

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512923
(P2025-512923A)

(43)公表日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 3
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 B 0 6 4
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/725(2006.01)	C 0 7 K	14/725		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全103頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-558408(P2024-558408)			(71)出願人	524363397
(86)(22)出願日	令和5年3月28日(2023.3.28)				シーアン オリマブ バイオテクノロジー
(85)翻訳文提出日	令和6年10月2日(2024.10.2)				カンパニー リミテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065017				中華人民共和国 シャンシー プロビンス
(87)国際公開番号	WO2023/192842				7 1 0 0 6 5, シーアン, ガオ シン
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)				ディストリクト, タン ヤン ロード 3
(31)優先権主張番号	63/325,330				5, ワン ツォオ シエン ダイ チェン
(32)優先日	令和4年3月30日(2022.3.30)				, ビルディング ディー, ルーム 2 7
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	110002077
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				園田・小林弁理士法人
	最終頁に続く			(72)発明者	チャオ, アイチー
					アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 9 0
					8 6, ウォーリングフォード, ノール
					ロード 2 0 4
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗 P S M A 抗体、バリエント、及びその使用

(57)【要約】

本発明は、改善された抗 P S M A 抗体又はその抗原結合断片、関連する核酸、ベクター、細胞、組成物、キット、及びそれらの使用方法に関する。

【選択図】 図 1

Affinity of PSMAb and PSMAbLm

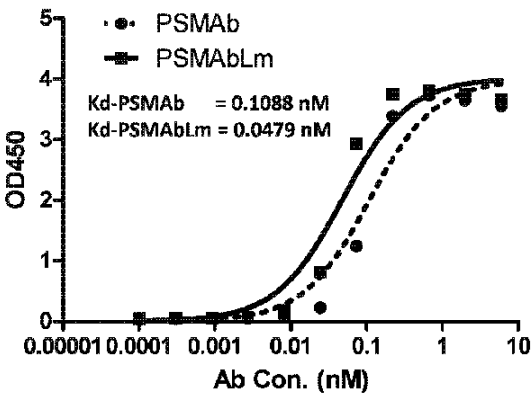


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

前立腺特異的膜抗原（PSMA）に特異的に結合する抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションであって、前記抗体又はその抗原結合断片が、

3つの軽鎖相補性決定領域（LCDR）（LCDR1、LCDR2、及びLCDR3）を含む軽鎖可変領域（LCVR）であって、前記LCDR1が、配列番号9のアミノ酸配列を含み、前記LCDR2が、配列番号13若しくは41のアミノ酸配列を含み、前記LCDR3が、配列番号17のアミノ酸配列を含む、LCVR、及び／又は

3つの重鎖相補性決定領域（HCDR）（HCDR1、HCDR2、及びHCDR3）重鎖可変領域（HCVR）であって、前記HCDR1が、配列番号25若しくは45のアミノ酸配列を含み、前記HCDR2が、配列番号29のアミノ酸配列を含み、前記HCDR3が、配列番号33若しくは49のアミノ酸配列を含むことを含む、HCVRを含み、

前記バリエーションが、前記LCDR1、前記LCDR2、前記LCDR3、前記HCDR1、前記HCDR2、又は前記HCDR3に1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

【請求項 2】

（a）前記LCDR1が、配列番号9のアミノ酸配列を含み、前記LCDR2が、配列番号13のアミノ酸配列を含み、前記LCDR3が、配列番号17のアミノ酸配列を含み、前記HCDR1が、配列番号25のアミノ酸配列を含み、前記HCDR2が、配列番号29のアミノ酸配列を含み、前記HCDR3が、配列番号33のアミノ酸配列を含むか、

（b）前記LCDR1が、配列番号9のアミノ酸配列を含み、前記LCDR2が、配列番号13のアミノ酸配列を含み、前記LCDR3が、配列番号17のアミノ酸配列を含み、前記HCDR1が、配列番号45のアミノ酸配列を含み、前記HCDR2が、配列番号29のアミノ酸配列を含み、前記HCDR3が、配列番号33のアミノ酸配列を含むか、

（c）前記LCDR1が、配列番号9のアミノ酸配列を含み、前記LCDR2が、配列番号41のアミノ酸配列を含み、前記LCDR3が、配列番号17のアミノ酸配列を含み、前記HCDR1が、配列番号45のアミノ酸配列を含み、前記HCDR2が、配列番号29のアミノ酸配列を含み、前記HCDR3が、配列番号33のアミノ酸配列を含むか、又は

（d）前記LCDR1が、配列番号9のアミノ酸配列を含み、前記LCDR2が、配列番号13のアミノ酸配列を含み、前記LCDR3が、配列番号17のアミノ酸配列を含み、前記HCDR1が、配列番号45のアミノ酸配列を含み、前記HCDR2が、配列番号29のアミノ酸配列を含み、前記HCDR3が、配列番号49のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

【請求項 3】

前記軽鎖可変領域が、配列番号5、7、11、15、19、39、43、61、63、65、67、及び69のアミノ酸配列のうちの1つ以上を含む、請求項1～2のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

【請求項 4】

前記重鎖可変領域が、配列番号21、23、27、31、35、47、51、53、55、57、59、及び68のアミノ酸配列のうちの1つ以上を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

【請求項 5】

（a）前記軽鎖可変領域が、配列番号5のアミノ酸配列に対して少なくとも75%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号5のアミノ酸配列を含み、かつ／又は前記重鎖可変領域が、配列番号21のアミノ酸配列に対して少なくとも75%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号21のアミノ酸配列を含み、

（b）前記軽鎖可変領域が、配列番号70のアミノ酸配列に対して少なくとも75%の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号70のアミノ酸配列を含み、かつ／又は前記重鎖可変領域が、配列番号72のアミノ酸配列に対して少なくとも75%の

同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 72 のアミノ酸配列を含み、

(c) 前記軽鎖可変領域が、配列番号 71 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は前記重鎖可変領域が、配列番号 73 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 73 のアミノ酸配列を含み、あるいは

(d) 前記軽鎖可変領域が、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は前記重鎖可変領域が、配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 74 のアミノ酸配列を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

10

【請求項 6】

前記軽鎖可変領域及び前記重鎖可変領域が、配列番号 5 及び 21、配列番号 70 及び 72、配列番号 71 及び 73、又は配列番号 5 及び 74 の LCVR 及び HCVR アミノ酸配列対を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

【請求項 7】

配列番号 75 及び 77、配列番号 76 及び 78、配列番号 69 及び 68、又は配列番号 75 及び 79 の重鎖／軽鎖配列対を含む、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

20

【請求項 8】

配列番号 3 及び 37 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

【請求項 9】

前記抗体又はその抗原結合断片が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD、及びIgEから選択されるか、あるいはIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgA、若しくはIgEの野生型又は非フコシル化免疫グロブリン定常及び／若しくは可変ドメインを有する、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

30

【請求項 10】

前記抗体又は抗原結合断片が、(i) 組換え抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び／若しくはポリクローナル抗体の混合物、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体であり、かつ／あるいは(ii) 細胞傷害性剤、薬物、成長阻害剤、毒素、酵素、タグ、標識、放射性同位体、又はナノ粒子にコンジュゲートされている、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション。

【請求項 11】

同じか又は異なる抗原で 2 つ以上の異なるエピトープに結合する二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片であって、前記エピトープのうちの 1 つが、ヒト前立腺特異的膜抗原 (PSMA) にあり、前記二重特異性又は多重特異性抗体が、先行請求項のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションの前記軽鎖可変領域及び／又は前記重鎖可変領域を含む、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片。

40

【請求項 12】

単離されたキメラ抗原受容体 (CAR) であって、前記 CAR が、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片又はバリエーションと、膜貫通ドメインと、1 つ以上の刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む、単離された CAR。

【請求項 13】

50

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片又はバリエーション、請求項 1 1 に記載の二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、あるいは請求項 1 2 に記載の C A R の、ポリペプチド鎖をコードする、核酸分子。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 1 5】

請求項 1 3 に記載の核酸分子又は請求項 1 4 に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 1 6】

抗体又はその抗原結合断片を調製する方法であって、

請求項 1 5 に記載の細胞を得ることと、

前記核酸分子によってコードされたポリペプチドの発現と、抗体又はその断片の組み立てとを可能にする条件下で、培地中で前記細胞を培養することと、

培養した前記細胞又は前記細胞の前記培地から前記抗体又は断片を精製することと、を含む、方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片又はバリエーション、請求項 1 1 に記載の二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、請求項 1 2 に記載の C A R 、請求項 1 3 に記載の核酸分子、請求項 1 4 に記載のベクター、あるいは請求項 1 5 に記載の細胞と、任意選択で、薬学的に許容される担体と、を含む、組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、請求項 1 1 に記載の二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、請求項 1 2 に記載の C A R 、請求項 1 3 に記載の核酸分子、請求項 1 4 に記載のベクター、請求項 1 5 に記載の細胞、あるいは請求項 1 7 に記載の組成物を含む、キット。

【請求項 1 9】

対象における P S M A の発現に関連する増殖性疾患に起因する状態の診断、予防、治療、又はそれらの組み合わせのための医薬品の製造のための、請求項 1 7 に記載の組成物の使用。

【請求項 2 0】

対象における P S M A の発現に関連する増殖性疾患を予防又は治療する方法であって、前記対象に、有効量の請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、請求項 1 1 に記載の二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、請求項 1 2 に記載の C A R 、請求項 1 3 に記載の核酸分子、請求項 1 4 に記載のベクター、請求項 1 5 に記載の細胞、あるいは請求項 1 7 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 2 1】

前記対象に、第 2 の薬剤又は療法を与えることを更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 2 の薬剤又は療法が、抗がん剤を含む、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

P S M A の発現に関連する疾患又は状態を有する対象を特定する方法であって、

前記対象から組織試料を提供することと、

前記試料を、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションと接触させることと、

前記抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションの前記組織試料との結合を決定することであって、前記抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションの前記組織試料との前記結合が、前記対象における P S M A の前記発現に関連する疾患状態の存在を示す、決定することと、を含む、方法。

【請求項 2 4】

P S M A を標的とするイメージングの方法であって、それを必要とする対象に、請求項

10

20

30

40

50

1～10のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、あるいは請求項17に記載の組成物を投与することを含み、前記抗体若しくはその抗原結合断片又はバリエーションが、試薬に結合されている、方法。

【請求項25】

前記試薬が、光活性化可能な薬剤、フルオロフォア、放射性同位体、生物発光タンパク質、生物発光ペプチド、蛍光タグ、蛍光タンパク質、蛍光ペプチド、造影剤、酵素、核磁気共鳴活性試薬、又はナノ粒子を含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記疾患が、がんを含む、請求項20～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

前記がんが、前立腺がんを含む、請求項26に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年3月30日に提出された米国仮出願第63／325,330号の優先権を主張する。この出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の参照

本出願は、2023年3月27日に作成され、81,222バイトを含むファイルSequenceList_168276.00301としてコンピュータ可読形式で提出された配列表を参照により組み込む。

【0003】

本発明は、改善された抗PSMA抗体及びそれらの使用方法に関する。

【背景技術】

【0004】

前立腺特異的膜抗原（PSMA）は、前立腺上皮細胞のための特異的マーカーとして確認されており、これは、前立腺がんを標的とする精密医療の開発における基礎を築いた。組織学的試験は、ほとんど全ての前立腺がんが、PSMAを発現し、より高い悪性度若しくは転移、又はアンドロゲン抑制療法に耐性を有するがんは、通常、はるかに高いPSMAを発現することを示した（Ananias, H. J., et al. (2009) Prostate, 69 (10): 1101-8、Wright, G. L., Jr., et al. (1995) Urol Oncol, 1 (1): 18-28、Wright, G. L., Jr., et al. (1996) Urology, 48 (2): 326-34、Sweat, S. D., et al. (1998) Urology, 52 (4): 637-40）。正常組織におけるPSMA発現レベルは、腫瘍におけるよりも100～1000倍低く（Sokoloff, R. L., et al. (2000) Prostate, 43 (2): 150-7）、これらの正常組織は、通常、循環抗体に容易にはアクセス可能ではなく（Troyer, J. K. et al. (1995) Int J Cancer, 62 (5): 552-8）、PSMAを標的としたイメージング及び療法の安全性を更に確信させた。前立腺に加えて、PSMAはまた、多くの固形腫瘍における血管新生でも高度に発現されるが、正常な血管には存在しない（Sokoloff, R. L., et al. (2000) Prostate, 43 (2): 150-7）。したがって、PSMAは、前立腺がんに対してだけでなく、他の固形腫瘍に対する血管新生標的化療法にとっても理想的なマーカーである。

【0005】

抗体は、腫瘍細胞で発現された腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原を特異的に認識することができる、腫瘍標的化のための最も効率的なツールであり、早期腫瘍検出のための光学的、PET、SPECT、又はMRIのイメージング、抗体-薬物コンジュゲート、及びがん治療のための放射線療法、二重特異性又は多重特異性抗体、キメラ抗原受容体T細胞

10

20

30

40

50

又はNK細胞療法などの腫瘍標的化イメージング及び治療を含む、抗体ベースの精密医療のための道を開く。

【0006】

しかしながら、抗体などのタンパク質薬物の安定性は、多くの異なる要因によって悪影響を受ける。タンパク質の分解及びその後のタンパク質活性における低下は、製薬業界で繰り返している問題である。したがって、改善された安定性を有する治療剤としての抗体が依然として必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、いくつかの態様において上記の必要性に対処する。一態様では、本開示は、ヒトPSMAなどのPSMAに特異的に結合する抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、(i) 3つの軽鎖相補性決定領域(LCDR)(LCDR1、LCDR2、及びLCDR3)を含む軽鎖可変領域(LCVR)であって、LCDR1が、配列番号9のアミノ酸配列を含み、LCDR2が、配列番号13若しくは41のアミノ酸配列を含み、LCDR3が、配列番号17のアミノ酸配列を含む、LCVR、及び／又は(ii) 3つの重鎖相補性決定領域(HCDR)(HCDR1、HCDR2、及びHCDR3)重鎖可変領域(HCVR)であって、HCDR1が、配列番号25若しくは45のアミノ酸配列を含み、HCDR2が、配列番号29のアミノ酸配列を含み、HCDR3が、配列番号33若しくは49のアミノ酸配列を含むことを含む、HCVRを含み、バリエーションは、LCDR1、LCDR2、LCDR3、HCDR1、HCDR2、又はHCDR3に1つ以上の保守的アミノ酸置換を含む。

10

20

【0008】

いくつかの実施形態では、LCDR1は、配列番号9のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、配列番号13のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、配列番号17のアミノ酸配列を含み、HCDR1は、配列番号25のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、配列番号29のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、配列番号33のアミノ酸配列を含む。

【0009】

いくつかの実施形態では、LCDR1は、配列番号9のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、配列番号13のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、配列番号17のアミノ酸配列を含み、HCDR1は、配列番号45のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、配列番号29のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、配列番号33のアミノ酸配列を含む。

30

【0010】

いくつかの実施形態では、LCDR1は、配列番号9のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、配列番号41のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、配列番号17のアミノ酸配列を含み、HCDR1は、配列番号45のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、配列番号29のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、配列番号33のアミノ酸配列を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、LCDR1は、配列番号9のアミノ酸配列を含み、LCDR2は、配列番号13のアミノ酸配列を含み、LCDR3は、配列番号17のアミノ酸配列を含み、HCDR1は、配列番号45のアミノ酸配列を含み、HCDR2は、配列番号29のアミノ酸配列を含み、HCDR3は、配列番号49のアミノ酸配列を含む。

40

【0012】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号5、7、11、15、19、39、43、61、63、65、67、及び69のアミノ酸配列のうちの1つ以上を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号21、23、27、31、35、47、51、53、55、57、59、及び68のアミノ酸配列のうちの1つ以上を含む。

【0014】

50

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 70 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 70 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 72 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 72 のアミノ酸配列を含む。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 71 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 73 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 73 のアミノ酸配列を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % の同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 74 のアミノ酸配列を含む。

20

【0018】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、配列番号 5 及び 21、配列番号 70 及び 72、配列番号 71 及び 73、又は配列番号 5 及び 74 の L C V R 及び H C V R アミノ酸配列対を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションは、配列番号 75 及び 77、配列番号 76 及び 78、配列番号 69 及び 68、又は配列番号 75 及び 79 の重鎖／軽鎖配列対を含む。

30

【0020】

いくつかの実施形態では、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションは、配列番号 3 及び 37 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig M、Ig A 1、Ig A 2、Ig A s e c、Ig D、及び Ig E から選択されるか、あるいは Ig G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4、Ig M、Ig A 1、Ig A 2、Ig A s e c、Ig A、若しくは Ig E の野生型又は非フコシル化免疫グロブリン定常及び／若しくは可変ドメインを有する。

40

【0022】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、組換え抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び／若しくはポリクローナル抗体の混合物、ヒト抗体、ヒト化抗体、又はキメラ抗体である。

【0023】

いくつかの実施形態では、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションは、細胞傷害性剤、薬物、成長阻害剤、毒素、酵素、タグ、標識、放射性同位体、又はナノ粒子にコンジュゲートされている。

【0024】

別の態様では、本開示はまた、同じか又は異なる抗原上の 2 つ以上の異なるエピトープ

50

に結合する二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、エピトープのうちの1つは、ヒト前立腺特異的膜抗原（PSMA）上にあり、二重特異性又は多重特異性抗体は、本明細書に記載される、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションの軽鎖可変領域及び／又は重鎖可変領域を含む。

【0025】

別の態様では、本開示は、単離されたキメラ抗原受容体（CAR）を更に提供する。いくつかの実施形態では、CARは、本明細書に記載の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションと、膜貫通ドメインと、1つ以上の刺激ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインと、を含む。

【0026】

また、（a）本明細書に記載される、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、あるいは請求の範囲のCARのポリペプチド鎖をコードする核酸分子、（b）本明細書に記載の核酸分子を含むベクター、（c）本明細書に記載される、核酸分子又はベクターを含む細胞も、本開示の範囲内である。

【0027】

別の態様では、本開示は、抗体又はその抗原結合断片を調製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、（i）本明細書に記載の細胞を得ることと、（ii）核酸分子によってコードされたポリペプチドの発現と、抗体又はその断片の組み立てとを可能にする条件下で、培地中で細胞を培養することと、（iii）培養した細胞又は細胞の培地から抗体又は断片を精製することと、を含む。

【0028】

別の態様では、本開示は加えて、本明細書に記載される、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、CAR、核酸分子、ベクター、あるいは細胞と、任意選択で、薬学的に許容される担体と、を含む組成物を提供する。

【0029】

別の態様では、本開示は加えて、本明細書に記載される、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、CAR、核酸分子、ベクター、細胞、あるいは組成物を含むキットを提供する。

【0030】

別の態様では、本開示はまた、対象におけるPSMAの発現に関連する増殖性疾患に起因する状態の診断、予防、治療、又はそれらの組み合わせのための医薬品の製造のための本明細書に記載の組成物の使用を提供する。

【0031】

別の態様では、本開示は、対象におけるPSMAの発現に関連する増殖性疾患を予防又は治療する方法を更に提供する。いくつかの実施形態では、方法は、対象に、本明細書に記載される、有効量の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、CAR、核酸分子、ベクター、細胞、あるいは組成物を投与することを含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、方法は、対象に、第2の薬剤又は療法を与えることを更に含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤又は療法は、抗がん剤を含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤又は療法は、対象に、本明細書に記載される、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、CAR、核酸分子、ベクター、細胞、あるいは組成物の前、後、又は同時に投与される。

【0033】

別の態様では、本開示はまた、PSMAの発現に関連する疾患又は状態を有する対象を特定する方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、（a）対象から組織試料を

10

20

30

40

50

提供することと、(b) 試料を抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションと接触させることと、(c) 抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションの組織試料との結合を決定することであって、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションの組織試料との結合が、対象における P S M A の発現に関連する疾患状態の存在を示す、決定することと、を含む。

【0034】

更に別の態様では、本開示はまた、P S M A を標的とするイメージングの方法を提供する。方法は、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションあるいは組成物を、それを必要とする対象に投与することを含み、抗体若しくはその抗原結合断片又はバリエーションは、試薬に結合されている。いくつかの実施形態では、試薬は、光活性化可能な薬剤、フルオロフォア、放射性同位体、生物発光タンパク質、生物発光ペプチド、蛍光タグ、蛍光タンパク質、蛍光ペプチド、造影剤、酵素、核磁気共鳴活性試薬、又はナノ粒子を含む。

【0035】

いくつかの実施形態では、疾患は、がんを含む。いくつかの実施形態では、がんは、前立腺がんを含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、ヒトである。

【0037】

以上の要約は、本開示の全ての態様を定義することを意図されたものではなく、追加的な態様が、以下の詳細な説明等の他の節において説明される。本明細書の全体は、統一された開示として関連付けられることを意図されたものであり、特徴の組み合わせが本明細書の同じ文、段落、又は節において一緒に見出されない場合であっても、本明細書に説明された特徴の全ての組み合わせが企図されることは、理解されるべきである。本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかしながら、本開示の趣旨及び範囲内での様々な変更及び修正が、この詳細な説明から当業者には明らかになるので、詳細な説明及び具体的な実施例は、本開示の具体的な実施形態を示しながらも、例示のためにのみ与えられるものであることは、理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0038】

本発明の好ましい実施形態の以下の詳細な説明は、添付の図面と併せて読むとき、より良く理解されるであろう。本発明を例示する目的のために、現在好ましい実施形態が図面に示されている。しかしながら、本発明は、図面に示された実施形態の正確な配置及び手段に限定されるものではないことが、理解されるべきである。

【0039】

【図1】キャプチャー E L I S A によって P S M A b 及び P S M A b L m における親和性を測定する実験の結果を示す。データは、P S M A b L m の親和性が、P S M A b よりも約 2.3 倍高いことを示した ($K_d = 0.0479 \text{ nM}$ (P S M A b L m) 対 $K_d = 0.1088 \text{ nM}$ (P S M A b))。

【図2】標的細胞に対する P S M A b - W T、P S M A b - A F、及び P S M A b L m - A F の A D C C 活性を示す。A D C C は、C D 16 - ジャーカットレポーター細胞を、標的として P S M A + C H O 細胞とともに使用して調査した。略語：P S M A b - W T：正常なグリコシル化を有する野生型 P S M A b、P S M A b - A F：非フコシル化 P S M A b、P S M A b L m - A F：軽鎖 C D R 3 領域に N => S 変異を有する非フコシル化 P S M A b。

【図3A-3B】L n C a p 細胞に対する P S M A b 及び P S M A b L m の結合を示す。図3Aは、細胞集団を示し、図3Bは、各抗体濃度の蛍光平均強度を示す。

【図4A-4D】P S M A b 及び P S M A b L m の L n C a p 細胞への内在化を示す。図4A-4Cは、内在化抗体をそれぞれ 0.001~0.009 nM、0.027~0.247 nM、及び 0.74~6.67 nM の抗体濃度で有する細胞集団を示す。図4Dは、内在化抗体を有する細胞の統計的蛍光平均強度を異なる濃度で示す。

【発明を実施するための形態】

【0040】

本開示は、がんを治療及び／又は予防するための組成物及び方法に関する。これは、P S M A（例えば、ヒトP S M A）の細胞外ドメインにおけるエピトープに特異的に結合する最適化した抗体又はその抗原結合断片の発見に部分的に基づいている。

【0041】

一態様では、本開示は、P S M Aに結合する抗体又はその抗原結合断片を提供する。開示される抗P S M A抗体又はその抗原結合断片は、親抗体と比較して優れた安定性及び有効性を有する。また、二重特異性抗体、抗体-薬物コンジュゲート、P S M A標的化イメージング剤、キメラ抗原受容体、キメラ抗原受容体を発現する細胞なども本開示の範囲内である。

10

【0042】

いくつかの実施形態では、本開示は、P S M Aの細胞外ドメインに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む組成物を提供する。抗体又はその抗原結合断片は、前立腺がん及び／又は他の固形腫瘍の血管新生に存在するP S M Aを標的とする治療用及び診断用組成物として製剤化することができる。一実施形態では、組成物は、抗体-薬物コンジュゲート（ADC）を含み得、抗体又はその抗体若しくは抗原結合断片は、薬物を腫瘍部位に対して標的化させる。一実施形態では、組成物は、二重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、P S M Aに特異的に結合する第1の抗原結合アームと、T細胞抗原（例えば、C D 3）に結合する第2の抗原結合アームと、を含む。一実施形態では、組成物は、P S M Aに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含むキメラ抗原受容体である。

20

【0043】

別の態様では、本開示はまた、本明細書に開示される、抗体若しくはその抗原結合断片、二重特異性抗体、又はキメラ抗原受容体をコードする単離された核酸を提供する。また本明細書に開示される、抗体若しくはその抗原結合断片、二重特異性抗体、又はキメラ抗原受容体を発現するように改変されている細胞、及び細胞を含む細胞培養も本開示の範囲内である。

【0044】

本開示は、加えて、前立腺がんを含むがこれに限定されない、がんを治療又は予防するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、対象に、P S M Aに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む有効量の組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、対象に、抗体若しくはその抗原結合断片、二重特異性抗体、又はキメラ抗原受容体を投与することを含む。一実施形態では、方法は、対象に、抗体若しくはその抗原結合断片、二重特異性抗体、又はキメラ抗原受容体をコードする単離された核酸を含む有効量の組成物を投与することを含む。一実施形態では、方法は、対象に、抗体若しくはその抗原結合断片、二重特異性抗体、又はキメラ抗原受容体を発現するように改変された細胞を投与することを含む。

30

【0045】

本開示は、対象におけるがんを検出するための方法を更に提供する。いくつかの実施形態では、方法は、対象に、P S M Aに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を含む標的化イメージング剤を投与することを含む。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、P E T、S P E C T、M R I、又は光学的イメージングを含むがこれらに限定されない様々なイメージングモダリティで使用される標的化イメージング剤を提供するために、任意のイメージング剤にコンジュゲートすることができる。

40

【0046】

抗体

一態様では、本開示は、P S M Aの細胞外部分におけるエピトープに特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施形態では、P S M Aの細胞外部分は、配列番号1のアミノ酸配列を含む。

50

【0047】

開示される抗体又はその抗原結合断片は、WO2017/180713A1に記載の抗PSMA抗体の最適化に部分的に基づいている。最適化は、軽鎖のCDR3における「NG」配列の「SG」への変異を含む。重要なことに、かかる最適化は、アスパラギン（Asn又はN）の潜在的な脱アミド化を排除する。またそれは、開示される抗体又はその抗原結合断片に、改善した安定性及び有効性を含むいくつかの優れた特性を、抗原結合親和性に悪影響を伴わずに付与する。例えば、PSMAbLmによって表されるような、最適化した完全抗体の親和性は、その親抗体PSMAbと同じか、又はわずかに高い親和性さえ示す（例えば、WO2017/180713A1の抗体の $K_d = 0.1088 \text{ nM}$ と比較して、PSMAbLmの $K_d = 0.049 \text{ nM}$ ）。

10

【0048】

開示される抗体又は抗原結合断片は、軽鎖のCDR3における「NG」配列の「SG」への変異に限定されない。開示される抗体又は抗原結合断片はまた、以下に列挙される1つ又は組み合わせた変異を含む任意の可能な変異を含む：軽鎖のCDR3におけるAsnのAla、Arg、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異、及び／又は軽鎖のCDR3におけるGlyのAla、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異。

20

【0049】

開示される抗体又は抗原結合断片はまた、重鎖のFR3における「NS」の潜在的な脱アミド化部位を除去するために、以下に列挙される1つ又は組み合わせた変異を含む任意の可能な変異を含む：FR3におけるAsnのAla、Arg、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異、及び／又は重鎖のFR3におけるSerのAla、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異。

30

【0050】

開示される抗体又は抗原結合断片はまた、「NT」の潜在的な脱アミド化部位を除去するために、以下に列挙される1つ又は組み合わせた変異を含む任意の可能な変異を含む：軽鎖のCDR2におけるAsnのAla、Arg、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異、及び／又は軽鎖のCDR2におけるThrのAla、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異。

40

【0051】

開示される抗体又は抗原結合断片はまた、重鎖のFR3における「NT」の潜在的な脱アミド化部位を除去するために、以下に列挙される1つ又は組み合わせた変異を含む任意の可能な変異を含む：重鎖のFR3におけるAsnのAla、Arg、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異、及び／又は重鎖のFR3におけるThrのAla、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異。

50

【0052】

開示される抗体又は抗原結合断片はまた、重鎖のCDR2における「DG」の潜在的な異性化モチーフを除去するために、以下に列挙される1つ又は組み合わせた変異を含む任意の可能な変異を含む：重鎖のCDR2におけるAspのAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異、及び／又は重鎖のCDR2におけるGlyのAla、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異。

10

【0053】

開示される抗体又は抗原結合断片はまた、軽鎖のCDR3における「DS」の潜在的な異性化モチーフを除去するために、以下に列挙される1つ又は組み合わせた変異を含む任意の可能な変異を含む：軽鎖のCDR3におけるAspのAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異、及び／又は軽鎖のCDR3におけるSerのAla、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異。

20

【0054】

開示される抗体又は抗原結合断片はまた、重鎖のFR3における「DS」の潜在的な異性化モチーフを除去するために、以下に列挙される1つ又は組み合わせた変異を含む任意の可能な変異を含む：重鎖のFR3におけるAspのAla、Arg、Asn、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Ser、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異、及び／又は重鎖のFR3におけるSerのAla、Arg、Asn、Asp、Cys、Glu、Gln、Gly、His、Ile、Leu、Lys、Met、Phe、Pro、Thr、Trp、Tyr、若しくはValへの変異を含むがこれらに限定されない任意の変異。

30

【0055】

また本開示において、抗体－薬物コンジュゲート（ADC）が提供される。ADCは、抗原特異的毒性送達のために抗体をアーム化するプラットフォーム戦略である。その根拠は、抗体、通常は腫瘍標的化抗体を超毒性薬物とコンジュゲートして、標的化した手段で腫瘍細胞を選択的に殺滅し、一方、正常組織は免れている。ADCに使用される薬物は、主に2つのタイプに分類され、1つは、アウリスチン（MMAE、MMAF）（Stephan, J. P., et al. (2008) Bioconjug Chem, 19 (8) : 1673-83、Younes, A., et al. (2010) N Engl J Med, 363 (19) : 1812-21、Okeley, N. M., et al. (2010) Clin Cancer Res, 16 (3) : 888-970）及びメイタンシノイド（DM1及びDM4）（Lambert, J. M. et al. (2014) J Med Chem, 57 (16) : 6949-64、Bender, B., et al. (2014) AAPS J, 16 (5) : 994-1008、Raufi, A., A. S. Ebrahim et al. (2013) Cancer Manag Res, 5 : 225-33）などのマイクロチューブリン阻害剤であり、他のタイプは、カリケアミシンなどの二本鎖DNA切断剤である。過毒性のため、特定の薬物は、化学療法剤として単独で使うことができず、代わりに、それらは、副作用を低減し、治療効果を改善するために抗体とコンジュゲートされなければならない。

40

【0056】

また、二重特異性又は多重特異性抗体も、本開示の範囲内である。二重特異性モノクロ

50

ーナル抗体 (BsMAb、BsAb) は、新規抗体を使用して強力な抗腫瘍兵器を作製する別の戦略である。BsAbは、2つの異なるモノクローナル抗体の断片から構成され、その結果、2つの異なるタイプの抗原に結合する人工タンパク質である。このアプローチの最も広く使用された適用は、がん免疫療法においてであり、BsMAbは操作されて、細胞傷害性細胞 (受容体様CD3を使用する) 及び破壊されるべき腫瘍細胞のような標的に同時に結合する (Muller D et al. (2010) BioDrugs, 24 (2) : 89-98、Chames P1 et al. (2009) MAbs, 1 (6) : 539-47)。二重特異性T細胞エンゲージャー (BiTE) 及びデュアルアフィニティリターゲティング (DART) は、小さな断片BsAbの例である。ノブインホールIgG、CrossMab、Triomab、DVD Igなどの様々なより大きなBsAbも開発された (Kontermann RE et al. (2015) Drug Discov Today, 20 (7) : 838-47)。BsAbでは、一方のアームは、抗CD3などのT細胞若しくはNK細胞活性化抗体又は抗CD16抗体などであり得、他方のアームは、腫瘍標的化抗体であり得るか、あるいは両方のアームは、腫瘍成長の相乗的阻害のために異なる腫瘍マーカーを標的とする。

10

20

30

40

50

【0057】

本開示は、キメラ抗原受容体 (CAR) を含む組成物を更に提供する。例えば、いくつかの実施形態では、組成物は、CARを発現するように遺伝子改変された細胞である。例えば、いくつかの実施形態では、T細胞又はNK細胞は、T細胞又はNK細胞が腫瘍細胞上の特定のタンパク質 (抗原) を認識することを可能にするCARをそれらの表面で産生するように遺伝子操作される。scFvは、かかる操作のために最も一般的に使用される受容体であり、がん治療のために臨床において成功裏に使用されてきている (Grupp SA et al. (2013) N Engl J Med, 368 (16) : 1509-18、Porter DL et al. (2011) N Engl J Med, 365 (8) : 725-33)。scFvは、ヒンジ及び膜貫通ドメインを介して細胞内シグナル伝達ドメインに融合される。かかる分子は、その標的のscFvによる認識にตอบสนองして、T細胞又はNK細胞の活性化をもたらす。T細胞又はNK細胞がかかるCARを発現するとき、それらは標的抗原を発現する標的細胞を認識して殺滅する。いくつかのCARが、腫瘍関連抗原に対して開発されてきており、かかるCAR発現T細胞を使用する養子移入アプローチが、現在、様々ながんの治療のために臨床試験中である。

【0058】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号3のアミノ酸配列を含む、高親和性抗PSMA scFv Mut-igy1を含む。

【0059】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号7のアミノ酸配列を含むVL FR1を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号9のアミノ酸配列を含むVL CDR1を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号11のアミノ酸配列を含むVL FR2を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号13のアミノ酸配列を含むVL CDR2を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号15のアミノ酸配列を含むVL FR3を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号17のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号19のアミノ酸配列を含むVL FR4を含む。

【0060】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号23のアミノ酸配列を含むVH FR1を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号25のアミノ酸配列を含むVH CDR1を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号27のアミノ酸配列を含むVH FR2を含む。一実施形態では、抗体

又はその抗原結合断片は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H F R 3 を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーを含む。

【0061】

例えば、一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、M u t - g y 1 として本明細書に示される s c F v を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖と、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。一実施形態では、M u t - g y 1 は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L F R 1、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V L F R 2、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V L F R 3、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V L F R 4、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H F R 1、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む V H F R 2、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H F R 3、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、及び／又は配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 を含む。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーを含む。

【0062】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、1 つ以上の変異を含む。例えば、一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V L F R 2 を含み、配列番号 39 は、配列番号 11 に対して V → A 点変異を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 を含み、配列番号 41 は、配列番号 13 に対して G → E 点変異を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 43 のアミノ酸配列を含む V L F R 4 を含み、配列番号 43 は、配列番号 19 に対して V → A 点変異を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 を含み、配列番号 45 は、配列番号 25 に対して S → F 点変異を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 47 のアミノ酸配列を含む V H F R 3 を含み、配列番号 47 は、配列番号 31 に対して I → V 点変異を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含み、配列番号 49 は、配列番号 33 に対して D → G 点変異を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 51 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 を含み、配列番号 51 は、配列番号 35 に対して G → E 点変異を含む。

【0063】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、M u t - g y 1 - s t として本明細書に示される s c F v を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - s t は、配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V L F R 2 と、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 と、配列番号 51 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 と、を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - s t は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L F R 1、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V L F R 2、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V L F R 3、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V L F R 4、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H F R 1、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む V H F R 2、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H F R 3、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、及び／又は配列番

号 5 1 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 を含む。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーを含む。

【 0 0 6 4 】

一実施形態では、組成物は、M u t - g y 1 - 2 として本明細書に示される s c F v を含む抗体断片を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - 2 は、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 と、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L F R 4 と、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 と、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H F R 3 と、を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - 2 は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L F R 1、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む V L F R 2、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む V L F R 3、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L F R 4、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む V H F R 1、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む V H F R 2、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H F R 3、配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、及び／又は配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 を含む。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーを含む。

10

【 0 0 6 5 】

一実施形態では、組成物は、M u t - g y 1 - 3 として本明細書に示される s c F v を含む抗体断片を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - 3 は、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 と、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 と、を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - 3 は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L F R 1、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む V L F R 2、配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む V L F R 3、配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む V L F R 4、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む V H F R 1、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む V H F R 2、配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H F R 3、配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3、及び／又は配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 を含む。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーを含む。

20

30

【 0 0 6 6 】

一実施形態では、本明細書に記載の s c F v は、別の断片抗体又は全長抗体に操作することができ、断片抗体は、F a b、F a b'、(F a b')₂、F v、s c F v - F c、s c F v - C H 2、s c F v - C H 3、又は完全抗体を指す。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、M u t - g y 1 - 2 s c F v を含み、P S M A b L m として本明細書に示される。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、シグナルペプチドを有する重鎖を含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号 5 3 又は 5 5 のアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 5 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態では、抗体は、配列番号 5 9 の重鎖定常領域を含む。

【 0 0 6 9 】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、シグナルペプチドを有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、配列番号 6 1 又は 6 3 のアミ

50

ノ酸配列を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片 y は、配列番号 65 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 67 の軽鎖定常領域を含む。

【0070】

一態様では、本開示は、ヒト P S M A などの P S M A に特異的に結合する抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションを提供する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、(i) 3つの軽鎖相補性決定領域 (L C D R) (L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3) を含む軽鎖可変領域 (L C V R) であって、L C D R 1 が、配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、L C D R 2 が、配列番号 13 又は 41 のアミノ酸配列を含み、L C D R 3 が、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む、L C V R、及び／又は (ii) 3つの重鎖相補性決定領域 (H C D R) (H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3) 重鎖可変領域 (H C V R) であって、H C D R 1 が、配列番号 25 又は 45 のアミノ酸配列を含み、H C D R 2 が、配列番号 29 のアミノ酸配列を含み、H C D R 3 が、配列番号 33 又は 49 のアミノ酸配列を含むことを含む、H C V R を含む、バリエーションは、L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3、H C D R 1、H C D R 2、又は H C D R 3 に 1 つ以上の保守的アミノ酸置換を含む。

10

【0071】

いくつかの実施形態では、L C D R 1 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、L C D R 2 は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含み、L C D R 3 は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含み、H C D R 1 は、配列番号 25 のアミノ酸配列を含み、H C D R 2 は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含み、H C D R 3 は、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む。

20

【0072】

いくつかの実施形態では、L C D R 1 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、L C D R 2 は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含み、L C D R 3 は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含み、H C D R 1 は、配列番号 45 のアミノ酸配列を含み、H C D R 2 は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含み、H C D R 3 は、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む。

【0073】

いくつかの実施形態では、L C D R 1 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、L C D R 2 は、配列番号 41 のアミノ酸配列を含み、L C D R 3 は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含み、H C D R 1 は、配列番号 45 のアミノ酸配列を含み、H C D R 2 は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含み、H C D R 3 は、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む。

30

【0074】

いくつかの実施形態では、L C D R 1 は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含み、L C D R 2 は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含み、L C D R 3 は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含み、H C D R 1 は、配列番号 45 のアミノ酸配列を含み、H C D R 2 は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含み、H C D R 3 は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含む。

【0075】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 5、7、11、15、19、39、43、61、63、65、67、及び 69 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上を含む。

【0076】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号 21、23、27、31、35、47、51、53、55、57、59、及び 68 のアミノ酸配列のうちの 1 つ以上を含む。

40

【0077】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % (例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %) 同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 21 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 % (例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %) 同一性を有

50

するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 21 のアミノ酸配列を含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 70 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 %（例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %）同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 70 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 72 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 %（例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %）同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 72 のアミノ酸配列を含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 71 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 %（例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %）同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 73 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 %（例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %）同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 73 のアミノ酸配列を含む。

【0080】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号 5 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 %（例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %）同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 5 のアミノ酸配列を含み、かつ／又は重鎖可変領域は、配列番号 74 のアミノ酸配列に対して少なくとも 75 %（例えば、75 %、80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %）同一性を有するアミノ酸配列を含むか、若しくは配列番号 74 のアミノ酸配列を含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、配列番号 5 及び 21、配列番号 70 及び 72、配列番号 71 及び 73、又は配列番号 5 及び 74 の LCVR 及び HCVR アミノ酸配列対を含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションは、配列番号 75 及び 77、配列番号 76 及び 78、配列番号 69 及び 68、又は配列番号 75 及び 79 の重鎖／軽鎖配列対を含む。

【0083】

いくつかの実施形態では、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションは、配列番号 3 及び 37 のアミノ酸配列のうちの少なくとも 1 つを含む。

【0084】

代表的配列

抗体バリエーション	VL	VH	VL							VH						
			CDR	CDR	CDR	FR1	FR2	FR3	FR4	CDR	CDR	CDR	FR1	FR2	FR3	FR4
			1	2	3					1	2	3				
Mut-gy1	5	21	9	13	17	7	11	15	19	25	29	33	23	27	31	35
Mut-gy1-st	70	72	9	13	17	7	39	15	19	45	29	33	23	27	31	51
Mut-gy1-2	71	73	9	41	17	7	11	15	43	45	29	33	23	27	47	35
Mut-gy1-3	5	74	9	13	17	7	11	15	19	45	29	49	23	27	31	35

10

20

30

40

50

		軽鎖		重鎖	
完全抗体名	関連した scFv	シグナルペプチド	軽鎖	シグナルペプチド	重鎖
PSMAb1Lm	Mut-gy1	63	75	55	77
PSMAb1stLm	Mut-gy1-st	63	76	55	78
PSMAbLm	Mut-gy1-2	63	69	55	68
PSMAb3Lm	Mut-gy1-3	63	75	55	79

10

配列番号 1 P S M A 細胞外ドメイン：

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

20

30

配列番号 2 M u t - g y 1 s c F v ヌクレオチド配列：

C A G T C T G T G C T G A C T C A G C C G C C C T C A G T G T C T G G G G C C
 C C A G G G C A G A G T G T C A T T A T C T C C T G C A C T G G G A G C A G C T
 C C A A C A T C G G G G C A G G T T C T C A T G T A C A C T G G T A C C A G C A
 G G T T C C A G G A A C A G C C C C C A A A C T C C T C A T C T A T G G A A A C
 A C C A A T C G G C C C T C A G G G G T C C C T G A C C G A T T C T C T G G C T
 C C A A G T C T G G C A C C T C A G G T T C C C T G G C C A T C A C T G G A C T
 C C A G C C T G A G G A T G A G G C T G A T T A T T A T T G T G C A A C A T G G
 G A T G A C A G T C T G A G T G G T G T A A T A T T C G G C G G A G G G A C C A
 A G G T C A C C G T C C T A G G C G G A T C C T C T A G G T C A A G T T C C A G
 C G G C G G C G G T G G C A G C G G A G G C G G C G G T G A G G T G C A G C T G
 G T G G A G T C T G G G G G A G C C C T G G C C A A G C C T G G G G G G T C C C
 T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T C C A C C C T C A G T G G
 C T A T G C T A T G C A C T G G G T C C G C C A G G C T C C A G G C A A G G G G
 C T G G A G T G G G T G G C A G T T A T A T C A T A T G A T G G A A G C A A T A
 A A T A C T A C G C A G A C T C C G T G A A G G G C C G A T T C A C C A T C T C
 C A G A G A C A A T T C C A A G A A C A C G C T G T T T C T G C A A A T G A A C
 A G C C T G A G A C C T G A G G A C A C G G C T G T G T A C T A T T G T G C T A
 A A G G C C T T A C T T G G G G A C T C G G T G A C A A T G A T G C T C T C G A
 T A T C T G G G G C C C C G G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C T C A

40

50

配列番号3 Mut-gy1 scFvアミノ酸配列:

QSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGSSSNIGAGSHVHWYQ
QVPGTAPKLLIYGNTNRP SGVPDRFSGSKSGTSGSLAITG
LQPEDEADYYCATWDDSLSGVIFGGGT KVTVLGGSSSRSSS
SGGGGSGGGGGEVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGSTLS
GYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDAL
DIWGP GTT VTVSS

配列番号4 Mut-gy1 VLヌクレオチド配列:

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCC
CCAGGGCAGAGTGTCATTATCTCCTGCACTGGGAGCAGCT
CCAACATCGGGG CAGGTTCTCATGTACACTGGTACCAGCA
GGTTCCAGGAACAGCCCCCAA ACTCCTCATCTATGGAAAC
ACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCT
CCAAGTCTGGCACCTCAGGTTCCCTGGCCATCACTGGACT
CCAGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGTGCAACATGG
GATGACAGTCTGAGTGGTGTAATATTCGGCGGGAGGGACCA
AGGTCACCGTCTCTA

10

配列番号5 Mut-gy1 VLアミノ酸配列:

QSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGSSSNIGAGSHVHWYQ
QVPGTAPKLLIYGNTNRP SGVPDRFSGSKSGTSGSLAITG
LQPEDEADYYCATWDDSLSGVIFGGGT KVTVL

20

配列番号6 Mut-gy1 VL FR1ヌクレオチド配列:

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCGCCCTCAGTGTCTGGGGCC
CCAGGGCAGAGTGTCATTATCTCCTGCACTGGGAGC

配列番号7 Mut-gy1 VL FR1アミノ酸配列:

QSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGS

配列番号8 Mut-gy1 VL CDR1ヌクレオチド配列:

AGCTCCAACATCGGGG CAGGTTCTCAT

配列番号9 Mut-gy1 VL CDR1アミノ酸配列:

SSNIGAGSH

30

配列番号10 Mut-gy1 VL FR2ヌクレオチド配列:

GTACACTGGTACCAGCAGGTTCCAGGAACAGCCCCCAA
CTCCTCATCTAT

配列番号11 Mut-gy1 VL FR2アミノ酸配列:

VHWYQQVPGTAPKLLIY

配列番号12 Mut-gy1 VL CDR2ヌクレオチド配列:

GGAAACACC

配列番号13 Mut-gy1 VL CDR2アミノ酸配列:

GNT

40

配列番号14 Mut-gy1 VL FR3ヌクレオチド配列:

AATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCC
AAGTCTGGCACCTCAGGTTCCCTGGCCATCACTGGACTCC
AGCCTGAGGATGAGGCTGATTATTATTGT

配列番号15 Mut-gy1 VL FR3アミノ酸配列:

NRP SGVPDRFSGSKSGTSGSLAITGLQPEDEADYYC

配列番号16 Mut-gy1 VL CDR3ヌクレオチド配列:

GCAACATGGGATGACAGTCTGAGTGGTGTAATA

配列番号17 Mut-gy1 VL CDR3アミノ酸配列

ATWDDSLSGVI

50

(Ser置換に対するAsnは太字である)

配列番号18: Mut-gy1 VL FR4ヌクレオチド配列

TTCGGCGGAGGGACCAAGGTCACCGTCTTA

配列番号19 Mut-gy1 VL FR4アミノ酸配列:

FGGGTKVTVL

配列番号20 Mut-gy1 VHヌクレオチド配列:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCCTGGCCCAAG
CCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAT
CCACCCTCAGTGGCTATGCTATGCACTGGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATAT
GATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTT
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGGCTGTG
TACTATTGTGCTAAAGGCCTTACTTTGGGGACTCGGTGACA
ATGATGCTCTCGATATCTGGGGGCCCCGGGACCAACGGTCA
CGTCTCCTCA

10

配列番号21 Mut-gy1 VHアミノ酸配列:

EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGSTLSGYAMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
FLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALDIWGP GTTV
TVSS

20

配列番号22 Mut-gy1 VH FR1ヌクレオチド配列:

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGCCCTGGCCCAAG
CCTGGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT

配列番号23 Mut-gy1 VH FR1アミノ酸配列:

EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAAS

配列番号24 Mut-gy1 VH CDR1ヌクレオチド配列:

GGATCCACCCTCAGTGGCTATGCT

配列番号25 Mut-gy1 VH CDR1アミノ酸配列:

GSTLSGYA

30

配列番号26 Mut-gy1 VH FR2ヌクレオチド配列:

ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGGCTGGAG
TGGGTGGCAGTT

配列番号27 Mut-gy1 VH FR2アミノ酸配列:

MHWVRQAPGKGLEWVAV

配列番号28 Mut-gy1 VH CDR2ヌクレオチド配列:

ATATCATATGATGGAAGCAATAAA

配列番号29 Mut-gy1 VH CDR2アミノ酸配列:

ISYDGSNK

配列番号30 Mut-gy1 VH FR3ヌクレオチド配列:

TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCC
AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACA
GCCTGAGACCTGAGGACACGGGCTGTGTACTATTGT

40

配列番号31 Mut-gy1 VH FR3アミノ酸配列:

YYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYC

配列番号32 Mut-gy1 VH CDR3ヌクレオチド配列:

GCTAAAGGCCTTACTTTGGGGACTCGGTGACAAATGATGCT
CTCGATATC

配列番号33 Mut-gy1 VH CDR3アミノ酸配列:

AKGLTWGLGDNDALDI

50

配列番号34 Mut-g y1 VH FR4ヌクレオチド配列：
TGGGGCCCCGGGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCA

配列番号35 Mut-g y1 VH FR4アミノ酸配列：
WGP GTTVTVSS

配列番号36 Mut-g y1 scFvリンカーヌクレオチド配列：
GGCGGATCCTCTAGGTCAAGTTCCAGCGGCGGGCGGTGGC
AGCGGAGGCGGGCGGT

配列番号37 Mut-g y1 scFvリンカーアミノ酸配列：
GSSSRSSSSSGGGGSGGGG

配列番号38 Mut-g y1 VL FR2ヌクレオチド配列（バリエント）：
GTACACTGGTACCAGCAGGCTCCAGGAACAGCCCCCAAA
CTCCTCATCTAT

配列番号39 Mut-g y1 VL FR2アミノ酸配列（バリエント）：
VHWYQQAPGTAPKLLIY (V=>A)

配列番号40 Mut-g y1 VL CDR2ヌクレオチド配列（バリエント）：
GAA AACACC

配列番号41 Mut-g y1 VL CDR2アミノ酸配列（バリエント）：
ENT (G=>E)

配列番号42 Mut-g y1 VL FR4ヌクレオチド配列（バリエント）
TTCGGCGGGAGGGACCAAGGCCACCGTCTCTA

配列番号43 Mut-g y1 VL FR4アミノ酸配列（バリエント）：
FGGGTKATVL (V=>A)

配列番号44 Mut-g y1 VH CDR1ヌクレオチド配列（バリエント）：
GGATTCAACCTCTAGTTGGCTATGCT

配列番号45 Mut-g y1 VH CDR1アミノ酸配列（バリエント）：
GFTLSGYA (S=>F)

配列番号46： Mut-g y1 VH FR3ヌクレオチド配列（バリエント）
TACTACGCAGACTCCGTGAAGGGGCCGATTCAACCGTCTCC
AGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAAATGAACA
GCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTGTACTATTGT

配列番号47 Mut-g y1 VH FR3アミノ酸配列（バリエント）：
YYADSVKGRFTVSRDNSKNTLFLQMNSLRPEDTAVYYC (I=>V)

配列番号48 Mut-g y1 VH CDR3ヌクレオチド配列（バリエント）：
GCTAAAGGCCTTACTTTGGGGACTCGGTGACCAATGATGCT
CTCGGTATC

配列番号49 Mut-g y1 VH CDR3アミノ酸配列（バリエント）：
AKGLTWGLGDNDALGI (D=>G)

配列番号50： Mut-g y1 VH FR4ヌクレオチド配列（バリエント）：
TGGGGCCCCGAGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCA

配列番号51 Mut-g y1 VH FR4アミノ酸配列（バリエント）：
WGPE TTVTVSS (G=>E)

配列番号52 PSMABLM重鎖ヌクレオチド配列：
ATGGAGTTTGGGGCTGAGCTGGGGTTTTTCCTCGTTTGCTCTT
TTAAGAGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG
GGGGAGCCCTGGCCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTCAACCTCAGTTGGCTATGCTATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGGCTGGAGTGGG
TGGCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAATACTACGC
AGACTCCGTGAAGGGGCCGATTCAACCGTCTCCAGAGACAAT

10

20

30

40

50

T C C A A G A A C A C G C T G T T T C T G C A A A T G A A C A G C C T G A G A C
C T G A G G A C A C G G C T G T G T A C T A T T G T G C T A A A G G C C T T A C
C T G G G G A C T C G G T G A C A A T G A T G C T C T C G A T A T C T G G G G C
C C C G G G A C C A C G G T C A C C G T C T C C T C A G C C T C C A C C A A G G
G C C C A T C G G T C T T C C C C C T G G C A C C C T C C T C C A A G A G C A C
C T C T G G G G G C A C A G C G G C C C T G G G C T G C C T G G T C A A G G A C
T A C T T C C C C G A A C C G G T G A C G G T G T C G T G G A A C T C A G G C G
C C C T G A C C A G C G G C G T G C A C A C C T T C C C G G C T G T C C T A C A
G T C C T C A G G A C T C T A C T C C C T C A G C A G C G T G G T G A C C G T G
C C C T C C A G C A G C T T G G G C A C C C A G A C C T A C A T C T G C A A C G
T G A A T C A C A A G C C C A G C A A C A C C A A G G T G G A C A A G A A A G T
T G A G C C C A A A T C T T G T G A C A A A A C T C A C A C A T G C C C A C C G
T G C C C A G C A C C T G A A C T C C T G G G G G G A C C G T C A G T C T T C C
T C T T C C C C C C A A A A C C C A A G G A C A C C C T C A T G A T C T C C C G
G A C C C C T G A G G T C A C A T G C G T G G T G G T G G A C G T G A G C C A C
G A A G A C C C T G A G G T C A A G T T C A A C T G G T A C G T G G A C G G C G
T G G A G G T G C A T A A T G C C A A G A C A A A G C C G C G G G A G G A G C A
G T A C A A C A G C A C G T A C C G G G T G G T C A G C G T C C T C A C C G T C
C T G C A C C A G G A C T G G C T G A A T G G C A A G G A G T A C A A G T G C A
A G G T C T C C A A C A A A G C C C T C C C A G C C C C C A T C G A G A A A A C
C A T C T C C A A A G C C A A A G G G C A G C C C C G A G A A C C A C A G G T G
T A C A C C C T G C C C C C A T C C C G G G A T G A G C T G A C C A A G A A C C
A G G T C A G C C T G A C C T G C C T G G T C A A A G G C T T C T A T C C C A G
C G A C A T C G C C G T G G A G T G G G A G A G C A A T G G G C A G C C G G A G
A A C A A C T A C A A G A C C A C G C C T C C C G T G C T G G A C T C C G A C G
G C T C C T T C T T C C T C T A C A G C A A G C T C A C C G T G G A C A A G A G
C A G G T G G C A G C A G G G G A A C G T C T T C T C A T G C T C C G T G A T G
C A T G A G G C T C T G C A C A A C C A C T A C A C G C A G A A G A G C C T C T
C C C T G T C T C C G G G T A A A T G A

配列番号 53 P S M A b L m アミノ酸配列 :

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

配列番号 54 P S M A b L m 重鎖シグナルペプチドヌクレオチド配列 :

A T G G A G T T T T G G G C T G A G C T G G G T T T T C C T C G T T G C T C T T
T T A A G A G G T G T C C A G T G T

配列番号 55 P S M A b L m 重鎖シグナルペプチドアミノ酸配列 :

M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C

配列番号 56 P S M A b L m 重鎖可変領域ヌクレオチド配列 :

G A G G T G C A G C T G G T G G A G T C T G G G G G A G C C C T G G C C A A G
C C T G G G G G T C C C T G A G A C T C T C C T G T G C A G C C T C T G G A T

TCACCCCTCAGTGGCTATGCTATGCACCTGGGGTCCGCCAGGC
TCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATAT
GATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCC
GATTCACCGTCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTT
TCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACACGGCTGTG
TACTATTGTGCTAAAGGCCTTACCTGGGGACTCGGTGACA
ATGATGCTCTCGATATCTGGGGCCCCCGGGACCAACGGTCA
CGTCTCCTCA

配列番号57 PSMA b L m重鎖可変領域アミノ酸配列：

EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTVSRDNSKNTL
FLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALDIWGP GTTV
TVSS

10

配列番号58 PSMA b L m重鎖定常領域ヌクレオチド配列：

GCCTCCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCC
TCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGGCT
GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGGTGTC
GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC
CCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCA
GCGTGGTGACCGGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACAAAACCTC
ACACATGCCCAACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGG
ACCGTCAAGTCTTCTCTTCCCCC CAAACCCCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGG
TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG
CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GGGTGGTCA
GCGTCCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCC
CCCATCGAGAA AACCATCTCCAAGCCAAAGGGGAGCCCC
GAGAACCAACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
GCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCCTGGTCAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCGAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCTCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT
CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AA

20

30

配列番号59 PSMA b L m重鎖定常領域アミノ酸配列：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

40

配列番号60 PSMA b L m軽鎖ヌクレオチド配列：

50

A T G G C C T G G T C T C C T C T C C T C C T C A C T C T C C T C G C T C A C
T G C A C A G G G T C C T G G G C C C A G T C T G T G C T G A C T C A G C C G C
C C T C A G T G T C T G G G G C C C C A G G G C A G A G T G T C A T T A T C T C
C T G C A C T G G G A G C A G C T C C A A C A T C G G G G G C A G G T T C T C A T
G T A C A C T G G T A C C A G C A G G T T C C A G G A A C A G C C C C C A A A C
T C C T C A T C T A T G A A A A C A C C A A T C G G C C C T C A G G G G T C C C
T G A C C G A T T C T C T G G C T C C A A G T C T G G C A C C T C A G G T T C C
C T G G C C A T C A C T G G A C T C C A G C C T G A G G A T G A G G C T G A T T
A T T A T T G T G C A A C A T G G G A T G A C A G T C T G A G T G G T G T A A T
A T T C G G C G G A G G G A C C A A G G C C A C C G T C C T A G G T C A G C C C
A A G G C T G C C C C C T C G G T C A C T C T G T T C C C G C C C T C C T C T G
A G G A G C T T C A A G C C A A C A A G G C C A C A C T G G T G T G T C T C A T
A A G T G A C T T C T A C C C G G G A G C C G T G A C A G T G G C C T G G A A G
G C A G A T A G C A G C C C C G T C A A G G C G G G A G T G G A G A C C A C C A
C A C C C T C C A A A C A A A G C A A C A A C A A G T A C G C G G C C A G C A G
C T A T C T G A G C C T G A C G C C T G A G C A G T G G A A G T C C C A C A G A
A G C T A C A G C T G C C A G G T C A C G C A T G A A G G G A G C A C C G T G G
A G A A G A C A G T G G C C C C T A C A G A A T G T T C A T G A

10

配列番号61 P S M A b L m 軽鎖アミノ酸配列：

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

20

配列番号62 P S M A b L m 軽鎖シグナルペプチドヌクレオチド配列：

A T G G C C T G G T C T C C T C T C C T C C T C A C T C T C C T C G C T C A C
T G C A C A G G G T C C T G G G C C

配列番号63 P S M A b L m 軽鎖シグナルペプチドアミノ酸配列：

M A W S P L L L T L L A H C T G S W A

30

配列番号64 P S M A b L m 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列：

C A G T C T G T G C T G A C T C A G C C G C C C T C A G T G T C T G G G G C C
C C A G G G C A G A G T G T C A T T A T C T C C T G C A C T G G G A G C A G C T
C C A A C A T C G G G G C A G G T T C T C A T G T A C A C T G G T A C C A G C A
G G T T C C A G G A A C A G C C C C C A A A C T C C T C A T C T A T G A A A C
A C C A A T C G G C C C T C A G G G G T C C C T G A C C G A T T C T C T G G C T
C C A A G T C T G G C A C C T C A G G T T C C C T G G C C A T C A C T G G A C T
C C A G C C T G A G G A T G A G G C T G A T T A T T A T T G T G C A A C A T G G
G A T G A C A G T C T G A G T G G T G T A A T A T T C G G C G G A G G G A C C A
A G G C C A C C G T C C T A

40

配列番号65 P S M A b L m 軽鎖可変領域アミノ酸配列：

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

配列番号66 P S M A b L m 軽鎖定常領域ヌクレオチド配列：

G G T C A G C C C A A G G C T G C C C C C T C G G T C A C T C T G T T C C C G
C C C T C C T C T G A G G A G C T T C A A G C C A A C A A G G C C A C A C T G G
T G T G T C T C A T A A G T G A C T T C T A C C C G G G A G C C G T G A C A G T
G G C C T G G A A G G C A G A T A G C A G C C C C G T C A A G G C G G G A G T G
G A G A C C A C C A C A C C C T C C A A A C A A A G C A A C A A C A A G T A C G

50

CGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCCTGAGCAGTGGAAG
GTCCACACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGG
AGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

配列番号67 PSMABLM軽鎖定常領域アミノ酸配列：

GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT
VAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW
KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

配列番号68 シグナルペプチドを有しないPSMABLM重鎖アミノ酸配列：

EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGRFTVSRDNSKNTL
FLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALDIWGP GTTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

配列番号69 シグナルペプチドを有しないPSMABLM軽鎖アミノ酸配列：

QSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGSSSNIGAGSHVHWYQ
QVPGTAPKLLIYENTNRP SGVPDRFSGSKSGTSGSLAITG
LQPEDEADYYCATWDDSLSGVIFGGGT KATVLGQPKAAP S
VTFLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP
VKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQ
VTHEGSTVEKTVAPTECS

配列番号70 Mut-gy1-st VLアミノ酸配列：

QSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGSSSNIGAGSHVHWYQ
QAPGTAPKLLIYGNTNRP SGVPDRFSGSKSGTSGSLAITG
LQPEDEADYYCATWDDSLSGVIFGGGT KVTVL

配列番号71 Mut-gy1-2 VLアミノ酸配列：

QSVLTQPPSVSGAPGQSVIISCTGSSSNIGAGSHVHWYQ
QVPGTAPKLLIYENTNRP SGVPDRFSGSKSGTSGSLAITG
LQPEDEADYYCATWDDSLSGVIFGGGT KATVL

配列番号72 Mut-gy1-st VHアミノ酸配列：

EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
FLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALDIWGPETTV
TVSS

配列番号73 Mut-gy1-2 VHアミノ酸配列：

EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGRFTVSRDN SKNTL
FLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALDIWGP GTTV
TVSS

配列番号74 Mut-gy1-3 VHアミノ酸配列：

EVQLVESGGALAKPGGSLRLSCAASGFTLSGYAMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGRFTISRDN SKNTL
FLQMNSLRPEDTAVYYCAKGLTWGLGDNDALGIWGP GTTV
TVSS

10

20

30

40

50

配列番号 75 シグナルペプチドを有しない P S M A b 1 L m 軽鎖アミノ酸配列 (Mu t - g y 1 から) :

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

配列番号 76 シグナルペプチドを有しない P S M A b 1 s t L m 軽鎖アミノ酸配列 (Mu t - g y 1 - s t から) :

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

配列番号 77 シグナルペプチドを有しない P S M A b 1 L m 重鎖アミノ酸配列 (Mu t - g y 1 から) :

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

配列番号 78 シグナルペプチドを有しない P S M A b 1 s t L m 重鎖アミノ酸配列 (Mu t - g y 1 - s t から) :

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

配列番号 79 シグナルペプチドを有しない P S M A b 3 L m 軽鎖アミノ酸配列 (Mu t - g y 1 - 3 から) :

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

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

【0085】

いくつかの実施形態では、「エピトープ」という用語は、抗体に結合する抗原の領域を指す。それは、第1の抗体によって認識される抗原の領域であり、第1の抗体のその領域との結合が、第2の抗体又は他の二価分子のその領域との結合を妨げる。領域は、抗体のクラスによって選択的に認識される特定のコア配列又は配列を包含する。一般に、エピトープは、連続的又は非連続的なアミノ酸配列によって形成することができる局所表面構造から構成される。

10

【0086】

別の実施形態では、「選択的に認識する」、「選択的に結合する」、又は「選択的に認識する」という用語は、当技術分野で既知であり、本明細書に記載される技法、例えば、E L I S A 及びコールド置換アッセイなどによって決定されるとき、抗体又は他の二価分子のエピトープとの結合が、二価分子の非関連エピトープとの結合よりも、又は非関連二価分子のエピトープとの結合よりも、少なくとも2倍大きい、2～5倍大きい、又は5倍大きいことを意味する。

20

【0087】

いくつかの実施形態では、「抗体」という用語は、抗体の自然な生物学的形態を構成する構造を指す。ヒト及びマウスを含むほとんどの哺乳動物において、この形態は、四量体であり、2つの免疫グロブリン鎖の2つの同一対からなり、各対は、1つの軽鎖及び1つの重鎖を有し、各軽鎖は、免疫グロブリンドメインV L 及びC L を含み、各重鎖は、免疫グロブリンドメインV H、C γ 1、C γ 2、C γ 3、及びC γ 4を含む。各対において、軽鎖及び重鎖可変領域（V L 及びV H）は、抗原との結合と一緒に関与し、定常領域（C L、C γ 1、C γ 2、C γ 3、及びC γ 4、特にC γ 1、C γ 2、及びC γ 3）は、抗体エフェクター機能を関与する。いくつかの哺乳動物、例えば、ラクダ及びラマでは、全長抗体は、2つの重鎖のみからなり得、各重鎖は、免疫グロブリンドメインV H、C γ 2、及びC γ 3を含む。本明細書において「免疫グロブリン（I g）」とは、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされた1つ以上のポリペプチドからなるタンパク質を意味する。免疫グロブリンは、抗体を含むが、これに限定されない。免疫グロブリンは、全長抗体、抗体断片、並びにV H、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、V L、及びC L を含むが、これらに限定されない、個々の免疫グロブリンドメインを含むが、これらに限定されない、いくつかの構造形態を有し得る。

30

【0088】

それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、インタクト抗体は、異なる「クラス」に割り当てられ得る。5つの主要なクラスのインタクト抗体：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mがあり、これらのうちのいくつかは、「サブクラス」（アイソタイプ）、例えば、I g G1、I g G2、I g G3、I g G4、I g A、及びI g A2に更に分けられ得る。異なるクラスの抗体に対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構成は十分知られている。

40

【0089】

いくつかの実施形態では、「抗体」又は「抗原結合断片」という用語は、それぞれ、所望の標的と特異的に相互作用することができるインタクト分子、並びにF a b、s c F v－F c 二価分子、F（a b'）2、及びF vなどのその機能的断片を指す。いくつかの実

50

施形態では、抗原結合断片は、

(1) 抗体分子の一価抗原結合断片を含有する断片であり、全抗体を酵素パパイニンによる消化によってインタクト軽鎖及び1つの重鎖の一部を生じることによって産生することができる断片である、F a b、

(2) 全抗体をペプシンで処理することによって、続いて還元によって、インタクト軽鎖及び重鎖の一部を生じて得ることができる抗体分子の断片である F a b ' であって、抗体分子当たり2つの F a b ' が得られる、F a b '、

(3) 全抗体を、後続の還元を伴わずに酵素ペプシンで処理することによって得ることができる抗体の断片であって、2つのジスルフィド結合によって一緒に保持された2つの F a b ' 断片の二量体である、(F a b ')₂、

(4) 2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された断片である、F v、並びに

(5) 遺伝子融合した単鎖分子として好適なポリペプチドリンカーによって結合された、軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子である、単鎖抗体 (S C A 又は s c F v)、

(6) 単鎖 F v (s c F v) を、I g G 及び F c 領域などの免疫グロブリン (I g) からのヒンジ領域と融合させることによって作製される、s c F v - F c、を含む。

【0090】

一実施形態では、本明細書に提供される抗体は、モノクローナル抗体である。別の実施形態では、本明細書に提供される抗原結合断片は、単鎖 F v (s c F v)、ダイアボディ、タンデム s c F v、s c F v - F c 二価分子、F a b、F a b '、F v、又は F (a b ')₂ である。

【0091】

一実施形態では、「二価分子」又は「B V」という用語は、2つの別個の標的に同時に結合することができる分子を指す。二価分子は、2つ及び2つのみの結合ドメインを有することに限定されず、多価分子又は連結された一価分子から構成される分子であることができる。二価分子の結合ドメインは、同じ標的に位置するか又は異なる種に由来する標的に位置する同じか又は異なるエピトープを選択的に認識することができる。結合ドメインは、ジスルフィド結合、ペプチド架橋、アミド結合、及び当技術分野で既知の他の天然又は合成結合を含むがこれらに限定されない、いくつかの手段のうちのいずれかで結合することができる (Spatola et al., "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins," B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983) (general review)、Morley, J. S., "Trends Pharm Sci" (1980) pp. 463-468 (general review)、Hudson et al., Int J Pept Prot Res (1979) 14, 177-185、Spatola et al., Life Sci (1986) 38, 1243-1249、Hann, M. M., J Chem Soc Perkin Trans I (1982) 307-314、Almquist et al., J Med Chem (1980) 23, 1392-1398、Jennings-White et al., Tetrahedron Lett (1982) 23, 2533、Szelke et al., European Application EP 45665; Chemical Abstracts 97, 39405 (1982)、Holladay, et al., Tetrahedron Lett (1983) 24, 4401-4404、及び Hruby, V. J., Life Sci (1982) 31, 189-199)。

【0092】

所望の配列アラインメントを達成するために使用することができる配列アラインメント方法としては、当業者によって理解されるように、ペアワイズアラインメント方法又は多重配列アラインメント方法が挙げられるが、これらに限定されない。配列アラインメント

10

20

30

40

50

は、多種多様なテキストベースのファイル形式で保存することができる。一実施形態では、これは、READSEQ、EMBOSS、及びBioPerl、BioRubyなどの変換プログラム及びプログラミングパッケージを使用して、いくつかの実施形態では、任意のフォーマット、例えば、FASTA又はGenBank、SwissProt、Entrez、及びEMBLフォーマットを変換することによって達成される。当業者は、当業者によって理解されるように、任意のプログラム又は記憶媒体を使用して、必要に応じて、配列を変換、修正、スコア化、更新、及び／又は保存することができることを理解されたい。

【0093】

いくつかの実施形態では、「配列アラインメント」という用語は、核酸又はアミノ酸配列アラインメントを行い、容易に探索、評価、並びに数学的及び統計的計算に供することができる結果を生じるために使用される、当業者によって理解されるような、任意のプログラム又は方法の使用を含む。一実施形態では、配列又は構造アラインメントのための方法は、当該技術分野で周知であり、当業者によって理解されるように、配列及び構造相同性に基づくアラインメントを含む。

【0094】

一実施形態では、「相同性」、「ホモログ」、又は「相同的」という用語は、配列同一性、又は構造的同一性、又は機能的同一性を指す。「相同性」という用語及び他の同様の形態を使用することによって、同様に機能し、かつ／又は配列同一性を含み、かつ／又は参照配列に近似するように構造的に保存されている任意の分子は、核酸又はペプチドにかかわらず、本発明の一部としてみなされることが理解されるべきである。別の実施形態では、「相同性」、「ホモログ」、又は「相同的」という用語は、任意の事例において、アミノ酸配列又は核酸配列にかかわらず、言及される配列が、示される配列と少なくとも86%の一致を表すことを示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と少なくとも90%の一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と少なくとも92%の一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と少なくとも95%の一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と少なくとも95%以上の一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と少なくとも97%以上の一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列に対して97%～100%の一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列に対して100%の一致を示す。同様に、一実施形態では、特定の配列に対する一致への言及は、直接的一致、並びに本明細書で定義されるその配列に対する相同性の両方を含む。

【0095】

したがって、一実施形態では、「非相同的」という用語は、示される配列と85%を超えない一致を示すアミノ酸配列又は核酸配列を指す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と75%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と65～74%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と55～64%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と45～54%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と35～44%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と35～44%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と15～34%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と5～14%を超えない一致を示す。別の実施形態では、アミノ酸配列又は核酸配列は、示される配列と0.1～4%を超えない一致を示す。別の実施形態では、「非相同的」という用語は、「低い配列類似性」と互換的に使用することができる。

【0096】

一実施形態では、軽鎖は、上に列挙される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含むか、又は 70% を超える同一性、例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% を超える同一性を有し、例えば、アミノ酸の 10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個の変異、欠失、又は挿入を有する。

【0097】

一実施形態では、軽鎖は、上に列挙される F R 1、F R 2、及び F R 3 配列を含むか、又は 70% を超える同一性、例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% を超える同一性を有し、例えば、アミノ酸の 10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個の変異、欠失、又は挿入を有する。

10

【0098】

一実施形態では、重鎖は、上に列挙される C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含むか、又は 70% を超える同一性、例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% を超える同一性を有し、例えば、アミノ酸の 10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個の変異、欠失、又は挿入を有する。

【0099】

一実施形態では、重鎖は、上に列挙される F R 1、F R 2、及び F R 3 配列を含むか、又は 70% を超える同一性、例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は 99% を超える同一性を有し、例えば、アミノ酸の 10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個の変異、欠失、又は挿入を有する。

20

【0100】

一実施形態では、完全抗体は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 のタイプのうちの 1 つである。別の実施形態では、M u t - g y 1 s c F v は、I g G 1 完全抗体に操作された。

【0101】

一実施形態では、完全抗体は、ラムダ、カッパ、又はそれらから変異したものの定常領域を有する。別の実施形態では、M u t - g y 1 s c F v は、C L 2 定常領域を使用して完全抗体に操作された。

30

【0102】

一実施形態では、重鎖は、配列番号 59 の定常領域、又は 70% を超える、例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99% を超える同一性を有する配列を含み、例えば、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個のアミノ酸の変異、欠失、若しくは挿入を有する。

【0103】

一実施形態では、軽鎖は、配列番号 67 の定常領域、又は 70% を超える、例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、若しくは 99% を超える同一性を有する配列を含み、例えば、10、9、8、7、6、5、4、3、2、又は 1 個のアミノ酸の変異、欠失、若しくは挿入を有する。

40

【0104】

一実施形態では、シグナルペプチドと可変領域との間、重鎖及び／又は軽鎖の可変領域と定常領域との間に、リンカーペプチドが存在し得るか、又は存在し得ない。かかるリンカーペプチドの 1 つの例は、制限酵素部位によってコードされる。

【0105】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、酵母細胞表面に提示される。別の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、ナノ粒子表面にコーティングされる。別の実施

50

形態では、抗体又はその抗原結合断片は、T細胞、NK細胞、又は他のヒト若しくは他の哺乳動物細胞などの哺乳動物細胞表面に提示される。更に別の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、酵母、E. coli、又は哺乳動物細胞によって分泌タンパク質として産生される。

【0106】

一実施形態では、「結合する」、「結合」という用語、又は文法的同義語は、互いに対して親和性を有する組成物を指す。「特異的結合」とは、結合が2つの分子間で選択的である場合である。特異的結合の特定の例は、抗体と抗原との間に生じるものである。典型的には、特異的結合は、解離定数(KD)が約 1×10^{-5} M未満、又は約 1×10^{-6} M若しくは 1×10^{-7} M未満である場合に、非特異的と区別することができる。特異的結合は、例えば、ELISA、免疫沈降、共沈殿、化学架橋の有無にかかわらず、2つのハイブリッドアッセイなどによって検出することができる。適切な対照を使用して、「特異的」結合と「非特異的」結合とを区別することができる。

10

【0107】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、修飾を有する。修飾は、本明細書において以下で更に定義されるものである。いくつかの実施形態では、修飾は、N末端修飾である。別の実施形態では、修飾は、C末端修飾である。別の実施形態では、修飾は、タンパク質の中間にある。一実施形態では、抗体又は抗原結合断片の分泌可能な形態は、免疫グロブリン(Ig)ヒンジ領域に結合することを可能にするN末端修飾を含む。別の実施形態では、Igヒンジ領域は、免疫グロブリンヒンジ領域からのものであるが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、修飾は、抗体又はその抗原結合断片での直接的修飾である。他の実施形態では、修飾は、1つ以上の他のペプチド、タンパク質、化学物質、炭水化物、又は更には二次抗体によって架橋された間接的修飾である。

20

【0108】

本発明によって包含される追加の翻訳後修飾には、例えば、N結合又はO結合炭水化物鎖、N末端又はC末端の処理、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N結合又はO結合炭水化物鎖の化学修飾、及び原核宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加又は欠失が含まれる。

【0109】

一実施形態では、「ポリペプチド」という用語は、一般に、本発明の抗体、抗原結合断片、又はバリエーションを指す。

30

【0110】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、アミノ酸置換を含む。一実施形態では、アミノ酸置換は、保存的である。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非帯電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、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)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)、及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が含まれる。別の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的なものではなく、天然ポリペプチドと比較して変異ポリペプチドの増強した活性をもたらす。

40

【0111】

本発明の抗体又は抗原結合断片は、当該技術分野で周知のものなど、任意の合成又は組換えプロセスによって産生することができる。本発明の抗体又は抗原結合断片は、当該技術分野で既知の技法によって生物物理学的又は生物学的特性を変化させるように更に修飾することができる。例えば、ポリペプチドは、プロテアーゼに対するその安定性を増加させるように、又はその親油性、溶解性、若しくはその天然受容体への結合親和性を変更す

50

るように修飾され得る。

【0112】

いくつかの実施形態では、抗体断片は、抗体のタンパク質分解加水分解によって、又は断片をコードするDNAのE. coli若しくは哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養又は他のタンパク質発現系）における発現によって調製され得る。抗体断片は、いくつかの実施形態では、従来の方法による全抗体のペプシン又はパイン消化によって得ることができる。例えば、抗体断片は、ペプシンによる抗体の酵素的切断によって生成され、F(ab')₂で示される5S断片を提供することができる。この断片は、チオール還元剤、及び任意選択で、ジスルフィド結合の切断に起因するスルフヒドリル基に対するブロック基を使用して更に切断して、3.5S Fab'一価断片を生成することができる。代替的に、ペプシンを使用する酵素的切断は、2つの一価Fab'断片及びFc断片を直接的に生成する。これらの方法は、例えば、Goldenberg、米国特許第4,036,945号、及び同第4,331,647号、並びにそれらに含まれる参照によって説明され、それらの特許は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。また、Porter, R. R., Biochem. J., 73:119-126, 1959も参照されたい。抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽-重鎖断片を形成する重鎖の分離、断片の更なる切断、又は他の酵素的、化学的、若しくは遺伝子技法もまた、断片がインタクト抗体によって認識される抗原に結合する限り、使用され得る。

【0113】

本発明のポリペプチド、抗体、又はタンパク質の「バリエント」は、一実施形態では、参照ポリペプチド、抗体、又はタンパク質に対して1つ以上のアミノ酸によって変化されているアミノ酸配列を指す。本発明において、ポリペプチドのバリエントは、参照タンパク質の抗体結合特性を保持する。別の実施形態では、「バリエント」は、本発明の抗原結合断片を指す。更に別の実施形態では、バリエントは、標的又はマーカーに対する特異性を保持する抗原結合断片のバリエントである。バリエントは、「保存的」変化を有し得、置換アミノ酸は、類似の構造的又は化学的特性（例えば、ロイシンのイソロイシンによる置換）を有する。別の実施形態では、バリエントは、1つ以上の予測される非必須アミノ酸残基に保存的アミノ酸置換を有する。別の実施形態では、「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似電荷の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものであり、他の実施形態では、反対電荷が、「非保存的置換」の例である。類似電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非帯電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、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）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。代替的に、変異は、例えば、飽和変異誘発などによって、コード配列の全て又は一部に沿ってランダムに導入することができ、得られた変異体は、生物学的活性についてスクリーニングして、活性を保持する変異体を特定することができる。変異誘発後、コードされたタンパク質は、定型的に発現され得、コードされたタンパク質の機能的及び／又は生物学的活性は、本明細書に記載の技法を使用して、又は当該技術分野で既知の定型的修正技法によって決定することができる。類似の小さな変化も、アミノ酸の欠失若しくは挿入、又はその両方を含み得る。どのアミノ酸残基が、免疫学的反応性を消失することなく置換、挿入、又は欠失され得るかを決定する際のガイダンスは、当該技術分野で周知のコンピュータプログラム、例えば、DNASTARソフトウェアを使用して見出され得る。

【0114】

一実施形態では、用語「フレームワーク領域」又は「FR」は、超可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン残基である。フレームワーク領域は、正確に定義されている。例え

ば、Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, National Institutes of Health, USA (5th ed. 1991)を参照されたい。各可変ドメインは、典型的には、FR1、FR2、FR3、及びFR4として特定される4つのFRを有する。いくつかの実施形態では、「FR」はまた、CDR領域、すなわち、抗体の可変領域内の抗体分子の認識エレメントとして機能する、抗原と直接相互作用する領域、に隣接するか、又は近接するが、CDR領域の外側にあるアミノ酸残基を含む抗体可変領域を指す。一実施形態では、「フレームワーク領域」という用語は、CDRによって分離されるフレームワークの各ドメインを意味することが意図される。いくつかの実施形態では、異なる軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。抗体の組み合わせた重鎖及び軽鎖フレームワーク領域は、抗原への適切な結合のためにCDRを配置及び整列させるように機能する。

10

【0115】

一実施形態では、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される非隣接抗原結合部位を含むアミノ酸残基を指す。別の実施形態では、「CDR」という用語は、Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) 及び Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)、並びに Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) 及び MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) によって記載される領域を含む。可変ドメインのCDRのアミノ酸は、抗体のアミノ酸残基について Kabat の番号付けシステムを使用して、ヒト重鎖可変ドメイン (VH) におけるアミノ酸残基 31~35B (H1)、50~65 (H2)、及び 95~102 (H3)、並びにヒト軽鎖可変ドメイン (VL) におけるアミノ酸残基 24~34 (L1)、50~56 (L2)、及び 89~97 (L3) からなるように、配列可変性に基づいて、Kabatによって最初に定義された。Kabat et al., sequences of proteins of immunological interest, US Dept. Health and Human Services, NIH, USA (5th ed. 1991)を参照されたい。Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) は、抗原結合活性において重要であることが見出された、可変ドメイン領域の三次元構造ループに含まれる残基に基づいたCDRの別の定義を提供した。Chothia et al. は、CDRが、ヒト重鎖可変ドメイン (VH) におけるアミノ酸残基 26~32 (H1)、52~56 (H2)、及び 95~102 (H3)、並びにヒト軽鎖可変ドメイン (VL) におけるアミノ酸残基 24~34 (L1)、50~56 (L2)、及び 89~97 (L3) からなるとして定義した。Kabat 及び Chothia の CDR 定義を組み合わせると、CDRは、Kabat の番号付けシステムに基づいて、ヒト VH におけるアミノ酸残基 26~35B (H1)、50~65 (H2)、及び 95~102 (H3)、並びにヒト VL におけるアミノ酸残基 24~34 (L1)、50~56 (L2)、及び 89~97 (L3) からなる。

20

30

40

【0116】

いくつかの実施形態では、「可変領域」は、抗体又はその重鎖若しくは軽鎖に関して使用される場合、分子に抗原結合を付与し、定常領域ではない、抗体のアミノ末端部分を意味することが意図される。用語は、その機能的断片を含むように意図され、可変領域全体の全ての結合機能のうちのいくつかを維持する。したがって、「ヘテロマー可変領域結合断片」という用語は、ヘテロマー複合体に組み立てられた少なくとも1つの重鎖可変領域及び少なくとも1つの軽鎖可変領域又はその機能的断片を意味することが意図される。ヘテロマー可変領域結合断片としては、例えば、Fab、F(ab)2、Fv、単鎖Fv (scfv) などの機能的断片が挙げられる。かかる機能的断片は、当業者に周知である。

50

したがって、ヘテロマー可変領域の機能的断片を説明する際のこれらの用語の使用は、当業者に周知の定義に対応することが意図される。かかる用語は、例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)、Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.)、Huston et al., Cell Biophysics, 22:189-224 (1993)、Pluckthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989)、及びDay, E. D., Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, N. Y. (1990)に記載されている。

10

【0117】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、単離されたポリペプチドのアイソフォームである。一実施形態では、「アイソフォーム」は、分子の型、例えば、本発明のタンパク質又はポリペプチドを指し、同じタンパク質又はポリペプチドの別のアイソフォームとわずかな違いを有する。一実施形態では、アイソフォームは、異なるが関連する遺伝子から産生されるか、又は別の実施形態では、それらは、選択的スプライシングによって同じ遺伝子から生じる。別の実施形態では、アイソフォームは、単一核酸多型によって引き起こされる。

20

【0118】

一実施形態では、本発明の単離されたポリペプチドは、天然タンパク質の断片である。一実施形態では、「断片」は、全長タンパク質又はポリペプチドよりも短いか、又は少ないアミノ酸を含むタンパク質又はポリペプチドを指す。別の実施形態では、断片は、全長核酸よりも短いか、又は少ない核酸を含む核酸を指す。別の実施形態では、断片は、N末端断片である。別の実施形態では、断片は、C末端断片である。一実施形態では、本発明の断片は、タンパク質、ペプチド、又は核酸の配列内部分である。別の実施形態では、断片は、タンパク質、ペプチド、又は核酸の機能的な配列内部分である。別の実施形態では、断片は、タンパク質、ペプチド、又は核酸内の機能的な配列内部分である。他の実施形態では、断片は、N末端の機能的断片である。一実施形態では、断片は、C末端の機能的断片である。

30

【0119】

一実施形態では、「機能的断片」という用語は、天然型又は野生型の抗体又はポリペプチドの修飾形式であるにもかかわらず、野生型と比較して、ある程度の生物学的活性を維持する断片を指す。この活性の程度は、野生型と比較して中度から高度の範囲であり得、「活性」は、その天然の生物物理学的又は生化学的特徴、例えば、結合能力、親和性、半減期などを指す。

【0120】

一実施形態では、本発明の単離されたポリペプチドは、本発明のポリペプチドの誘導体を含む。「誘導体」は、いくつかの実施形態では、問題のタンパク質の天然配列の全長部分未満を指すものとして理解されるべきである。いくつかの実施形態では、「誘導体」は、(その末端及び／又は配列自体内で)非天然配列、すなわち、問題の天然タンパク質の一部を形成しない配列を更に含み得る。「誘導体」という用語はまた、その範囲内に、化学基を天然タンパク質又はその断片のアミノ酸残基側鎖にコンジュゲートすることによって生成される分子種を含み、化学基は、天然タンパク質に存在する天然に生じるアミノ酸残基の一部を形成しない。

40

【0121】

抗体及び抗体断片を作製する方法は、当該技術分野で既知である。(例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New Yo

50

r k, 1988を参照されたく、参照により本明細書に組み込まれる)。

【0122】

抗体は、本発明の抗PSMAエピトープを含むPSMA又はPSMAのペプチド断片などの標的抗原を用いた、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、霊長類、ヒト、及びニワトリを含む様々な動物の免疫によって産生することができる。一実施形態では、抗体又は抗原結合断片は、動物の免疫化前に精製される。一実施形態では、本発明の抗体又は抗原結合断片は、当該技術分野で既知の方法、例えば、ゲル濾過、イオン交換、親和性クロマトグラフィーなどによって精製することができる。アフィニティークロマトグラフィー又は当該技術分野で既知のいくつかの他の技法のいずれかを使用して、血清、腹水、又はハイブリドーマ上清からポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を単離することができる。

10

【0123】

「精製された」とは、モノクローナル抗体が、通常、モノクローナル抗体と会合するタンパク質の少なくともいくつかから分離され、好ましくは、タンパク質以外の全ての細胞材料から分離されることを意味する。

【0124】

また、ポリペプチドの増加した溶解性、安定性、インビボ若しくはインビトロ循環時間、又は減少した免疫原性などの追加の利点を提供し得る、本発明の抗体の化学修飾誘導体が提供される(米国特許第4,179,337号を参照)。誘導体化のための化学部分は、ポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコールなどの水溶性ポリマーから選択され得る。抗体は、分子内のランダムな位置で、又は分子内の所定の位置で修飾され得、1つ、2つ、3つ、又はそれ以上の結合した化学部分を含み得る。

20

【0125】

ポリマーは、任意の分子量のものであり得、分岐又は非分岐であり得る。ポリエチレングリコールでは、分子量は、取り扱い及び製造における容易さのために、約1kDa~約100kDaである(「約」という用語は、ポリエチレングリコールの調製物において、いくつかの分子は、記載された分子量よりも高く、いくつかはより低い重量であることを示す)。所望の治療プロファイル(例えば、所望の持続放出の期間、生物学的活性に対する影響(ある場合)、取り扱いの容易さ、抗原性の程度又は欠如、及び治療用タンパク質又は類似体に対するポリエチレングリコールの他の既知の効果)に応じて、他のサイズが使用され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、約200、500、1000、1500、2000、2560、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、又は100,000kDaの平均分子量を有し得る。

30

40

【0126】

上述のように、ポリエチレングリコールは、分岐構造を有し得る。分岐ポリエチレングリコールは、例えば、米国特許第5,643,575号、Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72(1996)、Vorobjev et al., Nucleosides Nucleic acids 18:2745-2750(1999)、及びCaliceti et al., Bioconj. Chem. 10:638-646(1999)に記載されており、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0127】

ポリエチレングリコール分子(又は他の化学部分)は、抗体の機能的又は抗原性ドメイ

50

ンへの影響を考慮して抗体に結合されるべきである。当業者に利用可能であるいくつかの結合方法があり、例えば、本明細書に組み込まれているEP0401384（PEGのG-C-S-Fとのカップリング）、また、Malik et al., Exp. Hematol. 20:1028-1035（1992）（トレシルクロリドを使用するGM-C-S-Fのペグ化を報告している）も参照されたい。例えば、ポリエチレングリコールは、遊離アミノ基又はカルボキシル基などの反応性基を介してアミノ酸残基を通して共有結合され得る。反応性基は、活性化ポリエチレングリコール分子が結合し得るものである。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基には、例えば、リジン残基及びN末端アミノ酸残基が含まれ得る、遊離カルボキシル基を有するものには、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、及びC末端アミノ酸残基が含まれ得る。スルフヒドリル基はまた、ポリエチレングリコール分子を結合するための反応性基として使用され得る。いくつかの実施形態では、結合は、N末端又はリジン基での結合など、アミノ基においてである。

10

20

30

40

50

【0128】

上記で示唆されるように、ポリエチレングリコールは、いくつかのアミノ酸残基のうちのいずれかへの連結を介して、タンパク質、例えば、抗体に結合され得る。例えば、ポリエチレングリコールは、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、又はシステイン残基との共有結合を介してタンパク質に連結することができる。1つ以上の反応化学を用いて、ポリエチレングリコールを、タンパク質の特定のアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、又はシステイン）に、又は1つ以上のタイプのアミノ酸残基（例えば、リジン、ヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、及びそれらの組み合わせ）に結合し得る。

【0129】

グリコシル化バリエーション

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ以上のグリコシル化部位が作製又は除去されるようにアミノ酸配列を変更することによって、好都合に達成され得る。

【0130】

例えば、非グリコシル化抗体（すなわち、抗体がグリコシル化を欠く）を作製することができる。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変更することができる。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1つ以上のグリコシル化部位を変更することによって達成され得る。例えば、1つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、それによってその部位でのグリコシル化を排除する1つ以上のアミノ酸置換を作製することができる。かかる非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させ得る。かかるアプローチは、Coraによる米国特許第5,714,350号及び同第6,350,861号に更に詳細に記載されている。

【0131】

N297上の定常領域のグリコシル化は、N297残基を別の残基、例えば、N297Aに変異させることによって、及び／又は隣接するアミノ酸、例えば、298を変異させて、N297上のグリコシル化を低減することによって、防止してもよい。

【0132】

追加的又は代替的に、フコシル残基の量が減少した低フコシル化抗体、又はバイセクト（bisecting）GlcNAc構造が増加した抗体などの、変更されたタイプのグリコシル化を有する抗体を作製することができる。かかる変化したグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、改変されたグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって達成され得る。変更されたグリコシル化機構を有する細胞は、当該技術分野に記載されており、本明細書に記載される組換え抗体を発現し、それによって変更されたグリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として使用され得る。例えば、HanaïらによるEP1,176,195は、フコシルトランスフェラーゼをコードする、機能的に破壊さ

れたFUT8遺伝子を有する細胞株を記載しており、それによってかかる細胞株で発現される抗体は、低フコシル化を示す。PrestaによるPCT公開第03/035835号は、Asn(297)結合炭水化物にフコースを取り付ける能力が低下し、その宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化をもたらす、バリエーションハムスター卵巣細胞株、Led 3細胞を記載する(Shields, R. L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740も参照されたい)。UmanaらによるPCT公開第99/54342号は、操作された細胞株において発現された抗体が、抗体のADCC活性の増加をもたらす増加したバイセクトGlcNAc構造を示すように、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ(例えば、ベータ(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII))を発現するように操作された細胞株を記載している(Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180も参照されたい)。

10

【0133】

Fc領域バリエーション

本明細書に記載の抗体の可変領域は、Fc、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のFcに連結されてもよく(例えば、共有結合若しくは融合されてもよい)、これらは、任意のアロタイプ又はアイソアロタイプ、例えば、IgG1の場合：G1m、G1m1(a)、G1m2(x)、G1m3(f)、G1m17(z)；IgG2の場合：G2m、G2m23(n)；IgG3の場合：G3m、G3m21(gl)、G3m28(g5)、G3m11(b0)、G3m5(bl)、G3m13(b3)、G3m14(b4)、G3m10(b5)、G3m15(s)、G3m16(t)、G3m6(c3)、G3m24(c5)、G3m26(u)、G3m27(v)；及びKの場合：Km、Km1、Km2、Km3(例えば、Jeffries et al. (2009) mAbs 1:1を参照)であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体可変領域は、1つ以上の活性化Fc受容体(FcγI、FcγIIa、又はFcγIIIa)に結合するFcに連結され、それによってADCCを刺激し、T細胞枯渇を引き起こし得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体可変領域は、枯渇を引き起こすFcに連結されている。

20

【0134】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体可変領域は、典型的には、血清半減期、補体固定、Fc受容体結合、及び／又は抗原依存性細胞傷害性などの抗体の1つ以上の機能的特性を変化させるために、1つ以上の修飾を含むFcに連結されてもよい。更に、本明細書に記載の抗体は、化学修飾されてもよく(例えば、1つ以上の化学部分が抗体に結合されてもよい)、又はそのグリコシル化を変更して、抗体の1つ以上の機能的特性を変更してもよい。Fc領域における残基の番号付けは、KabattのEUIンデックスのものである。

30

【0135】

Fc領域は、免疫グロブリン、好ましくはヒト免疫グロブリンの定常領域に由来するドメインを包含し、定常領域の断片、類似体、バリエーション、変異体、又は誘導体を含む。好適な免疫グロブリンとしては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、並びにIgA、IgD、IgE、及びIgMなどの他のクラスが挙げられる。免疫グロブリンの定常領域は、免疫グロブリンC末端領域に相同な天然に存在するポリペプチド又は合成で産生されるポリペプチドとして定義され、CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、CH3ドメイン、又はCH4ドメインを、別個に又は組み合わせて含むことができる。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、野生型IgA1の領域以外のFc領域を有する。抗体は、IgGのもの(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4)又はIgA2、IgD、IgE、及びIgMなどの他のクラスのものからのFc領域を有することができる。Fcは、IgA1の変異体であり得る。

40

【0136】

免疫グロブリンの定常領域は、Fc受容体(FcR)結合及び補体結合(comple

50

ment fixation) の重要な抗体機能に関与する。重鎖定常領域には、IgA、IgG、IgD、IgE、IgMに分類される5つの主要なクラスがあり、それぞれがアイソタイプによって指定される特徴的なエフェクター機能を有する。例えば、IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4として知られる4つのサブクラスに分離される。

【0137】

Ig分子は、細胞受容体の複数のクラスと相互作用する。例えば、IgG分子は、抗体のIgGクラスに特異的な3つのクラスのFcγ受容体(FcγR)、すなわち、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIと相互作用する。IgGのFcγR受容体への結合のための重要な配列は、CH2及びCH3ドメインに位置することが報告されている。抗体の血清半減期は、その抗体がFcRに結合する能力によって影響を受ける。

10

【0138】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、望ましい構造的特徴及び／又は生物学的活性を提供するために、親Fc配列(例えば、その後、バリエーションを生成するように修飾される非修飾Fcポリペプチド)に対して修飾された(例えば、アミノ酸置換、欠失、及び／又は挿入によって)バリエーションFc領域である。例えば、(a)ADCCが増加若しくは減少し、(b)CDCが増加若しくは減少し、(c)Clqに対する親和性が増加若しくは減少し、及び／又は(d)親Fcと比較してFc受容体に対する親和性が増加若しくは減少したFcバリエーションを生成するために、Fc領域において修飾を行ってもよい。かかるFc領域バリエーションは、一般に、Fc領域内に少なくとも1つのアミノ酸修飾を含む。アミノ酸修飾を組み合わせることが特に望ましいと考えられる。例えば、バリエーションFc領域は、例えば、本明細書で特定される特定のFc領域位置のうちの2つ、3つ、4つ、5つなどの置換を含んでもよい。

20

【0139】

変異体Fc領域はまた、ジスルフィド結合形成に関与するアミノ酸が除去されるか、又は他のアミノ酸と置き換えられる配列改変を含んでもよい。かかる除去は、本明細書に記載される抗体を産生するために使用される宿主細胞内に存在する他のシステイン含有タンパク質との反応を回避し得る。システイン残基が除去されても、一本鎖Fcドメインは、依然として、非共有結合で一緒に保持される二量体Fcドメインを形成することができる。他の実施形態では、Fc領域は、それを選択された宿主細胞とより適合させるように修飾され得る。例えば、典型的な天然Fc領域のN末端付近のPA配列を除去してもよく、これは、プロリンイミノペプチダーゼなどのE.coli内の消化酵素によって認識されてもよい。他の実施形態では、Fcドメイン内の1つ以上のグリコシル化部位を除去してもよい。典型的には、グリコシル化されている残基(例えば、アスパラギン)は、細胞溶解反応を付与してもよい。かかる残基は、非グリコシル化残基(例えば、アラニン)で欠失又は置換され得る。他の実施形態では、補体との相互作用に関与する部位、例えば、Clq結合部位は、Fc領域から除去され得る。例えば、ヒトIgG1のEKK配列を欠失又は置換してもよい。いくつかの実施形態では、Fc受容体への結合に影響を与える部位は除去されてもよく、好ましくは、サルベージ受容体結合部位以外の部位である。他の実施形態では、Fc領域は、ADCC部位を除去するように修飾されてもよい。ADCC部位は、当該技術分野で既知であり、例えば、IgG1におけるADCC部位に関してMol. Immunol. 29(5):633-9(1992)を参照されたい。バリエーションFcドメインの具体例は、例えば、WO97/34631及びWO96/32478に開示されている。

30

40

【0140】

一実施形態では、Fcのヒンジ領域は、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変更されるように、例えば、増加又は減少するように修飾される。このアプローチは、Bodmerらによる米国特許第5,677,425号に更に記載されている。Fcのヒンジ領域におけるシステイン残基の数は、例えば、軽鎖及び重鎖の組み立てを容易にするために、又は抗体の安定性を増加又は減少させるために変更される。一実施形態では、抗体のFcヒ

50

ンジ領域は、抗体の生物学的半減期を減少させるように変異される。より具体的には、抗体が天然のFc-ヒンジドメインSpA結合と比較して減損したブドウ球菌タンパク質A (SpA) 結合を有するように、1つ以上のアミノ酸変異が、Fc-ヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン界面領域に導入される。このアプローチは、Wardらによる米国特許第6,165,745号に更に詳細に記載されている。

【0141】

更に他の実施形態では、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を変更するために、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基で置き換えることによって変更される。例えば、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320、及び322から選択される1つ以上のアミノ酸は、抗体がエフェクターリガンドに対する変更された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力を保持するように、異なるアミノ酸残基で置き換えられ得る。親和性に変更されるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体又は補体のC1構成要素であり得る。このアプローチは、Winterらによる米国特許第5,624,821号及び同第5,648,260号に更に詳細に記載されている。

【0142】

別の例では、アミノ酸残基329、331、及び322から選択される1つ以上のアミノ酸は、抗体がClq結合を変更し、及び／又はCDCを低減若しくは廃止したように、異なるアミノ酸残基で置き換えられ得る。このアプローチは、Idusogieらによる米国特許第6,194,551号に更に詳細に記載されている。

【0143】

別の例では、アミノ酸位置231及び239内の1つ以上のアミノ酸残基が変更され、それによって抗体が補体を固定する能力を変更する。このアプローチは、BodmerらによるPCT公開第94/29351号に更に記載されている。

【0144】

更に別の例では、Fc領域は、以下の位置で1つ以上のアミノ酸を修飾することによって、ADCCを増加させる、及び／又はFcγ受容体に対する親和性を増加させるように修飾され得る：234、235、236、238、239、240、241、243、244、245、247、248、249、252、254、255、256、258、262、263、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、299、301、303、305、307、309、312、313、315、320、322、324、325、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、433、434、435、436、437、438又は439。例示的な置換としては、236A、239D、239E、268D、267E、268E、268F、324T、332D、及び332Eが挙げられる。例示的なバリエーションとしては、239D/332E、236A/332E、236A/239D/332E、268F/324T、267E/268F、267E/324T、及び267E/268F7324Tが挙げられる。FcγR及び補体相互作用を増強するための他の修飾としては、置換298A、333A、334A、326A、247I、339D、339Q、280H、290S、298D、298V、243L、292P、300L、396L、305I、及び396Lが挙げられるが、これらに限定されない。これら及び他の修正は、Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685-691において概説されている。

【0145】

Fcγ受容体への結合を増加させるFc修飾は、Fc領域のアミノ酸位置238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、279、280、283、285、298、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、30

7、312、315、324、327、329、330、335、337、3338、340、360、373、376、379、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438又は439のうちのいずれか1つ以上におけるアミノ酸修飾を含み、ここでは、Fc領域における残基の番号付けは、abatにおけるEUインデックスと同じである(WO00/42072)。

【0146】

Fcに行うことができる他のFc修飾は、FcγR及び／又は補体タンパク質への結合を低減又は除去するためのものであり、それによって、ADCC、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、及びCDCなどのFc媒介性エフェクター機能を低減又は除去する。例示的な修飾としては、234、235、236、237、267、269、325、及び328位の置換、挿入、及び欠失が挙げられるが、これらに限定されず、番号付けは、EUインデックスに従う。例示的な置換としては、234G、235G、236R、237K、267R、269R、325L、及び328Rが挙げられるが、これらに限定されず、番号付けは、EUインデックスに従う。Fcバリエーションは、236R/328Rを含み得る。FcγR及び補体相互作用を低減するための他の修飾としては、置換297A、234A、235A、237A、318A、228P、236E、268Q、309L、330S、331S、220S、226S、229S、238S、233P、及び234V、並びに変異若しくは酵素的手段によって、又はタンパク質をグリコシル化しない細菌などの生物での産生によって、297位でのグリコシル化を除去することが挙げられる。これら及び他の修正は、Strohle, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20:685-691において概説されている。

10

20

【0147】

任意選択で、Fc領域は、当業者に既知の追加の及び／又は代替の位置に非天然型アミノ酸残基を含んでもよい(例えば、米国特許第5,624,821号、同第6,277,375号、同第6,737,056号、同第6,194,551号、同第7,317,091号、同第8,101,720号;WO00/42072、WO01/58957、WO02/06919、WO04/016750、WO04/029207、WO04/035752、WO04/074455、WO04/099249、WO04/063351、WO05/070963、WO05/040217、WO05/092925及びWO06/020114を参照されたい)。

30

【0148】

抑制性受容体FcγRIIbに対する親和性を増強するFcバリエーションも使用され得る。かかるバリエーションは、例えば、B細胞及び単球を含む、FcγRIIb細胞に関連する免疫調節活性を有するFc融合タンパク質を提供してもよい。一実施形態では、Fcバリエーションは、1つ以上の活性化受容体と比較して、FcγRIIbに対する選択的に増強された親和性を提供する。FcγRIIbへの結合を変更するための修飾には、EUインデックスに従って、234、235、236、237、239、266、267、268、325、326、327、328、及び332から選択される位置での1つ以上の修飾が挙げられる。FcγRIIb親和性を向上させるための例示的な置換としては、234D、234E、234F、234W、235D、235F、235R、235Y、236D、236N、237D、237N、239D、239E、266M、267D、267E、268D、268E、327D、327E、328F、328W、328Y、及び332Eが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な置換としては、235Y、236D、239D、266M、267E、268D、268E、328F、328W、及び328Yが挙げられる。FcγRIIbへの結合を増強するための他のFcバリエーションとしては、235Y/267E、236D/267E、239D/268D、239D/267E、267E/268D、267E/268E、及び267E/328Fが挙げられる。

40

【0149】

そのリガンドに対するFc領域の親和性及び結合特性は、平衡法(例えば、ELISA

50

、又は放射免疫測定法）、又は動態（例えば、B I A C O R E分析）、並びに他の方法、例えば、間接結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー伝達（F R E T）、ゲル電気泳動及びクロマトグラフィー（例えば、ゲル濾過）が挙げられるが、これらに限定されない当該技術分野において既知の様々なインビトロアッセイ方法（生化学的又は免疫学的ベースのアッセイ）によって決定され得る。これら及び他の方法は、検査されている構成要素のうちの1つ以上の標識を利用してもよく、及び／又は発色、蛍光、発光、又は同位体標識が挙げられるが、これらに限定されない様々な検出方法を用いてもよい。結合親和性及び動態の詳細な説明は、抗体と免疫原の相互作用に焦点を当てている、P a u l , W . E . , ed . , F u n d a m e n t a l I m m u n o l o g y , 4 t h E d . , L i p p i n c o t t - R a v e n , P h i l a d e l p h i a (1 9 9 9) で見出すことができる。

10

【0150】

いくつかの実施形態では、抗体は、その生物学的半減期を増加させるように修飾される。様々なアプローチが可能である。例えば、これは、F c R nに対するF c領域の結合親和性を増加させることによって行われ得る。例えば、米国特許第6, 277, 375号に記載されるように、以下の残基のうちの1つ以上が変異され得る：252、254、256、433、435、436。具体的な例示的置換としては、以下のうちの1つ以上が挙げられる：T252L、T254S、及び／又はT256F。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、抗体は、P r e s t aらによる米国特許第5, 869, 046号及び第6, 121, 022号に記載されているように、I g GのF c領域のC H 2ドメインの2つのループから得られたサルベージ受容体結合エピートプを含有するようにC H 1又はC L領域内で変更され得る。F c R nへの結合を増加させる、及び／又は薬物動態特性を改善する他の例示的なバリエーションには、例えば、259I、308F、428L、428M、434S、434H、434F、434Y、及び434Mを含む、259位、308、428、及び434位の置換が挙げられる。F c R nへのF c結合を増加させる他のバリエーションとしては、250E、250Q、428L、428F、250Q／428L（H i n t o n e t a l , , 2 0 0 4 , J . B i o l . C h e m . 2 7 9 (8) : 6 2 1 3 - 6 2 1 6 , H i n t o n e t a l . 2 0 0 6 J o u r n a l o f I m m u n o l o g y 1 7 6 : 3 4 6 - 3 5 6) 、 2 5 6 A 、 2 7 2 A 、 2 8 6 A 、 3 0 5 A 、 3 0 7 A 、 3 0 7 Q 、 3 1 1 A 、 3 1 2 A 、 3 7 6 A 、 3 7 8 Q 、 3 8 0 A 、 3 8 2 A 、 4 3 4 A (S h i e l d s e t a l , J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y , 2 0 0 1 , 2 7 6 (9) : 6 5 9 1 - 6 6 0 4) 、 2 5 2 F 、 2 5 2 T 、 2 5 2 Y 、 2 5 2 W 、 2 5 4 T 、 2 5 6 S 、 2 5 6 R 、 2 5 6 Q 、 2 5 6 E 、 2 5 6 D 、 2 5 6 T 、 3 0 9 P 、 3 1 1 S 、 4 3 3 R 、 4 3 3 S 、 4 3 3 I 、 4 3 3 P 、 4 3 3 Q 、 4 3 4 H 、 4 3 4 F 、 4 3 4 Y 、 2 5 2 Y / 2 5 4 T / 2 5 6 E 、 4 3 3 K / 4 3 4 F / 4 3 6 H 、 3 0 8 T / 3 0 9 P / 3 1 1 S (D a l l A c q u a e t a l . J o u r n a l o f I m m u n o l o g y , 2 0 0 2 , 1 6 9 : 5 1 7 1 - 5 1 8 0 , D a l l ' A c q u a e t a l . , 2 0 0 6 , J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 8 1 : 2 3 5 1 4 - 2 3 5 2 4) が挙げられる。F c R n結合を調節するための他の修飾は、Y e u n g e t a l . , 2 0 1 0 , J I m m u n o l , 1 8 2 : 7 6 6 3 - 7 6 7 1 に記載されている。いくつかの実施形態では、特定の生物学的特徴を有するハイブリッドI g Gアイソタイプを使用してもよい。例えば、I g G 1 / I g G 3ハイブリッドバリエーションは、C H 2及び／又はC H 3領域内のI g G 1位置を、2つのアイソタイプが異なる位置でI g G 3由来のアミノ酸で置換することによって構築されてもよい。したがって、1つ以上の置換、例えば、274Q、276K、300F、339T、356E、358M、384S、392N、397M、422I、435R、及び436Fを含むハイブリッドバリエーションI g G抗体を構築してもよい。本明細書に記載される他の実施形態では、I g G 1 / I g G 2ハイブリッドバリエーションは、C H 2及び／又はC H 3領域内のI g G 2位置を、2つのアイソタイプが異なる位置でI g G 1からのアミノ酸で置換することによって構築されてもよい。したがって、ハ

20

30

40

50

イブリッドバリエーションIgG抗体は、1つ以上の置換、例えば、以下のアミノ酸置換のうちの1つ以上を含むCHATによって構築され得る：233E、234L、235L、236G（236位のグリシンの挿入を指す）、及び321H。

【0151】

更に、FcγRI、FcγRII、FcγRIII及びFcRnのヒトIgG1上の結合部位がマッピングされ、改良された結合を有するバリエーションが記載されている（Shields, R. L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照されたい）。256位、290位、298位、333位、334位及び339位の特異的変異は、FcγRIIIへの結合を改善することが示された。加えて、以下の組み合わせ変異体は、FcγRIII結合を改善することが示された：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224A及びS298A/E333A/K334A（これらは、増強されたFcγRIIIa結合及びADCC活性を示すことが示されている）（Shields et al., 2001）。FcγRIIIaへの結合が強く増強された他のIgG1バリエーションが同定されており、これには、FcγRIIIaに対する親和性の最大の増加、FcγRIIb結合の減少、及びカニクイザルにおける強い細胞傷害性活性を示したS239D/I332E及びS239D/I332E/A330L変異を有するバリエーションが含まれる（Lazar et al., 2006）。アレムツズマブ（CD52特異的）、トラスツズマブ（HER2/neu特異的）、リツキシマブ（CD20特異的）、及びセツキシマブ（EGFR特異的）などの抗体への三重変異の導入は、インビトロで大幅に増強されたADCC活性に変換され、S239D/I332Eバリエーションは、サルにおけるB細胞を枯渇させる能力の増強を示した（Lazar et al., 2006）。加えて、B細胞悪性腫瘍及び乳がんのモデルにおいて、ヒトFcγRIIIaを発現するトランスジェニックマウスにおいてFcγRIIIaへの結合の増強及び同時に増強されたADCC活性を示したL235V、F243L、R292P、Y300L及びP396L変異を含有するIgG1変異体が同定されている（Stavénhagen et al., 2007; Nordstrom et al., 2011）。使用され得る他のFc変異体としては、以下が挙げられる：S298A/E333A/L334A、S239D/I332E、S239D/I332E/A330L、L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L、M428L/N434S。

【0152】

いくつかの実施形態では、FcγRへの結合が減少したFcが選択される。FcγR結合が減少した例示的なFc、例えばIgG1 Fcは、以下の3つのアミノ酸置換を含む：L234A、L235E、及びG237A。

【0153】

いくつかの実施形態では、補体固定が減少したFcが選択される。補体固定が減少した例示的なFc、例えば、IgG1 Fcは、以下の2つのアミノ酸置換を有する：A330S及びP331S。

【0154】

いくつかの実施形態では、本質的にエフェクター機能を有しない、すなわち、FcγRへの結合が減少し、補体固定が減少したFcが選択される。エフェクターレスである例示的なFc、例えば、IgG1 Fcは、以下の5つの変異を含む：L234A、L235E、G237A、A330S、及びP331S。

【0155】

IgG4定常ドメインを使用する場合、通常、置換S228Pを含むことが好ましく、これは、IgG1内のヒンジ配列を模倣し、それによってIgG4分子を安定化する。

【0156】

血清半減期を増加させるFc変異

いくつかの実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体のFc領域又はFcドメインは、抗原結合分子の血清半減期の増加を促進するアミノ酸改変を含む。抗体の半減期を

10

20

30

40

50

増加させる変異が、報告されている。一実施形態では、CD3標的化重鎖及びHIV抗原標的化重鎖の一方又は両方のFc領域又はFcドメインは、252位（EU番号付け）にメチオニンからチロシンへの置換、254位（EU番号付け）にセリンからスレオニンへの置換、及び256位（EU番号付け）にスレオニンからグルタミン酸への置換を含む。例えば、米国特許第7,658,921号を参照されたい。「YTE変異体」として指定されるこのタイプの変異体は、同じ抗体の野生型バージョンと比較して4倍増加した半減期を示す（DalFacqua, et al., J Biol Chem, 281:23514-24(2006)、Robbie, et al., Antimicrob Agents Chemotherap., 57(12):6147-6153(2013)）。特定の実施形態では、CD3標的化重鎖及びHIV抗原標的化重鎖の一方又は両方のFc領域又はFcドメインは、251～257位、285～290位、308～314位、385～389位、及び428～436位（EU番号付け）のアミノ酸残基の1つ、2つ、3つ、又はそれ以上のアミノ酸置換を含むIgG定常ドメインを含む。代替的に、M428L及びN434S（「LS」）置換は、多重特異性抗原結合分子の薬物動態半減期を増加させることができる。他の実施形態では、CD3標的化重鎖及びHIV抗原標的化重鎖の一方又は両方のFc領域又はFcドメインは、M428L及びN434S置換（EU番号付け）を含む。他の実施形態では、CD3標的化重鎖及びHIV抗原標的化重鎖の一方又は両方のFc領域又はFcドメインは、T250Q及びM428L（EU番号付け）変異を含む。他の実施形態では、CD3標的化重鎖及びHIV抗原標的化重鎖の一方又は両方のFc領域又はFcドメインは、H433K及びN434F（EU番号付け）変異を含む。

10

20

【0157】

エフェクター活性を高めるFc変異

いくつかの実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体のFc領域又はFcドメインは、エフェクター活性を増加させる、例えば、改善されたFcγRIIIa結合及び増加した抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有する翻訳後及び／又はアミノ酸改変を含む。いくつかの実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体のFc領域又はFcドメインは、Fc領域にDE改変（すなわち、EU付番によるS239D、及びI332E）を含む。いくつかの実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体のFc領域又はFcドメインは、Fc領域にDEL改変（すなわち、EU付番によるS239D、I332E、及びA330L）を含む。いくつかの実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体のFc領域又はFcドメインは、Fc領域にDEA改変（すなわち、EU付番によるS239D、I332E、及びG236A）を含む。いくつかの実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体のFc領域又はFcドメインは、Fc領域にDEAL改変（すなわち、EU付番によるS239D、I332E、G236A、及びA330L）を含む。例えば、米国特許第7,317,091号、同第7,662,925号、同第8,039,592号、同第8,093,357号、同第8,093,359号、同第8,383,109号、同第8,388,955号、同第8,735,545号、同第8,858,937号、同第8,937,158号、同第9,040,041号、同第9,353,187号、同第10,184,000号、及び同第10,584,176号を参照されたい。エフェクター活性を増加させる、例えば、改善されたFcγRIIIa結合及び増加した抗体依存性細胞傷害性（ADCC）を有する追加のアミノ酸改変としては、限定されないが、第1のFcドメインでの（EU番号付け）F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L、S298A/E333A/K334A、又はL234Y/L235Q/G236W/S239M/H268D/D270E/S298A、及び第2のFcドメインでのD270E/K326D/A330M/K334Eが挙げられる。Clq結合及び補体依存性細胞傷害性（CDC）を増加させるアミノ酸変異には、限定されないが、（EU番号付け）S267E/H268F/S324T又はK326W/E333Sが含まれる。エフェクター活性を増強するFc領域変異は、例えば、Wang, et al., Protein Cell (2018) 9(1):63-73、及びSaunders, Fro

30

40

50

nt Immunol. (2019) 10:1296にレビューされている。他の実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体又はその抗原結合断片は、修飾されたグリコシル化を有し、これは、例えば、翻訳後に又は遺伝子操作によって導入され得る。いくつかの実施形態では、抗HIV gp120指向性抗体又はその抗原結合断片は、例えば、抗体又はその抗原結合断片に存在するグリコシル化部位で、非フコシル化されている。ほとんどの承認されたモノクローナル抗体は、IgG1アイソタイプのものであり、2つのN連結した二分岐複合体型オリゴ糖が、Fc領域に結合している。Fc領域は、FcγRファミリーの白血球受容体との相互作用を通してADCCのエフェクター機能を発揮する。非フコシル化モノクローナル抗体は、抗体のFc領域におけるオリゴ糖がいかなるフコース糖単位も有しないように操作されたモノクローナル抗体である。

10

【0158】

多価抗体

一実施形態では、本開示の抗体は、一価又は多価（例えば、二価、三価など）であり得る。本明細書で使用される場合、「結合価」という用語は、抗体と会合する潜在的な標的結合部位の数を指す。各標的結合部位は、1つの標的分子又は標的分子での特定の位置若しくは遺伝子座に特異的に結合する。抗体が一価である場合、分子の各結合部位は、単一の抗原位置又はエピトープに特異的に結合する。抗体が2つ以上の標的結合部位（多価）を含む場合、各標的結合部位は、同じか又は異なる分子に特異的に結合し得る（例えば、異なるリガンド若しくは異なる抗原、又は同じ抗原上の異なるエピトープ若しくは位置に結合し得る）。例えば、米国特許（U.S.P.N.）第2009/0130105号を参照されたい。各場合において、結合部位のうちの少なくとも1つは、DLL3アイソフォームと会合するエピトープ、モチーフ、又はドメインを含む。

20

【0159】

一実施形態では、抗体は、Mills et al., 1983, Nature, 305:537-539に記載されているように、2つの鎖が異なる特異性を有する二重特異性抗体である。他の実施形態は、三重特異性抗体などの追加の特異性を有する抗体を含む。他のより洗練された互換性のある多重特異性構築物及びそれらの組み立て方法は、U.S.P.N. 2009/0155255、並びにWO94/04690、Suresh et al., 1986, Methods in Enzymology, 121:210、及びWO96/27011に示されている。

30

【0160】

上述のように、多価抗体は、所望の標的分子の異なるエピトープに免疫特異的に結合し得、又は標的分子並びに異種ポリペプチド若しくは固体支持体材料などの異種エピトープの両方に免疫特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、多価抗体は、二重特異性抗体又は三重特異性抗体を含み得る。二重特異性抗体はまた、架橋抗体又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートにおける抗体の一方は、アビジンに、他方はビオチンにカップリングすることができる。かかる抗体は、例えば、免疫系細胞を望ましくない細胞に対して標的化するために（米国特許第4,676,980号）、及びHIV感染の治療のために（WO91/00360、WO92/200373、及びEP03089）提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の好都合な架橋方法を使用して作製され得る。好適な架橋剤は、当技術分野で周知であり、いくつかの架橋技法とともに、米国特許第4,676,980号に開示されている。

40

【0161】

いくつかの実施形態では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体-抗原結合部位）は、当業者に周知の方法を使用して、ヒンジ、CH2、及び／又はCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインなどの免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。

【0162】

いくつかの実施形態では、単離された抗HIV抗体は、第1の抗原に結合する第1の抗原結合アームと、第2の抗原に結合する第2の抗原結合アームとを含む二重特異性抗体で

50

あり、第1の抗原と第2の抗原とは異なり、第1の抗原結合アームは、上で特定されるような重鎖アミノ酸配列及び軽鎖アミノ酸配列を含む。

【0163】

いくつかの実施形態では、第2の抗原は、CD3、FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、FcγRIII(CD16)、CD89、CCR5、CD4、CD8、CD28、CD137、CTLA-4、gp41、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのIgドメイン及び長細胞質テール1(KIR3DL1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのIgドメイン及び長細胞質テール1(KIR3DL1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのIgドメイン及び長細胞質テール1(KIR2DL1)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのIgドメイン及び長細胞質テール2(KIR2DL2)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのIgドメイン及び長細胞質テール3(KIR2DL3)、キラー細胞レクチン様受容体C1(KLRC1)、キラー細胞レクチン様受容体C2(KLRC2)、キラー細胞レクチン様受容体C3(KLRC3)、キラー細胞レクチン様受容体C4(KLRC4)、キラー細胞レクチン様受容体D1(KLRD1)、キラー細胞レクチン様受容体K1(KLRK1)、天然細胞傷害性誘発受容体3(NCR3又はNKp30)、天然細胞傷害性誘発受容体2(NCR2又はNK-p44)、天然細胞傷害性誘発受容体1(NCR1又はNK-p46)、CD226(DNAM-1)、細胞傷害性及び調節性T細胞分子(CRTAM又はCD355)、シグナル伝達リンパ球活性化分子ファミリーメンバー1(SLAMF1)、CD48(SLAMF2)、リンパ球抗原9(LY9又はSLAMF3)、CD244(2B4又はSLAMF4)、CD84(SLAMF5)、SLAMファミリーメンバー6(SLAMF6又はNTB-A)、SLAMファミリーメンバー7(SLAMF7又はCRACC)、CD27(TNFRSF7)、セマフォリン4D(SEMA4D又はCD100)、CD160(NK1)、免疫チェックポイントタンパク質(例えば、PD-1、PD-L1、CTLA-4)、及びgp120の第2のエピトープから選択される。

10

20

【0164】

抗体誘導体

本明細書に提供される抗体は、当該技術分野で既知であり、容易に入手可能な追加の非タンパク質性部分を含有するように更に修飾され得る。抗体の誘導体化に好適な部分としては、水溶性ポリマーが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0165】

水溶性ポリマーの非限定的な例としては、PEG、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン／マレイン酸無水物コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレン(propylene)グリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量を有し得、分岐状又は非分岐状であり得る。抗体に結合したポリマーの数は様々であり、2つ以上のポリマーが結合している場合、それらは同じ又は異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又は種類は、改善される抗体の特定の特性若しくは機能、抗体誘導体が定義された条件下で治療に使用されるかどうかなどが挙げられるが、これらに限定されない考慮事項に基づいて決定され得る。

40

【0166】

別の実施形態において、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る抗体と非タンパク質性部分とのコンジュゲートが提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである(Kam et al., Proc. Natl. Acad.

50

Sci. USA 102:11600-11605 (2005) を参照されたい)。放射線は、任意の波長のものであってもよく、通常の細胞に害を及ぼさないが、非タンパク質性部分を抗体非タンパク質性部分に近接する細胞が死滅する温度まで加熱する波長が含まれるが、これらに限定されない。

【0167】

本明細書に記載される抗体の別の修飾は、ペグ化である。抗体をペグ化して、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。抗体をペグ化するために、抗体、又はその断片を、典型的には、1つ以上のPEG基が抗体又は抗体断片に結合する条件下で、PEGの反応性エステル又はアルデヒド誘導体などのPEGと反応させる。好ましくは、ペグ化は、アシル化反応又は反応性PEG分子（又は類似の反応性水溶性ポリマー）とのアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（CIE-CIO）アルコキシ又はアリールオキシポリエチレングリコール又はポリエチレングリコールマレイミドなどの他のタンパク質を誘導体化するために使用されているPEGの形態のいずれかを包含することが意図される。いくつかの実施形態では、ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は当該技術分野で既知であり、本明細書に記載の抗体に適用することができる。例えば、NishimuraらによるEP0154316及びIshikawaらによるEP0401384を参照されたい。

10

【0168】

本開示は、治療剤、ポリマー、検出可能な標識又は酵素にコンジュゲートされた、本明細書に記載のヒトモノクローナル抗体も包含する。一実施形態では、治療剤は、細胞傷害性剤である。一実施形態では、ポリマーは、PEGである。

20

【0169】

核酸

一実施形態では、本開示はまた、開示される抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションのポリペプチド鎖をコードする核酸配列を含むか、又は代替的にそれからなる、ポリ核酸を提供する。本開示はまた、開示された抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーションのポリペプチド鎖をコードするポリ核酸配列を有する核酸に相補的なポリ核酸に、例えば、上記で定義されるように、高ストリンジェント、又は代替的に、中若しくは低ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリ核酸を包含する。

30

【0170】

別の実施形態では、ポリ核酸が得られ、ポリ核酸の核酸配列は、当該技術分野で既知の任意の方法によって決定することができる。代替的に、抗体（抗体断片又はそのバリエーションを含むか、又は代替的にそれからなる分子を含む）をコードするポリ核酸は、好適な供給源からの核酸から生成される。特定の抗体をコードする核酸を含有するクローンは入手できないが、抗体分子の配列は既知であり、免疫グロブリンをコードする核酸は、特定の種のための天然若しくは最適化されたコドンで化学合成され得るか、又は好適な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリ、あるいは本発明の抗体を発現するように選択されたハイブリドーマ細胞などの、抗体を発現する任意の組織若しくは細胞から生成されたcDNAライブラリ又はそれらから単離された核酸、好ましくはポリA+RNA）から、配列の3'及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、又は例えば、抗体をコードするcDNAライブラリからのcDNAクローンを特定するために特定の遺伝子に特異的なオリゴ核酸プローブを使用するクローニングによって得ることが可能である。次いで、PCRによって生成された増幅した核酸は、当該技術分野で周知の任意の方法を使用して、複製可能なクローニングベクターにクローニングされ得る。

40

【0171】

いくつかの実施形態では、「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）及び適切な場合にはリボ核酸（RNA）若しくはその模倣体などであるポリ核酸又はオリゴ核酸を指す。この用語はまた、等価物として、核酸類似体から作製されたRNA又はDNAの

50

いずれかの類似体、並びに記載されている実施形態に適用可能であるとき、単一（センス又はアンチセンス）及び二本鎖ポリ核酸を含むことが理解されるべきである。用語は、天然に存在する核酸塩基、糖、及び共有結合ヌクレオシド間（骨格）結合から構成されるオリゴ核酸、並びに同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴ核酸を含む。かかる修飾又は置換オリゴ核酸は、例えば、増強された細胞取り込み、核酸標的に対する増強された親和性、及びヌクレアーゼの存在下での増加した安定性などの所望の特性のために、多くの場合、天然形態を超えて好ましい。

【0172】

当業者によって理解されるように、タンパク質又はペプチドをコードする核酸配列又は遺伝子の断片又は誘導体は、依然として、完全な野生型遺伝子又は配列と同じ手段で機能することができる。同様に、核酸配列の形態は、野生型配列に対して変異を有することができ、それにもかかわらず、タンパク質若しくはペプチド、又はそれらの断片をコードし、これらの変異にもかかわらず、同じ生物学的効果を示す野生型機能を保持する。これらの各々は、本発明の別々の実施形態を表す。

【0173】

核酸は、当該技術分野で周知のものなど、任意の合成又は組換えプロセスによって產生することができる。核酸は、当該技術分野で既知の技法によって、生物物理学的又は生物学的特性を変化させるように更に改変することができる。例えば、核酸は、ヌクレアーゼに対するその安定性を増加させるため（例えば、「エンドキャッピング」）に、又はコドン最適化によって発現レベルを増加させるために、又はその親油性、溶解性、若しくは相補的配列との結合親和性を改善するために改変することができる。

【0174】

特定の目的を達成するように核酸を改変するための方法は、当該技術分野、例えば、Sambrook et al. (1989) に公表されている。更に、本発明の核酸配列は、目的のタンパク質をコードしていない核酸配列の1つ以上の部分を含むことができる。本発明は更に、本明細書に記載される配列によってコードされるものと同様のタンパク質をコードするが、遺伝子コードの縮重又は対立遺伝子変異（アミノ酸の変化をもたらし得るか、又はもたらし得ない、種集団に天然に存在する塩基変化）に起因して、それらのコドン配列に関して異なるDNA配列を提供し、本明細書に記載される本発明のタンパク質もコードし得る。点変異によってか、又は誘導された改変（挿入、欠失、及び置換を含む）によって引き起こされるDNA配列でコードされるポリペプチドの活性、半減期、又は産生を増強する、DNA配列における変異もまた、本発明に包含される。

【0175】

本明細書に提供される抗体又は抗原結合断片をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴ核酸プローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定される。単離されると、DNAは、発現ベクターに配置され得、次いで、トランスフェクトしなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないE. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、酵母細胞、又は骨髓腫細胞などの宿主細胞をトランスフェクトして、組換え宿主細胞における抗体の合成を得る。抗体の組換え産生は、以下でより詳細に記載される。

【0176】

一実施形態では、scFv Mut-*gy1*をコードする核酸分子は、配列番号3のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号2のヌクレオチド配列を含む。

【0177】

一実施形態では、核酸分子は、配列番号5のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、軽鎖をコードする核酸配列は、配列番号4のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号7のアミノ酸配列を含むVL FR1をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、VL FR1をコー

ドする核酸配列は、配列番号 6 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V L C D R 1 をコードする核酸配列は、配列番号 8 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む V L F R 2 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V L F R 2 をコードする核酸配列は、配列番号 10 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V L C D R 2 をコードする核酸配列は、配列番号 12 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V L F R 3 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V L F R 3 をコードする核酸配列は、配列番号 14 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V L C D R 3 をコードする核酸配列は、配列番号 16 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V L F R 4 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V L F R 4 をコードする核酸配列は、配列番号 18 のヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0178】

一実施形態では、核酸分子は、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む重鎖をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、重鎖をコードする核酸配列は、配列番号 20 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H F R 1 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V H F R 1 をコードする核酸配列は、配列番号 22 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V H C D R 1 をコードする核酸配列は、配列番号 24 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む V H F R 2 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V H F R 2 をコードする核酸配列は、配列番号 26 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V H C D R 2 をコードする核酸配列は、配列番号 28 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H F R 3 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V H F R 3 をコードする核酸配列は、配列番号 30 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V H C D R 3 をコードする核酸配列は、配列番号 32 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 をコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、V H F R 4 をコードする核酸配列は、配列番号 34 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーをコードする核酸配列を含む。例えば、一実施形態では、s c F v リンカーをコードする核酸配列は、配列番号 36 のヌクレオチド配列を含む。

【0179】

例えば、一実施形態では、核酸分子は、M u t - g y 1 をコードする。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む M u t - g y 1 をコードする。例えば、一実施形態では、M u t - g y 1 をコードする核酸配列は、配列番号 2 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 をコードする核酸分子は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードするヌクレオチド配列と、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む重鎖をコードするヌクレオチド配列と、を含む。例えば、一実施形態では、軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 4 のヌクレオチド配列を含み、重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 20 のヌクレオチド配列を含む。

【0180】

一実施形態では、Mut-gy1をコードする核酸分子は、配列番号7のアミノ酸配列を含むVL FR1をコードするヌクレオチド配列、配列番号9のアミノ酸配列を含むVLC DR1をコードするヌクレオチド配列、配列番号11のアミノ酸配列を含むVL FR2をコードするヌクレオチド配列、配列番号13のアミノ酸配列を含むVLC DR2をコードするヌクレオチド配列、配列番号15のアミノ酸配列を含むVL FR3をコードするヌクレオチド配列、配列番号17のアミノ酸配列を含むVLC DR3をコードするヌクレオチド配列、配列番号19のアミノ酸配列を含むVL FR4をコードするヌクレオチド配列、配列番号23のアミノ酸配列を含むVH FR1をコードするヌクレオチド配列、配列番号25のアミノ酸配列を含むVH CDR1をコードするヌクレオチド配列、配列番号27のアミノ酸配列を含むVH FR2をコードするヌクレオチド配列、配列番号29のアミノ酸配列を含むVH CDR2をコードするヌクレオチド配列、配列番号31のアミノ酸配列を含むVH FR3をコードするヌクレオチド配列、配列番号33のアミノ酸配列を含むVH CDR3をコードするヌクレオチド配列、配列番号35のアミノ酸配列を含むVH FR4をコードするヌクレオチド配列、及び／又は配列番号37のアミノ酸配列を含むscFvリンカーをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0181】

例えば、一実施形態では、VL FR1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号6のヌクレオチド配列を含み、VLC DR1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号8のヌクレオチド配列を含み、VL FR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、VLC DR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号12のヌクレオチド配列を含み、VL FR3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号14のヌクレオチド配列を含み、VLC DR3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号16のヌクレオチド配列を含み、VL FR4をコードするヌクレオチド配列は、配列番号18のヌクレオチド配列を含み、VH FR1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号22のヌクレオチド配列を含み、VH CDR1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号24のヌクレオチド配列を含み、VH FR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号26のヌクレオチド配列を含み、VH CDR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号28のヌクレオチド配列を含み、VH FR3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号30のヌクレオチド配列を含み、VH CDR3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号32のヌクレオチド配列を含み、VH FR4をコードするヌクレオチド配列は、配列番号34のヌクレオチド配列を含み、及び／又はscFvリンカーをコードするヌクレオチド配列は、配列番号36のヌクレオチド配列を含む。

【0182】

一実施形態では、核酸分子は、1つ以上の変異を含む抗体又はその抗原結合断片をコードする。例えば、一実施形態では、核酸分子は、配列番号39のアミノ酸配列を含むVL FR2をコードするヌクレオチド配列を含み、配列番号39は、配列番号11に対してV→A点変異を含む。例えば、一実施形態では、変異体VL FR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号38のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号41のアミノ酸配列を含むVLC DR2をコードするヌクレオチド配列を含み、配列番号41は、配列番号13に対してG→E点変異を含む。例えば、一実施形態では、変異体VLC DR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号40のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号43のアミノ酸配列を含むVL FR4をコードするヌクレオチド配列を含み、配列番号43は、配列番号19に対してV→A点変異を含む。例えば、一実施形態では、変異体VL FR4をコードするヌクレオチド配列は、配列番号42のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号45のアミノ酸配列を含むVH CDR1をコードするヌクレオチド配列を含み、配列番号45は、配列番号25に対してS→F点変異を含む。例えば、一実施形態では、変異体VH CDR1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号44のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号47のアミノ酸配列を含むVH FR3をコードするヌクレオチド配列を含み、配列番号47は、配列番号31に対してI→V点変

異を含む。例えば、一実施形態では、変異体 V H F R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 46 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 49 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 をコードするヌクレオチド配列を含み、配列番号 49 は、配列番号 33 に対して D → G 点変異を含む。例えば、一実施形態では、変異体 V H C D R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 48 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 51 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 をコードするヌクレオチド配列を含み、配列番号 51 は、配列番号 35 に対して G → E 点変異を含む。例えば、一実施形態では、変異体 V H F R 4 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 50 のヌクレオチド配列を含む。

【0183】

一実施形態では、核酸分子は、本明細書で M u t - g y 1 - s t として示される s c F v を含む抗体断片をコードする。一実施形態では、M u t - g y 1 - s t をコードする核酸分子は、配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V L F R 2 をコードするヌクレオチド配列と、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 をコードするヌクレオチド配列と、配列番号 51 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 をコードするヌクレオチド配列と、を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - s t をコードする核酸分子は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V L F R 1 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V L F R 2 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V L F R 3 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V L F R 4 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H F R 1 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む V H F R 2 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H F R 3 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 51 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 をコードするヌクレオチド配列、及び／又は配列番号 37 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0184】

一実施形態では、V L F R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 6 のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 8 のヌクレオチド配列を含み、V L F R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 38 のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 12 のヌクレオチド配列を含み、V L F R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 14 のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 16 のヌクレオチド配列を含み、V L F R 4 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 18 のヌクレオチド配列を含み、V H F R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 22 のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 44 のヌクレオチド配列を含み、V H F R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 26 のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 28 のヌクレオチド配列を含み、V H F R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 30 のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 32 のヌクレオチド配列を含み、V H F R 4 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 50 のヌクレオチド配列を含み、及び／又は s c F v リンカーをコードするヌクレオチド配列は、配列番号 36 のヌクレオチド配列を含む。

【0185】

例えば、一実施形態では、組成物は、M u t - g y 1 - 2 として本明細書に示される s

10

20

30

40

50

c F vを含む抗体断片をコードする核酸分子を含む。一実施形態では、M u t - g y 1 - 2をコードする核酸分子は、配列番号41のアミノ酸配列を含むV L C D R 2をコードするヌクレオチド配列、配列番号43のアミノ酸配列を含むV L F R 4をコードするヌクレオチド配列、配列番号45のアミノ酸配列を含むV H C D R 1をコードするヌクレオチド配列、及び／又は配列番号47のアミノ酸配列を含むV H F R 3をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0186】

一実施形態では、M u t - g y 1 - 2をコードする核酸分子は、配列番号7のアミノ酸配列を含むV L F R 1をコードするヌクレオチド配列、配列番号9のアミノ酸配列を含むV L C D R 1をコードするヌクレオチド配列、配列番号11のアミノ酸配列を含むV L F R 2をコードするヌクレオチド配列、配列番号41のアミノ酸配列を含むV L C D R 2をコードするヌクレオチド配列、配列番号15のアミノ酸配列を含むV L F R 3をコードするヌクレオチド配列、配列番号17のアミノ酸配列を含むV L C D R 3をコードするヌクレオチド配列、配列番号43のアミノ酸配列を含むV L F R 4をコードするヌクレオチド配列、配列番号23のアミノ酸配列を含むV H F R 1をコードするヌクレオチド配列、配列番号45のアミノ酸配列を含むV H C D R 1をコードするヌクレオチド配列、配列番号27のアミノ酸配列を含むV H F R 2をコードするヌクレオチド配列、配列番号29のアミノ酸配列を含むV H C D R 2をコードするヌクレオチド配列、配列番号47のアミノ酸配列を含むV H F R 3をコードするヌクレオチド配列、配列番号33のアミノ酸配列を含むV H C D R 3をコードするヌクレオチド配列、配列番号35のアミノ酸配列を含むV H F R 4をコードするヌクレオチド配列、及び／又は配列番号37のアミノ酸配列を含むs c F vリンカーをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

20

【0187】

一実施形態では、V L F R 1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号6のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号8のヌクレオチド配列を含み、V L F R 2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号10のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号40のヌクレオチド配列を含み、V L F R 3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号14のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号16のヌクレオチド配列を含み、V L F R 4をコードするヌクレオチド配列は、配列番号42のヌクレオチド配列を含み、V H F R 1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号22のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 1をコードするヌクレオチド配列は、配列番号44のヌクレオチド配列を含み、V H F R 2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号26のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号28のヌクレオチド配列を含み、V H F R 3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号46のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 3をコードするヌクレオチド配列は、配列番号32のヌクレオチド配列を含み、V H F R 4をコードするヌクレオチド配列は、配列番号34のヌクレオチド配列を含み、及び／又はs c F vリンカーをコードするヌクレオチド配列は、配列番号36のヌクレオチド配列を含む。

30

40

【0188】

一実施形態では、核酸分子は、M u t - g y 1 - 3として本明細書に示されるs c F vを含む抗体断片をコードする。一実施形態では、M u t - g y 1 - 3をコードする核酸分子は、配列番号45のアミノ酸配列を含むV H C D R 1をコードするヌクレオチド配列、及び配列番号49のアミノ酸配列を含むV H C D R 3をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、M u t - g y 1は、配列番号7のアミノ酸配列を含むV L F R 1をコードするヌクレオチド配列、配列番号9のアミノ酸配列を含むV L C D R 1をコードするヌクレオチド配列、配列番号11のアミノ酸配列を含むV L F R 2をコードするヌクレオチド配列、配列番号13のアミノ酸配列を含むV L C D R 2をコードするヌクレオチド配列、配列番号15のアミノ酸配列を含むV L F R 3をコードするヌクレオチド配列、配列番号17のアミノ酸配列を含むV L C D R 3をコードするヌクレオチ

50

ド配列、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V L F R 4 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H F R 1 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 27 のアミノ酸配列を含む V H F R 2 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H F R 3 をコードするヌクレオチド配列、配列番号 49 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 をコードするヌクレオチド配列、及び／又は配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V H F R 4 をコードするヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、核酸分子は、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む s c F v リンカーをコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0189】

一実施形態では、V L F R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 6 のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 8 のヌクレオチド配列を含み、V L F R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 10 のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 12 のヌクレオチド配列を含み、V L F R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 14 のヌクレオチド配列を含み、V L C D R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 16 のヌクレオチド配列を含み、V L F R 4 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 18 のヌクレオチド配列を含み、V H F R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 22 のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 1 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 44 のヌクレオチド配列を含み、V H F R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 26 のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 2 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 28 のヌクレオチド配列を含み、V H F R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 30 のヌクレオチド配列を含み、V H C D R 3 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 48 のヌクレオチド配列を含み、かつ／又は V H F R 4 をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 34 のヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、s c F v リンカーをコードするヌクレオチド配列は、配列番号 36 のヌクレオチド配列を含む。

20

【0190】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、P S M A b 又はそのポリペプチド鎖をコードする。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 68 のアミノ酸配列を含む重鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、シグナルペプチドを有する重鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、シグナルペプチドを有する重鎖は、配列番号 53 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 55 のアミノ酸配列を含む重鎖シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 57 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 59 の重鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 69 のアミノ酸配列を含む軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、シグナルペプチドを有する軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含み、シグナルペプチドを有する軽鎖は、配列番号 61 のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 63 のアミノ酸配列を含む軽鎖シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 65 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、核酸分子は、配列番号 67 の軽鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、シグナルペプチドを有する重鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 52 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、重鎖シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号 54 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 56 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、重鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 58 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、シグナルペプチドを有

30

40

50

する軽鎖をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 60 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、軽鎖シグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列は、配列番号 62 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 64 のヌクレオチド配列を含む。一実施形態では、軽鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列は、配列番号 66 のヌクレオチド配列を含む。

【0191】

いくつかの実施形態では、核酸分子は、本明細書に記載の 1 つ以上のヌクレオチド配列と同一性を有するヌクレオチド配列を含む。例えば、いくつかの実施形態では、核酸分子は、本明細書に記載のヌクレオチド配列に対して 70 % 以上、75 % 以上、80 % 以上、82 % 以上、85 % 以上、87 % 以上、90 % 以上、91 % 以上、92 % 以上、93 % 以上、94 % 以上、95 % 以上、96 % 以上、97 % 以上、98 % 以上、99 % 以上、又は 99.5 % 以上の同一性を有するヌクレオチド配列を含む。

10

【0192】

別の態様では、本開示はまた、様々なタンパク質発現系を使用して、抗 P S M A 抗体又はその抗原結合断片の組換えタンパク質を発現又は産生する方法を提供する。

【0193】

一実施形態では、本発明はまた、抗体又は抗原結合断片をコードする核酸分子が、インビトロ、エクスピボ、又はインビボで組換え DNA 技法の手段によって導入されている形質転換細胞及びその子孫を提供する。真核生物又は原核生物の形質転換細胞を使用して、精製のための、又は腫瘍の診断若しくは治療などの様々な目的のためのインサイツ若しくは分泌的発現のための組換え抗体又はその抗原結合断片を産生することができる。形質転換細胞を増殖させることができ、導入された核酸が転写されるか、又はコードされたタンパク質が発現される。複製中に発生する変異があり得るため、子孫細胞は親細胞と同一ではない可能性があることが理解される。形質転換細胞としては、細菌、真菌、植物、昆虫、及び動物（例えば、ヒトを含む哺乳動物）細胞などの原核生物細胞及び真核生物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。細胞は、培養に、エクスピボで細胞、組織、若しくは器官に存在し得、又は対象に存在し得る。

20

【0194】

典型的には、細胞形質転換は、ベクターを用いる。「ベクター」という用語は、例えば、プラスミド、ウイルスベクターなどのウイルス、あるいは遺伝子操作のために核酸の挿入若しくは組み込みによって操作することができるか（すなわち、「クローニングベクター」）、又は挿入されたポリ核酸を転写若しくは翻訳するために使用することができる（すなわち、「発現ベクター」）、当該技術分野で既知の他のビヒクルを指す。かかるベクターは、発現制御エレメントと操作可能に連結された抗体をコードする核酸を含む、核酸を導入し、コードされたタンパク質をインビトロ（例えば、溶液中又は固相中）、細胞中、又はインビボで発現させるのに有用である。

30

【0195】

一実施形態では、発現ベクターは、従来技法によって宿主細胞に移入され、トランスフェクトされた細胞は、次いで、従来技法によって培養されて、本発明の抗体又は抗原結合断片を産生する。したがって、本発明は、異種プロモーターに操作可能に連結された、本発明の抗体（例えば、全抗体、その重鎖若しくは軽鎖、又はその一部、あるいは単鎖抗体、又はその断片若しくはバリエーション）をコードするポリ核酸を含有する宿主細胞を含む。他の実施形態では、抗体分子全体の発現について、重鎖及び軽鎖の両方をコードするベクターが、免疫グロブリン分子全体の発現のために宿主細胞内で共発現される。

40

【0196】

様々な宿主発現ベクター系が、本発明の抗体分子を発現するために利用され得る。かかる宿主発現系は、目的のコード配列が産生され、その後精製され得るビヒクルを表すが、適切な核酸コード配列で形質転換又はトランスフェクトされたときに、インサイツで本発明の抗体分子を発現し得る細胞も表す。これらには、抗体断片又はそのバリエーション（単鎖抗体）を発現するように操作されたバクテリオファージ粒子、抗体コード配列を含む組換

50

えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換させた細菌（例えば、*E. coli*、*B. subtilis*）などの微生物；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、*Saccharomyces*、*Pichia*）；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）で感染させた昆虫細胞系；組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）で感染させたか、若しくは抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換させた植物細胞系；あるいは哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）若しくは哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター、CMVプロモーター、又はEF1 α プロモーター）に由来するプロモーターを含む組換え発現構築物を有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3、NS0細胞）が含まれるが、これらに限定されない。好ましくは、*Escherichia coli*、より好ましくは真核生物細胞などの細菌細胞が、特に組換え抗体分子全体の発現では、組換え抗体分子の発現のために使用される。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）などの哺乳動物細胞は、ヒトサイトメガロウイルスからの主要中間早期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと併せて、抗体のための有効な発現系である（Foecking et al., Gene 45:101 (1986)、Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)、Bebbington et al., Bio/Techniques 10:169 (1992)、Keen and Hale, Cytotechnology 18:207 (1996)）。これらの参考文献は、それらの全体が本明細書に参照により組み込まれる。

【0197】

細胞を形質転換するために使用されるベクター又は宿主発現ベクターは、一般に、細胞における増殖のための少なくとも複製起点を含む。ベクター内に存在する、本明細書に示される発現制御エレメントを含む制御エレメントは、転写及び翻訳を容易にするために含まれる。「発現制御エレメント」という用語は、存在が発現に影響を及ぼすことができる1つ以上の構成要素を最小限含むことが意図され、プロモーター又はエンハンサー以外の、又はそれらに加えて構成要素、例えば、リーダー配列及び融合パートナー配列、多重遺伝子又はポリシストロニックなメッセージの作製のための内部リボソーム結合部位（IRES）エレメント、イントロンのためのスプライシングシグナル、mRNAのフレーム内翻訳を可能にする遺伝子の正しいリーディングフレームの維持、目的の遺伝子の転写物の適切なポリアダニル化を提供するためのポリアダニル化シグナル、停止コドンなどを含むことができる。

【0198】

ベクターは、選択マーカーを含むことができる。当該技術分野で知られているように、「選択マーカー」は、遺伝子を含有する細胞の選択を可能にする遺伝子を意味する。「陽性選択」とは、選択マーカーを含有する細胞のみが、陽性選択に対する曝露で生存するプロセスを指す。薬物耐性は、陽性選択マーカーの一例であり、マーカーを含有する細胞は、選択薬物を含有する培地中で生存し、マーカーを含有しない細胞は死滅する。かかるマーカーには、とりわけ、G418に対する耐性を付与するneo、ヒグロマイシンに対する耐性を付与するhygr、又はピューロマイシンに対する耐性を付与するpuroなどの薬物耐性遺伝子が含まれる。他の陽性選択マーカー遺伝子には、マーカーを含有する細胞の識別又はスクリーニングを可能にする遺伝子が含まれる。これらの遺伝子には、とりわけ、蛍光タンパク質（GFP）の遺伝子、lacZ遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、及びCD8などの表面マーカーが含まれる。

【0199】

ベクターは、陰性選択マーカーを含むことができる。「陰性選択」とは、陰性選択マーカーを含有する細胞が、適切な陰性選択剤に曝露されると殺滅されるプロセスを指す。例えば、単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ（HSV-tk）遺伝子を含む細胞（W

10

20

30

40

50

igler et al., Cell 11:223 (1977)) は、薬物ガンシクロビル (GANC) に感受性である。同様に、gpt 遺伝子は、細胞を 6-チオキサンチンに対して感受性にする。

【0200】

哺乳動物発現系は、インビボ及びエクスビボ発現のために特異的に設計されたベクターを更に含む。かかる系には、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター (米国特許第 5, 604, 090 号) が含まれる。AAV ベクターは、ヒト及びマウスにおける第 IX 因子の発現を、治療効果のために十分なレベルで提供することが既に示されている (Kay et al., Nat. Genet. 24:257 (2000)、Nakai et al., Blood 91:4600 (1998))。アデノウイルスベクター (米国特許第 5, 700, 470 号、同第 5, 731, 172 号、及び同第 5, 928, 944 号)、単純ヘルペスウイルスベクター (米国特許第 5, 501, 979 号)、及びレトロウイルス (例えば、レンチウイルスベクターは、分裂細胞並びに非分裂細胞及び泡沫状ウイルスを感染させるのに有用である) ベクター (米国特許第 5, 624, 820 号、同第 5, 693, 508 号、同第 5, 665, 577 号、同第 6, 013, 516 号、及び同第 5, 674, 703 号、並びに WIPO 公開第 92/05266 号及び同第 92/14829 号)、並びにパピローマウイルスベクター (例えば、ヒト及びウシパピローマウイルス) は全て、遺伝子療法に用いられている (米国特許第 5, 719, 054 号)。ベクターにはまた、サイトメガロウイルス (CMV) ベースのベクターが含まれる (米国特許第 5, 561, 063 号)。遺伝子を腸管の細胞に効率的に送達するベクターが開発されており、また使用され得る (例えば、米国特許第 5, 821, 235 号、同第 5, 786, 340 号、及び同第 6, 110, 456 号を参照)。酵母では、例えば、相同組換えを介して、外来核酸配列の染色体への組み込みを容易にするベクターが、当該技術分野で既知であり、使用することができる。酵母人工染色体 (YAC) は、典型的には、挿入される核酸がより通常のベクターにとって大きすぎる (例えば、約 12 kb 超) 場合に使用される。

【0201】

一実施形態では、本発明で使用するためのファージミドベクターには、本発明の抗体／抗体テンプレート／FR ライブラリの産生に好適な当該技術分野で利用可能な任意のものが含まれ、ファージミドベクター pCB04、pIT1、pIT2、CANTAB6、pComb3HS を含む。糸状ベクター及びファージミド構築の方法は、例えば、米国特許第 6, 054, 312 号及び米国特許第 6, 803, 230 号に記載されており、各々が参照により本明細書に組み込まれる。細胞質バクテリオファージ又は溶解ファージとして知られる非糸状バクテリオファージベクターを含むバクテリオファージディスプレイシステムは、例えば、米国特許第 5, 766, 905 号に記載されるように利用することもでき、参照により本明細書に組み込まれる。

【0202】

本発明で使用するのに好適な細菌発現構築物としては、市販の発現構築物である、pCAL、pUC、pET、pETBlue (商標) (Novagen)、pBAD、pLEX、pTrcHis2、pSE280、pSE380、pSE420 (Invitrogen)、pKK223-2 (Clontech)、pTrc99A、pKK223-3、pRIT2T、pMC1871、pEZZ18 (Pharmacia)、pBluescript II SK (Stratagene)、pALTER-Ex1、pALTER-Ex2、pGEMEX (Promega)、pFive (MBI)、pQE (Qiagen)、及びそれらの誘導体、並びに当該技術分野で既知の他のものが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、構築物はまた、ウイルス、プラスミド、バクミド、ファージミド、コスミド、又はバクテリオファージを含み得る。

【0203】

核酸を含む、様々な組成物を細胞に導入するためのリポソームの使用は、当業者に既知である (例えば、米国特許第 4, 844, 904 号、同第 5, 000, 959 号、同第 4, 863, 740 号、及び同第 4, 975, 282 号を参照)。WO94/20078 及

び米国特許第 6, 096, 291 号に記載された、天然ポリマー、又は天然ポリマーの誘導体若しくは加水分解物を含む担体は、ポリペプチド及びポリ核酸などの分子の粘膜送達に好適である。遺伝子療法に有用なピペラジンベースの両親媒性カチオン性脂質もまた知られている（例えば、米国特許第 5, 861, 397 号を参照）。カチオン性脂質系も知られている（例えば、米国特許第 5, 459, 127 号を参照）。したがって、インビトロ、インビボ、及びエクスビボでの細胞又は組織へのウイルスベクター及び非ウイルスベクターの送達手段が含まれる。

【0204】

一実施形態では、核酸配列は、発現制御配列の機能を確実にするために、「操作可能に連結」、すなわち、配置することができる。これらの発現構築物は、典型的には、エピソームとして、又は細胞の染色体 DNA の不可欠な部分としてのいずれかで細胞において複製可能であり、発現に用いられるそれぞれの原核生物株における適切な複製起点を含有し得る。一般に、発現構築物は、テトラサイクリン耐性、アンピシリン耐性、カナマイシン耐性、又はクロルマフェニコール耐性などの選択マーカーを含有し、所望の核酸配列でトランスフェクトされたこれらの細菌細胞の検出及び／又は選択を容易にする（例えば、米国特許第 4, 704, 362 号を参照）。しかしながら、これらのマーカーは排除的ではなく、当業者に知られているように、他の多くのマーカーが用いられ得る。いくつかの実施形態では、発現構築物は、陽性及び陰性選択マーカーの両方を含有する。

【0205】

同様に、レポーター遺伝子が、転写産物の特定を容易にするために、発現構築物内に組み込まれ得る。したがって、本発明の一実施形態では、利用されるレポーター遺伝子は、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ルシフェラーゼ、及び蛍光タンパク質からなる群から選択される。

【0206】

原核生物プロモーター配列は、コードしたポリ核酸配列の発現を調節し、本発明のいくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドをコードするポリ核酸に操作可能に連結される。本発明の追加の実施形態では、これらのプロモーターは、構成的又は誘導性のいずれかであり、本発明のポリペプチドの高レベル及び低レベルの発現の手段を、いくつかの実施形態では、本発明の複数のポリペプチドの調節された発現のために提供し、いくつかの実施形態では、融合タンパク質として発現される。

【0207】

T7 プロモーター系、ラクトースプロモーター系、チプトファン (tryptophan) (Trp) プロモーター系、Trc / Tac プロモーター系、ベクターラクタマーゼプロモーター系、tetA プロモーター系、アラビノース調節プロモーター系、ファージ T5 プロモーター、又はファージラムダからのプロモーター系を含む、多くの周知の細菌プロモーターが用いられ得、他のものも同様であり、本発明の実施形態を含む。プロモーターは、典型的には、任意選択でオペレーター配列を用いて発現を制御し、例えば、転写及び翻訳を開始及び完了するために、リボソーム結合部位配列を含み得る。追加の実施形態により、ベクターはまた、発現制御配列、プロモーターの転写活性を調節し得るエンハンサー、プロモーターに隣接するインサートのクローニングを容易にする適切な制限部位、及び RNA スプライス部位、ポリアデニル化部位、転写終結配列などの他の必要な情報処理部位、並びに挿入された核酸の発現を容易にし得る任意の他の配列を含有し得る。

【0208】

別の実施形態では、本発明は、治療、阻害、又は予防における、本明細書に記載されるポリ核酸、ベクター、抗体、及び／若しくはその断片、並びに／又はそれを含む組成物の使用の方法を含む。

【0209】

P S M A 標的化抗体薬物コンジュゲート

一実施形態では、本発明は、化学療法剤、薬物、成長阻害剤、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、若しくは動物起源の酵素的に活性な毒素、又はそれらの断片）、又は放射性同

10

20

30

40

50

位体（すなわち、ラジオコンジュゲート）などの細胞傷害性剤にコンジュゲートした抗体又はその抗原結合断片を含む抗体－薬物コンジュゲート（ADC）を提供する。ある特定の実施形態では、薬物は、メイタンシノイド、アウリスタチン、ドラスタチン、及びカリケアミシンなどのチューブリン阻害剤及びDNA切断試薬を含むが、これらに限定されない。別の実施形態では、本発明は、ADCを使用する方法を更に提供する。一態様では、ADCは、細胞傷害性剤又は検出可能な薬剤に共有結合した上記PSMA抗体又は抗体断片のいずれかを含む。

【0210】

細胞傷害性剤又は細胞抑制剤、すなわちがんの治療において腫瘍細胞を殺滅又は阻害する薬物の局所送達のための抗体－薬物コンジュゲートの使用（Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614、Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172、米国特許第4,975,278号）は、薬物部分の腫瘍への標的化送達、及びそこでの細胞内蓄積を可能にするが、これらの非コンジュゲート薬物の全身投与は、正常細胞、並びに排除することが求められる腫瘍細胞に許容できないレベルの毒性をもたらし得る（Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05、Thorpe, (1985) “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical applications*, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506）。最小の毒性で最大の有効性が、それによって求められる。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体の両方が、これらの戦略に有用であると報告されている（Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87）。これらの方法で使用される薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、及びビンデシンが含まれる（Rowland et al., (1986) 同上）。抗体－毒素コンジュゲートで 사용되는毒素としては、ジフテリア毒素などの細菌毒素、リシンなどの植物毒素、ゲルダナマイシン（Mandler et al. (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92 (19):1573-1581、Mandler et al. (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028、Mandler et al. (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791）、メイタンシノイド（EP1391213、Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623）、及びカリケアミシン（Lode et al. (1998) *Cancer Res.* 58:2928、Hinman et al. (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342）などの小分子毒素が挙げられる。毒素は、チューブリン結合、DNA結合、又はトポイソメラーゼ阻害を含むメカニズムによって、それらの細胞傷害性及び細胞抑制効果に影響を及ぼし得る。いくつかの細胞傷害性薬物は、大きな抗体又はタンパク質受容体リガンドにコンジュゲートされたとき、不活性又はより低い活性である傾向にある。

【0211】

抗体－薬物コンジュゲートの例としては、正常及び悪性Bリンパ球の表面に見出されるCD20抗原に対して指向されるネズミIgG1カップモノクローナル抗体と、チオ尿素リンカーキレーターによって結合された111In又は90Y放射性同位体と、から構成される抗体－放射性同位体コンジュゲートである、ZEVALIN（登録商標）（イブリツモマブチウキセタン、Biogen/Idec）が挙げられる（Wiseman et al. (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27 (7):766-77、Wiseman et al. (2002) *Blood* 99 (12):4336-42、Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20 (10):2

453-63、Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20 (15) : 3262-69)。

【0212】

追加的に、カリケアミシンに連結したヒトCD33抗体から構成される抗体薬物コンジュゲートであるMYLOTARG (商標) (ゲムツズマブオゾガマイシン、Wyeth Pharmaceuticals) は、注射による急性骨髄性白血病の治療のために2000年に承認された (Drugs of the Future (2000) 25 (7) : 686、米国特許第4,970,198号、同第5,079,233号、同第5,585,089号、同第5,606,040号、同第5,693,762、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,773,001号)。

10

【0213】

最後に、ドラスタチンの合成類似体であるモノメチルアウリスタチンE (MMAE) などのアウリスタチンペプチドは、キメラモノクローナル抗体cBR96 (がん腫でルイスYに特異的) 及びcAC10 (血液悪性腫瘍でCD30に特異的) にコンジュゲートされた (Doronina et al. (2003) Nature Biotechnol. 21 (7) : 778-784)。cAC10は、治療開発下にある。

【0214】

更に、ADCの生成に有用な化学療法剤が本明細書に記載される。使用することができる酵素的に活性な毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖 (Pseudomonas aeruginosaから)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファーサルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質 (PAPI、PAPII、及びPAP-S)、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、リストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日に公開されたWO93/21232を参照されたい。ラジオコンジュゲートされた抗体の産生には、様々な放射性核種が利用可能である。例としては、212Bi、131I、131In、90Y、及び186Reが挙げられる。抗体と細胞傷害性剤とのコンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール) プロピオネート (SPDP)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二官能性誘導体 (ジメチルアジピミデートHClなど)、活性エステル (スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド (グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物 (ビス (p-アジドベンゾイル) ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体 (ビス- (p-ジアゾニウムベンゾイル) -エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート (トルエン2,6-ジイソシアネートなど)、及びビス活性フッ素化合物 (1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど) などの様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitte et al (1987) Science, 238:1098に記載されるように調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸 (MX-DTPA) は、放射性核酸の抗体とのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である (WO94/11026)。

20

30

40

【0215】

抗体と、カリケアミシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウリスタチン、トリコテセン、及びCC1065などの1つ以上の小分子毒素、並びに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体とのコンジュゲートもまた、本明細書で企図される。

【0216】

メイタンシノイド：

メイタンシノイド薬物部分としての使用に好適なメイタンシン化合物は、当該技術分野で周知であり、既知の方法に従って天然源から単離することができ、遺伝子工学技法 (Yuet al. (2002) PNAS 99:7968-7973を参照) を使用して

50

產生されるか、又はメイタンシノール及びメイタンシノール類似体が既知の方法に従って合成的に調製される。

【0217】

例示的なメイタンシノイド薬物部分には、C-19-デクロロ（米国特許第4,256,746号）（アンサマイトシンP2の水素化アルミニウムリチウム還元によって調製された）、C-20-ヒドロキシ（又はC-20-デメチル）+/-C-19-デクロロ（米国特許第4,361,650号及び同第4,307,016号）（ストレプトマイセス若しくはアクチノマイセスを使用した脱メチル化、又はLAHを使用した脱塩素化によって調製された）、及びC-20-デメトキシ、C-20-アシルオキシ（-OCOR）、+/-デクロロ（米国特許第4,294,757号）（塩化アシルを使用したアシル化によって調製された）、並びに他の位置で修飾を有するものなどの修飾芳香族環を有するものが含まれる。

10

【0218】

例示的なメイタンシノイド薬物部分にはまた、C-9-SH（米国特許第4,424,219号）（メイタンシノールとH₂S又はP₂S₅との反応によって調製された）、C-14-アルコキシメチル（デメトキシ/CH₂OR）（米国特許第4,331,598号）、C-14-ヒドロキシメチル又はアシルオキシメチル（CH₂OH又はCH₂OAc）（米国特許第4,450,254号）（ノカルジアから調製された）、C-15-ヒドロキシ/アシルオキシ（米国特許第4,364,866号）（ストレプトマイセスによるメイタンシノールの変換によって調製された）、C-15-メトキシ（米国特許第4,313,946号及び同第4,315,929号）（*Trewia nudiflora*から単離された）、C-18-N-デメチル（米国特許第4,362,663号及び同第4,322,348号）（ストレプトマイセスによるメイタンシノールの脱メチル化によって調製された）、及び4,5-デオキシ（米国特許第4,371,533号）（メイタンシノールの三塩化チタン/LAH還元によって調製された）などの修飾を有するものが含まれる。

20

【0219】

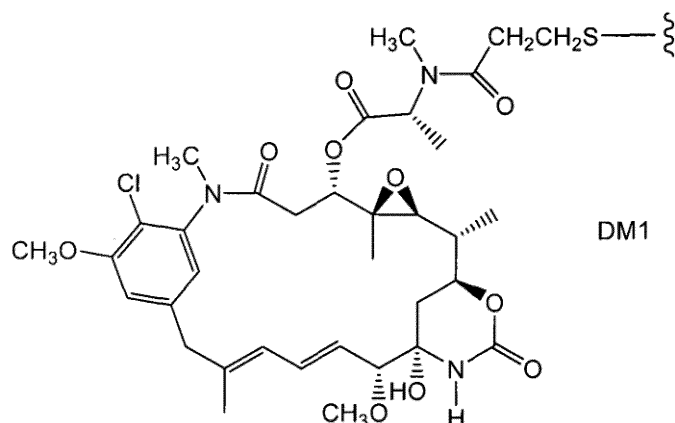
メイタンシノイドを含有するADC、それらを作製する方法、及びそれらの治療的使用は、例えば、米国特許第5,208,020号、同第5,416,064号、同第6,441,163号、及び欧州特許EP0425235B1に開示されており、これらの開示は参照により本明細書に明示的に組み込まれる。Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)は、ヒト結腸直腸がんに対して指向されたモノクローナル抗体C242に連結されたDM1と呼ばれるメイタンシノイドを含むADCを報告した。コンジュゲートは、培養した結腸がん細胞に対して高度に細胞傷害性であることが見出され、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示した。Charl et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)は、メイタンシノイドを、ヒト結腸がん細胞株で抗原に結合するネズミ抗体A7、又はHER-2/neuがん遺伝子に結合する別のネズミモノクローナル抗体TA.1にジスルフィドリンカーを介してコンジュゲートしたADCを報告している。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞傷害性を、細胞当たり3×10⁵個のHER-2表面抗原を発現するヒト乳がん細胞株SK-BR-3でインビトロ試験した。薬物コンジュゲートは、遊離メイタンシノイド薬物と同様の程度の細胞傷害性を達成し、これは、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることによって増加することができた。A7-メイタンシノイドコンジュゲートは、マウスにおける低い全身性細胞傷害性を示した。

30

40

【0220】

例示的なメイタンシノイド実施形態は、DM1である（式中、波線は、抗体-薬物コンジュゲートのリンカー（L）との共有結合を示す）。



10

【0221】

アウリスタチン及びドラスタチン：

いくつかの実施形態では、ADCは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチド類似体及び誘導体、アウリスタチンにコンジュゲートされた本発明の抗体を含む（米国特許第5,635,483号、同第5,780,588号）。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、並びに核分裂及び細胞分裂を妨げることが示されており（Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12) : 3580-3584）、抗がん（米国特許第5,663,149号）及び抗真菌活性（Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42 : 2961-2965）を有する。ドラスタチン又はアウリスタチン薬物部分は、ペプチド薬物部分のN（アミノ）末端又はC（カルボキシル）末端を介して抗体に結合され得る（WO02/088172）。

20

【0222】

例示的なアウリスタチン実施形態には、N末端連結したモノメチルアウリスタチン薬物部分DE及びDFが含まれ、Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented Mar. 28, 2004に公表され、米国特許公開第2005/0238649に記載されており、その開示は、その全体が参照により明示的に組み込まれる。

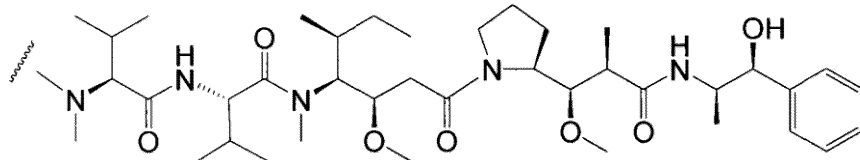
30

【0223】

様々なリンカー構成要素を有するMMAE及びMMAFを使用するADCが開示されている（US2005/0238649、US08968742）。

【0224】

例示的なアウリスタチン実施形態は、MMAEである（式中、波線は、抗体-薬物コンジュゲートのリンカー（L）との共有結合を示す）。

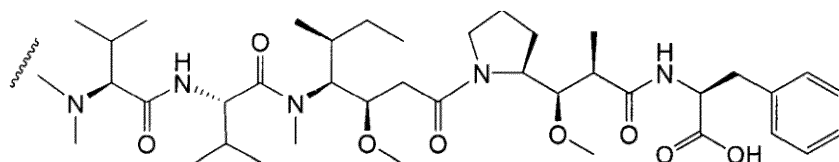


40

【0225】

別の例示的なアウリスタチン実施形態は、MMAFであり、波線は、抗体-薬物コンジュゲートのリンカー（L）との共有結合を示す（US2005/0238649）。

50



【0226】

典型的には、ペプチドベースの薬物部分は、2つ以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することによって調製することができる。かかるペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で周知である液相合成方法（E. Schröder and K. Lubke, "The Peptides," volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照）に従って調製することができる。アウリスタチン／ドラスタチン薬物部分は、米国特許第5,635,483号、米国特許第5,780,588号、Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465、Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277、Pettit, G. R., et al. Synthesis, 1996, 719-725、Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863、及びDoronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784の方法に従って調製され得る。

【0227】

カリケアミシン：

他の実施形態では、ADCは、1つ以上のカリケアミシン分子にコンジュゲートされた本発明の抗体を含む。抗生物質のカリケアミシンファミリーは、ピコモル以下濃度で二本鎖DNA切断を生じることができる。カリケアミシンファミリーのコンジュゲートの調製について、米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号、及び同第5,877,296号（全てAmerican Cyanamid Company）を参照されたい。使用され得るカリケアミシンの構造類似体としては、 γ 1I、 α 2I、 α 3I、N-アセチル- γ 1I、PSAG、及び θ 1Iが挙げられるが、これらに限定されない（Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)、Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)、及びAmerican Cyanamidの前述の米国特許）。抗体をコンジュゲートすることができる別の抗腫瘍剤は、抗葉酸であるQFAである。カリケアミシン及びQFAの両方は、細胞内作用部位を有し、形質膜を容易に通過しない。したがって、抗体媒介性内在化によるこれらの薬剤の細胞取り込みは、それらの細胞傷害性効果を大幅に増強する。

【0228】

他の細胞傷害性剤：

本発明の抗体にコンジュゲートすることができる他の抗腫瘍剤としては、BCNU、ストレプトゾシン、ビンクリスチン、及び5-フルオロウラシル、米国特許第5,053,394号、同第5,770,710号に記載されている集合的にLL-E33288複合体として知られている薬剤のファミリー、並びにエスペラミシン（米国特許第5,877,296号）が挙げられる。

【0229】

使用することができる酵素的に活性な毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖（Pseudomonas aeruginosaから）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファーサルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytola

ca americana タンパク質 (PAPI、PAPII、及び PAPS)、mordica charantia 阻害剤、クルシン、クロチン、sapaonarria officinalis 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、リストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日に公開された WO 93 / 21232 を参照されたい。

【0230】

本発明は、抗体と、ヌクレオチド分解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼ又はデオキシリボヌクレアーゼなどの DNA エンドヌクレアーゼ、DNase）との間に形成される ADC を更に企図する。

【0231】

腫瘍の選択的破壊のために、抗体は、高放射性原子を含み得る。様々な放射性同位体が、ラジオコンジュゲート抗体の産生に利用可能である。例として、At 211、I 131、I 125、Y 90、Re 186、Re 188、Sm 153、Bi 212、P 32、Pb 212、及び Lu の放射性同位体が挙げられる。コンジュゲートが検出のために使用される場合、それは、シンチグラフィ試験のための放射性原子、例えば、tc 99m 若しくは I 123、又は核磁気共鳴 (NMR) イメージング (磁気共鳴イメージング (MRI) としても知られる) のためのスピン標識、例えば、再びヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、若しくは鉄を含み得る。

【0232】

放射性標識又は他の標識は、既知の方法でコンジュゲートに組み込まれ得る。例えば、ペプチドは、生合成され得るか、又は水素の代わりに、例えば、フッ素-19を含む好適なアミノ酸前駆体を使用して化学アミノ酸合成によって合成され得る。tc 99m 又は I 123、Re 186、Re 188、及び In 111 などの標識は、ペプチドにおけるシステイン残基を介して結合させることができる。イットリウム-90は、リジン残基を介して結合することができる。IODOGEN 方法 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 は、ヨウ素-123を組み込むために使用することができる。「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatall, CRC Press 1989) は、他の方法を詳細に記載している。

【0233】

P SMA 標的化抗体-薬物コンジュゲート化合物:

本発明は、とりわけ、薬物の標的化送達のための抗体-薬物コンジュゲート化合物を提供する。本発明者らは、抗体-薬物コンジュゲート化合物が、P SMA を発現する細胞に対して強力な細胞傷害性及び／又は細胞抑制性活性を有するという発見をしている。抗体-薬物コンジュゲート化合物は、少なくとも1つの薬物単位に共有結合された抗体単位を含む。薬物単位は、直接的に、又はリンカー単位 (-LU-) を介して共有結合することができる。

【0234】

いくつかの実施形態では、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、以下の式:

$Ab - (LU - D)_p$

又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を有し、式中、

Ab は、抗体単位、例えば、P SMA Ab などの Mut- γ 1 又はその変異したバリエーション由来の本発明の完全抗体又はその抗原結合断片であり、

(LU - D) は、リンカー単位-薬物単位部分であり、式中、

LU- は、リンカー単位であり、

-D は、標的細胞に対して細胞抑制性又は細胞傷害性活性を有する薬物単位であり、

p は、1 ~ 20 の整数である。

【0235】

いくつかの実施形態では、p は、1 ~ 10、1 ~ 9、1 ~ 8、1 ~ 7、1 ~ 6、1 ~ 5

10

20

30

40

50

、1～4、1～3、又は1～2の範囲である。いくつかの実施形態では、 p は、2～10、2～9、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、又は2～3の範囲である。他の実施形態では、 p は、1、2、3、4、5、又は6である。いくつかの実施形態では、 p は、2又は4である。

【0236】

いくつかの実施形態では、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、以下の式：



又はその薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物を有し、式中、

A_b は、抗体単位、例えば、PSMA b などのMut- $g y 1$ 又はその変異したバリエーション由来の本発明の完全抗体又はその抗原結合断片であり、

— $A_a - W_w - Y_y$ —は、リンカー単位(LU)であり、式中、

— A —はストレッチャー単位であり、

a は、0又は1であり、

各— W —は、独立して、アミノ酸単位であり、

w は、0～12の整数であり、

— Y —は、自壊性スペーサー単位であり、

y は、0、1、又は2であり、

— D —は、標的細胞に対して細胞抑制性又は細胞傷害性活性を有する薬物単位であり、

p は、1～20の整数である。

【0237】

いくつかの実施形態では、 a は、0又は1であり、 w は、0又は1であり、 y は、0、1、又は2である。いくつかの実施形態では、 a は、0又は1であり、 w は、0又は1であり、 y は、0又は1である。いくつかの実施形態では、 p は、1～10、1～9、1～8、1～7、1～6、1～5、1～4、1～3、又は1～2の範囲である。いくつかの実施形態では、 p は、2～8、2～7、2～6、2～5、2～4、又は2～3の範囲である。他の実施形態では、 p は、1、2、3、4、5、又は6である。いくつかの実施形態では、 p は、2又は4である。いくつかの実施形態では、 w が、ゼロでない場合、 y は、1又は2である。いくつかの実施形態では、 w が、1～12である場合、 y は、1又は2である。いくつかの実施形態では、 w は、2～12であり、 y は、1又は2である。いくつかの実施形態では、 a は、1であり、 w 及び y は、0である。

【0238】

複数の抗体を含む組成物では、薬物負荷は、抗体当たりの平均薬物分子数である p によって表される。薬物負荷は、抗体当たり1～20薬物(D)の範囲であり得る。コンジュゲーション反応の調製における抗体当たりの平均薬物数は、質量分析、ELISAアッセイ、及びHPLCなどの従来手段によって特性評価され得る。 p に関する抗体-薬物コンジュゲートの定量的分布が決定され得る。いくつかの事例では、 p が他の薬物負荷を有する抗体-薬物コンジュゲートからの特定の値である場合、均一な抗体-薬物コンジュゲートの分離、精製、及び特性評価は、逆相HPLC又は電気泳動などの手段によって達成され得る。例示的な実施形態では、 p は、2～8である。

【0239】

抗体-薬物コンジュゲート化合物の生成は、当業者に既知である任意の技法によって達成することができる。簡潔に述べると、抗体-薬物コンジュゲート化合物は、抗体単位として本発明のMut- $g y 1$ 又はその変異したバリエーション由来の完全抗体又はその抗原結合断片と、薬物と、任意選択で、薬物及び結合剤を結合するリンカーと、を含む。好ましい実施形態では、抗体は、本明細書の他の箇所に記載されるように、Mut- $g y 1$ 又は点変異を有するそのバリエーションに由来する抗体又はその抗原結合断片である。薬物及び／又はリンカーの結合剤との共有結合のために、いくつかの異なる反応が利用可能である。これは、多くの場合、結合剤、例えば、抗体分子のアミノ酸残基の反応によって達成され、リジンのアミン基、グルタミン酸及びアスパラギン酸の遊離カルボン酸基、システインのスルフヒドリル基、及び芳香族アミノ酸の様々な部分が含まれる。共有結合の最も一般

10

20

30

40

50

的に使用される非特異的方法の1つは、化合物のカルボキシ（又はアミノ）基を抗体のアミノ（又はカルボキシ）基に連結するカルボジイミド反応である。加えて、ジアルデヒド又はイミドエステルなどの二官能性剤は、化合物のアミノ基を抗体分子のアミノ基に連結させるために使用されている。また、薬物の結合剤との結合に利用可能なのは、シッフ塩基反応である。この方法は、グリコール又はヒドロキシ基を含む薬物の過ヨウ素酸酸化を含み、したがって、次いで結合剤と反応するアルデヒドを形成する。結合は、結合剤のアミノ基とのシッフ塩基の形成を介して生じる。イソチオシアネートも、薬物を結合剤に共有結合するためのカップリング剤として使用することができる。他の技法は、当業者に既知であり、本発明の範囲内である。

【0240】

いくつかの実施形態では、リンカーの前駆体である中間体を、適切な条件下で薬物と反応させる。いくつかの実施形態では、反応性基は、薬物及び／又は中間体で使用される。薬物と中間体との間の反応の生成物、又は誘導体化薬物は、その後、Mutegy 1又はその変異体由来の完全抗体又はその抗原結合断片と、適切な条件下で反応させる。

【0241】

PSMA 標的化CAR-T又はCAR-NK

B細胞悪性腫瘍などのがん細胞での好適な細胞表面分子にT細胞をリダイレクトすることにより依存するキメラ抗原受容体（CAR）改変自己T細胞（CART）療法を使用する最近の開発は、B細胞悪性腫瘍及び他のがんを治療するために免疫系の力を利用することにより有望な結果を示している（例えば、Sadelain et al. Cancer Discovery 3:388-398 (2013) を参照）。ネズミ由来のCART19（すなわち、「CTL019」）の臨床結果は、CLLに罹患している患者において、並びに小児ALLにおいて、完全寛解を確立するのに有望であることを示している（例えば、Kalos et al., Sci Transl Med 3:95ra73 (2011)、Porter et al., NEJM 365:725-733 (2011)、Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)）。遺伝子改変T細胞でキメラ抗原受容体が標的細胞を認識して破壊する能力に加えて、成功する治療用T細胞療法は、増殖して経時的に持続する能力を有し、白血病細胞逃亡を更に監視することを必要とする。T細胞の可変的な質は、それがエネルギー、抑制、又は枯渇の結果であるかにかかわらず、CAR形質転換T細胞のパフォーマンスに影響を与えるが、習熟した医師は現時点でそのための管理が限られている。有効であるために、CAR形質転換した患者T細胞は、CARの抗原に応答して増殖する能力を持続し維持する必要がある。ALL患者T細胞は、ネズミscFvを含むCART19で行うことができることが示されている（例えば、Grupp et al., NEJM 368:1509-1518 (2013)）。

【0242】

本発明は、操作されたT細胞をリダイレクトしてPSMA陽性腫瘍細胞を認識及び殺滅するキメラ抗原受容体（CAR）構築物に組み込まれた、PSMAに結合する完全なヒト抗体断片（例えば、scFv）を提供することによって、患者における免疫応答を制御することに対処する。

【0243】

したがって、一態様では、本発明は、キメラ抗原受容体（CAR）をコードする単離された核酸分子に関するものであり、CARは、PSMA結合ドメインを含む抗体又はその抗原結合断片と、膜貫通ドメインと、細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、共刺激ドメイン及び／又は一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン）と、を含む。一実施形態では、CARは、本明細書に記載の完全なヒト抗PSMA結合ドメインを含む抗体又はその抗原結合断片と、本明細書に記載の膜貫通ドメインと、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメイン（例えば、共刺激ドメイン及び／又は一次シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメイン）と、を含む。

【0244】

一実施形態では、コードされたヒト抗P S M A結合ドメインは、本明細書に記載の完全なヒト抗P S M A結合ドメインの1つ以上（例えば、3つ全て）の軽鎖相補的決定領域1（L C C D R 1）、軽鎖相補的決定領域2（L C C D R 2）、及び軽鎖相補的決定領域3（L C C D R 3）、並びに／又は本明細書に記載の完全なヒト抗P S M A結合ドメインの1つ以上（例えば、3つ全て）の重鎖相補的決定領域1（H C C D R 1）、重鎖相補的決定領域2（H C C D R 2）、及び重鎖相補的決定領域3（H C C D R 3）を含み、例えば、完全なヒト抗P S M A結合ドメインは、1つ以上、例えば、3つ全てのL C C D R、及び／又は1つ以上、例えば、3つ全てのH C C D Rを含む。一実施形態では、コードされた軽鎖可変領域は、本明細書に記載の1つ、2つ、3つ、又は4つ全てのフレームワーク領域を含む。一実施形態では、コードされた重鎖可変領域は、以下に記載の1つ、2つ、3つ、又は4つ全てのフレームワーク領域を含む。一実施形態では、コードされた完全なヒト抗P S M A結合ドメインは、以下に記載のヒト軽鎖可変領域及び／又は以下に記載のヒト重鎖可変領域を含む。一実施形態では、コードされた抗P S M A結合ドメインは、以下に記載のアミノ酸配列の軽鎖及び重鎖を含むs c F vである。実施形態では、抗P S M A結合ドメイン（例えば、s c F v）は、以下に提供される軽鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも1、2、若しくは3個の改変（例えば、置換）だが30、20、若しくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列、又は以下に記載のアミノ酸配列に対して95～99%の同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域、及び／あるいは以下に提供される重鎖可変領域のアミノ酸配列の少なくとも1、2、若しくは3個以下の改変（例えば、置換）だが30、20、若しくは10個以下の改変（例えば、置換）を有するアミノ酸配列、又は以下に記載のアミノ酸配列に対して95～99%の同一性を有する配列を含む重鎖可変領域を含む。一実施形態では、コードされたヒト抗P S M A結合ドメインは、以下に記載の配列、又はその95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、ヒト抗P S M A結合ドメインをコードする核酸配列は、以下に記載の配列、又はその95～99%の同一性を有する配列を含む。一実施形態では、コードされたヒト抗P S M A結合ドメインは、s c F vであり、軽鎖可変領域は、リンカー、例えば、本明細書に記載のリンカーを介して重鎖可変領域に結合される。一実施形態では、コードされたヒト抗P S M A結合ドメインは、（G l y 4 - S e r）nリンカーを含み、式中、nは、1、2、3、4、5、又は6、好ましくは、3又は4である。別の実施形態では、コードされたヒト抗P S M A結合ドメインは、配列番号37に記載されるリンカー配列を含む。s c F vの軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、例えば、以下の配置：軽鎖可変領域－リンカー－重鎖可変領域又は重鎖可変領域－リンカー－軽鎖可変領域のうちのいずれかであることができる。

10

20

30

40

50

【0245】

いくつかの実施形態では、抗P S M A結合ドメインは、本明細書の他の箇所に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む。例えば、いくつかの実施形態では、抗P S M A結合ドメインは、本明細書の別の箇所に記載される、M u t - g y 1、M u t - g y 1 - s t、M u t - g y 1 - 2、M u t - g y 1 - 3、又はP S M A b L mを含む。

【0246】

P S M A 標的化二重特異性抗体

天然抗体とは異なり、二重特異性抗体（B s A b）は、二重の特異性を有する人工抗体であり、2つの異なる腫瘍抗原を標的とするか、又は一方は、腫瘍細胞で、他方は、免疫エフェクター細胞を腫瘍部位に効率的に動員し、それらを活性化して腫瘍細胞を特異的に殺滅することができるエフェクター細胞で、標的にする。前者の例、すなわち、2つの異なる腫瘍関連抗原を標的とするB s A bは、H e r 2及びV E G Fを同時に結合するb H 1（B o s t r o m J 1 e t a l. 2009, S c i e n c e 323: 1610-4）、又はE r B b 2 / E r B b 3二重標的化二重特異性s c F v（R o b i n s o n M K e t a l. 2008, B r J C a n c e r 99: 1415-25）である。2つの腫瘍関連抗原は、両方とも、腫瘍細胞で発現され得るか、又は一方は、腫瘍細胞で発現され、他方は、腫瘍微小環境細胞、例えば、腫瘍微小環境における線維芽細胞

、血管細胞、内皮、周細胞、若しくは免疫細胞（マクロファージ、B細胞、T細胞など）などの腫瘍細胞関連細胞で発現され得る。後者の例、すなわち、1つの腫瘍関連抗原及び免疫活性化可能抗原を標的とするBsAbは、Her2、CD19、又はCD123などの腫瘍抗原を標的とする一方のアーム、及び腫瘍細胞と、T細胞、NK細胞、又はマクロファージなどの免疫細胞とを会合させることができるCD3又はCD16などの免疫活性化可能抗原を標的とする他方のアームと、を有するBsAbである（Kontermann RE, et al. 2015, Drug Discovery Today 20: 838-847）。

【0247】

抗CD3抗体を含むBsAbは、T細胞と腫瘍細胞とを一緒に会合させ、腫瘍細胞（Muller and Kontermann, BioDrugs 2010; 24: 89-98、Baeuerle and Reinhardt 2009、Cancer Research 96: 4941）活性化T細胞の殺滅につながる。ブリナツモマブ（Bargou et al., Science 2008, 321: 974-976）は、BiTEと呼ばれる単鎖抗体構築物であり、CD19及びCD3を標的とすることによって細胞傷害性を誘導する。他の抗体断片ベースのT細胞会合二重特異性が報告されている（Moore et al. 2011, Blood 117: 4542-4551、Baeuerle et al. Current Opinion in Molecular Therapeutics 2009, 11: 22-30）。BiTE（商標）フォーマットは、2つの異なる抗体に由来する可変ドメインを連結する二重特異性単鎖抗体構築物である。しかしながら、ブリナツモマブは、インビボでは低い半減期を有し、産生及び安定性の点で製造することが困難である。したがって、T細胞を腫瘍細胞に標的化することができ、改善された製造可能性を有することができる、改善された二重特異性抗体が必要とされている。

【0248】

BsAbは、化学架橋、ハイブリドーマ技術、又は遺伝子方法によって生成することができるハイブリッドタンパク質である。化学架橋方法では、2種類のモノクローナル抗体及びその断片を還元剤によって解離させ、一価抗体及びその断片を生成した。得られたBsAbは、異なる親抗体からの2つの一価抗体及びその断片の化学架橋を介して構築される。この戦略は、大スケールでBsAbの迅速な産生に使用することができるが、時として架橋中にBsAbが不活性化され得、生成物の均質性を保証することが困難である。BsAbの産生のための別の戦略は、1つのモノクローナル抗体を分泌する確立されたハイブリドーマ細胞株を、他の抗原で免疫した脾臓細胞に融合するか、又は2つの異なるモノクローナル抗体を分泌する2つの確立されたハイブリドーマ細胞株を互いに融合してハイブリッドハイブリドーマを作製するハイブリドーマ技術である。前者の結果として得られるハイブリドーマは、二量体ハイブリドーマ及び四量体ハイブリドーマと呼ばれる。一般に、ハイブリドーマ技術によって産生されるBsAbは、高い生体活性を維持する。しかしながら、手順は面倒で時間がかかり、同時に生成される他の非活性抗体及び望ましくない抗体からBsAbを単離することは容易ではない。これらのBsAbフォーマットは、別の予測可能な問題に遭遇した：BsAbに含まれる大きすぎるサイズ及びネズミ構成要素は、患者において免疫原性であり、ヒト抗マウス抗体（HAMA）の産生を誘導し、臨床におけるこれらのBsAbの再利用を妨げ得る。更に、これらの形態のBsAbの産生及び精製は費用がかかり、臨床におけるBsAbの適用を制限する。これらの伝統的な方法の遺伝子組換えアプローチとの置き換えは、この領域での加速した進歩を有する。小分子抗体の技術に基づいて、遺伝子操作によるBsAbの産生は、プロセスの安定性、大スケール産生、低コスト、及び使い易さなど、上記のものを超えて有利である。遺伝子工学は、2つの異なる種類のscFvを接続することによって、様々な小分子BsAbフォーマットの開発をもたらしている。異なる連結によって分類される3種類のBsAbフォーマットがある。（1）ミニ抗体は、2つのscFv断片をオリゴマー化ドメイン（例えば、Fos又はJun転写因子に由来するロイシンジッパーモチーフ）と一緒に接続するこ

とによって組み立てられるヘテロ二量体である。(2) ダイアボディは、2つの単鎖VH1-VL2及びVH2-VL1によって組み立てられ、両方とも、同じ鎖からのVドメイン間の対形成を可能にするには短すぎる短リンカーによって接続されている、非共有結合的に会合したダイマー(dimer)である。したがって、各鎖単独では抗原に結合することができないが、2つの鎖(VH1-VL2及びVH2-VL1)の共発現は、2種類の抗原に結合することができるヘテロ二量体ダイアボディの組み立てをもたらす。(3) ScBsAb: インターリンカーを使用して、異なる特異性を有する2つの異なるscFvを接続し、ScBsAbを単一ポリペプチドとして宿主細胞で発現させた。scFv内の2つのドメイン間のイントラリンカーは、多くの場合、(Gly4Ser)3である。2つのscFv間のインターリンカーについて、それを設計するために2つの戦略がある。異種可変領域間の誤った対形成を回避する目的のために、インターリンカーは、多くの場合、Gly4Serなどの10個未満のアミノ酸残基を有する短いペプチドリナーである。別の戦略は、インターリンカーのために、より長いリンカーを選択することである。要するに、インターリンカーを設計するために最も重要なのは、可変ドメイン間の適切な対形成及びタンパク質の折り畳みを確実にして、生物学的活性及び安定性を維持するBsAbの形成をもたらすことである。精製を容易にし、血漿半減期を延長するために、いくつかの新しい特性が導入されるべきである。

10

20

30

40

50

【0249】

BsAb媒介性免疫療法は、腫瘍の臨床生物療法において有望な役割を果たす。BsAbによって媒介される腫瘍殺滅効果は、免疫系を刺激することに基づいており、腫瘍に対して高度に特異的であり、MHC拘束はない。したがって、BsAb媒介性療法は、手術、放射線療法、及び化学療法などの従来の方法を補完する。BsAbは、腫瘍を治癒するだけでなく、免疫系を刺激して免疫保護を長期間提供し、維持することができる。マウス及び臨床における実験の結果に基づいて、治験使用のために調製された最適なBsAbは、以下のような少なくとも5つの特徴を有するべきである: 1): それは、高い特異性及び親和性で関連する腫瘍抗原を標的とする、2): それは、エフェクター細胞-細胞傷害性細胞でトリガー因子に結合することができ、BsAbが腫瘍抗原に結合するときのみ、架橋をもたらすことができる、3): BsAbは、腫瘍部位で白血球の対応する群によって選択的に生じる有効な細胞傷害性及び炎症を促進することができる、4): BsAbは、反復使用後のヒト抗マウス応答の誘導を最小限に抑えるためにヒト化されなければならない、最後に、5): BsAbは、腫瘍に浸透するのに十分なだけ小さいだけでなく、循環中に十分な期間留まるのに十分なだけ大きくあるべきである。

【0250】

上記のこれらの点に基づいて、多くの種類の免疫エフェクター細胞を誘発し、異なる腫瘍細胞を標的とする多数のBsAbが過去数年間に開発されており、エフェクター細胞には、Tリンパ球、NK細胞、単球、マクロファージ、好中球、LAK細胞(リンホカイン活性化細胞傷害性細胞)、及びTIL細胞(腫瘍浸潤リンパ球)などが含まれる。T細胞は、免疫応答のための主要な特異的細胞として一般に認識されている。全ての成熟T細胞の表面で発現されるCD3は、T細胞における共通の表面マーカーである。CD3はTCRに非共有結合によって結合し、TCR-CD3複合体全体を形成し、抗原刺激に対する免疫応答に関与する。現在、CD3は、最も広く、成功裏に使用される免疫エフェクター細胞上の表面トリガー分子である。BsAb内の抗CD3抗体がT細胞の表面でCD3分子に結合した後、腫瘍細胞を殺滅するために以下のような多くの効果が生じる。これらの効果には、(1) T細胞の増殖及び分化。第1に、BsAbは休止T細胞を活性化することができ、CD4+又はCD8+を有する早期エフェクターT細胞に由来するTh細胞及びTc細胞をもたらす。第2に、BsAbは、多数の記憶細胞を活性化して増殖させ、腫瘍細胞を攻撃及び殺滅するエフェクターT細胞に分化させることができる。エフェクター細胞の数は、腫瘍排除の速度に直接的に関係する。(2) サイトカインの放出: BsAbによって活性化されたCD4+Th細胞は、大量のIL-2を分泌することができる。IL-2は、自己分泌におけるTh細胞の増殖を刺激するだけでなく、ナイーブCD8+T

細胞を T c 細胞になるように傍分泌で活性化し、T c 細胞の細胞傷害性の拡大をもたらす。加えて、I L - 2 は、T 細胞を活性化するための共刺激性シグナルである。したがって、I L - 2 は、B s A b 媒介性免疫効果において重要な役割を果たす。T N F - α 及び I F N - γ などのいくつかの他のサイトカインは、T 細胞活性化のプロセスで産生され、細胞間の媒体を介した「バースタンダー」腫瘍細胞の成長を阻害することによって「バースタンダー」効果をもたらすことができる。(3) 細胞傷害性：インビトロ実験は、B s A b によって媒介されると、C D 8 + T c が腫瘍細胞と直接的に相互作用し、顆粒エキソサイトシスを介して細胞傷害性物質を放出し、標的細胞を溶解することを示し、これは通常、腫瘍細胞を標的とした後、4 ~ 6 時間以内に迅速に起こる。細胞傷害性物質の主な構成要素は、パーフォリン及びセリンエステラーゼ又はグランザイムである。パーフォリンは、形質膜を攻撃し、イオンチャネルを形成し、したがって、大量のイオン及び水の侵入を引き起こし、細胞の溶解及び壊死をもたらす、一方、グランザイムは、リンホトキシンに類似しており、細胞内の D N a s e を活性化することができ、したがって、核 D N A の溶解を引き起こし、標的細胞のアポトーシスをもたらす。

10

20

30

40

50

【0251】

現在、F v 断片は、完全な抗原結合部位を有する最小単位であり、小さく（全抗体の約 6 分の 1）、F c ドメインが存在せず、低い免疫原性であり、血管壁及び固形腫瘍に容易に浸透するため、B s A b の構築のために広く使用されている。しかしながら、V H ドメインと V L ドメインとの間の共有結合が生成できないため、F v は不安定であり、インビボで解離し易い。F v 断片の安定性を改善するために、V H ドメインと V L ドメインとの間のポリペプチドイントラリンカーを使用して、いわゆる S c F v を形成する。イントラリンカーは、一般に、(G l y ₄ S e r)₃ などの長さが 15 アミノ酸残基を有する短い可撓性ペプチドである。本発明の一実施形態では、イントラリンカーは、抗 C D 3 s c F v に使用され、異なるイントラリンカーは、抗 P S M A s c F v に使用される。

【0252】

標準的な I g G フォーマットを有する二重特異性抗体は、それらが 4 つの異なるポリペプチド鎖を含むため、産生が困難であり得る。より小さく、より容易に産生される二重特異性分子の有効性は、非ホジキンリンパ腫において臨床的に実証されている。例えば、B a r g o u e t a l . (2 0 0 8) , S c i e n c e 3 2 1 (5 8 9 1) : 9 7 4 - 9 7 7 を参照されたい。

【0253】

この小さい単鎖分子の短いインビボ半減期のために、連続静脈内注入による長期投与を使用して、これらの結果を達成した。したがって、当該技術分野において、類似の治療有効性を保持し、産生が複雑でないフォーマットを有し、より長い半減期を含む好都合な薬物動態特性を有する二重特異性治療薬が必要とされている。

【0254】

本明細書に記載される、二重特異性 F c (B s - F c) は、2 つの異なるタンパク質に結合することができ、抗体の F c 領域又はその一部分を含む。B s - F c は、F c 領域を欠いている二重特異性単鎖分子と比較して、好都合な薬物動態特性を有することができる。B s - F c によって結合された 1 つのタンパク質は、T 細胞、N K 細胞、好中球、又はマクロファージなどの免疫エフェクター細胞で発現され得、他のタンパク質は、標的細胞、例えば、がん細胞、病原体によって感染された細胞、又は線維症を引き起こす線維芽細胞などの疾患を媒介する細胞で発現され得る。本明細書に記載の B s - F c 分子は、標的細胞の存在下で免疫エフェクター細胞の活性化及び／又は免疫エフェクター細胞の存在下で標的細胞の殺滅を誘発することができる。

【0255】

いくつかの実施形態では、抗 P S M A 結合ドメインは、本明細書の他の箇所に記載の抗体又はその抗原結合断片を含む。例えば、いくつかの実施形態では、抗 P S M A 結合ドメインは、本明細書の別の箇所に記載される、M u t - g y 1、M u t - g y 1 - s t、M u t - g y 1 - 2、M u t - g y 1 - 3、又は P S M A b L m を含む。

【0256】

治療方法

別の態様では、本開示は、対象におけるPSMAの発現に関連する増殖性疾患を予防又は治療する方法を更に提供する。いくつかの実施形態では、方法は、対象に、本明細書に記載される、有効量の抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、CAR、核酸分子、ベクター、細胞、あるいは組成物を投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、ヒトである。

【0257】

いくつかの実施形態では、方法は、対象に、第2の薬剤又は療法を与えることを更に含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤又は療法は、抗がん剤を含む。いくつかの実施形態では、第2の薬剤又は療法は、対象に、本明細書に記載される、抗体若しくはその抗原結合断片又はそのバリエーション、二重特異性若しくは多重特異性抗体又はその抗原結合断片、CAR、核酸分子、ベクター、細胞、あるいは組成物の前、後、又は同時に投与される。

10

【0258】

一実施形態では、本発明は、対象における、前立腺がん又は血管新生に高PSMA発現を有する固形腫瘍などの異常なPSMA発現を有する固形腫瘍を治療する方法を提供し、抗体又は抗原結合断片を用いてPSMA高発現細胞を標的化するステップを含む。いくつかの実施形態では、方法は、高PSMA発現に関連する腫瘍を有する対象に、抗体又はその抗原結合断片を含む組成物を投与することを含む。

20

【0259】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、生物学的に活性な薬剤又はかかる薬剤の組み合わせに操作可能に連結されており、薬剤は、毒素、放射性同位体、ナノ粒子、又は生体活性ペプチドである。これらの腫瘍としては、前立腺がん、肺がん、肝臓がん、膵臓がん、結腸がん、胃がん、乳がん、卵巣がん、腎臓がん、前立腺がん、膀胱がん、黒色腫、神経膠腫などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0260】

一実施形態では、本明細書において、対象における腫瘍を阻害又は抑制する方法が提供される。別の実施形態では、方法は、有効量の本明細書に記載の抗体又は抗原結合断片を投与するステップを含む。

30

【0261】

別の実施形態では、本明細書において、対象における固形腫瘍の進行を遅延させる方法が提供される。更に別の実施形態では、方法は、対象に、有効量の本明細書に提供される抗体又はその抗原結合断片を投与することを含む。別の実施形態では、対象は、固形腫瘍の血管新生に対する免疫応答を高め、それによって対象における固形腫瘍の進行を遅延させる。

【0262】

一実施形態では、「操作可能に連結された」という用語は、分子及び配列の適切な機能又は発現を確実にするような方法で、2つ以上の分子又は配列を配置／連結することを指す。

40

【0263】

一実施形態では、「治療有効量」という用語は、所与の状態及び投与レジメンに対して治療効果を提供する量を指す。本発明において、治療効果は、腫瘍の増殖、浸潤、拡散、転移若しくは再発の予防若しくは阻害、又は好ましくは腫瘍負荷の低減、又は患者の転帰の改善である。

【0264】

一実施形態では、「予防すること又は治療すること」という用語は、症状の発症を遅延させること、症状の重症度を低減すること、急性エピソードの重症度を低減すること、症状の数を低減すること、疾患関連症状の発生率を低減すること、症状の潜時を低減するこ

50

と、症状を緩和すること、二次的症狀を低減すること、二次感染を低減すること、患者の生存期間を延長すること、疾患の再発を防止すること、再発エピソードの数又は頻度を低減すること、症状のエピソード間の潜時を増加させること、持続的進行までの期間を増加させること、寛解を促進すること、寛解を誘導すること、寛解を増大すること、回復を迅速化すること、又は代替療法の有効性を増加させるか、若しくはそれに対する耐性を低減すること、のうちのいずれか1つ以上を指す。一実施形態では、「治療すること」は、治療的処置及び予防的又は防止的手段の両方を指し、目的は、上記の標的化病理学的状態又は障害を予防又は軽減することである。

【0265】

別の実施形態では、「症状」は、上記に記載される疾患又は病理学的状態の兆候である。

10

【0266】

一実施形態では、本発明の組成物は、単独で、又はいくつかの実施形態では、第2の薬学的に活性な薬剤と組み合わせて、本発明のポリペプチド、抗体、又は抗原結合断片を含む。別の実施形態では、組成物は、タンパク質分解阻害剤、薬学的担体、希釈剤、及びアジュバントを更に含む。

【0267】

一実施形態では、「薬学的に活性な薬剤」という用語は、示された目的を満たす任意の医薬品を指す。いくつかの実施形態では、薬学的に活性な薬剤には、化学療法剤、放射線療法剤、血管新生阻害剤、腫瘍イメージングプローブ、免疫調節剤、若しくは任意の他の腫瘍療法、及び／又はイメージング薬物／薬剤などが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0268】

別の実施形態では、本明細書において、対象における腫瘍の治療のために、生物学的に活性な薬剤と、本発明の抗体又は抗原結合断片と、を送達する方法が提供される。別の実施形態では、方法は、生物学的活性剤と、抗体又は抗原結合断片とを、同時であるが個別に投与するステップを含む。別の実施形態では、方法は、生物学的活性剤と、抗体又は抗原結合断片とを、別個に投与するステップを含む。

【0269】

一実施形態では、本明細書に提供される抗体又は抗原結合断片は、それ自体が「生物学的に活性」であり、それらが、修飾後でも、特に標的抗原への結合、リガンドの受容体との結合の阻害、更には調節に関して、特に抗原媒介性シグナル伝達の阻害、及び抗原媒介性疾患の予防若しくは治療において、それらの対応する親抗体の生物学的作用又は増強した作用を発揮することができることを意味する。「生物学的に活性な」という用語は、本明細書に記載される生物学的に活性な薬剤のいずれかに関連して使用される場合、当業者によって理解されるように、予防的、診断的、又は治療的效果をもたらすことができる手段で免疫応答を調節する薬剤の能力も指す。いくつかの実施形態では、この生物学的活性を達成するために使用される薬剤としては、当業者によって理解されるように、サイトカイン、酵素、ケモカイン、放射性同位体、酵素的に活性な毒素、治療用ナノ粒子、又は化学療法剤が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0270】

代替的な実施形態では、抗体のポリペプチドは、抗体依存性酵素媒介性プロドラッグ療法(ADEPT)を用いるために、酵素に対してそれらの意図された目的で機能するようにコンジュゲートされるか、又は操作可能に連結される。ADEPTは、抗体又はFc融合物を、プロドラッグ(例えば、ペプチジル化学療法剤)を活性抗がん剤に変換するプロドラッグ活性化酵素にコンジュゲートするか、又は操作可能に連結することによって使用され得る。ADEPTに有用な免疫複合体の酵素構成要素は、プロドラッグにそれをより活性な細胞傷害性形態に変換するような方法で作用することができる任意の酵素を含む。本明細書に提供される修飾分子の他の追加の修飾が、本明細書で企図される。例えば、ポリペプチド／抗体は、様々な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール

50

(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマーのうちの1つに結合され得る。

【0271】

別の実施形態では、本明細書に提供される抗体／ポリペプチドは、1つ以上の免疫調節剤とともに投与される。かかる薬剤は、1つ以上のサイトカインの産生を増加又は減少させるか、自己抗原提示を上方若しくは下方制御するか、MHC抗原をマスキングするか、又は1つ以上のタイプの免疫細胞の増殖、分化、移動、若しくは活性化状態を促進し得る。免疫調節剤としては、アスピリン、イブプロフェン、セレコキシブ、ジクロフェナク、エトドラック、フェノプロフェン、インドメタシン、ケトララック、オキサプロジン、ナブメントン (nabumentone)、スリンダック、トルメンチン、ロフェコキシブ、ナプロキセン、ケトプロフェン、及びナブメトンなどの非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID)；ステロイド (例えば、グルココルチコイド、デキサメタゾン、コルチゾン、ヒドロキシコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、プレドニゾロン、トリムシノロン、プロスタグランジンなどのアズルフィジンイコサノイド、トロンボキサン、及びロイコトリエン；並びにアントラリン、カルシボトリエン、クロベタゾール、及びタザロテンなどの局所ステロイド)；TGF β 、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-10などのサイトカイン；サイトカイン、ケモカイン、又は受容体拮抗剤であって、BATF、B7、CCR2、CCR5、CD2、CD3、CD4、CD6、CD7、CD8、CD11、CD14、CD15、CD17、CD18、CD20、CD23、CD28、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD52、CD64、CD80、CD86、CD147、CD152、補体因子 (C5、D) CTLA4、エオタキシン、Fas、ICAM、ICOS、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IFNAR、IgE、IL-1、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-5R、IL-6、IL-8、IL-9、IL-12、IL-13、IL-13R1、IL-15、IL-18R、IL-23、インテグリン、LFA-1、LFA-3、MHC、セレクトリン、TGF- β 、TNF- α 、TNF- β 、TNF-R1、T細胞受容体に対する抗体、可溶性抗体、及び受容体-Fc融合を含み、Enbrel (登録商標) (エタネルセプト)、Humira (登録商標) (アダリムマブ)、Remicade (登録商標) (インフリキシマブ)、PD1抗体 (OPDIVO (登録商標) (ニボルマブ)、KEYTRUDA (登録商標) (パンプロリズマブ)) 又はPD-L1抗体 (デュルバルマブ、MPDL3280A) を含む、受容体拮抗剤；異種抗リンパ球グロブリン；2-アミノ-6-アリール-5置換ピリミジン、MHC結合ペプチド及びMHC断片に対する抗イディオタイプ抗体、アザチオプリン、ブレキナル、プロモクリプチン、シクロホスファミド、シクロスポリンA、D-ペニシリンアミン、デオキシスベルグアリン、FK506、グルタルデヒド、金、ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、マロノニトリロアミド (例えば、レフルノミド)、メトトレキサート、ミノシクリン、ミゾリビン、ミコフェノール酸モフェチル、ラパマイシン、並びにスルファサザジン (sulfasazine) などの他の免疫調節分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0272】

代替的な実施形態では、本発明の抗体は、サイトカインとともに投与される。本明細書で使用される「サイトカイン」とは、細胞間メディエーターとして別の細胞に作用する1つの細胞集団によって放出されるタンパク質の一般的用語として意味される。かかるサイトカインの例は、リンホカイン、モノカイン、及び従来のポリペプチドホルモンである。サイトカインの中には、線維芽細胞成長因子、プロラクチン、胎盤性ラクトゲン、腫瘍壊死因子- α 及び- β 、ミューラー管抑制因子、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、インヒビン、アクチビン、血管内皮成長因子、インテグリン、トロンボポエチン (TPO)、NGF- β などの神経成長因子、血小板成長因子、TGF- α 及びTGF- β などの形質転換成長因子 (TGF)、インスリン様成長因子-I及び-II、エリスロポエチン (EPO)、骨誘導因子、インターフェロン- α 、- β 、及び- γ などのインターフェロン、マクロファージ-CSF (M-CSF) などのコ

ロニー刺激因子（CSF）、顆粒球－マクロファージ－CSF（GM-CSF）、及び顆粒球－CSF（G-CSF）、IL-1、IL-1アルファ、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12などのインターロイキン（IL）、IL-15、TNF-アルファ又はTNF-ベータなどの腫瘍壊死因子、並びにLIF及びkitリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子が含まれる。本明細書で使用される場合、サイトカインという用語は、天然源からの又は組換え細胞培養からのタンパク質、及び天然配列サイトカインの生物学的に活性な等価物を含む。

【0273】

化学療法剤又は他の細胞傷害性剤は、プロドラッグとして投与され得る。「プロドラッグ」という用語は、親薬物と比較して腫瘍細胞に対する細胞傷害性が低く、酵素によって活性化するか、又はより活性な親形態に変換することができる、薬学的に活性な物質の前駆体又は誘導体形態を指す。例えば、Wilman, 1986, Biochemical Society Transactions, 615th Meeting Belfast, 14:375-382、及びStella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.): 247-267, Humana Press, 1985を参照されたい。本明細書に提供される組成物及び方法による使用を見出し得るプロドラッグとしては、リン酸含有プロドラッグ、チオ硫酸含有プロドラッグ、硫酸含有プロドラッグ、ペプチド含有プロドラッグ、D-アミノ酸修飾プロドラッグ、グリコシル化プロドラッグ、ペーターラクトム含有プロドラッグ、任意選択で置換されたフェノキシアセトアミド含有プロドラッグ又は任意選択で置換されたフェニルアセトアミド含有プロドラッグ、5-フルオロシトシン、及びより活性な細胞傷害性遊離薬物に変換することができる他の5-フルオロウリジンプロドラッグが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に提供される組成物及び方法の抗体／ポリペプチドによる使用のためのプロドラッグ形態に誘導体化することができる細胞傷害性薬物の例としては、前述の化学療法剤のうちのいずれかが挙げられるが、これらに限定されない。

【0274】

いくつかの実施形態では、抗体／ポリペプチドと上記で特定される生物学的活性剤、すなわち、サイトカイン、酵素、ケモカイン、放射性同位体、酵素的に活性な毒素、又は化学療法剤との任意の組み合わせを適用することができる。別の実施形態では、抗体／ポリペプチドは、生物学的に活性な薬剤と操作可能に連結されて、本明細書に記載の方法で使用することができるか、又は本明細書に提供される抗体／ポリペプチドは、所望の予防、診断、又は治療効果を達成するために、両方が別々に投与される（すなわち、コンジュゲートされない）手段で、生物学的に活性な薬剤と組み合わせて単に使用することができる。

【0275】

併用療法

本明細書に記載の抗体、抗体断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体を含む組成物は、他の既知の薬剤及び療法と組み合わせて使用され得る。「組み合わせて」投与されるとは、本明細書で使用される場合、2つ（又はそれ以上）の異なる治療が、障害による対象の苦痛の経過中に対象に送達されることを意味し、例えば、2つ以上の治療は、対象が障害を有すると診断された後、障害が治癒若しくは排除される前、又は他の理由で治療が中止される前に送達される。いくつかの実施形態では、1つの治療の送達は、第2の送達が始まるときに依然として発生しているため、投与の観点から重複がある。これは、本明細書において時として「同時」又は「共送達」と称される。他の実施形態では、一方の治療の送達は、他方の治療の送達が始まる前に終了する。いずれかの場合のいくつかの実施形態では、治療は、組み合わせた投与によってより効果的である。例えば、第2の治療は、第2の治療が第1の治療の非存在下で投与された場合に示されるよりも、

より効果的であり、例えば、同等の効果がより少ない第2の治療で示されるか、又は第2の治療がより大きな程度まで症状を低減し、あるいは類似の状況が、第1の治療で示される。いくつかの実施形態では、送達は、障害に関連する症状又は他のパラメータにおける低減が、他方の治療の非存在下で送達される一方の治療で観察されるよりも大きいようなものである。2つの治療の効果は、部分的に相加的、完全に相加的、又は相加的よりも大きいものであり得る。送達は、送達された第1の治療の効果が、第2の治療が送達されたときに依然として検出可能であるようにできる。

【0276】

本明細書に記載の抗体、抗体断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体を含む組成物と、少なくとも1つの追加の治療剤とは、同時に、同じ若しくは別個の組成物で、又は逐次的に投与され得る。逐次投与では、本明細書に記載のCAR発現細胞は、最初に投与することができ、追加の薬剤は、2番目に投与することができ、又は投与順序は、逆にすることができる。

10

【0277】

更なる態様では、本明細書に記載の抗体、抗体断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体を含む組成物は、手術、化学療法、放射線、免疫抑制剤、例えば、シクロスポリン、アザチオプリン、メトトレキサート、ミコフェノール酸塩、及びFK506抗体など、又は他の免疫除去剤、例えば、CAMPATH、抗CD3抗体、若しくは他の抗体療法など、サイトキシン、フルダラビン、シクロスポリン、FK506、ラパマイシン、ミコフェノール酸、ステロイド、FR901228、サイトカイン、及び放射線照射と組み合わせた治療レジメンで使用され得る。Izumoto et al., 2008 J Neurosurg 108:963-971に記載されているようなペプチドワクチン。

20

【0278】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体、抗体断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体を含む組成物は、化学療法剤と組み合わせて使用することができる。例示的な化学療法剤としては、抗アンドロゲン（アンドロゲンアンタゴニスト）、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン（例えば、リボソームドキソルビシン））、ビンカアルカロイド（例えば、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、ビノレルビン）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、ダカルバジン、メルファラン、イホスファミド、テモゾロミド）、免疫細胞抗体（例えば、アレムツズマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、トシツモマブ）、代謝拮抗剤（例えば、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体、及びアデノシンデアミナーゼ阻害剤（例えば、フルダラビン））、mTOR阻害剤、TNFRグルコルコチコイド誘導TNFR関連タンパク質（GITR）アゴニスト、プロテアソーム阻害剤（例えば、アクラシノマイシンA、グリオトキシン、又はボルテゾミブ）、サリドミド又はサリドミド誘導体（例えば、レナリドミド）などの免疫調節剤が挙げられる。

30

【0279】

併用療法で使用するために考慮される一般的な化学療法剤としては、アナストロゾール（Arimidex（登録商標））、ビカルタミド（Casodex（登録商標））、ブレオマイシン硫酸塩（Blenoxane（登録商標））、ブスルファン（Myleran（登録商標））、ブスルファン注射液（Busulfex（登録商標））、カペシタビン（Xeloda（登録商標））、N4-ペントキシカルボニル-5-デオキシ-5-フルオロシチジン、カルボプラチン（Paraplatin（登録商標））、カルムスチン（BiCNU（登録商標））、クロラムブシル（Leukeran（登録商標））、シスプラチン（Platinol（登録商標））、クラドリビン（Leustatin（登録商標））、シクロホスファミド（Cytosan（登録商標）又はNeosar（登録商標））、シタラビン、シトシンアラビノシド（Cytosar-U（登録商標））、シタラビンリボソーム注射液（DepoCyt（登録商標））、ダカルバジン（DTIC-Dome（登録商標））、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD、コスメガン）、ダウノルビシン塩酸塩（Cerubidine（登録商標））、ダウノルビシクエン酸塩リポ

40

50

ソーム注射液 (DaunoXome (登録商標))、デキサメタゾン、ドセタキセル (Taxotere (登録商標))、ドキソルビシン塩酸塩 (Adriamycin (登録商標))、Rubex (登録商標))、エトポシド (Vepesid (登録商標))、フルダラビンリン酸塩 (Fludara (登録商標))、5-フルオロウラシル (Aldrucil (登録商標))、Efudex (登録商標))、フルタミド (Eulexin (登録商標))、テザシチビン、ゲムシタビン (ジフルオロデオキシシチジン)、ヒドロキシ尿素 (Hydrea (登録商標))、イダルビシン (Idamycin (登録商標))、イホスファミド (IFEX (登録商標))、イリノテカン (Camptosar (登録商標))、L-アスパラギナーゼ (ELSPAR (登録商標))、ロイコボリンカルシウム、メルファラン (Alkeran (登録商標))、6-メルカプトプリン (Purinethol (登録商標))、メトトレキサート (Folex (登録商標))、ミトキサントロン (Novantrone (登録商標))、ミロターグ、パクリタキセル (Taxol (登録商標))、フェニックス (イットリウム90/MX-DTPA)、ペントスタチン、カルムスチンインプラントを備えたポリフェプロサン20 (Gliadel (登録商標))、タモキシフェンクエン酸塩 (Nolvadex (登録商標))、テニポシド (Vumon (登録商標))、6-チオグアニン、チオテパ、チラパザミン (Tirazone (登録商標))、注射用トポテカン塩酸塩 (Hycamtin (登録商標))、ビンブラスチン (Velban (登録商標))、ピンクリスチン (Oncovin (登録商標))、及びビノレルビン (Navelbine (登録商標))が挙げられる。

10

20

【0280】

例示的な抗アンドロゲン (アンドロゲンアンタゴニスト) 剤としては、ビカルタミド、ゴセレリン酢酸塩SRデポが挙げられる。

【0281】

例示的なアルキル化剤としては、限定されないが、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソウレア、及びトリアゼン)：ウラシルマスタード (Aminouracil Mustard (登録商標))、Chlorethaminacil (登録商標)、Demethyldopan (登録商標)、Desmethyldopan (登録商標)、Haemanthamine (登録商標)、Nordopan (登録商標)、Uracil Nitrogen Mustard (登録商標)、Uracillost (登録商標)、Uracilmostaza (登録商標)、Uramustin (登録商標)、Uramustine (登録商標))、クロルメチン (Mustargen (登録商標))、シクロホスファミド (Cytoxan (登録商標)、Neosar (登録商標)、Clafen (登録商標)、Endoxan (登録商標)、Procyttox (登録商標)、Revimmune (商標))、イホスファミド (Mitoxana (登録商標))、メルファラン (Alkeran (登録商標))、クロラムブシル (Leukeran (登録商標))、ピボプロマン (Amedel (登録商標)、Vercyte (登録商標))、トリエチレンメラミン (Hemel (登録商標)、Hexylen (登録商標)、Hexastat (登録商標))、トリエチレンチオホスホラミン、テモゾロミド (Temodar (登録商標))、チオテパ (Thioplex (登録商標))、ブスルファン (Busilvex (登録商標)、Myleran (登録商標))、カルムスチン (BiCNU (登録商標))、ロムスチン (CeeNU (登録商標))、ストレプトゾシン (Zanosar (登録商標))、及びデカルバジン (DTIC-Dome (登録商標))が挙げられるが、これらに限定されない。追加の例示的なアルキル化剤としては、限定されないが、オキサリプラチン (Eloxatin (登録商標))、テモゾロミド (Temodar (登録商標) 及び Temodal (登録商標))、ダクチノマイシン (別名アクチノマイシン-D、Cosmegen (登録商標))、メルファラン (別名L-PAM、L-サルコリシン、及びフェニルアラニンマスタード、Alkeran (登録商標))、アルトレタミン (別名ヘキサメチルメラミン (HMM)、Hexylen (登録商標))、カルムスチン (BiCNU (登録商標))、ベンダムスチン (Treanda (登録商標))、ブスルファン (Busulfex (登録商標) 及び Myle

30

40

50

ran (登録商標))、カルボプラチン (Paraplatin (登録商標))、ロムスチン (別名 CCNU、CeeNU (登録商標))、シスプラチン (別名 CDDP、Platinol (登録商標) 及び Platinol (登録商標) - AQ)、クロラムブシル (Leukeran (登録商標))、シクロホスファミド (Cytosan (登録商標) 及び Neosar (登録商標))、ダカルバジン (別名 DTIC、DIC、及びイミダゾールカルボキサミド、DTIC-Dome (登録商標))、アルトレタミン (別名ヘキサメチルメラミン (HMM)、Hexylen (登録商標))、イホスファミド (Ifex (登録商標))、ブレドヌムスチン、プロカルバジン (Matulane (登録商標))、メクロレタミン (別名ナイトロジェンマスタード、ムスチン、及びメクロロエタミン塩酸塩、Mustargen (登録商標))、ストレプトゾシン (Zanosar (登録商標) 10))、チオテパ (別名チオホスホアミド、TESPA、及び TSPA、Thioplex (登録商標))、シクロホスファミド (Endoxan (登録商標)、Cytosan (登録商標)、Neosar (登録商標)、Procytos (登録商標)、Revimmune (登録商標))、及びベンダムスチン塩酸塩 (Treanda (登録商標)) が挙げられる。

【0282】

例示的な mTOR 阻害剤には、例えば、テムシロリムス、リダフォロリムス (正式にはデフェロリムス、(1R, 2R, 4S) - 4 - [(2R) - 2 [(1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28Z, 30S, 32S, 35R) - 1, 18 - ジヒドロキシ - 19, 30 - ジメトキシ - 15, 17, 21, 23, 29, 35 - ヘキサメチル - 2, 3, 10, 14, 20 - ペンタオキソ - 11, 36 - ジオキサ - 4 - アザトリシクロ [30.3.1.04, 9] ヘキサトリアコンタ - 16, 24, 26, 28 - テトラエン - 12 - イル] プロピル] - 2 - メトキシシクロヘキシルジルジメチルホスフィン酸として知られており、また AP23573 及び MK8669 としても知られており、PCT 公開第 03/064383 号に記載されている)、エベロリムス (Afinitor (登録商標) 又は RAD001)、ラパマイシン (AY22989、Sirolimus (登録商標))、シマピモド (simapimod) (CAS164301-51-3)、エムシロリムス、(5 - {2, 4 - ビス [(3S) - 3 - メチルモルホリン - 4 - イル] ピリド [2, 3 - d] ピリミジン - 7 - イル} - 2 - メトキシフェニル) メタノール (AZD8055)、2 - アミノ - 8 - [トランス - 4 - (2 - ヒドロキシエトキシ) シクロヘキシル] - 6 - (6 - メトキシ - 3 - ピリジニル) - 4 - メチル - ピリド [2, 3 - d] ピリミジン - 7 (8H) - オン (PF04691502、CAS1013101-36-4)、及び N2 - [1, 4 - ジオキソ - 4 - [[4 - (4 - オキソ - 8 - フェニル - 4H - 1 - ベンゾピラン - 2 - イル) モルホリニウム - 4 - イル] メトキシ] ブチル] - L - アルギニルグリシル - L - α - アスパルチル - L - セリン - 、分子内塩 (SF1126、CAS936487-67-1)、及び XL765 が挙げられる。

【0283】

例示的な免疫調節剤としては、例えば、アフツズマブ (Roche (登録商標) から入手可能)、ペグフィルグラスチム (Neulasta (登録商標))、レナリドミド (CC-5013、Revlimid (登録商標))、サリドミド (Thalomid (登録商標))、アクチミド (CC4047)、及び IRX-2 (インターロイキン1、インターロイキン2、及びインターフェロンγを含むヒトサイトカインの混合物、CAS951209-71-5、IRX Therapeutics から入手可能) が挙げられる。

【0284】

例示的なアントラサイクリンとしては、例えば、ドキソルビシン (Adriamycin (登録商標) 及び Rubex (登録商標))、ブレオマイシン (Lenoxane (登録商標))、ダウノルビシン (ダウオルビシン塩酸塩、ダウノマイシン、及びルビドマイシン塩酸塩、Cerubidine (登録商標))、ダウノルビシンリポソーム (ダウノルビシンクエン酸リポソーム、DaunoXome (登録商標))、ミトキサントロン (50)

DHAD、Novantrone（登録商標））、エピルピシン（Ellence（商標））、イダルピシン（Idamycin（登録商標）、Idamycin PFS（登録商標））、マイトマイシンC（Mutamycin（登録商標））、ゲルダナマイシン、ハービマイシン、ラビドマイシン、及びデスアセチルラビドマイシンが挙げられる。

【0285】

例示的なピンカアルカロイドとしては、例えば、ビノレルビン酒石酸塩（Navelbine（登録商標））、ピンクリスチン（Oncovin（登録商標）、及びビンデシン（Eldisine（登録商標））、ピンブラスチン（別名、ピンブラスチン硫酸塩、ピンカロイコブラスチン、及びVLB、Alkabon-AQ（登録商標）及びVelban（登録商標））、並びにビノレルビン（Navelbine（登録商標））が挙げられる。

10

【0286】

例示的なプロテオソーム阻害剤としては、ボルテゾミブ（Velcade（登録商標））、カルフィルゾミブ（PX-171-007、（S）-4-メチル-N-（（S）-1-（（（S）-4-メチル-1-（（R）-2-メチルオキシラン-2-イル）-1-オキソペンタン-2-イル）アミノ）-1-オキソ-3-フェニルプロパン-2-イル）-2-（（S）-2-（2-モルホリノアセトアミド）-4-フェニルブタアミド）-ペンタンアミド）、マリゾミブ（NPI-0052）、イキサゾミブクエン酸塩（MLN-9708）、デランゾミブ（CEP-18770）、及びO-メチル-N-〔（2-メチル-5-チアゾリル）カルボニル〕-L-セリル-O-メチル-N-〔（1S）-2-〔（2R）-2-メチル-2-オキシラニル〕-2-オキソ-1-（フェニルメチル）エチル〕-L-セリンアミド（ONX-0912）が挙げられる。

20

【0287】

例示的なGITRアゴニストとしては、例えば、GITR融合タンパク質及び抗GITR抗体（例えば、二価抗GITR抗体）、例えば、米国特許第6,111,090号、欧州特許第090505B1号、米国特許第8,586,023号、PCT公開第2010/003118号及び同第2011/090754号に記載されるGITR融合タンパク質、又は例えば、米国特許第7,025,962号、欧州特許第1947183B1号、米国特許第7,812,135号、米国特許第8,388,967号、米国特許第8,591,886号、欧州特許第1866339号、PCT公開第2011/028683号、PCT公開第2013/039954号、PCT公開第2005/007190号、PCT公開第2007/133822号、PCT公開第2005/055808号、PCT公開第99/40196号、PCT公開第2001/03720号、PCT公開第99/20758号、PCT公開第2006/083289号、PCT公開第2005/115451号、米国特許第7,618,632号、及びPCT公開第2011/051726号に記載されるGITR融合タンパク質が挙げられる。

30

【0288】

一実施形態では、対象に、ネイキッド抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体の投与に関連する副作用を低減又は改善する薬剤を投与することができる。

40

【0289】

一実施形態では、対象に、ネイキッド抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体の活性を増強する薬剤を投与することができる。例えば、一実施形態では、薬剤は、阻害分子を阻害する薬剤であることができる。阻害分子、例えば、プログラム死1（PD1）は、いくつかの実施形態では、免疫エフェクター応答を高めるCAR発現細胞の能力を低下させることができる。阻害分子の例としては、PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、及びTGFRベータが挙げられる。阻害分子の阻害は、例えば、DNA、RNA、又はタンパク質レベルでの阻害によって、ネイキッド抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体の能力を最適化す

50

ることができる。実施形態では、阻害核酸、例えば、阻害核酸、例えば、*dsRNA*、例えば、*siRNA*又は*shRNA*を使用して、CAR発現細胞又は二重特異性Ab反応性細胞における阻害分子の発現を阻害することができる。実施形態では、阻害剤は、*shRNA*である。一実施形態では、阻害シグナルの阻害剤は、例えば、阻害分子に結合する抗体又はその抗原結合断片であることができる。例えば、薬剤は、PD1、PD-L1、PD-L2、又はCTLA4に結合する抗体又はその抗原結合断片（例えば、イピリムマブ（MDX-010及びMDX-101とも呼ばれ、Yervoy（登録商標）として市販されている、Bristol-Myers Squibb；トレメリムマブ（Pfizerから入手可能なIgG2モノクローナル抗体、以前はチシリムマブ、CP-675、206として知られていた）であることができる。実施形態では、薬剤は、TIM3に結合する抗体又はその抗原結合断片である。実施形態では、薬剤は、LAG3に結合する抗体又はその抗原結合断片である。

10

【0290】

PD1は、CD28、CTLA-4、ICOS、及びBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの阻害メンバーである。PD1は、活性化B細胞、T細胞、及び骨髄細胞で発現される（Agata et al. 1996 Int. Immunol 8:765-75）。PD1、PD-L1、及びPD-L2に対する2つのリガンドは、PD1と結合すると、T細胞活性化を下方調節することが示されている（Freeman et al. 2000 J Exp Med 192:1027-34、Latchman et al. 2001 Nat Immunol 2:261-8、Carter et al. 2002 Eur J Immunol 32:634-43）。PD-L1は、ヒトがんにも豊富である（Dong et al. 2003 J Mol Med 81:281-7、Blank et al. 2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314、Konishi et al. 2004 Clin Cancer Res 10:5094）。免疫抑制は、PD1とPD-L1との局所相互作用を阻害することによって逆転することができる。PD1、PD-L1、及びPD-L2の抗体、抗体断片、及び他の阻害剤は、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載のPSMA標的化ネイキッド抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体と組み合わせて使用され得る。例えば、ニボルマブ（BMS-936558又はMDX1106とも称される、Bristol-Myers Squibb）は、PD1を特異的に遮断する完全なヒトIgG4モノクローナル抗体である。PD1に特異的に結合するニボルマブ（クローン5C4）及び他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第8,008,449号及びWO2006/121168に開示されている。ピディリズマブ（CT-011、Cure Tech）は、PD1ピディリズマブに結合するヒト化IgG1kモノクローナル抗体であり、他のヒト化抗PD1モノクローナル抗体は、WO2009/101611に開示されている。ランプロリズマブ（MK03475とも称される、Merck）は、PD1に結合するヒト化IgG4モノクローナル抗体である。ランプロリズマブ及び他のヒト化抗PD1抗体は、米国特許第8,354,509号及びWO2009/114335に開示されている。MDPL3280A（Genentech/Roche）は、PD-L1に結合するヒトFc最適化IgG1モノクローナル抗体である。PD-L1に対するMDPL3280A及び他のヒトモノクローナル抗体は、米国特許第7,943,743号及び米国公開第2012/0039906号に開示されている。他の抗PD-L1結合剤としては、YW243.55.S70（重鎖及び軽鎖可変領域は、WO2010/077634で配列番号20及び21に示される）及びMDX-1105（BMS-936559とも称され、例えば、WO2007/005874に開示される抗PD-L1結合剤）が挙げられる。AMP-224（B7-DC Ig、Amplimmune、例えば、WO2010/027827及びWO2011/066342に開示されている）は、PD1とB7-H1との間の相互作用を遮断するPD-L2 Fc融合可溶性受容体である。他の抗PD1抗体としては、AMP514（Amplimmune）、中でも、例えば、米国特許第8,609,089号、US201

20

30

40

50

0 / 0 2 8 3 3 0、及び／又はUS 2 0 1 2 / 0 1 1 4 6 4 9に開示されている抗PD1抗体が挙げられる。

【0291】

いくつかの実施形態では、CAR発現細胞の活性を増強する薬剤は、例えば、第1のドメイン及び第2のドメインを含む融合タンパク質であることができ、第1のドメインは、阻害分子又はその断片であり、第2のドメインは、陽性シグナルと関連するポリペプチド、例えば、本明細書に記載の細胞内シグナル伝達ドメインを含むポリペプチドである。いくつかの実施形態では、陽性シグナルと関連するポリペプチドは、例えば、CD28、CD27、ICOSの共刺激ドメイン、例えば、CD28、CD27及び／若しくはICOSの細胞内シグナル伝達ドメイン、並びに／又は例えば、本明細書に記載の一次シグナル伝達ドメイン、例えば、CD3ゼータを含むことができる。一実施形態では、融合タンパク質は、CARを発現した同じ細胞によって発現される。別の実施形態では、融合タンパク質は、細胞、例えば、抗PSMA CARを発現しないT細胞によって発現される。

10

【0292】

製剤及び投与経路

本発明の抗体、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体は、広範囲の製品における使用を見出し得る。一実施形態では、本発明の抗体、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体は、治療用、診断用、又は研究用試薬である。一実施形態では、本発明の抗体ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体は、治療剤である。いくつかの実施形態では、本発明の抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体は、工業使用のために使用される。本発明の抗体は、モノクローナル又はポリクローナルである抗体組成物における使用を見出し得る。本発明の抗体は、アゴニスト、アンタゴニスト、中和性、阻害性、又は刺激性であり得る。一実施形態では、本発明の抗体若しくは抗体断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体は、標的抗原を有する標的細胞、例えば、がん細胞を殺滅するために使用される。代替的な実施形態では、本発明の抗体は、標的抗原を遮断、拮抗、又はアゴナイズするために使用される。代替的な実施形態では、本発明の抗体は、標的抗原を遮断、アンタゴナイズ、又はアゴナイズし、標的抗原を有する標的細胞を殺滅するために使用される。別の実施形態では、標的細胞は、腫瘍細胞又はその血管新生である。一実施形態では、血管新生は、血管形成において重要な役割を果たし、また、本明細書に提供される抗体若しくは抗体断片、ADC、CAR発現細胞、又は二重特異性抗体の標的であるとみなされる。

20

30

【0293】

本開示は、好適な包装材料に包装された、薬学的製剤を含む、本発明の1つ以上の組成物を含むキットを更に提供する。別の実施形態では、キットは、本発明の抗体若しくはその抗原結合断片、CAR T若しくはCAR NK細胞、又は二重特異性抗体をコードする核酸を含む。追加の実施形態では、キットは、更に、発現制御エレメント、発現ベクター、ウイルス発現ベクター、アデノ随伴ウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、及びレトロウイルス発現ベクターを含む核酸を含む。更に追加の実施形態では、キットは、CAR T細胞又はCAR NK細胞などの、本発明の抗体又はその抗原結合断片を発現する細胞を含む。

40

【0294】

追加の実施形態では、キットは、インビトロ、インビボ、又はエクスピボで細胞において、抗体若しくは二重特異性抗体、又はその抗体、抗原結合断片、若しくは二重特異性抗体をコードする核酸を発現するための説明書を含む、標識又は包装添付文書を含む。更に追加の実施形態では、キットは、インビボ又はエクスピボで、本発明の抗体若しくはその抗原結合断片、ADC、CAR発現細胞、又はその二重特異性抗体を用いて対象（例えば、喘息を有するか、又は喘息を有するリスクにある対象）を治療するための説明書を含む、標識又は包装添付文書を含む。

【0295】

本明細書で使用される場合、「包装材料」という用語は、キットの構成要素を収容する

50

物理的構造を指す。包装材料は、構成要素を無菌的に維持することができ、かかる目的のために一般的に使用される材料（例えば、紙、段ボール、ガラス、プラスチック、箔、アンブルなど）で作製することができる。標識又は包装添付文書は、例えば、本発明の方法を行う、例えば、風邪を治療するなど、適切な書面説明を含むことができる。キットは、追加的に、本発明の方法でキット構成要素を使用するための説明書を更に含むことができる。

【0296】

説明書には、本明細書に記載される本発明の方法のいずれかを行うための説明書を含むことができる。したがって、本発明の医薬組成物は、対象への投与のための説明書と一緒に、容器、パック、又はディスペンサーに含めることができる。説明書は、満足 of いく臨床エンドポイント若しくは発生し得る任意の有害症状、又はヒト対象に使用するために食品医薬品局によって要求される追加情報の適応を更に含み得る。

【0297】

一実施形態では、本発明のポリペプチドは、ワクチンの一部として投与される。いくつかの実施形態では、ワクチンという用語は、任意の免疫調節組成物を包含することが理解されるべきであり、かかるワクチンは、本発明のポリペプチドに加えて、アジュバント、抗原、免疫調節化合物、又はそれらの組み合わせを含み得る。

【0298】

いくつかの実施形態では、アジュバントには、（A）アルミニウム化合物（例えば、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ヒドロキシリン酸アルミニウム、オキシヒドロキシド、オルトリン酸塩、硫酸塩など〔例えば、参照96の8及び9章を参照〕）、又は任意の好適な形態（例えば、ゲル、結晶、非晶質など）を有し、好ましい吸着を有する異なるアルミニウム化合物の混合物、（B）MF59（5%スクアレン、0.5% Tween 80、及び0.5% Span 85、マイクロフルイダイザーを使用してサブミクロン粒子に製剤化）、（C）リポソーム、（D）ISCOM、追加のデタージェントを欠いている場合がある、（E）SAF、10%スクアレン、0.4% Tween 80、5% プルロニックブロッックポリマーL121、及びthr-MDPを含有し、サブミクロンのエマルジョンにミクロ流動化されたか、又はより大きい粒子サイズのエマルジョンを生成するためにボルテックスされた、（F）Rib i（商標）アジュバントシステム（RAS）、（Rib i Immunoc hem）、2%スクアレン、0.2% Tween 80、並びにモノリン脂質A（MPL）、トレハロースジミコレート（TDM）、及び細胞壁骨格（CWS）からなる群からの1つ以上の細菌細胞壁構成要素、好ましくはMPL+CWS（Detox（商標））を含有する、（G）サポニンアジュバント、例えば、Quil A又はQS21など、Stimulon（商標）としても知られている、（H）キトサン、（I）完全フロイントアジュバント（CFA）及び不完全フロイントアジュバント（IFA）、（J）サイトカイン、例えば、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12など）、インターフェロン（例えば、インターフェロン- γ ）、マクロファージコロニー刺激因子、腫瘍壊死因子など、（K）モノホスホリル脂質A（MPL）又は3-O-デアシル化MPL（3dMPL）、（L）3dMPLとの組み合わせ、例えば、QS21及び／又は水中油エマルジョンと、（M）CpGモチーフを含むオリゴ核酸、すなわち、シトシンの代わりに任意選択で使用されている5-メチルシトシンを有する、少なくとも1つのCG二核酸を含有する、（N）ポリオキシエチレンエーテル又はポリオキシエチレンエステル、（O）オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤、又はオクトキシノールなどの少なくとも1つの追加の非イオン性界面活性剤と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテル若しくはエステル界面活性剤、（P）免疫刺激性オリゴ核酸（例えば、CpGオリゴ核酸）及びサポニン、（O）免疫刺激剤及び金属塩の粒子、（R）サポニン及び水中油エマルジョン、（S）サポニン（例えば、QS21）+3dMPL+IL12（任意選択で+ステロール）、（T）E. coli 熱不安定性エンテロトキシン（「LT」）、又はその解毒変異体、例えば、K63若しくはR72変異体、（U）コレラ

10

20

30

40

50

毒素（「C T」）、若しくはジフテリア毒素（「D T」）、又はそのいずれかの解毒変異体、（V）二本鎖RNA、（W）モノホスホリル脂質A模倣物、例えば、アミノアルキルグルコサミニドホスフェート誘導体、例えば、RC-529」、（X）ポリホスファゼン（PCPP）、あるいは（Y）生体接着剤、例えば、エステル化ヒアルロン酸マイクロスフェアなど、又は粘液接着剤、例えば、ポリ（アクリル酸）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、多糖類、及びカルボキシメチルセルロースの架橋誘導体などが含まれ得るが、これらに限定されない。

【0299】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片の投与は、病理学的状態の重症度を低減することが意図されている。「病理学的状態の重症度を低減する」という用語によって、本明細書に開示される方法、化合物、及び組成物を介した任意の低減が、本発明によって包含されるとみなされることを理解されたい。いくつかの実施形態では、重症度における低減は、生存の増強、又は別の実施形態では、疾患進行を停止すること、又は別の実施形態では、疾患進行における遅延を含み得る。

【0300】

一実施形態では、投薬は、投与される分子／化合物、又はそれを含む組成物に対する細胞応答性に依存する。一般に、上記の目的のために利用される用量は、変動するであろうが、当該技術分野の習熟した臨床医によって決定されるとき、所望の効果を発揮する有効量であろう。本明細書で使用される場合、「薬学的有効量」という用語は、患者における症状又は他の所望の表現型に所望の緩和をもたらす本明細書に記載の化合物の量を指す。

【0301】

一実施形態では、抗体又はその抗原結合断片の濃度は、治療されるべき状態の性質、患者の状態、投与経路、及び組成物の個々の忍容性を含む様々な要因に依存するであろう。

【0302】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物のうちのいずれかは、本明細書に記載される抗体又はその抗原結合断片から本質的になる。いくつかの実施形態では、「含む」という用語は、本発明の抗体又はその抗原結合断片などの示された活性剤、並びに製薬業界で知られているような他の活性剤、及び薬学的に許容される担体、賦形剤、軟化剤、安定剤などの包含を指す。

【0303】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物は、本明細書に記載されるポリペプチド／ポリ核酸／ベクターから本質的になる。いくつかの実施形態では、「から本質的になる」という用語は、特定のクラスの薬剤の唯一の活性成分が指示された活性成分である組成物を指すが、しかしながら、指示された活性成分の治療効果に直接的に関与する他の化合物が含まれ得る。いくつかの実施形態では、「から本質的になる」という用語は、特定の機構を標的とするか、又は特定の経路を介して作用する唯一の活性成分が指示された活性成分である組成物を指すが、しかしながら、指示された活性成分の治療効果に直接的に関与する他の化合物が含まれ得、例えば、指示された薬剤に関連するが、直接的ではない作用機構を有する。いくつかの実施形態では、「から本質的になる」という用語は、唯一の活性成分が示される活性成分である組成物を指す。しかしながら、製剤を安定化、保存するなどのためであるが、指指示された活性成分の治療効果に直接的に関与しない他の化合物が含まれ得る。いくつかの実施形態では、「から本質的になる」という用語は、活性成分の放出を促進する構成要素を指し得る。いくつかの実施形態では、「からなる」という用語は、活性成分と、薬学的に許容される担体又は賦形剤と、を含む組成物を指す。

【0304】

特定の場合における抗体又は抗原結合断片の実際の量は、製剤化された特定の組成物、適用の方式、並びに治療される特定の条件及び生物に応じて変化することを理解されたい。所与の宿主のための投薬量は、従来の考慮事項を使用して、例えば、適切な従来の薬理学的プロトコルによって、例えば、主題の化合物と既知の薬剤との差別的活性の慣習的な比較によって決定することができる。

【0305】

一実施形態では、本発明の化合物は、一時的な状態の急性治療のために急性的に投与されるか、又は慢性的に、特に進行性、再発性、若しくは変性疾患の症例では、慢性的に投与され得る。一実施形態では、本発明の1つ以上の化合物は、同時に投与され得るか、又は別の実施形態では、それらは、ずらした方式で投与され得る。一実施形態では、ずらした方式は、疾患の段階又は病期によって決定され得る。

【0306】

非経口ビヒクル（皮下、静脈内、動脈内、又は筋肉内注射用）には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース、塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液、及び固定油が含まれる。静脈内ビヒクルには、リンゲルデキストロースに基づくものなどの流体及び栄養補充剤、電解質補充剤などが含まれる。例は、界面活性剤及び他の薬学的に許容されるアジュバントの添加を伴うか又は伴わずに、水及び油などの無菌液体である。一般に、水、食塩水、デキストロース水溶液、及び関連する糖溶液、並びにプロピレングリコール又はポリエチレングリコールなどのグリコールは、特に注射可能な溶液のための好ましい液体担体である。油の例は、石油、動物、植物、又は合成起源のものであり、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱物油、オリーブ油、ヒマワリ油、及び魚肝油である。

10

【0307】

一実施形態では、投与経路は、非経口、又はそれらの組み合わせであり得る。別の実施形態では、経路は、眼内、結膜、局所、経皮、皮内、皮下、腹腔内、静脈内、動脈内、膈、直腸、腫瘍内、がん近傍（*paracancer al*）、経粘膜、筋肉内、血管内、脳室内、頭蓋内、吸入（エアロゾル）、鼻腔吸引（スプレー）、鼻腔内（滴）、舌下、経口、エアロゾル、若しくは坐剤、又はそれらの組み合わせであり得る。一実施形態では、投薬レジメンは、治療される状態の正確な性質、状態の重症度、患者の年齢及び一般的な身体状態、体重、及び個々の患者の応答などの要因に基づいて、習熟した臨床医によって決定される。

20

【0308】

鼻腔内投与又は吸入による適用のために、混合され、適切な担体の存在下でエアロゾル化又は噴霧される化合物の溶液又は懸濁液が好適である。かかるエアロゾルは、本明細書に記載の任意の薬剤を含み得る。

【0309】

非経口適用のために、注射可能な無菌溶液、好ましくは油性又は水性溶液、並びに坐剤及び浣腸剤を含む懸濁液、エマルション、又はインプラントが特に好適である。アンプルは、便利な単位投薬である。かかる坐剤は、本明細書に記載の任意の薬剤を含み得る。

30

【0310】

持続放出又は直接放出組成物は、例えば、リポソーム、又は抗体若しくは抗原結合断片が、例えば、マイクロカプセル化、複数コーティングなどによって、差次的に分解可能なコーティングで保護されるものを製剤化することができる。かかる組成物は、即時又は遅延放出のために製剤化され得る。新しい化合物を凍結乾燥し、得られた凍結乾燥物を使用して、例えば、注射用の生成物を調製することも可能である。

【0311】

液体製剤では、薬学的に許容される担体は、水性又は非水性溶液、懸濁液、エマルション、又は油であり得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、及びオレイン酸エチルのような注入可能な有機エステルである。

40

【0312】

水性担体には、生理食塩水及び緩衝化媒体を含む、水、アルコール性／水性溶液、エマルション、又は懸濁液が含まれる。油の例は、石油、動物、植物、又は合成起源のものであり、例えば、ピーナッツ油、ダイズ油、鉱物油、オリーブ油、ヒマワリ油、及び魚肝油である。

【0313】

一実施形態では、本発明の方法の組成物、又は本発明の方法で使用される組成物は、単

50

独で、又は組成物中で投与され得る。別の実施形態では、活性化合物と有害に反応しない、従来の賦形剤、すなわち、非経口、経腸（例えば、経口）、又は局所適用に好適な薬学的に許容される有機又は無機担体物質と混合した本発明の組成物が使用され得る。一実施形態では、好適な薬学的に許容される担体としては、水、塩溶液、アルコール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、炭水化物であるラクトース、アミロース、又はデンプンなど、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、白色パラフィン、グリセロール、アルギン酸、ヒアルロン酸、コラーゲン、香油、脂肪酸モノグリセリド、及びジグリセリド、ペンタエリスリトール脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられるが、これらに限定されない。別の実施形態では、医薬調製物を滅菌し、所望の場合、活性化合物と有害に反応しない補助剤、例えば、潤滑剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝剤、着色剤、香料、及び／又は芳香物質などと混合することができる。別の実施形態では、それらはまた、所望される場合、他の活性剤、例えば、ビタミンと組み合わせることができる。

10

20

30

40

50

【0314】

医薬組成物には、「薬学的に許容される」及び「生理学的に許容される」担体、希釈剤、又は賦形剤が含まれる。一実施形態では、「薬学的に許容される」及び「生理学的に許容される」という用語は、安全であり、本発明で使用するための有効量の少なくとも1つの抗体又は抗原結合断片の所望の投与経路に適切な送達を提供する任意の製剤を指す。この用語は、その上、緩衝化製剤の使用も指し、pHは、化合物の安定性及び投与経路に従って、pH 4.0～pH 9.0の範囲の特定の所望の値に維持される。これらの用語は、薬学的投与と適合性のある溶媒（水性又は非水性）、溶液、エマルション、分散媒、コーティング剤、等張剤、及び吸収促進又は遅延剤を含む。かかる製剤は、液体：エマルション、懸濁液、シロップ、若しくはエリキシル剤、又は固体形態：錠剤（コーティング又は非コーティング）、カプセル（硬質又は軟質）、粉末、顆粒、結晶、若しくはマイクロビーズに含有することができる。補助的な活性化合物（例えば、保存剤、抗細菌剤、抗ウイルス剤、及び抗真菌剤）も組成物中に組み込むことができる。

【0315】

本発明の医薬組成物は、ナイトロジェンマスタード（例えば、シクロホスファミド及びイホスファミド）、アジリジン（例えば、チオテパ）、アルキルスルホネート（例えば、ブスルファン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン及びストレプトゾシン）、白金複合体（例えば、カルボプラチン及びシスプラチン）、非古典的アルキル化剤（例えば、ダカルバジン及びテモゾールアミド）、葉酸類似体（例えば、メトトレキサート）、プリン類似体（例えば、フルダラビン及びメルカプトプリン）、アデノシン類似体（例えば、クラドリビン及びペントスタチン）、ピリミジン類似体（例えば、フルオロウラシル（単独で又はロイコボリンと組み合わせて）及びゲムシタビン）、置換尿素（例えば、ヒドロキシ尿素）、抗腫瘍抗生物質（例えば、ブレオマイシン及びドキソルビシン）、エピドフィロトキシン（例えば、エトポシド及びテニポシド）、微小管剤（例えば、ドセタキセル及びパクリタキセル）、カンプトテシン類似体（例えば、イリノテカン及びトポテカン）、酵素（例えば、アスパラギナーゼ）、サイトカイン（例えば、インターロイキン-2及びインターフェロン- α ）、モノクローナル抗体（例えば、トラスツズマブ及びペバシズマブ）、組換え毒素及び免疫毒素（例えば、組換えコレラ毒素-B及びTP-38）、がん遺伝子療法、物理的療法（例えば、温熱療法、放射線療法、及び手術）、並びにがんワクチン（例えば、テロメラーゼに対するワクチン）からなる群から選択される1つ以上の更なる化学療法剤を含むことができる。

【0316】

本発明の組成物（例えば、抗体、二重特異性分子）はまた、補体と一緒に投与することができる。したがって、ヒト抗体、多重特異性又は二重特異性分子、及び血清又は補体を含む組成物は、本発明の範囲内である。これらの組成物は、補体が、ヒト抗体、多重特異性又は二重特異性分子に近接して配置される点で有利である。代替的に、本発明のヒト抗

体、多重特異性又は二重特異性分子と、補体又は血清とは、別々に投与することができる。

【0317】

医薬組成物は、特定の局所的又は全身的投与経路と適合性であるように製剤化することができる。したがって、医薬組成物は、特定の経路による投与に好適な担体、希釈剤、又は賦形剤を含む。本発明の組成物の投与経路の特定の非限定的な例は、吸入又は鼻腔内送達である。追加の経路には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口、経皮（局所）、経粘膜、及び直腸投与が含まれる。

【0318】

非経口、皮内、又は皮下適用に使用される溶液又は懸濁液は、注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、又は他の合成溶媒などの無菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗細菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸、クエン酸、又はリン酸などの緩衝剤；及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの張度調整のための薬剤を含むことができる。pHは、塩酸又は水酸ナトリウムなどの酸又は塩基で調整することができる。

【0319】

注射用の医薬組成物は、無菌水溶液（水溶性の場合）又は分散液、及び無菌注射液又は分散液の即時調製のための無菌粉末を含む。静脈内投与では、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF、Parsippany, N. J.）、又はリン酸緩衝化生理食塩水（PBS）が挙げられる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びそれらの好適な混合物を含有する溶媒又は分散媒であることができる。流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合に必要な粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって維持することができる。抗細菌剤及び抗真菌剤としては、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、及びチメロサルが挙げられる。等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物に含めることができる。吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを含むことは、注射用組成物の吸収を延長することができる。

【0320】

無菌注射用溶液は、抗体又はその抗原結合断片を必要量で、上記成分の1つ又は組み合わせを有する適切な溶媒に組み込み、続いて濾過滅菌することによって調製することができる。一般に、分散は、抗体又はその抗原結合断片を、基本的な分散媒及び上記のような他の成分を含有する無菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。無菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法は、例えば、活性成分及び任意の追加の所望の成分の粉末を、予め滅菌濾過したその溶液から生じる、真空乾燥及び凍結乾燥を含む。

【0321】

経粘膜又は経皮投与では、障壁に浸透するのに適した浸透剤が、製剤に使用される。かかる浸透剤は、当技術分野で一般に既知であり、例えば、経粘膜投与では、デタージェント、胆汁塩、及びフシジン酸誘導体を含む。経粘膜投与は、鼻腔スプレー、吸入デバイス（例えば、吸引器）、又は坐剤の使用を通して達成することができる。経皮投与では、活性化合物は、当技術分野で一般に既知であるように、軟膏、膏薬、ゲル、又はクリームに製剤化される。

【0322】

部分配列及び修飾形態並びにそれらをコードする核酸を含む本発明の抗体は、制御放出製剤又はモノステアリン酸グリセリル若しくはステアリン酸グリセリルなどの時間遅延材料などの、体からの急速な排除から保護する担体を用いて調製することができる。組成物はまた、局所的又は全身的な持続的送達又は制御放出を達成するために、インプラント及びマイクロカプセル化送達システムを使用して送達することができる。

【0323】

エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用することができる。かかる製剤の調製のための方法は、当業者には明白であろう。材料はまた、Alza Corporation及びNova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に入手することができる。リボソーム懸濁液（抗体又はウイルスコーティングタンパク質を使用して細胞又は組織を標的とするリボソームを含む）はまた、薬学的に許容される担体として使用することができる。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号に記載されるように、当業者に既知の方法に従って調製することができる。

【0324】

本発明の方法における投与のための組成物に好適な追加の薬学的製剤は、当該技術分野で周知である（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, N. J., 及びPharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993) を参照）。薬学的製剤は、投与の容易さ及び投薬の均一性のために、投薬単位形態で包装することができる。本明細書で使用される「投薬単位形態」は、治療される対象のための単位投薬量として適切な物理的に別個の単位を指し、各単位は、所望の治療効果を生じさせるように計算された所定の量の抗体又はその抗原結合断片を薬学的担体又は賦形剤とともに含有する。

【0325】

本明細書に提供される医薬組成物は、主に、ヒトへの投与に好適な医薬組成物に向けられるが、かかる組成物が、一般に、あらゆる種類の動物への投与に好適であることが当業者によって理解されるであろう。様々な動物への投与に好適な組成物にするために、ヒトへの投与に好適な医薬組成物の修正が十分に理解されており、習熟した獣医薬理学者は、かかる修正を、もしあれば、ほとんど実験せずに設計及び実施することができる。本発明の医薬組成物の投与が企図される対象には、ヒト及び他の霊長類、並びに他の哺乳動物が含まれるが、これらに限定されない。

【0326】

本明細書に記載のポリペプチドに対して配列、構造的、又は機能的相同性を示す任意のアミノ酸配列は、天然又は任意の手段による合成で得られるかにかかわらず、本発明の一部とみなされることを理解されたい。

【0327】

任意の公開、特許出願、又は発行された特許への言及は、参照によりその全体が本明細書に完全に組み込まれるとみなされることが理解されるべきである。

【0328】

治療用化合物によって調節される特定の活性を測定するための任意のアッセイが、化合物の有効性、一実施形態では、化合物の最適な負荷、別の実施形態では、タイミング、及び投薬量、別の実施形態では、又はそれらの組み合わせを決定する手段として用いられ得ることを理解されたい。

【0329】

P S M Aを検出する方法

本明細書に提供される抗体、抗原結合断片、又は組成物は、診断又は治療手順において使用することができるが、当業者によって理解されるべきである。

【0330】

一実施形態では、本明細書において、対象における腫瘍又はがん成長の存在を診断する方法が提供される。別の実施形態では、方法は、本明細書に提供される抗体又は抗原結合断片を含む組成物とともに、対象から単離された組織試料をサンプリングすることを含み

、それによって、組織試料への抗体又は抗原結合断片の特異的結合は、対象における腫瘍又はがん成長の存在を示す。

【0331】

別の実施形態では、方法は、抗体又は抗原結合断片に特異的に結合するが、抗体又は抗原結合断片のその標的への結合と拮抗しない二次試薬を検出することを更に含む。別の実施形態では、「二次試薬」は、光活性化可能な薬剤、酵素、タグ、標識、フルオロフォア、放射性同位体、生物発光タンパク質、生物発光ペプチド、蛍光タグ、蛍光タンパク質、又は蛍光ペプチドである。

【0332】

一実施形態では、「がん」及び「がん性」という用語は、一実施形態では、典型的には、未制御の細胞増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか、又は説明する。がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫（脂肪肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍、中皮腫、シュワン腫、髄膜腫、腺がん、黒色腫、及び白血病又はリンパ性悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。

【0333】

一実施形態では、「がん」という用語には、卵巣がん、乳がん、膠芽腫、胃腸がんが含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態では、がんは、前立腺がんである。

【0334】

別の実施形態では、「サンプリング」は、抗体若しくは抗原結合断片と複合体化されているか、又はコンジュゲートされており、抗体又は抗原結合断片が標的に特異的に結合しているときに検出可能な「シグナル」を放出する二次試薬の検出を可能にする検出アッセイを使用して、試料を試験又は分析するステップを含む。別の実施形態では、検出は、限定されないが、免疫学的アッセイ（例えば、免疫組織化学、ELISAなど）又は顕微鏡イメージングなどの当該技術分野で日常的に使用されるアッセイを使用して達成される。

【0335】

一実施形態では、「標識された」という用語は、スクリーンにおける検出を可能にするように結合された1つ以上の要素、同位体、又は化学化合物を有する本発明の抗体を指す。一般に、標識は、3つのクラス：a) 抗体によって認識される融合パートナーとして組み込まれるエピトープであり得る、免疫標識と、b) 放射性同位体又は重同位体であり得る、同位体標識と、c) 蛍光及び熱量測定色素又は他の標識方法を可能にするビオチンなどの分子を含み得る、小分子標識と、に分けられる。一実施形態では、本発明の抗体は、ビオチンで標識される。他の関連する実施形態では、本発明のビオチン化抗体は、例えば、イメージング剤として、又は1つ以上のリガンド分子を特定する手段として使用される。別の実施形態では、標識は、抗体又は抗原結合断片に結合すると、検出又は視覚化することができるナノ粒子であり得る。標識は、任意の位置で化合物に組み込まれ得、またタンパク質発現中にインビトロ又はインビボで組み込まれ得る。

【0336】

一実施形態では、本明細書に提供される抗体又は抗原結合断片及び二次試薬によって形成されるコンジュゲートは、限定されないが、フローサイトメトリー、ELISA、ウェスタンブロッティング、免疫組織化学、膜アッセイ、並びに本明細書に更に記載されるような、又は当該技術分野で日常的に適用されるような診断及び治療方法などの様々な適用のために使用される。

【0337】

異常なPSMA発現を有する腫瘍のイメージング

一実施形態では、本発明の組成物は、標的抗原、タンパク質、又は他の分子の不適切な発現を伴う疾患を有する対象に投与される。例えば、一実施形態では、PSMAに結合する抗体又はその抗原結合断片を含む組成物は、対象におけるPSMAの存在、存在量、位置、又はそれらの組み合わせを検出するために投与される。例えば、存在するタンパク質の量における変化、タンパク質の局在化、翻訳後修飾、立体構造状態、変異体又は病原体タンパク質の存在などに起因する、異常なタンパク質を特徴とする疾患及び障害は、本開

10

20

30

40

50

示の範囲内である。同様に、疾患又は障害は、多糖及びガングリオシドを含むがこれらに限定されない分子における変化を特徴とし得る。過剰量は、正常と比較して、分子レベルでの過剰発現、作用部位での延長したか若しくは蓄積した出現、又はタンパク質の増加した活性を含むが、これらに限定されない任意の原因に起因し得る。この定義内には、タンパク質の減少を特徴とする疾患及び障害が含まれる。この減少は、限定されないが、正常と比較して、分子レベルでの低下した発現、作用部位での短縮又は減少した出現、タンパク質の変異体、又はタンパク質の低下した活性を含むが、これらに限定されない任意の原因に起因し得る。タンパク質のかかる過剰又は減少は、タンパク質の正常な発現、出現、又は活性と比較して測定することができ、測定は、本発明の抗体の開発及び／又は臨床試験において重要な役割を果たし得る。

10

【0338】

一実施形態では、開示される抗体又はその抗原結合断片は、対象に投与されたときに、前立腺がん細胞などの腫瘍細胞で発現される抗原に結合する。別の実施形態では、対象に投与された抗体又はその抗原結合断片は、肺がん、肝臓がん、膵臓がん、結腸がん、胃がん、乳がん、卵巣がん、腎臓がん、前立腺がん、膀胱がん、黒色腫、神経膠腫などを含むがこれらに限定されない、P S M A 陽性血管新生を有する腫瘍などの固形腫瘍の血管新生で発現される抗原に結合する。

【0339】

一実施形態では、本明細書において、P S M A 含有腫瘍をイメージングする方法が提供される。いくつかの実施形態では、方法は、対象に、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片を投与すること、又は組織試料を抗体又はその抗原結合断片と接触させることを含む。別の実施形態では、前立腺又は他のタイプの固形腫瘍は、抗体又は抗原結合断片がその標的、例えば、P S M A 含有組織又は器官に結合していると視覚化することができる。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、二次試薬に操作可能に連結されている。更に別の実施形態では、二次試薬は、光活性化可能な薬剤、酵素、タグ、標識、フルオロフォア、放射性同位体、生物発光タンパク質、生物発光ペプチド、蛍光タグ、蛍光タンパク質、又は蛍光ペプチドを含む。二次試薬の非限定的な例が、以下に提供される。

20

【0340】

一実施形態では、検出可能な標識又はそれに結合される二次試薬には、蛍光標識（例えば、フルオレセイン、イソチオシアネート（F I T C）、シアニン色素など）、親和性標識（例えば、ビオチン、アビジン、プロテインAなど）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）、若しくは同位体標識（例えば、 ^{124}I ）、又は抗体の検出及び単離を可能にする任意の他のかかる検出可能な部分などの標識を含むが、これらに限定されない。

30

【0341】

変化した可変領域の集団内の結合種を特定するための検出方法は、直接的又は間接的であることができ、例えば、光放出、放射性同位体、熱量測定色素、及びフルオロクロムの測定を含むことができる。直接的検出は、中間体又は二次測定手順なしで操作して、結合した抗原又はリガンドの量を評価する方法を含む。かかる方法は、一般に、それ自体が、例えば、放射性、光放出、又は蛍光部分によって標識されているリガンドを用いる。これに対して、間接的検出は、中間体又は二次測定手順を介して操作する方法を含む。これらの方法は、一般に、抗原又はリガンドと特異的に反応し、それ自体が二次試薬によって直接的に標識され得るか又は検出され得る分子を使用する。例えば、リガンドに特異的な抗体は、リガンドに特異的な第1の抗体と相互作用することができる二次抗体を使用し、直接的検出のために上記の検出方法を再度使用して検出することができる。間接的な方法は、酵素標識による検出を追加的に用いることができる。更に、触媒抗体のスクリーニングの具体例として、基質の消失又は生成物の出現は、結合親和性又は触媒活性の間接的尺度として使用することができる。

40

【0342】

50

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、近赤外線色素で標識される。例えば、抗体又はその抗原結合断片は、IRDye 800CW又はインドシアニンググリーン（ICG）で標識され得る。

【0343】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y、¹⁶⁶Ho、¹⁵³Sm、²¹⁵Bi、及び²²⁵Acを含むがこれらに限定されない、放射性金属イオンをポリペプチドにコンジュゲートするのに有用な大環状キレート剤に結合される。いくつかの実施形態では、本発明の抗体に結合した大環状キレート剤に関連する放射性金属イオンは、¹¹¹Inである。いくつかの実施形態では、本発明の抗体ポリペプチドに結合した大環状キレート剤に関連する放射性金属イオンは、⁹⁰Yである。10 特定の実施形態では、大環状キレート剤は、1, 4, 7, 10-テトラアザサイクロドデカン-N, N', N'', N'''-四酢酸（DOTA）である。特定の実施形態では、大環状キレート剤は、直角位相-（5-イソチオシアナト-2-メトキシフェニル）-1, 4, 7, 10-テトラアザサイクロドデカン-1, 4, 7, 10-四酢酸である。他の特定の実施形態では、DOTAは、リンカー分子を介して本発明の抗体に結合されている。DOTAなどの大環状キレート剤をポリペプチドにコンジュゲートするのに有用なリンカー分子の例は、当技術分野で一般に既知であり、例えば、DeNardo et al., Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90, 1998、Peterson et al., Bioconjug. Chem. 10 (4): 553-7, 1999、及びZimmerman et al., Nucl. Med. Biol. 26 (8): 943-50, 1999を参照されたく、これらは、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。加えて、抗体にコンジュゲートされ得るキレート剤、並びにそれらを作製及び使用する方法を開示する米国特許第5, 652, 361号及び同第5, 756, 065号は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。20

【0344】

定義

本開示による組成物及び方法の詳細な説明の理解を助けるために、本開示の様々な態様の明確な開示を容易化するように、いくつかの明示的な定義が提供される。別段の定義がされない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する分野における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。30

【0345】

本明細書で使用される場合、本明細書で使用される「コンジュゲート」又は「コンジュゲーション」又は「連結」という用語は、1つのエンティティを形成する2つ以上のエンティティの結合を指す。コンジュゲートは、ペプチド-小分子コンジュゲート並びにペプチド-タンパク質／ペプチドコンジュゲートの両方を包含する。

【0346】

「実質的な同一性」又は「実質的に同一」という用語は、核酸又はその断片を指すとき、別の核酸（又はその相補鎖）と、適切なヌクレオチド挿入又は欠失で最適に整列した場合、以下で論じられるように、FASTA、BLAST、又はGAPなどの配列同一性の任意の周知のアルゴリズムによって測定されるとき、少なくとも約90%、又は少なくとも約95%、96%、97%、98%、若しくは99%のヌクレオチド塩基にヌクレオチド配列同一性があることを示す。参照核酸分子に対して実質的な同一性を有する核酸分子は、特定の事例では、参照核酸分子によってコードされるポリペプチドと同じか又は実質的に類似のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。40

【0347】

ポリペプチドに適用される場合、「実質的な類似性」又は「実質的に類似」という用語は、2つのペプチド配列が、既定のギャップ重み付けを使用するプログラムGAP又はBESTFITによってなど最適に整列した場合、少なくとも90%の配列同一性、又は少なくとも95%、98%、又は99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換で異なる。「保存的アミノ酸置換」と50

は、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）を備えた側鎖（R基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されるものである。概して、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変化させないであろう。2つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合、類似性の割合又は程度は、置換の保存的性質について補正するために上向きに調整され得る。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331を参照されたく、本明細書に参照により組み込まれる。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸のグループの例としては、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン、2) 脂肪族-ヒドロキシル側鎖：セリン及びスレオニン、3) アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン、4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、5) 塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン、6) 酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸、並びに7) 含硫黄側鎖：システイン及びメチオニンが挙げられる。いくつかの実施形態では、保存的アミノ酸置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、及びアスパラギン-グルタミンである。代替的に、保存的置換は、参照により本明細書に組み込まれる、Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-45に開示されているPAM250対数尤度マトリックスにおいて正の値を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換は、PAM250対数尤度マトリックスにおいて負でない値を有する任意の変化である。

10

20

【0348】

ポリペプチドにおける配列類似性は、典型的には、配列分析ソフトウェアを使用して測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む種々の置換、欠失、及び他の改変に割り当てられた類似性の尺度を使用して類似した配列を一致させる。例えば、GCGソフトウェアは、GAP及びBESTFITなどのプログラムを含み、これらは、異なる種の生物からの相同ポリペプチドなどの密接に関連するポリペプチド間の、又は野生型タンパク質とその変異タンパク質との間の、配列相同性又は配列同一性を決定する既定のパラメータを用いて使用することができる。例えば、GCG Version 6.1を参照されたい。ポリペプチド配列はまた、GCGバージョン6.1におけるプログラムを、デフォルト又は推奨パラメータを用いてFASTAを使用して比較することができる。FASTA（例えば、FASTA2及びFASTA3）は、クエリー及び探索配列との間の最良の重複部分の領域のアラインメント及び配列同一性パーセントを提供する（Pearson (2000) 上記）。本発明の配列を、異なる生物からの多数の配列を含むデータベースと比較するとき、別の好ましいアルゴリズムは、既定パラメータを使用する、コンピュータプログラムBLAST、特にBLASTP又はTBLASTNである。例えば、Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410及び(1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402を参照されたく、それらの各々は、参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0349】

本明細書で使用される場合、「Kassoc」又は「Ka」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指すことが意図され、一方、本明細書で使用される場合、「Kdis」又は「Kd」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指すことが意図される。本明細書で使用される場合、「KD」という用語は、Kd対Kaの比（すなわち、Kd/Ka）から得られ、モル濃度（M）として表される解離定数を指すことが意図される。抗体のKD値は、当該技術分野において十分に確立された方法を使用して決定することができる。例として、抗体のKDを決定するための好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用すること、好ましくはBIAcoreシステムなどのバイオセンサーシステムを使用することである。

40

【0350】

本明細書で使用される場合、「検出可能な標識」という用語は、放射性同位体、蛍光体

50

、化学発光体、発色団、酵素、酵素基質、酵素補助因子、酵素阻害剤、発色団、色素、金属イオン、金属ゾル、リガンド（例えば、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン又はハプテン）、挿入（*intercalating*）色素などを含むがこれらに限定されない、検出可能な分子を指す。「蛍光体」という用語は、検出可能な範囲で蛍光を示すことができる物質又はその一部を指す。

【0351】

多くの実施形態では、「対象」及び「患者」という用語は、対象が任意の形態の治療を受けるか、又は現在受けているかにかかわらず、互換的に使用される。本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、及びマウス、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、チンパンジーなどのサル）、並びにヒト）を含むがこれらに限定されない任意の脊椎動物を指し得る。対象は、ヒト又は非ヒトであり得る。より例示的な態様では、哺乳動物は、ヒトである。本明細書で使用される場合、「それを必要とする対象」又は「それを必要とする患者」という表現は、障害（例えば、神経障害、自己免疫疾患、及び心臓血管疾患）の1つ以上の症状若しくは徴候を示し、かつ／又は炎症性障害を有すると診断されている、ヒト又は非ヒト哺乳動物を意味する。いくつかの実施形態では、対象は、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。

10

【0352】

本明細書で使用される場合、「疾患」という用語は、いずれも、正常な機能を損ない、典型的には明瞭な徴候及び症状によって明らかとなり、ヒト又は動物の生命の継続時間又は質を低下させる、ヒト若しくは動物の身体又はその一部の異常な状態（例えば、炎症性疾患、がん）を反映するという点で、（医学的状态における）「障害」及び「状態」という用語と一般的に同義であることが意図され、互換的に使用される。

20

【0353】

「減少する」、「低下した」、「低下」、「減少する」、又は「阻害する」という用語は全て、概して、統計的に有意な量による減少を意味するために本明細書で使用される。しかしながら、疑義を避けるために、「低下した」、「低下」、「減少する」、又は「阻害する」とは、参照レベルと比較して、少なくとも10%の減少、例えば、参照レベルと比較して、少なくとも約20%、若しくは少なくとも約30%、若しくは少なくとも約40%、若しくは少なくとも約50%、若しくは少なくとも約60%、若しくは少なくとも約70%、若しくは少なくとも約80%、若しくは少なくとも約90%、若しくは最大で100%の減少（例えば、参照試料と比較して、存在しないレベル）を含む減少、又は参照レベルと比較して、10～100%の間の任意の減少を意味する。

30

【0354】

本明細書で使用される場合、「薬剤」という用語は、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的巨大分子（核酸、抗体、タンパク質、又はそれらの一部、例えば、ペプチドなど）、又は細菌、植物、真菌、若しくは動物（特に哺乳動物）の細胞若しくは組織などの生体材料から作製された抽出物を示す。かかる薬剤の活性は、対象において局所的又は全身的に作用する生物学的、生理学的、又は薬理学的に活性な物質（複数可）である「治療剤」としてそれを好適にし得る。

40

【0355】

本明細書で使用される場合、「治療用薬剤」、「治療可能な薬剤」、又は「治療剤」という用語は、互換的に使用され、対象への投与でいくつかの有益な効果を付与する分子又は化合物を指す。有益な効果には、診断的決定の実施可能性；疾患、症状、障害、又は病理学的状態の緩和；疾患、症状、障害、又は状態の発症を低減又は予防すること；並びに一般に疾患、症状、障害、又は病理学的状態に対抗することが含まれる。

【0356】

「治療効果」という用語は、当技術分野で認識されており、薬理学的に活性な物質によって引き起こされる、動物、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒトにおける局所又は

50

全身効果を指す。

【0357】

「有効量」、「有効用量」、又は「有効投薬量」という用語は、所望の効果を達成するか、又は少なくとも部分的に達成するのに十分な量として定義される。薬物又は治療剤の「治療有効量」又は「治療有効投薬量」は、単独で又は別の治療剤と組み合わせて使用される場合、疾患症状の重症度における減少、疾患無症状期間の頻度及び期間における増加、又は疾患の苦痛に起因する機能障害若しくは無力の防止によって証明される疾患退縮を促進する薬物の任意の量である。薬物の「予防有効量」又は「予防有効投薬量」は、疾患を発症するリスクにあるか又は疾患の再発に罹患するリスクがある対象に、単独又は別の治療剤と組み合わせて投与されたときに、疾患の発症又は再発を阻害する薬物の量である。疾患退縮を促進するか、又は疾患の発症若しくは再発を阻害する治療剤又は予防剤の能力は、習熟した医師に既知の様々な方法を使用して、例えば、臨床試験中のヒト対象において、ヒトにおける効能を予測する動物モデル系において、又はインビトロアッセイにおいて薬剤の活性をアッセイすることによって評価することができる。

10

【0358】

用量は、多くの場合、体重に関連して表される。したがって、[g、mg、又は他の単位] / kg（又はg、mgなど）として表される用量は、通常、「体重」という用語が明確に言及されていなくても、「kg（又はg、mgなど）体重当たりの」[g、mg、又は他の単位]を指す。

【0359】

本明細書で使用される場合、「組成物」又は「医薬組成物」という用語は、本発明内で有用な少なくとも1つの構成要素と、担体、安定剤、希釈剤、分散剤、懸濁剤、増粘剤、及び／又は賦形剤などの他の構成要素との混合物を指す。医薬組成物は、本発明の1つ以上の構成要素の生物への投与を容易にする。

20

【0360】

「併用」療法は、本明細書で使用される場合、文脈から別途明確でない限り、調整された方式での2つ以上の治療剤の投与を包含することを意味し、同時投与を含むが、これに限定されない。具体的には、併用療法は、共投与（例えば、共製剤の投与又は別個の治療組成物の同時投与）、及び連続又は逐次投与の両方を包含するが、ただし、1つの治療剤の投与は別の治療剤の投与に何らかの方法で条件付けられている。例えば、1つの治療剤は、異なる治療剤が投与され、所定の期間作用させた後にのみ投与され得る。例えば、Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423を参照されたい。

30

【0361】

本明細書で使用される場合、「共投与」又は「共投与された」という用語は、対象への少なくとも2つの薬剤又は療法の投与を指す。いくつかの実施形態では、2つ以上の薬剤／療法の共投与は、同時である。他の実施形態では、第1の薬剤／療方は、第2の薬剤／療法の前に投与される。当業者は、使用される様々な薬剤／療法の製剤及び／又は投与経路が変化し得ることを理解する。

【0362】

本明細書で使用される「接触する」という用語は、構成要素の任意のセットに関して使用される場合、接触させられる構成要素が同じ混合物中に混合される（例えば同じ区画又は溶液に添加される）任意のプロセスを含み、言及された構成要素間の実際の物理的接触を必ずしも必要とするものではない。言及された構成要素は、任意の順序又は任意の組み合わせ（又はサブ組み合わせ）で接触させられてもよく、任意に他の言及された構成要素の添加に先立って、1つ又はいくつかの言及された構成要素が後続して混合物から除去される状況も含み得る。例えば、「AをB及びCと接触させること」は、以下：（i）AがCと混合され、次いでBが混合物に添加される状況、（ii）A及びBが混合物に混合され、Bが混合物から除去され、次いでCが混合物に添加される状況、及び（iii）Aが、BとCとの混合物に添加される状況、のうちのいずれか及び全てを含む。

40

【0363】

50

「試料」、「試験試料」、及び「患者試料」は、本明細書において互換的に使用され得る。試料は、血清、尿血漿、羊水、脳脊髄液、細胞、又は組織の試料であることができる。かかる試料は、患者から得られたときに直接使用することができるか、又は濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、干渉構成要素の不活性化、試薬の添加などによって前処理して、本明細書で考察されるように、さもなければ当該技術分野で知られているように、いくつかの手段で試料の特性を変更することができる。本明細書で使用される「試料」及び「生体試料」という用語は、一般に、抗体などの目的の分析物について試験され、かつ／又はそれを含有することが疑われる生体材料を指す。試料は、対象からの任意の組織試料であり得る。試料は、対象からのタンパク質を含み得る。

【0364】

10

本明細書で使用される用語「インビトロ」は、多細胞生物内ではなく、例えば試験管又は反応容器の中、細胞培養等のような、人工的な環境において起きる事象を指す。

【0365】

本明細書で使用される用語「インビボ」は、ヒト以外の動物等の多細胞生物内で起きる事象を指す。

【0366】

本明細書で使用される単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別段に明示しない限り、複数の言及を含む。

【0367】

本明細書で使用される用語「含む (including)」、「備える (comprising)」、「含む (containing)」、又は「有する (having)」、及びそれらの語形変化は、別段の言及がない限り、その後列挙されたアイテム及びその等価物並びに追加的な主題を包含することが意図されている。

20

【0368】

本明細書で使用される語句「一実施形態では」、「様々な実施形態では」、及び「いくつかの実施形態では」等は、繰り返し使用される。かかる語句は、必ずしも同じ実施形態を指すとは限らないが、文脈が明らかにそうでないことを示していない限り、同じ実施形態を指してもよい。

【0369】

本明細書で使用される用語「及び／又は」又は「／」は、この用語が関連するアイテムのいずれか1つ、アイテムのいずれかの組み合わせ、又はアイテムの全てを意味する。

30

【0370】

本明細書で使用される単語「実質的に」は、「完全に」を除外するものではなく、例えば、Yから「実質的にフリー」である組成物は、Yから完全にフリーであり得る。必要に応じて、「実質的に」という単語は、本発明の定義から省略され得る。

【0371】

本明細書で使用される用語「各」は、アイテムの集合に関連して使用される場合、集合の中の個々のアイテムを特定することを意図されているが、必ずしも集合の中の全てのアイテムを指すものではない。明示的な開示又は文脈が明確にそうでないことを示す場合には、例外が生じ得る。

40

【0372】

本明細書で使用される用語「およそ」又は「約」は、1つ以上の対象の値に適用される場合、言及された基準値と同様の値を指す。いくつかの実施形態では、「およそ」又は「約」という用語は、別段の言及がない限り、又は文脈からそうでないことが明らかでない限り（かかる数がとり得る値の100%を超える場合を除く）、いずれかの方向（より大きい又はより小さい）において、言及された基準値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、又はそれ未満に収まる値の範囲を指す。本明細書において別段の示唆がない限り、「約」という用語は、個々の成分、組成物、又は実施形態の機能性の観点から同等である、言及された範囲に近接した値、例えば重量パーセン

50

トを含むことが意図されている。

【0373】

本明細書に開示されるように、いくつかの範囲の値が提供される。文脈によって明確に指示されない限り、下限の単位の10分の1までの各介在値もまた、その範囲の上限と下限との間に具体的に開示されることを理解されたい。記載された範囲内の任意の記載された値又は介在値と、その記載された範囲内の任意の他の記載された値又は介在値との間の各々のより小さい範囲は、本発明に包含される。これらのより小さい範囲の上限及び下限は、独立して、範囲内に含まれるか、又は除外され得、より小さい範囲内にいずれか、どちらか、又は両方の限界が含まれる各範囲も、記載された範囲内の任意の具体的に除外された限界に従うことを条件として、本発明に包含される。記載された範囲が限界のうちの一方又は両方を含む場合、それらの含まれる限界のうちの一方又は両方を除く範囲も本明細書に含まれる。

10

【0374】

本明細書で提供される任意の及び全ての例、又は例示的な言語（例えば、「など（such as）」）の使用は、本発明をより良く示すことを意図しているに過ぎず、他の方法で特許請求されない限り、本発明の範囲に限定をもたらさない。本明細書中のいかなる文言も、請求されていない要素が本発明の実施に必須であることを示すものとして解釈されるべきではない。

【0375】

本明細書で記載される全ての方法は、本明細書で別段の示唆がない限り、又は文脈によって明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実行される。提供される方法のいずれかに関して、方法のステップは、同時に起きてもよいし、又は順次起きてもよい。方法のステップが順次起きる場合、別段の言及がない限り、ステップはいずれの順序で起きてもよい。方法がステップの組み合わせを含む場合においては、本明細書で別段の言及がない限り、ステップのそれぞれの及び全ての組み合わせ又はサブ組み合わせは、本開示の範囲内に包含される。

20

【0376】

本明細書で引用される各出版物、特許出願、特許、及びその他の参考文献は、本開示と矛盾しない程度に、参照によりその全体が組み込まれたものとする。本明細書で開示される出版物は、本発明の出願日前の開示についてのみ提供される。本明細書のいかなる内容も、本発明が先行発明によるかかる出版物に先行する権利を有しないことを認めるものとして、解釈されるべきではない。更に、提供された刊行物の公開日は、実際の公開日と異なり得るものであり、独立に確認する必要される必要があり得る。

30

【0377】

本明細書で記載された実施例及び実施形態は、単に例示の目的のためのものであり、当業者には、それを考慮した様々な修正又は変更が示唆され、本願の趣旨及び範囲、並びに添付される特許請求の範囲に含まれるべきものであることが理解される。

【実施例】

【0378】

実施例1

40

P S M A 抗体の軽鎖の C D R 3 領域における N => S 変異の操作

N G のホットスポットとして出現する P S M A b の軽鎖の C D R 3 におけるアスパラギンの脱アミド化の可能性は高い。潜在的な脱アミド化を排除することによって P S M A b の安定性を改善するために、N G モチーフを除去する必要がある。C D R 3 領域は、抗原との最も重要な結合部位であり、したがって、この領域におけるアミノ酸の変異は、通常、著しい親和性及び機能の低下をもたらす。アスパラギンをセリンに変異させることによって N G モチーフを除去することを試み、この変異した抗体の機能を調べた。変異は、重複 P C R を使用して導入し、アスパラギンコドン A A T をセリンコドン A G T に変異させた。変異前の P S M A b の C D R 3 領域は、

G C A A C A T G G A T G A C A G T C T G A A T G G T G T A A T A （配列番号80）

50

であり、一方、P S M A b L mにおける変異したC D R 3は、
GCA ACA TGG GAT GAC AGT CTG AGT GGT GTA ATA（配列番号81）

だった。したがって、コードするC D R 3領域は、P S M A bにおける元の
ATWDDSLSGVI（配列番号82）

からP S M A b L mにおける
ATWDDSLNGVI（配列番号17）

に変異された。

【0379】

実施例2

P S M A b L m及びP S M A bの非フコシル化完全抗体の調製

P S M A b L m及びP S M A bの重鎖及び軽鎖遺伝子を、それぞれ、発現のために、バ
イシストロン完全抗体発現ベクターにクローニングした。

【0380】

通常のコシ化修飾を有する野生型P S M A b及びP S M A b L mは、正規のC H O
- K 1細胞で発現させ、一方、非コシ化P S M A b及びP S M A b L mは、フコース
合成を100%消失されたゲノム改変C H O - K 1細胞株である、F u t 8 - / - C H O
- K 1で発現させた。非コシ化P S M A b L m及びP S M A b抗体は、P S M A b L
m f及びP S M A b fと名付けられた。

【0381】

F u t 8 - / - C H O細胞を、ペニシリン/ストレプトマイシンを補充したD M E M +
5% F B S中で培養した。C H O細胞を、トリプシン化によって組織培養プレートから採
取り、P S M A b L m及びP S M A b発現プラスミドでエレクトロポレーションした。エ
レクトロポレーション後、細胞をD M E M + 5% F B S中で培養し、ゼオシンで14日間
選択し、安定した細胞コロニーが出現し、これを安定したC H O細胞プールとして採取し
て、非コシ化抗体を発現させた。安定した細胞プールは、組換え抗体の精製に都合が
良いように、無血清培地及び懸濁培養で成長するように更に順応させた。

【0382】

安定した細胞プールを7~14日間培養して抗体を発現させ、続いてプロテインAクロ
マトグラフィーを使用して上清から精製した。精製した抗体をP B S中で緩衝液交換し、
小分けし、-80℃で保存した。

【0383】

実施例3

捕捉E L I S AによるP S M A b L m及びP S M A bの親和性測定

ヤギ抗ヒトI g G 1（F c特異的）（J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h
L a b o r a t o r i e s , I n c , P e n n s y l v a n i a , U S A）を、100μ
lのP B S中、3μg/mlの濃度でE L I S Aプレートのウェルに4℃で一晩コーティ
ングした。ウェルを200μlのP B S T（P B S、p H 7. 4、0. 05% T w e e n
20を含有）で2回洗浄した後、400μlのP B S T M（5%乾燥ミルクを含有するP
B S T）を用いて室温で2時間ブロッキングした。次いで、6nMから開始して0. 1p
Mまで50μlのP B S T Mで3倍連続希釈したP S M A b及びP S M A b L mをそれぞ
れウェルで、室温で1時間インキュベートした。P B S Tで6回洗浄した後、ウェルは、
P B S T M中に0. 5μg/mlの濃度で50μlのビオチン化P S M A細胞外ドメイン
組換えタンパク質（A c r o b i o s y s t e m s , D e l a w a r e , U S A）とともに
室温で1時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルはP B S Tを使用し
て6回洗浄し、P B S T M中の1:1000希釈した50μlのストレプトアビジン-H
R P（B D b i o s c i e n c e , C a l i f o r n i a , U S A）とともにインキュ
ベートした。P B S Tを用いた最後の6回の洗浄の後、70μlの3, 3', 5, 5'-テ

10

20

30

40

50

トラメチルベンジジン (TMB, eBioscience, CA, USA) を用いた室温での 20 分間インキュベーションによって比色シグナルを展開させ、次いで 70 μ l の 1 M H_2SO_4 を用いたインキュベーションによって停止させた。吸光度を、マイクロプレートリーダー (VWR, PA, USA) を使用して、450 nm で測定した。結合曲線は、GraphPad Prism 5.0 ソフトウェアを使用して分析した。ELISA 結果が、表 1 及び図 1 に示される。

表 1. 種々の濃度での PSMA b 及び PSMA b Lm の OD 450 読み取り

Ab 濃度 (nM)	6	2	0.6667	0.2222	0.0741	0.0247	0.0082	0.0027	0.0009	0.0003	0.0001	0
PSMAb	3.578	3.674	3.798	3.441	1.247	0.219	0.069	0.047	0.046	0.046	0.045	0.045
PSMAb	3.542	3.644	3.655	3.342	1.243	0.231	0.068	0.048	0.047	0.046	0.045	0.046
PSMAb	3.549	3.629	3.738	3.39	1.244	0.228	0.063	0.046	0.047	0.045	0.046	0.045
PSMAb Lm	3.541	3.742	3.767	3.722	2.922	0.792	0.173	0.068	0.05	0.045	0.045	0.044
PSMAb Lm	3.663	3.662	3.819	3.751	2.941	0.827	0.181	0.067	0.048	0.047	0.044	0.045
PSMAb Lm	3.788	3.828	3.838	3.765	2.94	0.831	0.178	0.067	0.05	0.047	0.045	0.045

10

20

【0384】

驚くべきことに、データは、PSMA b Lm が、その親抗体 PSMA b よりも約 2.3 倍高い親和性、すなわち、 $K_d = 0.0479$ nM (PSMA b Lm) 対 $K_d = 0.1088$ nM (PSMA b) を有することを示した (図 1)。重鎖及び軽鎖の両方の CDR3 領域は、抗原結合にとって枢軸である。これらの領域における変異は、通常、抗体の劇的な親和性喪失をもたらす。しかしながら、軽鎖 CDR3 における N から S への単一変異は、予想外に親和性を約 2.3 倍増加させ、特に PSMA b の親和性が既に非常に高く、分野における抗体親和性の頂部にほぼ到達し、更なる改善の余地がほとんど残されていないとき、これは非常にまれである。

30

【0385】

実施例 4

PSMA + CHO 細胞での PSMA b 及び PSMA b Lm の ADCC アッセイ

ADCC は、腫瘍殺滅などの標的細胞を殺滅する抗体の最も重要なメカニズムのうちの 1 つである。ADCC 活性を改善するために、非フコシル化 PSMA b 及び PSMA b Lm を調製し、それらの機能を調べた。アッセイの前日に、標的細胞 (PSMA + CHO 細胞) を 100 μ L 培地中で、Falcon 白色不透明 96 ウェルプレート (カタログ番号 353296) に細胞 10,000 個/ウェルで播種し、37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。翌日、75 μ L の培地を各ウェルから取り除き、200,000 個の CD16-J 細胞/25 μ L/ウェル + 25 μ L の 3 倍連続希釈 (20.6 pg/mL の最高濃度から) 抗体を添加し、細胞混合物を 37 $^{\circ}$ C で 6 時間培養した。培養の最後に、プレートを室温で 15 分間冷却し、60 μ L の Bio-Glo ルシフェラーゼアッセイ緩衝液 (Promega, カタログ番号 G719A) を各ウェルに添加した。ルシフェラーゼシグナルを、5~30 分以内に蛍光光度計で読み取った。陰性対照ウェルと比較したシグナル増加倍率を計算して、ADCC 活性を反映させた。結果が、表 2 及び図 2 に示される。

40

表 2. PSMA b-WT、PSMA b-AF、及び PSMA b Lm-AF の異なる濃度でのルシフェラーゼシグナル増加倍率

50

Ab 濃度 (pg/ml)	0	2.286	6.859	20.576
PMSAb-WT	1.038685	18.41199	29.98259	43.10832
PMSAb-AF	0.858801	33.03482	52.9323	55.54932
PMSAbLm-AF	1.102515	38.94778	56.58801	54.73114

【0386】

データは、正常のフコシル化修飾を有する P S M A b (P S M A b - W T) が比較的低い A D C C 活性を有し、一方、非フコシル化 P S M A b がより高い A D C C 機能を有したことを示した。P S M A b と比較して、P S M A b L m は、より高い A D C C 活性ではないにしても、同様の活性を示した (図 2)。

【0387】

実施例 5

L n C a p 細胞での P S M A b 及び P S M A b L m の結合

P S M A b 及び P S M A b L m を、室温で 2 時間、2 倍高い濃度の抗ヒト I g G - A l e x a 4 8 8 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h L a b o r a t o r i e s , I n c . , P e n n s y l v a n i a , U S A) とともにインキュベートすることによって、A l e x a 4 8 8 で標識した。10% F B S を含有する R P M I 1 6 4 0 中で培養した L n C a p 細胞を V e r s e n e 緩衝液で脱離させ、15 ml の P B S で 2 回洗浄し、培地 (10% F B S を含有する R P M I 1 6 4 0) でそれぞれ 3 倍連続希釈した A l e x a 4 8 8 標識 P S M A b 及び P S M A b L m とともに氷上で 1 時間インキュベートした。冷した培地で 2 回洗浄した後、細胞での抗体結合をフローサイトメトリーによって分析した。P S M A b 及び P S M A b L m は、各濃度で L n C a p 細胞に同様の結合パターンを示した (表 3、図 3 A 及び図 3 B)。

表 3 . 異なる抗体濃度によって染色された細胞の平均蛍光強度

Ab 濃度 (nM)	PSMAb	PSMAbLm
0	23	22.7
0.037	35.4	40.3
0.11	80.3	94.2
0.33	255	270
1	759	708

【0388】

実施例 6

P S M A b 及び P S M A b L m の L n C a p 細胞への内在化

内在化は、毒性薬物を細胞に送達する抗体の前提条件であり、これは、腫瘍療法のための抗体薬物コンジュゲート (A D C) のメカニズムである。A D C 開発における P M S A b L m の可能性を評価するために、その内在化効率を調査した。アッセイの前日に、L n C a p 細胞を、10% F B S を含有する 200 μ L の R P M I 1 6 4 0 中で、96 ウェルプレートに細胞 20000 個 / ウェルで播種した。翌日、培地を取り除き、細胞を、それぞれ 3 倍連続希釈した A l e x a 4 8 8 標識 P S M A b 及び P S M A b L m とともに、組織培養インキュベーター中で、37 $^{\circ}$ C でインキュベートした。A l e x a 4 8 8 による抗体の標識は、実施例 5 で説明した。2 時間のインキュベーション後、細胞を P B S によって 2 回洗浄し、50 μ L のトリプシンを添加して細胞を脱離させ、その間に、内在化されていない、細胞膜に依然として結合しているいずれの抗体も除去した。細胞を培地で 2 回洗浄し、抗体の内在化をフローサイトメトリーによって分析した。

表 4 . 異なる抗体濃度でインキュベートした L n C a p 細胞の平均蛍光強度

Ab 濃度 (nM)	0	0.001	0.003	0.009	0.027	0.082	0.247	0.74	2.22	6.67
PSMAb	21.8	22.5	23.3	27.4	39.6	81.4	190	587	1182	2447
PSMAbLm	21.4	21.4	23.8	29.1	51.4	106	287	750	1700	2711

【0389】

結果は、PSMAb及びPSMAbLmの両方が、非常に効率的に内在化され得ることを示し、両方の抗体について明らかな内在化を可能にする最低濃度を0.027nMで有した。驚くべきことに、PSMAbLmは、PSMAbよりも高い内在化効率を示し（表4及び図4A～4D）、PSMAbLmが、ADC開発においてPSMAbよりも優れていることを示した。

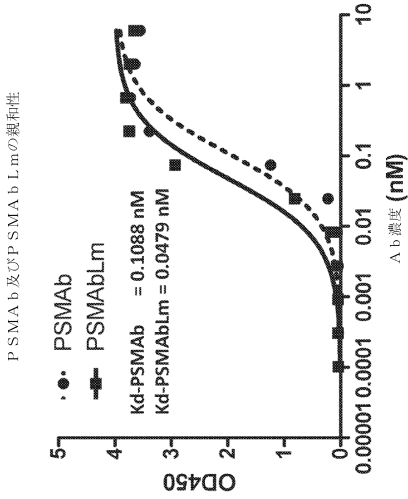
10

【0390】

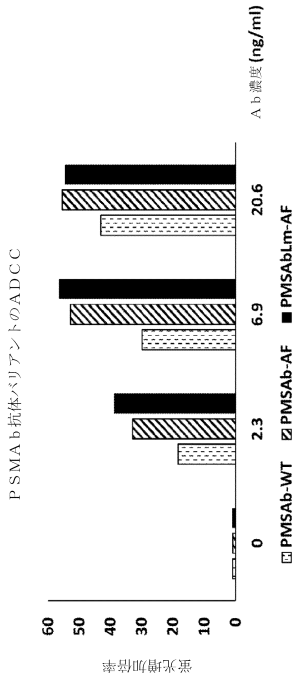
本明細書に引用される各々全ての特許、特許出願、及び刊行物の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。本発明は、特定の実施形態に関連して開示されているが、本発明の真の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本発明の他の実施形態及び変形が当業者によって考案され得ることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、かかる全ての実施形態及び同等の変形を含むように解釈されることが意図されている。

【図面】

【図1】



【図2】



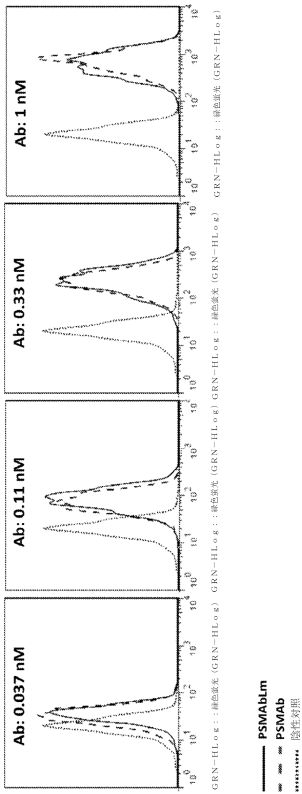
20

30

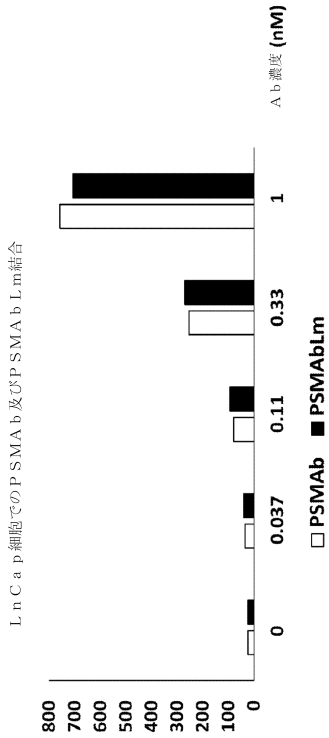
40

50

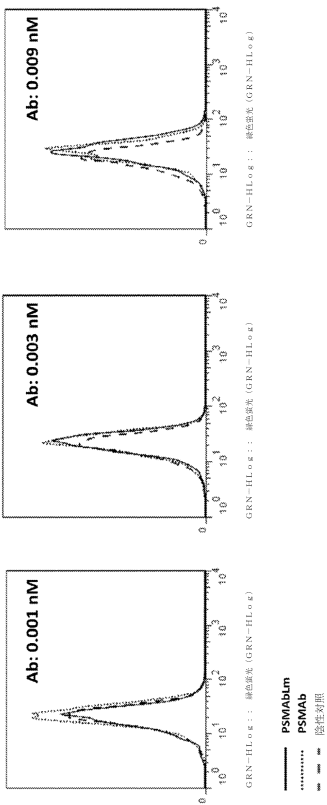
【図 3 A】



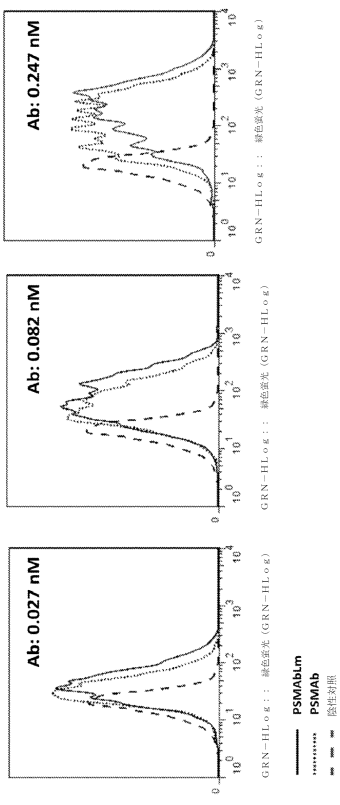
【図 3 B】



【図 4 A】



【図 4 B】



10

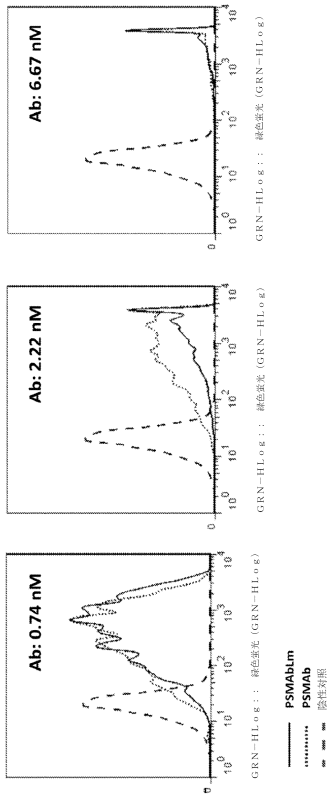
20

30

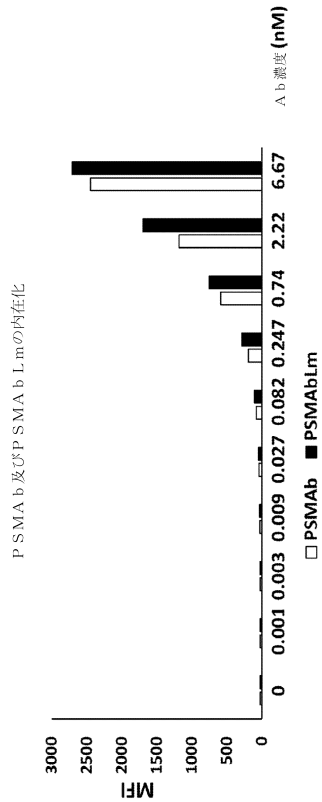
40

50

【図 4 C】



【図 4 E】



【配列表】

2025512923000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC - INV. C07K 16/30; A61K 39/395; A61P 35/00; G01N 33/574 (2023.01)		
ADD.		
CPC - INV. C07K 16/3069; A61K 39/39558; A61P 35/00; G01N 33/57434		
ADD. A61K 2039/505; C07K 2317/565		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- A	US 2021/0277141 A1 (ORIMABS LTD.) 9 September 2021; paragraph [0066]	1 --- 2-3
A	(VANDER HEIDEN, JA et al.) Immunoglobulin light chain junction region, partial [Homo sapiens]. GenPept entry (online). National Institute of Biotechnology Information. 11 June 2018 (Retrieved on 14 August 2023). Retrieved from the Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/MCB45155.1]; page 1	2, 3/2
A	US 2011/0076279 A1 (RAMACHANDRA, S et al.) 31 March 2011; paragraph [0055]	2, 3/2
A	US 2021/0115136 A1 (CENTRYMED PHARMACEUTICAL INC.) 22 April 2021; paragraphs [0009], [0015]	3/1
A	(SHRINER, AK et al.) Immunoglobulin light chain variable region, partial [Homo sapiens]. GenPept entry (online). National Institute of Biotechnology Information. 14 July 2016 (Retrieved on 14 August 2023). Retrieved from the Internet: [URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABI74141.1]; pages 1-2	3/1
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 August 2023 (14.08.2023)		Date of mailing of the international search report SEP 11 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/65017

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter:1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/65017

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-27
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-***Please See Supplemental Page-***

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I*, Claims 1-3, and SEQ ID NO: 13 (LCDR2 sequence), SEQ ID NO: 25 (HCDR1 sequence), SEQ ID NO: 33 (HCDR3 sequence), SEQ ID NO: 5 (light chain variable region sequence).

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65017

---Continued From Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

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

Groups I+, Claims 1-3, and SEQ ID NO: 13 (LCDR2 sequence), SEQ ID NO: 25 (HCDR1 sequence), SEQ ID NO: 33 (HCDR3 sequence), SEQ ID NO: 5 (light chain variable region sequence) are directed towards antibodies.

The antibodies of Claims 1-3 (each in-part) are believed to encompass the first named invention of Groups I+ and are the claims that will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 13 (first exemplary LCDR2 sequence), SEQ ID NO: 25 (first exemplary HCDR1 sequence), SEQ ID NO: 33 (first exemplary HCDR3 sequence), SEQ ID NO: 5 (first exemplary light chain variable region sequence). This first named invention of Group I+ has been selected to encompass the first species of each of the genera found in claims 1-3 based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines.

Applicant is invited to elect additional LCDR2, HCDR1, and HCDR3 sequence(s) to be searched. Additional LCDR2, HCDR1, and HCDR3 sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the searchable claims that encompass any additionally elected LCDR2, HCDR1, and HCDR3 sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. Exemplary elections would be SEQ ID NO: 13 (LCDR2 sequence), SEQ ID NO: 45 (HCDR1 sequence), SEQ ID NO: 49 (HCDR3 sequence), SEQ ID NO: 5 and 7 (light chain variable region sequence).

Groups I+ share the technical features including: an antibody or antigen-binding fragment thereof or a variant thereof that specifically binds to prostate specific membrane antigen or PSMA, wherein the antibody or antigen-binding fragment thereof comprises: a light chain variable region or LCVR comprising three light chain complementarity determining regions or LCDRs, LCDR1, LCDR2, and LCDR3, wherein the LCDR1 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9, the LCDR2 comprises a specified amino acid sequence, and the LCDR3 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17; and/or a heavy chain variable region or HCVR comprising three heavy chain complementarity determining regions or HCDRs, HCDR1, HCDR2, and HCDR3, comprising wherein the HCDR1 comprises a specified amino acid sequence, the HCDR2 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29, and the HCDR3 comprises a specified amino acid sequence, wherein the variant comprises one or more conservative amino acid substitutions in the LCDR1, the LCDR2, the LCDR3, the HCDR1, the HCDR2, or the HCDR3. These shared technical features are previously disclosed by US 2021/0277141 A1 to ORIMABS LTD. (hereinafter "Orimabs").

Orimabs discloses an antibody or antigen-binding fragment thereof or a variant thereof that specifically binds to prostate specific membrane antigen or PSMA (antibody that specifically binds PSMA; abstract), wherein the antibody or antigen-binding fragment thereof comprises: a light chain variable region or LCVR comprising three light chain complementarity determining regions or LCDRs, LCDR1, LCDR2, and LCDR3, wherein the LCDR1 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 (antibody comprising a VL CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 that has 100% sequence identity with SEQ ID NO: 9 of the instant PCT application; paragraph [0066]), the LCDR2 comprises a specified amino acid sequence (LCDR2 comprises a specified amino acid sequence; paragraph [0066]), and the LCDR3 comprises a sequence similar to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17 (a VL CDR3 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17 that has about 91% identity with SEQ ID NO: 17 of the instant PCT application; paragraph [0066]); and/or a heavy chain variable region or HCVR comprising three heavy chain complementarity determining regions or HCDRs, HCDR1, HCDR2, and HCDR3, comprising wherein the HCDR1 comprises a specified amino acid sequence (the HCDR1 comprises a specified amino acid sequence; paragraph [0067]), the HCDR2 comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 (a VH CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29 that has 100% identity with SEQ ID NO: 29 of the instant PCT application; paragraph [0067]), and the HCDR3 comprises a specified amino acid sequence (the HCDR3 comprises a specified amino acid sequence; paragraph [0067]), wherein the variant comprises one or more conservative amino acid substitutions in the LCDR1, the LCDR2, the LCDR3, the HCDR1, the HCDR2, or the HCDR3.

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

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/08		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	E	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	39/395	T	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	A 6 1 K	48/00		
G 0 1 N	33/577 (2006.01)	A 6 1 K	35/76		
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 K	35/12		
		G 0 1 N	33/574	A	
		G 0 1 N	33/577	B	
		C 1 2 P	21/08		

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

2. T W E E N

(72)発明者 ウェン, ウェイホン

中華人民共和国 シャンシー 7 1 0 0 3 2, シーアン, チャングル ウェスト ロード 1 6 9, アpartment 1 3 0, ビルディング 1 0

F ターム (参考) 4B063 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33 QS36 QX01
 4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA24
 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA13 AA19 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA31 MA35 MA37
 MA41 MA43 MA52 MA55 MA56 MA59 MA66 NA05 ZA811 ZA812 ZB261
 ZB262 ZC751
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 CC23 EE01
 4C087 AA01 AA02 BB64 BB65 CA12 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23
 MA31 MA35 MA37 MA41 MA43 MA52 MA55 MA56 MA59 MA66 NA14
 ZA81 ZB26 ZC75
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 BA41 BA50 CA40 DA50
 DA76 EA20 EA50 FA74