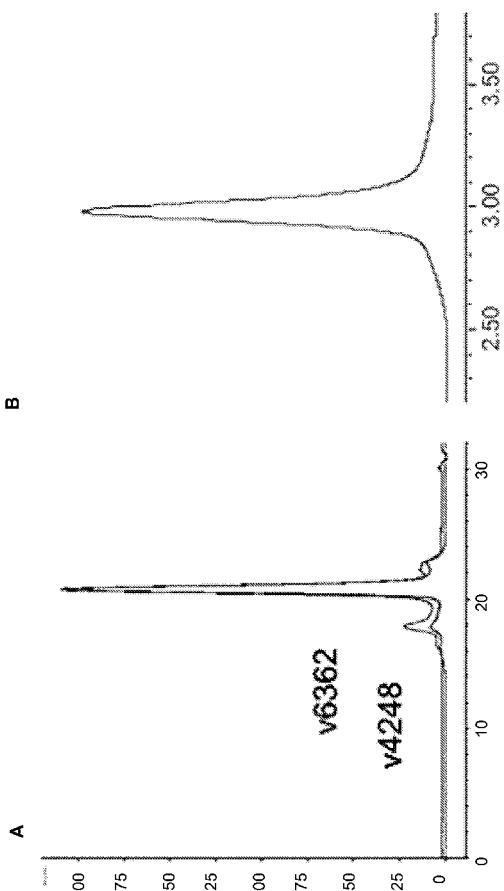


ヘテロ二量体

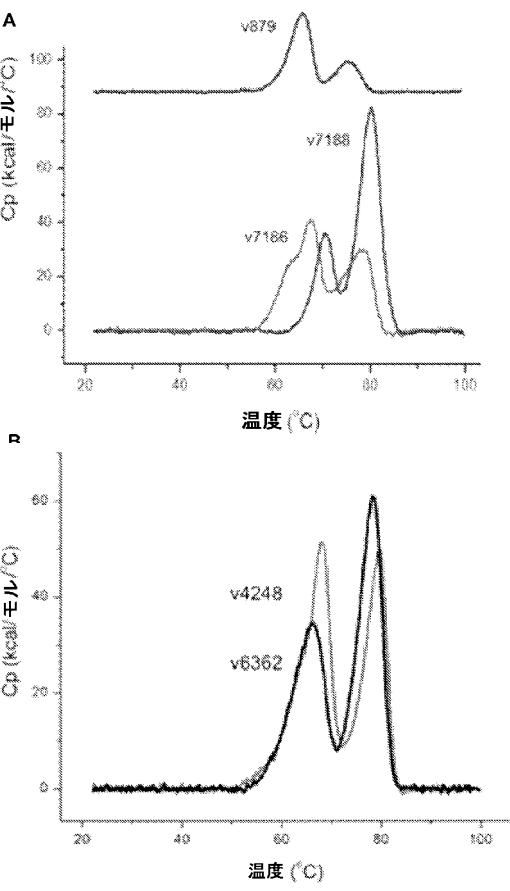


A

【図 1 3】

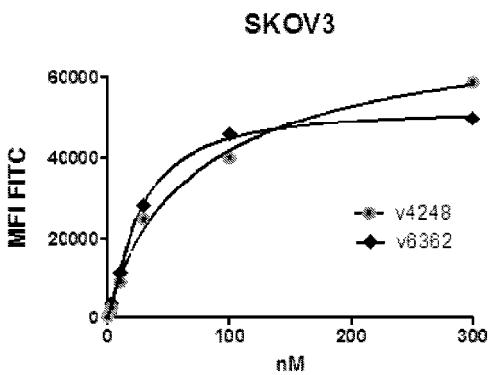


【図 1 4】

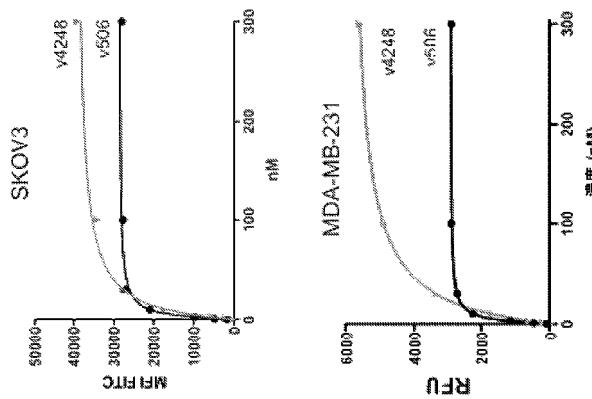


【図15】

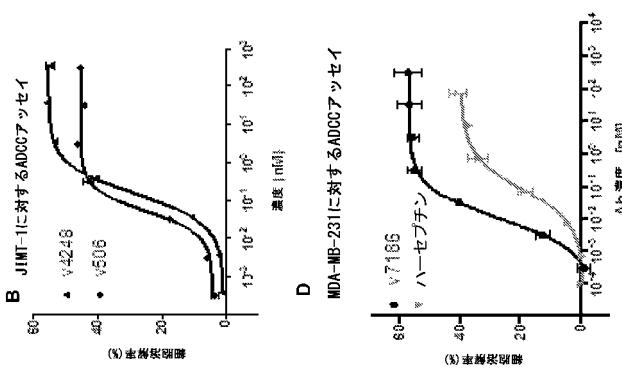
【 図 1 7 】



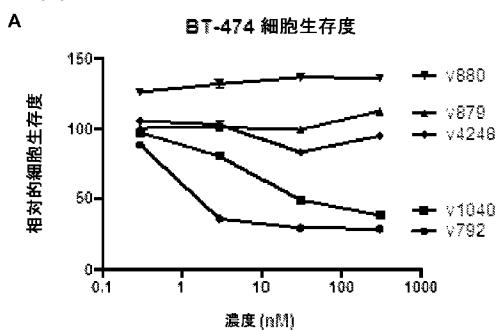
【 図 1 6 】



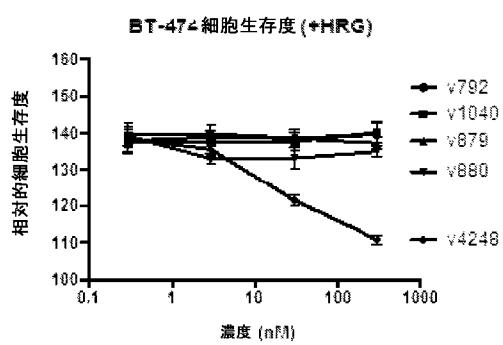
【 図 1 8 】



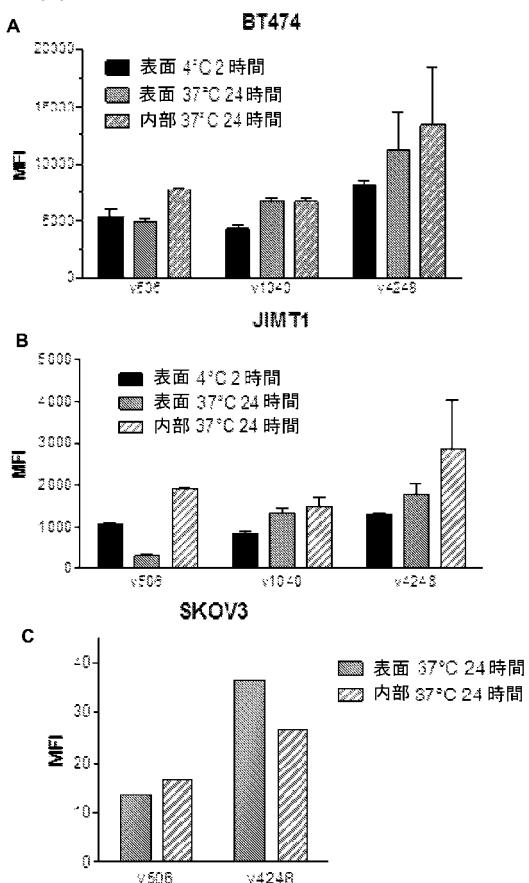
【図19】



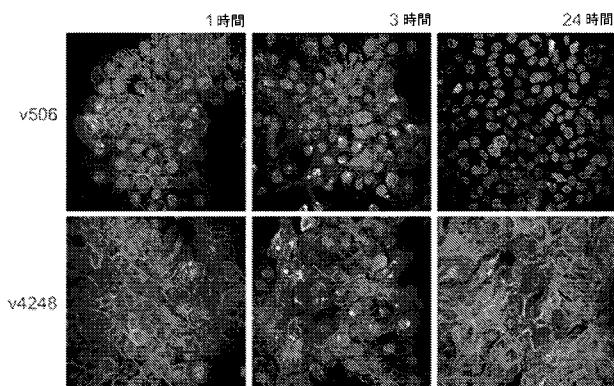
B



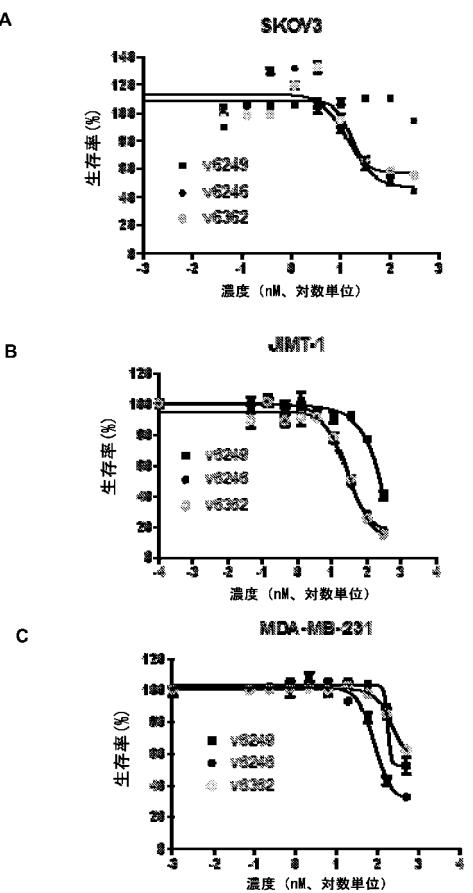
【図20】



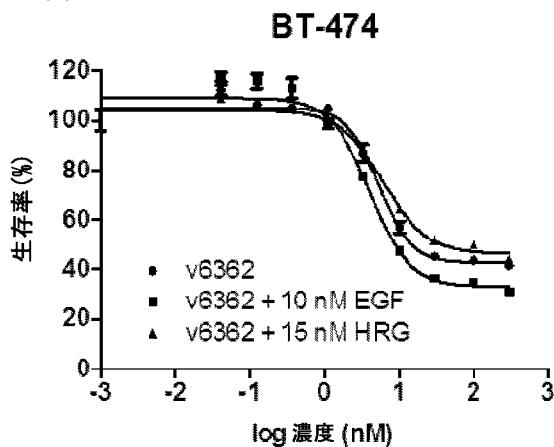
【図21】



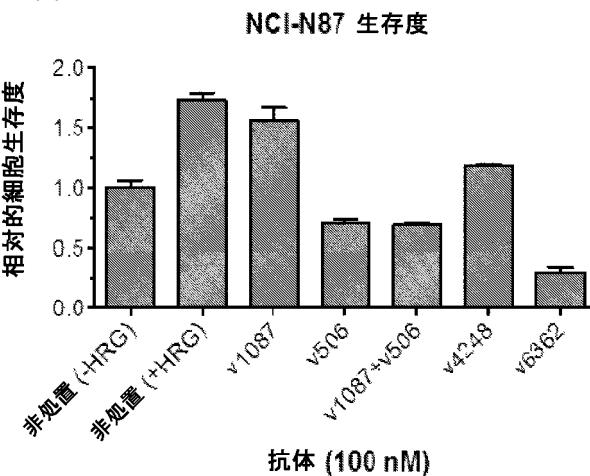
【図22】



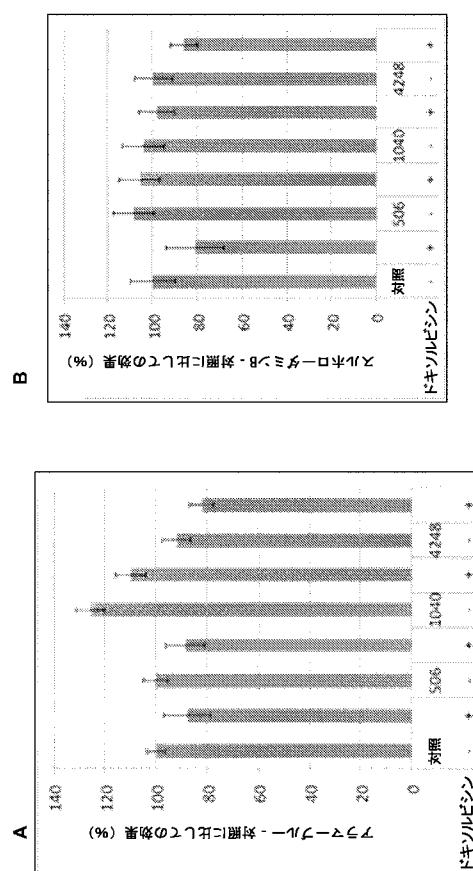
【図23】



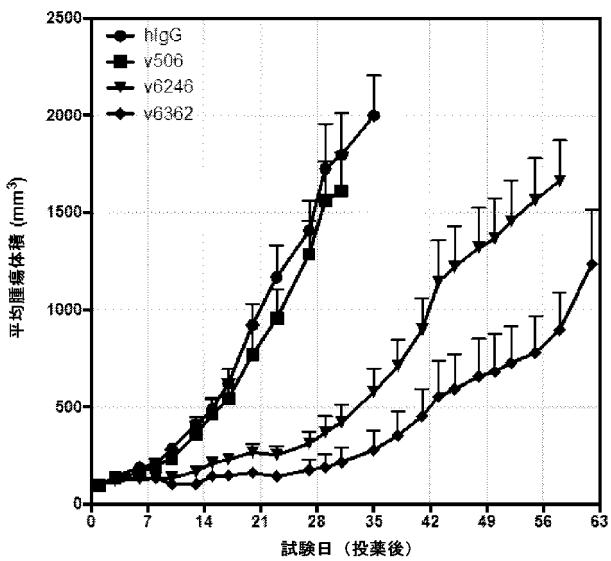
【図24】



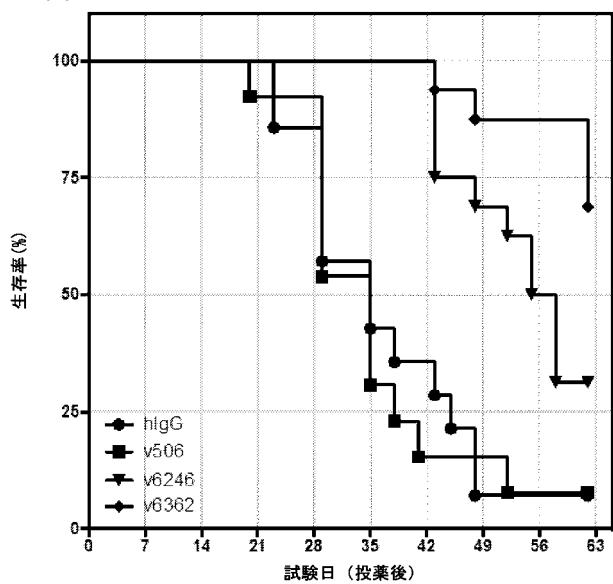
【図25】



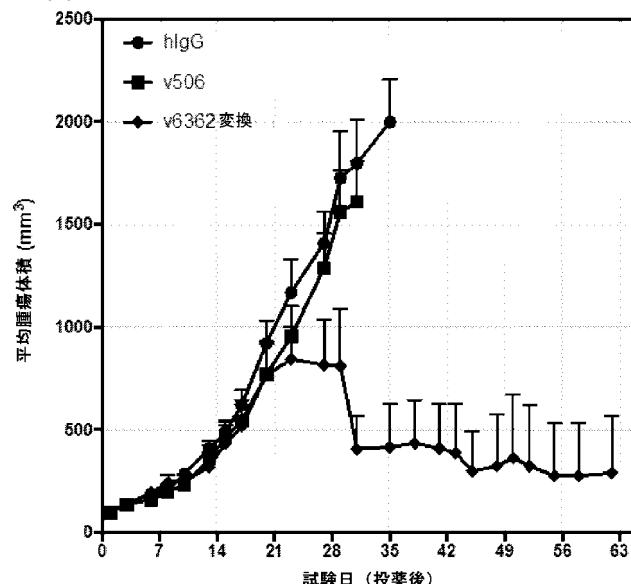
【図26】



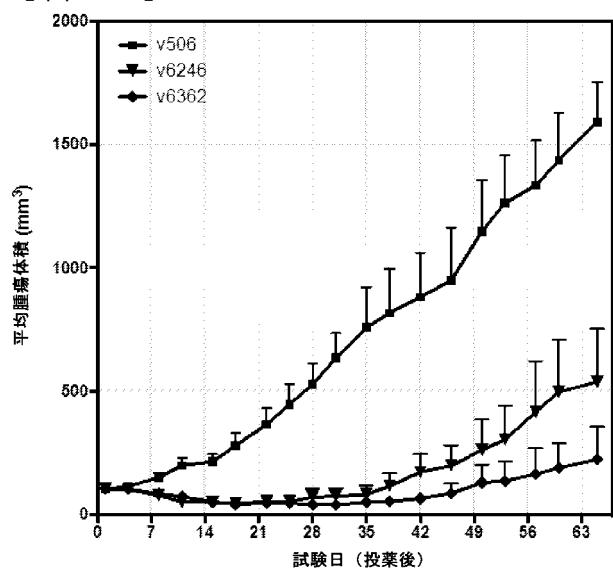
【図27】



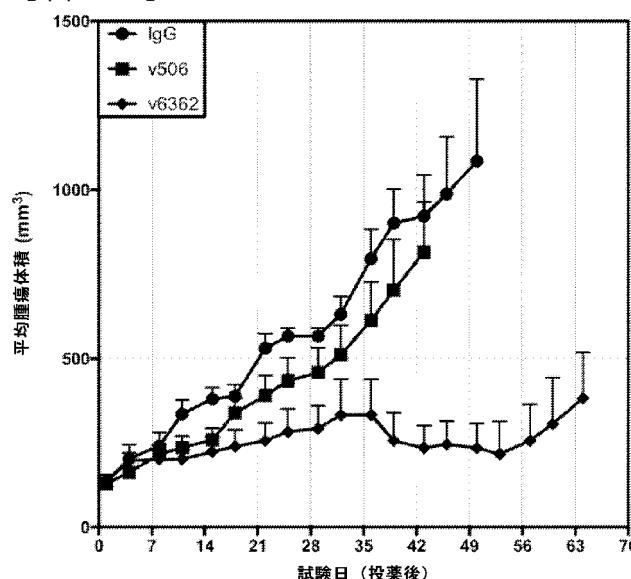
【図28】



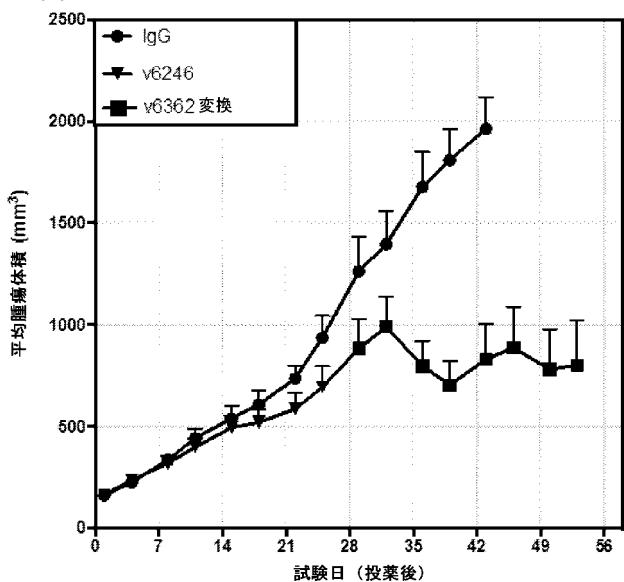
【図29】



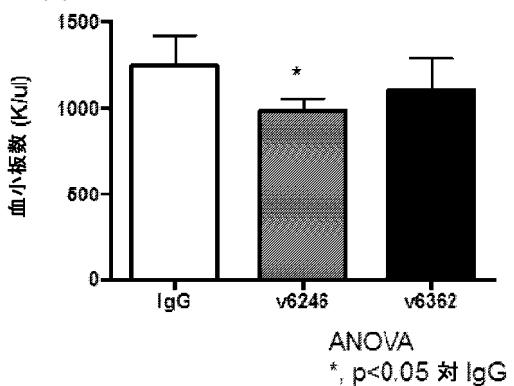
【図30】



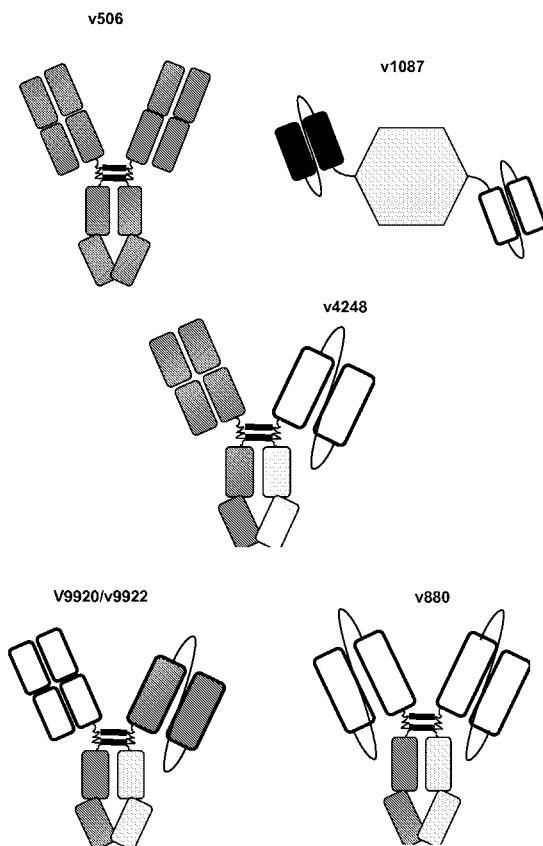
【図3 1】



【図3 2】



【図3 3】



【配列表】

2016520586000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/037401
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395 (2014.01) CPC - C07K 2317/31 (2014.09) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 16/18; C12N 15/09; C12P 21/02 (2014.01) USPC - 424/1.49, 130.1, 133.1, 134.1, 135.1, 136.1, 138.1; 530/387.1, 387.3, 387.7		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - A61K 39/395, 51/109, 2039/505; C07K 16/32, 2317/31, 2317/622, 2319/31 (2014.09)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0196265 A1 (ADAMS et al) 05 August 2010 (05.08.2010) entire document	1-5
A	US 2011/0059076 A1 (MCDONAGH et al) 10 May 2011 (10.05.2011) entire document	1-5
A	US 2004/0071696 A1 (ADAMS et al) 15 April 2004 (15.04.2004) entire document	1-5
A	WO 2003/031464 A2 (DE FREES et al) 17 April 2003 (17.04.2003) entire document	1-5
A	ROBINSON et al. "Targeting ErbB2 and ErbB3 with a bispecific single-chain Fv enhances targeting selectivity and induces a therapeutic effect in vitro," Br J Cancer, 07 October 2008 (07.10.2008), Vol. 99, Pgs. 1415-1425. entire document	1-5
A	MCDONAGH et al. "Antitumor activity of a novel bispecific antibody that targets the ErbB2/ErbB3 oncogenic unit and inhibits heregulin-induced activation of ErbB3," Mol Cancer Ther. 16 January 2012 (16.01.2012), Vol. 11, Pgs. 582-593. entire document	1-5
A	LU et al. "Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments," J Immunol Methods. 15 September 2002 (15.09.2002), Vol. 267, Pgs. 213-226. entire document	1-5
A	GUNASEKARAN et al. "Enhancing antibody Fc heterodimer formation through electrostatic steering effects: applications to bispecific molecules and monovalent IgG," J Biol Chem. 16 April 2010 (16.04.2010). Vol. 285, Pgs. 19637-19646. entire document	1-5
P, Y	KANG et al. "Engineering multivalent antibodies to target heregulin-induced HER3 signaling in breast cancer cells," Mabs. 26 December 2013 (26.12.2013), Vol. 6, Pgs. 340-353. entire document	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 September 2014	Date of mailing of the international search report 07 OCT 2014	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
PCT/US2014/037401		
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:		
a. (means) <input type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form		
b. (time) <input checked="" type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search		
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.		
3. Additional comments:		
SEQ ID NOs: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 55, 56, 57 and 61 were searched.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/037401
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 8-80 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.	<input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	4 C 2 0 6
A 6 1 K 47/26 (2006.01)	A 6 1 K 47/26	4 H 0 4 5
A 6 1 K 47/44 (2006.01)	A 6 1 K 47/44	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 15/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/08	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/138 (2006.01)	A 6 1 K 31/138	
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
A 6 1 K 31/4196 (2006.01)	A 6 1 K 31/4196	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	

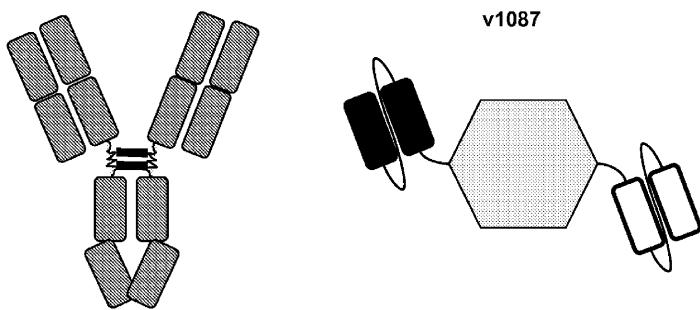
(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,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

(74)代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(74)代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(74)代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(74)代理人	100129506 弁理士 小林 智彦
(74)代理人	100114340 弁理士 大関 雅人
(74)代理人	100114889 弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人	100121072 弁理士 川本 和弥
(72)発明者	チャン ピーター ウィング イウ カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト エイス アベニュー 540 - 1385 ザイムワーカス, インコーポレイテッド内
(72)発明者	ウィックマン グラント レイモンド カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト エイス アベニュー 540 - 1385 ザイムワーカス, インコーポレイテッド内
(72)発明者	エング ゴードン イウ コン カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト エイス アベニュー 540 - 1385 ザイムワーカス, インコーポレイテッド内
F ターム(参考)	4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA05 4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA25 CA44

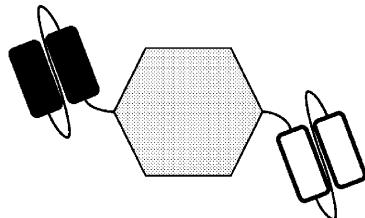
4C076 AA12 CC27 DD51A DD66A EE41A EE52A
4C084 AA19 NA05 ZB261 ZC751
4C085 AA14 AA16 AA21 AA25 AA27 BB11 CC23 DD62 EE01
4C086 AA01 AA02 BC46 BC60 GA02 GA07 HA12 MA02 MA04 NA05
ZB21 ZB26 ZC75
4C206 AA01 AA02 FA23 KA01 MA02 MA05 MA11 NA14 ZB26 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74 GA26

【要約の続き】

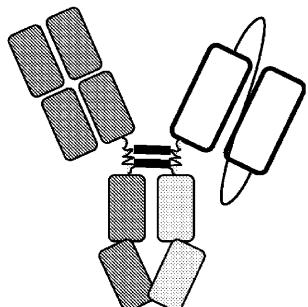
v506



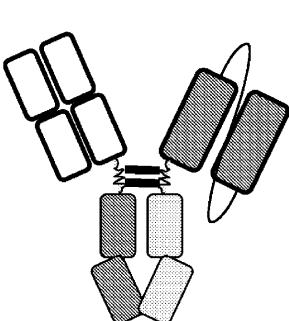
v1087



v4248



V9920/v9922



v880

