

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7325936号

(P7325936)

(45)発行日 令和5年8月15日(2023.8.15)

(24)登録日 令和5年8月4日(2023.8.4)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 K 9/19 (2006.01)

A 6 1 K 9/19

A 6 1 K 47/10 (2017.01)

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/14 (2017.01)

A 6 1 K 47/14

A 6 1 K 47/12 (2006.01)

A 6 1 K 47/12

請求項の数 20 外国語出願 (全118頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-89499(P2018-89499)

(22)出願日 平成30年5月7日(2018.5.7)

(65)公開番号 特開2018-188437(P2018-188437  
A)

(43)公開日 平成30年11月29日(2018.11.29)

審査請求日 令和3年3月4日(2021.3.4)

(31)優先権主張番号 62/502,578

(32)優先日 平成29年5月5日(2017.5.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 500049716

アムジエン・インコーポレーテッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1

3 2 0 , サウザンド オークス , ワン ア

ムジエン センター ドライブ

(74)代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 改善された貯蔵及び投与のための、二重特異性抗体構築物を含む医薬組成物

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

i . 第一の結合ドメインを介して、C D 1 9、C D 3 3、E G F R v I I I、M S L N、C D H 1 9、F L T 3、D L L 3、C D H 3、B C M A及びP S M Aから選択される標的細胞表面抗原に、第二の結合ドメインを介してT細胞表面抗原C D 3に結合する二重特異性抗体構築物であって、前記二重特異性抗体構築物の第一及び第二ドメインが、一本鎖F v ( s c F v )の形態であり、前記抗体構築物が、0 . 5 μ g / m l ~ 2 0 m g / m lの範囲の濃度で存在する、前記二重特異性抗体構築物；

i i . 微生物の増殖を阻害するのに有効な濃度の、ベンジルアルコールおよびメチルパラベンから選択され、0 . 1 1 ~ 0 . 9 % ( w / v )の範囲の濃度で存在する、1つの保存剤；ならびに

i i i . リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩及び酒石酸塩からなる群から選択される塩を含む緩衝液であり、及び/または前記緩衝液が、ヒスチジン、グリシン、T R I S グリシン、トリス、またはそれらの混合物を含む、前記緩衝液を含み、前記二重特異性抗体構築物が、タンパク質凝集体(高分子量( H M W )種)の形成の減少または予防を示し、パーセントイルのH M W濃度が5 %未満である、医薬組成物であって、

前記組成物が、溶液として、凍結状態の溶液として、または凍結乾燥物として、使用まで保存され、その後、任意で希釈または再構成ののちに、投与され、保存剤、安定化剤、または界面活性剤から選択される更なる賦形剤の添加を要しない、前記医薬組成物。

10

20

## 【請求項 2】

前記二重特異性抗体構築物が、以下：

- (a) pH 6.5 ~ 7.5 で 0.5 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または
- (b) pH 4.0 ~ 6.0 で 0.5 ~ 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または
- (c) CD3 結合ドメイン安定化剤の存在下、pH 4.0 ~ 7.5 で 0.5  $\mu\text{g}$  ~ 2 mg、または

- (d) pH 4.0 ~ 7.5 で 0.5  $\mu\text{g}$  ~ 20 mg、

からなる群から選択される範囲の濃度で存在し、

各々がヒンジ、CH<sub>2</sub> 及び CH<sub>3</sub> ドメインを含み、ペプチドリンカーを介して互いに融合された 2 つのポリペプチド単量体を含む第三の結合ドメインを前記二重特異性抗体が含み、前記第三の結合ドメインがアミノからカルボキシルに向けて順に：

ヒンジ - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub> - リンカー - ヒンジ - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>

を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記緩衝液が、リン酸カリウム、酢酸 / 酢酸ナトリウム、クエン酸 / クエン酸ナトリウム、コハク酸 / コハク酸ナトリウム、酒石酸 / 酒石酸ナトリウム、及びヒスチジン / ヒスチジン HCl またはそれらの混合物からなる群から選択される緩衝液である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

前記緩衝液が、0.1 ~ 150 mM の範囲の濃度で存在する、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

前記緩衝液が、0.25 ~ 50 mM の範囲の濃度のクエン酸塩を含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 6】

前記組成物の pH が、pH 4.0 ~ 5.0、または 6.0 ~ 7.5 の範囲である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 7】

スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、アルギニン、リジン、ポリソルベート 20、ポリソルベート 80、ポロキサマー 188、プルロニック及びその組合せからなる群から選択される 1 つ以上の賦形剤をさらに含む、請求項 1 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 8】

ポリソルベート及び / もしくはリジン HCl をさらに含む、または

二重特異性抗体構築物の濃度が少なくとも 10、15 もしくは 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  である場合、前記組成物がポリソルベート及び / もしくはリジン HCl を含まない、請求項 7 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

前記第一の結合ドメインが：

- (a) 配列番号 1 に記載する CDR - H1、配列番号 2 に記載する CDR - H2、配列番号 3 に記載する CDR - H3、配列番号 4 に記載する CDR - L1、配列番号 5 に記載する CDR - L2、及び配列番号 6 に記載する CDR - L3、

- (b) 配列番号 29 に記載する CDR - H1、配列番号 30 に記載する CDR - H2、配列番号 31 に記載する CDR - H3、配列番号 34 に記載する CDR - L1、配列番号 35 に記載する CDR - L2 及び配列番号 36 に記載する CDR - L3、

- (c) 配列番号 42 に記載する CDR - H1、配列番号 43 に記載する CDR - H2、配列番号 44 に記載する CDR - H3、配列番号 45 に記載する CDR - L1、配列番号 46 に記載する CDR - L2 及び配列番号 47 に記載する CDR - L3、

- (d) 配列番号 53 に記載する CDR - H1、配列番号 54 に記載する CDR - H2、配列番号 55 に記載する CDR - H3、配列番号 56 に記載する CDR - L1、配列番号

10

20

30

40

50

57に記載するCDR-L2及び配列番号58に記載するCDR-L3、

(e) 配列番号65に記載するCDR-H1、配列番号66に記載するCDR-H2、配列番号67に記載するCDR-H3、配列番号68に記載するCDR-L1、配列番号69に記載するCDR-L2及び配列番号70に記載するCDR-L3、

(f) 配列番号83に記載するCDR-H1、配列番号84に記載するCDR-H2、配列番号85に記載するCDR-H3、配列番号86に記載するCDR-L1、配列番号87に記載するCDR-L2及び配列番号88に記載するCDR-L3、

(g) 配列番号94に記載するCDR-H1、配列番号95に記載するCDR-H2、配列番号96に記載するCDR-H3、配列番号97に記載するCDR-L1、配列番号98に記載するCDR-L2及び配列番号99に記載するCDR-L3、

10

(h) 配列番号105に記載するCDR-H1、配列番号106に記載するCDR-H2、配列番号107に記載するCDR-H3、配列番号109に記載するCDR-L1、配列番号110に記載するCDR-L2及び配列番号111に記載するCDR-L3、

(i) 配列番号115に記載するCDR-H1、配列番号116に記載するCDR-H2、配列番号117に記載するCDR-H3、配列番号118に記載するCDR-L1、配列番号119に記載するCDR-L2及び配列番号120に記載するCDR-L3、

(j) 配列番号126に記載するCDR-H1、配列番号127に記載するCDR-H2、配列番号128に記載するCDR-H3、配列番号129に記載するCDR-L1、配列番号130に記載するCDR-L2及び配列番号131に記載するCDR-L3、

(k) 配列番号137に記載するCDR-H1、配列番号138に記載するCDR-H2、配列番号139に記載するCDR-H3、配列番号140に記載するCDR-L1、配列番号141に記載するCDR-L2及び配列番号142に記載するCDR-L3、

20

(l) 配列番号152に記載するCDR-H1、配列番号153に記載するCDR-H2、配列番号154に記載するCDR-H3、配列番号155に記載するCDR-L1、配列番号156に記載するCDR-L2及び配列番号157に記載するCDR-L3、ならびに

(m) 配列番号167に記載するCDR-H1、配列番号168に記載するCDR-H2、配列番号169に記載するCDR-H3、配列番号170に記載するCDR-L1、配列番号171に記載するCDR-L2及び配列番号172に記載するCDR-L3、からなる群から選択される、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3を含むVH領域ならびにCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3を含むVL領域を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

30

【請求項10】

液体である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項11】

前記組成物が、<5%または<1%の前記二重特異性抗体構築物の多量体を含む、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項12】

前記多量体が二量体である、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】

EVA、ポリオレフィン、及び/またはPVC製のプラスチック投与容器に充填される、請求項1に記載の医薬組成物。

40

【請求項14】

pH6.5~7.5で、少なくとも0.25mMのクエン酸、少なくとも0.0125mMのリジン及び/または少なくとも0.001%のポリソルベート80を含む、請求項13に記載の医薬組成物。

【請求項15】

前記組成物が、-50、-40、-30、または-20で保存された貯蔵溶液である、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項16】

50

各々がヒンジ、C H 2 及びC H 3 ドメインを含み、ペプチドリinkerを介して互いに融合された2つのポリペプチド単量体を含む第三の結合ドメインを含む前記二重特異性抗体を前記組成物が含み、前記第三の結合ドメインがアミノからカルボキシルに向けて順に：

ヒンジ - C H 2 - C H 3 - リンカー - ヒンジ - C H 2 - C H 3

を含む、請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】

前記組成物が、貯蔵のために凍結乾燥物として提供される、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項18】

前記二重特異性抗体構築物を凍結乾燥物として提供し、前記凍結乾燥物が、凍結保護剤、緩衝液及び/または界面活性剤を含み、

10

保存剤を含み且つ請求項1または3～7のいずれか一項に記載の緩衝液及び/または賦形剤を含む希釈剤によって、前記凍結乾燥物を再構成する、請求項1に記載の医薬組成物の、調製方法。

【請求項19】

悪性疾患の治療に使用するための、請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項20】

1～24時間、静脈内に連続的に投与される、または

2～14日間、静脈内に連続的に投与される、

請求項1に記載の医薬組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

タンパク質ベースの医薬品をはじめとするタンパク質治療薬は、すでに医薬品のほとんどすべての分野で重要な役割を果たしており、(前)臨床開発及び市販製品で最も急速に成長している治療薬の1つである(非特許文献1)。小型化学医薬品に比べて、タンパク質医薬品は、比較的低い濃度で高い特異性及び活性を有し、一般的に、様々な癌、自己免疫疾患、及び代謝障害のような重篤な疾患の治療を提供する(非特許文献2、非特許文献3)。

【0002】

30

商業規模の精製プロセスの進歩により、現在、組換えタンパク質などのタンパク質ベースの医薬品は、初期製造段階において高純度で得ることができる。しかしながら、タンパク質の安定性は低く、化学的にも物理的にも非常に分解しやすい。化学的分解とは、脱アミド化、酸化、新規ジスルフィド架橋の開裂または形成、加水分解、異性化、または脱グリコシル化などの共有結合を含む修飾を指す。物理的分解には、タンパク質のアンフォールディング、表面への望ましくない吸着、及び凝集が含まれる。これらの物理的及び化学的不安定性への対処は、タンパク質型医薬品の開発における最も困難な課題の1つである(非特許文献4、非特許文献2)。

【0003】

興味深いタンパク質ベースの医薬品として、2つの柔軟に結合した抗体由来結合ドメインから作製した組換えタンパク質構築物であるB i T E (登録商標)(二重特異性T細胞エンゲージャー)抗体構築物などの二重特異性抗体構築物が挙げられる。B i T E (登録商標)抗体構築物の1つの結合ドメインは、標的細胞上の選択した腫瘍関連表面抗原に特異的であり；第二の結合ドメインは、T細胞上のT細胞受容体複合体のサブユニットであるC D 3 に特異的である。それらの特定の設計により、B i T E (登録商標)抗体構築物は、T細胞と標的細胞とを一時的に連結させると同時に、標的細胞に対するT細胞の固有の細胞溶解能力を強力に活性化するというユニークな点において適している。A M G 1 0 3 及びA M G 1 1 0 として臨床開発された第1世代のB i T E (登録商標)抗体構築物(特許文献1及び特許文献2参照)の重要なさらなる発展は、C D 3 鎖のN末端において状況独立性エピトープに結合する二重特異性抗体構築物の提供であった(特許文献3)。

40

50

この選択したエピトープに結合する B i T E (登録商標) 抗体構築物は、ヒト及びマーモセット (C a l l i t h r i x j a c c h u s )、ワタボウシタマリン (S a g u i n u s o e d i p u s ) またはリスザル (S a i m i r i s c i u r e u s ) の C D 3 鎖に対して異種特異性を示すだけでなく、二重特異性 T 細胞結合分子における C D 3 結合体に対する前述のエピトープの代わりにこの特異的エピトープを認識するため、以前の世代の T 細胞結合抗体で観察された活性と同程度で T 細胞を非特異的に活性化することがない。この T 細胞活性化の低下は、副作用のリスクとして同定された患者における T 細胞再分布の減少または低下に関連していた。

#### 【 0 0 0 4 】

非特許文献 3 に記載されているような抗体構築物は、身体からの急速なクリアランスに直面する可能性があり；したがって、それらは身体の大部分に迅速に到達可能で、迅速に生成し、取り扱いが容易である一方で、それらの i n v i v o での応用は、i n v i v o における短い持続性によって制限され得る。この小さな一本鎖分子は i n v i v o での半減期が短いため、連続静脈内注入による長期投与を使用して、治療効果を達成する。しかしながら、このような連続静脈内注入は、例えば、微生物の混入、したがって敗血症のような副作用を回避するために、輸液バッグを少なくとも 2 日おきに頻繁に交換しなければならないことから、患者にとって不便なものとして分類される。

#### 【 0 0 0 5 】

保存剤の添加は、この問題の 1 つの解決策として考えられている。それらの主な機能は、微生物の増殖を抑制し、薬物製品の貯蔵寿命または使用期間を通じて製品の無菌性を保証することである。一般的に使用される保存剤として、ベンジルアルコール、フェノール及び m - クレゾールが挙げられる。保存剤は小分子非経口で長く利用されてきた歴史があるが、保存剤を含有するタンパク質製剤の開発は困難である。保存剤は、ほとんどの場合においてタンパク質に対する不安定化効果 (凝集) を有しており、このことがタンパク質製剤におけるそれらの使用を制限する主な要因となっている。したがって、現在の大部分のタンパク質医薬品は、一回限りの使用のために製剤化されている。保存剤の開発により、より便利で多目的な注射ペン用プレゼンテーションの商業化をもたらしたヒト成長ホルモン (h G H) のような保存剤含有製剤はごくわずかしが存在し得なかった。h G H 保存剤を含有する少なくとも 4 つのそのようなペンデバイスが、現在市販されている。N o r d i t r o p i n (液体、N o v o N o r d i s k )、N u t r o p i n A Q (液体、G e n e n t e c h ) 及び G e n o t r o p i n (凍結乾燥 デュアルチャンバカートリッジ、P h a r m a c i a & U p j o h n ) はフェノールを含有し、一方、S o m a t r o p e (E l i L i l l y ) は m - クレゾールとともに製剤化される。保存剤形の製剤化及び開発時には、いくつかの側面を考慮する必要がある。薬物製品中の有効な保存剤濃度を最適化しなければならない。これには、剤形中の所与の保存剤について、タンパク質の安定性を損なうことなく抗菌効力を与える濃度範囲を試験することが必要である。注意すべき重要な点は、防腐効果が、活性薬剤及びすべての賦形剤成分を含有する最終製剤において示されるべきであるということである。

#### 【 0 0 0 6 】

したがって、本発明の目的は、連続注入をより長い間隔で実施することができるように、すなわち患者の快適性を高め、同時に貯蔵中と投与中の両方で安定であるように好ましくは保存される、二重特異性抗体構築物を含む改良された医薬組成物を提供することである。しかしながら、二重特異性抗体構築物を含む適切な保存性の高い医薬組成物は、数日にわたる連続注入を必要としないが、数時間のみを必要とするそのような二重特異性抗体構築物においても利点を有すると考えられ、なぜならば、これらの半減期延長 (H L E ) 二重特異性抗体構築物の注入もまた、数時間を要する場合があります、その時間内における微生物混入のリスク、したがって感染症を低減する必要があるからである。同時に、それに含まれる医薬組成物及び二重特異性抗体構築物の回収もまた本発明の目的である。

#### 【 0 0 0 7 】

半減期の増大は、免疫グロブリン、具体的には抗体、及び最も具体的には小サイズの抗

10

20

30

40

50

体断片の *in vivo* 応用において一般的に有用である。当該技術分野で記載されているそのような効果を達成するためのアプローチは、小さな二重特異性抗体構築物のより大きなタンパク質への融合を含み、好ましくは B i T E（登録商標）抗体構築物の治療効果を妨げない。そのような二重特異性 T 細胞エンゲージャーのさらなる開発の例として、例えば、特許文献 4、特許文献 5、特許文献 6、特許文献 7、及び特許文献 8 に記載されているような二重特異性 F c 分子が挙げられる。

#### 【0008】

しかしながら、保存を目的とする場合、タンパク質の凝集を避けることは大きな障害となる。タンパク質凝集は、タンパク質の物理的不安定性の主要な事象を表しており、溶媒と疎水性タンパク質残基との間の熱力学的に好ましくない相互作用を最小限に抑える固有の傾向に起因して生じる。凝集は、リフォールディング、精製、滅菌、輸送、及び貯蔵プロセス中に日常的に起こるため、特に問題がある。凝集は、タンパク質の未変性状態が高度に熱力学的に好ましく（例えば、中性 pH 及び 37）、ストレスがない溶液条件下であっても起こり得る（非特許文献 4、非特許文献 2、非特許文献 3、非特許文献 5）。

10

#### 【0009】

半減期延長様式を有する F c 分子などの二重特異性 T 細胞エンゲージャーのような半減期延長抗体構築物もまた、タンパク質凝集及び／または他の分解事象から保護する必要がある。タンパク質凝集は、治療用タンパク質の生物学的活性を損なう可能性があるため、問題である。さらに、タンパク質凝集は、薬物製品の見栄えを悪くするうえに、最終生成物から凝集体を除去するために精巧な精製工程が必要となるため、生成物の収率を低下させる。最近では、凝集したタンパク質が存在する（ヒト化または完全ヒトタンパク質であっても）ことにより、患者が活性タンパク質単量体に対する免疫応答を発達させ、中和抗体の形成及び薬剤耐性、または他の有害な副作用をもたらすリスクを有意に増加させ得るという懸念及びエビデンスが増加している（非特許文献 5）。

20

#### 【0010】

一般的に、様々なメカニズムによるタンパク質凝集を最小限に抑えるために、いくつかの試みが文献に報告されている。タンパク質を、その一次構造を改変することにより安定化し、凝集体形成及び他の化学変化から保護し、それにより内部疎水性を高め、外部疎水性を低下させることができる。しかしながら、タンパク質の遺伝子改変は、機能の障害及び／または免疫原性の増加をもたらす得る。別のアプローチは、温度、圧力、pH、及び塩などの様々なメカニズムを用いることによって、機能的な未変性単量体を回収するための凝集体の解離（「脱凝集」と呼ばれる）に焦点を当てている。現在、タンパク質凝集体は、主に下流のプロセスの研磨工程において不純物として除去される。しかしながら、高分子量（HMW）の場合、相当量の HMW を除去すると実質的な収率損失が生じるだけでなく、ロバストな下流プロセスの設計が困難になる（非特許文献 4）。

30

#### 【0011】

その安定性を維持しながら投与容器から確実に定量的に回収する一方で、広い濃度範囲にわたる二重特異性抗体構築物製剤を保存することは、重大な課題を提起する。当該分野において、保存した治療用タンパク質製剤に対して高い安定性を提供する医薬組成物の最適化が必要である。本発明の目的は、非半減期延長二重特異性抗体構築物と、F c 分子を含む半減期延長モダリティを有する二重特異性 T 細胞エンゲージャーなどの半減期延長二重特異性抗体構築物の両方に関して、この必要性に応じることである。

40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0012】

【文献】WO 99/54440

WO 2005/040220

WO 2008/119567

US 2014/0302037

US 2014/0308285

50

WO 2014/144722

WO 2014/151910

WO 2015/048272

【非特許文献】

【0013】

【文献】Leader, Nature Reviews Drug Discovery 2008 Jan 7, 21-39

Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80

Wang, Int J Pharm. 1999 Aug 20;185(2):129-88

Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336

Mahler J Pharm Sci. 2009 Sep;98(9):2909-34

10

【発明の概要】

【0014】

二重特異性T細胞結合抗体構築物を含むタンパク質ベースの医薬品、例えば二重特異性抗体構築物の、通常、静脈内経路を介した、安全、定量的、かつ任意で長期的な投与は、課題である。このために、本発明に関して、以下を含む、医薬組成物を提供する：

i . 第一の結合ドメインを介して標的細胞表面抗原に結合し、第二の結合ドメインを介してT細胞表面抗原CD3に結合する二重特異性抗体構築物であって、前記鎖抗体構築物が0.5 µl/ml ~ 20、好ましくは0.5 µg/ml ~ 10または5 mg/mlの範囲の濃度で存在する、前記二重特異性抗体構築物；

ii . ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノール、メタクレゾール、メチルパラベン、フェノキシエタノール、プロピルパラベン及びチオメロサルから選択される、微生物の増殖を阻害するのに有効な濃度の少なくとも1つの保存剤；

20

iii . 二重特異性抗体構築物が安定である、希釈剤。

【0015】

本発明に関して、二重特異性抗体構築物が、以下からなるリストから選択される範囲の濃度で存在することが想定される：

(a) pH 6.5 ~ 7.5で、0.5 ~ 200 µg/ml；または

(b) pH 4.0 ~ 6.0で、0.5 ~ 1000 µg/ml；または

(c) CD3結合ドメイン安定化剤、好ましくはクエン酸塩の存在下、pH 4.0 ~ 7.5で、0.5 µg ~ 2 mg；または

30

(d) pH 4.0 ~ 7.5で、0.5 µg ~ 20 mg、好ましくは0.5 µg ~ 10または5 mg/ml、ここで二重特異性抗体は、それぞれヒンジ、CH2及びCH3ドメインを含む2つのポリペプチド単量体を含む第三の結合ドメインを含み、前記2つのポリペプチド単量体は、ペプチドリッカーを介して互いに融合され、かつ前記第三の結合ドメインは、アミノからカルボキシルに向けて順に以下を含む：

ヒンジ - CH2 - CH3 - リンカー - ヒンジ - CH2 - CH3。

【0016】

本発明に関して、医薬組成物が、二重特異性一本鎖抗体構築物である二重特異性抗体構築物を含むこともまた想定される。

【0017】

40

本発明に関して、二重特異性抗体構築物が、1.0 ~ 20 mg/ml、または1.0 ~ 10 mg/ml、または1.0 µg/ml ~ 5 mg/ml、または1.0 µg/ml ~ 4 mg/ml、または1.0 µg/ml ~ 3 mg/ml、または1.0 µg/ml ~ 2 mg/ml、または1.0 µg/ml ~ 1 mg/ml、または1.5 ~ 5 mg/ml、または1.5 µg/ml ~ 4 mg/ml、または1.5 µg/ml ~ 3 mg/ml、または1.5 µg/ml ~ 2 mg/ml、または1.5 µg/ml ~ 1 mg/ml、または1.5 ~ 200 µg/mlの範囲の濃度で存在することがさらに想定される。

【0018】

本発明に関して、少なくとも1種の保存剤が、0.001 ~ 1.0% (w/v)の範囲の濃度で存在することも想定される。

50

## 【0019】

本発明に関して、保存剤が、0.009～0.9% (w/v)、好ましくは0.11～0.9%、または0.5～0.75% (w/v)、または0.6～0.74% (w/v)の範囲の濃度で存在することがさらに想定される。

## 【0020】

本発明に関して、希釈剤が、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩及び酒石酸塩からなる群から選択される塩を含む緩衝液であり、及び/または、そこにおいて緩衝液が、ヒスチジン、グリシン、TRISグリシン、トリス、またはそれらの混合物を含むことが想定される。

## 【0021】

本発明に関して、希釈剤が、リン酸カリウム、酢酸/酢酸ナトリウム、クエン酸/クエン酸ナトリウム、コハク酸/コハク酸ナトリウム、酒石酸/酒石酸ナトリウム、及びヒスチジン/ヒスチジンHCl、またはそれらの混合物からなる群から選択される緩衝液であることがさらに想定される。

## 【0022】

本発明に関して、希釈剤が、0.1～150mMの範囲の、好ましくは0.25～50mMの範囲の濃度で存在する緩衝液であることも想定される。

## 【0023】

本発明に関して、希釈剤が、0.25～50mMの範囲の濃度のクエン酸塩を含む緩衝液であることがさらに想定される。

## 【0024】

本発明に関して、組成物のpHが、4.0～8.0の範囲、好ましくはpH4.0～5.0またはpH6.5～7.5の範囲、または好ましくはpH7.0であることが想定される。

## 【0025】

本発明に関して、医薬組成物が、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、アルギニン、リジン、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポロキサマー188、プルロニック及びそれらの組合せからなる群から選択される1つ以上の賦形剤をさらに含むことがさらに想定される。

## 【0026】

本発明に関して、医薬組成物が、ポリソルベート、好ましくはポリソルベート80、及び/またはリジンHClをさらに含むことも想定される。

## 【0027】

本発明に関して、二重特異性抗体構築物の濃度が少なくとも10µg/ml、好ましくは15µg/ml、または20µg/mlである場合、医薬組成物が、ポリソルベート、好ましくはポリソルベート80、及び/またはリジンHClを含まないことがさらに想定される。

## 【0028】

本発明に関して、二重特異性抗体構築物の第一の結合ドメインが、CD19、CD33、EGFRvIII、MSLN、CDH19、FLT3、DLL3、CDH3、BCMA及びPSMAからなる群から選択される少なくとも1つの標的細胞表面抗原に結合することが、なおさらに想定される。

## 【0029】

本発明に関して、第一の結合ドメインが：

(a) 配列番号1に示すCDR-H1、配列番号2に示すCDR-H2、配列番号3に示すCDR-H3、配列番号4に示すCDR-L1、配列番号5に示すCDR-L2及び配列番号6に示すCDR-L3、

(b) 配列番号29に示すCDR-H1、配列番号30に示すCDR-H2、配列番号31に示すCDR-H3、配列番号34に示すCDR-L1、配列番号35に示すCDR-L2及び配列番号36に示すCDR-L3、

10

20

30

40

50



(c) 配列番号 4 2 に示す C D R - H 1、配列番号 4 3 に示す C D R - H 2、配列番号 4 4 に示す C D R - H 3、配列番号 4 5 に示す C D R - L 1、配列番号 4 6 に示す C D R - L 2 及び配列番号 4 7 に示す C D R - L 3、

(d) 配列番号 5 3 に示す C D R - H 1、配列番号 5 4 に示す C D R - H 2、配列番号 5 5 に示す C D R - H 3、配列番号 5 6 に示す C D R - L 1、配列番号 5 7 に示す C D R - L 2 及び配列番号 5 8 に示す C D R - L 3、

(e) 配列番号 6 5 に示す C D R - H 1、配列番号 6 6 に示す C D R - H 2、配列番号 6 7 に示す C D R - H 3、配列番号 6 8 に示す C D R - L 1、配列番号 6 9 に示す C D R - L 2 及び配列番号 7 0 に示す C D R - L 3、

(f) 配列番号 8 3 に示す C D R - H 1、配列番号 8 4 に示す C D R - H 2、配列番号 8 5 に示す C D R - H 3、配列番号 8 6 に示す C D R - L 1、配列番号 8 7 に示す C D R - L 2 及び配列番号 8 8 に示す C D R - L 3、

10

(g) 配列番号 9 4 に示す C D R - H 1、配列番号 9 5 に示す C D R - H 2、配列番号 9 6 に示す C D R - H 3、配列番号 9 7 に示す C D R - L 1、配列番号 9 8 に示す C D R - L 2 及び配列番号 9 9 に示す C D R - L 3、

(h) 配列番号 1 0 5 に示す C D R - H 1、配列番号 1 0 6 に示す C D R - H 2、配列番号 1 0 7 に示す C D R - H 3、配列番号 1 0 9 に示す C D R - L 1、配列番号 1 1 0 に示す C D R - L 2 及び配列番号 1 1 1 に示す C D R - L 3、

(i) 配列番号 1 1 5 に示す C D R - H 1、配列番号 1 1 6 に示す C D R - H 2、配列番号 1 1 7 に示す C D R - H 3、配列番号 1 8 5 に示す C D R - L 1、配列番号 1 1 9 に示す C D R - L 2 及び配列番号 1 2 0 記載の C D R - L 3、

20

(j) 配列番号 1 2 6 に示す C D R - H 1、配列番号 1 2 7 に示す C D R - H 2、配列番号 1 2 8 に示す C D R - H 3、配列番号 1 2 9 に示す C D R - L 1、配列番号 1 3 0 に示す C D R - L 2 及び配列番号 1 3 1 に示す C D R - L 3、

(k) 配列番号 1 3 7 に示す C D R - H 1、配列番号 1 3 8 に示す C D R - H 2、配列番号 1 3 9 に示す C D R - H 3、配列番号 1 4 0 に示す C D R - L 1、配列番号 1 4 1 に示す C D R - L 2 及び配列番号 1 4 2 に示す C D R - L 3、

(l) 配列番号 1 5 2 に示す C D R - H 1、配列番号 1 5 3 に示す C D R - H 2、配列番号 1 5 4 に示す C D R - H 3、配列番号 1 5 5 に示す C D R - L 1、配列番号 1 5 6 に示す C D R - L 2 及び配列番号 1 5 7 に示す C D R - L 3、ならびに

30

(m) 配列番号 1 6 7 に示す C D R - H 1、配列番号 1 6 8 に示す C D R - H 2、配列番号 1 6 9 に示す C D R - H 3、配列番号 1 0 7 に示す C D R - L 1、配列番号 1 7 1 に示す C D R - L 2 及び配列番号 1 7 2 に示す C D R - L 3

からなる群から選択される、C D R - H 1、C D R - H 2 及び C D R - H 3 を含む V H 領域ならびに C D R - L 1、C D R - L 2 及び C D R - L 3 を含む V L 領域を含むことが想定される。

#### 【0030】

本発明に関して、二重特異性抗体構築物が、半減期延長 (H L E) 部分、好ましくは s c F c ドメインを有することがさらに想定される。

#### 【0031】

40

本発明に関して、医薬組成物が、液体、凍結乾燥物、または凍結した液体であることも想定される。

#### 【0032】

本発明に関して、組成物が、< 5 %、好ましくは < 1 % の二重特異性抗体構築物の多量体を含むことがなおさらに想定される。

#### 【0033】

本発明に関して、多量体は二量体であると考えられる。

#### 【0034】

本発明に関して、組成物が、室温で、少なくとも 4 日間、好ましくは少なくとも 1 0 日間、より好ましくは少なくとも 1 4 日間、< 5 %、好ましくは < 1 % の二重特異性抗体構

50

築物の多量体を含むことがさらに想定される。

【 0 0 3 5 】

本発明に関して、医薬組成物を、好ましくはEVA、ポリオレフィン、及び/またはPVC製のプラスチック投与容器に充填することも想定される。

【 0 0 3 6 】

本発明に関して、請求項6～13に記載の緩衝液及び/または賦形剤の少なくとも1つを含むプラスチック投与容器からの希釈物から、二重特異性一本鎖抗体構築物を少なくとも90%、好ましくは少なくとも95、96、97、98、または更に少なくとも99%回収することがなおさらに想定される。

【 0 0 3 7 】

本発明に関して、医薬組成物は、pH6.5～7.5で少なくとも0.25mMのクエン酸塩、少なくとも0.0125mMのリジン及び/または少なくとも0.001%のポリソルベート80を含むことが想定される。

【 0 0 3 8 】

本発明に関する医薬組成物は、-50、好ましくは-40、-30または-20で保存される貯蔵溶液であることがさらに想定される。

【 0 0 3 9 】

本発明に関して、-50、好ましくは-40、-30または-20で保存された貯蔵溶液として提供される医薬組成物は、それぞれヒンジ、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>ドメインを含む2つのポリペプチド単量体を含む第三の結合ドメインを含む二重特異性抗体を含み、前記2つのポリペプチド単量体は、ペプチドリンカーを介して互いに融合され、前記第三の結合ドメインは、アミノからカルボキシルに向けて順に以下のとおりであることも想定される：

ヒンジ - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub> - リンカー - ヒンジ - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>。

【 0 0 4 0 】

本発明に関して、二重特異性抗体構築物を凍結乾燥物として提供し、前記凍結乾燥物は、好ましくは、凍結保護剤、緩衝液及び/または界面活性剤を含み、前記凍結乾燥物を、保存剤を含み且つ好ましくは緩衝液及び/または賦形剤を含む希釈剤によって再構成することがさらに想定される。

【 0 0 4 1 】

本発明の文脈において、溶液として、凍結状態の溶液としてまたは凍結乾燥物として、医薬組成物は使用するまで保存され、その後、任意で希釈または再構成の後に、保存剤、安定化剤または界面活性剤から選択されるさらなる賦形剤を添加する必要なく、投与されることが特に想定される。

【 0 0 4 2 】

本発明に関して、医薬組成物を悪性疾患の治療に使用することも想定される。

【 0 0 4 3 】

本発明に関して、悪性疾患の治療または改善方法であって、それを必要とする対象に、本発明の、または本発明の方法により製造した医薬組成物を投与する工程を含む、前記治療または改善方法もなおさらに想定される。

【 0 0 4 4 】

本発明に関して、本発明による医薬組成物を、1～24時間、好ましくは1～10または2～5時間、静脈内に、好ましくは連続的に投与することが想定される。

【 0 0 4 5 】

本発明に関して、本発明による医薬組成物を、2～14日間、好ましくは2～10日間、最も好ましくは4～7日間、静脈内に連続的に投与することがさらに想定される。

【 0 0 4 6 】

また、本発明に関して、好ましくは凍結保護剤、緩衝液及び/または界面活性剤を含む凍結乾燥物としての、二重特異性抗体構築物と、保存剤を含み且つ好ましくは本発明による緩衝液及び/または賦形剤を含む、希釈剤と、を含むキットも想定される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 7 】

より具体的には、本発明は以下を提供する：

## [ 1 ]

以下を含む、医薬組成物：

i . 第一の結合ドメインを介して標的細胞表面抗原に、第二の結合ドメインを介してT細胞表面抗原CD3に結合する二重特異性抗体構築物であって、前記鎖抗体構築物が、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \text{mg}/\text{ml}$ 、好ましくは $0.5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10$ または $5 \text{mg}/\text{ml}$ の範囲の濃度で存在する、前記二重特異性抗体構築物；

ii . 微生物の増殖を阻害するのに有効な濃度の、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メタ-クレゾール、メチルパラベン、フェノキシエタノール、プロピルパラベン及びチオメロサルから選択される、少なくとも1つの保存剤；

iii . 前記二重特異性抗体構築物が安定である、希釈剤；

## [ 2 ]

前記二重特異性抗体構築物が、以下：

( a )  $\text{pH } 6.5 \sim 7.5$  で  $0.5 \sim 200 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または

( b )  $\text{pH } 4.0 \sim 6.0$  で  $0.5 \sim 1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、または

( c ) CD3 結合ドメイン安定化剤、好ましくはクエン酸の存在下、 $\text{pH } 4.0 \sim 7.5$  で  $0.5 \mu\text{g} \sim 2 \text{mg}$ 、または

( d )  $\text{pH } 4.0 \sim 7.5$ 、好ましくは $4.0 \sim 6.0$ で、 $0.5 \mu\text{g} \sim 20 \text{mg}$ 、好ましくは $0.05 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10$ または $5 \text{mg}/\text{ml}$ 、

からなる群から選択される範囲の濃度で存在し、

各々がヒンジ、CH2及びCH3ドメインを含み、ペプチドリッカーを介して互いに融合された2つのポリペプチド単量体を含む第三の結合ドメインを前記二重特異性抗体が含み、前記第三の結合ドメインがアミノからカルボキシルに向けて順に：

ヒンジ - CH2 - CH3 - リンカー - ヒンジ - CH2 - CH3

を含む、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 3 ]

前記二重特異性抗体構築物が、二重特異性一本鎖抗体構築物である、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 4 ]

前記少なくとも1つの保存剤が、 $0.001 \sim 1.0\%$  (w/v) の範囲の濃度で存在する、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 5 ]

前記保存剤が、 $0.009 \sim 0.9\%$  (w/v)、好ましくは $0.11 \sim 0.9\%$ 、または $0.5 \sim 0.75\%$  (w/v) の範囲の濃度で存在する、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 6 ]

前記希釈剤が、リン酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、コハク酸塩及び酒石酸塩からなる群から選択される塩を含む緩衝液であり、及び/または前記緩衝液が、ヒスチジン、グリシン、TRISグリシン、トリス、またはそれらの混合物を含む、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 7 ]

前記希釈剤が、リン酸カリウム、酢酸/酢酸ナトリウム、クエン酸/クエン酸ナトリウム、コハク酸/コハク酸ナトリウム、酒石酸/酒石酸ナトリウム、及びヒスチジン/ヒスチジンHClまたはそれらの混合物からなる群から選択される緩衝液である、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 8 ]

前記希釈剤が、 $0.1 \sim 150 \text{mM}$ の範囲の、好ましくは $0.25 \sim 50 \text{mM}$ の範囲の濃度で存在する緩衝液である、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 9 ]

前記希釈剤が、クエン酸塩を含む緩衝液である、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

## [ 1 0 ]

10

20

30

40

50

前記希釈剤が、0.25～50 mMの範囲の濃度のクエン酸塩を含む緩衝液である、[1]に記載の医薬組成物；

[11]

前記組成物のpHが4.0～8.0の範囲であり、好ましくはpH4.0～5.0、または6.0～7.5の範囲であり、好ましくはpH7.0である、[1]に記載の医薬組成物；

[12]

スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、アルギニン、リジン、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポロキサマー188、プルロニック及びその組合せからなる群から選択される1つ以上の賦形剤をさらに含む、[1]に記載の医薬組成物；

10

[13]

ポリソルベート、好ましくはポリソルベート80及び/またはリジンHCLをさらに含む、[12]に記載の医薬組成物；

[14]

二重特異性抗体構築物の濃度が少なくとも10、15または20 µg/ml、好ましくは15 µg/mlである場合、前記組成物がポリソルベート、好ましくはポリソルベート80及び/またはリジンHCLを含まない、[12]に記載の医薬組成物；

[15]

前記二重特異性抗体構築物の前記第一の結合ドメインが、CD19、CD33、EGFRvIII、MSLN、CDH19、FLT3、DLL3、CDH3、BCMA及びPSMAからなる群から選択される少なくとも1つの標的細胞表面抗原に結合する、[1]に記載の医薬組成物；

20

[16]

前記第一の結合ドメインが：

(a) 配列番号1に記載するCDR-H1、配列番号2に記載するCDR-H2、配列番号3に記載するCDR-H3、配列番号4に記載するCDR-L1、配列番号5に記載するCDR-L2、及び配列番号6に記載するCDR-L3、

(b) 配列番号29に記載するCDR-H1、配列番号30に記載するCDR-H2、配列番号31に記載するCDR-H3、配列番号34に記載するCDR-L1、配列番号35に記載するCDR-L2及び配列番号36に記載するCDR-L3、

30

(c) 配列番号42に記載するCDR-H1、配列番号43に記載するCDR-H2、配列番号44に記載するCDR-H3、配列番号45に記載するCDR-L1、配列番号46に記載するCDR-L2及び配列番号47に記載するCDR-L3、

(d) 配列番号53に記載するCDR-H1、配列番号54に記載するCDR-H2、配列番号55に記載するCDR-H3、配列番号56に記載するCDR-L1、配列番号57に記載するCDR-L2及び配列番号58に記載するCDR-L3、

(e) 配列番号65に記載するCDR-H1、配列番号66に記載するCDR-H2、配列番号67に記載するCDR-H3、配列番号68に記載するCDR-L1、配列番号69に記載するCDR-L2及び配列番号70に記載するCDR-L3、

(f) 配列番号83に記載するCDR-H1、配列番号84に記載するCDR-H2、配列番号85に記載するCDR-H3、配列番号86に記載するCDR-L1、配列番号87に記載するCDR-L2及び配列番号88に記載するCDR-L3、

40

(g) 配列番号94に記載するCDR-H1、配列番号95に記載するCDR-H2、配列番号96に記載するCDR-H3、配列番号97に記載するCDR-L1、配列番号98に記載するCDR-L2及び配列番号99に記載するCDR-L3、

(h) 配列番号105に記載するCDR-H1、配列番号106に記載するCDR-H2、配列番号107に記載するCDR-H3、配列番号109に記載するCDR-L1、配列番号110に記載するCDR-L2及び配列番号111に記載するCDR-L3、

(i) 配列番号115に記載するCDR-H1、配列番号116に記載するCDR-H2、配列番号117に記載するCDR-H3、配列番号118に記載するCDR-L1、

50

配列番号 1 1 9 に記載する C D R - L 2 及び配列番号 1 2 0 に記載する C D R - L 3、

( j ) 配列番号 1 2 6 に記載する C D R - H 1、配列番号 1 2 7 に記載する C D R - H 2、配列番号 1 2 8 に記載する C D R - H 3、配列番号 1 2 9 に記載する C D R - L 1、配列番号 1 3 0 に記載する C D R - L 2 及び配列番号 1 3 1 に記載する C D R - L 3、

( k ) 配列番号 1 3 7 に記載する C D R - H 1、配列番号 1 3 8 に記載する C D R - H 2、配列番号 1 3 9 に記載する C D R - H 3、配列番号 1 4 0 に記載する C D R - L 1、配列番号 1 4 1 に記載する C D R - L 2 及び配列番号 1 4 2 に記載する C D R - L 3、

( l ) 配列番号 1 5 2 に記載する C D R - H 1、配列番号 1 5 3 に記載する C D R - H 2、配列番号 1 5 4 に記載する C D R - H 3、配列番号 1 5 5 に記載する C D R - L 1、配列番号 1 5 6 に記載する C D R - L 2 及び配列番号 1 5 7 に記載する C D R - L 3、な  
らびに

10

( m ) 配列番号 1 6 7 に記載する C D R - H 1、配列番号 1 6 8 に記載する C D R - H 2、配列番号 1 6 9 に記載する C D R - H 3、配列番号 1 7 0 に記載する C D R - L 1、配列番号 1 7 1 に記載する C D R - L 2 及び配列番号 1 7 2 に記載する C D R - L 3、  
からなる群から選択される、C D R - H 1、C D R - H 2 及び C D R - H 3 を含む V H 領域  
ならびに C D R - L 1、C D R - L 2 及び C D R - L 3 を含む V L 領域を含む、[ 1 ] に  
記載の医薬組成物；

[ 1 7 ]

液体である、[ 1 ] に記載の医薬組成物；

[ 1 8 ]

前記組成物が、< 5 %、好ましくは < 1 % の前記二重特異性抗体構築物の多量体を含む、  
[ 1 ] に記載の医薬組成物；

20

[ 1 9 ]

前記多量体が二量体である、[ 1 8 ] に記載の医薬組成物；

[ 2 0 ]

前記組成物が、室温で、少なくとも 4 日間、好ましくは少なくとも 1 0 日間、より好ま  
しくは少なくとも 1 4 日間の期間、< 5 %、好ましくは < 1 % の前記二重特異性抗体構築  
物の多量体を含む、[ 1 7 ] に記載の医薬組成物；

[ 2 1 ]

好ましくは E V A、ポリオレフィン、及び / または P V C 製のプラスチック投与容器に  
充填される、[ 1 ] に記載の医薬組成物；

30

[ 2 2 ]

前記二重特異性一本鎖抗体構築物が、[ 6 ] ~ [ 1 3 ] に記載の緩衝液及び / または賦形剤  
の少なくとも 1 つを含む前記プラスチック投与容器由来の希釈物から、少なくとも 9 0 %  
、好ましくは少なくとも 9 5、9 6、9 7、9 8、または更には少なくとも 9 9 % まで回  
収される、[ 2 1 ] に記載の医薬組成物；

[ 2 3 ]

前記二重特異性一本鎖抗体構築物が、ポリソルベート 8 0 を含む前記プラスチック投与  
容器由来の希釈物から、少なくとも 9 0 %、好ましくは少なくとも 9 5、9 6、9 7、9  
8、または更には少なくとも 9 9 % まで回収される、[ 2 1 ] に記載の医薬組成物；

40

[ 2 4 ]

p H 6 . 5 ~ 7 . 5 で、少なくとも 0 . 2 5 m M のクエン酸、少なくとも 0 . 0 1 2 5  
m M のリジン及び / または少なくとも 0 . 0 0 1 % のポリソルベート 8 0 を含む、[ 2 1 ]  
に記載の医薬組成物；

[ 2 5 ]

前記組成物が、- 5 0 で、好ましくは - 4 0、- 3 0、または - 2 0 で保存さ  
れた貯蔵溶液である、[ 1 ] に記載の医薬組成物；

[ 2 6 ]

各々がヒンジ、C H 2 及び C H 3 ドメインを含み、ペプチドリinker を介して互いに融  
合された 2 つのポリペプチド単量体を含む第三の結合ドメインを含む前記二重特異性抗体

50

を前記組成物が含み、前記第三の結合ドメインがアミノからカルボキシルに向けて順に：  
ヒンジ - C H 2 - C H 3 - リンカー - ヒンジ - C H 2 - C H 3

を含む、[ 2 5 ]に記載の医薬組成物；

[ 2 7 ]

前記組成物が、貯蔵のために凍結乾燥物として提供される、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

[ 2 8 ]

前記組成物が、溶液として、凍結状態の溶液として、または凍結乾燥物として、使用まで保存され、その後、任意で希釈または再構成ののちに、投与され、保存剤、安定化剤、または界面活性剤から選択される更なる賦形剤の添加を要しない、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

10

[ 2 9 ]

前記二重特異性抗体構築物を凍結乾燥物として提供し、前記凍結乾燥物が、好ましくは、凍結保護剤、緩衝液及び／または界面活性剤を含み、

保存剤を含み且つ好ましくは[ 6 ]～[ 1 3 ]のいずれかに記載の緩衝液及び／または賦形剤を含む希釈剤によって、前記凍結乾燥物を再構成する、

[ 1 ]に記載の医薬組成物の、調製方法；

[ 3 0 ]

悪性疾患の治療に使用するための、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

[ 3 1 ]

[ 1 ]に記載の医薬組成物、または[ 2 9 ]に記載の方法に従って製造した医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、悪性疾患の治療または改善のための方法；

20

[ 3 2 ]

1 ～ 2 4 時間、好ましくは 1 ～ 1 0 時間、または 2 ～ 5 時間、静脈内に連続的に投与される、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

[ 3 3 ]

2 ～ 1 4 日間、好ましくは 2 ～ 1 0 日間、最も好ましくは 4 ～ 7 日間、静脈内に連続的に投与される、[ 1 ]に記載の医薬組成物；

[ 3 4 ]

好ましくは凍結保護剤、緩衝液及び／または界面活性剤を含む凍結乾燥物としての、前記二重特異性抗体構築物；ならびに

30

保存剤を含み且つ好ましくは[ 6 ]～[ 1 3 ]のいずれかに記載の緩衝液及び／または賦形剤を含む、希釈剤を含む、キット。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 4 8 】

【図 1】クロロブタノール、メチルパラベン、フェノール及びチオメロサールの保存剤について、S E C - H P L C によって測定した、2 5 、p H 4 におけるC D 1 9 x C D 3 二重特異性抗体構築物のパーセントイル高分子量（H M W）種による安定性の図表。

【図 2】保存剤ベンジルアルコールについて、S E C - H P L C で測定した、2 5 、p H 7 におけるC D 1 9 x C D 3 二重特異性抗体構築物の濃度依存的な、C D 1 9 x C D 3 二重特異性抗体構築物のパーセントイル高分子量（H M W）種の安定性の図表。

40

【図 3 A】パーセントイル主ピークによる安定性の図表。

【図 3 B】保存剤ベンジルアルコールの場合の、2 5 における保存剤濃度依存的な、S E C - H P L C によって測定したC D 1 9 x C D 3 二重特異性抗体構築物のパーセントイル高分子量（H M W）種による安定性の図表。

【図 3 C】保存剤ベンジルアルコールの場合の、投与容器材料に依存した、S E C - H P L C によって測定したC D 1 9 x C D 3 二重特異性抗体構築物のパーセントイル高分子量（H M W）種による安定性の図表。

【図 3 D】保存剤ベンジルアルコールの場合の、投与容器材料に依存した、2 5 における保存濃度依存的な、S E C - H P L C によって測定したC D 1 9 x C D 3 二重特異性抗

50

体構築物のパーセントイル主ピーク（単量体）による安定性の図表。

【図４】蛍光分光法によって測定した、保存剤ベンジルアルコールの存在下または非存在下における、 $\text{pH } 4$ での、 $1 \text{ mg/ml}$ の $\text{CD } 19 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物の変性の図表。

【図５】 $\text{CD } 19 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物及び $0$ 、 $0.5$ 、 $0.6$ または $0.7\%$ ベンジルアルコールを含む製剤中での大腸菌（*E. coli*）（ $A$ ）、緑膿菌（*P. aeruginosa*）（ $B$ ）、*E. cloacae*（ $C$ ）、黄色ブドウ球菌（*S. aureus*）（ $D$ ）、*M. luteus*（ $E$ ）、*C. albicans*（ $F$ ）の微生物増殖の図表。

【図６－１】ベンジルアルコールの存在下で適用可能な $\text{FAP}$ に対するクエン酸の安定化効果（ $A$ ）。抗 $\text{CD } 3$ ドメインであって、抗 $\text{CD } 3$ ドメイン中のペプチド $108 \sim 112$ （ $\text{YISYW}$ ）が $\text{FAP}$ 中のペプチド $367 \sim 370$ に対応する（ $B$ ）。 $\text{CD } 33 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物であって、 $\text{CD } 33 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物中のペプチド $364 \sim 368$ （ $\text{YISYW}$ ）が $\text{FAP}$ 中のペプチド $366 \sim 370$ に対応する（ $C$ ）。 $\text{EGFRvIIII} \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物であって、 $\text{EGFRvIIII} \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物中のペプチド $365 \sim 369$ （ $\text{YISYW}$ ）が $\text{FAP}$ のペプチド $366 \sim 370$ に対応する（ $D$ ）。

【図６－２】それぞれ二重特異性抗体構築物または単ドメインの $600 \mu\text{g/ml}$ の濃度での、図６ $E$ 及び $F$ はクエン酸及びベンジルアルコールの個々の効果を、図６ $G$ 及び $H$ は組み合わせでの効果を示す。結果は、抗 $\text{CD } 3$ ドメイン、 $\text{CD } 33 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物、 $\text{FAP}$ 、および $\text{EGFRvIIII} \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物について同じである。

【図７】 $0.9\%$ 生理食塩水中、 $0 \sim 10\%$ の $\text{IVSS}$ 中でそれぞれ $1 \mu\text{g/ml}$ に希釈した $\text{C } 8$ カラム上への $\text{EGFRvIIII} \times \text{CD } 3$ 非 $\text{HLE}$ 二重特異性抗体構築物の $50 \mu\text{L}$ 注入後の逆相クロマトグラム（ $A$ ）。各溶出 $\text{EGFRvIIII} \times \text{CD } 3$ 非 $\text{HLE}$ 二重特異性抗体構築物試料のピーク面積を、希釈溶液に含まれるパーセントイル $\text{IVSS}$ 濃度〔 $\% \text{IVSS}$ 〕の関数としてプロットしている（ $B$ ）。

【図８ $A$ 】パーセントイル回収に関する賦形剤の影響及び必要性が評価される。 $25^\circ\text{C}$ で $24$ 時間観察した場合、構築物濃度が少なくとも $15 \mu\text{g/ml}$ であれば、定量的な $\text{CD } 19 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物の回収を確実にするために、クエン酸、リジン、及びポリソルベート $80$ の組み合わせ（本明細書ではこの組み合わせを $\text{IVSS}$ と略す）を添加する必要はない。

【図８ $B$ 】定量的回収を促進する剤はポリソルベート $80$ であり、非界面活性剤賦形剤はこの効果のために必要ではない。

【図８ $C$ 】 $0.002\%$ のポリソルベート $80$ は、 $1 \mu\text{g/ml}$ 及び $0.05 \mu\text{g/ml}$ の非常に低い濃度であっても、 $\text{IV}$ バッグ中の $\text{CD } 19 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物の回収を確実にする。 $0.02\%$ のポリソルベート $80$ は、 $\text{IVSS}$ 中の典型的な濃度に相当する。

【図９】保存剤ベンジルアルコールは、 $-20^\circ\text{C}$ で $4$ 週間にわたる保存後に示されるように、 $\text{pH } 4$ で $1 \text{ mg/ml}$ の濃度で第三のドメイン（ $\text{HLE}$ ドメイン）を含む $\text{CD } 19 \times \text{CD } 3$ 、 $\text{CD } 33 \times \text{CD } 3$ 、 $\text{BCMA} \times \text{CD } 3$ 及び $\text{DLL } 3 \times \text{CD } 3$ 二重特異性抗体構築物を含む医薬組成物の凍結安定性を改善する。

【図１０】凍結安定性に関する保存剤ベンジルアルコールによる安定化効果は、 $0.1\%$ を超える濃度で最良であり、 $-20^\circ\text{C}$ で $4$ 週間にわたる保存後に、 $\text{pH } 4$ での $\text{DLL } 3 \times \text{CD } 3$ で例示されるように、二重特異性抗体構築物が $5 \text{ mg/ml}$ の高濃度であっても、 $\text{HMW}$ 種の減少を確実にする。

【発明を実施するための形態】

【 $0049$ 】

詳細な説明

本発明の根底にある一般的概念は、本発明による二重特異性抗体構築物を含む医薬組成

10

20

30

40

50

物の安定性が、溶液及び凍結乾燥状態の両方において、液体医薬組成物への保存剤の添加によって、典型的には、二重特異性抗体構築物及び保存剤の濃度に依存して向上するという驚くべき知見である。驚くべきことに、本明細書で定義される第三のドメインを含む場合、すなわち半減期延長（HLE）二重特異性抗体構築物であるか否かにかかわらず、約  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 5 \text{mg}/\text{ml}$  の特定の濃度で存在する場合、好ましくは B i T E（登録商標）抗体構築物などの一本鎖抗体構築物である二重特異性抗体構築物を含む医薬組成物は、保存剤の存在下において安定であるだけでなく、この保存剤によっても安定化され得ることが見出されている。ベンジルアルコール、m-クレゾール及びフェノキシエタノールのような保存剤が、抗体などのタンパク質の凝集を促進することが当該技術分野において知られているので、これは特に驚くべきことである。しかし、例えば、二重特異性抗体濃度の種類、及び任意で pH 及び更なる補完安定化剤の存在に依存して、本発明の医薬組成物は安定である。ここで、保存剤及び任意でさらなる安定化補完賦形剤（例えば、クエン酸塩）の安定化作用は、主として第二の結合ドメイン（CD3 結合ドメイン）との相互作用に関連するため、本明細書に記載の第一の結合ドメイン（標的化ドメイン）は、あまり重要でない。利点として、保存剤は、保存中、例えば凍結状態で、及び投与する際、任意で pH 調整後及び/または希釈後に、医薬組成物を物理的かつ微生物学的に安定化させるのに役立ち得る。したがって、好都合なことに、任意で pH 調整、例えば pH 4.0 ~ 6.5 のような低 pH から、pH 6.5 ~ 7.5 の中性 pH、及び i . v . 投与を目的とした希釈を行ったとしても、同じ医薬組成物を使用し得る。しかしながら、二重特異性抗体構築物の濃度は全体として、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 5 \text{mg}/\text{ml}$  の範囲、または場合によっては  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 10, 20$ 、またはさらには  $30 \text{mg}/\text{ml}$  の範囲である。したがって、医薬組成物を含む静脈内輸液バッグなどの容器は、微生物混入が低減することにより、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 またはさらには 14 日間などのより長い時間間隔で交換するだけでよく、これにより、患者の快適性は有意に向上する。

#### 【0050】

安定化及び微生物学的に有効な保存剤として、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルパラベン、フェノール及びチエロサルが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。医薬組成物を製剤化するのに有用な保存剤として、一般的に、抗菌剤（例えば、抗細菌剤または抗真菌剤）、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどが挙げられ；例として：塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素が挙げられる。抗菌保存剤は、微生物の増殖を低減することによって薬剤の貯蔵寿命を延ばすために使用する物質である。本発明の医薬組成物を製剤化するのに特に有用な保存剤として、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノール、メタクレゾール、メチルパラベン、フェノキシエタノール、プロピルパラベンチオメロサルが挙げられる。構造及びこれらの保存剤の使用に対する典型的な濃度は、Meyer et al . J Pharm Sci . 96 ( 12 ) , 3155 の表 1 に記載されている。

#### 【0051】

前述の保存剤は、異なる濃度で医薬組成物中に存在してもよい。例えば、ベンジルアルコールは、0.2 ~ 1.1 % ( w / v )、好ましくは 0.5 ~ 0.9 % ( v / v ) の濃度で、クロロブタノールは 0.3 ~ 0.5 % ( w / v ) の濃度で、フェノールは 0.07 ~ 0.5 % ( w / v ) の濃度で、メタクレゾールは 0.17 ~ 0.32 % ( w / v ) の濃度で、またはチオメロサルは 0.003 ~ 0.01 % ( w / v ) の濃度で存在してもよい。メチルパラベンの好ましい濃度は 0.05 ~ 0.5 % ( w / v )、フェノキシエタノールについては 0.1 ~ 3 % ( w / v )、及びプロピルパラベンについては 0.05 ~ 0.5 % ( w / v ) である。

#### 【0052】

理論に拘泥することを望むものではないが、ベンジルアルコールのような保存剤は、CD19 x CD3 二重特異性抗体構築物などの二重特異性抗体構築物の二量化部位に適切な

10

20

30

40

50



濃度で結合し、二量体または他の多量体の形成の可能性を低下させる。それによって、例えば  $CD19 \times CD3$ 、 $BCMA \times CD3$ 、 $PSAM \times CD3$ 、 $CD33 \times CD3$ 、または  $EGFR \vee I I I \times CD3$  二重特異性抗体構築物における凝集リスクを有意に低下させる。いくつかの領域のアンフォールディングは、ベンジルアルコールのような保存剤が、二重特異性抗体構築物の単量体を不安定化させ、そのことで二量体／凝集体の形成を増加させることを示唆しているため、これは特に驚くべきことである。しかしながら、これらの領域のいくつかは、二量体形成に関与する可能性が高い領域と重複する。領域性のアンフォールディングは、変換によって二量体形成を妨げて単量体へ戻し得、二重特異性抗体濃度が一定の限度内にある間は、全体の安定化に効果を与える。

#### 【0053】

特定の実施形態では、緩衝液及び／または賦形剤を用いて、本発明による静脈内投与のための医薬組成物中の保存剤の存在下での二重特異性抗体構築物の安定性を増加させてもよい。そのような賦形剤は本明細書において補完安定化剤と称され、これは  $CD3$  結合ドメインと相互作用する。特定の実施形態、例えば、中性  $pH$  にて、及び／または、本明細書に記載の第三の結合ドメインを有さず、且つ、より高濃度、例えば約 50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、もしくは  $1000 \mu g/ml$ 、典型的には少なくとも  $50 \mu g/ml$  もしくは  $200 \mu g/ml$  で医薬組成物に存在する二重特異性抗体構築物では、そのような補完安定化剤が、保存剤の存在下での二重特異性抗体構築物の安定性を保証するために好ましい場合がある。これは、本明細書に記載の、第三の結合ドメインを有さない二重特異性抗体構築物、例えば  $CD33 \times CD3$  二重特異性構築物の場合に当てはまり得る。二重特異性抗体構築物の濃度が、例えば 200、150、100、または  $50 \mu g/ml$  以下である場合、そのような補完安定化剤、例えばクエン酸は必要とされないと考えられる。しかしながら、量的回収を可能にするために、すなわち損失（例えば投与容器への吸着）が低く、回収量のパーセントが少なくとも 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、もしくは更には 99.5% であるために、他の緩衝液及び／または賦形剤、例えばポリソルベート、例えばポリソルベート 80 が、20、15、または  $10 \mu g/ml$  の濃度にあることが好ましい場合もある。このことは、実用性（取扱い）の面と、医学的理由（アレルギー、副作用）の両方に関して、過剰な賦形剤が節約されることから、特に有効である。

#### 【0054】

中性  $pH$  に比べると低い  $pH$  は、より高い濃度でもまた、保存剤による二重特異性抗体構築物の安定化を補完し、これはより高い濃度、例えば少なくとも 200、300、400、500、600、700、800、900、または  $1000 \mu g/ml$  で含む医薬組成物が安定であること、つまり、好ましくは 5、4、3、2、1、またはさらには 0.5% 未満の低いパーセントの  $HMW$  濃度を示すことが、理由である。

#### 【0055】

特定の実施形態において、保存剤の存在下で二重特異性抗体構築物を安定化するために使用する緩衝液及び／または賦形剤は、クエン酸、リジン及びポリソルベート 80 を含む場合があるが、必ずしもこれらに限定するものではない。これらの任意の化合物を個別に、または任意の組合せで、またはその機能または構造における類似の化合物を用いて、本発明による保存剤の存在下での二重特異性抗体構築物の安定化効果を得てもよく、且つ／または、後者が安定性もしくは微生物学的安定性のために必要とされない、保存剤の不在下でもまた、これらを用いて回収率を増加させてもよい。

#### 【0056】

驚くべきことに、保存剤の存在下で二重特異性抗体構築物を安定化するための特定の実施形態で使用する緩衝液及び／または賦形剤もまた、及び／または同時に、患者に医薬組成物を投与するために使用する（プラスチック）容器からの二重特異性抗体構築物の回収を向上させるために使用してもよい。本発明による薬物は、通常、非常に低い濃度で投与するため、例えば、静脈内輸液バッグなどの投与容器への吸着は、有効量に重大な影響を

10

20

30

40

50

及ぼす可能性がある。したがって、そのような緩衝液及び／または賦形剤の添加が容器からの薬物の回収を増加させ得ることは非常に有益である。例えば、クエン酸、リジン及び／またはポリソルベート 80 の組合せを医薬組成物に加え、患者に投与することにより、これらの化合物の非存在下での薬物濃度に比べて、回収率を最大 250 % 高め得る。この目的のためには、比較的低い量、例えば、少なくとも 0.25 ~ 1 mM のクエン酸、0.0125 M のリジン及び／または 0.001 % のポリソルベート 80 で十分である場合がある。これは、十分な量であり得る 1 % の IVSS 溶液を患者に投与することに相当する。2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 % の IVSS のようなより高い量でもより良い結果が得られる場合がある。4 % IVSS が好ましい場合がある。しかしながら、回収率向上の効果をj得るために、IVSS の全構成要素が必要とされるわけではない。例えば、ポリソルベートのみで、投与容器への薬物吸着を十分に低減し得る。本発明の前記態様は、非常に強力な薬物、例えば二重特異性抗体構築物の用量信頼性の向上に寄与する。したがって、本発明によって患者の安全性も向上する。

#### 【0057】

しかしながら、一定の閾値を超えると、そのような緩衝液及び／または賦形剤は、回収率を向上するためには必要とされないことがある。そのような閾値は、例えば、10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、または 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  である。しかしながら、一般的に、医薬組成物は、回収率に関して、好ましくは少なくとも賦形剤としての界面活性剤、例えばポリソルベート、特にポリソルベート 80 を含む。

#### 【0058】

本発明の別の局面において、HDX 所見に基づくと、本発明の第三の結合ドメインの存在の非存在に依存して、及び／または医薬組成物の pH に依存して、二重特異性抗体構築物が一定の閾値を超えて存在すると、ベンジルアルコールのような保存剤は、(疎水性) 相互作用によって本発明に従う二重特異性抗体構築物の第二の結合ドメイン(抗 CD3 ドメイン)を特異的に不安定化させ得る。本明細書に記載の第三の結合ドメインが存在する場合、及び／または pH が酸性、例えば pH 4.0 ~ 6.5 の場合、典型的には、この閾値は高くなる。理論に拘泥することを望むものではないが、そのような二重特異性抗体構築物の不安定化は、増加した立体配座の動力学と関連し得、ひいては、一般的には減少した分子安定性と関連し得る。しかしながら、驚くべきことに、本明細書では、緩衝液及び／または賦形剤、例えばクエン酸を含有する緩衝液または賦形剤は、不安定化効果を相殺し得る。そのような緩衝液及び／または賦形剤と保存剤との間の相殺効果は、配列番号 18 ~ 23 に表す CDRS によって特徴付けられる抗 CD3 ドメインを有するすべての二重特異性抗体構築物に当てはまり得る(立体構造に関して)。このような二重特異性抗体構築物に関しては、より低濃度(例えば、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  未満)で見られるように、二量体の抑制または減少が理由でベンジルアルコールのような保存剤が驚くべきことに単独で安定化特性を有する場合、ベンジルアルコールのような保存剤の存在下では安定化用の賦形剤は不要である。典型的には、医薬組成物が 6.5 を超える pH を有し、かつ／または二重特異性抗体構築物が本明細書に記載の第三のドメインを含むならば、より高濃度、例えば 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  より高い濃度では、これは当てはまらない。保存剤の不安定化効果が二重特異性抗体構築物濃度に基づくその安定化効果を上回る場合、クエン酸塩のような賦形剤を追加の補完安定化賦形剤として使用することができる。したがって、クエン酸塩のような追加の安定化剤の添加は、ベンジルアルコールのような保存剤の存在下での二重特異性抗体構築物のより多目的な使用(濃度範囲)を可能にする。

#### 【0059】

一方で、本発明に関して、医薬組成物は、例えば、静菌性 0.9 % 塩化ナトリウム、USP (0.9 % ベンジルアルコールを含有する)を用いる 7 日間にわたる注入に適していると考えられる。特に、この選択肢は、安全上の理由から一定の閾値以上の体重の患者に利用可能であることが想定され、そのような閾値は、20、22 または 25 kg であってもよい。

#### 【0060】

10

20

30

40

50

本発明に関する特定の実施形態では、本発明による二重特異性抗体構築物を、静脈内投与のために、単回投与バイアル中に、滅菌した保存剤フリーの白色～灰白色の凍結乾燥粉末として供給することが想定される。C D 1 9 x C D 3 抗体構築物の各単回用量バイアルは、本発明による 3 5 m c g の二重特異性抗体構築物、クエン酸一水和物 ( 3 . 3 5 m g )、塩酸リジン ( 2 3 . 2 3 m g )、ポリソルベート 8 0 ( 0 . 6 4 m g )、トレハロース二水和物 ( 9 5 . 5 m g )、及び pH を 7 . 0 に調整するための水酸化ナトリウムを含有する。3 m L の 0 . 9 % 塩化ナトリウム、U S P ( 0 . 9 % ベンジルアルコールを含む ) で再構成した後、濃度は、本発明による二重特異性抗体構築物が 1 2 . 5 m c g / m L となる。単回投与バイアル中に、I V S S ( I . v . S o l u t i o n S t a b i l i z e r ) を、滅菌した保存剤フリー、無色～淡黄色の透明な溶液として供給する。I V S o l u t i o n S t a b i l i z e r の各単回用量バイアルは、クエン酸一水和物 ( 5 2 . 5 m g )、塩酸リジン ( 2 2 8 3 . 8 m g )、ポリソルベート 8 0 ( 1 0 m g )、p H を 7 . 0 に調整するための水酸化ナトリウム、及び注射用の水を含む。

10

#### 【 0 0 6 1 】

本発明において、用語「安定性」または「安定化」とは、医薬組成物の全体的な安定性、特に有効成分（すなわち、二重特異性一本鎖抗体構築物）自体の、特に、製剤化、充填、出荷、貯蔵及び投与時の安定性に関する。本発明の医薬組成物及び二重特異性一本鎖抗体構築物に関して、用語「安定性」または「安定」とは、特に、タンパク質凝集体 ( H M W S ) の形成の減少または予防を指す。具体的には、用語「安定性」はまた、本明細書に記載の医薬組成物中に含まれる二重特異性（一本鎖）抗体構築物のコロイド安定性に関する。「コロイド安定性」とは、コロイド粒子（タンパク質など）が液体中に長時間（数日から数年）分散したままである能力のことである。保存に関する安定性に関して、微生物学的安定性という用語が用いられる。

20

#### 【 0 0 6 2 】

本明細書中で使用する用語「（タンパク質）凝集体」とは、一般的に、所望の定義する種（例えば、単量体）の代わりに、「オリゴマー」または「多量体」などの、より高分子量のタンパク質種を包含する。この用語は、本明細書中において用語「高分子量種」及び「H M W S」と同じ意味で使用する。タンパク質凝集体は、一般的に、サイズ（小さいもの（二量体）から大きな集合体（準可視的または可視粒子）まで、及び直径がナノメートル～マイクロメートルの範囲）、形態（ほぼ球状から線維状）、タンパク質構造（ネイティブに対して、非ネイティブ/変性）、分子間結合のタイプ（共有結合対非共有結合）、可逆性ならびに可溶性において異なっている。可溶性凝集体は、およそ 1 ~ 1 0 0 n m のサイズ範囲をカバーし、タンパク質微粒子は、準可視的（約 0 . 1 ~ 1 0 0 . m ）及び可視（ > 1 0 0 . m ）範囲をカバーする。前述のタイプのタンパク質凝集体はすべて一般的にこの用語に包含される。したがって、「（タンパク質）凝集体」という用語は、2 種以上のタンパク質単量体の物理的に関連するまたは化学的に結合した非天然種のすべての種類を指す。

30

#### 【 0 0 6 3 】

したがって、用語「タンパク質凝集」または「非天然凝集」とは、タンパク質分子が 2 つ以上のタンパク質からなる複合体に集合するプロセス（複数可）を意味し、そこでは個々のタンパク質は単量体として示される。タンパク質凝集をもたらす複数の経路が存在し、それらは、温度、振盪及び攪拌などの機械的ストレス、ポンピング、凍結及び/または融解ならびに製剤化を含む広範囲の条件によって誘導することができる。

40

#### 【 0 0 6 4 】

温度が上昇すると、タンパク質の酸化や脱アミド化などの化学反応が促進され、それによって凝集が促進し得る。より高い温度はまた、四次、三次、及び二次構造レベルでのタンパク質の立体配座に直接影響を及ぼし、温度誘導性のアンフォールディングをもたらす、凝集を促進し得る。本願で言及する温度は、通常、不安定なタンパク質に基づく医薬品を長期貯蔵するための冷凍保存温度（ - 7 0 ） 、 通常 の 凍 結 温 度 （ - 2 0 ） 、 冷 蔵 温 度 （ 4 ） 、 室 温 （ 2 5 ） 及 び 生 理 学 的 温 度 （ 3 7 ） である。

50

## 【 0 0 6 5 】

したがって、本発明の医薬組成物に保存剤を添加することにより、本発明の二重特異性抗体構築物に関して凍結状態での凝集が抑制され得ることが見出されたことは驚くべきことであった。したがって、そのような二重特異性抗体構築物は、- 70 の代わりに、- 50 、 - 40 、または好ましくはたとえ - 30 または - 20 であっても凍結状態での凝集を示さずに保存され、すなわち凝集物、例えば高分子量 ( H M W ) 種が、少なくとも1ヶ月、例えば1、2、3、4、5、6、12、または24ヶ月の貯蔵時間にわたって、1%未満、またはさらには0.8%、0.6%、0.4%未満またはさらには0.3%未満にとどまる。利点として、- 70 での貯蔵がより高い貯蔵温度に置き換えられ得る場合、または - 70 での貯蔵能力が他のより不安定な貯蔵要素に割り当てられ得る場合、エネルギーの無駄を無くし得る。同時に、本発明による医薬組成物を保存するために、冷凍範囲の代わりに通常の凍結の保存温度が必要な場合にのみ、輸送上の課題が軽減される。理論に拘泥することを望むものではないが、凍結状態の凝集物は、二重特異性抗体構築物の第一の結合ドメインの特異的領域と第二の結合ドメインとの間の疎水性相互作用が理由で形成される可能性が高い。ベンジルアルコールのような保存剤の添加は、凍結状態での凝集を低く保つことができる。例えば、本発明による二重特異性抗体構築物の第二の結合ドメイン中の疎水性パッチに結合することにより、(凍結)溶液中の二重特異性抗体構築物の総量に対して1%未満のH M W種を有する。これは、s c F c H L Eドメインのような、本発明による第三のドメインを含む二重特異性抗体構築物に特に当てはまる。

10

## 【 0 0 6 6 】

好ましくは、凍結状態で貯蔵する薬学的組成物は、p H 4.0 ~ 6.5、好ましくは4.2 ~ 4.8の範囲のp Hを有する。患者に投与する前に、より良いi . v .適合性のために、p Hを上げ得る。しかしながら、典型的には、医薬組成物は、投与前に賦形剤などの特定の成分を除去する必要なく使用することができる。従って、例えば凍結状態での貯蔵の間、物理的安定化剤として機能した保存剤は、任意で希釈及び/またはp H調整後に、液体投与医薬組成物中で安定化剤としてその後作用することができ、また本発明による医薬組成物の微生物学的安定性を保証するための保存剤として働くことができる。

20

## 【 0 0 6 7 】

新しい氷/溶液界面の生成、容器表面への吸着、タンパク質及び溶質の凍結濃縮、ならびに緩衝液成分の結晶化によるp H変化などの複雑な物理的及び化学的变化によって、凍結/解凍中にタンパク質の変性及び凝集が起こり得る。

30

## 【 0 0 6 8 】

タンパク質濃度の増加もまた、タンパク質凝集体の形成を促進し得る。高タンパク質濃度では、高分子溶質による高い全体積占有がその溶液中の各高分子種の挙動に与える影響を表す用語である、高分子クラウディングが生じる。この排除体積理論によれば、自己組織化、したがって潜在的に凝集が促進される可能性がある。

## 【 0 0 6 9 】

ベンジルアルコール及びフェノールなどの抗菌性保存剤は、保存期間中の無菌性を確実にするために、多くの場合、液体製剤中に必要であることが既知であり、また、それに加えて、多回投与製剤及びある種の薬物送達システム、例えば注射ペン、ミニポンプ及び局所塗布において必要である。多くの保存剤が、タンパク質の凝集を誘導すると報告されているが、根本的なメカニズムは十分に理解されていない。保存剤が、凝集しやすい折り畳まれていないタンパク質状態に結合し、そこを占有するとの説が提唱されている。

40

## 【 0 0 7 0 】

利点として、本発明の医薬組成物は、安定であること、すなわちストレス、特に熱ストレス、貯蔵、表面誘発ストレス(例えば凍結/融解サイクル、発泡)、濃縮(限外濾過及びダイアフィルトレーションによる)、または抗菌保存剤などの有機化合物との混合にさらされても、タンパク質凝集体を含まないかまたは実質的に含まないと考えられる。好ましくは、医薬組成物は、添付の実施例において評価した低p Hを有する組成物に比べて、同様の特性または向上した特性を有していてもよい。本発明の医薬組成物は、好ましくは

50

、半減期が延長された、分散した単量体型二重特異性一本鎖抗体構築物などのタンパク質ベースの医薬品の均質な溶液である。

【0071】

当業者であれば、医薬組成物が有効成分の安定化を効果的に提供する（すなわち、二重特異性一本鎖抗体構築物のタンパク質凝集体の形成を低減または阻害する）場合でさえ、いくつかの凝集体または配座異性体の場合によっては形成され得るものの、医薬組成物の全体的な有用性を実質的に損なうことはないことを認識するであろう。この場合、凝集体を「実質的に含まない」とは、特に、例えば添付の実施例で評価するような環境ストレスにさらされている場合においても、凝集体の量が、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%または1%（w/v）未満にとどまることを意味する。

10

【0072】

可溶性及び不溶性タンパク質凝集体の存在を判定するための方法は、とりわけ、Mahler et al., J Pharm Sci. 2009 Sep; 98(9): 2909-34に概説されている。可溶性タンパク質凝集体の形成は、添付の実施例に記載のように、サイズ排除超高速液体クロマトグラフィー（SEC-ULC）によって評価することができる。SECは、タンパク質凝集体の検出及び定量のために最もよく使用される分析方法の1つである。SEC分析により、凝集体のサイズ決定、及びその定量化の両方が可能になる。SEC-ULCは、約5~1000 kDaの分子量範囲におけるそれらの形状及びサイズ（流体力学的半径）に基づいて高分子の選択的かつ迅速な分離を可能にする。

20

【0073】

タンパク質溶液は、不透過率または濁度と呼ばれる光学特性を示す。溶液の光学特性は、光を散乱し且つ光を吸収する、存在する粒子の関数である。タンパク質は天然のコロイドであり、水性製剤の濁度は、タンパク質濃度、非溶解粒子の存在、粒径及び体積単位当たりの粒子数に依存する。濁度は、340~360 nmの範囲の光学密度としてUV-VIS分光法によって測定することができ、可溶性及び不溶性凝集体の両方を検出するために使用することができる。

【0074】

さらに、視覚的手段による試料の検査は、なおタンパク質凝集体を評価する重要な側面である。目に見える凝集体の有無の目視評価は、Deutscher Arzneimittel Codex (DAC) 試験5に従って行うことが好ましい。

30

【0075】

本明細書の他の箇所に記載されているように、本発明の医薬組成物は、おそらくは低pHの作用及び場合によりそれに含まれるさらなる安定化剤の作用により、二重特異性一本鎖抗体構築物のコロイド安定性の増加を選好し、したがって液-液相分離（LLPS）の低下を示すか、またはまったく示さない。LLPSは、熱力学的に駆動される現象であり、均質なタンパク質溶液が、温度の低下に伴って、タンパク質欠乏相（通常は最上層）及びタンパク質が豊富な相（通常は最下層）に分離する。LLPSは、通常、単に2つの相を混合し、溶液の温度を上げることによって、完全に可逆的となる。LLPSの発生は、短距離での誘引性のタンパク質-タンパク質相互作用に起因しており、タンパク質-タンパク質間の誘引力の強さの尺度となっている。本発明による $\alpha$ -シクロデキストリンを含有する医薬組成物は、 $\alpha$ -シクロデキストリンを含有しない医薬組成物に比べて、LLPSタンパク質欠乏相において二重特異性一本鎖抗体構築物を高濃度で含むことが見出されている。したがって、本発明の医薬組成物は、対照に比べて少ないLLPSを示すか、またはLLPSをまったく示さないことが想定され、したがって本発明の二重特異性一本鎖抗体構築物のコロイド安定性の増加を促進する。LLPSは誘導可能であり、添付の実施例に記載のように、異なる相のタンパク質含量を調べることができる。

40

【0076】

環境ストレスは、特に、熱変性及び/または化学変性に起因して、立体構造変化をもたらし得、このことが、今度は凝集に有利に働き得る。驚くべきことに、本発明者らは、二

50

重特異性一本鎖抗体構築物も、芳香族アミノ酸の自家蛍光の発光強度を測定することによって評価される立体構造変化に関して安定であることを見出した。したがって、本発明の医薬組成物は、好ましくは、配座異性体（すなわち、非天然の、異常に折りたたまれたタンパク質種）の形成を低減または阻害する。

#### 【0077】

先に説明したように、本発明の安定な医薬組成物は、第一の結合ドメインを介して標的細胞表面抗原に結合し、第二の結合ドメインを介してT細胞表面抗原CD3に結合する二重特異性一本鎖抗体構築物を含む。

#### 【0078】

用語「抗体構築物」とは、抗体の構造及び／または機能、例えば全長すなわち免疫グロブリン分子全体の構造及び／または機能に基づく分子及び／または抗体またはその断片の可変重鎖（VH）及び／または可変軽鎖（VL）ドメインから導出される分子を指す。したがって、抗体構築物は、その特定の標的または抗原に結合することができる。さらに、本発明による抗体構築物の結合ドメインは、標的結合を可能にする抗体の最小構造要件を含む。この最小要件は、例えば、少なくとも3つの軽鎖CDR（すなわち、VL領域のCDR1、CDR2及びCDR3）及び／または3つの重鎖CDR（すなわち、VH領域のCDR1、CDR2及びCDR3）、好ましくは6つすべてCDRの存在によって定義してもよい。抗体の最小構造要件を定義する別のアプローチは、それぞれ、特異的標的の構造内の抗体のエピトープの定義、エピトープ領域を構成する標的タンパク質のタンパク質ドメイン（エピトープクラスター）、または定義する抗体のエピトープと競合する特異的抗体への参照によるものである。本発明による構築物の由来元の抗体は、例えば、モノクローナル抗体、組換え抗体、キメラ抗体、脱免疫化抗体、ヒト化抗体及びヒト抗体を含む。

#### 【0079】

本発明による抗体構築物の結合ドメインは、例えば、上記CDRの群を含み得る。好ましくは、これらのCDRは、抗体軽鎖可変領域（VL）及び抗体重鎖可変領域（VH）のフレームワークに含まれるが；ただし、両方を含む必要はない。例えば、Fdフラグメントは2つのVH領域を有し、しばしば完全な抗原結合ドメインのいくつかの抗原結合機能を保持する。抗体断片、抗体変異体または結合ドメインのフォーマットのさらなる例として、（1）VL、VH、CL及びCH1ドメインを有する一価断片であるFabフラグメント；（2）ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結する2つのFabフラグメントを有する二価断片であるF(ab)<sub>2</sub>フラグメント；（3）2つのVH及びCH1ドメインを有するFdフラグメント；（4）抗体の単一アームのVL及びVHドメインを有するFvフラグメント；（5）VHドメインを有するdAbフラグメント（Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546）；（6）単離された相補性決定領域（CDR）、ならびに（7）一本鎖Fv（scFv）が挙げられ、後者が好ましい（例えば、scFvライブラリー由来）。本発明による抗体構築物の実施形態の例として、例えば、WO00/006605、WO2005/040220、WO2008/119567、WO2010/037838、WO2013/026837、WO2013/026833、US2014/0308285、US2014/0302037、WO2014/144722、WO2014/151910、及びWO2015/048272に記載されている。

#### 【0080】

また、VH、VHH、VL、（s）dAb、Fv、Fd、Fab、Fab<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>または「rIgG」（「半抗体」）などの全長抗体の断片である「結合ドメイン」または「結合するドメイン」もまた、定義の範囲内にある。scFv、di-scFvまたはbi（s）-scFv、scFv-Fc、scFvジッパー、scFab、Fab<sub>2</sub>、Fab<sub>3</sub>、ダイアボディ、一本鎖ダイアボディ、タンデムダイアボディ（Tandab）、タンデム-ジscFv、タンデム-トリscFv、トリアボディまたはテトラボディなどの「多重特異性抗体」、及びナノボディのような単ドメイン抗体、または他のV領域もしくはドメインとは独立して抗原もしくはエピトープに特異的に結合するVHH、

VHもしくはVLであり得るただ一つの可変ドメインを有する単一可変ドメイン抗体などの、抗体改変体とも呼ばれる抗体の改変断片をも含み得る。

【0081】

本明細書中で使用する場合、用語「一本鎖Fv」、「一本鎖抗体」または「scFv」とは、重鎖及び軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域を欠失している一本鎖ポリペプチド抗体断片を指す。通常、一本鎖抗体は、VH及びVLドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含み、抗原結合を可能にする所望の構造を形成可能にする。一本鎖抗体は、Pluckthunにより、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994)に記載されている。一本鎖抗体を産生する様々な方法が公知であり、米国特許第4,694,778号及び第5,260,203号；国際特許出願公開WO 88/01649；Bird (1988) Science 242:423-442；Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883；Ward et al. (1989) Nature 334:54454；Skerra et al. (1988) Science 242:1038-1041に記載されているものが挙げられる。特定の実施形態では、一本鎖抗体は、二重特異性、多重特異性、ヒト、及び/またはヒト化及び/または合成抗体であり得る。

10

【0082】

さらに、用語「抗体構築物」の定義には、別個の結合ドメインを介して、一価、二価及び多価 (polyvalent) / 多価 (multivalent) 構築物、したがって2つのみの抗原性構造に特異的に結合する二重特異性構築物、ならびに2つより多くの、例えば3つ、4つまたはそれ以上の抗原性構造に特異的に結合する多特異性 / 多重特異性構築物が含まれる。さらに、用語「抗体構築物」の定義には、1つのポリペプチド鎖のみからなる分子、ならびに同一鎖 (ホモ二量体、ホモ三量体またはホモオリゴマー) または異なる鎖 (ヘテロ二量体、ヘテロ三量体またはヘテロオリゴマー) であり得る、1つより多くのポリペプチド鎖からなる分子が含まれる。上記の同定した抗体及びその変異体または誘導体の例は、とりわけ、Harlow and Lane, Antibodies a laboratory manual, CSHL Press (1988) 及び Using Antibodies: a laboratory manual, CSHL Press (1999), Kontermann and Dubel, Antibody Engineering, Springer, 2nd ed. 2010ならびに Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009に記載されている。

20

30

【0083】

本明細書中で使用する用語「二重特異性」とは、「少なくとも二重特異性」である、すなわち、少なくとも第一の結合ドメイン及び第二の結合ドメインを有し、第一の結合ドメインが一つの抗原または標的 (本明細書では：標的細胞表面抗原) に結合し、第二の結合ドメインが別の抗原または標的 (本明細書では：CD3) に結合する抗体構築物を指す。したがって、本発明による抗体構築物は、少なくとも2つの異なる抗原または標的に対する特異性を有する。例えば、第一のドメインは、好ましくは、本明細書に記載の1つ以上の種のCD3の細胞外エピトープに結合しない。用語「標的細胞表面抗原」とは、細胞が発現し、本明細書に記載の抗体構築物が接近可能であるように細胞表面に存在する抗原性構造を指す。それは、タンパク質、好ましくはタンパク質の細胞外部分、または糖鎖構造、好ましくは糖タンパク質などのタンパク質の炭水化物構造であってもよい。それは、好ましくは腫瘍抗原である。本発明の用語「二重特異性抗体構築物」は、例えば、3つの結合ドメインを有する三重特異性抗体構築物、または3つより多く (例えば、4つ、5つ...) の特異性を有する構築物などの多重特異性抗体構築物も包含する。

40

【0084】

本発明による抗体構築物が (少なくとも) 二重特異性であるとすれば、それらは天然に

50

存在せず、それらは天然産物と顕著に異なる。したがって、「二重特異性」抗体構築物または免疫グロブリンは、異なる特異性を有する少なくとも2つの異なる結合サイトを有する人工ハイブリッド抗体または免疫グロブリンである。二重特異性抗体構築物は、ハイブリドーマの融合またはFab フラグメントの連結を含む様々な方法によって產生することができる。例えば、Song s i v i l a i & L a c h m a n n , C l i n . E x p . I m m u n o l . 7 9 : 3 1 5 - 3 2 1 ( 1 9 9 0 ) 参照。

【0085】

本発明の抗体構築物の少なくとも2つの結合ドメイン及び可変ドメイン(VH/VL)は、ペプチドリンカー(スパーサーペプチド)を含んでも含まなくてもよい。本発明によれば、用語「ペプチドリンカー」には、本発明の抗体構築物の1つの(可変及び/または結合)ドメイン及び別の(可変及び/または結合)ドメインのアミノ酸配列を互いに連結するアミノ酸配列が含まれる。ペプチドリンカーはまた、本発明の抗体構築物の他のドメインに第三のドメインを融合させるために使用してもよい。そのようなペプチドリンカーの本質的な技術的特徴は、いかなる重合活性も有さないことである。適切なペプチドリンカーには、米国特許第4,751,180号及び第4,935,233号またはWO88/09344に記載されているものがある。ペプチドリンカーはまた、他のドメインまたはモジュールまたは領域(半減期延長ドメインなど)を本発明の抗体構築物に結合させるために使用することもできる。

【0086】

本発明の抗体構築物は、好ましくは、「in vitroで作製した抗体構築物」である。この用語は、抗原結合能力について候補配列を試験することができる非免疫細胞選別法、例えばin vitroファージディスプレイ、プロテインチップまたは任意の他の方法において可変領域(例えば、少なくとも1つのCDR)の全部または一部を生成する、上記定義による抗体構築物を指す。したがって、この用語は、好ましくは、動物の免疫細胞におけるゲノム再編成によってのみ生成される配列を排除する。「組換え抗体」とは、組換えDNA技術または遺伝子工学を用いて作製した抗体である。

【0087】

本明細書中で使用する用語「モノクローナル抗体」(mAb)またはモノクローナル抗体構築物とは、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団からなる個々の抗体が、可能な天然起源の突然変異及び/または少量で存在し得る翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化)以外は同一であることを意味する。通常、異なる決定基(またはエピトープ)に対する異なる抗体を含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体は、抗原上の単一の抗原サイトまたは決定基に対して高度に特異的である。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養によって合成され、したがって他の免疫グロブリンの混入がないという点で有利である。修飾語「モノクローナル」とは、抗体の実質的に均質な集団から得られる抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の產生を必要とするとは解釈されない。

【0088】

モノクローナル抗体の調製のために、連続細胞株培養によって產生される抗体を提供する任意の技術を使用することができる。例えば、使用するモノクローナル抗体は、Koe h l e r e t a l . , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 ( 1 9 7 5 ) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製してもよく、または組換えDNA法によって作製してもよい(例えば、米国特許第4,816,567号参照)。ヒトモノクローナル抗体を產生するさらなる技術の例として、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(K o z b o r , I m m u n o l o g y T o d a y 4 ( 1 9 8 3 ) , 7 2 ) 及びEBVハイブリドーマ技術(C o l e e t a l . , M o n o c l o n a l A n t i b o d i e s a n d C a n c e r T h e r a p y , A l a n R . L i s s , I n c . ( 1 9 8 5 ) , 7 7 - 9 6 ) が挙げられる。

【0089】

次いで、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及び表面プラズモン共鳴(BIAC

10

20

30

40

50



ORE (商標)) 分析などの標準的な方法を用いてハイブリドーマをスクリーニングし、特定の抗原と特異的に結合する抗体を産生する1つ以上のハイブリドーマを同定することができる。関連抗原の任意の形態、例えば、組換え抗原、天然起源の形態、その任意の変異体または断片、ならびにその抗原ペプチドを免疫原として使用してもよい。BIAcore システムで用いられる表面プラズモン共鳴を使用して、標的細胞表面抗原のエピトープに結合するファージ抗体の効率を高めることができる (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13)。

【0090】

モノクローナル抗体を作製する別の例示的な方法は、タンパク質発現ライブラリー、例えばファージディスプレイまたはリボソームディスプレイライブラリーをスクリーニングすることを含む。ファージディスプレイは、例えば、Ladner et al., U.S. Patent No. 5,223,409; Smith (1985) Science 228:1315-1317, Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 及び Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)。

【0091】

ディスプレイライブラリーの使用に加えて、関連する抗原を用いて、非ヒト動物、例えばげっ歯類 (例えば、マウス、ハムスター、ウサギまたはラット) を免疫化することができる。一実施形態では、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、ヒトIg (免疫グロブリン) 遺伝子座のラージフラグメントを用いて、マウス抗体産生が欠損したマウス株を操作することが可能である。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する遺伝子に由来する抗原特異的モノクローナル抗体を産生し、選択してもよい。例えば、XENOMOUSE (商標)、Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21、US2003-0070185、WO96/34096、及びWO96/33735 参照。

【0092】

モノクローナル抗体はまた、非ヒト動物から取得し、次いで当該技術分野で公知の組換えDNA技術を用いて、例えば、ヒト化抗体、脱免疫化抗体、キメラ抗体などに改変可能である。改変された抗体構築物の例として、非ヒト抗体のヒト化変異体、「親和性成熟」抗体 (例えば Hawkins et al., J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) 及び Lowman et al., Biochemistry 30, 10832-10837 (1991) 参照)、ならびにエフェクター機能 (複数可) を改変した抗体変異体 (例えば、米国特許第5,648,260号、Kontermann and Dubel (2010)、前掲、及び Little (2009)、前掲、参照) が挙げられる。

【0093】

免疫学において、親和性成熟とは、B細胞が、免疫応答の過程で抗原に対する親和性を増大させた抗体を産生するプロセスである。同じ抗原への反復的な曝露により、宿主は連続的により大きな親和性の抗体を産生する。天然プロトタイプと同様に、in vitroでの親和性成熟は、突然変異及び選択の原理に基づいている。in vitroでの親和性成熟は、抗体、抗体構築物、及び抗体断片の最適化に首尾よく用いられている。CDR内部におけるランダム突然変異は、放射線、化学変異原またはエラープローンPCRを用いて導入する。さらに、鎖シャッフリングによって遺伝子多様性を増加させることができる。ファージディスプレイなどのディスプレイ法を用いた2~3ラウンドの突然変異及び選択は、通常、低いナノモル範囲の親和性を有する抗体断片を生じる。

【0094】

抗体構築物のアミノ酸置換変異の好ましいタイプは、親抗体 (例えば、ヒト化またはヒト抗体) の1つ以上の超可変領域残基を置換することを含む。一般的に、さらなる開発のために選択して得られた変異体 (複数可) は、それらを生成した親抗体に比べて向上した

10

20

30

40

50

生物学的特性を有するであろう。そのような置換変異体を生成するための簡便な方法は、ファージディスプレイを用いた親和性成熟を含む。簡潔に述べると、いくつかの超可変領域サイド（例えば、6～7サイド）に突然変異を導入し、各サイドですべての可能なアミノ酸置換を生成する。このようにして生成した抗体変異体を、各粒子内にパッケージングしたM13の遺伝子産物に対する融合物として繊維状ファージ粒子から一価の様式で提示する。次いで、ファージディスプレイした変異体を、本明細書に開示するように、それらの生物学的活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域サイドを同定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発を行って、抗原結合に有意に寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは、またはそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して、結合ドメインと、例えばヒト標的細胞表面抗原との間の接触点を同定することが有益であり得る。そのような接触残基及び隣接残基は、本明細書に詳述する技術による置換の候補である。そのような変異体が生成したならば、変異体のパネルを本明細書に記載するようなスクリーニングに供し、1つ以上の関連するアッセイにおいて優れた特性を有する抗体を、さらなる開発のために選択してもよい。

#### 【0095】

本発明のモノクローナル抗体及び抗体構築物は、具体的には、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）を含み、そこにおいては、重鎖及び/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一もしくは相同である一方で、残りの鎖（複数可）は、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一もしくは相同であり、ならびに所望の生物学的活性を示す限りにおいてそのような抗体の断片についても同様である（米国特許第4,816,567号；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本明細書で対象とするキメラ抗体として、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル、類人猿など）及びヒト定常領域配列に由来する可変ドメイン抗原結合配列を有する「霊長類化（primitized）」抗体が挙げられる。キメラ抗体を作製するための様々なアプローチが記載されている。例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985；Takeda et al., Nature 314:452, 1985；Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,397；Boss et al., U.S. Patent No. 4,816,397；Tanaguchi et al., EP0171496；EP0173494；及びGB2177096。

#### 【0096】

抗体、抗体構築物、抗体断片または抗体変異体はまた、例えば、WO98/52976またはWO00/34317に開示されている方法による、ヒトT細胞エпитープの特異的欠失（「脱免疫」と呼ばれる方法）によって改変することができる。簡潔に述べると、抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメインを、MHCクラスIIに結合するペプチドについて分析することができ；これらのペプチドは、潜在的なT細胞エпитープを表す（WO98/52976及びWO00/34317に定義されているように）。潜在的なT細胞エпитープの検出のために、「ペプチドスレッディング」と呼ばれるコンピューターモデリングアプローチを適用することができ、さらに、WO98/52976及びWO00/34317に記載されているように、ヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースを、VH及びVL配列に存在するモチーフに関して検索することができる。これらのモチーフは、18種の主要なMHCクラスII DRアロタイプのいずれかに結合し、したがって潜在的なT細胞エпитープを構成する。検出した潜在的なT細胞エпитープは、可変ドメイン中の少数のアミノ酸残基を置換することによって、または好ましくは単一のアミノ酸置換によって除去することができる。一般的には、保存的置換を行う。限定するものではないが、多くの場合、ヒト生殖系列抗体配列の位置に共通のアミノ酸を使用してもよい。ヒト生殖系列の配列は、例えば、Tomlinson, et al. (1992) J. Mo

10

20

30

40

50

I . B i o l . 2 2 7 : 7 7 6 - 7 9 8 ; C o o k , G . P . e t a l . ( 1 9 9 5 )  
I m m u n o l . T o d a y V o l . 1 6 ( 5 ) : 2 3 7 - 2 4 2 ; 及び T o m l i n  
s o n e t a l . ( 1 9 9 5 ) E M B O J . 1 4 : 1 4 : 4 6 2 8 - 4 6 3 8 に開示  
されている。V B A S E ディレクトリは、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的な  
ディレクトリを提供する ( T o m l i n s o n , L A . e t a l . M R C C e n t r e  
f o r P r o t e i n E n g i n e e r i n g , C a m b r i d g e , U K によ  
つてコンパイルされている ) 。これらの配列は、例えばフレームワーク領域及び C D R のた  
めのヒト配列の供給源として使用することができる。例えば、米国特許第 6 , 3 0 0 , 0  
6 4 号に記載されているように、コンセンサスのヒトフレームワーク領域を使用すること  
もできる。

10

#### 【 0 0 9 7 】

「ヒト化」抗体、抗体構築物、変異体またはその断片 ( F v 、 F a b 、 F a b 、 F ( a b ) 2 または抗体の他の抗原結合部分配列のような ) は、大部分がヒト配列の抗体または免疫グロブリンであり、( a ) 非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列 ( 複数可 ) を有する。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域 ( C D R も ) 由来の残基が、所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト ( 例えば、げっ歯類 ) 種、例えば、マウス、ラット、ハムスターまたはウサギなどの種 ( ドナー抗体 ) の超可変領域由来の残基によって置換された、ヒト免疫グロブリン ( レシピエント抗体 ) である。いくつかの場合には、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク領域 ( F R ) 残基を、対応する非ヒト残基によって置換する。さらに、本明細書中で使用する場合、「ヒト化抗体」は、レシピエント抗体またはドナー抗体のいずれにも見出されない残基も含む場合がある。これらの改変は、抗体性能をさらに改良し、最適化するために行われる。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域 ( F c ) 、一般的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む場合がある。さらなる詳細については、J o n e s e t a l . , N a t u r e , 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ( 1 9 8 6 ) ; R e i c h m a n n e t a l . , N a t u r e , 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 9 ( 1 9 8 8 ) ; 及び P r e s t a , C u r r . O p . S t r u c t . B i o l . , 2 : 5 9 3 - 5 9 6 ( 1 9 9 2 ) 参照。

20

#### 【 0 0 9 8 】

ヒト化抗体またはその断片は、抗原結合に直接関与しない F v 可変ドメインの配列を、ヒト F v 可変ドメイン由来の等価な配列で置換することによって作製することができる。ヒト化抗体またはその断片を生成するための例示的な方法は、M o r r i s o n ( 1 9 8 5 ) S c i e n c e 2 2 9 : 1 2 0 2 - 1 2 0 7 によって ; O i e t a l . ( 1 9 8 6 ) B i o T e c h n i q u e s 4 : 2 1 4 によって ; ならびに U S 5 , 5 8 5 , 0 8 9 ; U S 5 , 6 9 3 , 7 6 1 ; U S 5 , 6 9 3 , 7 6 2 ; U S 5 , 8 5 9 , 2 0 5 ; 及び U S 6 , 4 0 7 , 2 1 3 によって提供されている。これらの方法は、重鎖または軽鎖の少なくとも 1 つに由来する免疫グロブリン F v 可変ドメインの全部または一部をコードする核酸配列を単離、操作、及び発現することを含む。そのような核酸は、上記のような所定の標的に対する抗体を産生するハイブリドーマから、ならびに他の供給源から取得してもよい。次いで、ヒト化抗体分子をコードする組換え DNA を適切な発現ベクターにクローニングすることができる。

30

40

#### 【 0 0 9 9 】

ヒト化抗体はまた、トランスジェニック動物、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現するが、内在性マウス免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができないマウスなどを用いて産生してもよい。W i n t e r は、本明細書に記載するヒト化抗体を調製するために使用してもよい例示的な C D R 移植法を記載している ( 米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号 ) 。特定のヒト抗体のすべての C D R を、非ヒト C D R の少なくとも一部で置換してもよく、または C D R の一部のみを非ヒト C D R と置換してもよい。所定の抗原へのヒト化抗体の結合に必要なとされる数の C D R を置き換えるだけでよい。

#### 【 0 1 0 0 】

ヒト化抗体は、保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖系列置換及び / または逆突然

50

変異の導入によって最適化することができる。そのような改変型免疫グロブリン分子は、当該分野で公知のいくつかの技術のいずれかによって作製することができる（例えば、Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982, 及びEP239400）。

【0101】

用語「ヒト抗体」、「ヒト抗体構築物」及び「ヒト結合ドメイン」には、抗体、抗体構築物、ならびに、例えば、Kabatt et al. (1991) (前掲)に記載されているような当該分野で公知の実質的にヒト生殖系列免疫グロブリン配列に対応する可変及び定常領域またはドメインなどの抗体領域を有する結合ドメインが含まれる。本発明のヒト抗体、抗体構築物または結合ドメインは、例えばCDR、特にCDR3中に、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、in vitroでのランダムまたはサイド特異的突然変異誘発またはin vivoでの体細胞突然変異によって導入した変異）を有する場合がある。ヒト抗体、抗体構築物または結合ドメインは、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基で置換された少なくとも1、2、3、4、5、またはそれ以上の位置を有することができる。しかしながら、本明細書中で使用する場合、ヒト抗体、抗体構築物及び結合ドメインの定義はまた、ゼノマウスなどの技術または系を用いて誘導可能な、非人工的及び/または遺伝的に改変した抗体のヒト配列のみを有する「完全ヒト抗体」を意図している。好ましくは、「完全ヒト抗体」は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基を含まない。

【0102】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体構築物は、「単離された」または「実質的に純粋な」抗体構築物である。本明細書中に開示する抗体構築物を記載するために使用する場合、「単離された」または「実質的に純粋な」とは、その産生環境の成分から同定、分離、及び/または回収した抗体構築物を意味する。好ましくは、抗体構築物は、その産生環境からの他のすべての成分と遊離または実質的に会合しない。その産生環境の混入成分、例えば、組換え形質移入した細胞に由来する成分は、通常、ポリペプチドの診断的または治療的使用を妨げるであろう物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。抗体構築物は、例えば、所与の試料中の総タンパク質の少なくとも約5重量%、または少なくとも約50重量%を構成し得る。単離されたタンパク質は、状況に応じて、総タンパク質含量の5重量%~99.9重量%を構成し得ると考えられる。誘導可能なプロモーターまたは高発現プロモーターを使用することによって、ポリペプチドを有意により高い濃度で作製してもよく、それにより、ポリペプチドは高い濃度レベルで作製される。この定義には、当該技術分野で公知の多種多様な生物及び/または宿主細胞における抗体構築物の産生が含まれる。好ましい実施形態では、抗体構築物を、(1)スピニングカップ配列決定装置の使用によって少なくとも15残基のN末端もしくは内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで、または(2)クーマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を使用して、非還元もしくは還元条件下で行うSDS-PAGEによって均質になるまで、精製する。しかしながら、通常は、少なくとも1つの精製工程によって、単離された抗体構築物を調製する。

【0103】

用語「結合ドメイン」は、本発明に関連して、所与の標的エピトープまたは標的分子（抗原）の所与の標的サイド、例えば、それぞれ、CD33及びCD3上に（特異的に）結合/相互作用/認識するドメインを特徴とする。第一の結合ドメインの構造及び/または機能（例えばCD33を認識する）、及び好ましくは第二の結合ドメインの構造及び/または機能（CD3を認識する）もまた、抗体、例えば、全長すなわち免疫グロブリン分子全体の構造及び/または機能に基づいており、及び/または、抗体の可変重鎖（VH）及び/または可変軽鎖（VL）ドメインまたはその断片から導出される。好ましくは、第一

の結合ドメインは、3つの軽鎖CDR（すなわち、VL領域のCDR1、CDR2及びCDR3）及び/または3つの重鎖CDR（すなわち、VH領域のCDR1、CDR2及びCDR3）の存在を特徴とする。第二の結合ドメインは、好ましくは、標的結合を可能にする抗体の最小構造要件も含む。より好ましくは、第二の結合ドメインは、少なくとも3つの軽鎖CDR（すなわち、VL領域のCDR1、CDR2及びCDR3）及び/または3つの重鎖CDR（すなわち、VH領域のCDR1、CDR2及びCDR3）を含む。第一及び/または第二の結合ドメインは、既存の（モノクローナル）抗体由来のCDR配列を骨格に移植するのではなく、ファージディスプレイまたはライブラリスクリーニング法によって産生されるかまたは入手可能であると考えられる。

#### 【0104】

本発明によれば、結合ドメインは、1つ以上のポリペプチドの形態である。そのようなポリペプチドは、タンパク質性部分及び非タンパク質性部分（例えば、化学的リンカーまたはグルタルアルデヒドのような化学的架橋剤）を含む場合がある。タンパク質（その断片、好ましくは生物学的に活性な断片、及び通常30アミノ酸未満のペプチドを含む）は、共有ペプチド結合（アミノ酸の鎖を生じる）を介して互いに結合した2つ以上のアミノ酸を含む。

#### 【0105】

本明細書中で使用する用語「ポリペプチド」は、通常30個を超えるアミノ酸からなる分子群を記述する。ポリペプチドは、二量体、三量体及びより高次のオリゴマー、すなわち1残基を超えるポリペプチド分子からなる多量体をさらに形成する場合がある。そのような二量体、三量体などを形成するポリペプチド分子は、同一でも異なってもよい。したがって、そのような多量体の対応する高次構造は、ホモまたはヘテロ二量体、ホモまたはヘテロ三量体などと呼ばれる。ヘテロ多量体の一例は抗体分子であり、その天然に存在する形態では2つの同一の軽ポリペプチド鎖及び2つの同一の重鎖ポリペプチド鎖からなる。用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」はまた、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などの翻訳後修飾によってもたらされた天然起源の修飾ペプチド/ポリペプチド/タンパク質も指す。本明細書中で言及する場合、「ペプチド」、「ポリペプチド」または「タンパク質」はまた、ペグ化などの化学修飾であってもよい。そのような改変は、当該技術分野において周知であり、本明細書において以下に記載される。

#### 【0106】

好ましくは、標的細胞表面抗原に結合する結合ドメイン及び/またはCD3に結合する結合ドメインは、ヒト結合ドメインである。少なくとも1つのヒト結合ドメインを有する抗体及び抗体構築物は、げっ歯類（例えばネズミ、ラット、ハムスターまたはウサギ）可変及び/または定常領域のような非ヒト型を保有する抗体または抗体構築物に関連する問題のいくつかを回避する。そのようなげっ歯類由来タンパク質が存在することにより、抗体もしくは抗体構築物の迅速なクリアランスが生じ得るか、または患者による抗体もしくは抗体構築物に対する免疫応答が生じ得る。げっ歯類由来の抗体または抗体構築物の使用を避けるために、げっ歯類に完全なヒト抗体を産生させるようにヒト抗体機能をげっ歯類に導入することにより、ヒトすなわち完全ヒト抗体/抗体構築物を作製することができる。

#### 【0107】

メガベースサイズのヒト遺伝子座をYACにおいてクローニング及び再構成し、それらをマウス生殖系列に導入する能力は、非常に広大にまたは粗くマッピングした遺伝子座の機能的構成要素を解明し、ならびにヒト疾患の有用なモデルを生成する強力なアプローチを提供する。さらに、マウス遺伝子座をそれらのヒト等価物で置換するためのそのような技術の使用は、発生中のヒト遺伝子産物の発現及び調節、他のシステムとのそれらの情報伝達、ならびに疾患の誘導及び進行へのそれらの関与に関するユニークな洞察を提供し得る。

#### 【0108】

そのような戦略の重要な実的な応用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。内在性 I g 遺伝子を不活性化したマウスへのヒト免疫グロブリン ( I g ) 遺伝子座の導入によって、プログラム化された発現及び抗体の組立ての背景にあるメカニズムならびに B 細胞発生におけるそれらの役割を研究する機会が得られる。さらに、そのような戦略は、ヒト疾患における抗体治療の展望を開くための重要なマイルストーンである、完全ヒトモノクローナル抗体 ( m A b ) の生産の理想的な供給源を提供することができる。完全なヒト抗体または抗体構築物は、マウスまたはマウス誘導化 m A b に固有の免疫原性及びアレルギー性反応を最小限に抑え、したがって投与した抗体 / 抗体構築物の有効性及び安全性を高めることが期待される。完全なヒト抗体または抗体構築物を使用することにより、化合物の反復投与を必要とする炎症、自己免疫、及び癌などの慢性及び再発性のヒト疾患の治療において実質的な利点を提供することが期待できる。

10

## 【 0 1 0 9 】

この目標のための 1 つのアプローチは、そのようなマウスがマウス抗体の非存在下で多くのレパートリーのヒト抗体を産生することを想定して、ヒト I g 遺伝子座のラージフラグメントを用いてマウス抗体の産生を欠損したマウス株を操作することであった。ヒト I g ラージフラグメントは、大きな可変遺伝子多様性ならびに抗体産生及び発現の適切な調節を保持しているであろう。抗体の多様化及び選択のためのマウス機構、ならびにヒトタンパク質に対する免疫学的寛容の欠如を利用することにより、これらのマウス株において複製されるヒト抗体レパートリーは、ヒト抗原を含む任意の目的の抗原に対する高親和性抗体を産生するはずである。ハイブリドーマ技術を使用して、所望の特異性を有する抗原特異的ヒト m A b を容易に作製し選択することができた。この一般的な戦略は、最初の X e n o M o u s e マウス株の生成と関連して実証された ( G r e e n e t a l . N a t u r e G e n e t i c s 7 : 1 3 - 2 1 ( 1 9 9 4 ) 参照 ) 。 X e n o M o u s e 株は、それぞれ、コア可変及び定常領域配列を含むヒト重鎖遺伝子座及び 軽鎖遺伝子座の 2 4 5 k b 及び 1 9 0 k b サイズの生殖系列構成断片を含む、酵母人工染色体 ( Y A C ) を用いて操作された。ヒト I g 含有 Y A C は、抗体の再構成及び発現の両方に対してマウス系と適合性があることが証明され、不活化マウス I g 遺伝子を置換することができた。これは、B 細胞発生を誘導し、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを作製し、抗原特異的ヒト m A b を生成する能力によって示された。これらの結果はまた、より多くの V 遺伝子、追加の調節要素、及びヒト I g 定常領域を含むヒト I g 遺伝子座のより大きな部分を導入することによって、感染及び免疫化に対するヒトの体液性応答の特徴である完全なレパートリーが実質的に再現される可能性を示唆した。G r e e n らの研究は、それぞれ、ヒト重鎖遺伝子座及び 軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの生殖細胞系列構成 Y A C フラグメントを導入することにより、ヒト抗体レパートリーのおよそ 8 0 % 超を導入するまでに最近拡張された。M e n d e z e t a l . N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 ( 1 9 9 7 ) 及び米国特許出願第 0 8 / 7 5 9 , 6 2 0 号参照。

20

30

## 【 0 1 1 0 】

X e n o M o u s e マウスの作製については、米国特許第 0 7 / 4 6 6 , 0 0 8 号、第 0 7 / 6 1 0 , 5 1 5 号、第 0 7 / 9 1 9 , 2 9 7 号、第 0 7 / 9 2 2 , 6 4 9 号、第 0 8 / 0 3 1 , 8 0 1 号、第 0 8 / 1 1 2 , 8 4 8 号、第 0 8 / 2 3 4 , 1 4 5 号、第 0 8 / 3 7 6 , 2 7 9 号、第 0 8 / 4 3 0 , 9 3 8 号、第 0 8 / 4 6 4 , 5 8 4 号、第 0 8 / 4 6 4 , 5 8 2 号、第 0 8 / 4 6 3 , 1 9 1 号、第 0 8 / 4 6 2 , 8 3 7 号、第 0 8 / 4 8 6 , 8 5 3 号、第 0 8 / 4 8 6 , 8 5 7 号、第 0 8 / 4 8 6 , 8 5 9 号、第 0 8 / 4 6 2 , 5 1 3 号、第 0 8 / 7 2 4 , 7 5 2 号、及び第 0 8 / 7 5 9 , 6 2 0 号；ならびに、米国特許第 6 , 1 6 2 , 9 6 3 号；第 6 , 1 5 0 , 5 8 4 号；第 6 , 1 1 4 , 5 9 8 号；第 6 , 0 7 5 , 1 8 1 号、及び第 5 , 9 3 9 , 5 9 8 号、ならびに日本国特許第 3 0 6 8 1 8 0 B 2 号、第 3 0 6 8 5 0 6 B 2 号、及び第 3 0 6 8 5 0 7 B 2 号において論じられ、記述されている。M e n d e z e t a l . N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 ( 1 9 9 7 ) 及び G r e e n a n d J a k o b o v i t s J . E x p . M e d . 1 8 8 : 4 8 3 - 4 9 5 ( 1 9 9 8 ) 、 E P 0 4 6 3 1 5 1 B 1 、 W O 9 4

40

50

/ 0 2 6 0 2、WO 9 6 / 3 4 0 9 6、WO 9 8 / 2 4 8 9 3、WO 0 0 / 7 6 3 1 0、及びWO 0 3 / 4 7 3 3 6も参照されたい。

【 0 1 1 1 】

別のアプローチでは、GenPharm International, Inc.を含む他の企業は、「ミニ遺伝子座」アプローチを利用している。ミニ遺伝子座アプローチでは、外来性Ig遺伝子座を、そのIg遺伝子座由来の断片（個々の遺伝子）を包含させることによって模倣する。したがって、1つ以上のVH遺伝子、1つ以上のDH遺伝子、1つ以上のJH遺伝子、mu定常領域、及び第二の定常領域（好ましくは 定常領域）を、動物への挿入のための構築物に形成する。このアプローチは、Suraniらの米国特許第5,545,807号、及び各々Lonberg及びKayの米国特許第5,545,806号；第5,625,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号；第5,770,429号；第5,789,650号；第5,814,318号；第5,877,397号；第5,874,299号；及び第6,255,458号、Krimpenfort及びBernsの米国特許第5,591,669号及び第6,023,010号、Bernsらの米国特許第5,612,205号；5,721,367；及び第5,789,215号、Choi及びDunnの米国特許第5,643,763号、ならびにGenPharm Internationalの米国特許出願第07/574,748号、第07/575,962号、第07/810,279号、第07/853,408号、第07/904,068号、第07/990,860号、第08/053,131号、第08/096,762号、第08/155,301号、第08/161,739号、第08/165,699号、第08/209,741号に記載されている。EP 0 5 4 6 0 7 3 B 1、WO 9 2 / 0 3 9 1 8、WO 9 2 / 2 2 6 4 5、WO 9 2 / 2 2 6 4 7、WO 9 2 / 2 2 6 7 0、WO 9 3 / 1 2 2 2 7、WO 9 4 / 0 0 5 6 9、WO 9 4 / 2 5 5 8 5、WO 9 6 / 1 4 4 3 6、WO 9 7 / 1 3 8 5 2、及びWO 9 8 / 2 4 8 8 4、ならびに米国特許第5,981,175号も参照されたい。さらにTaylor et al. (1992)、Chen et al. (1993)、Tuail lon et al. (1993)、Choi et al. (1993)、Lonberg et al. (1994)、Taylor et al. (1994)、及びTuail lon et al. (1995)、Fishwild et al. (1996)参照。

【 0 1 1 2 】

Kirinはまた、マイクロセル融合によって染色体の大部分または染色体全体を導入した、マウスからのヒト抗体の生成も示した。欧州特許出願第773288号及び第843961号参照。Xenerex Biosciencesは、ヒト抗体の潜在的な生成技術を開発している。この技術においては、SCIDマウスを、ヒトリンパ細胞、例えば、B細胞及び/またはT細胞で再構成する。次いで、マウスを抗原で免疫化し、その抗原に対する免疫応答を生じさせることができる。米国特許第5,476,996号；第5,698,767号；及び第5,958,765号参照。

【 0 1 1 3 】

ヒト抗マウス抗体（HAMA）応答が存在することから、業界はキメラ抗体またはヒト化抗体を調製する必要に迫られた。しかしながら、特に抗体の慢性的使用、または多回にわたる使用により、特定のヒト抗キメラ抗体（HACA）応答が観察されることが予想される。したがって、HAMAまたはHACA応答の懸念及び/または影響を低下させるために、標的細胞表面抗原に対するヒト結合ドメイン及びCD3 に対するヒト結合ドメインを含む抗体構築物を提供することが望ましいと考えられる。

【 0 1 1 4 】

用語「（特異的に）結合する」、「（特異的に）認識する」、「（特異的に）指向する」及び「（特異的に）反応する」とは、本発明によれば、結合ドメインが、標的分子（抗原）上の所与のエピトープまたは所与の標的サイド、本明細書では：それぞれ、標的細胞表面抗原とCD3 とが相互作用するか、または特異的に相互作用することを意味する。

10

20

30

40

50

## 【0115】

用語「エピトープ」とは、抗体もしくは免疫グロブリン、または抗体もしくは免疫グロブリンの誘導体、断片もしくは変異体などの結合ドメインが、特異的に結合する抗原上のサイドを指す。「エピトープ」は抗原性であり、したがって、用語「エピトープ」は、本明細書において「抗原性構造」または「抗原決定基」と呼ばれることもある。したがって、結合ドメインは「抗原相互作用サイド」である。前記結合／相互作用はまた、「特異的認識」を定義すると理解される。

## 【0116】

「エピトープ」は、タンパク質の三次折り畳みによって並置された連続アミノ酸または非連続アミノ酸の両方によって形成され得る。「連続性エピトープ」とは、アミノ酸一次配列が認識エピトープを含むエピトープである。連続性エピトープは、通常、ユニークな配列中に、少なくとも3残基または少なくとも4残基、より一般的には、少なくとも5残基または少なくとも6残基または少なくとも7残基、例えば約8～約10残基のアミノ酸を含む。

## 【0117】

「構造的エピトープ」とは、連続性エピトープとは対照的に、エピトープを含むアミノ酸の一次配列が認識エピトープの唯一の規定成分ではないエピトープ（例えば、アミノ酸の一次配列が結合ドメインによって必ずしも認識されないエピトープ）である。通常、構造的エピトープは、連続性エピトープよりも多くの数のアミノ酸を含む。構造的エピトープの認識に関して、結合ドメインは、抗原、好ましくはペプチドもしくはタンパク質またはその断片の3次元構造を認識する（本発明に関しては、結合ドメインの1つに対する抗原性構造は、標的細胞表面抗原タンパク質に含まれる）。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成する場合、構造的エピトープを形成する特定のアミノ酸及び／またはポリペプチド主鎖が並置され、抗体がエピトープを認識することが可能になる。エピトープの立体構造を決定する方法として、X線結晶学、二次元核磁気共鳴（2D-NMR）分光法及び部位特異的スピン標識及び電子常磁体共鳴（EPR）分光法が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

## 【0118】

エピトープマッピング法を、以下に記載する：ヒト標的細胞表面抗原タンパク質の領域（隣接するアミノ酸ストレッチ）を、非ヒト及び非霊長類標的細胞表面抗原（例えば、マウス標的細胞表面抗原、しかし、ニワトリ、ラット、ハムスター、ウサギなどの他種のものも考え得る）の対応する領域と交換／置換する場合、使用する非ヒト、非霊長類標的細胞表面抗原に対して結合ドメインが交差反応性を有していない限り、結合ドメインの結合は減少すると考えられる。ヒト標的細胞表面抗原タンパク質内のそれぞれの領域への結合を100%とする場合、前記減少は、ヒト標的細胞表面抗原タンパク質内のそれぞれの領域への結合に比べて、好ましくは、少なくとも10%、20%、30%、40%、または50%であり；より好ましくは、少なくとも60%、70%、または80%、最も好ましくは90%、95%、またはさらには100%である。上記のヒト標的細胞表面抗原／非ヒト標的細胞表面抗原のキメラは、CHO細胞中で発現することが想定される。ヒト標的細胞表面抗原／非ヒト標的細胞表面抗原のキメラは、EpCAMなどの異なる膜結合タンパク質の膜貫通ドメイン及び／または細胞質ドメインと融合することも想定される。

## 【0119】

エピトープマッピングのための代替的または追加の方法では、結合ドメインによって認識される特定の領域を決定するために、ヒト標的細胞表面抗原細胞外ドメインのいくつかの短縮型を生成することができる。これらの短縮型では、異なる細胞外標的細胞表面抗原ドメイン／サブドメインまたは領域を、N末端から開始して段階的に欠失させる。標的細胞表面抗原の短縮型を、CHO細胞で発現させ得ることが想定される。標的細胞表面抗原の短縮型を、EpCAMなどの異なる膜結合タンパク質の膜貫通ドメイン及び／または細胞質ドメインと融合させ得ることも想定される。標的細胞表面抗原の短縮型は、そのN末端にシグナルペプチドドメイン、例えばマウスIgG重鎖シグナルペプチド由来のシグナ

10

20

30

40

50



ルペプチドを包含し得ることも想定される。標的細胞表面抗原の短縮型は、細胞表面上のそれらの正しい発現を確認することを可能にする $\nu$ 5ドメインをN末端に（シグナルペプチドの後に）包含し得ることがさらに想定される。結合ドメインによって認識される標的細胞表面抗原領域をそれ以上包含しない標的細胞表面抗原の短縮型では、結合の減少または消失が起こると予想される。ヒト標的細胞表面抗原タンパク質全体（またはその細胞外領域もしくはドメイン）への結合を100とする場合、結合の減少は、好ましくは少なくとも10%、20%、30%、40%、50%であり；より好ましくは少なくとも60%、70%、80%、最も好ましくは90%、95%またはさらには100%である。

#### 【0120】

抗体構築物または結合ドメインによる認識に対する標的細胞表面抗原の特定の残基の寄与を決定するさらなる方法は、アラニンスキャニングであり（例えば、Morrisson KL & Weiss GA, Curr Opin Chem Biol. 2001 Jun; 5(3): 302-7 参照）、そこでは、例えば、部位特異的突然変異誘発により、分析すべき各残基をアラニンに置換する。アラニンは、その嵩張っていない、化学的に不活性なメチル官能基を有しながらも、他のアミノ酸の多くが有する二次構造基準を模倣することから、用いられる。突然変異させる残基のサイズを保存することが望ましい場合には、バリンまたはロイシンなどの嵩高いアミノ酸を用いることができる。アラニンスキャニングは、長い間使用されてきた成熟した技術である。

#### 【0121】

結合ドメインとエピトープまたはエピトープを含む領域との間の相互作用は、結合ドメインが、特定のタンパク質または抗原（本明細書では：それぞれ、標的細胞表面抗原及びCD3）上のエピトープ/エピトープを含む領域に対して明白な親和性を示し、標的細胞表面抗原またはCD3以外のタンパク質または抗原では有意な反応性を示さない。「明白な親和性」とは、約 $10^{-6}$  M (KD) 以上の親和性での結合を含む。好ましくは、結合親和性が約 $10^{-12}$  ~  $10^{-8}$  M、 $10^{-12}$  ~  $10^{-9}$  M、 $10^{-12}$  ~  $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  ~  $10^{-8}$  Mの場合に特異的であると考えられ、好ましくは約 $10^{-11}$  ~  $10^{-9}$  Mである。結合ドメインが標的と特異的に反応するか、または標的に結合するかどうかは、とりわけ、前記結合ドメインと標的タンパク質または抗原との反応と、前記結合ドメインと標的細胞表面抗原またはCD3以外のタンパク質または抗原との反応とを比較することによって容易に試験することができる。好ましくは、本発明の結合ドメインは、標的細胞表面抗原またはCD3以外のタンパク質または抗原に本質的にまたは実質的に結合しない（すなわち、第一の結合ドメインは標的細胞表面抗原以外のタンパク質に結合することができず、第二の結合ドメインはCD3以外のタンパク質に結合することができない）。本発明による抗体構築物の予想される特徴は、他のHLEフォーマットに比べて優れた親和性特性を有することである。そのような優れた親和性は、結果として、*in vivo*での半減期の延長を示唆する。本発明による抗体構築物がより長い半減期を有することは、投与期間及び頻度を低減する可能性があり、これは通常は患者コンプライアンスの向上に寄与する。このことは、本発明の抗体構築物が、非常に弱体化しているか、または多疾病罹患癌患者にとっても特に有効であることから、特に重要な点である。

#### 【0122】

用語「本質的に/実質的に結合しない」または「結合することができない」とは、本発明の結合ドメインが、標的細胞表面抗原またはCD3以外のタンパク質または抗原に結合しないこと、すなわち、それぞれ、標的細胞表面抗原またはCD3への結合を100%とした場合、標的細胞表面抗原またはCD3以外のタンパク質または抗原に対し、好ましくは30%を超える、より好ましくは20%を超える、より好ましくは10%を超える、特に好ましくは9%、8%、7%、6%または5%を超える反応性を示さないことを意味する。

#### 【0123】

特異的結合は、結合ドメイン及び抗原のアミノ酸配列の特定のモチーフによって影響されると考えられる。したがって、それらの一次、二次及び/または三次構造ならびに前記

10

20

30

40

50

構造の二次修飾の結果として結合が達成される。抗原相互作用サイドとその特異的抗原との特異的相互作用は、前記サイドの抗原への単純な結合をもたらす得る。さらに、抗原相互作用サイドとその特異的抗原との特異的相互作用は、例えば、抗原の立体構造変化の誘導、抗原のオリゴマー化などにより、代替的または追加的にシグナルの開始をもたらす場合がある。

#### 【0124】

用語「可変」とは、その配列の可変性を示し、特定の抗体（すなわち、「可変ドメイン（複数可）」）の特異性及び結合親和性を決定することに関与する抗体または免疫グロブリンドメインの部分を目指す。可変重鎖（VH）と可変軽鎖（VL）の対形成は、共に単一の抗原結合サイトを形成する。

10

#### 【0125】

可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均一に分布しているのではなく；重鎖及び軽鎖可変領域のそれぞれのサブドメインに集中している。これらのサブドメインは、「超可変領域」または「相補性決定領域」（CDR）と呼ばれる。可変ドメインのより保存された（すなわち、非超可変）部分は、「フレームワーク」領域（FRMまたはFR）と呼ばれ、三次元空間において6つのCDRの骨格を提供し、抗原結合表面を形成する。天然に存在する重鎖及び軽鎖の可変ドメインはそれぞれ、大部分においてシート構成をとる4つのFRM領域（FR1、FR2、FR3、及びFR4）であって、ループ接続部を形成するとともに場合によってはシート構造の一部を形成する3つの超可変領域によって連結した前記FRM領域を有する。各鎖中の超可変領域は、FRMにより近接して一緒に保持され、そして他の鎖由来の超可変領域と共に、抗原結合サイトの形成に寄与する（Kabataら、前掲参照）。

20

#### 【0126】

用語「CDR」及びその複数形の「CDRs」とは、3つが軽鎖可変領域（CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3）の結合特性を構成し、3つが重鎖可変領域（CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3）の結合特性を構成する相補性決定領域を目指す。CDRは、抗体と抗原との特異的相互作用を担う残基の大部分を含み、したがって抗体分子の機能的活性に寄与し；それらは抗原特異性の主な決定因子である。

#### 【0127】

正確な定義上のCDR境界及び長さは、異なる分類及びナンバリングシステムの対象となる。したがって、CDRを、Kabata、Chothia、接触定義によって、または本明細書に記載のナンバリングシステムを含む任意の他の境界定義によって参照してもよい。境界が異なるにもかかわらず、これらの系の各々は、可変配列内のいわゆる「超可変領域」の構成においてある程度の重複を有する。したがって、これらの系によるCDRの定義は、隣接するフレームワーク領域に関して長さ及び境界領域が異なる可能性がある。例えば、Kabata（種間配列多様性に基づく手法）、Chothia（抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づく手法）、及び/またはMacCallum（Kabata et al.、前掲；Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987, 196: 901-917；及びMacCallum et al., J. Mol. Biol., 1996, 262: 732）参照。抗原結合サイトの特徴付けるさらに別の基準は、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用されるAbM定義である。例えば、Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg) 参照。2残基同定技術が、重複する領域だが同一ではない領域を定義する限りにおいて、これらを組み合わせてハイブリッドCDRを定義することができる。しかしながら、いわゆるKabata系によるナンバリングが好ましい。

30

40

#### 【0128】

一般的には、CDRは、正準構造として分類可能なループ構造を形成する。用語「正準

50

構造」とは、抗原結合（CDR）ループによって採用される主鎖の立体構造を指す。比較構造研究から、6つの抗原結合ループのうちの5つは、利用可能な立体構造のうちの限られたレパートリーしか有さないことが判明した。各正準構造は、ポリペプチド主鎖のねじれ角によって特徴付けることができる。したがって、抗体間の対応するループは、ループのほとんどの部分においてアミノ酸配列変動率が高いにもかかわらず、非常に類似した3次元構造を有し得る（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196:901; Chothia et al., Nature, 1989, 342:877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263:800）。さらに、採用されたループ構造とそれを取り巻くアミノ酸配列との間には関連性がある。特定の正準クラスの立体構造は、ループの長さ、及びループ内のキーポジション、ならびに保存されたフレームワーク（すなわち、ループの外側）内に存在するアミノ酸残基によって決定される。したがって、これらの重要なアミノ酸残基の存在に基づいて特定の正準クラスへの割り当てを行うことができる。

#### 【0129】

用語「正準構造」とは、例えば、Kabat（Kabat et al., 前掲）にカタログ記載されているように、抗体の直鎖配列に関する考察も含む場合がある。Kabatナンバリングスキーム（システム）は、抗体可変ドメインのアミノ酸残基を一貫した方法で番号付けするために広く採用されている基準であり、本明細書中の他の箇所でも言及されているように、本発明に適用する好ましいスキームである。さらなる構造的考察を用いて、抗体の正準構造を決定することもできる。例えば、Kabatナンバリング法によって完全には反映されていないそれらの差異は、Chothiaらのナンバリングシステムによって記述し、及び/または他の技術、例えば、結晶学及び2次元または3次元計算モデリングによって明らかにすることができる。したがって、所与の抗体配列を正準クラスに入れてもよく、それにより、とりわけ、適切なシャーシ配列（例えば、ライブラリー中の様々な正準構造を含むという要望に基づく）を同定することができる。抗体のアミノ酸配列のKabatナンバリング及びChothia et al., 前掲、に記載される構造に関する考察、ならびに抗体構造の正準態様を解釈するためのそれらの意義は、文献に記載されている。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元立体配置は、当該技術分野で公知である。抗体構造の概説については、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988参照。

#### 【0130】

軽鎖及び重鎖可変領域内の抗原結合において、軽鎖のCDR3、及び特に重鎖のCDR3は、最も重要な決定因子を構成し得る。いくつかの抗体構築物において、重鎖CDR3は、抗原と抗体との間の主要な接触領域を構成すると考えられる。CDR3のみを変化させるin vitro選択スキームを用いて、抗体の結合特性を変化させたり、どの残基が抗原の結合に寄与するかを判定したりすることができる。したがって、CDR3は、通常、抗体結合サイドの分子多様性の最大の供給源である。例えば、H3は、最小で2アミノ酸残基まで短くてもよく、または26アミノ酸を超えてもよい。

#### 【0131】

古典的な全長抗体または免疫グロブリンでは、各軽鎖（L）は1つの共有ジスルフィド結合によって重（H）鎖に連結する一方で、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じて、1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結する。VHに最も近いCHドメインは通常CH1と呼ばれる。定常（「C」）ドメインは、抗原結合に直接関与しないが、抗体依存性、細胞を介した細胞傷害性及び補体活性化などの様々なエフェクター機能を示す。抗体のFc領域は、重鎖定常ドメイン内に含まれ、例えばFc受容体に位置する細胞表面と相互作用することができる。

#### 【0132】

組換え及び体細胞突然変異後の抗体遺伝子の配列は非常に多様であり、これらの変化した遺伝子は、 $10^{10}$ 種類の異なる抗体分子をコードすると推定される（Immunog

10

20

30

40

50

lobulin Genes, 2<sup>nd</sup> ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995)。したがって、免疫系は、免疫グロブリンのレパートリーを提供する。用語「レパートリー」とは、少なくとも1つの免疫グロブリンをコードする少なくとも1つの配列に、全体的または部分的に由来する少なくとも1つのヌクレオチド配列を指す。その配列（複数可）は、重鎖のV、D、及びJセグメント、ならびに軽鎖のV及びJセグメントのin vivoでの再構成によって生成し得る。あるいは、その配列（複数可）は、例えばin vitroでの刺激にตอบสนองして再構成が生じた細胞から生成することができる。あるいは、DNAスプライシング、ヌクレオチド合成、突然変異誘発及び他の方法によって、配列（複数可）の一部または全部を得てもよく、例えば、米国特許第5,565,332号を参照されたい。レパートリーは、1つの配列のみを含んでもよく、または遺伝子的に多様なコレクションの配列を含む複数の配列を含んでもよい。

10

#### 【0133】

本発明に関して、用語「Fc部分」または「Fc単量体」は、免疫グロブリン分子のCH2ドメインの機能を有する少なくとも1つのドメイン及びCH3ドメインの機能を有する少なくとも1つのドメインを含むポリペプチドを意味する。用語「Fc単量体」から明らかのように、これらのCHドメインを含むポリペプチドは「ポリペプチド単量体」である。Fc単量体は、重鎖（CH1）の第一の定常領域の免疫グロブリンドメインを除く少なくとも1つの免疫グロブリン定常領域の断片を含むが、1つのCH2ドメインの機能的部分及び1つのCH3ドメインの機能的部分を維持しており、そこにおいてCH2ドメインはCH3ドメインのアミノ末端にある。この定義の好ましい態様において、Fc単量体は、Ig-Fcヒンジ領域の一部、CH2領域及びCH3領域を含むポリペプチド定常領域であり得、そこにおいてヒンジ領域はCH2ドメインのアミノ末端にある。本発明のヒンジ領域は二量化を促進することが想定される。そのようなFcポリペプチド分子は、限定するものではないが、例えば、免疫グロブリン領域のパパイン消化によって得ることができる（当然、結果的に2つのFcポリペプチドの二量体得られる）。この定義の別の態様では、Fc単量体は、CH2領域の一部とCH3領域とを含むポリペプチド領域であり得る。そのようなFcポリペプチド分子は、例えば、限定するものではないが、免疫グロブリン分子のペプシン消化によって得ることができる。一実施形態では、Fc単量体のポリペプチド配列は：IgG<sub>1</sub> Fc領域、IgG<sub>2</sub> Fc領域、IgG<sub>3</sub> Fc領域、IgG<sub>4</sub> Fc領域、IgM Fc領域、IgA Fc領域、IgD Fc領域及びIgE Fc領域のFcポリペプチド配列と実質的に同様である。（例えば、Padlan, Molecular Immunology, 31(3), 169-217 (1993) 参照）。免疫グロブリン間にはある程度のバリエーションがあるため、また、単に明確にするために、Fc単量体は、IgA、IgD、及びIgGの最後部の2つの重鎖定常領域免疫グロブリンドメイン、ならびにIgE及びIgMの最後部の3つの重鎖定常領域免疫グロブリンドメインを指す。言及したように、Fc単量体はまた、これらのドメインのN末端に可撓性ヒンジを有することができる。IgA及びIgMについては、Fc単量体はJ鎖を含み得る。IgGについては、Fc部分は免疫グロブリンドメインCH2及びCH3ならびに最初の2つのドメインとCH2との間にヒンジを含む。Fc部分の境界は、様々な異なり得るが、機能的ヒンジ、CH2及びCH3ドメインを含むヒトIgG重鎖Fc部分の例は、例えば、それぞれ、D231（ヒンジドメインの以下の表1中のD234に対応する）～P476、CH3ドメインのカルボキシル末端のL476（IgG<sub>4</sub>の場合）の残基を含むように規定することができる（ただし、ナンバリングはKabata法による）。ペプチドリンカーを介して互いに融合した2つのFc部分またはFc単量体は、本発明の抗体構築物の第三のドメインを定義し、scFcドメインと定義してもよい。

20

30

40

#### 【0134】

本発明の一実施形態では、本明細書において開示するscFcドメイン、すなわち、お互いに融合したFc単量体は、抗体構築物の第三のドメインにのみ含まれることが想定される。

50

## 【 0 1 3 5 】

本発明によれば、I g G ヒンジ領域は、表 1 に示す K a b a t ナンバリングを用いて類推することによって同定することができる。上記に則して、本発明のヒンジドメイン / 領域は、K a b a t ナンバリングによる D 2 3 4 ~ P 2 4 3 の I g G<sub>1</sub> 配列ストレッチに対応するアミノ酸残基を含むと考えられる。同様に、本発明のヒンジドメイン / 領域は、I g G<sub>1</sub> ヒンジ配列 D K T H T C P P C P ( 配列番号 1 4 4 9 ) ( 以下の表 1 に示すストレッチ D 2 3 4 ~ P 2 4 3 に対応する - ヒンジ領域が依然として二量体化を促進する限り、前記配列の変異も想定される ) を含むか、またはそれらからなると考えられる。本発明の好ましい実施形態では、抗体構築物の第三のドメイン内の C H 2 ドメインの K a b a t 位置 3 1 4 のグリコシル化部位を、N 3 1 4 X 置換によって除去し、そこにおいて X は Q 以外の任意のアミノ酸である。前記置換は好ましくは N 3 1 4 G 置換である。より好ましい態様では、前記 C H 2 ドメインは、以下の置換 ( K a b a t による位置 ) V 3 2 1 C 及び R 3 0 9 C をさらに含む ( これらの置換は、K a b a t 位置 3 0 9 及び 3 2 1 にドメイン内システインのジスルフィド架橋を導入する ) 。

## 【 0 1 3 6 】

本発明の抗体構築物の第三のドメインは、アミノ末端からカルボキシル末端に向けて：D K T H T C P P C P ( 配列番号 1 4 4 9 ) ( すなわちヒンジ ) - C H 2 - C H 3 - リンカー - D K T H T C P P C P ( 配列番号 1 4 4 9 ) ( すなわちヒンジ ) - C H 2 - C H 3 を含むか、またはそれらからなると考えられる。好ましい実施形態では、上記抗体構築物のペプチドリンカーは、アミノ酸配列 G l y - G l y - G l y - G l y - S e r 、すなわち G l y<sub>4</sub> S e r ( 配列番号 1 ) 、またはそのポリマー、すなわち ( G l y<sub>4</sub> S e r ) x を特徴とし、式中、x は 5 以上の整数 ( 例えば、5、6、7、8 以上など ) であり、6 が好ましい ( ( G l y<sub>4</sub> S e r )<sub>6</sub> ) 。上記構築物は、上記構築物は、上記置換 N 3 1 4 X 、好ましくは N 3 1 4 G 、及び / またはさらなる置換 V 3 2 1 C 及び R 3 0 9 C をさらに含む場合がある。本明細書中において前述で定義した本発明の抗体構築物の好ましい実施形態では、第二のドメインがヒト及び / または M a c a c a の C D 3 鎖の細胞外エピトープに結合することが想定される。

## 【 0 1 3 7 】

( 表 1 ) ヒンジ領域のアミノ酸残基の K a b a t ナンバリング

ヒンジに対する IMGT ナンバリング	IgG <sub>1</sub> アミノ酸翻訳	Kabat ナンバリング
1	(E)	226
2	P	227
3	K	228
4	S	232
5	C	233
6	D	234
7	K	235
8	T	236
9	H	237
10	T	238
11	C	239
12	P	240
13	P	241
14	C	242
15	P	243

## 【 0 1 3 8 】

本発明のさらなる実施形態では、ヒンジドメインノ領域は、I g G 2 サブタイプヒンジ配列 E R K C C V E C P P C P (配列番号 1 4 5 0)、I g G 3 サブタイプヒンジ配列 E L K T P L D T T H T C P R C P (配列番号 1 4 5 1) または E L K T P L G D T T H T C P R C P (配列番号 1 4 5 8)、及び/または I g G 4 サブタイプヒンジ配列 E S K Y G P P C P S C P (配列番号 1 4 5 2) を含むか、またはそれらからなる。I g G 1 サブタイプヒンジ配列は、以下の配列 E P K S C D K T H T C P P C P (表 1 及び配列番号 1 4 5 9 に示す) であってもよい。したがって、これらのコアヒンジ領域もまた、本発明において想定される。

## 【 0 1 3 9 】

I g G C H 2 及び I g G C D 3 ドメインの位置及び配列は、表 2 に示す K a b a t ナンバリングを用いて類推することによって同定することができる。

## 【 0 1 4 0 】

(表 2) I g G C H 2 及び C H 3 領域のアミノ酸残基の K a b a t ナンバリング

IgG サブタイプ	CH2 アミノ酸翻訳	CH2 Kabat ナンバリング	CH3 アミノ酸翻訳	CH3 Kabat ナンバリング
IgG <sub>1</sub>	APE... ..KAK	244... ..360	GQP.....PGK	361... ..478
IgG <sub>2</sub>	APP... ..KTK	244... ..360	GQP.....PGK	361... ..478
IgG <sub>3</sub>	APE... ..KTK	244... ..360	GQP.....PGK	361... ..478
IgG <sub>4</sub>	APE... ..KAK	244... ..360	GQP.....LGK	361... ..478

## 【 0 1 4 1 】

本発明の一実施形態では、第一のまたは両方の F c 単量体の C H 3 ドメイン内の強調した太字のアミノ酸残基を欠失させる。

## 【 0 1 4 2 】

第三のドメインのポリペプチド単量体(「F c 部分」または「F c 単量体」)を互いに融合させるペプチドリinkerは、好ましくは、少なくとも 2 5 個(2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0 個など)のアミノ酸残基を有する。より好ましくは、このペプチドリinkerは、少なくとも 3 0 個(3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、3 5 個など)のアミノ酸残基を有する。また、リンカーが、最大 4 0 個のアミノ酸残基、より好ましくは最大 3 5 個のアミノ酸残基、最も好ましくはちょうど 3 0 個のアミノ酸残基を有することが好ましい。そのようなペプチドリinkerの好ましい実施形態は、アミノ酸配列 G l y - G l y - G l y - G l y - S e r、すなわち G l y<sub>4</sub> S e r (配列番号 1)、またはそのポリマー、すなわち (G l y<sub>4</sub> S e r)<sub>x</sub> を特徴とし、式中、x は 5 以上(例えば、6、7 または 8)の整数である。好ましくは、整数は 6 または 7 であり、より好ましくは、整数は 6 である。

## 【 0 1 4 3 】

リンカーを使用して第一のドメインを第二のドメインへ、または第一もしくは第二のドメインを第三のドメインへ融合させる場合、このリンカーは、好ましくは、第一及び第二のドメインのそれぞれが互いに独立してそれらの異なる結合特異性を保持することを保証するのに十分な長さ及び配列を有する。本発明の抗体構築物中の少なくとも 2 つの結合ドメイン(または 2 つの可変ドメイン)を連結するペプチドリinkerについては、これらのペプチドリinkerは、数個のアミノ酸残基、例えば 1 2 アミノ酸残基以下しか含まないペプチドリinkerが好ましい。したがって、1 2、1 1、1 0、9、8、7、6 または 5 アミノ酸残基のペプチドリinkerが好ましい。5 残基未満のアミノ酸を有する想定されるペプチドリinkerは、4、3、2 または 1 残基のアミノ酸(複数可)を有し、G l y を豊富に含むリンカーが好ましい。第一及び第二のドメインの融合用のペプチドリinkerの好ましい実施形態を、配列番号 1 に示す。第二及び第三のドメインの融合用のペプチドリinkerの好ましいリンカーの実施形態は、(G l y)<sub>4</sub> リンカー、すなわち、それぞれ G<sub>4</sub> リンカーである。

## 【0144】

上記の「ペプチドリinker」の1つに関して、特に好ましい「単一」のアミノ酸は、Glyである。したがって、前記ペプチドリinkerは単一のアミノ酸Glyからなってもよい。本発明の好ましい実施形態では、ペプチドリinkerは、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser、すなわちGly<sub>4</sub>Ser（配列番号1）、またはそのポリマー、すなわち（Gly<sub>4</sub>Ser）<sub>x</sub>を特徴とし、式中、<sub>x</sub>は1以上の整数（例えば、2または3）である。好ましいリンカーを、配列番号1～12に示す。二次構造の促進がないことを含む前記ペプチドリinkerの特徴は、当該分野で公知であり、例えば、Dall'Aquila et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) 及び Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80) に記載されている。任意の二次構造をさらに促進しないペプチドリinkerが好ましい。前記ドメインの相互の連結は、実施例に記載のように、例えば遺伝子工学によって提供することができる。融合し、機能的に連結した二重特異性一本鎖構築物を調製し、哺乳類細胞または細菌においてそれらを発現させる方法は、当該技術分野において公知である（例えば、WO99/54440または Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001）。

10

## 【0145】

抗体構築物の好ましい実施形態または本発明では、第一及び第二のドメインは、（scFv）<sub>2</sub>、scFv単一ドメインmAb、それらの形態のいずれかのダイアボディ及びオリゴマーからなる群から選択される形態の抗体構築物を形成する。

20

## 【0146】

特に好ましい実施形態によれば、及び添付の実施例に記載されるように、本発明の抗体構築物の第一及び第二ドメインは、「二重特異性一本鎖抗体構築物」、より好ましくは二重特異性「一本鎖Fv」（scFv）である。Fvフラグメントの2つのドメイン、VL及びVHは、別々の遺伝子によってコードされているが、組換え法を用いて、上述のような合成リンカーにより、それらを単一のタンパク質鎖として作製することができ、そこにおいてVL及びVH領域は対になって一価分子を形成する；例えば、Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883) 参照。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を用いて得られ、その断片を、全体すなわち全長抗体に対する方法と同じ方法で機能について評価する。したがって、一本鎖可変断片（scFv）は、免疫グロブリンの重鎖（VH）及び軽鎖（VL）の可変領域の融合タンパク質であり、通常、約10～約25アミノ酸、好ましくは約15～20アミノ酸の短いリンカーペプチドでこれらを連結する。リンカーは、通常、可撓性のためのグリシン、ならびに可溶性のためのセリンまたはトレオニンを豊富に含み、VHのN末端をVLのC末端に、またはその逆のいずれかで連結することができる。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。

30

40

## 【0147】

二重特異性一本鎖抗体構築物は、当該分野で公知であり、WO99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Löffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Bruhl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56に記載されている。一本鎖抗体の生成について記載する技術（とりわけ、米国特許第4,946,778号、Kontermann and Dubel (2010)、前掲、及びLittle (2009)、前

50

掲、を参照されたい)を適合させ、(1つの)選出した標的(複数可)を特異的に認識する一本鎖抗体構築物を生成することができる。

【0148】

2つのscFv分子を(例えば、上記のようなリンカーを用いて)連結することにより、二価(2価とも呼ばれる)または二重特異性一本鎖可変断片((scFv)<sub>2</sub>)の形態を有するbi-scFvまたはdi-scFv)を操作することができる。2つのscFv分子が同じ結合特異性を有する場合、得られる(scFv)<sub>2</sub>分子は、好ましくは二価であると呼ばれる(すなわち、同じ標的エピトープに対して2つの価数を有する)。2つのscFv分子が異なる結合特異性を有する場合、得られる(scFv)<sub>2</sub>分子は、好ましくは二重特異性であると呼ばれる。2つのVH領域及び2つのVL領域を有する単一のペプチド鎖を生成することによって連結を行い、タンデムscFvを得ることができる(例えば、Kufner P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5): 238-244 参照)。別の可能性は、2つの可変領域が一緒に折り畳まれるには短すぎるリンカーペプチド(例えば、約5残基のアミノ酸)を有するscFv分子を作製し、scFvを二量体化させることである。このタイプは、ダイアボディとして知られる(例えば、Hollinger, Philipp et al., (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(14): 6444-8 参照)。

10

【0149】

本発明によれば、第一、第二ドメインのいずれか、または第一及び第二ドメインは、それぞれ、単一ドメイン抗体、可変ドメイン、または少なくとも単一ドメイン抗体のCDRを含む場合がある。単一ドメイン抗体は、他のV領域またはドメインとは無関係に、特異的抗原に選択的に結合可能な一つ(単量体)の抗体可変ドメインのみを含む。最初の単一ドメイン抗体は、ラクダ科動物において見出された重鎖抗体から操作され、これらはV<sub>H</sub>Hフラグメントと呼ばれる。軟骨魚類もまた、重鎖抗体(IgNAR)を有し、この抗体からV<sub>NAR</sub>フラグメントと呼ばれる単一ドメイン抗体を得ることができる。別のアプローチは、一般的な、例えば、ヒトまたはげっ歯類由来の免疫グロブリンから、二量体可変ドメインを分割して単量体に変換し、したがってVHまたはVLを単一ドメイン抗体として得ることである。単一ドメイン抗体に関するほとんどの研究は現在、重鎖可変ドメインに基づいているが、軽鎖由来のナノボディも標的エピトープに特異的に結合することが示されている。単一ドメイン抗体の例は、sdAb、ナノボディまたは単一可変ドメイン抗体と呼ばれる。

20

30

【0150】

したがって、(単一ドメインmAb)<sub>2</sub>は、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>H及びV<sub>NAR</sub>を含む群から個別に選択される(少なくとも)2つの単一ドメインモノクローナル抗体からなるモノクローナル抗体構築物である。リンカーは、好ましくは、ペプチドリリンカーの形態である。同様に、「scFv単一ドメインmAb」は、上記の少なくとも1つの単一ドメイン抗体及び上記の1つのscFv分子からなるモノクローナル抗体構築物である。この場合もまた、リンカーは好ましくはペプチドリリンカーの形態である。

40

【0151】

抗体構築物が別の所与の抗体構築物との結合について競合するか否かは、競合アッセイ、例えば、競合ELISAまたは細胞ベースの競合アッセイなどで測定することができる。アビジン結合微粒子(ビーズ)も使用することができる。アビジンコーティングELISAプレートと同様に、ビオチン化タンパク質と反応させた場合、これらのビーズの各々を基質として用いて、ビーズ上でアッセイを行うことができる。抗原をビーズ上にコーティングし、次いで第一の抗体でプレコーティングする。第二の抗体を添加し、任意のさらなる結合を測定する。読取り用の可能な手段として、フローサイトメトリーが挙げられる。

【0152】

T細胞またはTリンパ球は、細胞性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球(それ

50



自体が白血球の一種)の一種である。T細胞のいくつかのサブセットが存在し、それぞれ異なる機能を有する。T細胞は、細胞表面上のT細胞受容体(TCR)の存在によって、B細胞及びNK細胞などの他のリンパ球と区別することができる。TCRは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子に結合した抗原を認識する役割を担い、2つの異なるタンパク質鎖からなる。T細胞の95%において、TCRはアルファ( )及びベータ( )鎖からなる。TCRが抗原ペプチド及びMHC(ペプチド/MHC複合体)と結合すると、Tリンパ球は、関連する酵素、共受容体、特殊アダプター分子、及び活性化または遊離転写因子によって媒介される一連の生化学的事象によって活性化される。

#### 【0153】

CD3受容体複合体はタンパク質複合体であり、4つの鎖からなる。哺乳類では、複合体はCD3 (ガンマ)鎖、CD3 (デルタ)鎖、及び2つのCD3 (イプシロン)鎖を含む。これらの鎖は、T細胞受容体(TCR)及びいわゆる(ゼータ)鎖と会合してT細胞受容体CD3複合体を形成し、Tリンパ球において活性化シグナルを生成する。CD3 (ガンマ)、CD3 (デルタ)及びCD3 (イプシロン)鎖は、単一の細胞外免疫グロブリンドメインを含む免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連性が高い細胞表面タンパク質である。CD3分子の細胞内尾部には、免疫受容体チロシンに基づく活性化モチーフまたは短縮してITAMとして知られる単一の保存モチーフが含まれており、これはTCRのシグナル伝達能力にとって不可欠である。CD3分子は、ヒトにおいては、第11染色体に存在するCD3E遺伝子によってコードされるポリペプチドである。CD3の最も好ましいエピトープは、ヒトCD3細胞外ドメインのアミノ酸残基1~27内に含まれる。本発明による抗体構築物は、一般的に、及び効果的なことに、特異的免疫療法において望ましくない非特異的T細胞活性化をあまり示さないと考えられる。これは、副作用のリスクの低減につながる。

#### 【0154】

多重特異的、少なくとも二重特異的な抗体構築物によるT細胞の動員による標的細胞のリダイレクト溶解は、細胞溶解シナプス形成及びパーフォリン及びグランザイムの送達を含む。関与するT細胞は、連続標的細胞溶解が可能であり、ペプチド抗原のプロセッシング及び提示、またはクローン性T細胞分化を妨害する免疫逃避機構によって影響されない；例えば、WO2007/042261参照。

#### 【0155】

本発明の抗体構築物によって媒介される細胞傷害性は、様々な方法で測定することができる。エフェクター細胞は、例えば、刺激した濃縮(ヒト)CD8陽性T細胞または非刺激(ヒト)末梢血単核細胞(PBMC)であり得る。標的細胞がマカク起源であるか、または発現しているか、または第一のドメインが結合しているマカク標的細胞表面抗原で標的細胞を形質移入する場合、エフェクター細胞はまた、マカクT細胞株、例えば4119LnPxなどのマカク起源でなければならない。標的細胞は、標的細胞表面抗原、例えば、ヒトまたはマカク標的細胞表面抗原(の少なくともその細胞外ドメイン)を発現するはずである。標的細胞は、標的細胞表面抗原、例えばヒトまたはマカク標的細胞表面抗原で安定にまたは一過性に形質移入される細胞株(例えば、CHO)であり得る。あるいは、標的細胞は、標的細胞表面抗原陽性の天然発現細胞株であることもできる。通常、細胞表面上により高いレベルの標的細胞表面抗原を発現する標的細胞株では、EC<sub>50</sub>値はより低いと予想される。エフェクター対標的細胞(E:T)比は、通常、約10:1であるが、変化させることもできる。標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物の細胞傷害活性は、<sup>51</sup>Cr遊離アッセイ(約18時間のインキュベーション時間)またはFACSベースの細胞傷害性アッセイ(約48時間のインキュベーション時間)で測定することができる。アッセイのインキュベーション時間の改変(細胞傷害性反応)も可能である。細胞傷害性を測定する他の方法は当業者に周知であり、これには、MTTまたはMTSアッセイ、生物発光アッセイを含むATPベースのアッセイ、スルホローダミンB(SRB)アッセイ、WSTアッセイ、クローン原性アッセイ及びECIS技術が含まれる。

#### 【0156】

本発明の標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物によって媒介される細胞傷害性活性は、好ましくは、細胞ベースの細胞傷害性アッセイにおいて測定する。また、<sup>51</sup>Cr遊離アッセイで測定してもよい。それはEC<sub>50</sub>値によって表され、それは、最大有効濃度の半分（ベースラインと最大の間の中間の細胞傷害性反応を誘導する抗体構築物の濃度）に相当する。好ましくは、標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物のEC<sub>50</sub>値は、5000 pMまたは4000 pM、より好ましくは3000 pMまたは2000 pM、さらにより好ましくは1000 pMまたは500 pM、さらにより好ましくは400 pMまたは300 pM、さらにより好ましくは200 pM、さらにより好ましくは100 pM、さらにより好ましくは50 pM、さらにより好ましくは20 pMまたは10 pM、最も好ましくは5 pMである。

10

【0157】

上記のEC<sub>50</sub>値は、異なるアッセイで測定することができる。当業者は、刺激/濃縮CD8<sup>+</sup>T細胞をエフェクター細胞として使用する場合、非刺激PBMCに比べて、EC<sub>50</sub>値がより低いと予想され得ることを認識している。標的細胞が多数の標的細胞表面抗原を発現している場合、標的の発現が少ないラットに比べてEC<sub>50</sub>値がより低いことがさらに予測され得る。例えば、刺激/濃縮ヒトCD8<sup>+</sup>T細胞をエフェクター細胞として使用し（そして標的細胞表面抗原を形質移入したCHO細胞などの細胞または標的細胞表面抗原陽性ヒト細胞株のいずれかを標的細胞として使用する）、標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物のEC<sub>50</sub>値は、好ましくは1000 pM、より好ましくは500 pM、さらにより好ましくは250 pM、さらにより好ましくは100 pM、さらにより好ましくは50 pM、さらにより好ましくは10 pM、最も好ましくは5 pMである。ヒトPBMCをエフェクター細胞として使用する場合、標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物のEC<sub>50</sub>値は、好ましくは5000 pMまたは4000 pM（特に、標的細胞が標的細胞表面抗原陽性ヒト細胞株である場合）であり、より好ましくは2000 pM（特に、標的細胞が標的細胞表面抗原を形質移入したCHO細胞などの細胞である場合）、より好ましくは1000 pMまたは500 pM、さらにより好ましくは200 pM、さらにより好ましくは150 pM、さらにより好ましくは100 pM、最も好ましくは50 pM、またはそれ以下である。エフェクター細胞としてLnP×4119などのマカクT細胞株を用い、マカク標的細胞表面抗原を形質移入したCHO細胞などの細胞株を標的細胞株とした場合、標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物のEC<sub>50</sub>値は、好ましくは2000 pMまたは1500 pM、より好ましくは1000 pMまたは500 pM、さらにより好ましくは300 pMまたは250 pM、さらにより好ましくは100 pM、最も好ましくは50 pMである。

20

30

【0158】

好ましくは、本発明の標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物は、CHO細胞などの標的細胞表面抗原陰性細胞の溶解を誘導/媒介せず、または本質的に誘導/媒介しない。用語「溶解を誘導しない」、「本質的に溶解を誘導しない」、「溶解を媒介しない」または「本質的に溶解を媒介しない」とは、標的細胞表面抗原陽性ヒト細胞株の溶解を100%とした場合、本発明の抗体構築物が、標的細胞表面抗原陰性細胞の30%超、好ましくは20%超、より好ましくは10%超、特に好ましくは9%、8%、7%、6%または5%超の溶解を誘導または媒介しないことを意味する。これは、通常、500 nMまでの抗体構築物濃度に対して適用される。さらなる労力を必要とせずに細胞溶解を測定する方法は、当業者には周知である。さらに、本明細書は、細胞溶解を測定する具体的な指示について示す。

40

【0159】

個々の標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物の単量体アイソフォームと二量体アイソフォームとの間の細胞傷害活性の差は、「力価ギャップ」と呼ばれる。この力価の差は、例えば、分子の単量体型と二量体型のEC<sub>50</sub>値の間の比として計算することができる。本発明の標的細胞表面抗原×CD3二重特異性抗体構築物の力価ギャップは、好

50

ましくは 5、より好ましくは 4、さらにより好ましくは 3、さらにより好ましくは 2、最も好ましくは 1である。

【0160】

本発明の抗体構築物の第一及び/または第二の(またはいずれかの)結合ドメイン(複数可)は、好ましくは、霊長類目の哺乳類のメンバーに対して種間特異的である。種間特異的CD3結合ドメインは、例えばWO2008/119567に記載されている。一実施形態によれば、ヒト標的細胞表面抗原及びヒトCD3へのそれぞれの結合に加えて、第一及び/または第二の結合ドメインは、新世界霊長類(マーモセット、ワタボウシタマリ、またはリスザルなど)、旧世界霊長類(ヒビヤマカクなど)、テナガザル、及び非ヒト *homininae* を含む(が必ずしもこれらに限定されない)霊長類の標的細胞表面抗原/CD3にも結合する。

10

【0161】

本発明の抗体構築物の一実施形態では、第一のドメインは、ヒト標的細胞表面抗原に結合し、さらにマカク標的細胞表面抗原、例えばカニクイザル(*Macaca fascicularis*)の標的細胞表面抗原、より好ましくはマカク細胞表面上に発現するマカク標的細胞表面抗原に結合する。マカク標的細胞表面抗原に対する第一の結合ドメインの親和性は、好ましくは 15 nM、より好ましくは 10 nM、さらにより好ましくは 5 nM、さらにより好ましくは 1 nM、さらにより好ましくは 0.5 nM、さらにより好ましくは 0.1 nM、最も好ましくは 0.05 nMまたはさらに 0.01 nM である。

20

【0162】

好ましくは、マカク標的細胞表面抗原対ヒト標的細胞表面抗原[マカク標的細胞表面抗原:ヒト標的細胞表面抗原]の結合のための本発明の抗体構築物の親和性ギャップ(例えば、BiaCoreまたはScatchard分析によって測定するような)は、<100、好ましくは<20、より好ましくは<15、さらに好ましくは<10、さらにより好ましくは<8、さらに好ましくは<6であり、最も好ましくは<2である。マカク標的細胞表面抗原対ヒト標的細胞表面抗原の結合に対する本発明による抗体構築物の親和性ギャップの好ましい範囲は、0.1~20、より好ましくは0.2~10、さらにより好ましくは0.3~6、さらにより好ましくは0.5~3または0.5~2.5、最も好ましくは0.5~2または0.6~2である。

30

【0163】

本発明の抗体構築物の第二の(結合)ドメインは、ヒトCD3 及び/またはMacaca CD3 に結合する。好ましい実施形態では、第二のドメインは、さらに、マーモセット、ワタボウシタマリまたはリスザル CD3 に結合する。マーモセット及びワタボウシタマリは、マーモセット亜科(*Callitrichidae*)に属する新世界霊長類であり、一方、リスザルは、マーモセット科(*Cebidae*)に属する新世界霊長類である。

【0164】

本発明の抗体構築物は、ヒト及び/またはMacaca CD3の細胞外エピトープに結合する第二のドメインが、以下から選択されるCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3を含むVL領域を有することが好ましい:

40

(a) WO2008/119567の配列番号27に記載のCDR-L1、WO2008/119567の配列番号28に記載のCDR-L2、及びWO2008/119567の配列番号29に記載のCDR-L3;

(b) WO2008/119567の配列番号117に記載のCDR-L1、WO2008/119567の配列番号118に記載のCDR-L2、及びWO2008/119567の配列番号119に記載のCDR-L3;ならびに

(c) WO2008/119567の配列番号153に記載のCDR-L1、WO2008/119567の配列番号154に記載のCDR-L2、及びWO2008/119567の配列番号155に記載のCDR-L3。

50

## 【 0 1 6 5 】

本発明の抗体構築物の好ましい実施形態では、ヒト及び／またはM a c a c a C D 3鎖の細胞外エピトープに結合する第二のドメインは、以下から選択されるC D R - H 1、C D R - H 2及びC D R - H 3を含むV H領域を有する：

( a ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号12に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号13に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号14に記載のC D R - H 3；

( b ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号30に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号31に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号32に記載のC D R - H 3；

10

( c ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号48に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号49に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号50に記載のC D R - H 3；

( d ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号66に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号67に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号68に記載のC D R - H 3；

( e ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号84に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号85に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号86に記載のC D R - H 3；

( f ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号102に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号103に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号104に記載のC D R - H 3；

20

( g ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号120に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号121に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号122に記載のC D R - H 3；

( h ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号138に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号139に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号140に記載のC D R - H 3；

( i ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号156に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号157に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号158に記載のC D R - H 3；ならびに

30

( j ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号174に記載のC D R - H 1、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号175に記載のC D R - H 2、及びW O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号176に記載のC D R - H 3。

## 【 0 1 6 6 】

本発明の抗体構築物の好ましい実施形態では、上記の3つのV L C D R群は、第二の結合ドメイン内の上記10種のV H C D R群と結合して、各々がC D R - L 1 ~ 3及びC D R - H 1 ~ 3を含む( 3 0 )群を形成する。

## 【 0 1 6 7 】

C D 3に結合する第二のドメインが、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号17、21、35、39、53、57、71、75、89、93、107、111、125、129、143、147、161、165、179もしくは183に記載されているか、または添付の配列表に配列番号16もしくは25として記載されているV L領域からなる群から選択されるV L領域を有することは、本発明の抗体構築物にとって好適である。

40

## 【 0 1 6 8 】

また、C D 3に結合する第二のドメインが、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7の配列番号15、19、33、37、51、55、69、73、87、91、105、109、123、127、141、145、159、163、177または181に記載されているか、または添付の配列表に配列番号15もしくは24として記載されているV H領域からなる群から選択されるV H領域を有することも、本発明の抗体構築物にとって好適である。

50

## 【 0 1 6 9 】

より好ましくは、本発明の抗体構築物は、以下からなる群から選択される V L 領域及び V H 領域を含む C D 3 に結合する第二のドメインを特徴とする：

( a ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 7 または 2 1 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 5 または 1 9 に記載の V H 領域；

( b ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 3 5 または 3 9 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 3 3 または 3 7 に記載の V H 領域；

( c ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 5 3 または 5 7 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 5 1 または 5 5 に記載の V H 領域；

( d ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 7 1 または 7 5 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 6 9 または 7 3 に記載の V H 領域；

( e ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 8 9 または 9 3 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 8 7 または 9 1 に記載の V H 領域；

( f ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 0 7 または 1 1 1 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 0 5 または 1 0 9 に記載の V H 領域；

( g ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 2 5 または 1 2 9 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 2 3 または 1 2 7 に記載の V H 領域；

( h ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 4 3 または 1 4 7 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 4 1 または 1 4 5 に記載の V H 領域；

( i ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 6 1 または 1 6 5 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 5 9 または 1 6 3 に記載の V H 領域；ならびに

( j ) W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 7 9 または 1 8 3 に記載の V L 領域、及び W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 1 7 7 または 1 8 1 に記載の V H 領域。

## 【 0 1 7 0 】

本発明の抗体構築物に関して、配列番号 1 6 または 2 5 に記載の V L 領域及び添付の配列表に配列番号 1 5 または 2 4 として記載される V H 領域を有する C D 3 に結合する第二のドメインは、好適である。

## 【 0 1 7 1 】

本発明の抗体構築物の好ましい実施形態によれば、第一及び / または第二のドメインは、以下のフォーマットを有する： V H 領域及び V L 領域の対は、一本鎖抗体 ( s c F v ) のフォーマットである。V H 及び V L 領域は、V H - V L または V L - V H の順に配置される。V H 領域はリンカー配列の N 末端に位置し、V L 領域はリンカー配列の C 末端に位置することが好ましい。

## 【 0 1 7 2 】

上記の本発明の抗体構築物の好ましい実施形態は、W O 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 の配列番号 2 3、2 5、4 1、4 3、5 9、6 1、7 7、7 9、9 5、9 7、1 1 3、1 1 5、1 3 1、1 3 3、1 4 9、1 5 1、1 6 7、1 6 9、1 8 5 または 1 8 7 からなる群から選択されるか、または添付の配列表に配列番号 2 6 として記載されているアミノ酸配列を有する C D 3 に結合する第二のドメインを特徴とする。

## 【 0 1 7 3 】

抗体構築物の共有結合修飾もまた、本発明の範囲内に含まれ、通常、修飾は翻訳後に行うが、必ずしも常にそうであるというわけではない。例えば、選択した側鎖または N もしくは C 末端残基と反応可能な有機誘導体化剤を、抗体構築物の特定のアミノ酸残基と反応させることによって、抗体構築物のいくつかのタイプの共有結合修飾を分子に導入する。

## 【 0 1 7 4 】

システイニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸またはクロロアセトアミドなどの - ハロアセテート ( 及び対応するアミン ) と反応して、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を生じる。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 - プロモ - ( 5 - イミドゾイル ) プロピオン酸、クロロアセチルリン酸、N - ア

10

20

30

40

50

ルキルマレイミド、3 - ニトロ - 2 - ピリジルジスルフィド、メチル 2 - ピリジルジスルフィド、p - クロロメルクリベンゾエート、2 - クロロメルクリ - 4 - ニトロフェノール、またはクロロ - 7 - ニトロベンゾ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジアゾールとの反応によっても誘導体化される。

#### 【 0 1 7 5 】

ジエチルピロカルボネートがヒスチジル側鎖に対して比較的特異的であるため、ヒスチジル残基は、pH 5 . 5 ~ 7 . 0 において、ジエチルピロカルボネートとの反応によって誘導体化される。p - 臭化プロモフェナシルも有用であり；好ましくは pH 6 . 0 の 0 . 1 M カコジル酸ナトリウム中で反応を行う。リジニル及びアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応する。これらの薬剤による誘導体化は、リジニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。 - アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬として、メチルピコリンイミデートなどのイミドエステル；ピリドキサルリン酸；ピリドキサル；クロロハウ水素化物；トリニトロベンゼンスルホン酸；O - メチルイソ尿素；2 , 4 - ペンタンジオン；及びグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応が挙げられる。

#### 【 0 1 7 6 】

アルギニル残基は、フェニルグリオキサル、2 , 3 - ブタンジオン、1 , 2 - シクロヘキサンジオン、及びニンヒドリンのうちの 1 つまたはいくつかの従来の試薬との反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高い p K a のために、反応をアルカリ性条件下で行う必要がある。さらに、これらの試薬は、リジンの基ならびにアルギニン - アミノ基と反応し得る。

#### 【 0 1 7 7 】

チロシル残基に特定の修飾を行ってもよく、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によってチロシル残基にスペクトル標識を導入することに特に関心が持たれている。最も一般的には、N - アセチルイミダゾール及びテトラニトロメタンを用いて、O - アセチルチロシル種及び 3 - ニトロ誘導体をそれぞれ形成する。<sup>1 2 5</sup> I または <sup>1 3 1</sup> I を用いてチロシル残基をヨウ素化し、ラジオイムノアッセイで使用するための標識タンパク質を調製するが、標識には上記のクロラミン T 法が適切である。

#### 【 0 1 7 8 】

カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミル）をカルボジイミド（R - N = C = N - R'）との反応により選択的に修飾し、式中、R 及び R' は、場合により異なるアルキル基、例えば 1 - シクロヘキシル - 3 - （2 - モルホリニル - 4 - エチル）カルボジイミドまたは 1 - エチル - 3 - （4 - アゾニア - 4 , 4 - ジメチルペンチル）カルボジイミドである。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニル及びグルタミニル残基に変換される。

#### 【 0 1 7 9 】

二官能性薬剤による誘導体化は、様々な方法で使用するための水不溶性支持マトリックスまたは表面に、本発明の抗体構築物を架橋するのに有用である。一般的に使用される架橋剤として、例えば 1 , 1 - ビス（ジアゾアセチル） - 2 - フェニルエタン、グルタルアルデヒド、例えば 4 - アジドサリチル酸とのエステルなどの N - ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば 3 , 3' - ジチオビス - （スクシンイミジルプロピオン酸）などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、及び、例えばビス - N - マレイミド - 1 , 8 - オクタンなどの二官能性マレイミドが挙げられる。メチル - 3 - [（p - アジドフェニル）ジチオ]プロピオイミデートなどの誘導体化剤は、光の存在下で架橋形成可能な光活性化性中間体を生成する。あるいは、臭化シアン活性化炭水化物などの反応性の水不溶性マトリックス及び米国特許第 3 , 9 6 9 , 2 8 7 号；第 3 , 6 9 1 , 0 1 6 号；第 4 , 1 9 5 , 1 2 8 号；第 4 , 2 4 7 , 6 4 2 号；第 4 , 2 2 9 , 5 3 7 号；及び第 4 , 3 3 0 , 4 4 0 号に記載されているような反応性基質を、タンパク質固定化のために使用する。

#### 【 0 1 8 0 】

グルタミル及びアスパラギン残基は、それぞれ対応するグルタミル及びアスパラギン酸残基に脱アミドされることが多い。あるいは、これらの残基は、穏やかな酸性条件下で脱アミノ化される。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内に入る。

【0181】

他の修飾として、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリンまたはトレオニン残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン及びヒスチジン側鎖の - アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79 - 86)、N末端アミンのアセチル化、及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

10

【0182】

本発明の範囲内に含まれる抗体構築物の共有結合修飾の別のタイプは、タンパク質のグリコシル化パターンを変更することを含む。当該技術分野で公知のように、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列 (例えば、以下に記載する特定のグリコシル化アミノ酸残基の存在または非存在)、またはタンパク質を産生する宿主細胞もしくは生物の両方に依存し得る。特定の発現系を以下に記載する。

【0183】

ポリペプチドのグリコシル化は、一般的にはN結合型またはO結合型のいずれかである。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン - X - セリン及びアスパラギン - X - トレオニン (式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である) は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列のいずれかを存在させることによって、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。O結合型グリコシル化とは、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンに、糖類であるN - アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの1つを結合させることを意味するが、5 - ヒドロキシプロリンまたは5 - ヒドロキシリジンも使用してよい。

20

【0184】

抗体構築物へのグリコシル化部位の付加は、(N結合型グリコシル化部位のための)上記のトリペプチド配列の1つ以上を含むようにアミノ酸配列を改変することによって簡便に達成される。改変はまた、(O結合型グリコシル化部位のための)開始配列への1つ以上のセリンまたはトレオニン残基の付加または置換によって行ってもよい。容易にするために、抗体構築物のアミノ酸配列は、好ましくは、ポリペプチドをコードするDNAを、所望のアミノ酸に翻訳するコドンが生成されるように、予め選択した塩基で突然変異させることによる、DNAレベルでの変化によって改変する。

30

【0185】

抗体構築物上の炭水化物部分の数を増加させる別の手段は、タンパク質へのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによる。これらの手順は、N及びO結合型グリコシル化のためのグリコシル化能力を有する宿主細胞中でのタンパク質の産生を必要としない点で効果的である。使用するカップリングの様式に応じて、糖 (複数可) を、(a) アルギニン及びヒスチジン、(b) 遊離カルボキシル基、(c) 遊離スルフヒドリル基、例えばシステインの遊離スルフヒドリル基、(d) 遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基、(e) 芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンなどの芳香族残基、または(f) グルタミンのアミド基に結合させてもよい。これらの方法は、WO 87 / 05330及びApplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259 - 306に記載されている。

40

【0186】

出発抗体構築物上に存在する炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に達成してもよい。化学的脱グリコシル化は、トリフルオロメタンスルホン酸化合物、または同等の化

50

合物へのタンパク質の曝露を必要とする。この処理により、結合している糖（N - アセチルグルコサミンまたはN - アセチルガラクトサミン）を除くほとんどまたはすべての糖が切断され、ポリペプチドはそのまま残る。化学的脱グリコシル化は、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 及び Edge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131 に記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350 に記載されているように様々なエンド及びエキソグルコシダーゼを使用することによって達成できる。潜在的なグリコシル化部位でのグリコシル化は、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105 に記載されているように、化合物ツニカマイシンを使用することによって阻止してもよい。ツニカマイシンは、タンパク質 - N - グリコシド結合の形成を阻止する。

#### 【0187】

抗体構築物の他の改変もまた、本明細書において企図される。例えば、抗体構築物の共有結合修飾の別のタイプは、米国特許第4,640,835号；第4,496,689号；第4,301,144号；第4,670,417号；第4,791,192号または第4,179,337号に記載されているような方法で、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールとポリプロピレンの共重合体などの様々なポリオールを含むが、必ずしもこれらに限定されない様々な非タンパク質性ポリマーに抗体構築物を結合することを含む。さらに、当該技術分野で公知のように、例えば、PEGのようなポリマーの添加を容易にするために、抗体構築物内の様々な位置でアミノ酸置換を行ってもよい。

#### 【0188】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体構築物の共有結合修飾は、1つ以上の標識の付加を含む。様々な長さのスペーサーアームを介して抗体構築物に標識基を結合させ、潜在的な立体障害を低減してもよい。タンパク質を標識するための様々な方法が当該分野で公知であり、本発明を実施する際に使用することができる。用語「標識」または「標識基」とは、任意の検出可能な標識を指す。一般的に、標識は、検出するアッセイに応じて、様々なクラスに分類され、これには以下の例が含まれるが、必ずしもこれらに限定するものではない：

a) 放射性同位体または放射性核種などの放射性または重同位元素であってもよい同位体標識（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、

b) 磁気標識（例えば磁性粒子）

c) レドックス活性部分

d) 蛍光基（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、化学発光基、及び「小分子」蛍光体またはタンパク質性蛍光体のいずれかであり得る蛍光体などの光学色素（発色団、蛍光体及びフルオロフォアを含むが、必ずしもこれらに限定されない）

e) 酵素基（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）

f) ビオチン化基

g) 二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合サイド、金属結合ドメイン、エピトープタグなど）。

#### 【0189】

「蛍光標識」とは、その固有の蛍光特性によって検出され得る任意の分子を意味する。適切な蛍光標識として、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチル - クマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファー・イエロー、Cascade Blue J、Texas Red、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy5、Cy5.5、LC Red 705、オレゴングリーン、Alexa-Fluor dye (Alexa



Fluor350、Alexa Fluor430、Alexa Fluor488、Alexa Fluor546、Alexa Fluor568、Alexa Fluor594、Alexa Fluor633、Alexa Fluor660、Alexa Fluor680)、Cascade Blue、Cascade Yellow及びR-フィコエリトリン(PE)(Molecular Probes、ユージーン、オレゴン)、FITC、ローダミン、及びTexas Red(Pierce、ロックフォード、イリノイ)、Cy5、Cy5.5、Cy7(Amersham Life Science、ピッツバーグ、ペンシルベニア)が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。フルオロフォアを含む適切な光学色素は、Richard P. HauglandによるMolecular Probes Handbookに記載されている。

10

#### 【0190】

適切なタンパク質性蛍光標識として、ウミシイタケ(Renilla)、オレンジシーペン(Ptilosarcus)、またはオワンクラゲ(Aequorea)種のGFPを含む緑色蛍光タンパク質(Chalfie et al., 1994, Science 263:802-805)、EGFP(Clontech Laboratories, Inc., Genbank登録番号U55762)、青色蛍光タンパク質(BFP、Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182)、高感度黄色蛍光タンパク質(EYFP、Clontech Laboratories, Inc.)、ルシフェラーゼ(Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417)、ガラクトシダーゼ(Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2603-2607)及びRenilla(WO92/15673、WO95/07463、WO98/14605、WO98/26277、WO99/49019、米国特許第5,292,658号;第5,418,155号;第5,683,888号;第5,741,668号;第5,777,079号;第5,804,387号;第5,874,304号;第5,876,995号;第5,925,558号)も挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

20

30

#### 【0191】

本発明の抗体構築物はまた、さらなるドメインを含み場合があり、それは、例えば、分子の単離において有用であるか、または分子の適合した薬物動態特性に関連する。抗体構築物の単離に有用なドメインは、ペプチドモチーフまたは二次導入した部分から選択してもよく、これは単離法、例えば、分離カラムにおいて捕捉可能である。そのようなさらなるドメインの非限定的な実施形態は、Mycタグ、HATタグ、HAタグ、TAPタグ、GSTタグ、キチン結合ドメイン(CBDタグ)、マルトース結合タンパク質(MBPタグ)、Flagタグ、Strepタグ及びその変異体(例えば、StrepIIタグ)ならびにHisタグとして知られるペプチドモチーフを有する。同定したCDRによって特徴づける本明細書に開示するすべての抗体構築物は、Hisタグドメインを含む場合があり、それは、通常、分子のアミノ酸配列中の連続したHis残基、すなわち、好ましくは5個、より好ましくは6個のHis残基(ヘキサ-ヒスチジン)の反復として知られる。Hisタグは、例えば、抗体構築物のN末端またはC末端に配置してもよく、好ましくは、それはC末端に位置する。最も好ましくは、ヘキサヒスチジントグ(HHHHHH)(配列番号16)を、ペプチド結合を介して本発明の抗体構築物のC末端に連結させる。さらに、徐放適用及び薬物動態特性の向上のために、PLGA-PEG-PLGAの複合体システムをポリヒスチジントグと組み合わせてもよい。

40

#### 【0192】

本明細書に記載の抗体構築物のアミノ酸配列改変もまた意図される。例えば、抗体構築物の結合親和性及び/または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗

50

体構築物のアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド変化を抗体構築物核酸に導入することによって、またはペプチド合成によって調製する。以下に記載するすべてのアミノ酸配列修飾は、非修飾の親分子の所望の生物学的活性（標的細胞表面抗原及びCD3への結合）を依然として保持する抗体構築物をもたらすはずである。

#### 【0193】

用語「アミノ酸」または「アミノ酸残基」とは、一般的に、当該分野で認識されている定義を有するアミノ酸、例えば：アラニン（AlaまたはA）；アルギニン（ArgまたはR）；アスパラギン（AsnまたはN）；アスパラギン酸（AspまたはD）；システイン（CysまたはC）；グルタミン（GlnまたはQ）；グルタミン酸（GluまたはE）；グリシン（GlyまたはG）；ヒスチジン（HisまたはH）；イソロイシン（HeまたはI）；ロイシン（LeuまたはL）；リジン（LysまたはK）；メチオニン（MetまたはM）；フェニルアラニン（PheまたはF）；プロリン（ProまたはP）；セリン（SerまたはS）；トレオニン（ThrまたはT）；トリプトファン（TrpまたはW）；チロシン（TyrまたはY）；及びバリン（ValまたはV）からなる群から選択されるアミノ酸を指すが、望みに応じて、改変した、合成の、または希なアミノ酸を使用してもよい。一般的に、アミノ酸は、非極性側鎖（例えば、Ala、Cys、He、Leu、Met、Phe、Pro、Val）；負に荷電した側鎖（例えば、Asp、Glu）；正に帯電した側鎖（例えば、Arg、His、Lys）；または非荷電極性側鎖（例えば、Asn、Cys、Gln、Gly、His、Met、Phe、Ser、Thr、Trp、及びTyr）を有するアミノ酸として分類することができる。

#### 【0194】

アミノ酸修飾には、例えば、抗体構築物のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び／または挿入、及び／または置換が含まれる。最終構築物が所望の特性を有するという条件の下に、欠失、挿入、及び置換の任意の組合せを最終構築物に到達するように行う。アミノ酸変化はまた、グリコシル化部位の数または位置を変化させるなど、抗体構築物の翻訳後プロセスを変化させる可能性がある。

#### 【0195】

例えば、各CDRにおいて、1、2、3、4、5、または6個のアミノ酸を挿入、置換または欠失させてもよく（もちろんそれらの長さに応じて）、一方、各FRにおいて、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または25個のアミノ酸を挿入、置換または欠失させてもよい。好ましくは、抗体構築物へのアミノ酸配列の挿入には、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10残基～100残基以上を有するポリペプチドまでの範囲の長さのアミノ及び／またはカルボキシル末端への融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の内部配列挿入が含まれる。対応する改変を、本発明の抗体構築物の第三のドメイン内においても、行ってよい。本発明の抗体構築物の挿入変異体は、酵素の抗体構築物のN末端またはC末端への融合またはポリペプチドへの融合を含む。

#### 【0196】

置換突然変異誘発にとって最も関心のある部位には、重鎖及び／または軽鎖のCDR、特に超可変領域が含まれる（しかし、必ずしもこれらに限定されない）が、重鎖及び／または軽鎖のFR改変もまた意図される。置換は、好ましくは、本明細書に記載するような保存的置換である。好ましくは、CDRまたはFRの長さに応じて、CDR内の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸を置換してもよく、一方、フレームワーク領域（FR）において、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、または25個のアミノ酸を置換してもよい。例えば、CDR配列が6個のアミノ酸を包含する場合、これらのアミノ酸の1、2または3個を置換することが想定される。同様に、CDR配列が15個のアミノ酸を包含する場合、1、2、3、4、5または6個のこれらのアミノ酸を置換することが想定される。

#### 【0197】

10

20

30

40

50

突然変異誘発の好ましい位置である抗体構築物の特定の残基または領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells in Science, 244:1081-1085(1989)に記載されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。本明細書では、抗体構築物内の標的残基の残基または基（例えばarg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電残基）を同定し、中性または負に荷電したアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）に置換し、アミノ酸とエピトープとの相互作用に影響を与える。

#### 【0198】

置換に対する機能的感受性を示すそれらのアミノ酸位置は、置換部位に、または置換部位のためにさらなるまたは他の変異体を導入することによって精製する。したがって、アミノ酸配列変異を導入するための部位または領域は予め決定するが、突然変異そのものの性質は予め決定する必要はない。例えば、所与の部位における突然変異の性能を分析または最適化するために、アラニンスキャニングまたはランダム突然変異誘発を標的コドンまたは領域で行い、発現した抗体構築物変異体を所望の活性の最適な組合せについてスクリーニングしてもよい。既知の配列を有するDNA中の所定の部位で置換変異を作製する技術、例えばM13プライマー突然変異誘発法及びPCR突然変異誘発法は公知である。突然変異体のスクリーニングは、標的細胞表面抗原またはCD3結合などの抗原結合活性のアッセイを用いて行う。

10

#### 【0199】

一般的に、重鎖及び/または軽鎖のCDRの1つ以上またはすべてにおいてアミノ酸を置換する場合、その後得られる「置換」配列は、「元の」CDR配列に対して、少なくとも60%または65%、より好ましくは70%または75%、さらにより好ましくは80%または85%、特に好ましくは90%または95%同一であるCDR配列を有する。このことは、その同一性の程度が、「置換」配列と同一であるCDRの長さに依存することを意味する。例えば、5個のアミノ酸を有するCDRは、少なくとも1個のアミノ酸が置換されるように、その置換後の配列と80%同一であることが好ましい。したがって、抗体構築物のCDRは、それらの置換後の配列と異なる程度の同一性を有する場合があります、例えば、CDRL1が80%を有する一方で、CDRL3が90%を有する場合があります。

20

#### 【0200】

好ましい置換（または置換え）は保存的置換である。しかしながら、抗体構築物が、それぞれ、第一のドメインを介して標的細胞表面抗原に、及び第二のドメインを介してCD3、CD3に結合する能力を保持し、及び/またはそのCDRが、置換後の配列に対して同一性を有する（「元の」CDR配列に対して、少なくとも60%または65%、より好ましくは70%または75%、さらにより好ましくは80%または85%、そして特に好ましくは90%または95%同一である）限り、（非保存的置換または以下の表3に列挙する1つ以上の「例示的置換」を含む）任意の置換が想定される。

30

#### 【0201】

保存的置換を、「好適な置換」の見出しの下で表3に示す。そのような置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、表3の「例示的置換」と呼ばれる、またはアミノ酸クラスに関して以下にさらに記載するようなより実質的な変化を導入し、産物を所望の特性についてスクリーニングしてもよい。

40

#### 【0202】

（表3）アミノ酸置換

置換前	例示的置換	好適な置換
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	ノルロイシン, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

10

20

30

## 【 0 2 0 3 】

本発明の抗体構築物の生物学的特性の実質的な改変は、( a ) 置換の領域におけるポリペプチド主鎖の構造、例えば、シートもしくはヘリカル構造、( b ) 標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または( c ) 側鎖の嵩高さを維持することに対する効果が有意に異なる置換を選択することによって達成される。天然に存在する残基は、共通の側鎖特性：( 1 ) 疎水性：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；( 2 ) 中性親水性：cys、ser、thr、asn、gln；( 3 ) 酸性：asp、glu；( 4 ) 塩基性：his、lys、arg；( 5 ) 鎖の配向に影響を及ぼす残基：gly、pro；( 6 ) 芳香族：trp、tyr、phe、に基づいてグループに分類される。

## 【 0 2 0 4 】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴う。抗体構築物の適切なコンフォメーションを維持することに関与しない任意のシステイン残基を、通常、セリンで置換して、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止してもよい。逆に、システイン結合（複数可）を抗体に添加して、その安定性を向上させてもよい（特に、抗体がFvフラグメントのような抗体断片である場合）。

## 【 0 2 0 5 】

アミノ酸配列に関して、配列同一性及び／または類似性は、限定するものではないが、Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482の局所配列同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443の配列同一性アライメントアルゴリズム、Pe

40

50

arson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 85: 2444の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装版(Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA)、Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12: 387-395によって記載されたBest Fit配列プログラムを含む当該分野で公知の標準的な技術を用いて、好ましくはデフォルト設定を使用して決定するか、または検査によって決定する。好ましくは、同一性の割合を、以下のパラメータに基づいてFastDBによって計算する：ミスマッチペナルティ1；ギャップペナルティ1；ギャップサイズペナルティ0.33；及び結合ペナルティ30、“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis”, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp127-149(1988), Alan R. Liss, Inc.

#### 【0206】

有用なアルゴリズムの例は、PILEUPである。PILEUPは、漸進的なペアワイズアライメントを用いて関連配列のグループから複数の配列アライメントを作成する。また、アライメントを作成するために使用するクラスタリング関係を示すツリーをプロットすることもできる。PILEUPは、Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35: 351-360のプログレッシブアライメント法を単純化したものを使用し；この方法は、Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5: 151-153に記載されたものと同様である。有用なPILEUPパラメータは、デフォルトのギャップウェイト3.00、デフォルトのギャップ長ウェイト0.10、及び加重エンドギャップを含む。

#### 【0207】

有用なアルゴリズムの別の例は、BLASTアルゴリズムであり：Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410；Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402；及びKarin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 5873-5787に記載されている。特に有用なBLASTプログラムは、Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266: 460-480から得られたWU-BLAST-2プログラムである。WU-BLAST-2は、いくつかの検索パラメータを使用し、その大部分はデフォルト値に設定されている。調整可能なパラメータは、以下の値に設定する：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値(T)=11。HSP S及びHSP S2パラメータは動的な値であり、特定の配列の組成及び目的の配列を検索する特定のデータベースの組成に応じて、プログラム自体によって確立される；しかしながら、値を調整して感度を高めてもよい。

#### 【0208】

さらなる有用なアルゴリズムは、Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402によって報告されたgapped BLASTである。gapped BLASTはBLOSUM-62置換スコアを用い；閾値Tパラメータを9に設定する；ギャップのない延長を生じるツー・ヒット法は、kのギャップ長を $10+k$ のコストでチャージし；Xuを16に設定し、Xgをデータベース検索ステージでは40、アルゴリズムの出力ステージでは67に設定する。約22ビットに対応するスコアによってギャップアライメントを生じさせる。

#### 【0209】

一般的に、個々の変異型CDRまたはVH/VL配列間のアミノ酸相同性、類似性または同一性は、本明細書に記載する配列に対して少なくとも60%であり、より一般的には

10

20

30

40

50

、少なくとも65%または70%、より好ましくは少なくとも75%または80%、さらにより好ましくは少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、及びほぼ100%の高い相同性または同一性が好ましい。同様に、本明細書中で同定する結合タンパク質の核酸配列に関する「パーセント(%)核酸配列同一性」は、抗体構築物のコード配列中のヌクレオチド残基と同一である候補配列中のヌクレオチド残基の百分率として定義される。特定の方法は、デフォルトパラメーターに設定したWU-BLAST-2のBLASTNモジュールを利用し、オーバーラップスパン及びオーバーラップフラクションはそれぞれ1及び0.125に設定する。

#### 【0210】

一般的に、個々の変異型CDRまたはVH/VL配列をコードするヌクレオチド配列と本明細書に記載するヌクレオチド配列との間の核酸配列相同性、類似性または同一性は、少なくとも60%であり、より一般的には、少なくとも65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%、及びほぼ100%の高い相同性または同一性が好ましい。したがって、「変異型CDR」または「変異型VH/VL領域」は、本発明の親CDR/VH/VLに対して特定の相同性、類似性、または同一性を有するものであり、必ずしも限定するものではないが、親CDRまたはVH/VLの特異性及び/または活性の少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%を含む、生物学的機能を共有する。

#### 【0211】

一実施形態では、本発明による抗体構築物のヒト生殖系列に対する同一性の割合は、70%または75%、より好ましくは80%または85%、さらにより好ましくは90%、最も好ましくは91%、92%、93%、94%、95%または96%である。ヒト抗体の生殖系列遺伝子産物に対する同一性は、治療中の患者の薬物に対する免疫応答を誘発する治療タンパク質のリスクを低減する重要な特徴であると考えられている。Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36(2005)3-10)は、薬物抗体構築物の非ヒト部分の低減が、治療中の患者において抗薬物抗体を誘発するリスクを低下させることを示す。網羅的な数の臨床的に評価された抗体薬物とそれぞれの免疫原性データとを比較することにより、抗体のV領域のヒト化は、未改変非ヒトV領域を保有する抗体(患者の平均23.59%)よりもタンパク質の免疫原性を低くする(患者の平均5.1%)ことを示す。したがって、ヒト配列に対するより高い程度の同一性は、抗体構築物の形態のV領域に基づくタンパク質治療剤にとって望ましい。生殖系列の同一性を決定する目的のために、ベクターNTIソフトウェアを使用して、VLのV領域を、ヒト生殖系列Vセグメント及びJセグメント(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)のアミノ酸配列に対してアライメントすることができ、かつアミノ酸配列は、同一アミノ酸残基をVLのアミノ酸残基の総数で割った百分率で計算することができる。VH CDR3が、その高い多様性及び既存のヒト生殖系列VH CDR3アライメントパートナーの欠如のため、除外され得ることを除いて、VHセグメント(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>)についても同様であり得る。次いで、組換え技術を用いて、ヒト抗体生殖系列遺伝子に対する配列同一性を高めることができる。

#### 【0212】

さらなる実施形態では、本発明の二重特異性抗体構築物は、標準的な研究規模条件下で、例えば標準的な二段階精製プロセスにおいて高い単量体収率を示す。好ましくは、本発明による抗体構築物の単量体収率は0.25mg/L上清、より好ましくは0.5mg/L、さらにより好ましくは1mg/L、最も好ましくは3mg/L上清である。

#### 【0213】

10

20

30

40

50

同様に、二量体抗体構築物アイソフォームの収量、したがって、抗体構築物の単量体比率（すなわち、単量体：（単量体＋二量体））を決定することができる。単量体及び二量体抗体構築物の生産性及び計算した単量体比率は、例えば、ローラーボトルにおける標準化された研究規模の生産に由来する培養上清のSEC精製工程において得ることができる。一実施形態では、抗体構築物の単量体比率は 80%、より好ましくは 85%、さらにより好ましくは 90%、最も好ましくは 95%である。

#### 【0214】

一実施形態では、抗体構築物の好ましい血漿安定性（血漿存在下でのEC50と血漿非存在下でのEC50の比率）は、5または4、より好ましくは3.5または3、さらにより好ましくは2.5または2、最も好ましくは1.5または1である。抗体構築物の血漿安定性は、37℃での24時間のヒト血漿中での構築物のインキュベーションと、その後の<sup>51</sup>クロム遊離細胞傷害アッセイにおけるEC50測定によって試験することができる。細胞傷害性アッセイにおけるエフェクター細胞は、濃縮したヒトCD8陽性T細胞を刺激することができる。標的細胞は、例えば、ヒト標的細胞表面抗原を形質移入したCHO細胞であり得る。エフェクター対標的細胞（E：T）比は、10：1を選択することができる。この目的のために使用するヒト血漿プールは、EDTAでコーティングしたシリンジによって収集した健常ドナーの血液に由来する。遠心分離によって細胞成分を除去し、上部血漿相を集め、続いてプールする。対照として、抗体構築物を、RPMI-1640培地中の細胞傷害性アッセイの直前に希釈する。血漿安定性はEC50（血漿インキュベーション後）とEC50（対照）との比として計算される。

#### 【0215】

本発明の抗体構築物の単量体から二量体への変換が少ないことがさらに好ましい。この変換は、異なる条件下で測定し、高速サイズ排除クロマトグラフィーによって分析することができる。例えば、抗体構築物の単量体アイソフォームのインキュベーションは、インキュベーター中で、37℃、7日間、例えば、100 µg/mlまたは250 µg/mlの濃度で行うことができる。これらの条件下で、本発明の抗体構築物は、5%、より好ましくは4%、さらにより好ましくは3%、さらにより好ましくは2.5%、さらにより好ましくは2%、さらにより好ましくは1.5%、最も好ましくは1%または0.5%またはさらには0%の二量体比率を示す。

#### 【0216】

本発明の二重特異性抗体構築物は、多数の凍結/融解サイクル後に非常に低い二量体変換を示すことも好ましい。例えば、抗体構築物単量体は、例えば、一般的な製剤の緩衝液中で250 µg/mlの濃度に調整し、3回の凍結/解凍サイクル（-80℃で30分間凍結し、続いて室温で30分間解凍）に供した後、高速SECにより、二量体抗体構築物に変換した、初期の単量体抗体構築物の割合を決定する。好ましくは、例えば3回の凍結/融解サイクルの後の二重特異性抗体構築物の二量体比率は、5%、より好ましくは4%、さらにより好ましくは3%、さらにより好ましくは2.5%、さらにより好ましくは2%、さらにより好ましくは1.5%、最も好ましくは1%、またはさらには0.5%である。

#### 【0217】

本発明の二重特異性抗体構築物は、45℃または50℃、より好ましくは52℃または54℃、さらにより好ましくは56℃または57℃、最も好ましくは58℃または59℃の凝集温度で好適な温度安定性を示す。熱安定性パラメータは、抗体凝集温度に関して以下のように決定することができる：濃度250 µg/mlの抗体溶液を使い捨て型キュベットに移し、動的光散乱（DLS）装置に入れる。測定した半径を一定に取得しながら、0.5℃/minの加熱速度で試料を40℃から70℃に加熱する。タンパク質の融解及び凝集を示す半径の増加を利用して、抗体の凝集温度を計算する。

#### 【0218】

あるいは、示差走査熱量測定（DSC）によって温度融解曲線を測定して、抗体構築物の固有の生物物理学的タンパク質安定性を決定することができる。これらの実験は、Mi

10

20

30

40

50

croCal LLC (ノーサンブトン、マサチューセッツ、米国) VP-DSC装置を用いて実施する。抗体構築物を含有する試料のエネルギー吸収を、製剤緩衝液のみを含有する試料と比較して、20 ~ 90 で記録する。例えば、SECランニング緩衝液中における抗体構築物の最終濃度を250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調整する。それぞれの融解曲線を記録するために、全体の試料温度を段階的に上昇させる。各温度Tにおいて、試料及び製剤緩衝液標準のエネルギー吸収量を記録する。それぞれの温度に対して、試料のエネルギー吸収量Cp ( $\text{kcal}/\text{mol}/$  ) から標準の吸収量を引いた差分をプロットする。融解温度は、エネルギー吸収の最初の極大での温度として定義される。

#### 【0219】

本発明の標的細胞表面抗原 x CD3 二重特異性抗体構築物はまた、0.2、好ましくは0.15、より好ましくは0.12、さらにより好ましくは0.1、最も好ましくは0.08の濁度(精製単量体抗体構築物を2.5  $\text{mg}/\text{ml}$  へ濃縮し、一晚インキュベーション後のOD340によって測定する)を有することも想定される。

10

#### 【0220】

さらなる実施形態では、本発明による抗体構築物は酸性pHで安定である。pH5.5(例えば陽イオン交換クロマトグラフィーを行うのに必要なpH)またはそれ未満、例えばpH4.0 ~ 5.5のような非生理的pHで、抗体構築物がより高い耐性を示すほど、イオン交換カラムを用いての、ロードしたタンパク質の総量に対する抗体構築物の回収率は高くなる。pH5.5でのイオン(例えば陽イオン)交換カラムからの抗体構築物の回収率は、好ましくは30%、より好ましくは40%、より好ましくは50%、さらにより好ましくは60%、さらにより好ましくは70%、さらにより好ましくは80%、さらにより好ましくは90%、さらにより好ましくは95%、及び最も好ましくは99%である。

20

#### 【0221】

さらに、本発明の二重特異性抗体構築物は、治療効果または抗腫瘍活性を示すことが想定される。これは、例えば、進行した段階のヒト腫瘍異種移植片モデルの以下の実施例に開示するような試験において評価することができる。

#### 【0222】

この試験の特定のパラメータ、例えば、注入する腫瘍細胞の数、注射部位、移植するヒトT細胞の数、投与する二重特異性抗体構築物の量、及びタイムラインなどを修正または適合させる一方で、依然として有意義かつ再現性のある結果を達成する方法は、当業者には周知である。好ましくは、腫瘍増殖阻害T/C [%]は、70または60、より好ましくは50または40、さらにより好ましくは30または20、最も好ましくは10または5またはさらに2.5である。

30

#### 【0223】

本発明の抗体構築物の好ましい実施形態では、抗体構築物は一本鎖抗体構築物である。

#### 【0224】

また、好ましい実施形態では、本発明の抗体構築物は、HLEドメイン中にアミノからカルボキシルに向けて順に：

ヒンジ - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub> - リンカー - ヒンジ - CH<sub>2</sub> - CH<sub>3</sub>  
を有する。

40

#### 【0225】

本発明の一実施形態ではまた、第三のドメインの1つまたは好ましくはそれぞれ(両方)のポリペプチド単量体のCH<sub>2</sub>ドメインは、ドメイン内システインジスルフィド架橋を有する。当該技術分野で公知のように、用語「システインジスルフィド架橋」とは、一般構造R-S-S-Rを有する官能基を指す。この結合は、SS結合またはジスルフィド架橋とも呼ばれ、システイン残基の2つのチオール基のカップリングによって誘導される。成熟抗体構築物中のシステインジスルフィド架橋を形成するシステインを、309及び321に対応するCH<sub>2</sub>ドメインのアミノ酸配列(Kabatナンバリング)に導入することは、本発明の抗体構築物にとって特に好ましい。

50



## 【0226】

本発明の一実施形態では、C H 2ドメインのK a b a t位置314のグリコシル化部位を除去する。このグリコシル化部位の除去は、XがQ以外の任意のアミノ酸であるN314X置換によって達成することが好ましい。前記置換は好ましくはN314G置換である。より好ましい形態では、前記C H 2ドメインは、以下の置換（K a b a tによる位置）V321C及びR309C（これらの置換はK a b a t位置309及び321でドメイン内システインジスルフィド架橋を導入する）をさらに有する。

## 【0227】

例えば当該技術分野で公知の二重特異性ヘテロF c抗体構築物（図1b）と比較しての、本発明の抗体構築物の好ましい特徴は、とりわけ、C H 2ドメインにおける上記修飾の導入に関連し得ると考えられる。したがって、本発明の抗体構築物の第三のドメイン中のC H 2ドメインが、K a b a t位置309及び321でのドメイン内システインジスルフィド架橋を有すること、及び/またはK a b a t位置314でのグリコシル化部位を上記のようなN314X置換、好ましくはN314G置換により除去することは、本発明の構築物にとって好ましい。

## 【0228】

本発明のさらに好ましい実施形態では、本発明の抗体構築物の第三のドメイン内のC H 2ドメインは、K a b a t位置309及び321でドメイン内システインジスルフィド架橋を有しており、K a b a t位置314のグリコシル化部位は、N314G置換によって除去されている。

## 【0229】

一実施形態では、本発明は、抗体構築物を提供し、そこにおいて：

（i）第一のドメインは2つの抗体可変ドメインを含み、第二のドメインは2つの抗体可変ドメインを含むか；

（i i）第一のドメインは1つの抗体可変ドメインを含み、第二のドメインは2つの抗体可変ドメインを含むか；

（i i i）第一のドメインは2つの抗体可変ドメインを含み、第二のドメインは1つの抗体可変ドメインを含むか；または

（i v）第一のドメインは1つの抗体可変ドメインを含み、第二のドメインは1つの抗体可変ドメインを含む。

## 【0230】

したがって、第一及び第二のドメインは、V H及びV Lドメインのような2つの抗体可変ドメインをそれぞれ含む結合ドメインであってもよい。2つの抗体可変ドメインを含むそのような結合ドメインの例は、本明細書において上記に記載されており、例えば、本明細書において上記に記載した、F vフラグメント、s c F vフラグメントまたはF a bフラグメントが挙げられる。あるいは、これらの結合ドメインの一方または両方は、単一の可変ドメインのみを含む場合がある。そのような単一ドメインの結合ドメインの例は、上記に記載されており、例えば、他のV領域またはドメインとは独立して抗原またはエピトープに特異的に結合するV H H、V HまたはV Lであってもよい1つの可変ドメインのみを含む単一の可変ドメイン抗体またはナノボディが挙げられる。

## 【0231】

本発明の抗体構築物の好ましい実施形態では、第一及び第二のドメインを、ペプチドリンカーを介して第三のドメインに融合させる。好ましいペプチドリンカーは、上に記載されており、アミノ酸配列G l y - G l y - G l y - G l y - S e r、すなわちG l y<sub>4</sub> S e r、またはそのポリマー、すなわち（G l y<sub>4</sub> S e r）<sub>x</sub>を特徴とし、式中、xは1以上の整数（例えば2または3）である。

## 【0232】

本発明の一態様では、第一のドメインによって結合する標的細胞表面抗原は、腫瘍抗原、免疫学的障害に特異的な抗原またはウイルス抗原である。本明細書中で使用する場合、用語「腫瘍抗原」とは、腫瘍細胞上に提示される抗原として理解してもよい。これらの抗

原は、細胞表面上に、分子の膜貫通及び細胞質部分としばしば組み合わされる細胞外部分を用いて提示することができる。これらの抗原は、腫瘍細胞のみが提示可能であり、正常細胞は提示不可能なことがある。腫瘍抗原は、腫瘍細胞上でのみ発現可能であるか、または正常細胞に比べて腫瘍特異的突然変異を提示し得る。この場合、それらは腫瘍特異的抗原と呼ばれる。腫瘍細胞及び正常細胞によって提示される抗原は、より一般的であり、腫瘍関連抗原と呼ばれる。これらの腫瘍関連抗原は、正常細胞に比べて過剰に発現し得るか、または正常組織に比べてコンパクト性に欠ける腫瘍組織の構造に起因して、腫瘍細胞における抗体結合のためのアクセス性が高い。本明細書で使用する腫瘍抗原の非限定的な例は、CD19、CD33、EGFRvIII、MSLN、CDH19、FLT3、DLL3、CDH3、BCMA及びPSMAである。

10

#### 【0233】

本発明の抗体構築物の腫瘍抗原は、CD19、CD33、EGFRvIII、MSLN、CDH19、FLT3、DLL3、CDH3、BCMA及びPSMAからなる群から選択されることが想定される。

#### 【0234】

本発明に関して、CD19に対する二重特異性抗体構築物の例は、配列番号1～6に記載するCDRを有する抗体構築物である。CD3結合ドメインは、配列番号9～14に示されるCDRによって特徴付けられる。本発明に関する特定の例は、CD19×CD3二重特異性抗体構築物である。本発明に関して、CD19に対する二重特異性HLE抗体構築物の例は、配列番号102～104及び106～108に記載するCDRを有する抗体構築物である。本発明に関する特定の例は、BCMA×CD3二重特異性抗体構築物である。本発明に関して、CD33に対する二重特異性抗体構築物の例は、配列番号29～31及び34～36に記載するCDRを有する抗体構築物である。本発明に関する特定の例は、CD33×CD3二重特異性抗体構築物である。本発明に関して、CD33に対する二重特異性HLE抗体構築物の例は、配列番号29～31及び34～36に記載するCDRを有する抗体構築物である。本発明に関する特定の例は、HLEに対する第三のドメインを含む、CD33×CD3二重特異性抗体構築物である。本発明に関して、EGFRvIIIに対する二重特異性抗体構築物の例は、配列番号42～47に記載するCDRを有する抗体構築物である。本発明に関する特定の例は、EGFRvIII×CD3二重特異性抗体構築物である。

20

30

#### 【0235】

一態様では、本発明の抗体構築物は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を有することを特徴とする：

- (a) 配列番号37～41；CD33
- (b) 配列番号51及び52；EGFRvIII
- (c) 配列番号62、63及び64；MSLN
- (d) 配列番号74～82 CDH19
- (e) 配列番号103及び103 DLL3
- (f) 配列番号17、113及び114 CD19
- (g) 配列番号92及び93 FLT3
- (h) 配列番号124及び125 CDH3
- (i) 配列番号135及び136 BCMA
- (j) 配列番号146～151、161～168及び176～181 PSMA。

40

上記の二重特異性抗体構築物のいずれかは、半減期延長ドメイン、好ましくはscFcドメインまたはヘテロFcドメインまたはアルブミン結合ドメインである、第三のドメインを備えていてもいなくてもよい。

#### 【0236】

本発明はさらに、本発明の抗体構築物をコードするポリヌクレオチド/核酸分子を提供する。ポリヌクレオチドは、鎖中において共有結合した13個以上のヌクレオチド単量体からなる生体高分子である。DNA(cDNAなど)及びRNA(mRNAなど)は、明

50

確な生物学的機能を有するポリヌクレオチドの例である。ヌクレオチドは、単量体またはDNAもしくはRNAなどの核酸分子の単量体またはサブユニットとして機能する有機分子である。核酸分子またはポリヌクレオチドは、二本鎖及び一本鎖、直鎖状ならびに環状であり得る。これは、好ましくはベクターに含まれ、そのベクターは、好ましくは宿主細胞に含まれる。前記宿主細胞は、例えば、本発明のベクターまたはポリヌクレオチドで形質転換または形質移入した後、抗体構築物を発現することができる。その目的のために、ポリヌクレオチドまたは核酸分子を、調節配列に作動可能に連結させる。

#### 【0237】

遺伝コードとは、遺伝物質（核酸）内にコードされた情報がタンパク質に翻訳される一連の規則である。生存細胞における生物学的デコーディングは、tRNA分子を使用してアミノ酸を運び、mRNAの3個のヌクレオチドを一度に読み取り、mRNAによって特定される順序でアミノ酸を連結するリボソームによって達成される。このコードは、コドンと呼ばれるこれらの3連ヌクレオチドの配列が、タンパク質合成中に次にどのアミノ酸を付加するかを特定する方法を定義する。いくつかの例外を除いて、核酸配列中の3ヌクレオチドのコドンは、単一のアミノ酸を特定する。大多数の遺伝子はまったく同じコードでコードされているため、この特定のコードは、しばしば正準または標準遺伝コードと呼ばれる。遺伝コードは、所定のコード領域のタンパク質配列を決定するが、他のゲノム領域は、これらのタンパク質を産生する時期及び場所に影響を及ぼし得る。

#### 【0238】

さらに、本発明は、本発明のポリヌクレオチド/核酸分子を含むベクターを提供する。ベクターは、（外来の）遺伝物質を細胞に移入するためのビヒクルとして使用される核酸分子である。用語「ベクター」は、プラスミド、ウイルス、コスミド及び人工染色体を包含するが、これらに限定されない。一般的に、改変ベクターは、複製起点、マルチクローニングサイト及び選択マーカーを備える。ベクター自体は、通常、ヌクレオチド配列、一般的には、インサート（導入遺伝子）及びベクターの「骨格」として働くより大きな配列を含むDNA配列である。現代のベクターは、導入遺伝子のインサート及び骨格に加えて、以下のようなさらなる形質を包含する場合がある：プロモーター、遺伝マーカー、抗生物質耐性遺伝子、レポーター遺伝子、標的配列、タンパク質精製タグ。発現ベクター（発現構築物）と呼ばれるベクターは、標的細胞内での導入遺伝子の発現に特化しており、通常、調節配列を有する。

#### 【0239】

用語「調節配列」とは、特定の宿主生物において作動可能に連結するコード配列の発現に必要なDNA配列を指す。原核生物に適した調節配列として、例えば、プロモーター、場合によりオペレーター配列、及びリボソーム結合サイドが挙げられる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、及びエンハンサーを利用することが知られている。

#### 【0240】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれた場合に「作動可能に連結する」。例えば、プレ配列または分泌リーダー配列のDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドのDNAに作動可能に連結し；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響する場合、コード配列に作動可能に連結し；リボソーム結合サイドは、翻訳を容易にするように配置されている場合、コード配列に作動可能に連結する。一般的に、「作動可能に連結する」とは、連結しているDNA配列が隣接しており、分泌リーダーの場合には隣接しているとともにリーディング・フェーズ内にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは連続している必要はない。連結は、便利な制限酵素部位でのライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合、従来の方 法に従って、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを使用する。

#### 【0241】

「形質移入」は、核酸分子またはポリヌクレオチド（ベクターを含む）を意図的に標的細胞に導入するプロセスである。この用語は、真核細胞における非ウイルス性の方法にお

10

20

30

40

50

いて主に使用される。形質導入は、核酸分子またはポリヌクレオチドのウイルスを介した伝達を記載するためにしばしば用いられる。動物細胞の形質移入は、一般的には、細胞膜に一時的な孔または「穴」を開き、物質の取込みを可能にすることを含む。形質移入は、リン酸カルシウムを用いて、電気穿孔法によって、細胞圧搾によって、またはカチオン性脂質を物質と混合してリポソームを生成し、これを細胞膜と融合させ、内部に積荷を蓄積させることによって行うことができる。

#### 【0242】

用語「形質転換」は、核酸分子またはポリヌクレオチド（ベクターを含む）の細菌への、及び植物細胞を含む非動物真核細胞への非ウイルス性移入を記載するために使用される。したがって、形質転換とは、細胞周囲からの細胞膜（複数可）を介した直接取込み、及びその後の外来性遺伝物質（核酸分子）の組込みに起因する、細菌性または非動物性真核細胞の遺伝子改変である。形質転換は人為的手段によって行うことができる。形質転換が起こるためには、細胞または細菌がコンピテント状態にある必要があり、この状態は、飢餓及び細胞密度などの環境条件に対する時間制限のある応答として生じ得る。

#### 【0243】

さらに、本発明は、ポリヌクレオチド／核酸分子または本発明のベクターで形質転換または形質移入した宿主細胞を提供する。本明細書中で使用する場合、用語「宿主細胞」または「レシピエント細胞」は、本発明の抗体構築物をコードするベクター、外来性核酸分子、及びポリヌクレオチドのレシピエント；及び／または抗体構築物それ自体のレシピエントであるかまたはあり得る任意の個々の細胞または細胞培養物を含むことを意図する。細胞へのそれぞれの物質の導入は、形質転換、形質移入などによって行う。用語「宿主細胞」はまた、単一細胞の子孫または潜在的子孫を含むことを意図する。自然発生的、偶発的、もしくは意図的な突然変異または環境的な影響のために、特定の改変が後続の世代で起こる可能性があるため、そのような子孫は、実際には親細胞と完全に同一ではない（形態学的に、またはゲノムもしくは全DNAの相補性において）が、本明細書中で使用する用語の範囲内に依然として含まれる。適切な宿主細胞として、原核細胞または真核細胞が挙げられ、さらに、細菌、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、ならびに動物細胞、例えば昆虫細胞及び哺乳類細胞、例えばマウス、ラット、マカクまたはヒトなどが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

#### 【0244】

本発明の抗体構築物は、細菌中で産生することができる。発現後、本発明の抗体構築物を可溶性画分中の大腸菌細胞ペーストから単離し、例えばアフィニティークロマトグラフィー及び／またはサイズ排除法を介して精製することができる。最終精製は、例えばCHO細胞内で発現させた抗体を精製するプロセスと同様に行うことができる。

#### 【0245】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物は、本発明の抗体構築物の適切なクローニングまたは発現宿主である。サッカロマイセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、または一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物の中で最も一般的に使用されている。しかしながら、例えばシゾサッカロマイセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、クリベロマイセス属（*Kluyveromyces*）宿主、例えば*K. ラクティス*（*K. lactis*）、*K. フラジリス*（*K. fragilis*）（ATCC12424）、*K. ブルガリクス*（*K. bulgaricus*）（ATCC16045）、*K. ウィッカーラミ*（*K. wickerhamii*）（ATCC24178）、*K. ワルティ*（*K. waltii*）（ATCC56500）、*K. ドロソフィラム*（*K. drosophilum*）（ATCC36906）、*K. サーモトレランス*（*K. thermotolerans*）、及び*K. マルキシアヌス*（*K. marxianus*）；ヤロウイア属（*yarrowia*）（EP402226）；ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）（EP183070）；カンジダ属（*Candida*）；トリコデルマ・リーゼイ（*Trichoderma reesei*）（EP244234）；ニューロスポラ・クラッサ（*Neurospora*

a crassa) ; シュワニオマイセス属 (Schwanniomyces) 、例えばシュワニオマイセス・オキシデンタリス (Schwanniomyces occidentalis) ; ならびに糸状菌 (filamentous fungi) 、例えばニューロスポラ属 (Neurospora) 、ペニシリウム属 (Penicillium) 、トリボクラジウム属 (Tolypocladium) 、及びアスペルギルス属 (Aspergillus) 宿主、例えば A . ニデュランス (A . nidulans) 及び A . ニガー (A . niger) などの、本明細書中の多数の他の属、種、及び株が一般に利用可能で有用である。

#### 【0246】

本発明のグリコシル化抗体構築物の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例として、植物及び昆虫細胞が挙げられる。例えば、ヨトウガ (Spodoptera frugiperda) (幼虫)、ネッタイシマカ (Aedes aegypti) (カ)、ヒトスジシマカ (Aedes albopictus) (カ)、キロショウジョウバエ (Drosophila melanogaster) (ショウジョウバエ) 及びカイコ (Bombyx mori) などの、多数のパキキュロウイルス株及び変異体ならびに対応する許容昆虫宿主細胞が同定されている。形質移入用の様々なウイルス株、例えばオートグラフィア・カリフォルニカ (Autographa californica) NPV の L - 1 変異体及びカイコ NPV の Bm - 5 株が公に入手可能であり、そのようなウイルスは、本明細書において、本発明によるウイルスとして、特にヨトウガ細胞の形質移入用に使用してもよい。

#### 【0247】

ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、シロイヌナズナ及びタバコの植物細胞培養物も宿主として使用することができる。植物細胞培養におけるタンパク質の産生に有用なクローニング及び発現ベクターは、当業者に公知である。例えば、Hiatt et al. , Nature (1989) 342 : 76 - 78 , Owen et al. (1992) Bio/Technology 10 : 790 - 794 , Artsenko et al. (1995) The Plant J 8 : 745 - 750 、及び Fecker et al. (1996) Plant Mol Biol 32 : 979 - 986 参照。

#### 【0248】

しかしながら、脊椎動物細胞での関心が最も高く、培養 (組織培養) における脊椎動物細胞の増殖は日常的な手順となっている。有用な哺乳類宿主細胞株の例は、SV40 (COS - 7、ATCC CRL1651) によって形質転換したサル腎臓 CV1 株 ; ヒト胚性腎臓株 (293 or 293 cells subcloned for growth in suspension culture , Graham et al. , J. Gen Virol . 36 : 59 (1977) ) ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK、ATCC CCL10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO、Urlaub et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 : 4216 (1980) ) ; マウスセルトリ細胞 (TM4、Mather , Biol. Reprod. 23 : 243 - 251 (1980) ) ; サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL70) ; アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO - 76、ATCC CRL1587) ; ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL2) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK、ATCC CCL34) ; バッファローラット肝臓細胞 (BRL3A、ATCC CRL1442) ; ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL75) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2、1413 8065) ; マウス乳腺腫瘍 (MMT060562、ATCC CCL51) ; TRI細胞 (Mather et al. , Annals N. Y. Acad. Sci. (1982) 383 : 44 - 68) ; MRC5細胞 ; FS4細胞 ; ヒト肝細胞腫株 (Hep G2) である。

#### 【0249】

さらなる実施形態では、本発明は、本発明の抗体構築物の産生プロセスであって、本発明の抗体構築物の発現を可能にする条件下で本発明の宿主細胞を培養し、産生した抗体を

培養物から回収することを含む、前記プロセスを提供する。

【0250】

本明細書中で使用する場合、用語「培養する」とは、培地中の適切な条件下での細胞の *in vitro* 維持、分化、生育、増殖及び/または繁殖を指す。用語「発現」とは、転写、転写後修飾、翻訳、翻訳後修飾、及び分泌を含むが、必ずしもこれらに限定されない、本発明の抗体構築物の産生に關与する任意の段階を含む。

【0251】

組換え技術を用いる場合、抗体構築物は、細胞内、ペリプラズム空間内で産生可能であるか、または培地中に直接分泌できる。抗体構築物を細胞内で産生する場合、第一の工程として、宿主細胞または溶解した断片のいずれかである微粒子破片を、例えば遠心分離または限外濾過によって除去する。Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) には、大腸菌のペリプラズム空間に分泌される抗体を単離するための手順が記載されている。簡潔に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA、及びフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) の存在下で約30分間かけて解凍する。細胞破片を、遠心分離によって除去することができる。抗体が培地中に分泌される場合、そのような発現系からの上清は、一般的に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過装置を用いて最初に濃縮する。上記の工程のいずれかにおいて、PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を含ませてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含ませて外来の汚染菌の増殖を防止してもよい。

【0252】

宿主細胞から調製した本発明の抗体構築物は、例えばヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて回収または精製することができる。イオン交換カラムによる分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE (商標) クロマトグラフィー、陰イオンまたは陽イオン交換樹脂 (ポリアスパラギン酸カラムなど) クロマトグラフィー、等電点電気泳動、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿も、回収すべき抗体に応じて利用可能である。本発明の抗体構築物がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX樹脂 (J.T. Baker、フィリップスバーグ、ニュージャージー) は精製に有用である。

【0253】

アフィニティークロマトグラフィーは、好ましい精製技術である。アフィニティリガンドが付着するマトリックスは、最も頻繁にはアガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。細孔性ガラスまたはポリ (スチレンジビニル) ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースで達成可能なマトリックスよりも、速い流速及びより短い処理時間を可能にする。

【0254】

さらに、本発明は、本発明の抗体構築物、または本発明のプロセスに従って産生した抗体構築物を含む医薬組成物を提供する。抗体構築物の均質性は、80%、より好ましくは81%、82%、83%、84%、または85%、さらに好ましくは86%、87%、88%、89%、または90%、さらにより好ましくは91%、92%、93%、94%、または95%、及び最も好ましくは96%、97%、98%、または99%であることが本発明の医薬組成物にとって好ましい。

【0255】

本明細書中で使用する場合、用語「医薬組成物」は、患者、好ましくはヒト患者への投与に適した組成物に関する。本発明の特に好ましい医薬組成物は、本発明の抗体構築物 (複数可) の1つ以上を、好ましくは治療有効量で含む。好ましくは、医薬組成物は、1つ以上の (薬学的に有効な) 担体、安定化剤、賦形剤、希釈剤、可溶化剤、界面活性剤、乳化剤、保存剤及び/またはアジュバントの適切な製剤をさらに含む。組成物の許容可能な成分は、好ましくは、使用する用量及び濃度でレシipientに対して非毒性である。本発

明の医薬組成物として、液体型、凍結型及び凍結乾燥型の組成物が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

#### 【 0 2 5 6 】

本発明の組成物は、薬学的に許容可能な担体を含み得る。本明細書中で使用する場合、「薬学的に許容可能な担体」とは、任意の及びすべての水性及び非水性溶液、滅菌溶液、溶媒、例えばリン酸緩衝生理食塩水（PBS）溶液などの緩衝液、水、懸濁液、油／水エマルジョンなどのエマルジョン、様々なタイプの湿潤剤、リポソーム、分散媒体ならびにコーティングを意味し、これらは、薬学的投与、特に非経口投与に適合する。そのような媒体及び薬剤の医薬組成物における使用は、当該技術分野において周知であり、そのような担体を含む組成物は、周知の従来の方法によって製剤化することができる。

10

#### 【 0 2 5 7 】

特定の実施形態は、本発明の抗体構築物と、さらなる1つ以上の賦形剤、例えば本節及び本明細書の他の箇所に例示的に記載する賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。本発明において、賦形剤は、例えば、製剤の物理的、化学的または生物学的特性の調整、例えば、粘性の調節などの多種多様な目的のために、及び／または、有効性を向上させるための、及び／または、例えば、製造、出荷、貯蔵、使用前の調製、投与の最中及びその後に生じるストレスに起因する分解及び腐敗に対して、そのような製剤及びプロセスを安定化するための、本発明のプロセスに使用することができる。

#### 【 0 2 5 8 】

特定の実施形態では、医薬組成物は、例えば、組成物のpH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解もしくは放出、吸収または浸透の速度などを改変、維持または保存する目的で製剤物質を含む場合がある（REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18<sup>th</sup> Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company 参照）。そのような実施形態では、適切な製剤物質として以下のものが挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない：

20

- ・アミノ酸、例えば、グリシン、アラニン、グルタミン、アスパラギン、トレオニン、プロリン、2-フェニルアラニンなど、荷電アミノ酸、好ましくはリジン、リジンアセテート、アルギニン、グルタミン酸及び／またはヒスチジンを含む

- ・抗菌剤、例えば、抗細菌剤及び抗真菌剤

30

- ・抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸、メチオニン、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム；

- ・組成物を約5.5～7.5、好ましくは6.5～7に維持するために使用する、緩衝液、緩衝液系及び緩衝剤；緩衝液の例は、ホウ酸塩、クエン酸塩、リン酸塩または他の有機酸、コハク酸塩、リン酸塩、ヒスチジン及び酢酸塩である；

- ・非水性溶媒、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル；

- ・水、アルコール／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液を含む水性担体、例えば、生理食塩水及び緩衝媒体；

- ・生分解性ポリマー、例えばポリエステル；

40

- ・増量剤、例えば、マンニトールまたはグリシン；

- ・キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）；

- ・等張化剤及び吸収遅延剤；

- ・錯化剤、例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 $\beta$ -シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル- $\beta$ -シクロデキストリン

- ・充填剤；

- ・単糖類；二糖類；他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンなど）；炭水化物は、非還元糖、好ましくはトレハロース、スクロース、オクタ硫酸、ソルビトールまたはキシリトールであってもよい；

- ・（低分子量）タンパク質、ポリペプチドまたはタンパク質性担体、例えば、ヒトもし

50

くはウシ血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン、好ましくはヒト起源のもの；

- ・着色剤及び着香剤；
- ・硫黄含有還元剤、例えば、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、[ ] - モノチオグリセロール、及びチオ硫酸ナトリウム
- ・希釈用の剤；
- ・乳化剤；
- ・親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン）
- ・塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；
- ・保存剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス；例としては：塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素）である；
- ・金属複合体、例えば、Zn - タンパク質複合体；
- ・溶媒及び共溶媒（グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなど）；
- ・糖及び糖アルコール、例えば、トレハロース、スクロース、オクタ硫酸、マンニトール、ソルビトールまたはキシリトールスタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、ミオイニシトース、ガラクトース、ラクチトール、リビトール、ミオイニシトール、ガラクトール、グリセロール、シクリトール（例えばイノシトール）、ポリエチレングリコール；及び多価糖アルコール；

10

- ・懸濁剤；
- ・界面活性剤または湿潤剤、例えば、プルロニックス、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート、例えば、ポリソルベート20、ポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパール；界面活性剤は、好ましくは $> 1.2$  KDの分子量を有する洗剤及び／または好ましくは $> 3$  KDの分子量を有するポリエーテルであってもよく；好ましい洗剤の非限定的な例は、Tween 20、Tween 40、Tween 60、Tween 80及びTween 85であり；好ましいポリエーテルの非限定的な例は、PEG 3000、PEG 3350、PEG 4000及びPEG 5000である；

20

- ・安定性増強剤、例えば、スクロースまたはソルビトール；
- ・等張化剤、例えば、アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトール；
- ・塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または不揮発性油を含む非経口送達ビヒクル；
- ・静脈内送達ビヒクル、例えば、流体及び栄養補充剤、電解質補充剤（リンガーデキストロースに基づくものなど）。

30

#### 【0259】

医薬組成物の異なる構成成分（例えば、上に列挙したもの）が、例えば異なる効果を有することができ、アミノ酸が、緩衝剤、安定化剤及び／または抗酸化剤として作用することができ；マンニトールが、増量剤及び／または等張化剤として作用することができ；塩化ナトリウムが、送達ビヒクル及び／または等張化剤として作用することができる；などは当業者には明らかである。

40

#### 【0260】

本発明の組成物は、組成物の意図される用途に応じて、本明細書で定義する本発明のポリペプチドに加えて、さらなる生物学的に活性な薬剤を含み得ることが想定される。そのような薬剤は、胃腸系に作用する薬物、細胞増殖阻害剤として作用する薬物、高尿酸血症を予防する薬物、免疫反応を阻害する薬物（例えばコルチコステロイド）、炎症応答を調節する薬物、循環系に作用する薬物及び／または当該分野で公知のサイトカインなどの薬剤であってもよい。本発明の抗体構築物を、併用療法において、すなわち別の抗癌剤と組み合わせて適用することも想定される。

#### 【0261】

50



特定の実施形態では、最適な医薬組成物は、例えば、意図する投与経路、送達形態及び所望の用量に応じて、当業者が決定する。例えば、上記の REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 参照。特定の実施形態では、そのような組成物は、本発明の抗体構築物の物理的状态、安定性、in vivo 放出速度及び in vivo クリアランス速度に影響を与え得る。特定の実施形態では、医薬組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、性質上、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、適切なビヒクルまたは担体は、注射用水、生理食塩水または人工脳脊髄液であってもよく、場合により、非経口投与のための組成物に一般的な他の物質を補充してもよい。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合した生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。特定の実施形態では、本発明の組成物の抗体構築物は、所望の純度を有する選択した組成物を、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態の任意の製剤物質 (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、上記) と混合することによって貯蔵用に調製してもよい。さらに、特定の実施形態では、スクロースなどの適切な賦形剤を用いて、本発明の抗体構築物を凍結乾燥物として製剤化してもよい。

10

#### 【0262】

非経口投与を企図する場合、本発明で使用するための治療組成物は、薬学的に許容可能なビヒクル中に本発明の所望の抗体構築物を含むパイロジェンフリーの非経口的に許容可能な水溶液の形態で提供してもよい。非経口注射のための特に適切なビヒクルは滅菌蒸留水であり、この滅菌蒸留水中で本発明の抗体構築物を、適切に保存された滅菌等張液として製剤化する。特定の実施形態では、調製は、注射可能なミクロスフェア、生体分解性粒子、高分子化合物 (ポリ乳酸またはポリグリコール酸など)、ビーズまたはリボソームなどの薬剤とともに、所望の分子を製剤化することを含むことができ、それは、デポー注射によって送達可能な生成物の徐放または持続性放出を提供し得る。特定の実施形態では、循環器中での持続期間を促進する効果を有するヒアルロン酸もまた使用してよい。特定の実施形態では、移植可能な薬物送達デバイスを使用して、所望の抗体構築物を導入してもよい。

20

#### 【0263】

持続性または徐放性送達 / 放出製剤中に本発明の抗体構築物を含有する製剤を含む、さらなる医薬組成物は、当業者には明らかであろう。リボソーム担体、生体分解性微小粒子または多孔性ビーズ及びデポー注射などの様々な他の持続性または徐放性送達手段を製剤化するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、医薬組成物の送達のための多孔性ポリマー微粒子の徐放を記載している国際特許出願第 PCT/US93/00829 号参照。持続放出性製剤は、成型品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスを含み得る。持続放出性マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド (米国特許第 3,773,919 号及び欧州特許出願公開第 EP058481 号に開示されている)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸の共重合体 (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 及び Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105)、エチレンビニルアセテート (Langer et al., 1981、上記) またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸 (欧州特許出願公開第 EP133,988 号)。持続放出性組成物はまた、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製可能なリボソームを含み得る。例えば、Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; 欧州特許出願公開第 EP036,676 号; 第 EP088,046 号及び第 EP143,949 号参照。

30

40

#### 【0264】

抗体構築物はまた、例えばコアセルベーション技術によって、もしくは界面重合 (例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル) によって調製したマイクロカプセル中に

50

、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中に、またはマクロエマルジョン中に封入してもよい。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)に開示されている。

【0265】

in vivo 投与のために使用する医薬組成物は、通常、滅菌調製物として提供される。滅菌は、滅菌濾過膜を通す濾過によって達成することができる。組成物を凍結乾燥させる場合、この方法を用いた滅菌は、凍結乾燥及び再構成の前または後のいずれで行ってもよい。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液中で保存することができる。非経口組成物は、通常、滅菌アクセスポート、例えば皮下注射針で穿孔可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたは容器に入れる。

10

【0266】

本発明の別の態様は、国際特許出願WO06138181A2 (PCT/US2006/022599)に記載されているように、医薬組成物として使用することができる本発明の自己緩衝性抗体構築物製剤を含む。Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3):285-91(1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13:61-84(2002), and Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", Pharm Biotechnol. 13:159-75(2002)などの、タンパク質安定化ならびにそれに関して有用な製剤物質及び方法に関する様々な解説が利用可能であり、本発明による自己緩衝性タンパク質製剤に関する賦形剤及びそのプロセスに関連する部分、特に獣医学及び/またはヒトの医療用途のためのタンパク質医薬品及びプロセスに関する部分を参照されたい。

20

【0267】

本発明の特定の実施形態に従って、塩を使用して、例えば、製剤のイオン強度及び/または等張性を調節し、及び/またはタンパク質または本発明による組成物の他の成分の溶解性及び/または物理的安定性を改善してもよい。周知のように、イオンは、タンパク質の表面の荷電残基に結合し、タンパク質中の帯電した極性基を遮蔽し、それらの静電相互作用の強さ、誘引性、反発性の相互作用を減少させることによってタンパク質の天然状態を安定化することができる。イオンはまた、特にタンパク質の変性ペプチド結合(-CONH)に結合することにより、タンパク質の変性状態を安定化することができる。さらに、タンパク質中の荷電した及び極性の基とのイオン相互作用はまた、分子間の静電相互作用を減少させ、それによってタンパク質の凝集及び不溶性を防止または低減することができる。

30

40

【0268】

イオン種は、タンパク質に対するその効果が大きく異なる。本発明に従って医薬組成物を製剤化する際に使用することができる、タンパク質に対するイオンの多数の分類別の順位付け及びその効能が開発されている。一例は、Hofmeisterシリーズであり、これは、溶液中のタンパク質の立体構造安定性への影響によって、イオン性及び極性の非イオン性溶質をランク付けする。安定化溶質は「コスモトロピック」と呼ばれる。不安定化溶質は、「カオトロピック」と呼ばれる。コスモトロプは、通常、溶液からタンパク質を沈殿させるために高濃度（例えば、>1Mの硫酸アンモニウム）で用いられる（「塩析」）。カオトロプは、通常、タンパク質の変性及び/または可溶化に用いられる（「塩溶」）。「塩溶」と「塩析」に対するイオンの相対的な有効性は、Hofmeister

50

r シリーズにおけるイオンの順位を規定する。

【 0 2 6 9 】

本発明の様々な実施形態に従って、増量剤、安定化剤、及び抗酸化剤、ならびに他の標準的な用途として、遊離アミノ酸を本発明の製剤の抗体構築物において使用することができる。リジン、プロリン、セリン及びアラニンは、製剤中のタンパク質を安定化するために使用することができる。グリシンは、凍結乾燥に有用であり、正しいケーキ構造及び特性を保証する。アルギニンは、液体及び凍結乾燥製剤の両方において、タンパク質凝集を阻害するのに有用であり得る。メチオニンは抗酸化剤として有用である。

【 0 2 7 0 】

ポリオールは、糖、例えば、マンニトール、スクロース、及びソルビトール、ならびに多価アルコール、例えば、グリセロール及びプロピレングリコール、ならびに本明細書において考察を目的として、ポリエチレングリコール ( P E G ) 及び関連物質を含む。ポリオールはコスモトロピックである。それらは、液体及び凍結乾燥製剤の両方において有用な安定化剤であり、物理的及び化学的分解プロセスからタンパク質を保護する。ポリオールはまた、製剤の等張性を調整するのに有用である。本発明の選択した実施形態において有用なポリオールの中にはマンニトールがあり、凍結乾燥製剤中のケーキの構造安定性を保証するために一般的に使用される。それはケーキの構造的安定性を保証する。これは、通常、凍結防止剤、例えば、スクロースと共に使用される。ソルビトール及びスクロースは、等張性を調節するための、及び輸送中または製造工程時のバルク調製中の凍結 - 融解ストレスから保護するための安定化剤として好ましい薬剤の 1 つである。グルコース及びラクトースのような還元糖 ( 遊離アルデヒドまたはケトン基を含む ) は、表面リジン及びアルギニン残基を糖化することができる。したがって、それらは一般的に、本発明による使用のための好ましいポリオールではない。さらに、そのような反応種を形成する糖、例えばショ糖のような、酸性条件下でフルクトース及びグルコースに加水分解され、結果的に糖化を生じる糖類もまた、本発明の好ましいポリオールではない。P E G はタンパク質を安定化させるのに有用であり、凍結保護剤として有用であり、この点で本発明で使用する

【 0 2 7 1 】

本発明の製剤の抗体構築物の実施形態は、さらに界面活性剤を含む。タンパク質分子は、表面の吸着、ならびに気 - 液、固 - 液、及び液 - 液界面での変性、その結果としての凝集の影響を受けやすい場合がある。これらの影響は、通常、タンパク質濃度に反比例する。これらの有害な相互作用は、通常、タンパク質濃度に反比例し、一般的には、製品の輸送及び取扱い中に生成されるような物理的振動によって悪化する。界面活性剤は、表面吸着を防止、最小化、または低減するために日常的に使用されている。これに関して本発明における有用な界面活性剤として、ポリソルベート 2 0、ポリソルベート 8 0、ソルビタンポリエトキシレートその他の脂肪酸エステル、及びポロキサマー 1 8 8 が挙げられる。界面活性剤はまた、タンパク質立体構造安定性を調節するために一般的に使用される。所与の界面活性剤は、通常、いくつかのタンパク質を安定化させ、他のタンパク質を不安定化するため、この点に関する界面活性剤の使用は、タンパク質特異的である。

【 0 2 7 2 】

ポリソルベートは、酸化分解を受けやすく、しばしば、供給されると、タンパク質残基の側鎖、特にメチオニンの酸化を引き起こすのに十分な量の過酸化物を含む。したがって、ポリソルベートは慎重に使用する必要があり、使用する場合、最低有効濃度で使用する必要がある。これに関して、ポリソルベートは、賦形剤は最も低い有効濃度で使用するべきであるという一般的なルールを例示している。

【 0 2 7 3 】

本発明の製剤の抗体構築物の実施形態は、1 つ以上の抗酸化剤をさらに含む。適切なレベルの周囲酸素及び温度を維持し、光への曝露を避けることによって、医薬製剤において、タンパク質の有害な酸化は、ある程度防止することができる。抗酸化性の賦形剤は、タンパク質の酸化的分解を防ぐためにも使用することができる。これに関する有用な抗酸化

10

20

30

40

50

剤の中には、還元剤、酸素／フリーラジカールスカベンジャー、及びキレート剤がある。本発明による治療用タンパク質製剤に使用する抗酸化剤は、水溶性であり、製品の貯蔵寿命を通じてその活性を維持することが好ましい。EDTAは、この点に関して本発明による好ましい抗酸化剤である。抗酸化剤はタンパク質に損傷を与える可能性がある。例えば、特にグルタチオンのような還元剤は、分子内ジスルフィド結合を破壊する可能性がある。したがって、本発明で使用する抗酸化剤は、とりわけ、製剤中のタンパク質を損傷する可能性を排除するか、または十分に低減するように選択される。

#### 【0274】

本発明による製剤は、タンパク質補因子であり且つ特定のインスリン懸濁液を形成するのに必要な亜鉛などのタンパク質配位複合体を形成するのに必要な金属イオンを含み得る。金属イオンはまた、タンパク質を分解するいくつかのプロセスを阻害することができる。しかしながら、金属イオンはまた、タンパク質を分解する物理的及び化学的プロセスを触媒する。アスパラギン酸のイソアスパラギン酸への異性化を阻害するために、マグネシウムイオン ( $10 \sim 120 \text{ mM}$ ) を使用することができる。 $\text{Ca}^{+2}$  イオン (最大  $100 \text{ mM}$ ) は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼの安定性を高めることができる。しかしながら、 $\text{Mg}^{+2}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$ 、及び  $\text{Zn}^{+2}$  は、*rhDNase* を不安定化させる可能性がある。同様に、 $\text{Ca}^{+2}$  及び  $\text{Sr}^{+2}$  は第VII因子を安定化する可能性があり、 $\text{Mg}^{+2}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$  及び  $\text{Zn}^{+2}$ 、 $\text{Cu}^{+2}$  及び  $\text{Fe}^{+2}$  によって不安定化する可能性があり、その凝集は  $\text{Al}^{+3}$  イオンによって増大する可能性がある。

#### 【0275】

本明細書中に開示する抗体構築物はまた、免疫リポソームとして製剤化してもよい。「リポソーム」は、哺乳類への薬物送達に有用な様々なタイプの脂質、リン脂質及び／または界面活性剤からなる小胞である。リポソームの成分は、一般的に、生物学的膜の脂質配置と同様に、二重層形成で配置される。抗体構築物を含有するリポソームは、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号; 及びWO97/38731に記載されているような当該分野で公知の方法によって調製する。循環時間を高めたリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン (PEG-PE) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成することができる。リポソームは、所定の細孔サイズのフィルターを通して押し出され、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体構築物のFabフラグメントは、Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介して、リポソームに複合体化することができる。化学療法剤は場合によりリポソーム内に含まれる。Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19)1484 (1989) 参照。

#### 【0276】

医薬組成物を製剤化したら、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、結晶として、または脱水もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアルに保存してもよい。そのような製剤は、即時使用可能な形態または投与前に再構成する形態 (例えば、凍結乾燥) のいずれかで保存し得る。

#### 【0277】

本明細書中で定義する医薬組成物の生物学的活性は、例えば、以下の実施例、WO99/54440、またはSchlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12)に記載されているような細胞傷害性アッセイによって測定することができる。本明細書中で使用する「有効性」または「in vivo 有効性」は、本発明の医薬組成物による、例えば、標準化されたNCI応答基準を用いた治療への応答を指す。本発明の医薬組成物を用いる治療の成果またはin

v i v o有効性は、その意図する目的、すなわち組成物がその所望の効果、すなわち病的細胞、例えば腫瘍細胞の枯渇を引き起こす能力に対する組成物の有効性を指す。i n v i v o有効性は、白血球数、差異、蛍光標識細胞分取、骨髓穿刺法を含むが必ずしもこれらに限定されないそれぞれの疾患実体について確立された標準的方法によってモニタリングしてもよい。さらに、様々な疾患特異的臨床化学パラメータ及び他の確立された標準的方法を使用してもよい。さらに、コンピュータ支援断層撮影法、X線、核磁気共鳴断層撮影（例えば、米国国立癌研究所の基準に基づく応答評価 [Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino R, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe R, Canellos GP. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr; 17(4): 1244]）、陽電子放射断層撮影スキャン、白血球数、差異、蛍光標識細胞分取、骨髓穿刺法、リンパ節生検／組織病理、及び様々なリンパ腫特異的臨床化学パラメータ（例えば、乳酸脱水素酵素）ならびに他の確立された標準的方法を使用してもよい。

【0278】

本発明の医薬組成物のような薬物の開発における別の主要な課題は、薬物動態学的特性の予測可能な調節である。この目的のために、薬物候補の薬物動態特性、すなわち所与の状態を治療する特定薬物の能力に影響を及ぼす薬物動態パラメータの特性を確立することができる。特定の疾患実体を治療するための薬剤の能力に影響を及ぼす薬剤の薬物動態パラメータとして：半減期、分布容積、肝初回通過代謝及び血清結合度が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。所与の薬剤の有効性は、上記のパラメータの各々によって影響され得る。

【0279】

「半減期」とは、投与した薬物の50%が生物学的プロセス、例えば代謝、排泄などによって排除される時間を意味する。「肝初回通過代謝」とは、肝臓との最初の接触、すなわち、肝臓を最初に通過する間における、薬物が代謝される傾向を意味する。「分布容積」とは、身体の様々な区画、例えば、細胞内及び細胞外の空間、組織及び器官などにわたる薬物の保持の程度、ならびにこれらの区画内の薬剤の分布を意味する。「血清結合度」とは、薬物がアルブミンなどの血清タンパク質と相互作用して結合する傾向を意味し、薬物の生物学的活性の低下または損失をもたらす。

【0280】

薬物動態パラメータとして、投与した所定量の薬物についてのバイオアベイラビリティ、遅延時間 (Tlag)、Tmax、吸収速度、より多くの発症、及び／またはCmaxが挙げられる。「バイオアベイラビリティ」とは、血液区画中の薬物の量を意味する。「遅延時間」とは、薬物の投与と血液または血漿中でのその検出及び可測性との間の時間遅延を意味し、「Tmax」は薬物の最大血中濃度に到達した後の時間であり、「Cmax」は所与の薬物の最大血中濃度である。その生物学的効果に必要とされる薬物の血中または組織濃度に到達する時間は、すべてのパラメータに影響を受ける。上記で概説したように、非チンパンジー霊長類において試験する、前臨床動物において決定され得る異種特異性を示す二重特異性抗体構築物の薬物動態パラメータは、例えば、Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12) による刊行物にも記載されている。

【0281】

本発明の好ましい態様では、医薬組成物は、約 - 20 で少なくとも4週間安定である。添付の実施例から明らかなように、本発明の抗体構築物の品質と、対応する最先端の抗

体構築物の品質とを、異なるシステムを用いて試験してもよい。これらの試験は、“ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C and Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for Biotech Biotechnological/Biological Products Q6B”に準拠していると理解されており、したがって、これらの試験は、安定性を示す特性を提供するように選択され、それによって、製剤の同一性、純度、及び力価における変化の検出に確実性を提供する。純度という用語は、相対的用語であることはよく受け入れられている。グリコシル化、脱アミド化または他の異種性の効果のために、生物学/生物学的製剤の絶対純度は、通常、複数の方法によって評価すべきであり、得られる純度値は方法依存である。安定性試験を行う目的のために、純度試験は分解生成物の測定方法に焦点を当てるべきである。

10

#### 【0282】

本発明の抗体構築物を含む医薬組成物の品質の評価のために、例えば、溶液中の可溶性凝集体の含量を分析することにより分析してもよい（サイズ排除あたりのHMWS）。約 - 20 で少なくとも4週間の安定性は、1.5%未満のHMWS含量、好ましくは1%未満のHMWS含量を特徴とすることが好ましい。

#### 【0283】

医薬組成物の形態の本発明の抗体構築物の安定性の評価に関する他の例は、添付の実施例4～12に提供する。これらの実施例において、本発明の抗体構築物の実施形態を、異なる医薬製剤中の異なるストレス条件に関して試験し、結果を、当該分野で公知の二重特異性T細胞結合抗体構築物の他の半減期延長（HLE）フォーマットと比較する。本発明による特異的FCモダリティを備えた抗体構築物は、通常、異なるHLEフォーマットで、またはHLEフォーマットなしで提供された抗体構築物（例えば、「正準的な」抗体構築物）に比べて、温度及び光ストレスなどの広範なストレス条件にわたってより安定であることが想定される。前記温度安定性は、低下した（凍結を含む室温未満の）及び増加した（体温以上の温度を含む室温より上の）温度の両方に関連し得る。当業者には理解されるように、診療においてほとんど不可避な、ストレスに関するそのような安定性の向上は、診療において生じる分解産物がより少なくなるため、抗体構築物をより安全にする。結果として、前記安定性の向上は、安全性の向上を意味する。

20

30

#### 【0284】

水素 - 重水素交換（HDX）は、共有結合した水素原子を重水素原子で置き換えるか、またはその逆の化学反応である。これは交換可能なプロトン及び重水素に最も容易に適用することができ、そのような変換は触媒なしで適切な重水素源の存在下で起こる。この方法は、分子の様々な部分、したがってタンパク質の三次構造の溶媒アクセス性に関する情報を与える。

#### 【0285】

一実施形態は、増殖性疾患、腫瘍性疾患、ウイルス性疾患または免疫学的障害の予防、治療または寛解における使用のための、本発明の抗体構築物または本発明のプロセスに従って作製した抗体構築物を提供する。

40

#### 【0286】

本明細書に記載の製剤は、それを必要とする患者における本明細書に記載の病理学的病状の治療、寛解及び/または予防における医薬組成物として有用である。用語「治療」とは、治療的処置と、予防的または防止的措置の両方を指す。治療は、疾患/障害、疾患/障害の症状、または疾患/障害の素因を有する患者由来の身体、単離された組織、または細胞への、製剤の塗布または投与を含み、疾患、疾患の症状、または疾患の素因を、治療、回復、緩和、軽減、改変、治療、寛解、改善、または作用する。

#### 【0287】

本明細書中で使用する用語「寛解」とは、本発明の抗体構築物を、それを必要とする対

50

象へ投与することによる、腫瘍または癌または本明細書において以下に記載する転移性癌を有する患者の疾患状態の任意の改善を指す。そのような改善は、患者の腫瘍または癌または転移性癌の進行の遅延または停止としても認められ得る。本明細書中で使用する用語「予防」とは、本発明の抗体構築物を、それを必要とする対象へ投与することによって、本明細書において以下に記載する腫瘍または癌または転移性癌を有する患者の発生または再発を回避することを意味する。

【0288】

用語「疾患」とは、本明細書に記載の抗体構築物または医薬組成物での治療により利益を得るであろう任意の状態を指す。これには、哺乳類を問題の疾患にかかりやすくする病的状態を含む慢性及び急性の障害または疾患が含まれる。

10

【0289】

「新生物」は組織の異常な成長であり、通常は塊を形成するが、常にそうであるとは限らない。また、塊を形成する場合、それは一般に「腫瘍」と呼ばれる。新生物または腫瘍は、良性、潜在的に悪性（前癌性）、または悪性であり得る。悪性新生物は一般に癌と呼ばれる。それらは、通常、周囲の組織に侵入して破壊し、転移を形成し得る、すなわち、それらは身体他の部分、組織または器官に広がる。したがって、用語「転移性癌」は、元の腫瘍とは別の、他の組織または器官への転移を包含する。リンパ腫及び白血病はリンパ系新生物である。本発明の目的のために、それらもまた、「腫瘍」または「癌」という用語に包含される。

【0290】

用語「ウイルス性疾患」は、対象のウイルス感染の結果である疾患を記載する。

20

【0291】

本明細書中で使用する用語「免疫学的障害」は、この用語、すなわち免疫学的障害の共通定義に沿って記載し、例えば、自己免疫疾患、過敏症、免疫不全などである。

【0292】

一実施形態では、本発明は、増殖性疾患、腫瘍性疾患、ウイルス性疾患または免疫学的障害の治療もしくは寛解方法であって、それを必要とする対象に本発明の、または本発明のプロセスに従って製造した抗体構築物を投与する工程を含む方法を提供する。

【0293】

用語「必要とする対象」またはそれらの「治療を必要とする」とは、障害を既に有する者、ならびに障害を予防するべき者を含む。必要とする対象または「患者」は、予防的または治療的処置のいずれかを受けるヒトまたは哺乳類の対象を含む。

30

【0294】

本発明の抗体構築物に対し、特定の投与経路及び投与方法、特定の用量及び投与頻度、特定の疾患の特定の治療に関して、とりわけバイオアベイラビリティ及び持続性の範囲に関して、一般的に設計を行う。組成物の材料は、好ましくは、投与部位に許容可能な濃度で製剤化する。

【0295】

したがって、製剤及び組成物は、任意の適切な投与経路による送達のために、本発明に従って設計してもよい。本発明に関して、投与経路は、好ましくは非経口経路（静脈内、動脈内、骨内、筋肉内、大脳内、脳室内、硬膜外、髄腔内、皮下、腹腔内、羊水外、関節内、心臓内、皮内、病巣内、子宮内、膀胱内、硝子体内、経皮、鼻腔内、経粘膜、関節滑液嚢内、管腔内など）である。

40

【0296】

本発明の医薬組成物及び抗体構築物は、非経口投与、例えばボーラス注射などの注射、または連続注入などの注入による、例えば皮下または静脈内送達に対して特に有用である。医薬組成物は、医療機器を用いて投与してもよい。医薬組成物を投与するための医療機器の例は、米国特許第4,475,196号；第4,439,196号；第4,447,224号；第4,447,233号；第4,486,194号；第4,487,603号；第4,596,556号；第4,790,824号；第4,941,880号；第5,

50

064, 413号;第5, 312, 335号;第5, 312, 335号;第5, 383, 851号;及び第5, 399, 163号に記載されている。

【0297】

特に、本発明は、適切な組成物の中断のない投与を提供する。非限定的な例として、患者の体内への治療剤の流入を計量するために患者が着用する小型ポンプシステムによって、中断のない、または実質的に中断のない、すなわち連続投与を実現してもよい。本発明の抗体構築物を含む医薬組成物は、前記ポンプシステムを用いて投与することができる。そのようなポンプシステムは、一般的に当該技術分野において公知であり、通常、注入する治療剤を含むカートリッジの定期的な交換に依存する。そのようなポンプシステムにおいてカートリッジを交換する場合、患者の体内への治療薬の中断のないフローの一時的中断が起り得る。そのような場合、今なお、本発明の薬理学的手段の目的の範囲内において、カートリッジ交換前の投与段階とカートリッジ交換後の投与段階とを考慮するものと考えられるが、本発明の方法は、そのような治療薬の1つの「中断のない投与」を構成する。

10

【0298】

本発明の抗体構築物の連続的または中断のない投与は、リザーバから流体を駆動するための流体駆動機構と、駆動機構を作動させるための作動機構とを備える流体送達装置または小型ポンプシステムによる、静脈内または皮下への投与であってもよい。皮下投与のためのポンプシステムは、患者の皮膚を貫通させ、適切な組成物を患者の体内に送達するための針またはカニューレを有し得る。前記ポンプシステムは、静脈、動脈または血管とは無関係に患者の皮膚に直接固定または取り付けてもよく、それによってポンプシステムと患者の皮膚との間の直接接触が可能になる。ポンプシステムは、患者の皮膚に24時間、最大で数日間、取り付けることができる。ポンプシステムは、小さな容積のリザーバを有する小型のものであってもよい。非限定的な例として、投与する適切な医薬組成物のリザーバの容積は0.1~50mlであり得る。

20

【0299】

連続投与はまた、皮膚に着用し、間隔を置いて交換するパッチによる、経皮投与であってもよい。当業者は、この目的に適した薬物送達のためのパッチシステムを認識している。消耗した第一のパッチの交換は、例えば消耗した第一のパッチの直近の皮膚表面上に、消耗した第一のパッチを取り除く直前に、新しい第二のパッチを配置することと同時に効果的に達成することができるため、経皮的投与は特に中断のない投与に適していることは特筆すべき点である。フローの中断、または電池障害の問題は発生しない。

30

【0300】

医薬組成物を凍結乾燥している場合、凍結乾燥した物質を、投与前にまず適切な液体中で再構成する。凍結乾燥した物質は、例えば、注射用静菌水(BWF I)、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)、または凍結乾燥の前にタンパク質を入れていたものと同じ製剤で再構成してもよい。

【0301】

本発明の組成物は、本明細書に記載する種間特異性を示す本発明の抗体構築物を、チンパンジー以外の霊長類、例えば、マカクへ、用量を増加させて投与することによる用量漸増試験によって測定可能な、適切な用量で対象に投与することができる。上述のように、本明細書に記載する種間特異性を示す本発明の抗体構築物は、チンパンジー以外の霊長類における前臨床試験において、及びヒトにおける薬物として、同一の形態で効果的に使用することができる。投薬レジメンは主治医及び臨床的要因によって決定される。医学分野において周知であるように、任意の患者に対する用量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、投与する特定の化合物、性別、投与の時間及び経路、全身の健康状態、ならびに同時に投与するその他の薬物を含む、多くの要因に依存する。

40

【0302】

用語「有効量」または「有効用量」とは、所望の効果を達成するか、または少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。用語「治療有効量」とは、すでに疾患

50



に罹患している患者における疾患及びその合併症を治癒または少なくとも部分的に阻止するのに十分な量として定義される。この使用に有効な量または用量は、治療しようとする状態（適応症）、送達する抗体構築物、治療の背景及び目的、疾患の重篤度、前治療、患者の病歴及び治療剤に対する応答、投与経路、患者のサイズ（体重、体表面積または器官の大きさ）及び／または状態（年齢及び全身健康状態）、ならびに患者自身の免疫系の一般的な状態に依存する。一回または一連の投与にわたって患者に投与可能なように、及び最適な治療効果が得られるように、担当医師の判断に応じて適切な用量を調整することができる。

#### 【0303】

一般的な用量は、上記要因に応じて、約  $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$  ～ 約  $30 \text{mg} / \text{kg}$  またはそれ以上までの範囲であり得る。特定の実施形態では、用量は、 $1.0 \mu\text{g} / \text{kg}$  ～ 最大約  $20 \text{mg} / \text{kg}$ 、場合により  $10 \mu\text{g} / \text{kg}$  ～ 最大約  $10 \text{mg} / \text{kg}$  または  $100 \mu\text{g} / \text{kg}$  ～ 最大約  $5 \text{mg} / \text{kg}$  の範囲であり得る。

10

#### 【0304】

本発明の抗体構築物の治療有効量は、好ましくは、疾患症状の重篤度の低減、疾患症状のない期間の頻度もしくは期間の増加、または疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の予防をもたらす。標的細胞抗原を発現する腫瘍を治療するために、本発明の抗体構築物、例えば、抗標的細胞抗原／抗CD3抗体構築物の治療有効量は、未治療の患者に比べて、好ましくは、細胞増殖または腫瘍増殖を少なくとも約20%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、阻害する。腫瘍増殖を阻害する化合物の能力は、有効性を予測する動物モデルにおいて評価してもよい。

20

#### 【0305】

医薬組成物は、唯一の治療剤として、または必要に応じて抗癌剤、例えば、他のタンパク質性及び非タンパク質性薬物などの追加の治療薬と組み合わせて投与することができる。これらの薬物は、本明細書中で定義する本発明の抗体構築物を含む組成物と同時に、または適時に規定された間隔及び用量で前記抗体構築物の投与の前または後に別々に投与してもよい。

#### 【0306】

本明細書中で使用する用語「有効及び非毒性用量」とは、主要な毒性作用を及ぼさないか、または実質的に及ぼさずに、病的細胞の除去、腫瘍の除去、腫瘍の収縮または疾患の安定化を引き起こすのに十分な高さの本発明の抗体構築物の耐量を指す。そのような有効及び非毒性用量は、例えば、当技術分野で述べられている用量漸増試験により求めてもよいが、重篤な有害な副作用を誘発する用量（用量制限毒性、DLT）を下回る用量でなければならない。

30

#### 【0307】

本明細書中で使用する用語「毒性」とは、有害事象または重篤な有害事象に現れる薬物の毒性作用を指す。これらの副作用は、一般的に、投与後の薬物の忍容性の欠如及び／または局所寛容の欠如を意味し得る。毒性はまた、薬物によって引き起こされる催奇形性または発癌性の作用を含み得る。

40

#### 【0308】

本明細書中で使用する用語「安全性」、「*in vivo*安全性」または「忍容性」は、投与直後（局所寛容）及び薬物のより長い投与期間中に重篤な有害事象を誘発することのない薬物の投与を規定する。「安全性」、「*in vivo*安全性」または「忍容性」は、例えば、治療及びフォローアップ期間中に定期的な間隔で評価することができる。測定には臨床評価、例えば、器官の所見、及び検査値の異常のスクリーニングが含まれる。NCI-CTC及び／またはMedDRA基準に従って、臨床評価を実施し、正常所見からのずれを記録／コード化してもよい。器官の所見は、例えば、有害事象共通用語規準v3.0（CTCAE）に記載されるように、アレルギー／免疫学、血液／骨髄、心臓不整脈、凝固などの基準を含み得る。臨床検査用パラメータとして、例えば、血液学、臨床化

50

学、凝固特性及び尿分析、ならびに血清、血漿、リンパ液または髄液、脊髄液などの他の体液の検査が挙げられる。したがって、例えば、物理的試験、画像化技術（すなわち、超音波、X線、CTスキャン、磁気共鳴イメージング（MRI）、技術装置による他の測定（すなわち、心電図）、検査用パラメータの測定及び有害事象の記録によるバイタルサインによって、安全性を評価することができる。例えば、本発明による使用及び方法におけるチンパンジー以外の霊長類における有害事象は、組織病理学的及び／または組織化学的方法によって試験してもよい。

【0309】

上記の用語については、例えば、バイオテクノロジー由来医薬品S6の前臨床安全性評価；ICH統一三極ガイドライン；1997年7月16日のICH運営委員会も参照されたい。

10

【0310】

最後に、本発明は、本発明の抗体構築物または本発明の方法に従って製造した抗体構築物、本発明の医薬組成物、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター及び／または本発明の宿主細胞を含むキットを提供する。

【0311】

本発明に関して、用語「キット」は、容器、レシピエントまたはその他のものに、ともにパッケージングされた2つ以上の構成要素を意味し、それらのうちの1つは、本発明の抗体構築物、医薬組成物、ベクターまたは宿主細胞に対応する。したがって、キットは、特定の目標を達成するのに十分な製品及び／または器具のセットとして説明することができ、キットは単一のユニットとして市販可能である。

20

【0312】

キットは、投与のための適切な用量（上記参照）で本発明の抗体構築物または医薬組成物を含有する任意の適切な形状、サイズ及び材料（好ましくは防水性、例えばプラスチックまたはガラス）の1つ以上のレシピエント（バイアル、アンプル、容器、シリンジ、ボトル、バッグなど）を含み得る。キットは、さらに、使用のための指示書（例えば、リーフレットまたは取扱説明書の形態の）、シリンジ、ポンプ、注入器などのような本発明の抗体構築物を投与するための手段、本発明の抗体構築物を再構成するための手段及び／または本発明の抗体構築物を希釈するための手段を含む。

【0313】

30

本発明はまた、単回投与のためのキットも提供する。本発明のキットはまた、乾燥／凍結乾燥抗体構築物を含む第一のレシピエント及び水性製剤を含む第二のレシピエントを含み得る。本発明の特定の実施形態では、単一チャンバー及び複数チャンバーのプレフィルドシリンジ（例えば、液体シリンジ及びリオシリンジ）を含むキットを提供する。

【0314】

本発明の医薬組成物は、さらに緩衝液を含み、緩衝液は、リン酸カリウム、酢酸／酢酸ナトリウム、クエン酸／クエン酸ナトリウム、コハク酸／コハク酸ナトリウム、酒石酸／酒石酸ナトリウム、ヒスチジン／ヒスチジンHCl、グリシン、トリス、グルタミン酸塩、酢酸塩及びそれらの混合物、特にリン酸カリウム、クエン酸／クエン酸ナトリウム、コハク酸、ヒスチジン、グルタミン酸塩、酢酸塩及びそれらの組合せからなる群から選択し得る。

40

【0315】

適切な緩衝液濃度は、約200mM以下、例えば、約190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、80、70、60、50、40、30、20、10または5mMの濃度を包含する。当業者であれば、本明細書に記載の医薬組成物の安定性を提供するために、緩衝液濃度を容易に調整することができるであろう。本発明の医薬組成物中の想定される緩衝液濃度は、具体的には、約5～約200mM、好ましくは約5～約100mM、より好ましくは約10～約50mMの範囲である。

【0316】

本明細書中で使用する場合、用語「医薬組成物」は、それを必要とする対象への投与に

50

適した組成物に関する。用語「対象」または「個体」または「動物」または「患者」は、本明細書では同じ意味で用いられ、本発明の医薬組成物の投与が望まれる任意の対象、特に哺乳類対象を指す。哺乳類対象として、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ウシ、雌ウシなどが挙げられ、好ましくはヒトである。本発明の医薬組成物は、安定で薬学的に許容可能、すなわち、医薬組成物を投与する対象において望ましくない局所的または全身的作用を引き起こすことなく所望の治療効果を引き出すことができる。本発明の薬学的に許容可能な組成物は、特に、無菌及び／または薬学的に不活性であり得る。具体的には、用語「薬学的に許容可能な」とは、動物、特にヒトにおける使用のために、規制当局または他の一般的に認められている薬局方に承認されていることを意味し得る。

10

#### 【0317】

本発明の医薬組成物は、本明細書に記載する1つ以上の二重特異性一本鎖抗体構築物（複数可）を、好ましくは治療有効量で、 $\alpha$ -シクロデキストリン及び緩衝液を含む。「治療有効量」とは、所望の治療効果を誘発する前記構築物の量を意味する。治療有効性及び毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順、例えばED<sub>50</sub>（集団の50%において治療上有効な用量）及びLD<sub>50</sub>（集団の50%に致命的な用量）によって決定することができる。治療効果と毒性作用との間の用量比は治療指数であり、ED<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub>の比として表すことができる。高い治療指数を示す医薬組成物が一般に好ましい。

#### 【0318】

20

組成物は、 $\alpha$ -シクロデキストリン及び前記の緩衝液を含み得る。医薬組成物は、場合により、本明細書に記載するようなその有利な特性、特にその安定性を低下または消失させない限り、1つ以上のさらなる賦形剤を含む場合がある。

#### 【0319】

賦形剤は、粘度の調整などの製剤の物理的、化学的または生物学的特性の調整、及びまたは、有効性をさらに改善するための、及びまたは、例えば、製造、出荷、貯蔵、使用前調製、投与中に、及びその後に生じるストレスに起因する分解及び腐敗に対して、そのような製剤及びプロセスをさらに安定化するための本発明のプロセスの調整などの、多種多様な目的のために本発明において使用することができる。用語「賦形剤」は、一般的に、充填剤、結合剤、崩壊剤、コーティング剤、吸着剤、抗付着剤、流動促進剤、保存剤、抗酸化剤、香味料、着色料、甘味料、溶媒、共溶媒、緩衝剤、キレート剤、粘度付与剤、界面活性剤、希釈剤、湿潤剤、担体、希釈剤、保存剤、乳化剤、安定化剤及び等張性調整剤を含む。

30

#### 【0320】

医薬組成物の異なる賦形剤（例えば、上記に列挙したもの）が異なる効果を有することが可能であり、例えば、アミノ酸が、緩衝剤、安定化剤及び／または抗酸化剤として作用することができ；マンニトールが、増量剤及び／または張性増強剤として作用することができ；塩化ナトリウムが、送達ビヒクル及び／または張性増強剤として作用することができ；などは、当業者には明らかである。

#### 【0321】

40

ポリオールは、液体及び凍結乾燥製剤の両方において物理的及び化学的分解プロセスからタンパク質を保護する有用な安定化剤であり、製剤の等張性を調整するためにも有用である。ポリオールには、糖、例えばマンニトール、スクロース、及びソルビトール、ならびに多価アルコール、例えば、グリセロール及びプロピレングリコール、ならびに本明細書における考察を目的として、ポリエチレングリコール（PEG）及び関連物質が含まれる。マンニトールは、凍結乾燥製剤中のケーキの構造安定性を保証するために一般的に使用される。マンニトールはケーキの構造的安定性を保証する。これは、一般的に、リオブプロテクタント、例えば、スクロースと共に使用される。ソルビトール及びスクロースは、等張性を調節するための、及び輸送中または製造工程時のバルク調製中の凍結-融解ストレスに対して保護するための安定化剤として一般的に使用される薬剤である。PEGは、

50

タンパク質を安定化させるため、及び凍結防止剤として有用である。

【0322】

界面活性剤は、表面吸着を防止、最小化、または低減するために日常的に使用される。タンパク質分子は、表面の吸着、ならびに気-液、固-液、及び液-液界面での変性、その結果としての凝集の影響を受けやすい場合がある。これらの影響は、通常、タンパク質濃度に反比例する。これらの有害な相互作用は、通常、タンパク質濃度に反比例し、一般的には、製品の輸送及び取扱い中に生成されるような物理的振動によって悪化する。一般的に使用される界面活性剤として、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ソルビタンポリエトキシレートその他の脂肪酸エステル、及びポロキサマー188が挙げられる。界面活性剤はまた、タンパク質立体構造安定性を調節するために一般的に使用される。所与の界面活性剤は、通常、いくつかのタンパク質を安定化させ、他のタンパク質を不安定化するため、この点に関する界面活性剤の使用は、タンパク質特異的である。

10

【0323】

ポリソルベートは、酸化分解を受けやすく、しばしば、供給されると、タンパク質残基の側鎖、特にメチオニンの酸化を引き起こすのに十分な量の過酸化物を含む。したがって、ポリソルベートは慎重に使用する必要があり、使用する場合、最低有効濃度で使用する必要がある。

【0324】

抗酸化剤は、適切なレベルの周辺酸素及び温度を維持し、光への曝露を避けることによって、医薬製剤中のタンパク質の有害な酸化をある程度防止することができる。抗酸化性の賦形剤は、タンパク質の酸化的分解を防ぐためにも使用することができる。これに関する有用な抗酸化剤の中には、還元剤、酸素/フリーラジカルスカベンジャー、及びキレート剤がある。治療用タンパク質製剤に使用するための抗酸化剤は、好ましくは水溶性であり、製品の貯蔵寿命を通じてその活性を維持する。EDTAは有用な例である。

20

【0325】

金属イオンは、タンパク質補助因子として作用可能であり、タンパク質配位複合体の形成を可能にする。金属イオンはまた、タンパク質を分解するいくつかのプロセスを阻害することができる。しかしながら、金属イオンはまた、タンパク質を分解する物理的及び化学的プロセスを触媒する。マグネシウムイオン(10~120mM)を使用して、アスパラギン酸からイソアスパラギン酸への異性化を阻害することができる。Ca<sup>2+</sup>イオン(最大100mM)は、ヒトデオキシリボヌクレアーゼの安定性を高めることができる。しかしながら、Mg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>、及びZn<sup>2+</sup>は、rhdNaaseを不安定化させる可能性がある。同様に、Ca<sup>2+</sup>及びSr<sup>2+</sup>は第VII因子を安定化させる可能性があり、これはMg<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup>及びZn<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>ならびにFe<sup>2+</sup>によって不安定化することがあり、その凝集はAl<sup>3+</sup>イオンによって増大する可能性がある。

30

【0326】

本発明に従って塩を使用して、例えば、医薬製剤のイオン強度及び/または等張性を調節し、及び/または抗体構築物または他の成分の溶解性及び/または物理的安定性をさらに向上させてもよい。周知のように、イオンは、タンパク質の表面の荷電残基に結合し、タンパク質中の荷電した極性基を遮蔽し、それらの静電相互作用、誘引性、及び反発性相互作用の強度を低減することによってタンパク質の天然状態を安定化することができる。イオンはまた、特にタンパク質の変性ペプチド結合(-CONH)に結合することにより、タンパク質の変性状態を安定化することができる。さらに、タンパク質中の荷電した及び極性の基とのイオン相互作用はまた、分子間の静電相互作用を低減し、それによってタンパク質の凝集及び不溶性を防止または低減することができる。イオン種は、タンパク質に対するその効果が異なる。本発明に従って医薬組成物を製剤化する際に使用可能な、タンパク質に対するイオンの多数の分類別の順位付け及びそれらの効能が開発されている。一例はHofmeisterシリーズであり、これは、溶液中のタンパク質の立体構造安定性への影響によって、イオン性及び極性の非イオン性溶質をランク付けする。安定化溶質は「コスモトロピック」と呼ばれる。不安定化溶質は、「カオトロピック」と呼ばれる

40

50

。コスモトロープは、通常、溶液からタンパク質を沈殿させるために高濃度（例えば、 $> 1 \text{ M}$ の硫酸アンモニウム）で用いられる（「塩析」）。カオトロープは、通常、タンパク質の変性及び／または可溶化に用いられる（「塩溶」）。「塩溶」と「塩析」に対するイオンの相対的な有効性は、Hofmeisterシリーズにおけるイオンの順位を規定する。

#### 【0327】

増量剤、安定化剤、及び抗酸化剤、ならびに他の標準的な用途として、遊離アミノ酸を医薬製剤において使用することができる。リジン、プロリン、セリン、及びアラニンは、製剤中のタンパク質を安定化するために使用することができる。グリシンは、凍結乾燥に有用であり、正しいケーキ構造及び特性を保証する。アルギニンは、液体及び凍結乾燥製剤の両方において、タンパク質凝集を阻害するのに有用であり得る。メチオニンは抗酸化剤として有用である。

#### 【0328】

医薬組成物を製剤化するための特に有用な賦形剤として、スクロース、トレハロース、マンニトール、ソルビトール、アルギニン、リジン、ポリソルベート20、ポリソルベート80、ポロキサマー188、プルロニック及びそれらの組合せが挙げられる。組成物が本明細書に例示する望ましい特性を示し、特に含有する二重特異性一本鎖抗体構築物の安定化を促進する限り、前記賦形剤は、異なる濃度で医薬組成物中に存在してもよい。例えば、スクロースは、 $2\% (w/v) \sim 12\% (w/v)$ の濃度で、すなわち $12\% (w/v)$ 、 $11\% (w/v)$ 、 $10\% (w/v)$ 、 $9\% (w/v)$ 、 $8\% (w/v)$ 、 $7\% (w/v)$ 、 $6\% (w/v)$ 、 $5\% (w/v)$ 、 $4\% (w/v)$ 、 $3\% (w/v)$ または $2\% (w/v)$ の濃度で医薬組成物中に存在してもよい。好ましいスクロース濃度は、 $4\% (w/v) \sim 10\% (w/v)$ 、より好ましくは $6\% (w/v) \sim 10\% (w/v)$ の範囲である。ポリソルベート80は、 $0.001\% (w/v) \sim 0.5\% (w/v)$ の濃度で、すなわち $0.5\% (w/v)$ 、 $0.2\% (w/v)$ 、 $0.1\% (w/v)$ 、 $0.08\% (w/v)$ 、 $0.05\% (w/v)$ 、 $0.02\% (w/v)$ 、 $0.01\% (w/v)$ 、 $0.008\% (w/v)$ 、 $0.005\% (w/v)$ 、 $0.002\% (w/v)$ または $0.001\% (w/v)$ の濃度で医薬組成物中に存在してもよい。好ましいポリソルベート80濃度は、 $0.002\% (w/v) \sim 0.5\% (w/v)$ 、好ましくは $0.005\% (w/v) \sim 0.02\% (w/v)$ の範囲である。

#### 【0329】

しかしながら、医薬組成物がいかなる保存剤も含まないことも想定される。特に、本発明は、とりわけ、約 $0.5 \text{ mg/ml} \sim 50 \text{ mg/ml}$ の濃度の好ましくは一本鎖である二重特異性抗体構築物、ならびに緩衝液であって、そこにおいて抗体構築物は安定に存在し、 $\text{pH}$ 約6.0で、約 $10 \text{ mM}$ の濃度のリン酸カリウム、さらに約 $8\% (w/v)$ の濃度のスクロース及び約 $0.01\% (w/v)$ の濃度のポリソルベート80を含む、1つ以上の保存剤を含む医薬組成物を提供する。

#### 【0330】

本発明の医薬組成物は、様々な形態、例えば、固体、液体、凍結、気体または凍結乾燥の形態で、とりわけ、軟膏、クリーム、経皮パッチ、ゲル、散剤、錠剤、溶液、エアロゾル、顆粒、丸剤、懸濁液、エマルジョン、カプセル、シロップ、液剤、エリキシル剤、抽出物、チンキまたは液体抽出物の形態で製剤化することができる。

#### 【0331】

一般的に、本発明の医薬組成物には、とりわけ、意図する投与経路、送達形態及び所望の用量に応じて、様々な貯蔵形態及び／または剤形が考えられる（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed., (2012)）。当業者は、特定の剤形のそのような選択が、例えば、本発明の抗体構築物の物理的状态、安定性、in vivo放出速度及びin vivoクリアランス速度に影響し得ることを認識するであろう。

#### 【0332】

例えば、医薬組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、性質が水性または非水性のいずれかであり得る。適切なビヒクルまたは担体は、注射用水、生理食塩水または人工脳脊髄液であってもよく、場合により、非経口投与用の組成物に一般的な他の物質を補充してもよい。中性緩衝生理食塩水または血清アルブミンと混合した生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。

#### 【0333】

非経口投与を企図する場合、本発明の治療用組成物を、薬学的に許容可能なビヒクル中に所望の抗体構築物を含むパイロジェンフリーの非経口的に許容可能な水溶液の形態で提供してもよい。非経口注射用の特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、そこにおいて抗体構築物を、適切に保存される滅菌等張液として製剤化する。製剤は、注射可能なミクロスフェア、生体分解可能な粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸またはポリグリコール酸など）、ビーズまたはリポソームなどの薬剤とともに、所望の分子を製剤化することを含むことができ、それは、デポー注射によって送達可能な生成物の徐放または持続性放出を提供し得る。循環器中での持続期間を促進する効果を有するヒアルロン酸もまた使用してよい。移植可能な薬物送達デバイスを使用して、所望の抗体構築物を導入してもよい。

#### 【0334】

持続または制御 - 送達 / 放出製剤もまた本明細書において想定される。リポソーム担体、生体分解可能な微小粒子または多孔性ビーズ及びデポー注射などの様々な他の持続または制御送達手段を製剤化するための技術もまた、当業者に公知である。例えば、医薬組成物の送達のための多孔性ポリマー微粒子の徐放を記載している国際特許出願第 P C T / U S 9 3 / 0 0 8 2 9 号を参照されたい。持続放出性製剤は、成型品、例えばフィルム、またはマイクロカプセルの形態の半透性ポリマーマトリックスを含み得る。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第 3,773,919 号及び欧州特許出願公開第 E P 0 5 8 4 8 1 号に開示されている）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸の共重合体（Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556）、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 及び Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langer et al., 1981, 上記）またはポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第 E P 1 3 3,988 号）を含み得る。持続放出性組成物はまた、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製可能なリポソームを含み得る。例えば、Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; 欧州特許出願公開第 E P 0 3 6,676 号; 第 E P 0 8 8,046 号及び第 E P 1 4 3,949 号参照。抗体構築物はまた、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中で、コアセルベーション技術または界面重合（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）によって調製したマイクロカプセルに封入してもよい。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed., (2012) に開示されている。

#### 【0335】

in vivo 投与に使用する医薬組成物は、通常、滅菌調製物として提供する。滅菌は、滅菌濾過膜を通す濾過によって達成することができる。組成物を凍結乾燥させる場合、凍結乾燥及び再構成の前または後のいずれかにおいて、この方法を用いた滅菌を行ってもよい。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥形態で、または溶液中で貯蔵することができる。非経口組成物は、一般的に、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針で穿孔可能な栓を有する静脈内溶液バッグまたはバイアルに入れる。

#### 【0336】

本明細書中に開示する抗体構築物はまた、免疫リポソームとして製剤化してもよい。「

10

20

30

40

50

リポソーム」は、哺乳類への薬物の送達に有用な様々なタイプの脂質、リン脂質及び／または界面活性剤からなる小胞である。リポソームの成分は、一般的に、生体膜の脂質配置と同様に、二重層形成で配置される。抗体構築物を含有するリポソームは、E p s t e i n e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 8 2 : 3 6 8 8 ( 1 9 8 5 ) ; H w a n g e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 7 7 : 4 0 3 0 ( 1 9 8 0 ) ; 米国特許第 4 , 4 8 5 , 0 4 5 号及び第 4 , 5 4 4 , 5 4 5 号 ; 及び W 0 9 7 / 3 8 7 3 1 に記載されているような、当業者に公知の方法で調製する。循環時間を高めたリポソームは、米国特許第 5 , 0 1 3 , 5 5 6 号に開示されている。特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及び P E G 誘導体化ホスファチジルエタノールアミン ( P E G - P E ) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成することができる。リポソームを所定の細孔サイズのフィルターに通して押し出し、所望の直径を有するリポソームを得る。本発明の抗体構築物の F a b フラグメントは、M a r t i n e t a l . J . B i o l . C h e m . 2 5 7 : 2 8 6 - 2 8 8 ( 1 9 8 2 ) に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介して、リポソームに複合体化することができる。化学療法剤は場合によりリポソーム内に含まれる。G a b i z o n e t a l . J . N a t i o n a l C a n c e r I n s t . 8 1 ( 1 9 ) 1 4 8 4 ( 1 9 8 9 ) 参照。

#### 【 0 3 3 7 】

本発明の組成物は、組成物の意図する用途に応じて、本明細書中で定義する二重特異性一本鎖抗体構築物に加えて、さらなる生物学的に活性な薬剤を含み得ることが想定される。そのような薬剤は、特に、腫瘍及び／または悪性細胞に作用する薬剤であり得るが、医薬組成物の意図する用途に応じて、胃腸系に作用する薬剤、免疫反応を阻害する薬剤（例えば、コルチコステロイド）、炎症反応を調節する薬剤、循環系に作用する薬剤、及び／または当該分野で公知のサイトカインなどの薬剤を含む、他の活性薬剤もまた、想定される。また、本発明の医薬組成物は、併用療法で、すなわち別の抗癌剤と組み合わせて投与することも想定される。

#### 【 0 3 3 8 】

医薬組成物を製剤化すると、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、結晶として、または脱水もしくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアルに貯蔵してもよい。そのような製剤は、即時使用可能な形態または投与前に再構成する形態（例えば、凍結乾燥）のいずれかで貯蔵してもよい。例えば、凍結乾燥組成物は、例えば、静菌注射用水 ( B W F I ) 、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) 、または凍結乾燥前にタンパク質を入れていたものと同じ製剤で再構成してもよい。

#### 【 0 3 3 9 】

本発明の医薬組成物は、一般的に、任意の適切な投与経路による送達のために製剤化してもよい。本発明に関して、投与経路として、局所経路（経皮、吸入、経鼻腔、経眼、経耳介／経耳、経腔、経粘膜など）；経腸経路（経口、胃腸管、舌下、口唇下、口腔、直腸など）；及び非経口経路（静脈内、動脈内、骨内、筋肉内、大脳内、脳室内、硬膜外、髄腔内、皮下、腹腔内、羊水外、関節内、心臓内、皮内、病巣内、子宮内、膀胱内、硝子体内、経皮、鼻腔内、経粘膜、関節滑液嚢内、管腔内など）が挙げられるが、必ずしもこれらに限定するものではない。

#### 【 0 3 4 0 】

本明細書に記載の医薬組成物は、非経口投与、例えばボラス注射などの注射、または連続注入などの注入による、例えば皮下または静脈内送達に対して特に有用である。医薬組成物は、医療機器を用いて投与してもよい。医薬組成物を投与するための医療機器の例は、米国特許第 4 , 4 7 5 , 1 9 6 号 ; 第 4 , 4 3 9 , 1 9 6 号 ; 第 4 , 4 4 7 , 2 2 4 号 ; 第 4 , 4 4 7 , 2 3 3 号 ; 第 4 , 4 8 6 , 1 9 4 号 ; 第 4 , 4 8 7 , 6 0 3 号 ; 第 4 , 5 9 6 , 5 5 6 号 ; 第 4 , 7 9 0 , 8 2 4 号 ; 第 4 , 9 4 1 , 8 8 0 号 ; 第 5 , 0 6 4 , 4 1 3 号 ; 第 5 , 3 1 2 , 3 3 5 号 ; 第 5 , 3 1 2 , 3 3 5 号 ; 第 5 , 3 8 3 , 8 5 1 号 ; 及び第 5 , 3 9 9 , 1 6 3 号に記載されている。

10

20

30

40

50

## 【 0 3 4 1 】

本発明の医薬組成物は、中断なく投与することもできる。非限定的な例として、患者の体内への治療剤の流入を計量するために患者が着用する小型ポンプシステムによって、中断のない、または実質的に中断のない、すなわち連続投与を実現してもよい。医薬組成物は、前記ポンプシステムを用いて投与することができる。そのようなポンプシステムは、一般的に当該技術分野において公知であり、通常、注入する治療剤を含むカートリッジの定期的な交換に依存する。そのようなポンプシステムにおいてカートリッジを交換する場合、患者の体内への治療薬の中断のないフローの一時的中断が起こり得る。そのような場合、今なお、本発明の薬理学的手段の目的の範囲内において、カートリッジ交換前の投与段階とカートリッジ交換後の投与段階とを考慮するものと考えられるが、本発明の方法は、そのような治療薬の1つの「中断のない投与」を構成する。

10

## 【 0 3 4 2 】

本発明の医薬組成物の連続的または中断のない投与は、リザーバから流体を駆動するための流体駆動機構と、駆動機構を作動させるための作動機構とを備える流体送達装置または小型ポンプシステムによる、静脈内または皮下への投与であってもよい。皮下投与のためのポンプシステムは、患者の皮膚を貫通させ、適切な組成物を患者の体内に送達するための針またはカニューレを有し得る。前記ポンプシステムは、静脈、動脈または血管とは無関係に患者の皮膚に直接固定または取り付けてもよく、それによってポンプシステムと患者の皮膚との間の直接接触が可能になる。ポンプシステムは、患者の皮膚に24時間、最大で数日間、取り付けることができる。ポンプシステムは、小さな容積のリザーバを有する小型のものであってもよい。非限定的な例として、投与する適切な医薬組成物のリザーバの容積は0.1~50mlであり得る。

20

## 【 0 3 4 3 】

本発明の医薬組成物が、通常、上記の賦形剤、もしくは追加の活性薬剤のいずれかを含んでもよく、または、本発明の医薬組成物が安定であり、好ましくは、添付の実施例において評価する - シクロデキストリンを含む医薬組成物と同じ特性を示す限り、それを任意の適切な形態で提供してもよいことは、当業者であれば容易に理解するであろう。当業者であれば、様々な成分を調整し、それによって、安定な、すなわち、好ましくは、その中に含まれる二重特異性一本鎖抗体断片の凝集体及び/または配座異性体を実質的に含まない医薬組成物を提供することができる。

30

## 【 0 3 4 4 】

本明細書中で使用する場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」は、文脈が他に明白に示さない限り、複数への言及を含むことに留意する必要がある。したがって、例えば、「試薬(agent)」への言及は、そのような異なる試薬の1つ以上を含み、「方法(the method)」への言及は、本明細書に記載する方法に対して変更または置き換え可能な、当業者に公知の同等の工程及び方法への言及を含む。

## 【 0 3 4 5 】

他に特段の指示がない限り、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、一連の要素のすべてを指すものと理解される。当業者であれば、本明細書に記載する本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、または日常的な実験のみを用いて確認することができるであろう。そのような均等物は、本発明に包含されるものとする。

40

## 【 0 3 4 6 】

本明細書中で使用する用語「及び/または」は、「及び」、「または」及び「前記用語によって接続される要素のすべてまたは任意の他の組合せ」の意味を含む。

## 【 0 3 4 7 】

本明細書中で使用する用語「約」または「およそ」は、所与の値または範囲の20%以内、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内を意味する。しかしながら、具体的な数字も含み、例えば、約20には20が含まれる。

## 【 0 3 4 8 】

50



用語「未満」または「より高い」は、具体的な数字を含む。たとえば、20未満とは、それ未満またはそれに等しいことを意味する。同様に、上回るまたはより高いとは、それぞれ、その数字を上回るかもしくはその数字に等しい、またはその数字より高いかもしくはその数字に等しいことを意味する。

【0349】

本明細書及び添付の特許請求の範囲を通して、文脈上他の意味を必要としない限り、用語「含む (comprise)」、ならびに「含む (comprises)」及び「含む (comprising)」などの変形は、記載する整数もしくは工程または整数もしくは工程のグループを包含するが、他の整数もしくは工程または整数もしくは工程のグループを除外するものではないことを意味するものと理解される。本明細書中で使用する場合、用語「含む (comprising)」は、用語「含有する (containing)」もしくは「含む (including)」で、または場合により、本明細書中で使用する場合、用語「有する (having)」で置き換え可能である。

10

【0350】

本明細書中で使用する場合、「からなる」は、請求項の要素において特定されていない任意の要素、工程、または成分を除外する。本明細書中で使用する場合、「本質的に～からなる」は、請求項の基本的及び新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない物質または工程を排除しない。

【0351】

本明細書中の各例において、用語「含む」、「本質的に～からなる」及び「からなる」のいずれかは、他の2つの用語のいずれかと置き換えてもよい。

20

【0352】

本発明は、本明細書に記載する特定の方法論、プロトコール、材料、試薬、及び物質などに限定されるものではなく、したがって様々な異なり得ることを理解すべきである。本明細書中で使用する用語は、単に特定の実施形態を説明するためのものに過ぎず、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0353】

上記または下記のいずれかにかかわらず、本明細書の本文において引用するすべての刊行物及び特許（すべての特許、特許出願、科学刊行物、製造元の仕様書、指示書などを含む）は、参照としてその全体を本明細書に援用する。本明細書中のいかなるものも、本発明が先行発明によってそのような開示よりも先行する資格がないことを認めるものとして解釈されるものではない。参照として援用する資料が本明細書と矛盾するかまたは不整合である場合、本明細書はそのような資料よりも優先する。

30

【0354】

本発明及びその利点のより良い理解は、単に例示のために提供する以下の実施例から得られるであろう。いずれにせよ、これらの実施例は、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0355】

実施例1：公知の保存剤と、本発明による代表的な二重特異性抗体構築物との適合性を調べるために、CD19×CD3二重特異的抗体構築物を、表4に示すパラメータを有するそれぞれの公知の保存剤の存在下で製剤化した。

40

【0356】

(表4) CD19×CD3二重特異的抗体構築物との保存剤適合性を試験するための製剤パラメータ

製剤名	pH	タンパク質 (mg/mL)	緩衝液 (mM)	スクロース (%)	保存剤 (w/v)	ポリソルベート80 (%)
G4SuT	4.0	0.8	10 mM グルタミン酸塩	9	NA	0.01
G4SuT_CH	4.0	0.8	10 mM グルタミン酸塩	9	0.3% クロロブタノール	0.01
G4SuT_ME	4.0	0.8	10 mM グルタミン酸塩	9	0.2% メチルパラベン	0.01
G4SuT_PH	4.0	0.8	10 mM グルタミン酸塩	9	0.5% フェノール	0.01
G4SuT_TH	4.0	0.8	10 mM グルタミン酸塩	9	0.01% チメロサル	0.01

10

## 【 0 3 5 7 】

使用した製剤パラメータは、二重特異的抗体構築物を効率的に安定化するために以前に見出された。したがって、保存剤を含まない陰性対照 ( G 4 S u T ) と比較した差異は、より明白になるはずである。選択した保存剤濃度は、当該分野で用いられる標準濃度を反映したものであった。それぞれの製剤を 2 5 で 1 4 日間保存し、0、1、3、7 及び 1 4 日目に、サイズ排除クロマトグラフィー ( S E C - H P L C ) によって試験した。図 1 から分かるように、0 % の保存剤を含む対照を含め、試験したいくつかの製剤は、2 5 で経時的に高分子量 ( H M W ) 種の割合の減少を示した。これは、クロロブタノール及びメチルパラベンの場合にあてはまり、これらの保存剤がタンパク質薬物を不安定化せず、凝集を誘導せず、さらには凝集を減少させることを示す。フェノールを添加すると、H M W 値は全体的に一定のままであり、所定の実験条件下での、試験した二重特異性抗体構築物とフェノールとの適合性も示している。チメロサルは、経時的に H M W のわずかな増加が認められたため、適さないようであった。H M W から主ピークへの再平衡化は、部分的には、薬物製品濃度から I V バッグ濃度への希釈によるものであり得る。4 . 0 ~ 6 . 5 の範囲の低い pH、例えば 4 . 0 において、本発明の二重特異性抗体構築物は安定なままであるか、または例えばクロロブタノールもしくはメチルパラベンのような保存剤によって、あるいはベンジルアルコールによってもまた、安定化される、と概して結論づける。低い pH は、二重特異性抗体構築物の安定化を補完し、これは、より高い濃度、例えば少なくとも 2 0 0、3 0 0、4 0 0、5 0 0、6 0 0、7 0 0、8 0 0、9 0 0 または 1 0 0 0  $\mu$  g / m l を含む医薬組成物が安定であること、すなわち、パーセントイル H M W 濃度が低いことを示すこと理由である。

20

30

## 【 0 3 5 8 】

実施例 2 : さらなる公知の保存剤として、ベンジルアルコールを、本発明による代表的な二重特異性抗体構築物である C D 1 9  $\times$  C D 3 二重特異性抗体構築物との適合性について試験した。本明細書に記載の典型的な二重特異的抗体構築物は、p H 4 の環境に比べて p H 7 の環境において凝集に対する保護が少ないため、臨床適用状況をよりよく模倣するために、シビアな環境として生理学的 p H 7 を選択した。全体的に凝集しやすい傾向にあると予想すべきと考えられる。詳細には、一般的な臨床適用濃度及びそれを超え得る濃度を反映した 4 . 5 ~ 8 0 0  $\mu$  g / m l の C D 1 9  $\times$  C D 3 二重特異性抗体構築物の希釈系列を調製した。0 . 9 % のベンジルアルコール濃度は、商業的及び規制上認可された 0 . 9 % の塩化ナトリウム、U S P ( 0 . 9 % ベンジルアルコールを含有 ) に則して選択した。臨床環境においても一般的な周囲温度である 2 5 での 0、1 及び 2 日後に、サイズ排除クロマトグラフィー ( S E C - H P L C ) によって、望ましくない H M W 種の割合を測定することによって適合性を調べた。図 1 に見られるように、望ましくない H M W 種の割合で表した凝集速度は、二重特異性抗体構築物、本事例では、C D 1 9  $\times$  C D 3 二重特異性抗体構築物の濃度に依存する。驚くべきことに、5 0  $\mu$  g / m l 未満の濃度では H M W 種の増加は認められない。4 . 5  $\mu$  g / m l の濃度での H M W の割合の値から、H M W 種は単量体への可逆性も示すことが認められる。したがって、約 5 0  $\mu$  g / m l の閾値以下では、代表的な C D 1 9  $\times$  C D 3 二重特異性抗体構築物は、ベンジルアルコールのような

40

50

保存剤との接触時にH M W種はほとんど見られず、2日間保存してもH M Wの割合は2%未満に留まることが観察された。また、200  $\mu$ g / ml未満の濃度では、初期H M W濃度は非常に低く(1%未満)、保存2日後でさえも5%を有意に下回ったままである。本発明によるC D 19  $\times$  C D 3二重特異性抗体構築物が、安定性の点でより感受性の高い二重特異性抗体構築物であると同様に、他の構築物は、それぞれの二重特異性抗体構築物濃度でさらに低いH M Wの割合を示し、さらなる任意の補完安定化剤が存在しなくても、臨床応用に適切な生理的p H 7及び温度25において、代表的な保存剤ベンジルアルコールの存在下で安定であることが観察された。

#### 【0359】

実施例3：代表的な保存剤ベンジルアルコールの存在下、ならびに生理的p H 7、冷凍及び臨床現場での投与をカバーする4及び25の両方における代表的なC D 19  $\times$  C D 3二重特異性抗体構築物について、S E C - H P L Cにより、単量体に戻るH M W種の可逆性を14日間にわたってさらに調べた。当該構築物の濃度は、それぞれ4  $\mu$ g / mlであった。ベンジルアルコールの濃度はそれぞれ0.25、0.5及び0.9%であった。図3Aから分かるように、4ではH M Wの割合は0日目から7日目にかけて低下するが、7日目から14日目にかけては有意に変化しない。ベンジルアルコールを含む製剤のH M W値は、安定化効果を示さないものよりもわずかに低い。この効果は25でさらに顕著である(図3B参照)。ベンジルアルコール濃度が高く、観察時間が長いほど、H M Wの割合は低い。この結果からは、H M W種が、代表的な保存剤ベンジルアルコールの存在下で、好ましくはより高いが調節許容可能な濃度(0.9%)において、単量体へ戻る可逆性をも示すことが確認される。

#### 【0360】

同じ実験条件下で、輸液バッグ材料の潜在的な影響を同様に調べた。7日間のI Vバッグの予想される投与濃度である1900 ng / mlのB l i n c y t oを含む微生物増殖試験用のI Vバッグを調製した。安定性試験のために調製したI Vバッグは、投与濃度を階層化し、4500 ng / mlまたは1900 ng / mlのいずれかでB l i n c y t oを含有させた。安定性指示アッセイS E - H P L C及びC E - H P L Cに対しては、L O Qを上回る、より高い濃度が必要であった。

#### 【0361】

両方の研究で250 mlのI Vバッグを利用した。微生物増殖試験は、空のE V A I Vバッグのみを用いて評価した。これらのバッグは、滅菌環境で調製し、室温で14日間インキュベーションする間、微生物播種及び増殖試験のために調製した。安定性試験ではE V AとポリオレフィンI Vバッグの両方を評価した。生理食塩水で満たしたポリオレフィンI Vバッグを、使用前に排出させた。B l i n c y t oを含有する注入溶液を調製した後、両方のI Vバッグタイプを4で10日間置いて、診療所での最大貯蔵時間をシミュレートし、その後、25及び37で14日間、インキュベーションした。したがって、輸液バッグ材料エチルビニルアセテート(E V A)及びポリオレフィンを、パーセントایلH M W種に関してB i T E(登録商標)安定性の差について比較した。

#### 【0362】

それぞれの製剤は、4  $\mu$ g / mlのC D 19  $\times$  C D 3二重特異性構築物を含み、0%、0.5%、0.6%または0.74%のベンジルアルコール濃度を、25で0、4、7、9、11または14日間維持し、1つの試料を静的対照として4で10日間インキュベートした。図3Cから分かるように、ベンジルアルコールを含む製剤は、全体的に安定性の向上を示し、H M W値をさらに低下させたが、このことは、特に保存剤濃度に依存した単量体への可逆性を示している。この傾向は、ポリオレフィンの場合よりもE V Aの方がやや一貫して観察された。したがって、単量体の指標としてのパーセントایل主ピーク、すなわち非凝集及び活性二重特異性抗体構築物は、より高い濃度の保存剤及び検査時間にわたって増加する(図3D参照)。一般的に、ベンジルアルコールが存在することにより、特に25でのインキュベーション中の再平衡化の速度が高まるようであった。全体として、試験した2種類のI Vバッグ材料の間に有意差はなかった。

10

20

30

40

50

## 【0363】

実施例4：ベンジルアルコールのような保存剤によって付与される本発明の代表的な二重特異性抗体構築物の安定性の向上を、検出手段として蛍光を用いる変性アッセイによってさらに試験した。実験条件は、変性剤として塩化グアニジニウムを含み、その濃度をx軸上にプロットした(図4参照)。インキュベーション時間は、生理条件に近いpH7、25、2.5時間であった。蛍光励起を280nmに設定し、発光スキャンを300~400nmで行った。パーセント変性画分を、当該分野で標準的な蛍光アッセイから計算した。その結果を図4に見ることができる。灰色の曲線はベンジルアルコールを含む製剤を表し、黒色の曲線は保存剤を含まない製剤を表す。灰色の曲線は、曲線の底部の右側へのシフトを示す。これは、この領域、すなわちCD3ドメインをアンフォールディング

10

## 【0364】

実施例5：この実施例は、静脈内(IV)バッグを介して投与するCD19×CD3二重特異性抗体構築物薬物製品(DP)のサポートによる微生物チャレンジ試験であった。この試験は、異なる濃度(0.5%~0.74%)のベンジルアルコール(BeOH)の能力を評価し、ベンジルアルコール、CD19×CD3二重特異性抗体構築物DP、及び静脈内溶液安定化剤(IVSS)を含有するブリナツモマブ輸液を保持し、20~25で最大14日間維持したIVバッグ中の微生物増殖を低減または排除する。

## 【0365】

20

この試験から得られた結果は、評価した濃度でのベンジルアルコールが、評価した6種の微生物の増殖を阻害できることを示している。試験で評価したグラム陰性細菌(大腸菌、緑膿菌(*P. aeruginosa*)、及びE.クロアカ(*E. cloacae*))に対する抗菌効力は明らかである。これらの微生物は、BeOHを含まないブリナツモマブ輸液において約106CFU/mLまで増殖することができたが、評価した3つすべての濃度で増殖が完全に阻害された。この研究で評価したグラム陽性細菌(黄色ブドウ球菌、及びM.ルテウス)ならびに酵母(C.アルビカンス)に対する効果は、グラム陰性細菌に対する効果と同様には明らかでなく、これは主に、ブリナツモマブ輸液がグラム陽性細菌及び酵母の増殖をサポートしないことに起因する。これらの微生物の0.0%BeOH陽性対照については、力価の漸減と、評価期間の終了時に向けて回復可能な力価が低いものから回復しないものが観察された。それにもかかわらず、これらの微生物に対するベンジルアルコールの抗菌効力は、BeOH処理した試料中でチャレンジした播種菌を完全に不活性化または阻害するのに必要な持続時間の差によって示すことができる。

30

## 【0366】

この試験は、ベンジルアルコール(BeOH、最終濃度0.0%、0.5%、0.6%または0.74%)、CD19×CD3二重特異性抗体構築物DP、及びIVSSを含むCD19×CD3二重特異性抗体構築物輸液109mLを充填したIVバッグ中の6つの異なる微生物の増殖を評価するために実施した。調製したIVバッグを20~25で最大14日間保持した。

## 【0367】

40

この試験のために選択した細菌及び酵母は、一般的に院内感染から単離された公知のヒト病原体の代表である。これらの微生物には、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)(ATCC10231)、エンテロバクター・クロアカ(*Enterobacter cloacae*)(ATCC13047)、大腸菌(*Escherichia coli*)(ATCC8739)、ミクロコッカス・ルテウス(*Micrococcus luteus*)(ATCC4698)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)(ATCC9027)、及び黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)(ATCC6538)が含まれる。

## 【0368】

ブリナツモマブDP製剤は、25mMクエン酸一水和物、200mM L-リジナー塩

50

酸塩、15% (w/v) トレハロース二水和物、0.1% (w/v) ポリソルベート80 (pH 7.0) 中に1.91 µg/mL プリナツモマブを含有する。IVSS用の製剤は、25 mM クエン酸一水和物、1.25 M L-リジン塩酸塩、0.1% (w/v) ポリソルベート80、pH 7.0である。

#### 【0369】

被験物質：試験で評価した被験物質は、総容積109 mL/バッグ中に1.91 µg/mLの濃度のプリナツモマブを含有するIVバッグに充填したプリナツモマブ輸液であった。2.2 mLのIVSS、16.8 mLのブールし、再構成したプリナツモマブDP (210 µg)、ならびに合計90 mLの総容量の生理食塩水及び0.9%ベンジルアルコールを含む生理食塩水 (b s a l i n e) の組合せを加えることによってこの溶液を作製した。この試験で評価した4つの異なるレベルのBeOH (0.0%、0.5%、0.6%及び0.74%) は、異なる量の生理食塩水及びb s a l i n eを加えることによって達成された。例えば、生理食塩水90 mLを添加することにより0.0% BeOH (陽性対照) を有するバッグを調製し、一方、18 mLの生理食塩水及び72 mLの0.9% b s a l i n eを2.2 mLのIVSS及び16.8 mLのプリナツモマブDPに加えることによって0.6% BeOHを有するバッグを調製した。詳細は、付録Aを参照されたい。この報告の付録Aの図1 (IVバッグ調製の概略図) における0.0% BeOH陽性対照の図、及び付録Dの図4の同じ図は、最終BeOH濃度を0.0%ではなく0.5%であると不注意にも記載した。これは誤植であり、試験結果に影響を及ぼすものではない。

#### 【0370】

合計24個のCD19 × CD3二重特異性抗体構築物輸液を充填したIVバッグを評価し、上記6種の異なる微生物に対するベンジルアルコールの4種のレベルの効果 (6 × 4 = 24) を評価した。< 1 × 10<sup>4</sup> CFUの微生物を含有するおよそ1 mLの播種菌を、注入ポートを通して各バッグ内に播種し、約1 × 10<sup>2</sup> CFU/mLの初期微生物負荷を生じさせた。播種後、袋上のサンプリングポートを滅菌IPAで洗浄し、袋を短時間混合し、次いで20 ~ 25 °Cでインキュベートした。

#### 【0371】

陰性対照：チャレンジした微生物を含まない3種のレベルのBeOH (0.5%、0.6%及び0.74%) のプリナツモマブ輸液を含む3つのIVバッグを、試験化合物と共にインキュベートし、陰性対照として機能させた。0.1%ペプトン水 (PEPW) 及びリン酸緩衝生理食塩水 (PHSS) を含む、追加のアッセイ陰性対照を、この試験で評価した。これらの陰性対照は、常に増殖するために陰性でなければならない。さらなる詳細は、付録Aを参照されたい。

#### 【0372】

サンプリング及び滴定手順：0時間、4日、8日、10日、12日及び14日目の各時点で、評価した各バッグから3 mLのアリコートを採取し、滴定した。

#### 【0373】

滴定した各試料について、1 mLのアリコートを2連で、膜濾過法によって試料の滴定を行った。さらなる希釈を行い、計数可能な結果 (< 300 CFU/プレート) を得た。

#### 【0374】

チャレンジした微生物に対するBeOHの効果を、図1 ~ 図6にグラフで示す。通常、この試験で評価したグラム陰性 (G-) 細菌 (大腸菌、緑膿菌、及びE. クロアカ) は、グラム陽性 (G+) 細菌 (黄色ブドウ球菌、及びM. ルテウス) ならびに酵母 (C. アルピカンス) よりもはるかに良好に増殖し、プリナツモマブ輸液 (BeOHを含まない) 中で生存率を維持した。3種すべての評価したG-バクテリアの0.0% BeOH陽性対照は、8日目に約106 CFU/mLまで増殖し、試験終了 (14日間) までそのレベルを維持した (図5A、5B及び5C)。対照的に、播種したG-バクテリア (約100 CFU/mL) の増殖は、BeOHの存在下で阻害された (すなわち不活性化された)。3種のBeOH濃度の全てで、4日目以降に回復可能な緑膿菌はなく (図5B)、10日目以降に回復可能な大腸菌またはE. クロアカはなかった (それぞれ図5A及び図5C)。

## 【 0 3 7 5 】

G - バクテリアとは異なり、G + バクテリア（黄色ブドウ球菌、及びM . ルテウス）またはC . アルピカンスの増殖（それぞれ、図5 D、5 E及び5 F）は、ブリナツモマブ輸液（BeOHありまたはなし）によってサポートされなかった。0 . 0 % BeOH陽性対照の経時試料中のG + バクテリア及びC . アルピカンスの力価の漸減が観察され、試験終了時まで回復可能な力価が低いかまたは回復しなかった。同様に、これらの微生物に対するBeOHの抗菌効力は、それでもなお顕著ではあるが、G - バクテリアで観察されたほど明白なものではない。この作用は、チャレンジした微生物が、BeOH処理した試料において、0 . 0 % BeOH対照に比べてより早く完全に不活性化または阻害されることを実証することができる。黄色ブドウ球菌について、チャレンジした播種菌は、陽性対照が10日目であったのに対して、0 . 74 % BeOHでは4日目以降に、0 . 5 %または0 . 6 % BeOHでは8日目に回復不能になった（図5 D）。同様に、チャレンジしたM . ルテウスは、0 . 74 % BeOHでは8日目に、0 . 5 %または0 . 6 % BeOHでは14日目に回復不能になり、陽性対照は14日目においても低い微生物の回復率を有し（図5 E）；チャレンジしたC . アルピカンスは、3つすべてのレベルのBeOHで8日目に、陽性対照については10日目に回復不能であった（図5 F）。したがって、試験した製剤における口バストな抗菌活性を示すことができた。

10

## 【 0 3 7 6 】

実施例6：本発明の二重特異性抗体構築物及び保存剤を含む製剤中で使用する緩衝液及び/または賦形剤による追加の安定化効果を証明することが本実験の目的であった。モデル抗FAPドメイン、単離された抗CD3ドメイン（I2C、すべての例示される二重特異性抗体構築物にわたって典型的に使用される）、CD33 x CD3二重特異性抗体構築物及びEGFRvIIII x CD3二重特異性抗体構築物を試験した。FAPa、抗CD3ドメイン、及びCD33 x CD3二重特異性抗体構築物については、実験手順は同じであった。第一に、タンパク質試料をトリス - リン酸緩衝液（35 mMトリス、17 . 5 mMリン酸、pH 6 . 0）及び（35 mMトリス、17 . 5 mMリン酸、50 mMクエン酸、pH 6 . 0）にそれぞれ透析した。透析後、タンパク質濃度を0 . 3 mg / mLに調整した。第二に、正確に同じ組成を有する対応するD2O緩衝液中へのタンパク質試料の1 ~ 5倍希釈によって水素 - 重水素交換（HDX）反応を開始した。第三に、HDX反応を、10秒、1分、10分、1時間、4時間、及び12時間後にクエンチし、次いで、クエンチしたタンパク質試料を質量分析によって分析した。FAPaについては、HDX反応を4、25、及び37で行った。HDX反応は、CD33 x CD3二重特異性抗体構築物AMG330及び抗CD3に関して37で行った。ベンジルアルコールの存在下での抗体構築物の安定性の評価のために、ベンジルアルコールを0 . 9 %の濃度でタンパク質試料に直接添加した。EGFRvIIII x CD3二重特異性抗体構築物については、タンパク質試料を（a）10 mM KH2PO4、2 %スクロース、4 %マニトール、pH 6、及び（b）10 mM KH2PO4、2 %スクロース、4 %マニトール、50 mMクエン酸、pH 6に、それぞれ透析した。透析後、タンパク質濃度を1 mg / mLに調整した。第二に、正確に同じ組成を有する対応するD2O緩衝液中へのタンパク質試料の1 ~ 5希釈によって、HDX反応を開始した。第三に、10秒、10分、2時間、8時間、16時間、24時間後にHDX反応をクエンチし、次いで、クエンチしたタンパク質試料を質量分析によって分析した。実験は25で行った。

20

30

40

## 【 0 3 7 7 】

これらの図は、FAP（図6 A）、抗CD3ドメイン（YISYW）中のペプチド108 ~ 112がFAP中のペプチド367 ~ 370に対応する抗CD3ドメイン（図6 B）、CD33 x CD3二重特異性抗体構築物（YISYW）中のペプチド364 ~ 368がFAP中のペプチド366 ~ 370に対応するCD33 x CD3二重特異性抗体構築物（図6 C）、及びEGFRvIIII x CD3二重特異性抗体構築物（YISYW）中のペプチド365 ~ 369がFAP中のペプチド366 ~ 370に対応するEGFRvIIII x CD3二重特異性抗体構築物（図6 D）に対する、ベンジルアルコールの存在下

50

での適用可能なクエン酸の安定化効果を示す。したがって、異なる B i T E 分子に対する抗 C D 3 ドメインの C D R - H 3 領域 ( Y I S Y W ) に対するクエン酸塩安定化効果を観察することができる。F A P a、抗 C D 3、及び C D 3 3 x C D 3 二重特異性抗体構築物については、実験条件は同一であり、安定化効果は同等である。E G F R v I I I x C D 3 二重特異性抗体構築物については、上記のようにわずかに異なる条件で実験を行ったが、同様の安定化効果が得られた。したがって、クエン酸は、必要に応じて保存剤の存在下で二重特異性抗体構築物を安定化することができることが示されている。

#### 【 0 3 7 8 】

さらに、F A P a、A M G 3 3 0、A M G 5 9 6、及び単離された C D 3 結合体それ自身に対するクエン酸及びベンジルアルコールの効果を試験した。それぞれ試験された構築物に関して、結果は、同様の効果を示す。ここで、クエン酸及びベンジルアルコールは残基 3 6 6 ~ 3 7 0 ( Y I S Y W ) の領域に対して相殺効果を有し得ることが示される。図 6 E 及び 6 F は、クエン酸及びベンジルアルコールの個々の効果を示す。例えば、トリス - リン酸 ( スライド中、丸 ) の製剤にクエン酸塩 ( スライド中、四角 ) を添加することにより、この領域の立体配座の動態が低下する。比較として、ベンジルアルコール ( スライド中、三角 ) をトリス - リン酸の製剤に添加すると、この領域の立体配座の動態が増加する。図 6 G 及び 6 H は、クエン酸及びベンジルアルコールの相殺作用を示す。クエン酸塩とベンジルアルコール ( 白菱形 ) の両方の添加では、立体配座の動態は、トリス - リン酸 ( 黒丸 ) の製剤に戻っており、クエン酸塩とベンジルアルコールが互いに相殺することを示している。したがって、二重特異性抗体構築物が、ベンジルアルコールのような保存剤の安定化効果 ( 抗二量体化効果 ) よりも高い場合に、クエン酸塩は、保存剤の不安定化作用を相殺するための補完安定化剤として役立ち得る。

#### 【 0 3 7 9 】

実施例 7 : この実施例は、I V 注入バッグからの B i T E ( 登録商標 ) 回収のような低濃度二重特異性抗体構築物の改良に関する。B i T E ( 登録商標 ) 抗体構築物の高い力価の結果として、通常、B i T E ( 登録商標 ) 濃度は低くて済む。I V バッグ適合性試験の間、静脈内連続注入による投与のために E G F R v I I I x C D 3 二重特異性抗体構築物を 0 . 9 % ( v / v ) 生理食塩水中に非常に低い濃度へと希釈する。F I H 臨床試験のための最小のコホート投与では、タンパク質濃度は約 8 0 n g / m L で済む。この極低濃度での E G F R v I I I x C D 3 二重特異性抗体構築物回収の分析には、タンパク質由来のシグナルを最大化するために、かなり標準的な逆相クロマトグラフィー法に対するいくつかの工夫と適応が必要であった。

#### 【 0 3 8 0 】

p H 7 で 2 5 m M のクエン酸、1 . 2 5 M のリジン及び 0 . 1 % のポリソルベートを含む静脈内安定化溶液 I V S S を添加した場合と添加しなかった場合の E G F R v I I I x C D 3 二重特異性抗体構築物の回収を調べた初期の研究は、同じ調製プロトコールの下で、I V S S の存在下で生理食塩水に希釈したタンパク質由来のシグナルは、I V S S の非存在下で生理食塩水に希釈したタンパク質由来のシグナルよりも実質的に高かった。4 % ( v / v ) の単一 I V S S 濃度をこの試験に利用した。

#### 【 0 3 8 1 】

シグナルの相違を理解するために、小規模の試験を設計し、記録したシグナルとして、2 1 5 n m の吸光度を用いて C 8 カラムからの溶出時に記録したタンパク質ピーク面積を比較した。以下のプロトコールでは、実行した実験について簡単に記載する。0 %、1 %、2 %、4 %、6 %、8 %、または 1 0 % ( v / v ) I V S S とともに 0 . 9 % 生理食塩水を希釈剤として用いて、2 m g / m L の濃度を有する E G F R v I I I x C D 3 二重特異性抗体構築物のストックをエッペンドルフチューブ中で連続的に 2 0 0 0 倍まで希釈して 1 µ g / m L までとした。希釈は、以下の希釈スキームを用いて同じストック E G F R v I I I x C D 3 二重特異性抗体構築物アリコートで行った : 1 : 1 0 1 : 1 0 1 : 1 0 1 : 2。1 µ g / m L の設定濃度を有する各 5 0 µ L の E G F R v I I I x C D 3 二重特異性抗体構築物試料を C 8 カラムに負荷し、逆相クロマトグラフィーを用いて溶出

した。215 nmの吸光度を用いてクロマトグラムを記録した。比較のために各試料についてピーク高さ及び面積を記録した。生成した生データを以下の図7Aに示す。各EGFR $\nu$ IIIXCD3二重特異性抗体構築物試料のピーク面積を、以下の図2の希釈溶液に含まれる%IVSSの関数としてプロットする。

#### 【0382】

図7Bから、生理食塩水希釈剤への1%(v/v)IVSSの添加は、EGFR $\nu$ IIIXCD3二重特異性抗体構築物の回収率に有意な影響を与え、EGFR $\nu$ IIIXCD3二重特異性抗体構築物回収率をおよそ250%増加させることが明らかである。4%~10%(v/v)のIVSSを生理食塩水希釈剤に添加すると、溶出ピークの高さ及び面積により評価するEGFR $\nu$ IIIXCD3二重特異性抗体構築物の回収率は一定であり、このことは、4%(v/v)IVSSで分子の完全回収が得られたことを示している。

#### 【0383】

EGFR $\nu$ IIIXCD3二重特異性抗体構築物の試料はすべて、同一条件下で調製及び分析を行い、生理食塩水希釈剤中の%IVSSは、唯一、試料間で異なっていたが、カラムに充填したタンパク質の量は、おそらく、分子が処理中に接触した表面への吸着を介してのタンパク質の損失の結果として、0%IVSS、1~2%IVSS、及び4~10%IVSS試料の間で様々に異なっていたと結論づけるのが合理的である。逆に、IVSS溶液の存在下でのEGFR $\nu$ IIIXCD3二重特異性抗体構築物の回収率の増加は、おそらく、処理中のEGFR $\nu$ IIIXCD3二重特異性抗体構築物表面吸着の阻止の結果である。この理解を様々な薬物製品の投与工程で用いて、活性薬物製品の正確な送達を保証することができる。

#### 【0384】

(表5) 配列の表

1.	CD19 VL CDR1	合成	アミノ酸	KASQSVDDYDGDSYLN
2.	CD19 VL CDR2	合成	アミノ酸	DASNLVS
3.	CD19 VL CDR3	合成	アミノ酸	QQSTEDPWT
4.	CD19 VH CDR1	合成	アミノ酸	SYWMN
5.	CD19 VH CDR2	合成	アミノ酸	QIWPGDGDTNYNGKFKG
6.	CD19 VH CDR3	合成	アミノ酸	RETTTVGRYYYAMDY
7.	CD19 VL	合成	アミノ酸	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWY QQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHP VEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIK
8.	CD19 VH	合成	アミノ酸	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVK QRPQGGLIEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKATLTAEDESS STAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWG QGTTTVVSS
9.	CD3 VH CDR1	合成	アミノ酸	RYTMH

10

20

30

40

50



10.	CD3 VH CDR2	合成	アミノ酸	YINPSRGYTNYNQKFKD
11.	CD3 VH CDR3	合成	アミノ酸	YYDDHYCLDY
12.	CD3 VL CDR1	合成	アミノ酸	RASSSVSYMN
13.	CD3 VL CDR2	合成	アミノ酸	DTSKVAS
14.	CD3 VL CDR3	合成	アミノ酸	QQWSSNPLT
15.	CD3 VH	合成	アミノ酸	DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVK QRPQGGL EWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSS LTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
16.	CD3 VL	合成	アミノ酸	VDDIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQ QKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
17.	CD19xCD3 scFv リンカー及びhisタグ	合成	アミノ酸	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWY QQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGSGSGTDFTLNIHP VEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGGSGGGG SGGGGGSQVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSY WMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPGDGDTNNGKFKGK ATLTADESSSTAYMQLSSLAASEDSAVYFCARRETTTVGRYY YAMDYWGQGTTVTVSSGGGGSDIKLQQSGAELARPGAS VKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSR GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSVEGGSGSGSGSGGS GGVDDIQLTQSPAIMASAPGEKVTMTCRASSSVSYMNW YQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFGSGSGTSYSLTIS SMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKHHHHHH
18.	CDR-L1 I2C	合成	アミノ酸	GSSTGAVTSGNYPN
19.	CDR-L2 I2C	合成	アミノ酸	GTKFLAP
20.	CDR-L3 I2C	合成	アミノ酸	VLWYSNRWV
21.	CDR-H1 I2C	合成	アミノ酸	KYAMN
22.	CDR-H2 I2C	合成	アミノ酸	RIRSKYNNYATYYADSVKD
23.	CDR-H3 I2C	合成	アミノ酸	HGNFGNSYISYWAY
24.	VH I2C	合成	アミノ酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTTLTVSS
25.	VL I2C	合成	アミノ酸	QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALT SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
26.	VH-VL I2C	合成	アミノ酸	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGNFGNSYISYW AYWGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQA PRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
27.	CD33 ccVH E11	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWV KQAPGQCLEWMGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTD TSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFD YWQGTSVTVSS

10

20

30

40

28.	CD33 VH E11	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWW KQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTD TSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFD YWGGQTSVTVSS
29.	CD33 HCDR1 E11	合成	アミノ酸	NYGMN
30.	CD33 HCDR2 E11	合成	アミノ酸	WINTYTGEPTYADKFQG
31.	CD33 HCDR3 E11	合成	アミノ酸	WSWSDGYVYFDY
32.	CD33 CC VL E11	合成	アミノ酸	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSA WYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFT LTIDSPQPEDSATYYCQQAHPITFGCGTRLEIK
33.	CD33 VL E11	合成	アミノ酸	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSA WYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFT LTIDSPQPEDSATYYCQQAHPITFGCGTRLEIK
34.	CD33 LCDR1 E11	合成	アミノ酸	KSSQSVLDSSTNKNLSA
35.	CD33 LCDR2 E11	合成	アミノ酸	WASTRES
36.	CD33 LCDR3 E11	合成	アミノ酸	QQAHPIT
37.	CD33 HL CC E11	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWW KQAPGQCLEWMGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTD TSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFD YWGGQTSVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPD SLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSAWYQQKPGQ PPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPED SATYYCQQAHPITFGCGTRLEIK
38.	CD33 HL E11	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWW KQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTD TSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFD YWGGQTSVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPD SLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSAWYQQKPGQ PPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPED SATYYCQQAHPITFGCGTRLEIK
39.	CD33 CC E11 HL x I2C HL 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWW KQAPGQCLEWMGWINTYTGEPTYADKFQGRVTMTTD TSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFD YWGGQTSVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPD SLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSAWYQQKPGQ PPKLLLSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPED SATYYCQQAHPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWVRQAPGKGL EWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGT TVSSGGGSGGGGSGGGGSGTQVTVTQEPSTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTK FLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLW YSNRWVFGGGTKLTVL

10

20

30

40

50

40.	CD33 E11 HL x I2C HL	合成	アミノ酸	MGWSCIIILFVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGESVK VSCKASGYTFTNYGMNWWKQAPGQGLEWMGWINTY TGEPTYADKFQGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLGGDDTA VYYCARWSWSDGYVYFDYWGGQTSVTVSSGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVL DSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLSWASTRESGIPDRF SGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYCQQAHPITFGQG TRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGG GGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYP NWWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLH HHHHH
41.	CD33 CC x I2C- scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSCKASGYTFTNYGMNWWK QAPGQCLEWMGWINTYTGPTYADKFQGRVTMTTDTST TSTAYMEIRNLGGDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYW GGQTSVTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLTV SLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLL LSWASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQPEDSATYYC QQAHPITFGCGTRLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFTFNKYAMNWWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG SGGGGSGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGA VTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSG SLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK LTVLGGGGDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP CEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GYPQSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKHTCPCP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42.	EGFRvIIIxCD3- scFc VH CDR1	合成	アミノ酸	NYGMH
43.	EGFRvIIIxCD3- scFc VH CDR2	合成	アミノ酸	VIWYDGSDKYYADSVRG
44.	EGFRvIIIxCD3- scFc VH CDR3	合成	アミノ酸	DGYDILTGNPRDFDY
45.	EGFRvIIIxCD3- scFc VL CDR1	合成	アミノ酸	RSSQSLVHSDGNTYLS
46.	EGFRvIIIxCD3- scFc VL CDR2	合成	アミノ酸	RISRRFS
47.	EGFRvIIIxCD3-	合成	アミノ酸	MQSTHVPRT

10

20

30

40

	scFc VL CDR3			
48.	EGFRvIII_CCxCD 3-scFc VH	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVR QAPGKCLEWVAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYWG QGTLTVTVSS
49.	EGFRvIII_CCxCD 3-scFc VL	合成	アミノ酸	DTVMTQTPLSSHVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLS WLQQRPGQPPRLLIYRISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEI SRVEAEDVGVYYCMQSTHVPRTFGCGTKVEIK
50.	EGFRvIII_CCxCD 3-scFc scFv	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVR QAPGKCLEWVAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYWG QGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMQTPLSSHVT LGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIY RISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCM QSTHVPRTFGCGTKVEIK
51.	EGFRvIII_CCxCD 3-scFc 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVR QAPGKCLEWVAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYWG QGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMQTPLSSHVT LGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIY RISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCM QSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRS KYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVTVSSGGGGG GGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VL
52.	EGFRvIII_CCxCD 3-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQSGRSLRLSCAASGFTFRNYGMHWVR QAPGKCLEWVAVIWDGSDKYYADSVRGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGYDILTGNPRDFDYWG QGTLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDTVMQTPLSSHVT LGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQQRPGQPPRLLIY RISRRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLEISRVEAEDVGVYYCM QSTHVPRTFGCGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRS KYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLTVTVSSGGGGG GGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC EEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV

10

20

30

40

				YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
53.	MSLN_5 VH CDR1	合成	アミノ酸	DYYMT
54.	MSLN_5 VH CDR2	合成	アミノ酸	YISSSGSTIYYADSVKG
55.	MSLN_5 VH CDR3	合成	アミノ酸	DRNSHFDY
56.	MSLN_5 VL CDR1	合成	アミノ酸	RASQGINTWLA
57.	MSLN_5 VL CDR2	合成	アミノ酸	GASGLQS
58.	MSLN_5 VL CDR3	合成	アミノ酸	QQAQSFPR
59.	MSLN_5 VH	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIR QAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNS LFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFDYWGGGTLTV SS
60.	MSLN_5 VL	合成	アミノ酸	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGINTWLAWYQ QKPGKAPKLLIYGASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPEDFATYYCQQAQSFPRTFGGGTKVEIK
61.	MSLN_5 scFv	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIR QAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNS LFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFDYWGGGTLTV SSGGGGSGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGINTWLAWYQKPGKAPKLLIYGASGLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAQSFPRTF GGGTKVEIK
62.	MSLN_5x12C0 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIR QAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNS LFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFDYWGGGTLTV SSGGGGSGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGINTWLAWYQKPGKAPKLLIYGASGLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAQSFPRTF GGGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTAVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSG NYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLG GKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VL
63.	MSLN_5xCD3- scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIR QAPGKGLEWLSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNKNS LFLQMNSLRAEDTAVYYCARDNRNSHFDYWGGGTLTV SSGGGGSGGGGGGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVT ITCRASQGINTWLAWYQKPGKAPKLLIYGASGLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAQSFPRTF GGGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC

10

20

30

40

50

				VRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSG NYPNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGDKHTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PCEEQYGSTYRCVSVTLVLHQQDWLNGKEYCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKT HTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVTLVLHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
64.	MSLN_5_CCxCD 3-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMSWIR QAPGKCLEWFSYISSSGGIYYADSVKGRFTISRDNKNS LYLMNSLRAEDTAVYYCARDVGSFHDYWGQGLTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRTV ITCRASQDISRWLAWYQQKPGKAPKLLISAASRLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQAKSFPRTEGC GTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGK AALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLG GGGDKHTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCE EQYGSTYRCVSVTLVLHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHT CPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVTLVLHQQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65.	CDR-H1 CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	SYGMH
66.	CDR-H2 CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	FIWYEGSNKYAESVKD
67.	CDR-H3 CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	RAGIIGTIGYYYGMDV
68.	CDR-L1 CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	SGDRLGEKYTS
69.	CDR-L2 CDH19	合成	アミノ酸	QDTKRPS

10

20

30

40

50

	65254.007			
70.	CDR-L3 CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	QAWESSTVV
71.	VH CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAFIWIYEGSNKYAESVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDV WGQGTTVTVSS
72.	VL CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQR GQSPLLVIYQDTKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQA MDEADYYCQAWESSTVVFGGGTKLTVLS
73.	VH-VL CDH19 65254.007	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAFIWIYEGSNKYAESVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSYELTQPPSVS VSPGQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQD TKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WESSTVVFGGGTKLTVLS
74.	CDH19 65254.007 x I2C	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAFIWIYEGSNKYAESVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSYELTQPPSVS VSPGQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQD TKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WESSTVVFGGGTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLHHHHH
75.	CDH19 65254.007 x I2C -scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAFIWIYEGSNKYAESVKDRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDV WGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSP GQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQD TKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WESSTVVFGGGTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSG GGGSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLGGG

				WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
76.	CDH19 65254.007 x I2C -scFc <sub>del</sub> GK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVR QAPGKLEWVAFIWEYSNKKYAESVKDRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDVWG QGTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSP GQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQDTRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESS TVVFGGKTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGKTKLTVLGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYG STYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGSGGGSGGSDKHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
77.	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc VH	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVR QAPGKLEWVAFIWEYSNKKYAESVKDRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDVWG QGTTTVTVSS
78.	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc VL	合成	アミノ酸	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPG QSPLLVIYQDTRKPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMD EADYYCQAWESSTVVFGCGTKLTVL
79.	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc scFv	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVR QAPGKLEWVAFIWEYSNKKYAESVKDRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDVWG QGTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSP GQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQDTRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESS TVVFGCGTKLTVL
80.	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVR QAPGKLEWVAFIWEYSNKKYAESVKDRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDVWG QGTTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSSYELTQPPSVSVSP GQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQDTRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESS TVVFGCGTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL

10

20

30

40



				SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGS GGGGSQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
81.	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVR QAPGKCLEWVAFIWEYSNKKYAESVKDRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDVWG QGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSP GQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQDTRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESS TVVFGCGTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGS GGGGSQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYG STYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
82.	CDH19 65254.007_CC x I2C -scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTSSYGMHWVR QAPGKCLEWVAFIWEYSNKKYAESVKDRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRAGIIGTIGYYYGMDVWG QGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVSP GQTASITCSGDRLEGEKYSWYQQRPGQSPLLVIYQDTRP SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWESS TVVFGCGTKLTVLSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGSGGGGS GGGGSQT VVTQEPLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNY PNWVQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGG GGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYG STYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGG

10

20

30

40

				PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNV GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
83.	FLT3_7 A8xCD3- scFc VH CDR1	合成	アミノ酸	NARMGV
84.	FLT3_7 A8xCD3- scFc VH CDR2	合成	アミノ酸	HIFSNDEKSYSTSLKN
85.	FLT3_7 A8xCD3- scFc VH CDR3	合成	アミノ酸	IVGYGSGWYGFDDY
86.	FLT3_7 A8xCD3- scFc VL CDR1	合成	アミノ酸	RASQGIRNDLG
87.	FLT3_7 A8xCD3- scFc VL CDR2	合成	アミノ酸	AATLQS
88.	FLT3_7 A8xCD3- scFc VL CDR3	合成	アミノ酸	LQHNSYPLT
89.	FLT3_7 A8xCD3- scFc VH	合成	アミノ酸	QVTLKESGPTLVKPTETLTCTLSGFSLNARMGVSWIR QPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGT LTVSS
90.	FLT3_7 A8-scFc VL	合成	アミノ酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQK PGKAPKRLIYAATLQSGVPSRFGSGSGTEFTLTISLQPE DFATYYCLQHNSYPLTFGCGTKVEIK
91.	FLT3_7 A8xCD3- scFv	合成	アミノ酸	QVTLKESGPTLVKPTETLTCTLSGFSLNARMGVSWIR QPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAATLQSGV PSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGC GTKVEIK
92.	FLT3_7 A8xCD3 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVTLKESGPTLVKPTETLTCTLSGFSLNARMGVSWIR QPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAATLQSGV PSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGC GTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGQ TVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
93.	FLT3_7 A8xCD3- scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVTLKESGPTLVKPTETLTCTLSGFSLNARMGVSWIR QPPGKCLEWLAHIFSNDEKSYSTSLKNRLTISKDSSKTQVV LTMTNVPVDTATYYCARIVGYGSGWYGFDDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAATLQSGV PSRFGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGC GTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF

10

20

30

40

50

				TFNKYAMNWWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCK KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSPGK
94.	VH CDR1 DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	SYIWS
95.	VH CDR2 DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	YVYSGTTNYPNPSLKS
96.	VH CDR3 DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	IAVTGFYFDY
97.	VL CDR1 DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	RASQRVNNNYLA
98.	VL CDR2 DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	GASSRAT
99.	VL CDR3 DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	QQYDRSPLT
100.	VH DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP PGKCLEWIGYVYSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASIATVGFYFDYWGQGLTVTVSS
101.	VL DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	EIVLTQSPGTLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQR PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIK
102.	DLL3_1_CC_delG K	合成	アミノ酸	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP PGKCLEWIGYVYSGTTNYPNPSLKSRTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASIATVGFYFDYWGQGLTVTVSSG GGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVTLSCRASQ RVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGDFTLTISRLEPEFAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIK
103.	DLL3_1_CCxCD3	合成	アミノ酸	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP

10

20

30

40

50

	_delGK 二重特異性 分子			PGKCLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASIATGTFYFDYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVTLSCRASQ RVNNNNYLAWYQQRPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYDRSPLTFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQA PRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
104.	DLL3_1_CCxCD3- scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQP PGKCLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYYCASIATGTFYFDYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVTLSCRASQ RVNNNNYLAWYQQRPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGS GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYDRSPLTFGCGTKLEIK SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFT ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISY WAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGTQVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWWQKPGQA PRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHTCPPCP APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105.	VH CDR1 CD19 97-G1RE-C2	合成	アミノ酸	SYGMH
106.	VH CDR2 CD19 97-G1RE-C2	合成	アミノ酸	VISYEGSNKYAESVKG
107.	VH CDR3 CD19 97-G1RE-C2	合成	アミノ酸	DRGTIFGNYGLEV
108.	VH CD19 97- G1RE-C2 CC	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKCLEWVAVISYEGSNKYAESVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRDEDTAVYYCARDRTGTFGNYGLEVWGQGT TVTVSS
109.	VL CDR1 CD19 97-G1RE-C2	合成	アミノ酸	RSSQSLHKNFNYLD
110.	VL CDR2 CD19 97-G1RE-C2	合成	アミノ酸	LGSNRAS
111.	VL CDR3 CD19	合成	アミノ酸	MQALQTPFT

10

20

30

40

50

40

	G8A 6-B12			
119.	VL CDR2 CDH3 G8A 6-B12	合成	アミノ酸	WASTRES
120.	VL CDR3 CDH3 G8A 6-B12	合成	アミノ酸	QQYYSYPYT
121.	VH CDH3 G8A 6- B12	合成	アミノ酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQA PGKGLEWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQ GTLTVTVSS
122.	VL CDH3 G8A 6- B12	合成	アミノ酸	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLYSSNQKNYFA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTL TISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGQGTKLEIK
123.	CDH3 G8A 6-B12 scFv	合成	アミノ酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQA PGKGLEWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQ GTLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLYSSNQKNYFAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ QYYSYPYTFGQGTKLEIK
124.	CDH3 G8A 6-B12 x I2C0 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQA PGKGLEWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQ GTLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLYSSNQKNYFAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ QYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VL
125.	CDH3 G8A 6-B12 x I2C0 二重特異性 分子 HLE	合成	アミノ酸	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYPINWVRQA PGKGLEWVGVIWTGGGTNYASSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSRGVYDFDGRGAMDYWGQ GTLTVTVSSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSLYSSNQKNYFAWYQQKPGQPPKLLIY WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQ QYYSYPYTFGQGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPG GSLKLSAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS KYNNAATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED TAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVTVSSGGGGS GGGGSGGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSL LGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLT VLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC EEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGG

10

20

30

40

				GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCP PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNATKPKCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
126.	BCMA A7 27-C4- G7 CDR1 VH	合成	アミノ酸	NHIIH
127.	BCMA A7 27-C4- G7 CDR2 VH	合成	アミノ酸	YINPYPGYHAYNEKFQG
128.	BCMA A7 27-C4- G7 CDR3 VH	合成	アミノ酸	DGYRDTDVLDY
129.	BCMA A7 27-C4- G7 CDR1 VL	合成	アミノ酸	QASQDISNYLN
130.	BCMA A7 27-C4- G7 CDR2 VL	合成	アミノ酸	YTSRLHT
131.	BCMA A7 27-C4- G7 CDR3 VL	合成	アミノ酸	QQGNTLPWT
132.	BCMA A7 27-C4- G7 CC (44/100) VH	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNHHHWVRQ APGQCLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDATVYYCARDGYRDTDVLDYWGQGT LVTVSS
133.	BCMA A7 27-C4- G7 CC (44/100) VL	合成	アミノ酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQK PGKAPKLLIYTSRLHTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPE DIATYYCQQGNTLPWTFGCGTKLEIK
134.	BCMA A7 27-C4- G7 CC (44/100) scFv	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNHHHWVRQ APGQCLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDATVYYCARDGYRDTDVLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLHTGV PSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG CGTKLEIK
135.	BCMA A7 27-C4- G7 CC (44/100) x I2C0 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNHHHWVRQ APGQCLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDATVYYCARDGYRDTDVLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLHTGV PSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG CGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASG FTFNKYAMNWVRQAPGKGLVVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDATVYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQ QKPGQAPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTSG VQPEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
136.	BCMA A7 27-C4- G7 CC (44/100) x I2C0-scFc 二重特異性 分子HLE	合成	アミノ酸	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTNHHHWVRQ APGQCLEWMGYINPYPGYHAYNEKFQGRATMTSDTSTS TVYMELSSLRSEDATVYYCARDGYRDTDVLDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYTSRLHTGV PSRFSGSGSGTDFTFTISSLEPEDIATYYCQQGNTLPWTFG

10

20

30

40

50

				CGTKVEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYA DSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTS GVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRC VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGG GGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
137.	PM 76-B10.17 CC VH CDR1	合成	アミノ酸	DYYMY
138.	PM 76-B10.17 CC VH CDR2	合成	アミノ酸	IISDAGYYTYYSDIK
139.	PM 76-B10.17 CC VH CDR3	合成	アミノ酸	GFPLLRHGAMDY
140.	PM 76-B10.17 CC VL CDR1	合成	アミノ酸	KASQNV DANVA
141.	PM 76-B10.17 CC VL CDR2	合成	アミノ酸	SASYVYW
142.	PM 76-B10.17 CC VL CDR3	合成	アミノ酸	QQYDQQLIT
143.	PM 76-B10.17 CC VH	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLTVT VSS
144.	PM 76-B10.17 CC VL	合成	アミノ酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNV DANVAWYQQ KPGQAPKSLIYSASYVYWDVPSRFGSASGTDFLTISVQ SEDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK
145.	PM 76-B10.17 CC scFv	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLTVT VSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFGSASGTDFLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIK
146.	PM 76-B10.17 CC x I2C0	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL

10

20

30

40

50



	二重特異性 分子			QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTTLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGTTLVTSSGGGSGGGGSGGGGSGQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
147.	PM 76-B10.17 CC x I2C0-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYSDIIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTTLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGTTLVTSSGGGSGGGGSGGGGSGQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSGGGG SGGGSGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYK KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
148.	PM 76-B10.17 CC x I2C0- scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYSDIIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTTLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGTTLVTSSGGGSGGGGSGGGGSGQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS

10

20

30

40

				VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGG GGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
149.	PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYYSDIIGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYASVYVDVP SRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
150.	PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYYSDIIGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYASVYVDVP SRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRGLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSG GGGGSGGGSGGGSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCK VSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
151.	PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDAGYYTYYSDIIGRFTISRDNKNSLYL

10

20

30

40

50

	(103/43)- scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子			QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGLTVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCKASQNV DANVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRLIGGTGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGSGGGGSGGGGSGG GGGSGGGGSGGGGSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGYSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
152.	PM 76-B10.11 CC VH CDR1	合成	アミノ酸	DYYMY
153.	PM 76-B10.11 CC VH CDR2	合成	アミノ酸	IISDGGYYTYYSDIK
154.	PM 76-B10.11 CC VH CDR3	合成	アミノ酸	GFLLRHGAMDY
155.	PM 76-B10.11 CC VL CDR1	合成	アミノ酸	KASQNVDTNVA
156.	PM 76-B10.11 CC VL CDR2	合成	アミノ酸	SASYVYW
157.	PM 76-B10.11 CC VL CDR3	合成	アミノ酸	QYDQQLIT
158.	PM 76-B10.11 CC VH	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGLTVT VSS
159.	PM 76-B10.11 CC VL	合成	アミノ酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQNVDTNVAWYQQ KPGQAPKSLIYSASYVYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQ SEDFATYYCQYDQQLITFGGGTKLEIK
160.	PM 76-B10.11 CC scFv	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFLLRHGAMDYWGQGLTVT VSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP

10

20

30

40

50

				SRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGG GTKLEIK
161.	PM 76-B10.11 CC x I2C0 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGG GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLT TVVTQEPLSLTVSPGGTVTLT KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFVGGGKTLTVL
162.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGG GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLT TVVTQEPLSLTVSPGGTVTLT KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFVGGGKTLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPCPEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNATKPCPEEQYGSTYRCVSLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
163.	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGG GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLT TVVTQEPLSLTVSPGGTVTLT KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFVGGGKTLTVLGGGGDKTHT

10

20

30

40

				KPGQAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV SCSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGSGGGSGGGSDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNNHYTQKSL LSPGK	10
164.	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYSDIIKGRFTISRDNANKSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQYDQQLITFGG GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQT VVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL	20
165.	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYSDIIKGRFTISRDNANKSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQYDQQLITFGG GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGQT VVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSG GGGGSGGGSGGGSDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG	30 40

				SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
166.	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)- scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKGLEWVAIISDGGYYTYYSDIIGKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGG GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGTTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRLIGGTKFLAPGTPARFSGSLGKKAALTLSGVQ PEDEAEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKHTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVSMHEALHNHYTQKSL LSPGK
167.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc VH CDR1	合成	アミノ酸	DYYMY
168.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc VH CDR2	合成	アミノ酸	IISDGGYYTYYSDIIGK
169.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc VH CDR3	合成	アミノ酸	GFPLLRHGAMDY
170.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc VL CDR1	合成	アミノ酸	KASQNVDTNVA
171.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc VL CDR2	合成	アミノ酸	SASYVYW
172.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc VL CDR3	合成	アミノ酸	QQYDQQLIT
173.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc VH	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDGGYYTYYSDIIGKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGTTLVT VSS
174.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc	合成	アミノ酸	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQ KPGQAPKSLIYSASYVYWDVPSRFSGSASGTDFTLTISVQ

10

20

30

40

50

	VL			SEDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIK
175.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc scFv	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDGGYYTYYSDIIGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIK
176.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDGGYYTYYSDIIGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLT TVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
177.	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDGGYYTYYSDIIGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLT TVSSGGGGSGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGSGGGGSDKHTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
178.	PM 76-B10.11 CC x I2C0- scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDGGYYTYYSDIIGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLT VSSGGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP

10

20

30

40

				SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ TVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSQ GGGSGGGGSGGGGSDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPGK
179.	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc 二重特異性 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDGGYYTYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
180.	PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKPGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAIISDGGYYTYSDIIKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLTVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQ VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

10

20

30

40

50



				CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
181.	PM 76-B10.11 CC x 12C0 CC (103/43)- scFc_delGK 二重特異性 HLE 分子	合成	アミノ酸	QVQLVESGGGLVKGESLRLSCAASGFTFSDYYMYWVRQ APGKCLEWVAISDGGYYTYSDIIKGRFTISRDNKNSLYL QMNSLKAEDTAVYYCARGFP LLRHGAMDYWGQGT LVT VSSGGGSGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV TI TCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPKSLIYSASYVYWDVP SRFSGSASGTDFTLTISVQSEDFATYYCQYDQQLITFGC GTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF TFNKYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNF GNSYISYWAYCGQGT LTVSSGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQCPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQ PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGS GGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSL LSPGK

10

20

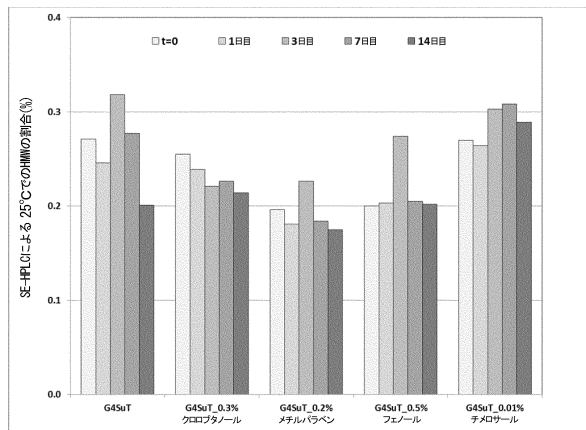
30

40

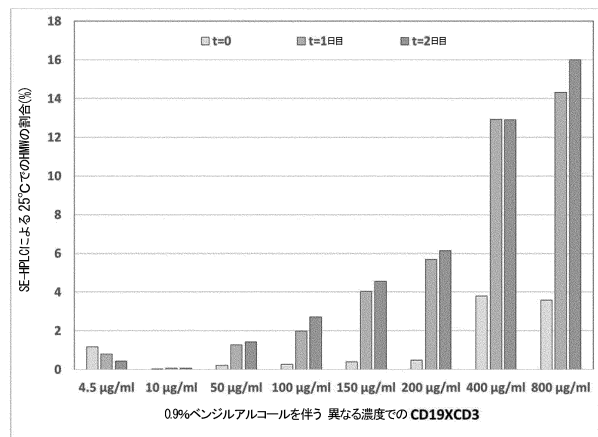
50

【図面】

【図 1】

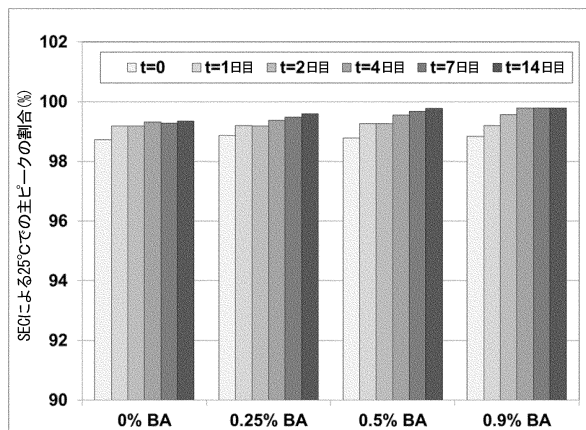


【図 2】

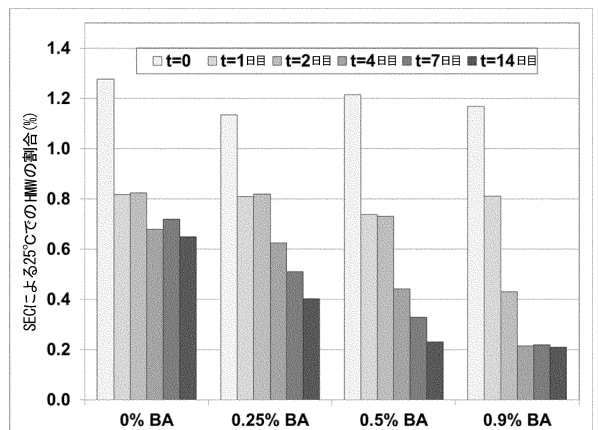


10

【図 3 A】



【図 3 B】



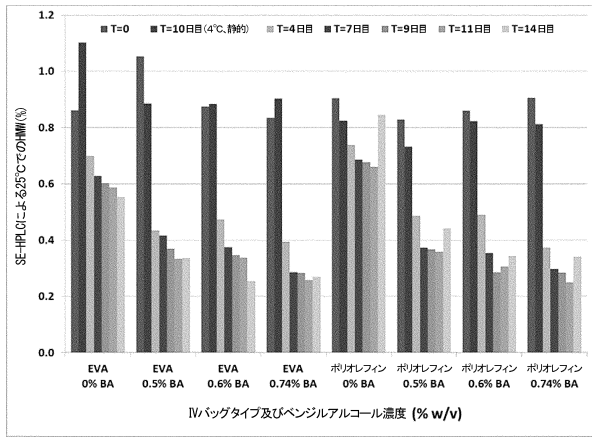
20

30

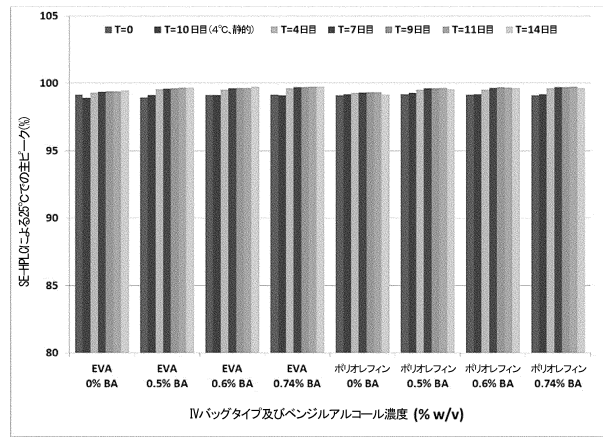
40

50

【図 3 C】

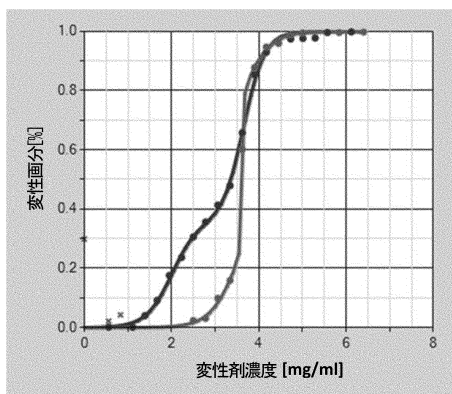


【図 3 D】

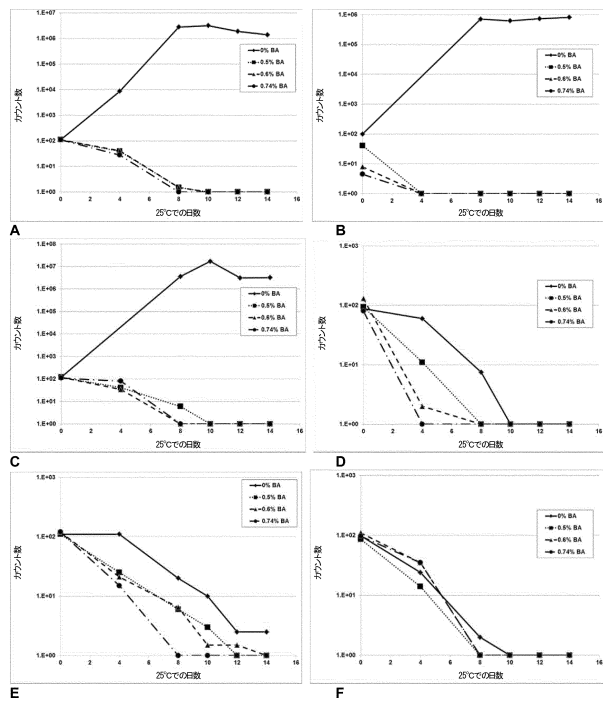


10

【図 4】

G4Su  
G4Su + BA

【図 5】



20

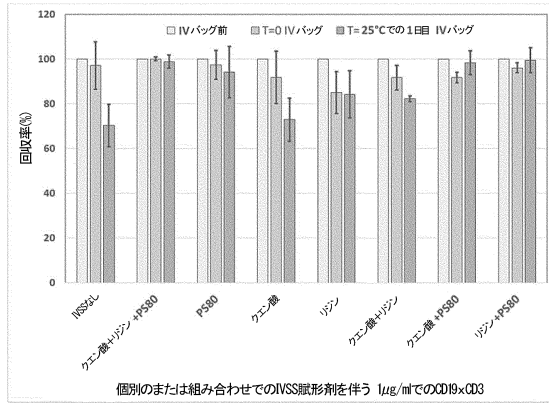
30

40

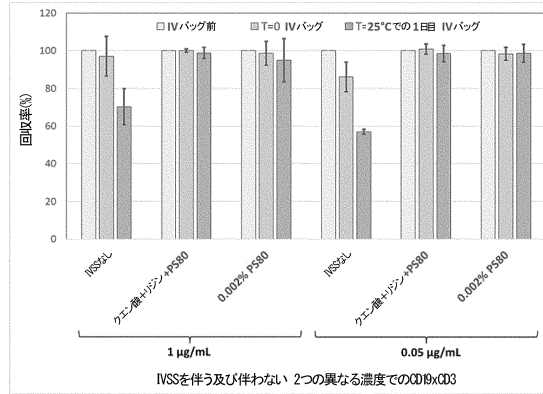
50



【図 8 B】

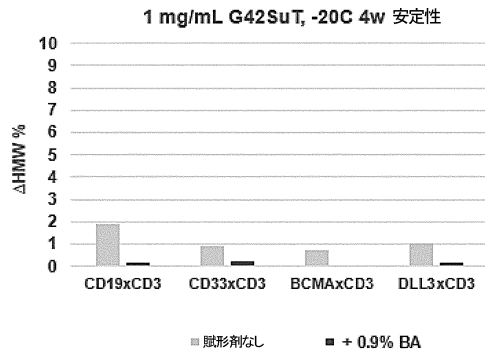


【図 8 C】

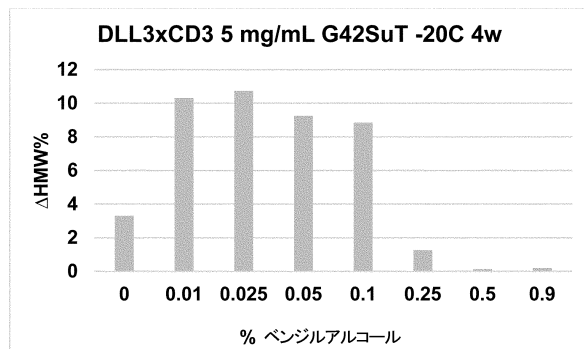


10

【図 9】



【図 10】



20

【配列表】

0007325936000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

A 6 1 K	47/02	(2006.01)	A 6 1 K	47/02
A 6 1 K	47/18	(2017.01)	A 6 1 K	47/18
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00

(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 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 アベル ジェフ

アメリカ合衆国 9 3 0 6 5 カリフォルニア州 シミ バレー ウィロウ グレン サークル 4 0 2

(72)発明者 チャン ジュン

アメリカ合衆国 9 1 3 2 0 カリフォルニア州 ニューベリー パーク ヴィア マグノリア 8 8

(72)発明者 シュナイダー マイケル

アメリカ合衆国 9 1 3 6 0 カリフォルニア州 サウザンド オークス ラケット クラブ レーン 6 1 7

(72)発明者 ジャガナサン パラドウェイ

アメリカ合衆国 9 1 3 2 0 カリフォルニア州 サウザンド オークス アマレル ストリート 1 6 6 3

(72)発明者 トロイハイト マイク

アメリカ合衆国 9 1 3 2 0 カリフォルニア州 ニューベリー パーク パメラ ウッド ストリート  
8 0 7

(72)発明者 キュイ リンウェン

アメリカ合衆国 9 1 3 6 0 カリフォルニア州 サウザンド オークス ホデンキャンプ ロード 3 5 9

(72)発明者 セスラマン アナンサクリシュナン

アメリカ合衆国 1 8 9 2 9 ペンシルベニア州 ジャミソン ウィン ウェイ 2 1 0 7

(72)発明者 カナブラム セクハー

アメリカ合衆国 9 1 3 2 0 カリフォルニア州 サウザンド オークス ヴィア ボニータ 5 6 7 6

(72)発明者 マコーリー アーノルド

アメリカ合衆国 9 1 3 2 0 カリフォルニア州 ムーアパーク ラファイエット ストリート 6 9 3 1

(72)発明者 ゴスワミ デヴリシ

アメリカ合衆国 9 1 3 2 0 カリフォルニア州 ニューベリー パーク ヴィア マグノリア 8 8

(72)発明者 フフ ジュン

アメリカ合衆国 9 0 2 3 0 カリフォルニア州 カルバー シティ ベリーマン アベニュー 4 5 1 5

審査官 大島 彰公

(56)参考文献 特表 2 0 1 1 - 5 0 4 9 3 3 ( J P , A )

特表 2 0 1 3 - 5 2 7 1 8 9 ( J P , A )

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K、A 6 1 P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

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