

(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2017-504564

(P2017-504564A)

(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)
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 Z N A N	4 C 0 7 6
C 1 2 N 5/09 (2010. 01)	C 1 2 N 5/09	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/537 (2006. 01)	A 6 1 K 31/537	4 C 0 8 5
A 6 1 P 15/00 (2006. 01)	A 6 1 P 15/00	4 C 0 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 104 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-530151 (P2016-530151)
 (86) (22) 出願日 平成26年11月13日 (2014. 11. 13)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年7月8日 (2016. 7. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/065571
 (87) 国際公開番号 W02015/073743
 (87) 国際公開日 平成27年5月21日 (2015. 5. 21)
 (31) 優先権主張番号 61/903, 839
 (32) 優先日 平成25年11月13日 (2013. 11. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510214045
 ザイムワークス、インコーポレイテッド
 カナダ国、ブリティッシュ コロンビア州
 ブイ6エイチ 3ブイ9、バンクーバー
 , ウェスト 8番 アベニュー 540ー
 1385
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H E R 2 標的の一価抗原結合コンストラクトの使用法

(57) 【要約】

本明細書は、H E R 2 を標的とする第1のまたは第1及び第2の一価抗原結合コンストラクトを用いる、使用方法及び治療方法を提供する。一価抗原結合コンストラクトは、H E R 2 に特異的に結合する、重鎖可変ドメインを含む少なくとも1つの抗原結合ポリペプチドと、ヘテロ二量体F c とを含み得、該F c は、少なくとも2つのC H 3 配列を含み、リンカーによりまたはリンカーなしで抗原結合ポリペプチドに連結している。

【選択図】 図1

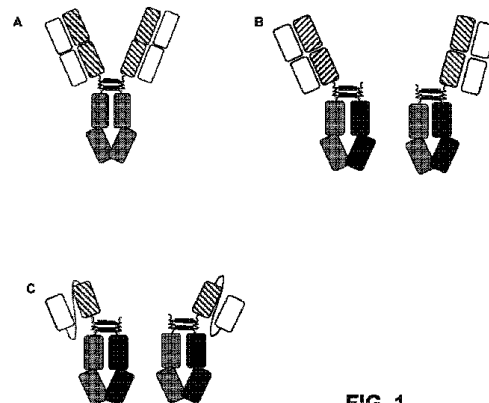


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の治療方法であって、有効量の第 1 の一価抗原結合コンストラクトまたは第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトの組み合わせを前記対象へ投与することを含み、

- a) 前記第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトがそれぞれ、抗原結合ポリペプチドコンストラクトと、前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトにリンカーによりまたはリンカーなしで連結した二量体 Fc とを含み；
- b) 各抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) の細胞外ドメイン 2 (ECD2)、HER2 の ECD4、または HER2 の ECD1 に特異的に結合し；
- c) 前記第 1 の一価抗原結合コンストラクト及び前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトが、重複していないエピトープに結合し、HER2 への結合に関して互いに競合せず；
- d) 前記第 1 の一価抗原結合コンストラクトが v1040 を含み、前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトが v4182 を含み；かつ
- e) 前記対象の治療が、免疫組織化学 (IHC) により判定したとき、2+以下のレベルで HER2 を発現している HER2+癌の治療である、前記方法。

10

【請求項 2】

対象の治療方法であって、有効量の第 1 の一価抗原結合コンストラクトまたは第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトの組み合わせを前記対象へ投与することを含み、

- a) 前記第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトが、それぞれ抗原結合ポリペプチドコンストラクトと、前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトにリンカーによりまたはリンカーなしで連結した二量体 Fc とを含み；
- b) 各抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2) の細胞外ドメイン 2 (ECD2)、HER2 の ECD4、または HER2 の ECD1 に特異的に結合し；かつ、
- c) 前記第 1 の一価抗原結合コンストラクト及び前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトが、重複していないエピトープに結合し、HER2 への結合に関して互いに競合しない、前記方法。

20

【請求項 3】

対象の治療が、HER2+腫瘍の増殖阻害、HER2+腫瘍の進行の遅延、HER2+癌の治療、または HER2+癌の予防である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

30

【請求項 4】

前記 HER2+腫瘍または癌が、乳房の、卵巣の、胃の、食道胃接合部の、子宮内膜の、唾液腺の、頭頸部の、肺の、脳の、腎臓の、結腸の、結腸直腸の、甲状腺の、膵臓の、前立腺の、または膀胱の腫瘍または癌から選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 HER2+腫瘍または癌が、乳房の、卵巣の、胃の、肺の、または脳の腫瘍または癌から選択される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 HER2+腫瘍または癌が、免疫組織化学 (IHC) により判定したとき、2+以下のレベルで HER2 を発現している、請求項 4 に記載の方法。

40

【請求項 7】

前記 HER2+腫瘍または癌が、免疫組織化学 (IHC) により判定したとき、2+または 3+のレベルで HER2 を発現している卵巣癌である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 HER2+腫瘍または癌が乳癌である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記乳癌が、免疫組織化学 (IHC) により判定したとき、2+以下のレベルで HER2 を発現している、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

50

前記乳癌が、トラスツズマブ耐性乳癌、化学療法耐性乳癌、トリプルネガティブ乳癌、エストロゲン受容体陰性乳癌、またはエストロゲン受容体陽性乳癌である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記治療が、HER2 + 転移性癌の治療または予防である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記HER2 + 転移性癌が、転移性乳癌、転移性脳癌、または転移性肺癌である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記HER2 + 癌が、定着した原発性及び転移性乳癌、または乳癌の肺転移もしくは脳転移である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記対象がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記第 1 の一価抗原結合コンストラクトが v 1 0 4 0 を含み、前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトが v 4 1 8 2 を含む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記二量体Fcが少なくとも 2 つのCH3 配列を含むヘテロ二量体Fcであり、前記二量体化CH3 配列が約 6 8 °C 以上の融解温度 (Tm) を有する、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

各一価抗原結合コンストラクトが、HER2 に特異的に結合する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較してより大きい最大結合 (Bmax) で、HER2 に選択的に及び／または特異的に結合し、1 : 1 の一価抗原結合コンストラクト : 標的比において、前記単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較したBmaxの増加が、飽和濃度以下の前記コンストラクトについて観察された平衡定数 (KD) を超える濃度で観察される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記第 1 の一価抗原結合コンストラクトの前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、前記 v 1 0 4 0 抗原結合ポリペプチドアミノ酸配列を含み、前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトの前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、前記 v 4 1 8 2 抗原結合ポリペプチドコンストラクトアミノ酸配列を含む、請求項 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記第 1 の一価抗原結合コンストラクトの前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、前記 v 1 0 4 0 抗原結合ポリペプチドコンストラクトと少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含み、前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトの前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、前記 v 1 0 4 0 抗原結合ポリペプチドコンストラクトと少なくとも 8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記第 1 の一価抗原結合コンストラクトが v 1 0 4 0 のヘテロ二量体Fcを含み、前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトが v 4 1 8 2 のヘテロ二量体Fcを含む、請求項 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記第 1 の一価抗原結合コンストラクト及び前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトが、v 1 0 4 1、v 1 0 4 1、v 4 1 8 2、v 6 3 0、v 8 7 8、v 4 4 4 2、v 4 4 4 3、v 4 4 4 4、及び v 4 4 4 5 から選択される、請求項 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 22】

第1の一価抗原結合コンストラクト及び第2の一価抗原結合コンストラクトの組み合わせが、v1040及びv4182である、請求項2～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

第1の一価抗原結合コンストラクトのみを投与し、前記第1の一価抗原結合コンストラクトが、v1041、v1041、v4182、v630、v878、v4442、v4443、v4444、及びv4445から選択される、請求項2～17のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

各ヘテロ二量体Fcが、
 a. ヒトFcであり；及び／または
 b. ヒトIgG1Fcであり；及び／または
 c. 前記CH3ドメインの少なくとも1つに1つ以上の修飾を含み；及び／または
 d. 野生型ホモ二量体Fcと同等の安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進する、前記CH3ドメインの少なくとも1つにおける1つ以上の修飾を含み；及び／または
 e. 表A2に記載のとおり、前記CH3ドメインの少なくとも1つにおける1つ以上の修飾を含み；
 f. 少なくとも1つのCH2ドメインを更に含み；及び／または
 g. 1つ以上の修飾を含む少なくとも1つのCH2ドメインを更に含み；及び／または
 h. 表A2に記載のとおり、CH2ドメインの少なくとも1つにおける1つ以上の修飾を含む少なくとも1つのCH2ドメインを更に含み；及び／または
 i. Fcγ受容体の選択的結合を促進するために、1つ以上の修飾を含む、
 請求項16に記載の方法。

【請求項 25】

前記二量体化CH3ドメインが、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77.5、78、79、80、81、82、83、84、または85℃以上の融解温度(Tm)を有する、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

各ヘテロ二量体Fcドメインが、リンカーによって前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトに融合されている、請求項24に記載の方法。

【請求項 27】

前記リンカーがポリペプチドリinkerである、請求項26に記載の方法。

【請求項 28】

前記リンカーがIgG1ヒンジ領域を含む、請求項26に記載の方法。

【請求項 29】

前記第1の及び／または第2の一価抗原結合コンストラクトが、薬物に複合体化されている、請求項2～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記第1の及び／または第2の一価抗原結合コンストラクトが、メイタンシン(DM1)に複合体化されている、請求項2～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

医薬組成物の状態で前記第1の及び第2の一価抗原結合コンストラクトを投与することを含む、請求項2～30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

緩衝液、酸化防止剤、低分子量分子、薬物、タンパク質、アミノ酸、炭水化物、脂質、キレート化剤、安定剤、または賦形剤を含む医薬組成物の状態で、前記第1の及び第2の一価抗原結合コンストラクトを投与することを含む、請求項2～30のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

前記第 1 の及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトが同時投与される、請求項 1 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

追加の薬剤の投与を更に含む、請求項 1 ～ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

投与が、経口的であるかまたは注射を介する、請求項 1 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

請求項 1 ～ 3 5 のいずれか一項に記載の方法において使用するための医薬組成物。

【請求項 3 7】

- a. 対象において腫瘍を縮小するための；及び／または
b. 腫瘍を有する前記対象において全生存を向上させるための；及び／または
c. 前記対象において H E R 2 の発現を特徴とする疾患を治療するための；及び／または
d. 前記対象の乳房組織、結腸組織、卵巢組織、胃腸組織、もしくは脳組織における H E R 2 の発現を特徴とする疾患を治療するための；及び／または
e. トラスツズマブ及び／もしくはペルツズマブ及び／もしくはトラスツズマブエムタンシン（T－DM 1）を含む抗 H E R 2 治療に対して治療抵抗性もしくは耐性である前記対象において、H E R 2 の発現を特徴とする疾患を治療するための；及び／または
f. 前記対象において癌を治療するための；及び／または
g. 化学療法の標準治療（S o C）に対して治療抵抗性である前記対象において癌を治療するための；及び／または
h. 前記対象において乳癌を治療するための
方法であって、

有効量の第 1 の一価抗原結合コンストラクトまたは第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトの組み合わせを前記対象へ投与することを含み、

- a) 前記第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトがそれぞれ、少なくとも 1 つの抗原結合ポリペプチドコンストラクトと、前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトにリンカーによりまたはリンカーなしで連結した二量体 F c とを含み；
b) 各抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、ヒト上皮成長因子受容体 2（H E R 2）の細胞外ドメイン 2（E C D 2）、H E R 2 の E C D 4、または H E R 2 の E C D 1 を特異的に結合し；かつ
c) 前記第 1 の一価抗原結合コンストラクト及び前記第 2 の一価抗原結合コンストラクトが、重複していないエピトープに結合し、H E R 2 への結合に関して互いに競合しない、前記方法。

【請求項 3 8】

前記二量体 F c が少なくとも 2 つの C H 3 ドメインを含み、前記二量体化 C H 3 ドメインが約 6 8 ℃以上の融解温度（T m）を有する、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

各一価抗原結合コンストラクトが、H E R 2 に特異的に結合する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較してより大きい最大結合（B m a x）で、H E R 2 に選択的に及び／または特異的に結合し、1：1 のコンストラクト：標的比において、前記単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較した B m a x の増加が、飽和濃度以下の前記コンストラクトについて観察された平衡定数（K D）を超える濃度で観察される、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトが、

- a. 細胞を各一価抗原結合コンストラクト単独及び／もしくは H E R 2 に特異的に結合する二価抗原結合コンストラクトと接触させた場合と比較して、細胞を双方のコンストラクトと接触させた場合に、F A C S 及び／もしくは共焦点顕微鏡によって判定される S K O V 3 細胞における細胞表面修飾がより多いこと；及び／または

b. B T-474細胞を各一価抗原結合コンストラクト単独と接触させた場合と比較して、前記細胞を双方のコンストラクトと接触させた場合に、B T-474細胞における増殖阻害が増強されること；及び／または

c. S K O V 3細胞を双方のコンストラクトと接触させた場合、S K O V 3細胞中に双方の一価抗原結合コンストラクトが内部移行すること；及び／または

d. S K O V 3細胞を双方のコンストラクトと接触させた場合、S K O V 3細胞の抗体依存性細胞障害（A D C C）が媒介されること；及び／または

e. S K O V 3及び／もしくはJ I M T-1細胞を各一価抗原結合コンストラクト単独と接触させた場合と比較して、前記細胞を双方のコンストラクトと接触させた場合に、S K O V 3及び／もしくはJ I M T-1細胞における細胞毒性により測定される効力が増大すること；及び／または

f. ハーセプチン耐性J I M T-1細胞を各一価抗原結合コンストラクト単独と接触させた場合と比較して、前記細胞を双方のコンストラクトと接触させた場合に、ハーセプチン耐性J I M T-1細胞における細胞毒性により測定される効力が同等であること
によって特徴付けられる、請求項37に記載の方法。

【請求項41】

H E R 2+癌細胞の増殖の阻害方法であって、対象に対して、前記H E R 2+癌細胞を、第1の一価抗原結合コンストラクトと、または第1及び第2の一価抗原結合コンストラクトの組み合わせと接触させることを含み、

a. 前記第1及び第2の一価抗原結合コンストラクトがそれぞれ、少なくとも1つの抗原結合ポリペプチドコンストラクトと、前記抗原結合ポリペプチドにリンカーによりまたはリンカーなしで連結した二量体F cとを含み；

b. 各抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、ヒト上皮成長因子受容体2（H E R 2）の細胞外ドメイン2（E C D 2）、H E R 2のE C D 4、またはH E R 2のE C D 1に特異的に結合し；かつ、

c. 前記第1の一価抗原結合コンストラクト及び前記第2の一価抗原結合コンストラクトが、重複していないエピトープに結合し、H E R 2への結合に関して互いに競合しない、前記方法。

【請求項42】

H E R 2+癌細胞の死滅方法であって、対象に対して、前記H E R 2+癌細胞を、第1の一価抗原結合コンストラクトと、または第1及び第2の一価抗原結合コンストラクトの組み合わせと接触させることを含み、

a. 前記第1及び第2の一価抗原結合コンストラクトがそれぞれ、少なくとも1つの抗原結合ポリペプチドコンストラクトと、前記抗原結合ポリペプチドコンストラクトにリンカーによりまたはリンカーなしで連結した二量体F cとを含み；

b. 各抗原結合ポリペプチドコンストラクトが、ヒト上皮成長因子受容体2（H E R 2）の細胞外ドメイン2（E C D 2）、H E R 2のE C D 4、またはH E R 2のE C D 1に特異的に結合し；かつ、

c. 前記第1の一価抗原結合コンストラクト及び前記第2の一価抗原結合コンストラクトが、重複していないエピトープに結合し、H E R 2への結合に関して互いに競合しない、前記方法。

【請求項43】

前記二量体F cが少なくとも2つのC H 3ドメインを含み、前記二量体化C H 3ドメインが、約68℃以上の融解温度（T m）を有する、請求項41または42に記載の方法。

【請求項44】

各一価抗原結合コンストラクトが、H E R 2に特異的に結合する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較してより大きい最大結合（B m a x）で、H E R 2に選択的に及び／または特異的に結合し、1：1のコンストラクト：標的比において、前記単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較したB m a xの増加が、飽和濃度以下の前記コンストラクトについて観察された平衡定数（K D）を超える濃度で観察される、請求項41また

10

20

30

40

50

は 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記第 1 の一価抗原結合または第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトの前記組み合わせが、A D C C、A D C P、または C D C による H E R 2 + 癌細胞の死滅を媒介する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記第 1 の一価抗原結合または第 1 及び第 2 の一価抗原結合コンストラクトの前記組み合わせが薬物に複合体化されている、請求項 4 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本願は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、2 0 1 3 年 1 1 月 1 3 日出願の米国特許仮出願第 6 1 / 9 0 3 , 8 3 9 号の優先権を主張する。

【0 0 0 2】

配列表

本願発明は、E F S - W e b を介して提示されている配列表を含み、その全体が参照によって本明細書に援用される。2 0 1 4 年 1 1 月 1 3 日に作成の該 A S C I I 原稿は、ファイル名 2 7 9 0 5 P C T _ s e q u e n c e l i s t i n g . t x t で、容量が 3 5 5 , 9 8 6 バイトである。

20

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

治療用タンパク質の分野では、それらの多価の標的結合特性を有する抗体は、薬剤候補品のデザインの優良なスカフォールドである。現在市販の抗体治療薬は、2 つの抗体 F A B によって付与される高アフィニティ結合及びアビディティに関して最適化され、選択されている二価の単一特異性抗体である。突然変異誘発による F c g R 結合の脱フコシル化または強化を用いて、細胞障害メカニズム依存の抗体 F c を介して抗体をより効果的なものとしてきた。非フコシル化抗体または F c g R 結合が強化されている抗体は、臨床検査において治療的有効性が依然として不完全であり、これらの抗体はいずれも、依然として市販されていない。

30

【0 0 0 4】

治療用抗体は、理想的には、対象患者投与後の標的特異性、生体内安定性、生物学的利用能及び体内分布、並びに治療的効果依存抗体を最大化するための十分な標的結合アフィニティ、及び高標的占有、及び標的細胞への抗体結合など、ある特定の最少の特性を有する。これらの最小限の特性をすべて所有する抗体療法を生み出す目的においては、特に、抗体対標的の比率が 1 : 1 で完全に標的を占有することができる抗体において、奏功が制限されていた。例えば、従来の二価の単一特異性 I g G 抗体は、飽和濃度であっても 1 : 1 の比率で完全に標的を占有することができなかった。理論上、飽和濃度で、従来の単一特異性二価抗体は、一価抗体断片と比較して、アビディティ効果を付与することができる 2 つの同一の抗原結合 F A B の存在により、抗体 1 対標的 2 の比率で最大限標的に結合すると考えられている。更に、こうした従来の抗体は、より大きい分子サイズの結果として、生物学的利用能及び／または体内分布の更なる制限を受けている。更に、従来の抗体は、場合によっては標的抗原へ結合時にアゴニスト作用を示し、これは、アンタゴニスト作用が望ましい治療的機能である場合には、好ましくないものである。いくつかの例では、この現象は、細胞表面受容体に結合することによりレセプターの活性化をもたらす受容体の二量化が促進するとき、二価抗体の「架橋」効果に起因する。さらに、従来の二価抗体は、抗体依存性細胞障害効果または他の治療的活性のメカニズムが可能である最大治療的安全投与量で抗体対標的抗原との比率 1 : 2 での抗体の標的細胞への結合が制限されることにより、治療的有効性の制限を受ける。

40

50

【0005】

HER2と結合する一価抗体は、国際公開特許第WO2008/131242号（Zymogenetics, Inc.）（特許文献1）及びWO2011/147982号（Genmab A/S）（特許文献2）に記述されている。2011年11月4日出願の共有特許出願PCT/CA2011/001238（特許文献3）、2012年11月2日出願のPCT/CA2012/050780（特許文献4）、2013年5月10日出願のPCT/CA2013/00471（特許文献5）、及び2013年5月8日出願のPCT/CA2013/050358（特許文献6）には、治療用抗体について記述されている。いずれも、すべての目的において、その全体が参照によって援用される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】WO2008/131242号

【特許文献2】WO2011/147982号

【特許文献3】PCT/CA2011/001238

【特許文献4】PCT/CA2012/050780

【特許文献5】PCT/CA2013/00471

【特許文献6】PCT/CA2013/050358

【発明の概要】

【0007】

概要

本明細書では、有効量の第1の一価抗原結合コンストラクト（例えば、抗体）または第1及び第2の一価抗原結合コンストラクトの組み合わせを対象に投与することによる、ヒトなどの対象の治療方法を開示し、この第1及び第2の一価抗原結合コンストラクトはそれぞれ、抗原結合ポリペプチドコンストラクトと、リンカーの有無に関わらず、抗原結合ポリペプチドコンストラクトに結合している二量体Fcとを有する。各抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）の細胞外ドメイン2（ECD2）、HER2のECD4、またはHER2のECD1に特異的に結合する。第1の一価抗原結合コンストラクト及び第2の一価抗原結合コンストラクトは、重複していないエピトープに結合し、HER2への結合に関して互いに競合することはない。

【0008】

さまざまな実施形態において、対象の治療方法としては、例えば、HER2＋腫瘍の増殖の阻害、HER2＋腫瘍の進行の遅延、HER2＋癌の治療、またはHER2＋癌の予防が挙げられる。HER2＋腫瘍または癌は、乳房の、卵巣の、胃の、食道胃接合部の、子宮内膜の、唾液腺の、頭頸部の、肺の、脳の、腎臓の、結腸の、結腸直腸の、甲状腺の、膵臓の、前立腺の、または膀胱の腫瘍または癌であり得る。

【0009】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で使用される一価抗原結合コンストラクトとしては、融解温度（Tm）約68℃以上を有する少なくとも2つのCH3配列及び二量体化CH3配列を含むヘテロ二量体Fcが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法において使用される一価抗原結合コンストラクトは、HER2に特異的に結合する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、より大きい最大結合（Bmax）で、選択的に及び／または特異的にHER2に結合し、1：1の一価抗原結合コンストラクト：標的比において、単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較したBmaxの増大は、飽和濃度以下のコンストラクトの観察された平衡定数（KD）を超える濃度で観察される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】異なるOA抗体フォーマットの略図を示す。Aは、二価単一特異性全長抗体のコンストラクトを示し、軽鎖は白色で示し、重鎖のFab部分は斜線で示し、重鎖のFc部

10

20

30

40

50

分は灰色で示す。Bは、抗原結合ドメインがF a bフォーマットにある一価の単一特異性O Aの2つの型を示す。いずれの型も、軽鎖は白色で示し、重鎖のF a b部分は斜線で示す。鎖AのF c部分は灰色であり、鎖BのF c部分は黒色である。左側の型では、F a bは鎖Aに融合し、右側の型では、F a bは鎖Bに縮合される。Cは、抗原結合ドメインがs c F vフォーマットにあるO Aの2つの型を示す。これらのいずれの型も、軽鎖の可変ドメイン(V L)は白色で示し、重鎖の可変ドメイン(V H)は斜線で示す。鎖AのF c部分は灰色であり、鎖BのF c部分は黒色である。左側の型では、s c F vは鎖Aに融合させ、右側の型では、s c F vは鎖Bに融合させる。

【図2】F A C Sにより測定したとき、卵巣H E R 2 2～3+（増幅遺伝子）S K O V 3細胞に結合する一価の抗H E R 2抗体コンストラクトの能力を示す。

10

【図3】一価の抗H E R 2抗体がH E R 2発現乳癌細胞の増殖を阻害する能力を示す。Aは、さまざまな一価の抗H E R 2抗体の能力を示し、B T - 4 7 4細胞の増殖阻害を制御する。Bは、さまざまな一価の抗H E R 2抗体の能力を示し、S K O V 3細胞の増殖阻害を制御する。

【図4】S K O V 3細胞内に内部移行する一価の抗H E R 2抗体及び組み合わせの内部移行効率を示す。

【図5】一価の抗H E R 2抗体及び組み合わせがS K O V 3細胞内で、濃度依存性A D C Cを媒介する能力を示す。

【図6】一価の抗H E R 2抗体A D Cが濃度依存的方法で細胞障害を媒介する能力を示す。Aは、一価の抗H E R 2抗体A D CがS K O V 3細胞において細胞障害を媒介する能力を示す。Bは、一価の抗H E R 2抗体A D CがJ I M T 1細胞において細胞障害を媒介する能力を示す。

20

【図7】T - D M 1類縁体(v 6 2 4 6)と比較して、一価の抗H E R 2抗体A D CがJ I M T 1細胞において濃度依存性細胞障害性を媒介する能力を示す。

【図8 A】マウス異種移植片モデルにおいて、一価の抗H E R 2抗体の組み合わせが、定着した卵巣S K O V 3腫瘍増殖を阻害する能力を示す。

【図8 B】一価の抗H E R 2抗体の組み合わせが本モデルでの生存に及ぼす効果を示す。

【図9】原発性乳癌異種移植片モデルにおいて、一価の抗H E R 2抗体の定着した原発性乳房腫瘍(トラスツズマブ及び化学療法耐性)の増殖を阻害する能力を示す。

【図10】マウスにおける例示的な一価抗原結合コンストラクトの薬物動態学的プロファイルを示す。

30

【図11】インビトロ血液脳関門モデルの略図を示す。不死ラット脳微小血管内皮細胞(S V - A R B E C)は、血液脳関門を模した強固なバリアを形成する。

【図12】O A - H E R 2がB B Bを経細胞輸送する能力をF S A - H E R 2と比較して示す。Aは、非特異的I g G対照と比較して、インビトロB B Bモデルでの抗体の経細胞輸送の倍増を示す(n = 3)。Bは、F S A - H E R 2と比較し、v 1 0 4 0の経細胞輸送を示す。棒は、A 2 0 . 1非特異的対照への正規化後の底部チャンバ抗体濃度の中央A U Cを示す(n = 3 . *, p < 0 . 0 5)。

【図13】v 5 0 6と比較して、脳へのv 1 0 4 0の分布の増加を示していることを示す。棒は、蛍光標識抗体1 0 m g / k gを注入後2 4時間の平均エキスピボ脳蛍光を示す(n = 1)。

40

【図14】v 5 0 6と比較して、肺へのv 1 0 4 0の分布が増加していることを示す。棒は、蛍光標識抗体1 0 m g / k gを注入後2 4時間の平均エキスピボ肺蛍光を示す(n = 1)。

【図15】H B C x - 1 3 b患者由来異種移植片を担持する動物での肺転移のエキスピボ定量を示す。点は、ラインで示した中央値を有する個々の動物を示す(n = 4)。

【図16 A】H E R 2 + 細胞において一価の抗H E R 2抗体がA D C Cを媒介する能力を示す。S K B R 3細胞でのA D C C活性を示す。

【図16 B】H E R 2 + 細胞において一価の抗H E R 2抗体がA D C Cを媒介する能力を示す。Z R - 7 5 - 1細胞でのA D C C活性を示す。

50

【図16C】HER2+細胞において一価の抗HER2抗体がADCCを媒介する能力を示す。MCF7細胞でのADCC活性を示す。

【図16D】HER2+細胞において一価の抗HER2抗体がADCCを媒介する能力を示す。MDA-MB-231細胞でのADCC活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

詳細な説明

本明細書には、HER2+癌の治療方法を記述し、本方法は、HER2に一価で結合する1つ以上の一価抗原結合コンストラクト（一価の抗HER2抗原結合コンストラクト、一価の抗HER2抗体）を投与することを含む。各一価の抗HER2抗原結合コンストラクトは、細胞外ドメイン1（ECD1）、細胞外ドメイン2（ECD2）、または細胞外ドメイン4（ECD4）に配置されるHER2のエピトープに結合する。一実施形態では、2つ以上の一価の抗HER2抗原結合コンストラクトが投与され、一価の抗HER2抗原結合コンストラクトは、重なり合ったエピトープに結合しないようまたは互いにHER2への結合を阻害しないように選択される。いくつかの実施形態では、2つ以上の一価の抗HER2抗原結合コンストラクトが投与され、一価の抗HER2抗原結合コンストラクトの少なくとも1つは、例えば、メイタンシノイドなどの薬物または毒素に複合体化される。別の実施形態では、投与される一価の抗HER2抗原結合コンストラクトはいずれも、薬物または毒素に複合体化される。

【0012】

本明細書に記載される方法において使用するために好適な一価の抗HER2抗原結合コンストラクトは、標準の二価の単一特異性抗HER2抗原結合コンストラクト（例えば、対応する全長抗体、FSA）と比較して、HER2発現標的細胞に対してさらに高い最大結合Bmaxを示す。また、一価の抗HER2抗原結合コンストラクトは、i) 癌細胞増殖阻害能力；ii) 癌細胞死滅能力；iii) 癌細胞内の内部移行能力；iv) HER2のダウンレギュレーション能力；及び／またはv) エフェクター細胞指向細胞死滅媒介能力などのインビトロ特性を示す。いくつかの実施形態では、好適な一価の抗HER2抗原結合コンストラクトは、標準二価の単一特異性抗HER2抗原結合コンストラクトと比較して、増殖阻害及び／またはエフェクター細胞指向細胞の死滅の増加を伴うBmaxの上昇を示し、いくつかの実施形態では、一価の抗HER2抗原結合コンストラクトの組み合わせは、標準二価の単一特異性抗HER2抗原結合コンストラクトとの組み合わせと比較して、増殖阻害及び／またはエフェクター細胞指向細胞の死滅の増加を伴うBmaxの上昇を示す。また、一価の抗HER2抗原結合コンストラクトは、標準二価の単一特異性抗HER2抗原結合コンストラクトと比較して、組織分布の増加を示す。

【0013】

このため、一実施形態では、1つ以上の一価の抗HER2抗原結合コンストラクトを投与することを含むHER2+癌を治療する方法に関して記載され、HER2+癌は、乳癌、卵巣癌、胃癌、食道胃接合癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、脳腫瘍、肺癌、腎癌、結腸癌、結腸直腸癌、甲状腺癌、膵癌、前立腺癌、膀胱癌及び頭頸部から選択される。別の実施形態では、HER2+癌は、乳癌、卵巣癌、脳腫瘍、及び肺癌から選択される。

【0014】

他の実施形態では、乳癌は、トラスツズマブに対して治療抵抗性または耐性である、化学療法耐性乳癌、トリプルネガティブ乳癌、エストロゲン受容体陰性乳癌、またはエストロゲン受容体陽性乳癌である。

【0015】

標準二価の単一特異性抗HER2抗原結合コンストラクトと比較して、HER2発現標的細胞のBmaxの上昇、並びに一価の抗HER2抗原結合コンストラクトのADCCを媒介する能力が、HER2の発現レベルに依存することなく観察されるが、一実施形態では、0～2+レベルでHER2が発現しているHER2+細胞内で、一価の抗HER2抗原結合コンストラクトと標準二価の単一特異性抗HER2抗原結合コンストラクトとのA

D C C 活性の最大差が観察され、このH E R 2 発現レベルは、免疫組織化学（I H C）によって評価される。このため、一実施形態では、1つ以上の一価の抗H E R 2 抗原結合コンストラクトを投与することを含むH E R 2 + 癌の治療方法が本明細書に記述され、H E R 2 + 癌は、2 + 以下のレベルでH E R 2 を発現している。一実施形態では、H E R 2 + 癌は、1 + レベルでH E R 2 を発現している。

【0016】

一実施形態では、H E R 2 + 癌は、I H C で評価したとき2 + / 3 + レベルでH E R 2 を発現している卵巣癌である。一実施形態では、H E R 2 + 癌は、I H C で評価したとき2 + 以下のレベルでH E R 2 を発現している乳癌である。一実施形態では、H E R 2 + 癌は、I H C で評価したとき1 + のレベルでH E R 2 を発現している乳癌である。

10

【0017】

本明細書に記載される方法において使用するために好適な一価の抗H E R 2 抗原結合コンストラクトは、標準の二価の抗H E R 2 抗原結合コンストラクトと比較して、更なる差異を示す。例えば、一価の抗H E R 2 抗原結合コンストラクトは、標準の二価の抗H E R 2 抗原結合コンストラクトと比較して、血液脳関門（B B B）透過性の増大を示し、インビボモデルにおいて肺転移数を減少させることができる。このため、H E R 2 + 癌の治療方法が本明細書に記述され、1つ以上の一価の抗H E R 2 抗原結合コンストラクトを投与することを含み、H E R 2 + 癌は、定着した原発性及び転移性乳癌である。一実施形態では、H E R 2 + 癌は、原発性乳癌の肺転移または脳転移である。

【0018】

治療方法

本明細書において、対象の治療方法を記述する。本方法は、対象にH E R 2 に結合する有効量の1つ以上の一価抗原結合コンストラクトを投与することを含む。

20

【0019】

いくつかの実施形態において、治療法は、H E R 2 + 腫瘍の増殖の阻害、及び／またはH E R 2 + 腫瘍の進行の遅延、及び／またはH E R 2 + 癌の治療、及び／またはH E R 2 + 癌の予防を目的とする。H E R 2 + 腫瘍または癌は、乳房の、卵巣の、胃の、食道胃接合の、子宮内膜の、唾液腺の、頭頸部の、肺の、脳の、腎臓の、結腸の、結腸直腸の、甲状腺の、膵臓の、前立腺の、または膀胱の腫瘍または癌であり得る。いくつかの実施形態では、本方法は、トラスツズマブ耐性乳癌、化学療法耐性乳癌、トリプルネガティブ乳癌、エストロゲン受容体陰性乳癌、エストロゲン受容体陽性乳癌であるH E R + 乳癌の治療方法である。いくつかの実施形態では、本方法は、転移性乳癌、転移性脳腫瘍若しくは転移性肺癌、定着した原発性若しくは転移性乳癌、または乳癌の肺転移若しくは脳転移であるH E R 2 + 転移性癌を治療すること若しくは予防することである。

30

【0020】

いくつかの実施形態では、H E R 2 + 腫瘍または癌は、2 + 以下のレベルでH E R 2 を発現している。いくつかの実施形態では、H E R 2 + 腫瘍または癌は、免疫組織化学（I H C）により判定し、本明細書に記載されるように、2 + または3 + のレベルでH E R 2 を発現している卵巣癌である。

【0021】

本明細書に記載の治療方法は、H E R 2 に結合する一価抗原結合コンストラクトまたは一価抗原結合コンストラクトの組み合わせを投与することを含む。一実施形態では、本方法は、H E R 2 に結合する2つの一価抗原結合コンストラクトを投与することを含む。別の実施形態では、本方法は、H E R 2 に結合する3つの一価抗原結合コンストラクトを投与することを含む。更に別の実施形態では、本方法は、H E R 2 に結合する3つ以上の抗原結合コンストラクトを投与することを含む。

40

【0022】

一価抗原結合コンストラクトの組み合わせを使用するとき、重複していないエピトープと結合するかまたはH E R 2 と結合するために互いに競合するように、一価抗原結合コンストラクトが選択される。例えば、各一価抗原結合コンストラクトがH E R 2 のE C D 1

50

、E C D 2、またはE C D 3に結合する一価抗原結合コンストラクトの組み合わせを使用することができる。このため、一実施形態では、本組み合わせは、H E R 2のE C D 1に結合する一価抗原結合コンストラクト及びH E R 2のE C D 2に結合する一価抗原結合コンストラクトを含む。一実施形態では、本組み合わせは、E C D 1に結合する一価抗原結合コンストラクト及びE C D 4に結合する一価抗原結合コンストラクトを含む。一実施形態では、本組み合わせは、E C D 2に結合する一価抗原結合コンストラクト及びE C D 4に結合する一価抗原結合コンストラクトを含む。一実施形態では、本組み合わせは、E C D 1に結合する一価抗原結合コンストラクト、E C D 2に結合する一価抗原結合コンストラクト及びE C D 4に結合する一価抗原結合コンストラクトを含む。

【0023】

用語「癌」及び「癌性」は、典型的には未調節細胞成長／増殖を特徴とする哺乳類における生理学的状態を意味するまたは説明する。癌の例としては、これらに限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫及び白血病が挙げられる。こうした癌の更に特定の例としては、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、肝細胞癌、胃腸癌、膵癌、グリア芽細胞腫／グリオーマ（例えば、未分化星状細胞腫、グリア芽細胞腫多形、退形成オリゴデンドログリオーマ、退形成オリゴデンドロアストロサイトーマ）、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌及びさまざまな型の頭頸部癌が挙げられる。

【0024】

本明細書で使用するとき、「治療」は、治療対象の個体または細胞の自然経過を変化させるための臨床的介入を指し、予防としてまたは臨床病理学の経過中のいずれかで実施することができる。治療の望ましい効果としては、疾患の発症または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の間接的または非間接的な病理学的帰結の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、疾患状態の改善または緩和及び寛解または予後の改善が挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体を使用して、疾患または障害の進行を遅延させる。一実施形態では、本明細書に記載の抗体及び方法により、腫瘍の退縮となる。一実施形態では、本明細書に記載の抗体及び方法により、腫瘍／癌の増殖の阻害となる。

【0025】

本発明で使用するとき、用語「対象」は、動物を指し、いくつかの実施形態では哺乳類を指し、他の実施形態ではヒトであり、治療、観察または実験の対象である。動物は、コンパニオン動物（例えば、イヌ、ネコなど）、家畜（例えば、雌ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）または実験室用動物（例えば、ラット、マウス、モルモットなど）である。

【0026】

いくつかの実施形態では、対象は障害を有する。実施例としては、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトまたは方法を用いる治療から利益を得る任意の状態が挙げられる。この状態としては、哺乳類が、問題の障害に罹患しやすいこれらの病理学的状態などの慢性及び急性の障害または疾患が挙げられる。本明細書で治療対象となる障害の非限定例としては、悪性及び良性腫瘍；非白血病及びリンパ液悪性疾患；ニューロン、グリア、星状細胞、視床下部及び他の腺、マクロファージ性、上皮性、間質性及び卵割腔障害；及び炎症性障害、免疫性疾患及び他の脈管形成関連障害が挙げられる。

【0027】

本明細書で使用するとき、用語「有効量」とは、投与される一価抗原結合コンストラクトの量を指し、治療される疾病、病態または障害の1つ以上の症状がある程度軽減されることとなる。本明細書に記載のコンストラクトを含む組成物は、予防的に、強化するために、及び／または治療用処置のために投与され得る。

【0028】

用語「強化する」または「強化すること」は、所望の効果の効力または持続時間のいずれかを増大するか、または延長することを意味する。このため、薬物分子または治療薬の効果を強化することに関して、用語「強化すること」は、任意の系での治療薬の効果を、

10

20

30

40

50

効力または持続時間のいずれかにおいて増大するかまたは延長する能力を意味する。本明細書で使用するときに、「強化有効量」とは、所望の系において別の治療薬または薬剤の効果を強化するために適切な量を意味する。患者に使用される場合、この用途に有効な量は、疾病、障害または病態の重症度及び経過、従来の療法、患者の健康状態及び薬物応答性、並びに治療担当医師の判断に依存する。

【0029】

癌治療

対象の治療用薬物を製造するために、本明細書に記載の少なくとも1つの一価抗原結合コンストラクトを使用することが本明細書に記載される。ある実施形態では、例えば、乳房の、卵巣の、胃の、食道胃接合部の、子宮内膜の、唾液腺の、頭頸部の、肺の、脳の、腎臓の、結腸の、結腸直腸の、甲状腺の、膵臓の、前立腺の、または膀胱のHER2+腫瘍または癌などの、HER2+腫瘍の増殖阻害、HER2+腫瘍の進行の遅延、HER2+癌の治療またはHER2+癌の予防のために薬物を製造することを目的として、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトを使用することが記述されている。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、薬剤の製造のための、本明細書に記載の一価のHER2結合抗原結合コンストラクト使用は、癌の治療またはHER1機能障害、HER2機能障害、HER3機能障害及び／またはHER4機能障害など、EGFR及び／またはHER機能障害に関連する任意の増殖性疾患の治療のためである。ある実施形態では、癌は低EGFR及び／またはHER2発現癌である。特定の態様において、癌は、二価のHER2抗体を用いる治療に耐性がある。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のHER2結合一価抗原結合コンストラクトは、乳癌細胞の治療において使用される。

【0032】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の一価のHER2結合抗原結合コンストラクトは、現在の療法に一部応答性のある患者を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のHER2結合一価抗原結合コンストラクトは、現在の療法に耐性のある患者を治療するために使用される。別の実施形態では、本明細書に記載の一価のHER2結合抗原結合コンストラクトは、現在の療法に耐性を発現している患者を治療するために使用される。いくつかの実施形態では、薬剤の製造のための、本明細書に記載の一価のHER2結合抗原結合コンストラクトの使用は、トラスツズマブを用いる治療に耐性のある癌を治療するためである。

30

【0033】

一実施形態では、本明細書に記載の一価のHER2結合抗原結合コンストラクトは、現在の乳癌の療法に非応答性である患者を治療するために有用である。ある実施形態では、これらの患者は、トリプルネガティブ癌を患っている。いくつかの実施形態では、トリプルネガティブ癌は、低いかまたは無視できるほどのエストロゲン受容体(ER)遺伝子、プロゲステロン受容体(PR)遺伝子及びHER2遺伝子の発現を有する乳癌である。特定の他の実施形態では、本明細書に記載の一価のHER2結合抗原結合コンストラクトが、任意により、例えば、乳癌の治療などのための1つ以上の現在の抗HER2療法を組み合わせ、現在の治療に無応答である患者に提供される。いくつかの実施形態では、現在の抗HER2療法としては、これらに限定されないが、抗HER2または抗HER3単一特異性二価抗体、トラスツズマブ、ペルツズマブ、T-DM1、二重特異性HER2/HER3 scFv若しくはこれらの組み合わせが挙げられる。一実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、トラスツズマブ、ペルツズマブ、T-DM1、抗HER2、または抗HER3の単独のもの、または組み合わせたものに応答しない患者を治療するために使用される。

40

【0034】

一実施形態では、HER2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む一価

50

のHER2結合抗原結合コンストラクトは、転移性乳癌患者の治療において使用可能である。一実施形態では、HER2結合一価抗体は、局所的進行または進行性転移癌患者の治療に有用である。一実施形態では、HER2結合一価抗体は、治療抵抗性癌患者の治療に有用である。一実施形態では、HER2結合一価抗体は、患者がこれまでの抗HER2治療で進行した場合に、転移性癌の治療のために該患者に提供される。一実施形態では、本明細書に記載のHER2結合一価抗体は、トリプルネガティブ乳癌患者の治療に使用することも可能である。一実施形態では、本明細書に記載のHER2結合一価抗体は、進行性、治療抵抗性HER2増幅ヘレグリン陽性癌患者の治療に使用される。

【0035】

一価のHER2結合抗原結合コンストラクトは、癌治療用の他の公知の療法と組み合わせて投与され得る。この実施形態によれば、一価抗原結合コンストラクトは、FSAを上回って有意にB_{max}及び抗体依存性細胞障害活動を上昇させるために、重複していない結合標的エピトープを有する他の一価抗原結合コンストラクトまたは多価抗体と組み合わせて投与され得る。例えば、本明細書に記載の一価のHER2結合抗原結合コンストラクトは、以下の組み合わせで投与され得る：

(1) v4182との組み合わせにおいて、v1040またはv1041などの一価抗原結合コンストラクト（ペルツズマブをベースとする）；(2) セツキシマブ二価EGFR抗体との組み合わせにおいて、v1041またはv1040及び／またはv4182、ならびに(3) 同一標的細胞での同一及び異なる表面抗原で指向された非競合抗体の複数の組み合わせ。ある実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、進行性HER2増幅ヘレグリン陽性乳癌患者の治療のために、ハーセプチン（商標）、T-DM1、非フルコシ化抗体またはPerjetaから選択される治療法と組み合わせて投与する。ある実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、食道下部、胃食道（GE）接合部及び胃のHER2発現癌患者において、ハーセプチン（商標）またはPerjetaと組み合わせて投与する。

【0036】

HER2+癌とは、HER2発現している癌を意味し、したがって本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトが癌と結合できる。当該技術分野で周知のように、HER2+癌では、さまざまなレベルでHER2を発現している。癌におけるErbb、例えば、Erbb2の発現を判定するために、さまざまな診断アッセイ／予後アッセイが利用可能である。一実施形態では、IHC、例えば、HERCEPTEST（登録商標）（Dako）を用いることによって、Erbb2の過剰発現を解析することもできる。腫瘍生検によるパラフィン包埋組織切片に対してIHCアッセイを行い、以下のErbb2タンパク質の染色強度基準に従ってもよい：

スコア0。染色が観察されないか、または、腫瘍細胞の10%未満の膜染色が観察される。

スコア1+。腫瘍細胞の10%超にかすかな／ほとんど識別できない膜染色が検出される。細胞は、それらの膜の一部のみ染色されている。

スコア2+。腫瘍細胞の10%超に弱～中程度の完全な膜染色が観察される。

スコア3+。腫瘍細胞の10%超に中～強程度の完全な膜染色が観察される。

【0037】

Erbb2過剰発現評価用のスコア0または1+のこれらの腫瘍は、Erbb2を過剰発現していないとみなし、またスコア2+または3+のこれらの腫瘍は、Erbb2を過剰発現しているとみなしてよい。

【0038】

代替的または追加の方法として、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織で、例えば、商品名INFORM（商標）（Ventana, Arizより販売）または商品名PATHVISION（商標）（Vysis, Ill）などのFISH（fluorescence in situ hybridization）法を実施して、腫瘍中のErbb2過剰発現範囲（存在する場合には）を測定してもよい。IHC法と比較して、HER2

遺伝子の増幅を測定する F I S H 法は、患者のハーセプチン（登録商標）による治療への応答とより良好に相関していると考えられ、また、現在では、ハーセプチン（登録商標）治療または本発明の二重特異性抗体コンストラクトによる治療より利益を受ける可能性が高い患者の同定に好ましい方法であると考えられている。

【0039】

いくつかの実施形態では、薬剤の製造のための、本明細書に記載の一価の H E R 2 結合抗原結合コンストラクト使用は、2 + レベル以下で H E R 2 を発現している癌の治療のためであり、H E R 2 のレベルは I H C により測定する。いくつかの実施形態では、薬剤の製造のための、本明細書に記載の一価の H E R 2 結合抗原結合コンストラクト使用は、1 + レベル以下で H E R 2 を発現している癌の治療のためであり、H E R 2 のレベルは I H C により測定する。いくつかの実施形態では、薬剤の製造のための、本明細書に記載の一価の H E R 2 結合抗原結合コンストラクト使用は、3 + レベルで H E R 2 を発現している癌の治療のためであり、H E R 2 のレベルは、I H C により測定する。いくつかの実施形態では、薬剤の製造のために本明細書に記載の一価の H E R 2 結合抗原結合コンストラクトを使用することは、2 + レベルまたは 3 + レベルで H E R 2 を発現している癌の治療のためであり、H E R 2 のレベルは I H C により測定する。

10

【0040】

併用投与：

いくつかの実施形態では、一価の H E R 2 抗原結合コンストラクトの使用は、追加の剤（例えば、放射線治療剤、化学療法剤、ホルモン療法剤、免疫療法剤及び抗腫瘍剤）と組み合わせて投与され得る。

20

【0041】

抗原結合コンストラクト

本明細書に記載の治療法としては、H E R 2 に結合する少なくとも 1 つの一価抗原結合コンストラクト、例えば少なくとも 1 つの一価抗体の投与が挙げられる。本明細書に記載の方法で使用される抗原結合コンストラクトとしては、F c 及び抗原結合ポリペプチドコンストラクトが挙げられる。

【0042】

用語「抗原結合コンストラクト」とは、例えば、抗原に結合可能なポリペプチドまたはポリペプチド錯体など、任意の剤を意味する。いくつかの態様では、抗原結合コンストラクトは、目的とする抗原に特異的に結合するポリペプチドである。抗原結合コンストラクトは、単量体、二量体、多量体、タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド錯体、抗体、抗体断片、またはそれらの抗原結合断片、s c F v などであってもよい。抗原結合コンストラクトは、単一特異性、二重特異性、多特異性のポリペプチドコンストラクトであってもよい。いくつかの態様では、抗原結合コンストラクトとしては、例えば、1 つ以上の F c に連結する 1 つ以上の抗原結合要素（例えば、F a b または s c F v）などを挙げることができる。抗原結合コンストラクトの更なる例としては、以下で説明し、実施例に示す。

30

【0043】

本明細書で使用するとき、用語「一価抗原結合コンストラクト」は、1 つの抗原結合ドメインを有する抗原結合コンストラクトを意味する。抗原結合ドメインは、これに限定されないが、F a b（抗原結合断片）、s c F v（単鎖 F v）及び s d a b（シングルドメイン抗体）などのフォーマットであってもよい。一価抗原結合コンストラクトの例示的コンストラクトは、図 1 B 及び 1 C に示す。

40

【0044】

本明細書で使用するとき、用語「単一特異性二価抗原結合コンストラクト」は、2 つの抗原結合ドメイン（二価）を有する抗原結合コンストラクトを意味し、そのいずれもが同一のエピトープ／抗原（単一特異性）に結合する。抗原結合ドメインは、これに限定されないが、F a b（抗原結合断片）、s c F v（単鎖 F v）及び s d a b（シングルドメイン抗体）などのフォーマットであってもよい。また、単一特異性二価抗原結合コンストラ

50

クトは、本明細書において、「全長抗体」または「F S A」とも称される。単一特異性二価抗原結合コンストラクトの例示的コンストラクトは、図1 Aに示す。いくつかの実施形態では、単一特異性二価抗原結合コンストラクトは、一価抗原結合コンストラクトの性質を測定したものに対する基準である。いくつかの他の実施形態では、2つの単一特異性二価抗原結合コンストラクトの組み合わせは、2つの一価抗原結合コンストラクトの性質を測定したものに対する基準である。かかる場合、標準の単一特異性二価抗原結合コンストラクトは、一価抗原結合コンストラクトに対応している。例えば、HER2のECD2において一価抗原結合コンストラクトがエピトープに結合し、かつ抗原結合ドメインがFabフォーマットにある場合、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトもHER2のECD2内の同一エピトープに結合し、2つの抗原結合ドメインもFabフォーマット内にある。2つの単一特異性二価抗原結合コンストラクトの組み合わせが標準として使用される場合には、同じことが言え、2つの単一特異性二価抗原結合コンストラクトのそれぞれが、一価抗原結合コンストラクトの1つに対応することになる。いくつかの実施形態では、2つの一価抗原結合コンストラクトの組み合わせが使用される場合、1つの単一特異性二価抗原結合コンストラクトが標準として使用され、1つの単一特異性二価抗原結合コンストラクトは、例えば、ハーセプチン（商標）またはT-DM1などの標準（SOC）療法を指す。

10

【0045】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法で使用される一価抗原結合コンストラクトはヒト化されている。非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンから誘導される最少の配列を含有するキメラ抗体である。ほとんどの部分では、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの高頻度可変領域の残基は、マウス、ラット、ウサギまたは所望の特異性、アフィニティ及び能力を有する非ヒト霊長類など、非ヒト種（ドナー抗体）の高頻度可変領域の残基に置き換えられる。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において検出されない残基を含んでもよい。これらの修飾を行って更に抗体性能を洗練させる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの実質的に全ての可変ドメインを含み、全てまたは実質的に全ての高頻度可変性ループは、非ヒト免疫グロブリンのこれらのループに対応し、全てまたは実質的に全てのFRは、ヒト免疫グロブリン配列のループである。また、ヒト化抗体は、任意により少なくとも一部の免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域も含む。更なる詳細については、Jones et al., Nature 321: 522~525 (1986); Riechmann et al., Nature 332: 323~329 (1988); 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593~596 (1992)を参照されたい。

20

30

【0046】

ヒト化HER2抗体としては、参照によって本明細書に明示的に援用される米国特許明細書第5, 821, 337号表3に示すように、huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7及び、huMAb4D5-8またはトラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））、米国特許明細書第2006/0018899号に記載されているようにヒト化520C9（WO93/21319）及び20'ヒト化2C4抗体が挙げられる。

40

【0047】

抗原結合ポリペプチドコンストラクト

本明細書に記載の方法において使用される抗原結合コンストラクトとしては、例えば、抗原結合ドメインなどの抗原結合ポリペプチドコンストラクトが挙げられる。抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2に特異的に結合する。抗原結合ポリペプチドコンストラクトのフォーマットは、その適用に依存して、例えば、Fabフォーマット、sc

50

F Vフォーマット、S d a bフォーマットであり得る。

【0048】

「F a b断片」フォーマット（抗原結合断片とも称される）は、それぞれ軽鎖及び重鎖での可変ドメインV L及びV Hと共に、軽鎖の定常ドメイン（C L）及び重鎖の第1の定常ドメイン（C H 1）を含有する。可変ドメインは、抗原結合に伴う相補性決定ループ（C D R、高頻度可変性領域とも称される）を含む。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域の1つ以上のシステインなど、重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端に少数の残基を添加することによって、F a b断片とは異なる。

【0049】

「一本鎖F v」または「s c F v」フォーマットとしては、これらのドメインは、一本鎖ポリペプチド内に存在する抗体のV H及びV Lドメインが挙げられる。一実施形態では、F vポリペプチドは、抗原結合のために、s c F vが所望のコンストラクトを形成できるようになるV HドメインとV Lドメインとの間にポリペプチドリッカーを更に含む。s c F vを検討する場合は、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269~315 (1994)を参照されたい。H E R 2抗体s c F v断片は、W O 9 3 / 1 6 1 8 5、米国特許明細書第5, 5 7 1, 8 9 4号及び米国特許明細書第5, 5 8 7, 4 5 8号に記載されている。

【0050】

「シングルドメイン抗体」または「S d a b」フォーマットは、個々の免疫グロブリンドメインである。S d a bは、かなり安定しており、抗体のF c鎖との融合パートナーとして、容易に発現する（Harmsen MM, De Haard HJ (2007), "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments" Appl. Microbiol Biotechnol. 77 (1) : 13~22）。

【0051】

一価で抗原に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、公知の抗体若しくは抗原結合ドメインから誘導することができるか、または新規の抗体若しくは抗原結合ドメインから誘導することができる。抗原結合コンストラクトの選択は、本明細書に更に詳細に記載されている。

【0052】

一価抗原結合コンストラクトがH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、F a b断片、s c F v及びs d a bなどのさまざまなフォーマットで公知の抗H E R 2抗体または抗H E R 2結合ドメインから誘導することができる。ある実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、これらの抗体のヒト化体またはキメラ体から誘導することができる。一実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、トラスツズマブ、ペルツズマブ、またはそれらのヒト化体のF a b断片から誘導される。このような抗原結合ポリペプチドコンストラクトの非限定的例としては、これらに限定されないが、1 0 4 0、1 0 4 1及び4 1 8 2など、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクト内で見出されるものが挙げられる。一実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、s c F vから誘導される。このような抗原結合ポリペプチドコンストラクトの非限定的例としては、6 3 0及び8 7 8など、一価抗原結合コンストラクト内で見出されるものが挙げられる。一実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、s d a bから誘導される。

【0053】

本明細書の他の場所で記述しているように、E C D 1、E C D 2またはE C D 4に結合する抗体は、当技術分野において既知であり、例えば、2 C 4またはペルツズマブ（E C D 2に結合する）、4 D 5またはトラスツズマブ（E C D 4に結合する）、あるいは7 C

2/F3、B1D2、またはc6.5 (ECD1に結合する)が挙げられる。HER2に結合する他の抗体についても、当該技術分野、例えば、WO2011/147982 (Genmab A/S)に記述されている。本明細書に記載の治療法での使用に好適な一価抗原結合コンストラクトは、ECD1、ECD2、またはECD4に結合する他の公知の抗HER2抗体から誘導することができる。

【0054】

いくつかの実施形態では、一価抗原結合コンストラクトの抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2のECD4へのトラスツズマブの結合を50%以上遮断する抗体から誘導される。いくつかの実施形態では、一価抗原結合コンストラクトの抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2のECD2へのペルツズマブの結合を50%以上遮断する抗体から誘導される。いくつかの実施形態では、一価抗原結合コンストラクトの抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2のECD1へのC6.5、B1D2または7C2/F3の結合を50%以上遮断する抗体から誘導される。

10

【0055】

いくつかの実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトを修飾して、HER2のアフィニティを増大させる。HER2のアフィニティが増大している抗原結合コンストラクトの作製方法及び/またはスクリーニング方法の例を、本明細書に記載する。非限定的例としては、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクト4442、4443、4444、及び4445内で見出されるものが挙げられる。

【0056】

HER2

本明細書に記載の方法としては、HER2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを有する少なくとも1つの単離された一価抗原結合コンストラクトの投与が挙げられる。いくつかの実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2のECD1及びECD2またはECD4に結合される。

20

【0057】

発現「ErbB2」及び「HER2」は、本明細書では同義的に用いられ、例えば、Semba et al., PNAS (USA) 82:6497~6501 (1985) 及び Yamamoto et al., Nature 319:230~234 (1986) (Genebankアクセッション番号X03363)に記載されたヒトHER2タンパク質を意味する。用語「erbB2」及び「neu」は、ヒトErbB2タンパク質をコードする遺伝子を意味し、p185またはp185neuは、neu遺伝子のタンパク質生成物を意味する。好ましいHER2は、天然配列ヒトHER2である。

30

【0058】

HER2の細胞外 (ecto) ドメインは、4つのドメイン、ドメインI (ECD1、約1~195のアミノ酸残基)、ドメインII (ECD2、約196~319のアミノ酸残基)、ドメインIII (ECD3、約320~488のアミノ酸残基)、及びドメインIV (ECD4、約489~630のアミノ酸残基) (残基の数には、シグナルペプチドを含まない)を含む。Garrett et al., Mol. Cell. 11:495~505 (2003), Cho et al., Nature 421:756~760 (2003), Franklin et al., Cancer Cell 5:317~328 (2004), Tse et al., Cancer Treat Rev. 2012 Apr; 38(2):133~42 (2012)、または Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746~1750 (1993)を参照されたい。

40

【0059】

HER2の配列は次のとおりである; ECD境界は、ドメインI:1~165; ドメインII:166~322; ドメインIII:323~488; ドメインIV:489~607である。

```

1 tqvctgtdmk lrlpaspeth ldmlrhlyqg cqvvqgnlel tylptnasls flqdiqevqg
61 yvliahnqvr qvplqrlriv rgtqlfedny alavldngdp lnnttpvtga spggglrelql
121 rslteilkkg vliqrnpqlc yqdtlwkdi fhknnqlalt lidtnrsrac hpcspmckgs
181 rcwgessedc qsltrtvcag gcarckgplp tdccheqcaa gctgpkhsdc lacihfnhsg
241 icelhcpalv tyntdtfesm pnpegrytfg ascvtacpyn ylstdvgsct lvcplhnqev
301 taedgtqrce kcskpcarvc yglgmehltre vrvavtsaniq efagckkifg slaflpesfd
361 gdpasntapl qpeqlqvfet leeitgylyi sawpdsldpl svfqnlqvgr grilhngays
421 ltlqglgisw lglrslrelg sglalihhnt hlcfvhtvpw dqlfrnphqa llhtanrped
481 ecvgeglach qlcarghchw pgptqcvncs qflrgqecve ecrvlqglpr eyvna rhclp
541 chpecqpqng svtcfgpead qcvacahykd pffcvarcps gvkpdl symp iw kfpdeega
601 cqpccpin (SEQ ID NO:318)

```

10

【0060】

「HER受容体」は、ヒト上皮成長因子受容体（HER）ファミリーに属する受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、EGFR受容体、HER2受容体、HER3受容体及びHER4受容体が挙げられる。HER受容体は、概して細胞外ドメインを含み、HERリガンド、親油性の膜貫通ドメイン、保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン、及びリン酸化され得るいくつかのチロシン残基を含むカルボキシ末端シグナル伝達ドメインに結合し得る。

20

【0061】

「HERリガンド」は、HER受容体に結合する及び／または活性化するポリペプチドを意味する。例としては、以下などの天然配列ヒトHERリガンドが挙げられる；上皮成長因子（EGF）（Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612~7621（1972））；トランスフォーミング成長因子アルファ（TGF- α ）（Marquardt et al., Science 223:1079~1082（1984））；schwanomaとしても公知のアンフィレグリンまたはケラチノサイトオートクライン成長因子（Shoyab et al., Science 243:1074~1076（1989））；Kimura et al., Nature 348:257~260（1990）；及びCook et al., Mol. Cell. Biol. 11:2547~2557（1991））；betacellulin（Shing et al., Science 259:1604~1607（1993））；及びSasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173（1993））；ヘパリン結合上皮成長因子（HB-EGF）（Higashiyama et al., Science 251:936~939（1991））；epiregulin（Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495~7500（1995））；及びKomurasaki et al., Oncogene 15:2841~2848（1997））；ヘレグリン（下記参照）；ニューレグリン-2（NRG-2）（Carraway et al., Nature 387:512~516（1997））；ニューレグリン-3（NRG-3）（Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562~9567（1997））；ニューレグリン-4（NRG-4）（Harari et al., Oncogene 18:2681~89（1999））またはクリプロ（CR-1）（Kannan et al., J. Biol. Chem. 272（6）:3330~3335（1997））。EGFRを結合するHERリガンドとしては、EGF、TGF- α 、アンフィレグリン、betacellulin、HB-EGF及びepiregulinが挙げられる。HER3を結合するHERリガンドとしては、ヘレグリンが挙げられる。HER4を結合可能なHERリガンドとしては、betacellulin、epiregulin、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4及

30

40

50

びヘレグリンが挙げられる。

【0062】

本明細書で使用する時、米国特許第5,641,869号またはMarchionni et al., Nature, 362:312~318 (1993)に記載されているように、「ヘレグリン」(HRG)は、ヘレグリン遺伝子産物によってコードされるポリペプチドを意味する。ヘレグリンの例としては、以下が挙げられる；ヘレグリン- α 、ヘレグリン- β 1、ヘレグリン- β 2及びヘレグリン- β 3 (Holmes et al., Science, 256:1205~1210 (1992))；及び米国特許第5,641,869号)；neu分化因子(NDF) (Peles et al. Cell 69:205~216 (1992))；アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA) (Falls et al. Cell 72:801~815 (1993))；グリア成長因子(GGF) (Marchionni et al., Nature, 362:312~318 (1993))；感覚神経及び運動神経誘導因子(SMDF) (Ho et al. J. Biol. Chem. 270:14523~14532 (1995))； γ -ヘレグリン (Schaefer et al. Oncogene 15:1385~1394 (1997))。この用語には、それらのEGF-様ドメイン断片などの(例えば、HRG β 1177~244)天然配列HRGポリペプチドの生物学的活性断片及び／またはアミノ酸配列変異型が含まれる。

【0063】

「HER活性化」または「HER2活性化」とは、いずれか1つ以上のHER受容体またはHER2受容体の活性化またはリン酸化を意味する。概して、HER活性化により、シグナル伝達が起こる(例えば、HER受容体または基質ポリペプチド内でのHER受容体リン酸化チロシン残基の細胞内キナーゼドメインによって起こる)。HER活性化は、目的のHER受容体を含むHER二量体に結合しているHERリガンドに媒介されてもよい。HER二量体に結合するHERリガンドは、二量体中の1つ以上のHER受容体のキナーゼドメインを活性化することもあり、これによって、1つ以上のHER受容体においてチロシン残基がリン酸化される、及び／またはAktまたはMAPK細胞内キナーゼなど、追加の基質ポリペプチド(複数可)中のチロシン残基がリン酸化される。

【0064】

本明細書で使用する時、用語「EGFR」は、上皮成長因子受容体(HER-1またはErb-B1としても公知)を意味し、ヒト形態(複数可) (Ulrich, A. et al., Nature 309:418~425 (1984))；SwissProtアクセッション#P00533；セカンダリアクセセッション番号：O00688、O00732、P06268、Q14225、Q92795、Q9BZS2、Q9GZX1、Q9H2C9、Q9H3C9、Q9UMD7、Q9UMD8、Q9UMG5)並びに天然アイソフォーム及びそれらの変異型が挙げられる。このようなアイソフォーム及び変異型としては、これらに限定されないが、EGFRvIII変異体、選択的スプライシング産物(例えば、SwissProtアクセセッション番号P00533-1、P00533-2、P00533-3、P00533-4により識別される)、変異型GLN-98、ARG-266、Lys-521、ILE-674、GLY-962及びPRO-988 (Livingston, R. J. et al., NIEHS-SNPs, environmental genome project, NIEHS ES15478, Department of Genome Sciences, Seattle, Wash. (2004))、及び次のアクセセッション番号によって同定される他のもの：NM005228.3、NM201282.1、NM201283.1、NM201284.1 (REFSEQ mRNA)；AF125253.1、AF277897.1、AF288738.1、AI217671.1、AK127817.1、AL598260.1、AU137334.1、AW163038.1、AW295229.1、BC057802.1、CB160831.1、K03193.1、U48722.1、U95089.1、X00588.1、X00663.1；H54484S1、H54484S3、

H 5 4 4 8 4 S 2 (M I P S アセンブリ) ; D T . 4 5 3 6 0 6、D T . 8 6 8 5 5 6 5 1、D T . 9 5 1 6 5 5 9 3、D T . 9 7 8 2 2 6 8 1、D T . 9 5 1 6 5 6 0 0、D T . 1 0 0 7 5 2 4 3 0、D T . 9 1 6 5 4 3 6 1、D T . 9 2 0 3 4 4 6 0、D T . 9 2 4 4 6 3 4 9、D T . 9 7 7 8 4 8 4 9、D T . 1 0 1 9 7 8 0 1 9、D T . 4 1 8 6 4 7、D T . 8 6 8 4 2 1 6 7、D T . 9 1 8 0 3 4 5 7、D T . 9 2 4 4 6 3 5 0、D T . 9 5 1 5 3 0 0 3、D T . 9 5 2 5 4 1 6 1、D T . 9 7 8 1 6 6 5 4、D T . 8 7 0 1 4 3 3 0、D T . 8 7 0 7 9 2 2 4 (D O T S アセンブリ) が挙げられる。本明細書で参照しているアクセッション番号はすべて、2013年11月8日時点でのNCBI データベース (または関連した標準データベース) から取得する。

【0065】

一価抗原結合コンストラクトがHER2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2若しくはHER2の特定のドメインまたはエピトープに結合する。一実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2の細胞外ドメインに結合する。当該技術分野で周知であるとおり、HER2抗原は、複数の細胞外ドメイン (ECD) を含む。

【0066】

一実施形態は、ECD1、ECD2、ECD3及びECD4から選択されるHER2のECDに結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトである。別の実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、ECD1、ECD2及びECD4から選択されるHER2のECDに結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、ECD1に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、ECD2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、ECD4に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。別の実施形態では、一価抗原結合構造コンストラクトは、2C4、4D5及びC6.5から選択されるHER2のエピトープに結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。

【0067】

「エピトープ2C4」は、抗体2C4が結合するHER2細胞外ドメイン内の領域である。2C4エピトープに結合する抗体のスクリーニングを行うには、ルーチンの交差ブロッキングアッセイ (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されているものなど) を実施してもよい。あるいは、当該技術分野において既知の方法を使用して、エピトープマッピングを実施して、抗体がHER2の2C4エピトープに結合するかを評価することができる、及び/または抗体HER2コンストラクト (Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)) を研究して、HER2の何のドメイン (複数可) が抗体によって結合されているかがわかる。エピトープ2C4は、HER2の細胞外ドメインにおいてドメインII由来の残基を含む。2C4及びペルツズマブは、ドメインI、II及びIIIの接合部でHER2の細胞外ドメインに結合する (Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)) 。

【0068】

「エピトープ4D5」は、抗体4D5 (ATCC CRL10463) 及びトラスツマブが結合するHER2細胞外ドメイン内の領域である。このエピトープは、HER2の膜貫通ドメインに近く、HER2のドメインIV内にある。4D5エピトープに結合する抗体のスクリーニングを行うには、ルーチンの交差ブロッキングアッセイ (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されているものなど) を実施してもよい。あるいは、エピトープマッピングを実施して、抗体がHER2の4D5エピトープ (例えば、約529残基〜約62

10

20

30

40

50

5 残基の範囲内で任意の 1 つ以上の残基) に結合するかを評価することができる (米国特許公報第 2006/0018899 号図 1 を参照されたい)。

【0069】

「エピトープ 7C2/F3」は、7C2 及び/または 7F3 抗体 (それぞれ、ATCC に寄託。下記参照) が結合する HER2 の細胞外ドメインのドメイン I 内の N 末端領域である。7C2/7F3 エピトープに結合する抗体のスクリーニングを行うには、ルーチンの交差ブロッキングアッセイ (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) に記載されているものなど) を実施してもよい。あるいは、エピトープマッピングを実施して、抗体が HER2 の 7C2/7F3 エピトープ (例えば、HER2 の約 22 残基～約 53 残基の範囲内で任意の 1 つ以上の残基) に結合するかを証明することができる (米国特許公報第 2006/0018899 号図 1 を参照されたい)。

10

【0070】

「エピトープ C6.5」は、抗体 C6.5 が結合する HER2 の細胞外ドメインのドメイン I 内の領域である (Schier R. et al. (1995) In vitro and in vivo characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. Immunotechnology 1, 73)。

20

【0071】

「特異的に結合する」、「特異的結合」または「選択的結合」は、抗原にとって結合が選択的であり、不必要なまたは非特異的な相互作用とは区別され得ることを意味する。抗原結合部分が特定の抗原決定基に結合する能力は、酵素-結合免疫吸着アッセイ (ELISA) または当業者に既知の他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術 (BIACore instrument にて解析) (Liljebblad et al, Glyco J 17, 323～329 (2000)) 及び従来の結合アッセイ (Heeley, Endocr Res 28, 217～229 (2002)) を介して測定され得る。一実施形態では、非関連タンパク質への抗原結合部分の結合長さは、例えば、SPR で測定されたとおり、抗原への抗原結合部分の結合の約 10% 未満である。ある実施形態では、抗原に結合する抗原結合部分、またはその抗原結合部分を含む抗原結合分子は、解離定数 (K_D) 1 μ M 未満、100 nM 未満、10 nM 未満、1 nM 未満、0.1 nM 未満、0.01 nM 未満、または 0.001 nM 未満 (例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 10^{-8} M～ 10^{-13} M、例えば、 10^{-9} M～ 10^{-13} M) を有する。

30

【0072】

Fc

本明細書に記載の方法で使用される抗原結合コンストラクトとしては、Fc、例えば二量体 Fc が挙げられる。

【0073】

用語「Fc」は、少なくとも一部分の定常領域を含有する免疫グロブリン重鎖の C 末端領域であり、次に詳細に記載する。この用語には、天然配列 Fc 領域及び変異型 Fc 領域が挙げられる。本明細書で特に指示がない限り、Fc 領域または定常領域でのアミノ酸残基は、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 にて記載されているように、EU ナンバリングシステム (EU インデックスとも称される) により付番される。本明細書で使用する時、二量体 Fc の「Fc ポリペプチド」は、二量体 Fc ドメイン (すなわち、免疫グロブリン重鎖の C 末端定常領域を含むポリペプチド) を形成する 2 つのポリペプチドのうちの 1 つを意味し、安定的自己組織化が可能である。例えば、二量体の IgG Fc

40

50

のFcポリペプチドは、IgG CH₂及びIgG CH₃定常ドメイン配列を含む。

【0074】

「二量体」または「ヘテロ二量体」は、少なくとも、第1のモノマーポリペプチド及び第2のモノマーポリペプチドを含む分子である。ヘテロ二量体の場合、該モノマーのうちの1つは、他のモノマーとは少なくとも1つのアミノ酸残基が異なる。ある実施形態では、二量体の組織化は、表面積の埋設により行われる。いくつかの実施形態では、単量体ポリペプチドは、所望の二量体の好ましい形成及び／または他の所望外の試験体の好ましくない形成により二量体の形成を駆動する静電相互作用及び／または塩橋相互作用により互いに相互作用する。いくつかの実施形態では、モノマーポリペプチドは、所望の二量体の好ましい形成及び／または他の自己組織型の好ましくない形成により二量体の形成を駆動する疎水性相互作用により互いに相互作用する。ある実施形態では、モノマーポリペプチドは、共有結合形成により互いに相互作用する。ある実施形態では、所望の二量体形成を駆動する天然に存在するシステインまたは取り込まれたシステインに共有結合が形成される。本明細書に記載のある実施形態では、モノマー間にいずれの共有結合も形成されていない。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、所望の二量体の好ましい形成、及び／または他の所望外の実施形態の好ましくない形成により二量体の形成を駆動するpacking（パッキング）／サイズ相補性／knobs-into-holes／protruberance-cavity type相互作用により、互いに相互作用する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、二量体の形成を駆動するカチオンπ相互作用により互いに相互作用する。ある実施形態では、個々のモノマーポリペプチドは、溶液中に単離モノマーとして存在することはできない。

【0075】

Fcドメインは、CH₃ドメインまたはCH₃及びCH₂ドメインのいずれかを含む。CH₃ドメインは、2つのCH₃配列を含み、二量体Fcの2つのFcポリペプチドのそれぞれの由来のものである。CH₂ドメインは、2つのCH₂配列を含み、二量体Fcの2つのFcポリペプチドのそれぞれの由来のものである。

【0076】

いくつかの態様では、Fcは、少なくとも1つのまたは2つのCH₃配列を含む。いくつかの態様では、Fcは、1つ以上のリンカーの有無に関係なく、第1の抗原結合コンストラクト及び／または第2の抗原結合コンストラクトに連結する。いくつかの態様では、FcはヒトFcである。いくつかの態様では、FcはヒトIgGまたはIgG1 Fcである。いくつかの態様では、Fcはヘテロ二量体Fcである。いくつかの態様では、Fcは少なくとも1つまたは2つのCH₂配列を含む。

【0077】

いくつかの態様では、Fcは、CH₃配列の少なくとも1つに1つ以上の修飾を含む。いくつかの態様では、Fcは、CH₂配列の少なくとも1つに1つ以上の修飾を含む。いくつかの態様では、Fcは1つのポリペプチドである。いくつかの態様では、Fcは複数のペプチド、例えば2つのポリペプチドである。

【0078】

いくつかの態様では、Fcは2011年11月4日出願の特許出願PCT/CA2011/001238または2012年11月2日出願のPCT/CA2012/050780に記載されているFcであり、そのそれぞれの全体開示が、本出願において参照によって本明細書に援用される。

【0079】

修飾CH₃ドメイン

いくつかの態様では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトは、非対称に修飾された修飾CH₃ドメインを含むヘテロ二量体Fcを含む。ヘテロ二量体Fcは、第1のFcポリペプチド及び第2のFcポリペプチドの2つの重鎖定常ドメインポリペプチドを含むことができる。Fcが1つの第1のFcポリペプチド及び1つの第2のFcポリペプチドを含む場合には、これらは同義的に使用可能である。概して、第1のFcポリペプチドは

第1のCH3配列を含み、第2のFcポリペプチドは、第2のCH3配列を含む。

【0080】

非対称形式で取り込まれた1つ以上のアミノ酸の修飾を含む2つのCH3配列は、2つのCH3配列が二量化するとき、概して、ホモ二量体ではなく、ヘテロ二量体Fcとなる。本明細書で使用するとき、「非対称のアミノ酸修飾」とは、第1のCH3配列の特定の位置でのアミノ酸は、第2のCH3配列の同一位置でのアミノ酸とは異なり、第1及び第2のCH3配列は優先的に対となり、ホモ二量体ではなく、ヘテロ二量体を形成する任意の修飾を意味する。このヘテロ二量体化は、各配列において対応するアミノ酸の同じ位置の2つのアミノ酸のうちの1つのみ修飾した結果であるか、または第1及び第2のCH3配列のそれぞれの対応する同じ位置での各配列の双方のアミノ酸の修飾であってもよい。ヘテロ二量体Fcの第1及び第2のCH3配列は、1つ以上の非対称のアミノ酸修飾を含むことができる。

10

【0081】

表Aは、ヒトIgG1 Fc配列のアミノ酸配列を示し、これは、全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231～447に相当する。CH3配列は、全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸341～447を含む。

【0082】

典型的には、Fcは、二量化が可能な2つの連続重鎖配列（A及びB）を含むことができる。いくつかの態様では、Fcの片方または両方の配列は、次の場所で1つ以上の突然変異または修飾を含む：L351、F405、Y407、T366、K392、T394、T350、S400及び／またはN390（EU番号を使用）。いくつかの態様では、Fcとしては、表Xに示す変異配列が挙げられる。いくつかの態様では、Fcとしては、変異型1A～Bの変異が挙げられる。いくつかの態様では、Fcとしては、変異型2A～Bの変異が挙げられる。いくつかの態様では、Fcとしては、変異型3A～Bの変異が挙げられる。いくつかの態様では、Fcとしては、変異型4A～Bの変異が挙げられる。いくつかの態様では、Fcとしては、変異型5A～Bの変異が挙げられる。

20

【0083】

（表A）IgG1 Fc配列

ヒトIgG1 Fc配列 231～447 (EU番号)	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:317)	
変異型IgG1 Fc配列 (231～447)	鎖	変異
1	A	L351Y_F405A_Y407V
1	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
2	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
3	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
4	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
5	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

10

20

30

【0084】

第1及び第2のCH3配列は、全長ヒトIgG1重鎖のアミノ酸231～447に関して、本明細書に記載されるように、アミノ酸変異を含んでもよい。一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、F405及びY407位にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列及びT394位にアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含む。一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351Y、F405A及びY407Vから選択される1つ以上のアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列及びT366L、T366I、K392L、K392M及びT394Wから選択される1つ以上のアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含む。

【0085】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407位にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列及びT366、K392、及びT394位でのアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含み、第1または第2のCH3配列の片方はQ347位にアミノ酸修飾を更に含み、他方のCH3配列は、K360位にアミノ酸修飾を更に含む。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407位にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列及びT366、K392、及びT394でのアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含み、第1または第2のCH3配列の片方はQ347位にアミノ酸修飾を更に含み、他方のCH3配列は、K360位にアミノ酸修飾を更に含み、また該CH3配列の片方または両方は、アミノ酸修飾T350Vを更に含む。

40

50

【0086】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407位にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列及びT366、K392、及びT394位でのアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含み、該第1または第2のCH3配列の片方はD399RまたはD399Kのアミノ酸修飾を更に含み、該他方のCH3配列は、T411E、T411D、K409E、K409D、K392E及びK392Dの1つ以上を含む。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407位にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列及びT366、K392、及びT394位でのアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含み、該第1及び第2のCH3配列の片方はD399RまたはD399Kのアミノ酸修飾を更に含み、該他方のCH3配列は、T411E、T411D、K409E、K409D、K392E及びK392Dの1つ以上を含み、該CH3配列の片方または両方は、アミノ酸修飾T350Vを更に含む。

10

【0087】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、L351、F405及びY407位にアミノ酸修飾を有する第1のCH3配列並びにT366、K392、及びT394位にアミノ酸修飾を有する第2のCH3配列を有する修飾CH3ドメインを含み、該CH3配列の片方または両方はT350Vのアミノ酸修飾を更に含む。

【0088】

一実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、次のアミノ酸修飾を含む修飾CH3ドメインを含み、「A」は第1のCH3配列に対するアミノ酸修飾を示し、「B」は第2のCH3配列に対するアミノ酸修飾を示す。A：L351Y__F405A__Y407V、B：T366L__K392M__T394W、A：L351Y__F405A__Y407V、B：T366L__K392L__T394W、A：T350V__L351Y__F405A__Y407V、B：T350V__T366L__K392L__T394W、A：T350V__L351Y__F405A__Y407V、B：T350V__T366L__K392M__T394W、A：T350V__L351fY__S400E__F405A__Y407V、及び／またはB：T350V__T366L__N390R__K392M__T394W。

20

【0089】

1つ以上の非対称のアミノ酸の修飾により、ヘテロ二量体CH3ドメインが野生型ホモ二量体CH3ドメインに相当する安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成が促進され得る。一実施形態において、1つ以上の非対称のアミノ酸修飾により、ヘテロ二量体Fcドメインが野生型ホモ二量体Fcドメインに相当する安定性を有するヘテロ二量体Fcドメインの形成が促進される。一実施形態において、1つ以上の非対称のアミノ酸の修飾により、ヘテロ二量体Fcドメインが、示差走査熱量測定試験において、融解温度(Tm)を介して観察された安定性を有し、該融解温度が、対応する対称野生型ホモ二量体Fcドメインで観察された融解温度の4℃以内であるヘテロ二量体Fcドメインの形成が促進される。いくつかの態様では、Fcは、野生型ホモ二量体Fcに相当する安定性を有するヘテロ二量体Fcの形成を促進する少なくとも1つのCH3配列において1つ以上の修飾を含む。

30

40

【0090】

一実施形態では、CH3ドメインの安定性は、例えば、示差走査熱量測定(DSC)によって、CH3ドメインの融解温度を測定することによって評価することができる。したがって、更なる実施形態では、CH3ドメインは、約68℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約70℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約72℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約73℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約75℃以上の融解温度を有する。別の実施形態では、CH3ドメインは、約78℃以上の融解温度を有する。いくつかの態様では、二量体化CH3配列は、融解温度(Tm)約68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、77.5、78、79、

50

80、81、82、83、84、または85℃以上を有する。

【0091】

いくつかの実施形態では、修飾CH3配列を含むヘテロ二量体Fcは、発現生成物内のホモ二量体Fcと比較して、少なくとも約75%の純度で形成することができる。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約80%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約85%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約90%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約95%超の純度で形成される。別の実施形態では、ヘテロ二量体Fcは、約97%超の純度で形成される。いくつかの態様では、Fcは、発現するとき、約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%超の純度で形成されるヘテロ二量体である。いくつかの態様では、Fcは、単一細胞を介して発現するとき、約75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%超の純度で形成されるヘテロ二量体である。

10

【0092】

ヘテロ二量体Fc形成を促進するためのモノマーFcポリペプチドの追加の修飾方法は、以下に記述されている；PCT国際公開特許WO96/027011 (knobs into holes)、Gunasekaran et al. (Gunasekaran K. et al. (2010) J Biol Chem. 285, 19637~46, electrostatic design to achieve selective heterodimerization)、Davis et al. (Davis, JH. et al. (2010) Prot Eng Des Sel ; 23 (4) : 195-202, strand exchange engineered domain (SEED) technology)、及びLabrijn et al [Efficient generation of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange. Labrijn AF, Meesters JI, de Goeij BE, van den Bremer ET, Neijssen J, van Kampen MD, Strumane K, Verploegen S, Kundu A, Gramer MJ, van Berkel PH, van de Winkel JG, Schuurman J, Parren PW. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Mar 26; 110 (13) : 5145~50。

20

30

【0093】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離した抗原結合コンストラクトは、抗原を結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクト及び安定性など、優れた生物物理学的性質を有する二量体Fcを含み、かつ同一の二量体Fcを含まない抗原結合コンストラクトと比較して、製造が簡易である。Fc領域におけるいくつかのアミノ酸の修飾は、異なるFcガンマ受容体のFcのアフィニティを選択的に変更するために、当技術分野において既知である。いくつかの態様では、Fc-ガンマ受容体の選択的結合を促進するために、Fcは1つ以上の修飾を含む。これらのアミノ酸修飾の型は、典型的には、CH2ドメイン内または抗原結合コンストラクト内のヒンジ領域に配置される。

40

【0094】

CH2ドメイン

FcのCH2ドメインは、表aに示す配列のアミノ酸231~340である。代表的突然変異は以下に記載される：

● S298A/E333A/K334A, S298A/E333A/K334A/K326A (Lu Y, Vernes JM, Chiang N, et al. J Immunol Methods. 2011 Feb 28; 365 (1-2) : 13

50

2-41) ;

●F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (Stavénhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, et al. Cancer Res. 2007 Sep 15; 67(18): 8882-90; Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, et al. Breast Cancer Res. 2011 Nov 30; 13(6): R123);

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

●S239D/I332E/A330L, S239D/I332E (Lazar GA, Dang W, Karki S, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Mar 14; 103(11): 4005~10);

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

●S239D/D265S/S298A/I332E、S239E/S298A/K326A/A327H、G237F/S298A/A330L/I332E、S239D/I332E/S298A、S239D/K326E/A330L/I332E/S298A、G236A/S239D/D270L/I332E、S239E/S267E/H268D、L234F/S267E/N325L、G237F/V266L/S267D並びに本明細書に参照として援用されるWO2011/120134及びWO2011/120135に列挙されている他の突然変異。Therapeutic Antibody Engineering (by William R. Strohl and Lila M. Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012)では、283頁に突然変異が列挙されている。

【0095】

いくつかの実施形態では、CH2ドメインは、1つ以上の非対称アミノ酸の修飾を含む。いくつかの実施形態では、CH2ドメインは、FcRの選択的結合を促進するために、1つ以上の非対称アミノ酸の修飾を含む。いくつかの実施形態では、CH2ドメインにより、本明細書に記載の単離コンストラクトの分離及び精製が可能になる。

【0096】

エフェクター機能の向上のための更なる修飾

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトを修飾して、そのエフェクター機能を向上し得る。このような修飾は、当技術分野において既知であり、低フルコシル化、または活性化受容体（主にADC用FCGR3a及びCDC用のC1q）に対するFcアフィニティの修飾操作が挙げられる。次表Bは、エフェクター機能工学に関する文献で報告されているさまざまな設計についてまとめている。

【0097】

したがって、一実施形態では、本明細書に記載のコンストラクトとしては、表Bに記載のように、改善されたエフェクター機能を付与する1つ以上のアミノ酸の修飾を含む二量体Fcを挙げることができる。別の実施形態では、コンストラクトを低フルコシル化することで、エフェクター機能を改善することができる。

【0098】

(表B) CH2ドメイン及びエフェクター機能工学

文献	変異	効果
Lu, 2011, Ferrara 2011, Mizushima 2011	低フコシル化	ADCCの増大
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A	ADCCの増大
Lu, 2011	S298A/E333A/K334A/K326A	ADCCの増大
Stavenshagen, 2007	F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L	ADCCの増大
Nordstrom, 2011	F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L	ADCCの増大
Stewart, 2011	F243L	ADCCの増大
Shields, 2001	S298A/E333A/K334A	ADCCの増大
Lazar, 2006	S239D/I332E/A330L	ADCCの増大
Lazar, 2006	S239D/I332E	ADCCの増大
Bowles, 2006	AME-D, 特定の変異なし	ADCCの増大
Heider, 2011	37.1, 変異非開示	ADCCの増大
Moore, 2010	S267E/H268F/S324T	CDCの増大

10

20

30

40

【0099】

FcγR及び／または補体結合及び／またはエフェクター機能が低下するFc修飾が当技術分野において既知である。近年の公報では、低下またはサイレンス化されたエフェクター活性を有する抗体の操作に使用されてきた戦略が記述されている（Stroh1, WR (2009), Curr Opin Biotech 20:685～691及びStroh1, WR and Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp225～249を参照されたい）。これらの戦略としては、Fcのヒンジ領域またはCH2領域における、グリコシル化の修飾、IgG2/IgG4スカフォールドの使用、または突然変異の導入を介するエフェクター機能の低下が挙げられる。例えば、米国特許公報第2011/0212087号（Stroh1）、国際公開特許第WO2006/105338号（Xencor）、米国特許公報第2012/0225058号（Xencor）、米国特許公報第2012/0251531号（Genentech）及びStrop et al（（2012） J. Mol. Biol. 420:204～219）では、Fcに結合するFcγRまたは補体を減少するための特定の修飾について記述している。

【0100】

公知のアミノ酸修飾の特定の非限定的実施例としては、以下の表に示すものが挙げられる：

（表C）Fcに結合するFcγRまたは補体を減少するための修飾

企業名	変異
GSK	N297A
Ortho Biotech	L234A/L235A
Protein Design labs	IGG2 V234A/G237A
Wellcome Labs	IGG4 L235A/G237A/E318A
GSK	IGG4 S228P/L236E
Alexion	IGG2/IGG4組み合わせ (combo)
Merck	IGG2 H268Q/V309L/A330S/A331S
Bristol-Myers	C220S/C226S/C229S/P238S
Seattle Genetics	C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A
Amgen	大腸菌 (E.coli) で生成、糖なし
Medimune	L234F/L235E/P331S
Trubion	ヒンジ変異、おそらく C226S/P230S

10

20

【0101】

30

一実施形態では、Fcは、上記表に示される少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、L234、L235、またはD265の少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、L234、L235、及びD265のアミノ酸修飾を含む。別の実施形態では、Fcは、L234A、L235A、及びD265Sのアミノ酸修飾を含む。

【0102】

FcRn結合及びPKパラメータ

当該技術分野で公知のように、FcRnへの結合により、エンドソームから血流に戻る形質膜陥入抗体を再利用する (Raghavan et al, 1996, Annu Rev Cell Dev Biol 12:181~220; Ghetie et al, 2000, Annu Rev Immunol 18:739~766)。この工程では、全長分子が大きいために腎臓ろ過の防止と一体となり、1週から3週の範囲である好ましい抗体血清半減期となる。FcとFcRnとの結合も、抗体輸送において重要な役割を担っている。したがって、一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトは、FcRnに結合し得る。

40

【0103】

リンカー

本明細書に記載の抗原結合コンストラクトとしては、本明細書に記載のFcに操作可能に連結される1つ以上の抗原結合ポリペプチドコンストラクトを挙げることができる。いくつかの態様では、Fcは1つ以上のリンカーにより1つ以上の抗原結合ポリペプチドコ

50

ンストラクトと連結される。いくつかの態様では、Fcは1つ以上の抗原結合ポリペプチドコンストラクトと直接連結される。いくつかの態様では、Fcはリンカーにより各抗原結合ポリペプチドの重鎖に連結される。

【0104】

いくつかの態様では、1つ以上のリンカーは、1つ以上のポリペプチドリinkerである。いくつかの態様では、1つ以上のリンカーは、1つ以上のIgG1ヒンジ領域を含む。

【0105】

抗原結合コンストラクトの選択

本明細書に記載の方法で使用される抗原結合コンストラクトは、当業者に既知の任意の数の分析法を使用して用いるために、選択され得る。

10

【0106】

アフィニティ成熟

その同種抗原に関して抗原結合ポリペプチドコンストラクトのアフィニティを増大することが望ましい場合、当該技術分野に公知の方法を使用して、その抗原の抗原結合ポリペプチドコンストラクトのアフィニティを増大させることができる。このような方法の例は、次の文献に記述されている；Birtalan et al. (2008) JMB 377, 1518~1528；Gerstner et al. (2002) JMB 321, 851~862；Kelley et al. (1993) Biochem 32 (27), 6828~6835；Li et al. (2010) JBC 285 (6), 3865~3871及びVajdos et al. (2002) JMB 320, 415~428。

20

【0107】

こうした方法の一例としては、アフィニティ成熟である。1つの例示的なHER2抗原結合ドメインのアフィニティ成熟方法を次に示す。トラスツズマブ／HER2 (PDBコード1N8Z) 錯体コンストラクト及びペルツズマブ／HER2錯体コンストラクト (PDBコード1S78) をモデリング化に使用する。分子動態 (MD) を用いて、水性環境でのWT錯体の内因性動的性質を評価することができる。可撓性主鎖と共に平均場法及びdead-end elimination法を用いて、スクリーニング対象の変異モデルコンストラクトを最適化し、作製することができる。挿入後、接触密度、衝突スコア、疎水性及び静電など、いくつかの特性に評点をつける。一般化ボルン法により、溶媒環境の効果の正確なモデリングが可能になり、タンパク質中の特定の位置での交互の残基の型に対する変異後の自由エネルギー差を算出することができる。接触密度及び衝突スコアから、相補性の尺度、効果的なタンパク質挿入の重大な態様をもたらされる。スクリーニング手順では、知識に基づいた潜在性並びに対残基相互作用エネルギー及びエントロピー計算に依存する結合解析スキームを用いる。HER2の結合を強化することが公知の文献に記述されている変異は、次の表にまとめる。

30

【0108】

(表A4) トラスツズマブ－HER2系のHER2への結合の増大が公知のトラスツズマブ変異

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

10

【 0 1 0 9 】

20

(表 A 5) ペルツズマブー H E R 2 系の H E R 2 への結合の増大が公知のペルツズマブ変異

変異	報告されている改善
L_I31A	1.9X
L_Y96A	2.1X
L_Y96F	2.5X
H_T30A	2.1X
H_G56A	8.3X
H_F63V	1.9X

30

【 0 1 1 0 】

好適な一価抗原結合コンストラクトは、以下の性質を有する。i) 飽和抗体濃度での H E R 2 + 癌細胞への最大結合 (B m a x) の上昇、i i) H E R 2 + 癌細胞に内部移行する能力；i i i) H E R 2 + 癌細胞の細胞障害をもたらすエフェクター細胞機能を媒介する能力、及び／または H E R 2 + 癌細胞の増殖を阻害する能力。

40

【 0 1 1 1 】

本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、一旦、標的細胞に結合すると、内部移行する。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、同じ程度になるように内部移行している。いくつかの実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、より効率よく内部移行している。

【 0 1 1 2 】

標的細胞

50

標的細胞は、一価抗原結合コンストラクトの用途に基づいて選択される。一実施形態では、標的細胞は、癌、感染症、自己免疫疾患または炎症性疾患内で活性化されたまたは増幅された細胞である。

【0113】

一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、癌治療に使用することを目的とし、標的細胞は、例えば、SKBR3及びBT474など、EGFR及び／またはHER2の3+過剰発現を示す腫瘍から誘導される。一実施形態では、標的細胞は、例えば、MCF7など、EGFR及び／またはHER2の発現が少ない腫瘍から誘導される。一実施形態では、標的細胞は、例えば、JIMT1など、EGFR及び／またはHER2耐性を示す腫瘍から誘導される。一実施形態では、標的細胞は、トリプルネガティブ（ER／PR／HER2）腫瘍である腫瘍から誘導される。

10

【0114】

一価抗原結合コンストラクトを癌治療に使用することを目的としている一実施形態では、標的細胞は、例示的なEGFR及び／またはHER2の3+過剰発現である癌細胞株である。一実施形態では、標的細胞は、代表的なEGFR及び／またはHER2の発現が少ない癌細胞株である。一実施形態では、標的細胞は、代表的なEGFR及び／またはHER2耐性である癌細胞株である。一実施形態では、標的細胞は、代表的な乳癌トリプルネガティブ細胞（例えば、MDA-MD-231細胞）である癌細胞株である。

【0115】

一実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、乳癌細胞または上皮細胞由来癌細胞を標的とするように設計されている。例としては、以下に限定されないが、プロゲステロン受容体（PR）陰性細胞及びエストロゲン受容体（ER）陰性細胞、低HER2発現細胞、中程度のHER2発現細胞、高HER2発現細胞、抗HER2抗体耐性細胞または上皮細胞由来癌細胞が挙げられる。

20

【0116】

一実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、胃及び食道腺癌を標的とするように設計されている。例示的病理組織学的タイプとしては、腸型表現型を有するHER2陽性近位胃癌、及びHER2陽性遠位びまん性胃癌が挙げられる。胃癌細胞の例示的分類としては、これらに限定されないが、（N-87、OE-19、SNU-216及びMKN-7）が挙げられる。

30

【0117】

他の実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、脳内の転移性HER2+乳癌を標的とするように設計されている。胃癌細胞の例示的分類としては、これらに限定されないが、BT474が挙げられる。

【0118】

一価抗体コンストラクトがHER2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2若しくはHER2の特定のドメインまたはエピトープに結合する。一実施形態では、抗原結合ポリペプチドコンストラクトは、HER2の細胞外ドメインに結合する。当該技術分野で周知であり、HER2抗原は、複数の細胞外ドメイン（ECD）を含む。

40

【0119】

一実施形態では、ECD1、ECD2、ECD3及びECD4から選択されるHER2のECDに結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む本明細書に記載の一価抗体コンストラクトである。別の実施形態では、一価抗体コンストラクトは、ECD1、ECD2及びECD4から選択されるHER2のECDに結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。一実施形態では、一価抗体コンストラクトは、ECD1に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。一実施形態では、一価抗体コンストラクトは、ECD2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。一実施形態では、一価抗体コンストラクトは、ECD4に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。別の実施形態では、一価抗体コンストラクトは、2C4、4D5及びC6.5から

50

選択されるHER2のエピトープに結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む。

【0120】

解離定数 (K_D) 及び最大結合 (B_{max})

いくつかの実施形態では、これらに限定されないが、解離定数及び最大結合などの機能的特性により抗原結合コンストラクトについて記載する。

【0121】

本明細書で使用する時、用語「解離定数 (K_D)」は、特定のリガンドータンパク質相互作用の平衡解離定数と称することを意図する。本明細書で使用する時、リガンドータンパク質相互作用とは、これらに限定されないが、タンパク質ータンパク質相互作用または抗体ー抗原相互作用を意味する。 K_D では、2つのタンパク質（例えば、AB）の性質を測定し、可逆的により小さい要素 ($A+B$) に解離させ、解離速度（「off-rate (k_{off})」とも称される）対会合速度（「on-rate (k_{on})」）の比率として定義される。したがって、 K_D は、 k_{off}/k_{on} と等しく、モル濃度 (M) として表現されている。 K_D がより小さい場合には、結合アフィニティがより強いという結果となる。このため、 $K_D 1mM$ は、 $K_D 1nM$ と比較して、弱い結合アフィニティを示す。抗原結合コンストラクトの K_D 値は、当該技術分野において確立されている方法を用いて求めることができる。抗原結合コンストラクトの K_D を求める一方法は、表面プラズモン共鳴 (SPR)、典型的には、例えばBiacore（登録商標）システムなどの生体内感知装置を用いることによる。等温滴定熱量測定 (ITC) は、値を求める際に使用可能である別の方法である。

【0122】

抗原結合コンストラクトの結合特性は、さまざまな技術によって決定することができる。そのうちの1つは、フローサイトメトリー (FACS, Fluorescence-activated cell sorting) により、抗原を発現している標的細胞への結合を測定することである。典型的には、このような実験では、目的とする抗原を発現している標的細胞を抗原結合コンストラクトと共に異なる濃度でインキュベートし、洗浄し、抗原結合コンストラクトを検出するために第2の剤でインキュベートし、洗浄し、フローサイトメトリー装置で分析し、細胞での検出シグナルの強度を表す中央蛍光強度 (MFI) を測定し、これは、細胞に結合される抗原結合コンストラクトの数に関係する。その後、抗原結合コンストラクト濃度対MFIデータを、飽和結合方程式にフィッティングし、2つの重要な結合パラメータ、 B_{max} 及びみかけの K_D を求める。

【0123】

みかけの K_D またはみかけの平衡解離定数は、細胞の最大半減結合が観察される抗原結合コンストラクトの濃度を示す。明かであるように、 K_D 値が小さいほど、最大の細胞結合に到達するのにより低い抗原結合コンストラクト濃度が必要とされ、このため、抗原結合コンストラクトのアフィニティがより高い。みかけの K_D は、細胞に発現する異なる受容体レベルなど、細胞結合実験条件及びインキュベーション条件に依存し、このため、みかけの K_D は、概して、SPR及びITCなどの無細胞分子実験から求める K_D 値とは異なる。しかし、概して、異なる方法間でも上手く一致している。

【0124】

用語「 B_{max} 」または「最大結合」は、抗原結合コンストラクトの飽和濃度での細胞での最大抗原結合コンストラクトの結合レベルを指す。このパラメータは、相対比較用の任意の単位のMFIで報告され得るか、または標準曲線を用いて、細胞に結合される抗原結合コンストラクト数に対応する絶対値に変換することができる。いくつかの実施形態では、抗原結合コンストラクトは、標準抗原結合コンストラクトの B_{max} の1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9または2.0倍である B_{max} を示す。

【0125】

本明細書に記載の抗原結合コンストラクトについては、飽和濃度であり、FSAにより

Bmaxがこれ以上上昇することがない場合にBmax対FSAの最も明白な分離が発生している。この有意性は、非飽和濃度より低い。一実施形態では、標準抗原結合コンストラクトと比較したときに、抗原結合コンストラクトのBmax及びKDの上昇は、標的細胞での標的抗原の発現レベルに依存していない。一実施形態では、標的細胞において、一価抗原結合コンストラクトは、対応する二価抗原結合コンストラクトと比較して、Bmaxの1.1～1.5倍の上昇を示す。一実施形態では、標的細胞において、一価抗原結合コンストラクトは、対応する二価抗原結合コンストラクトを組み合わせした場合と比較して、Bmaxの1.1～1.5倍の上昇を示す。

【0126】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離された抗原結合コンストラクトであり、該抗原結合コンストラクトは、対応する標準抗原結合コンストラクトと比較して、該抗原を示す標的細胞に対するBmax（最大結合）の上昇を示す。いくつかの実施形態では、Bmaxの該上昇は、対応する標準抗原結合コンストラクトのBmaxの少なくとも約125%である。ある実施形態では、Bmaxの上昇は、対応する標準抗原結合コンストラクトのBmaxの少なくとも約150%である。いくつかの実施形態では、Bmaxの上昇は、対応する標準抗原結合コンストラクトのBmaxの少なくとも約200%である。いくつかの実施形態では、Bmaxの上昇は、対応する標準抗原結合コンストラクトのBmaxの約110%超である。

【0127】

有効性／生物活性

本明細書に示すように、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、優れた有効性及び／または生物活性を示す。本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトの有効性及び／または生物活性の非限定的例は、標的細胞の増殖を阻害し、またはエフェクター細胞媒介細胞死滅を媒介する一価抗原結合コンストラクトの能力によって表わされる。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトの優れた有効性及び／または生物活性は、主に、単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、一価抗原結合コンストラクトのエフェクター機能の増大の結果である。

【0128】

抗体「エフェクター機能」とは、抗体のFcドメイン（天然配列Fcドメインまたはアミノ酸配列変異型Fcドメイン）に起因するこれらの生物学的活性を意味する。抗体エフェクター機能の例としては、抗体依存性細胞貪食活性（ADCP）、C1q結合；補体依存性細胞障害（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞介在細胞障害（ADCC）；貪食活性；細胞表面受容体のダウンレギュレーション（例えば、B細胞受容体、BCR）などが挙げられる。

【0129】

「抗体依存細胞介在細胞障害」及び「ADCC」は、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的細胞障害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）が標的細胞での結合抗体を認識し、その後、標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介反応を意味する。

【0130】

「補体依存性細胞傷害」及び「CDC」とは、補体の存在下における標的の溶解を意味する。補体活性化経路は、補体系（C1q）の第1の構成要素と、同種抗原と錯体化させた分子（例えば、抗体）との結合により開始される。

【0131】

「抗体依存性細胞貪食活性」及び「ADCP」は、単核細胞またはマクロファージ媒介貪食活性を介する標的細胞の破壊を意味する。

【0132】

用語「Fc受容体」及び「FcR」は、抗体のFcドメインに結合する受容体を説明するために使用する。例えば、FcRは、天然配列ヒトFcRであってもよい。概してFc

10

20

30

40

50

Rは、IgG抗体（ガンマ受容体）と結合する受容体であり、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスの受容体（これらの受容体の対立遺伝子変異型及び代替的スプライシング型など）が挙げられる。FcγRII受容体としては、FcγRIIA（「活性化受容体」）及びFcγRIIB（「阻害受容体」）が挙げられ、それらの細胞質ドメインが主に異なる類似のアミノ酸配列を有する。他のイソタイプの免疫グロブリンも、特定のFcRにより結合され得る（例えば、Janeway et al., *Immunobiology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999)を参照されたい）。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（ITAM）を含む。阻害受容体FcγRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン系阻害モチーフ（ITIM）を含む（Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)にて検討）。FcRは、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994)及びde Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)にて検討されている。他のFcRは（今後同定されるものを含む）、本明細書の用語「FcR」を包含する。また、本用語は、新生児型受容体FcRnを更に含み、これは、母性IgGの胎児への移行に関与している（Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976); 及びKim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)）。

10

20

【0133】

本明細書では、用語「アビディティ」は、結合アフィニティと主要コンストラクトとを組み合わせた相乗的な強さ並びに治療用単一特異性二価抗体の生物学的属性を示すために使用される。アビディティがなく、相乗的結合強さがないことによって、みかけの標的結合アフィニティの低下をもたらし得る。他方では、固定数の抗原を有する標的細胞では、多価の（または二価の）結合から生じたアビディティにより、一価の結合を示す抗体に対して、更に少ない数の抗体分子で標的抗原の占有の増加が引き起こされる。二価の溶解抗体を適用するにあたって、標的細胞に結合される更に少ない数の抗体分子で、抗体依存性細胞障害死滅メカニズムは、効率良く機能しないかもしれず、有効性の低下をもたらされる。エフェクター機能のこれらの型は、概して、Fc濃度しきい値に依存すると考えられるため、不十分な抗体が結合して、ADCC、CDC、ADCPを媒介する。アゴニスト抗体の場合、アビディティの低下によりこの効率が低下し、それらの抗原が架橋し、二量化し、経路を活性化する。

30

【0134】

ADCC

このため、一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、さらに高い程度のADCCによる細胞死滅を示す。この実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトを上回る約1.2～1.8倍のADCC活性の上昇を示す。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、ADCCによる細胞死滅において、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、約1.3倍の上昇を示す。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、ADCCによる細胞死滅において、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、約1.4倍の上昇を示す。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、ADCCによる細胞死滅において、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、約1.5倍の上昇を示す。

40

【0135】

一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、EGFR及び／またはHER2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含み、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトを上回る約1.2～1.6倍のADCC活性の上昇を示す。一実施形態では

50

、一価抗原結合コンストラクトは、E G F R及び／またはH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含み、A D C Cによる細胞死滅において、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、約1.3倍の上昇を示す。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、E G F R及び／またはH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含み、A D C Cによる細胞死滅において、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、約1.5倍の上昇を示す。

【0136】

A D C P

一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、さらに高い程度のA D C Pによる細胞死滅を示す。

10

【0137】

C D C

一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、さらに高い程度のC D Cによる細胞死滅を示す。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、E G F R及び／またはH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含み、C D Cによる細胞死滅において、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトよりも、約1.5倍の上昇を示す。

【0138】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離された一価抗原結合コンストラクトであり、該コンストラクトは、2つの抗原結合ポリペプチドコンストラクトを有する対応する二価抗原結合コンストラクトの少なくとも1つのA D C C、A D C P及びC D Cの少なくとも約125%を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離された一価抗原結合コンストラクトであり、該コンストラクトは、2つの抗原結合ポリペプチドコンストラクトを有する対応する二価抗原結合コンストラクトの少なくとも1つのA D C C、A D C P及びC D Cの少なくとも約150%を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の単離された一価抗原結合コンストラクトであり、該コンストラクトは、2つの抗原結合ポリペプチドコンストラクトを有する対応する二価抗原結合コンストラクトの少なくとも1つのA D C C、A D C P及びC D Cの少なくとも約300%を有する。

20

【0139】

F c γ Rに対する結合能力の増大

30

いくつかの実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、1つ以上のF c γ Rへのさらに高い結合能力(R m a x)を示す。一価抗原結合コンストラクトがH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトを上回る約1.3～2倍の間の1つ以上のF c γ Rに対するR m a xの上昇を示す。一価抗原結合コンストラクトがE G F R及び／またはH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトを上回る約1.3～1.8倍の間のC D 1 6 F c γ Rに対するR m a xの上昇を示す。一価抗原結合コンストラクトがE G F R及び／またはH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトを上回る約1.3～1.8倍の間のC D 3 2 F c γ Rに対するR m a xの上昇を示す。一価抗原結合コンストラクトがE G F R及び／またはH E R 2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含む一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトを上回る約1.3～1.8倍の間のC D 6 4 F c γ Rに対するR m a xの上昇を示す。

40

【0140】

F c γ Rのアフィニティの増大

一実施形態では、本明細書に提供される一価抗原結合コンストラクトは、対応する二価抗原結合コンストラクトと比較したとき、予想外のF c γ Rのアフィニティの増大を有する。結合に起因するF c濃度の上昇は、A D C C、A D C P、C D C活性の増大と一致す

50

る。

【0141】

いくつかの実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、1つ以上のFcγRのアフィニティの上昇を示す。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、HER2に結合する抗原結合ポリペプチドコンストラクトを含み、一価抗原結合コンストラクトは、少なくとも1つのFcγRのアフィニティの上昇を示す。本実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、CD32のアフィニティの上昇を示す。

【0142】

別の実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、内部移行の増大を示し、これによって、優れた有効性及び／または生物活性をもたらす。

10

【0143】

一価抗原結合コンストラクトの試験。FcγR、FcRn及びClq結合

本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、エフェクター機能の強化を示す。一価抗原結合コンストラクトのエフェクター機能は、次のように試験を行うことができる。インビトロ及び／またはインビボ細胞障害アッセイを実施して、ADCP、CDC及び／またはADCC活性を評価することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを実施して、FcγR結合を測定することができる。ADCC、NK細胞を媒介するための初代細胞は、FcγRIIIのみを発現し、単核細胞は、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457~92(1991)の464頁表3にまとめられる。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記述されている。こうしたアッセイ向けの有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。代替的に、または追加的に、目的の分子のADCC活性は、インビボ、例えば、Clynes et al. PNAS(USA)95:652~656(1998)に開示されているモデルなどの動物モデルで評価してもよい。また、Clq結合アッセイを実施して、一価抗原結合コンストラクトがClqの結合及びそのためにCDCの活性が可能であるかを判断してもよい。補体の活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al, J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載されているように、CDCアッセイを実施してもよい。当該技術分野において周知の方法を使用して、例えばSPRによるFcRn結合及び抗体のインビボPK測定を実施することもできる。

20

30

【0144】

薬物動態学的パラメータ

ある実施形態では、本明細書に提示されている一価抗原結合コンストラクトは、市販の治療用抗体と同程度である薬物動態学(PK)特性を示す。一実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、血清濃度、 $t_{1/2}$ 、ベータ半減期及び／またはCLに関して、既知の治療用抗体に類似したPK特性を示す。一実施形態では、一価抗原結合コンストラクトは、該単一特異性二価抗原結合コンストラクトと同等以上のインビボ安定性を示す。このようなインビボ安定性パラメータとしては、血清濃度、 $t_{1/2}$ 、ベータ半減期及び／またはCLが挙げられる。

40

【0145】

一実施形態では、本明細書に提示の一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、さらに高い分布量(Vss)を示す。抗体の分布量は、血漿または血液体積(Vp)、組織量(VT)及び組織対血漿分画(kP)に関連する。線形条件では、IgG抗体は、動物、またはヒトにおいて血管内投与された後、主に血漿コンパートメント及び血管外液に分布する。いくつかの実施形態では、例えば、新生児のFc受容体(FcRn)による取り込みなどの能動的輸送プロセスも、他の結

50

合するタンパク質の中で、抗体の体内分布に影響を与える。

【0146】

別の実施形態では、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトは、対応する単一特異性二価抗原結合コンストラクトと比較して、さらに高い分布量（V s s）を示し、類似したアフィニティを有する F c R n に結合する。

【0147】

本明細書で使用する時、用語「血清半減期の調節」は、天然形態に対して、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトに含まれる抗原結合ポリペプチドの循環半減期の陽性または陰性の変化を意味する。血清半減期は、コンストラクト投与後のさまざまな時点で血液サンプルを採取し、各サンプル中の該分子の濃度を測定することにより測定される。血清濃度と時間との相関関係から、血清半減期を算出することができる。血清半減期の上昇は、好ましくは少なくとも約2倍であるが、より少ない上昇であれば、例えば、良好な投与計画が可能であるか、または毒性作用を回避することが可能である場合、有用であり得る。いくつかの実施形態では、上昇は少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍である。

【0148】

本明細書で使用する時、用語「治療的半減期の調節」は、非修飾形態に対して、本明細書に記載の一価抗原結合コンストラクトに含まれる治療有効量の抗原結合ポリペプチドの半減期の陽性または陰性変化を意味する。治療的半減期は、投与後、さまざまな時間での該分子の薬物動態学及び／または薬力学的特性を測定することによって測定される。治療用半減期の上昇により、特定の有益な投与計画、特定の有益な全量が好ましく得られるか、好ましくない効果が回避され得る。いくつかの実施形態では、治療用半減期の上昇は、効力の増加、その標的に対する修飾分子の結合の増加若しくは減少、プロテアーゼなどの酵素による該分子の分解の増加または減少、または非修飾分子の活動の別のパラメータまたはメカニズムの増加または減少、または該分子の受容体媒介クリアランスの増加または減少からもたらされる。

【0149】

抗原結合コンストラクトの作製

抗原結合コンストラクトは、例えば、米国特許第4,816,567に記載のような組換え方法及び組成物を使用して作製され得る。一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトをコードする単離された核酸が提供される。このような核酸は、V Lを含むアミノ酸配列及び／または抗原結合コンストラクトのV Hを含むアミノ酸配列（例えば、抗原結合コンストラクトの軽鎖及び／または重鎖）をコードし得る。さらなる実施形態では、かかる核酸を含む1つまたはそれ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。一実施形態では、核酸は多シストロン性ベクター内に提供される。さらなる実施形態では、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。このような一実施形態では、宿主細胞は、（1）抗原結合コンストラクトのV Lを含むアミノ酸配列と抗原結合性ポリペプチドコンストラクトのV Hを含むアミノ酸配列とをコードする核酸を含むベクター、または、（2）抗原結合性ポリペプチドコンストラクトのV Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター及び抗原結合性ポリペプチドコンストラクトのV Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターを含む（例えば、これらのベクターで形質転換されている）。一実施形態では、宿主細胞は真核生物の細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはヒト胎児由来腎臓（HEK）細胞、またはリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施形態では、抗原結合コンストラクトを作製する方法が提供され、この方法には、抗原結合コンストラクトをコードする上記で提供されたような核酸を含む宿主細胞を、抗原結合コンストラクトの発現に好適な条件下で培養すること、及び任意選択で、宿主細胞（または宿主細胞培地）から抗原結合コンストラクトを回収することが含まれる。

【0150】

抗原結合コンストラクトの組換え作製では、例えば、上記のような抗原結合コンストラ

クトをコードする核酸を単離して1つまたはそれ以上のベクターに挿入し、さらなるクローニング及び／または宿主細胞での発現に供する。このような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗原結合コンストラクトの重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用して）容易に単離し配列決定され得る。

【0151】

いくつかの実施形態では、発現した抗原結合コンストラクトにはシグナルペプチドが含まれる。例としては、スタニオカルシンのシグナル配列（SEQ ID NO：1）及びコンセンサスのシグナル配列（SEQ ID NO：2）が含まれるがこれらに限定されない。

【0152】

抗原結合コンストラクトをコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞には、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞が挙げられる。例えば、抗原結合コンストラクトは、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要な場合に細菌内に作製され得る。抗原結合コンストラクトの断片及びポリペプチドの細菌内発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、5,789,199号、及び5,840,523号を参照のこと。（抗体断片を大腸菌内に発現させる記載のCharlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 245-254も参照のこと）。発現後、抗原結合コンストラクトを細菌細胞ペーストから可溶性画分に単離してよく、それをさらに精製することができる。

【0153】

原核生物の他、糸状菌または酵母などの真核微生物は、抗原結合コンストラクトをコードするベクターに好適なクローニング宿主または発現宿主であり、これらの、グリコシル化経路はすでに「ヒト化」されていて、部分的または完全にヒトグリコシル化パターンを伴う抗原結合コンストラクトの産生をもたらす。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)、及びLi et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照のこと。

【0154】

グリコシル化された抗原結合コンストラクトの発現に好適な宿主細胞は、多細胞性生物（無脊椎動物及び脊椎動物）由来でもある。無脊椎動物の細胞の例には植物細胞及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス株が同定されており、特にヨウトガ（Spodoptera frugiperda）細胞のトランスフェクションに昆虫細胞と併用して使用され得る。

【0155】

植物細胞培養も宿主として用いることができる。例えば、米国特許第米国特許第. 5,959,177号、6,040,498号、6,420,548号、7,125,978号、及び6,417,429号（トランスジェニック植物に抗原結合コンストラクトを作製するためのPLANTIBODIES（商標）技術を記載）を参照のこと。

【0156】

脊椎動物細胞を宿主として使用してもよい。例えば、浮遊培養に適応させた哺乳類細胞株は有用であり得る。有用な哺乳類宿主細胞株の他の例には、SV40（COS-7）で形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胎児由来腎臓株（293または、例えば、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)に記載のような293細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)に記載のようなTM4細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK）；バッファローラット肝細胞（BRL3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝細胞（Hep G2）；マウス乳房腫瘍（MMT060562）；例えば、Mather et al., An

10

20

30

40

50

nals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載のようなTRI細胞；MRC5細胞；及びFS4細胞がある。有用な哺乳類宿主細胞株には他に、DHFR⁻CHO細胞（Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）などの、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞；並びにY0、NS0及びSp2/0のような骨髓腫細胞株が挙げられる。抗原結合コンストラクトの作製に好適な特定の哺乳類宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J.), 255~268頁 (2003)を参照のこと。

【0157】

一実施形態では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトは安定した哺乳類細胞で作製され、その際、少なくとも1つの安定した哺乳類細胞を、抗原結合コンストラクトをコードする所定の比率の核酸で形質移入すること；及び、前述の少なくとも1つの哺乳類細胞に前述の核酸を発現させることを含む方法により作製される。いくつかの実施形態では、核酸の所定の比率は、発現産物における抗原結合コンストラクトの割合が最も高くなるような核酸投入量の相対比を測定するための一過性トランスフェクションの実験で決定される。

【0158】

いくつかの実施形態には、本明細書に記載のように一価抗原結合コンストラクトを安定した哺乳類細胞に作製する方法が記載され、これにおいて、前述の少なくとも1つの安定した哺乳類細胞の発現産物は、所望のグリコシル化された一価抗体を、重鎖若しくは軽鎖の単量体ポリペプチド、または他の抗体よりも多く含む。

【0159】

いくつかの実施形態には、グリコシル化された一価抗原結合コンストラクトを、本明細書に記載の安定した哺乳類細胞に作製する方法が記載され、該方法は、所望のグリコシル化された一価抗体を同定及び精製することを含む。いくつかの実施形態では、かかる同定を、液体クロマトグラフィー及び質量分析の両方またはいずれか一方により行う。

【0160】

必要に応じ、抗原結合コンストラクトは、発現後、精製または単離することができる。タンパク質は、当業者に公知の多種多様な方法で単離または精製され得る。標準的な精製方法には、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、粒径排除またはゲルろ過クロマトグラフィー、及び逆相クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法が含まれ、大気圧またはFPLC及びHPLCのようなシステムを使用して高圧で行われる。精製方法には、電気泳動法、免疫測定法、沈降法、透析法、及びクロマトフォーカシング法も含まれる。タンパク質濃度と併用した限外ろ過及び血液透析ろ過技術も有用である。当技術分野において周知のように、多種多様な天然タンパク質がFc及び抗体を結合し、これらのタンパク質を、抗原結合コンストラクトを精製するために本発明で利用することができる。例えば、細菌のプロテインA及びGはFc領域に結合する。同様に、細菌のタンパク質Lは一部の抗体のFab領域に結合する。精製は、特定の融合パートナーにより可能なことが多い。例えば、抗体は、GST融合を使用する場合はグルタチオン樹脂を使用して、また、Hisタグを使用する場合はNi²⁺アフィニティクロマトグラフィーを、または、flagタグを使用する場合は固定化抗flag抗体を使用して精製され得る。好適な精製技術の一般ガイダンスについては、例えば、参照により全体が組み込まれるProtein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994を参照のこと（参照により全体が組み込まれる）。必要な精製の程度は、抗原結合コンストラクトの使用に応じて異なってくる。いくつかの場合、精製が必要ない場合もある。

【0161】

ある実施形態では、抗原結合コンストラクトは、Q-sepharose、DEAE

sepharose、poros HQ、poros DEAF、Toyopearl Q、Toyopearl QAE、Toyopearl DEAE、Resource / Source Q及びDEAE、Fractogel Q及びDEAEカラムでのクロマトグラフィーを含むが、これらに限定されない陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して精製される。

【0162】

特定の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質は、SP-sepharose、CM-sepharose、poros HS、poros CM、Toyopearl SP、Toyopearl CM、Resource / Source S及びCM、Fractogel S及びCMの各種カラム並びにそれらと同等及び匹敵するものを含むが、これらに限定されない陽イオン交換クロマトグラフィーを使用して精製される。

10

【0163】

さらに、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトが、当技術分野で公知である技術を使用して化学的に合成可能である（例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. Y and Hunkapiller et al., Nature, 310:105-111 (1984)を参照のこと）。例えば、あるポリペプチドの断片に対応するポリペプチドは、ペプチド合成装置の使用により合成可能である。さらに、必要であれば、非典型的なアミノ酸または化学的アミノ酸類似体を、置換体または付加体としてポリペプチド配列に導入することができる。非古典的アミノ酸には、共通アミノ酸のD-異性体、2, 4ジアミノ酪酸、アルファ-アミノイソ酪酸、4アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、γ-Abu、ε-Ahx、6アミノヘキサ酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、-アラニン、フルオロ-アミノ酸、-メチルアミノ酸、C-メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸、及び一般アミノ酸類似体のようなデザイナー・アミノ酸が挙げられるが、これに限定されるものではない。さらに、かかるアミノ酸は、D（右旋性）またはL（左旋性）であり得る。

20

【0164】

「組換え型宿主細胞」または「宿主細胞」とは、例えば、直接取込み、形質導入、f-接合、または組換え型宿主細胞を作出するために当技術分野で公知の他の方法など、挿入に使用した方法にかかわらず外因性ポリヌクレオチドを含む細胞をいう。外因性ポリヌクレオチドを、非組み込みベクター、例えば、プラスミドとして維持してよく、または別法として、宿主ゲノムに組み込んでよい。

30

【0165】

本発明において、用語「真核生物」とは、動物（哺乳類、昆虫類、爬虫類、鳥類等を含むがこれらに限定されない）、絨毛虫類、植物（単子葉植物、双子葉植物、藻類等を含むがこれらに限定されない）、真菌類、酵母、鞭毛虫類、微孢子虫類、原生生物等のような、系統発生学的ドメインで真核生物に属する生物をいう。

40

【0166】

本発明において、用語「原核生物」とは、原核生物をいう。例えば、非真核生物は、系統発生学的ドメインの真正細菌（大腸菌（Escherichia coli）、サーマス・サーモフィルス（Thermus thermophilus）、バシラス・ステアロサーモフィラス（Bacillus stearothermophilus）、シュールドモナス・フルオレッセンス（Pseudomonas fluorescens）、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）、シュールドモナス・プチダ（Pseudomonas putida）等を含むがこれらに限定されない）、または系統発生学的ドメインの古細菌（メタノコックス・ヤンナスキイ（Methanococcus jannaschii）、メタノバクテリウム・サーモオートトロフィクム（Me

50

thanobacterium thermoautotrophicum)、ハロフェラックス・ボルカニイ (*Haloferax volcanii*) 及びハロバクテリウム (*Halobacterium*) NRC-1 種のようなハロバクテリウム (*Halobacterium*)、アーケオグロブス・フルギダス (*Archaeoglobus fulgidus*)、パイロコッカス・フリオサス (*Pyrococcus furiosus*)、パイロコッカス・ホリコシイ (*Pyrococcus horikoshii*)、アエロパイラム・ペルニクス (*Aeropyrum pernix*) 等を含むがこれらに限定されない) に属し得る。

【0167】

本発明において、用語「培地 (medium)」または「培地 (media)」には、任意の培養培地、液体培地、固形培地、半固形培地、または細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真核生物宿主細胞、哺乳類宿主細胞、CHO細胞、原核生物宿主細胞、大腸菌またはシュドモナス宿主細胞、及び細胞内容物などの任意の宿主細胞を支持または含有し得る固い支持体が含まれる。したがって、かかる用語には、増殖工程の前または後のいずれの培地も含めた、宿主細胞の中で増殖させた培地、例えば、中にタンパク質が分泌された培地が包含され得る。また、かかる用語には、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトが細胞内に作製され、ヘテロ多量体を放出させるために宿主細胞が溶解または破壊される場合のような、宿主細胞の溶解物を含有する緩衝液または試薬も包含され得る。

【0168】

抗原結合コンストラクトの試験

本明細書に記載の抗原結合コンストラクトまたは医薬組成物を、ヒトでの使用に先立ち、所望の治療的または予防的作用についてインビトロで試験した後、インビボで試験した。例えば、化合物または医薬組成物の治療または予防上の有用性を実証するためのインビトロ試験には、細胞株または患者の組織試料に対する化合物の作用が含まれる。細胞株及び／または組織試料に対する化合物または組成物の作用は、ロゼット形成試験及び細胞溶解試験を含むが、これらに限定されない当業者に公知の技術を使用して測定することができる。本発明に従い、特定の抗原結合コンストラクトを投与することが適応されるか否かを決定するために使用可能なインビトロ試験には、インビトロ細胞培養試験、または患者の組織試料を培養で増殖させ、抗原結合コンストラクトに曝露させるか別の方法で投与し、かかる抗原結合コンストラクトの組織試料に対する作用を観察するインビトロ試験が含まれる。

【0169】

一価抗原結合コンストラクトの候補は、細胞、例えば、HER2を発現している乳癌細胞株を使用して分析し調べることができる。以下の表Aには、いくつかの代表的癌細胞株のHER2発現レベルが記載されている。

【0170】

(表A5) 対象細胞株におけるHER2の相対的発現レベル

WI-38	正常肺	0	1.0x10E4	10
MDA-MB-231	トリプルネガティブ乳癌	0/1+	1.7x10E4 – 2.3x10E4	
MCF-7	エストロゲン受容体陽性乳癌	1+	4x10E4 – 7x10E	
JIMT-1	トラスツズマブ耐性乳癌	2+	2x10 E 5 - 8x10 E 5	
ZR-75-1	エストロゲン受容体陽性乳癌	2+	3x10 E 5	
SKOV3	卵巣癌	2/3+	5x10 E 5 - 1x10 E 6	20
SKBr3	乳癌	3+	> 1x10 E 6	
BT-474	乳癌	3+	> 1x10 E 6	
細胞株	説明	IHC スコア	HER2 受容体/細胞	

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

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

Carter et al. PNAS, 1994: 89; 4285 – 4289; Yarden 2000, HER2: Basic Research, Prognosis and Therapy

Hendricks et al Mol Cancer Ther 2013; 12: 1816 – 28

30

【0171】

当技術分野で公知のように、本明細書に記載の方法での使用に好適な一価抗原結合コンストラクトを同定するために、多数の試験法が使用され得る。これらの試験法は、HER2を発現している癌細胞で実施可能である。好適な癌細胞の例を表A5に示す。実施され得る試験法の例を以下の通り記載する。

【0172】

例えば、HER2を結合する一価抗原結合コンストラクトの増殖阻害候補を同定するために、HER2を発現している癌細胞の増殖を阻害する抗体についてスクリーニングしてよい。一実施形態では、抗原結合コンストラクトの選択候補は、細胞培養での癌細胞の増殖を、対照の抗原結合コンストラクトに比べ約20～100%、好ましくは約50～100%阻害できる。

40

【0173】

例えば、PI（ホスファチジルイノシトール）で示される細胞死、膜統合性の損失を誘導する抗原結合コンストラクトの候補を選択するには、対照と比較したトリパンブルーまたは7AADの取込みが評価され得る。

【0174】

アポトーシスを誘導する抗原結合コンストラクト候補を選択するためには、アネキシン結合アッセイが使用され得る。アネキシン結合アッセイの他に、DNA染色法を使用してもよい。

50

【0175】

一実施形態では、対象とする一価抗原結合コンストラクトの候補は、共免疫沈降実験で測定した場合に、MCF7細胞及びSK-BR-3細胞いずれにおいてもErBB2とErBB3とのヘレグリン依存性会合をモノクローナル抗体4D5より実質的に有効に、好ましくは、モノクローナル抗体7F3より実質的に有効にブロックし得る。

【0176】

対象抗体が結合したErBB2のエピトープに結合する一価抗原結合コンストラクトについてスクリーニングするには、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載のようなルーチンのクロスブロッキング(cross-blocking)法を実施できる。別法として、または追加で、当技術分野で公知の方法によりエピトープマッピングを実施することができる。

10

【0177】

細胞を用いた上記の試験で得られた結果から、次に、動物モデル、例えば、マウスモデルでの試験、及びヒト臨床試験を行うことができる。

【0178】

抗原結合コンストラクト及び抗体薬物複合体(ADC)

ある実施形態では、抗原結合コンストラクトを、薬物、例えば、毒素、化学療法薬、免疫調節薬、または放射性同位元素に複合体化させる。ADC(抗体薬物複合体または抗原結合コンストラクト薬物複合体)を調製する各種方法は当技術分野で公知であり、例えば、米国特許第8,624,003(ポット法(pot method)号、8,163,888(一段階法(one-step)号、及び5,208,020(二段階法(two-step method)号に記載されている。

20

【0179】

いくつかの実施形態では、薬物は、メイタンシン、アウリスタチン、カリケアマイシン、またはその誘導体から選択される。その他の実施形態では、薬物は、DM1及びDM4から選択されるメイタンシンである。さらなる実施例を以下に記載する。

【0180】

いくつかの実施形態では、SMCCリンカー(DM1)、またはSPDBリンカー(DM4)を有する単離された抗原結合コンストラクトに薬物を複合体化させる。さらなる例を以下に記載する。薬物と抗原結合タンパク質の比(DAR)は、例えば、1.0対6.0または3.0対5.0または3.5対4.2であり得る。

30

【0181】

いくつかの実施形態では、抗原結合コンストラクトを細胞傷害性薬剤に複合体化させる。本明細書で使用する用語「細胞傷害性薬剤」とは、細胞の機能を阻害または防止する物質及び／または細胞破壊を引き起こす物質をいう。かかる用語には、放射性同位体(例えば、At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、及びLu177)、化学療法薬、並びに、細菌、真菌、植物若しくは動物由来の酵素活性毒素のような毒素または低分子毒素(その断片及び／または変異体を含む)が含まれることが意図される。さらなる実施例を以下に記載する。

40

【0182】

薬物

ADCのさまざまな実施形態で使用される薬物またはペイロードの非限定的例としては、DM1(メイタンシン、N2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-またはN2'-デアセチル-N2'-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイタンシン)、mc-MMA(6-マレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチン-DまたはN-メチル-L-バリン-N-[(1S,2R)-2-メトキシ-4-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-メトキシ-2-メチル-3-オキソ-3-[[[1S)-2-フェニル-1-(2-チアゾリル)エチル]アミノ]プロピル]-1-ピロ

50

リジニル] - 1 - [(1S) - 1 - メチルプロピル] - 4 - オキソブチル] - N - メチル - (9C1) - L - バリンアミド)、mc - MMAF (マレイミドカプロイル - モノメチルアウリスタチンFまたはN - [6 - (2, 5 - ジヒドロ - 2, 5 - ジオキソ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 1 - オキソヘキシル] - N - メチル - L - バリル - L - バリル - (3R, 4S, 5S) - 3 - メトキシ - 5 - メチル - 4 - (メチルアミノ) ヘプタノイル - (αR, βR, 2S) - β - メトキシ - α - メチル - 2 - ピロリジンプロパノイル - L - フェニルアラニン)、及びmc - Val - Cit - PABA - MMAE (6 - マレイミドカプロイル - Val - Cit - (p - アミノベンジルオキシカルボニル) - モノメチルアウリスタチンEまたはN - [[4 - [N - [6 - (2, 5 - ジヒドロ - 2, 5 - ジオキソ - 1H - ピロール - 1 - イル) - 1 - オキソヘキシル] - L - バリル - N5 - (アミノカルボニル) - L - オルニチル] アミノ] フェニル] メトキシ] カルボニル] - N - メチル - L - バリル - N - [(1S, 2R) - 4 - [(2S) - 2 - [(1R, 2R) - 3 - [[(1R, 2S) - 2 - ヒドロキシ - 1 - メチル - 2 - フェニルエチル] アミノ] - 1 - メトキシ - 2 - メチル - 3 - オキソプロピル] - 1 - ピロリジニル] - 2 - メトキシ - 1 - [(1S) - 1 - メチルプロピル] - 4 - オキソブチル] - N - メチル - L - バリンアミド)が挙げられる。DM1はチューブリン阻害薬メイタンシンの誘導体であり、MMA D、MMA E、及びMMA Fはアウリスタチン誘導体である。

10

【0183】

メイタンシノイド薬物部分

上記に示したように、いくつかの実施形態では、薬物はメイタンシノイドである。例示的なメイタンシノイドには、DM1、DM3 (N^{2'} - デアセチル - N^{2'} - (4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) メイタンシン)、及びDM4 (N^{2'} - デアセチル - N^{2'} - (4 - メチル - 4 - メルカプト - 1 - オキソペンチル) メチルメイタンシン) (US 20090202536を参照のこと)が挙げられる。

20

【0184】

結合の種類に応じて、メイタンシン化合物の多くの位置が結合位置として有用であることが知られている。例えば、エステル結合の形成には、ヒドロキシル基を有するC - 3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC - 14位、ヒドロキシル基で修飾されたC - 15位及びヒドロキシル基を有するC - 20位はいずれも好適である。

30

【0185】

メイタンシノイド薬物部分のすべての立体異性体が、本明細書に記載のADCとして意図され、すなわち、D型キラル炭素におけるR及びSの立体配置のあらゆる組み合わせが意図される。

40

【0186】

アウリスタチン類

いくつかの実施形態では、薬物は、アウリスタチンE (当技術分野ではドラスタチン - 10の誘導体としても知られる) またはその誘導体のようなアウリスタチンである。アウリスタチンは、例えば、アウリスタチンEとケト酸の間に形成されるエステルであり得る。例えば、アウリスタチンEをパラアセチル安息香酸またはベンゾイル吉草酸と反応させて、それぞれからAEB及びAEVBを生成させることができる。典型的な他のアウリスタチンには、AFP、MMAF、及びMMAEが挙げられる。例示的なアウリスタチンの合成及び構造は、米国特許第. 6, 884, 869号、7, 098, 308号、7, 256, 257号、7, 423, 116号、7, 498, 298号及び7, 745, 394号に記載されており、その各々はあらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。

40

【0187】

化学療法薬

いくつかの実施形態では、抗原結合コンストラクトを化学療法薬に複合体化させる。例としては、シスプラチン (Cisplatin) 及びラパチニブが含まれるが、これらに限定されない。「化学療法薬」は癌治療に有用な化学的化合物である。

50

【0188】

化学療法薬の例には、チオテパ及びシクロホスファミド (CYTOXAN (商標)) のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (meturedopa)、及びウレドーパ (uredopa) のようなアジリジン類；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド (triethylenephosphoramidate)、トリエチレンチオホスホルアミド (triethylenethiophosphoramidate) 及びトリメチロールメラミン (trimethylolmelamine) のようなエチレンイミン類及びメチラメラミン類；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド (cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード類；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンのようなニトロスレア類 (nitrosurea)；アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン類、カクチノマイシン (cactinomycin)、カリケアマイシン、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシルビシン、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン類 (olivomycin)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシンのような抗生物質；メトトレキサート及び5-フルオロウラシル (5-FU) のような代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートのような葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン、5-FUのようなピリミジン類似体；カルステロン、ドロモスタノロンプロピオナート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンのようなアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎皮質ホルモン剤；フロリン酸のような葉酸補充剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside)；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトラキサート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エルホルニチン (elfornithine)；酢酸エリプチニウム (elliptinium acetate)；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン (nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK7；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2'-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボブroman；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド ("Ara-C")；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン類、例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) 及びドキセタキセル (doxetaxel) (TAXOTERE (登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シ

10

20

30

40

50

スプラチン及びカルボプラチンのような白金類似体；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害薬RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸；エスペラミシン類；カペシタビン；及び上述薬の薬学的に許容される塩類、酸類または誘導体が挙げられる。この定義には、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4（5）-イミダゾール類、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、及びトレミフェン（Fareston）などの抗エストロゲン薬、並びに、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、リュープロリド、及びゴセレリンなどの抗アンドロゲン薬のような腫瘍のホルモン作用を調節または阻害して作用する抗ホルモン剤、並びに上述薬の薬学的に許容される塩類、酸類または誘導体も含まれる。

【0189】

複合体リンカー

いくつかの実施形態では、薬物は抗原結合コンストラクト、例えば、抗体にリンカーにより結合している。抗体に対するリンカーの付加は、表面のリジンを介した付加、酸化炭水化物への還元的カップリング、及び鎖間ジスルフィド結合の還元により遊離化したシステイン残基を介した付加のような多種多様な方法で達成可能である。ヒドラゾン系結合、ジスルフィド系結合及びペプチド系結合など多種多様なADC結合系が当技術分野で公知である。

【0190】

好適なリンカーには、例えば、開裂可能なリンカー及び開裂不可能なリンカーが含まれる。開裂可能なリンカーは典型的には細胞内の条件で開裂しやすい。好適な開裂可能リンカーには、例えば、リソソームプロテアーゼまたはエンドソームプロテアーゼのような細胞内プロテアーゼで開裂可能なペプチドリンカーが含まれる。例示的な実施形態では、リンカーは、バリナーシトルリン（val-cit）、フェニルアラニン-リシン（phe-lys）リンカー、またはマレイミドヘキサ（maleimidocaprone）-バリナーシトルリン-p-アミノベンジルオキシカルボニル（mc-Val-Cit-PABA）リンカーなどのジペプチドリンカーであり得る。別のリンカーはスルホスクシンイミジル-4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサ-1-カルボキシラート（SMCC）である。スルホ-smcc複合体化は、スルフヒドリル類（チオール類、-SH）と反応するマレイミド基を介して起こるが、そのスルホ-NHSエステルは第一級アミン類（リシン内及びタンパク質またはペプチドN末端に見られるもの）に対し反応性がある。さらに別のリンカーはマレイミドカプロイル（MC）である。好適なリンカーには他に、ヒドラゾンリンカーのような特定pHまたはあるpH範囲で加水分解性のあるリンカーが挙げられる。さらなる好適な開裂可能リンカーには、ジスルフィドリンカーが挙げられる。リンカーは、抗体が細胞内で必ず分解され薬物、例えば、MCリンカー等を放出するような程度に抗体に共有結合させてよい。

【0191】

ADCの調製

ADCは、当業者に公知の有機化学の反応、条件、及び試薬を用いたいくつかの経路で調製でき、これらには、（1）抗体の求核基または求電子基と二価のリンカー試薬とを反応させて共有結合を介した抗体-リンカー中間体A-B-Lを形成した後、活性化薬物部分Dと反応させる経路；及び（2）薬物部分の求核基または求電子基とリンカー試薬とを反応させて共有結合を介した薬物-リンカー中間体D-Lを形成した後、抗体の求核基または求電子基と反応させる経路が挙げられる。複合体化方法（1）及び（2）を多種多様な抗体、薬物部分、及びリンカーと共に用いてここに記載の抗体-薬物複合体を調製してよい。

【0192】

A D C の調製方法の各種具体例が当技術分野で公知であり、米国特許第 8, 6 2 4, 0 0 3 号 (ポット法 (p o t m e t h o d))、8, 1 6 3, 8 8 8 号 (一段階法 (o n e - s t e p))、及び 5, 2 0 8, 0 2 0 号 (二段階法 (t w o - s t e p m e t h o d)) に記載がある。

【0193】

抗原結合コンストラクト製剤及び投与方法

本明細書に記載の抗原結合コンストラクトは、当業者に周知のあらゆる方法により適応に応じて製剤化及び投与が可能である。いくつかの実施形態では、抗原結合コンストラクトは、抗原結合コンストラクトと薬学的に許容される担体との医薬組成物中に配合される。

10

【0194】

用語「薬学的に許容される」とは、動物での使用、より具体的にはヒトでの使用について、連邦政府または州政府の規制当局により承認されている、または米国薬局方または一般に認識されている他の薬局方に掲載されていることを意味する。用語「担体」とは、共に治療薬が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような医薬担体は、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等のような石油由来、動物由来、植物由来または合成由来のものを含めた水及び油などの無菌液であり得る。いくつかの態様では、担体は自然界には見られない人為的に作製した担体である。医薬組成物を静脈内投与する場合は水を担体として使用できる。生理食塩水及び水溶性ブドウ糖及びグリセロール溶液も、特に、注射液用の液状担体として使用できる。好適な医薬賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、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、エタノールなどが挙げられる。組成物には、必要に応じ、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、または pH 緩衝剤を含有させることもできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、徐放性製剤等の形態をとり得る。組成物は、トリグリセリド類などの従来の結合剤及び担体と共に坐剤として製剤化可能である。経口製剤には、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等のような標準的担体を含むことができる。好適な医薬担体の例は、E. W. M a r t i n 著「R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s」に記載されている。このような組成物には、患者に適切に投与するための形態を提供するため、治療有効量の化合物が、好ましくは精製された形態で、好適量の担体と共に含有されることとなる。製剤は投与方法に適していなければならない。

20

30

【0195】

ある実施形態では、コンストラクトを含む組成物を、ヒトへの静脈内投与に適した医薬組成物として常套的手順に従って製剤化する。典型的には、静脈内投与用組成物は、無菌の等張水性緩衝液に溶解させた溶液である。必要な場合には、組成物に、可溶化剤及び注射部位の痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔薬を含めてもよい。一般に、成分は、例えば、活性薬量が表記されたアンプルまたは小袋のような密封容器内に凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、別々に、または混合された状態で単位剤形にして供給される。組成物を注入により投与する場合、無菌の医薬品グレードの水または生理食塩水を含有する注入ボトルで調合することができる。組成物を注射で投与する場合、成分を投与前に混合できるよう注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

40

【0196】

ある実施形態では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトを中性または塩の形態として製剤化する。薬学的に許容される塩類には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来する陰イオンのような陰イオンで形成される塩類、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄 (I I I) イソプロピルアミン (f e r r i c h y d r o x i d e i s o p r o p y l a m i n e)、トリエチルアミン、2-エチルア

50

ミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来する陽イオンのような陽イオンで形成される塩類が含まれる。

【0197】

さまざまな送達システムが公知であり、本明細書に記載の抗原結合コンストラクト製剤の投与に使用できるが、例えば、リボソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、化合物を発現できる組換え型細胞、受容体媒介によるエンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などのシステムがある。導入方法には、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経鼻、硬膜外、及び経口の経路が含まれるが、これらに限定されない。化合物または組成物は、任意の好都合な経路、例えば、注入若しくはボーラス注射、上皮内膜または粘膜皮膚内膜（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜及び腸管粘膜等）からの吸収により投与してよく、また、生物学的に活性な他の薬剤と共に投与してよい。投与は、全身投与または局所投与であり得る。さらに、ある実施形態では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクト組成物を、脳室内注射及びくも膜下腔内注射など任意の好適な経路により中枢神経系に導入することが望ましく、脳室内注射は、例えば、オンマヤ（Ommaya）リザーバのようなリザーバに取り付けた、脳室内カテーテルを使用することで容易に実施され得る。例えば、吸入器または噴霧器、及びエアロゾル化剤配合製剤の使用により、肺への投与も可能である。

10

【0198】

特定の実施形態では、本明細書に記載の抗原結合コンストラクトまたは組成物を、処置を要する領域に局所的に投与することが望ましく、これは、例えば、非限定的に、術中の局所注入、例えば術後の、創傷被覆材と併用した局所塗布、注射、カテーテル手段、坐剤手段、またはsialasticメンブレン若しくは繊維のようなメンブレンを含め多孔質材料、非多孔質材料またはゲル状材料のインプラント手段により達成され得る。好ましくは、本明細書に記載の抗体などのタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収しない材料を使用するよう注意が必要である。

20

【0199】

別の実施形態では、抗原結合コンストラクトまたは組成物は、小胞、特にリボソームに入れて送達可能である（Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, 353~365頁 (1989); Lopez-Berestein, 同書, pp. 317~327; 及び、同書全般を参照のこと）

30

【0200】

さらに別の実施形態では、抗原結合コンストラクトまたは組成物は、放出制御システムで送達可能である。一実施形態では、ポンプが使用され得る（Langer, 前掲; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88:507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)を参照のこと）。別の実施形態では、高分子物質を使用できる（Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983)を参照のこと; Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard

40

50

et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989) も参照のこと)。さらに別の実施形態では、放出制御システムを治療の標的、例えば、脳の近傍に配置して、必要全身用量を少なくすることができる（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 前掲, vol. 2, pp. 115-138 (1984) を参照のこと）。

【0201】

本明細書に記載の抗原結合コンストラクトをコードする核酸を含む特定の実施形態では、かかる核酸をインビボ投与し、そのコードされたタンパク質の発現を促進することができ、これは、例えば、レトロウイルスベクターの使用により（米国特許第4,980,286号を参照のこと）、細胞内に取り込まれるよう適切な核酸発現ベクターの一部として核酸を構築し投与すること、または直接注射すること、または、微粒子の撃ち込み（例えば、遺伝子銃；Dupont社Biolistic）または脂質若しくは細胞表面受容体または形質移入薬剤でコーティングすること、または細胞核に入り込むことが知られているホメオボックス様ペプチドに結合させて投与すること（例えば、Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991) を参照のこと）等により可能である。別法として、核酸を細胞内に導入し、相同組換えにより宿主細胞DNA内に組み込んで発現させることができる。

【0202】

ある実施形態では、本明細書に記載する、単一アームの一価抗原結合コンストラクトを、結合標的エピトープが重複しない、別の単一アームの一価抗体または多価抗体との組み合わせとして投与する。

【0203】

本明細書では医薬組成物も提供される。このような組成物は、治療有効量の化合物、及び薬学的に許容される担体を含む。特定の実施形態では、用語「薬学的に許容される」は、動物での使用、より具体的にはヒトでの使用について、連邦政府または州政府の規制当局により承認されている、または米国薬局方または一般に認識されている他の薬局方に掲載されていることを意味する。用語「担体」とは、共に治療薬が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルをいう。このような医薬担体は、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等のような石油由来、動物由来、植物由来または合成由来のものを含めた水及び油などの無菌液であり得る。水は、医薬組成物を静脈内投与する場合に好ましい担体である。生理食塩水及び水溶性ブドウ糖及びグリセロール溶液も、特に、注射液用の液状担体として使用できる。好適な医薬賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、ショ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、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、エタノールなどが挙げられる。組成物には、必要に応じ、少量の湿潤剤若しくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含有させることもできる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルジョン、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、徐放性製剤等の形態をとり得る。組成物は、トリグリセリド類などの従来の結合剤及び担体と共に坐剤として製剤化可能である。経口製剤には、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等のような標準的担体を挙げることができる。好適な医薬担体の例は、E. W. Martin 著「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。このような組成物には、患者に適切に投与するための形態を提供するため、治療有効量の化合物が、好ましくは精製された形態で、好適量の担体と共に含有されることとなる。製剤は投与方法に適していなければならない。

【0204】

ある実施形態では、抗原結合コンストラクトを含む組成物をヒトへの静脈内投与に適した医薬組成物として常套的手順に従って製剤化する。典型的には、静脈内投与用組成物は、無菌の等張水性緩衝液に溶解させた溶液である。必要な場合には、組成物に、可溶化剤及び注射部位の痛みを和らげるためのリグノカインなどの局所麻酔薬を含めてもよい。一

般に、成分は、例えば、活性薬剂量が表記されたアンプルまたは小袋のような密封容器内に凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、単位剤形にして別々に、または混合された状態で供給される。組成物を注入により投与する場合、無菌の医薬品グレードの水または生理食塩水を含む注入ボトルで調合することができる。組成物を注射で投与する場合、成分を投与前に混合できるよう注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

【0205】

ある実施形態では、本明細書に記載の組成物を中性または塩の形態として製剤化する。薬学的に許容される塩類には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来する陰イオンのような陰イオンで形成される塩類、及びナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄 (III) イソプロピルアミン (ferric hydroxide isopropylamine)、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来する陽イオンのような陽イオンで形成される塩類が含まれる。

10

【0206】

治療用タンパク質の異常な発現及び／または活性に関連した、疾患若しくは障害の治療、阻害及び予防に有効となる、本明細書に記載の組成物量は、標準的な臨床技術により決定され得る。さらに、至適用量範囲を同定するための一助として、インビトロ試験法を任意選択で使用してよい。製剤に使用する正確な用量もまた、投与経路、及び疾患または障害の重篤性に左右されることになり、医師の判断及び各患者の状況にしたがって決定されるべきである。有効用量は、インビトロまたは動物モデルの試験系に由来する用量-反応曲線から外挿する。

20

【0207】

本明細書に記載の抗原結合コンストラクトは、単独または他の種類の治療（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法及び抗腫瘍薬）と併用して投与され得る。一般に、患者と同一種である種由来または種反応性（抗体の場合）の製品の投与が好ましい。したがって、一実施形態では、ヒト抗体、断片誘導体、類似体、または核酸を、ヒト患者に治療または予防のために投与する。

【0208】

ポリペプチド及び核酸

本明細書に記載の方法では、核酸によりコードされるポリペプチドを含む単離された抗原結合コンストラクトが使用される。

30

【0209】

用語「単離された」を核酸またはタンパク質に使用する場合、核酸またはタンパク質が、それが天然状態で会合している細胞成分の少なくとも一部を含まないこと、または、核酸またはタンパク質が、それがインビボまたはインビトロで産生される濃度よりも高いレベルまで濃縮されていることを意味する。それは、均一な状態であり得る。単離された物質は、乾燥若しくは半乾燥状態、または水溶液など、これに限定されない溶液中のいずれでもよい。それは、さらなる薬学的に許容される担体及び／または賦形剤を含む医薬組成物の成分であり得る。純度及び均一性は、典型的に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技術を使用して測定される。調製物中に含まれる主な種であるタンパク質は実質的に精製されている。特に、単離された遺伝子は、その遺伝子に隣接しタンパク質をコードする、対象遺伝子以外のオープンリーディングフレームから分離される。用語「精製された」は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲルで実質的に1本のバンドになることを意味する。特に、核酸またはタンパク質が少なくとも85%純粋である、少なくとも90%純粋である、少なくとも95%純粋である、少なくとも99%以上純粋であることを意味し得る。

40

【0210】

用語「核酸」とは、一本鎖または二本鎖いずれの形態でも、デオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはリボヌクレオチド及びそのポリマーをいう。具体的に限定しない限り、かかる用語には、参照核酸と同様の結合特性を有

50

し、天然に生じるヌクレオチドと同様の方法で代謝される既知の天然ヌクレオチド類似体を含む核酸が包含される。特に具体的に限定しない限り、かかる用語は、PNA（ペプチド核酸）などのオリゴヌクレオチド類似体、アンチセンス技術で使用するDNA類似体（ホスホロチオエート、ホスホルアミダート等）も指す。特に明記しない限り、特定の核酸配列にも、その保存的に修飾された変異体（縮重コドンの置換を含むがこれに限定されない）及び相補配列、並びに、明示される配列が暗黙のうちに包含される。具体的には、縮重コドンの置換は、選択した1つまたはそれ以上（またはすべて）のコドンの3番目が混合塩基及び／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することにより達成され得る（Batzler et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)）。

10

【0211】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書では同じ意味で使用されアミノ酸残基のポリマーを意味する。すなわち、ポリペプチドを対象とする記載は、ペプチドの記載及びタンパク質の記載についても同等に適用され、その逆も同様である。かかる用語は、天然に生じるアミノ酸ポリマー並びに1つまたはそれ以上のアミノ酸残基が人工的にコードされたアミノ酸であるアミノ酸ポリマーにも適用される。本発明において、かかる用語には、アミノ酸残基がペプチド共有結合により結合している、完全長タンパク質などあらゆる長さのアミノ酸鎖が包含される。

20

【0212】

用語「アミノ酸」とは、天然に生じるアミノ酸及び天然には生じないアミノ酸、並びに天然に生じるアミノ酸と同様の方法で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体をいう。天然にコードされるアミノ酸は、20の共通アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、及びバリン）及びピロリシン及びセレノシステインである。アミノ酸類似体とは、天然に生じるアミノ酸と基本化学構造体が同一である、すなわち、 α 炭素に水素、カルボキシル基、アミノ基、及びホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムなどのR基が結合している化合物をいう。このような類似体は、修飾されたR基（ノルロイシンなど）または修飾ペプチド骨格を有するが、天然に生じるアミノ酸と同一の基本化学構造体を維持している。アミノ酸には、例えば、天然に生じるタンパク質構成L-アミノ酸；D-アミノ酸、アミノ酸変異体及びアミノ酸誘導体のような化学的に修飾したアミノ酸； β -アラニン、オルニチン等のような天然に生じる非タンパク質構成アミノ酸；及び当技術分野でアミノ酸の特徴として知られる特性を有する化学的合成した化合物が含まれる。天然には生じないアミノ酸の例には、 α -メチルアミノ酸（例えば、 α -メチルアラニン）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（例えば、2-アミノ-ヒスチジン、 β -ヒドロキシーヒスチジン、ホモヒスチジン）、側鎖に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、及び側鎖のカルボン酸官能基がスルホン酸基で置換されているアミノ酸（例えば、システイン酸）が挙げられるが、これに限定されるものではない。非天然型合成アミノ酸、置換アミノ酸、または1つ若しくはそれ以上のD-アミノ酸などの非天然型アミノ酸を、本発明のタンパク質に組み込むことは、多数の異なる方法において有利である。D-アミノ酸含有ペプチド等は、インビトロまたはインビボで、L-アミノ酸含有ペプチドに比べ高い安定性を示す。したがって、D-アミノ酸を組み込むペプチド等の構築は、高い細胞内安定性が所望または要求される場合には特に有用であり得る。より具体的には、D-ペプチド等は内因性のペプチダーゼ類及びプロテアーゼ類に耐性があるため、分子の生物学的利用能の改善、インビボでの寿命延長が望ましいとされる場合にはそれらが得られる。その上、D-ペプチド等は、ヘルパーT細胞に対して主要組織適合性複合体クラスII拘束性に提示されるための、効率的なプロセッシングを受けることができないため、生物体全体

30

40

50

において液性免疫応答を誘導しにくいと考えられる。

【0213】

アミノ酸は、本明細書では、一般に公知の3文字表記で、またはIUPAC-IUB生化学命名委員会(Biochemical Nomenclature Commission)推奨の1文字表記で言及され得る。同様に、ヌクレオチドは、それらに対して一般に認められている1文字表記で言及され得る。

【0214】

「保存的に修飾された変異体」はアミノ酸及び核酸配列の双方に適用される。特定の核酸配列に関する場合、「保存的に修飾された変異体」とは、同一または本質的に同一なアミノ酸配列をコードする核酸を指し、または、核酸がアミノ酸配列をコードしない場合は、本質的に同一な配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、機能的に同一な多数の核酸が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドンのGCA、GCC、GCG及びGCUはいずれもアラニンというアミノ酸をコードする。したがって、コドンでアラニンが指定されているあらゆる位置で、そのコドンを、コードされるポリペプチドを改変せずに対応する任意の記載コドンに改変することができる。このような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的に修飾された変異の一種である。一ポリペプチドをコードする本明細書の核酸配列の各々は、核酸のあらゆる可能なサイレント変異も表す。当業者は、核酸内の各コドン(ただし、通常はメチオニンの唯一のコドンであるAUG、及び、通常はトリプトファンの唯一のコドンであるTGGを除く)を修飾して機能的に同一な分子を得ることができることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異が各記載配列に含まれる。

【0215】

アミノ酸配列に関しては、核酸、ペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質の配列に対し、単一アミノ酸若しくはコードされた配列のうち少量の割合のアミノ酸を改変、付加または欠失させる個々の置換、欠失または付加は、その改変によりあるアミノ酸が欠失する、あるアミノ酸が付加される、またはあるアミノ酸が化学的に類似のアミノ酸に置換される場合は「保存的に修飾された変異体」であることを当業者は認識するであろう。機能的に類似のアミノ酸が記載された保存的置換の表は、当業者に公知である。このような保存的に修飾された変異体は、本明細書に記載の多形変異体、種間の相同体、及び対立遺伝子への追加であって除外ではない。

【0216】

機能的に類似のアミノ酸が記載された保存的置換の表は当業者に公知である。以下の各8群には、互いに保存的置換であるアミノ酸が含まれている: 1) アラニン(A)、グリシン(G); 2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E); 3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q); 4) アルギニン(R)、リシン(K); 5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V); 6) フェニルアラニン(L)、チロシン(Y)、トリプトファン(W); 7) セリン(S)、スレオニン(T); 及び [0139] 8) システイン(C)、メチオニン(M) (例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993) を参照のこと))。

【0217】

2つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、用語「同一な」またはパーセントの「同一性」とは、同一である2つまたはそれ以上の配列若しくはサブ配列を意味する。以下の配列比較アルゴリズムの1つ(または当業者が入手可能な他のアルゴリズム)を使用した測定で、比較枠(comparison window)または指定領域上で最大一致度について比較及びアライメントを行った場合、または手作業でアライメントし目視確認した場合に、アミノ酸残基またはヌクレオチドの割合が同じ(すなわち、特定領域にわたり、約60%の同一性、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%の同一性)であれば、配列は「実質的に同一」であ

る。この定義は、試験配列の相補体も指す。同一性は、長さが少なくとも約50アミノ酸またはヌクレオチドである領域にわたって、または長さが75～100アミノ酸またはヌクレオチドである領域にわたって、または、ポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列全体を通して特定されていない場所に存在し得る。ヒト以外の種に由来する相同体を含め、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、本明細書に記載のポリヌクレオチド配列またはその断片を有する標識プローブを用いてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングする工程、及び前述のポリヌクレオチド配列を含む完全長cDNA及びゲノムクローンを単離する工程を含む処理により得られる。このようなハイブリダイゼーション技術は当業者に周知である。

【0218】

配列比較の場合、典型的に1つの配列を参照配列とし、それに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列と参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じてサブ配列の座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムのパラメータを指定する。デフォルトのプログラムパラメータを使用でき、または別のパラメータを指定することもできる。その後、配列比較アルゴリズムにより、参照配列に対する試験配列の配列同一性パーセントがプログラムパラメータに基づいて計算される。

【0219】

本発明において「比較枠 (comparison window)」には、20～600、通常約50～約200、より一般的には約100～約150からなる群から選択される連続位置番号のいずれか1つの位置のセグメントに対する参照が含まれ、比較対象配列及びそれと同じ連続位置番号のリファレンス配列を最適にアライメントしてから2配列の比較を行ってよい。比較のための配列アライメント方法は当業者に公知である。比較のための最適な配列アライメントは、Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482の局所相同性アルゴリズムによるもの、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性アライメントアルゴリズムによるもの、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性検索法によるもの、これらのアルゴリズム実装コンピュータ (GAP、BESTFIT、FASTA、及びTFASTA: Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) によるもの、または手作業でのアライメントと目視検査によるもの (例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995補遺) を参照のこと) を含むが、これらに限定されずに実施可能である。

【0220】

配列同一性及び配列類似性のパーセント測定に好適なアルゴリズムの一例は、BLAST及びBLAST2.0アルゴリズムであり、それぞれ、Altschul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402、及びAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLAST解析実行用ソフトウェアは、国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) に公開されており <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> で入手可能である。BLASTアルゴリズムパラメータのW、T、及びXで、アライメントの感度及び速度が決まる。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列の場合) では、ワード長 (W) 11、期待値 (E) 10、M=5、N=-4及び両鎖比較がデフォルトで使用される。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、ワード長3、及び期待値 (E) 10をデフォルトで使用し、BLOSUM62スコア行列 (Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと) はアライメント (B) 50、期待値 (E) 10、M=5、N=-4、及び両鎖比較をデフォルトで使用する。BLASTアルゴリズムは典型的に

10

20

30

40

50

「低複雑度」フィルターを外して実施する。

【0221】

BLASTアルゴリズムでは、2配列間の類似性の統計解析も実施される（例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787を参照のこと）。BLASTアルゴリズムによって得られる類似性の1つの基準は最小和確率（smallest sum probability）（ $P(N)$ ）であり、ヌクレオチドまたはアミノ酸の2つの配列間の一致が偶然に起こる確率の指標が得られる。例えば、核酸が参照配列に類似すると見なされるのは、被験核酸と参照核酸との比較で最小和確率（smallest sum probability）が約0.2未満、または約0.01未満、または約0.001未満の場合である。

10

【0222】

語句「に選択的に（または特異的に）ハイブリッド形成する」とは、特定のヌクレオチド配列が複合混合体（全細胞性またはライブラリーのDNAまたはRNAを含むがこれらに限定されない）に存在している場合に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で分子がその特定ヌクレオチド配列に対してのみ結合、二重鎖形成（duplexing）、またはハイブリッド形成することを指す。

【0223】

語句「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、DNA、RNA、または他の核酸、またはそれらの組み合わせの配列のハイブリダイゼーションを、当技術分野で公知のように低イオン強度及び高温という条件下で行うことを指す。典型的に、ストリンジェントな条件下では、プローブは、核酸の複合混合体中のその標的サブ配列とはハイブリッド形成するが（全細胞性若しくはライブラリーのDNAまたはRNAを含むがこれらに限定されない）、複合混合体中の他の配列とはハイブリッド形成をしない。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、状況が異なれば条件は異なってくる。配列が長いほど、より高温で特異的にハイブリッド形成する。核酸のハイブリダイゼーションに関する広範なガイドは、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)に記載されている。

20

30

【0224】

本明細書で使用する用語「修飾された」とは、ポリペプチドの長さ、アミノ酸配列、化学的構造体に対する変更、ポリペプチドの共翻訳修飾、またはポリペプチドの翻訳後修飾のような、所与のポリペプチドに行われるあらゆる変更をいう。「（修飾された）」という形になっている場合、用語は、そこで述べているポリペプチドは任意選択で修飾される、すなわち、そこで述べているポリペプチドは、修飾されてもよいし、または修飾されなくてもよいことを意味する。

【0225】

用語「翻訳後修飾された」とは、天然または非天然型アミノ酸がポリペプチド鎖に組み込まれた後に、かかる天然または非天然型のアミノ酸に対して行われるあらゆる修飾を指す。かかる用語には、あくまでも例示のためであるが、インビボの共翻訳修飾、インビトロの共翻訳修飾（無細胞翻訳系など）、インビボの翻訳後修飾、及びインビトロの翻訳後修飾が包含される。

40

【0226】

提供されるのは、翻訳中または翻訳後に差別的な修飾を受ける、例えば、公知の保護基／ブロック基、タンパク質分解開裂、抗体分子または他の細胞リガンド等への結合によるグリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、誘導体化を受ける抗原結合コンストラクトである。多数ある化学的修飾のいずれの修飾も、臭化シアン、トリプシン、キモ

50

トリプシン、パパイン、V8プロテアーゼ、 NaBH_4 による特異的な化学的開裂；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシン存在下の代謝合成等を含むがこれらに限定されない公知の技術により行われ得る。

【0227】

本明細書に包含されるさらなる翻訳後修飾には、例えば、原核生物の宿主細胞に発現した結果としての、N結合またはO結合した炭水化物鎖（N末端またはC末端のプロセッシング）、アミノ酸骨格への化学部分の付加、N結合またはO結合した炭水化物鎖の化学的修飾、及びN末端メチオニン残基の付加または欠失が挙げられる。タンパク質を検出及び単離できるよう、抗原結合コンストラクトを酵素標識、蛍光標識、同位体標識、またはアフニティ標識のような検出可能な標識で修飾する。好適な酵素の例には、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれ；好適な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン・ビオチン及びアビジン／ビオチンが含まれ；好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン（*dichlorotriazinylamine fluorescein*）、ダンシルクロリドまたはフィコエリスリンが含まれ；発光物質の例には、ルミノール；生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが含まれ；また、好適な放射性物質の例には、ヨウ素、炭素、硫黄、トリチウム、インジウム、テクネチウム、タリウム、ガリウム、パラジウム、モリブデン、キセノン、フッ素が含まれる。

10

20

【0228】

本明細書ではさまざまな刊行物が引用しているが、それらの開示内容は、参照によりその全体が組み入れられたものとする。

【0229】

本発明は、特定のプロトコルに限定されるものではなく、したがって本明細書に記載の細胞株、コンストラクト、及び試薬は異なり得ることを理解されるべきである。本明細書で使用する用語はあくまでも個々の実施形態を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定することは意図されず、添付の請求の範囲によってのみ限定されることも理解されるべきである。

【0230】

特に明記しない限り、本明細書で使用する技術用語及び科学用語はいずれも、本発明の属する分野の当業者に共通して理解される意味と同一の意味を持つ。本明細書に記載の方法、装置、及び材料と類似または等価なあらゆるものを使用して本明細書の記載内容の実施または試験が可能であるが、その好ましい方法、装置及び材料をここに記載する。

30

【0231】

本明細書で言及したすべての刊行物及び特許は、例えば、刊行物に記載されるコンストラクト及び方法の説明及び開示を目的として参照により本明細書に組み込まれ、それらは本願記載の発明と関連してその使用が考えられる。本明細書で論じる刊行物は、本出願の出願日前の関連技術の開示のみを目的として提供されるものである。本明細書のいかなる記載も、本発明者らが先行発明を理由として、または他のいかなる理由によっても、かかる開示に先行する権利がないことを承認するものと解釈すべきではない。

40

【0232】

参考文献：

Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, Marquis D, Ondek B, Wooldridge JE, Smith BJ, Breitmeyer JB, Weiner GJ. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*. 2006 Oct 15;108(8):2648-54. Epub 2006 Jul 6.

Desjarlais JR, Lazar GA. Modulation of antibody effector function. *Exp Cell Res*. 2011 May 15;317(9):1278-85.

10

Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Brünker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M, Umaña P, Benz J. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Aug 2;108(31):12669-74.

Heider KH, Kiefer K, Zenz T, Volden M, Stilgenbauer S, Ostermann E, Baum A, Lamche H, Küpcü Z, Jacobi A, Müller S, Hirt U, Adolf GR, Borges E. A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADCC and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27. *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4159-68. Epub 2011 Jul 27.

20

Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, Vielmetter J, Carmichael DF, Hayes RJ, Dahiyat BI. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4005-10. Epub 2006 Mar 6.

Lu Y, Vernes JM, Chiang N, Ou Q, Ding J, Adams C, Hong K, Truong BT, Ng D, Shen A, Nakamura G, Gong Q, Presta LG, Beresini M, Kelley B, Lowman H, Wong WL, Meng YG. Identification of IgG(1) variants with increased affinity to FcγRIIIa and unaltered affinity to FcγRI and FcRn: comparison of soluble receptor-based and cell-based binding assays. *J Immunol Methods*. 2011 Feb 28;365(1-2):132-41. Epub 2010 Dec 23.

30

Mizushima T, Yagi H, Takemoto E, Shibata-Koyama M, Isoda Y, Iida S, Masuda K, Satoh M, Kato K. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes Cells*. 2011 Nov;16(11):1071-1080.

40

Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):181-9.

Nordstrom JL, Gorlatov S, Zhang W, Yang Y, Huang L, Burke S, Li H, Ciccarone V, Zhang T, Stavenhagen J, Koenig S, Stewart SJ, Moore PA, Johnson S, Bonvini E. Anti-tumor activity and toxicokinetics analysis of MGAH22, an anti-HER2 monoclonal antibody with enhanced Fc-gamma receptor binding properties. *Breast Cancer Res*. 2011 Nov 30;13(6):R123. [Epub ahead of print]

10

Richards JO, Karki S, Lazar GA, Chen H, Dang W, Desjarlais JR. Optimization of antibody binding to FcgammaRIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Aug;7(8):2517-27.

Schneider S, Zacharias M. Atomic resolution model of the antibody Fc interaction with the complement C1q component. *Mol Immunol*. 2012 May;51(1):66-72.

Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6591-604.

20

Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, Huang L, Vijn S, Johnson S, Bonvini E, Koenig S. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating Fcgamma receptors. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8882-90.

30

Stewart R, Thom G, Levens M, Güler-Gane G, Holgate R, Rudd PM, Webster C, Jeremius L, Lund J. A variant human IgG1-Fc mediates improved ADCC. *Protein Eng Des Sel*. 2011 Sep;24(9):671-8. Epub 2011 May 18.

【実施例】

【0233】

以下は、本発明を実施するための具体的な実施形態例である。実施例は、あくまで事例を提供するにすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。使用する数字（例えば、量、温度など）に関し、正確さを保証する努力がなされたが、一部の実験上の誤差及び偏差は当然許容されるべきである。

40

【0234】

本発明の実施には、特に明記しない限り、当技術分野の技術の範囲内であるタンパク質化学、生化学、組換えDNA技術及び薬理学の従来方法が使用される。そのような技術は文献に十分に説明されている。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al.,

50

Molecular Cloning: Laboratory Manual (2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)を参照のこと。

【0235】

実施例で使用する試薬は、一般に市販されているか、当技術分野で公知の市販の計測器、方法、または試薬を使用して調製可能である。上述の各例は本明細書に記載の多種多様な態様及び本明細書に記載の方法の実施について例示している。各例で、本明細書に記載の多数の異なる実施形態についての記載を網羅しているわけではない。したがって、上述の発明は、明瞭な理解を目的とした説明及び実施例で一部が詳述されているが、添付の請求の範囲の趣旨および範囲から逸脱することなく多くの変更及び修正を行うことが可能であることを当業者は容易に理解するであろう。

【0236】

実施例1：単一アーム（OA）抗HER2抗体及び対照群の調製

多数の一価抗HER2抗体及び対照群を以下に記載のように調製した。図1は、各種OA抗体フォーマットの概略図を示す。図1Aは、二価の単一特異性全長抗体の構造を示し、軽鎖は白で示され、重鎖のFab部分は斜線で示され、重鎖のFc部分は灰色で示されている。図1Bは、抗原結合ドメインがFabフォーマットである一価単一特異性OAの2つの型を示す。これらのいずれの型においても、軽鎖は白色で示され、重鎖のFab部分は斜線で示されている。鎖AのFc部分は灰色であり、鎖BのFc部分は黒色である。左の型では、Fabは鎖Aに融合しており、右の型では、Fabは鎖Bに融合している。図1Cは、抗原結合ドメインがscFvフォーマットであるOAの2つの型を示す。これらのいずれの型においても、軽鎖（VL）の可変ドメインは白色で示され、重鎖（VH）の可変ドメインは斜線で示されている。鎖AのFc部分は灰色であり、鎖BのFc部分は黒色である。左の型では、scFvは鎖Aに融合しており、右の型では、scFvは鎖Bに融合している。図1Bまたは図1Cに記載のフォーマットにある多数のOA抗HER2抗体を以下に及び実施例17に記載のように調製した。

【0237】

例示的な抗HER2一価抗体（単一アーム抗体（One-armed antibody）、OAA）：

v1040：一価抗HER2抗体。HER2結合ドメインは鎖A上のトラストズマブ由来のFabであり、Fc領域は、鎖A内に変異T350V__L351Y__F405A__Y407Vを、鎖B内に変異T350V__T366L__K392L__T394Wを有するヘテロ二量体であり、鎖Bのヒンジ領域に変異C226Sを有する。抗原結合ドメインはHER2のドメイン4に結合する。重鎖A、軽鎖、及び重鎖BのDNA配列はそれぞれ、SEQ ID NO：11、SEQ ID NO：13及びSEQ ID NO：15に示される。重鎖A、軽鎖、及び重鎖Bのアミノ酸配列はそれぞれ、SEQ ID NO：12、SEQ ID NO：14、及びSEQ ID NO：16に示される。

【0238】

v4182：一価抗HER2抗体。HER2結合ドメインは鎖A上のペルツズマブ由来のFabであり、Fc領域は鎖A内に変異T350V__L351Y__F405A__Y407Vを、鎖B内に変異T350V__T366L__K392L__T394Wを有するヘテロ二量体であり、鎖Bのヒンジ領域に変異C226Sを有する。抗原結合ドメインはHER2のドメイン2に結合する。

【0239】

対照用抗HER2二価抗体（全長抗体（full-sized antibody）、FSA）

v506は、対照として、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で自作した野生型の抗HER2である。HER2結合ドメインは双方ともトラスツズマブ由来のFabフォーマットであり、Fcは野生型ホモ二量体である。抗原結合ドメインはHER2のドメイン4に結合する。この抗体はトラスツズマブ類似体とも呼ばれる。

【0240】

v792はIgG1ヒンジを有する野生型トラスツズマブである。HER2結合ドメインは双方ともトラスツズマブ由来のFabフォーマットであり、Fc領域は鎖A内に変異T350V__L351Y__F405A__Y407Vを、鎖B内に変異T350V__T366L__K392L__T394Wを有するヘテロ二量体である。抗原結合ドメインはHER2のドメイン4に結合する。この抗体はトラスツズマブ類似体とも呼ばれる。

【0241】

v4184：二価抗HER2抗体。HER2結合ドメインは双方ともペルツズマブ由来のFabフォーマットであり、Fc領域は鎖A内に変異F351Y__S400E__F405A__Y407Vを、鎖B内に変異T366I__N390R__K392M__T394Wを有するヘテロ二量体である。抗原結合ドメインはHER2のドメイン2に結合する。この抗体はペルツズマブ類似体とも呼ばれる。

【0242】

hIgGは市販の非特異的ポリクローナル抗体対照である（Jackson ImmunoResearch、#009-000-003）。

【0243】

各変異体に対応する関連するアミノ酸配列とDNA配列を表1に示す。

（表1）

変異体	種類	重鎖 A	重鎖 B	軽鎖
v1040	アミノ酸	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:14
	DNA	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:13
v4182	アミノ酸	SEQ ID NO:40	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:44
	DNA	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:43
v506	アミノ酸	SEQ ID NO:23	-	SEQ ID NO:25
	DNA	SEQ ID NO:24	-	SEQ ID NO:26
v792	アミノ酸	SEQ ID NO:28	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:30
	DNA	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:29
v4184	アミノ酸	SEQ ID NO:52	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:56
	DNA	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:55

【0244】

これらの抗体及び対照をクローニングし以下のように発現させた。ヒト／哺乳類での発現用に至適化したコドンを使用した遺伝子合成により、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子を構築した。トラスツズマブFab配列を公知のHER2/neuドメイン4結合抗体（Carter P. et al. (1992) Humanization of an anti p185 her2 antibody for human cancer therapy. Proc Natl Acad Sci 89, 4285）から生成した。FcはIgG1アイソタイプであった。ペルツズマブFab配列を公知のHER2/neuドメイン2結合抗体（Adams CW et al. (2

006) Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER2 dimerization inhibitor, Pertuzumab. Cancer Immunol Immunother. 2006;55(6):717-27) から生成した。

【0245】

最終遺伝子産物を、哺乳類用発現ベクターPTT5 (NRC-BRI, Canada) にサブクロニングし、CHO細胞において発現させた (Durocher, Y., Perret, S. & Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing CHO cells. Nucleic acids research 30, e9 (2002))。

10

【0246】

CHO細胞を、対数増殖期 (150~200万細胞/ml) に、25kDaの水溶性ポリエチレンジアミン1mg/ml (PEI, polysciences) をPEI:DNA比2.5:1で用いてトランスフェクションした (Raymond C. et al. A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications. Methods. 55(1):44-51 (2011))。ヘテロ二量体の形成に至適な濃度範囲を測定するため、ヘテロ二量体形成を可能にする、重鎖A (HC-A)、軽鎖 (LC)、及び重鎖B (HC-B) の至適なDNA比でDNAをトランスフェクションした (例えば、HC-A/HC-B/LC比=30:30:40 (v1040またはv4182))。トランスフェクションした細胞は5~6日後に、培地を4000rpmにて遠心分離した後に回収し、0.45µmフィルターを使用して清澄化して、回収した。

20

【0247】

清澄化した培地をMabSelect (商標) SuRe (GE Healthcare) プロテインAカラムに添加し、10カラム体積のPBS緩衝液 (pH7.2) で洗浄した。抗体を、10カラム体積のクエン酸緩衝液 (pH3.6) で溶出させ、抗体を含有するプール画分をpH11のトリスで中和した。

30

【0248】

プロテインA抗体溶出液をゲルろ過 (SEC) でさらに精製した。ゲルろ過では、3.5mgの抗体混合物を1.5mLまで濃縮し、AKTA Express FPLCにより流速1mL/分でSephadex 200 HiLoad 16/600 200 pg カラム (GE Healthcare) に添加した。pH7.4のPBS緩衝液を流速1mL/分で使用した。精製抗体に相当する画分を採取し、約1mg/mLまで濃縮した。

【0249】

実施例2：例示的な抗HER2抗体薬物複合体 (ADC) の調製

40

以下の抗HER2抗体薬物複合体を調製した：v6246:v506とDM1との複合体 (T-DM1類似体)；v6247:v1040 (OA-tras) とDM1との複合体；v6248:v4182 (OA-pert) とDM1との複合体。

【0250】

これらのADCは、メイタンシンに直接結合させて調製した。実施例1に記載のようにプロテインAとSECとで精製した抗体 (純度>95%) をADC分子の調製に使用した。Kovtun YV, Audette CA, Ye Y, et al. Antibody-drug conjugates designed to eradicate tumors with homogeneous and heterogeneous expression of the target antigen C

50

ancer Res 2006; 66: 3214-21に記載の方法に従いADCを結合させた。ADCは、以下に記載のLC/MSで測定した場合に、1抗体あたり平均モル比2.8~3.5のメイタンシノイド分子を有していた。

【0251】

ADC複合体化反応に使用した試薬の詳細は、以下の通りである。結合用緩衝液1: 50 mM リン酸カリウム/50 mM 塩化ナトリウム (pH 6.5)、2 mM EDTA。結合用緩衝液2: 50 mM コハク酸ナトリウム (pH 5.0)。ADC製剤緩衝液: 20 mM コハク酸ナトリウム、6% (w/v) トレハロース、0.02% ポリソルベート20 (pH 5.0)。ジメチルアセトアミド (DMA); DMAに溶解させた10 mM SMCC (複合体化する前に調製しておく)、DMAに溶解させた10 mM DM1-SH (複合体化する前に調製しておく)、PBSに溶解させた1 mM DTNB、緩衝液に溶解させた1 mM システイン、20 mM コハク酸ナトリウム (pH 5.0)。UV-VIS分光光度計 (Fisher Scientific製 Nano drop 100)、PD-10カラム (GE Healthcare)。

【0252】

ADCを以下の通り調製した。25 mlの結合用緩衝液1、続いて0.5 mlの結合用緩衝液1で予め平衡化しておいたPD-10カラムに出発抗体溶液を添加した。抗体溶出液を回収してA₂₈₀で濃度測定し、その濃度を20 mg/mLに調整した。DMAに溶解させた10 mM SMCC-DM1溶液を調製した。抗体に対して7.5モル当量のSMCC-DM1を抗体溶液に加えた後、DMAを加えて最終DMA量を10 v/v%とする。反応物を簡単に混合し、室温で2時間インキュベートした。第2のPD-10カラムを25 mlの結合用緩衝液1で平衡化し、抗体-SMCC-DM1溶液をカラムに加えて0.5 mlの緩衝液1を入れた。抗体-SMCC-DM1溶出液を採取し、抗体溶液のA₂₅₂及びA₂₈₀を測定した。抗体-SMCC-DM1濃度を計算した (= 1.45 mg⁻¹ cm⁻¹、または217500 M⁻¹ cm⁻¹)。ADCを、高分子量分析用のSEC-HPLCカラムで分析した (SEC-HPLCカラム TOSOH、G3000-SWL、7.8 mm × 30 cm、緩衝液、100 mM リン酸ナトリウム、300 mM 塩化ナトリウム、pH 7.0、流速: 1 ml/分)。

【0253】

ADCの抗体に対する薬物の比 (DAR) を以下の方法によりLC/MSで測定した。抗体を、LC-MSに添加する前にPNGase Fで脱グリコシル化した。Agilent 1100 Series HPLCで以下の条件下で液体クロマトグラフィーを行った。

【0254】

流速: 1 mL/分からポストカラム型スプリットでMSへ100 µL/分で送液。溶媒: A = 0.1% 蟻酸含有 ddH₂O、B = 65% アセトニトリル、25% THF、9.9% ddH₂O、0.1% 蟻酸。カラム: 2.1 × 30 mm Poros R2。カラム温度: 80 °C; 溶媒も予熱。勾配: 20% B (0~3分)、20~90% B (3~6分)、90~20% B (6~7分)、20% B (7~9分)

【0255】

その後、質量分析 (MS) をLTQ-Orbitrap XL質量分析計で以下の条件下行った: Ion Max Electrosprayを使用したイオン化法。校正及び同調の方法: CsIの2 mg/mL溶液を流速10 µL/分で注入した。次いで、Automatic Tune自動調節機能を使用してOrbitrapをm/z値2211に調節する (観察された全体的なCsIイオン範囲: 1690~2800)。コーン電圧: 40 V; チューブレンズ: 115 V; FT分解能: 7,500; 走査範囲m/z 400~4000; 走査遅延: 1.5分。Thermo製Promass deconvolutionソフトウェアを使用して、得られたデータの分子量プロファイルを生成した。DARを計算: Σ (DAR × 画分ピーク強度) を用いて求めた。

【0256】

表2は、ADC分子の平均DARをまとめたものである。OA抗HER2 ADCの平

均DARは約2であり、抗HER2 FSAの平均DARは3.4であった。

【0257】

(表2)

ADC変異体	LC/MSにより測定したDAR
v6247	1.9
v6248	2.1
v6246	3.4

10

【0258】

実施例3：FACSを使用した一価抗HER2抗体及びその組み合わせの細胞表面結合の測定

【0259】

高レベルのHER2を発現している卵巣HER2 2-3+（遺伝子増幅）細胞株であるSKOV3細胞の表面に結合した一価抗HER2抗体の量を測定するため、以下の実験を実施した。実験を以下の通り行った。

【0260】

SKOV3細胞表面への被験抗体の結合をフローサイトメトリーにより測定した。細胞を準飽和密度（subconfluency）まで増殖させ、PBSで洗浄し、DMEMに 1×10^5 細胞/100 μ lで再懸濁させた。細胞懸濁液100 μ lを各微量遠沈管に加えた後、10 μ l/管の抗体変異体を加えた。管を回転装置上で4℃にて2時間インキュベートした。微量遠沈管を2000RPMで室温にて2分間遠心分離し、細胞ペレットを培養液500 μ lで洗浄した。各細胞ペレットを、培養液に2 μ g/試料で希釈した蛍光色素標識した二次抗体100 μ lに再懸濁させた。その後、試料を回転装置上で4℃にて1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を2000rpmで2分間遠心分離し、培養液で洗浄した。細胞を、培養液500 μ lに再懸濁させ、ろ過し、ヨウ化プロピジウム（PI）5 μ l含有管に移してから、BD LSR IIフローサイトメーターで製造者の指示に従い解析した。パラトープが2つある例示的な抗HER2ヘテロ二量体抗体及び対照抗体の K_D をFACSにより評価し、データ解析及び曲線フィッティングをGraphPad Prismで実施した。

20

30

【0261】

その結果を図2に示し、下記表3にまとめている。

(表3)

抗体変異体	KD (nM)	Bmax (MFI)
v506	2.713	29190
v4184	4.108	29188
v506 + v4184	13.85	46279
v1040	6.058	43668
v4182	10.00	45790
v1040 + v4182	26.04	78874

40

【0262】

50

図2及び表2にまとめたデータにあるFACSの結合結果から、抗HER2 OAA 2つの組み合わせ(v1040+v4182)は全細胞結合(Bmax)が個々のOAA(v1040、v4182)のBmax及びFSAの組み合わせ(v506+v4184)のBmaxより約1.7倍多く、FSA抗体(v506)のBmaxより約2.7倍多いことがわかる。見かけの K_D 値を見ると、抗HER2 OAA 2つの組み合わせの K_D はFSAの組み合わせの K_D より約2倍高く、またFSA v506の K_D より約10倍高いことがわかる。

【0263】

実施例4：共焦点顕微鏡による一価抗HER2抗体及びその組み合わせの細胞表面結合の測定

一価抗HER2抗体及びその組み合わせがJIMT-1細胞(トラスツズマブ耐性乳癌細胞株)の表面に結合する能力を、共焦点顕微鏡を使用して測定した。異なる測定時点を通して全細胞結合を可視化するために共焦点顕微鏡を使用した。

【0264】

JIMT-1細胞を抗体変異体(200nM)と共に無血清DMEM中で37℃にて1時間、3時間、及び16時間インキュベートした。細胞を、温めた無菌PBS(500ml/ウェル)で穏やかに2回洗浄した。細胞を10%ホルマリン/PBS溶液250mlを用いて室温で10分間固定させた。ホルマリン溶液を除去し、固定した細胞をPBS(500µl/ウェル)で3回洗浄した。細胞を、250µl/ウェルの0.2%Triton X-100含有PBSで5分間透過処理し、次いで、500µl/ウェルのPBSで3回洗浄した。500µl/ウェルのPBS+5%ヤギ血清を用いて室温で1時間ブロッキングを行った。ブロッキング緩衝液を除去し、二次抗体300µl/ウェルを加え、細胞を室温で1時間インキュベートした。二次抗体を、500µl/ウェルのPBSで3回洗浄して除去した。その後、Prolong gold褪色防止剤(DAPI含有)(Life technologies/製品番号P36931/ロット番号1319493)を使用して、固定した細胞を含有しているカバースリップをスライド上に封入した。Olympus FV1000共焦点顕微鏡を使用して60倍の単一画像を得た。

【0265】

本実験結果から、FSA抗体(v506)及びFSAの組み合わせ(v506+v4184)は点状の細胞内染色(データ示さず)によって示されるように1時間及び3時間において内部移行したように見られたのに比べ、抗HER2単一アーム抗体2つ(v1040+v4182)の組み合わせでは、1時間、3時間及び16時間(一晚)においてJIMT-1細胞表面が濃く染色されたことがわかる。OAAの組み合わせ(v1040+v4182)の表面染色は、いずれの時点においても、個々のOAA単独(v1040またはv4182)の表面染色より濃かった。JIMT-1細胞の細胞染色共焦点画像は、実施例3に記載の、SKOV3細胞内の抗HER2 OAA 2つの組み合わせで得た、高い細胞表面修飾(Bmax)データと一致している。

【0266】

実施例5：一価抗HER2抗体及びその組み合わせの細胞増殖阻害能力

一価抗HER2抗体及びその組み合わせがSKOV3細胞及びBT-474細胞の増殖を阻害する能力を測定するため、本実験を実施した。先に示したように、SKOV3細胞は卵巣HER2 2-3+(遺伝子増幅)細胞株である。BT-474細胞は、HER2 3+乳癌細胞株である。実験を以下に記載のように行った。

【0267】

被験抗体を培養液に希釈し、SKOV3またはBT-474細胞に3連で10µl/ウェル(300nM)加えた。プレートを37℃で5日間インキュベートした。AlamarBlue(商標)(BIOSOURCE # DAL 1100)を使用し細胞生存率を測定した。ウェルあたり10µlのAlamarBlue(商標)を加え、プレートを37℃で2時間インキュベートした。530/580nmの吸光度を読み取った。[対照?]

10

20

30

40

50

【0268】

B T-474細胞の増殖阻害アッセイの結果を図3Aに記載する。これらの結果から、v1040+v4182の組み合わせは、個々のOAA単独の場合(v1040またはv4182)より高い増殖阻害、FSA v506と同等の増殖阻害、FSAの組み合わせ(v506+v4184)より低い増殖阻害を媒介することがわかる。

【0269】

SKOV3細胞での増殖阻害アッセイの結果を図3Bに示す。データは、対照IgGと比較した増殖(%)として報告する。v1040とv4182の組み合わせは、SKOV3においてFSA v506と同等の増殖阻害を有し、FSAの組み合わせv506+v4184より優れた増殖阻害を有する。

10

【0270】

先のデータでは、一価抗HER2抗体の組み合わせはHER2 3+乳癌細胞及びHER2 2-3+卵巣癌細胞の増殖を阻害できることが示されている。しかしながら、検証したHER2 3+乳癌細胞とHER2 2-3+卵巣癌細胞とでは観察された増殖阻害レベルには差がある。

【0271】

実施例6：一価抗HER2抗体及びその組み合わせのHER2+細胞における内部移行能力

FSA及び組み合わせと比較した、一価抗HER2抗体及び組み合わせの内部移行する能力を測定するため、本実験を実施した。HER2 3+卵巣腫瘍細胞株であるSKOV3でアッセイを行った。アッセイを以下の通り行った。

20

【0272】

直接導入法を、Schmidt, M. et al., Kinetics of anti-carcinoembryonic antigen antibody internalization: effects of affinity, bivalency, and stability. Cancer Immunol Immunother (2008) 57:1879-1890に詳述されている操作手順にしたがい行った。具体的には、AlexaFluor (登録商標) 488 Protein Labeling Kit (Invitrogen、カタログ番号A10235)を使用して製造者の指示書にしたがいながら抗体を直接標識した。

30

【0273】

内部移行アッセイでは、12ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルを播種し、 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ で一晩インキュベートした。翌日、標識した抗体をDMEM+10% FBSに200nM加え、 $37^\circ\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ で24時間インキュベートした。暗所条件下、培養液を吸引し、ウェルをPBS 500 μL で2回洗浄した。細胞を回収するため、細胞解離緩衝液を(250 μL) 37°C で加えた。細胞をペレット化し、anti-Alexa Fluor 488 ウサギIgG画分(Molecular Probes A11094、ロット番号1214711) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を加えて、または加えずに、100 μL のDMEM+10% FBSに再懸濁させ、氷上で30分間インキュベートした。分析に先立ち、300 μL のDMEM+10% FBSで試料をろ過しヨウ化プロピジウム4 μL を加えた。試料を、LSRIIフローサイトメーターを使用して分析した。

40

【0274】

結果は図4に示され、図中、アスタリスク(*)は蛍光標識された抗体を指し、記載の内部移行効率は、内部移行した標識された抗体量の測定値である(例えば、「v1040*+v4182」の場合、v4182存在下で内部移行した標識されたv1040の量の測定値である)。単一抗体治療剤はすべて200nMで測定し、組み合わせ治療剤は200nM+200nMで測定した。結果は、抗HER2 OAAはいずれもHER2 3+SKOV3細胞内に内部移行できることを示している。

【0275】

実施例7：一価抗HER2抗体及び組み合わせのHER2+細胞におけるADCC媒介能

50

力

一価抗HER2抗体及び組み合わせが、SKOV3細胞株に濃度依存的ADCCを媒介する能力を評価するため以下の実験を実施した。被験一価抗体は1040、1040と4182との組み合わせ、FSA対照群としての792と4184であった。被験抗体はいずれも、nanoLC-MSでグリコペプチドの解析及び検出を行って測定した場合に、FcのN結合グリカンのフコシル化レベルは同等であった（約88%）（データ示さず）。アッセイを以下の通り行った。

【0276】

SKOV3標的細胞（ATCC、カタログ番号HTB-30）を800rpm、3分間の遠心分離により回収した。細胞をアッセイ培地で1回洗浄して遠心分離し、ペレット上の培地を完全に除去した。細胞をアッセイ培地で穏やかに懸濁し単一細胞溶液を作製した。SKOV3細胞数を4x細胞ストックに調整した（50μlアッセイ培地中10,000細胞）。その後、被験抗体を図5に示す所望の濃度に希釈した。

【0277】

SKOV3標的細胞を以下のようにアッセイプレートに播種した。4x標的細胞ストック50μl及び4x試料希釈液50μlを96ウェルアッセイプレートのウェルに加え、プレートを細胞培養インキュベーター内で室温にて30分インキュベートした。エフェクター細胞（NK92/Fcγ3a（158V/V）、100μl、E/T=5:1、すなわち、1ウェルあたり50,000エフェクター細胞）を加えて反応を開始させ、クロス振盪（cross shaking）で穏やかに混合した。プレートを37℃/5%CO₂にしたインキュベーターで6時間インキュベートした。

【0278】

エフェクター細胞及び抗体を含まない細胞対照群に、標的細胞を溶解させるためにTriton X-100を最終濃度1%に加え、これらの対照群を最大溶解対照とした。ADCCアッセイ緩衝液（98%のフェノールレッド不含のMEM培地、1%のPen/Strep及び1%のFBS）をエフェクター細胞及び抗体を含まない細胞対照群に加え、これを最小LDH放出対照とした。抗体を含まずエフェクター細胞と共にインキュベートした標的細胞を、両細胞と一緒にインキュベートした場合の非特異的LDH放出のバックグラウンド対照とした。細胞生存率を、LDHキットを用いて調べた（Roche、カタログ番号11644793001）。OD492nm及びOD650nmの吸光度データをFlexstation 3で読み取った。データ解析及び曲線フィッティング（シグモイド型用量-反応、可変傾斜）をGraphPad Prismで実施した。

【0279】

結果を図5に示し、結果の概要を下記表4に記載している。図5及び表4のデータから、抗HER2 OAA 2つの組み合わせは、抗HER2 FSA（v792:Fc領域にアミノ酸修飾が含まれている点でv506とは異なる。実施例1の記載を参照のこと）に比べADCCによる最大細胞溶解率を約1.5倍高く媒介し、また、抗HER2 FSAの組み合わせ（v792+v4184）に比べADCCを約1.1倍高く媒介できることがわかる。最大細胞溶解パーセントは、OA単独（v1040）とOAAの組み合わせ（v1040+v4182）とではほぼ同等であった。

【0280】

（表4）

10

20

30

40

抗体変異体	IC50 (nM) SKOV3	最大細胞溶解(%)
v792	約0.032	18
v792 + v4184	約0.04	24
v1040	約0.039	31
v1040 + v4182	2.01	27

10

【0281】

実施例8：一価抗HER2抗体薬物複合体（ADC）の組み合わせにより一価抗HER2 ADC単独の場合よりもHER2 2 + 細胞傷害性効力が増加

DM1に複合体化させた場合の一価抗HER2抗体の組み合わせが濃度依存的に細胞傷害性を媒介する能力を、HER2 2-3 + 卵巣腫瘍（SKOV3）、及びHER2 2 + 乳房腫瘍（JIMT-1）細胞において測定した。アッセイを以下の通り行った。

【0282】

被験抗体を培養液に希釈し、10 µl / ウェルを細胞に3連で加えた。プレートを37 °Cで4日間インキュベートした。細胞生存率を、AlamarBlue（商標）（BIO SOURCE # DAL1100）を使用して測定した。1ウェルあたり10 µlのAlamarBlue（商標）を加え、プレートを37 °Cで2時間インキュベートした。530 / 580 nmの吸光度を読み取った。

20

【0283】

結果を図6A（SKOV3細胞）及び図6B（JIMT-1細胞）に示し、結果の概要を表5に記載している。図6A、図6B及び表5の結果から、IC₅₀として示されるSKOV3における等モル濃度での細胞傷害性は、抗HER2 OAA 2つの組み合わせ（v6247 + v6248）の方が単一OAA単独（v6247またはv6248）に比べ約2～3倍から4倍高いことがわかる。JIMT-1細胞では、Log EC₅₀で示される等モル濃度での細胞傷害性は、抗HER2 OAA 2つの組み合わせ（v6247 + v6248）の方が単一OAA単独（v6247またはv6248）に比べ約2～6倍高い。

30

【0284】

（表5）

ADC変異体	IC50 (nM) JIMT-1	IC50 (nM) SKOV3
v6247	11.3	0.751
v6248	4.62	0.483
v6247 + v6248	2.05	0.177

40

【0285】

実施例9：一価抗HER2抗体薬物複合体（ADC）の組み合わせによりFSA-Trans-DM1よりもHER2 + 細胞傷害性効力が増加

一価抗HER2 ADCの組み合わせが細胞傷害性に及ぼす作用をハーセプチン（商標）耐性HER2 2 + 乳房腫瘍細胞株であるJIMT-1で測定し、FSA-Trans-DM1（v6246、T-DM1類似体）及びFSA-Trans-DM1とv4184（ベルツズマブ類似体）とのFSA組み合わせ体と比較した。実施例8のJIMT-1細胞

50

についての記載のようにアッセイを実施した。ただし、細胞は、O A A D Cと共に5日間インキュベートした。

【0286】

結果を図7に示し、結果の概要を下記表6に記載している。個々のO A A D C (v 6 2 4 7またはv 6 2 4 8)の細胞傷害性はT-D M 1類似体(v 6 2 4 6)及びT-D M 1+ペルツズマブ類似体(v 6 2 4 6+v 4 1 8 4)と同等であった。抗H E R 2-A D C O A Aの組み合わせ(v 6 2 4 7+v 6 2 4 8)は、5種のA D C治療剤のうちI C 5 0値が最も低く(表6)、細胞傷害性はT-D M 1+ペルツズマブ類似体(v 6 2 4 6+v 4 1 8 4)治療剤より約2倍高かった。

【0287】

(表6)

ADC変異体	IC50 (nM) JIMT-1
v6246	23.8
v6247	未測定
v6248	19.3
v6247 + v6248	14.3
v6246 + v4184	33.5

【0288】

実施例10：一価抗H E R 2抗体の組み合わせは、S K O V 3マウスモデルで確立された腫瘍増殖をI g G対照群より有効に阻害する

一価抗H E R 2抗体の単剤として、及び後続追加による組み合わせとしての腫瘍増殖阻害に対する有効性を測定するため、ヌードマウスでは中程度にトラスツズマブ感受性である、異種移植モデル由来の卵巣癌細胞S K O V 3 (H E R 2 3+)で本実験を実施した。O A -トラスツズマブ(v 1 0 4 0)の効果をトラスツズマブ類似体(v 5 0 6)単独と比較し、次に、それぞれにO A -ペルツズマブ(4 1 8 2)またはペルツズマブ類似体(4 1 8 4)を後続追加により組み合わせで比較した。

【0289】

雌の無胸腺ヌードマウスに腫瘍断片1mm³を皮下挿入することにより腫瘍を接種させた。腫瘍を平均体積220mm³に達するまで監視し、その後、動物をI g G対照群、トラスツズマブ類似体(v 5 0 6)、及びO A -T r a s (v 1 0 4 0)の3つの治療群に無作為化した。動物15匹を各群に組み入れた。各群の用量は、下記用量または腫瘍体積が2000mm³(終了エンドポイント)に達するまでの、いずれか早い方とした。

【0290】

A) I g G対照群に、初回用量30mg/kgを試験1日目に、その後、維持用量20mg/kgを試験39日目まで週2回静脈内投与した。

【0291】

B) トラスツズマブ類似体(v 5 0 6)を、試験1日目に初回用量15mg/kg、その後、試験18日目まで週2回の維持用量10mg/kgを静脈内に投与した。22日目から39日目まで、トラスツズマブ類似体5mg/kg週2回の静脈内投与をペルツズマブ類似体(v 4 1 8 4)5mg/kg週2回腹腔内投与と併用して行った。

【0292】

C) O A -T r a s (v 1 0 4 0)を、試験1日目に初回用量15mg/kg、その後、試験18日目まで週2回の維持用量10mg/kgを静脈内に投与した。試験日22日

日から39日目まで、単一アームのトラスツズマブ10mg/kg週2回静脈内投与を、O A - P e r t (v 4 1 8 2) 10mg/kg週2回腹腔内投与と併用して行った。

【0293】

結果を図8A、図8B、及び表7及び8に示す。O A - トラスツズマブ一価抗体及びトラスツズマブ類似体では、I g G対照群と比較して有意及び同様の腫瘍増殖阻害が誘導された。さらに、O A - トラスツズマブでの治療は、トラスツズマブに比較すると治療に反応する腫瘍数の増加と関連しており（それぞれ15例中7例と15例中5例）、動物1匹は残存疾患ゼロであった（表7）。P Kの結果と一致して、試験11日目のO A - トラスツズマブ抗体の血清曝露は、トラスツズマブ類似体より低く、それぞれの値は70.9及び146.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった（表7）。 10

【0294】

上記に示したように、試験22日目に、トラスツズマブ類似体への組み合わせでペルツズマブ類似体を、または、O A - トラスツズマブ一価抗体への組み合わせでO A - ペルツズマブ一価抗体を追加した。2種の抗H E R 2 O A A (v 1 0 4 0 + v 4 1 8 2) の組み合わせは、組み合わせ投与後に腫瘍増殖速度が遅くなったことからわかるように改善された腫瘍増殖阻害を示した。v 5 0 6 及びv 1 0 4 0 の各治療群間、また、22日後に組み合わせを行った群間（すなわち、v 1 0 4 0 + v 4 1 8 2、及びv 5 0 6 + v 4 1 8 4）いずれにおいても腫瘍増殖阻害における有意差は検出されなかった。2種の抗H E R 2

O A A (v 1 0 4 0 + v 4 1 8 2) の組み合わせでは、対照I g G群に対し生存期間中央値の有意な改善が示され（それぞれ46日と22日）、また、全長抗体の組み合わせ（v 5 0 6 + v 4 1 8 4）に比べ生存期間中央値の改善が示された（それぞれ46日と36日）（表8）。治療剤の組み合わせはいずれも対照に比べ生存率を有意に改善し、抗H E R 2 O A A 2つの組み合わせ（v 1 0 4 0 + v 4 1 8 2）では、全長抗体の組み合わせ（v 5 0 6 + v 4 1 8 4）より生存期間が延長される傾向が認められた（図8B）。この結果は、O A 抗H E R 2抗体が、単一薬剤として、またO A 抗H E R 2抗体の組み合わせとして、H E R 2陽性卵巣癌の治療に有用であり得ることを示している。 20

【0295】

（表7）

22日目、n=15	IgG	v506	v1040
平均TV(mm ³) (ベースラインからの 変化%)	1908 (+766%)	1291 (+486%)	1194 (+446%)
T/C (IgG) 比	1	0.68	0.62
応答被験体 (TV<対照の 50%)	0/15	5/15	7/15
完全奏効 (>10%のベースライン からの退縮)	0/15	0/15	0/15
ゼロ残存 病変 (TV<20mm ³)	0/15	0/15	1/15

10

20

【0296】

(表8)

61日目、n=15	IgG	v506+v4184	v1040+v4182
生存期間中央値 (日)	22	36	46
11日目の 血清曝露 (μ g/ml)	na	146.7	70.9

30

【0297】

実施例11：原発性乳癌の異種移植モデルHBCx-13bにおける一価抗HER2抗体の腫瘍増殖阻害有効性

40

一価抗HER2抗体の有効性と全長トラスツズマブ類似体の有効性とを比較するため、トラスツズマブ耐性の原発性乳癌の異種移植モデルHBCx-13bで本実験を実施した。HBCx-13bは、HER2 3+、エストロゲン受容体陰性、転移性乳癌であり、ヌードマウスでは先天的にトラスツズマブ耐性である。HBCx-13bはまた、ドセタキセル、カペシタビンの他、アドリアマイシン/シクロホスファミドの組み合わせに耐性がある。

【0298】

雌の無胸腺ヌードマウスに腫瘍断片20mm³を皮下挿入することにより腫瘍を接種させた。腫瘍を平均体積100mm³に達するまで監視し、その後、動物をトラスツズマブ類似体(v506)及びOAtas(v1040)の2つの治療群に無作為化した。

50

動物 7 匹を各群に組み入れた。両群とも、試験 1 日目に初回用量 15 mg/kg を静脈内投与し、試験 3、7、10、14、17、21、及び 24 日目に維持用量 10 mg/kg を投与した。総試験期間は 64 日であった。

【0299】

結果を図 9 に示し、図中、縦の点線は 24 日目の最終投与日を指す。一価抗 HER2 抗体 (v1040) は、トラスツズマブ類似体 (506) より有意に優れた腫瘍増殖阻害を示し、また、腫瘍が進行するまでの期間をトラスツズマブの類似体より有意に延長した (それぞれ 41 日と 15 日)。PK の結果と一致して、試験 11 日目の OA-トラスツズマブ抗体の血清曝露は、トラスツズマブ類似体より低かった (それぞれ、107.3 µg/ml 及び 190.5 µg/ml) (表 9)。結果から、v1040 は、トラスツズマブ及び化学療法薬に耐性のある転移性乳癌に有用性があり得ることが示唆される。

10

【0300】

表 9 は、一価抗 HER2 抗体及び FSA-tras 対照 (v506) の有効性測定値を比較するデータを示す。表 9 から、一価抗 HER2 抗体 (v1040) は FSA-tras (v506) よりも平均腫瘍体積 (TV mm³) の減少、応答被験体数 (TV > 対照の 50%)、完全奏効数 (< 10% のベースラインからの退縮)、残存疾患ゼロ (TV < 20 mm³) を示す数、進行性腫瘍 (腫瘍倍加) の数、及び腫瘍が進行するまでの平均期間 (倍加時間) において優れていることがわかる。

【0301】

(表 9)

20

25 日目、n=7	v506	v1040
平均 TV (mm ³) (ベースラインからの変化%)	447 (+335%)	115 (+11%)
T/C (tras) 比	1	0.26
応答被験体 (TV < 対照の 50%)	0/7	5/7
完全奏効 (>10% のベースラインからの退縮)	0/7	4/7
ゼロ残存病変 (TV < 20 mm ³)	0/7	1/7
進行までの平均期間 (ベースラインから倍加までの所要日数)	15	41
進行性腫瘍の数	7/7	5/7
25 日目の血清曝露 (µg/ml)	190.5	107.3

30

40

【0302】

実施例 12：一価抗 HER2 抗体は二価 HER2 抗体 (FSA) よりも分布体積増大を示す

例示的な一価抗 HER2 抗体 (v1040、OA-tras) の薬物動態 (PK) を調

50

べ、対照の二価抗HER2抗体（トラスツズマブ類似体のv506）と比較した。これらの試験を以下に記載のように行った

系統／性別：CD-1マウス／雄

治療時の動物の目的体重：0.025kg

動物数：12、n=3／時点

体重：投与するべき容量を計算するため治療前日に記録。

臨床徴候観察：注射後2時間まで観察し、以降、1日目から11日目まで1日2回。

【0303】

1日目、用量10mg/kgの被験物質をマウス尾静脈にIV注射で投与した。投与後240時間まで下記表8に従い選択測定時点で（各測定時点につき動物3匹）顎下静脈または伏在静脈から血液試料を約0.060mL採取した。治療前血清試料（Pre-Rx）を未処置動物から得た。血液試料を室温で15～30分間凝固させた。血液試料を2700rpm、室温にて10分間遠心分離して血清を得、得られた血清を-80℃で保存した。終末血液には、心臓穿刺により血液を採取した。

10

【0304】

血清濃度をELISAにより測定した。簡単に言えば、HER2を、HighBind 384プレート（Corning 3700）プレートにPBS中0.5ug/ml、25ul/ウェルでコーティングし、4℃で一晩インキュベートした。ウェルをPBS-0.05% tween-20で3回洗浄し、80ul/ウェルの1%BSA含有PBSで室温にて1～2時間ブロッキングした。抗体血清の希釈液及び標準液1%BSA含有PBSを調製した。ブロッキング後、ブロッキングを除去し、抗体希釈液をウェルに移した。ELISAプレートを1000gで30秒間遠心分離して気泡を除去し、プレートを室温で2時間インキュベートした。プレートをPBS-0.05% tween-20で3回洗浄し、25ul/ウェルのAP結合ヤギ抗ヒトIgG、Fc（Jackson ImmunoResearch）を加え（1%BSA含有PBSに1：5000で希釈）室温で1時間インキュベートした。プレートをPBS-0.05% tween-20で4回洗浄し、25ul/ウェルのAP基材（5.5mL pNPP緩衝液中1錠）を加えた。Perkin Elmer製Envisionプレートリーダーを使用して、異なる時間間隔（0～30分）で405nmのODを読み取った。OD405が2.2に達する前に5ulの3N NaOHを添加して反応を中止させた。最終読取の前にプレートを1000gで2分間遠心分離した。

20

30

【0305】

血清濃度を、WinnonLinソフトウェアバージョン5.3を使用して解析しPKパラメータを得た。血清試料を2セットの多段階希釈液で解析し、検証された範囲内にある結果を許容とし平均を求めた。ELISA解析後に定量下限値（LLOQ）に満たない血清濃度値を0と見なして平均血清濃度を計算した。ELISAアッセイから得られたLLOQは約1.2ug/mLであった。

【0306】

結果を図10に示し、検討PKパラメータを表10に示す。

（表10）PKパラメータ

40

パラメータ	506 10 mg/kg	% CV	v1040 10 mg/kg	% CV
α (1/h)	1.104	49.89	0.8065	32.93
β (1/h)	0.0089	23.29	0.0115	26.72
k10 (1/h)	0.0181	22.38	0.0329	21.75
k12 (1/h)	0.5515	59.20	0.5031	36.46
k21 (1/h)	0.5437	44.13	0.2820	32.37
C0 ($\mu\text{g/mL}$)	292.5	12.57	301.4	8.52
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	16134	17.93	9158	19.49
MRT (h)	111.1	23.28	84.60	26.88
Vc (mL/kg)	34.19	12.58	33.17	8.53
Vp (mL/kg)	34.69	20.91	59.20	18.07
CL (mL/h/kg)	0.620	17.95	1.092	19.51
Vss (mL/kg)	68.88	8.96	92.37	11.38
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.628	49.85	0.8594	32.91
$t_{1/2\beta}$ (h)	77.68	23.27	60.24	26.71

【 0 3 0 7 】

図 10 に示される結果は、O A - t r a s の P K パラメータがヒトへの投与に妥当であることを指している。明白にわかるように、O A - t r a s は V s s (定常状態における体積) が大きく、このことは、抗体がより大きな体積に分布しており、組織内により広く分布していることを指している。O A - t r a s は組織分布が一層大きく、また一般的な O A A も組織分布が大きいいため、かかる抗体は、抗体濃度が限られる末梢組織の疾患を治療する上で、治療的有用性を有し得る。

【 0 3 0 8 】

実施例 1 3 : 一価抗 H E R 2 抗体は、インビトロで F S A よりも血液脳関門 (B B B) 通過能の促進を示す

例示的な一価抗 H E R 2 抗体変異体 v 1 0 4 0 の、インビトロの B B B モデルにおける通過能を検討するため、本実験を実施した。使用したインビトロの B B B モデルは、G a r b e r g , M . B a l l , N . B o r g , R . C e c c h e l l i , L . F e n a r t , R . D . H u r s t , T . L i n d m a r k , A . M a b o n d z o , J . E . N i l s s o n , T . J . R a u b , D . S

10

20

30

40

50

tanimirovic, T. Terasaki, J. O. Oberg, and T. Osterberg. In vitro models for the blood-brain barrier. Toxicol, in Vitro 19:299-334 (2005) に詳述されている。このモデルでは、前掲の Garb erg らの記載にあるように調製した SV-ARBE C ラットの脳内皮細胞を使用した。
【0309】

アッセイの実験設計を図 11 に示す。12 ウェル組織培養プレートにフェノールレッド 10
不含 SV-ARBE C フィード培地 1 mL を入れた、ラット尾コラーゲンでコーティングした細孔径 1 μ m の 0.83 cm² Falcon セルインサートに、ラット脳内皮細胞 (SV-ARBE C) 80,000 を播種した。下層チャンバーには、フェノールレッド 10
不含 SV-ARBE C 培地とラットアストロサイト馴化培地との 50:50 (v/v) 混合物 2 mL を入れた。輸送緩衝液 (10 mM HEPES、5 mM MgCl₂、及び 0.01 % BSA を溶解させたリン酸緩衝生理食塩液、pH 7.4; アッパーチャンバーに 1 mL 及びボトムチャンバーに 2 mL) を多分割して使用し、被験抗体と、経細胞輸送能が既知である陽性対照抗体 (マウス Fc 融合 VHH の A20.1 VHH を 79 kDa) と、非特異的陰性対照抗体断片 (VHH 17 kDa) とを加えて、輸送実験を 3 連で実施した。

【0310】

アッセイに使用した試験材料とそのサイズを下記表 11 に記載する。

(表 11)

変異体	標的	サイズ(kDa)
v506、全長二価、トラスツズマブ	ヒトHER2	145
v1040、0A-tras	ヒトHER2	98
+対照	経細胞輸送特異的	79
対照 (A20.1VHH)	非特異的	17

【0311】

各抗体の投入濃度 (input concentration) を 5 μ M とし、多重反
応モニタリング (MRM: multiple reaction monitoring)
法 (Haqqani et al., 2008, Haqqani et al.,
2008、2013) を使用して 30、60 及び 90 分にボトムチャンバーから分注し
たアリコート 1 μ L (分注後は、アリコートの採取ごとに輸送緩衝液 100 μ L をボトム
チャンバーに入れた) の抗体濃度を測定することにより、全抗体の経細胞輸送を定量化し
た。

【0312】

簡単に言えば、MRM は、先に記載の LCMS 法 (Haqqani et al., 2
008、Haqqani et al., 2008、2013) を使用してペプチド特異
的抗体断片を検出し定量する。標準曲線を使用して試料中の各 MRM ペプチドの濃度を計
算した。本アッセイの結果を図 12 に示す。図 12 A は、v506 及び v1040 の経細
胞輸送における 30、60 及び 90 分時の平均増加倍率を非特異的 IgG と比較したもの
を示す。図 12 B は、3 回繰り返しのすべてから得られた二価抗体及び一価抗体の曲線下
面積 (AUC) の平均を示し、AUC は、非特異的 IgG 対照群に合わせて標準化してから
計算されたものである。

【0313】

図 12 B に示される結果は、一価抗 HER2 抗体が、FSA よりも 1.8 倍高い、統計
的に有意な高レベルの BBB 経細胞輸送を示すことを実証している。

【0314】

実施例 1 4：一価抗 H E R 2 抗体のインビトロ B B B 通過能の増加は分子量に関連しない
分子量が被験抗体のインビトロ B B B 通過能に与える影響を測定するため、変異体 5 0 6（トラスツズマブ類似体対照）、4 1 8 2（O A - p e r t）、v 6 2 4 7（v 1 0 4 0 と D M - 1 との複合体）、v 6 2 4 8（4 1 8 2 と D M - 1 との複合体）及び v 6 3 0（抗原結合ドメインがトラスツズマブ由来の s c F v である、トラスツズマブ系一価抗 H E R 2 抗体。以下のさらなる記載を参照のこと）の性能と v 1 0 4 0 の性能とを比較した。

【 0 3 1 5 】

V 6 3 0 は一価抗 H E R 2 抗体であり、これは、H E R 2 結合ドメインがトラスツズマブ由来 s c F v であり、F c 領域は、鎖 A 内に変異 L 3 5 1 Y _ S 4 0 0 E _ F 4 0 5 A _ Y 4 0 7 V、鎖 B 内に変異 T 3 6 6 I _ N 3 9 0 R _ K 3 9 2 M _ T 3 9 4 W を有するヘテロ二量体である。v 6 3 0 は、H E R 2 のドメイン 4 に結合する。

【 0 3 1 6 】

アッセイを実施例 1 3 に記載のように行った。結果を下記表 1 2 に示す。

（表 1 2）

変異体	組成物	分子量 (kDa)	インビトロ経細胞輸送 (正規化AUCの平均)
v506	FSA-トラスツズマブ_Fab	145.6	54-71
v1040	OA-トラスツズマブ_Fab	98.9	143
v4182	OA-ペルツズマブ_Fab	98.8	120
V6247 (v1040-DM1)	OA-トラスツズマブ_Fab- ADC	98.9	82
V6248 (4182- DM1)	OA-ペルツズマブ_Fab- ADC	98.8	92
v630	OA-トラスツズマブ_scFv- Fc	78.6	33

【 0 3 1 7 】

これらの結果から、F a b（トラスツズマブ系でもペルツズマブ系でも）からなる単一アーム（一価）の抗体は、全長抗体よりも優れたインビトロ B B B 通過能を有することが示される。その上、抗体質量は B B B 通過能と相関しないように思われる。さらに、O A A に D M 1 を結合させると抗体のインビトロ B B B 通過能が減少した。

【 0 3 1 8 】

実施例 1 5：一価抗 H E R 2 抗体は脳及び肺の分布が全長抗体よりも広い

一価抗 H E R 2 抗体、O A - t r a s（v 1 0 4 0）の脳及び肺に分布する能力を全長抗 H E R 2 抗体（トラスツズマブ類似体 v 5 0 6）のそれとエキソビボ画像診断を使用して比較した。

【 0 3 1 9 】

雌の無胸腺ヌードマウスに S K O V 3 腫瘍細胞懸濁液を皮下で接種させた。腫瘍体積が約 2 0 0 0 m m³ に達するまで腫瘍を監視し、その後、動物を蛍光標識した抗 H E R 2 全長抗体 v 5 0 6 または蛍光標識した一価抗 H E R 2 抗体 v 1 0 4 0 の 2 つの治療群に無作為化した。両抗体を画像診断用に C y 5 . 5 で蛍光標識したところ、どちらの抗体もタンパク質染色は同様で比は約 1 . 5 : 1 であった。1 匹の動物に各抗体 1 0 m g / k g を I V 投与した。注射から 2 4 時間後、動物に麻酔をかけヘパリン加生理食塩水で心内灌流した。灌流後、脳及び両肺を除去し、光学的画像診断で抗体分布を測定した。

【0320】

結果を図13（脳）及び図14（肺）に示す。図13は、v1040の脳分布がv506より1.6倍大きいことを示している。脳内でFSAより優れた脳分布を示す一価抗HER2抗体は、脳転移の治療において治療上の利点を提供し得る。

【0321】

図14は、v1040の肺分布がv506より2.4倍大きいことを示している。FSAより優れた肺分布を示す一価抗HER2抗体は、肺転移の治療において治療上の利点を提供し得る。

【0322】

実施例16：一価抗HER2抗体は、トラスツズマブ耐性PDXモデルにおいてT-DM1類似体よりも自然転移性肺疾患の抑制を示す。

トラスツズマブ耐性原発性乳癌の異種移植モデルHBCx-13bにおいて、一価抗HER2抗体が自然肺転移を予防する能力を、緩衝液対照及びT-DM1類似体（v6246）のそれと比較した。HBCx-13bは、ヌードマウスにおいて先天的にトラスツズマブ耐性である、HER2 3+、エストロゲン受容体陰性、転移性乳癌モデルである。

【0323】

雌の無胸腺ヌードマウスに、患者由来の乳癌をマウスに連続継代させたHBCx-13bの腫瘍断片20mm³を皮下で接種させた。HBCx-13bは、ヌードマウスにおいてトラスツズマブ耐性である、HER2 3+、エストロゲン受容体陰性、転移性乳癌モデルである。その後、腫瘍を平均体積150mm³に達するまで監視した。その後、動物をビヒクル対照、T-DM1類似体（v6246）及び脱フコシル化一価抗HER2抗体（OA-HER2-afuco、v7188）の3つの治療群（各群8匹または9匹）に無作為化した。v7188はv1040の脱フコシル化型であり、ここでは一価抗HER2抗体の別例として使用した。v1040の脱フコシル化型を、実施例1に記載のものと同一の一過性CHO発現システム及びプロテインA及びサイズ排除クロマトグラフィー精製手順を使用して調製した。ただし、その他に、トランスフェクションした総DNAの15%にGDP-6-デオキシ-D-リキソ-4-ヘキスロースレダクターゼ（RMD）をコードする余分のクローンを加えた。

【0324】

投与を以下の通り行った。

- A. ビヒクル対照を5ml/kgの製剤緩衝液と共に試験39日目まで週2回静脈内投与した。
- B. T-DM1類似体を3mg/kgで試験開始日、15、33、及び43日目に静脈内投与した。
- C. OA-HER2afuco（v7188）を10mg/kgで試験39日目まで週2回静脈内投与した。

【0325】

試験43日目に各群につき動物4匹を屠殺して両肺及び腫瘍を採取し、瞬間凍結（snap freezing）して転移の定量用に保存した。先に記載のように特異的ヒトAlu配列のPCRにより両肺の転移を定量した（Scheuer Wet al. 2009. Cancer Res 69:9330-9336）。HBCx-13bの凍結腫瘍ライセートを使用して標準曲線を生成した。

【0326】

表13に示すように、緩衝液を投与したマウスにおいてHBCx-13b腫瘍の肺への自然転移が認められ、投入DNA（ng）あたりのヒトDNA（pg）（n=4）の中央値は27.4pgであった。図15は、T-DM1類似体またはOA-HER2afuco（v7188）の投与を受けたマウスの投入DNA（ng）あたりのヒトDNA（pg）（n=4）の中央値は、それぞれ、21.3pg及び18.7pgであることを示す。OA-HER2afuco抗体では、対照及びT-DM1類似体よりも肺転移が抑制される傾向が示された。この結果は、OA-HER2afuco抗体は肺転移の抑制に

10

20

30

40

50

有効であり得ることを示している。

【0327】

(表13) HBCx-13b腫瘍を有するマウスにおける、転移性疾患を示すヒトDNAのPCRによる定量

処置	動物番号	肺における投入DNA(ng)あたりのヒトAlu DNA(pg)
対照	27	39.8
	57	39.5
	102	2.1
	204	15.4
T-DM1 類似体	23	42.2
	53	16.5
	153	9.6
	167	26.1
OA-HER2 - 低フコシル化	24	18.9
	42	8.2
	145	18.5
	203	24.7

10

20

30

【0328】

実施例17：さらなるOA抗HER2抗体の調製

本明細書に記載の方法による使用に好適なOA抗HER2抗体のさらなる例として、以下のOA抗体を調製した。v1041、v630、及びv878は先に記載されており、国際特許公開第 WO2013/166604号に明らかにされている。

【0329】

トラスツズマブ由来OA抗体

v1041—一価抗HER2抗体。HER2結合ドメインは鎖B上のトラスツズマブ由来のFabであり、Fc領域は、鎖A内に変異T350V__L351Y__F405A__Y407Vを、鎖B内に変異T350V__T366L__K392L__T394Wを有するヘテロ二量体であり、ヒンジ領域は、鎖A内に変異C226S (EU番号付け)を有する。抗原結合ドメインはHER2のドメイン4に結合する。

40

【0330】

v630、一価抗Her2抗体。HER2結合ドメインは鎖A上のトラスツズマブ由来のscFvであり、Fc領域は、鎖A内に変異L351Y__S400E__F405A__Y407V、鎖B内に変異T366I__N390R__K392M__T394Wを有するヘテロ二量体であり、ヒンジ領域は、両鎖に変異C226S (EU番号付け)を有する。抗原結合ドメインはHER2のドメイン4に結合する。

【0331】

50

抗体 B 1 D 2 由来 O A 抗体

v 8 7 8、一価抗 H e r 2 抗体。H E R 2 結合ドメインは鎖 A 上の抗体 B 1 D 2 由来 s c F v (既知の H e r 2 / n e u 結合 A b から作製 (S c h i e r R. e t a l. (1995) *In vitro and in vivo characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. Immunotechnology* 1, 73)) であり、F c 領域は、鎖 A 内に変異 L 3 5 1 Y__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V、鎖 B 内に変異 T 3 6 6 L__K 3 9 2 M__T 3 9 4 W を有するヘテロ二量体であり、ヒンジ領域は両鎖に変異 C 2 2 6 S (E U 番号付け) を有する。抗原結合ドメインは H E R 2 のドメイン 1 に結合する。

【0332】

親和性が改善された抗原結合ドメインを有する O A 抗体

v 4 4 4 2: 一価抗 H E R 2 抗体。H E R 2 結合ドメインは鎖 A 上にある親和性が改善されたペルツズマブ由来の F a b であり、重鎖に変異 T 3 0 A、及び軽鎖に Y 9 6 F (K a b a t 番号付け) を有し、F c 領域は、鎖 A 内に変異 T 3 5 0 V__L 3 5 1 Y__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V、鎖 B 内に変異 T 3 5 0 V__T 3 6 6 L__K 3 9 2 L__T 3 9 4 W を有するヘテロ二量体であり、ヒンジ領域は、鎖 B 内に変異 C 2 2 6 S (E U 番号付け) を有する。抗原結合ドメインは H E R 2 のドメイン 2 に結合する。

【0333】

v 4 4 4 3: 一価抗 H E R 2 抗体。H E R 2 結合ドメインは鎖 A 上にある、親和性が改善されたペルツズマブ由来の F a b であり、重鎖に変異 T 3 0 A、軽鎖に変異 Y 9 6 A (K a b a t 番号付け) を有し、F c 領域は、鎖 A 内に変異 T 3 5 0 V__L 3 5 1 Y__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V、鎖 B 内に変異 T 3 5 0 V__T 3 6 6 L__K 3 9 2 L__T 3 9 4 W を有するヘテロ二量体であり、ヒンジ領域は、鎖 B 内に変異 C 2 2 6 S (E U 番号付け) を有する。抗原結合ドメインは H E R 2 のドメイン 2 に結合する。

【0334】

v 4 4 4 4: 一価抗 H E R 2 抗体。H E R 2 結合ドメインは鎖 A 上にある、親和性が改善されたペルツズマブ由来の F a b であり、重鎖に変異 T 3 0 A 及び G 5 7 A、軽鎖に変異 Y 9 6 F (K a b a t 番号付け) を有し、F c 領域は、鎖 A 内に変異 T 3 5 0 V__L 3 5 1 Y__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V、鎖 B 内に変異 T 3 5 0 V__T 3 6 6 L__K 3 9 2 L__T 3 9 4 W を有するヘテロ二量体であり、ヒンジ領域は、鎖 B 内に変異 C 2 2 6 S (E U 番号付け) を有する。抗原結合ドメインは H E R 2 のドメイン 2 に結合する。

【0335】

v 4 4 4 5: 一価抗 H E R 2 抗体。H E R 2 結合ドメインは鎖 A 上にある、親和性が改善されたペルツズマブ由来の F a b であり、重鎖に変異 T 3 0 A 及び G 5 7 A、軽鎖に変異 Y 9 6 A (K a b a t 番号付け) を有し、F c 領域は、鎖 A 内に変異 T 3 5 0 V__L 3 5 1 Y__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V、鎖 B 内に変異 T 3 5 0 V__T 3 6 6 L__K 3 9 2 L__T 3 9 4 W を有するヘテロ二量体であり、ヒンジ領域は、鎖 B 内に変異 C 2 2 6 S (E U 番号付け) を有する。抗原結合ドメインは H E R 2 のドメイン 2 に結合する。

【0336】

さらに明瞭に理解するために、抗体の F a b 部において修飾されたアミノ酸残基番号を、I M G T 及び K a b a t の両方の番号付け (numbering conventions) を使用して下記表 1 4 にて識別する。

【0337】

(表 1 4) F a b 領域の修飾された残基の I M G T 及び K a b a t による番号付け

10

20

30

40

IMGT #	Kabat #
H_T35A	H_T30A
H_G64A	H_G56A
L_Y116A/F	L_Y96A/F

【0338】

すべての変異体を実施例1に記載のように調製し、発現させて精製した。

【0339】

実施例18：親和性が改善されたOA抗HER2抗体の生物物理学的特性の測定

親和性が改善されたOA抗HER2抗体4442、4443、4444、及び4445の生物物理学的特性を評価した。評価した生物物理学的特性は熱安定性及び標的結合親和性であった。

【0340】

熱安定性

熱安定性を、示差走査熱量測定法により以下の通り評価した。SECで精製した各変異体に示差走査熱量測定法(DSC)を実施し、分子の熱力学的安定性を評価した。OA変異体4442、4443、4444、及び4445と、野生型ペルツズマブのFabを有するOA変異体であるOA変異体4182とを比較した。

【0341】

GEまたはMicroCal VP-Capillary装置を使用してDSC実験を行った。タンパク質をPBS(pH7.4)にバッファー交換し0.3~0.7mg/mLまで希釈した後、0.137mLをサンプルセルに充填し、スキャンレート1℃/分で20~100℃を測定した。データは、Originソフトウェア(GE Healthcare)を使用し、PBS緩衝液のバックグラウンドは減算して解析した。

【0342】

融解温度(T_m)で表されるDSCの結果を下記表15に示す。

【0343】

標的結合親和性

親和性が改善された変異体がHER2に結合する能力を、表面プラズモン共鳴(SPR)により以下の通り評価した。

【0344】

SECで精製した変異体にSPRを実施し変異体のHER2細胞外ドメインへの親和性を評価した。すべてのSPR法は、Biacore T200装置(GE Healthcare(Canada)Ltd.(Mississauga, ON))を使用して行い、その際、1X PBSランニング緩衝液(0.05%Tween20に0.5M EDTA原液を加えて最終濃度3.4mMとした1X PBS緩衝液)を用いてトラスツマブは37℃で、またペルツズマブでは25℃で行った。抗ヒトFc表面をCM5センサーチップで作製し、標準固定化ウィザードテンプレート(immobilization wizard template)に記載の条件を使用して、固定化量のオプションを2000RUに設定して行った。4つのフローセル(FC)はいずれも、10mM NaOAc(pH4.5)に5~10ug/mLで希釈された抗ヒトFcと同様の量で固定化した。OA変異体6449(トラスツマブを結合)と、野生型(wt)トラスツマブFabを有するOA変異体であるv1040とを比較した。OA変異体4442、4443、4444、及び4445と、野生型ペルツズマブFabを有するOA変異体であるOA変異体4182とを比較した。変異体を0.5~2μg/mLで60秒間、流速10μL/分でFC2、FC3またはFC4に注入した。FC1は変異体捕捉には使用せず、ブランクの対照表面として残した。

【0345】

10

20

30

40

50

捕捉された変異体に対するH e r 2 結合の動態パラメータは、シングルサイクルキネティクス（S C K）を使用して測定し、B i a c o r e T 2 0 0 評価ソフトウェアを使用して1：1モデルから求めた。H E R 2を、流速50μl／分、濃度系列0.74、2.22、6.66、20及び60nMで180秒間注入し、解離時間を1800秒とした。すべての測定を少なくとも2連で実施した。

【0346】

被験O A抗体で測定された親和性（K_Dで表示）についても下記表15に示す。
（表15）熱安定性及び標的親和性の測定値概要

WT Fab	変異体	Tm (wtとの差)	KD (M)	STEDEV KD (M)	KD_wt/KD _var
ペルツズ マブ	4442	-1.3	2.65E-9	8.62E-10	5.2
	4443	-1.1	1.70E-09	3.95E-10	8.5
	4444	0.9	2.86E-09	7.52E-10	4.7
	4445	1	2.18E-09	3.86E-10	6.5
	4182 (wt)	0	1.49E-08	4.20E-09	1

【0347】

表15に示すデータは、親和性が改善された変異体の熱安定性は野生型の対照抗体の熱安定性と非常に類似していることを指している。親和性が改善された変異体6449は、野生型対照と比べ約1.7倍高い親和性を示している。親和性が改善された変異体4442～4445は、野生型対照と比べ4.7倍～8.5倍の高い親和性を示している。

【0348】

実施例19：O A抗H E R 2親和性成熟変異体のH E R 2発現細胞への結合能測定

O A抗H E R 2親和性成熟変異体がS K O V 3細胞に結合する能力を、実施例3に記載のようにF A C Sにより評価した。ここでは、親和性が改善されたペルツズマブF a bを有する変異体のみを評価し、すべての変異体をA l e x a F l u o r（登録商標）488 Protein Labeling Kit（Invitrogen、カタログ番号A10235）を使用して製造者の指示書にしたがいながら直接標識した。

【0349】

結果は下記表16に示されており、ここで試験した親和性が改善されたO A抗H E R 2変異体は、S K O V 3細胞表面に発現しているH E R 2に結合できることを示している。

【0350】

（表16）S K O V 3細胞での結合データ

WT Fab	変異体	Bmax	KD (M)
ペルツズ マブ	4442	12087	8.8E-09
	4443	10715	9.3E-09
	4444	11208	1.3E-08
	4445	10243	7.4E-09
	4182 (wt)	9469	9.7E-09

10

【0351】

実施例20：親和性が改善されたO A抗HER2変異体のHER2発現細胞への内部移行能力

親和性が改善されたペルツズマブFabを有するO A抗HER2変異体の内部移行する能力をSKOV3細胞で評価した。アッセイは、各抗体を個別に試験したことを除いては、実施例6に記載のように行った。

【0352】

結果は表17に示されており、被験O A抗HER2変異体は、対照変異体4182と同程度にSKOV3細胞内に内部移行できたことを示している。

20

【0353】

(表17) SKOV3細胞への内部移行

WT Fab	変異体	内部のMFI
ペルツズ マブ	4442	5482
	4443	5253
	4444	5212
	4445	4342
	4182 (wt)	6268

30

【0354】

実施例21：一価抗HER2抗体及び組み合わせがHER2+細胞にADCCを媒介する能力

一価抗HER2抗体及び組み合わせが、HER2+腫瘍細胞株、SKBr3 (HER2 3+)、ZR-75-1 (HER2 2+、エストロゲン受容体陽性、乳癌)、MCF7 (HER2 1+)及びMDA-MB-231 (HER2 0/1+、トリプルネガティブ乳癌；TNBC)にADCCを媒介する能力を評価するため以下の実験を実施した。アッセイを実施例7に記載のように行った。ただし、ZR-75-1には、PBMCをエフェクター細胞としてE/T=30:1で使用した。被験一価抗体は1040、4182、及び1040と4182との組み合わせであり、ハーセプチン(商標)をFSA対照とした。被験抗体はいずれも、nanoLC-MSでグリコペプチドの解析及び検出を行って測定した場合に、FcのN結合グリカンのフコシル化レベルは同等であった(約88%) (データ示さず)。ハーセプチン(商標)をRoche社より購入した。

40

【0355】

結果を図16A~D及び表18~21に示す。

【0356】

SKBr3 HER2 3+ 乳房腫瘍細胞での結果は図16A及び表18に示されて

50

おり、抗HER2 OAA 2つの組み合わせは、抗HER2 FSA（ハーセプチン（商標））及び抗HER2 OAA（v1040）と比べ、ADCCによる最大細胞溶解を同等に媒介できることを示している。

【0357】

（表18）

抗体変異体	最大細胞溶解 (%)
ハーセプチン	26
v1040	23
v1040 + v4182	25

10

【0358】

ZR-75-1 HER2 2+ 乳房腫瘍細胞での結果は図16B及び表19に示されており、抗HER2 OAA 2つの組み合わせは、ADCCによる最大細胞溶解を、抗HER2 FSA（市販ハーセプチン）より約1.4倍高く、抗HER2 OAA（v1040）より約1.2倍高く媒介できることを示している。

【0359】

（表19）

抗体変異体	最大細胞溶解 (%)
ハーセプチン	18
v1040	21
v1040 + v4182	26

20

【0360】

MCF7 HER2 1+ 乳房腫瘍細胞での結果は図16C及び表20に示されており、抗HER2 OAA 2つの組み合わせは、ADCCによる最大細胞溶解を抗HER2 FSA（市販ハーセプチン）より約1.5倍高く媒介し、また抗HER2 OAA（v1040）と同等のADCCを媒介できることを示している。

【0361】

（表20）

抗体変異体	最大細胞溶解 (%)
ハーセプチン	35
v1040	49
v1040 + v4182	52

30

【0362】

MDA-MB-231 HER2 0/1+ TNBC腫瘍細胞での結果は図16D及び表21に示されており、抗HER2 OAA 2つの組み合わせは、ADCCによる最大細胞溶解を抗HER2 FSA（市販ハーセプチン）より約1.4倍高く媒介でき、抗HE

40

50

R 2 O A A (v 1 0 4 0) より約 1 . 1 倍高い A D C C を媒介できることを示している。

【 0 3 6 3 】

(表 2 1)

抗体変異体	最大細胞溶解 (%)
ハーセプチン	41
v1040	51
v1040 + v4182	58

10

【 0 3 6 4 】

ここに記載の結果及び実施例 7 の結果から、抗 H E R 2 O A A 2 つの組み合わせは、抗 H E R 2 F S A より高い標的細胞溶解率で、H E R 2 3 +、2 +、1 + 及び 0 / 1 + の乳癌及び卵巣腫瘍細胞に A D C C を媒介するのに有効であることがわかる。また、結果は、抗 H E R 2 O A A 2 つの方が抗 H E R 2 O A A 1 つよりも H E R 2 2 + Z R - 7 5 - 1 及び H E R 2 0 / 1 + M D A - M B - 2 3 1 の乳房腫瘍細胞における A D C C が高い傾向にあることも示している。O A の組み合わせで A D C C が高くなるこの傾向は、図 2 に示される高い細胞表面修飾と一致している。細胞表面修飾 (図 2) 及び図 5 の A D C C データに基づく、抗 H E R 2 O A A 2 つの組み合わせは、抗 H E R 2 F S A の組み合わせ (v 7 9 2 + v 4 1 8 4) より高い最大細胞溶解を H E R 2 陽性腫瘍細胞に誘発するであろうと予測される。

20

【 0 3 6 5 】

(表 2 2) 例示的な変異体、クローン名称、及び SEQ ID NO

SEQ ID NO	変異体の名称、配列の説明、及び種類
3	628 鎖 A DNA
4	628 鎖 A アミノ酸
5	628 鎖 B DNA
6	628 鎖 B アミノ酸
7	630 鎖 A DNA
8	630 鎖 A アミノ酸
9	630 鎖 B DNA
10	630 鎖 B アミノ酸
11	1040 鎖 A DNA
12	1040 鎖 A アミノ酸
13	1040 軽鎖 DNA
14	1040 軽鎖 アミノ酸
15	1040 鎖 B DNA
16	1040 鎖 B アミノ酸
17	1041 鎖 A DNA

30

40

50

SEQ ID NO	変異体の名称、配列の説明、及び種類
18	1041 鎖 A アミノ酸
19	1041 軽鎖 DNA
20	1041 軽鎖 アミノ酸
21	1041 鎖 B DNA
22	1041 鎖 B アミノ酸
23	506 重鎖 DNA
24	506 重鎖 アミノ酸
25	506 軽鎖 DNA
26	506 軽鎖 アミノ酸
27	792 鎖 A 重鎖 DNA
28	792 鎖 A 重鎖 アミノ酸
29	792 軽鎖 DNA
30	792 軽鎖 アミノ酸
31	792 鎖 B 重鎖 DNA
32	792 鎖 B 重鎖 アミノ酸
33	871 鎖 A 及び B DNA
34	871 鎖 A 及び B アミノ酸
35	878 鎖 A DNA
36	878 鎖 A アミノ酸
37	878 鎖 B DNA
38	878 鎖 B アミノ酸
39	4182 鎖 A DNA
40	4182 鎖 A アミノ酸
41	4182 鎖 B DNA
42	4182 鎖 B アミノ酸
43	4182 軽鎖 DNA
44	4182 軽鎖 アミノ酸
45	4183 鎖 A DNA
46	4183 鎖 A アミノ酸
47	4183 鎖 B DNA
48	4183 鎖 B アミノ酸

10

20

30

40

SEQ ID NO	変異体の名称、配列の説明、及び種類
49	4183 軽鎖 DNA
50	4183 軽鎖アミノ酸
51	4184 鎖A DNA
52	4184 鎖A アミノ酸
53	4184 鎖B DNA
54	4184 鎖B アミノ酸
55	4184 軽鎖 DNA
56	4184 軽鎖アミノ酸

10

【 0 3 6 6 】

(表 2 3)

変異体	H1 (クローン)	H2 (クローン)	L1 (クローン)	L2 (クローン)
1040	4560	4553	4561	n/a
4182	4560	3057	1811	n/a
506	642	642	4561	4561
792	1011	1015	4561	4561
4184	3057	3041	1811	1811
1041	4558	4555	4561	n/a
630	719	716	n/a	n/a
878	1070	1039	n/a	n/a
4442	4560	3376	3383	n/a
4443	4560	3376	3382	n/a
4444	4560	3379	3383	n/a
4445	4560	3379	3382	n/a

20

30

【 0 3 6 7 】

(表 2 4)

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
57.	642	全長 pr	タンパク質
58.	642	全長	DNA
59.	642	VH	タンパク質
60.	642	VH	DNA
61.	642	H1	タンパク質
62.	642	H1	DNA
63.	642	H3	タンパク質
64.	642	H3	DNA
65.	642	H2	タンパク質
66.	642	H2	DNA

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
67.	642	CH1	タンパク質
68.	642	CH1	DNA
69.	642	CH2	タンパク質
70.	642	CH2	DNA
71.	642	CH3	タンパク質
72.	642	CH3	DNA
73.	716	全長	タンパク質
74.	716	全長	DNA
75.	716	CH2	タンパク質
76.	716	CH2	DNA
77.	716	CH3	タンパク質
78.	716	CH3	DNA
79.	1039	全長	タンパク質
80.	1039	全長	DNA
81.	1039	CH2	タンパク質
82.	1039	CH2	DNA
83.	1039	CH3	タンパク質
84.	1039	CH3	DNA
85.	1811	全長	タンパク質
86.	1811	全長	DNA
87.	1811	VL	タンパク質
88.	1811	VL	DNA
89.	1811	L1	タンパク質
90.	1811	L1	DNA
91.	1811	L3	タンパク質
92.	1811	L3	DNA
93.	1811	L2	タンパク質
94.	1811	L2	DNA
95.	1811	CL	タンパク質
96.	1811	CL	DNA
97.	1070	全長	タンパク質

10

20

30

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
98.	1070	全長	DNA
99.	1070	VH	タンパク質
100.	1070	VH	DNA
101.	1070	H1	タンパク質
102.	1070	H1	DNA
103.	1070	H3	タンパク質
104.	1070	H3	DNA
105.	1070	H2	タンパク質
106.	1070	H2	DNA
107.	1070	VL	タンパク質
108.	1070	VL	DNA
109.	1070	L1	タンパク質
110.	1070	L1	DNA
111.	1070	L3	タンパク質
112.	1070	L3	DNA
113.	1070	L2	タンパク質
114.	1070	L2	DNA
115.	1070	CH2	タンパク質
116.	1070	CH2	DNA
117.	1070	CH3	タンパク質
118.	1070	CH3	DNA
119.	3376	全長	タンパク質
120.	3376	全長	DNA
121.	3376	VH	タンパク質
122.	3376	VH	DNA
123.	3376	H1	タンパク質
124.	3376	H1	DNA
125.	3376	H3	タンパク質
126.	3376	H3	DNA
127.	3376	H2	タンパク質
128.	3376	H2	DNA

10

20

30

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
129.	3376	CH1	タンパク質
130.	3376	CH1	DNA
131.	3376	CH2	タンパク質
132.	3376	CH2	DNA
133.	3376	CH3	タンパク質
134.	3376	CH3	DNA
135.	3379	全長	タンパク質
136.	3379	全長	DNA
137.	3379	VH	タンパク質
138.	3379	VH	DNA
139.	3379	H1	タンパク質
140.	3379	H1	DNA
141.	3379	H3	タンパク質
142.	3379	H3	DNA
143.	3379	H2	タンパク質
144.	3379	H2	DNA
145.	3379	CH1	タンパク質
146.	3379	CH1	DNA
147.	3379	CH2	タンパク質
148.	3379	CH2	DNA
149.	3379	CH3	タンパク質
150.	3379	CH3	DNA
151.	3382	全長	タンパク質
152.	3382	全長	DNA
153.	3382	VL	タンパク質
154.	3382	VL	DNA
155.	3382	L1	タンパク質
156.	3382	L1	DNA
157.	3382	L3	タンパク質
158.	3382	L3	DNA
159.	3382	L2	タンパク質

10

20

30

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
160.	3382	L2	DNA
161.	3382	CL	タンパク質
162.	3382	CL	DNA
163.	3383	全長	タンパク質
164.	3383	全長	DNA
165.	3383	VL	タンパク質
166.	3383	VL	DNA
167.	3383	L1	タンパク質
168.	3383	L1	DNA
169.	3383	L3	タンパク質
170.	3383	L3	DNA
171.	3383	L2	タンパク質
172.	3383	L2	DNA
173.	3383	CL	タンパク質
174.	3383	CL	DNA
175.	4553	全長	タンパク質
176.	4553	全長	DNA
177.	4553	VH	タンパク質
178.	4553	VH	DNA
179.	4553	H1	タンパク質
180.	4553	H1	DNA
181.	4553	H3	タンパク質
182.	4553	H3	DNA
183.	4553	H2	タンパク質
184.	4553	H2	DNA
185.	4553	CH1	タンパク質
186.	4553	CH1	DNA
187.	4553	CH2	タンパク質
188.	4553	CH2	DNA
189.	4553	CH3	タンパク質
190.	4553	CH3	DNA

10

20

30

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
191.	4555	全長	タンパク質
192.	4555	全長	DNA
193.	4555	VH	タンパク質
194.	4555	VH	DNA
195.	4555	H1	タンパク質
196.	4555	H1	DNA
197.	4555	H3	タンパク質
198.	4555	H3	DNA
199.	4555	H2	タンパク質
200.	4555	H2	DNA
201.	4555	CH1	タンパク質
202.	4555	CH1	DNA
203.	4555	CH2	タンパク質
204.	4555	CH2	DNA
205.	4555	CH3	タンパク質
206.	4555	CH3	DNA
207.	4558	全長	タンパク質
208.	4558	全長	DNA
209.	4558	CH2	タンパク質
210.	4558	CH2	DNA
211.	4558	CH3	タンパク質
212.	4558	CH3	DNA
213.	719	全長	タンパク質
214.	719	全長	DNA
215.	719	VL	タンパク質
216.	719	VL	DNA
217.	719	L1	タンパク質
218.	719	L1	DNA
219.	719	L3	タンパク質
220.	719	L3	DNA
221.	719	L2	タンパク質

10

20

30

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
222.	719	L2	DNA
223.	719	VH	タンパク質
224.	719	VH	DNA
225.	719	H1	タンパク質
226.	719	H1	DNA
227.	719	H3	タンパク質
228.	719	H3	DNA
229.	719	H2	タンパク質
230.	719	H2	DNA
231.	719	CH2	タンパク質
232.	719	CH2	DNA
233.	719	CH3	タンパク質
234.	719	CH3	DNA
235.	4560	全長	タンパク質
236.	4560	全長	DNA
237.	4560	CH2	タンパク質
238.	4560	CH2	DNA
239.	4560	CH3	タンパク質
240.	4560	CH3	DNA
241.	4561	全長	タンパク質
242.	4561	全長	DNA
243.	4561	VL	タンパク質
244.	4561	VL	DNA
245.	4561	L1	タンパク質
246.	4561	L1	DNA
247.	4561	L3	タンパク質
248.	4561	L3	DNA
249.	4561	L2	タンパク質
250.	4561	L2	DNA
251.	4561	CL	タンパク質
252.	4561	CL	DNA

10

20

30

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
253.	3041	全長	タンパク質
254.	3041	全長	DNA
255.	3041	VH	タンパク質
256.	3041	VH	DNA
257.	3041	H1	タンパク質
258.	3041	H1	DNA
259.	3041	H3	タンパク質
260.	3041	H3	DNA
261.	3041	H2	タンパク質
262.	3041	H2	DNA
263.	3041	CH1	タンパク質
264.	3041	CH1	DNA
265.	3041	CH2	タンパク質
266.	3041	CH2	DNA
267.	3041	CH3	タンパク質
268.	3041	CH3	DNA
269.	3057	全長	タンパク質
270.	3057	全長	DNA
271.	3057	VH	タンパク質
272.	3057	VH	DNA
273.	3057	H1	タンパク質
274.	3057	H1	DNA
275.	3057	H3	タンパク質
276.	3057	H3	DNA
277.	3057	H2	タンパク質
278.	3057	H2	DNA
279.	3057	CH1	タンパク質
280.	3057	CH1	DNA
281.	3057	CH2	タンパク質
282.	3057	CH2	DNA
283.	3057	CH3	タンパク質

10

20

30

40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
284.	3057	CH3	DNA
285.	1011	全長	タンパク質
286.	1011	全長	DNA
287.	1011	VH	タンパク質
288.	1011	VH	DNA
289.	1011	H1	タンパク質
290.	1011	H1	DNA
291.	1011	H3	タンパク質
292.	1011	H3	DNA
293.	1011	H2	タンパク質
294.	1011	H2	DNA
295.	1011	CH1	タンパク質
296.	1011	CH1	DNA
297.	1011	CH2	タンパク質
298.	1011	CH2	DNA
299.	1011	CH3	タンパク質
300.	1011	CH3	DNA
301.	1015	全長	タンパク質
302.	1015	全長	DNA
303.	1015	VH	タンパク質
304.	1015	VH	DNA
305.	1015	H1	タンパク質
306.	1015	H1	DNA
307.	1015	H3	タンパク質
308.	1015	H3	DNA
309.	1015	H2	タンパク質
310.	1015	H2	DNA
311.	1015	CH1	タンパク質
312.	1015	CH1	DNA
313.	1015	CH2	タンパク質
314.	1015	CH2	DNA

10

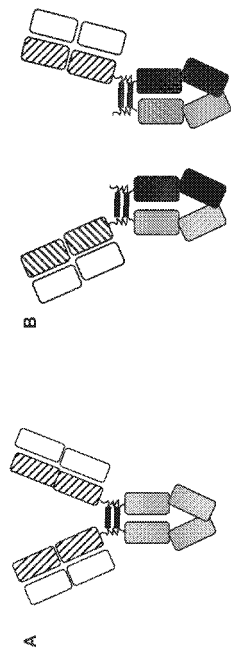
20

30

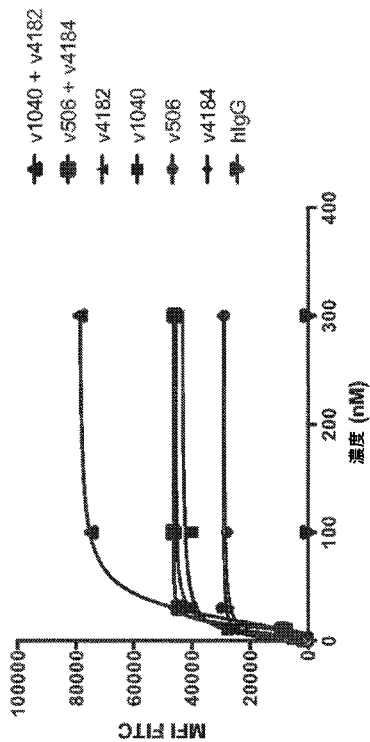
40

SEQ ID NO	クローン	説明	種類
315.	1015	CH3	タンパク質
316.	1015	CH3	DNA

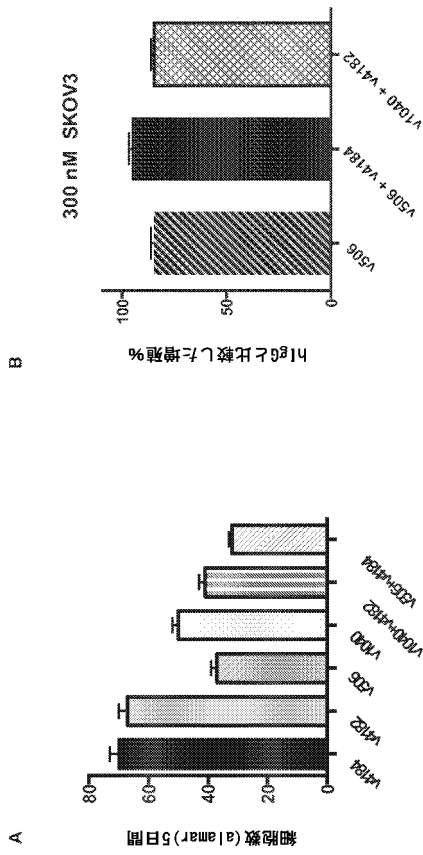
【 図 1 】



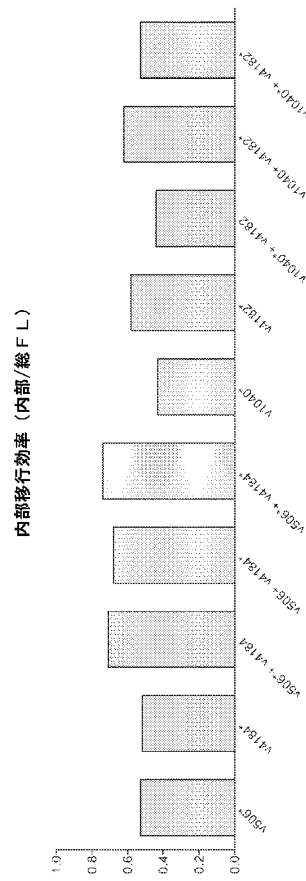
【 図 2 】



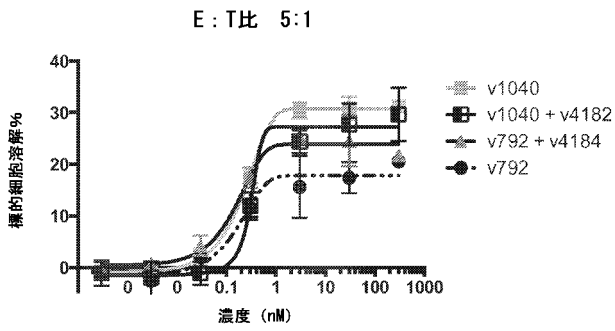
【図 3】



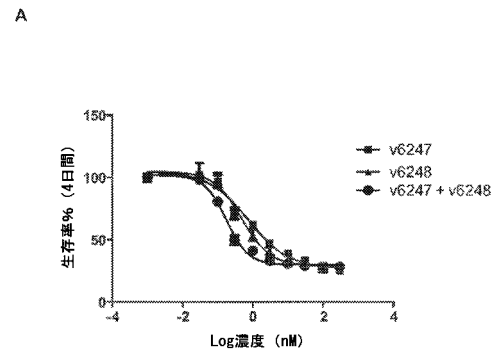
【図 4】



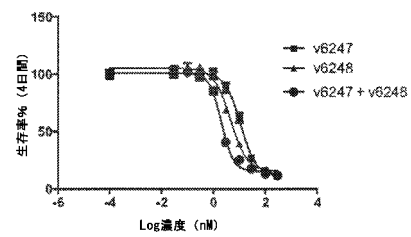
【図 5】



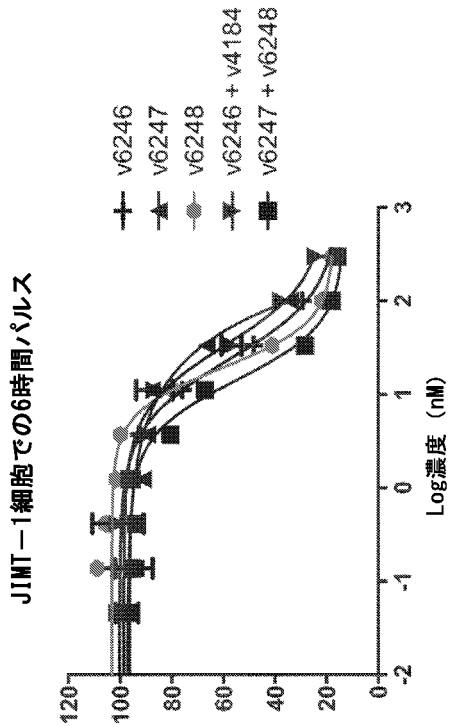
【図 6】



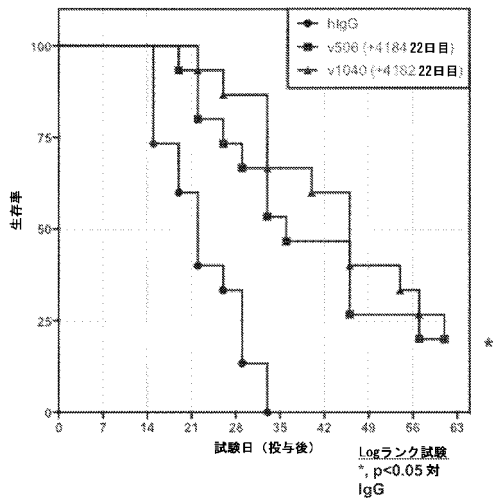
B



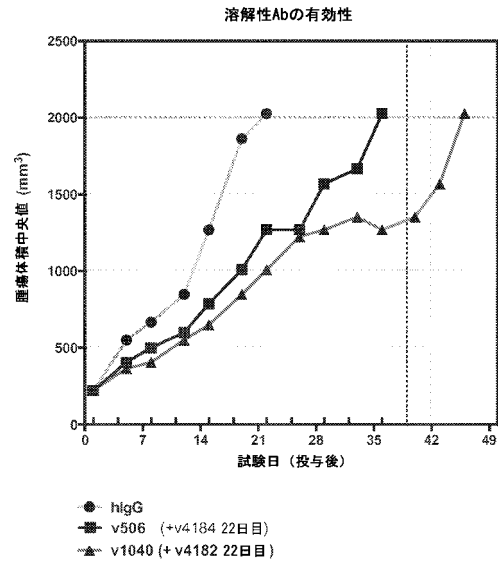
【図 7】

(図 8)
生存率%

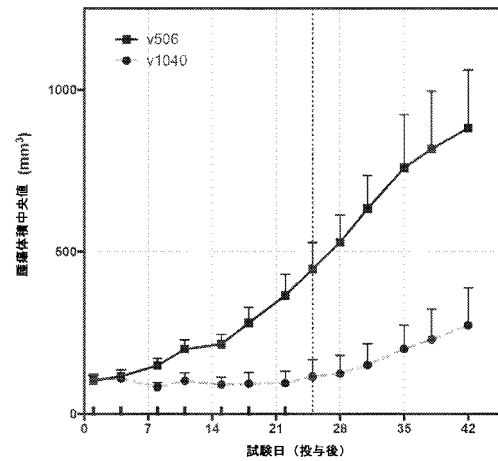
【図 8 B】



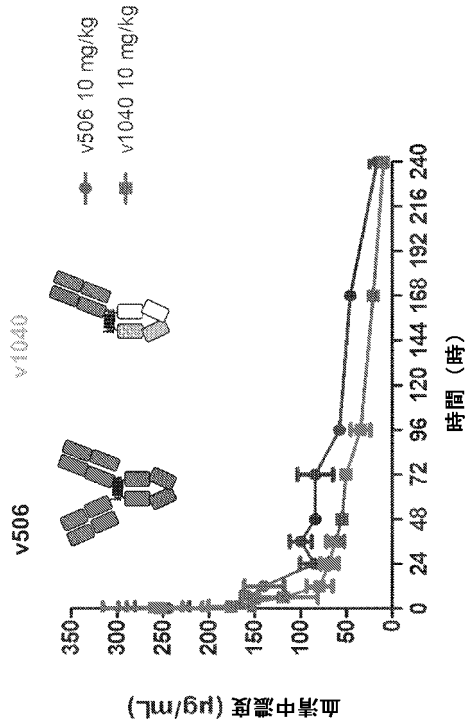
【図 8 A】



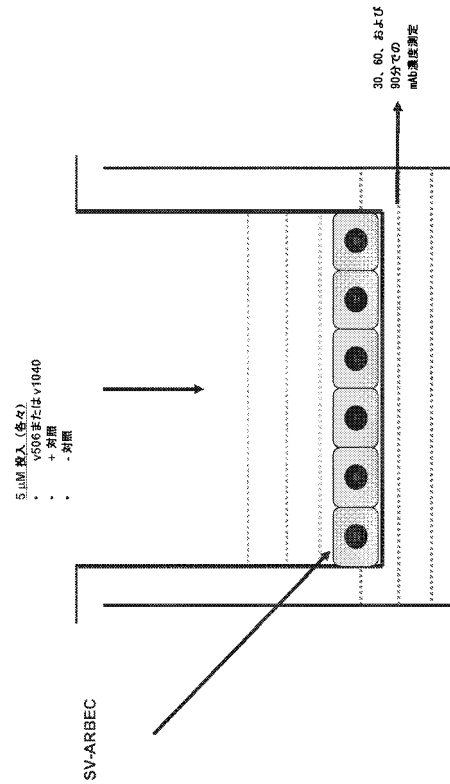
【図 9】



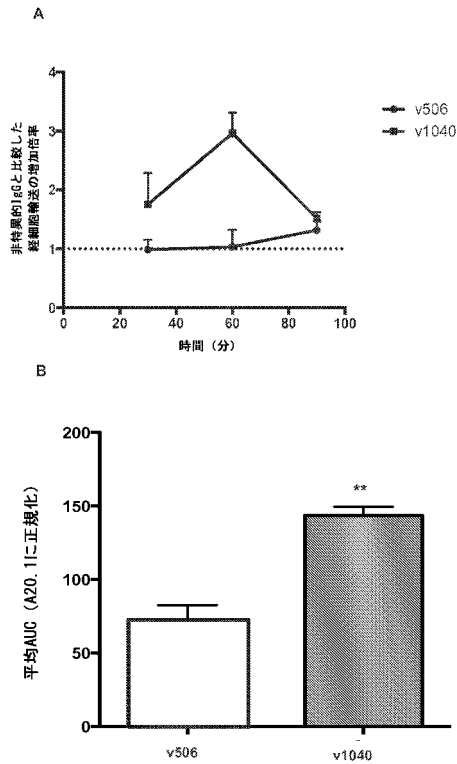
【図 10】



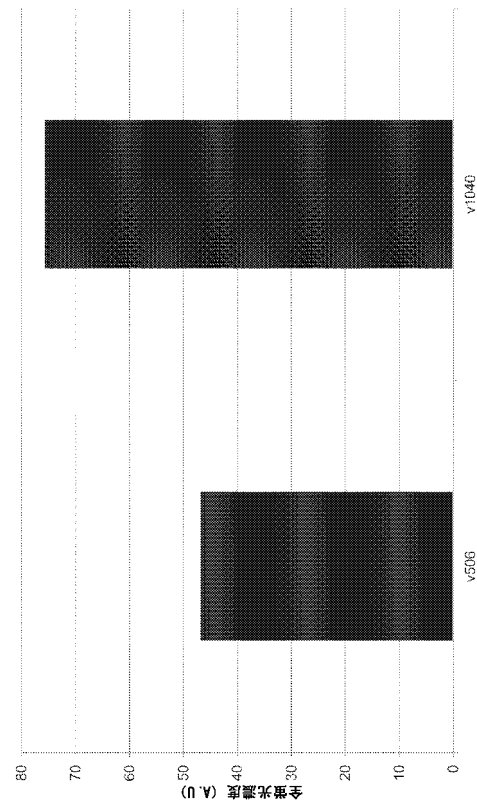
【図 11】



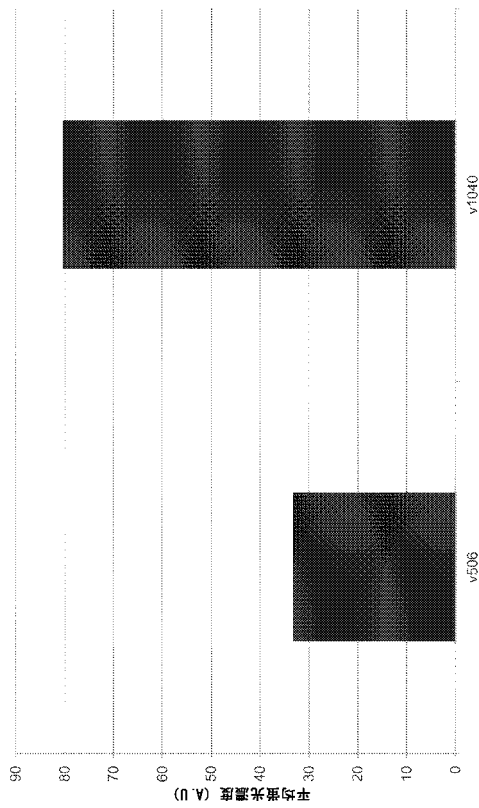
【図 12】



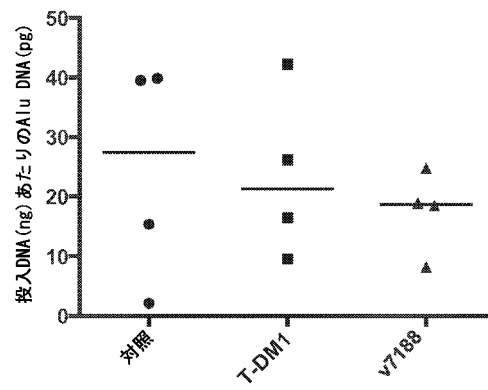
【図 13】



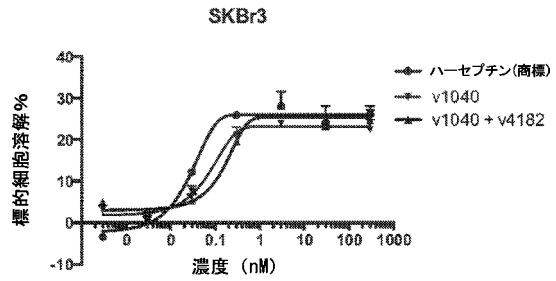
【図 1 4】



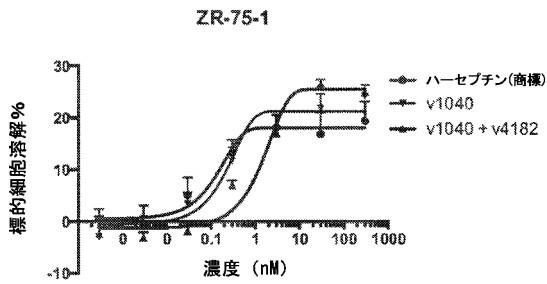
【図 1 5】



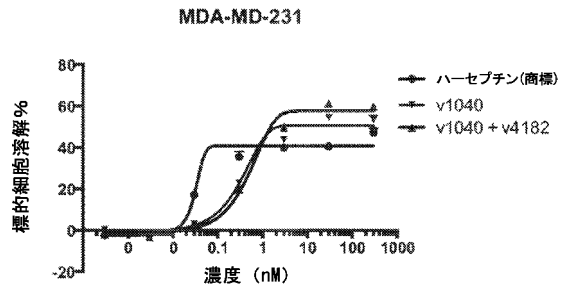
【図 1 6 A】



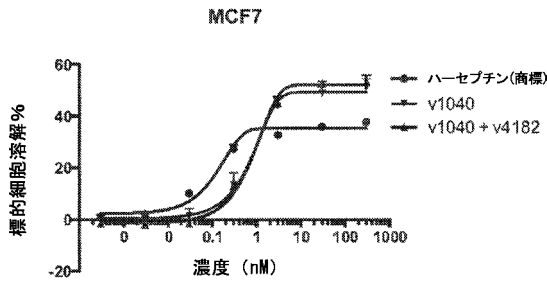
【図 1 6 B】



【図 1 6 D】



【図 1 6 C】



【配列表】

2017504564000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/065571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K-39/395 (2015.01)

CPC - A61K-39/39558 (2015.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - A61K 39/395; C07K 14/705, 16/00, 16/30; C12P 21/08 (2015.01)

USPC - 424/133.1, 138.1, 178.1; 506/9; 536/23.53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - A61K 39/39558, 2039/505; C07K 16/00, 2317/64, 2317/526, 2317/732 (2015.01) (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Orbit, Google Patents, Google Scholar, Google

Search terms used: monovalent, antigen-binding construct, polypeptide, dimeric Fc, extracellular domain, HER2, cancer, human epidermal growth factor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/0228466 A1 (FONG et al) 10 September 2009 (10.09.2009) entire document	1-14, 37, 40-42, 45, 46
Y	MOORE et al. "A novel bispecific antibody format enables simultaneous bivalent and monovalent co-engagement of distinct target antigens," MAbs, 01 November 2011 (01.11.2011), Vol. 3, No. 6, Pgs. 548-557. entire document	38, 39, 43, 44
Y	TROISE et al. "Differential binding of human immunoagents and Herceptin to the ErbB2 receptor," FEBS Journal, 15 September 2008 (15.09.2008), Vol. 275, No. 20, Pgs. 4967-4979. entire document	38, 43
		39, 44

☐ 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

29 January 2015

Date of mailing of the international search report

19 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:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/065571

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.: 15-36
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ 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.:

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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04		4 H 0 4 5
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 11/00		
A 6 1 P 25/00 (2006.01)		A 6 1 P 25/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 35/04 (2006.01)		A 6 1 P 35/04		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K 45/00		
A 6 1 K 47/42 (2017.01)		A 6 1 K 47/42		
A 6 1 K 47/18 (2006.01)		A 6 1 K 47/18		
A 6 1 K 47/26 (2006.01)		A 6 1 K 47/26		
A 6 1 K 47/44 (2017.01)		A 6 1 K 47/44		
C 0 7 K 16/30 (2006.01)		C 0 7 K 16/30		

(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,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ウェイサー ニーナ イー.
カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト エイス アベニュー 540-1385 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 エング ゴードン イウ コン
カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト エイス アベニュー 540-1385 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

(72)発明者 ウィックマン グラント レイモンド
カナダ ブリティッシュコロンビア州 バンクーバー ウエスト エイス アベニュー 540-1385 ザイムワークス, インコーポレイテッド内

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC12 AC20 BB19 BC12 CA46

4C076	AA12	BB01	BB11	CC27	DD51	DD66	EE41	EE51	FF51	FF61
	FF63									
4C084	AA19	AA22	MA52	MA66	NA05					
4C085	AA14	AA16	BB36	BB42	CC23	DD62	EE01	EE03	EE05	GG01
	GG08									
4C086	AA01	AA02	CB22	MA02	MA03	MA04	MA05	MA52	MA66	NA05
	ZA02	ZA59	ZA66	ZA81	ZB26	ZC41				
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	CA40	DA76	EA28	FA74		