

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7055794号
(P7055794)

(45)発行日 令和4年4月18日(2022.4.18)

(24)登録日 令和4年4月8日(2022.4.8)

(51)国際特許分類

C 1 2 N	15/13 (2006.01)	F I	C 1 2 N	15/13	Z N A
C 1 2 N	15/63 (2006.01)		C 1 2 N	15/63	Z
C 0 7 K	16/28 (2006.01)		C 0 7 K	16/28	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)		C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)		C 1 2 N	1/15	

請求項の数 29 (全115頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-515626(P2019-515626)
 (86)(22)出願日 平成29年9月20日(2017.9.20)
 (65)公表番号 特表2019-535234(P2019-535234
 A)
 (43)公表日 令和1年12月12日(2019.12.12)
 (86)国際出願番号 PCT/EP2017/073773
 (87)国際公開番号 WO2018/054973
 (87)国際公開日 平成30年3月29日(2018.3.29)
 審査請求日 令和2年9月18日(2020.9.18)
 (31)優先権主張番号 PCT/EP2016/072688
 (32)優先日 平成28年9月23日(2016.9.23)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁(EP)
 早期審査対象出願

(73)特許権者 510330301
 バイオンテック エスエー
 ドイツ・55131・マインツ・アン・
 デア・ゴルトグルーベ・12
 (73)特許権者 000006677
 アステラス製薬株式会社
 東京都中央区日本橋本町二丁目5番1号
 (74)代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74)代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74)代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦
 (72)発明者 ウグール・ザヒン
 ドイツ・55116・マインツ・フィリ
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 クローディン発現がん疾患の処置のためのクローディン6又はクローディン18.2とCD3とに結合する二重特異的三価抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも3つの結合ドメインを含む結合因子であって、

第1の結合ドメインがT細胞特異的抗原CD3に結合し、第2の結合ドメイン及び第3の結合ドメインがクローディン6に結合し、

第1の結合ドメインがFab分子のフォーマットを有し、並びに第2の結合ドメイン及び第3の結合ドメインがscFv分子のフォーマットを有し、

(a)T細胞特異的抗原に対する特異性を有する免疫グロブリンの重鎖の可変(VH)ドメイン(VH(T))、クローディンに対する特異性を有するVHドメイン(VH(CLDN))及びクローディンに対する特異性を有する免疫グロブリンの軽鎖の可変(VL)ドメイン(VL(CLDN))を含む第1のポリペプチドと、

(b)T細胞特異的抗原に対する特異性を有するVLドメイン(VL(T))、クローディンに対する特異性を有するVHドメイン(VH(CLDN))及びクローディンに対する特異性を有するVLドメイン(VL(CLDN))を含む第2のポリペプチドと

を含み、

第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとが結合因子を形成するように会合し、

VH(T)が配列番号5で表されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり、VL(T)が配列番号6で表されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり、VH(CLDN)が配列番号8で表されるアミノ酸配列を含み又はそれからなり、VL(CLDN)が配列番号10で表されるアミノ酸配列を含む又はそれからなる、結合因子。

【請求項 2】

第1のポリペプチドが免疫グロブリンの重鎖の定常ドメイン1(CH1)を更に含み、第2のポリペプチドが免疫グロブリンの軽鎖の定常ドメイン(CL)を更に含み、両方のドメインが会合することができる、請求項1に記載の結合因子。

【請求項 3】

第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとが、CH1ドメインとCLドメインとの間のジスルフィド架橋を介して共有結合している、請求項2に記載の結合因子。

【請求項 4】

第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドにおいて、VHドメイン、VLドメイン、CH1ドメイン及びCLドメインが、N末端からC末端へと、

10

- VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN);又は

- VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)

の順序で配置されている、請求項2又は3に記載の結合因子。

【請求項 5】

VH-VL又はVL-VHドメインが、ペプチドリンカーを介してCH1ドメイン又はCLドメインに連結されている、請求項4に記載の結合因子。

【請求項 6】

前記ペプチドリンカーが、アミノ酸配列DVPG₂S又はSGPG₃RS(G₄S)₂を含む、請求項5に記載の結合因子。

20

【請求項 7】

第1の結合ドメインが、CD3のイプシロン鎖に結合する、請求項1から6のいずれか一項に記載の結合因子。

【請求項 8】

クローディンを発現するがん細胞に対してT細胞媒介性細胞傷害性を誘導する、請求項1から7のいずれか一項に記載の結合因子。

【請求項 9】

10nM又は1nM又は500pM又は250pM又は100pM又は50pMのEC50で、クローディンを発現するがん細胞に対してT細胞媒介性細胞傷害性を誘導する、請求項1から8のいずれか一項に記載の結合因子。

30

【請求項 10】

(i) 第1のポリペプチドが、配列番号14で表されるアミノ酸配列を含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが、配列番号16で表されるアミノ酸配列を含む若しくはそれからなる；

(ii) 第1のポリペプチドが、配列番号15で表されるアミノ酸配列を含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが、配列番号16で表されるアミノ酸配列を含む若しくはそれからなる；

(iii) 第1のポリペプチドが、配列番号17で表されるアミノ酸配列を含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが、配列番号19で表されるアミノ酸配列を含む若しくはそれからなる；或いは

(iv) 第1のポリペプチドが、配列番号18で表されるアミノ酸配列を含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが、配列番号19で表されるアミノ酸配列を含む若しくはそれからなる、

40

請求項1から9のいずれか一項に記載の結合因子。

【請求項 11】

請求項1から10のいずれか一項に記載の結合因子をコードする核酸。

【請求項 12】

ベクターの形態又はRNAの形態である、請求項11に記載の核酸。

【請求項 13】

請求項1から10のいずれか一項に記載の結合因子をコードする核酸配列を含む宿主細胞。

【請求項 14】

50

請求項1から10のいずれか一項に記載の結合因子、請求項11又は12に記載の核酸、又は請求項13に記載の宿主細胞を含む、医薬。

【請求項15】

請求項1から10のいずれか一項に記載の結合因子、請求項11又は12に記載の核酸、又は請求項13に記載の宿主細胞を含む、がんの処置又は予防に使用するための医薬。

【請求項16】

請求項1から10のいずれか一項に記載の結合因子、請求項1から10のいずれか一項に記載の結合因子をコードする核酸、又は請求項13に記載の宿主細胞を含む医薬組成物。

【請求項17】

前記がんがクローディン6を発現するがん細胞によって特徴付けられ、前記がんが、膀胱がん、卵巣がん、小細胞肺がん(SCLC)及び非小細胞肺がん(NSCLC)を含む肺がん、胃がん、乳がん、肝臓がん、脾臓がん、皮膚がん、悪性黒色腫、頭頸部がん、肉腫、胆管がん、膀胱のがん、腎臓がん、結腸がん、回腸のがんを含む小腸がん、精巣胎児性癌、胎盤絨毛癌、子宮頸がん、精巣がん、精巣奇形腫及び胚性精巣がん、子宮がん、胚細胞腫瘍、及びそれらの転移性形態からなる群から選択される、請求項15に記載の医薬。

10

【請求項18】

前記卵巣がんが、卵巣腺癌又は卵巣奇形癌である、請求項17に記載の医薬。

【請求項19】

前記非小細胞肺がんが、肺扁平上皮癌又は腺癌である、請求項17に記載の医薬。

20

【請求項20】

前記皮膚がんが、基底細胞癌又は扁平上皮癌である、請求項17に記載の医薬。

【請求項21】

前記頭頸部がんが、悪性多形腺腫である、請求項17に記載の医薬。

【請求項22】

前記肉腫が、滑膜肉腫又は癌肉腫である、請求項17に記載の医薬。

【請求項23】

前記膀胱のがんが、移行上皮癌又は乳頭癌である、請求項17に記載の医薬。

30

【請求項24】

前記腎臓がんが、明細胞腎細胞癌及び乳頭状腎細胞癌を含む腎細胞癌である、請求項17に記載の医薬。

【請求項25】

前記小腸がんが、小腸腺癌である、請求項17に記載の医薬。

【請求項26】

前記回腸のがんが、回腸の腺癌である、請求項17に記載の医薬。

【請求項27】

前記精巣がんが、精巣セミノーマである、請求項17に記載の医薬。

【請求項28】

前記胚細胞腫瘍が、奇形癌、胎児性癌及び精巣の胚細胞腫瘍からなる群から選択される、請求項17に記載の医薬。

40

【請求項29】

がん、肉腫及び腫瘍が、転移性形態である、請求項17から28のいずれか一項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん疾患の治療のための新規薬剤及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

クローディンは、上皮及び内皮のタイトジャンクション内に位置する内在性膜タンパク質である。クローディンは、2つの細胞外ループを有する4つの膜貫通セグメントと、細胞質

50

内に位置するN末端及びC末端とを有すると予測されている。膜貫通タンパク質のクローディン(CLDN)ファミリーは、上皮及び内皮のタイトジャンクションの維持に重要な役割を果たしており、細胞骨格の維持及び細胞シグナル伝達でも役割を果たしている可能性がある。

【0003】

CLDN18は、マウス及びヒトで記載されている(Niimi、Mol. Cell. Biol. 21:7380-90頁、2001)、2つの異なるスライスバリエントで存在する。スライスバリエント(Genbank受託番号:スライスバリエント1(CLDN18.1):NP_057453、NM_016369及びスライスバリエント2(CLDN18.2):NM_001002026、NP_001002026)は、およそ27.9/27.72kDの分子量を有する。スライスバリエントCLDN18.1及びCLDN18.2は、第1の膜貫通(TM)領域とループ1とを含むN末端部分で異なるが、C末端の一次タンパク質配列は同一である。

10

【0004】

正常組織において、CLDN18.2は、短命の分化した胃上皮細胞でのみ発現し、胃以外ではCLDN18.2の発現は検出されない。CLDN18.2は、悪性形質転換の過程で維持され、したがってヒト胃がん細胞の表面で提示されることが多い。また、この汎腫瘍抗原は、異所的に、食道、膵臓及び肺腺癌において有意なレベルで活性化されている。CLDN18.2タンパク質はまた、胃がん腺癌のリンパ節転移、特に卵巣への遠隔転移(いわゆるクルーケンベルグ腫瘍)に局在している。

【0005】

CLDN6は、一連の異なるヒトがん細胞で発現するが、正常組織における発現は胎盤に限定されている。

20

【0006】

CLDN18.2及びCLDN6等のクローディンが、がんと正常細胞との間で発現に差異があること、それらが膜局在化していること、並びに傷害に関わる正常組織の大半で存在しないことにより、これらの分子はがん免疫療法のための魅力的な標的である。がん治療において、クローディンを標的とする抗体ベース治療薬の使用は、高レベルの治療特異性が見込まれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

30

【文献】米国特許出願公開第2003/0118592号

米国特許出願公開第2003/0133939号

国際公開第2004/035607号

国際公開第87/04462号

国際公開第89/01036号

欧州特許出願公開第338 841号

米国特許出願公開第2009004213号

【非特許文献】

【0008】

【文献】Niimi、Mol. Cell. Biol. 21:7380-90頁、2001

40

Lin and Weiss、Journal of Cell Science 114、243-244頁(2001)

Wardら、(1989)Nature 341:544-546頁

Birdら、(1988)Science 242:423-426頁

Hustonら、(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883頁

Chang、C.-H.ら、In:Bispecific Antibodies. Kontermann R E(編)、Springer Heidelberg Dordrecht London New York、199-216頁(2011)

Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら(編)、243~56頁(Alan R. Liss、Inc.社、1985)

Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery(第2

50

- 版)、Robinsonら(編)、623~53頁(Marcel Dekker、Inc.社、1987)
 Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review」、Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475~506頁(1985)
 「Analysis、Results、And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303~16頁(Academic Press社、1985)
 Thorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev.、62:119-58頁(1982)
 Scatchardら、Ann N.Y. Acad. ScL、51:660頁(1949) 10
 Smith and Waterman、1981、Ads App. Math. 2、482頁
 Neddeleman and Wunsch、1970、J. Mol. Biol. 48、443頁
 Pearson and Lipman、1988、Proc. Natl Acad. Sci. USA 85、2444頁
 Kohler and Milstein、Nature 256:495頁
 Spieker-Poletら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348頁(1995)
 Rossiら、Am. J. Clin. Pathol. 124:295頁(2005)
 Morrison、S.(1985)Science 229頁
 Verma、R.ら、(1998)J. Immunol. Meth. 216:165-181頁
 Pollockら、(1999)J. Immunol. Meth. 231:147-157頁
 Fischer、R.ら、(1999)Biol. Chem. 380:825-839頁 20
 Riechmann, L.ら、(1998)Nature 332:323-327頁
 Jones, P.ら、(1986)Nature 321:522-525頁
 Queen, C.ら、(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033頁
 Andersenら、2008:Cancer treatment:the combination of vaccination with other therapies. Cancer Immunology Immunotherapy、57(11):1735-1743頁
 Quoixら、2011:Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer:a controlled phase 2B trial. Lancet Oncol. 12(12):1125-33頁
 Lisethら、2010:Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies:the hematological experience. J Biomed Biotechnol. 2010:6920979頁 30
 Hirookaら、2009:A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. Pancreas 38 (3):e69-74頁
 Baskarら、2012:Cancer and radiation therapy:current advances and future directions. Int. J Med Sci. 9(3):193-199頁
 Gadriら、2009:Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. J Immunother. 32(4):333-40頁
 Lechnerら、2011:Chemokines、costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3(11)、1317-1340頁 40
 Zhangら、2009:Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9、28-39頁
 van Duinら、2005:Triggering TLR signaling in vaccination. Trends in Immunology、27(1):49-55頁
 Schoenfeld and Dranoff 2011:Anti-angiogenesis immunotherapy. Hum Vaccin. (9):976-81頁
 Sorensen and Thomsen 2007:Virus-based immunotherapy of cancer:what do we know and where are we going? APMIS 115(11):1177-93頁
 Buonaguroら、2011:Developments in virus-like particle-based vaccines for in 50

fectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83頁
 Guillenら、2010:Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants:application to chronic disease、cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2(2)、128-133頁

2007:Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. J Immunother 30:762-772頁

Castleら、2012:Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Cancer Res 72(5):1081-91頁

Rapoportら、2011:Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. Blood 117(3):788-97頁

Yamada 2011:Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer、bladder cancer、and malignant glioma. Nihon Rinsho 69(9):1657-61頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、がん疾患の治療のための新規薬剤及び方法を提供することである。

【0010】

本発明の根底にある問題の解決策は、腫瘍関連クローディン分子、つまり、がん細胞に特異的な2つの結合ドメインを含む結合因子(binding agent)を生成するという概念に基づく。結合因子は、CD3等のT細胞特異的抗原に特異的な結合ドメインを含み、T細胞に結合して、T細胞を複合体に引き付けることが可能であり、したがってT細胞のがん細胞に対する細胞傷害作用を標的とすることが可能である。この複合体の形成は、単独で又はアクセサリー細胞との組合せのいずれかで、細胞傷害性T細胞にシグナル伝達を誘導することが可能であり、これにより細胞傷害性メディエータの放出を導く。

【0011】

我々は、クローディンを標的とする2つの結合ドメインと、CD3等のT細胞特異的抗原を標的とする別の結合ドメインとを含む結合因子が、強力なT細胞媒介性溶解を誘導することができ、腫瘍疾患の治療に有効であることを初めて報告する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、少なくとも3つの結合ドメインを含む結合因子であって、第1の結合ドメインがT細胞特異的抗原に結合し、第2の結合ドメイン及び第3の結合ドメインがクローディンに結合する、結合因子を提供する。本発明の結合因子は、T細胞(例えば、CD3受容体に係合することによる)に結合することができ、且つ、標的として破壊されるクローディンを発現するがん細胞に結合することができる。

【0013】

一実施形態では、結合因子は、少なくとも3つの結合ドメインを有する6つの抗体可変ドメインを含み、ここで少なくとも2つの結合ドメインは、クローディンに結合し、少なくとも1つの結合ドメインは、T細胞特異的抗原に結合する。

【0014】

一実施形態では、第1、第2及び第3の結合ドメインのそれぞれは、免疫グロブリンの重鎖の可変ドメイン(VH)と、免疫グロブリンの軽鎖の可変ドメイン(VL)とを含む。

【0015】

一実施形態では、第1の結合ドメインは、T細胞特異的抗原に対する特異性を有する免疫グロブリンの重鎖可変(VH)ドメイン(VH(T))と、T細胞特異的抗原に対する特異性を有する免疫グロブリンの軽鎖可変(VL)ドメイン(VL(T))とを含み、第2の結合ドメイン及び第3の結合ドメインはそれぞれ、クローディン抗原に対する特異性を有する免疫グロブリンの重鎖可変(VH)ドメイン(VH(CLDN))と、クローディン抗原に対する特異性を有する免疫グロ

10

20

30

40

50

プリンの軽鎖可変(VL)ドメイン(VL(CLDN))とを含む。

【0016】

一実施形態では、1つ又は複数の結合ドメインの前記重鎖可変ドメイン(VH)と、対応する軽鎖可変ドメイン(VL)とは、ペプチドリンカー、特に、グリシン-セリンペプチドリンカー等のフレキシブルペプチドリンカーを介して連結されている。一実施形態では、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列(G4S)_x(ここでxは、3、4、5又は6である)を含む。

【0017】

一実施形態では、1つ又は複数の結合ドメインの前記重鎖可変ドメイン(VH)と、対応する軽鎖可変ドメイン(VL)とは、Fab分子及び/又はscFv分子のフォーマットを有する。

【0018】

一実施形態では、第1の結合ドメインはFab分子のフォーマットを有し、並びに/又は第2の結合ドメイン及び第3の結合ドメインはscFv分子のフォーマットを有する。

【0019】

一実施形態では、本発明の結合因子は、2つのポリペプチド鎖で構成された二量体であり、ここで第1のポリペプチドは、免疫グロブリンの軽鎖の定常ドメイン(CL)を通して更なるVLドメインに連結されたscFvを含み、第2のポリペプチドは、免疫グロブリンの重鎖の定常ドメイン1(CH1)を通して更なるVHドメインに連結されたscFvを含む。2つのポリペプチド鎖は、好ましくは、ジスルフィド架橋によって一緒に結合されている。ジスルフィド架橋は、好ましくは、抗原結合構成において第1のポリペプチドの更なるVLドメインと第2のポリペプチドの更なるVHドメインとが会合し、結合因子全体として3つの抗原結合ドメインを含むように、CLドメインにおけるCys残基とCH1ドメインにおけるCys残基との間に形成される。本発明によれば、scFv部分のVH及びVLドメインは、好ましくは、アミノ酸配列(G4S)_x(ここでxは、3、4、5又は6である)を含むペプチドリンカー等のペプチドリンカーによって連結され、Fab鎖とscFvは、好ましくは、アミノ酸配列DVPG₂S又はSGPG₃RS(G4S)₂を含むペプチドリンカー等のペプチドリンカーによって連結される。一実施形態では、scFv部分はクローディンに結合し、Fab部分はT細胞特異的抗原に結合する。

【0020】

一実施形態では、第1の結合ドメインはFab断片によって構成され、第2及び第3の結合ドメインはそれぞれscFvによって構成され、ここでFab断片のそれぞれの鎖は1つのscFvに連結され、scFvは好ましくはFab断片のC末端に連結されている。

【0021】

一実施形態では、結合因子は、第1及び第2のポリペプチドを含み、前記第1及び第2のポリペプチドは、T細胞特異的抗原に対する特異性を有するVHドメイン(VH(T))、T細胞特異的抗原に対する特異性を有するVLドメイン(VL(T))、クローディンに対する特異性を有する第1のVHドメイン(VH(CLDN))、クローディンに対する特異性を有する第2のVHドメイン(VH(CLDN))、クローディンに対する特異性を有する第1のVLドメイン(VL(CLDN))、及びクローディンに対する特異性を有する第2のVLドメイン(VL(CLDN))を含み、ここで第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとは結合因子を形成するように会合している。

【0022】

一実施形態では、結合因子は、

(a)T細胞特異的抗原に対する特異性を有するVHドメイン(VH(T))、クローディンに対する特異性を有するVHドメイン(VH(CLDN))及びクローディンに対する特異性を有するVLドメイン(VL(CLDN))を含む第1のポリペプチドと、

(b)T細胞特異的抗原に対する特異性を有するVLドメイン(VL(T))、クローディンに対する特異性を有するVHドメイン(VH(CLDN))及びクローディンに対する特異性を有するVLドメイン(VL(CLDN))を含む第2のポリペプチドと

を含み、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとは結合因子を形成するように会合している。

【0023】

10

20

30

40

50

一実施形態では、第1のポリペプチドは免疫グロブリンの重鎖の定常ドメイン1(CH1)を更に含み、第2のポリペプチドは免疫グロブリンの軽鎖の定常ドメイン(CL)を更に含み、ここで両方のドメインは会合することができる。

【0024】

一実施形態では、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとは、CH1ドメインとCLドメインとの間のジスルフィド架橋を介して共有結合している。

【0025】

本発明の結合因子の一実施形態では、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドにおいて、VHドメイン、VLドメイン、CH1ドメイン及びCLドメインは、N末端からC末端へと、

- VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN)、又は
 - VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)、又は
 - VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)、又は
 - VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T)及びVL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T)及びVL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T)及びVL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T)及びVL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T)、又は
 - VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T)

の順序で配置されている。

【0026】

一実施形態では、一方の鎖の最N端VHドメインは、もう一方の鎖の最N端VLドメインと会合して結合ドメインを形成し、1つの鎖内のVH-VL又はVL-VHドメインのそれぞれは結合ドメインを形成する。

【0027】

一実施形態では、VH-VL又はVL-VHドメインは、アミノ酸配列DVP₂S又はSGPG₃RS(G₄S)₂を含むペプチドリンカー等のペプチドリンカーを介してCH1ドメイン又はCLドメインに連結される。

【0028】

一実施形態では、VH及びVLドメインは、アミノ酸配列(G₄S)_x(ここでxは、3、4、5又は6である)を含むペプチドリンカー等のペプチドリンカーを介して連結され、VH-VL又はVL-VHドメインを形成している。

【0029】

本発明の結合因子では、T細胞特異的抗原に対する特異性を有するVHドメイン(VH(T))及びT細胞特異的抗原に対する特異性を有するVLドメイン(VL(T))は、T細胞特異的抗原に結合する結合ドメインを形成するように会合することができる。

【0030】

更に、本発明の結合因子では、クローディンに対する特異性を有するVHドメイン(VH(CLDN))及びクローディンに対する特異性を有するVLドメイン(VL(CLDN))は、クローディンに結合する結合ドメインを形成するように会合することができる。本発明によれば、クローディンに対する特異性を有するVHドメイン(VH(CLDN))及びクローディンに対する特異性を有するVLドメイン(VL(CLDN))はそれぞれ同一でも異なっていてもよい。クローディンに対する特異性を有する異なるVHドメイン(VH(CLDN)、VH(CLDN)^{*})及び/又はクローディンに対する特異性を有する異なるVLドメイン(VL(CLDN)、VL(CLDN)^{*})を含む本発明の結合因子の場合、VH(CLDN)及びVL(CLDN)は、クローディンに結合する第1の結合ドメインを形成するように会合することができ、VH(CLDN)^{*}及びVL(CLDN)^{*}は、クローディンに結合する第2の結合ドメインを形成するように会合することができる。

【0031】

10

20

30

40

50

一実施形態では、本発明の結合因子は、二重特異性二量体結合因子である。

【0032】

一実施形態では、T細胞特異的抗原は、T細胞の表面に発現しているものである。

【0033】

一実施形態では、T細胞上のT細胞特異的抗原への結合因子の結合は、T細胞の増殖及び/又は活性化に至る。

【0034】

一実施形態では、T細胞特異的抗原は、CD3である。

【0035】

一実施形態では、第1の結合ドメインが、CD3のイプシロン鎖に結合する。

【0036】

一実施形態では、CD3は、T細胞の表面に発現しているものである。一実施形態では、T細胞上のCD3への結合因子の結合は、T細胞の増殖及び/又は活性化に至り、ここで前記T細胞は、好ましくは、細胞傷害性因子、例えばパーフォリン及びグランザイムを放出し、がん細胞の細胞溶解及びアポトーシスを開始する。

【0037】

一実施形態では、クローディンは、がん細胞の表面に発現しているものである。

【0038】

一実施形態では、クローディンは、クローディン6及びクローディン18.2からなる群から選択される。

【0039】

一実施形態では、結合因子は、クローディンの細胞外ドメインに結合する。

【0040】

一実施形態では、本発明の結合因子は、生細胞の表面に存在するクローディンのネイティブエピトープに結合する。一実施形態では、結合因子は、クローディンの第1の細胞外ループに結合する。

【0041】

一実施形態では、T細胞特異的抗原への結合及び/又はクローディンへの結合は、特異的結合である。

【0042】

一実施形態では、結合因子は、クローディンを発現するがん細胞に対してT細胞媒介性細胞傷害性を誘導する。

【0043】

一実施形態では、結合因子は、10nM又は1nM又は500pM又は250pM又は100pM又は50pMのEC50で、クローディンを発現するがん細胞に対してT細胞媒介性細胞傷害性を誘導する。

【0044】

一実施形態では、クローディンはクローディン6であり、がん細胞は、膀胱がん、卵巣がん、特に卵巣腺癌及び卵巣奇形癌、小細胞肺がん(SCLC)及び非小細胞肺がん(NSCLC)、特に肺扁平上皮癌及び腺癌を含む肺がん、胃がん、乳がん、肝臓がん、脾臓がん、皮膚がん、特に基底細胞癌及び扁平上皮癌、悪性黒色腫、頭頸部がん、特に悪性多形腺腫、肉腫、特に滑膜肉腫及び癌肉腫、胆管がん、膀胱のがん、特に移行上皮癌及び乳頭癌、腎臓がん、特に明細胞腎細胞癌及び乳頭状腎細胞癌を含む腎細胞癌、結腸がん、回腸のがんを含む小腸がん、特に小腸腺癌及び回腸の腺癌、精巣胎児性癌、胎盤絨毛癌、子宮頸がん、精巣がん、特に精巣セミノーマ、精巣奇形腫及び胚性精巣がん、子宮がん、奇形癌又は胎児性癌等の胚細胞腫瘍、特に精巣の胚細胞腫瘍、及びそれらの転移性形態からなる群から選択されるがんに由来する。

【0045】

一実施形態では、クローディンはクローディン18.2であり、がん細胞は胃がん、食道がん、脾臓がん、非小細胞肺がん(NSCLC)等の肺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肝臓が

10

20

30

40

50

ん、頭頸部がん、胆嚢がん及びそれらの転移、クルーケンベルグ腫瘍、腹膜転移及び/又はリンパ節転移からなる群から選択されるがんに由来する。

【 0 0 4 6 】

一実施形態では、T細胞特異的抗原はCD3であり、VH(T)は、配列番号5で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、並びに/或いはVL(T)は、配列番号6で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる。

【 0 0 4 7 】

一実施形態では、クローディンはクローディン6であり、VH(CLDN)は、配列番号8で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、並びに/或いはVL(CLDN)は、配列番号10で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる。

10

【 0 0 4 8 】

一実施形態では、T細胞特異的抗原はCD3であり、クローディンはクローディン6であり、- 第1のポリペプチドが、配列番号14で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号16で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号15で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号16で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

20

- 第1のポリペプチドが、配列番号17で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが、配列番号19で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；或いは

- 第1のポリペプチドが、配列番号18で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが、配列番号19で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる。

30

【 0 0 4 9 】

一実施形態では、クローディンはクローディン18.2であり、(i)VH(CLDN)が、配列番号20で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、及び/又はVL(CLDN)が、配列番号22で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；或いは(ii)VH(CLDN)が、配列番号21で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、及び/又はVL(CLDN)が、配列番号23で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる。

40

【 0 0 5 0 】

一実施形態では、T細胞特異的抗原はCD3であり、クローディンはクローディン18.2であり、

- 第1のポリペプチドが、配列番号30で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号32で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号31で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号32で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片

50

のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号33で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号35で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号34で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号35で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号36で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号37で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号38で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号39で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号40で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが配列番号41で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる；

- 第1のポリペプチドが、配列番号42で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み若しくはそれからなり、第2のポリペプチドが、配列番号43で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む若しくはそれからなる。

【0051】

異なる実施形態では、本発明の結合因子又は本発明の結合因子の1つ又は複数のポリペプチド鎖は、分泌シグナル、例えばN末端分泌シグナル、特に免疫グロブリン、例えば、IgG分泌シグナル、例えば配列MGWSCIILFLVATATGVHSを含み又は含まず、並びに/又はタグ、特にC末端タグ、例えばHisタグ、特に配列Gly-Gly-Ser-(His)6若しくは(His)6又はStrepタグを含む又は含まない。

【0052】

また本発明は、本発明の結合因子をコードする核酸を提供する。

【0053】

また本発明は、本明細書で定義される第1のポリペプチド及び/又は第二のポリペプチドをコードする核酸を提供する。

【0054】

一実施形態では、本発明の核酸は、ベクターの形態又はRNAの形態である。

【0055】

一実施形態では、本発明の核酸は、組換え核酸である。

【0056】

また本発明は、本発明の核酸を含む宿主細胞を提供する。

【0057】

また本発明は、医薬として使用するための、本発明の結合因子、本発明の核酸、又は本発明の宿主細胞を提供する。

【0058】

また本発明は、がんの処置又は予防に使用するための、本発明の結合因子、本発明の核酸、又は本発明の宿主細胞を提供する。

【0059】

また本発明は、本発明の結合因子、本発明の核酸、又は本発明の宿主細胞を含む医薬組成

10

20

30

40

50

物を提供する。

【0060】

一実施形態では、医薬組成物は、薬学的に許容される担体及び/又は賦形剤を更に含む。

【0061】

また本発明は、本発明の結合因子、本発明の核酸、本発明の宿主細胞、又は本発明の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、疾患を処置する方法を提供する。一実施形態では、疾患はがんである。

【0062】

また本発明は、本発明の結合因子、本発明の核酸、本発明の宿主細胞、又は本発明の医薬組成物を、それを必要とする対象に投与する工程を含む、がんを処置又は予防する方法を提供する。

10

【0063】

また本発明は、医薬を製造するための、本発明の結合因子、本発明の核酸、本発明の宿主細胞、又は本発明の医薬組成物の使用を提供する。一実施形態では、医薬は、がんの処置のための医薬である。

【0064】

一実施形態では、前記がんの細胞は、前記結合因子が結合可能であるクローディンを発現する。

【0065】

一実施形態では、前記クローディンはクローディン6であり、前記がんは、膀胱がん、卵巣がん、特に卵巣腺癌及び卵巣奇形癌、小細胞肺がん(SCLC)及び非小細胞肺がん(NSCLC)、特に肺扁平上皮癌及び腺癌を含む肺がん、胃がん、乳がん、肝臓がん、脾臓がん、皮膚がん、特に基底細胞癌及び扁平上皮癌、悪性黒色腫、頭頸部がん、特に悪性多形腺腫、肉腫、特に滑膜肉腫及び癌肉腫、胆管がん、膀胱のがん、特に移行上皮癌及び乳頭癌、腎臓がん、特に明細胞腎細胞癌及び乳頭状腎細胞癌を含む腎細胞癌、結腸がん、回腸のがんを含む小腸がん、特に小腸腺癌及び回腸の腺癌、精巣胎児性癌、胎盤絨毛癌、子宮頸がん、精巣がん、特に精巣セミノーマ、精巣奇形腫及び胚性精巣がん、子宮がん、奇形癌又は胎児性癌等の胚細胞腫瘍、特に精巣の胚細胞腫瘍、及びそれらの転移性形態からなる群から選択される。

20

【0066】

一実施形態では、前記クローディンはクローディン18.2であり、前記がんは、胃がん、食道がん、脾臓がん、非小細胞肺がん(NSCLC)等の肺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肝臓がん、頭頸部がん、胆嚢がん及びそれらの転移、クルーケンベルグ腫瘍、腹膜転移及び/又はリンパ節転移からなる群から選択される。

30

【0067】

また本発明は、本明細書に記載の処置方法に使用するための、本明細書に記載の結合因子、核酸又は宿主細胞を提供する。一実施形態では、本発明は、本明細書に記載の処置方法に使用するための、本明細書に記載の医薬組成物を提供する。

【0068】

本発明によれば、クローディン18.2は、好ましくは、配列番号1によるアミノ酸配列を有し、クローディン6は、好ましくは、配列番号2又は3によるアミノ酸配列を有する。

40

【0069】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかである。

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1A】図1A及び図1Bは、TAA CLDN6を標的とするDNA構築物及びbstbタンパク質を示すモジュラースキームを示す図である。(A)DNAレベルでのbstb鎖の設計、(B)bstb分子の概略モデル。CH1は、bstb_369/367のIgG1及びbstb_371/367のIgG2に由来する。Cは定常領域;CMVはサイトメガロウイルスプロモーター;Fdは可消化断片/Fabの重鎖部分(抗原結合断片);Hは重鎖;Hisは6xHisタグ;Lは軽鎖;L1はSGPG₃RS(G₄S)₂リンカー;L

50

2はDVPG₂Sリンカー;L3は(G₄S)4リンカー;S-Sはジスルフィド架橋;scFvは一本鎖可変断片;Secは分泌シグナル;StrpはStrepタグ;Vは可変ドメインを示す。

【図1B】図1A参照。

【図2A】図2A～図22Dは、細胞培養上清からのタグ付き及びタグ無しbstbタンパク質の精製を示す図である。Expi293F(商標)細胞を各bstb構築物で一過性トランスフェクトした。上清を、トランスフェクションの7日後に採集し、精製を行った。(A)Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィー(固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー-IMAC)を介したタグ付きbstbの第1の精製工程を示すクロマトグラム。y軸上のmAU(ミリ吸光度単位)を、x軸上の体積(ml)に対してプロットしている。左は、bstb_369/367のIMACピークであり、右は、bstb_371/367のIMACピークである。それぞれの右のピークはHMW種を含み、それぞれの中央のピークは単量体種を含む。それぞれの左のピークは不純物を示す。1)は、主に単量体種を含有する主ピークとしてプールされた画分を特定し、2)は、HMW種としてプールされた画分を特定する。(B)タグ付きbstbの第2の精製工程を示すクロマトグラム。IMAC主ピークのプールを、Strep-Tactin(登録商標)アフィニティークロマトグラフィーに供した。左側のプロットはbstb_369/367のピークであり、右側のプロットはbstb_371/367のピークである。(C)サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によるbstb_369/367のHMW種及び単量体種の分離。プールされたHMW及びプールされた単量体画分を角括弧で特定している。(D)精製後のタグ無しbstb_5726/5725のSE-HPLC分析。y軸上のmAU(ミリ吸光度単位)を、x軸上の時間(分)に対してプロットしている。bstbは、二重特異性TriMAB;HMWは高分子量種;LMWは低分子量種を示す。

10

20

30

【図2B】図2A参照。

【図2C】図2A参照。

【図2D】図2A参照。

【図3A】図3A及び図3Bは、CLDN6 × CD3タンパク質bstb_369/367のSDS-PAGE分析を示す図である。bstb_369/367を一過性発現するExpi293F(商標)細胞の上清を、IMACを介して精製した。HMW種は、主ピークとは別個に溶出された。主ピーク種を、次いで、Strep-Tactin(登録商標)アフィニティークロマトグラフィーに供した。溶出されたプールを、SECによって更に分離して、高度(hightly)単量体bstbを採集した。細胞培養上清、参照、及び異なる精製工程のアリコートを、非還元(左)及び還元(右)条件下で4～15%Tris-グリシンのstain-freeゲルにロードした。(A)バンドをstain-freeゲル上で蛍光によって可視化した。(B)抗Hisタグ検出抗体(上段プロット)又はStrepMAB検出抗体を使用するウエスタンプロット分析。左側の矢印は、非還元単量体及びHMWを指し、右側の矢印は還元bstb鎖を指す。Fdは可消化断片/Fabの重鎖部分(抗原結合断片);HMWは高分子量種;Hisは6xHisタグ;IMACは固定化金属アフィニティークロマトグラフィー;Lは軽鎖;scFvは一本鎖可変断片;SECはサイズ排除クロマトグラフィーを示し;StrpはStrepタグを示す。

【図3B】図3A参照。

【図4A】図4A～図4Dは、CLDN6 × CD3タンパク質bstb_369/367及びbstb_371/367によって媒介される特異的溶解を決定するためのin vitro細胞傷害性アッセイを示す図である。ヒトPBMCをエフェクター細胞とし、ヒト安定ルシフェラーゼ形質導入癌細胞を標的細胞として、ルシフェラーゼに基づく細胞傷害性アッセイにおいてエフェクター:標的を5:1の比で使用して特異的濃度依存性溶解を決定した.CLDN6+細胞株PA-1(卵巣奇形癌)及び/又はOV-90(卵巣がん)を陽性標的として用い、CDLN6-細胞株MDA-MB-231(乳がん)を陰性標的として用いた。三連の平均値を、標準偏差を含めて示す。最大半量溶解値(E₅₀)を、対応するグラフの下に示す。(A)48時間インキュベーションした後のCLDN6+卵巣癌細胞OV-90のbstb_369/367及びbstb_371/367によって媒介される特異的溶解(標準勾配)。(B)bstb_369/367及びCDLN6 × CD3特異的二重(scFv)₂参照タンパク質によって媒介される特異的溶解(標準勾配)の比較。細胞株及びインキュベーション時間を单一のグラフで示す。(C)bstb_369/367の特異的溶解(可変勾配)及びbstb_369/367の活性に対する5%HMWの影響。左:PA-1との16時間インキュベーション;右:OV-90との48時間インキュベーション。実線は、単量体bstb_369/367の溶解曲線を示し、点線は、5%HMW

40

50

種でスパイクした単量体bstb_369/367の溶解曲線を示す。(D)インキュベーションの48時間後のOV-90の特異的溶解(標準勾配)。左のプロット:単量体としてのbstb_369/367及びタグ無しアナログbstb_5726/5725によって媒介され、5%HMWでスパイクされた溶解。右のプロット:参照としてのbstb_369/367及び単量体としてのCH1(IgG2)保有バリエントbstb_5727/5725によって媒介され、5%HMWでスパイクされた溶解。bstbは二重特異性TriMABを示し;二重(scFv)₂は二重特異性一本鎖可変断片を示し;EC50は最大半量有効濃度を示し;HMWは高分子量種を示す。

【図4 B】図4A参照。

【図4 C】図4A参照。

【図4 D】図4A参照。

10

【図5 A】図5A及び図5Bは、CLDN6×CD3タンパク質bstb_369/367及びbstb_371/367によって媒介される標的依存性T細胞調節を示す図である。CLDN6+ OV-90及びPA-1、並びにCLDN6- MDA-MB-231がん細胞株を標的細胞として使用した。ヒトPBMCをエフェクター細胞として、E:T比5:1で用いた。抗CD3 IgG2a OKT3を、活性化対照として100ng/mlの濃度で適用した。Mock試料をDPBSとインキュベートして、バックグラウンドシグナルを、分析された試料の値から差し引いた。標的細胞無しのPBMCを、更なる特異性対照として使用した。全ての試料を24ウェルフォーマットで二連でセットアップした。bstbタンパク質bstb_369/367又はbstb_371/367の漸増濃度(0.005~5000ng/ml)を適用した。(A)T細胞活性化:PBMCを48時間の同時インキュベーション後に採集し、抗CD5-PE-Cy7、抗CD25-PE、抗CD69-APC及びeFluor506で標識して、T生細胞の活性化をフローサイトメトリーによって分析した。(B)T細胞増殖:ヒトPBMCを、アッセイのセットアップの前にCFSE染色した。PBMCを、72時間の同時インキュベーション後に採集し、抗CD5-APC及びeFluor506で標識して非リンパ球細胞及び死細胞を排除した。T細胞増殖を示すCFSEシグナルの減少をフローサイトメトリーによって分析した。bstbは二重特異性TriMAB;ctrlは対照を示す。

20

【図5 B】図5A参照。

【図6 A】図6A及び図6Bは、腫瘍特異的抗原CLDN6への様々なCLDN6×CD3二重特異性抗体の結合を示す図である。(A)二重(scFv)₂参照、bstb_369/367及びbstb_5726/5725の相対結合親和性を、内因性CLDN6発現PA-1ヒト癌細胞でのフローサイトメトリーによって、9.77ng/ml~10 μg/mlの濃度範囲で調べた。一次抗体を、タンパク質L-FITC(4 μg/ml)で検出した。データは平均±標準偏差(n=2反復)として示す。(B)単量体bstb_5726/5725の結合に対する高分子量(HMW)種の影響を、単量体bstb_5726/5725又は単量体bstb_5726/5725を約3%又は5%のHMW種でスパイクして(濃度範囲9.77ng/ml~10 μg/ml)、フローサイトメトリーで分析した。一次抗体をタンパク質L-FITC(4 μg/ml)で検出した。データは平均±標準偏差(n=2反復)として示す。bstbは二重特異性TriMAB;MFIは蛍光強度の中央値を示す。

30

【図6 B】図6A参照。

【図7 A】図7A~図7Cは、マウス異種移植腫瘍モデルにおけるCLDN6×CD3タンパク質bstb_369/367のin vivo有効性を示す図である。雄及び雌の免疫不全NSGマウスを使用した。(A)注射スケジュールスキーム。マウスに、標的細胞としてのCLDN6+ヒト卵巣癌細胞OV-90を皮下接種し、エフェクター細胞としてのヒトPBMCを腹腔内(i.p.)生着させた。処置は、1群あたり約35mm³の平均腫瘍体積で開始し、1週あたり3回のi.p.適用を行った。群1(G1)はビヒクリ緩衝液DPBSを受け、群2(G2)は31 μg/kgの低用量bstb_369/367を受け、群3(G3)は308 μg/kgの高用量を受けた。(B)経時的な全てのマウス及び群の腫瘍成長。処置は、枠で強調した期間中にi.p.適用した。上図はビヒクリ群G1であり;左下図はbstb_369/367低用量群G2であり、右下図はbstb_369/367高用量群G3である。各線は、個々のマウスを表す。(C)処置の開始日から安楽死の日までの全ての群のカプラン-マイヤー生存プロット。下の表は、群ごとの生存日数中央値と、log-rank(Mantel-Cox)検定によってG1と比較したG2及びG3の生存の有意性を示す。bstbは二重特異性TriMAB;dは日数;Gは群;GVHDは移植片対宿主病;i.p.は腹腔内;PBMCは末梢血単核細胞;s.c.は皮下

40

50

を示す。

【図 7 B】図7A参照。

【図 7 C】図7A参照。

【図 8】CLDN6 × CD3タンパク質bstb_369/367のin vivo薬物動態の推定。5 mg/kgのbstb_369/367を、雌の免疫不全NSGマウスに0日目でi.p.注射した。DPBS注射(「0時間」)を注射前対照として用いた。血漿を、注射後0.25時間、1時間、2時間、3時間、6時間及び8時間で採取した。bstb_369/367血漿濃度をELISAによって検出した。濃度は、y軸に対数目盛でプロットしている。各点は、3匹のマウスの平均値及び標準偏差を表す。i.p.は腹腔内を示す。

【図 9 A】マウス異種移植腫瘍モデルにおけるCLDN6 × CD3-bstbタンパク質bstb_5726/5725を用いたin vivo用量の知見を示す図である。雄及び雌の免疫不全NSGマウスに、標的細胞としてCLDN6+ヒト卵巣癌細胞OV-90を皮下接種し、エフェクター細胞としてヒトPBMCを腹腔内(i.p.)生着させた。処置は、1群あたり約150 mm³の平均腫瘍体積で開始し、1週あたり3回のi.p.適用を行った。(A)注射スケジュールスキーム。(B)腫瘍成長プロット。群(n=6)の用量は、単独のプロットで示される通りである。対照群G7(n=8)はDPBSを受けた。プロットは、全てのマウス及び群の腫瘍成長を経時的に示す。処置期間は、枠によって強調されている。各線は、個々のマウス(マウスID=BIO-####)を表す。bstbは二重特異性TriMAB;DPBSはダルベッコリン酸緩衝食塩水;i.p.は腹腔内適用;PBMCは末梢血単核細胞;s.c.は皮下を示す。

【図 9 B】図9A参照。

【図 10 A】図10A及び図10Bは、TAA CLDN18.2を標的とするDNA構築物及びbstbタンパク質を示すモジュラースキームを示す図である。(A)DNAレベルでのbstb鎖の設計。抗CLDN18.2-scFvは、V_H-V_Lの順序(上のスキーム)又はV_L-V_Hの順序(下のスキーム)のいずれかの配向である。ジスルフィド架橋(S-S)有り又は無し(「+/-」)の構築物を設計した。(B)scFv部分にタグはあるがジスルフィド架橋(S-S)が無い場合(上図)とタグは無いがS-Sがある場合(下図)のV_H-V_L又はV_L-V_Hの順序の抗CLDN18.2 scFvを有する例示的bstb分子の理論モデル。C_H1は、IgG1又はIgG2に由来する。Cは定常領域;CMVはサイトメガロウイルスプロモーター;Fdは可消化断片/Fabの重鎖部分(抗原結合断片);Hは重鎖;Hisは6xHisタグ;Lは軽鎖;L1はSGPG₃RS(G4S)₂リンカー;L2はDVPG₂Sリンカー;L3は(G4S)₄リンカー;L4は(G4S)₅リンカー;S-Sはジスルフィド架橋;scFvは一本鎖可変断片;Secは分泌シグナル;StrepはStrepタグ;Vは可変ドメインを示す。

【図 10 B】図10A参照。

【図 11】CLDN18.2 × CD3-bstbタンパク質によって媒介される特異的溶解を比較するためのin vitro細胞傷害性アッセイを示す図である。エフェクター細胞としてヒトPBMC、標的細胞としてヒト安定ルシフェラーゼ形質導入癌細胞を、ルシフェラーゼに基づく細胞傷害性アッセイにおいて、エフェクター:標的比5:1で使用した。IMAC及びStrep-Tactin(登録商標)精製bstb試験アイテムを、SECを介して、単量体種を更に濃縮することなく使用した。左のグラフ:48時間のインキュベーション後のbstb_5730/5728、bstb_5731/5729、bstb_5732/5728及びbstb_5733/5729によって媒介されたCLDN18.2+胃癌細胞NUGC-4_hCLDN18.2の特異的及び濃度依存性溶解。右のグラフ:CLDN18.2-対照細胞株MDA-MB-231の溶解。三連の平均値を標準偏差を含めて示す。bstbは二重特異性TriMABを示す。

【図 12 A】図12A及び図12Bは、精製後の様々なCLDN18.2 × CD3-bstbタンパク質のSEC-HPLC分析を示す図である。Expi293F(商標)細胞を、bstb_5745/5747、bstb_5749/5751、bstb_5746/5748又はbstb_5750/5752構築物で一過性トランスフェクトした。上清を、トランスフェクション7日後に採取し、精製を行った。(A)bstb_5745/5747(上のプロット)及び精製後(下のプロット)のbstb_5749/5751(下のプロット)のSEC-HPLC分析。y軸上のmAU(ミリ吸光度単位)を、x軸上の時間(分)に対してプロットしている。単量体含量は、抗CLDN18.2 scFv部分内に残余のジスルフィド結合を含むbstb_5749/5751で大きく増加する。(B)bstb_5746/5748(上のプロット)及び精製後(下のプロット)

10

20

30

40

50

のbstb_5750/5752(下のプロット)のSE-HPLC分析。y軸上のmAU(ミリ吸光度単位)を、x軸上の時間(分)に対してプロットしている。単量体含量は、抗CLDN18.2 scFv部分内に残余のジスルフィド結合を含むbstb_5749/5751で大きく増加する。bstbは二重特異性TriMAB;HMWは高分子量種;LMWは低分子量種を示す。

【図12B】図12A参照。

【図13A】図13A及び図13Bは、高度単量体ジスルフィド架橋含有CLDN18.2 × CD3-bstb及び二重(scFv)₂タンパク質によって媒介される特異的溶解を比較するためのin vitro細胞傷害性アッセイを示す図である。エフェクター細胞としてヒトPBMC、標的細胞としてヒト安定ルシフェラーゼ形質導入CLDN18.2+胃癌細胞NUGC-4_hCLDN18.2を、ルシフェラーゼに基づく細胞傷害性アッセイにおいて、エフェクター:標的比5:1で使用した。SECによって分離された単量体bstb試験アイテム及びそれらの二重(scFv)₂タンパク質アナログを、10点5倍連続希釈で使用した。(A)48時間のインキュベーション後のbstb_5749/5751及びbstb_5750/5752(左のグラフ)並びに二重scFv_5506及び二重scFv_5538(右のグラフ)によって媒介される濃度依存性特異的溶解。EC50値を下の表にまとめている。「プレート参照」のEC50値を正規化に用いた。(B)「プレート参照」に対する正規化後の関連二重(scFv)₂アナログと比較した二価bstbの倍数差。関連二重(scFv)₂EC50値を計算のために1に設定した。Bi-scFvは二重特異性一本鎖可変断片;bstbは二重特異性TriMAB;EC50は最大半量有効濃度を示す。

【図13B】図13A参照。

【図14】CLDN6 × CD3bstbをコードするためのRNA構築物を示すモジュラースキームを示す図である。RNAレベルでのbstb Fd鎖(上図)及びL鎖(下図)の設計。Cは定常領域;CMVはサイトメガロウイルスプロモーター;Fdは可消化断片/Fabの重鎖部分(抗原結合断片);Hは重鎖;Hisは6xHisタグ;Lは軽鎖;L1はSGPG₃RS(G₄S)₂リンカー;L2はDVPG₂Sリンカー;L3は(G₄S)₄リンカー;S-Sはジスルフィド架橋;scFvは一本鎖可変断片;Secは分泌シグナル;StrpはStrepタグ;Vは可変ドメインを示す。

【図15A】図15A～図15Cは、プロデューサー細胞におけるIVT-mRNAでコードされたCLDN6 × CD3 bstb_435/434及びbstb_436/434のウエスタンプロット分析を示す図である。ヒト慢性骨髄性白血病細胞株K-562を、Fd-及びL-鎖の等量のIVT-mRNA又はH₂Oのみ(Mock)を用いたエレクトロポレーションを介して一過性トランスフェクトした。エレクトロポレーションの48時間後にK-562上清を採取し、細胞溶解物を生成した。参考として、精製されたタンパク質アナログbstb_369/367(A)又はbstb_371/367(B)を、単量体及びHMW調製物としてゲル上にロードした。グラジェントSDS-PAGE及びウエスタンプロット分析を、翻訳及び精製されたタンパク質産物の検出のために行った。bstbバリアント((A)bstb_435/434、(B)bstb_436/434)の両方が、K-562上清及び細胞溶解物中で、抗6xHisタグHRP(Fd部分)及び抗Strep-MAB-HRP(L部分)によって検出された。抗-アクチン免疫プロッティングを、細胞溶解物のローディング対照として用いた。試料を、添付の試料ロード表に示されるように、非還元及び還元条件下でロードした。矢先は、目的のタンパク質バンドを示す。(A)bstb_435/434、(B)bstb_436/434。(C)において、両方のbstbバリアントが、還元条件下、抗6xHisタグHRP及び抗Strep-MAB-HRPとの混合物を用いて検出され、抗体誘導体のヘテロ二量体状態が可視化された。bstbは二重特異性TriMAB;Fdは可消化断片/Fabの重鎖部分(抗原結合断片);Hisは6xHisタグ;HMWは高分子量種;HRPは西洋ワサビペルオキシダーゼ;Lはbstbの軽鎖部分;scFvは一本鎖可変断片;SNは上清を示す。

【図15B】図15A参照。

【図15C】図15A参照。

【図16】CLDN6 × CD3 bstb_435/434及びbstb_436/434によって媒介される特異的溶解を決定するためのin vitro細胞傷害性アッセイを示す図である。ヒトPBMCをエフェクター細胞とし、ヒト安定ルシフェラーゼ形質導入癌細胞を標的細胞として、ルシフェラーゼに基づく細胞傷害性アッセイにおいてエフェクター:標的比5:1で使用した。K-562SN含有RNAコードbstb_435/434又はbstb_436/434に、7点5倍連続希釈を適用した。

10

20

30

40

50

時間インキュベーションした後のCLDN6⁺卵巣癌細胞OV-90のbstb_435/434及びbstb_436/434によって媒介された濃度依存性特異的溶解を示す。CLDN6⁻乳癌細胞MDA-MB-231を陰性対照として用いた。三連の平均値を、標準偏差を含めて示す。bstbは二重特異性TriMABを、EC50は最大半量有効濃度を示す。

【図17A】図17A～図17Cは、マウス異種移植腫瘍モデルにおけるCLDN6 × CD3 RNA及びタンパク質bstb及び二重(scFv)₂のin vivo有効性の比較を示す図である。雄(黒色の記号)及び雌(白色の記号)免疫不全NSGマウスを使用した。(A)注射スケジュールスケジューム。マウスに、標的細胞としてのCLDN6⁺ヒト卵巣癌細胞OV-90を皮下接種(s.c.)し、エフェクター細胞としてのヒトPBMCを腹腔内(i.p.)生着させた。処置は、1群あたり約250 mm³の平均腫瘍体積で開始し、1週あたり1回静脈内(i.v.)適用した。群1(G1)はRNA対照複合体(TransIT中のルシフェラーゼ RNA)、G2はbstb RNA複合体、G3は二重(scFv)₂RNA複合体を受けた。各注射は、合計で3 μgのRNAを含んだ。G4～6をタンパク質対照/参照群として用いた。G4はビヒクリ緩衝液(タンパク質製剤緩衝液)、G5は100 μg/kgのbstb参照、G6は200 μg/kgの二重(scFv)₂参照を受けた。(B)全てのマウス及び群の経時的な腫瘍成長。処置は、矢印で示されているようにi.v.適用した。群ごとの処置は、グラフの標題に示されている。各線は個々のマウスを表す。(C)対照RNA(G1)、bstb RNA(G2)又は二重(scFv)₂RNA(G3)で処置したマウスの異種移植腫瘍組織に浸潤したヒトT細胞のフローサイトメトリー分析。各記号は個々のマウスを表し、線は群ごとの平均値を表す。記号は(B)に従う。二重scFvは二重特異性一本鎖断片;bstbは二重特異性TriMAB;dは日数;Gは群;GVHDは移植片対宿主病;i.p.は腹腔内;i.v.は静脈内;PBMCは末梢血単核細胞;s.c.は皮下を示す。

【図17B】図17A参照。

【図17C】図17A参照。

【図18A】図18A及び図18Bは、IMGT命名法に従ったV_H及びV_Lアミノ酸配列を示す図である。本明細書に記載のbstb分子で使用したV_H及びV_Lドメインの標準一文字コードでのアミノ酸配列を示す。A)抗CLDN18.2及び抗CLDN6のV_H及びV_L配列、B)抗CD3のV_H及びV_L配列。CDRは相補性決定領域;FRはフレームワーク領域;IMGTは国際免疫遺伝学情報システム(international ImMunoGeneTics information system);V_Hは可変重鎖;V_Lは可変軽鎖を示す。

【図18B】図18A参照。

【発明を実施するための形態】

【0071】

本発明を以下で詳細に説明するが、本明細書に記載の特定の方法論、プロトコル及び試薬は変動しうることから、本発明はそれらに限定されないことが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを記述するために使用されるものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。

【0072】

以下に、本発明の要素を説明する。これらの要素は特定の実施形態で列挙されているが、任意の様式で及び任意の数で組み合わされて追加的実施形態を生じうると理解されるべきである。様々に記載された実施例及び好ましい実施形態は、本発明を、明示的に記載された実施形態のみに限定するものと解釈されるべきではない。本明細書の記載は、明示的に記載された実施形態と任意の数の記載された及び/又は好ましい要素とを組み合わせた実施形態を支持及び網羅するものと理解されるべきである。更に、この出願に記載の全ての要素の任意の順序及び組合せが、文脈が他に言及していない限り、本出願の記載によって開示されていると解釈されるべきである。

【0073】

好ましくは、本明細書で使用される用語は、「A multilingual glossary of biotechnol

10

20

30

40

50

ogical terms:(IUPAC Recommendations)」、H.G.W. Leuenberger、B. Nagel、and H. Kolbl、Eds.、Helvetica Chimica Acta、CH-4010 Basel、Switzerland,(1995)に記載のように定義される。

【0074】

本発明の実施は、他に言及されていない限り、化学、生化学、細胞生物学、免疫学の従来の方法、並びに当技術分野の文献(例えば、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、第2版、J. Sambrookら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor 1989を参照)で説明されている組換えDNA技術を利用する。

【0075】

本明細書及びそれに続く特許請求の範囲を通じて、文脈が他のことを要求しない限り、「
10
含む(comprise)」という用語並びにその変形、例えば「含む(comprises)」及び「含むこと(comprising)」は、示されたメンバー、整数若しくは工程又はメンバー、整数若しくは工程の群を含むが、任意の他のメンバー、整数若しくは工程又はメンバー、整数若しくは工程の群を排除しないことを示す。但し、一部の実施形態では、そのような他のメンバー、整数若しくは工程又はメンバー、整数若しくは工程の群は、排除されうる、つまり、対象事項は、示されたメンバー、整数若しくは工程又はメンバー、整数若しくは工程の群の包含から構成されると理解される。「1つの(a)」、「1つの(an)」、及び「その(the)」
20
という用語並びに本発明を記載する文脈(特に特許請求の範囲の文脈)で使用される同様の参照は、本明細書で他に言及されない限り又は内容に明確に矛盾が生じない限り、単数形及び複数形のいずれも包含すると解釈される。本明細書の数値範囲の引用は、範囲内に入るそれぞれ別個の値の個々の引用を簡略化した方法として示すことを意図するにすぎない。本明細書で他に言及されていない限り、個々の値はそれぞれ、あたかもそれらの値が個別に本明細書で復唱されているかのように、本明細書に組み入れられる。本明細書に記載の全ての方法は、本明細書で他に言及されていない限り又は内容によって明確に矛盾が生じない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で示される任意の及び全ての例、又は例示的な言語(例えば「等(such as)」)の使用は、本発明をより良く例証することを意図するものにすぎず、特許請求の範囲に記載のない限定を本発明の範囲に課すものではない。本明細書中のいかなる言語も、本発明の実施に不可欠な主張されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。

【0076】

いくつかの刊行物が、本明細書の文中で引用されている。本明細書で引用されている各文献(全ての特許、特許出願、科学的出版物、製造業者の仕様書、説明書等)は、前掲であれ後掲であれ、参照によってその全体を本明細書に組み入れる。本明細書のいかなるものも、先行発明によるそのような開示によって本発明が日時が前であるという権利がないとの承認として、解釈されるべきではない。

【0077】

クローディンは、タイトジャンクションの最も重要な構成要素であるタンパク質ファミリーであり、タイトジャンクションにおいて、クローディンは、上皮の細胞間の間隙中の分子の流れを制御する傍細胞バリアを確立している。クローディンは、膜を4回貫通し、そのN末端及びC末端の両方が細胞質に位置している膜貫通タンパク質である。EC1又はECL
40
1と称される第1の細胞外ループは、平均して53個のアミノ酸で構成され、EC2又はECL2と称される第2の細胞外ループは、約24個のアミノ酸で構成される。CLDN6及びCLDN18.2等のクローディンファミリーの細胞表面タンパク質は、様々な起源の腫瘍に発現し、その選択的発現(傷害性に関連する正常組織での発現はない)及び血漿膜への局在化により、抗体媒介がん免疫療法と結び付けた標的構造として特に適している。

【0078】

本発明の文脈において、好ましいクローディンは、CLDN6及びCLDN18.2である。CLDN
6及びCLDN18.2は、腫瘍組織において差次的に発現することが同定されており、CLDN18.2が発現する唯一の正常組織は胃であり、CLDN6が発現する唯一の正常組織は胎盤である。

10

20

30

40

50

【0079】

CLDN18.2は、胃粘膜の分化した上皮細胞における正常組織に選択的に発現される。CLDN18.2は、肺臓癌、食道癌、胃癌、気管支癌、乳癌、及びENT腫瘍等の様々な起源のがんにおいて発現される。CLDN18.2は、胃がん、食道がん、肺臓がん、非小細胞肺がん(NSCLC)等の肺がん、卵巣がん、結腸がん、肝臓がん、頭頸部がん、及び胆嚢のがん等の原発性腫瘍、並びにそれらの転移、特にクルーケンベルク腫瘍等の胃がんの転移、腹膜転移及びリンパ節転移の予防及び/又は処置のための価値のある標的である。

【0080】

CLDN6は、例えば、卵巣がん、肺がん、胃がん、乳がん、肝臓がん、肺臓がん、皮膚がん、メラノーマ、頭頸部がん、肉腫、胆管がん、腎細胞がん、及び膀胱がんで発現することが見出されている。CLDN6は、卵巣がん、特に卵巣腺癌及び卵巣奇形癌、小細胞肺がん(SCLC)及び非小細胞肺がん(NSCLC)、特に肺扁平上皮癌及び腺癌を含む肺がん、胃がん、乳がん、肝臓がん、肺臓がん、皮膚がん、特に基底細胞癌及び扁平上皮癌、悪性黒色腫、頭頸部がん、特に悪性多形腺腫、肉腫、特に滑膜肉腫及び癌肉腫、胆管がん、膀胱のがん、特に移行上皮癌及び乳頭癌、腎臓がん、特に明細胞腎細胞癌及び乳頭状腎細胞癌を含む腎細胞癌、結腸がん、回腸のがんを含む小腸がん、特に小腸腺癌及び回腸の腺癌、精巣胎児性癌、胎盤絨毛癌、子宮頸がん、精巣がん、特に精巣セミノーマ、精巣奇形腫及び胚性精巣がん、子宮がん、奇形癌又は胎児性癌等の胚細胞腫瘍、特に精巣の胚細胞腫瘍、及びそれらの転移性形態の予防及び/又は処置のための特に好ましい標的である。一実施形態では、CLDN6発現に関連するがん疾患は、卵巣がん、肺がん、転移性卵巣がん及び転移性肺がんからなる群から選択される。好ましくは、卵巣がんは、癌腫又は腺癌である。好ましくは、肺がんは、癌腫又は腺癌であり、好ましくは細気管支癌腫又は気管支腺癌等の細気管支がんである。

10

【0081】

「クローディン」又は「CLDN」という用語には、CLDN18.2及びCLDN6が含まれる。好ましくは、クローディンは、ヒトクローディンである。

【0082】

「クローディン18」又は「CLDN18」という用語には、任意のバリエント、例えば、クローディン18スプライスバリエント1(クローディン18.1(CLDN18.1))及びクローディン18スプライスバリエント2(クローディン18.2(CLDN18.2))が含まれる。

20

【0083】

「クローディン18.2」又は「CLDN18.2」という用語は、好ましくは、ヒトCLDN18.2に關し、特に、配列表の配列番号1のアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列のバリエントを含む、好ましくはそれからなるタンパク質に関する。CLDN18.2の第1の細胞外ループは、好ましくは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸27～81、より好ましくはアミノ酸29～78を含む。CLDN18.2の第2の細胞外ループは、好ましくは、配列番号1に示すアミノ酸配列のアミノ酸140～180又は144～167を含む。前記第1及び第2の細胞外ループは、好ましくは、CLDN18.2の細胞外部分を形成する。

【0084】

「クローディン6」又は「CLDN6」という用語は、好ましくは、ヒトCLDN6に關し、特に、配列表の配列番号2又は配列番号3のアミノ酸配列又は前記アミノ酸配列のバリエントを含む、好ましくはそれからなるタンパク質に関する。CLDN6の第1の細胞外ループは、好ましくは配列番号2に示されるアミノ酸配列又は配列番号3に示されるアミノ酸配列のアミノ酸28～80又は29～81、より好ましくはアミノ酸28～76を含む。CLDN6の第2の細胞外ループは、好ましくは配列番号2に示されるアミノ酸配列又は配列番号3に示されるアミノ酸配列のアミノ酸138～160、好ましくはアミノ酸141から159、より好ましくはアミノ酸145～157を含む。前記第1及び第2の細胞外ループは、好ましくはCLDN6の細胞外部分を形成する。

40

【0085】

本発明による「バリエント」という用語は、特に、変異体、スプライスバリエント、立体

50

構造、アイソフォーム、対立遺伝子バリアント、種バリアント及び種ホモログ、特に天然に存在するこれらのバリアントを関する。対立遺伝子バリアントは、遺伝子の正常配列の変化に関係し、その重要性は不明であることが多い。完全な遺伝子配列決定は、多くの場合、所与の遺伝子について多数の対立遺伝子バリアントを識別する。種ホモログは、所与の核酸又はアミノ酸配列と種の起源の異なる核酸又はアミノ酸配列である。「バリアント」という用語には、あらゆる翻訳後修飾バリアント及び立体構造バリアントが含まれる。

【0086】

本明細書に記載の結合因子の第2の標的分子は、T細胞特異的抗原である。T細胞特異的抗原は、T細胞の表面の抗原である。そのようなT細胞特異的抗原の好ましい実施形態は、CD3(cluster of differentiation 3)複合体である。

10

【0087】

CD3複合体は、多分子T細胞受容体(TCR)複合体の一部として、成熟ヒトT細胞、胸腺細胞及びナチュラルキラー細胞のサブセット上で発現される抗原を意味する。T細胞共受容体は、タンパク質複合体であり、4つの別個の鎖で構成されている。哺乳類において、複合体は、CD3鎖、CD3鎖、及び2つのCD3鎖を含有する。これらの鎖は、T細胞受容体(TCR)として知られる分子及び鎖と会合してTリンパ球に活性化シグナルを生じる。TCR、鎖及びCD3分子は一緒にTCR複合体を構成する。

【0088】

ヒトCD3イプシロンは、GenBank受託番号NM_000733に示され、配列番号4を含む。ヒトCD3ガンマは、GenBank受託番号NM_000073に示される。ヒトCD3デルタは、GenBank受託番号NM_000732に示される。CD3は、TCRのシグナル伝達を担う。Lin and Weiss、Journal of Cell Science 114、243-244頁(2001)に記載されているように、MHC提示特異的抗原エピトープの結合によるTCR複合体の活性化は、Srcファミリーキナーゼによる免疫受容活性化チロシンモチーフ(ITAM)のリン酸化をもたらし、Ca²⁺放出を含むT細胞の活性化に至る更なるキナーゼの動員を誘発する。例えば、固定化抗CD3抗体による、T細胞上のCD3のクラスタリングは、T細胞受容体の結合に似たT細胞活性化を導くが、そのクローンに典型的な特異性からは独立している。

20

【0089】

本明細書で使用されるとき、「CD3」にはヒトCD3が含まれ、CD3は、多分子T細胞受容体複合体の一部としてヒトT細胞上に発現される抗原を意味する。

30

【0090】

CD3に関して、本発明の結合因子は、好ましくは、CD3のイプシロン鎖を認識し、特に、CD3イプシロンの最初の27個のN末端アミノ酸又はこの27個のアミノ酸ストレッチの機能的断片に対応するエピトープを認識する。

【0091】

本発明によれば、「クローディン陽性がん」という用語又は同様の用語は、クローディンを発現するがん細胞を含むがん、好ましくは前記がん細胞の表面にクローディンを発現するがん細胞を含むがんを意味する。

【0092】

「細胞表面」は、当技術分野の通常の意味に従って使用され、したがって、タンパク質及び他の分子による結合にアクセス可能である細胞の外部を含む。

40

【0093】

クローディンは、細胞の表面に位置する場合、前記細胞の表面に発現し、細胞に加えられたクローディン特異的抗体による結合に利用できる。

【0094】

本発明の文脈における「細胞外部分」という用語は、細胞の細胞外空間に面するタンパク質等の分子の部分を指し、好ましくは、例えば、細胞の外部に位置する抗体等の抗原結合分子によって前記細胞の外部から近づき易い。好ましくは、該用語は、1つ又は複数の細胞外ループ若しくはドメイン又はそれらの断片を指す。

【0095】

50

「部分」又は「断片」という用語は、本明細書において互換的に使用され、連続的な要素を指す。例えば、アミノ酸配列又はタンパク質等の構造体の部分は、前記構造体の連続的要素を指す。構造体の一部、部分又は断片は、好ましくは、前記構造体の1つ又は複数の機能的特性を含む。例えば、エピトープの一部、部分又は断片は、好ましくは、それが由来するエピトープ又はペプチドと免疫学的に等価である。タンパク質配列の部分又は断片は、そのタンパク質配列の好ましくは少なくとも4個、特に少なくとも6個、少なくとも8個、少なくとも12個、少なくとも15個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも50個、又は少なくとも100個の連続アミノ酸の配列を含む。

【0096】

本発明によれば、CLDN18.2は、発現のレベルが、胃細胞又は胃の組織における発現と比較して低い場合には、実質的に細胞内で発現していない。好ましくは、発現のレベルは、胃細胞又は胃の組織における発現の10%未満、好ましくは5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%若しくは0.05%未満である又はより低い。好ましくは、CLDN18.2は、発現のレベルが、胃以外の非癌性組織の発現レベルを2倍以下、好ましくは1.5倍以下でしか超えない場合、好ましくは、前記非癌性組織における発現のレベルを超えない場合に、前記細胞において実質的に発現していない。好ましくは、CLDN18.2は、発現のレベルが検出限界未満である場合及び/又は発現のレベルが低すぎて細胞に添加されたCLDN18.2特異的抗体によって結合できない場合、実質的に発現していない。

10

【0097】

本発明によれば、CLDN18.2は、発現のレベルが、胃以外の非癌性組織における発現のレベルを、好ましくは2倍を上回る、好ましくは10倍、100倍、1000倍、又は10000倍を上回る場合に、細胞において発現している。好ましくは、CLDN18.2は、発現のレベルが検出限界を上回る及び/又は発現のレベルが、細胞に添加されたCLDN18.2特異的抗体の結合が可能であるように十分高い場合に、細胞において発現している。好ましくは、細胞で発現されるCLDN18.2は、前記細胞の表面に発現又は露出している。

20

【0098】

本発明によれば、CLDN6は、発現のレベルが、胎盤細胞又は胎盤組織における発現と比較して低い場合に、実質的に発現していない。好ましくは、発現のレベルは、胎盤細胞又は胎盤組織における発現の10%未満、好ましくは5%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%又は0.05%未満である又はより低い。好ましくは、CLDN6は、発現のレベルが、胎盤以外の非癌性組織の発現レベルを2倍以下、好ましくは1.5倍以下でしか超えない場合、好ましくは、前記非癌性組織における発現のレベルを超えない場合に、前記細胞において実質的に発現していない。好ましくは、CLDN6は、発現のレベルが検出限界未満である場合及び/又は発現のレベルが低すぎて細胞に添加されたCLDN6特異的抗体によって結合できない場合、実質的に発現していない。

30

【0099】

本発明によれば、CLDN6は、発現のレベルが、胎盤以外の非癌性組織における発現のレベルを、好ましくは2倍を上回る、好ましくは10倍、100倍、1000倍、又は10000倍を上回る場合に、細胞において発現している。好ましくは、CLDN6は、発現のレベルが検出限界を上回る及び/又は発現のレベルが、細胞に添加されたCLDN6特異的抗体の結合が可能であるように十分高い場合に、細胞において発現している。好ましくは、細胞で発現されるCLDN6は、前記細胞の表面に発現又は露出している。

40

【0100】

本発明によれば、「疾患」という用語は、がんを含む任意の病理学的状態、特に本明細書に記載のがんの病理学的形態を指す。がん又はがんの特定の形態に関する本明細書におけるあらゆる参照は、そのがんの転移も含む。好ましい実施形態では、本出願に従って処置される疾患は、クローディン(CLDN)、例えばCLDN18.2及び/又はCLDN6を発現する細胞を含む。

【0101】

「クローディンが発現する細胞に関連する疾患」又は同様の表現は、本発明によれば、罹

50

患組織又は器官の細胞にクローディンが発現していることを意味する。一実施形態では、罹患組織又は器官の細胞におけるクローディンの発現は、健常な組織又は器官の状態と比較して増加している。増加は、少なくとも10%、特に少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも1000%、少なくとも10000%又はより多い増加を指す。一実施形態では、発現は、罹患組織でのみ見出され、一方で健常組織での発現は抑制されている。本発明によれば、クローディンを発現する細胞に関連する疾患には、がん疾患が含まれる。更に、本発明によれば、がん疾患は、好ましくは、がん細胞がクローディンを発現しているがん疾患である。

【0102】

本明細書で使用されるとき、「がん疾患」又は「がん」は、異常調節された細胞の成長、増殖、分化、接着及び/又は遊走によって特徴付けられる疾患を含む。「がん細胞」とは、急速な、制御されていない細胞増殖によって成長し、新たな成長を開始した刺激が停止した後も成長を続ける、異常な細胞を意味する。好ましくは、「がん疾患」は、クローディンを発現する細胞によって特徴付けられ、がん細胞はクローディンを発現する。クローディンを発現する細胞は、好ましくは、がん細胞、好ましくは、本明細書に記載のがんの細胞である。

10

【0103】

本発明による「がん」という用語は、白血病、セミノーマ、黒色腫、奇形腫、リンパ腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、直腸がん、子宮内膜がん、腎臓がん、副腎がん、甲状腺がん、血液がん、皮膚がん、脳のがん、子宮頸がん、腸がん、肝臓がん、大腸がん、胃がん、小腸がん、頭頸部がん、消化器がん、リンパ節がん、食道がん、結腸直腸がん、脾臓がん、耳、鼻及び喉(ENT)のがん、乳がん、前立腺がん、子宮がん、卵巣がん及び肺癌、並びにそれらの転移を含む。その例としては、肺癌、乳房癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌、子宮頸癌、又は前述のがんの種類又は腫瘍の転移である。本発明によるがんという用語は、がんの転移も含む。

20

【0104】

本発明によれば、「癌」は、上皮細胞に由来する悪性腫瘍である。この群は、乳がん、前立腺がん、肺がん及び結腸がんの一般的な形態を含む、最も一般的ながんを表す。

【0105】

「腺癌」は、腺組織に由来するがんである。またこの組織は、上皮組織として知られるより大きな組織カテゴリーの一部である。上皮組織には、皮膚、腺、並びに身体の腔及び器官を裏打ちする様々な他の組織が含まれる。上皮は、発生学的に、外胚葉、内胚葉及び中胚葉に由来する。腺癌として分類されるために、細胞は、分泌特性を有する限り、必ずしも腺の一部である必要はない。癌のこの形態は、ヒトを含む一部の高等哺乳類で発生しうる。高分化腺癌は、それらが由来する細胞腺組織に類似している傾向にあるが、あまり分化していない腺癌はそうでない場合がある。生検からの細胞を染色することにより、病理医は腫瘍が腺癌であるか又は癌の他のタイプであるかどうかを決定する。腺癌は、体内的腺のユビキタス性のために、身体の多くの組織で発生することができる。各腺は同じ物質を分泌しない場合があるが、細胞への外分泌機能がある限り、腺と考えられ、したがってその悪性形態は、腺癌と称される。悪性腺癌は、他の組織に侵入し、多くの場合、十分な時間を与えられて転移する。卵巣腺癌は、卵巣癌の最も一般的なタイプである。これには、漿液及び粘液腺癌、明細胞腺癌及び子宮内膜腺癌が含まれる。

30

【0106】

「転移」とは、がん細胞が、その元の部分から別の部分へ拡散することを意味する。転移の形成は非常に複雑なプロセスであり、原発腫瘍からの悪性細胞の分離、細胞外マトリックスの侵襲、体腔及び脈管に入るための内皮基底膜の貫入、次いで、血液により輸送された後、標的器官の浸潤によってなる。最終的に、標的部位での新たな腫瘍の成長は血管新生に依存する。腫瘍転移は、原発腫瘍を除去した後でも生ずることがよくあるが、その理由は、腫瘍細胞又は部分が残り、転移能を発展させる可能性があるためである。一実施形態では、本発明による「転移」という用語は、原発腫瘍及び所属リンパ節系から離れた転

40

50

移に関する「遠隔転移」に関する。一実施形態では、本発明による「転移」という用語は、リンパ節転移に関する。本発明の治療法を使用して処置可能である転移の一つの特定の形態は、胃がんを原発部位として発生した転移である。好ましい実施形態では、このような胃がんの転移は、クルーケンベルク腫瘍、腹膜転移及び/又はリンパ節転移である。

【0107】

クルーケンベルク腫瘍は、全ての卵巣腫瘍の1%~2%を占める珍しい転移性腫瘍である。クルーケンベルク腫瘍の予後は依然として非常に悪く、クルーケンベルク腫瘍に対する治療法は確立されていない。クルーケンベルク腫瘍は、卵巣の転移性の印環細胞腺癌である。胃は、ほとんどのクルーケンベルク腫瘍例における原発部位である(70%)。結腸、虫垂及び乳房の癌(主に浸潤性小葉癌)は、二番目によく見られる原発部位である。胆嚢、胆道、脾臓、小腸、ファーテー膨大部、子宮頸部及び膀胱/尿膜管の癌から発生したクルーケンベルク腫瘍の稀な例が報告されている。

10

【0108】

「処置」とは、対象における腫瘍の大きさ若しくは腫瘍の数を減少させることを含む疾患の予防若しくは除去のため、対象における疾患を停止若しくは遅延させるため、対象における新たな疾患の発生を阻害若しくは遅延させるため、疾患を現在有する若しくは以前に有していた対象における症状の頻度若しくは重症度及び/若しくは再発を減少させるため、並びに/又は対象の寿命を延長、つまり寿命を増加させるために、化合物又は組成物又は化合物若しくは組成物の組合せを対象に投与することを意味する。

20

【0109】

特に「疾患の処置」という用語は、本明細書で使用するとき、治すこと、期間を短くすること、緩和すること、予防すること、進行若しくは悪化を遅延若しくは阻害すること、又は、疾患若しくはその症状の発生を予防若しくは遅らせることを含む。

【0110】

本発明の文脈において、「保護する」、「予防する」、「防御する」、「予防的」又は「保護的」等の用語は、対象における疾患の発生及び/又は増殖の予防又は処置又は両方に関し、特に対象が疾患を発生する機会を縮小すること又は疾患の発生を遅らせることに関する。例えば、がんのリスクがある人は、がんを予防する治療のための候補となる。

【0111】

「リスクがある」とは、対象が、一般集団と比較して、疾患、特にがんを発生する見込みが通常より高いとして同定されることを意味する。更に、疾患、特にがんに罹っていた又は現在罹っている対象は、そのような対象が疾患を継続して発症しうるので、疾患を発生するリスクの高い対象である。がんを現在有する又は有していた対象も、がんの転移について増加したリスクを有する。

30

【0112】

「患者」という用語は、本発明によれば、処置の対象、特に、疾患のある対象、例えば、ヒト、非ヒト霊長類又は別の動物、特に哺乳類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、又はマウス及びラット等の齧歯類を含む、疾患のある対象を意味する。特に好ましい実施形態では、患者はヒトである。

40

【0113】

「標的細胞」は、がん細胞等の任意の望ましくない細胞を意味するものとする。好ましい実施形態では、標的細胞は、クローディンを発現する。

【0114】

「抗原」という用語は、薬剤が向かう及び/又は向かう予定であるエピトープを含むタンパク質又はペプチド等の、好ましくは免疫応答を誘導する、分子に関する。好ましい実施形態では、抗原は、腫瘍関連抗原、例えばCLDN18.2又はCLDN6、つまり、細胞質、細胞表面及び細胞核に由来しうるがん細胞の構成成分であり、特にがん細胞の細胞内で又は表面抗原として、好ましくは大量に産生されるそれらの抗原である。

【0115】

本発明の文脈において、「腫瘍関連抗原」という用語は、好ましくは、限定された数の組

50

織及び/若しくは器官で、又は特定の発達段階で、通常の条件下、特異的に発現しており、1つ又は複数の腫瘍又はがん組織で発現している又は異常発現しているタンパク質に関する。本発明の文脈において、腫瘍関連抗原は、好ましくは、がん細胞の細胞表面と結合しており、好ましくは正常組織において発現していない又は稀にしか発現していない。

【0116】

「エピトープ」という用語は、分子の抗原決定基、例えば、免疫系によって認識される、例えば、抗体によって認識される、分子の一部を指す。例えば、エピトープは、免疫系によって認識される、抗原上の離散した三次元部位である。エピトープは通常、アミノ酸又は糖側鎖等の化学的に活性な分子表面基からなり、特定の三次元構造の特徴と特定の荷電特性を有する。立体構造エピトープと非立体構造エピトープとは、変性溶媒の存在下で、立体構造エピトープへの結合は消失するが非立体構造エピトープへの結合は消失しないという点で区別される。タンパク質のエピトープは、好ましくは前記タンパク質の連続又は不連続部分を含み、好ましくは5~100、好ましくは5~50、より好ましくは8~30、最も好ましくは10~25アミノ酸長であり、例えば、エピトープは、好ましくは8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24又は25アミノ酸長である。

10

【0117】

「結合因子」という用語は、本明細書で使用されるとき、望ましい抗原に結合可能な任意の因子を指す。本発明のある特定の実施形態において、結合因子は、抗体、抗体断片、又はその構築物を指す。結合因子は、合成の修飾された非天然部分、特に非ペプチド部分を含んでもよい。そのような部分は、例えば、所望の抗原結合機能又は領域、例えば抗体又は抗体断片と結合しうる。一実施形態では、結合因子は、抗原結合CDR又は可変領域を含む合成構築物である。

20

【0118】

「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリンスーパーファミリーのタンパク質、好ましくは抗体又はB細胞受容体(BCR)等の抗原受容体に関する。免疫グロブリンは、特徴的な免疫グロブリン(Ig)折り畳みを有する構造ドメイン、つまり免疫グロブリンドメインによって特徴付けられる。この用語は、膜結合免疫グロブリン並びに可溶性免疫グロブリンを包含する。可溶性免疫グロブリンは、一般的に抗体と称される。免疫グロブリンは、一般的に、いくつかの鎖、典型的には、2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖を含み、これらはジスルフィド結合を介して連結されている。これらの鎖は、主に免疫グロブリンドメイン、例えば、 V_L (軽鎖可変)ドメイン、 C_L (軽鎖定常)ドメイン、及び C_H (重鎖定常)ドメイン C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} 及び C_{H4} で構成されている。哺乳類の免疫グロブリン重鎖には5つのタイプ、つまり γ 、 α 、 δ 、 ϵ 及び μ があり、これらは抗体の異なるクラス、つまりIgA、IgD、IgE、IgG及びIgMを占める。可溶性免疫グロブリンの重鎖とは対照的に、膜又は表面免疫グロブリンの重鎖はそのカルボキシ末端に膜貫通ドメイン及び短い細胞質ドメインを含む。哺乳類には、2種類の軽鎖、つまり、ラムダ及びカッパがある。免疫グロブリン鎖は、可変領域及び定常領域を含む。定常領域は、免疫グロブリンの様々なアイソタイプ内で本質的に保存されており、ここで可変部分は高度に多様であって、抗原認識を説明するものである。

30

【0119】

「抗体」という用語は、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む免疫グロブリン又はその抗原結合部分を指す。「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、組換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体及びキメラ抗体を含む。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書でVHと略される)及び重鎖定常領域で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書でVLと略される)及び軽鎖定常領域で構成される。「領域」という用語及び「ドメイン」という用語は、本明細書において互換的に使用される。VH及びVL領域は、相補性決定領域(CDR)と称される超可変領域に更に再分割することができ、CDR領域は、フレームワーク領域(FR)と称される、より保存的な領域に散在されている。各VH及びVLは3つのCDR及び4つのFRから構成され、次の順序でアミノ末端からカルボ

40

50

キシ末端へと配置されている:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系(例えば、エフェクター細胞)の種々の細胞及び古典的補体系の第1成分(C1q)を含む宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【0120】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、單一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体は、單一の結合特異性及び親和性を示す。一実施形態では、モノクローナル抗体は、不死化細胞に融合された非ヒト動物、例えばマウスから得られたB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【0121】

「組換え抗体」という用語は、本明細書で使用されるとき、組換え手段によって、調製、発現、作製又は単離された全ての抗体、例えば(a)免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニック又はトランス染色体である動物(例えば、マウス)又はそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体、(b)抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えばトランスフェクトーマから単離された抗体、(c)組換えのコンビナトリアル抗体ライブラリから単離された抗体、並びに(d)免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製又は単離された抗体を含む。

【0122】

「ヒト抗体」という用語は、本明細書で使用されるとき、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変及び定常領域を有する抗体を含むことが意図されている。ヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基(例えば、*in vitro*のランダム若しくは部位特異的変異、又は*in vivo*の体性変異によって導入される変異)を含んでもよい。

【0123】

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト種由来の免疫グロブリンから実質的に誘導される抗原結合部位を有する分子であって、分子の残りの免疫グロブリン構造がヒト免疫グロブリンの構造及び/又は配列に基づく分子を指す。抗原結合部位は、定常ドメインに融合された完全な可変ドメインを含んでもよく、又は可変ドメインの適切なフレームワーク領域にグラフトされた相補性決定領域(CDR)のみを含んでもよい。抗原結合部位は、野生型であってもよく、1つ又は複数のアミノ酸置換によって修飾されていてもよく、例えばヒト免疫グロブリンにより近似するように修飾されていてもよい。ヒト化抗体の一部の形態は、全てのCDR配列を保存している(例えば、マウス抗体由来の6つのCDRの全てを含有しているヒト化マウス抗体)。他の形態は、元の抗体に対して変化した1つ又は複数のCDRを有する。

【0124】

「キメラ抗体」という用語は、重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列のそれぞれの一部分が特定の種に由来する又は特定のクラスに属する抗体の対応する配列に相同であり、一方で鎖の残りのセグメントが別の種の対応する配列に相同である抗体を指す。典型的には、軽鎖及び重鎖の両方の可変領域は、哺乳類の一種に由来する抗体の可変領域を模倣しており、一方で定常部分は、別の種に由来する抗体の配列に相同である。そのようなキメラ形態に対する一つの明らかな利点は、可変領域が、容易に入手可能なB細胞、又は例えばヒト細胞調製物由来の定常領域と組み合わせた非ヒト宿主生物のハイブリドーマを使用して、現在公知の供給源から好都合に誘導できることである。可変領域が調製の容易さという利点を有し、特異性が供給源によって影響を受けない一方、定常領域はヒトであり、非ヒト供給源由来の定常領域の場合と比べて、抗体を注射するときにヒト対象から免疫応答を誘発する可能性が少ない。但し、定義は、この特定の例に限定するものではない。

【0125】

抗体は、様々な種、例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット及びヒトを含むが、これらに限定されない種に由来してもよい。

【0126】

10

20

30

40

50

本明細書に記載される抗体は、IgA、例えば、IgA1又はIgA2、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgE、IgM及びIgD抗体を含む。様々な実施形態では、抗体は、IgG1抗体、より特にはIgG1、カッパ又はIgG1、ラムダアイソタイプ(つまり、IgG1、IgG2a抗体(例えば、IgG2a、IgG2b抗体(例えば、IgG2b、IgG3抗体(例えば、IgG3、IgG4又はIgG4抗体(例えば、IgG4)である。

【 0 1 2 7 】

本明細書で使用されるとき、「異種抗体」は、そのような抗体を产生するトランスジェニック生物に関する定義される。この用語は、トランスジェニック生物を構成していない生物で見出されるアミノ酸配列又はそれに対応するコード核酸配列を有し、一般にトランスジェニック生物以外の種に由来する、抗体を指す。

【 0 1 2 8 】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロハイブリッド抗体」は、異なる生物起源の軽鎖及び重鎖を有する抗体を指す。例えば、マウス軽鎖と会合しているヒト重鎖を有する抗体は、ヘテロハイブリッド抗体である。

【 0 1 2 9 】

本明細書に記載される抗体等の結合因子は、好ましくは単離されている。本明細書で使用される「単離された」とは、異なる抗原特異性を有する他の薬剤を実質的に含まない結合因子を指すことを意図する(例えば、CLDN18.2に特異的に結合する単離された抗体は、CLDN18.2以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、ヒトCLDN18.2のエピトープ、アイソフォーム、又はバリアントに特異的に結合する単離された結合因子は、他の関連抗原、例えば、他の種(例えば、CLDN18.2種ホモログ)由来の抗原に交差反応性を有しうる。更に、単離された結合因子は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まない結合因子でありうる。

【 0 1 3 0 】

抗体の「抗原結合部分」(又は単に「結合部分」)又は抗体の「抗原結合断片」(又は単に「結合断片」)又は同様の用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ又は複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によっても行われうることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語内に包含される結合断片の例としては、(i)Fab断片、VL、VH、CL及びCHドメインからなる一価断片、(ii)F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結されている2つのFab断片を含む二価断片、(iii)VH及びCHドメインからなるFd断片、(iv)抗体の单一アームのVL及びVHドメインからなるFv断片、(v)VHドメインからなるdAb断片(Wardら、(1989)Nature 341:544-546頁)、(vi)単離された相補性決定領域(CDR)、及び(vii)場合により合成リンカーによって連結されている2つ以上の単離されたCDRの組合せが含まれる。更に、Fv断片の2つのドメインVL及びVHは、別の遺伝子によってコードされているが、組換え方法を使用して、それらをVL及びVH領域のペアが一価分子を形成する一本のタンパク質鎖として形成可能な合成リンカーによって、連結することができる(一本鎖Fv(scFv)として知られる;例えば、Birdら、(1988)Science 242:423-426頁及びHustonら、(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883頁)を参照)。またそのような一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合断片」という用語に包含されることが意図されている。更なる例は、(i)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合された結合ドメインポリペプチド、(ii)ヒンジ領域に融合された免疫グロブリン重鎖CH2定常領域、及び(iii)CH2定常領域に融合された免疫グロブリン重鎖CH3定常領域を含む結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である。結合ドメインポリペプチドは、重鎖可変領域又は軽鎖可変領域でありうる。結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、米国特許出願公開第2003/0118592号及び米国特許出願公開第2003/0133939号に更に開示されている。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を使用して取得され、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。

[0 1 3 1]

一本鎖可変断片(scFv)は、通常10から約30アミノ酸の短いリンカーペプチドで連結された免疫グロブリンの重鎖の可変領域(VH)及び軽鎖の可変領域(VL)の融合タンパク質である

。リンカーは、通常、フレキシビリティのためのグリシン、並びに、溶解性のためのセリン又はトレオニンに富み、VHのN末端をVLのC末端に連結するか又はその逆で連結することができる。2価(又は二価)の一本鎖可変断片(ジ-scFv、二重scFv)は、2つのscFvを連結することにより工学的に作製することができる。これは、タンデムscFvを生じる2つのVH及び2つのVL領域を有する单一のペプチド鎖を製造することによって行うことができる。また本発明は、3つ以上のscFv結合ドメインを含む多重特異性分子を含む。一般的なフレキシブル連結ペプチドの1つは、(Gly₄Ser)_x(ここでxは、3、4、5又は6でありうる)である。場合により、VH及びVLの会合は、1つ又は複数の分子間ジスルフィド結合によって安定化させることができる。

【0132】

10

本明細書で使用されるとき、「結合ドメイン」又は「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原に結合し且つ抗体の抗原結合部分を含んでいる部位、例えば、抗体の部位を指す。結合ドメインは、そのそれぞれが4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と3つのCDRを含む重鎖及び軽鎖可変ドメイン(VH及びVL)で構成されてもよい。CDRは、配列が変化し、特定の抗原に対する特異性を決定する。VH及びVLドメインは一緒に、特定の抗原に特異的に結合する部位を形成することができる。

【0133】

Fab(断片抗原結合)抗体断片は、重鎖可変領域(VH)及び重鎖定常領域1(CH1)部分からなるポリペプチドと、軽鎖可変領域(VL)及び軽鎖定常領域からなるポリペプチドとで構成された抗体の一価抗原結合ドメインを含む免疫反応性ポリペプチドである(ここで、CL及びCH1部分は、好ましくはCys残基間のジスルフィド結合によって、一緒に結合されている)。好ましくは、本明細書に記載のFab断片において、CH1領域及びCL領域は、ヒト起源である。一実施形態では、CL領域は、カッパ型CL領域である。一実施形態では、CH1領域は、IgG1又はIgG2由来である。

20

【0134】

本発明の目的のために本明細書で記載される全ての抗体及び抗体断片等の抗体の誘導体は、「抗体」という用語に包含される。「抗体誘導体」という用語は、抗体の任意の修飾された形態、例えば、抗体と、別の薬剤又は抗体又は抗体断片とのコンジュゲートを指す。更に、本明細書に記載される抗体及び抗体の誘導体は、抗体断片等の本発明の結合因子を製造するために使用される。

30

【0135】

天然に存在する抗体は、一般に单一特異性であり、つまり、单一の抗原に結合する。本発明は、T細胞等の細胞傷害性細胞に(例えば、CD3受容体に係合することによって)結合する及びがん細胞等の標的細胞に(クローディンに係合することによって)結合する結合因子を提供する。本発明の結合因子は、少なくとも2つの異なる種類の抗原に結合し、少なくとも二重特異性、又は三重特異性、四重特異性等の多重特異性である。

【0136】

本発明の結合因子は、少なくとも三価でありうる。本明細書で使用されるとき、「価の(valent)」、「価(valence)」、「複数の価(valencies)」又は他の文法的変形は、結合因子の抗原結合部位又は結合ドメインの数を意味する。同じ抗原に結合する抗原結合部位は、同じエピトープ又は異なるエピトープを認識しうる。三価の二重特異性抗体及び四価の二重特異性抗体は、当技術分野で公知である。本発明の結合因子は、4より高い価数を有してもよい。

40

【0137】

本明細書に記載の結合因子は、好ましくは、少なくとも2つの異なる抗体の断片で構成されうる(少なくとも2つの異なる抗体の前記断片が少なくとも2つの異なる結合ドメインを形成している)人工タンパク質(タンパク質複合体を含む)であり、その結果、少なくとも2つの異なる種類の抗原に結合する。本発明による結合因子は、免疫エフェクター細胞等の免疫細胞、特に、細胞傷害性細胞等のT細胞に(例えば、CD3への結合によって)結合し、同時に、破壊されるがん細胞のような標的細胞に(腫瘍関連抗原クローディンへの結合によつ

50

て)結合するように工学的に作製されている。

【 0 1 3 8 】

数種の三価抗体が開発され、全ての種類が本発明の範囲内である。トリプルボディ又は一本鎖三重抗体(single-chain triple antibodies、sctb)は、リンカー配列によって連結された3つの異なるscFv領域で構成されている。更に、重鎖(CH1ドメイン)及び軽鎖(CLドメイン)の天然in vivoへテロ二量体化も、複数のscFvが追加されうる骨格を形成するために使用することができる。例えば、1つの抗原に特異的なscFvは、別の抗原に特異的なscFvにも連結されているCH1ドメインに連結することができ、この鎖は、CLドメインに連結されたいずれかの抗原に特異的なscFvを含む別の鎖と相互作用することができる(scFv3-CH1/CL)。三価構築物の別の例は、別のエピトープに特異的な、各鎖上の2つのscFvにC末端連結された1つのエピトープに特異的なFab断片(Fab-scFv2)の使用を含む。三価(又は四価)分子の別の例は、抗体のN-又はC-末端に結合した更なる結合実体を含有する様々なフォーマットを含む。例えば、1つのフォーマットは、分子(IgG-scFab)のC末端に連結された一本鎖Fab(scFab)を有する1つの抗原に特異的な無傷の抗体分子からなる。ドック・アンド・ロック(dock-and-lock、DNL)法もまた、三価抗体(DNL-F(ab)3)を生成するために使用してきた(Chang、C.-H.ら、In: Bispecific Antibodies. Kontermann R E(編)、Springer Heidelberg Dordrecht London New York、199-216頁(2011))。前記抗体のそれぞれが本発明の範囲内である。

10

【 0 1 3 9 】

四価抗体も構築されており、全ての種類が本発明の範囲内である。四価の抗体の例には、限定されないが、scFv2-Fc、F(ab')2-scFv2、scFv2-H/L及びscFv-dhIx-scFv分子が含まれる。二重特異性scFv2-Fc構築物は、Fc鎖のN末端に連結した1つの分子に特異的な2つのscFvを有するFcドメインと、Fc鎖のC末端に連結した別の分子に特異的な別の2つのscFvとを有する。二重特異性F(ab')2-scFv2構築物としては、F(ab')2断片のC末端に連結されたscFv断片が挙げられる。scFv2-H/L構築物は、重鎖に連結された1つの分子に特異的なscFvを有し、一方で別の分子に特異的なscFvは、軽鎖に連結されている。最後に、scFv-dhIx-scFv構築物は、1種の螺旋状二量体化ドメインに連結されたscFvを含み、続いて別の種類のscFvを含む。この種類の2つの鎖は、二量体化して四価抗体を生成させることができる。

20

【 0 1 4 0 】

本発明の結合因子は、抗体分子のフォーマット、又は抗体様分子のフォーマット、又は抗体様の特性を有するタンパク質骨格のフォーマット、又は少なくとも二つの結合特異性を有する環状ペプチドのフォーマットであってもよい。したがって、結合因子は、本明細書に記載の1つ又は複数の抗体又はその断片を含みうる。

30

【 0 1 4 1 】

一実施形態では、本発明の結合因子は、ヘテロ二量体化することができるFab断片の重鎖(Fd断片)及び軽鎖(L)を含み、更に追加の結合機能又はドメインを含むことができる。そのような追加の結合ドメインは、2つの抗体可変領域、例えばscFv結合ドメイン、つまりVH-VL又はVL-VHを含む結合ドメイン、及び1つの抗体可変領域、例えばVH結合ドメイン及びVHH結合ドメインを含む結合ドメインからなる群から独立して選択されてもよい。

40

【 0 1 4 2 】

一実施形態では、本発明の結合因子は、Fab-scFv2構築物のフォーマット、つまり、2つのscFv断片を、好ましくはFab断片の定常領域のC末端に備えたFab断片のフォーマットである。一実施形態では、本発明の結合因子は、好ましくはジスルフィド架橋によって一緒に結合された2つのポリペプチド鎖で構成された二量体であり、ここで第1のポリペプチドは、CLポリペプチド鎖を通じて更なるVLドメインに連結されたscFvを含み、第2のポリペプチドは、CH1ポリペプチド鎖を通じて更なるVHドメインに連結されたscFvを含む。ジスルフィド架橋は、好ましくは、抗原結合構成において第1のポリペプチドの更なるVLと第2のポリペプチドの更なるVHとが会合し、結合因子全体として3つの抗原結合ドメインを含むように、CLにおけるCys残基とCH1におけるCys残基との間に形成される。したが

50

つて、一実施形態では、本発明の結合因子は、ヘテロ二量体化することができるFab断片の重鎖(Fd断片)及び軽鎖(L)を含み、更にscFv結合ドメインが(好ましくはFd/LのC末端で)組み込まれている。本発明によれば、scFv部分のVH及びVLドメインは、好ましくはペプチドリンカーによって連結され、及び/又はFab鎖及びscFvは、好ましくはペプチドリンカーによって連結される。本発明によれば、scFv部分のVH及びVLドメインは、好ましくはアミノ酸配列(G4S)_x(ここでxは、3、4、5又は6である)を含むペプチドリンカーによって連結される。Fab鎖及びscFvは、好ましくはアミノ酸配列DVPG₂S又はSGPG₃RS(G4S)₂を含むペプチドリンカーによって連結される。一実施形態では、アミノ酸配列SGPG₃RS(G4S)₂を含むリンカーは、scFv結合ドメインをFd断片に連結し、アミノ酸配列DVPG₂Sを含むリンカーは、scFv結合ドメインをL断片に連結する。一実施形態では、scFv部分は、クローディンに結合し、Fab部分は、T細胞特異的抗原に結合する。

【0143】

一実施形態では、本発明の結合因子は、第1及び第2のポリペプチドを含み、ここで第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドは、N末端からC末端へと、以下のドメイン: VH-CH1-scFv及びVL-CL-scFvを含み、ここで、VH及びVLは、結合ドメインを形成するように会合している。

【0144】

一実施形態では、本発明の結合因子は、第1及び第2のポリペプチドを含み、ここで第1のポリペプチド及び第2のポリペプチドにおいて、VHドメイン、VLドメイン、CH1ドメイン及びCLドメインは、N末端からC末端へと、

- VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN);又は
- VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN);又は
- VH(T)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(T)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN);又は
- VH(T)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(T)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN);又は
- VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T)及びVL(CLDN)-CL-VH(CLDN)-VL(CLDN);又は
- VH(CLDN)-CH1-VL(T)-VH(T)及びVL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN);又は
- VH(CLDN)-CH1-VH(T)-VL(T)及びVL(CLDN)-CL-VL(CLDN)-VH(CLDN);又は
- VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T);又は
- VH(CLDN)-CH1-VL(CLDN)-VH(CLDN)及びVL(CLDN)-CL-VH(T)-VL(T);又は
- VH(CLDN)-CH1-VH(CLDN)-VL(CLDN)及びVL(CLDN)-CL-VL(T)-VH(T)

の順序で配置されている。

【0145】

「リンカー」という用語は、2つの異なる機能単位(例えば、抗原結合部分)を連結するため役立つ任意の手段を指す。リンカーの種類には、限定されないが、化学リンカー及びポリペプチドリンカーが含まれる。ポリペプチドリンカーの配列は、限定されない。ポリペプチドリンカーは、好ましくは非免疫原性及びフレキシブルであり、例えば、セリン及びグリシン配列を含むリンカーである。特定の構築物に依存して、リンカーは長くても短くてもよい。

【0146】

本発明によれば、VH及びVLドメインを連結してVH-VL又はVL-VH scFvドメインを形成するリンカーは、好ましくは、フレキシブルペプチドリンカー、例えばグリシン-セリンペプチドリンカーを含む。一実施形態では、リンカーは、アミノ酸配列(G4S)_x(ここでxは、3、4、5又は6である)を含む。VH-VLの配向でVH及びVLドメインを含むscFvドメインの場合には、リンカーは、好ましくは、アミノ酸配列(G4S)₄を含む。VL-VHの配向でVH及びVLドメインを含むscFvドメインの場合には、リンカーは、好ましくは、アミノ酸配列(G4S)₅を含む。

【0147】

本発明によれば、scFvドメイン及びFdドメインを連結するリンカーは、好ましくはCH1の

10

20

30

40

50

C末端に、好ましくはアミノ酸配列DVPG₂S又はSGPG₃RS(G₄S)₂、好ましくはSGPG₃RS(G₄S)₂を含む。本発明によれば、scFvドメイン及びLドメインを連結するリンカーは、好ましくはCLのC末端に、好ましくはアミノ酸配列DVPG₂S又はSGPG₃RS(G₄S)₂、好ましくはDVPG₂Sを含む。

【0148】

また本発明による結合因子は、分子の分泌を容易にするためのアミノ酸配列、例えばN末端分泌シグナル及び/又は分子の結合、精製若しくは検出を容易にする1つ若しくは複数のエピトープタグを含む。

【0149】

好ましくは、分泌シグナルは、分泌経路及び/又は細胞外環境への結合因子若しくはそのポリペプチド鎖の分泌を通じた十分な通過を可能にするシグナル配列(例えば、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS)である。好ましくは、分泌シグナル配列は、切断可能であり、成熟した結合因子から除去される。分泌シグナル配列は、好ましくは、結合因子が作成される細胞又は生物に関して選択される。

10

【0150】

エピトープタグのアミノ酸配列は、結合因子のアミノ酸配列内の任意の位置に導入されてもよく、コードされたタンパク質構造内でループの形状をとってもよく、又は結合因子にN末端若しくはC末端融合されてもよい。好ましくは、エピトープタグは、結合因子にC末端融合されている。エピトープタグは、結合因子からのタグの除去を可能にする切断部位を含んでもよい。前記エピトープタグは、天然及び/又は変性条件下で機能的である任意の種類のエピトープタグであることができ、好ましくはヒスチジンタグ、最も好ましくは6つのヒスチジンを含むタグであることができる。

20

【0151】

本発明の結合因子は、前記第1、第2、及び第3の結合ドメインに加えて、例えば、腫瘍細胞に対する選択性を向上させるために役立つ1つ又は複数の更なる結合ドメインを含んでもよい。これは、例えば、腫瘍細胞に発現される他の抗原に結合する結合ドメインを提供することによって達成されうる。

【0152】

本発明の文脈において、生成される結合因子は、本明細書に記載される免疫エフェクター機能を誘発できることが好ましい。前記免疫エフェクター機能は、その表面に腫瘍関連抗原クローディンを保有する細胞に対して向かうことが好ましい。

30

【0153】

本発明の文脈において「免疫エフェクター機能」という用語は、例えば、腫瘍の播種及び転移の阻害を含む、腫瘍成長の阻害及び/又は腫瘍発生の阻害をもたらす、免疫系の成分によって媒介される任意の機能を含む。好ましくは、免疫エフェクター機能は、腫瘍細胞の死滅をもたらす。そのような機能には、補体依存性細胞傷害(CDC)、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞媒介食作用(ADCP)、腫瘍関連抗原を保有する細胞におけるアポトーシスの誘導、腫瘍関連抗原を保有する細胞の細胞溶解、及び/又は腫瘍関連抗原を保有する細胞の増殖の阻害が含まれる。また結合因子は、がん細胞の表面の腫瘍関連抗原に単に結合することによって効果を発揮することができる。例えば、抗体は、がん細胞の表面の腫瘍関連抗原に単に結合することによって、腫瘍関連抗原の機能をブロックし、又はアポトーシスを誘導することができる。

40

【0154】

本明細書に記載の結合因子は、細胞毒、薬物(例えば、免疫抑制剤)又は放射性同位体等の治療部分又は薬剤にコンジュゲートさせることができる。細胞毒性又は細胞傷害剤には、細胞にとって有害である、特に細胞を死滅させる任意の薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化工チジウム、エメチン、マイトイシン、エトボシド、テノボシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトロマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロ

50

カイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール及びピューロマイシン並びにそのアナログ又はホモログが含まれる。コンジュゲートを形成するための適切な治療剤としては、代謝拮抗剤(例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパ(thioepa)、クロラムブシリ、メルファラン、カルムスチン(BSNU)及びロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及びcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン(従前のダウノマイシン)及びドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(従前のアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC)、及び抗有糸分裂剤(例えば、ビンクリスチン及びビンプラスチン)が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施形態では、治療剤は、細胞傷害剤又は放射能毒性剤である。別の実施形態では、治療剤は、免疫抑制剤である。更に別の実施形態では、治療剤は、GM-CSFである。好ましい実施形態では、治療剤は、ドキソルビシン、シスプラチン、ブレオマイシン、硫酸塩、カルムスチン、クロラムブシリ、シクロホスファミド又はリシンAである。

【0155】

また結合因子は、細胞傷害性放射性医薬品を生成するために、放射性同位元素、例えば、ヨウ素-131、イットリウム-90、又はインジウム-111にコンジュゲートしてもよい。

【0156】

抗体にそのような治療部分をコンジュゲートするための技術は周知であり、例えば、Arnonら、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeldら(編)、243～56頁(Alan R. Liss、Inc.社、1985);Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、Controlled Drug Delivery(第2版)、Robinsonら(編)、623～53頁(Marcel Dekker、Inc.社、1987);Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review」、Monoclonal Antibodies '84:Biological And Clinical Applications、Pincheraら(編)、475～506頁(1985);「Analysis、Results、And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwinら(編)、303～16頁(Academic Press社、1985)及びThorpeら、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev.、62:119-58頁(1982)を参照されたい。

【0157】

本発明による「結合」という用語は、好ましくは、特異的結合に関する。

【0158】

本発明によれば、抗体等の薬剤は、標準的なアッセイで所定の標的に有意な親和性を有し、前記所定の標識に結合する場合には、前記所定の標識に結合することができる。「親和性」又は「結合親和性」は、多くの場合、平衡解離定数(K_D)によって測定される。好ましくは、「有意な親和性」という用語は、 $10^{-5}M$ 以下、 $10^{-6}M$ 以下、 $10^{-7}M$ 以下、 $10^{-8}M$ 以下、 $10^{-9}M$ 以下、 $10^{-10}M$ 以下、 $10^{-11}M$ 以下、又は $10^{-12}M$ 以下の解離定数(K_D)で所定の標的に結合することを指す。

【0159】

薬剤は、標準アッセイにおいて標的に有意な親和性を有しない及び標的に有意に結合しない、特に検出可能に結合しない場合には、前記標的に(実質的に)結合することができない。好ましくは、薬剤が最大 $2\mu g/ml$ 、好ましくは $10\mu g/ml$ 、より好ましくは $20\mu g/ml$ 、特に $50\mu g/ml$ 若しくは $100\mu g/ml$ 以上の濃度で存在する場合、前記標的に検出可能に結合しない。好ましくは、薬剤は、該薬剤が結合できる所定の標識への結合に対する K_D よりも少なくとも10倍、100倍、10³倍、10⁴倍、10⁵倍、又は10⁶倍高い K_D で標的に結合する場合には、前記標的に有意な親和性を有しない。例えば、薬剤が結合することができる標的への薬剤の結合に対する K_D が $10^{-7}M$ である場合には、該薬剤が有意な親和性を有し

10

20

30

40

50

ない標的への結合に対する K_D は、少なくとも $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-2}M$ 又は $10^{-1}M$ である。

【 0 1 6 0 】

抗体等の薬剤が、標準的なアッセイで所定の標識に結合することができる一方で、他の標的に結合することができない場合、つまり他の標的に有意な親和性を有さず、他の標的に有意に結合しない場合には、薬剤は、前記所定の標識に特異的である。本発明によれば、薬剤は、クローディンに結合することができるが、他の標的に(実質的に)結合することができない場合には、クローディンに対して特異的である。好ましくは、薬剤は、そのような他の標的にに対する親和性及び結合が、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、ヒト血清アルブミン(HSA)、又はMHC分子若しくはトランスフェリン受容体等の非クローディン膜貫通タンパク質、又は任意の他の特定ポリペプチド等のクローディンに関連しないタンパク質に対する親和性又は結合を有意に超えない場合には、クローディンに対して特異的である。好ましくは、薬剤は、特異的でない標的への結合に対する K_D の少なくとも10分の1、100分の1、 10^{3} 分の1、 10^4 分の1、 10^5 分の1又は 10^6 分の1の K_D で前記標的に結合する場合には、所定の標的に対して特異的である。例えば、特異的である標的への薬剤の結合に対する K_D が $10^{-7}M$ である場合、特異的でない標的への結合に対する K_D は少なくとも $10^{-6}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $10^{-2}M$ 又は $10^{-1}M$ である。

10

【 0 1 6 1 】

標的にに対する薬剤の結合は、任意の適切な方法(例えば、Berzofskyら、「Antibody-Antigen Interactions」、In Fundamental Immunology、Paul、W. E.編、Raven Press New York、NY(1984)、Kuby、Janis Immunology、W. H. Freeman and Company New York、NY(1992)を参照)及び本明細書に記載の方法を使用して実験的に決定することができる。親和性は、従来技術を使用して、例えば、平衡透析によって、BIAコア2000機器を使用することによって、製造業者によって概説された一般的手順を使用して、放射性標識標的抗原を使用するラジオイムノアッセイによって、又は当業者に既知の別の方法によって、容易に決定することができる。親和性データは、例えば、Scatchardら、Ann N.Y. Acad. ScL、51:660頁(1949)に記載の方法によって分析することができる。特定の抗体-抗原相互作用の測定される親和性は、塩濃度、pH等の異なる条件下で測定される場合には、変動する可能性がある。したがって親和性及び他の抗原結合パラメータ、例えば、 K_D 、 IC_{50} 等の測定は、好ましくは、抗体及び抗原の標準化溶液、及び標準化緩衝液を用いて行なうことが好ましい。

20

【 0 1 6 2 】

「競合する」という用語は、標的抗原に結合する2つの抗体間の競争を指す。2つの抗体が標的抗原への結合を互いに妨げない場合、そのような抗体は非競合であり、抗体が、同じ部位、つまり標的抗原のエピトープに結合しないことを示す。標的抗原に結合する抗体の競合を試験するための方法は、当業者にとって周知である。そのような方法の一例は、例えば、ELISA又はフローサイトメトリーとして行なう、いわゆる交差競合アッセイである。例えば、ELISAベースのアッセイは、ELISAプレートウェルを各抗体で被覆し;競合抗体及び抗原/標的のHisタグ化細胞外ドメインを添加してインキュベートし;添加した抗体が、ビオチン化抗His抗体、続いてストレプトアビジン-ポリHRPを添加することによって行われる被覆された抗体へのHisタグ化タンパク質の結合を阻害するかどうかを検出し、更にABTSとの反応を展開し、405nmでの吸光度を測定することによって行なうことができる。例えば、フローサイトメトリーアッセイは、抗原/標的を発現する細胞を過剰の非標識抗体とインキュベートし、細胞を、最適濃度未満のビオチン標識抗体とインキュベートし、続いて蛍光標識されたストレプトアビジンとインキュベートし、フローサイトメトリーで分析することによって行なうことができる。

30

【 0 1 6 3 】

2つの抗体は、同じ抗原及び同じエピトープに結合する場合、同じ特異性を有する。試験される抗体が、特定の抗原結合抗体として同じエピトープを認識するか、つまり抗体が同じエピトープに結合するかどうかは、同じエピトープに対するそれらの競合に基づいて分

40

50

析することができる。抗体間の競合は、交差ブロッキングアッセイによって検出することができる。例えば、競合的ELISAアッセイは、交差ブロッキングアッセイとして使用することができる。例えば、標的抗原をマイクロタイタープレートのウェルに被覆してもよく、抗原結合抗体及び競合候補試験抗体を加えてよい。ウェル中の抗原に結合される抗原結合抗体の量は、同じエピトープへの結合について抗原結合抗体と競合する競合候補試験抗体の結合能力と、間接的に相関する。詳細には、同じエピトープについての競合候補試験抗体の親和性が大きいほど、抗原で被覆されたウェルに結合する抗原結合抗体の量は少ない。ウェルに結合される抗原結合抗体の量は、抗体を、検出可能な又は測定可能な標識物質で抗体を標識することによって測定することができる。

【0164】

10

別の抗体と抗原への結合について競合する抗体、例えば本明細書に記載の重鎖及び軽鎖可変領域を含む抗体、又は別の抗体の抗原に対して特異性を有する抗体、例えば本明細書に記載の重鎖及び軽鎖可変領域を含む抗体は、本明細書に記載の前記重鎖及び/又は軽鎖可変領域のバリエント、例えばCDRの修飾及び/又は本明細書に記載されるようある程度の同一性を含む抗体でありうる。

【0165】

本明細書で使用されるとき、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス(例えば、IgM又はIgG1)を指す。

【0166】

20

本明細書で使用されるとき、「アイソタイプスイッチング」は、抗体のクラス又はアイソタイプが、1つのIgクラスから他のIgクラスの1つに変化する現象を指す。

【0167】

本明細書で使用される「天然に存在する」という用語は、対象に対して適用されるとき、対象が天然で見出すことができるという事実を指す。例えば、天然の供給源から単離することができ、実験室で人によって意図的に改変されておらず、生物(ウイルスを含む)中に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

【0168】

本明細書で使用される「再構成」という用語は、Vセグメントが、本質的に完全なVH又はVLドメインをコードする立体構造においてそれぞれD-J又はJセグメントにすぐ隣接して配置されている、重鎖又は軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の構成を指す。再構成された免疫グロブリン(抗体)遺伝子座は、生殖系列DNAとの比較によって同定することができ、再構成された遺伝子座は、少なくとも1つの組換え7量体/9量体相同性エレメントを有する。

30

【0169】

Vセグメントに関連して本明細書で使用される「再構成されていない」又は「生殖系列構成」という用語は、VセグメントがD又はJセグメントにすぐに隣接するように再結合されていない構成を指す。

【0170】

一実施形態では、本発明の結合因子は、CLDN18.2に結合する能力、つまりCLDN18.2に存在するエピトープ、好ましくはCLDN18.2の細胞外ドメイン内のエピトープ、特に第1の細胞外ループ、好ましくはCLDN18.2のアミノ酸29～78内に位置するエピトープに結合する能力を有する。特定の実施形態では、CLDN18.2に結合する能力を有する薬剤は、CLDN18.1に存在しないCLDN18.2のエピトープに結合する。

40

【0171】

CLDN18.2に結合する能力を有する薬剤は、好ましくはCLDN18.2に結合するが、CLDN18.1には結合しない。好ましくは、CLDN18.2に結合する能力を有する薬剤は、CLDN18.2に特異的である。好ましくは、CLDN18.2に結合する能力を有する薬剤は、細胞表面に発現しているCLDN18.2に結合する。特定の好ましい実施形態では、CLDN18.2に結合する能力を有する薬剤は、生細胞の表面に存在するCLDN18.2のネイティブエピトープに結合する。

【0172】

50

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、配列番号20、21、24からなる群から選択されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む重鎖可変領域(VH)を含む。

【0173】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、配列番号22、23、25からなる群から選択されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む軽鎖可変領域(VL)を含む。

【0174】

ある特定の好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、以下の可能性:

- (i) VHは、配列番号20で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号22で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、
- (ii) VHは、配列番号20で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号23で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、
- (iii) VHは、配列番号21で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号22で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、
- (iv) VHは、配列番号21で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号23で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、
- (v) VHは、配列番号24で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号25で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む

から選択される重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せを含む。

【0175】

特に好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号20で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号22で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む
を含む。

【0176】

特に好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号21で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号23で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む
を含む。

【0177】

「断片」という用語は、特に、1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)、好ましくは重鎖可変領域(VH)及び/又は軽鎖可変領域(VL)の少なくともCDR3可変領域を指す。一実施形態では、前記1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)は、相補性決定領域CDR1、CDR2及びCDR3のセットから選択される。特に好ましい実施形態では、「断片」という用語は、重鎖可変領域(VH)及び/又は軽鎖可変領域(VL)の相補性決定領域CDR1、CDR2及びCDR3を指す。

【0178】

一実施形態では、本明細書に記載の1つ又は複数のCDR、CDRのセット又はCDRのセットの組合せを含む結合ドメインは、それらに介入するフレームワーク領域と共に前記CDRを

10

20

30

40

50

含む。好ましくは、その部分は、第1及び第4のフレームワーク領域の一方又は両方の少なくとも約50%を含み、その50%は、第1のフレームワーク領域のC末端50%及び第4のフレームワーク領域のN末端50%である。組換えDNA技術によって作製される結合因子の構築は、クローニング又は他の操作工程を容易にするために導入するリンカーによってコードされる可変領域に残基N又はC末端を導入すること、例えば、本発明の可変領域を免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン又はタンパク質標識を含む更なるタンパク質配列に連結するリンカーを導入することに至り得る。

【0179】

一実施形態では、本明細書に記載の1つ又は複数のCDR、CDRのセット又はCDRのセットの組合せを含む結合ドメインは、ヒト抗体フレームワークにおける前記CDRを含む。

10

【0180】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号58に示される配列を含む重鎖相補性決定領域3(HCDR3)を含み、VLは、配列番号64に示される配列を含む軽鎖相補性決定領域3(LCDR3)を含む、を含む。

【0181】

一実施形態では、VHは、配列番号56に示される配列を含むHCDR1及び/若しくは配列番号57に示される配列を含むHCDR2を更に含み、並びに/又はVLは、配列番号62に示される配列を含むLCDR1及び/若しくは配列番号63に示される配列を含むLCDR2を更に含む。

20

【0182】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号56に示される配列を含むHCDR1、配列番号57に示される配列を含むHCDR2及び配列番号58に示される配列を含むHCDR3を含み、VLは、配列番号62に示される配列を含むLCDR1、配列番号63に示される配列を含むLCDR2及び配列番号64に示される配列を含むLCDR3を含む、を含む。

【0183】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

30

VHは、配列番号61に示される配列を含む重鎖相補性決定領域3(HCDR3)を含み、VLは、配列番号65に示される配列を含む軽鎖相補性決定領域3(LCDR3)を含む、を含む。

【0184】

一実施形態では、VHは、配列番号59に示される配列を含むHCDR1及び/若しくは配列番号60に示される配列を含むHCDR2を更に含み、並びに/又はVLは、配列番号62に示される配列を含むLCDR1及び/若しくは配列番号63に示される配列を含むLCDR2を更に含む。

【0185】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

40

VHは、配列番号59に示される配列を含むHCDR1、配列番号60に示される配列を含むHCDR2及び配列番号61に示される配列を含むHCDR3を含み、VLは、配列番号62に示される配列を含むLCDR1、配列番号63に示される配列を含むLCDR2及び配列番号65に示される配列を含むLCDR3を含む、を含む。

【0186】

一実施形態では、前記重鎖及び軽鎖可変領域は、フレームワーク領域内に散在する前記相補性決定領域を含む。一実施形態では、各可変領域は、3つの相補性決定領域(CDR1、2及び3)と4つのフレームワーク領域(FR1、2、3及び4)を含む。一実施形態では、前記相補

50

性決定領域及び前記フレームワーク領域は、次の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端へと配置されている。

【0187】

更なる実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、(i)上述の重鎖及び軽鎖可変領域を含む抗体とCLDN18.2結合について競合する抗体及び/又は(ii)上述の重鎖及び軽鎖可変領域を含む抗体のCLDN18.2に対する特異性を有する抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を含む。

【0188】

一実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインの重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)は、scFv分子のフォーマットを有する。この実施形態では、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、配列番号26、27、28、29若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリエントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0189】

本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインは、同一若しくは本質的に同一であっても又は異なっていてもよく、従って同一若しくは本質的に同一のエピトープ又は異なるエピトープに結合しうると理解すべきである。したがって、本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインの両方が本明細書に記載の本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインの1つに対応又は本質的に対応していてもよく、本明細書に記載の本発明の結合因子のCLDN18.2に結合する結合ドメインから独立して選択されてもよい。

20

【0190】

一実施形態では、本発明の結合因子は、CLDN6に結合する能力、つまりCLDN6に存在するエピトープ、好ましくは、CLDN6の細胞外ドメイン内、特に第1の細胞外ループ、好ましくはCLDN6のアミノ酸28~76位若しくは29~81位内、又は第2の細胞外ループ、好ましくはCLDN6のアミノ酸141から159位内に位置するエピトープに結合する能力を有する。特定の実施形態では、CLDN6に結合する能力を有する薬剤は、CLDN9に存在しないCLDN6のエピトープに結合する。好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する薬剤は、CLDN4及び/又はCLDN3に存在しないCLDN6のエピトープに結合する。最も好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する薬剤は、CLDN6以外のクローディンタンパク質に存在しないCLDN6のエピトープに結合する。

30

【0191】

CLDN6に結合する能力を有する薬剤は、好ましくはCLDN6に結合するが、CLDN9に結合せず、好ましくはCLDN4及び/又はCLDN3に結合しない。好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する薬剤は、CLDN6に特異的である。好ましくは、CLDN6に結合する能力を有する薬剤は、細胞表面に発現しているCLDN6に結合する。特定の好ましい実施形態では、CLDN6に結合する能力を有する薬剤は、生細胞の表面に存在するCLDN6のネイティブエピトープに結合する。

30

【0192】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、配列番号7、8、11若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリエントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む。

40

【0193】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、配列番号9、10、12若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリエントからなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。

【0194】

ある特定の好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、以下の可能性:

(i)VHは、配列番号7で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しく

50

は断片のバリアントを含み、VLは、配列番号9で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

(ii)VHは、配列番号7で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号10で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

(iii)VHは、配列番号8で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号9で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

(iv)VHは、配列番号8で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号10で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

(v)VHは、配列番号11で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号12で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

(vi)VHは、配列番号7で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号12で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

(vii)VHは、配列番号8で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号12で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

から選択される重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せを含む。

【0195】

特に好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号8で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号10で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

を含む。

【0196】

特に好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号7で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号12で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、

を含む。

【0197】

「断片」という用語は、特に、1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)、好ましくは重鎖可変領域(VH)及び/又は軽鎖可変領域(VL)の少なくともCDR3可変領域を指す。一実施形態では、前記1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)は、相補性決定領域CDR1、CDR2及びCDR3のセットから選択される。特に好ましい実施形態では、「断片」という用語は、重鎖可変領域(VH)及び/又は軽鎖可変領域(VL)の相補性決定領域CDR1、CDR2及びCDR3を指す。

【0198】

一実施形態では、本明細書に記載の1つ又は複数のCDR、CDRのセット又はCDRのセットの組合せを含む結合ドメインは、それらに介入するフレームワーク領域と共に前記CDRを含む。好ましくは、その部分は、第1及び第4のフレームワーク領域の一方又は両方の少なくとも約50%を含み、その50%は、第1のフレームワーク領域のC末端50%及び第4のフレームワーク領域のN末端50%である。組換えDNA技術によって作製される結合因子の構築は、クローニング又は他の操作工程を容易にするために導入するリンクアによってコードされる可変領域に残基N又はC末端を導入すること、例えば、本発明の可変領域を免疫グロ

10

20

30

40

50

プリン重鎖、他の可変ドメイン又はタンパク質標識を含む更なるタンパク質配列に連結するリンカーを導入することに至り得る。

【0199】

一実施形態では、本明細書に記載の1つ又は複数のCDR、CDRのセット又はCDRのセットの組合せを含む結合ドメインは、ヒト抗体フレームワークにおける前記CDRを含む。

【0200】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列Ala Arg Asp Xaa1 Gly Xaa2 Val Xaa3 Asp Tyrを含む重鎖相補性決定領域3(HCDR3)を含み、ここでXaa1は、任意のアミノ酸、好ましくは芳香族アミノ酸、より好ましくはPhe又はTyr、最も好ましくはTyrであり、Xaa2は、任意のアミノ酸、好ましくは芳香族アミノ酸、より好ましくはPhe又はTyr、最も好ましくはTyrであり、Xaa3は、任意のアミノ酸、好ましくはLeu又はPhe、最も好ましくはLeuであり、一実施形態では、HCDR3は、配列番号46又は47に示される配列を含み、

10

VLは、配列Gln Gln Arg Xaa1 Xaa2 Xaa3 Pro Pro Trp Thrを含む軽鎖相補性決定領域3(LCDR3)を含み、ここでXaa1は、任意のアミノ酸、好ましくはSer又はAsn、最も好ましくはSerであり、Xaa2は、任意のアミノ酸、好ましくはTyr、Ser、Ile、Asn又はThr、より好ましくはIle、Asn又はThr、最も好ましくはIle又はAsnであり、Xaa3は、任意のアミノ酸、好ましくはSer又はTyr、より好ましくはTyrである。一実施形態では、LCDR3は、配列番号52又は53に示される配列を含む。

20

【0201】

一実施形態では、VHは、配列番号44に示される配列を含むHCDR1及び/又は配列番号48に示される配列を含むHCDR2を更に含み、ここでXaaは、任意のアミノ酸、好ましくはThr、Ser又はIle、最も好ましくはThrであり、例えば配列番号45に示される配列であり、並びに/又は、VLは、配列番号54に示される配列を含むLCDR1であって、ここでXaaは、任意のアミノ酸、好ましくはSer又はAsn、最も好ましくはSerであり、例えば配列番号50に示される配列であるLCDR1及び/又は配列番号51に示される配列を含むLCDR2を更に含む。

【0202】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

30

VHは、配列番号44に示される配列を含むHCDR1、配列番号45に示される配列を含むHCDR2及び配列番号46に示される配列を含むHCDR3を含み、VLは、配列番号50に示される配列を含むLCDR1、配列番号51に示される配列を含むLCDR2及び配列番号52に示される配列を含むLCDR3を含む、
を含む。

【0203】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号44に示される配列を含むHCDR1、配列番号45に示される配列を含むHCDR2及び配列番号47に示される配列を含むHCDR3を含み、VLは、配列番号50に示される配列を含むLCDR1、配列番号51に示される配列を含むLCDR2及び配列番号53に示される配列を含むLCDR3を含む、
を含む。

40

【0204】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号44に示される配列を含むHCDR1、配列番号45に示される配列を含むHCDR2及び配列番号46に示される配列を含むHCDR3を含み、VLは、配列番号50に示される配列を含むLCDR1、配列番号51に示される配列を含むLCDR2及び配列番号53に示される

50

配列を含むLCDR3を含む、
を含む。

【 0 2 0 5 】

一実施形態では、前記重鎖及び軽鎖可変領域は、フレームワーク領域内に散在する前記相補性決定領域を含む。一実施形態では、各可変領域は、3つの相補性決定領域(CDR1、2及び3)と4つのフレームワーク領域(FR1、2、3及び4)を含む。一実施形態では、前記相補性決定領域及び前記フレームワーク領域は、次の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で、アミノ末端からカルボキシ末端へと配置されている。

【 0 2 0 6 】

更なる実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、(i)上述の重鎖及び軽鎖可変領域を含む抗体とCLDN6結合について競合する抗体及び/又は(ii)上述の重鎖及び軽鎖可変領域を含む抗体のCLDN6に対する特異性を有する抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を含む。

【 0 2 0 7 】

一実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインの重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)は、scFv分子のフォーマットを有する。この実施形態では、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、配列番号13若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリエントに示されるアミノ酸配列を含む。

【 0 2 0 8 】

本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインは、同一若しくは本質的に同一であっても又は異なっていてもよく、従って同一若しくは本質的に同一のエピトープ又は異なるエピトープに結合しうると理解すべきである。したがって、本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインの両方が、本明細書に記載の本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインの1つに対応又は本質的に対応していてもよく、本明細書に記載の本発明の結合因子のCLDN6に結合する結合ドメインから独立して選択されてもよい。

【 0 2 0 9 】

本発明による結合因子を提供するために有用である抗CD3抗体としては、UCHT1-HS(ヒト化mAB)、UCHT1-MM(マウスmAB)、CLB-T3、TR66、145-2C11が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 2 1 0 】

UCHT1は、ヒト及び霊長類の試料の種類におけるCD3を検出するモノクローナルIgG1抗CD3モノクローナル抗体である。CLB-T3は、CD3抗原に向かい、80~90%のヒト末梢Tリンパ球及び髓質胸腺細胞と反応するマウスモノクローナル抗CD3抗体である。TR66は、ヒトCD3のイプシロン鎖を認識するマウスIgG1モノクローナル抗CD3抗体である。145-2C11は、アルメニアハムスターモノクローナル抗マウスCD3抗体である。

【 0 2 1 1 】

好ましくは、CD3結合ドメインのVH及びVL領域は、その天然の構成でTCRを発現する活性化初代ヒトT細胞に存在する他のTCRサブユニットの場面でヒトCD3を特異的に認識することができる抗体/抗体分子及び抗体様分子に由来する。CD3-イプシロン鎖に特異的な抗体に由来するVH及びVL領域が最も好ましく、前記(親)抗体は、天然又はほぼ天然の構造を反映するエピトープ又はTCR複合体の場面で提示されたヒトCD3の立体配座エピトープに特異的に結合することができる。本発明の好ましい実施形態では、CD3-結合ドメインのVH及びVL領域は、UCHT1-HS、UCHT1-MM、CLB-T3及びTR66からなる群から選択されるCD3特異的抗体、好ましくはTR66に由来する。

【 0 2 1 2 】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCD3に結合する結合ドメインは、配列番号5に示されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリエントを含む重鎖可変領域(VH)を含む。

【 0 2 1 3 】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCD3に結合する結合ドメインは、配列番号6

10

20

30

40

50

に示されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む軽鎖可変領域(VL)を含む。

【0214】

好ましい実施形態では、本発明の結合因子のCD3に結合する結合ドメインは、以下の重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)の組合せ:

VHは、配列番号5で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含み、VLは、配列番号6で表されるアミノ酸配列若しくはその断片又は該アミノ酸配列若しくは断片のバリアントを含む、
を含む。

【0215】

「断片」という用語は、特に1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)、好ましくは重鎖可変領域(VH)及び/又は軽鎖可変領域(VL)の少なくともCDR3可変領域を指す。一実施形態では、前記1つ又は複数の相補性決定領域(CDR)は、相補性決定領域CDR1、CDR2及びCDR3のセットから選択される。特に好ましい実施形態では、「断片」という用語は、重鎖可変領域(VH)及び/又は軽鎖可変領域(VL)の相補性決定領域CDR1、CDR2及びCDR3を指す。

【0216】

一実施形態では、本明細書に記載の1つ又は複数のCDR、CDRのセット又はCDRのセットの組合せを含む結合ドメインは、それらに介入するフレームワーク領域と共に前記CDRを含む。好ましくは、その部分は、第1及び第4のフレームワーク領域の一方又は両方の少なくとも約50%を含み、その50%は、第1のフレームワーク領域のC末端50%及び第4のフレームワーク領域のN末端50%である。組換えDNA技術によって作製される結合因子の構築は、クローニング又は他の操作工程を容易にするために導入するリンカーによってコードされる可変領域に残基N又はC末端を導入すること、例えば、本発明の可変領域を免疫グロブリン重鎖、他の可変ドメイン又はタンパク質標識を含む更なるタンパク質配列に連結するリンカーを導入することに至り得る。

【0217】

一実施形態では、本明細書に記載の1つ又は複数のCDR、CDRのセット又はCDRのセットの組合せを含む結合ドメインは、ヒト抗体フレームワークにおける前記CDRを含む。

【0218】

本明細書に記載の結合因子は、薬剤をコードするRNA等の核酸を投与すること及び/又は薬剤をコードするRNA等の核酸を含む宿主細胞を投与することによって患者に送達することができる事が理解されるべきである。結合因子が2つ以上のポリペプチド鎖を含む場合、異なるポリペプチド鎖は、同じ核酸をコードしても又は異なる核酸をコードしてもよい。したがって、投与される核酸(nucleic)は、異なる核酸分子の混合物であってもよい。患者に投与されるとき、結合因子をコードする核酸は、裸の形態であってもよく、リポソーム若しくはナノ粒子若しくはウイルス粒子の形態等の適切な送達ビヒクル内に存在してもよく、又は宿主細胞内に存在してもよい。提供される核酸は、治療用抗体について少なくとも部分的に観察される不安定性を長時間にわたって持続的に緩和する薬剤を製造することができる。患者に送達される核酸は、組換え手段によって製造することができる。核酸が宿主細胞内に存在することなく、患者に投与される場合、核酸によってコードされる結合因子の発現について、患者の細胞によって取り込まれることが好ましい。核酸が、患者に投与される一方、宿主細胞に存在する場合、核酸によってコードされる結合因子を生成するように、患者の体内的宿主細胞によって核酸が発現されることが好ましい。

【0219】

本発明の文脈に「組換え」という用語は、「遺伝子工学によって作られた」ことを意味する。好ましくは「組換え体」、例えば、組換え核酸は、本発明の文脈において、天然に存在するものでない。

【0220】

本明細書で使用される「天然に存在する」という用語は、物体が天然に見出されうるという事実を指す。例えば、生物(ウイルスを含む)中に存在し、天然の供給源から単離するこ

10

20

30

40

50

とができ、実験室で人によって意図的に改変されていないペプチド又は核酸は、天然に存在する。

【0221】

「核酸」という用語は、本明細書中で使用されるとき、例えばゲノムDNA、cDNA、mRNA、組換え的に產生された及び化学的に合成された分子等のDNA及びRNAを含むことが意図されている。核酸は、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。RNAは、*in vitro*で転写されたRNA(IVT RNA)又は合成RNAを含む。

【0222】

核酸は、ベクターに含まれていてもよい。「ベクター」という用語は、本明細書で使用するとき、当業者に既知の任意のベクター、例えば、プラスミドベクター、コスミドベクター、ファージベクター、例えばラムダファージ、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルス若しくはバキュロウイルスベクター、又は人工染色体ベクター、例えば細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)、若しくはP1人工染色体(PAC)を含む。前記ベクターは、発現ベクター及びクローニングベクターを含む。発現ベクターとしては、プラスミド及びウイルスベクターが挙げられる。発現ベクターは、一般的に、所望のコード配列と、特定の宿主生物(例えば、細菌、酵母、植物、昆虫、若しくは哺乳類)又は*in vitro*発現系で作動可能に連結されている該コード配列を発現するために必要な適切なDNA配列とを含む。クローニングベクターは、一般的に、所望のDNA断片を工学的に作製し増幅するために使用され、所望のDNA断片の発現に必要な機能的配列は欠いている場合がある。

10

【0223】

本発明の文脈において、「RNA」という用語は、リボヌクレオチド残基を含む、好ましくは完全に又は実質的にリボヌクレオチド残基から構成されている、分子に関する。「リボヌクレオチド」は、-D-リボフラノシリル基の2'位にヒドロキシリル基を有するヌクレオチドに関する。この用語には、二本鎖RNA、一本鎖RNA、部分的に精製されたRNAを含む単離されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え的に產生されたRNA、並びに1つ又は複数のヌクレオチドの付加、欠失、置換及び/又は改変によって天然のRNAとは異なる修飾されたRNAが含まれる。そのような改変には、非ヌクレオチド物質の、例えば、RNAの末端への、例えばRNAの1つ又は複数のヌクレオチドでの付加を含むことができる。RNA分子中のヌクレオチドは、非天然ヌクレオチド又は化学合成されたヌクレオチド又はデオキシヌクレオチド等の非標準ヌクレオチドを含むこともできる。これらの改変されたRNAは、アナログ又は天然RNAのアナログと称される場合がある。

20

【0224】

本発明によれば、「RNA」という用語は、「メッセンジャーRNA」を意味する「mRNA」を含み、好ましくはそれに関連し、更に、鑄型としてDNAを使用して製造される場合があり、ペプチド又はタンパク質をコードする「転写物」に関連する。mRNAは、典型的に、5'非翻訳領域(5'-UTR)、タンパク質又はペプチドコード領域及び3'非翻訳領域(3'-UTR)を含む。mRNAは、細胞内及び*in vitro*において限定された半減期を有する。好ましくは、mRNAは、DNA鑄型を使用して*in vitro*転写によって製造される。本発明の一実施形態では、RNAは、*in vitro*転写又は化学合成によって取得される。*in vitro*転写方法は、当業者にとって既知である。例えば、市販の様々な*in vitro*転写キットがある。

30

【0225】

本発明の一実施形態では、RNAは、一本鎖自己複製RNA等の自己複製RNAである。一実施形態では、自己複製RNAは、ポジティブセンスの一本鎖RNAである。一実施形態では、自己複製RNAは、ウイルスRNA又はウイルスRNAに由来するRNAである。一実施形態において、自己複製RNAは、アルファウイルスゲノムRNAである、又はアルファウイルスゲノムRNAに由来する。一実施形態では、自己複製RNAは、ウイルス遺伝子発現ベクターである。一実施形態では、ウイルスは、セムリキ森林ウイルスである。一実施形態では、自己複製RNAは、1つ又は複数の導入遺伝子を含み、前記導入遺伝子の少なくとも1つは、本明細書に記載の結合因子をコードしている。一実施形態では、RNAがウイルスRNAであるか又はウイルスRNAに由来するものである場合、導入遺伝子は、構造タンパク質をコードする

40

50

ウイルス配列等のウイルス配列を部分的に又は完全に置き換えてよい。一実施形態では、自己複製RNAは、*in vitro*転写RNAである。

【0226】

アルファウイルスのゲノムは、大きいポリプロテインのための2つのオープンリーディングフレーム(ORF)をコードするポジティブセンスの一本鎖RNA(ssRNA(+))である。ゲノムの5'末端のORFは、非構造タンパク質nSP1からnSP4(nsP1-4)をコードし、これらは翻訳され、RNA依存性RNAポリメラーゼ(レプリカーゼ)にプロセシングされる;3'末端のORFは、構造タンパク質-カプシド及び糖タンパク質をコードする。両方のORFは、構造ORFの転写を支配する、いわゆるサブゲノムプロモーター(SGP)によって分離される。遺伝子ベクターとして利用されると、SGPの背後にある構造タンパク質は、一般的に、導入遺伝子によって置き換えられる。ウイルス粒子にそのようなベクターをパッケージングするために、構造タンパク質は、一般的にヘルパー構築物からトランスで発現される。アルファウイルスは、RNAレベルで感染細胞の細胞質内で排他的に複製される。感染後、ssRNA(+)ゲノムは、断片nsP123及びnsP4へ自己タンパク分解的に(autoproteolytically)プロセシングされるウイルスライフサイクルの初期段階である、nsP1234ポリプロテイン前駆体の翻訳のためのmRNAとして作用する。断片nsP123及びnsP4は、ゲノムRNA鑄型由来の(-)鎖RNAを転写する(-)鎖レプリカーゼ複合体を形成する。後の段階で、nsP1234ポリプロテインは、新しい(+)鎖ゲノムを合成する(+)鎖レプリカーゼ複合体を組み立てる単一のタンパク質並びに構造タンパク質をコードするサブゲノム転写物、又は導入遺伝子に完全に切断される。サブゲノムRNA並びに新たなゲノムRNAはキャッピングされ、ポリアデニル化され、したがって標的細胞の感染後のmRNAとして認識される。唯一の新しいゲノムRNAは、出芽ビリオンへのゲノムRNAの排他的なパッケージングを確実にするパッケージングシグナルを含んでいる。ベクター開発研究(vectorology)のためのアルファウイルスレプリコンの魅力は、キャップされた及びポリアデニル化されたRNAゲノムのポジティブ配向に基づく。翻訳可能なレプリコンRNAは、*in vitro*で容易に合成することができ、ここでキャッピングは*in vitro*転写反応に加えられたキャップアナログを用いて達成されてもよく、転写反応及びポリAテールは、プラスミド鑄型のポリTトラックとしてコードされてもよい。*in vitro*転写(IVT)レプリコンは、従来のトランسفエクション技術によってトランسفクトされ、少量の開始IVT RNAであっても急速に増加する。転写後数時間以内に、SGPの下流に配置される導入遺伝子は、細胞あたりのサブゲノムRNAが約40.000~200.000の非常に高いコピー数に転写され、従って組換えタンパク質が強く発現していることは驚くべきことではない。特定の目的に依存して、IVTレプリコンは、標的細胞に直接トランسفクトされてもよく、又はトランスの構造遺伝子を提供するヘルパーベクターでアルファウイルス粒子にパッケージングされてもよい。皮膚又は筋肉への移行は、体液性及び細胞性免疫応答の強力な誘導と並列して、高度及び持続性の局所発現を導く。

【0227】

本発明で使用されるRNAの発現及び/又は安定性を増加させるために、好ましくは発現されるペプチド又はタンパク質の配列を変えることなく、修飾がなされてもよい。

【0228】

本発明に従って使用されるRNAの文脈における「修飾」という用語は、前記RNAに天然に存在しない、RNAの任意の修飾を含む。

【0229】

本発明の一実施形態では、本発明に従って使用されるRNAは、キャップされていない5'-三リン酸を有しない。そのようなキャップされていない5'-三リン酸の除去は、RNAをホスファターゼで処置することによって達成することができる。

【0230】

本発明によるRNAは、安定性を増加及び/又は細胞傷害性及び/又は免疫原性を減少させるために、修飾された天然リボヌクレオチド又は合成リボヌクレオチドを含んでもよい。例えば、一実施形態では、本発明に従って使用されるRNAにおいて、5-メチルシチジンは、部分的に又は完全に、好ましくは完全にシチジンと置き換わっている。代替的に又は追加

10

20

30

40

50

的に、一実施形態では、本発明に従って使用されるRNAにおいて、プソイドウリジンは、部分的に又は完全に、好ましくは完全にウリジンと置き換わっている。

【0231】

一実施形態では、「修飾」という用語は、5'キャップ又は5'キャップアナログを有するRNAを提供することに関する。「5'キャップ」という用語は、mRNA分子の5'端に見出されるキャップ構造を指し、一般的に、通常と異なる5'-5'三リン酸結合を介してmRNAに接続されたグアノシンヌクレオチドから成る。一実施形態では、このグアノシンは7位でメチル化されている。「通常5'キャップ」は、天然のRNAの5'キャップ、好ましくは7-メチルグアノシンキャップ(m7G)を指す。本発明の文脈において、「5'キャップ」という用語は、RNAキャップ構造に類似し、RNAに結合した場合に、RNAを、好ましくはin vivo及び/又は細胞内で安定化する能力を有するように修飾された5'キャップアナログを含む。

10

【0232】

5'キャップ又は5'キャップアナログを有するRNAの提供は、前記5'キャップ又は5'キャップアナログの存在下でのDNA鑄型のin vitro転写によって達成することができ、ここで前記5'キャップは、生成されたRNA鎖に同時転写的に組み込まれ、或いは、RNAは、例えばin vitro転写によって生成され、5'キャップは、キャッピング酵素を使用して、例えばワクシニアウイルスのキャッピング酵素を使用して、転写後的にRNAに付けることができる。

【0233】

RNAは、更なる修飾を含んでもよい。例えば、本発明で使用されるRNAの更なる修飾は、天然に存在するポリ(A)テールの延長又は短縮、又は5'-又は3'-非翻訳領域(UTR)の改変、例えば、前記RNAのコード領域に関連しないUTRの導入、例えば、アルファ2-グロビン、アルファ1-グロビン、ベータ-グロビン、好ましくはベータ-グロビン、より好ましくはヒトベータ-グロビン等のグロビン遺伝子由来の3'-UTRの1つ又は複数の、好ましくは2つのコピーの挿入でありうる。

20

【0234】

したがって、本発明に従って使用されるRNAの安定性及び/又は発現を増加させるために、好ましくは10~500、より好ましくは30~300、更により好ましくは65~200、及び特に100~150個のアデノシン残基を有するポリA配列と一緒に存在するように修飾してもよい。特に好ましい実施形態において、ポリA配列は、約120個のアデノシン残基の長さを有している。更に、RNA分子の3'-非翻訳領域への2つ以上の3'-非翻訳領域(UTR)の組込みは、翻訳効率の向上をもたらすことができる。特定の一実施形態では、3'-UTRは、ヒト-グロビン遺伝子に由来する。

30

【0235】

好ましくは、細胞に、特にin vivoに存在する細胞に、送達された、つまりトランスフェクトされたRNAは、コードしているタンパク質、ペプチド又は抗原を発現する。

【0236】

「トランスフェクション」という用語は、核酸、特にRNAの、細胞への導入に関する。また本発明の目的のために、「トランスフェクション」という用語は、細胞への核酸の導入又はそのような細胞による核酸の取り込みを含み、ここで細胞は、対象、例えば患者に存在しうる。したがって本発明によれば、本明細書に記載の核酸のトランスフェクションのための細胞は、in vitro又はin vivoで存在することができ、例えば細胞は、患者の器官、組織及び/又は生体の一部を形成することができる。本発明によれば、トランスフェクションは、一過性であっても安定的であってもよい。トランスフェクションの一部の用途のためには、トランスフェクトされた遺伝物質が一過性にのみ発現されれば十分である。トランスフェクションプロセス中に導入される核酸は、核のゲノムに通常は組み込まれないので、外来核酸は有糸分裂又は分解を介して希釈される。核酸のエピソーム増幅を可能にする細胞は、希釈率が大幅に低下する。トランスフェクトされた核酸が細胞又は娘細胞のゲノムに実際に残ることが所望される場合、安定なトランスフェクションが起きる必要がある。RNAは、そのコードされたタンパク質を発現するように細胞にトランスフェクトする

40

50

ことができる。

【0237】

RNAの「安定性」という用語は、RNAの「半減期」に関する。「半減期」は、分子の活性、量又は数を半減するために必要とされる期間を指す。本発明の文脈において、RNAの半減期は、前記RNAの安定性の指標である。RNAの半減期は、RNAの「発現の期間」に影響を与える場合がある。長い半減期を有するRNAは長期間発現することが予測されうる。

【0238】

本発明の文脈において、「転写」という用語は、DNA配列における遺伝コードがRNAに転写されるプロセスに関する。その後、RNAはタンパク質に翻訳されてもよい。本発明によれば、「転写」という用語は「*in vitro*転写」を含み、ここで「*in vitro*転写」という用語は、RNA、特にmRNAが、無細胞系で、好ましくは適切な細胞抽出物を使用して、*in vitro*合成されるプロセスに関する。好ましくは、クローニングベクターは、転写物の生成のために適用される。これらのクローニングベクターは、一般的に転写ベクターとして設計され、本発明に従って「ベクター」という用語に包含される。

10

【0239】

本発明による「翻訳」という用語は、細胞のリボソームにおいて、メッセンジャーRNAの鎖がペプチド又はタンパク質を作製するためにアミノ酸の配列の組み立てを指示するプロセスに関する。

【0240】

「発現」という用語は、本発明に従ってその最も一般的な意味で使用され、例えば転写及び/又は翻訳によるRNA及び/又はペプチド又はタンパク質の産生に関する。RNAに関して、「発現」又は「翻訳」という用語は、特に、ペプチド又はタンパク質の産生に関する。それはまた核酸の部分発現を含む。更に、発現は、一過性であっても安定的であってもよい。本発明によれば、「発現」という用語は、「異常な発現」又は「通常でない発現」も含む。

20

【0241】

「異常な発現」又は「通常でない発現」は、本発明によれば、発現が、参照、例えば、ある特定のタンパク質、例えば、腫瘍抗原の異常な又は通常でない発現と関連する疾患有しない対象の状態と比較して、変化している、好ましくは増加していることを意味する。発現の増加は、少なくとも10%、特に、少なくとも20%、少なくとも50%、又は少なくとも100%以上の増加を指す。一実施形態では、発現は、罹患組織でのみ見出され、健常組織では抑制されている。

30

【0242】

「特異的に発現される」という用語は、タンパク質が、特定の組織又は器官においてのみ本質的に発現されていることを意味する。例えば、胃粘膜において特異的に発現される腫瘍抗原は、前記タンパク質が胃粘膜において主に発現され、他の組織では発現されていないか又は他の種類の組織若しくは器官において有意な程度に発現していないことを意味する。したがって、胃粘膜において排他的に発現され、任意の他の組織、例えば精巣では、著しく少なく発現しているタンパク質は、胃粘膜において特異的に発現している。一部の実施形態では、腫瘍抗原は、通常の条件下で、2種類以上の組織タイプ又は器官で、例えば2又は3種類の組織タイプ又は器官で、但し好ましくは3種類以下の異なる組織又は器官タイプで特異的に発現していてもよい。この場合に、腫瘍抗原は、これらの器官で特異的に発現している。例えば、腫瘍抗原が、通常の条件下で、好ましくはほぼ等しい程度で肺及び胃において発現する場合、前記腫瘍抗原は、肺及び胃において特異的に発現している。

40

【0243】

本発明によれば、「RNAコード化」という用語は、適切な環境内、好ましくは細胞内に存在する場合、コードしているタンパク質又はペプチドを産生するように発現させることができるRNAを意味する。

【0244】

本発明の一部の態様は、本明細書に記載の結合因子をコードするRNA等の核酸で、*in vitro*

50

oでトランスフェクトされ、好ましくは低い前駆体頻度から臨床的に関連する細胞数でex vivo増殖した後に、患者等のレシピエントに移行される、宿主細胞の養子移入に依存する。本発明による処置のために使用される宿主細胞は、処置されるレシピエントに対して、自家、同種又は同系であってもよい。

【0245】

「自家」という用語は、同じ対象に由来するものを記述するために使用される。例えば、「自家移植」は、同じ対象由来の組織又は器官の移植を指す。そのような手法は、他の手法では拒絶をもたらす免疫学的障壁を克服するために有利である。

【0246】

「同種」という用語は、同じ種の異なる個体に由来するものを記述するために使用される。2以上の個体は、1つ又は複数の遺伝子座の遺伝子が同一でないとき、互いに対して同種であると言われる。

10

【0247】

「同系」という用語は、同一の遺伝子型を有する個体又は組織、つまり、一卵性双生児又は同血統の動物又はその組織に由来するものを記述するために使用される。

【0248】

「異種」という用語は、複数の異なる要素で構成されるものを記述するために使用される。一例として、ある個体の骨髄を異なる個体に移すことは、異種移植片を構成する。異種遺伝子は、対象以外の供給源に由来する遺伝子である。

【0249】

本発明による「ペプチド」という用語は、オリゴ及びポリペプチドを含み、ペプチド結合によって共有結合された2個以上、好ましくは3個以上、好ましくは4個以上、好ましくは6個以上、好ましくは8個以上、好ましくは9個以上、好ましくは10個以上、好ましくは13個以上、好ましくは16個より多く、好ましくは21個以上、及び好ましくは最大で8、10、20、30、40又は50個、特に100個のアミノ酸を含む物質を指す。「タンパク質」という用語は、大きなペプチド、好ましくは100個を超えるアミノ酸残基を有するペプチドを指すが、一般に「ペプチド」及び「タンパク質」という用語は同義語であり、本明細書において互換的に使用される。

20

【0250】

特定のアミノ酸配列、例えば、配列表に示されるアミノ酸配列に関して本明細書で与えられる教示は、前記特定の配列と機能的に同等である配列に至る前記特定の配列のバリアント、例えば特定のアミノ酸配列の特性と同一又は類似の特性を示すアミノ酸配列にも関するように解釈されるべきである。一つの重要な特性は、標的への結合を保持していること又はエフェクター機能を維持していることである。好ましくは、特定の配列に関してバリアントである配列は、抗体における特定の配列に置き換わるとき、前記抗体のクローディン及び/又はCD3への結合、好ましくは本明細書に記載の前記抗体の機能、例えば、CDC媒介性溶解又はADCC媒介性溶解の機能を保持している。更に、好ましくは、特定の配列に関してバリアントである配列は、結合因子における特定の配列に置き換わるとき、前記結合因子のクローディン及び/又はCD3への結合、好ましくは本明細書に記載の前記結合因子の機能、例えば、細胞傷害性T細胞媒介性溶解の機能を保持している。

30

【0251】

例えば、配列表に示される配列は、1つ又は複数の、好ましくは、全ての遊離システイン残基を、特にシステイン残基をシステイン以外のアミノ酸、好ましくはセリン、アラニン、トレオニン、グリシン、チロシン、トリプトファン、ロイシン又はメチオニンに置き換えることによって除去するように修飾されてもよい。

40

【0252】

特にCDR、超可変及び可変領域の配列が、クローディン及び/又はCD3に結合する能力を失うことなく修飾されうることは、当業者によって理解される。例えば、CDR領域は、本明細書に記載の領域と同一であるか又は高度に相同である。「高度に相同」とは、CDRにおいて、1から5個、好ましくは1から4個、例えば1から3個、又は1若しくは2個の置換が

50

なされうることが企図されている。更に、超可変及び可変領域は、本明細書に具体的に開示されている領域と実質的に相同性を示すように改変されていてもよい。一実施形態では、可変領域配列は、本明細書に具体的に開示された可変領域配列からフレームワーク配列にずれたのみでありうる。

【0253】

本発明の目的に關して、アミノ酸配列の「バリアント」は、アミノ酸挿入バリアント、アミノ酸付加バリアント、アミノ酸欠失バリアント及び/又はアミノ酸置換バリアントを含む。タンパク質のN末端及び/又はC末端に欠失を含むアミノ酸欠失バリアントは、N末端及び/又はC末端切斷バリアントとも称される。

【0254】

アミノ酸挿入バリアントは、特定のアミノ酸配列に1つ又は2つ以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入を有するアミノ酸配列バリアントの場合には、1つ又は複数のアミノ酸残基がアミノ酸配列の特定の部位に挿入されるが、得られた産物の適切なスクリーニングでのランダム挿入も可能である。

【0255】

アミノ酸付加バリアントは、1つ又は複数のアミノ酸、例えば1、2、3、5、10、20、30、50個又はより多くのアミノ酸のアミノ末端及び/又はカルボキシ末端融合を含む。

【0256】

アミノ酸欠失バリアントは、1つ又は複数のアミノ酸の配列からの除去、例えば、1、2、3、5、10、20、30、50個又はより多くのアミノ酸の除去によって特徴付けられる。欠失は、タンパク質の任意の位置でありうる。

【0257】

アミノ酸置換バリアントは、配列における除去される少なくとも1つの残基とその場所に挿入される別の残基とによって特徴付けられる。相同なタンパク質又はペプチド間で保存されていないアミノ酸配列の位置での修飾及び/又は同様の特性を有する別のアミノ酸でのアミノ酸の置換が好ましい。好ましくは、タンパク質バリアントにおけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、つまり同様の荷電又は非荷電のアミノ酸での置換が好ましい。保存的アミノ酸変化には、その側鎖に関するアミノ酸ファミリーの1つでの置換が含まれる。天然に存在するアミノ酸は、一般的に、酸性(アスパラギン酸、グルタミン酸)、塩基性(リジン、アルギニン、ヒスチジン)、非極性(アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、及び非荷電極性(グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシン)アミノ酸の4つのファミリーに分けられる。フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンは、芳香族アミノ酸と一緒に分類される。

【0258】

好ましくは、所与のアミノ酸配列と、前記所与のアミノ酸配列のバリアントであるアミノ酸配列との間の類似性、好ましくは同一性の程度は、少なくとも約60%、65%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%である。類似性又は同一性の程度は、好ましくは、参照アミノ酸配列の全長の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%又は約100%でのアミノ酸領域について与えられる。例えば、参照アミノ酸配列が200個のアミノ酸で構成されている場合、類似性又は同一性の程度は、好ましくは少なくとも約20個、少なくとも約40個、少なくとも約60個、少なくとも約80個、少なくとも約100個、少なくとも約120個、少なくとも約140個、少なくとも約160個、少なくとも約180個、又は約200個のアミノ酸、好ましくは連続的なアミノ酸について与えられる。好ましい実施形態では、類似性又は同一性の程度は、参照アミノ酸配列の全長にわたって与えられる。配列類似性、好ましくは配列同一性を決定するためのアラインメントは、当技術分野で既知のツールを用いて、好ましくは最良の配列アラインメントを使用して、例えばAlignを使用して、標準的な設定、好ましくはEMBOSS::n

10

20

30

40

50

eedle、Matrix:Blosum62、Gap Open 10.0、Gap Extend 0.5で行うことができる。

【0259】

「配列類似性」は、同一であるか又は保存的アミノ酸置換を表すアミノ酸のパーセンテージを示す。2つのアミノ配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。

【0260】

「パーセント同一性」という用語は、最良のアライメント後に得られた、比較される2つの配列間で同一であるアミノ酸残基のパーセンテージを指すことを意図しており、このパーセンテージは純粋に統計学的であり、2つの配列間の差異はランダムにその全長にわたって分散されている。2つのアミノ酸配列間の配列比較は、通常、それらを最適に整列させた後にこれらの配列を比較することによって実施され、前記比較は、配列類似性の局所領域を同定及び比較するために、セグメントによって又は「比較ウインドウ」によって実施される。比較のための配列の最適アライメントは、手動に加えて、Smith and Waterman、1981、Ad. App. Math. 2、482頁のローカル相同性アルゴリズムによって、Nedleman and Wunsch、1970、J. Mol. Biol. 48、443頁のローカル相同性アルゴリズムによって、Pearson and Lipman、1988、Proc. Natl Acad. Sci. USA 85、2444頁の類似性検索方法によって、又はこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム(Wisconsin Genetics Software PackageにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N及びTFASTA、Genetics Computer Group社、575 Science Drive、Madison、Wis.)によって作成することができる。

10

【0261】

同一性パーセントは、比較される2つの配列間の同一の位置の数を決定し、この数を比較される位置の数で割算し、得られた結果に100を乗算して、これらの2つの配列間の同一性パーセントを得ることによって計算される。

20

【0262】

本発明の結合因子は、細胞内的に(例えばサイトゾル中、ペリプラズム中、又は封入体中)で產生し、次いで宿主細胞から単離し、場合により更に精製するか、又は細胞外的に(例えば、宿主細胞が培養される培地内で)產生し、次いで培養培地から単離し、場合により更に精製することによって製造することができる。ポリペプチドの組換え產生のために使用される方法及び試薬、例えば特に適切な発現ベクター、形質転換又はトランスフェクション法、選択マーカー、タンパク質発現の誘導方法、培養条件等は、当業者にとって周知である。同様に、タンパク質単離及び精製技術は、当業者にとって周知である。

30

【0263】

「細胞」又は「宿主細胞」という用語は、無傷の細胞、つまり、酵素、細胞小器官、又は遺伝物質等の通常の細胞内成分を放出していない無傷の膜を有する細胞に関する。無傷の細胞は、好ましくは生細胞、つまり、通常の代謝機能を行うことができる、生きている細胞である。好ましくは、前記用語は、本発明によれば、外因性核酸をトランスフェクトすることができる任意の細胞に関する。好ましくは、細胞は、外因性核酸をトランスフェクトし、レシピエントに移したとき、レシピエントで核酸を発現することができる。「細胞」という用語には、細菌細胞が含まれる。他の有用な細胞は、酵母細胞、真菌細胞、又は哺乳類細胞である。適切な細菌細胞には、グラム陰性細菌株、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、プロテウス(*Proteus*)、及びシュードモナス(*Pseudomonas*)の菌株、並びにグラム陽性細菌株、例えば、枯草菌(*Bacillus subtilis*)、ストレプトマイセス(*Streptomyces*)、スタフィロコッカス(*Staphylococcus*)、及びラクトコッカス(*Lactococcus*)の菌株由来の細胞が含まれる。適切な真菌細胞には、トリコデルマ属(*Trichoderma*)、ニューロスボラ属(*Neurospora*)、及びアスペルギルス属(*Aspergillus*)の種由来の細胞が含まれる。適切な酵母細胞としては、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)(例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*))、シゾサッカロミセス属(*Schizosaccharomyces*)(例えば、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*))、ピキア(*Pichia*)(例えば、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)及びピキア・メタノリカ(*Pic*

40

50

hia methanolicd))並びにハンゼヌラ(Hansenula)属の種由来の細胞が含まれる。適切な哺乳類細胞には、例えばCHO細胞、BHK細胞、HeLa細胞、COS細胞、HEK293等が含まれる。しかしながら、両生類細胞、昆虫細胞、植物細胞、及び異種タンパク質の発現のために当技術分野で使用されるいづれかの他の細胞も同様に使用される。哺乳類細胞、例えば、ヒト、マウス、ハムスター、ブタ、ヤギ及び靈長類の細胞が、養子移入のために特に好ましい。細胞は、多数の組織型に由来することができ、初代細胞及び免疫系の細胞等の細胞株、特に樹状細胞及びT細胞等の抗原提示細胞、造血幹細胞及び間葉系幹細胞等の幹細胞、並びに他の細胞型を含みうる。抗原提示細胞は、その表面の主要組織適合遺伝子複合体の場面において抗原を提示する細胞である。T細胞は、そのT細胞受容体(TCR)を使用してこの複合体を認識することができる。

10

【 0 2 6 4 】

本明細書で使用される「減少する」、「低下する」又は「阻害する」は、例えば発現のレベル又は細胞の増殖レベル等のレベルにおいて、好ましくは5%以上、10%以上、20%以上、より好ましくは50%以上、そして最も好ましくは75%以上の全体的な低下又は全体的な低下を引き起こす能力を意味する

【 0 2 6 5 】

「増加する」又は「増強する」等の用語は、少なくとも約10%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、更により好ましくは少なくとも80%、及び最も好ましくは少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%、少なくとも1000%、少なくとも10000%又はより多くの増加又は増強に関連する。

20

【 0 2 6 6 】

抗体依存性細胞介在性細胞傷害

ADCCは、好ましくは標的細胞が抗体により印を付けられていることを要する、本明細書に記載のエフェクター細胞、特にリンパ球の細胞死滅能力を指す。

【 0 2 6 7 】

ADCCは、好ましくは、抗体が腫瘍細胞上の抗原に結合するときに生じ、抗体Fcドメインは、免疫エフェクター細胞の表面上のFc受容体(FcR)に結合する。Fc受容体のいくつかのファミリーが同定されており、特定の細胞集団は、定義されたFc受容体を特徴的に発現する。ADCCは、抗原提示及び腫瘍指向性T細胞応答の誘導を導く様々な度合の腫瘍即時破壊を直接誘導する機構とみなすことができる。好ましくは、ADCCのin vivo誘導は、腫瘍指向性T細胞応答及び宿主由来抗体応答を導く。

30

【 0 2 6 8 】

補体依存性細胞傷害

CDCは、抗体によって誘導することができる別の細胞死滅方法である。IgMは、補体活性化のための最も有効なアイソタイプである。IgG1及びIgG3は両方とも、古典的補体活性化経路を介したCDCの指令に非常に有効である。好ましくは、このカスケードにおいて、抗原-抗体複合体の形成は、IgG分子等の関与する抗体分子のCH2ドメインに近接する複数のC1q結合部位の曝露をもたらす(C1qは、補体C1の3つのサブコンポーネントの一つである)。好ましくは、これらの曝露されたC1q結合部位は、以前に低親和性のC1q-IgG相互作用を高アビディティのものに変換し、これによって一連の他の補体タンパク質を含む事象のカスケードが誘発され、エフェクター-細胞走化/活性化剤C3a及びC5aのタンパク質分解放出が導かれる。好ましくは、補体カスケードは、水及び溶質の細胞内外への自由な通過を容易にする孔を細胞膜に形成する膜攻撃複合体の形成を終了させる。

40

【 0 2 6 9 】

本明細書に記載の抗体、例えばVL及びVH領域を形成するための抗体は、従来のモノクローナル抗体方法論、例えばKohler and Milstein、Nature 256:495頁(1975)に記載の標準的体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む、様々な技術によって製造することができる。体細胞ハイブリダイゼーション手法が好ましいが、原理的には、モノクローナル抗体を產生するための他の技術、例えば、抗体遺伝子のライブラリを使用するBリンパ球又

50

はファージディスプレイ技術のウイルス性又は発癌性形質転換を利用することができる。

【0270】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製するための好ましい動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は非常によく確立された手法である。融合のための免疫プロトコル及び免疫された脾細胞の単離のための技術は、当該分野で公知である。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)及び融合手順も公知である。

【0271】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製するための他の好ましい動物系は、ラット及びウサギ系である(例えば、Spieker-Poletら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348頁(1995)に記載、またRossiら、Am. J. Clin. Pathol. 124:295頁(2005)を参照)。

10

【0272】

更に別の好ましい実施形態において、ヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなく、ヒト免疫系の一部を保有するトランスジェニック又はトランス染色体マウスを使用して生成することができる。これらのトランスジェニック及びトランス染色体マウスとしては、それぞれHuMAbマウス及びKMマウスとして知られるマウスが挙げられ、それらは集約的に本明細書で「トランスジェニックマウス」として言及される。そのようなトランスジェニックマウスにおけるヒト抗体の産生は、国際公開第2004/035607号でCD20について詳細に記載されているように実施することができる。

20

【0273】

モノクローナル抗体を作製するための更に別の戦略は、定義された特異性の抗体を産生するリンパ球から抗体をコードする遺伝子を直接単離することである。例えば、Babcockら、1996;A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificitiesを参照されたい。組換え抗体工学の詳細については、Welschof and Kraus、Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8及びBenny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1も参照されたい。

30

【0274】

抗体を作製するために、マウスは、抗原配列、つまり、本明細書に記載されるような抗体が指向する配列、組換え的に発現された抗原若しくはその断片、及び/又は該抗原を発現する細胞の濃縮調製物から誘導される担体コンジュゲートペプチドで免疫化してもよい。代替的に、マウスは、抗原又はその断片をコードするDNAで免疫化してもよい。抗原の精製又は濃縮調製物を使用する免疫化が抗体を生じない場合には、免疫応答を促進するために、抗原を発現する細胞、例えば細胞株でマウスを免疫化してもよい。

【0275】

免疫応答は、尾静脈又は後眼窩出血によって得られる血漿及び血清試料を用いた免疫化プロトコルの経過にわたってモニタリングしてもよい。免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスは、融合のために使用することができる。マウスは、殺及び脾臓の除去の3日前に、抗原発現細胞を用いて腹腔内又は静脈内的に追加免疫し、特定の抗体分泌ハイブリドーマの割合を高めてもよい。

40

【0276】

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを生成するために、免疫化マウスから脾細胞及びリンパ節細胞を単離し、マウス骨髄腫細胞株等の適切な不死化細胞株に融合させてもよい。次いで、得られたハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングしてもよい。次いで、個々のウェルを、ELISAによって、抗体分泌ハイブリドーマについてスクリーニングしてもよい。抗原発現細胞を使用する免疫蛍光及びFACS分析によって、抗原に対する特異性を有する抗体を同定することができる。抗体分泌ハイブリドーマを再播種し、再びスクリーニングし、モノクローナル抗体が依然として陽性の場合には、限界希釈によってサブクローニングしてもよい。安定なサブクローニングをin vitroで培養して、抗体を組織培養培地で生成し、特性決定してもよい。

50

【0277】

また抗体は、当技術分野で周知のように、例えば、組換えDNA技術及び遺伝子トランスフェクション方法の組合せ(Morrison, S.(1985)Science 229頁:1202)を使用して、宿主細胞トランスフェクトーマで作製してもよい。

【0278】

例えば、一実施形態では、目的の遺伝子、例えば抗体遺伝子は、国際公開第87/04462号、国際公開第89/01036号及び欧州特許出願公開第338 841号に開示されているGS遺伝子発現系又は当技術分野で周知の他の発現系によって使用される真核生物発現プラスミド等の発現ベクターに連結することができる。クローニングされた抗体遺伝子を有する精製されたプラスミドは、CHO細胞、NS/0細胞、HEK293T細胞又はHEK293細胞等の真核生物の宿主細胞、又は代替的に植物由来細胞、真菌細胞又は酵母細胞のような他の真核細胞に導入することができる。これらの遺伝子を導入するために使用される方法は、エレクトロポレーション、リポフェクチン、リポフェクタミン等の当技術分野で記載された方法であることができる。これらの抗体遺伝子を宿主細胞に導入した後、抗体を発現する細胞を同定し、選択することができる。これらの細胞は、その後、それら抗体遺伝子の発現レベルに増幅し、抗体を産生するために規模拡大することができるトランスフェクトーマを示す。組換え抗体は、これらの培養上清及び/又は細胞から単離及び精製することができる。

10

【0279】

代替的に、クローニングされた抗体遺伝子は、微生物、例えば大腸菌等の原核細胞を含む他の発現系において発現させることができる。更に抗体は、ヒツジ及びウサギの乳、又は雌鳥の卵、又はトランスジェニック植物等のトランスジェニック非ヒト動物で製造することができる。例えば、Verma, R.ら、(1998)J. Immunol. Meth. 216:165-181頁;Pollowら、(1999)J. Immunol. Meth. 231:147-157頁及びFischer, R.ら、(1999)Biol. Chem. 380:825-839頁を参照されたい。

20

【0280】

キメラ化

非標識マウス抗体はヒトにおいて免疫原性が高く、繰り返し適用したとき、治療効果の減少を導く。主たる免疫原性は、重鎖定常領域によって媒介される。ヒトにおけるマウス抗体の免疫原性は、それぞれの抗体がキメラ化又はヒト化している場合に、低下又は完全に回避させることができる。キメラ抗体は、マウス抗体に由来する可変領域及びヒト免疫グロブリン定常領域を有する抗体のように、抗体の異なる部分が異なる動物種に由来する抗体である。抗体のキメラ化は、マウス抗体重鎖及び軽鎖の可変領域を、ヒト重鎖及び軽鎖の定常領域に連結することによって達成される(例えば、Krausら、in Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-896 03-918-8に記載されるように)。好ましい実施形態では、キメラ抗体は、ヒトカッパ軽鎖定常領域をマウス軽鎖可変領域に連結することによって生成される。別の好ましい実施形態では、キメラ抗体は、ヒトラムダ軽鎖定常領域をマウス軽鎖可変領域に連結することによって生成される。キメラ抗体を生成するための好ましい重鎖定常領域は、IgG1、IgG3及びIgG4である。キメラ抗体を生成するための他の好ましい重鎖定常領域は、IgG2、IgA、IgD及びIgMである。

30

【0281】

ヒト化

抗体は、主として6つの重鎖及び軽鎖相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を主に通じて標的抗原と相互作用する。この理由のため、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列よりも、個々の抗体間で多様である。CDR配列はほとんどの抗体-抗原相互作用に関与しているので、様々な特性を有する異なる抗体由来のフレームワーク配列にグラフトした特定の天然に存在する抗体からのCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特定の天然に存在する抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現することができる(例えば、Riechmann, L.ら、(1998)Nature 332:323-327頁;Jones, P.ら、(1986)Nature 321:522-525頁;及びQueen, C.ら、(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-

40

50

10033頁を参照)。そのようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベースから取得することができる。これらの生殖系列配列は、B細胞成熟中のV(D)J連結によって形成される完全に構築された可変遺伝子を含んでいないので、成熟抗体遺伝子配列とは異なる。また生殖系列遺伝子配列は、可変領域に個々に均一にまたがる高親和性二次レパートリー抗体の配列とは異なる。

【0282】

抗原に結合する抗体及び他の結合因子の能力は、標準的な結合アッセイ(例えば、ELISA、ウエスタンプロット、免疫蛍光及びフローサイトメトリー分析)を使用して決定することができる。

【0283】

抗体を精製するために、選択されたプロデューサー細胞株は、組換え抗体精製用の2リットルのスピナーフラスコ中で増殖させることができる。代替的に、抗体は、透析をベースとするバイオリアクターで製造することができる。上清は、濾過し、必要であれば濃縮し、その後、タンパク質L-セファロースを用いたアフィニティクロマトグラフィーを行ってもよい。溶出した抗体は、純度を確実にするために、ゲル電気泳動及び高速液体クロマトグラフィーによってチェックしてもよい。緩衝液をPBSに交換し、濃度を、それぞれの吸光係数を使用するOD280によって決定することができる。組換え抗体を等分し、-65~-85 で保存してもよい。

10

【0284】

抗原を発現する生細胞に対するモノクローナル抗体の結合を実証するために、フローサイトメトリーを使用してもよい。天然に又はトランスフェクション後に抗原を発現する細胞株及び抗原発現を欠く陰性対照を(標準成長条件下で成長)、ハイブリドーマ上清又は1%FB Sを含有するPBS中で様々な濃度のモノクローナル抗体と混合して、4 で30分間インキュベートしてもよい。洗浄後、蛍光標識検出試薬(例えば蛍光コンジュゲート抗IgG抗体、抗Fab抗体又はタンパク質L)を、一次抗体染色と同じ条件下で、抗原結合モノクローナル抗体と結合させてもよい。試料は、単一の生細胞をゲートするために光及び側方散乱特性を使用してFACS機器でフローサイトメトリーによって分析してもよい。単一の測定において抗原特異的モノクローナル抗体を非特異的結合因子から区別するために、コトランスフェクション方法を用いることができる。抗原及び蛍光マーカーをコードするプラスミドで一過性トランスフェクトした細胞を、上記のように染色することができる。トランスフェクトされた細胞は、抗体染色細胞とは異なる蛍光チャネルで検出してもよい。トランスフェクトされた細胞の大部分が両方の導入遺伝子を発現するとき、抗原特異的モノクローナル抗体は、蛍光マーカー発現細胞に優先的に結合し、一方で非特異的抗体は、非トランスフェクト細胞に匹敵する割合で結合する。フローサイトメトリーアッセイに加えて又はその代わりに、蛍光顕微鏡を使用する代替的アッセイを使用してもよい。細胞は上記のように正確に染色することができ、蛍光顕微鏡によって調べることができる。

20

【0285】

抗原を発現する生細胞に対するモノクローナル抗体の結合を実証するために、免疫蛍光顕微鏡分析を使用することができる。例えば、自発的に又はトランスフェクション後に抗原を発現する細胞株及び抗原発現を欠く陰性対照を、10%ウシ胎児血清(FCS)、2 mMのL-グルタミン、100IU/mlのペニシリン及び100 µg/mlのストレプトマイシンを補充したDME M/F12培地で、標準成長条件下でチャンバースライドで成長させる。細胞は、メタノール又はパラホルムアルデヒドで固定してもよく又は未処理のままであってもよい。次いで細胞を、抗原に対するモノクローナル抗体と30分間25 で反応させることができる。洗浄後、細胞を、同じ条件下でAlexa555標識抗マウスIgG第2抗体(Molecular Probes社)と反応させることができる。次いで、細胞を蛍光顕微鏡によって検査することができる。

30

【0286】

抗原を発現する細胞及び適切な陰性対照からの細胞抽出物を調製することができ、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)ポリアクリラミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離された抗原を、ニトロセルロース膜に移し、ブロッキングし、試験するモノク

40

50

ローナル抗体でプロープする。IgG結合は、抗マウスIgGペルオキシダーゼを用いて検出することができ、ECL基質で展開することができる。

【0287】

抗体は更に、当業者に周知の方法で、免疫組織化学によって、例えばルーチンの外科的処置中に患者から得られた非がん組織又はがん組織試料からの、又は自発的若しくはトランスフェクション後に抗原を発現する細胞株を接種した異種移植腫瘍を保有するマウスからの、パラホルムアルデヒド又はアセトン固定凍結切片又はパラホルムアルデヒドで固定したパラフィン包埋組織切片を使用して、抗原との反応性を試験することができる。免疫染色のために、抗原に反応する抗体を、続いて、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウス又はヤギ抗ウサギ抗体(DAKO社)と、ベンダーの教示に従ってインキュベートすることができる。

10

【0288】

前臨床試験

また本明細書に記載の結合因子は、in vivoモデルで(例えば、クローディンを発現する細胞株を接種した異種移植腫瘍を担持する免疫不全マウスにおいて)、クローディン発現腫瘍細胞の成長を制御するそれらの有効性を決定するために試験することができる。

【0289】

クローディン発現腫瘍細胞を免疫不全マウス又は他の動物に異種移植した後のin vivo試験は、本明細書に記載の結合因子を使用して行うことができる。結合因子を、腫瘍のないマウスに投与し、続いて腫瘍細胞を注射して、結合因子が腫瘍又は腫瘍関連症状の形成を予防する効果を測定することができる。結合因子を腫瘍担持マウスに投与して、腫瘍成長、転移又は腫瘍関連症状を減少させるそれぞれの結合因子の治療有効性を決定することができる。結合因子の適用を、細胞分裂薬、成長因子阻害剤、細胞周期遮断薬、血管新生阻害剤又は抗体等の他の物質の適用と組み合わせて、組合せの相乗的有効性及び潜在的な傷害性を決定することができる。結合因子によって媒介される毒性副作用を分析するために、動物に結合因子又は対照試薬を接種し、クローディン結合因子療法に潜在的に関連する症状を徹底的に調べることができる。

20

【0290】

結合因子によって認識されるエピトープのマッピングは、Glenn E. Morrisによる「Epitope Mapping Protocols(Methods in Molecular Biology)」ISBN-089603-375-9及びOlwyn M. R. Westwood、Frank C. Hayによる「Epitope Mapping: A Practical Approach」Practical Approach Series、248に詳細に記載されているように実施することができる。

30

【0291】

本明細書に記載の化合物及び薬剤は、任意の適切な医薬組成物の形態で投与することができる。

【0292】

本発明の医薬組成物は、好ましくは無菌であり、所望の反応又は所望の効果を生じるように、本明細書に記載の結合因子及び場合により本明細書に記載の更なる薬剤の有効量を含有することができる。

40

【0293】

医薬組成物は、通常、一定の投与形態で提供され、それ自体既知の様式で調製されうる。医薬組成物は、例えば、溶液又は懸濁液の形態でありうる。

【0294】

医薬組成物は、塩、緩衝物質、防腐剤、担体、希釈剤及び/又は賦形剤を含んでもよく、それらの全てが、好ましくは薬学的に許容される。「薬学的に許容される」という用語は、材料の非毒性を指し、医薬組成物の有効成分と相互作用しない非毒性を指す。

【0295】

薬学的に許容されない塩は、薬学的に許容される塩を調製するために使用してもよく、本発明に含まれる。この種の薬学的に許容される塩としては、非制限的に、以下の酸:塩酸、

50

臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸等から調製されるものが含まれる。薬学的に許容される塩は、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はカルシウム塩としても調製されうる。

【0296】

医薬組成物における使用のために適切な緩衝物質には、酢酸塩、クエン酸塩、ホウ酸塩、及びリン酸塩が含まれる。

【0297】

医薬組成物における使用のために適切な保存剤には、塩化ベンザルコニウム、クロロブタノール、パラベン、及びチメロサールが含まれる。

10

【0298】

注射用製剤は、リンガー乳酸液等の薬学的に許容される賦形剤を含んでもよい。

【0299】

「担体」という用語は、有効成分と組み合わせて適用を容易、増強又は可能にする天然又は合成の有機又は無機の成分を指す。本発明によれば、「担体」という用語には、患者への投与に適切な1つ又は複数の適合性の固体又は液体の充填剤、希釈剤又は封入物質が含まれる。

【0300】

非経口投与のために考えられる担体物質は、例えば、滅菌水、リングル液、乳酸リングル液、滅菌塩化ナトリウム溶液、ポリアルキレングリコール、水素化ナフタレン、特に、生体適合性ラクチドポリマー、ラクチド/グリコリドコポリマー、又はポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンコポリマーである。

20

【0301】

「賦形剤」という用語は、本明細書で使用するとき、医薬組成物に存在しうるが有効成分でない全ての物質を含むことが企図されており、例えば、担体、バインダー、滑剤、増粘剤、界面活性剤、保存剤、乳化剤、緩衝剤、芳香剤、又は着色剤である。

【0302】

本明細書に記載の薬剤及び組成物は、従来の任意の経路を介して、例えば、注射又は注入を含む非経口投与によって投与することができる。投与は、好ましくは、非経口、例えば、静脈内、動脈内、皮下、皮内、又は筋肉内投与でありうる。

30

【0303】

非経口投与に適した組成物は、通常、活性化合物の滅菌水溶性又は非水溶性調製物を含み、特定の実施形態では、レシピエントの血液に等張である。適合する担体及び溶媒の例は、リングル液及び等張塩化ナトリウム溶液である。更に、通常、滅菌不揮発油が、溶液又は懸濁液の媒体として使用される。

【0304】

本明細書に記載の薬剤及び組成物は、有効量で投与される。「有効量」は、単独で又は更なる用量と一緒にになって所望の反応又は所望の効果を達成する量を指す。特定の疾患又は特定の状態を処置する場合、所望の反応は、特に疾患の進行を阻害することに関する。これには、疾患の進行を遅延させること、特に疾患の進行を中断又は逆転することが含まれる。疾患又は状態の処置における所望の反応は、前記疾患又は前記状態の発症の遅延又は発症の予防であってもよい。

40

【0305】

本明細書に記載の薬剤又は組成物の有効量は、処置される状態、疾患の重症度、患者の年齢、身体状態、大きさ及び体重等の個々のパラメータ、処置の期間、併用する治療(もしあれば)の種類、投与の特定の経路等の因子に応じて決まる。したがって、本明細書に記載の薬剤の投与される用量は、そのような様々なパラメータに依存する。初回の用量で患者の反応が不十分な場合には、より高用量(又は異なった、より局所的な投与経路によって達成されるより効果の高い用量)が使用される。

【0306】

50

本明細書に記載の薬剤及び組成物は、本明細書に記載の障害等の様々な障害を処置又は予防するために、患者に、例えば、*in vivo*で投与することができる。好ましい患者には、本明細書に記載の薬剤及び組成物を投与することによって修復又は改善されうる障害を有するヒト患者が含まれる。これには、CLDN18.2及び/又はCLDN6等のクローディンの改変された発現パターンによって特徴付けられる細胞が関与する障害が含まれる。

【0307】

例えば、一実施形態では、本明細書に記載の薬剤は、がん疾患、例えば、クローディンを発現するがん細胞の存在によって特徴付けられる本明細書に記載されるようながん疾患、を有する患者を処置するために使用することができる。

【0308】

本発明に従って記載される医薬組成物及び処置方法は、本明細書に記載の疾患を予防するための免疫又はワクチン接種のために使用することもできる。

【0309】

本発明の医薬組成物は、その有効性を更に増加させるために、好ましくは免疫刺激の相乗効果を達成するために、1つ又は複数のアジュバント等の補充免疫増強物質と一緒に投与してもよく、1つ又は複数の免疫増強物質を含んでもよい。「アジュバント」という用語は、免疫応答を延長又は増強若しくは促進する化合物に関する。アジュバントの種々のタイプに応じて、この点に関して、様々なメカニズムが可能である。例えば、DCの成熟を可能にする化合物、例えば、リポ多糖又はCD40リガンドは、第1のクラスの適切なアジュバントを形成する。一般的に、「危険シグナル」種(LPS、GP96、dsRNA等)又はGM-CSF等のサイトカインの免疫系に影響を与える任意の薬剤を、制御された様式で免疫応答を強化しうる及び/又はそれに影響しうるアジュバントとして使用することができる。上述したように、特定の状況下で発生するその副作用を考慮すべきであるが、CpGオリゴデオキシヌクレオチドを、場合により、この場面で使用することができる。特に好ましいアジュバントは、モノカイン、リンフォカイン、インターロイキン又はケモカイン等のサイトカイン、例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、INF-、INF-、GM-CSF、LT- 又は成長因子、例えばhGHである。更に公知のアジュバントは、水酸化アルミニウム、フロイントアジュバント、又はオイル、例えばMontanide(登録商標)、最も好ましくはMontanide(登録商標)ISA51である。Pam3Cys等のリポペプチドも本発明の医薬組成物でアジュバントとして使用するために適切である。

【0310】

本明細書で提供される薬剤及び組成物は、単独で、又は手術、放射線照射、化学療法及び/又は骨髄移植(自家、同系、同種異系又は無関係)等の従来の治療法と組み合わせて使用することができる。

【0311】

がんの処置は、組合せ戦略が特に望ましい分野であるが、その理由は、2つ、3つ、4つ又は更に多くのがん薬物/治療の組合せ作用が、単剤療法アプローチの影響より非常に高い相乗効果を生じることがよくあるためである。したがって、本発明の別の実施形態では、本発明の方法及び医薬組成物等の免疫又はワクチン接種ベースのメカニズムを利用するがん処置は、同様の又は他の特定のメカニズムを標的とする様々な他の薬物及び/又は方法と効果的に組み合わせてもよい。これらの中には、例えば、従来の腫瘍療法、マルチエピトープ戦略、更なる免疫療法、及び血管新生又はアポトーシスを標的とする処置アプローチとの組合せがある(概説について、例えば、Andersenら、2008:Cancer treatment:the combination of vaccination with other therapies. *Cancer Immunology Immunotherapy*、57(11):1735-1743頁を参照)。異なる薬剤の逐次投与は、異なるチェックポイントでがん細胞の成長を阻害しうる一方、他の薬剤は、例えば、血管新生、悪性細胞の生存又は転移、がんが慢性疾患に変換する可能性を阻害しうる。本発明と組み合わせて使用することができる抗がん薬及び治療の一部の非限定的な例を以下のリストに示す。

【0312】

1. 化学療法

10

20

30

40

50

化学療法は、複数の種類のがんの標準治療である。最も一般的な化学療法薬は、がん細胞の主要な特性の一つである、急速に分裂する細胞を死滅させることによって作用する。したがって、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤等の従来の化学療法剤、及び細胞分裂又はDNA合成に影響を与える他の抗腫瘍剤との組合せは、サプレッサー細胞を除去することによって、免疫系を再起動することによって、腫瘍細胞を免疫媒介性死滅に感受性にすることによって、又は免疫系の細胞の更なる活性化によって、本発明の治療効果を顕著に改善することができる。化学療法及びワクチン接種に基づく免疫療法薬の相乗的な抗癌作用は、複数の試験で実証されている(例えはQuoixら、2011:Therapeutic vaccination with TG4010 and first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer:a controlled phase 2B trial. *Lancet Oncol.* 12(12):1125-33頁;更にLisethら、2010:Combination of intensive chemotherapy and anticancer vaccines in the treatment of human malignancies:the hematological experience. *J Biomed Biotechnol.* 2010:6920979頁;更にHirookaら、2009:A combination therapy of gemcitabine with immunotherapy for patients with inoperable locally advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 38(3):e69-74頁を参照)。根本的に、併用療法に適した何百もの利用可能な化学療法薬がある。本発明と組み合わせることができる化学療法薬の一部の(非限定的な)例は、カルボプラチニン(パラプラチニン)、シスプラチニン(プラチノール、プラチノール-AQ)、シクロホスファミド(シトキサン、ネオサー)、ドセタキセル(タキソテール)、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、エルロチニブ(タルセバ)、エトポシド(VePesid)、フルオロウラシル(5-FU)、ゲムシタビン(ジェムザール)、メシル酸イマチニブ(グリーベック)、イリノテカン(カンプトサー)、メトトレキサート(FOLEX、MEXATE、アメトブテリン)、パクリタキセル(タキソール、アブラキサン)、ソラフェニブ(sorafenib)(ネクサバール)、スニチニブ(ステント)、トポテカン(ハイカムチン)、ビンクリスチン(オンコビン、Vincasar PFS)、及びビンプラスチン(ベルバン)である。

【0313】

2. 手術

がん手術-腫瘍を除去する手術-は依然としてがん処置の根幹である。手術は、残っている腫瘍細胞を除去するために、他のがん処置と組み合わせることができる。外科的方法をその後の免疫治療的処置と組み合わせることは、数えきれないほど実証されている有望なアプローチである。

【0314】

3. 放射線

放射線療法は、依然としてがん処置の重要な要素であり、がん患者のおよそ50%がその疾患の過程で放射線療法を受けている。放射線療法の主な目標は、がん細胞からその倍加(細胞分裂)能力を奪うことである。がんを処置するために使用される放射線の種類は、光子放射線(X線及びガンマ線)及び粒子放射線(電子、陽子、及び中性子ビーム)である。がんの場所に放射線を送達させるための2つの方法がある。外部ビーム放射線は、高エネルギー線(光子、陽子又は粒子線)を腫瘍の位置に向けることによって体外から送達される。内部放射線又は近接照射療法は、腫瘍部位へ直接、カテーテル又はシードで封入された放射線源によって体内から送達される。本発明と組み合わせて適用される放射線治療技術は、例えは、分別(分別レジームで送達される放射線療法、例えは数週間にわたりて1.5~3Gyで毎日与えられる分別)、三次元等角放射線療法(3DCRT;全腫瘍体積への放射線送達)、強度変調放射線治療(IMRT;複数の放射線ビームのコンピュータ制御の強度変調)、画像誘導放射線治療(IGRT;補正を可能にする事前放射線画像化を含む技術)、及び定位体放射線治療(SRT、非常に高用量の個々の放射線を少数の処置画分に送達する)である。放射線療法の概説については、Baskarら、2012:Cancer and radiation therapy:current advances and future directions. *Int. J Med Sci.* 9(3):193-199頁を参照されたい。

【0315】

4. 抗体

10

20

30

40

50

抗体(好ましくはモノクローナル抗体)は、様々なメカニズムを介して、がん細胞に対するその治療効果を達成する。それらは、アポトーシス又はプログラム細胞死を生じさせるために直接的な効果を有することができる。例えば、成長因子受容体等のシグナル伝達経路の成分を遮断し、腫瘍細胞の成長を効果的に阻止することができる。モノクローナル抗体を発現する細胞では、それらは、抗イディオタイプ抗体の形成をもたらすことができる。間接的な効果には、単球やマクロファージ等の細胞傷害性を有する細胞を動員することができる。この種の抗体媒介性細胞死滅は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(antibody-dependent cell mediated cytotoxicity、ADCC)と呼ばれる。また抗体は、補体にも結合し、補体依存性細胞傷害(complement dependent cytotoxicity、CDC)として知られる直接的な細胞毒性をもたらす。外科的方法を、免疫療法的薬物又は方法と組み合わせることは、例えば、Gadriら、2009:Synergistic effect of dendritic cell vaccination and anti-CD20 antibody treatment in the therapy of murine lymphoma. J Immunother. 32(4):333-40頁に記載されているように、首尾のよいアプローチである。本発明と組み合わせて使用することができる抗がん抗体及び抗体標的候補(括弧内)の一部の非限定的な例を以下に列挙する:アバゴボマブ(CA-125)、アブシキシマブ(CD41)、アデカツムマブ(EpCAM)、アフツズマブ(CD20)、アラシズマブペゴール(VEGFR2)、アルツモマブペンテート(CEA)、アマツキシマブ(MORAb-009)、アナツモマブ マフェナトキス(TAG-72)、アポリズマブ(HLA-DR)、アルシツモマブ(CEA)、バビツキシマブ(ホスファチジルセリン)、ベクツモマブ(CD22)、ベリムマブ(BAFF)、ベバシズマブ(VEGF-A)、ビバツズマブ メルタンシン(CD44 v6)、ブリナツモマブ(CD19)、ブレンツキシマブ ベドチン(CD30 TNFRSF8)、カンツズマブ メルタンシン(ムチンCanAg)、カンツズマブ ラブタンシン(MUC1)、カプロマブペンデチド(前立腺癌細胞)、カールマブ(CNT0888)、カツマキソマブ(EpCAM、CD3)、セツキシマブ(EGFR)、シタツズマブボガトキス(EpCAM)、シキツムマブ(IGF-1受容体)、クローディキシマブ(クローディン)、クリバツズマブ テトラキセタン(MUC1)、コナツムマブ(TRAIL-R2)、ダセツズマブ(CD40)、ダロツズマブ(インスリン様成長因子1受容体)、デノスマブ(RANKL)、デツモマブ(B-リンパ腫細胞)、ドロジツマブ(DR5)、エクロメキシマブ(GD3ガングリオシド)、エドレコロマブ(EpCAM)、エロツズマブ(SLAMF7)、エナバツズマブ(PDL192)、エンシツキシマブE(NPC-1C)、エプラツズマブ(CD22)、エルツマキソマブ(HER2/neu、CD3)、エタラシズマブ(インテグリン v 3)、ファルレツズマブ(葉酸受容体1)、FBTA05(CD20)、フィクラツズマブ(SCH 900105)、フィギツムマブ(IGF-1受容体)、フランボツマブ(糖タンパク質75)、フレソリムマブ(TGF-)、ガリキシマブ(CD80)、ガニツマブ(IGF-I)、ゲムツズマブ オゾガマイシン(CD33)、ゲボキズマブ(IL-1)、ギレンツキシマブ(炭酸脱水酵素9(CA-IX))、グレムバツムマブ ベドチン(GPNMB)、イブリツモマブ チウキセタン(CD20)、イクルクマブ(VEGFR-1)、イゴボマブ(Igovoma)(CA-125)、インダツキシマブ ラブタンシン(SDC 1)、インテツムマブ(CD51)、イノツズマブオゾガマイシン(CD22)、イピリムマブ(CD152)、イラツムマブ(CD30)、ラベツズマブ(CEA)、レキサツムマブ(TRAIL-R2)、リビビルマブ(B型肝炎表面抗原)、リンツズマブ(CD33)、ロルボツズマブ メルタンシン(CD56)、ルカツムマブ(CD40)、ルミリキシマブ(CD23)、マバツムマブ(TRAIL-R1)、マツズマブ(EGFR)、メポリズマブ(IL-5)、ミラツズマブ(CD74)、ミツモマブ(GD3ガングリオシド)、モガムリズマブ(CCR4)、モキセツモマブ パスドトクス(CD22)、ナコロマブ タフェナトクス(C242抗原)、ナブツモマブ エスタフェナトクス(5T4)、ナルナツマブ(RON)、ネシツムマブ(EGFR)、ニモツズマブ(EGFR)、ニボルマブ(IgG4)、オファツムマブ(CD20)、オララツマブ(PDGF-R)、オナルツズマブ(ヒト細胞分散因子受容体キナーゼ)、オボルツズマブ モナトクス(EpCAM)、オレゴボマブ(CA-125)、オキセルマブ(OX-40)、パニツムマブ(EGFR)、パトリツマブ(HER3)、ペムツモマブ(Pemtumoma)(MUC1)、ペルツズマブ(HER2/neu)、ピンツモマブ(腺癌抗原)、プリツムマブ(ビメンチン)、ラコツモマブ(N-グリコリルノイラミン酸)、ラドレツマブ(フィプロネクチンエクストラドメイン-B)、ラフィビルマブ(狂犬病ウイルス糖タンパク質)、ラムシルマブ(VEGFR2)、リロツムマブ(HGF)、リツキシマブ(CD20)、ロバツムマブ(IGF-1受容体)、サマリズマブ(CD200)、

10

20

30

40

50

シプロツズマブ(FAP)、シルツキシマブ(IL-6)、タバルマブ(BAFF)、タカツズマブ テトラキセタン(-フェトプロテイン)、タブリツモマブ パプトクス(CD19)、テナツモマブ(テネイシンC)、テプロツムマブ(CD221)、チシリムマブ(CTLA-4)、チガツズマブ(TRAIL-R2)、TNX-650(IL-13)、トシツモマブ(CD20)、トラスツズマブ(HER2/neu)、TRBSO7(GD2)、トレメリムマブ(CTLA-4)、ツコツズマブ セルモロイキン(EpCAM)、ウブリツキシマブ(MS4A1)、ウレルマブ(4-1BB)、ボロシキシマブ(インテグリン 5 1)、ボツムマブ(腫瘍抗原CTAA16.88)、ザルツムマブ(EGFR)、ザノリムマブ(CD4)。

【0316】

5. サイトカイン、ケモカイン、共刺激分子、融合タンパク質

本発明の抗原をコードする医薬組成物と、有益な免疫調節又は腫瘍阻害効果を誘発するサイトカイン、ケモカイン、共刺激分子及び/又はその融合タンパク質との組合せ使用は、本発明の別の実施形態である。腫瘍への免疫細胞の浸潤を増加させ、腫瘍流入領域リンパ節への抗原提示細胞の移動を容易にするために、C、CC、CXC及びCX3C構造を有する様々なサイトカインが使用されうる。最も有望なケモカインの一部は、例えば、CCR7及びそのリガンドCCL19及びCCL21、更にCCL2、CCL3、CCL5及びCCL16である。他の例は、CXCR4、CXCR7及びCXCL12である。更に、例えば、B7リガンド(B7.1及びB7.2)等の共刺激又は調節分子が有用である。他のサイトカイン、例えばインターロイキン、特に(例えば、IL-1からIL17)、インターフェロン(例えば、IFNアルファ1からIFNアルファ8、IFNアルファ10、IFNアルファ13、IFNアルファ14、IFNアルファ16、IFNアルファ17、IFNアルファ21、IFNベータ1、IFNW、IFNE1及びIFNK)、造血因子、TGF(例えば、TGF- α 、TGF- β 及びTGFファミリーの他のメンバー)、受容体の腫瘍壊死因子ファミリーの最終メンバー及びそれらのリガンド、並びに他の刺激分子、例えば限定されないが、4-1BB、4-1BB-L、CD137、CD137L、CTLA-4GITR、GITRL、Fas、Fas-L、TNFR1、TRAIL-R1、TRAIL-R2、p75NGF-R、DR6、LT.ベータ.R、RANK、EDAR1、XEDAR、Fn114、Troy/Trade、TAJ、TNFRII、HVEM、CD27、CD30、CD40、4-1BB、OX40、GITR、GITRL、TACI、BAFF-R、BCMA、RELT,及びCD95(Fas/APO-1)、グルココルチコイド誘導TNFR関連タンパク質、TNFレセプター関連アポトーシス媒介タンパク質(TRAM P)及び死受容体-6(DR6)も有用である。特にCD40/CD40L及びOX40/OX40Lは、組合せ免疫療法の重要な標的であり、その理由は、T細胞の生存及び増殖に直接影響を与えるためである。概説について、Lechnerら、2011:Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. Immunotherapy 3 (11), 1317-1340頁を参照されたい。

【0317】

6. 細菌処置

研究者は、酸素の乏しい腫瘍の内部を消耗するために、クロストリジウム・ノービイ(Clostridium novyi)等の嫌気性菌を使用してきた。これらの菌は、腫瘍の酸素化側面に接触すると死に、このことは人体の残りの部分には無害であることを意味する。別の戦略は、非毒性のプロドラッグを毒性薬物に変換することができる酵素で形質転換された嫌気性細菌を使用することである。細菌は、腫瘍の壊死及び低酸素領域で増殖し、酵素は、腫瘍においてのみ発現される。したがって全身適用されるプロドラッグは、腫瘍でのみ毒性薬物に代謝される。このことは、非病原性嫌気性菌のクロストリジウム・スプロロゲネス(Clostridium sporogenes)で、効果的であることが実証されている。

【0318】

7. キナーゼ阻害剤

補完的がん療法のための有望な標的である別の大きなグループには、キナーゼ阻害剤が含まれるが、その理由は、がん細胞の成長及び生存がキナーゼ活性の脱調節と密接に連動しているためである。通常のキナーゼ活性を回復し、その腫瘍成長を減少させるために、広範囲の阻害剤が使用されている。標的キナーゼの群には、受容体チロシンキナーゼ、例えば、BCR-ABL、B-Raf、EGFR、HER-2/ErbB2、IGF-IR、PDGFR- α 、PDGFR- β 、c-Kit、Flt-4、Flt3、FGFR1、FGFR3、FGFR4、CSF1R、c-Met、RON、c-Ret、ALK、細

10

20

30

40

50

胞質チロシンキナーゼ、例えば、c-SRC、c-YES、Ab1、JAK-2、セリン/トレオニンキナーゼ、例えば、ATM、Aurora A&B、CDKs、mTOR、PKCι、PLKs、b-Raf、S6K、STK 11/LKB1及び脂質キナーゼ、例えば、PI3K、SK1が含まれる。小分子キナーゼ阻害剤は、例えば、PHA-739358、ニロチニブ、ダサチニブ及びPD166326、NSC 743411、ラバチニブ(GW-572016)、カネルチニブ(CI-1033)、セマキシニブ(SU5416)、バタラニブ(PTK787/ZK222584)、ステント(SU11248)、ソラフェニブ(BAY 43-9006)及びレフルノミド(SU101)である。更なる情報について、例えば、Zhangら、2009:Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nature Reviews Cancer* 9、28-39頁を参照されたい。

【0319】

10

8. Toll様受容体

Toll様受容体(TLR)ファミリーのメンバーは、自然免疫と適応免疫とを結びつけるために重要であり、多くのアジュvantの効果が、TLRの活性化に依存する。がんに対する確立されたワクチンの大多数で、ワクチン応答を高めるために、TLRに対するリガンドが組み込まれている。TLR2に加えて、TLR3、TLR4、特にTLR7及びTLR8が、受動免疫療法アプローチでのがん治療のために検討されている。密接に関連するTLR7及びTLR8は、免疫細胞、腫瘍細胞及び腫瘍微小環境に影響を与えることによって抗腫瘍応答に寄与し、ヌクレオシド類似体の構造によって活性化することができる。全てのTLRは、スタンダロン免疫療法、又はがんワクチンアジュvantとして使用されており、本発明の製剤及び方法と相乗的に組み合わせることができる。更なる情報について、van Duinら、2005:Triggering TLR signaling in vaccination. *Trends in Immunology*、27(1):49-55頁を参照されたい。

20

【0320】

20

9. 血管新生阻害剤

腫瘍媒介性エスケープ機構によって影響を受ける免疫調節受容体及び免疫抑制を標的とした治療に加えて、腫瘍環境を標的とする治療がある。血管新生阻害剤は、腫瘍が生き残るために必要な血管の大規模な成長(血管新生)を防止する。腫瘍細胞の増加する栄養及び酸素の要求に合致するために腫瘍細胞によって促進される血管新生は、例えば、異なる分子を標的とすることによって遮断することができる。本発明と組み合わせることができる血管新生媒介分子又は血管新生阻害剤の非限定的な例には、可溶性VEGF(VEGFアイソフォームVEGF121及びVEGF165受容体VEGFR1、VEGFR2及び共受容体ニューロピリン-1及びニューロピリン-2)1及びNRP-1、アンジオポエチン2、TSP-1及びTSP-2、アンジオエタチン及び関連分子、エンドスタチン、バソスタチン、カルレティキュリン、血小板因子-4、TIMP及びCDAI、Meth-1及びMeth-2、IFN- α 、 β 及び γ 、CXCL10、IL-4、-12及び-18、プロトロンビン(クリングルドメイン-2)、アンチトロンビンIII断片、プロラクチン、VEGI、SPARC、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質、レスチン、及び例えば、ベバシズマブ、イトラコナゾールカルボキシアミドトリアゾール、TNP-470、CM101、IFN- γ 、血小板因子-4、スラミン、SU5416、トロンボスポンジン、VEGFRアンタゴニスト、血管新生抑制ステロイド+ヘパリン、軟骨由来の血管新生阻止因子、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、2-メトキシエストラジオール、テコガラン(tecolagan)、テトラチオモリブデン酸、サリドマイド、トロンボスponジン、プロラクチンV₃阻害剤、リノマイド、タスキニモド等の薬物である。概説について、例えばSchoenfeld and Dranoff 2011:Anti-angiogenesis immunotherapy. *Hum Vaccin.*(9):976-81頁を参照されたい。

30

【0321】

40

10. 小分子標的治療薬

小分子標的治療薬は、一般的に、がん細胞内で突然変異した、過剰発現した又はその他の重要なタンパク質の酵素ドメインの阻害剤である。著名な非限定的例は、チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブ(グリーベック/グリベック)及びゲフィチニブ(イレッサ)である。がん治療のためのワクチンと組み合わせて、一部のキナーゼを標的とする小分子、例えばリン

50

ゴ酸スニチニブ及び/又はトシリ酸ソラフェニブを使用することは、先の特許出願である米国特許出願公開第2009004213号にも記載されている。

【0322】

11. ウイルスベースのワクチン

本発明の製剤と組合せ治療アプローチにおいて使用することができる、利用可能である又は開発中のいくつかのウイルスベースがんワクチンがある。そのようなウイルスベクターを使用する一つの利点は、免疫活性化に必要な危険信号を生成するウイルス感染の結果として生じる炎症反応と共に免疫応答を開始するその固有の能力である。理想的なウイルスベクターは安全であるべきであり、抗腫瘍特異的応答をブーストすることを可能にする抗ベクター免疫応答を導入すべきでない。ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス及びアビポックスウイルス等の組換えウイルスは、動物腫瘍モデルで使用されており、それらの有望な結果に基づいて、ヒト臨床試験が開始された。特に重要なウイルスベースのワクチンは、ウイルスの外皮由来の特定のタンパク質を含む小粒子であるウイルス様粒子(VLP)である。ウイルス様粒子は、ウイルス由来の任意の遺伝物質を含まず、感染症を引き起こすことができない一方、その外皮に腫瘍抗原を提示するように構築することができる。VLPは、例えば、B型肝炎ウイルス、又はパルボウイルス(例えばアデノ随伴ウイルス)、レトロウイルス(例えばHIV)、及びフラビウイルス科(例えばC型肝炎ウイルス)を含む他のウイルスファミリー等の種々のウイルスから誘導することができる。一般的な概説について、Sorensen and Thomsen 2007:Virus-based immunotherapy of cancer:what do we know and where are we going? APMIS 115(11):1177-93頁を参照されたい。がんに対するウイルス様粒子は、Buonaguroら、2011:Developments in virus-like particle-based vaccines for infectious diseases and cancer. Expert Rev Vaccines 10(11):1569-83頁;及びGuillenら、2010:Virus-like particles as vaccine antigens and adjuvants:application to chronic disease, cancer immunotherapy and infectious disease preventive strategies. Procedia in Vaccinology 2(2), 128-133頁に概説されている。

10

20

20

【0323】

12. マルチエピトープ戦略

マルチエピトープの使用は、ワクチン接種のための有望な結果を示す。インテリジェントアルゴリズムシステムと組み合わせた高速配列決定技術は、腫瘍ミュータノーム(mutanome)の利用を可能にし、本発明と組み合わせることができる個別化ワクチンのためのマルチエピトープを提供する。更なる情報について、2007:Vaccination of metastatic colorectal cancer patients with matured dendritic cells loaded with multiple major histocompatibility complex class I peptides. J Immunother 30:762-772頁;更にCastleら、2012:Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Cancer Res 72(5):1081-91頁を参照されたい。

30

【0324】

13. 養子T細胞移入

例えば、腫瘍抗原ワクチン接種とT細胞移入との組合せが、Rapoportら、2011:Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. Blood 117(3):788-97頁に記載されている。

40

【0325】

14. ペプチドベースの標的療法

ペプチドは、細胞表面受容体又は腫瘍の周囲の罹患細胞外マトリックスに結合することができる。ペプチドに付された放射性核種(例えば、RGD)は、核種が細胞の近くで崩壊する場合、最終的にがん細胞を死滅させる。特に、これらの結合モチーフのオリゴ又は多量体は、増強された腫瘍特異性及びアビディティを導くことができるので非常に興味深い。非限定的な例として、Yamada 2011:Peptide-based cancer vaccine therapy for prostate cancer, bladder cancer, and malignant glioma. Nihon Rinsho 69(9):1657

50

-61頁を参照されたい。

【0326】

15. 他の治療法

相乗効果を奏するために、本発明の製剤及び方法と組み合わせができる多くの他のがん治療法がある。非限定的な例には、アポトーシスを標的とする処置、温熱療法、ホルモン療法、テロメラーゼ療法、インスリン増強療法、遺伝子療法及び光線力学療法が含まれる。

【0327】

本発明を以下の実施例で更に例証するが、これらは本発明の範囲を限定するものと解釈されない。

10

【実施例】

【0328】

(実施例1)CLDN6及びCD3(CLDN6 × CD3)を標的とする二重特異性抗体誘導体の生成、精製及び分析

a. 配列の起源、bstb構築物の設計、及び発現ベクターへのクローニング

二重特異性キメラTriMAB(bstb)構築物を、定常領域のC末端に2つの一本鎖可変断片(scFv)を有する抗原結合断片(Fab)として設計した。Fab結合ドメインは、ヒトT細胞受容体成分CD3に特異的である。抗CD3重鎖可変領域(VH)及び対応する軽鎖可変領域(VL)ドメインは、マウスIgG TR66に由来する(Lanzavecchia und Scheidegger 1987)。114位のシステイン(IMG命名法による)は、セリンによって置換されている。重鎖定常領域(CH1)及び軽鎖定常領域(CL)は、ヒト起源である。カッパ型軽鎖定常領域を我々の構築物のために選択する。2つのscFv結合部分は、ヒト腫瘍関連抗原(TAA)CLDN6について特異的である。対応するVH及びVL領域は、キメラIgG1 IMAB206-SUBW(Ganymed Pharmaceuticals AG社、Mainz、Germany)に由来する。図18は、本発明の過程で使用したVH及びVLドメインのアミノ酸配列を示す。

20

【0329】

CH1領域の異なる2つのbstb分子を生成した。bstb_369/367は、ヒトIgG1由来のCH1領域を有し、bstb_371/367は、ヒトIgG2由来のCH1領域を有する。異なるサブクラスのCH1及びCLによる異なるジスルフィド結合形成のため、ヘテロ二量体形成の比較が合理的であった(Rothlisbergerら、2005)。カッパ型CLの配列がIgG1及びIgG2で保存されているので、同じCL構築物を、2つの構築物の形成のために使用した。bstb分子の形成について、タンパク質レベルで以下の分子が取得された:

30

bstb_369/367:

N-VH CD3-CH1(IgG1)-VH CLDN6-VL CLDN6-6xHisタグ-C (Fd bstb_369/367)
N-VL CD3-CL-VH CLDN6-VL CLDN6-Strepタグ-C (L bstb_369/367)

bstb_371/367:

N-VH CD3-CH1(IgG2)-VH CLDN6-VL CLDN6-6xHisタグ-C (Fd bstb_371/367)
N-VL CD3-CL-VH CLDN6-VL CLDN6-Strepタグ-C (L bstb_371/367)

【0330】

CはC末端、CHは重鎖定常領域、CLは軽鎖定常領域、Fdは可消化断片(Fabの重鎖部分)、LはFabの軽鎖部分、NはN末端、VHは重鎖可変ドメイン、VLは軽鎖可変ドメインである。

40

【0331】

Table 1(表1)に、本発明の過程で生成されたTAA CLDN6に特異的なBSTB構築物についての情報をまとめた。bstb構築物断片を、GeneArt Stringとして、対応するIgG抗体のVH及びVL配列並びに保存されたヒトCH及びCL配列を使用して、GeneArt AG(GeneArt/Thermo Fisher Scientific社、Regensburg、Germany)による遺伝子合成によって生成した。CHOコドン最適化は、GeneArt社のGeneOptimizer(登録商標)ソフトウェアによって実施した。特異性、モノクローナル抗体(mAB)からの配列の起源、コドン使用頻度最適化のためのパラメータ、及び追加的な配列特徴に関する情報をTable 1(表1)に列挙する。標的細胞結合部分の可変ドメインをコードする配列は、元々はGanymed Pharmaceuticals

50

cals AG社から得た。

【 0 3 3 2 】

DNAクローニング及び発現ベクター構築を、当業者に公知のSeamless PLUS Cloning and Assembly Kit(GeneArt/Thermo Fisher Scientific社)を用いて行った。MGWSCIILFLVATATGVHSをコードするヒトIgG分泌シグナル配列を、培養培地へのタンパク質分泌のために、Fd-及びL-bstb V-領域配列の5'端上流に導入した。抗TAA scFvの組成のために、20個のアミノ酸(AA)フレキシブルグリシン-セリン(G-S)ペプチドリンカー((GGGS)4)をコードする配列を挿入してVH及びVLドメインを連結した。VH及びVLドメインごとに、システインにそれぞれ1つの置換を導入し、scFv-安定ジスルフィド架橋を形成した。一方のscFvドメイン配列を、18個のAAリンカー(SGPGGGRS(GGGGS)2)をコードする配列によってFd部分(CH1のC末端)に連結し、他方のscFvを、6つのAAリンカー(DVPGGS)をコードする配列によってL部分(CLのC末端)に連結した。異なるリンカー長により、Fd部分とL部分とを大きさによって識別することを可能にした。6xHisタグ配列をFd-scFv部分の3'端へ、及びStrepタグをL-scFv部分の3'端へ加え、第1世代の純粋なヘテロ二量体bstbの精製を容易にした。Table 2(表2)に、bstbタンパク質をコードするDNA配列の全長を示す。Table 3(表3)に、参照として使用した二重(scFv)2をコードするDNA配列を示す。

10

【 0 3 3 3 】

bstb抗体構築物を、標準的な哺乳類pCEP4をベースとする発現ベクター(Invitrogen/Thermo Fisher Scientific社、Darmstadt、Germany)にクローニングし、NaeI及びPmlIによって切断して、平滑末端線状プラスミドを得た。C末端6xHisタグ及びStrepタグを、タンパク質の親和性クロマトグラフィー精製のため及び検出目的のために用いた。タグ無し構築物を、同様に生成した。全ての構築物を、外部のシーケンシングサービスによって検証した。構築及びタンパク質スキーマは、図1に示す通りである。

20

【 0 3 3 4 】

【表 1】

Table 1:CLDN6×CD3-bstb抗体の特徴の概要

内部名	特異性	ScFv VH-VL領域の起源	Fab VH-VL領域の起源	コドン使用頻度	CH1	タグ	scFv部分のds架橋
Bstb_369/367 (配列番号14/16)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp	+
Bstb_371/367 (配列番号15/16)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp	+
Bstb_5726/5725 (配列番号17/19)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	-	+
Bstb_5727/5725 (配列番号18/19)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	-	+

30

bstbは二重特異性TriMAB、Cはシステイン、CH1は重鎖(heavy)定常領域1、CGはチャイニーズハムスター(Cricetus griseus)、IMABはidealモノクローナル抗体、Hisは6xHisタグ、HSはホモ・サピエンス(Homo sapiens)、IgGは免疫グロブリンG、Sはセリン、StrpはStrepタグ、Wはトリプトファンを示す。

40

【 0 3 3 5 】

50

【表 2 A】

Table 2: CLDN6×CD3-bstb DNAコード配列

プラス ミド 内部名	対応する bstb 断片	DNA コード配列
#367	L bstb_369/367, L bstb_371/367	<p>ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCGCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCTCCTCCGTGTCCCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCTCCAACCCCCCTGACCTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAACTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCTGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCCTCAACCAGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCTGAGCTGGTG AAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGCTACAGCTT CACCGGCTACACCATGAACTGGTAAAACAGAGGCCACGGCAAGTGCCTGG AATGGATCGGCTGATCAACCCCTACAACGGCGCACCATCTACAACCAAG AAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGC CTACATGGAACTGCTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTACTACT GCGCCAGAGACTACGGCTCGTGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACC CTGACAGTGTCTAGCGGAGGCAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGG CGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCT CCATCATGTCCGTGTCTCCGGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCTCCGCC TCCTCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTCCAGCAGAGCGCCGGCACCTC CCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCTCCGGCGTGGCGG CCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCAAGCTACTCCCTGACCATCTCC AGAGTGGCCGCGAGGACGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGTCCAA CTACCCCCCTGGACCTTGGCTGCCGCACCAAGCTGGAAATCAAGTCTG CTGGAGCCACCCACAGTCGAGAAGTGA</p>

10

20

30

【0336】

40

50

【表 2 B】

#369	Fd bstb_369/367	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACAACCGACAAGTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGGCTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCAACTACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTGCCCC CCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGACCGCCGCTCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGAACTCTGGGCC TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCCTCCCTGGGACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGGCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGAGGAGGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAAACCCGGCGTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGCTACAGCTTACCGGCTACACCATGAACGGTGAAACAGAGGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGACAGAGCG GCAGCAGCACCGCCTACATGGAACTGCTGAGCCTGACCGAGCGAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCAGAGACTACGGCTCGTGTGGACTACTGGGG CCAGGGCACCACCCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGGCGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGAGCCAGATCGTGCTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCGTGTCCTCCGTCTACATGCACTGGTCCAGCAGA TACCTGCTCCGCCCTCCGTCTACATGCACTGGTCCAGCAGA AGCCCGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTCCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGGCTCCGGCACCAAGCTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCGCCGAGGACGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACACTACCCCCCTGGACCTTGCGCTGCGGCACCAAGCTG GAAATCAAGGGCGCTCCACCAACCAACTACCACTGA
		10
		20

【0337】

【表 2 C】

#371	Fd bstb_371/367	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGGCCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTGCCCC CCTTGCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCGCTCTGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACACTCTGGGCC TGACCAAGCGGGCTGACACCTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTCCAACTCGGCACCCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCAAGCCTCCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGGCTAAGTCCGCCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGAGGAGGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTAAACCCGGCGCTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTACCGGCTACACCATGAACGGTGAAACAGAGGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA GCAGCAGCACCGCCTACATGGAACGTGCTGACCGTACCGAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTCGTGTGGACTACTGGGG CCAGGGCACCACCCGTACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCGTCCTCCCGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGCTCCGCCCTCCTCCGTGTCCTACATGCACTGGTCCAGCAGA AGCCCGGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTCCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCGACTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCGCCGAGGACGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTGGCTGCGGACCAAGCTG GAAATCAAGGGCGGCTCCACCAACCACCATCACCACGTGA
		10
		20

【0338】

【表 2 D】

#5725	L bstb_5726/5725, L bstb_5727/5725	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACCTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCTCCTCCGTGTCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGCTCTCCAACCCCCGTACCTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCCGCTCTTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCTGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCGTACCCGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGGCCCTGAGCTGGT AAACCCGGCGTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGCTACAGCTT CACCGGCTACACCATGAACTGGTGAAACAGAGGCCACGGCAAGTGCCTGG AATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGACCATCTACAACCAG AAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGC CTACATGGAACCTGCTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTACTACT GCGCCAGAGACTACGGCTCGTGTGGACTACTGGGCCAGGGCACCCACC CTGACAGTGTCTAGCGGAGGCAGGAGATCTGGTGGTGGCGATCTGGCG CGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTGACCCAGTCCCCCT CCATCATGTCCGTGTCTCCCGCGAGAAAGTGACAATTACCTGCTCCGCC TCCTCCCTCCGTGTCTACATGCACTGGTCCAGCAGAAGCCGGCACCTC CCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCCTCCGGCGTGGCC CCAGATTCTCCCGAAGAGGCTCCGGCACCGACTACTCCCTGACCATCTCC AGAGTGGCCGGCGAGGACGCCACCTACTACTGCCAGCAGCGGTCCAA CTACCCCCCTGGACCTTGGCTGGCACCAAGCTGAAATCAAGTGA
		10
		20

【0339】

【表 2 E】

#5726	Fd bstb_5726/5725	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCGCTGGACAGGGCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCCCTCCGTACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGGCCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTCCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGACCGCCGCTCTGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTCTGGCGCC TGACCAAGCGGGCTGACACCTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCTG TACTCCCTGTCCCTCCGTGGTGACCGTGCCTCCCTCCCTGGGACCCA GACCTACATGTGCAACGTGAAACCACAAGCCTCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGGCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGGC GGAGGCGGATCCGGCGAGGAGGCTGAAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTAAACCCGGCGCTAGCATGAAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTACCGGCTACACCATGAACTGGGTGAAACAGAGGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA GCAGCAGCACCGCCTACATGGAACGTGCTGAGCCTGACCAGCGAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTCGTGTGGACTACTGGGG CCAGGGCACCACCCGTACAGTGTCTAGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCGTGTCCTCCCGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGCTCCGCCCTCCTCCGTGTCCTACATGCACTGGTCCAGCAGA AGCCCGGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTCCCCGCCAGATTCTCCGGAAGAGGCTCCGGCACCGACTACTC CCTGACCATCTCCAGAGTGGCGCCGAGGACGCCACCTACTACTGCC AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTGGCTGCGGCACCAAGCTG GAAATCAAGTGA
		10
		20
		30

【0340】

【表 2 F】

#5727	Fd bstb_5727/5725	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGTAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACAACCGACAAGTCCTCCTCACCGCCTACATG CAGCTGTCCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCGTGTACTACTGCGCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTGCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCGCTCTGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTCCCTGAGCGTGTGACCGTGAGCTGAACTCTGGCACC TGACCCAGCGCGTGCACACCTCCCTGCCGTGCTGCACTCCGCGCTG TACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCTGCCTCCAACTTCGGCACCC GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGCCTAAGTCCGCCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGGC GGAGGCAGGATCCGGCGAGGAGGCTCTGAAGTGCAGCTGCAGCAGAGCGG CCCTGAGCTGGTGAACCCGGCGTAGCATGAAGATCAGCTGCAAGGCCA GCGGCTACAGCTTCACCGCCTACACCAGTGGTGAACAGAGGCCAC GGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCCTGATCAACCCCTACAACGGCGGCAC CATCTACAACCAGAAGTCAAGGGCAAGGCCACACTGACCGTGGACAAGA GCAGCAGCACCGCCTACATGGAACCTGCTGACCGTGACCAGCGAGGACAGC GCCGTGTACTACTGCGCCAGAGACTACGGCTTGGACTACTGGGG CCAGGGCACCACCCCTGACAGTGTCTAGCGGAGGGGGAGGATCTGGTGGTG GCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCCAGATCGTGTG ACCCAGTCCCCCTCCATCATGTCCTGCTCCCGCGAGAAAGTGACAAT TACCTGCTCCGCCCTCCTCCGTGTCCTACATGCACTGGTCCAGCAGA AGCCCGCACCTCCCCAAGCTGTGGATCTACTCCACCTCCAACCTGGCC TCCGGCGTGCCGCCAGATTCTCGGAAGAGGGCTCCGGCACCGACTACTC CCTGACCATCTCCAGACTGGCGCCGAGGACGCCACCTACTACTG AGCAGCGGTCCAACCTACCCCCCTGGACCTTGGCTGCGGCACCAAGCTG GAAATCAAGTGA
		10
		20
		30

【0341】

【表3】

Table 3: CLDN6×CD3-二重(scFv)₂DNAコード配列

プラス ミド 内部名	対応する二重 (scFv) ₂	DNA コード配列
#123	二重 scFv 「参照」	ATGGGCTGGCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGCCACCGCCACCGCGT GCACAGCGACATCAAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGGCCAGACCTG GGGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGAACAGCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCAGCATGCAGCTGGGTGAAACAGCGGCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCAGCCGGGCTACACCAAACATACAACCCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATG CAGCTGAGCAGCCTGACCACCGAGGACAGCGCCGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACATACAGCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCAACCC TGACAGTGTCTAGCGTGGAGGAGGAAGCGGAGGATCTGGCGGCTCTGGG GGAAGCGGTGGCGTGGACGACATCCAGCTGACCCAGAGCCCCGCCATCAT GTCTGCCAGCCCTGGCGAGAAAGTGACCATGACCTGCCGGCAGCAGCA GCGTGTCCATCATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCAAGCCCCAAG CGGTGGATCTACGACACCAGCAAGGTGGCAAGCGGCGTGCCTACAGATT CAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCTCCTACTCCCTGACCATCAGCAGCATGG AAGCCGAGGACGCCGACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCAGCAACCC CTGACCTTCGGAGCCGGACCAAGCTGGAACCTGAAGTCTGGCGGGGAGG ATCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGAGCTGGTAAACCCGGCG CTAGCATGAAGATCTCTGCAAGGCCCTCCGGCTACAGCTTACCGGCTAC ACAATGAATTGGGTGAAGCAGAGCCACGGCAAGAATCTGGAATGGATTGG CCTGATCAACCCCTACAACGGCGGACAATCTATAATCAGAAGTTAAAG GGAAGGCCACACTGACAGTGGACAAGTCCAGCTCCACAGCCTACATGGAA CTGCTGAGCCTGACCTCCGAGGACTCTGCCGTGTTACTGTGCCAGAGA CTACGGCTTCGTGCTGGATTATTGGGGACAGGGAAACAACACTGACCGTGT CCTCCGGGGAGGGGGATCAGGTGGGGAGGTAGTGGGGTGGCGGCTCT GATATCGTGTGACCCAGTCCCTAGCATCATGAGCGTGTCCCCAGCGA AAAAGTGACAATCACTTGCAAGCGCCAGCTCCTCCGTGTCTTATATGCATT GGTCCAGCAGAAGCCTGGCACATCCCCAAACTGTTAATCTACAGCACC TCCAACCTGGCTTCCGGCGTGGCGCCAGATTTCTGGCAGAGGCAGCGG CACCAAGCTACAGCCTGACAATCAGCGGGTGGCCCGAAGATGCCGCCA CATATTATTGTCAAGCAGGGAGCAACTACCCCCCTGGACATTGGGGGA GGAACAAAGCTGGAAATCAAGCACCACCAACCACCACTGA

【0342】

B. 一過性トランスフェクション及び產生

CLDN6特異的bstbタンパク質の一過性產生のために、Expi293(商標)発現系(Thermo Fisher Scientific社、Darmstadt、Germany)-ヒト胚性腎細胞株HEK293の誘導体-を製造元の取扱説明書に従って使用した。この目的のために、Expi293F(商標)細胞を、細胞培養懸濁フラスコ内のExpi293(商標)発現培地1ml当たり 2.0×10^6 個の密度で2日間、前培養した。トランスフェクションの日に、新鮮なExpi293(商標)発現培地1mlあたり 2.5×10^6 個のExpi293F(商標)細胞を、5倍体積のための容量を有する無菌エルレンマイヤーガラスフラスコに移した。Fd断片及びL断片含有pCEP4プラスミドを1:1の比率でOpti-MEM(Gibco/Thermo Fisher Scientific社)と混合した。細胞懸濁液1ml当たり1 μ gのDNA混合物をチューブ内の50 μ lのOpti-MEM中に前希釈し、細胞懸濁液1ml当たり2.7 μ lのExpiFectamine(商標)293試薬を別のチューブ内の50 μ lのOpti-MEM中に前希釈し、室温で5分間インキュベートした。続いて、前希釈したDNA混合物を、前希釈したExpiFecta

10

20

30

40

50

mine(商標)293試薬に加え、混合し、室温で20分間インキュベートした後、細胞懸濁液に添加した。細胞培養フラスコを、125rpmで、8%CO₂中37°の加湿Multitron Cellシェーカー(Infors HT社、Bottmingen、Switzerland)中で16~18時間攪拌した。次いで、細胞懸濁液1ml当たり3.9μlのエンハンサー1及び39μlのエンハンサー2を加え、細胞培養フラスコを更にインキュベートした。タンパク質を含む上清を、トランスフェクション7日後に採集した。上清を、0.22μmのNalgene Rapid Flow 90mmフィルターユニット、低タンパク質結合性(Thermo Fisher Scientific社)で濾過した。分泌タンパク質の含有量を、製造元のプロトコルに従って、Protein L Biosensors(Pall/ForteBio社、Dreieich、Germany)を使用してBLItz定量によって評価した。上清を精製するまで2~8°で保存した。

10

【0343】

c. タグ付きタンパク質bstb_369/367及びbstb_371/367の精製

タンパク質bstb_369/367又はbstb_371/367を含有する一過性トランスフェクトされたExpi293F(商標)細胞の細胞培養上清(実施例1bで記載)を、標準的手法(Coliganら、2001b)を使用して固定化金属アフィニティークロマトグラフィー(IMAC)に供した。簡潔には、10mMのイミダゾールを補充した細胞培養上清をAKTA pure 25 FPLCシステムに連結されたHisTrap HP 1mlカラム(両方ともGE Healthcare Life Sciences社、Freiburg、Germany)にロードし、洗浄緩衝液(20mMのNaH₂PO₄、500mMのNaCl、10mMのイミダゾール、pH7.5)で平衡化した。試料を1ml/分の速度でロードした。溶出緩衝液は、500mMのイミダゾール濃度によって、洗浄緩衝液とは異なっていた。10カラム体積(CV)で洗浄した後、タンパク質を0~100%溶出緩衝液の線形勾配を使用して溶出した。溶出液を、1mlの画分で1ml/分の速度で回収した。高分子量(HMW)及び単量体種(主ピーク)を回収した(図2A)。溶出されたbstbタンパク質をプールし、直ちにSlide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassette 10K MWCO(Pierce/Thermo Fisher Scientific社、Rockford、IL、USA)を使用して、137mMのNaCl、2.7mMのKCl、10mMのNa₂HPO₄、2mMのKH₂PO₄、pH7.4を含むStrep-Tactin(登録商標)結合緩衝液DPBS(Dulbeccoリン酸緩衝生理食塩水、Gibco/Thermo Fisher Scientific社)に対して透析した。IMAC主ピークからの透析bstbタンパク質を、更なるStrep-Tactin(登録商標)アフィニティークロマトグラフィー(GE Healthcare Life Sciences社)によって精製した。以下の全てのStrep-Tactin(登録商標)精製工程を1ml/分の流量で行った。

20

【0344】

Strep-Tactin(登録商標)カラムを、結合緩衝液で平衡化した後に、bstbタンパク質を適用した。bstbタンパク質の溶出は、5回のCV結合緩衝液の洗浄工程の後、2.5mMのデスチオビオチン(SigmaAldrich社、Taufkirchen、Germany)含有結合緩衝液の0~100%線形勾配によって行った(図2B)。1ml画分に溶出したbstbタンパク質をプールし、平衡化サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)HiLoad 16/600Superdex200pgカラム(GE Healthcare Life Sciences社)にサブ注入し、続いて1回のCV DPBSで定組成溶出した。溶出されたHMW及び単量体bstb種を1mlの画分に回収し(図2C)、プールした。

30

【0345】

bstb濃度を、吸光係数とProtParamツール(<http://web.expasy.org/protparam/>)を介して決定される理論的分子量を考慮してNanoDrop2000cを用いて280nmで測定することによって決定した。精製されたタンパク質を等分し、2~8°で保存した。

40

【0346】

d. タグ無しタンパク質bstb_5726/5725及びbstb_5727/5725の精製

タンパク質bstb_5726/5725及びbstb_5727/5725(実施例1bに記載)-どちらもタグ無し-を含有する一過性トランスフェクトされたExpi293F(商標)細胞の細胞培養上清を、Supracap(商標)50デプスフィルターカプセル(Pall corporation社、Crailsheim、Germany)を使用して濾過し、続けてタンパク質精製プロセスに供した。精製bstbタンパク質を、サイズ排除-高速液体クロマトグラフィー、ショートSE-HPLCによって分析した(図2D)。

50

【0347】

SE-HPLCを、サイズ排除TSKゲルG3000SWxIカラム(300×7.8mm、Tosoh Bioscience社、Griesheim、Germany)を備えたDionex Ultimate 3000(Thermo Scientific社)を使用して行った。最大で100μlを注入した。カラムを、SE-HPLC緩衝液(0.3M Na₂HPO₄、pH 7.2)でリーンスし、bstbタンパク質を定組成溶出によって分離した。

【0348】

bstb_5726/5725及びbstb_5727/5725(データ示さず)の両方を確立されたプロセスで効率的に精製することができ、単量体含量は、精製プロセス後に 93%に増加した(図2D)。単量体画分を約100%に更に濃縮するために、PBSに対して透析した試料を、最終的にHiLoad 26/600 Superdex 200pgカラム(GE Healthcare Life Sciences社)を使用する分取SECに供した。

10

【0349】

これにより、タグ無しbstbについての精製戦略を示すことができる。

【0350】

e. タグ付きタンパク質bstb_369/367及びbstb_371/367の分析

タグを有するbstbタンパク質の質及び純度を4~15%Criterion(商標)TGX Stain-Free(商標)Gel(Bio-Rad Laboratories社、Dreieich、Germany)を使用するポリアクリルアミドゲル電気泳動により試験し、次いで当業者に周知の標準的手法に従ってstain-freeゲル(図3A)及びウエスタンプロット分析(図3B)により試験した。ウエスタンプロット分析のために使用した抗体は、抗6xHisタグ(登録商標)抗体(HRP)(1:10,000、Abcam社、Cambridge、MA、USA)及びStrepMAB-Classic、HRPコンジュゲート(1:10,000、IBA GmbH社、Gottingen、Germany)であった。ゲル及びウエスタンプロット膜を、Bio-Rad社のChemidoc MP Imaging Systemで記録した。bstbタンパク質のシグナルを、内部分子量標準と比較して、還元条件下(DTT添加)で50~55kDで検出し、非還元条件下で約100kDで検出した(図3)。bstbのヘテロ二量体組成が、還元条件下でのstain-freeゲルにおけるFd及びL断片の分離によって明らかになった。

20

【0351】

精製タンパク質の凝集状態を分析SE-HPLCによって経時的に分析した。SE-HPLCは、サイズ排除TSKgel G3000SWxIカラム(300×7.8mm、Tosoh Bioscience社)を備えたAgilent 1260 Infinityシステム(Agilent Technologies社、Waldborn、Germany)を使用して行った。最大で100μlを注入した。カラムを、SE-HPLC緩衝液(0.3MのNa₂HPO₄、pH7.2)でリーンスし、bstbタンパク質を定組成溶出によって分離した。Table 4(表4)に要約したように、精製されたbstb_369/367タンパク質を6ヶ月を超える過程にわたって分析用SE-HPLCによって試験し、DPBS中2~8℃で凝集又は分解の兆しの無い高い安定性が示された。

30

【0352】

【表4】

Table 4:SE-HPLCによって分析されるbstb_369/367の安定性

DPBS中2~8℃での保存時間 [日数]	HMW [%]	単量体 [%]	LMW [%]
0	0.59	99.41	0
7	0.54	99.46	0
30	0.76	99.24	0
56	0.74	99.26	0
203	0.66	99.34	0

40

【0353】

50

これによりbstb分子の高い安定性を示すことができた。その後の精製により、100%の単量体bstb_369/367タンパク質も得られた。

【0354】

(実施例2)in vitro細胞傷害性アッセイにおけるbstb_369/367及びbstb_371/367の特異的溶解活性の決定

特異的溶解効果の決定のために、in vitroルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイを使用した。標的細胞株として、安定ルシフェラーゼ及び内因性CLDN6発現ヒト卵巣がん細胞株OV-90(ATCC CRL-11732)及び奇形癌細胞株PA-1(ATCC CRL-1572)を使用した。ヒトCLDN6-陰性乳癌細胞株MDA-MB-231(ATCC HTB-26)-この株も安定にルシフェラーゼを発現する-を、特異性(オフターゲット)対照として用いた。

10

【0355】

標準的な手順(Coliganら、2001a)に従って、健康なドナーのヒト血液(University Medicine of the JGU Mainz、Blood Transfusion Centre、Mainz、Germany)から単離したヒト末梢血単核細胞(PBMC)をエフェクター細胞として選択した。

【0356】

a. EC50の決定

高度単量体 bstb_369/367の最大半量有効濃度(EC50)の決定のために、タンパク質の滴定列をin vitroルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで試験した。

【0357】

記載された実施例では、エフェクター(E)及び標的(T)細胞をE:T比5:1で混合し、白色96ウェル細胞培養プレート(Nunclon(登録商標) Delta Surface、Thermo Scientific社、Braunschweig、Germany)に播種し、ウェル当たりの最終細胞数は、 1×10^4 個の標的細胞及び 5×10^4 個のエフェクター細胞であった。細胞を、4.85aM ~ 48.50nMの濃度範囲のbstb_369/367又はbstb_371/367タンパク質の10点10倍連続希釈列とインキュベートした。 L_{min} 及び L_{max} 値(下記参照)となるウェルに、bstbタンパク質の代わりにDPBSを補充した。

20

【0358】

細胞培養マイクロプレートを、37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。分析のために、1mg/mlのルシフェリン(BD Monolight、BD Biosciences社、Heidelberg、Germany)及び50mMのHEPESを含む50μlの水溶液をウェルごとに加え、その後プレートを37℃で暗所で30分間インキュベートした。ルシフェラーゼを発現している生細胞によってルシフェリンの酸化から生じる発光を、Infinite M200 Tecanマイクロプレートリーダー(Tecan社、Mannedorf、Switzerland)で測定した。特異的標的細胞溶解のパーセンテージを以下の式によって計算した:

30

$$\% \text{特異的溶解} = [1 - (発光試験試料 - L_{max}) / (L_{min} - L_{max})] \times 100$$

式中、「L」は溶解を示す。 L_{min} はbstbが存在しない状態での最小溶解での発光を示し、 L_{max} は、bstbが存在しない状態でTriton X-100(2%最終濃度)を加えることによって達成される最大溶解での発光(自発発光カウントに等しい)を指す。

【0359】

EC50値を、PRISM6ソフトウェア(GraphPad Software社、San Diego、California、USA)に統合したシグモイド用量応答アルゴリズム(log(アゴニスト)対応答-可変勾配(3つのパラメータ)を使用して計算した。

40

【0360】

CLDN6陽性OV-90細胞に対してbstb_369/367の決定されたEC50は39.71pMであり、したがって117.00pMであるbstb_371/367のEC50の3分の1であった(図4A)。CLDN6陰性対照細胞株MDA-MB-231では溶解は観察されなかった。このアッセイの結果は、ヒトPBMCの効力に強く依存し、他からも報告されているように、ドナーの免疫状態に従って変化する(例えば、Lutterbueseら、2010を参照)。従って、8人の異なるPBMCドナーを使用して、bstb_369/367タンパク質のEC50値の範囲を0.98fM ~ 39.71pMと決定した(データ示さず)。

50

【0361】

b. bstb_369/367とCLDN6 × CD3二重(scFv)₂との比較

二価のCLDN6結合bstb_369/367を、高度単量体(99.5%)の社内生成したCLDN6 × CD3二重(scFv)₂(BioNTech AG社、Stadlerら、2015)と比較して、溶解効力に対する二価抗腫瘍標的化の有益なアビディティー効果を調べた。

【0362】

この目的のために、bstb及び二重(scFv)₂を等モル濃度で使用し、溶解効果を、基本的に実施例2aに記載されるように、細胞傷害性アッセイでPA-1、OV-90及びMDA-MB-231に対して試験した(図4B)。PA-1細胞は、24時間のみ同時インキュベートした。驚くべきことに、bstb_369/367媒介PA-1細胞死滅は、PA-1に対して使用される最も低い濃度の0.24pMで58%であり、一方で二重(scFv)₂参照は、0%死滅で開始する溶解曲線を示した。OV-90の場合、二重(scFv)₂と比較したbstb_369/367のより高い効力が、bstbの55分の1のEC50によって明らかになった。両方の分子がオフターゲット溶解効果を示さなかった。したがってbstb分子による二価CLDN6結合は、二重(scFv)₂分子による一価CLDN6結合と比較して、標的細胞死滅潜在性を強く向上させる。

10

【0363】

C. 溶解活性に対するbstb_369/367高分子量種の影響の調査

二量体又は多量体等のHMW種は、対応する抗原に対する多価性のために単量体種と比較して様々な活性を奏しうる。分子はその単量体の状態で安定であることが示されているが、HMW種の活性に対する影響を、更なる安全性側面のために試験した。

20

【0364】

この目的のために、HMW種を精製手順の間に回収し、SECによって濃縮し、単量体調製物にスパイクして、5%の規定量とした。続いて、5%HMW種を補充した99.3%単量体及び94.3%単量体を、実施例2aに記載される通りであるが15点20倍連続希釈列として、細胞傷害性アッセイで比較した。PA-1及びOV-90を標的細胞として用いた。bstb_369/367との同時インキュベーションを、やや感受性である細胞株PA-1で16時間実施し、より頑丈な細胞株OV-90と48時間実施した。EC50値を、図4Cに示すように、PRISM6ソフトウェア(GraphPad Software社)に統合したシグモイド用量応答アルゴリズム(log(アゴニスト)対応答-可変勾配(4つのパラメータ))を使用して計算した。5%HMW bstb_369/367試料の計算されたEC50は、PA-1の場合は1.5倍高く、OV-90の場合は2.3分の1であった。したがってPA-1でわずかな活性の低下が観察され、OV-90でわずかな活性の増加が観察された。全体として、5%HMW種の活性に対する影響は小さく、標的細胞株及び/又はインキュベーション時間に依存しうる。bstbタンパク質の安定性と幾分高い割合のHMW種の影響が低い点で、bstb分子は、治療製品開発のために適格である。

30

【0365】

d. bstb_369/367とタグ無しバリアントbstb_5726/5725及びbstb_5727/5725との比較

タグ無しbstbバリアントを、細胞傷害性アッセイで評価し、bstb_369/367と比較した。更に、活性に対するHMW種の影響を試験した。アッセイのセットアップは、実施例2cに記載される通りであるが、試験アイテムは10点5倍連続希釈で、CLDN6+標的細胞としてOV-90のみに適用した。

40

【0366】

bstb_369/367及びそのタグ無しアナログbstb_5726/5725(99.9%単量体)は、約9.3pMのEC50値で等しい溶解効率を示した(図4D、左のプロット)。5%HMWは、1.4分の1のEC50値を導いた。CH1(IgG2)保有バリアントbstb_5727/5725(100%単量体)のEC50は、参照bstb_369/367より約1.6倍高く、実施例2aのタグ無しバリアントについても示されているように、このバリアントのわずかに低い効力が確認された。bstb_5727/5725に対して、5%HMWは、その効力にほとんど影響しなかった(図4D、右のプロット)。この例示的試験で、スパイクしたHMWでのEC50は、単量体での場合と比較して1.1分の1にすぎなかった。

50

【 0 3 6 7 】

結論として、タグ付き及びタグ無しCH1(IgG1)保有bstbは、その機能において同等であり、CH1(IgG2)保有bstbと比較してわずかに高い効力を示す。HMW種の影響は、両方のバリエントに対して低い。

【 0 3 6 8 】

(実施例3)bstb_369/367及びbstb_371/367によって媒介されるT細胞調節bstb_369/367及びbstb_371/367によって媒介されるT細胞の調節、詳細にはT細胞の活性化及び増殖を、同じ標的細胞株で実施例2の記載と同様のセットアップで調べた。簡単に述べると、CLDN6⁺標的細胞OV-90及びPA-1並びにCLDN6⁻MDA-MB-231対照細胞を、24ウェルプレートの0.5ml完全培地中にE:T比5:1でヒトPBMCと共に播種した。標的依存性を更に確認するために、PBMCを標的細胞無しでbstbタンパク質と共に同時インキュベーションした。bstbタンパク質bstb_369/367及びbstb_371/367を0.005~5,000ng/mlの濃度範囲で4点100倍連続希釈列で加えた。陽性対照として、100ng/mlの、標的非依存性T細胞細胞活性化マウスIgGであるヒト抗CD3 IgG2aクローンOKT3(BioXCell社、West Lebanon、NH、USA)を適用した。陰性対照としてDPBS、bstb緩衝液を加えた。

10

【 0 3 6 9 】**a. T細胞活性化**

エフェクター細胞及び標的細胞をbstbと48時間、同時インキュベートした。PBMCを採集し、丸底96ウェル(Fisher Scientific社、Schwerte、Germany)に移し、遠心分離し、洗浄した。細胞を、抗ヒト蛍光標識抗体抗CD5-PE-Cy7(Abcam社)、CD69-APC、CD25-PE(BD Biosciences社)及び生/死色素eFluor506(eBioscience社、Frankfurt am Main、Germany)で染色した。試料をBD FACSCantollで測定し、10,000個のCD5⁺シングルレット生リンパ球を記録した。データをFlowJo software V10(Tree Star社、San Carlos、CA、USA)及びMicrosoft Excel 2010(Microsoft社、Deutschland GmbH、Unterschleißheim、Germany)で分析した。mock試料からのバックグラウンドシグナルを差し引いた。

20

【 0 3 7 0 】

図5Aに示すように、両方のbstbが、強力なCLDN6依存性T細胞活性化を媒介する。48時間後、T細胞は、初期活性化マーカーCD69及び後期活性化マーカーCD25について二重陽性の高いパーセンテージであり、CD25のみ陽性のT細胞が無いことによって決定される中間の活性化段階にある。データは、bstb濃度が低いほど、活性化状態が初期であることを更に示す。5,000ng/mlの高濃度でのみ、bstbタンパク質は、測定可能な標的非依存性T細胞活性化を導き、この活性化は5.5%未満であった。bstb_369/367は、標的依存性T細胞活性化の媒介で、bstb_371/367よりもわずかに高いが有意ではない効力を示している(Table 5(表5)も参照)。

30

【 0 3 7 1 】

40

50

【表5】

Table 5: bstb_369/367及びbstb_371/367によるT細胞活性化

細胞株	PA-1-SC12				OV-90-SC12				MDA-MB-231				標的細胞無し			
CLDN6発現	+				+				-				-			
試験アイテム	Bstb_369/367		Bstb_371/367													
濃度(ng/ml)	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000	0.5	5000
全活性化(%)	67.1	70.6	60.4	70.9	17.4	83.1	2.8	80.1	0.0	4.2	0.5	3.8	1.4	4.4	0.6	5.4
CD69 ⁺ /CD25 ⁻ [%]	33.6	25.0	43.6	27.2	16.2	15.7	2.8	18.8	0.0	3.6	0.4	3.5	1.1	3.4	0.6	3.9
CD69 ⁺ /CD25 ⁺ [%]	33.5	45.6	16.9	43.7	1.2	67.4	0.0	61.2	0.0	0.3	0.0	0.3	0.2	0.2	0.0	0.2
CD69/CD25 ⁺ [%]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.3	0.1	0.0	0.0	0.8	0.0	1.3

【0372】

b. T細胞増殖

PBMCを、セットアップをアッセイする前に、製造業者のプロトコルに従って、CellTrace[®] CFSE Cell Proliferation Kit(Thermo Fisher Scientific社、Darmstadt、Germany)を用いて標識した。エフェクター細胞及び標的細胞をbstbと72時間、同時インキュベートした。PBMCを、実施例3.a.で記載したように採取した。細胞を、抗ヒト蛍光標識抗体抗CD5-APC(BD Biosciences社)及び生/死色素eFluor506(eBioscience社)を用いて染色した。試料をBD FACSCantollで測定し、10,000個のCD5+シングレット生リンパ球を記録した。データをTree Star社のFlowJo software V10及びMicrosoft Excel 2010で分析した。

【0373】

図5Bに示されるように、両方のbstbが、細胞分裂を示すCFSE陽性消色によって決定される強力なCLDN6依存性T細胞増殖を媒介する。PA-1の存在下で、強い増殖の観点で2つのbstb分子の効力の明らかな違いは決定することができなかった。またOV-90の存在下でのT細胞活性化で見られるように、bstb_369/367媒介効果はbstb_371/367より強力であった。非特異的又は標的非依存性T細胞増殖は検出されなかった。

【0374】

まとめると、両方のbstb分子が、厳密に標的依存性で強力にT細胞調節を媒介する。

【0375】

(実施例4)bstb_369/367及びbstb_5726/5725のCLDN6への結合

二重(scFv)₂参照タンパク質、bstb_369/367及びそのタグ無しアナログbstb_5726/5725の相対結合親和性を、フローサイトメトリー分析を使用して決定した。内在的にCLDN6を発現するPA-1細胞を、0.05%トリプシン/EDTA用いて採取し、PBSで洗浄し、FACS緩衝液(2%FCS及び0.1%アジュバントリウムを含有するPBS)中に 2×10^6 細胞/mlの濃度で再懸濁した。100 μlの細胞懸濁液を、FACS緩衝液で希釈(11点2倍連続希釈9.77 ~ 10,000ng/ml)した異なる抗体のそれぞれの濃度系列とインキュベートし、4 ℃で45分間インキュベートした。続いて細胞を、FACS緩衝液で3回洗浄し、4 μg/mlの濃度でSquarix(Squarex Biotechnology社、Marl、Germany)によりFITCとコンジュゲートしたタンパク質L(Pierce/Thermo Scientific社)と4 ℃で45分間インキュベートした。その後、細胞を2回洗浄し、100 μlのFACS緩衝液に再懸濁した。結合は、BD FACSArray(BD Biosciences社)を使用してフローサイトメトリーによって分析した。最大半量結合のEC50をGraphPad Prism 6 One siteを使用して決定した-特異的結合。

【0376】

一価のCLDN6結合部位を有する二重(scFv)₂タンパク質は、低い相対結合親和性を示した(EC50:約150nMに対応する約8.3 μg/ml)。比較して、bstb_369/367及びbstb_5726

/5725は、約19nMに対応する約1.9 μg/mlの濃度で最大半量結合を示し、したがって相対結合親和性は、二重(scFv)₂参照タンパク質と比較して約8倍高かった(図6A)。このことは、標的CLDN6への結合が二価の結合部位の使用によって強く改善され、従ってアビティ効果を実装することによって結合親和性を増加させることを示す。注目すべきことに、タグ付き及びタグ無しbstbの結合曲線は一致している。

【0377】

我々は更に、bstb_5726/5725単量体の結合特性に対するHMW種の影響を、4 μg/mlの濃度でタンパク質L-FITCを使用して、又は第2の検出試薬として6 μg/mlの濃度でPE-コンジュゲートマウス抗ヒトIgG(Fab領域)抗体(antikoerper-online社、Aachen、Germany)を使用して、フローサイトメトリーで分析した。最大半量結合のEC50は、100%単量体、97%単量体/3%HMW及び95%単量体/5%HMWの間で差が無かった(第2の検出試薬に応じて28nMと31から34nMとの間で変動)。図6Bにおいて、タンパク質L-FITCによる検出のみを例示的に示す。これらのデータは、5%HMWが、bstb_369/367分子の活性に関連する影響を有さず、したがって製品開発のためにこのフォーマットが有利であることを明確に示す、細胞傷害性アッセイによるデータ(実施例2c参照)と一致している。

10

【0378】

(実施例5)マウス異種移植モデルにおける有効性

タンパク質bstb_369/367 *in vivo*の治療効力の調査のために、免疫不全マウス系統NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1Wjl/SzJ又はショートNSG(Jackson laboratory社、Bar Harbor、ME、USA)を選択した。全てのマウスは、ヨハネス・グーテンベルク大学(Johannes Gutenberg University、Mainz、Germany)の施設内動物管理委員会からのガイドラインに従って使用した。

20

【0379】

a. タンパク質bstb_369/367を用いたマウスにおける高度CLDN6発現腫瘍の処置

典型的試験では、8週齢で体重21から36gの雄及び雌のNSGマウスを使用した。CLDN6陽性OV-90細胞を腫瘍細胞として用い、PBMCをエフェクター細胞として用いた。

【0380】

5×10^6 腫瘍細胞を皮下(s.c.)接種し、その8日後、 1×10^7 PBMCを腹腔内(i.p.)投与した。PBMC生着マウス-PBMC注射の5日後に末梢血で分析-のみを腫瘍体積及び性別(全ての群で両方の性別)に従って群に層別化した。処置は群ごとに約30mm³の平均腫瘍体積で開始した。マウスを、ビヒクル(DPBS)、31 μg/kgのbstb(低用量)又は308 μg/kgのbstb(高用量)でi.p.注射により週に3回(月-水-金)処置した。群「G1-ビヒクル」は4匹のマウス(n=4)で構成し、「G2-bstb_369/367(低用量)」は8匹のマウス(n=8)で構成し、「G3-bstb_369/367(高用量)」は9匹のマウス(n=9)で構成した。処置群をTable 6(表6)にまとめる。投与は、腫瘍体積読み出しに応じて、連続した5週間(G1)、6週間(G2)又は4週間(G3)、腹腔内に行った(図7A)。週に2回、腫瘍の大きさを、デジタル較正ノギスで測定し、腫瘍体積は、式:腫瘍体積[mm³]=長さ[mm] × (幅[mm])²/2によって計算した。腫瘍体積が1500mm³に達したとき又は重度の病的状態(主に移植片対宿主病(GVHD)の症状)の場合に、マウスを頸椎脱臼により殺した。

30

【0381】

図7Bに、bstb処置群G2及びG3の全てのマウスの腫瘍成長の阻害を示す。抗腫瘍有効性を、ビヒクル対照G1と比較した腫瘍成長阻害/除去及び生存として測定した。試験アイテムbstb_369/367での処置は、対照群とは対照的に、両方の投与群における腫瘍の除去をもたらした。bstb_369/367高用量群(G3)の9匹のマウス全てが7回の注射後に腫瘍が無かった。bstb_369/367低用量群(G2)の8匹のマウス全てが、15回の注射後に腫瘍が無かった。腫瘍の無いマウスは、GVHD症状が発生するまで、腫瘍の再発について観察した。腫瘍再発の発生は、この期間で記録されなかった。

40

【0382】

カプラン・マイヤー生存プロット(図7C)作成のため、治療開始の日を0日とみなした。ペアワイズ比較のためのマンテル-コックスログランク検定と組み合わせたカプラン・マイヤ

50

一生存の統計によって決定されるように、両方のbstb_369/367処置群の生存は、対照群G1と比較して有意に延長された。G2のG1に対する比較では、p=0.0001のp値が得られ、G3のG1に対する比較ではp=0.0043が得られた。生存期間中央値は、対照群G1で31日間であり、処置群G2及びG3でそれぞれ52及び42日間であった。まとめるに、bstb_369/367は、腫瘍除去の観点で非常に効率的であり、更に、このGVHD制限マウスモデルの生存の観点で有益であることが実証された。

【0383】

【表6】

Table 6: 処置群

処置群(G)	マウスの数(n)	腫瘍細胞	エフェクター細胞	Bstbタンパク質	Bstbタンパク質の用量[μ g/kg]
G1	4	OV-90	PBMC	-	0
G2	8	OV-90	PBMC	369/367	31
G3	9	OV-90	PBMC	369/367	308

【0384】

b. 体重に対する治療の影響の決定

各マウスの体重を、実験室のスケールを使用して1週間に2回検査した。いずれの群のマウスも、処置の期間にわたり有意な体重減少を示さなかった(データ示さず)。

【0385】

c. 脾細胞の単離

マウスを安樂死させた後、脾臓を切開して、フローサイトメトリー分析によってヒト細胞の生着を検出した。脾細胞の単離は、脾臓切開の直後に3~5mlのシリジンの滅菌プランジヤを用いて50mlの反応チューブへ70 μ mの配置セルストレーナーを通して脾臓を叩解し、RT DPBSでの細胞ストレーナーを繰り返しフラッシングして行った。単離された脾細胞を遠心分離し、DPBSをデカントし、脾細胞ペレットを、10%DMSOを補充した1mlの熱不活性化ウシ胎児血清中に再懸濁した。試料を、直ちに-65~-85 $^{\circ}$ で凍結し、全てのマウスからの脾細胞試料が完了するまで保存した。

【0386】

d. マウス脾臓におけるヒトTリンパ球の生着の分析

完全に回収した脾細胞試料を、一度解凍し、全ての細胞を温めたDPBSで2回洗浄し、試料あたり 1×10^6 個の脾細胞を蛍光標識抗体(BD Biosciences社)と暗所で20分間4 $^{\circ}$ でインキュベートし、抗hCD45-APC染色によってヒト細胞の生着を検出し、抗hCD3-FITC染色によってヒトT細胞のパーセンテージを検出する。フローサイトメトリー分析を、FACSCant II(BD Biosciences社)を用いて行った。ヒトT細胞生着は、hCD45/hCD3二重陽性シングレット脾細胞の50~95%のパーセンテージによって確認することができた(データ示さず)。

【0387】

(実施例6)免疫不全マウスにおける薬物動態挙動の推定

マウスにおけるbstb_369/367タンパク質の適切な半減期及びクリアランスを決定するために9~49週齢の雌NSGマウスを使用した。5mg/kgの高度単量体(100%)bstb_369/367を含むDPBSを、マウスごとにi.p.注射した。血液回収の1つの時間点に対応する群の大きさは、各群あたり3匹のマウスで構成した。基本値(「注射後時間」=0時間)として1つの群をビヒクリ緩衝液(DPBS)のみで注射した。血液回収のための更なる時間点を、15分、1時間、2時間、3時間、6時間及び8時間に設定した。血液をLi-ヘパリンチューブ(Microvette 300 LH、Sarstedt社、Nurnbrecht、Germany)に直接回収し、血漿を、当業者に既知のように遠心分離によって分離した。血漿を採取し、直ちに液体窒素で急速凍結し、

10

20

30

40

50

使用まで-65~-85 で保存した。

【0388】

ELISAを行って、血漿中のbstb_369/367を定量した。この目的のために、各群の血漿アリコートを室温で解凍し、PBS/0.2%BSAで希釈した。希釈したbstb_369/367含有血漿及びbstb_369/367タンパク質を標準系列(0.39ng/ml~3.41μg/ml)として、ヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂抗体(Abd Serotec社、Oxford、UK)で被覆されたMaxiSorp(商標)プレート(Thermo Scientific社)に加え、3%ミルクでブロッキングした。洗浄工程の後、bstb_369/367の抗CLDN6結合部位に特異的なマウスIgG(Ganymed Pharmaceuticals Ag社)を3.5μg/mlの濃度でインキュベートし、その後、洗浄工程、及びアルカリホスファターゼコンジュゲートヤギ-抗マウスIgG(Fc)抗体(Dianova、Hamburg、Germany)の1:500希釈液とのインキュベーションを続けた。最後に4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム塩6水和物、短PNPP(PanReac AppliChem社、Darmstadt、Germany)をアルカリホスファターゼの基質として加え、30分後に反応を3Mの水酸化カリウムで停止させた。ELISAを405/492nmでマイクロプレートリーダーM200Pro(Tecan社)で測定した。bstb_369/367標準曲線に基づいて、測定吸収値を濃度値に変換した。

10

【0389】

図8に示されるように、i.p.注射後1時間以内で34μg/mlのbstb_369/367最大血漿濃度に到達した。分析終了点のi.p.注射後8時間で、bstb_369/367タンパク質は、血清中で依然として検出可能であった(8ng/ml)。

20

【0390】

長期循環が確実である患者における腫瘍標的及びT細胞への結合を考慮すると、1週間あたり1回から2回のbstb分子の注射サイクルが考えられる。

【0391】

(実施例7)タグ無しbstb_5726/5725のin vivo用量設定試験

図9Aに示されるスケジュールに従って、実施例5に記載されるように、異種移植モデルを設定した。簡単に述べると、44匹の10~36週齢の雄及び雌のNSGにOV-90(s.c.)及びヒトPBMC(i.p.)を生着させた。マウスを6匹のマウスの6つの処置群と8匹のマウスの1つのPBS対照群の7つの群に無作為化した。最適なbstb_5726/5725用量を決定するために、実施例5で使用したbstb_369/367の有効用量(約300及び30μg/kg)を上回る及び下回る濃度、詳細には、1,000μg/kg、300μg/kg、100μg/kg、30μg/kg、10μg/kg及び3μg/kgを選択した。処置の開始の日に、平均腫瘍体積は、無作為化群で、約150mm³であった。処置は、腫瘍細胞接種から28日後に開始して1週間に3回i.p.適用した。合計で11回の注射を群ごとに加えた。腫瘍はデジタルノギスで1週間に2回測定した。

30

【0392】

図9Bに示すように、腫瘍縮小率は用量と相關する。処置の開始時の約400mm³の腫瘍体積は、30μg/kgのbstb用量によってのみ除去される臨界の大きさを提示しているようである。興味深いことに、3μg/kgでも、長期的に腫瘍の成長及び大きさの減少を導き、腫瘍塊におけるbstbの蓄積効果が想定される。

【0393】

この設定では、100μg/kgが非常に効果的かつ安全な用量と決定された。1,000μg/kgの最高用量群では、皮膚の黄色化及び体重減少等の有害作用が観察された。

40

【0394】

(実施例8)CLDN18.2及びCD3を標的とする二重特異性抗体誘導体の生成、精製及び分析
a. 配列の起源、bstb構築物の設計、及び発現ベクターへのクローニング

二重特異性キメラTriMAB(bstb)構築物を、定常領域のC末端に2つの一本鎖可変断片(scFv)を有する抗原結合断片(Fab)として設計した。Fab結合ドメインは、ヒトT細胞受容体成分CD3に特異的である。抗CD3重鎖可変領域(V_H)及び対応する軽鎖可変領域(V_L)ドメインは、IgG TR66に由来する(Lanzavecchia und Scheidegger 1987)。114位のシステインは、セリンによって置換されている。重鎖定常(C_H1)及び軽鎖定常領域(C_L)は、ヒト起源である。カッパ型軽鎖(light)定常領域を我々の構築物のために選択する。2つのsc

50

Fv結合部分は、ヒト腫瘍関連抗原(TAA)CLDN18.2について特異的である。対応するV_H及びV_L領域は、NCT01630083及びNCT01671774等として現在臨床試験中であるキメラIgG1 IMAB362(Ganymed Pharmaceuticals AG社、Mainz、Germany)(例えば、Wöllら、2014)に由来する。V_H及びV_L領域の配向並びにscFv部分におけるリンカーの選択は、特許出願PCT/EP2013/003399に記載の二重(scFv)₂分子5506及び5538と相関している。図18は、本発明の過程で使用したV_H及びV_Lドメインのアミノ酸配列を示す。

【0395】

4つのbstb分子は、C_H1領域及びIMAB362scFv部分で異なる第1世代として生成した。bstb_5730/5728及びbstb_5731/5729は、ヒトIgG1由来のC_H1領域を含有し、bstb_5732/5728及びbstb_5733/5729は、ヒトIgG2由来のC_H1領域を含有する。更にbstb_5730/5728及びbstb_5732/5728は、V_H-V_Lの配向でIMAB362scFv部分を保有し、一方でbstb_5731/5729及びbstb_5733/5728は、V_L-V_Hの配向でIMAB362scFv部分を保有する。bstb分子の形成について、以下の分子が、タンパク質レベルで取得された:

bstb_5730/5728:

N-V_H CD3-C_H1(IgG1)-V_H CLDN18.2-V_L CLDN18.2-6xHisタグ-C (Fd bstb_5730/5728)

N-V_L CD3-C_L-V_H CLDN18.2-V_L CLDN18.2-Strepタグ-C (L bstb_5730/5728)

bstb_5732/5728:

N-V_H CD3-C_H1(IgG2)-V_H CLDN18.2-V_L CLDN18.2-6xHisタグ-C (Fd bstb_5732/5728)

bstb_5731/5729:

N-V_H CD3-C_H1(IgG1)-V_L CLDN18.2-V_H CLDN18.2-6xHisタグ-C (Fd bstb_5731/5729)

N-V_L CD3-C_L-V_L CLDN18.2-V_H CLDN18.2-Strepタグ-C (L bstb_5731/5729)

bstb_5733/5729:

N-V_H CD3-C_H1(IgG2)-V_L CLDN18.2-V_H CLDN18.2-6xHisタグ-C (Fd bstb_5733/5729)

【0396】

CはC末端、C_Hは重鎖定常領域、C_Lは軽鎖定常領域、Fdは可消化断片(Fabの重鎖部分)、LはFabの軽鎖部分、NはN末端、V_Hは重鎖可変ドメイン、V_Lは軽鎖可変ドメインを示す。

【0397】

Table 7(表7)に、本発明の過程で生成されたTAA CLDN18.2に特異的なbstb構築物についての情報をまとめた。特異性、モノクローナル抗体(mAB)からの配列の起源、コドン使用頻度及び更なる配列特徴に関する情報を列挙する。標的細胞結合部分の可変ドメインをコードする配列は、元々はGanymed Pharmaceuticals AG社から得た。

【0398】

DNAクローニング及びpCEP4発現ベクター構築は、GeneArt(GeneArt/Thermo Fisher Scientific社)によって実施した。MGWSCIILFLVATATGVHSをコードするヒトIgG分泌シグナル配列を、培養培地へのタンパク質分泌のために、Fd-及びL-bstb V-領域配列の5'端上流に導入した。V_H-V_Lの配向の抗TAA scFvの組成のために、20個のアミノ酸(AA)フレキシブルグリシン-セリン(G-S)ペプチドリンカー((GGGGS)₄)をコードする配列を挿入してV_H及びV_Lドメインを連結し、一方、V_L-V_Hの配向の抗TAA scFvの組成のために25個のAAフレキシブル(GGGGS)₅-ペプチドリンカーを挿入した。一方のscFvドメイン配列を、18個のAAリンカー(SGPGGGRS(GGGGS)₂)をコードする配列によってFd部分(C_H1のC末端)に連結し、他方のscFvを、6つのAAリンカー(DVPGGS)をコードする配列によってL部分(C_LのC末端)に連結した。異なるリンカー長により、Fd部分とL部分とを大きさによって識別することを可能にした。6xHisタグ配列をFd-scFv部分の3'端へ、及びStrepタグをL-scFv部分の3'端へ加え、第1世代の純粋なヘテロ二量体bstbの精製を容易にした。Ta

10

20

30

40

50

ble 8(表8)に、bstbタンパク質をコードするDNA配列の全長を示す。Table 9(表9)に、親二重(scFv)₂及びin vitro試験で使用した参照二重(scFv)₂の、タンパク質をコードするDNA配列を示す。

【0399】

C末端6xHisタグ及びStrepタグは、タンパク質の親和性精製のため及び検出分析のために用いた。全ての構築物は、外部のシーケンシングサービスによって検証した。構築スキームは、図10Aに示す通りである。第2世代のbstbはタグ無しで設計し、ジスルフィド架橋をscFv部分に導入した。

【0400】

【表7】

10

Table 7: CLDN18.2×CD3-bstb抗体の特徴の概要

内部名	特異性	scFv VH VL領域の起源	CLDN1 8.2-scFv V _H /V _L の配向	CDLN18.2-s cFv参考二重 (scFv) ₂	Fab VH-V L領域の起源	コドン 使用頻度	CH1	タグ	scFv部分のds 架橋
Bstb_5730/5728 (配列番号30/32)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (配列番号76)	TR66(C114 S)	CG	IgG1	His/ Strp	-
Bstb_5732/5728 (配列番号31/32)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (配列番号76)	TR66(C114 S)	CG	IgG2	His/ Strp	-
Bstb_5731/5729 (配列番号33/35)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (配列番号77)	TR66(C114 S)	CG	IgG1	His/ Strp	-
Bstb_5733/5729 (配列番号34/35)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (配列番号77)	TR66(C114 S)	CG	IgG2	His/ Strp	-
Bstb_5745/5747 (配列番号36/37)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (配列番号76)	TR66(C114 S)	CG	IgG1	-	-
Bstb_5746/5748 (配列番号38/39)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (配列番号77)	TR66(C114 S)	CG	IgG1	-	-
Bstb_5749/5751 (配列番号40/41)	HS	IMAB362	V _H -V _L	5506 (配列番号76)	TR66(C114 S)	CG	IgG1	-	+
Bstb_5750/5752 (配列番号42/43)	HS	IMAB362	V _L -V _H	5538 (配列番号77)	TR66(C114 S)	CG	IgG1	-	+

CH1は重鎖(heavy)定常領域1、CGはチャイニーズハムスター、dsはジスルフィド、IMABはidealモノクローナル抗体、Hisは6xHisタグ、HSはホモ・サピエンス、IgGは免疫グロブリンG、StrpはStrepタグを示す。

20

30

【0401】

40

50

【表 8 A】

Table 8: CLDN18.2×CD3-bstb DNAコード配列

プラス ミド 内部名	対応する bstb 断片	DNA コード配列
#5728	L bstb_5730/5728, L bstb_5732/5728	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGT GCACTCTCAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCTCCTCCGTGTCCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAACCTGAAGCGGACCGTGGCGCTCCTCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTACCCCTGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCCTCACCCCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTCAACCGGGGCAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACCTGGTC CGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTT CACAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCAGCCTGGCAGGGCCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAG AAGTCAGGACAAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAGTCCTCCCTCACCGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTACTACT GCACCCGGTCCCTGGGGCAACTCCTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCCCTGACAGTGTCCCTGGAGGCAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGGGGTGGAAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGCAACCAGAAGAAACTACCTGACCTG GTATCAGCAGAAGCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGCCT CCACCCGGAGTCTGGCGTGCCTGATAGATTACCCGGCTCCGGCAGGGC ACCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCGT GTATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTCACCTTCGGCTCTGGCA CCAAGCTGGAAATCAAGTCTGCCTGGAGCCACCCACAGTTGAGAAGTGA

10

20

30

【0402】

40

50

【表 8 B】

#5729	L bstb_5731/5729, L bstb_5733/5729	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGCTACCGCCACCGCGT GCACTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCGTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCTCTCCCTCCGTGTCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAACTGAAGCGGACCGTGGCGCTCCTCCGTGT TCATCTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCCTCACCCCTGACCTGTCC AAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGACATCGTGTGATGACCCAGTCCCTCCAGCCTGACC GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCCCTCCAGTCCCT GCTGAACTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAC CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGCCTCCACCCCGAGTCT GGCGTGCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCC GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCAGGACCTGGCGTGTATTACTGTCAGA ACGACTACTCCTACCCCTCACCTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAAATC AAGGGAGGCGGTGGTTCAAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAAGCTGCAAGGCC CGGTGGCGGTTCAAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAAGCTGCAAGGCC GCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGCTCTGCAAGGCC TCCGGCTACACCTCACCAAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGGCC TGGCCAGGGCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACA CCAACATACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAG TCCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTC CGCCGTGTACTACTGCACCCGGCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATT GGGGCCAGGGCACCACCCCTGACAGTGTCTCTCTGCCTGGAGGCCACCCA CAGTTCGAGAAGTGA
		10
		20

【0403】

【表 8 C】

#5730	Fd bstb_5730/5728	ATGGGCTGGCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCTGGCGTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTGAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTCACCGG TACACCAGTGCACGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCGTACAACCGACAAGTCCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGCACGCCGCTCTGGCTGCCCTGGT GAAGGACTACTCCCTGACCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTGGGCC TGACCAGCGCGTGCACACCTCCCTGCCGTGTCAGTCTCCGCC TACTCCCTGTCCCTCCGTGGTGACCGTGCCTCCCTCCCTGGGACACCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTCCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAACGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGC GGAGGCAGGATCCGGCGAGGAGGCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG CGCTGAACGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGCTGCAAGGGCT CCGGCTACACCTCACCAAGCTACTGGATCAACTGGTCAAGCAGCGCC GGCCAGGGCTGGAATGGATCGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACAC CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAGT CCTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGCAACTCCTGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCCCTGACAGTGTCCCTGGAGGCGGAGGATCTGGT GTGGCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGT ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCGGCAGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACTGGGCTCCACCCCGAGTCTGGCGTCCCCGATAAGATTACCGG CTCCGGCAGCGGACCGACTTACCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCC AGGACCTGGCGTGTATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACC TTGGCTCTGGCACCAAGCTGGAAATCAAGGGCGGCTCCACCAACCA TCACCACTGA
		10
		20
		30

【0404】

【表 8 D】

#5731	Fd bstb_5731/5729	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGGGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGTACACCTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGGCCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGCACGCCGCTCTGGCTGCCGTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCC TGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGTCAGTCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTACCGTGCCCTCCCTCCCTGGGACCCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTCCAACACCAAGGTGGACA AGGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGC GGAGGCAGGATCCGGCGAGGGAGGCTGACATCGTGATGACCCAGTCCCC CTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGAAACTACCTGACCTGG TATCAGCAGAACGCCGGCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCC CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCTGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCGTG TATTACTGTAGAACGACTACTCCTACCCCTCACCTCGCTCTGGCAC CAAGCTGGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTCAGGGCGGAGGCAGCGGTG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGTTCAAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGTGAACCTGGCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCT GTCCTGCAAGGCCCTCCGGTACACCTCACCAGCTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGGCCCTGGCCAGGGCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCC GACCGTGGACAAGTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCAGGCC CCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAAC TCCTCGACTATTGGGGCAGGGCACCACCCGTACAGTGTCTCTTCTCA CCACCAACCATCACCACTGA
		10
		20

【0405】

【表 8 E】

#5732	Fd bstb_5732/5728	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTGCGCC CCTTGCTCCAAGTCCACCTCCGAAGGCACCGCCGCTGGGCTGCGCTGGT GAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCC TGACCAGCGCGTGCACACCTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTACCGTGCCCTCCAACTTCGGCACCCA GACCTACACCTGCAACGGACCAAGCCTCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGCCTAAGTCGCCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGGC GGAGGCAGGATCCGGCGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG CGCTGAACCTGGCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTTCACCAAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGC GGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACAC CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCGTACCGTGGACAAGT CCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCCGTACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGT ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCAGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACTGGGCTCCACCCCGAGTCTGGCGTCCCCGATAGATTACCGG CTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCTGACCATCTCAGCGTGCAAGGCC AGGACCTGGCGGTGTTACTGTCAAGAAGCAGTACTCCTACCCCTTCACC TTGGCCTGGCACCAAGCTGAAATCAAGGGGGCTCCACCAACACCA TCACCACTGA
		10
		20

【0406】

【表 8 F】

#5733	Fd bstb_5733/5729	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTCACCCGG TACACCAGTCAACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAGTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCCTACTCCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTGCTCCAAGTCCACCTCGAAGGCACCGCCGCTCTGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACACTCTGGCGCC TGACCAGCGCGTGCACACCTCCCTGCCGTGTCAGTCCTCCGGCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTACCGTGCCCTCCAACTTCGGCACCCCA GACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCTCCAACACCAAGGTGGACA AGACCGTGGAGGCTAAGTCGCCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGC GGAGGCGGATCCGGCGAGGGAGGCTCTGACATCGTGTGACCCAGTCCCC CTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGG TATCAGCAGAACGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTC CACCCGCGAGTCTGGCGTGCCTGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGGCGAGGACCTGGCGTG TATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTCACCTCGCTCTGGCAC CAAGCTGGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTTCAAGGGGGAGGTGGCTGCAGG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGTTCAAGGGGGAGGTGGCTGCAGGTGCAG CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACCTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCT GTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTCACCGACTACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGGCCTGGCCAGGGCTGGAATGGATGGCAACATCTACCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCC GACCGTGGACAAGTCCTCCACCGCTACATGCAAGCTGTCAGGCC CCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGCAAC TCCTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCAACCTGACAGTGTCTCTTCTCA CCACCAACCACCATCACCACTGA
		10
		20
		30

【0407】

【表 8 G】

#5745	Fd bstb_5745/5747	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCTCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCACTACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTGCCC CCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCCACGCCGCTCTGGCTGCGCTGGT GAAGGACTACTTCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCCC TGACCAGCGCGGTGCACACCTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCCTCCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTCCAACACCAAGGTGGACA AGCAGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCAGC GGAGGCGGATCCGGCGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG CGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTTCACCAAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGC GGCCAGGGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACAC CAACTACAACCAGAACGTTCAAGGACAAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAGT CCTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCCGTACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGT ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGA CATGAGCTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAACGCCGCCAGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACTGGGCCTCCACCCCGAGTCTGGCGTCCCCGATAGATTCACCGG CTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCGTACCATCTCAGCGTGCAAGGCC AGGACCTGGCCGTGTATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTTACCC TTCGGCTCTGGCACCAAGCTGAAATCAAGTGA
		10
		20
		30

【0408】

【表 8 H】

#5746	Fd bstb_5746/5748	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCAGTCAACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCAACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGACCGCCGCTCTGGCTGCGCTGGT GAAGGACTACTTCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACCTGGCGCC TGACCAGCGGGGTGACACCTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCCTCCCTGGGACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTCAACACCAAGGTGGACA AGCAGGGTGGAGGCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGC GGAGGGCGGATCCGGCGGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCCAGTC CTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGAAACTACCTGACCTG TATCAGCAGAACGCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGC CACCCCGCAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGAGGGCGAGGACCTGGCGTG TATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTCACCTCGGCTCTGGCAC CAAGCTGGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTCAGGGCGGGAGGCAGCGGTG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTCAAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCA CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCT GTCCTGCAAGGGCTCCGGCTACACCTCACAGACTGGATCAACTGGG TCAAGCAGCGGCCTGGCCAGGGCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCT GACCGTGGACAAGTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCAGCAGGCC CCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCAACCCGTGACAGTGTCCCT TCCTCGACTATTGGGGCAGGGCACCCCTGACAGTGTCCCTTTGA
		10
		20
		30

【0409】

【表 8 I】

#5747	L bstb_5745/5747	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGCCTCTCCGTGTCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCGCTCCTCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCTGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCCTCACCCCTGACCTGTCC AAGGCCACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCAGCCCTGTGACCAAGTCCCTCAACCAGGGCGAGTGTGACG TGCCCTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGTGAACGGTC CGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCCCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCTT CACCAAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCAGCCTGGCCAGGGCTGG AATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAG AAGTTCAAGGACAAGGCCACCCGTACCGTGGACAAGTCCCTCCACCGC CTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTACTACT GCACCCGGTCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCCGTACAGTGTCCCTGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGGCGTGGAAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGTGATGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAG TCCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGCAACCAGAAGAAACTACCTGACCTG GTATCAGCAGAAGCCGGCCAGCCCCCAAGCTGTGATCTACTGGCCT CCACCCCGAGTCTGGCGTGCCTGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCAGC ACCGACTTTACCCGTACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCGT GTATTACTGTAGAACGACTACTCCTACCCCTCACCTTCACCTCGGCTCTGGCA CCAAGCTGGAAATCAAGTGA
		10
		20

【0410】

【表 8 J】

#5748	L bstb_5746/5748	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACCTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCCTCCGTGTCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCGCTCCTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCGGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCTGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCCACCCCTGACCTGTCC AAGGCCACTACGAGAACGACAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGACATCGTGTGACCCAGTCCCTCCAGCCTGACCC GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCCTCCAGTCCT GCTGAACCTCGGCAACCAGAACACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAC CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGCCTCCACCGCGAGTCT GGCGTGCCCGATAGATTCACGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCC GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCAGGGACCTGGCGTGTATTACTGTCA ACGACTACTCCTACCCCTCACCTCGGCTCTGGCACCAAGCTGGAAATC AAGGGAGGCGGTTAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGC CGCTGGCGGTTAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGC CGCTGAACCTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCC TCCGGCTACACCTCACCGACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC TGGCCAGGGCTTGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGC CGCGTGAACCTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCC TCCGGCTACACCTCACCGACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCC TGGCCAGGGCTTGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGC CGCGTGAACCTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGACTATT GGGGCCAGGGCACCAACCTGACAGTGTCTCTTGA
		10
		20
		30

【0411】

【表 8 K】

#5749	Fd bstb_5749/5751	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCTGCAAGAACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCTCACCACCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCAACTACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGCCACGCCGCTCTGGCTGCGCTGGT GAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGAACTCTGGCGCCC TGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTGACCGTGCCTCCCTCCCTGGGACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGC GGAGGCGGATCCGGCGAGGAGGCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGG CGCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGAAGCTGCTGCAAGGCCT CCGGCTACACCTTACCCAGCTACTGGATCAACTGGTCAAGCAGCGCCT GGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCGACTCCTACAC CAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCCCTGACCGTGGACAAGT CCTCCCTCACCGCCTACATGCAGCTGTCAGCAGCCCCACCTCCGAGGACTCC GCCGTGTA CTACTGCACCCGGTCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATTG GGGCCAGGGCACCACCCCTGACAGTGTCTCTGGAGGCGGAGGATCTGGTG GTGGCGGATCTGGCGCGGTGGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTG ATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGAC CATGAGCTGCAAGTCCTCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGA ACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCGGCAGCCCCCAAGCTGCTG ATCTACTGGCCTCCACCCCGAGTCTGGCGTCCCCGATAGATTACCGG CTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCG AGGACCTGGCCGTATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACC TTCGGCTGCGGCACCAAGCTGAAATCAAGTGA
		10
		20

【0 4 1 2】

【表 8 L】

#5750	Fd bstb_5750/5752	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACCTCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTG GCGCCTCCGTAAAGATGTCTGCAAGACCTCCGGCTACACCTTCACCCGG TACACCATGCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCTACATCAACCCCTCCGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACAACCGACAAGTCCTCCACCGCTACATG CAGCTGTCTCCCTGACCTCCGAGGACTCCGCCGTACTACTGCGCCCG GTACTACGACGACCAACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACAC TGACAGTGTCTAGCGCTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCTCCAAGTCCACCTCCGGCGGACCGCCCTCTGGCTGCTGGT GAAGGACTACTCCCTGAGCCTGTGACCGTGAGCTGGAACACTGGGCC TGACCAGCGCGTGCACACCTCCCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCTG TACTCCCTGTCTCCGTGGTACCGTGCTCCCTCCCTGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTCAACACCAAGGTGGACA AGCGGGTGGAGCCTAAGTCCTGCTCCGGCCCTGGGGCGGACGCAGCGC GGAGGCAGGATCCGGCGAGGAGGCTCTGACATCGTGATGACCCAGTC CTCCAGCCTGACCGTGACCGTGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGT CCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAAGAAACTACCTGAC TATCAGCAGAACGCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCC CACCCCGCAGTCTGGCGTCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCA CCGACTTACCCGTGACCATCTCCAGCGTGAGGCCGAGGACCTGGCGT TATTACTGTCAGAACGACTACTCCTACCCCTCACCTCGGCTGCGGCA CAAGCTGGAAATCAAGGGAGGCGGTGGTTCAGGGGGAGGTGGCTCG GAGGTGGTAGTGGCGGTGGCGGTTCAAGGGGGAGGTGGCTCGAGGT CTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACCTGGTCCGACCTGGCGCTCCGTGA GTCCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCTCACAGCTACTGGATCAACTGG TCAAGCAGCGGCTGGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTAC TCCGACTCCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCAC GACCGTGGACAAGTCCTCCACCGCCTACATGCACTGCTCCAGGCC CCTCCGAGGACTCCGCCGTGACTACTGCAACCCGGTCTGGGGGGCA TCCTCGACTATTGGGCCAGGGCACCCCTGACAGTGTCTCTTGA
		10
		20

【0413】

【表 8 M】

#5751	L bstb_5749/5751	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACCTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCCAGCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCTCCGTGTCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCACATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCCCTCAAACCCCTGACCTTGG CGCTGGCACCAAGCTGGAACCTGAAGCGGACCGTGGCGCTCTCCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAACCTCTACCCCTGGGAGGCCAAGGTGCACTGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCCTCACCCCTGACCCCTG AAGGCCACTACGAGAACAGCACAAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGCCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCTCAACCGGGCGAGTGTGACG TGCCCTGGTGGTAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACCTGG CGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGCTCTGCAAGGCCCTCCGGCTACACCT CACCAGCTACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCGGCTGGCAGTGCCTGG AATGGATGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCAG AAGTTCAAGGACAAGGCCACCCGTACCGTGGACAAGTCCTCCACCGC CTACATGCAGCTGTCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTACTACT GCACCCGGTCCCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATTGGGGCCAGGGCACC ACCTGACAGTGTCCCTGGAGGCGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGG CGGGCGTGGAAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGTGACCCAGTCCC CCTCCAGCCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTG TCCTCCCAGTCCCTGCTGAACCTCCGGCAACCAGAACAGAACACTAC GTATCAGCAGAACGCCGGCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGC CCACCCGGAGTCTGGCGTGCCTGACCGTGGCGAGGACCTGGCG ACCGACTTTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCG GTATTACTGTAGAACGACTACTCCTACCCCTTCACCTTCCGGTGC CCAAGCTGGAAATCAAGTGA
		10
		20

【0414】

【表 8 N】

#5752	L bstb_5750/5752	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCTCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCTGCTAGCC CTGGCGAGAAAGTACAATGACCTGCCGGCCTCCTCCGTGTCTAC ATGAACCTGGTATCAGCAGAAGTCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTA CGACACCTCCAAGGTGGCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGAT GCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTG CGCTGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGCGGACCGTGGCGCTCCTCGTGT TCATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTCCGTG GTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCTGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA GGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGCAACTCCAGGAAAGCGTCACCGAGC AGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCCTCACCCGTACCCGTCC AAGGCCACTACGAGAACGACAAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCA GGGCCTGTCCAGCCCTGTGACCAAGTCCCTCAACCGGGGCGAGTGTGACG TGCCTGGTGGTAGCGACATCGTGTGACCTGACCTGGTATCAGCAGAAC GTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCCTCCAGTCCT GCTGAACTCCGCAACCAGAACACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAC CCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCGCGAGTCT GGCGTGCCGATAGATTCACGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTTACCC GACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCGTGTATTACTGTCA ACGACTACTCCCTACCCCTCACCTTCCGGCTGCACCAAGCTGGAAATC AAGGGAGGCGGTGGTTCAAGGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGC CGCCTGAACTGGTCCGACCTGGCGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCC TCCGGCTACACCTCACCAAGCTACTGGATCAACTGGTCAAGCAGCGGCC TGGCCAGTGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACA CCAACATACAACCAGAACAGTTCAAGGACAAGGCCACCTGACCGTGGACA AGTCCTCCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTC CGCCGTGTACTACTGCACCCGGTCTGGCGGGGCAACTCCTCGACTATT GGGGCCAGGGCACCACCCGTACAGTGTCTCTTGA	10
			20
			30

【0415】

【表 9 A】

Table 9: CLDN18.2×CD3-二重(scFv)₂ DNAコード配列

プラス ミド 内部名	対応する二重(scFv) ₂	DNA コード配列
#5506	二重 scFv_5506	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACCTCTCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGCTGAACCTGGTCCGACCTG GCGCCTCCGTAAAGCTGCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCAGC TACTGGATCAACTGGGTCAAGCAGCAGCCTGGCAGGGCCTGGAATGGAT CGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTACAACCCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACCGTGGACAAGTCCTCCTCCACCGCCTACATG CAGCTGTCCAGCCCCACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCACCCG GTCCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATTGGGGCCAGGGCACCACCTGA CAGTGTCCCTGGAGGCGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGCGGT GGAAGTGGCGGAGGTGGTAGCGACATCGTGTGACCCAGTCCCCCTCCAG CCTGACCGTGACCGCTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCCTCCC AGTCCCTGCTGAACCTCCGCAACCAGAAGAAACTACCTGACCTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCCAGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCG CGAGTCTGGCGTGCCCGATAGATTACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACT TTACCCCTGACCATCTCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCGTGTATTAC TGTCAAGACGACTACTCCTACCCCTTCACCTTCCGGCTCTGGCACCAAGCT GGAAATCAAGTCTGGCGGAGGCGATCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTG GCGCTGAGCTGGCTAGACCTGGCGCTCCCGTGAAGATGTCTGCAAGACC TCCGGCTACACCTTCACCCGGTACACCATGCACCTGGGTCAAGCAGAGGCC TGGACAGGGCTTGAATGGATCGGCTACATCAACCCCTCCCAGGGCTACA CCAACATACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACCTGACAACCGACAAG TCCTCCCTCACCAGCCTACATGCAGCTGCTCCCTGACCTCCGAGGACTC CGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACTACGACGACCAACTACTCCCTGGACT ACTGGGGCCAGGGCACCAACTGACAGTGTCTAGCGGTGGTGGAGGAAGC GGAGGGGGTGGTAGCGGTGGAGGCTCTGGCGGGGGAGGGAGTCAGAT CGTGCTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCTGCTAGCCCTGGCGAGAAAG TGACAAATGACCTGCCGGGCTCCTCCCGTGTCTACATGAACTGGTAT CAGCAGAAGTCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCTCCAA GGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCT CCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAGGATGCCGCCACCTAC TACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTTGGCGTGGCACCAA GCTGGAACGTGAAGGGCGGCTCTACCACCACCATCACCAGTGA 10 20 30

【0416】

【表 9 B】

#5538	二重 scFv_5538	ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACTCTGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGACCGTGACCG CTGGCGAGAAAGTGACCATGAGCTGCAAGTCCTCCAGTCCTGCTGAAC TCCGGCAACCAGAAGAAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGCCA GCCCGCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCACCCGCGAGTCTGGCGTGC CCGATAGATTCACCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTACCCCTGACCATC TCCAGCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCGTGTAGTGGCGGTGGC GGTCAGGGGAGGTGGCTCGCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGCGTGA ACTGGTCCGACCTGGCCTCCGTGAAGCTGTCTGCAAGGCCTCCGGCT ACACCTTCACCAGCTACTGGATCAACTGGGCAAGCAGCAGCAGCAGCCTGGCAG GGCCTGGAATGGATCGGCAACATCTACCCCTCCGACTCCTACACCAACTA CAACCAGAAGTCAAGGACAAGGCCACCCGTGGACAAGTCTCCT CCACCGCCTACATGCAGCTGTCCAGCCCCACCTCGAGGACTCCGCCGTG TACTACTGCACCCGGCTGGCGGGCAACTCCTCGACTATTGGGCCA GGGCACCAACCCGTACAGTGTCTCTCTGGCGGAGGCGGATCCCAGGTGC AGCTGCAGCAGCTGGCGCTGAGCTGGCTAGACCTGGCGCCTCCGTGAAG ATGTCCTGCAAGACCTCCGGTACACCTCACCCGGTACACCATGCACTG GGTCAAGCAGAGGGCTGGACAGGGCTGGAATGGATCGGCTACATCAACC CCTCCCGGGCTACACCAACTACAACCAAGTCAAGGACAAGGCCACC CTGACAACCGACAAGTCCTCCACCGCTACATGCAGCTGTCTCCCT GACCTCCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCCGGTACTACGACGACC ACTACTCCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCAACTGACAGTGTCTAGC GGAGGGCGAGGATCTGGTGGTGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGG AGGTGGTAGCCAGATCGTGTGACCCAGTCTCCGCCATCATGTCTGCTA GCCCTGGCGAGAAAGTGACAATGACCTGCCGGGCTCCTCCGTGTCC TACATGAACTGTTACAGCAGAAGTCCGGCACCTCCCCAAGCGGTGGAT CTACGACACCTCCAAGGTGGCCTCTGGCGTGCCTACAGATTCTCCGGCT CTGGCTCTGGCACCTCCTACAGCCTGACCATCTCCAGCATGGAAGCCGAG GATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTGACCTT TGGCGCTGGCACCAAGCTGGAACTGAAGGGCGGCTCTCACCAACCACCATC ACCACTGA
		10
		20

【0417】

【表 9 C】

#5376	二重 scFv 「プレート 参照」	ATGGGATGGTCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCTACCGCCACCGCGT GCACAGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCCTGGAGCTGAACCTGGTGCACCGCTG GAGCCAGCGTGAAGCTGCTGCAAGGCCAGCGCTACACCTTACCCAGC TACTGGATCAACTGGGTGAAGCAGCGCCCTGGACAGGGCCTGGAATGGAT CGGCAACATCTACCCAGCGACAGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCA AGGACAAGGCCACCCGTACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATG CAGCTGTCCAGCCCCACCTCGAGGACAGCGCCGTACTACTGCACCAAG AAGCTGGCGGGCAACAGCTCGACTACTGGGGCAGGGCACCACACTGA CAGTCAGCAGCGGAGGAGGGGATCTGGCGGGGAGGAAGCGGAGGGGG GGAAGCGACATCGTATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGACCGTACAGC CGGGGAAAGGTGACCATGAGCTGCAAGAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACA GCGGCAACCAGAAGAACTACCTGACCTGGTATCAGCAGAAGCCGGCAG CCCCCAAGCTGCTGATCTACTGGGCCAGCACCCGGAGAGCGGCGTGGC CGACCGGTTTACCGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCGTACCATCA GCAGCGTGCAGGCCAGGACCTGGCGTGTATTACTGTCAGAACGACTAC AGCTACCCCTCACCTTCCGGCAGCGGCCAACAGCTGAAATCAAGAGCGG AGGGGGAGGATCCGATATCAAGCTGCAAGCAGAGCGGAGCTGAACGGCTA GGCCAGGCGCCTCCGTGAAGATGAGCTGTAAGACCTCCGGCTACCTTT ACCCGGTACACCATGCACTGGGTGAAACAGAGGCCGGACAGGGGCTGGA ATGGATTGGCTATATCAACCCCTCCGGGCTACACAAATTACAATCAGA AATTCAAAGATAAAGCCACACTGACAACCGACAAGTCCAGCTCCACAGCC TATATGCAGCTGCTCCCTGACCAGCGAGGACTCTGCCGTGTACTATTG CGCCCGGTACTACGACGACCACCTACAGCCTGGATTATTGGGGGAGGGGA CAACACTGACAGTCTCCAGCGTGGAGGGCGGCAGCGGAGGATCTGGCGGG AGCGGCGGCTCTGGGGCGTCGACGACATCCAGCTGACCCAGTCCCCCGC CATCATGAGCGCCAGCCCTGGCGAGAAGGTGACAATGACCTGCCGGGCCA GCAGCGCGTGAAGCTACATGAATTGGTATCAGCAGAAAAGCGGCACCAGC CCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGGTGCCCTCCGGCGTGCCTA CAGATTCTCCGGCTCCGGCTCTGGCACCAAGCTACAGCCTGACAATTCTA GCATGGAAGCCAGGACGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGCAGC AACCCCTGACCTTGGCGCCGGAACAAAGCTGGAACGTGAAGTGA
		10
		20
		30

【0418】

(実施例9)in vitro細胞傷害性アッセイにおける4つのCLDN18.2 × CD3-bstbの特異的溶解活性の比較

タンパク質bstb_5730/5728、bstb_5731/5729、bstb_5732/5728及びbstb_5733/5729(全てscFv部分にタグを含むがスルフィド架橋は無し)を、実施例1b及びcに記載されるように作製及び精製した。SECによる高度単量体種の分離の前に、タンパク質(50~7%単量体種)の機能を、基本的に実施例2aに記載のようにin vitroルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで調べた。偏差は、以下に記載する。

【0419】

典型的研究では、安定ルシフェラーゼ及びCLDN18.2発現ヒト胃がん細胞株NUGC-4_hCLDN18.2を標的細胞株として使用した。ヒトCLDN18.2陰性乳癌細胞株MDA-MB-231を特異性対照として用いた。PBMCエフェクター細胞及び標的細胞を、47.44aM~47.44nMの濃度範囲でbstbタンパク質の10点10倍連続希釈列とインキュベートした。

【0420】

図11に示すように4つのCLDN18.2 × CD3-bstb分子(図10B)の全てが、典型的試験で48時間の同時インキュベーション後にNUGC-4_hCLDN18.2細胞の効率的な溶解をもたらし

た。最大で93%の標的細胞が溶解された。CLDN18.2陰性対照細胞株MDA-MB-231では溶解は観察されなかった。SEC前の単量体含量及び細胞傷害性アッセイの効率に関して、1gG1のCH1部分を有する2つのbstbバリエントbstb_5730/5728及びbstb_5731/5729が、タグ無し且つscFv部分のジスルフィド架橋有り又は無しの更なる試験のために選択された。

【0421】

(実施例10)精製されたタグ無しCLDN18.2×CD3-bstbの物理化学的特性の比較

タンパク質bstb_5745/5747、bstb_5746/5748、bstb_5749/5751又はbstb_5750/5752を含有する一過性トランスフェクトしたExpi293F(商標)細胞の細胞培養上清を、Supracap(商標)50デプスフィルターカプセル(Pall Corporation社、Port Washington、NY、USA)を使用して濾過し、続いてタンパク質精製プロセスに供した。

10

【0422】

様々な精製CLDN18.2×CD3-bstbタンパク質の凝集状態を分析するために、サイズ排除TSKゲルG3000SWxIカラム(300×7.8mm、Tosoh Bioscience社)を備えたDionex Ultimate 3000(Thermo Scientific社)を使用してサイズ排除-高速液体クロマトグラフィー(SE-HPLC)を行った。カラムを、SE-HPLC緩衝液(0.3M Na₂HPO₄、pH7.2)でリンスし、bstbタンパク質を定組成溶出によって分離した。bstb_5745/5747及びbstb_5746/5748は、比較的低い量の単量体タンパク質(それぞれ約60%及び約40%)であることが示されたが、bstb_5749/5751及びbstb_5750/5752は精製後に高度の単量体であることが示された(それぞれ約96%及び約89%)(図12A及びB)。更に、bstb_5745/5747及びbstb_5746/5748の室温での短時間の蓄積は、目に見える凝集物の形成をもたらした。

20

【0423】

bstb_5745/5747及びbstb_5749/5751並びにbstb_5746/5748及びbstb_5750/5752はそれぞれ、各抗CLDN18.2scFv部分の2つのアミノ酸でのみ異なっており、それによりbstb_5749/5751及びbstb_5750/5752の抗CLDN18.2scFv部分内でのジスルフィド架橋の形成が可能になる。抗CLDN18.2scFv部分における更なるジスルフィド架橋の導入は単量体タンパク質の形成に有利であり、したがって各bstbの物理化学的特性を改善する。

【0424】

初回精製後の全てのbstbバリエントをPBSに透析し、活性及び結合の更なる特徴付けのために、最終的に、HiLoad26/600Superdex 200pgカラム(GE Healthcare社、Life Sciences)を使用して分取SECに供し、単量体画分を約100%に濃縮した。

30

【0425】

(実施例11)CLDN18.2×CD3 bstb及び二重(scFv)₂タンパク質の活性の直接比較

単量体タンパク質bstb_5749/5751及びbstb_5750/5752(全てscFv部分にジスルフィド架橋を含む)及びそれらの二重(scFv)₂アナログ二重scFv_5506及び二重scFv_5538(ジスルフィド架橋無し)を、基本的に実施例9に記載されるように、in vitroルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイで調べた。前述したこと以外には、24.64fM～48.11nMの濃度範囲で10点5倍連続希釈列を適用した。更に正規化のために、参照を各プレートに含めた。bstb及び二重(scFv)₂タンパク質を等モル濃度で使用した。

40

【0426】

bstb_5750/5752は、bstb_5749/5751(70.94pM)(図13A、左プロット)の1.8分の1のEC50(40.63pM)を示し、したがって第1のbstbよりわずかに高い活性が同定された。両方のbstbタンパク質が、最高濃度で約95%の標的細胞の効率的な溶解に至った。CLDN18.2陰性対照細胞株MDA-MB-231では溶解は観察されなかった(データ示さず)。興味深いことに、それぞれの二重(scFv)₂-二重scFv_5506及び5538-アナログ(図13A、右プロット)は、EC50値がそれぞれ9.99pM及び777.20pMで有意差を示す。続けて、EC50値をプレート参照(二重scFv_5376)に対して正規化し、二重(scFv)₂EC50を1に設定して倍数差を計算した。驚くべきことに、bstb_5749/5751のEC50は、二重scFv_5506と比較して6倍高く、最初の約80%の活性の損失が指摘される(図13B、左のプロット)。他方で

50

、bstb_5750/5752のEC50は、二重scFv_5538と比較して23分の1であり、bstbフォーマットの使用により 2000%の活性の増加が示唆される(図13B、右のプロット)。

【0427】

まとめると、使用する結合ドメインに応じた一価から二価への切り替え並びにそれらの配向は、二重scFv_5538と比較したbstb_5750/5752の劇的な活性の増加から実証されるように、二重特異性抗体の活性を改善することができる。更にbstbフォーマットのタンパク質特性は、安定性の点で、二重(scFv)₂フォーマットより優れているようである。

【0428】

(実施例12)CLDN6及びCD3を標的とするIVT-mRNAをベースとする二重特異性抗体-誘導体の生成

a. bstb IVT-mRNA鑄型ベクター及びIVT-mRNA合成のクローニング
in vitro転写メッセンジャーRNA(IVT-mRNA)としてのCLDN6 × CD3二重特異性キメラTriMAB(bstb)の生成のために、(実施例1に記載の)bstb_369/367及びbstb_371/367のDNA配列を、標準技術を使用してIVT-mRNA鑄型ベクターpST1-TEV-MCS-F-I(BioNTech AG社、Mainz、Germany)にサブクローニングした。TEVリーダー配列は、他に記載されており(Zeenko und Gallie 2005; Weingarten-Gabbayら、2016; Gallieら、1995)及びF-I配列は、親出願「RNAの安定化のための3'UTR配列」(PCT/EP2015/073180)に記載されている。以下の構築物をbstb分子の形成のために取得した:

bstb_435/434:

pST1-5'TEV-Sec-V_H CD3-CH1(IgG1)-V_H CLDN6-V_L CLDN6-6xHisタグ-F-I-A3
0リンカ-A70 (Fd)

pST1-5'TEV-Sec-V_L CD3-CL-V_H CLDN6-V_L CLDN6-Strepタグ-F-I-A30リンカ-A70 (L)

bstb_436/434:

pST1-5'TEV-Sec-V_H CD3-CH1(IgG2)-V_H CLDN6-V_L CLDN6-6xHisタグ-F-I-A3
0リンカ-A70 (Fd)

pST1-5'TEV-Sec-V_L CD3-CL-V_H CLDN6-V_L CLDN6-Strepタグ-F-I-A30リンカ-A70 (L)

【0429】

Aはアデニン、Fdは可消化断片(Fabの重鎖部分)、F-Iは3'UTR配列、LはFabの軽鎖部分、Secは分泌シグナル、5'TEVはタバコエッチャイルス由来の5'UTRである。

【0430】

Table 10(表10)に、本発明の過程で生成されたTAA CLDN6に特異的なbstb構築物についての情報をまとめた。特異性、モノクローナル抗体(mAB)からの配列の起源、コドン使用頻度、更なる配列の特徴に関する情報を列挙する。標的細胞結合部分の可変ドメインをコードする配列は、元々はGanymed Pharmaceuticals AG社から得た。

【0431】

10

20

30

40

50

【表10】

Table 10: CLDN6×CD3-bstb抗体の特徴の概要

内部名	特異性	scFv VH-VL領域の起源	Fab VH-VL領域の起源	コドン使用頻度	CH1	タグ
Bstb_435/434 (配列番号79/78)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG1	His/Strp
Bstb_436/434 (配列番号80/78)	HS	IMAB206-SUBW	TR66(C114S)	CG	IgG2	His/Strp

bstbは二重特異性TriMAB、Cはシスティン、CH1は重鎖定常領域1、CGはチャイニーズハムスター、IMABはidealモノクローナル抗体、Hisは6xHisタグ、HSはホモ・サピエンス、IgGは免疫グロブリンG、Sはセリン、StrpはStrepタグ、Wはトリプトファンを示す。

10

【0432】

b. IVT-mRNA合成

in vitro転写のための鋳型を精製するために、プラスミドDNAをクラスII制限エンドヌクレアーゼを使用してポリ(A)テールコード領域の下流を線状化し、それによってポリ(A)テールを越えて更なるヌクレオチドを有しないRNAを転写する鋳型を生成した(Holtkampら、2006)。線状化鋳型DNAを精製し、分光光度法で定量し、次いでT7RNAポリメラーゼを用いて本質的に従前に記載された方法(Grudzien-Nogalskaら、2013)で、7.5mMの各ATP、CTP、UTP、1.5mMのGTP及び6mMのベータ-S-ARCA(D2)キャップアナログ(Kuhnら、2010)の存在下でin vitro転写した。RNAは、磁性粒子を使用して精製した(Berensmeier 2006)。in vivo試験のために、非免疫原性RNAを使用した。この目的のために、N1-メチルプソイドウリジン-5'-三リン酸(TriLink Biotechnologies社、San Diego、CA、USA)をUTPの代わりに組込み、二本鎖RNAを除去した。RNAをScriptCap m7G Capping System及び2'O-メチルトランスフェラーゼ(CellScript、Madison、WI、USA)で酵素的にキャップした。RNA濃度及び質を、2100 Bioanalyzer(Agilent社、Santa Clara、CA、USA)で分光光度法及び分析によって評価した。完全bstb分子の形成に必要な2つのIVT-mRNAのスケッチを図14に示す。

20

【0433】

(実施例13)in vitro細胞傷害性アッセイにおけるbstb_435/434及びbstb_436/434の特異的溶解活性の決定

a. プロデューサー細胞のエレクトロポレーション

bstbタンパク質をIVT-mRNAから産生するために、対数期の成長で1mlあたり 4×10^6 個のK-562細胞(ATCC CCL-243、LGC Standards GmbH社、Wesel、Germany)を、H₂O(Mock)又はbstb鎖あたり25 μg/mlのIVT-mRNAを用いて0.4mmキュベット中でGene Pulser MXCell(Bio-Rad Laboratories社 Dreieich、Germany)を使用して、200V、2パルス、8msの設定でエレクトロポレーションした。次いで細胞を6ウェルの組織培養プレートに 5×10^5 /mlの密度で完全培養培地に播種した。48時間のインキュベーション後、上清を遠心分離によって採取し、0.2 μmのMinisart NML Syringe Filters(Sartorius社

30

、Gottingen、Germany)を用いて滅菌濾過した。

40

【0434】

b. ELISAを介したプロデューサー細胞の上清中のbstbの定量

エレクトロポレーションしたK-562からの上清を、定量のために社内設計のELISAに供した。簡単に述べると、96ウェルのMaxiSorp(商標)プレート(Thermo Scientific社、Braunschweig、Germany)を4.5 μg/mlのヤギ抗ヒトIgG F(ab')₂抗体(Abd Serotec社、Puchheim、Germany)を含むDPBSを用いて37℃で1時間被覆し、3回洗浄し(洗浄緩衝液:

50

PBS/0.05% Tween-20)、3%粉乳を含むDPBSを用いて2~8で一晩プロッキングした。洗浄工程後、参照としてのbstb_369/367及びbstb_371/367タンパク質の連続希釈並びにbstb_435/434及びbstb_436/434の連続希釈を含むK-562上清(希釈剤:0.2% BSA)を被覆プレートに三連で加えた。RTで2時間後、プレートを3回洗浄した。抗F(ab')₂に結合したbstbの検出のために、3.5 μg/mlのマウス抗IMAB206(Ganymed Pharmaceuticals AG社、Mainz、Germany)を加え、RTで1時間インキュベートし、プレートを再度3回洗浄した。1:500希釈のAP-コンジュゲートヤギ-抗マウスIgG Fc抗体(Jackson ImmunoResearch社、Newmarket、UK)を室温で1時間インキュベートした。可視化のために、プレートを、自社製pNPP基質溶液と共に室温で30分間、暗室中でインキュベートし、反応を最終的に3MのKOHで停止させた。分析は、Tecan M200マイクロプレートリーダー(Tecan社、Mannedorf、Switzerland)で405/492nmで行った。データは、Graph Pad Prismソフトウェア6とMicrosoft Excel 2010を用いて分析した(データ示さず)。

【0435】

濃度253ng/mlのbstb_435/434及び427ng/mlのbstb_436/434を、K-562上清中で測定することができた。したがって、両方のbstbは翻訳され、異なる量で分泌された。得られるタンパク質の量はエレクトロポレーションに大きく依存し、それぞれの時間で変動する。様々な実験の経過で、bstb_435/434と比較して1.0~1.7倍のbstb_436/434が作製された。

【0436】

c. プロデューサー細胞溶解物及び上清のウエスタンプロット分析

K-562細胞の上清及び細胞溶解物(実施例13a.)をbstbタンパク質の翻訳及び分泌の分析のために使用した。細胞溶解物を、20単位のベンゾナーゼ(Merck Millipore社、Darmstadt、Germany)を含む200 μlの4×Laemmli緩衝液(Bio-Rad Laboratories社)中の1×10⁶個の洗浄細胞のインキュベーションによって取得した。その後、試料を1Mのジチオトレイトール(DTT、最終濃度0.1M)有り(還元)又は無し(非還元)で95~10分間加熱した。上清をLaemmli緩衝液で同様に処理した。調製した細胞溶解物及び上清並びに対応する精製bstbタンパク質を、4~15%Criterion(商標)TGX Stain-Free(商標)Gel(Bio-Rad Laboratories社)を使用してポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、次いで当業者に既知の標準的な手法に従ってウエスタンプロット分析(図15)を行った。ウエスタンプロット分析のために、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲート抗体抗6xHisタグ(1:10,000、Abcam社、Cambridge、MA、USA)、StrepMAB-Classic(1:10,000、IBA GmbH社、Gottingen、Germany)及び抗-アクチン(1:25,000、Abcam社)を使用した。ウエスタンプロット膜は、Bio-Rad社からのChemidoc MP Imaging Systemで記録した。bstbタンパク質のシグナルを、内部分子量標準と比較して、還元条件下で50~55kDで検出し、非還元条件下で約100kDで検出した。bstb_435/436(図15A)及びbstb_436/434(図15B)が主に上清で検出されたが、細胞溶解物からも検出され、採取時点で分泌が不完全であったことが示された。bstbタンパク質のヘテロ二量体組成は、還元条件下及び抗6xHisタグHRPとStrepMAB-Classic HRPとの混合物を用いた検出で明らかとなる(図15C)。Fd断片とL断片とは大きさで約2kD異なる(それぞれ、約51kD及び約49kD)。非還元条件下で検出されるHMW及び単量体bstbに対応するタンパク質バンドの定量により、3%のHMW及び88%の単量体bstb_435/434種、並びに1.4%のHMW及び92%の単量体bstb_436/434種を決定した。細胞培養の間のわずかな分解を示す少数の小さいバンド(それぞれ合計で約8%及び約6%)が検出された。

【0437】

まとめると、両方のbstbがIVT-mRNAから効率的に翻訳することができ、それらは細胞培養上清に分泌される。bstb_436/434は、HMW種及び分解産物に関して幾分有利なタンパク質パターンを示すが、HMW種のパーセンテージは両方のbstb分子で低い。

【0438】

d. ルシフェラーゼ細胞傷害性アッセイ及びEC50の決定

細胞傷害性アッセイを、原則的に実施例2aに記載のように行った。bstbタンパク質を参照

10

20

30

40

50

として使用した。実施例13aからのK-562上清試料を、K-562 mock上清(IVT-mRNA無しでエレクトロポレーション)で希釈した。L_{min}及びL_{max}のK-562上清試料にK-562 mock上清を補充した。

【0439】

上清中の20 μlのbstbを、33.1fM ~ 516.5pMの7点5倍連続希釈列でエフェクター細胞としてのPBMCと一緒にプレーティングした(E:T 5:1)OV-90及びMDA-MB-231がん細胞(ルシフェラーゼで安定形質導入)に加えた。48時間の同時インキュベーションの後、測定のためにルシフェラーゼ溶液を加え、プレートを分析した。

【0440】

図16に示すように、両方のbstbが、CLDN6+ OV-90の効率的な溶解を媒介したが、CLDN6- MDA-MB-231では媒介しなかった。およそ77 ~ 80%の最大溶解が、516.5pMのbstb_436/434及びbstb_435/434でそれぞれ達成された。EC50値は、bstb_435/434の1.3倍高い活性を示す。RNA翻訳bstbのEC50値は、対応するタンパク質アイテムbstb_369/367及びbstb_371/367と比較して、それぞれ4分の1及び7.5分の1であった。この効果は、任意の更なるタンパク質操作の欠如に基づく高いタンパク質活性から、HMW種の影響から、定量の偏差又はそれらの組合せから発生している可能性がある。

10

【0441】

まとめると、RNAアプローチは、実現可能で非常に効率的であり、タンパク質の発現、精製、安定性及び分析が省略されることから時間が節約される。

【0442】

(実施例14)マウス異種移植モデルにおけるタンパク質参照と比較した二重特異性抗体をコードするIVT-RNAの有効性

20

in vivoでタンパク質参照と比較した二重特異性bstb及び二重(scFv)₂抗体をコードするIVT-mRNAの治療効力を調べるために、免疫不全マウス株NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtm1 Wjl/SzJ又はショートNSG(Jackson laboratory社、Bar Harbour、ME、USA)を再度選択した。全てのマウスは、ヨハネス・グーテンベルク大学(Johannes Gutenberg University、Mainz、Germany)の施設内動物管理委員会からのガイドラインに従って使用した。

【0443】

a. タンパク質と比較した、bstb及び二重(scFv)₂コードIVT-RNAを用いたマウスの高度CLDN6発現腫瘍の処置

30

典型的試験では、6 ~ 25週齢で体重18 ~ 38gの雄及び雌のNSGマウスを使用した。CLDN6陽性OV-90細胞を腫瘍細胞として用い、PBMCをエフェクター細胞として用いた。

【0444】

5 × 10⁶腫瘍細胞を皮下(s.c.)接種し、その19日後、1 × 10⁷ PBMCを腹腔内投与した(i.p.)。PBMC生着マウス-PBMC注射後6日間末梢血で分析-を腫瘍体積及び性別(全てのグループで両方の性別)に従ってグループを層別化した。群ごとに約250mm³の平均腫瘍体積のかなり高度の腫瘍段階であるPBMC投与後8日で処置を開始した。マウスを後眼窩静脈叢への静脈内注射(i.v.)(注射スケジュール図17A)によって週に1回処置した。群「G1-RNA対照」、「G2-bstb RNA」及び「G3-二重scFv RNA」は、TransIT(登録商標)-mRNA Transfection Kit(Mirus Bio社、Madison、WI、USA)で複合体化された3 μgのIVT-mRNAを含む200 μl体積をマウスごとに受けた。RNA対照として、ルシフェラーゼIVT-mRNAを使用し、bstbコード化RNAは、CLDN6 × CD3 bstb Fd及びLC鎖IVT-mRNA435及び434(1:1で混合)であり、二重(scFv)₂コードRNAは、CLDN6 × CD3二重(scFv)₂IVT-RNA 123rであった。全てのIVT-RNAは、実施例12bに従ってin vivo合成した。「G4-ビヒクル対照」は、DPBSで処置した6匹のマウスと、10mMのNaOAc緩衝液、pH5.5で処置した6匹のマウス(それぞれbstb及び二重(scFv)₂製剤緩衝液)を含んだ。「G5-bstbタンパク質」及び「G6-二重scFvタンパク質」を、IVT-mRNAアイテムに対するタンパク質アナログで処置した。bstbタンパク質は、bstb_369/367(100 μg/kg、5 μl/g体重の用量)及び二重(scFv)₂タンパク質は、二重scFv_123(200 μg/kg、5 μl/g体重の用量)であった。処置群をTable 11にまとめた。投与は4週間連続で行った。週に2回、腫瘍の大きさを

40

50

デジタル較正ノギスで測定し、腫瘍体積は、式:腫瘍体積[mm³]=長さ[mm]×(幅[mm])²/2によって計算した。腫瘍体積が1500mm³に達したとき又は重度の病的状態(主に移植片対宿主病(GVHD)の症状)の場合に、マウスを頸椎脱臼により殺した。

【0445】

図17Bが、腫瘍成長に対する処置の効果を示す。抗腫瘍有効性を、RNA対照群G1又はビヒクル対照G4と比較した腫瘍成長阻害/減少及び生存として測定した。腫瘍成長減少が0/10マウスであった対照群G1と比較して、試験アイテムbstb_435/434(G2)での処置は8/9マウスで腫瘍減少に至り、試験アイテムbi-scFv_123r(G3)での処置は9/9マウスで腫瘍減少に至った。bstbについてタンパク質アナログ(G5、G6)を用いた処置は同様であったが、二重(scFv)₂については効率が低かった。重要なことに、タンパク質は、確立されたタンパク質処置スケジュールである週に3回i.p.ではなく、直接比較のためにRNA注射スケジュール(週に1回、眼窩後でのi.v.)に従って投与した。タンパク質の長く続く翻訳と数日間にわたる分泌によって、より効率の高いRNAがおそらく生じるが、注射されたタンパク質は迅速に除去される。RNA注射後のin vivoタンパク質血中濃度は不明である。G1からG3の3匹のマウスを早くに殺し、フローサイトメトリー分析によって腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を調べた。この目的のために、単一の腫瘍細胞懸濁液を、抗ヒトCD45及びCD3蛍光標識抗体(BD Biosciences社、Heidelberg、Germany)で染色し、全腫瘍のシングレット細胞をBD FACS Cantollフローサイトメーターで分析した。RNA対照群では、3%の浸潤ヒトT細胞が検出され、一方で、7%及び12%のヒトT細胞がそれぞれbstb-及び二重(scFv)₂-RNA群で検出された(図17C)。これらのデータは、二重特異性RNAでコードされた抗体によって結合されたヒトT細胞の指向性浸潤を示す。

10

【0446】

b. 体重に対する治療の影響の決定

各マウスの体重を、週に1回、実験室スケールで検査した。処置に関連する体重減少は観察されなかった(データ示さず)。

【0447】

(参考文献)

20

20

30

40

50

Berensmeier, Sonja (2006): Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. In: *Applied microbiology and biotechnology* 73 (3), S. 495–504. DOI: 10.1007/s00253-006-0675-0.

Coligan, John E.; Bierer, Barbara E.; Margulies, David H.; Shevach, Ethan M.; Strober, Warren (2001a): *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Coligan, John E.; Dunn, Ben M.; Speicher, David W.; Wingfield, Paul T. (2001b): *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Gallie, D. R.; Tanguay, R. L.; Leathers, V. (1995): The tobacco etch viral 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. In: *Gene* 165 (2), S. 233–238. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00521-7.

10

Grudzien-Nogalska, Ewa; Kowalska, Joanna; Su, Wei; Kuhn, Andreas N.; Slepnevov, Sergey V.; Darzynkiewicz, Edward et al. (2013): Synthetic mRNAs with superior translation and stability properties. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 969, S. 55–72. DOI: 10.1007/978-1-62703-260-5_4.

Holtkamp, S.; Kreiter, S.; Selmi, A.; Simon, P.; Koslowski, M.; Huber, C. et al. (2006): Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. In: *Blood* 108 (13), S. 4009–4017. DOI: 10.1182/blood-2006-04-015024.

Kuhn, A. N.; Diken, M.; Kreiter, S.; Selmi, A.; Kowalska, J.; Jemielity, J. et al. (2010): Phosphorothioate cap analogs increase stability and translational efficiency of RNA vaccines in immature dendritic cells and induce superior immune responses *in vivo*. In: *Gene Ther* 17 (8), S. 961–971. DOI: 10.1038/gt.2010.52.

20

Lanzavecchia, A.; Scheidegger, D. (1987): The use of hybrid hybridomas to target human cytotoxic T lymphocytes. In: *Eur. J. Immunol.* 17 (1), S. 105–111. DOI: 10.1002/eji.1830170118.

Lutterbuese, Ralf; Raum, Tobias; Kischel, Roman; Hoffmann, Patrick; Mangold, Susanne; Rattel, Benno et al. (2010): T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (28), S. 12605–12610. DOI: 10.1073/pnas.1000976107.

Röthlisberger, Daniela; Honegger, Annemarie; Plückthun, Andreas (2005): Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. In: *Journal of molecular biology* 347 (4), S. 773–789. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.01.053.

Stadler, Christiane R.; Bähr-Mahmud, Hayat; Plum, Laura M.; Schmoldt, Kathrin; Kölsch, Anne C.; Türeci, Özlem; Sahin, Ugur (2015): Characterization of the first-in-class T-cell-engaging bispecific single-chain antibody for targeted immunotherapy of solid tumors expressing the oncofetal protein claudin 6. In: *OncImmunoTherapy* 5 (3), S. e1091555. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1091555.

30

Weingarten-Gabbay, Shira; Elias-Kirma, Shani; Nir, Ronit; Gritsenko, Alexey A.; Stern-Ginossar, Noam; Yakhini, Zohar et al. (2016): Comparative genetics. Systematic discovery of cap-independent translation sequences in human and viral genomes. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6270). DOI: 10.1126/science.aad4939.

Woll, Stefan; Schlitter, Anna Melissa; Dhaene, Karl; Roller, Marc; Esposito, Irene; Sahin, Ugur; Türeci, Ozlem (2014): Claudin 18.2 is a target for IMAB362 antibody in pancreatic neoplasms. In: *International journal of cancer* 134 (3), S. 731–739. DOI: 10.1002/ijc.28400.

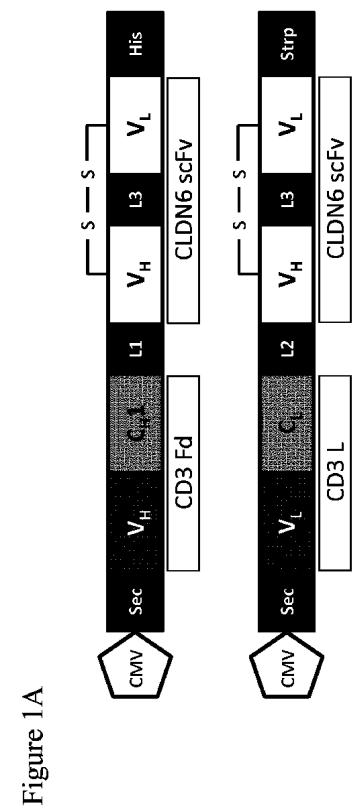
Zenko, Vladimir; Gallie, Daniel R. (2005): Cap-independent translation of tobacco etch virus is conferred by an RNA pseudoknot in the 5'-leader. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (29), S. 26813–26824. DOI: 10.1074/jbc.M503576200.

40

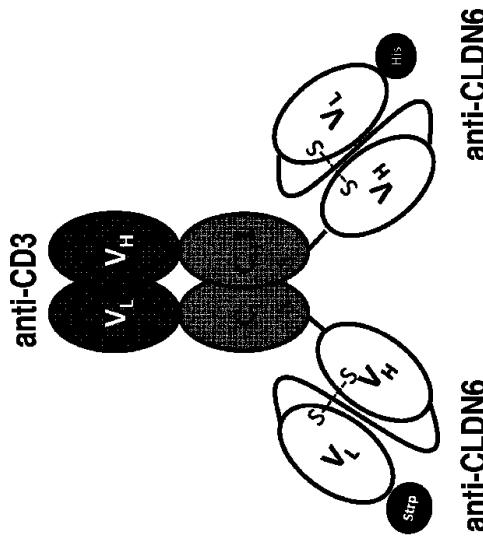
50

【図面】

【図 1 A】



【図 1 B】



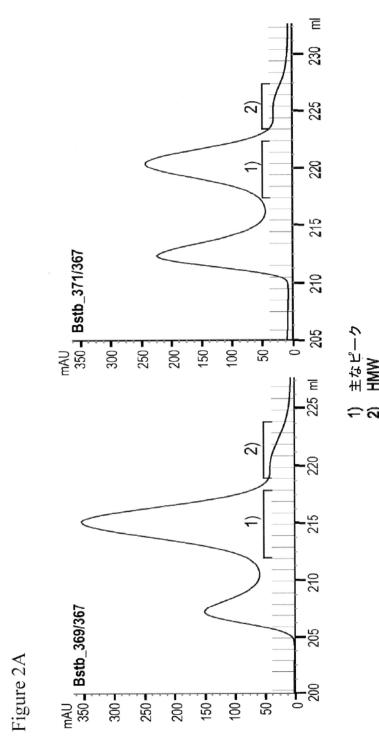
10

20

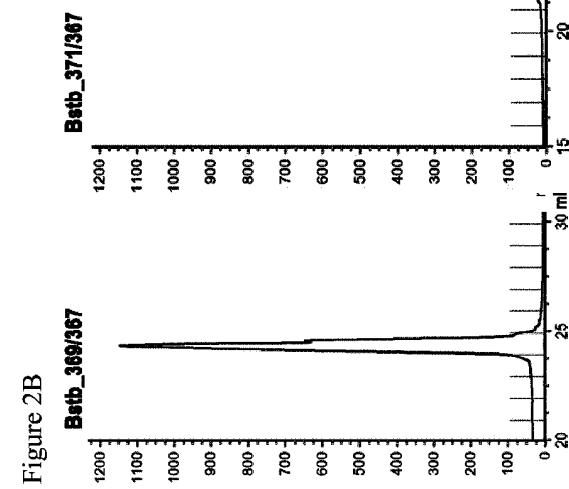
30

40

【図 2 A】



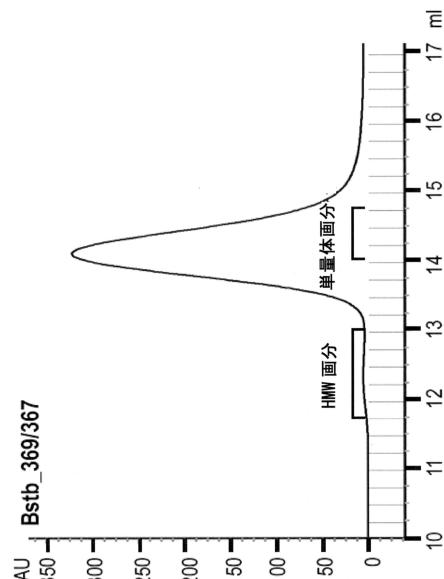
【図 2 B】



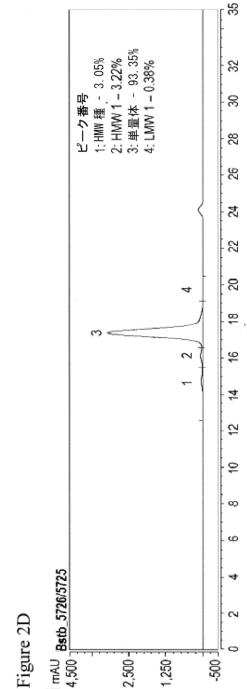
50

【図 2 C】

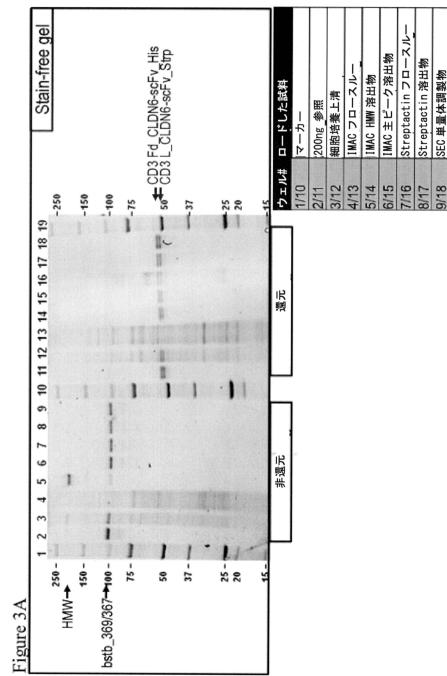
Figure 2C



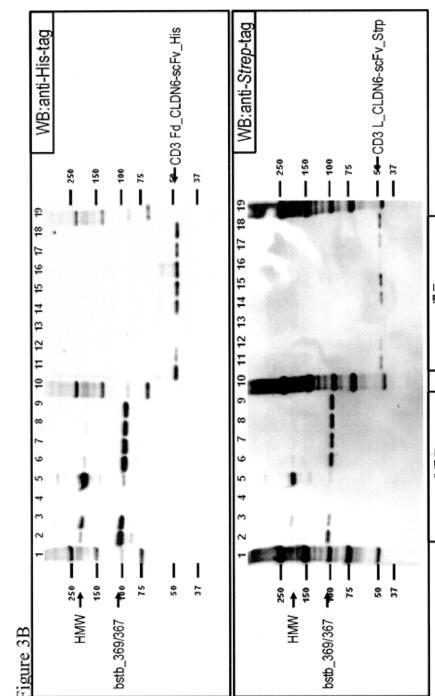
【図 2 D】



【図 3 A】



【図 3 B】



【図 4 A】

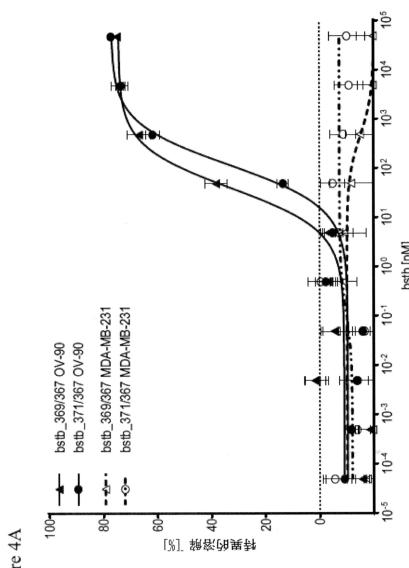


Figure 4A

【図 4 B】

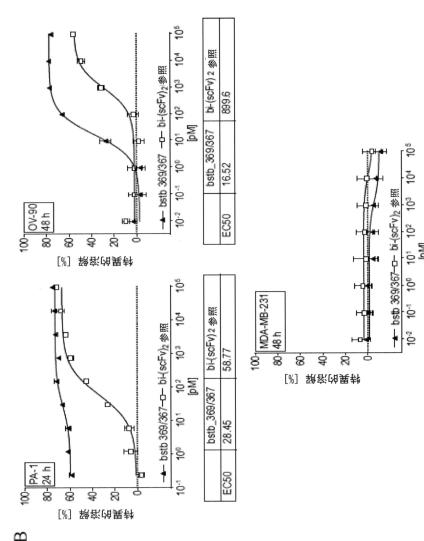


Figure 4B

【図 4 C】

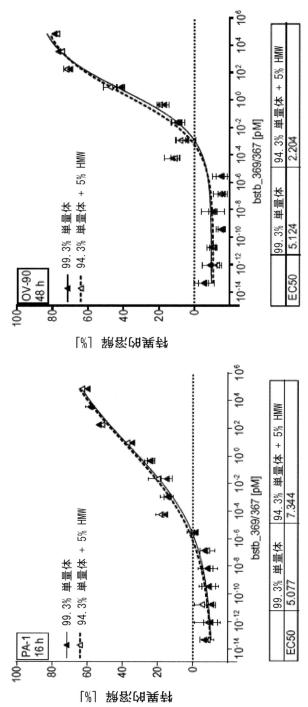


Figure 4C

【図 4 D】

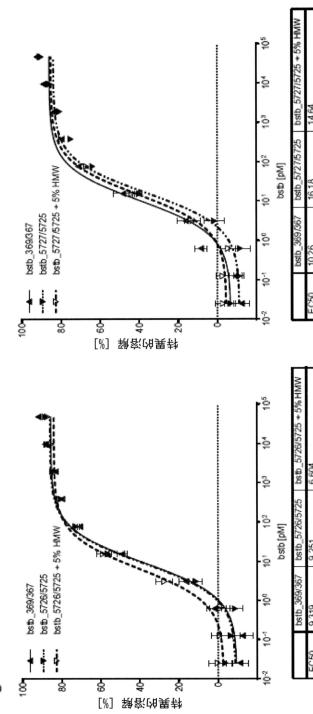


Figure 4D

【図 5 A】

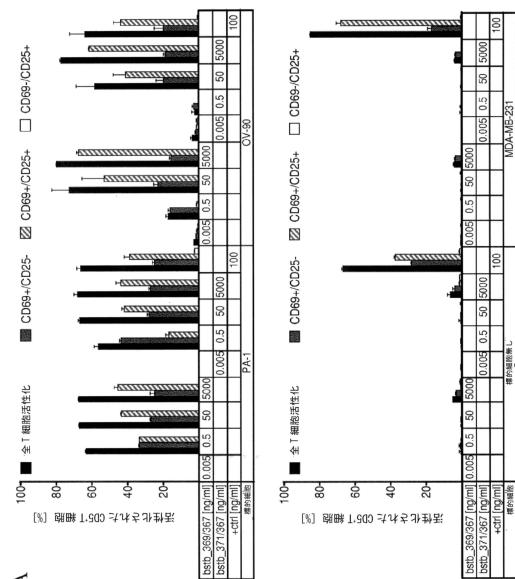


Figure 5A

【図 5 B】

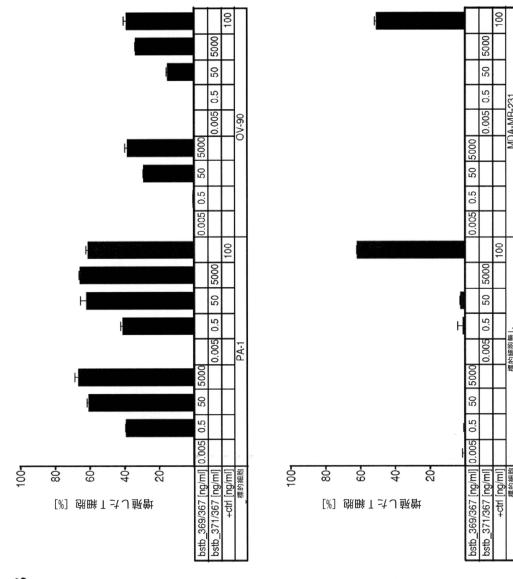
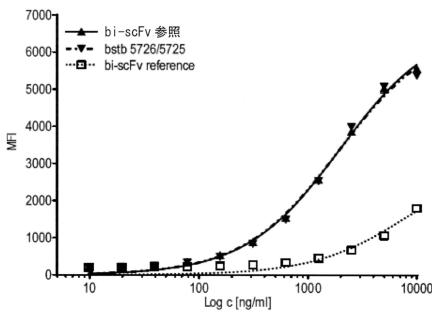


Figure 5B

【図 6 A】

Figure 6A



【図 6 B】

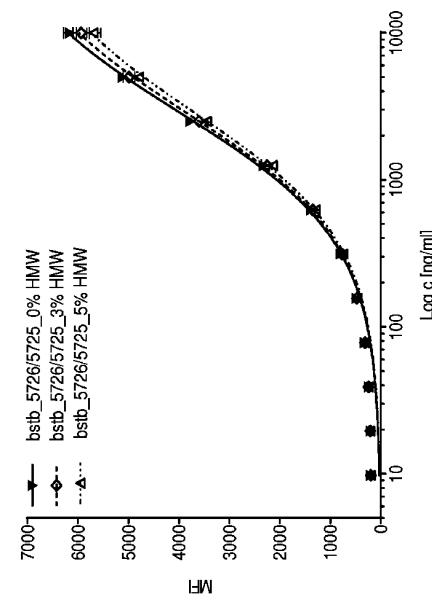


Figure 6B

10

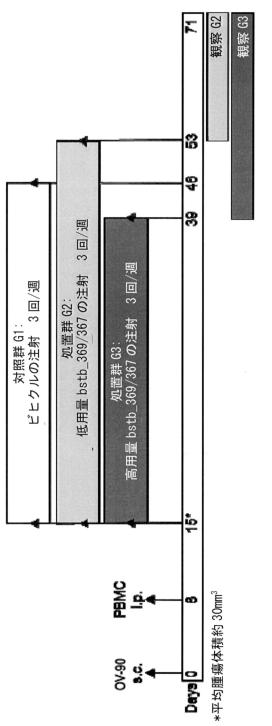
20

30

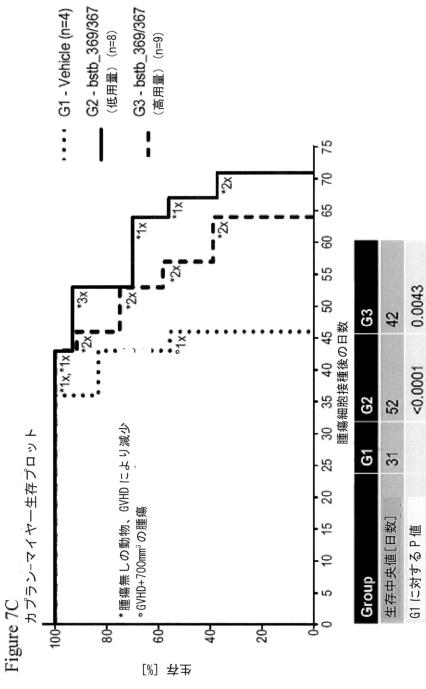
40

50

【図 7 A】



【図7C】



【図 7 B】

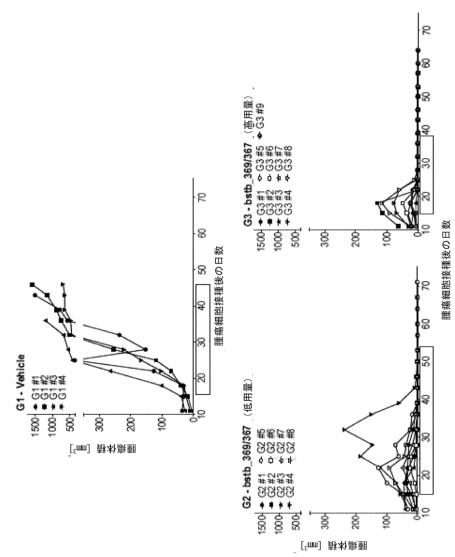


Figure 7B

【 四 8 】

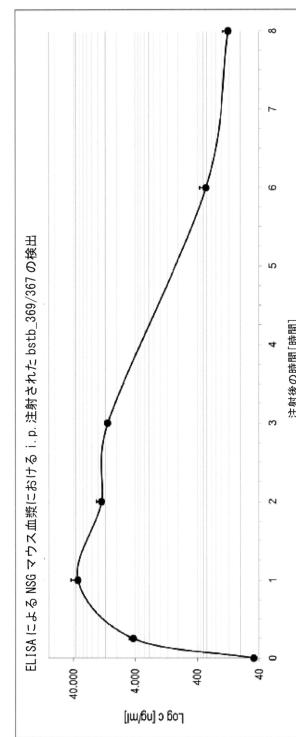
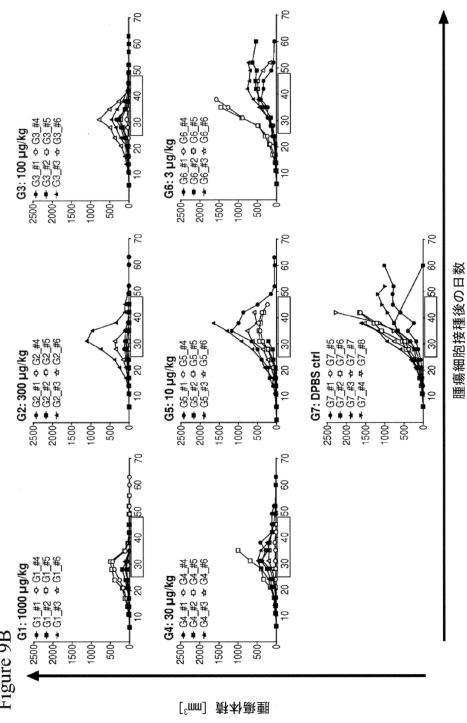
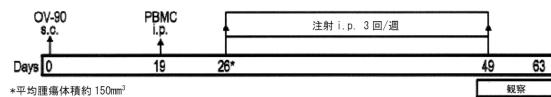


Figure 8

【図 9 A】

【図9B】

Figure 9A



【 义 1 0 A 】

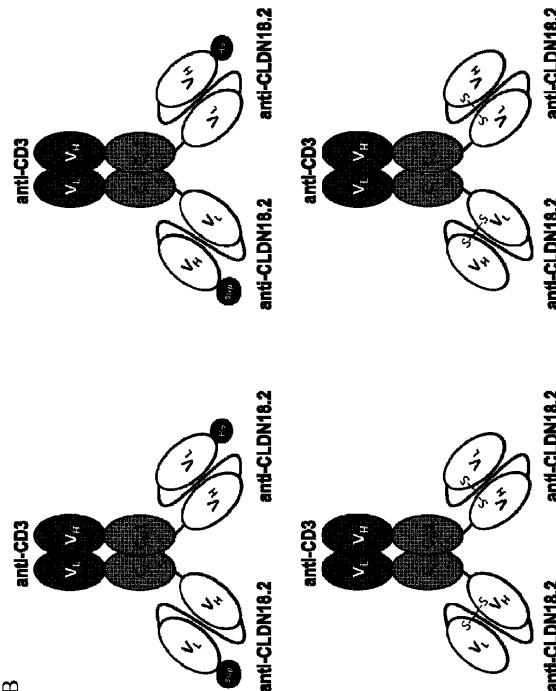
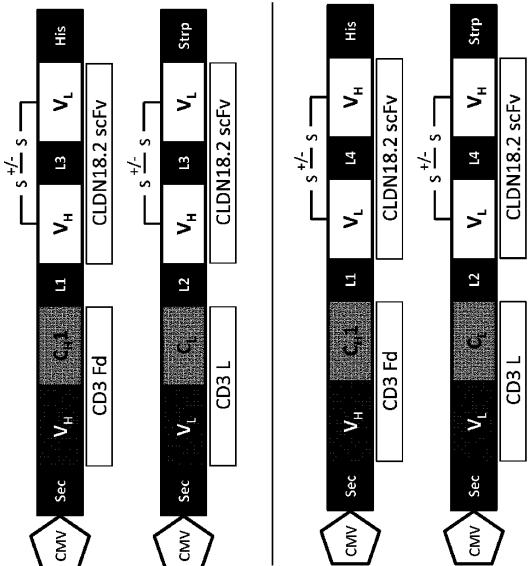
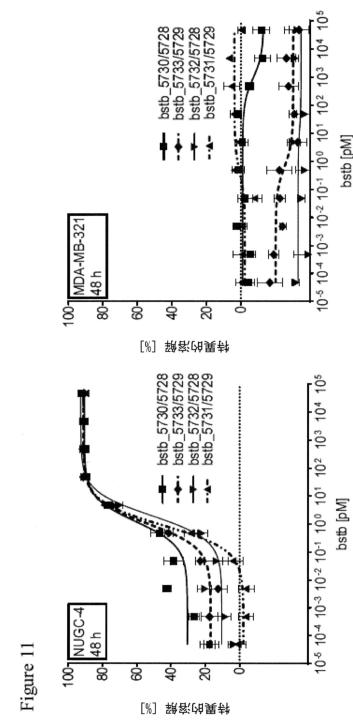
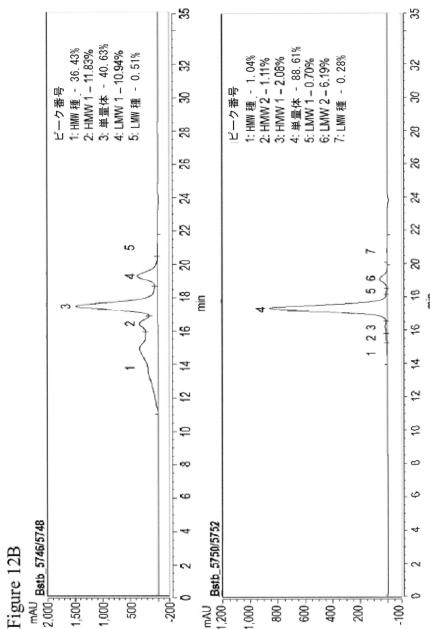


Figure 10A

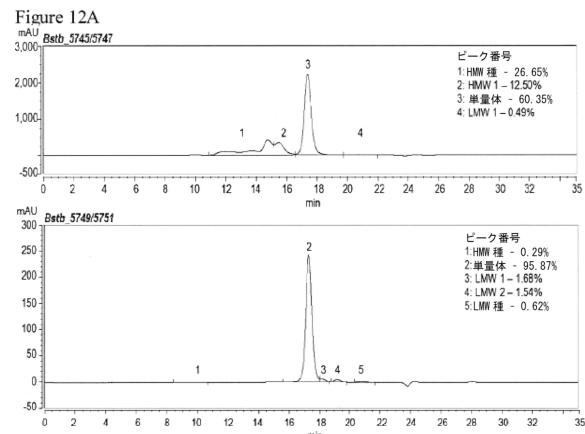
【図 1 1】



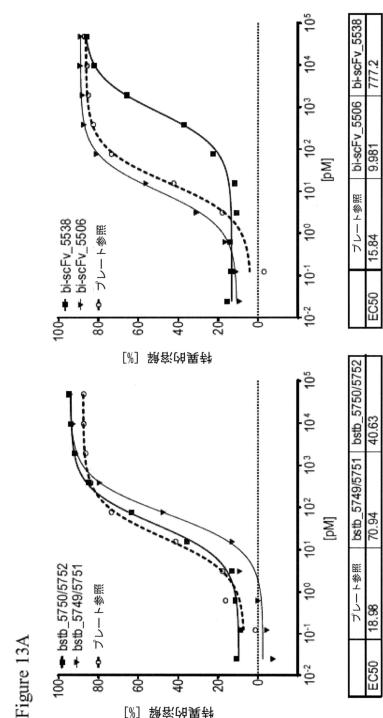
【図12B】



【図12A】



【図13A】

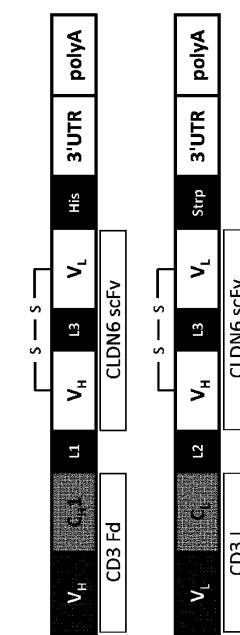


【図 1 3 B】

Figure 13B

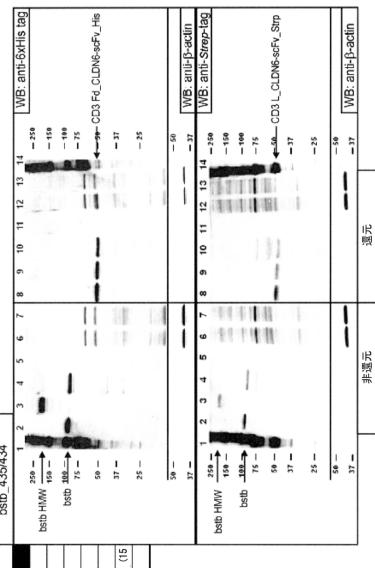


【図 1 4】



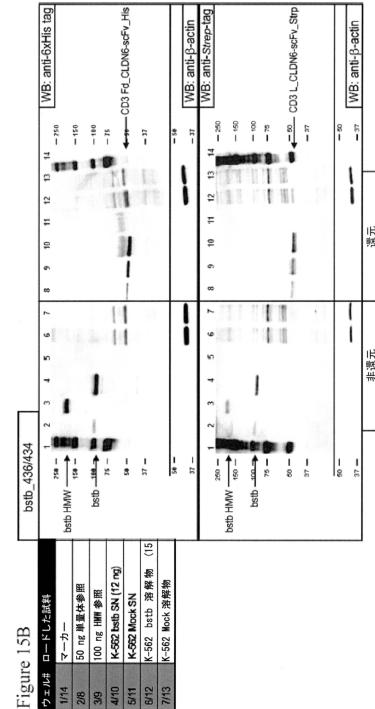
【図 1 5 A】

Figure 15A

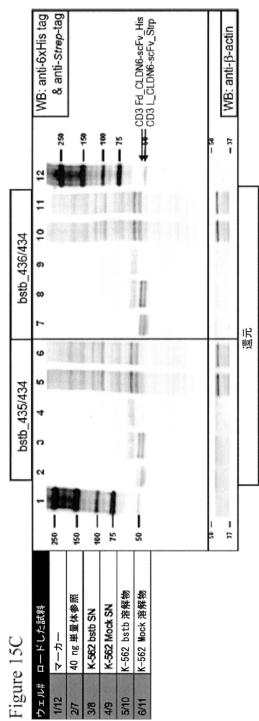


【図 1 5 B】

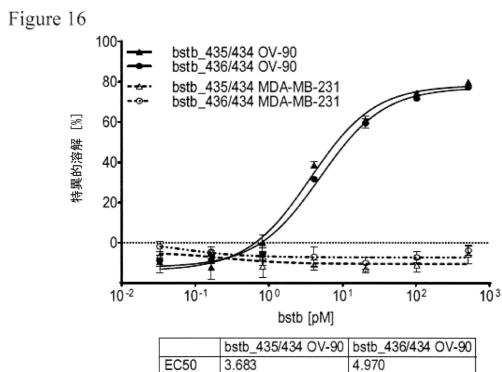
Figure 15B



【図15C】



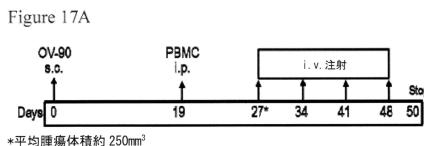
【 図 1 6 】



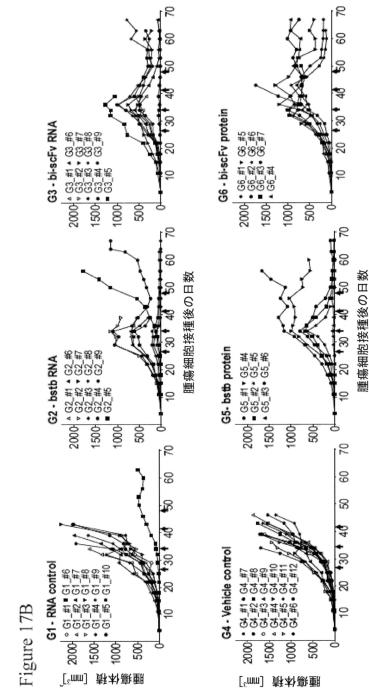
10

20

【図 17A】



【図17B】



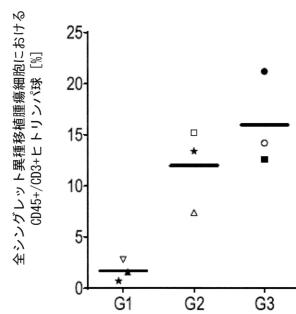
30

40

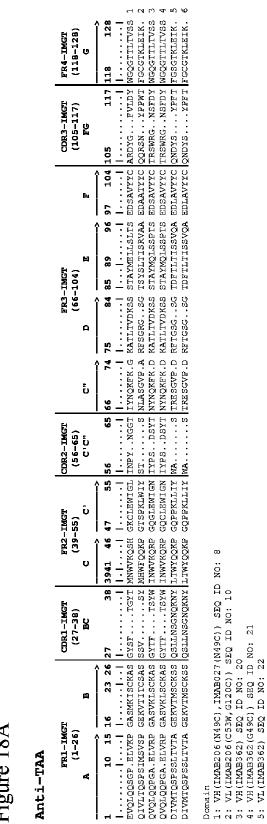
Figure 17B

【図 1 7 C】

Figure 17C

全シングレット異種移植腫瘍細胞における
CD45+/CD3+ヒトリンパ球 [%]

【図 1 8 A】



WO 2018/054973, 2

1: WO/2018/054973 (C1148) SEQ ID NO: 5

2: WO/2018/054973 (C1146) SEQ ID NO: 6

Domain

1: WO/2018/054973 (C1148) SEQ ID NO: 5

2: WO/2018/054973 (C1146) SEQ ID NO: 6

3: WO/2018/054973 (C1147) SEQ ID NO: 7

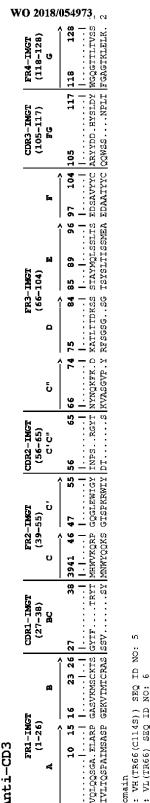
4: WO/2018/054973 (C1149) SEQ ID NO: 8

5: WO/2018/054973 (C1150) SEQ ID NO: 9

6: WO/2018/054973 (C1151) SEQ ID NO: 23

【図 1 8 B】

Figure 18B



WO 2018/054973, 2

1: WO/2018/054973 (C1148) SEQ ID NO: 5

2: WO/2018/054973 (C1146) SEQ ID NO: 6

Domain

1: WO/2018/054973 (C1148) SEQ ID NO: 5

2: WO/2018/054973 (C1146) SEQ ID NO: 6

3: WO/2018/054973 (C1147) SEQ ID NO: 7

4: WO/2018/054973 (C1149) SEQ ID NO: 8

5: WO/2018/054973 (C1150) SEQ ID NO: 9

6: WO/2018/054973 (C1151) SEQ ID NO: 23

【配列表】

0007055794000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F	I	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K
A 6 1 K	31/7088	(2006.01)	A 6 1 K
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P
A 6 1 K	35/76	(2015.01)	A 6 1 K

ツプ - フォン - ツァーバーン - ブラツツ・ 1

(72)発明者 クリストイアーネ・シュタードラー

ドイツ・ 6 4 6 2 5 ・ベンスハイム・フリツツ - ボッキウス - シュトラーセ・ 1 3

(72)発明者 レイラ・フィッシュナー

ドイツ・ 5 5 2 3 9 ・ガウ - オーダーンハイム・テオドール - ホイス - シュトラーセ・ 2 0 アー

(72)発明者 アルネ・イェントレツキー

ドイツ・ 5 5 2 4 6 ・マインツ - コストハイム・ハウプトシュトラーセ・ 1 6 3

(72)発明者 ウズレム・テュレチ

ドイツ・ 5 5 1 1 6 ・マインツ・フィリップ - フォン - ツァーバーン - ブラツツ・ 1

(72)発明者 フアブリス・ル・ギャル

ドイツ・ 5 5 1 2 2 ・マインツ・ゴンスバッハブリック・ 2 9

(72)発明者 マリア・クロイツベルク

ドイツ・ 5 5 1 3 1 ・マインツ・オーベレ・ツールバッハ - シュトラーセ・ 6 6

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表 2 0 1 6 - 5 0 0 0 5 9 (J P , A)

国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 7 4 0 8 (WO , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 3 5 2 3 9 (WO , A 1)

MERTENS, N. , BISPECIFIC ANTIBODIES , 2011年 , pp.135-149

STADLER, C. , et al. , ONCOIMMUNOLOGY , 2013年03月21日 , Vol.5, No.3 , e1091555(pp .1-12) , doi: 10.1080/2162402X.2015.1091555

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

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

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

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d