

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-504578

(P2017-504578A)

(43) 公表日 平成29年2月9日(2017.2.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B064
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C076
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4C084
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-536401 (P2016-536401)
 (86) (22) 出願日 平成26年8月20日 (2014. 8. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年4月18日 (2016. 4. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/051793
 (87) 国際公開番号 W02015/026894
 (87) 国際公開日 平成27年2月26日 (2015. 2. 26)
 (31) 優先権主張番号 13198859. 4
 (32) 優先日 平成25年12月20日 (2013. 12. 20)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 61/907, 691
 (32) 優先日 平成25年11月22日 (2013. 11. 22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/869, 528
 (32) 優先日 平成25年8月23日 (2013. 8. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504438727
 マクロジェニクス, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 20850 メリーランド州、ロックヴィル、メディカル センター ドライブ 9704
 (74) 代理人 100123858
 弁理士 磯田 志郎
 (72) 発明者 ムーア ポール エー.
 アメリカ合衆国 メリーランド州 20878, ペセスダ, オールド ゲート ロード 7013

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 gpA33及びCD3に結合二重特異性1価ダイアボディ、並びにその使用

(57) 【要約】

本発明は、2本のポリペプチド鎖を含み、少なくともgpA33のエピトープに特異的な1つの結合部位とCD3のエピトープに特異的な1つの結合部位を保有する二重特異性1価ダイアボディ（すなわち、「gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ」）を対象とする。また、本発明は、免疫グロブリンFcドメインを含む二重特異性の1価のダイアボディ（「二重特異性の1価のFcダイアボディ」）であって、3つのポリペプチド鎖から構成され、かつ少なくともgpA33のエピトープに特異的な1つの結合部位とCD3のエピトープに特異的な1つの結合部位を保有するダイアボディ（すなわち、「gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ」）も対象とする。本発明の二重特異性1価ダイアボディ及び二重特異性1価FcダイアボディはgpA33及びCD3に同時に結合できる。本発明は、上記二重特異性1価ダイアボディまたは上記二重特異性1価Fcダイアボディを含有する医薬組成物を対象とする。本発明はさらに、癌及び他の疾患及び状態の治療における上記二重特異性抗体を使用する方法に関する。

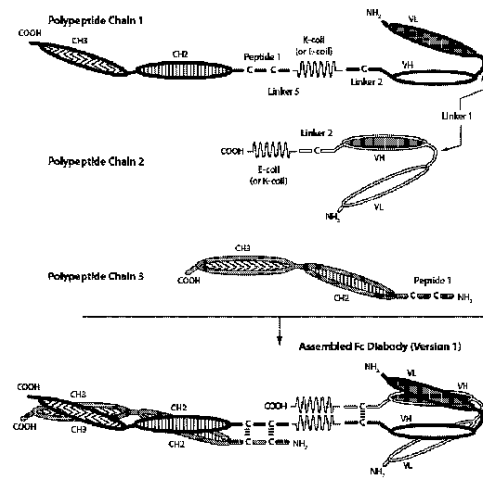


Figure 2A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

g p A 3 3 のエピトープ及び C D 3 のエピトープに特異的に結合できる、二重特異性 1 価ダイアボディであって、前記二重特異性 1 価ダイアボディは、互いに共有結合した第 1 のポリペプチド鎖及び第 2 のポリペプチド鎖を含み、

A . 第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端の方向に、

i . ドメイン 1 であって、C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン (V L_{CD3}) (配列番号 5) を含むサブドメイン (1 A)、及び g p A 3 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン (V H_{gpA33}) (配列番号 2 7) を含むサブドメイン (1 B) を含み、前記サブドメイン (1 A) 及び (1 B) はペプチドリンカー (配列番号 1) によって互いから分離されている、ドメイン 1 と、

i i . ドメイン 2 であって、前記ドメイン 2 は K コイルドメイン (配列番号 4) 又は E コイルドメイン (配列番号 3) であり、また前記ドメイン 2 はペプチドリンカー (配列番号 2) によって前記ドメイン 1 から分離されている、ドメイン 2 と
を含み、

B . 第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端の方向に、

i . ドメイン 1 であって、g p A 3 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン (V L_{gpA33}) (配列番号 2 6) を含むサブドメイン (1 A)、及び C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン (V H_{CD3}) (配列番号 2 5) を含むサブドメイン (1 B) を含み、前記サブドメイン (1 A) 及び (1 B) はペプチドリンカー (配列番号 1) によって互いから分離されている、ドメイン 1 と、

i i . ドメイン 2 であって、前記ドメイン 2 は E コイルドメイン (配列番号 3) 又は K コイルドメイン (配列番号 4) であり、また前記ドメイン 2 はペプチドリンカー (配列番号 2) によって前記ドメイン 1 から分離されており、かつ前記第 1 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 及び前記第 2 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 は、両方が E コイルドメインではなく、又は両方が K コイルドメインではない、ドメイン 2 と
を含み、

(a) 前記第 1 のポリペプチド鎖の前記 V L ドメイン及び前記第 2 のポリペプチド鎖の前記 V H ドメインは、C D 3 のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成し、

(b) 前記第 2 のポリペプチド鎖の前記 V L ドメイン及び前記第 1 のポリペプチド鎖の前記 V H ドメインは、g p A 3 3 のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成する、ダイアボディ。

【請求項 2】

前記第 1 のポリペプチド鎖は、アルブミン結合ドメイン (配列番号 3 4) を含み、前記アルブミン結合ドメインが、前記ドメイン 2 の C 末端に配置され、リンカー 3 (配列番号 3 2) によって前記ドメイン 2 から分離されている、請求項 1 に記載のダイアボディ。

【請求項 3】

g p A 3 3 のエピトープ及び C D 3 のエピトープに特異的に結合でき、I g G の F c ドメインを保有する、二重特異性 1 価 F c ダイアボディに関し、前記二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、第 1 のポリペプチド鎖、第 2 のポリペプチド鎖及び第 3 のポリペプチド鎖を含み、前記第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、前記第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、

A . 第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端の方向に、

i . ドメイン 1 であって、g p A 3 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン (V L_{gpA33}) (配列番号 2 6) を含むサブドメイン (1 A)、及び C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン (V H_{CD3}) (配列番号 2 5) を含むサブドメイン (1 B) を含み、前記サブドメイン (1 A) 及び (1 B) はペプチドリンカー (配列番号 1) によって互いから分離されている、ドメイン 1 と、

i i . ドメイン 2 であって、前記ドメイン 2 は E コイルドメイン (配列番号 3) 又は K

10

20

30

40

50

コイルドメイン（配列番号4）であり、また前記ドメイン2はペプチドリンカー（配列番号2）によって前記ドメイン1から分離されている、ドメイン2と、

i i i . ドメイン3であって、システイン含有ペプチド（ペプチド1）（配列番号39）を含むサブドメイン（3A）、及びI g G免疫グロブリンF cドメインのC H 2ドメイン及びC H 3ドメインを有する、I g GのF cドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン（3B）を含み、前記ドメイン3及び前記ドメイン2はスパーサペプチド（リンカー5）（配列番号33）によって互いから分離されている、ドメイン3と
を含み、

B . 第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、

i . ドメイン1であって、C D 3に結合できるモノクローナル抗体のV Lドメイン（V L_{CD3}）（配列番号5）を含むサブドメイン（1A）、及びg p A 33に結合できるモノクローナル抗体のV Hドメイン（V H_{gpA33}）（配列番号27）を含むサブドメイン（1B）を含み、前記サブドメイン（1A）及び（1B）はペプチドリンカー（配列番号1）によって互いから分離されている、ドメイン1と、

i i . ドメイン2であって、前記ドメイン2はKコイルドメイン（配列番号4）又はEコイルドメイン（配列番号3）であり、また前記ドメイン2はペプチドリンカー（配列番号2）によって前記ドメイン1から分離されており、かつ前記第1のポリペプチド鎖の前記ドメイン2及び前記第2のポリペプチド鎖の前記ドメイン2は、両方がEコイルドメインではなく、又は両方がKコイルドメインではない、ドメイン2と
を含み、

C . 第3のポリペプチド鎖は、N末端からC末端方向へ向かって、ドメイン3を含み、ドメイン3は、

(1)システイン含有ペプチド（ペプチド1）（配列番号39）を含むサブドメイン（3A）、及び

(2)I g G免疫グロブリンF cドメインのC H 2ドメイン及びC H 3ドメインを有する、I g GのF cドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン（3B）を含み、
かつ、

(a)前記第1及び第3のポリペプチド鎖のI g GのF cドメインの前記ポリペプチド部分は、I g GのF cドメインを形成し、

(b)前記第1のポリペプチド鎖の前記V Lドメイン及び前記第2のポリペプチド鎖の前記V Hドメインは、C D 3のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成し、

(c)前記第2のポリペプチド鎖の前記V Lドメイン及び前記第1のポリペプチド鎖の前記V Hドメインは、g p A 33のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成する、ダイアボディ。

【請求項4】

g p A 33のエピトープ及びC D 3のエピトープに特異的に結合でき、I g GのF cドメインを保有する、二重特異性1価F cダイアボディに関し、前記二重特異性1価F cダイアボディは、第1のポリペプチド鎖、第2のポリペプチド鎖及び第3のポリペプチド鎖を含み、前記第1及び第2のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、前記第1及び第3のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、

A . 第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、

i . ドメイン3であって、システイン含有ペプチド（ペプチド1）（配列番号39）を含むサブドメイン（3A）、及びI g G免疫グロブリンF cドメインのC H 2ドメイン及びC H 3ドメインを有する、I g GのF cドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン（3B）を含む、ドメイン3と

i i . ドメイン1であって、g p A 33に結合できるモノクローナル抗体のV Lドメイン（V L_{gpA33}）（配列番号26）を含むサブドメイン（1A）、及びC D 3に結合できるモノクローナル抗体のV Hドメイン（V H_{CD3}）（配列番号25）を含むサブドメイン（1B）を含み、前記サブドメイン（1A）及び（1B）はペプチドリンカー（配列番号

10

20

30

40

50

1) によって互いから分離されており、前記ドメイン 1 及び前記ドメイン 3 はスパーサペプチド (リンカー 4) (配列番号 38) によって互いから分離されている、ドメイン 1 と

i i i . ドメイン 2 であって、前記ドメイン 2 は E コイルドメイン (配列番号 3) 又は K コイルドメイン (配列番号 4) であり、また前記ドメイン 2 はペプチドリンカー (配列番号 2) によって前記ドメイン 1 から分離されている、ドメイン 2 と、
を含み、

B . 第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端の方向に、

i . ドメイン 1 であって、C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン (V L_{CD3}) (配列番号 5) を含むサブドメイン (1 A)、及び g p A 3 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン (V H_{gpA33}) (配列番号 27) を含むサブドメイン (1 B) を含み、前記サブドメイン (1 A) 及び (1 B) はペプチドリンカー (配列番号 1) によって互いから分離されている、ドメイン 1 と、

i i . ドメイン 2 であって、前記ドメイン 2 は K コイルドメイン (配列番号 4) 又は E コイルドメイン (配列番号 3) であり、また前記ドメイン 2 はペプチドリンカー (配列番号 2) によって前記ドメイン 1 から分離されており、かつ前記第 1 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 及び前記第 2 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 は、両方が E コイルドメインではなく、又は両方が K コイルドメインではない、ドメイン 2 と
を含み、

C . 第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端方向へ向かって、ドメイン 3 を含み、ドメイン 3 は、

(1) システイン含有ペプチド (ペプチド 1) (配列番号 39) を含むサブドメイン (3 A)、及び

(2) I g G 免疫グロブリン F c ドメインの C H 2 ドメイン及び C H 3 ドメインを有する、I g G の F c ドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン (3 B) を含み、
かつ、

(a) 前記第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖の I g G の F c ドメインの前記ポリペプチド部分は、I g G の F c ドメインを形成し、

(b) 前記第 1 のポリペプチド鎖の前記 V L ドメイン及び前記第 2 のポリペプチド鎖の前記 V H ドメインは、C D 3 のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成し

(c) 前記第 2 のポリペプチド鎖の前記 V L ドメイン及び前記第 1 のポリペプチド鎖の前記 V H ドメインは、g p A 3 3 のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成する、ダイアボディ。

【請求項 5】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記サブドメイン (3 B) が、前記第 3 のポリペプチド鎖の前記サブドメイン (3 B) の配列とは異なる配列を含む、請求項 3 又は 4 に記載のダイアボディ。

【請求項 6】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記サブドメイン (3 B) が配列番号 40 のアミノ酸配列を有し、前記第 3 のポリペプチド鎖の前記サブドメイン (3 B) が配列番号 41 のアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載のダイアボディ。

【請求項 7】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記サブドメイン (3 B) が配列番号 41 のアミノ酸配列を有し、前記第 3 のポリペプチド鎖の前記サブドメイン (3 B) が配列番号 40 のアミノ酸配列を有する、請求項 5 に記載のダイアボディ。

【請求項 8】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 3 及び / 又は前記第 3 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 3 が、F c 受容体に対する結合の変化を示す改変体 C H 2 - C H 3 の配列を含む、請求項 3 又は 4 に記載のダイアボディ。

10

20

30

40

50

【請求項 9】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 が E コイルドメイン (配列番号 3) を含み、前記第 2 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 が K コイルドメイン (配列番号 4) を含む、請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載のダイアボディ。

【請求項 10】

前記第 1 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 が K コイルドメイン (配列番号 4) を含み、前記第 2 のポリペプチド鎖の前記ドメイン 2 が E コイルドメイン (配列番号 3) を含む、請求項 1 乃至 8 の何れか 1 項に記載のダイアボディ。

【請求項 11】

C D 3 のエピトープ及び g p A 3 3 のエピトープに特異的に結合できる二重特異性 1 価ダイアボディに関し、前記二重特異性 1 価ダイアボディは、

(1) 配列番号 28 のアミノ酸配列を有する第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 30 のアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチド鎖、又は

(2) 配列番号 35 のアミノ酸配列を有する第 1 のポリペプチド鎖、及び配列番号 30 のアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチド鎖

を含み、前記第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は、ジスルフィド結合によって互いに共有結合する、ダイアボディ。

【請求項 12】

C D 3 のエピトープ及び g p A 3 3 のエピトープに特異的に結合できる二重特異性 1 価 F c ダイアボディに関し、前記二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、

(1) 配列番号 42 のアミノ酸配列を有する第 1 のポリペプチド鎖、配列番号 44 のアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチド鎖、及び配列番号 46 のアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチド鎖、又は

(2) 配列番号 48 のアミノ酸配列を有する第 1 のポリペプチド鎖、配列番号 28 のアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチド鎖、及び配列番号 46 のアミノ酸配列を有する第 2 のポリペプチド鎖

を含み、前記第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は、第 1 のジスルフィド結合によって互いに共有結合し、前記第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖は、第 2 のジスルフィド結合によって互いに共有結合する、ダイアボディ。

【請求項 13】

請求項 1 乃至 12 の何れか 1 項に記載のダイアボディ及び生理学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物。

【請求項 14】

g p A 3 3 の発現を特徴とする癌の治療における、請求項 3 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 15】

前記癌は、大腸癌、結腸癌、胃癌又は膵臓癌である、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】

請求項 1 乃至 12 の何れか 1 項に記載のダイアボディの何れかのポリペプチド鎖を発現する細胞。

に関し、同様に、そのような発現したポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドに関する。

【請求項 17】

請求項 16 に記載のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド。

【請求項 18】

抗体又はポリペプチド部分又はそのフラグメントを発現する細胞に関し、抗体は g p A 3 3 と結合し、抗体又はポリペプチド部分又はそのフラグメントは、

(1) 抗ヒト g p A 3 3 抗体の軽鎖の C D R 1 (配列番号 14)、C D R 2 (配列番号 15) 及び C D R 3 (配列番号 16)、

(2) 抗ヒト g p A 3 3 抗体の重鎖の C D R 1 (配列番号 18)、C D R 2 (配列番号 1

10

20

30

40

50

9) 及び C D R 3 (配列番号 2 0)、又は
(3) (1) 及び (2) の両方
を含む、細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、米国特許出願第 6 1 / 8 6 9 , 5 2 8 号 (2 0 1 3 年 8 月 2 3 日出願 ; 係属
中)、米国特許出願第 6 1 / 9 0 7 , 6 9 1 号 (2 0 1 3 年 1 1 月 2 2 日出願 ; 係属中)
、並びに欧州特許出願第 1 3 1 9 8 8 5 9 号 (2 0 1 3 年 1 2 月 2 0 日出願) に対する優
先権を主張するものであり、上述の特許出願はそれぞれ、参照によりその全体が本出願に
援用される。

10

【0002】

[配列表の参照]

本出願は、連邦規則法典第 3 7 卷第 1 . 8 2 1 節以下による 1 つ又は複数の配列表を含
み、これらの配列表は、書類及びコンピュータ可読媒体の両方において開示されており、
上記書類及びコンピュータ可読型開示は、参照によりその全体が本出願に援用される。

【0003】

本発明は、2本のポリペプチド鎖を含み、g p A 3 3 のエピトープに特異的な 1 つの結合
部位と C D 3 のエピトープに特異的な 1 つの結合部位を保有する二重特異性 1 価ダイアボ
ディ (すなわち、「g p A 3 3 x C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ」) を対象とする。
また、本発明は、免疫グロブリン F c ドメインを含む二重特異性の 1 価のダイアボディ (「
二重特異性の 1 価の F c ダイアボディ」) であって、3つのポリペプチド鎖から構成さ
れ、かつ g p A 3 3 のエピトープに特異的な 1 つの結合部位と C D 3 のエピトープに特異
的な 1 つの結合部位を保有するダイアボディ (すなわち、「g p A 3 3 x C D 3 二重特異
性 1 価 F c ダイアボディ」) も対象とする。本発明の二重特異性 1 価ダイアボディ及び二
重特異性 1 価 F c ダイアボディは g p A 3 3 及び C D 3 に同時に結合できる。本発明は、
上記二重特異性 1 価ダイアボディまたは上記二重特異性 1 価 F c ダイアボディを含有する
医薬組成物を対象とする。本発明はさらに、癌及び他の疾患及び状態の治療における上記
二重特異性抗体を使用する方法に関する。

20

30

【背景技術】

【0004】

I . g p A 3 3

結腸直腸癌は、西欧諸国の最も一般的な悪性腫瘍であり、癌による死亡の主な原因であ
る (非特許文献 1)。大腸癌に対する潜在的に有用なターゲットは、43 k D の膜貫通糖
タンパク質 A 3 3 である (g p A 3 3) (非特許文献 2、3)。g p A 3 3 は、最初のヒ
ト膵臓癌由来細胞株 A S P C 1 に対するモノクローナルマウス抗体の培養を通じて発見さ
れた。ある抗体 (M A b A 3 3) は、43 k D a の表面細胞タンパク質と反応すること
が発見されたため、「g p A 3 3」と命名された (非特許文献 4)。

40

【0005】

g p A 3 3 は、接合部接着分子ファミリーの膜貫通タンパク質である (非特許文献 5 ~
7)。A 3 3 抗原の機能的意義はまだ解明されていないが、大腸炎の動物モデルにおいて
結腸粘膜修復を媒介することが示されており、全大腸癌の > 9 5 % で均一に発現される。
A 3 3 発現は、病期及び組織学的分化度の両方にわたって不変であり、この抗原は、血流
に検出可能に分泌または流れていない (非特許文献 7、8)。逆に、非胃腸 A 3 3 抗原発
現のわずかな数例が同定されている (非特許文献 9)。

【0006】

A 3 3 抗原の非常に限定された発現を踏まえ、研究者らは、抗体を用いた A 3 3 関連癌
の治療の可能性を探求してきた (非特許文献 8、10 ~ 19)。同様に、このような抗体

50

のフラグメントも、それらの潜在的な治療的役割のために評価されてきた（非特許文献 20）。

【0007】

II . CD3

CD3 は、4 つの別個の鎖で構成された T 細胞補助受容体である（非特許文献 21、22）。

【0008】

哺乳類において、この CD3 複合体は CD3 鎖、CD3 鎖及び 2 つの CD3 鎖を含有する。これらの鎖は、T 細胞受容体（TCR）として公知である分子と連動して、T リンパ球の活性化信号を生成する。CD3 が存在しない場合、TCR は適切に集合せず、劣化する（非特許文献 23）。CD3 は、全ての成熟 T 細胞の膜に結合し、実質的に他の細胞タイプには結合しないことが知られている（非特許文献 24、25、26）。

10

【0009】

III . 二重特異性ダイアボディ

完全な未修飾抗体（例えば IgG）の、抗原のエピトープに結合する能力は、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖上の可変ドメイン（即ちそれぞれ VL 及び VH ドメイン）の存在に左右される。ダイアボディの設計は、単鎖 Fv 構造（scFv）に基づく（例えば非特許文献 27、特許文献 1、2、非特許文献 28、29、特許文献 3、非特許文献 30～34 参照）。

【0010】

抗体軽鎖と抗体重鎖との相互作用、特にその VL ドメインと VH ドメインとの相互作用は、抗体のエピトープ結合部位のうちの 1 つを形成する。対照的に、scFv 構造は、単一ポリペプチド鎖が含有する抗体の VL 及び VH ドメインを備え、これらのドメインは、2 つのドメインの機能性エピトープ結合部位への自己集合を可能とするのに十分な長さのフレキシブルリンカーによって隔てられる。VL 及び VH ドメインの自己集合が、不十分な長さ（約 12 個未満のアミノ酸残基）のリンカーによって不可能となる場合、scFv 構造のうちの 2 つが互いに相互作用して、2 価分子を形成し、この 2 価分子において一方の鎖の VL が他方の鎖の VH と関連する（非特許文献 35 において概説されている）。

20

【0011】

天然の抗体は、1 つのエピトープ種のみと結合できる（即ち単一特異性）が、これらはその種の複数の複製に結合できる（即ち 2 価性又は多価性を呈する）。本技術分野は、2 つ以上の異なるエピトープ種と結合できる（即ち 2 価性又は多価性に加えて二重特異性又は多重特異性を呈することができる）という点でこのような天然抗体とは異なるダイアボディを産生できる可能性に注目している（例えば非特許文献 27、特許文献 1、2、非特許文献 28、29、特許文献 3、非特許文献 36、非特許文献 31～34 参照）。

30

【0012】

非単一特異性ダイアボディの提供は、異なるエピトープを発現する複数の細胞を共連結（co ligate）して共存させることができる能力という有意な利点を提供する。従って二価のダイアボディは、療法及び免疫診断を含む広範な用途を有する。二価性は、様々な用途におけるダイアボディの設計及び加工の大幅な柔軟性を可能とし、これにより、多量体抗原に対するアビディティーの上昇、異なる複数の抗原の架橋、及び両標的抗原の存在に基づく特定の細胞タイプに対する指向性標的化を提供する。当該技術分野において公知のダイアボディ分子は、（～50 kDa 以下の小さいサイズのダイアボディに関して）その高い結合価、低い解離率及び循環からの迅速な排除により、腫瘍撮像の分野での特定の使用も示している（非特許文献 37）。特に重要なのは、異なる細胞の共連結、例えば細胞毒性 T 細胞と腫瘍細胞との架橋である（非特許文献 38、非特許文献 39）。

40

【0013】

ダイアボディエピトープ結合ドメインは、CD3、CD16、CD32 又は CD64 等のいずれの免疫エフェクタ細胞の表面決定基も指向してよく、これらは T リンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞又は他の単核細胞上に発現する。多くの研究において、エフェ

50

クタ細胞決定基（例えばFc 受容体（Fc R））に対するダイアボディ結合は、エフェクタ細胞を活性化させることも発見された（非特許文献39、40、特許文献4～8）。通常、エフェクタ細胞の活性化は、抗原に結合した抗体がFc Fc R相互作用によってエフェクタ細胞に結合することによってトリガされる。従って、これに関して、本発明のダイアボディ分子は、（例えば、当該技術分野において公知の、又は本出願において例示されるいずれのエフェクタ機能アッセイ（例えばADCCアッセイ）において分析されるように）Fcドメインを備えるかどうかとは独立して、Igのような機能性を呈し得る。腫瘍とエフェクタ細胞とを架橋することによって、ダイアボディはエフェクタ細胞を腫瘍細胞近傍にもたすだけでなく、効果的な腫瘍の殺滅をもたらす（例えば非特許文献41参照）。

10

【0014】

しかしながら、上述の利点は顕著なコストにつながる。このような非単一特異性ダイアボディの形成は、2つ以上の別個の異なるポリペプチドの良好な集合を必要とする（即ち上記形成は、ダイアボディが、異なるポリペプチド鎖種のヘテロ二量体形成によって形成されることを必要とする）。この事実は、同一のポリペプチド鎖のホモ二量体形成によって形成される単一特異性ダイアボディとは対照的である。非単一特異性ダイアボディを形成するために少なくとも2つの異なるポリペプチドを提供しなければならないため、及びこのようなポリペプチドのホモ二量体形成は不活性分子をもたらす（非特許文献33）ため、このようなポリペプチドの産生は、同一種のポリペプチド間での共有結合を防止するような（即ちホモ二量体形成を防止するような）方法で達成しなければならない（非特許文献33）。従って本技術分野は、このようなポリペプチドの非共有結合的関連を教示している（例えば非特許文献30、32、33、29参照）。

20

【0015】

しかしながら、本技術分野は、非共有結合的に関連したポリペプチドで構成される二重特異性1価ダイアボディが不安定であり、非機能性モノマーへと容易に分解することを認識している（例えば非特許文献29参照）。

【0016】

この課題に直面して、本技術分野は、安定した共有結合ヘテロ二量体性非単一特異性ダイアボディの開発に成功した（例えば特許文献4～8、非特許文献42～44、特許文献9、10参照）。このようなアプローチは、1つ又は複数のシステイン残基を、採用したポリペプチド種それぞれの中へと加工するステップを伴う。例えば、このような構造のC末端へのシステイン残基の追加は、ポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を可能とすることが分かっており、これは、2価分子の結合特性に干渉することなく、得られるヘテロ二量体を安定化させる。

30

【0017】

ダイアボディ及び他の免疫グロブリンにおいて、gpA33及びCD3のいずれかまたは両方に対する特異性を有すると称する報告がある（例えば特許文献11～20参照）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0018】

40

【特許文献1】米国特許出願公開第2004/0058400号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2004/0220388号明細書

【特許文献3】国際公開第02/02781号

【特許文献4】国際公開第2006/113665号

【特許文献5】国際公開第2008/157379号

【特許文献6】国際公開第2010/080538号

【特許文献7】国際公開第2012/018687号

【特許文献8】国際公開第2012/162068号

【特許文献9】米国特許出願公開第2012/0294796号明細書

【特許文献10】米国特許出願公開第2013/0149236号明細書

50

- 【特許文献 1 1】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 1 4 9 5 7 号明細書
- 【特許文献 1 2】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 3 4 1 6 0 号明細書
- 【特許文献 1 3】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 0 8 7 8 5 8 号明細書
- 【特許文献 1 4】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 8 9 5 4 1 号明細書
- 【特許文献 1 5】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 9 5 9 0 0 号明細書
- 【特許文献 1 6】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 0 1 7 4 6 号明細書
- 【特許文献 1 7】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 3 7 4 4 2 号明細書
- 【特許文献 1 8】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 6 3 7 2 2 号明細書
- 【特許文献 1 9】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 5 8 1 0 8 号明細書
- 【特許文献 2 0】米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 7 6 6 0 8 号明細書 10
- 【非特許文献】
- 【0 0 1 9】
- 【非特許文献 1】Silverberg, E. et al. (1989) "Cancer Statistics, 1989," *CA Cancer J Clin.* 39(1):3-20
- 【非特許文献 2】Heath, J.K. et al. (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 94(2):469-474
- 【非特許文献 3】Ritter, G. et al. (1997) "Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(3):682-686 20
- 【非特許文献 4】Wong, N.A. et al. (2006) "EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia," *J. Clin. Pathol.* 59(3):260-263
- 【非特許文献 5】Abud, H.E. et al. (2000) "The Murine A33 Antigen Is Expressed At Two Distinct Sites During Development, The ICM Of The Blastocyst And The Intestinal Epithelium," *Mech. Dev.* 98(1-2):111-114
- 【非特許文献 6】Barendswaard, E.C. et al. (1998) "Rapid And Specific Targeting Of Monoclonal Antibody A33 To A Colon Cancer Xenograft In Nude Mice," *Int. J. Oncol.* 12(1):45-53
- 【非特許文献 7】Panjideh, H. et al. (2008) "Biodistribution And Efficacy Of [131I]A33scFv::CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer," *Int. J. Oncol.* 32(4):925-930 30
- 【非特許文献 8】Infante, J.R. et al. (2013) "Safety, Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer," *Eur. J. Cancer.* 49(6):1169-1175
- 【非特許文献 9】Johnstone, C.N. et al. (2000) "Characterization Of Mouse A33 Antigen, A Definitive Marker For Basolateral Surfaces Of Intestinal Epithelial Cells," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279(3):G500-G510
- 【非特許文献 1 0】Ackerman, M.E. et al. (2008) "A33 Antigen Displays Persistent Surface Expression," *Cancer Immunol. Immunother.* 57(7):1017-1027 40
- 【非特許文献 1 1】Barendswaard, E.C. et al. (2001) "Relative Therapeutic Efficacy Of (125)I- And (131)I-Labeled Monoclonal Antibody A33 In A Human Colon Cancer Xenograft," *J. Nucl. Med.* 42(8):1251-1256
- 【非特許文献 1 2】Carrasquillo, J.A. et al. (2011) "(124)I-huA33 Antibody PET Of Colorectal Cancer," *J. Nucl. Med.* 52(8):1173-1180
- 【非特許文献 1 3】Chong, G. et al. (2005) "Phase I Trial Of 131I-HuA33 In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma," *Clin. Cancer Res.* 11(13):4818-4826
- 【非特許文献 1 4】Deckert, P.M. et al. (2000) "Pharmacokinetics And Microdistribution Of Polyethylene Glycol-Modified Humanized A33 Antibody Targeting Colon Cancer Xenografts," *Int. J. Cancer.* 87(3):382-390 50

- 【非特許文献 1 5】Johnston, A.P. et al. (2012) "Targeting Cancer Cells: Controlling The Binding And Internalization Of Antibody-Functionalized Capsules" *ACS Nano*. 6(8):6667-6674
- 【非特許文献 1 6】Koppe, M.J. et al. (2005) "Radioimmunotherapy And Colorectal Cancer," *Br. J. Surg. Mar*:92(3):264-276
- 【非特許文献 1 7】Sakamoto, J. et al. (2006) "A Phase I Radioimmunolocalization Trial Of Humanized Monoclonal Antibody HuA33 In Patients With Gastric Carcinoma," *Cancer Sci*. 97(11):1248-1254
- 【非特許文献 1 8】Scott, A.M. et al. (2005) "A Phase I Trial Of Humanized Monoclonal Antibody A33 In Patients With Colorectal Carcinoma: Biodistribution, Pharmacokinetics, And Quantitative Tumor Uptake," *Clin. Cancer Res*. 11(13):4810-4817
- 【非特許文献 1 9】Tschmelitsch, J. et al. (1997) "Enhanced Antitumor Activity Of Combination Radioimmunotherapy (131I-Labeled Monoclonal Antibody A33) With Chemotherapy (Fluorouracil)," *Cancer Res*. 57(11):2181-2186
- 【非特許文献 2 0】Coelho, V. et al. (2007) "Design, Construction, And In Vitro Analysis Of A33scFv::CDy, A Recombinant Fusion Protein For Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy In Colon Cancer," *Int. J. Oncol*. 31(4):951-957
- 【非特許文献 2 1】Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2(4):a005140: pages 1-14
- 【非特許文献 2 2】Chetty, R. et al. (1994) "CD3: Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice," *J. Pathol*. 173:303-307
- 【非特許文献 2 3】Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer," *Immunology* 129(2):170-177
- 【非特許文献 2 4】Janeway, C.A. et al. (2005) In: *Immunobiology: The Immune System In Health And Disease*, 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216
- 【非特許文献 2 5】Sun, Z. J. et al. (2001) "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 : Heterodimer," *Cell* 105(7):913-923
- 【非特許文献 2 6】Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex," *Immunity*. 2006 Feb;24(2):133-139
- 【非特許文献 2 7】Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448
- 【非特許文献 2 8】Alt et al. (1999) *FEBS Lett*. 454(1-2):90-94
- 【非特許文献 2 9】Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem*. 280(20):19665-19672
- 【非特許文献 3 0】Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," *Protein Eng. Des Sel*. 17(1):21-27
- 【非特許文献 3 1】Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange," *Protein Engineering* 14(2):1025-1033
- 【非特許文献 3 2】Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region," Abstract 3P-683, *J. Biochem*. 76(8):992
- 【非特許文献 3 3】Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng*. 13(8):583-588

10

20

30

40

50

【非特許文献 3 4】Baeuerle, P.A. et al. (2009) “Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,” *Cancer Res.* 69(12):4941-4944).

【非特許文献 3 5】Marvin et al. (2005) “Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies,” *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658

【非特許文献 3 6】Mertens, N. et al., “New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives,” In: *Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use*, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208;

【非特許文献 3 7】Fitzgerald et al. (1997) “Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*,” *Protein Eng.* 10:1221

【非特許文献 3 8】Staerz et al. (1985) “Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,” *Nature* 314:628-631

【非特許文献 3 9】Holliger et al. (1996) “Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,” *Protein Eng.* 9:299-305

【非特許文献 4 0】Holliger et al. (1999) “Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins,” *Cancer Res.* 59:2909-2916

【非特許文献 4 1】Cao et al. (2003) “Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics,” *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197

【非特許文献 4 2】Johnson, S. et al. (2010) “Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion,” *J. Molec. Biol.* 399(3):436-449;

【非特許文献 4 3】Veri, M.C. et al. (2010) “Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,” *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943;

【非特許文献 4 4】Moore, P.A. et al. (2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,” *Blood* 117(17):4542-4551;

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

このような成功にもかかわらず、安定した機能性ヘテロ二量体の非単一特異性ダイアボディは、採用したポリペプチド鎖のドメインに関する注意深い考察及びその配置によって、更に改善できる。従って本発明は、gpA33及びCD3と同時に結合できる、共有結合を介したヘテロ二量体ダイアボディ及びヘテロ二量体Fcダイアボディを形成するために特別に設計された特異的ポリペプチドの提供に関する。

【課題を解決するための手段】

【0021】

本発明は、gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディに関する。特定の実施形態では、本発明のダイアボディは更に、免疫グロブリンFcドメイン（すなわち「Fcドメイン」）を有するダイアボディ（「gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ」）又はアルブミン結合ドメイン（ABD）を有するダイアボディ（「ABD含gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ」）であり、これによりインビボでの半減期が延長される。本発明のgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ及び本発明のgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、2つの異なるポリペプチド鎖を含み、これらはヘテロ二量体として互いに関連して、gpA33のエピトープに対して特異的な1つの結合部位、及びCD3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を形成する。従って、本発明のgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ及び本発明のgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、gpA33のエピトープの1つのみの複

10

20

30

40

50

製及びCD3のエピトープの1つのみの複製に結合できるという点で1価であるが、単一のダイアボディがgpA33のエピトープ及びCD3のエピトープに対して同時に結合できるという点で二重特異性である。

【0022】

本発明のgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディは、2つのポリペプチド鎖(「第1」及び「第2」のポリペプチド鎖)からなり、例えば各ポリペプチド鎖内に位置するシステイン残基のジスルフィド結合によって互いに共有結合する。本発明のgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディは、3つのポリペプチド鎖(「第1」、「第2」及び「第3」のポリペプチド鎖)からなり、第1及び第2のポリペプチド鎖は互いに共有結合し、第1及び第3のポリペプチド鎖は互いに共有結合する。本発明の二重特異性1価ダイアボディ及び二重特異性1価Fcダイアボディは、gpA33及びCD3と同時に結合できる。本発明は、上記gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ及びgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ、及び上記gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ又はgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディを含む医薬組成物に関する。本発明はさらに、癌及び他の疾患及び状態の治療における上記ダイアボディを使用する方法に関する。

10

【0023】

詳細には、本発明は、gpA33のエピトープ及びCD3のエピトープに特異的に結合できる、二重特異性1価ダイアボディを提供し、この二重特異性1価ダイアボディは、互いに共有結合した第1のポリペプチド鎖及び第2のポリペプチド鎖を含み、

20

A. 第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、

i. ドメイン1であって、CD3に結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン(VL_{CD3}) (配列番号5)を含むサブドメイン(1A)、及びgpA33に結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン(VH_{gpA33}) (配列番号27)を含むサブドメイン(1B)を含み、サブドメイン(1A)及び(1B)はペプチドリンカー(配列番号1)によって互いから分離されている、ドメイン1と、

ii. ドメイン2であって、ドメイン2はKコイルドメイン(配列番号4)又はEコイルドメイン(配列番号3)であり、またドメイン2はペプチドリンカー(配列番号2)によってドメイン1から分離されている、ドメイン2と

30

B. 第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、

i. ドメイン1であって、gpA33に結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン(VL_{gpA33}) (配列番号26)を含むサブドメイン(1A)、及びCD3に結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン(VH_{CD3}) (配列番号25)を含むサブドメイン(1B)を含み、サブドメイン(1A)及び(1B)はペプチドリンカー(配列番号1)によって互いから分離されている、ドメイン1と、

ii. ドメイン2であって、ドメイン2はEコイルドメイン(配列番号3)又はKコイルドメイン(配列番号4)であり、またドメイン2はペプチドリンカー(配列番号2)によってドメイン1から分離されており、かつ第1のポリペプチド鎖のドメイン2及び第2のポリペプチド鎖のドメイン2は、両方がEコイルドメインではなく、又は両方がKコイルドメインではない、ドメイン2と

40

(a) 第1のポリペプチド鎖のVLドメイン及び第2のポリペプチド鎖のVHドメインは、CD3のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成し、

(b) 第2のポリペプチド鎖のVLドメイン及び第1のポリペプチド鎖のVHドメインは、gpA33のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成する。

【0024】

本発明は更に、上述の二重特異性1価ダイアボディの実施形態に関し、第1のポリペプチド鎖又は第2のポリペプチド鎖が更に、リンカー3(配列番号32)を介して、C末端においてドメイン2に、又はN末端においてドメイン1に連結した、アルブミン結合ドメ

50

イン（配列番号 34）を含む。

【0025】

さらに、本発明は、gpA33のエピトープ及びCD3のエピトープに特異的に結合でき、IgGのFcドメインを保有する、二重特異性1価Fcダイアボディに関し、この二重特異性1価Fcダイアボディは、第1のポリペプチド鎖、第2のポリペプチド鎖及び第3のポリペプチド鎖を含み、第1及び第2のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、第1及び第3のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、

A. 第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、

i. ドメイン1であって、gpA33に結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン（VL_{gpA33}）（配列番号26）を含むサブドメイン（1A）、及びCD3に結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン（VH_{CD3}）（配列番号25）を含むサブドメイン（1B）を含み、サブドメイン（1A）及び（1B）はペプチドリンカー（配列番号1）によって互いから分離されている、ドメイン1と、

ii. ドメイン2であって、ドメイン2はEコイルドメイン（配列番号3）又はKコイルドメイン（配列番号4）であり、またドメイン2はペプチドリンカー（配列番号2）によってドメイン1から分離されている、ドメイン2と、

iii. ドメイン3であって、システイン含有ペプチド（ペプチド1）（配列番号39）を含むサブドメイン（3A）、及びIgG免疫グロブリンFcドメインのCH2ドメイン及びCH3ドメインを有する、IgGのFcドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン（3B）を含み、ドメイン3及びドメイン2はスペーサペプチド（リンカー5）（配列番号33）によって互いから分離されている、ドメイン3と

B. 第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、

i. ドメイン1であって、CD3に結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン（VL_{CD3}）（配列番号5）を含むサブドメイン（1A）、及びgpA33に結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン（VH_{gpA33}）（配列番号27）を含むサブドメイン（1B）を含み、サブドメイン（1A）及び（1B）はペプチドリンカー（配列番号1）によって互いから分離されている、ドメイン1と、

ii. ドメイン2であって、ドメイン2はKコイルドメイン（配列番号4）又はEコイルドメイン（配列番号3）であり、またドメイン2はペプチドリンカー（配列番号2）によってドメイン1から分離されており、かつ第1のポリペプチド鎖のドメイン2及び第2のポリペプチド鎖のドメイン2は、両方がEコイルドメインではなく、又は両方がKコイルドメインではない、ドメイン2と

C. 第3のポリペプチド鎖は、N末端からC末端方向へ向かって、ドメイン3を含み、ドメイン3は、

(1) システイン含有ペプチド（ペプチド1）（配列番号39）を含むサブドメイン（3A）、及び

(2) IgG免疫グロブリンFcドメインのCH2ドメイン及びCH3ドメインを有する、IgGのFcドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン（3B）を含み、

かつ、

(a) 第1及び第3のポリペプチド鎖のIgGのFcドメインのポリペプチド部分は、IgGのFcドメインを形成し、

(b) 第1のポリペプチド鎖のVLドメイン及び第2のポリペプチド鎖のVHドメインは、CD3のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成し、

(c) 第2のポリペプチド鎖のVLドメイン及び第1のポリペプチド鎖のVHドメインは、gpA33のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成する。

【0026】

さらに、本発明は、gpA33のエピトープ及びCD3のエピトープに特異的に結合でき、IgGのFcドメインを保有する、二重特異性1価Fcダイアボディに関し、この二

重特異性 1 価 F c ダイアボディは、第 1 のポリペプチド鎖、第 2 のポリペプチド鎖及び第 3 のポリペプチド鎖を含み、第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖は互いに共有結合され、

A . 第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端の方向に、

i . ドメイン 3 であって、システイン含有ペプチド (ペプチド 1) (配列番号 39) を含むサブドメイン (3 A)、及び I g G 免疫グロブリン F c ドメインの C H 2 ドメイン及び C H 3 ドメインを有する、I g G の F c ドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン (3 B) を含む、ドメイン 3 と

i i . ドメイン 1 であって、g p A 33 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン (V L_{gpA33}) (配列番号 26) を含むサブドメイン (1 A)、及び C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン (V H_{CD3}) (配列番号 25) を含むサブドメイン (1 B) を含み、サブドメイン (1 A) 及び (1 B) はペプチドリンカー (配列番号 1) によって互いから分離されており、ドメイン 1 及びドメイン 3 はスパーサペプチド (リンカー 4) (配列番号 38) によって互いから分離されている、ドメイン 1 と、

i i i . ドメイン 2 であって、ドメイン 2 は E コイルドメイン (配列番号 3) 又は K コイルドメイン (配列番号 4) であり、またドメイン 2 はペプチドリンカー (配列番号 2) によってドメイン 1 から分離されている、ドメイン 2 と、
を含み、

B . 第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端の方向に、

i . ドメイン 1 であって、C D 3 に結合できるモノクローナル抗体の V L ドメイン (V L_{CD3}) (配列番号 5) を含むサブドメイン (1 A)、及び g p A 33 に結合できるモノクローナル抗体の V H ドメイン (V H_{gpA33}) (配列番号 27) を含むサブドメイン (1 B) を含み、サブドメイン (1 A) 及び (1 B) はペプチドリンカー (配列番号 1) によって互いから分離されている、ドメイン 1 と、

i i . ドメイン 2 であって、ドメイン 2 は K コイルドメイン (配列番号 4) 又は E コイルドメイン (配列番号 3) であり、またドメイン 2 はペプチドリンカー (配列番号 2) によってドメイン 1 から分離されており、かつ第 1 のポリペプチド鎖のドメイン 2 及び第 2 のポリペプチド鎖のドメイン 2 は、両方が E コイルドメインではなく、又は両方が K コイルドメインではない、ドメイン 2 と
を含み、

C . 第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端方向へ向かって、ドメイン 3 を含み、ドメイン 3 は、

(1) システイン含有ペプチド (ペプチド 1) (配列番号 39) を含むサブドメイン (3 A)、及び

(2) I g G 免疫グロブリン F c ドメインの C H 2 ドメイン及び C H 3 ドメインを有する、I g G の F c ドメインのポリペプチド部分を含むサブドメイン (3 B) を含み、
かつ、

(a) 第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖の I g G の F c ドメインのポリペプチド部分は、I g G の F c ドメインを形成し、

(b) 第 1 のポリペプチド鎖の V L ドメイン及び第 2 のポリペプチド鎖の V H ドメインは、C D 3 のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成し、

(c) 第 2 のポリペプチド鎖の V L ドメイン及び第 1 のポリペプチド鎖の V H ドメインは、g p A 33 のエピトープに特異的に結合できる抗原結合ドメインを形成する。

【 0 0 2 7 】

本発明は更に、上述した二重特異性 1 価 F c ダイアボディのいずれかの実施形態に関し、第 1 のポリペプチド鎖のサブドメイン (3 B) が、第 3 のポリペプチド鎖のサブドメイン (3 B) の配列とは異なる配列を含む。

【 0 0 2 8 】

本発明は更に、上述した二重特異性 1 価 F c ダイアボディの実施形態に関し、第 1 のポリペプチド鎖のサブドメイン (3 B) が配列番号 40 のアミノ酸配列を有し、第 3 のポリ

10

20

30

40

50

ペプチド鎖のサブドメイン(3B)が配列番号41のアミノ酸配列を有する。

【0029】

本発明は更に、上述した二重特異性1価Fcダイアボディの実施形態に関し、第1のポリペプチド鎖のサブドメイン(3B)が配列番号41のアミノ酸配列を有し、第3のポリペプチド鎖のサブドメイン(3B)が配列番号40のアミノ酸配列を有する。

【0030】

本発明は更に、上述した二重特異性1価Fcダイアボディの実施形態に関し、第1のポリペプチド鎖のドメイン3及び/又は第3のポリペプチド鎖のドメイン3が、Fc受容体に対する結合の変化を示す改変体CH2-CH3の配列を含む。

【0031】

本発明は更に、上述した二重特異性1価ダイアボディのいずれか又は上述した二重特異性1価Fcダイアボディのいずれかの実施形態に関し、第1のポリペプチド鎖のドメイン2がEコイルドメイン(配列番号3)を含み、第2のポリペプチド鎖のドメイン2がKコイルドメイン(配列番号4)を含む。

【0032】

本発明は更に、上述した二重特異性1価ダイアボディのいずれか又は上述した二重特異性1価Fcダイアボディのいずれかの実施形態に関し、第1のポリペプチド鎖のドメイン2がKコイルドメイン(配列番号4)を含み、第2のポリペプチド鎖のドメイン2がEコイルドメイン(配列番号3)を含む。

【0033】

本発明は更に、CD3のエピトープ及びgpA33のエピトープに特異的に結合できる二重特異性1価ダイアボディに関し、この二重特異性1価ダイアボディは、
(1)配列番号28のアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド鎖、及び配列番号30のアミノ酸配列を有する第2のポリペプチド鎖、又は
(2)配列番号35のアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド鎖、及び配列番号30のアミノ酸配列を有する第2のポリペプチド鎖
を含み、第1及び第2のポリペプチド鎖は、ジスルフィド結合によって互いに共有結合する。

【0034】

本発明は更に、CD3のエピトープ及びgpA33のエピトープに特異的に結合できる二重特異性1価Fcダイアボディに関し、この二重特異性1価Fcダイアボディは、
(1)配列番号42のアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド鎖、配列番号44のアミノ酸配列を有する第2のポリペプチド鎖、及び配列番号46のアミノ酸配列を有する第2のポリペプチド鎖、又は
(2)配列番号48のアミノ酸配列を有する第1のポリペプチド鎖、配列番号28のアミノ酸配列を有する第2のポリペプチド鎖、及び配列番号46のアミノ酸配列を有する第2のポリペプチド鎖
を含み、第1及び第2のポリペプチド鎖は、第1のジスルフィド結合によって互いに共有結合し、第1及び第3のポリペプチド鎖は、第2のジスルフィド結合によって互いに共有結合する。

【0035】

本発明は更に、上述した二重特異性1価ダイアボディのいずれか又は上述した二重特異性1価Fcダイアボディのいずれか、及び生理学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物に関する。

【0036】

本発明は更に、gpA33の発現を特徴とする癌の治療における、上述の医薬組成物の使用に関し、特に、大腸癌、結腸癌、胃癌又は膵臓癌の治療における使用に関する。

【0037】

本発明は更に、上述した二重特異性1価ダイアボディのいずれか又は上述した二重特異性1価Fcダイアボディのいずれかのポリペプチド鎖を発現する細胞に関し、同様に、そ

10

20

30

40

50

のような発現したポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチドに関する。

【0038】

本発明は更に、抗体又はポリペプチド部分又はそのフラグメントを発現する細胞に関し、抗体は g p A 3 3 と結合し、抗体又はポリペプチド部分又はそのフラグメントは、
 (1) 抗ヒト g p A 3 3 抗体の軽鎖の C D R 1 (配列番号 14)、C D R 2 (配列番号 15) 及び C D R 3 (配列番号 16)、
 (2) 抗ヒト g p A 3 3 抗体の重鎖の C D R 1 (配列番号 18)、C D R 2 (配列番号 19) 及び C D R 3 (配列番号 20)、又は
 (3) (1) 及び (2) の両方
 を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】図1は、本発明の2鎖 g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディの第1及び第2のポリペプチド鎖の構造を示す。

【図2】図2A及び2Bは、本発明の3鎖 g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価Fcダイアボディの第1、第2及び第3のポリペプチド鎖の各バージョンの構造を示す(バージョン1が図2A、バージョン2が図2B)。

【図3】図3は、本発明のダイアボディがC D 3 及び g p A 3 3 に同時に結合できることを示す。

【図4】図4は、本発明のダイアボディの癌を治療する能力を示す。大腸癌又は膵臓癌細胞を g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(DART-1)及びヒトPBM C (E:T=25:1)又は活性化したヒトT細胞(E:T=10:1)のいずれかの存在下でインキュベートし、細胞毒性を測定した(図4A(結腸C S C L大腸細胞)、図4B(C o l o 2 0 5大腸細胞)、及び図4C(A S P C - 1膵臓癌細胞))。

20

【図5】図5A~5Fは、癌細胞の存在下におけるC D 3 二重特異性1価ダイアボディ(DART-1)の存在によって発生したC D 8 T細胞の活性を示す。図5A~C:C D 8 T細胞+c o l o 2 0 5細胞(図5A)、C D 8 T細胞+A S P C - 1細胞(図5B)、C D 8 T細胞単独(図5C)、図5D~F:C D 4 T細胞+c o l o 2 0 5細胞(図5D)、C D 4 T細胞+A S P C - 1細胞(図5E)、C D 4 T細胞単独(図5F)。

【図6】図6A~6Dは、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(DART-1およびDART-2)が、S W 9 4 8 結腸直腸腺癌細胞(図6A)、c o l o 2 0 5細胞(図6B)、C o l o 2 0 5 - L u c細胞(図6C)について同等の細胞毒性を媒介したこと、及びg p A 3 3 陰性癌細胞株H C T 1 1 6(図6D)について、いずれのダイアボディも細胞毒性を媒介しなかったことを実証する。

30

【図7】図7A~Dは、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(DART-2)、アルブミン結合ドメインを有するg p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(ABD含DART-2、「w/ABD」)及び免疫グロブリンFcドメインを有するg p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(Fc含DART-2、「w/Fc」)がヒト又はカニクイザルPBM Cの存在下における癌細胞の細胞毒性を促進する能力を実証する。

40

【図8】図8は、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(DART-1)のマウスのc o l o 2 0 5 結腸癌モデルにおける腫瘍体積を減少するインビボ能力を実証する。

【図9】図9A~Dは、C o l o 2 0 5細胞を埋入したN O D S C I Dガンマ(NSG)マウスのビヒクルを受容した後2日目(図9A)、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(DART-1)を受容した後2日目(図9B)、ビヒクルを受容した後12日目(図9C)、DART-1を受容した後12日目(図9D)の腫瘍画像データを示す。

【図10】図10は、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性1価ダイアボディ(DART-1)のマウスのA S P C - 1膵臓癌モデルにおける腫瘍体積を減少するインビボ能力を実証する

50

る。。

【図11】図11は、免疫グロブリンFcドメインを有するgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ(DART-2w/Fcバージョン1)のインビボ結腸癌モデルにおける劇的な減少を媒介する能力を示す。

【図12】図12は、免疫グロブリンFcドメインを有するgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ(DART-2w/Fcバージョン1)の極微量の用量でインビボ結腸癌モデルにおける減少を媒介する能力を示す。

【図13】図13は、カニクイザルにおけるgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ(DART-2)、及び免疫グロブリンFcドメインを有するgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ(DART-2w/Fcバージョン1)の薬物動態を示す。

【図14】図14A~14Bは、固定化されたヒト及びカニクイザルCD3へのDART-2w/Fcバージョン1の結合のSPR分析を示す。黒破線は、DART-2w/Fcバージョン1濃度0、6.25、12.5、25、50又は100nMにおいて得られた、結合曲線の1:1ラングミュアモデルに対するグローバルフィットを表す。データは、3つの独立した実験の代表例である。

【図15】図15A~15Bは、捕捉されたヒト及びカニクイザルgpA33へのDART-2w/Fcバージョン1の結合のSPR分析を示す。黒破線は、DART-2w/Fcバージョン1の濃度0、6.25、12.5、25、50又は100nMにおいて得られた、結合曲線の1:1ラングミュアモデルに対するグローバルフィットを表す。データは、3つの独立した実験の代表例である。

【発明を実施するための形態】

【0040】

本発明は、2つのポリペプチド鎖を含み、gpA33のエピトープに特異的な1つの結合部位及びCD3のエピトープに特異的な1つの結合部位を保有する二重特異性1価ダイアボディ(すなわち、「gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ」)に関する。また、本発明は、免疫グロブリンFcドメインを含む二重特異性1価ダイアボディ(「二重特異性1価Fcダイアボディ」)であって、3つのポリペプチド鎖からなり、gpA33のエピトープに特異的な1つの結合部位及びCD3のエピトープに特異的な1つの結合部位を保有する二重特異性1価ダイアボディ(すなわち、「gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ」)に関する。本発明の二重特異性1価ダイアボディ及び二重特異性1価FcダイアボディはgpA33及びCD3と同時に結合できる。本発明は、上記二重特異性1価ダイアボディまたは上記二重特異性1価Fcダイアボディを含有する医薬組成物を対象とする。本発明はさらに、癌及び他の疾患及び状態の治療における上記二重特異性抗体を使用する方法に関する。

【0041】

本発明のgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディは、2つのポリペプチド鎖からなり、これらは互いに関連して、gpA33のエピトープに対して特異的な1つの結合部位、及びCD3のエピトープに対して特異的な1つの結合部位を形成する。このダイアボディの個々のポリペプチド鎖は、例えば各ポリペプチド鎖内に位置するシステイン残基のジスルフィド結合によって互いに共有結合する。各ポリペプチド鎖は、軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメイン、重鎖可変ドメインの抗原結合ドメイン、及びヘテロ二量体化ドメインを含有する。介在リンカーペプチド(リンカー1)は、軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメインを、重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインから分離する。第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメインは、第2のポリペプチド鎖の重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインと相互作用して、第1の抗原(即ちgpA33又はCD3)に対して特異的な第1の機能性抗原結合部位を形成する。同様に、第2のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメインは、第1のポリペプチド鎖の重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインと相互作用して、第2の抗原(即ち第1の抗原の種別に応じてgpA33又はCD3)に対して特異的な第2の機能性抗原結合部位を形成する。このように、第1及び第2のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメイン及び重鎖可変ドメインの抗原結

10

20

30

40

50

合ドメインの選択は、2つのポリペプチド鎖が全体として、g p A 3 3 及び C D 3 に結合できる軽鎖及び重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインを含むように、整合される。

【0042】

本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、第 1 のポリペプチド鎖、第 2 のポリペプチド鎖及び第 3 のポリペプチド鎖からなる。第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は互いに関連して、g p A 3 3 のエピトープに対して特異的な 1 つの結合部位、及び C D 3 のエピトープに対して特異的な 1 つの結合部位を形成する。第 1 のポリペプチド鎖及び第 3 のポリペプチド鎖は互いに関連して、免疫グロブリン F c ドメインを形成する。二重特異性 1 価 F c ダイアボディの第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は、例えば各ポリペプチド鎖内に位置するシステイン残基のジスルフィド結合によって互いに共有結合する。第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖は、例えば各ポリペプチド鎖内に位置するシステイン残基のジスルフィド結合によって互いに共有結合する。第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖はそれぞれ、軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメイン、重鎖可変ドメインの抗原結合ドメイン、及びヘテロ二量体化ドメインを含有する。介在リンカーペプチド（リンカー 1）は、軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメインを、重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインから分離する。第 1 のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメインは、第 2 のポリペプチド鎖の重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインと相互作用して、第 1 の抗原（即ち g p A 3 3 又は C D 3）に対して特異的な第 1 の機能性抗原結合部位を形成する。同様に、第 2 のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメインは、第 1 のポリペプチド鎖の重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインと相互作用して、第 2 の抗原（即ち第 1 の抗原の種別に応じて C D 3 又は g p A 3 3）に対して特異的な第 2 の機能性抗原結合部位を形成する。このように、第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメインの抗原結合ドメイン及び重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインの選択は、2つのポリペプチド鎖が全体として、g p A 3 3 及び C D 3 に結合できる軽鎖及び重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインを含むように、整合される。第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖はそれぞれ、システイン含有ペプチド（ペプチド 1）配列番号 3 9、及び完全な免疫グロブリン F c ドメインの C H 2 ドメインの一部若しくは全体及び / 又は C H 3 ドメインの一部若しくは全体、並びにシステイン含有ペプチドを含有する。C H 2 ドメインの一部若しくは全体及び / 又は C H 3 ドメインの一部若しくは全体は、関連して、本発明の二重特異性 1 価 F c ダイアボディの免疫グロブリン F c ドメインを形成する。本発明の二重特異性 1 価 F c ダイアボディの第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖は、例えばポリペプチド鎖のシステイン含有ペプチド内に位置するシステイン残基のジスルフィド結合によって互いに共有結合する。

10

20

30

40

【0043】

二重特異性 1 価ダイアボディ又は二重特異性 1 価 F c ダイアボディの第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖のヘテロ二量体の形成は、ヘテロ二量体化ドメインによって開始させることができる。このようなドメインは、一方のポリペプチド鎖上に G V E P K S C（配列番号 5 4）（又は V E P K S C；配列番号 5 5）、及び他方のポリペプチド鎖上に G F N R G E C（配列番号 5 6）（又は F N R G E C；配列番号 5 7）を含む（米国特許第 2 0 0 7 / 0 0 0 4 9 0 9 号）。あるいはこのようなドメインは、反対の電荷のコイルを含有するように加工できる。ポリペプチド鎖のうちの一方のヘテロ二量体化ドメインは、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個又は少なくとも 8 個の正荷電アミノ酸の配列を含み、他方のポリペプチド鎖のヘテロ二量体化ドメインは、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個又は少なくとも 8 個の負荷電アミノ酸の配列を含む。例えば第 1 又は第 2 のヘテロ二量体化ドメインは好ましくは、8 個の正荷電アミノ酸の配列を含んでもよく、他方のヘテロ二量体化ドメインは好ましくは、8 個の負荷電アミノ酸の配列を含んでもよい。正荷電アミノ酸は、リジン、アルギニン、ヒスチジン等であってよく、及び / 又は負荷電アミノ酸は、グルタミン酸、アスパラギン酸等であってよい。正荷電アミノ酸は好ましくはリジンであり、及び / 又は負荷電アミノ酸は好ましくはグルタミン酸である。

【0044】

本発明の二重特異性 1 価ダイアボディ及び二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、上述の

50

ような第1及び第2のポリペプチド鎖が、その長さに沿ってシステイン残基を介して互いに共有結合するように、加工される。このようなシステイン残基は、ポリペプチドのV L及びV Hドメインを分離する介在リンカーに導入してよい。あるいは更に好ましくは、第2のペプチド（リンカー2）を各ポリペプチド鎖に、例えばポリペプチド鎖のアミノ末端に、又はヘテロ二量体化ドメインと軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインの抗原結合ドメインとの間の位置に導入する。

【0045】

上述したとおり、gpA33は大腸細胞において発現される。gpA33に免疫特異的に結合できる抗体は、そのような細胞に結合できる。CD3はT細胞上に発現される。従って、gpA33及びCD3の両方に免疫特異的に結合できる抗体は、T細胞を大腸癌及び他のgpA33が発現する癌細胞（例えば、結腸癌細胞、膵臓癌細胞等）にターゲティングさせることができ、それ故に、それらの癌について改善した療法を提供できる。

10

【0046】

I. 好ましい本発明のgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ

A. gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ

本発明のgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの一実施形態は、第1のポリペプチド鎖及び第2のポリペプチド鎖からなり、それらの配列は、gpA33及びCD3の両方と同時に結合できる共有結合性複合体を形成するために互いに共有結合することが可能である。

【0047】

好ましいgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、N末端、CD3又はgpA33のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のV Lドメイン（すなわち、V L_{CD3}又はV L_{gpA33}のいずれか）、第1の介在スペーサペプチド（リンカー1）、gpA33（当該第1のポリペプチド鎖がV L_{CD3}を含む場合）又はCD3（当該第1のポリペプチド鎖がV L_{gpA33}を含む場合）のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のV Hドメイン、システイン含有第2の介在スペーサペプチド（リンカー2）、ヘテロ二量体促進性ドメイン及びC末端を含む（図1）。

20

【0048】

好ましいgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディの第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、N末端、CD3又はgpA33のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のV Lドメイン（すなわち、ダイアボディの第1のポリペプチド鎖について選択されたV Lドメインにより決まるV L_{gpA33}又はV L_{CD3}のいずれか）、介在スペーサペプチド（リンカー1）、CD3（当該第2のポリペプチド鎖がV L_{gpA33}を含む場合）又はgpA33（当該第2のポリペプチド鎖がV L_{CD3}を含む場合）のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のV Hドメイン、システイン含有スペーサペプチド（リンカー2）、ヘテロ二量体促進性ドメイン及びC末端を含む（図1）。

30

【0049】

好ましいgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディの第1のポリペプチド鎖のV Lドメインは、好ましいgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディの第2のポリペプチド鎖のV Hドメインと相互作用して、第1の抗原に特異的である第1の機能的な抗原結合部位（すなわち、CD3又はgpA33のいずれか）を形成する。同様に、第2のポリペプチド鎖のV Lドメインは、第1のポリペプチド鎖のV Hドメインと相互作用して、第2の抗原に特異的である第2の機能的な抗原結合部位（すなわち、第1の抗原が特定されることにより決まるgpA33又はCD3のいずれか）を形成する。従って、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖のV LドメインおよびV Hドメインの選択は、好ましいgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディの2つのポリペプチド鎖が共同でgpA33及びCD3に結合し得るV LドメインおよびV Hドメインを含むように調整される（すなわち、それらは、V L_{CD3}/V H_{CD3}およびV L_{gpA33}/V H_{gpA33}を含む）。

40

【0050】

最も好ましくは、介在するリンカーペプチド（V LドメインおよびV Hドメインを隔て

50

るリンカー 1) の長さは、ポリペプチド鎖の V L ドメインおよび V H ドメインが互いに結合することを実質的にまたは完全に妨げるように選択される。従って、第一のポリペプチド鎖の V L ドメインおよび V H ドメインは、お互いに対して実質的にまたは完全に結合できない。同様に第二のポリペプチド鎖の V L ドメインおよび V H ドメインは、お互いに対して実質的にまたは完全に結合できない。好ましい介在スペーサペプチド (リンカー 1) は GGGSGGGG という配列 (配列番号 1) を有する。

【 0 0 5 1 】

システイン含有第 2 の介在スペーサペプチド (リンカー 2) は、1、2、3 またはそれ以上のシステイン残基を含む。好ましいシステイン含有介在スペーサペプチド (リンカー 2) は配列番号 2 : GGCGGG の配列を有する。

10

【 0 0 5 2 】

互いに異なる第一のポリペプチド及び第二のポリペプチドのヘテロ二量体促進性ドメインは、お互いと会合するように設計され、それによって、第一のポリペプチド鎖および第二のポリペプチド鎖の会合を促進する。従って、好ましい実施形態では、これらのポリペプチド鎖のうちの 1 つは、残基が p H 7 では負の荷電を形成するヘテロ二量体促進性「E コイル」ドメイン (配列番号 3) :

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

を含むように設計され、2 つのポリペプチド鎖のうちの他方は、残基が p H 7 では正の荷電を形成するヘテロ二量体促進性「K コイル」ドメイン (配列番号 4) :

KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

20

を含むように設計される。このような荷電されたドメインの存在は、第一のポリペプチドと第二のポリペプチドとの間の会合を促進し、これによってヘテロ二量体化が助長される。第一および第二のポリペプチド鎖で使用されるコイルが異なり、これによってこれらのポリペプチド鎖の間のヘテロ二量体化が助長される限りは、どちらのコイルがどちらの鎖に提供されるかは重要ではない。

【 0 0 5 3 】

1 . g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ「DART - 1」

「DART - 1」と称する、好ましい g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディの第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は、以下の配列を有するポリペプチドドメインを含む。

【 0 0 5 4 】

30

C D 3 に結合する抗体の V L ドメイン (V L _{CD3}) (配列番号 5) :

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGKTLTVLG

【 0 0 5 5 】

V L _{CD3} の抗原結合ドメインは、RSSTGAVTTSNYAN という配列 (配列番号 6) を有する C D R 1、GTNKRAP という配列 (配列番号 7) を有する C D R 2、及び ALWYSNLWV という配列 (配列番号 8) を有する C D R 3 を含む。

【 0 0 5 6 】

C D 3 に結合する抗体の V H ドメイン (V H _{CD3}) (配列番号 9) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKY
NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS
WFAYWGQGLTLTVSS

40

【 0 0 5 7 】

V H _{CD3} の抗原結合ドメインは、TYAMN という配列 (配列番号 10) を有する C D R 1、RIRSKYNNYATYYADSVKD という配列 (配列番号 11) を有する C D R 2、及び HGNFGNSYVSWFAY という配列 (配列番号 12) を有する C D R 3 を含む。

【 0 0 5 8 】

g p A 3 3 に結合するマウス抗体の V L ドメイン (V L _{gpA33}) (配列番号 13) :

QIVLTQSPAIMSASPERVTMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS
GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELK

50

【 0 0 5 9 】

V L_{gpA33}の抗原結合ドメインは、SARSSISFMYという配列（配列番号14）を有するCDR1、DTSNLASという配列（配列番号15）を有するCDR2、及びQQWSSYPLTという配列（配列番号16）を有するCDR3を含む。

【 0 0 6 0 】

g p A 3 3 に結合するマウス抗体のV Hドメイン（V H_{gpA33}）（配列番号17）：
 QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGD
 GETNYNGKFKDKATLTADKSSTTAYMELSSLTSVDSAVYFCARIYGNVYFDVWG
 AGTTVTVSS

【 0 0 6 1 】

V H_{gpA33}の抗原結合ドメインは、GSWMNという配列（配列番号18）を有するCDR1、RIYPGDGETNYNGKFKDという配列（配列番号19）を有するCDR2、及びIYGNVYFDVという配列（配列番号20）を有するCDR3を含む。

【 0 0 6 2 】

第1の介在スペーサペプチド（リンカー1）はGGGSGGGGという配列（配列番号1）を有する。システイン含有スペーサペプチド（リンカー2）はGGCGGGという配列（配列番号2）を有する。

【 0 0 6 3 】

第1のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進性ドメインは「Eコイル」ドメイン（配列番号3）である。第2のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進性ドメインは「Kコイル」ドメイン（配列番号4）である。

【 0 0 6 4 】

従って、D A R T - 1の第1のポリペプチド鎖は次の配列（配列番号21）を有する。

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNK
 RAPWTPARFSGSLLGGKAAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG
 GGGSGGGGQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPGQGLEW
 IGR IYPGDGETNYNGKFKDKATLTADKSSTTAYMELSSLTSVDSAVYFCARIYGN
 NVYFDVWGAGTTVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

【 0 0 6 5 】

上記の内容からわかるように、配列番号21の残基1～110は、CD3に結合する抗体のV Lドメイン（V L_{CD3}）（配列番号5）であり、配列番号21の残基111～118は、第1の介在スペーサペプチド（リンカー1）（配列番号1）であり、配列番号21の残基119～237は、g p A 3 3 に結合するマウス抗体のV Hドメイン（V H_{gpA33}）（配列番号17）であり、配列番号21の残基238～243は、システイン含有スペーサペプチド（リンカー2）（配列番号2）であり、及び配列番号21の残基244～271は、ヘテロ二量体促進性「Eコイル」ドメイン（配列番号3）である。

【 0 0 6 6 】

D A R T - 1の第1のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列（配列番号22）を有する。

caggctgtggtgactcaggagccttcaactgaccgtgtccccaggcggaaactgtga
 ccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacgccaattg
 ggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgatcgggggtacaaacaaa
 agggctccctggacccctgcacggttttctggaagtctgctggcggaaggccg
 ctctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgatfactattgtgctct
 gtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgctggga
 ggtggtggatccggcggaggaggacaggtccagctgcagcagctctggacctgagc
 tgggaagcttggggctcagtgaaagatttctgcaaagcttcaggctacacatt
 cagtggctcttggatgaactgggtgaagcagaggcctggacagggtcttgagtgg
 attggacggatctacctggagatggagaaactaactacaatgggaagttaagg
 acaaggccacactgactgcagacaaatcatccaccacagcctacatggagctcag

10

20

30

40

50

cagcctgacctctgtggactctgcggtctat t t t c t g t g c a a g a a t c t a t g g t a a t
 aacg t t t a c t t c g a t g t c t g g g g c g c a g g g a c c a c g g t c a c c g t g t c t t c c g g a g
 g a t g t g g c g g t g g a g a a g t g g c c g c a c t g g a g a a a g a g g t t g c t g c t t t g g a g a a
 g g a g g t c g t g c a c t t g a a a a g g a g g t c g c a g c c c t g g a g a a a

【 0 0 6 7 】

D A R T - 1 の第 2 のポリペプチド鎖は次の配列 (配列番号 2 3) を有する。

QIVLTQSPA IMSASPGERVMTCSARSS ISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLAS
 GVPVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELKRGGG
 SGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVAR
 I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N S L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G
 N S Y V S W F A Y W G Q G T L V T V S S G G C G G G K V A A L K E K V A A L K E K V A A L K E K V A A L K E

10

【 0 0 6 8 】

上記の内容からわかるように、配列番号 2 3 の残基 1 ~ 1 0 7 は、g p A 3 3 に結合するマウス抗体の V L ドメイン (V L_{g p A 3 3}) (配列番号 1 3) であり、配列番号 2 3 の残基 1 0 8 ~ 1 1 5 は、第 1 の介在スペーサペプチド (リンカー 1) (配列番号 1) であり、配列番号 2 3 の残基 1 1 6 ~ 2 4 0 は、C D 3 に結合する抗体の V H ドメイン (V H_{C D 3}) (配列番号 9) であり、配列番号 2 3 の残基 2 4 1 ~ 2 4 6 は、システイン含有スペーサペプチド (リンカー 2) (配列番号 2) であり、及び配列番号 2 3 の残基 2 4 7 ~ 2 7 4 は、ヘテロ二量体促進性「K コイル」ドメイン (配列番号 4) である。

【 0 0 6 9 】

20

D A R T - 1 の第 2 のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列 (配列番号 2 2) を有する。

caaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaggg
 tcacatgacctgcagtgccaggcaagtataagtttcatgtactggtaccagca
 gaagccaggatcctccccagactcctgat t t a t g a c a c a t c c a a c c t g g c t t c t
 ggagtccctgttgccttcagtgccagtggtctgggacctctattctctcacia
 tcagccggaatggaggctgaagatgctgccacttat t a c t g c c a g c a g t g g a g t a g
 ttaccactcacgttcggttctgggaccaagctggagctgaaacgggggtggagga
 tccggcggaggcggagaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggccagc
 ctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcaacacata
 cgc t a t g a a t t g g g t c c g c c a g g c t c c a g g g a a g g g g c t g g a g t g g g t t g c a a g g
 a t c a g g t c c a a g t a c a a c a a t t a t g c a a c c t a c t a t g c c g a c t c t g t g a a g g a t a
 g a t t c a c c a t c t c a a g a g a t g a t t c a a a g a a c t c a c t g t a t c t g c a a a t g a a c a g
 c c t g a a a a c c g a g g a c a c g g c c g t g t a t t a c t g t g t g a g a c a c g g t a a c t t c g g c
 a a t t c t t a c g t g t c t t g g t t t g c t t a t t g g g g a c a g g g g a c a c t g g t g a c t g t g t
 c t t c c g g a g g a t g t g g c g g t g g a a a a g t g g c c g c a c t g a a g g a g a a a g t t g c t g c
 t t t g a a a g a g a a g g t c g c c g c a c t t a a g g a a a a g g t c g c a g c c c t g a a a g a g

30

【 0 0 7 0 】

2 . g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ「D A R T - 2」

「D A R T - 2」と称する、第 2 の好ましい g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディの第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖は、以下の配列を有するポリペプチドドメインを含む。

40

【 0 0 7 1 】

C D 3 に結合する抗体の V L ドメイン (V L_{C D 3}) (配列番号 5) :

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLI GG TNK
 R A P W T P A R F S G S L L G G K A A L T I T G A Q A E D E A D Y Y C A L W Y S N L W V F G G G T K L T V L G

【 0 0 7 2 】

V L_{C D 3} の抗原結合ドメインは、RSSTGAVTTSNYANという配列 (配列番号 6) を有する C D R 1、GTNKRAPという配列 (配列番号 7) を有する C D R 2、及びALWYSNLWVという配列 (配列番号 8) を有する C D R 3 を含む。

50

【 0 0 7 3 】

C D 3 に結合する抗体の V H ドメイン (V H_{CD3}) (配列番号 2 5) :

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWWVQAPGKGLEWVGRIRSKY
 NNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVS
 WFAYWGQGLTVTVSS

【 0 0 7 4 】

V H_{CD3} の抗原結合ドメインは、TYAMN という配列 (配列番号 1 0) を有する C D R 1、RIRSKYNNYATYYADSVKD という配列 (配列番号 1 1) を有する C D R 2、及び HGNFGNSYVSWFAY という配列 (配列番号 1 2) を有する C D R 3 を含む。

【 0 0 7 5 】

上述したヒト g p A 3 3 に結合するマウス抗体は、好ましいダイアボディ D A R T - 2 の V L および V H ドメインを提供するためにヒト化される。これらのヒト化ドメインは次のとおりである。

【 0 0 7 6 】

g p A 3 3 に結合するヒト化抗体の V L ドメイン (V L_{gpA33}) (配列番号 2 6) :

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSARSSISFMYWYQKPKGAPKLLIYDTSNLAS
 GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK

【 0 0 7 7 】

V L_{gpA33} の抗原結合ドメインは、SARSSISFMY という配列 (配列番号 1 4) を有する C D R 1、DTSNLAS という配列 (配列番号 1 5) を有する C D R 2、及び QQWSSYPLT という配列 (配列番号 1 6) を有する C D R 3 を含む。

【 0 0 7 8 】

g p A 3 3 に結合するヒト化抗体の V H ドメイン (V H_{gpA33}) (配列番号 2 7) :

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSMNWWVQAPGQGLEWIGRIYPGD
 GETNYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARIYGNNVYFDVWG
 QGTTVTVSS

【 0 0 7 9 】

V H_{gpA33} の抗原結合ドメインは、GSWMN という配列 (配列番号 1 8) を有する C D R 1、RIYPGDGETNYNGKFKD という配列 (配列番号 1 9) を有する C D R 2、及び IYGNNVYFDV という配列 (配列番号 2 0) を有する C D R 3 を含む。

【 0 0 8 0 】

第 1 の介在スペーサペプチド (リンカー 1) は GGGSGGGG という配列 (配列番号 1) を有する。システイン含有スペーサペプチド (リンカー 2) は GCGGG という配列 (配列番号 2) を有する。

【 0 0 8 1 】

第 1 のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進性ドメインは「Eコイル」ドメイン (配列番号 3) である。第 2 のポリペプチド鎖のヘテロ二量体促進性ドメインは「Kコイル」ドメイン (配列番号 4) である。

【 0 0 8 2 】

従って、D A R T - 2 の第 1 のポリペプチド鎖は次の配列 (配列番号 2 8) を有する。

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWWQKPGQAPRGLIGGTNK
 RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG
 GGGSGGGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSMNWWVQAPGQGLEW
 IGR IYPGDGETNYNGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARIYGN
 NVYFDVWGQGTTVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

【 0 0 8 3 】

上記の内容からわかるように、配列番号 2 8 の残基 1 ~ 1 1 0 は、C D 3 に結合する抗体の V L ドメイン (V L_{CD3}) (配列番号 5) であり、配列番号 2 8 の残基 1 1 1 ~ 1 1 8 は、第 1 の介在スペーサペプチド (リンカー 1) (配列番号 1) であり、配列番号 2 8 の残基 1 1 9 ~ 2 3 7 は、g p A 3 3 に結合する抗体の V H ドメイン (V H_{gpA33}) (配

10

20

30

40

50

列番号 27) であり、配列番号 28 の残基 238 ~ 243 は、システイン含有スパーサペプチド (リンカー 2) (配列番号 2) であり、及び配列番号 28 の残基 244 ~ 271 は、ヘテロ二量体促進性「Eコイル」ドメイン (配列番号 3) である。

【0084】

DART - 2 の第 1 のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列 (配列番号 29) を有する。

```
caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtcccaggcggaaactgtga
ccctgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaatg
ggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgatcgggggtacaaacaaa
agggtccctggacccctgcacggttttctggaagtctgctggcggaaggccg
ctctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctct
gtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcaciaaactgactgtgctggga
ggtggtggatccggcggagggtggacagggtccagctggccagagcggggccgaag
tcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctcctgcaaagcatcaggctatacatt
tacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccaggacagggactggagtgg
atcgggcgcatctacctggagacggcgaaactaactataatggaaagtcaaaag
accgagtgaccatcacagccgataagctacttagtaccgcctacatggagctgag
ctccctcggtctgaagataccgccgtctactattgctgtagaatttacggaaac
aatgtctatfttgacgtgtggggcagggacaactgtgactgtctcctccggag
gatgtggcgggtggagaagtggccgcactggagaaaagggtgtgctttggagaa
ggaggtcgtgcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaa
```

10

20

【0085】

DART - 2 の第 2 のポリペプチド鎖は次の配列 (配列番号 30) を有する。

```
DIQLTQSPSFLSASVDRVTITCSARSSISFMYWYQQKPKAPKLLIYDTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSELEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGS
GGGGEVQLLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKLEWVGR
RSKYNNTATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGN
SYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
```

【0086】

上記の内容からわかるように、配列番号 30 の残基 1 ~ 106 は、gpA33 に結合する抗体の VL ドメイン (VL_{gpA33}) (配列番号 26) であり、配列番号 30 の残基 107 ~ 114 は、第 1 の介在スパーサペプチド (リンカー 1) (配列番号 1) であり、配列番号 30 の残基 115 ~ 239 は、CD3 に結合する抗体の VH ドメイン (VH_{CD3}) (配列番号 25) であり、配列番号 30 の残基 240 ~ 245 は、システイン含有スパーサペプチド (リンカー 2) (配列番号 2) であり、及び配列番号 30 の残基 246 ~ 273 は、ヘテロ二量体促進性「Kコイル」ドメイン (配列番号 4) である。

30

【0087】

DART - 2 の第 2 のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列 (配列番号 31) を有する。

```
gacattcagctgactcagtcacctcttttctgtccgcatccgtcggagatcgag
tgactattacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggatcagca
gaagcccggcaagcacctaagctgctgatctacgacacaagcaacctggcctcc
ggggtgccatctcgggtctctggcagtggtcaggaactgagttacctgacaa
ttagctccctggaggctgaagatgccgctacctactattgccagcagtgagcag
ctatcctctgaccttcggacaggggactaaactggaaatcaaggggtggaggatcc
ggcggcggaggcaggtgcagctggtggagtctgggggaggcttggccagcctg
gagggctccctgagactcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatagc
tatgaattgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtgggttggaggatc
aggtccaagtaacaatatgcaacctactatgccgactctgtgaaggatagat
tcacatctcaagagatgatcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcct
```

40

50

gaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaat
tcttacgtgtcttggtttgcttatggggacaggggacactggtgactgtgtctt
ccggaggatgtggcgggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagtgtctgcttt
gaaagagaaggtcgccgcacttaaggaaaaggtcgagccctgaaagag

【 0 0 8 8 】

3 . アルブミン結合ドメイン (A B D) を有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価
ダイアボディ (「 D A R T - 2 w / A B D 」)

本発明の他の実施形態において、 g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディはアルブミン結合ドメイン (A B D) を含むことができる (A B D 含有 g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ) 。

10

【 0 0 8 9 】

国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 8 6 8 7 号に開示されているように、ダイアボディ分子のインビボ薬物動態特性を改善するために、ダイアボディ分子を、ダイアボディ分子の末端のうちの一つ又は複数に血清結合タンパク質のポリペプチド部分を含有するように修飾してよい。最も好ましくは、このような血清結合タンパク質のポリペプチド部分は、ダイアボディ分子の C 末端に配置されることになる。この目的のために特に好ましい血清結合タンパク質のポリペプチド部分は、連鎖球菌タンパク質 G からアルブミン結合ドメイン (A B D) である。連鎖球菌株 G 1 4 8 のタンパク質 G のアルブミン結合ドメイン 3 (A B D 3) が特に好ましい。

【 0 0 9 0 】

20

連鎖球菌株 G 1 4 8 のタンパク質 G のアルブミン結合ドメイン 3 (A B D 3) は、安定した 3 重螺旋束を形成する 4 6 個のアミノ酸残基からなり、広範なアルブミン結合特異性を有する (Johansson, M.U. et al. (2002) " Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules, " J. Biol. Chem. 277(10):8114 8120) 。 アルブミンは、血漿中に最も豊富なタンパク質であり、ヒトにおいて 1 9 日の半減期を有する。アルブミンは複数の小さな分子結合部位を有し、これによりアルブミンは他のタンパク質に非共有結合して血清半減期を延長できる。

【 0 0 9 1 】

従って、アルブミン結合ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖又は第 2 のポリペプチド鎖は、第 3 のリンカー (リンカー 3) を含有し、これは上記ポリペプチド鎖の E コイル (又は K コイル) をアルブミン結合ドメインから分離する。このようなリンカー 3 に関する好ましい配列は、GGGS (配列番号 3 2) 又は GGGNS (配列番号 3 3) である。好ましいアルブミン結合ドメイン (A B D) は、以下の配列 (配列番号 3 4) を有する。

30

LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

【 0 0 9 2 】

このような本発明の形態を例示するために、上述の D A R T - 2 の第 1 のポリペプチド鎖を、アルブミン結合ドメインを含有するように修飾し、「 D A R T - 2 w / A B D 」と称する、アルブミン結合ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディとした。

40

【 0 0 9 3 】

D A R T - 2 w / A B D の第 1 のポリペプチド鎖は次のアミノ酸配列 (配列番号 3 5) を有する。

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNK
RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG
GGGSGGGGQVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGSWMNWRQAPGGGLEW
IGRIYPGDGETNYNGKFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGN
NVYFDVWGQTTVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGS
LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

【 0 0 9 4 】

50

上記の内容からわかるように、配列番号35の残基1~271は、DART-2の残基1~271と同一であり、従って、N末端からC末端方向へ向かって、CD3に結合する抗体のVLドメイン(VL_{CD3}) (配列番号5)、第1の介在スペーサペプチド(リンカー1) (配列番号1)、gpA33に結合する抗体のVHドメイン(VH_{gpA33}) (配列番号27)、システイン含有スペーサペプチド(リンカー2) (配列番号2)、ヘテロ二量体促進性「Eコイル」ドメイン(配列番号3)及びC末端を備える。残基272~275はリンカー3(配列番号32)であり、及び残基276~321はアルブミン結合ドメイン(配列番号34)である。

【0095】

DART-2w/ABDの第1のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列(配列番号36)を有する。

```
caggctgtggtagactcaggagccttcaactgaccgtgtccccaggcggaactgtga
ccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacgccaattg
ggtagcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgatcgggggtacaaacaaa
agggctccccggacccctgcacgggttttctggaagtctgctgggcggaaggccg
ctctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctct
gtggtagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaacactgactgtgctggga
gggggtggatccggcgagggtggacaggtccagctgggtccagagcggggccgaag
tcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctcctgcaaagcatcaggctatacatt
tacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccaggacagggactggagtgg
atcgggcgcatctaccctggagacggcgaaactaactataatggaaagttaaag
accgagtgaccatcacagccgataagcttactagtaccgctacatggagctgag
ctccctcggtctgaagataccgccgtctactattgctgtagaatttacggaaac
aatgtctattttgacgtgtggggcagggacaactgtgactgtctcctccggag
gatgtggcgttgagaagtggccgcactggagaaagagggtgctgctttggagaa
ggaggctgctgcacttgaaggagggtcgagccctggagaaaggcggcggtct
ctggcccaggcaaaaaggcagccatccgcgaactggataaataatggcgtgagcg
attattataagaacctgattgacaacgcaaaatccgcggaaggcgtgaaagcact
gattgatgaaattctggccgccctgcct
```

10

20

30

【0096】

DART-2w/ABDの第2のポリペプチド鎖は上述したDART-2の第2のポリペプチド鎖と同じである(配列番号30)。

【0097】

B.IgG Fcドメインを有するgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ(「DART-2w/Fc」)

さらに他の実施形態において、本発明は、IgG Fcドメインを有するgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディを提供する。このようなダイアボディは、「gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ」と引用することもある。本発明のFcダイアボディのFcドメインは、完全なFc領域(例えば、完全なIgGのFc領域)であっても、または完全なFc領域のフラグメントのみであってもよい。本発明の二重特異性の1価のFcダイアボディのFcドメインは、1つ以上のFc受容体(例えば、FcR(単数または複数))に結合する能力を保有し得、さらに好ましくはこのようなFcドメインは、FcRIA(CD64)、FcRIIA(CD32A)、FcRIIB(CD32B)、FcRIIIA(CD16a)またはFcRIIIB(CD16b)に対する結合の低下(野性型Fc領域によって示される結合に対して)を生じるか、またはこのようなFcドメインがこのような受容体(単数または複数)に結合する能力を実質的に取り除く。本発明の二重特異性の1価のFcダイアボディのFcドメインは、完全なFc領域のいくつかのもしくは全てのCH2ドメインおよび/またはいくつかのもしくは全てのCH3ドメインを含んでもよいし、あるいは改変体CH2および/または改変体CH3の配列(これは、例えば、完全なFc領域のCH2もしくはCH3ドメインに対して、

40

50

1つ以上の挿入および/または1つ以上の欠失を含んでもよい)を含んでもよい。本発明の二重特異性の一価のFcダイアボディのFcドメインは、非-Fcポリペプチド部分を含んでもよく、または天然ではない完全なFc領域の一部を含んでもよく、またはCH2および/もしくはCH3ドメインの天然には存在しない方向性を含んでもよい(例えば、2つのCH2ドメインもしくは2つのCH3ドメイン、またはN末端からC末端方向へ向かって、CH2ドメインに連結されたCH3ドメインなど)。

【0098】

バージョン1と表記され、図2Aに示された第1の実施形態において、例示的なgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、N末端、gpA33又はCD3のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン(すなわち、VL_{gpA33}又はVL_{CD3}のいずれか)、介在スペーサペプチド(リンカー1)、gpA33(当該第1のポリペプチド鎖がVL_{CD3}を含む場合)又はCD3(当該第1のポリペプチド鎖がVL_{gpA33}を含む場合)のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン、システイン含有第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)、ヘテロ二量体促進性ドメイン、スペーサペプチド(リンカー5)、システイン含有ペプチド(ペプチド1)、IgGFcドメイン(好ましくは、抗体のFc領域のCH2ドメイン及びCH3ドメインの全部又は一部)、及びC末端を含むことができる。

10

【0099】

バージョン2と表記され、図2Bに示された第2の実施形態において、例示的なgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、N末端、システイン含有ペプチド(ペプチド1)、IgGFcドメイン(好ましくは、抗体のFc領域のCH2ドメイン及びCH3ドメインの全部又は一部)、介在スペーサペプチド(リンカー4)、gpA33又はCD3のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン(すなわち、VL_{gpA33}又はVL_{CD3}のいずれか)、介在スペーサペプチド(リンカー1)、gpA33(当該第1のポリペプチド鎖がVL_{CD3}を含む場合)又はCD3(当該第1のポリペプチド鎖がVL_{gpA33}を含む場合)のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン、システイン含有第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)、ヘテロ二量体促進性ドメイン、及びC末端を含むことができる。

20

【0100】

好ましくは、いずれかの実施形態において、第1のポリペプチド鎖のFcドメインは、FcRIA(CD64)、FcRIIA(CD32A)、FcRIIB(CD32B)、FcRIIIA(CD16a)またはFcRIIIB(CD16b)に対する結合の低下(野性型Fc領域によって示される結合に対して)を生じるか、またはこのようなFcドメインがこのような受容体(単数または複数)に結合する能力を実質的に取り除く。

30

そのような変更された結合を媒介できるFc変異及び突然変異型は、当該分野で周知であり、位置234および235のアミノ酸置換、位置265のアミノ酸置換、または位置297のアミノ酸置換を含む(例えば、参照によって本明細書に援用される、米国特許第5,624,821号を参照)。好ましい実施形態では、CH2ドメインおよびCH3ドメインは、位置234でアラニンによる置換、および位置235でアラニンによる置換を含む。

40

【0101】

例示的なgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ(バージョン1及びバージョン2)の第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、N末端、CD3又はgpA33のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン(すなわち、ダイアボディの第1のポリペプチド鎖について選択されたVLドメインにより決まるVL_{gpA33}又はVL_{CD3}のいずれか)、介在スペーサペプチド(リンカー1)、CD3(当該第2のポリペプチド鎖がVL_{gpA33}を含む場合)又はgpA33(当該第2のポリペプチド鎖がVL_{CD3}を含む場合)のいずれかに結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン、システイン含有スペーサペプチド(リンカー2)、ヘテロ二量体促進性ドメイン(好ましくは

50

、Kコイルドメイン)及びC末端を含むことができる。

【0102】

例示的なgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ(バージョン1及びバージョン2)は、さらに第3のポリペプチド鎖を含むことができ、第3のポリペプチド鎖は、N末端からC末端の方向に、N末端、システイン含有ペプチド(ペプチド1)、第1のポリペプチド鎖のFcドメインのものと同一アイソタイプを有するIgGのFcドメイン(好ましくは、抗体のFc領域のCH2ドメイン及びCH3ドメインの全部又は一部)、及びC末端を含む。好ましくは、第3のポリペプチド鎖のFcドメインは、例示的なgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第1のポリペプチド鎖において上述したように、FcRIIA(CD64)、FcRIIA(CD32A)、FcRIIB(CD32B)、FcRIIIA(CD16a)またはFcRIIIB(CD16b)に対する結合の低下(野性型のFc領域によって示される結合に対して)を生じるか、またはこのようなFcドメインが、このような受容体(単数または複数)に結合する能力を実質的に取り除く。

10

【0103】

任意に存在する介在スペーサペプチド(リンカー4)は、APSSSというアミノ酸配列(配列番号37)を含むことが好ましく、APSSSPMEというアミノ酸配列(配列番号38)を含むことがさらに好ましい。

【0104】

第1及び第3のポリペプチド鎖のシステイン含有ペプチド(ペプチド1)は、同じアミノ酸配列から構成されても、または異なるアミノ酸配列から構成されてもよく、1、2、3またはそれ以上のシステイン残基を含む。特に好ましいペプチド1は、DKTHTCPPCPというアミノ酸配列(配列番号39)を有する。

20

【0105】

介在スペーサペプチド(リンカー1)は、上記のとおり配列番号1の配列を有することが好ましい。システイン含有第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)は、上記のとおり、配列番号2の配列を有することが好ましい。

【0106】

gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第一及び第二のポリペプチドのヘテロ二量体促進性ドメインは、上述したEコイルドメイン(配列番号3)及びKコイルドメイン(配列番号4)であり、上述したとおり、一方のポリペプチド鎖にEコイルドメインが選択されると、他方がKコイルドメインを保有する。

30

【0107】

好ましいスペーサペプチド(リンカー5)はGGGという配列(配列番号33)を有する。

【0108】

第1及び第3のポリペプチドのCH2及び/又はCH3ドメインは同一である必要はなく、有利には2つのポリペプチド鎖間の錯体形成を促進するために修飾される。例えば、CH2又はCH3ドメインにアミノ酸置換(好ましくは「ノブ(knob)」を形成する嵩高な側鎖基、例えばトリプトファンを含むアミノ酸による置換)を導入して、立体障害により、同様に変異させたドメインとの相互作用を防止し、上記変化させたドメインを、相補的な又は適応した変異(例えばグリシンによる置換)を施されたドメイン、即ち「ホール(hole)」とペアにすることができる。このような一連の変化は、二重特異性1価Fcダイアボディ分子を構成するポリペプチドのいずれのペアに施すことができ、また更に、上記ペアのポリペプチド鎖のいずれの部分に施すことができる。ホモ二量体化を抑えてヘテロ二量体化を促進するためのタンパク質加工の方法は、特に免疫グロブリン様分子の加工に関して当該技術分野で公知であり、本明細書に包含される(例えば、Ridgway et al. (1996) " 'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Dis

40

50

play Library,” J. Mol. Biol. 270: 26-35, and Xie et al. (2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” J. Immunol. Methods 296:95-101を参照(これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に援用される)。好ましくは、「ノブ」は第1のポリペプチド鎖のCH₂ CH₃ドメインに加工され、「ホール」は第3のポリペプチド鎖のCH₂ CH₃ドメインに加工される。従って「ノブ」は、第1のポリペプチド鎖がそのCH₂及び/又はCH₃ドメインを介してホモ二量体化するのを防止する役割を果たすことになる。第3のポリペプチド鎖は好ましくは「ホール」置換基を含有するため、第1のポリペプチド鎖とヘテロ二量体化し、かつそれ自体とホモ二量体化する。好ましいノブは、天然IgGのFc領域のFcドメインを修飾して修飾基T366Wを含有させることによって生成される。好ましいホールは、天然IgGのFc領域のFcドメインを修飾して修飾基T366S、L368A及びY407Vを含有させることによって生成される。第3のポリペプチド鎖ホモ二量体を、第1、第2及び第3のポリペプチド鎖を含む最終的な二重特異性1価Fcダイアボディから精製するのを補助するために、好ましくは、第3のポリペプチド鎖のCH₂及びCH₃ドメインのタンパク質A結合部位を、位置435(H435R)におけるアミノ酸置換によって変異させる。第1、第2および第3のポリペプチド鎖を含んでいる最終的な二重特異性1価Fcダイアボディから第3のポリペプチド鎖ホモ二量体を精製することを補助するために、第3のポリペプチド鎖のCH₂及びCH₃ドメインのプロテインA結合部位を、好ましくは、アミノ酸置換によって変異する。このようにして、第3のポリペプチド鎖ホモ二量体はタンパク質Aに結合せず、その一方で二重特異性1価Fcダイアボディは、第1のポリペプチド鎖のタンパク質A結合部位を介してタンパク質Aに結合する能力を有したままとなる。

10

20

【0109】

第1のポリペプチド鎖中に存在する抗体FcドメインのCH₂及びCH₃ドメインに関する好ましい配列は、以下の配列番号40である。

```
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

30

【0110】

第3のポリペプチド鎖中に存在する抗体FcドメインのCH₂及びCH₃ドメインに関する好ましい配列は、以下の配列番号41である。

```
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDSGFFLVSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK
```

【0111】

1. DART-2w/Fcバージョン1

「DART-2w/Fcバージョン1」と称する、gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディの第1、第2及び第3のポリペプチド鎖は、以下の配列を有するポリペプチドドメインを含む。

40

【0112】

DART-2w/Fcバージョン1の第1のポリペプチド鎖は次のアミノ酸配列(配列番号42)を有する。

```
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSARSSISFMYWYQQKPKGKAPKLLIYDTSNLAS
GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGS
GGGGEVQLVESGGGLVQPGLSLRSLCAASGFTTFSTYAMNWRQAPGKLEWVGRIR
SKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGN
SYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGG
GDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
```

50

FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

【 0 1 1 3 】

上記の内容からわかるように、配列番号 4 2 の残基 1 ~ 1 0 6 は、g p A 3 3 に結合する抗体の V L ドメイン (V L _{gpA33}) (配列番号 2 6) であり、配列番号 4 2 の残基 1 0 7 ~ 1 1 4 は、第 1 の介在スペーサペプチド (リンカー 1) (配列番号 1) であり、配列番号 4 2 の残基 1 1 5 ~ 2 3 9 は、C D 3 に結合する抗体の V H ドメイン (V H _{CD3}) (配列番号 2 5) であり、配列番号 4 2 の残基 2 4 0 ~ 2 4 5 は、システイン含有スペーサペプチド (リンカー 2) (配列番号 2) であり、配列番号 4 2 の残基 2 4 6 ~ 2 7 3 は、ヘテロ二量体促進性「 E コイル」ドメイン (配列番号 3) であり、配列番号 4 2 の残基 2 7 4 ~ 2 7 6 は、スペーサペプチド (リンカー 5) (配列番号 3 3) であり、配列番号 4 2 の残基 2 7 7 ~ 2 8 6 は、ペプチド 1 (配列番号 3 9) であり、配列番号 4 2 の残基 2 8 7 ~ 5 0 3 は、抗体の F c ドメインの C H 2 及び C H 3 ドメインについての配列 (配列番号 4 0) である。

10

【 0 1 1 4 】

D A R T - 2 w / F c バージョン 1 の第 1 のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列 (配列番号 4 3) を有する。

gacattcagctgactcagtcacccctctttctgtccgcatccgtcggagatcgag
 tgactattacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggatcagca
 gaagcccggcaaacacctaagctgctgactacgacacaagcaacctggcctcc
 ggggtgccatctcggttctctggcagtggtcaggaactgagttaccctgacaa
 ttagctcccggaggctgaagatgccgctacctactatggcagcagtgagcag
 ctatcctctgacctcggacaggggactaaactggaaatcaagggtgaggatcc
 ggcgggaggcaggtgcagctggaggctctggggaggcttggccagcctg
 gaggtcccagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgc
 tatgaaatgggtccgccaggctccaggaagggcaggagtggttggaaaggatc
 aggtccaagtacaacaatatgcaacctactatgccgactctgtgaaggatagat
 tcacatctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcct
 gaaaaccgaggacacggcctgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaat
 tcttacgtgtcttggtttgcttatggggacaggggacactggtgactgtgtctt
 ccggaggaatggcggaggagaagtgccgcactggagaaagagggtgctgcttt
 ggagaaggaggctcgtgcacttgaaaaggaggctgcagcccggagaaaggcggc
 ggggacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccgaagccgcggggggac
 cgtcagctctcctctccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccggac
 cctgaggtcacatgctggagggtggcagtgagccacgaagacctgaggtcaag
 tcaactggtagctggcggcgtggaggtgataatgccaagacaaagccgagg
 aggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacca
 ggactggctgaaatggcaaggagtacaagtcaaggctccaacaaagccctcca
 gccccatcgagaaaacctctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacagg
 gtacacctgccccatcccggaggagatgaccaagaaccaggctcagcctgtg
 gtgctggcctcaaggctctatcccagcgacatcgccgtggaggggagagcaat
 gggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggct
 cctctctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaa
 cgtctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag
 agcctctcctgtctccgggtaaa

20

30

40

【 0 1 1 5 】

D A R T - 2 w / F c バージョン 1 の第 2 のポリペプチド鎖は次のアミノ酸配列 (配列番号 4 4) を有する。

50

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNK
 RAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG
 GGGSGGGGQVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGSMNWRQAPGGGLEW
 IGRIPYGDGETNYNGKFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARIYGN
 NVYFDVWGQGTTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

【0116】

上記の内容からわかるように、配列番号44の残基1~110は、CD3に結合する抗体のVLドメイン(VL_{CD3}) (配列番号5)であり、配列番号44の残基111~118は、第1の介在スペースペプチド(リンカー1) (配列番号1)であり、配列番号44の残基119~237は、gpA33に結合する抗体のVHドメイン(VH_{gpA33}) (配列番号27)であり、配列番号44の残基238~243は、システイン含有スペースペプチド(リンカー2) (配列番号2)であり、及び配列番号44の残基244~271は、ヘテロ二量体促進性「Kコイル」ドメイン(配列番号4)である。

10

【0117】

DART-2w/Fcバージョン1の第2のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列(配列番号45)を有する。

caggctgtggtagactcaggagccttcaactgaccgtgtcccaggcggaactgtgac
 ccctgacatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattg
 ggtagcagcagaagccaggacaggcaccaaggggcctgatcgggggtacaaacaaa
 agggctccctggacccctgcacgggttttctggaagtctgctgggaggaaaggccg
 ctctgactattaccggggcacaggccgaggacgaagccgattactattgtgctct
 gtggtagcaaatctgtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgctggga
 ggggtggatccggcggaggtagacaggtccagctggtagcagcggggccgaag
 tcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctcctgcaaagcatcaggctatacatt
 tacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccaggacagggactggagtgg
 atcgggcgcatctacctggagacggcgaaactaactataatggaaagtcaaaag
 accgagtgaccatcacagccgataagctctactagtaccgctacatggagctgag
 ctccctgcggtctgaagataccgcccgtctactattgcgctagaatttacggaaac
 aatgtctatfttgacgtgtggggcagggaaacaactgtgactgtctcctccggag
 gatgtggcggtagaaaagtggccgcactgaaggagaaaagtgtctgctttgaaaga
 gaaggtagccgcacttaaggaaaaggtagcagccctgaaagag

20

30

【0118】

DART-2w/Fcバージョン1の第3のポリペプチド鎖は次のアミノ酸配列(配列番号46)を有する。

DKHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTSCAVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRYTQKS
 LSLSPGK

【0119】

上記の内容からわかるように、配列番号46の残基1~10は、ペプチド1(配列番号39)であり、配列番号46の残基11~227は、抗体のFcドメインのCH2及びCH3ドメイン(配列番号41)である。

40

【0120】

DART-2w/Fcバージョン1の第3のポリペプチド鎖をエンコードする好ましいポリヌクレオチドは次の配列(配列番号47)を有する。

gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcaccatgaagccgcggggggaccgt
 cagctcttccctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccc
 tgaggtcacatgctgtgggtggtagcgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc
 aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggagg

50

agcagtacaacagcacgtaccgtgtgggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagga
 ctggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggctccaacaaagccctcccagcc
 cccatcgagaaaaccaatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacagggtg
 acacctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgagttg
 cgcagtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg
 cagccggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctcct
 tcttctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgt
 ctctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagc
 ctctccctgtctccgggtaaa

【 0 1 2 1 】

10

2 . D A R T - 2 w / F c バージョン 2

「DART - 2 w / F c バージョン 2」と称する、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの第 1、第 2 及び第 3 のポリペプチド鎖は、以下の配列を有するポリペプチドドメインを含む。その他の違いとしては、DART - 2 w / F c バージョン 1 は、ポリペプチド鎖の C H 2 および C H 3 の配列の位置が DART - 2 w / F c バージョン 2 と異なり、これらの配列が DART - 2 w / F c バージョン 1 では V L 及び V H 配列の C 末端側に配置されているのに対し、DART - 2 w / F c バージョン 2 では V L 及び V H 配列の N 末端側に配置されている。

【 0 1 2 2 】

そのような DART - 2 w / F c バージョン 2 の第 1 のポリペプチド鎖は次のアミノ酸配列 (配列番号 4 8) を有する。

20

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWWYDGVVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
 I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
 Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S
 L S L S P G K A P S S S P M E D I Q L T Q S P S F L S A S V G D R V T I T C S A R S S I S F M Y W Y Q Q K P G
 K A P K L L I Y D T S N L A S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L E A E D A A T Y Y C Q Q W S S Y P L
 T F G Q G T K L E I K G G S G G G G E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S T Y A M N W
 V R Q A P G K G L E W V G R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N S L Y L Q M N S L K T E
 D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y V S W F A Y W G Q G T L V T V S S G G C G G G K V A A L K E K V A A L K E K
 V A A L K E K V A A L K E

30

【 0 1 2 3 】

上記の内容からわかるように、配列番号 4 8 の残基 1 ~ 1 0 は、ペプチド 1 (配列番号 3 9) であり、配列番号 4 8 の残基 1 1 ~ 2 2 7 は、抗体の F c ドメインの C H 2 及び C H 3 ドメインについての配列 (配列番号 4 0) である。配列番号 4 8 の残基 2 2 8 ~ 2 3 5 は、介在スペーサペプチド (リンカー 4) (配列番号 3 8) であり、配列番号 4 8 の残基 2 3 6 ~ 3 4 1 は、g p A 3 3 に結合する抗体の V L ドメイン (V L_{g p A 3 3}) (配列番号 2 6) であり、配列番号 4 8 の残基 3 4 2 ~ 3 4 9 は、第 1 の介在スペーサペプチド (リンカー 1) (配列番号 1) であり、配列番号 4 8 の残基 3 5 0 ~ 4 7 4 は、C D 3 に結合する抗体の V H ドメイン (V H_{C D 3}) (配列番号 2 5) であり、配列番号 4 8 の残基 4 7 5 ~ 4 8 0 は、システイン含有スペーサペプチド (リンカー 2) (配列番号 2) であり、配列番号 4 8 の残基 4 8 1 ~ 5 0 8 は、ヘテロ二量体促進性「K コイル」ドメイン (配列番号 4) である。

40

【 0 1 2 4 】

DART - 2 w / F c バージョン 2 の第 2 のポリペプチド鎖は、DART - 2 の第 1 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列 (すなわち、配列番号 2 8 (既出)) を有する。

【 0 1 2 5 】

DART - 2 w / F c バージョン 2 の第 3 のポリペプチド鎖は、配列番号 4 6 (既出) のアミノ酸配列を有する。

【 0 1 2 6 】

50

[医薬組成物]

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に使用できるバルク薬剤組成物（例えば不純又は非滅菌組成物）、及び単位剤形の調製に使用できる医薬組成物（即ち被験体又は患者への投与に好適な組成物）を含む。これらの組成物は、予防的又は治療的有効量の上記の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ及び追加の治療剤、又はこのような作用剤と薬学的に許容可能なキャリアとの組み合わせを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防的又は治療的有効量の本発明の 1 つ又は複数の分子と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。

【 0 1 2 7 】

本発明はまた、上記の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ、及び特定の癌に関連した抗原に対して特異的である第 2 の治療用抗体（例えば癌抗原特異性モノクローナル抗体）、及び薬学的に許容可能なキャリアを含む、医薬組成物も包含する。

【 0 1 2 8 】

ある具体的実施形態では、用語「薬学的に許容可能な (p h a r m a c e u t i c a l l y a c c e p t a b l e) 」は、動物、より詳細にはヒトにおける使用に関して、連邦規制当局若しくは州政府によって承認されている、又は米国薬局方若しくは他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。用語「キャリア (c a r r i e r) 」は、希釈剤、アジュバント（例えばフロイントアジュバント（完全及び不完全））、賦形剤、又は治療薬の投与に用いられるビヒクルを指す。これらの薬学的キャリアは、水及び石油、動物油、植物油若しくは合成油を含む油（例えば落花生油、大豆油、鉱物油、胡麻油等）等の、無菌液体とすることができる。医薬組成物を静脈投与する場合、水が好ましいキャリアである。特に注射用溶液のための液体キャリアとして、食塩水、並びに水性デキストロース及びグリセロール溶液も採用できる。好適な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコレート、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等が挙げられる。必要な場合は、上記組成物は、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、又は p H 緩衝剤を含有することもできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳液、錠剤、ピル、カプセル、粉体、徐放性製剤等の形態を取ることができる。

【 0 1 2 9 】

一般に、本発明の組成物の成分は、例えば活性作用剤の量を示すアンプル又はサシェ等の気密性コンテナ中の凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、別個に、又は単位剤形にまとめて混合された状態で供給される。組成物を点滴によって投与する場合、組成物は、滅菌された薬学的グレードの水又は食塩水を内包する点滴ボトルを用いて吐出できる。組成物を注射によって投与する場合、投与前に成分を混合できるように、注射用無菌水又は食塩水のアンプルを提供できる。

【 0 1 3 0 】

本発明の組成物は、中性又は塩形態として処方できる。薬学的に許容可能な塩としては：塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等由来の陰イオンを有して形成されるもの、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-メチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等由来の陽イオンを有して形成されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 3 1 】

本発明はまた、上述の薬学的に許容可能なキャリアと併せて、上記の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディ（単独又は追加の治療剤と共に）で充填された 1 つ又は複数のコンテナを備える、医薬パック又はキットも提供する。更に、疾患の治療に有用な 1 つ又は複数の他の予防剤又は治療剤も、上記医薬パック又はキットに含めることができる。本発明はまた、本発明の医薬組成物の成分のうちの 1 つ又は複数で充填された 1 つ又は複数のコンテナを備える、医薬

10

20

30

40

50

パック又はキットも提供する。任意に、このような1つ又は複数のコンテナは、医薬製品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知と関連するものとすることができ、上記通知は、ヒトへの投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を反映したものである。

【0132】

本発明は、上述の方法において使用できるキットを提供する。一実施形態において、キットは、1つ又は複数の本発明の分子を含む。他の実施形態において、キットは更に、癌の治療に有用な1つ又は複数の他の予防剤又は治療剤を、1つ又は複数のコンテナ内に含む。さらに他の実施形態において、キットは更に、癌に関連する1つ又は複数の抗原に結合する1つ又は複数の抗体を含むことができる。特定の実施形態では、他の予防剤又は治療剤は、化学療法剤である。他の実施形態では、予防剤又は治療剤は生物学的治療剤又はホルモン療法剤である。

10

【0133】

[本発明の組成物の使用]

本発明の gpA33 × CD3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は gpA33 × CD3 二重特異性 1 価Fcダイアボディは、gpA33 の発現に関連する又は gpA33 の発現を特徴とするいずれの疾患又は状態を治療する能力を有する。従って、このような分子を含む医薬組成物は、限定するものではないが、結腸癌、大腸癌、及び膵臓癌の診断又は治療において採用してよい。

【0134】

20

[投与方法]

本発明の組成物は、有効量の医薬組成物を被験体に投与することによる、疾患、障害又は感染症に関連する1つ又は複数の症状の治療、予防及び改善のために提供できる。好ましい態様では、上記組成物は実質的に精製される（即ち上記組成物の効果を制限する、又は望ましくない副作用を生成する物質を実質的に含まない）。ある具体的実施形態では、被験体は動物、好ましくは非霊長類（例えばウシ属、ウマ科、ネコ科、イヌ科、齧歯類等）又は霊長類（例えばカニクイザル等のサル、ヒト等）といった哺乳類である。ある好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

【0135】

例えば抗体又は融合タンパク質を発現できるリポソーム、微粒子マイクロカプセル、組み換え細胞内へのカプセル化；受容体媒介性エンドサイトーシス（例えば、Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）；レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築等、様々な送達系が公知であり、本発明の組成物の投与に使用できる。

30

【0136】

本発明の gpA33 × CD3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は gpA33 × CD3 二重特異性 1 価Fcダイアボディを投与する方法としては：非経口投与（例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）；硬膜外；並びに粘膜（例えば鼻腔内及び経口経路）が挙げられるがこれらに限定されない。ある具体的実施形態では、本発明の分子は、筋肉内、静脈内又は皮下投与される。組成物は、いずれの便利な経路によって、例えば点滴又はボラス注射によって、上皮又は粘膜皮膚層（例えば口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を通じた吸収によって投与してよく、他の生物学的活性作用剤と共に投与してよい。投与は全身性又は局所性とする事ができる。更に、例えば吸入器又は噴霧器の使用及びエアロゾル化剤を用いた処方により、肺投与を採用することもできる。例えば米国特許第 6,019,968号；5,985,320号；5,985,309号；5,934,272号；5,874,064号；5,855,913号；5,290,540号；4,880,078号；国際公開第 92/19244号；97/32572号；97/44013号；98/31346号；99/66903を参照（これらはそれぞれ、参照により本明細書に援用される）。

40

50

【0137】

本発明はまた、本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディを、この分子の量を示すアンプル又はサシェ等の気密性コンテナ内に包装することも提供する。一実施形態では、本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、気密性コンテナ内の滅菌凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として供給され、例えば水又は食塩水を用いて、被験体への投与に適切な濃度へと再構成できる。好ましくは、本発明の g p A 3 3 × C D 3 ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 F c ダイアボディは、少なくとも 5 μg、より好ましくは少なくとも 10 μg、少なくとも 15 μg、少なくとも 25 μg、少なくとも 50 μg、少なくとも 100 μg 又は少なくとも 200 μg の単位剤形で、気密性コンテナ内の滅菌凍結乾燥粉末として供給される。

10

【0138】

凍結乾燥された本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、その元々のコンテナ内において 2 ~ 8 で保管するべきであり、またこの分子は、再構成後 12 時間以内、好ましくは 6 時間以内、5 時間以内、3 時間以内又は 1 時間以内に投与するべきである。ある代替実施形態では、本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、この分子、融合タンパク質又はコンジュゲート分子の量及び濃度を示す気密性コンテナ内に、液体形態で供給される。好ましくは、このような二重特異性 1 価ダイアボディ又は二重特異性 1 価 F c ダイアボディの液体形態は、少なくとも 1 μg / ml、より好ましくは少なくとも 2.5 μg / ml、少なくとも 5 μg / ml、少なくとも 10 μg / ml、少なくとも 50 μg / ml 又は少なくとも 100 μg / ml の濃度でこの分子が存在する気密性コンテナ内に供給される。

20

【0139】

障害に関連する 1 つ又は複数の症状の治療、予防及び改善に効果的な本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの量は、標準的な臨床技術によって決定できる。処方において採用すべき正確な用量は、投与経路及び状態の重篤度にも左右され、施術者の判断及び各患者の状況に従って決定するべきである。効果的な用量は、インビトロ又は動物モデル試験系から得られた用量 応答曲線から外挿できる。

30

【0140】

本発明が包含する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディに関して、患者に投与される投薬量は、典型的には、被験者の体重に対して、少なくとも約 0.01 μg / kg、少なくとも約 0.05 μg / kg、少なくとも約 0.1 μg / kg、少なくとも約 0.2 μg / kg、少なくとも約 0.5 μg / kg、少なくとも約 1 μg / kg、少なくとも約 2 μg / kg、少なくとも約 3 μg / kg、少なくとも約 5 μg / kg、少なくとも約 10 μg / kg、少なくとも約 20 μg / kg、少なくとも約 30 μg / kg、少なくとも約 50 μg / kg、少なくとも約 0.1 mg / kg、少なくとも約 0.15 mg / kg 又はそれ以上である。

【0141】

本発明の二重特異性 1 価ダイアボディ又は二重特異性 1 価 F c ダイアボディ配列の投与の投薬量及び頻度は、例えば脂質化等の修飾によって、上記二重特異性 F c ダイアボディの取り込み及び組織貫通を増進することにより、低減又は変更してよい。

40

【0142】

一実施形態において、患者に投与される本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディの用量は、単一作用剤療法としての使用に関して計算してよい。他の実施形態において、本発明の二重特異性 1 価ダイアボディ又は二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、他の治療用組成物と併用され、患者に投与される用量は、上記二重特異性 1 価ダイアボディ又は二重特異性 1 価 F c ダイアボディを単一作用剤療法として使用する場合よりも低い。

50

【 0 1 4 3 】

ある特定の実施形態において、本発明の医薬組成物は、治療が必要な領域に局所的に投与することが望ましく、これは、以下に限定されるものではないが、例えば局所的点滴によって、注射によって、又はインプラントを用いて達成してよく、上記インプラントは多孔性、非多孔性又はゼラチン材料性であり、シラスティック膜 (sialastic) 等の膜又は繊維を含む。好ましくは、本発明の分子を投与する際、この分子が吸収されない材料を使用するよう注意しなければならない。

【 0 1 4 4 】

他の実施形態において、組成物は、小囊、特にリポソーム中で送達できる (Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327参照)。

【 0 1 4 5 】

さらに他の実施形態において、組成物は、放出制御系又は徐放系中で送達できる。1つ又は複数の本発明の分子を含む徐放性処方を製造するために、当業者に公知のいずれの技術を使用できる。例えば、米国特許第 4, 526, 938号、国際公開第 91/05548号、国際公開第 96/20698号、Ning et al. (1996) "Intratatumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854、及び Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760を参照 (これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に援用される)。一実施形態では、放出制御系においてポンプを使用してよい (Langer, *supra*; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-240, Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," *Surgery* 88:507-516、及び Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," *N. Engl. J. Med.* 321:574-579参照)。別の実施形態では、抗体の放出制御を達成するためにポリマー材料を使用できる (例えば、*Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974)、*Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984)、Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," *Science* 228:190-192、During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," *Ann. Neurol.* 25:351-356、Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," *J. Neurosurg.* 7(1):105-112)、米国特許第 5, 679, 377号、米国特許第 5, 916, 597号、米国特許第 5, 912, 015号、米国特許第 5, 989, 463号、米国特許第 5, 128, 326号、国際公開第 99/15154号、及び国際公開第 99/20253号参照)。徐放性処方において使用されるポリマーの例としては、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(メチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(エチレンコ酢酸ビニル)、ポリ(メタクリル酸)、ポリグリコリド (PLG)、ポリ無水物類、ポリ(N-ビニルピロリドン)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリアクリルアミド、ポリ(エチレングリコール)、ポリラクチド類 (PLA)、ポリ(ラクチドコグリコリド)類 (PLGA) 及びポリオルトエステル類が挙げ

られるが、これらに限定されない。さらに他の実施形態において、放出制御系は、治療標的（例えば、肺）の近傍に配置でき、従って全身用量の一部しか必要としない（例えば、Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)参照）。他の実施形態において、放出制御インプラントとして有用なポリマー組成物は、ダン他（米国特許第5,945,155号参照）に従って使用する。この特定の方法は、ポリマー系からの生物活性材料のインサイチュ放出制御の治療効果に基づく。埋入は一般に、治療的処置を必要とする患者の身体内のいずれの部位において実施できる。非ポリマー徐放系を使用でき、この場合、被験体の身体内の非ポリマーインプラントを、薬剤送達系として使用する。身体内への埋入後、インプラントの有機溶媒が組成物から周辺の組織液中へと放散、分散又は浸出し、非ポリマー材料は徐々に凝集又は沈殿して、固体の微小細孔性マトリクスを形成する（米国特許第5,888,533号参照）。

10

【0146】

放出制御系については、Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," *Science* 249:1527-1533)による報告中で議論されている。1つ又は複数の本発明の治療剤を含む徐放性処方製造のために、当業者に公知のいずれの技術を使用できる。例えば：米国特許第4,526,938号；国際公開第91/05548号及び第96/20698号、Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189、Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397、Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854、及びLam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760参照（これらはそれぞれ、参照によりその全体が本明細書に援用される）。

20

【0147】

ある特定の実施形態において、本発明の組成物が、本発明の二重特異性1価ダイアボディ又は二重特異性1価Fcダイアボディをエンコードする核酸である場合、この核酸は、この核酸がエンコードする二重特異性1価ダイアボディ又は二重特異性1価Fcダイアボディの発現を促進するために、この核酸を適切な核酸発現ベクターの一部として構築して、例えばレトロウイルスベクターの使用によって（米国特許第4,980,286号参照）、又は直接注射によって、又は微粒子衝撃（例えば、遺伝子銃；Biolistic, Dupont）の使用によって、又は脂質若しくは細胞表面受容体若しくは遺伝子導入剤を用いてコーティングすることによって、又は細胞核に入ることが知られているホメオボックス様ペプチドと連鎖させて上記核酸を投与すること（例えば、Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:1864-1868を参照）等によって、上記核酸を投与することにより、インビボ投与できる。あるいは核酸を細胞内に導入して、相同遺伝子組み換えによる発現のためのホスト細胞DNA内に組み込むことができる。

30

【0148】

治療的又は予防的有効量の本発明のgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ又はgpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディを用いた被験体の治療は、単回治療を含むことができ、又は好ましくは一連の複数回の治療を含むことができる。ある好ましい例では、被験体は、本発明の分子を用いて、約1～10週間、好ましくは2～8週間、より好ましくは約3～7週間、更に好ましくは約4、5又は6週間に亘って週1回処置される。他の実施形態において、本発明の医薬組成物は、1日1回、1日2回又は1日3回投与する。他の実施形態において、この医薬組成物は、1週間に1回、1週間に2回、2週間に1回、1ヶ月に1回、6週間に1回、2ヶ月に1回、1年に2回又は1年に1回投与する。治療に使用される上記分子の有効な用量設定は、特定の治療の期間に亘って増減させてよいことも理解されるだろう。

40

50

【 0 1 4 9 】

ここまで本発明を概説してきたが、以下の実施例を参照することにより、本発明は更に容易に理解されるだろう。これらの実施例は例示として提供されており、そうでないことが明記されていない限り本発明を制限することを意図したものではない。

【 実施例 】

【 0 1 5 0 】

実施例 1 抗ヒト gpA33 モノクローナル抗体

ヒト gpA33 に特異的に結合できるマウスモノクローナル抗体をキメラ化およびヒト化した。元のマウス抗体の VL 及び VH 鎖は、それぞれ配列番号 13 及び 17 の配列を有する。ヒト化抗体の VL 及び VH 鎖は、それぞれ配列番号の配列 26 及び 27 を有する。

10

【 0 1 5 1 】

VL_{gpA33} の抗原結合ドメインは、SARSSISFMY という配列 (配列番号 14) を有する CDR1、DTSNLAS という配列 (配列番号 15) を有する CDR2、及び QQWSSYPLT という配列 (配列番号 16) を有する CDR3 を含む。

【 0 1 5 2 】

VH_{gpA33} の抗原結合ドメインは、GSWMN という配列 (配列番号 18) を有する CDR1、RIYPGDGETNYNGKFKD という配列 (配列番号 19) を有する CDR2、及び IYGNNVYFDV という配列 (配列番号 20) を有する CDR3 を含む。

【 0 1 5 3 】

表 1 は、上記変化による結合の反応速度論的な影響を示す。

20

【 0 1 5 4 】

【 表 1 】

表 1			
抗体	KD	ka	kd
マウス mAb 1	2.3 nM	3.3×10^5	7.5×10^{-4}
キメラ mAb 1	2.4 nM	5.8×10^5	1.4×10^{-3}
ヒト化 mAb 1	3.4 nM	5.6×10^5	1.9×10^{-3}

30

【 0 1 5 5 】

データは、抗体の VL 及び VH ドメインのヒト化に至る修飾が、実質的に gpA33 結合反応速度に影響を与えなかったことを示している。

【 0 1 5 6 】

実施例 2 gpA33 × CD3 二重特異性 1 価ダイアボディ及び Fc ダイアボディ並びに対照ダイアボディの構築

表 2 は、発現及び精製後の好ましい gpA33 × CD3 ダイアボディ及び gpA33 × CD3 Fc ダイアボディのポリペプチド鎖の配列のリストを含む。例示的な gpA33 × CD3 二重特異性 1 価ダイアボディ、DART-1 及び DART-2、並びに例示的な gpA33 × CD3 二重特異性 1 価 Fc ダイアボディ (DART-2w/Fc) による同時結合の検出結果から判断して、ダイアボディは、gpA33 及び CD3 に同時に結合できることが分かった。さらに、対照二重特異性 1 価ダイアボディ (「対照 DART」) を産生した。対照 DART は、CD3 及び FITC に対して二重特異性 1 価であり、CD3 及び FITC に同時に結合できることが分かった。

40

【 0 1 5 7 】

【表 2】

表 2	
ダイアボディ	置換ポリペプチド (N末端からC末端の方向)
g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (DART-1)	配列番号 2 1 配列番号 2 3
g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (DART-2)	配列番号 2 8 配列番号 3 0
アルブミン結合ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (DART-2w/ABD) インビボ半減期の延長のためにアルブミン結合ドメイン (ABD) を含む	配列番号 3 5 配列番号 3 0
I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ バージョン 1 (DART-2w/Fcバージョン1) インビボ半減期の延長のために F c ドメインを含む	配列番号 4 2 配列番号 4 4 配列番号 4 6
I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ バージョン 2 (DART-2w/Fcバージョン2) インビボ半減期の延長のために F c ドメインを含む	配列番号 4 8 配列番号 2 8 配列番号 4 6

10

20

【 0 1 5 8 】

g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディは 2 つのポリペプチド鎖 (挙げられている各配列の鎖) からなるヘテロ二量体であり、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは 3 つのポリペプチド鎖 (挙げられている各アミノ酸配列の鎖) からなるヘテロ二量体である。二重特異性 1 価ダイアボディを形成するための方法は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 1 3 6 6 5 号、国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 7 3 7 9 号、国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 0 5 3 8 号、国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 8 6 8 7 号、国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 2 0 6 8 号、国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 2 0 6 7 号において提供される。

30

【 0 1 5 9 】

対照 C D 3 × F I T C 二重特異性 1 価ダイアボディは、C D 3 及び F I T C に同時に結合できることが分かった。上述した g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ及び g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディは、g p A 3 3 及び C D 3 に同時に結合できることが分かった。このような同時結合を実証するため、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 1 を固体支持体に固定された可溶性 C D 3 フラグメントの存在下でインキュベートした。結合の検出は、固体化抗体の g p A 3 3 追加結合能力によって評価した。結果から、上述した g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ及び g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価 F c ダイアボディが g p A 3 3 及び C D 3 との同時結合を媒介する能力が確認された (図 3) 。

40

【 0 1 6 0 】

実施例 3 癌細胞に対する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディの細胞毒性
本発明の g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディの癌を治療する能力は、大腸癌又は膵臓癌細胞を g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 1 及びヒト P B M C (E : T = 2 5 : 1) 又は活性化したヒト T 細胞 (E : T = 1 0 : 1) のいずれかの存在下でインキュベートすることによって示される。g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 1 は、5 0 % の最大活性 (E C 5 0) を達成するために必要なサブ n g / m L から 1 n g / m L の範囲の濃度を用いて、潜在的な再指向殺滅能力を

50

呈した。対照的に、gpA33陰性癌細胞株（例えば、HCT116）を採用した時は、細胞毒性は観察されなかった。調査の結果を図4A（大腸癌幹様細胞（結腸CSCL細胞））、図4B（Colo205大腸細胞）、及び図4C（ASPC-1膵臓癌細胞）に示す。結果を表3にまとめる。

【0161】

【表3】

標的細胞株	gpA33×CD3 二重特異性1価ダイ アボディのEC50 (ng/mL)	エフェクター：標的 (E:T)	観察された 最高%殺滅
結腸CSLC	0.9015	25:1	38
Colo205	0.5853	10:1	35
ASPC-1	1.142	10:1	25

10

20

【0162】

実施例4 gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディの存在下におけるT細胞活性化

本発明のダイアボディの癌を治療する能力をさらに実証するために、癌細胞（Colo205又はASPC-1）の存在下又は不存在下で、gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディDART-1と共に休止ヒトT細胞をインキュベートした。gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ（DART-1）媒介性再指向殺滅プロセス中のT細胞活性化を特性決定するために、再指向殺滅アッセイからのT細胞を、T細胞活性化マーカーCD25に関して染色し、FACSで分析した。CD25は、CD8（図5A～5B）及びCD4（図5D～5E）T細胞中において用量依存的に発現増加され、これはgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディが、再配向殺滅のプロセスにおいてT細胞活性化を誘発することを示している。対照的に、標的細胞の不在時、CD8（図5C）及びCD4（図5F）T細胞の活性化は発生せず（図5パネルC）、これは、gpA33×CD3ダイアボディが、標的細胞の不在時にT細胞を活性化させないことを示している。同様に、CD8又はCD4T細胞は、標的細胞及び対照二重特異性1価ダイアボディ（対照DART）を用いてインキュベートした場合に活性化されず（それぞれ、図5A～5B及び図5D～5F）、これは、gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディを用いてT細胞及び標的細胞を架橋する必要があることを示している。

30

【0163】

実施例5 マウス抗ヒトgpA33可変ドメイン配列を有するgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ（DART-1）とヒト化抗ヒトgpA33可変ドメイン配列を有するgpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディ（DART-2）の同等性

上述したとおり、gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディDART-1は、マウスモノクローナル抗体のVL_{gpA33}及びVH_{gpA33}ドメインを含むが、gpA33×CD3二重特異性1価ダイアボディDART-2は、同一のマウス抗体のヒト化VL_{gpA33}及びヒト化VH_{gpA33}ドメインを含む。

ヒト化VL_{gpA33}及びVH_{gpA33}ドメインのT細胞をgpA33発現癌細胞へのターゲッティングを促進する能力を実証するため、休止T細胞（LDHアッセイ；E:T=10:1）が存在し、DART-1、DART-2又は対照二重特異性1価ダイアボディ（対照DART）のいずれかの存在下でgpA33を発現する癌細胞をインキュベートした。この

40

50

分析の結果（図6A～6Dに示す）は、DART-1及びDART-2が、SW948結腸直腸腺癌細胞（図6A）及びcolo205細胞（図6B）について同等の細胞毒性を媒介したことを実証している。DART-1及びDART-2は、ホタルルシフェラーゼ遺伝子（Luc2）が安定に導入されたルシフェラーゼ発現Colo205細胞株（Colo205-Luc）について、発光の減少が測定されたことから、両方とも細胞毒性を媒介した（図6C）。DART-1及びDART-2は、gpA33陰性癌細胞株HCT116について、いずれも細胞毒性を媒介しなかった（図6D）。表4に示すように、DART-1及びDART-2は、複数の腫瘍細胞株に対して類似の同等な生物活性を呈した。

【0164】

【表4】

10

エフェクター／標的		LDHアッセイ		ルシフェラーゼアッセイ	
ドナー T細胞	腫瘍細胞株	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1
D54677	SW948	0.79	1.34		
D54677	Colo205	1.17	2.52		
D51031	Colo205-Luc	2.29	3.53	2.53	4.55
D41440	Colo205	2.29	3.37		
D41440	Colo205-Luc	2.80	4.26	2.57	3.26

20

【0165】

実施例6 gpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディ、アルブミン結合ドメインを有するgpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディ及びIgGFcドメインを有するgpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディと、カニクイザルPBMCとの交差反応性

上述したとおり、gpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディDART-2のヒト化VL_{gpA33}及びヒト化VH_{gpA33}ドメインは、ヒトT細胞の存在下において、gpA33発現癌細胞の細胞毒性を媒介する。本発明のgpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディのVL_{gpA33}及びVH_{gpA33}ドメインは、予想外にもカニクイザルT細胞のCD3とも結合する能力があり、それらの細胞をgpA33発現細胞の殺滅に再指向することが分かった。

30

40

【0166】

図7A～7Dに示すように、gpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディDART-2、アルブミン結合ドメインを有するgpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディ（DART-2w/ABD）及びIgGFcドメインを有するgpA33xCD3二重特異性1価ダイアボディ（DART-2w/Fc）は全て、ヒト又はカニクイザルPBMCの存在下における癌細胞の細胞毒性を促進できることが分かった。図7A～7Bは、LDHアッセイ（図7A）又はルシフェラーゼ（図7B）の測定により、上記3つのダイアボディが、ヒトPBMCと共にインキュベートされたColo205-Luc細胞の細胞毒性を媒介する能力を示す。図7C～7Dは、LDHアッセイ（図7C）又はルシフェラーゼ（図7D）の測定により、上記3つのダイアボディが、ヒトPBMCと共にインキ

50

ユベートされた C o l o 2 0 5 - L u c 細胞の細胞毒性を媒介する同様の能力を示す。

【 0 1 6 7 】

表 5 に示すように、 g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 2 及びアルブミン結合ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2 w / A B D) は、同等な C T L 活性を示した。二重特異性 1 価ダイアボディは、ヒトおよびカニクイザル (c y n o) の P B M C エフェクタ細胞の両方で一貫して活性を呈した。

【 0 1 6 8 】

【表 5】

表 5				
	E C 5 0 - C T L 活性 (n g / m L) C o l o 2 0 5 標的細胞			
	L D H アッセイ		ルシフェラーゼアッセイ	
D A R T	ヒト P B M C	カニクイザル P B M C	ヒト P B M C	カニクイザル P B M C
g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2)	4.09	3.81	2.73	1.55
アルブミン結合ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2 w / A B D)	5.52	4.63	3.07	1.63

10

20

30

【 0 1 6 9 】

実施例 7 マウス結腸癌モデルにおける g p A 3 3 × C D 3 ダイアボディのインビボ反応性

本発明の g p A 3 3 × C D 3 ダイアボディの癌の治療を提供するインビボ能力を実証するため、活性化 T 細胞と共に c o l o 2 0 5 細胞が免疫不全 N S G (N O D S C I D ガンマ) マウスに共埋入 (c o - i m p l a n t e d) された (A g l i a n o , A . e t a l . (2 0 0 8) “ H u m a n A c u t e L e u k e m i a C e l l s I n j e c t e d I n N O D / L t s z - S c i d / I L - 2 R g a m m a N u l l M i c e G e n e r a t e A F a s t e r A n d M o r e E f f i c i e n t D i s e a s e C o m p a r e d T o O t h e r N O D / S c i d - R e l a t e d S t r a i n s , ” I n t . J . C a n c e r 1 2 3 (9) : 2 2 2 2 - 2 2 2 7 、 S a n c h e z , P . V . e t a l . (2 0 0 9) “ A R o b u s t X e n o t r a n s p l a n t a t i o n M o d e l F o r A c u t e M y e l o i d L e u k e m i a , ” L e u k e m i a 2 3 (1 1) : 2 1 0 9 - 2 1 1 7 、 R a c k i , W . J . e t a l . (2 0 1 0) “ N O D - S c i d I L 2 r g a m m a (N u l l) M o u s e M o d e l O f H u m a n S k i n T r a n s p l a n t a t i o n A n d A l l o g r a f t R e j e c t i o n , ” T r a n s p l a n t a t i o n 8 9 (5) : 5 2 7 - 5 3 6 、 C h o i , B . e t a l . (2 0 1 1) “ H u m a n B C e l l D e v e l o p m e n t A n d A n t i b o d y P r o d u c t i o n I n H u m a n i z e d N O D / S C I D / I L - 2 R (N u l l) (N S G) M i c e C o n d i t i o n e d B y B u s u l f a n , ” J . C l i n . I m m u n o l . 3 1 (2) : 2 5 3 - 2 6 4 、 S a r t e l e t , H . e t a l . (2 0 1 2) “ D e s c r i p t i o n O f A N e w X e n o g r a f t M o d e l O f M e t a s t a t i c N e u r o b l a s t o m a U s i n g N O D / S C I D / I L 2 r g N u l l (N S G) M i c e , ” I n V i v o 2 6 (1) : 1 9 - 2 9 、 S p r a n g e r , S . e t a l . (2 0 1 2) “ N O D / s c i d I L - 2 R g (n u l l) M i c e : A P r e c l i n i c a l M o d e l S y s t e m T o E v a l u a t e H u m a n D e n d r i t i c C e l l - B a s e d V a c c i n e S t r a t e g i e s i n v i v o , ” J . T r a n s l . M e d . 1 0 : 3 0 、 v o n B o n i n , M . e t a l . (2 0 1 3) “ i n v i v o E x p a n s i o n O f C o - T r a n s p l a n t e d T C e l l s I m p a c t s O n T u m o r R e - I n i t i a t i n g A c t i v i t y O f H u m a n A c u t e M y e l o i d L e u k

40

50

emia In NSG Mice, ” PLoS One. 8(4):e60680)。

【0170】

g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 1 は、マウスに、1 日 1 回、埋入時から開始して 4 日間 (Q D × 4) 静脈投与された。c o l o 2 0 5 腫瘍体積は、ビヒクル対照を受容したマウスにおいて増加することが見出された (図 8)。しかし、D A R T - 1 を受容した動物は、c o l o 2 0 5 腫瘍体積がより少ない又は存在しないことが示されている

(図 8)。

【0171】

C o l o 2 0 5 細胞を埋入した N S G マウスの画像は、処理 2 日目では、ビヒクル (図 9 A) 又は g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 1 (図 9 B) を受容したマウスが有意な腫瘍を有することを示した。しかし、処理 1 2 日目では、g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 1 を受容したマウスは劇的に少ない腫瘍体積であった (図 9 D)。処理 1 2 日目では、ビヒクルを受容したマウスは増大した腫瘍体積を示した (図 9 C)。

10

【0172】

本発明の g p A 3 3 × C D 3 ダイアボディの癌の治療を提供するインビボ能力をさらに証明するため、A S P C - 1 膵臓腫瘍細胞及び活性化ヒト T 細胞 (E : T = 1 : 1) を用いて上述した腫瘍モデルを実施した。g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ D A R T - 1、対照二重特異性 1 価ダイアボディ (対照 D A R T)、又はビヒクルを 1 日 1 回、埋入時から開始して 9 日間 (Q D × 9) 静脈投与した。A S P C - 1 腫瘍体積は、ビヒクル対照を受容したマウスにおいて増加することが見出された (図 1 0)。しかし、D A R T - 1 を受容した動物は、用量依存的に、より少ない腫瘍体積を呈することが見出された (図 1 0)。

20

【0173】

実施例 8 I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディのバージョン 1 (D A R T - 2 w / F c バージョン 1) の効能判定

I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 ダイアボディのバージョン 1 (D A R T - 2 w / F c バージョン 1) の効能を実証するため、マウスは、様々な投薬量レベルで上述の D A R T - 2 w / F c バージョン 1 を 7 日間 (浸透圧ポンプを使用して) 注入された。ポンプ注入から 4 8 時間後 (すなわち、定常状態となった D A R T - 2 w / F c バージョン 1 の循環濃度の存在下)、C o l o 2 0 5 腫瘍細胞及び T 細胞の混合物をマウスに皮下埋入し、腫瘍成長の程度を監視した。表 6 は、研究の設計をまとめたものであり、各グループは 8 匹のメスのマウスが含まれる。

30

【0174】

【表 6】

表6				
グループ	処置	用量 (mg/kg)	ルート/ スケジュール	細胞埋入
1	ビヒクル	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	I g G F c ドメインを有する g p A 3 3×CD 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (DART-2w /F c バージョン1)	3.1	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
3	DART-2w/F c バージョ ン1	1.5	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
4	DART-2w/F c バージョ ン1	0.75	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
5	DART-2w/F c バージョ ン1	0.375	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
6	DART-2w/F c バージョ ン1	0.5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)

10

20

30

【0175】

研究の結果は図11に示され、I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (DART-2w/F c バージョン1) の投与が、全ての試験した投薬量において、腫瘍体積の劇的な低下を媒介したことを示している。

【0176】

上記研究で得られた腫瘍体積の劇的な低下を踏まえ、より低用量での効能を評価する追加研究を実施した。表7は、追加研究の設計をまとめたものであり、各グループは8匹のメスのマウスが含まれる。

40

【0177】

【表 7】

表 7				
グループ	処置	用量 (mg/kg)	ルート/ スケジュール	細胞埋入
1	ビヒクル	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2 w / F c パージョン 1)	0.2	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
3	D A R T - 2 w / F c パージョ ン 1	0.04	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
4	D A R T - 2 w / F c パージョ ン 1	0.008	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
5	D A R T - 2 w / F c パージョ ン 1	0.0016	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)
6	D A R T - 2 w / F c パージョ ン 1	0.5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-cells (5E6)

10

20

30

【 0 1 7 8 】

この追加研究の結果は図 1 2 に示されている。図 1 2 において、各記号は、上述した I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2 w / F c パージョン 1) またはビヒクルの指示用量を受容した動物を意味している。

【 0 1 7 9 】

実施例 9 カニクイザルにおける g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2) 及び I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2 w / F c) の薬物動態プロファイル

40

カニクイザルの C D 3 に結合する本発明のダイアボディの V L _{CD3} 及び V H _{CD3} ドメインの能力は、本発明のダイアボディのインビボ薬物動態を測定するために、このような動物の使用を可能にする。

【 0 1 8 0 】

このような薬物動態を測定するために、上述した g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2) 又は I g G F c ドメインを有する g p A 3 3 × C D 3 二重特異性 1 価ダイアボディ (D A R T - 2 w / F c パージョン 1) をカニクイザルに (1 0 μ g / k g / 日) 注入し、循環中に残っている上記分子の濃度を監視した。図 1 3 は、本

50

研究の結果を示すものであり、DART-2及びDART-2w/Fcバージョン1が1次の脱離速度を呈することを示している。

【0181】

実施例10 gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ(DART-1w/Fcバージョン1)のヒト及びカニクイザルのCD3及びgpA33への結合のSPR分析
ヒト及びカニクイザルのCD3受容体の可溶性バージョンに結合するgpA33×CD3二重特異性Fcダイアボディ(DART-2w/Fcバージョン1)が、BIAcore 3000バイオセンサ(GE, Healthcare)でSPR分析された。受容体は、製造元が推奨した手順に従って、CM5センサーチップ上に固定化した。要約すると、センサーチップ表面上のカルボキシル基は、0.2MのN-エチル-N-(3ジエチルアミノ)プロピル)カルボジイミド、及び0.05MのN-ヒドロキシスクシンイミドを含有する溶液の注射によって活性化された。可溶性CD3受容体(1µg/ml)を、10mMの酢酸ナトリウム(pH5.0、流量5µL/分)中で、活性化されたCM5表面全体に亘って注射し、続いて不活性化のために1Mエタノールアミンを注射した。

10

【0182】

かかる分析に採用されたカニクイザル及びヒトのCD3の可溶性バージョンは、CD3/CD3ヘテロ二量体などの哺乳動物細胞で発現させ、C末端の逆帯電したヘテロ促進Eコイル及びKコイル配列により安定化される。可溶性カニクイザルCD3は、V35対立遺伝子(FN18+)であるカニクイザルCD3の最初の118アミノ酸残基と、そのカルボキシ末端に続く上述したEコイルドメイン(配列番号3)を含む。カニクイザルCD3のV35対立遺伝子(FN18+)のアミノ酸配列は、配列番号49である。

20

MQSGTRWRVL GLCLLSIGVW GQDGNEEMGS ITQTPYQVSI SGTTVILTCS
QHLGSEAQWQ HNGKNKEDSG DRLFLPEFSE MEQSGYVVCY PRGSNPEDAS
HHLYLKARVC ENCMEMDVMA VATIVIVDIC ITLGLLLLLVY YWSKNRKAKA
KPVTRGAGAG GRQRGQNKER PPPVPNPDIYE PIRKGQQDLY SGLNQRR I

【0183】

可溶性カニクイザルCD3は、カニクイザルCD3の最初の101アミノ酸残基と、そのカルボキシ末端に続く上述したKコイルドメイン(配列番号4)を含む。カニクイザルCD3のアミノ酸配列は配列番号50である。

30

MEHSTFLSGL VLATLLSQVS PFKIPVEELE DRVFVKCNTS VTWVEGTVGT
LLTNTRLDL GKRIIDPRGI YRCNGTDIYK DKESAVQVHY RMCQNCVELD
PATLAGIIVT DVIATLLLLAL GVFCFAGHET GRLSGAADTQ ALLRNDQVYQ
PLRDRDDAQY SRLGGNWARN K

【0184】

2つのタンパク質は、哺乳動物のCHO-S細胞中で共発現(co-expressed)し、SEPHAROSE(登録商標)に結合した抗E/KコイルmAbを使用して精製した。

【0185】

可溶性ヒトCD3は、C119S及びC122Sを備えたヒトCD3の1~127残基と、そのカルボキシ末端に続く上述したEコイルドメイン(配列番号3)を含む。ヒトCD3のアミノ酸配列は配列番号51である。

40

MQSGTHWRVL GLCLLSVGVW GQDGNEEMGG ITQTPYKVS I SGTTVILTCP
QYPGSEILWQ HNDKNIGGDE DDKNIGSDED HLSLKEFSEL EQSGYVVCYP
RGSKPEDANF YLYLRARVCE NCMEMDVMSV ATIVIVDICI TGGLLLLLVY
WSKNRKAKAK PVTRGAGAGG RQRGQNKERP PPVPNPDIYEP IRKGQRDLYS
GLNQRR I

【0186】

可溶性ヒトCD3は、ヒトCD3の1~101残基と、そのカルボキシ末端に続く上述したKコイルドメイン(配列番号4)を含む。2つのタンパク質は、哺乳動物のCHO-S細胞中で共発現(co-expressed)し、抗E/Kコイルアフィニティカラムを使用し

50

て精製した。ヒトCD3のアミノ酸配列は配列番号52である。

FKIPIEELE DRVFNCSNTS ITWVEGTVGT LLSIDITRLDL GKRIIDPRGI
YRCNGTDIYK DKESTVQVHY RMCQSCVELD PATVAGIIVT DVIATLLLLAL
GVFCFAGHET GRLSGAADTQ ALLRNDQVYQ PLRDRDDAQY SHLGGNWARN
K

【0187】

可溶性ヒトgpA33は、カルボキシ末端に配列番号53のHHHHHH(「6His」)反復を備えたヒトgpA33の1~235残基を含む。可溶性カニクイザルgpA33は、カルボキシ末端に6His反復を備えたカニクイザルgpA33の1~314残基(Met1~Gln314)を含む。タンパク質は哺乳動物のCHO-S細胞中で共発現し、Ni SEPHAROSE(登録商標)を使用して精製した。

10

【0188】

10mMのHEPES、pH7.4、150mMのNaCl、3mMのEDTA及び0.005%のP20界面活性剤を含有するHBS-E緩衝液中で結合実験を実施した。0、6.25、12.5、25、50および100nMの濃度、30μL/分の流量で120秒間注射時のDART-2w/Fcバージョン1の結合を(二重に)分析した。

【0189】

固定化された受容体表面の再生成を、10mMグリシン、pH1.5のパルス注射によって実施した。基準曲線は、DART-2w/Fcの各希釈物をタンパク質が固定化されていない処理表面全体に亘って注射することによって得た。ゼロ濃度での結合曲線は、ブランクとして差し引いた。KD値は、ラングミュア1:1結合モデル(BIAevaluation(商標)ソフトウェアv4.1)に対する結合曲線のグローバルフィットによって決定した。

20

【0190】

gpA33×CD3二重特異性1価Fcダイアボディ(DART-2w/Fcバージョン1)のヒト及びカニクイザルのCD3及びgpA33への結合のSPR分析は、2つの異なる種からの分子についてかなり類似することを実証した(図14A~14B、図15A~15B)。表8は、DART-2w/Fc相互作用に関する1:1ラングミュアモデルのアフィニティ及び速度定数に対するグローバルフィットにより算出した平衡解離定数(KDs)を提供する。ヒト及びカニクイザルCD3に関するDART-2w/Fcバージョン1のKD値は、2つの抗原間における最大結合応答の違いにもかかわらず、それぞれ23及び26nMと略同一である。表面上に直接固定化された異なるアミノ酸配列を有する抗原のランダム配向は、表面上の利用可能な結合部位の密度を異ならせる原因となる。DART-2w/Fcバージョン1のヒト及びサルgpA33との相互作用に関するKD値は、それぞれ2.2nM及び12nMである(表8)。アフィニティの差は、DART-2w/Fcバージョン1のカニクイザルgpA33との相互作用に関して、相対的に、会合速度定数がわずかに小さく、解離速度定数が大きいためである(表8)。データは、それぞれ二重に実施された3回の独立した実験の平均である(SD=標準偏差、hはヒト、cynoはカニクイザル)。

30

【0191】

40

【表 8】

表 8 異なる種からの抗原に対するDART-2w/Fcバージョン1 の結合に関する並行解離定数 (KD)			
抗原	$k_a (\pm SD)$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$k_d (\pm SD)$ (s^{-1})	$K_D (\pm SD)$ (nM)
hCD3ε/δ	$1.5(\pm 0.1) \times 10^5$	$3.5(\pm 0.06) \times 10^{-3}$	23 ± 2.0
cynoCD3ε/δ	$1.3(\pm 0.02) \times 10^5$	$3.4(\pm 0.02) \times 10^{-3}$	26 ± 0.6
hgpA33-His	$4.2(\pm 0.3) \times 10^5$	$9.0(\pm 0.5) \times 10^{-4}$	2.2 ± 0.2
cynogpA33-His	$2.3(\pm 0.2) \times 10^5$	$2.8(\pm 0.1) \times 10^{-3}$	12 ± 1.0

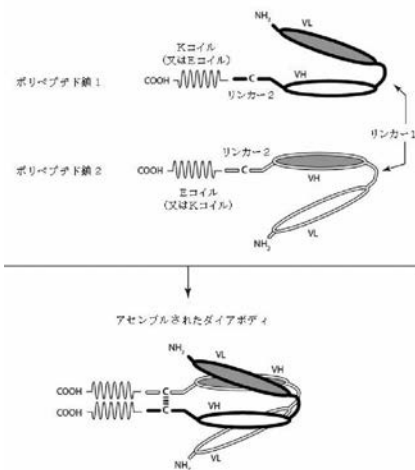
10

【 0 1 9 2 】

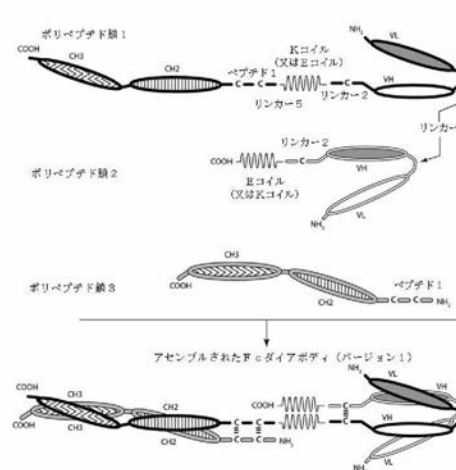
本明細書において言及されている全ての公刊物及び特許は、個々の公刊物又は特許出願それぞれの全体が参照により本明細書に援用されていることが具体的かつ独立に指示されている場合と同程度に、参照により本明細書に援用されている。本発明をその具体的実施形態に関して説明したが、更なる修正形態が可能であり、本出願は、本発明が属する分野の公知の方法又は慣例の範囲内であるような、及びこれまでに挙げた必須の特徴に適用できるような、本開示からの逸脱を含む、本発明の原理に概ね従う本発明のいずれの変形、使用又は改変を包含することを意図していることを理解されたい。

20

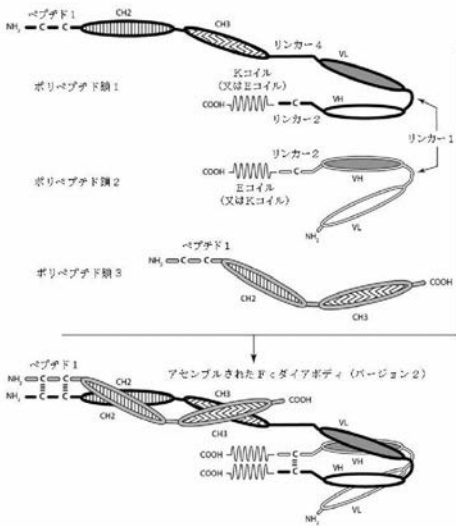
【 図 1 】



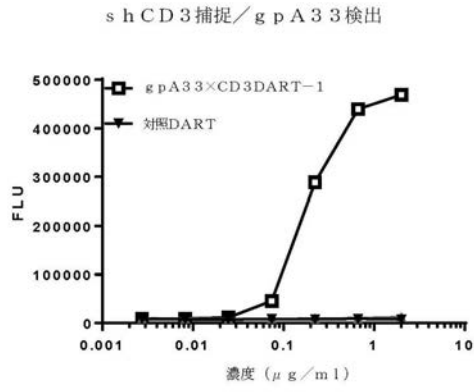
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 3 】



【 図 4 】

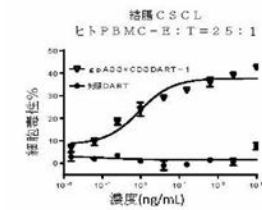


Figure 4A

【 図 5 - 1 】

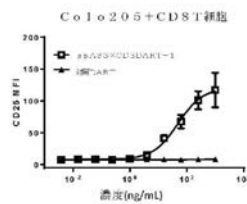


Figure 5A

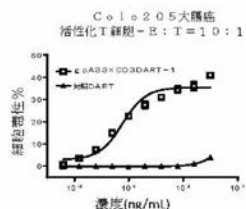


Figure 4B

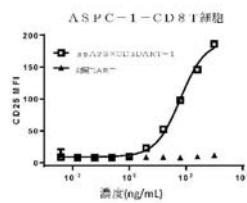


Figure 5B

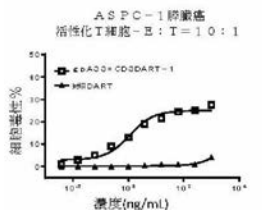


Figure 4C

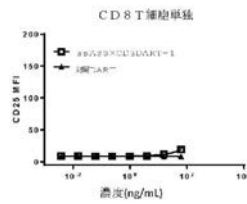


Figure 5C

【 図 5 - 2 】

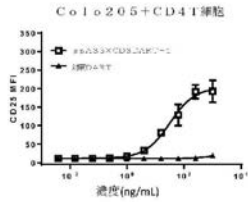


Figure 5D

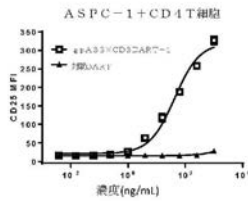


Figure 5E

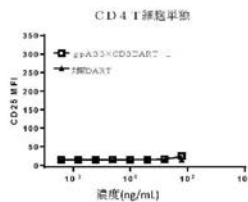


Figure 5F

【 図 6 - 1 】

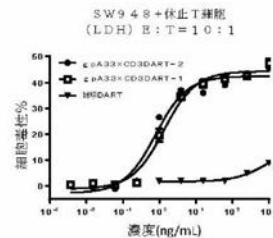


Figure 6A

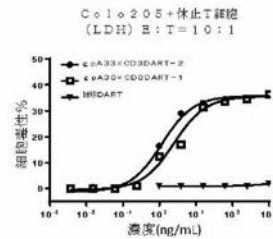


Figure 6B

【 図 6 - 2 】

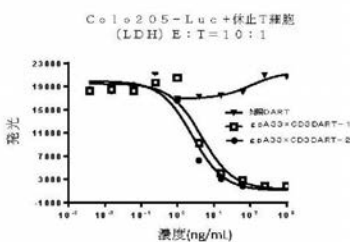


Figure 6C

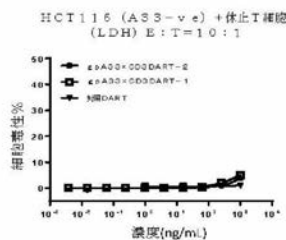


Figure 6D

【 図 7 - 1 】

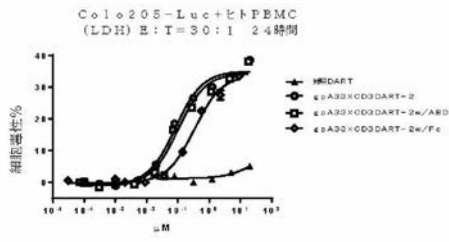


Figure 7A

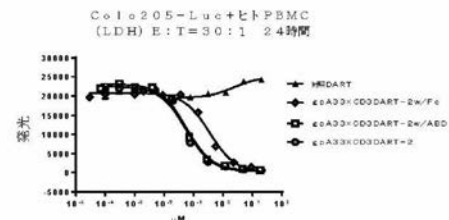
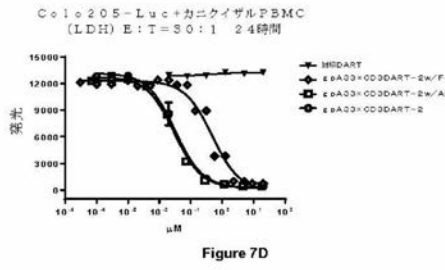
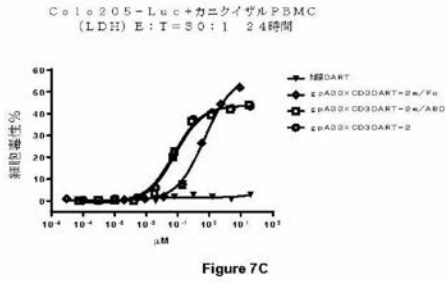
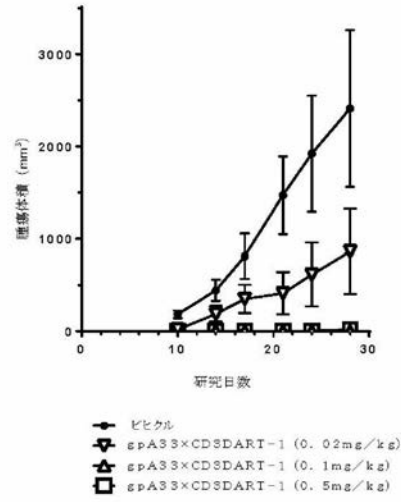


Figure 7B

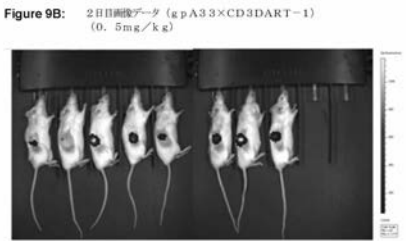
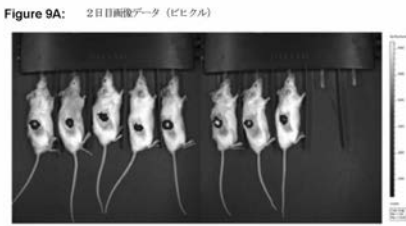
【 図 7 - 2 】



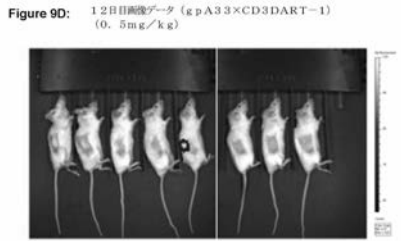
【 図 8 】



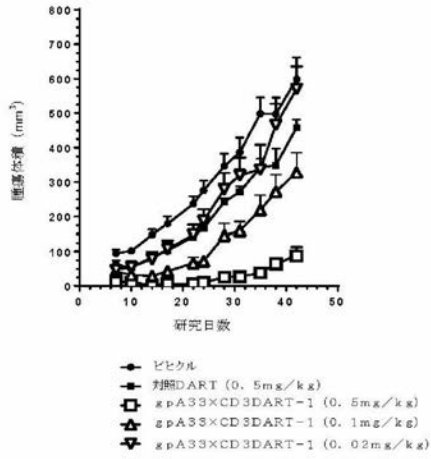
【 図 9 - 1 】



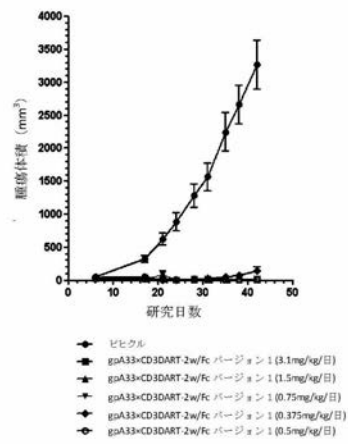
【 図 9 - 2 】



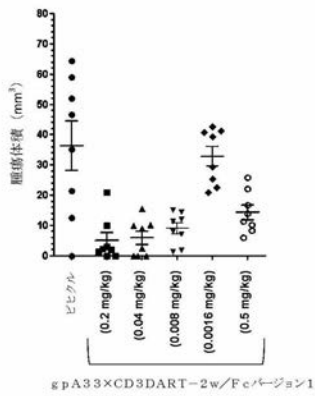
【 図 1 0 】



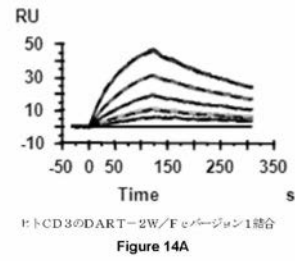
【 図 1 1 】



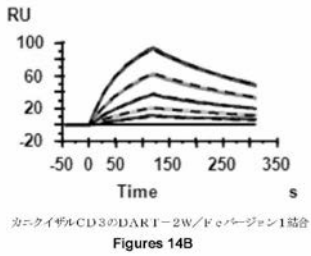
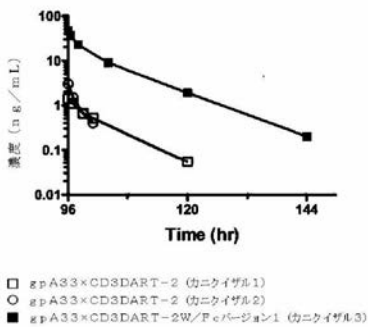
【 図 1 2 】



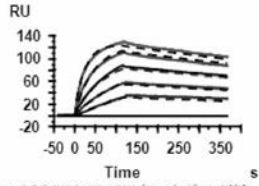
【 図 1 4 】



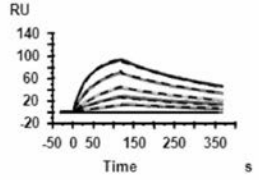
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



ヒト Ig pA33 の DART-2W/Fc ノーブジョン 1 結合
Figures 15A



カニクイザル Ig pA33 の DART-2W/Fc ノーブジョン 1 結合
Figures 15B

【 配 列 表 】

2017504578000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US14/51793
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 16/00 (2015.01) CPC - C07K 14/47, 2319/00, 2317/24; A61K 38/00, 2039/505 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 16/00 CPC: C07K 14/47, 2319/00, 2317/24; A61K 38/00, 2039/505; USPC: 424/139.1, 130.1; 530/387.9, 387.3, 387.1, 386, 380, 350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO); Google; Google Scholar; Dialog ProQuest; Entrez PubMed; bispecific, monovalent, diabody, 'VH,' 'VL,' 'sub-domains,' linker, spacer, 'gpA33,' 'CD3,' epitope		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/162067 A2 (MACRO-GENICS, INC.) November 29, 2012; abstract; paragraphs [0003], [0013], [0018], [0023], [0036], [0049], [0050], [0060], [0077], [0099], [0134], [0136], [0216], [0232], [0311], [0315]; SEQ ID NOs: 26, 42, 71, 299	1-8
A	US 2007/0004909 A1 (JOHNSON, LS et al.) January 4, 2007; paragraph [0099]; SEQ ID NO: 10	1-8
A	US2004/0082039 A1 (GILLIES, S et al.) April 29, 2004; paragraph [0051]; SEQ ID NO: 3	1-8
A	US 2003/0229208 A1 (QUEEN, CL et al.) December 11, 2003; paragraph [0306]; SEQ ID NO: 18	1-8
A	US 2012/0184716 A1 (FISCHER, N et al.) July 19, 2012; abstract; paragraphs [0023], [0036], [0060]	3, 4, 5/3, 5/4, 6/5/3, 6/5/4, 7/5/3, 7/5/4, 8/3, 8/4
A	US 2002/0193571 A1 (CARTER, PJ et al.) December 19, 2002; paragraph [0344]; SEQ ID NO: 44	3, 4, 5/3, 5/4, 6/5/3, 6/5/4, 7/5/3, 7/5/4, 8/3, 8/4
A	US 2010/0174053 A1 (JOHNSON, LS et al.) July 8, 2010; paragraphs [0543], [0588]; SEQ ID NO: 301	3, 4, 5/3, 5/4, 6/5/3, 6/5/4, 7/5/3, 7/5/4, 8/3, 8/4
A	US 2010/0196372 A1 (JOHNSON, LS et al.) August 5, 2010; paragraphs [0137], [0374]; SEQ ID NO: 48	4, 5/4, 8/5/4, 7/5/4, 8/4
A	US 2012/0289418 A1 (WILLARD-GALLO, K et al.) November 15, 2012; abstract	1-4, 5/3, 5/4, 6/5/3, 6/5/4, 7/5/3, 7/5/4, 8/3, 8/4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 January 2015 (30.01.2015)		Date of mailing of the international search report 7 FEB 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/51793

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US14/51793

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 9, 10, 13-17
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

---Please See Supplemental Page---

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Group I: Claims 1-8

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US14/51793

***-Continued from Box III: Lack of Unity of Invention:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1-8 are directed toward a bi-specific monovalent diabody, wherein said bi-specific monovalent diabody is capable of specific binding to an epitope of gpA33 and to an epitope of CD3, wherein the bi-specific monovalent diabody comprises a VL Domain of a monoclonal antibody capable of binding to CD3 (VLcd3) (SEQ ID NO: 5); and a sub-Domain (1B), which comprises a VH Domain of a monoclonal antibody capable of binding to gpA33 (VHgpA33) (SEQ ID NO: 27).

Group II: Claims 11 and 12 are directed toward a bi-specific monovalent diabody, wherein said bi-specific monovalent diabody is capable of specific binding to an epitope of CD3 and to an epitope of gpA33, wherein said bi-specific monovalent diabody comprises a polypeptide chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28.

Group III: Claim 18 is directed toward a cell that expresses an antibody or a polypeptide portion or fragment thereof, wherein the antibody binds to gpA33, and wherein the antibody or polypeptide portion or fragment thereof comprises: (1) CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 15) and CDR3 (SEQ ID NO: 16) of a light chain of an anti-human gpA33 antibody; (2) CDR1 (SEQ ID NO: 18), CDR2 (SEQ ID NO: 19) and CDR3 (SEQ ID NO: 20) of a heavy chain of an anti-human gpA33 antibody.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Group I include a sub-Domain (1B), which comprises a VH Domain of a monoclonal antibody capable of binding to gpA33 (VHgpA33) (SEQ ID NO: 27), which is not present in either of Groups II or III, the special technical features of Group II including a polypeptide chain having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28, which is not present in either of Groups I or III, the special technical features of Group III including CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 15) and CDR3 (SEQ ID NO: 16).

Groups I-III share the technical features including an antibody or polypeptide portion or fragment thereof, wherein the antibody binds to gpA33 or an epitope thereof, a light chain and a heavy chain. Groups I and II share the technical features including: a bi-specific monovalent diabody, wherein said bi-specific monovalent diabody is capable of specific binding to an epitope of CD3 and to an epitope of gpA33, wherein said bi-specific monovalent diabody comprises: a first polypeptide chain having an amino acid sequence and a second polypeptide chain having an amino acid sequence; wherein said first and said second polypeptide chains are covalently bonded to one another; and a bi-specific monovalent Fc diabody, wherein said bi-specific monovalent Fc diabody is capable of specific binding to an epitope of CD3 and to an epitope of gpA33, and possesses an IgG Fc Domain, wherein said bi-specific monovalent Fc diabody comprises: (1) a first polypeptide chain having an amino acid sequence, a second polypeptide chain having an amino acid sequence, and a third polypeptide chain having an amino acid sequence.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2012/162067 A2 to Huang, et al. (hereinafter 'Huang'). Huang discloses an antibody or polypeptide portion or fragment thereof (an antibody or polypeptide portion or fragment thereof or bispecific antibody; paragraphs [0003], [0050]), wherein the antibody binds to gpA33 or an epitope thereof (wherein the bispecific antibody binds to A33 (gpA33) or an epitope thereof; paragraph [0050]); a light chain (a light chain variable domain (a light chain); paragraph [0016]) and a heavy chain (a heavy chain variable domain (a heavy chain); paragraph [0018]); a bi-specific (a bi-specific; paragraphs [0048], [0050]) monovalent diabody (monovalent diabody; paragraph [0049]), wherein said bi-specific monovalent diabody (bi-specific monovalent diabody; paragraphs [0048]-[0050]) is capable of specific binding to an epitope of CD3 (capable of specific binding to an epitope of CD3; abstract, paragraph [0013]) and to an epitope of gpA33 (and to an epitope of A33 (gpA33); paragraph [0050]), wherein said bi-specific monovalent diabody comprises: a first polypeptide chain (a first polypeptide chain; paragraph [0018]) having an amino acid sequence (having CDR sequences (having an amino acid sequence); paragraph [0053]) and a second polypeptide chain (second polypeptide chain; paragraph [0018]) having an amino acid sequence (having CDR sequences (having an amino acid sequence); paragraph [0053]); wherein said first and said second polypeptide chains are covalently bonded to one another (wherein said first and said second polypeptide chains are covalently bonded to one another; paragraph [0018]); and a bi-specific (paragraphs [0048], [0050]) monovalent (paragraph [0049]) Fc (paragraph [00134]) diabody (paragraphs [0049], [00134]), wherein said bi-specific (paragraphs [0048], [0050]) monovalent (paragraph [0049]) Fc (paragraph [00134]) diabody (paragraphs [0049], [00134]) is capable of specific binding to an epitope of CD3 (abstract, paragraph [0013]) and to an epitope of gpA33 (paragraph [0050]), and possesses an IgG Fc Domain (paragraph [00134]), wherein said bi-specific (paragraphs [0048], [0050]) monovalent (paragraph [0049]) Fc (paragraph [00134]) diabody (paragraphs [0049], [00134]) comprises: (1) a first polypeptide chain (paragraph [0018]) having an amino acid sequence (having CDR sequences (having an amino acid sequence); paragraph [0053]), a second polypeptide chain (a second polypeptide chain; paragraph [0018]) having an amino acid sequence (having CDR sequences (having an amino acid sequence); paragraph [0053]); wherein the binding molecules may be monovalent, bivalent, trivalent, tetravalent, pentavalent, hexavalent (wherein the binding molecules may be monovalent, bivalent, trivalent, tetravalent, pentavalent, hexavalent; paragraph [0049]), and able to simultaneously bind one, two, three, four, five or six molecules (able to simultaneously bind one, two, three, four, five or six molecules; paragraph [0049]); and wherein the binding molecules may be used in the treatment of cancer, autoimmune and/or inflammatory diseases and other conditions (abstract).

Huang does not disclose a third polypeptide chain having an amino acid sequence. However, since Huang discloses a polypeptide chain comprising a Fc region, and multivalent constructs capable of binding up to six molecules simultaneously, it would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention have modified the previous disclosure of Huang, for implementing additional polypeptide chains, including a third polypeptide chain having an amino acid sequence of an Fc region in a monovalent construct, or additional polypeptide chains, for enabling the production of the multivalent constructs capable of binding up to six molecules, for improving the efficacy of the use of the molecules in the treatment of cancer, autoimmune and/or inflammatory diseases and other conditions.

Since none of the special technical features of the Groups I-III inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Huang reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 47/42 (2017.01)	A 6 1 K 47/42	
A 6 1 K 47/50 (2017.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

- (72) 発明者 リー ジョナサン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 3 0 , ミルブレース , ヒルクレスト ボルヴァード
 1 5 0 1 , アパートメント 3
- (72) 発明者 チェン フランシーヌ ジーフェン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 0 4 1 1 6 , サンフランシスコ , 3 1 s t アヴェニュー
 2 6 6 0
- (72) 発明者 ジョンソン レスリー エス .
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 4 , ダーネスタウン , ボブラー ヒル ロード 1 4
 4 1 1
- (72) 発明者 シャー カルパナ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 4 1 , ボイズ , エセル ローズ ウェイ 1 3 0 1 3
- (72) 発明者 ボンビニ エツィオ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 4 , ポトマック , パウダー ホーン ドライブ 1 1
 1 3 6

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01
 4B065 AA91X AA91Y AA99Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C076 CC27 CC29 CC41 EE41 EE59 FF70
 4C084 AA02 AA03 AA07 BA41 BA44 NA14 ZB26
 4C085 AA14 DD62 EE01
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 BA50 DA76 EA28 FA74

【要約の続き】

【選択図】図3A