

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-127305

(P2017-127305A)

(43) 公開日 平成29年7月27日(2017.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
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	
審査請求 有 請求項の数 24 O L (全 118 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-23634 (P2017-23634)	(71) 出願人	511001758
(22) 出願日	平成29年2月10日 (2017. 2. 10)		アプティボ リサーチ アンド デベロ
(62) 分割の表示	特願2014-506600 (P2014-506600)		ップメント エルエルシー
原出願日	平成24年4月20日 (2012. 4. 20)		アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 1
(31) 優先権主張番号	61/478, 449		, シアトル, フォース アベニュー
(32) 優先日	平成23年4月22日 (2011. 4. 22)	(74) 代理人	2 4 0 1, スイート 1 0 5 0
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		(74) 代理人	100114775
			弁理士 高岡 亮一
		(74) 代理人	100121511
			弁理士 小田 直
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 前立腺特異的膜抗原結合タンパク質および関連組成物ならびに方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】前立腺特異的膜抗原 (P S M A) 発現細胞を特異的標的し、前立腺癌、腫瘍関連血管形成又は良性前立腺肥大症の治療に有用である、単一特異性及び多重特異性ポリペプチド治療に用いるポリペプチドの提供。

【解決手段】ヒト化された前立腺特異的膜抗原 (P S M A) 結合ドメインを含む前立腺特異的膜抗原 (P S M A) 結合ポリペプチドであって、P S M A 結合ドメインは、L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、H C D R 1、H C D R 2、及び H C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域とを含み、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 及び H C D R 3 が、それぞれ特定のアミノ酸配列を有する、P S M A 結合ポリペプチド。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト化された前立腺特異的膜抗原（P S M A）結合ドメインを含む前立腺特異的膜抗原（P S M A）結合ポリペプチドであって、前記 P S M A 結合ドメインは、

（i）L C D R 1、L C D R 2、および L C D R 3 を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と、

（i i）H C D R 1、H C D R 2、および H C D R 3 を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、

を含み、

L C D R 1、L C D R 2 および L C D R 3 が、それぞれ配列番号 1 5、配列番号 1 6 および配列番号 1 7 に示されるアミノ酸配列を有し、 10

H C D R 1、H C D R 2 および H C D R 3 が、それぞれ配列番号 9、配列番号 1 0 および配列番号 1 1 に示されるアミノ酸配列を有する、

P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 2】

アミノ末端からカルボキシル末端へ向けて、

（a）前記 P S M A 結合ドメイン、

（b）第 1 ヒンジ領域、および

（c）免疫グロブリン定常領域、

を含む、請求項 1 に記載の P S M A 結合ポリペプチド。 20

【請求項 3】

第 2 結合ドメインをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 4】

アミノ末端からカルボキシル末端側への順で、またはカルボキシル末端からアミノ末端側への順で、

（a）前記 P S M A 結合ドメイン、

（b）第 1 ヒンジ領域、

（c）免疫グロブリン定常領域、

（d）第 2 ヒンジ領域、および

（e）第 2 結合ドメイン

を含む、請求項 3 に記載の P S M A 結合ポリペプチド。 30

【請求項 5】

前記第 2 結合ドメインが、前記第 2 ヒンジ領域に対してカルボキシル末端側またはアミノ末端側である、請求項 3 または 4 に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 6】

前記免疫グロブリン軽鎖可変領域が、配列番号 5 または配列番号 2 3 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み、

前記重鎖可変領域が、配列番号 2、配列番号 2 5、または配列番号 2 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、 40

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 7】

ヒト P S M A への結合において、前記 P S M A 結合ドメインが、配列番号 2 1 に示されるアミノ酸配列を有する単鎖 F v（s c F v）と競合する、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 8】

前記第 1 ヒンジ領域が、（i）I I 型 C レクチンの軸領域または（i i）免疫グロブリンのヒンジ領域に由来する、請求項 2 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 9】

前記第 2 ヒンジ領域が、(i) I I 型 C レクチンの軸領域または (i i) 免疫グロブリンのヒンジ領域に由来する、請求項 4～8 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 1 0】

前記第 2 ヒンジ領域が、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、または配列番号 6 6 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 4～9 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 1 1】

前記 P S M A 結合ドメインが、単鎖 F v (s c F v) である、請求項 1～1 0 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

10

【請求項 1 2】

前記 s c F v が、配列番号 1 9、配列番号 2 1、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 4、または配列番号 3 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1 1 に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 1 3】

配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 7 0、または配列番号 7 2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1～1 2 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 1 4】

前記第 2 結合ドメインが、T 細胞、C D 3、C D 3 ε、あるいは T 細胞受容体 (T C R) 複合体またはその成分と特異的に結合する、請求項 3～1 3 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

20

【請求項 1 5】

C D 3 ε への結合において、前記第 2 結合ドメインが、C R I S - 7 および H u M 2 9 1 からなる群から選択されるモノクローナル抗体と競合する、請求項 1 4 に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 1 6】

前記第 2 結合ドメインが、C R I S - 7 および H u M 2 9 1 からなる群から選択されるモノクローナル抗体に由来する免疫グロブリン軽鎖可変領域および免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、請求項 1 4 または 1 5 に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

30

【請求項 1 7】

前記第 2 結合ドメインの軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、

(a) 配列番号 4 7 の残基 1 3 9～2 4 5 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号 4 7 の残基 1～1 2 1 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに、

(b) 配列番号 7 8 の残基 6 3 4～7 4 0 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号 7 8 の残基 4 9 6～6 1 6 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、

40

からなる群から選択される、請求項 1 4～1 6 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 1 8】

配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 7 4、配列番号 7 6、配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 8 2、配列番号 8 4、配列番号 1 5 8、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 2、または配列番号 1 6 4 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一のアミノ酸配列を含む、請求項 1～1 7 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチド。

【請求項 1 9】

第 1 ポリペプチド鎖および第 2 ポリペプチド鎖を含む二量体 P S M A 結合タンパク質で

50

あって、前記ポリペプチド鎖のそれぞれが、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチドである、二量体 P S M A 結合タンパク質。

【請求項 20】

請求項 1～19 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチドをコードする、単離された核酸。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の核酸を含む、組換え宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 19 に記載の P S M A 結合タンパク質、ならびに
医薬上許容される担体、希釈剤、または賦形剤
を含む組成物。

10

【請求項 23】

前立腺特異的膜抗原（P S M A）発現細胞に対する再指向性の T 細胞の細胞傷害性（R T C C）を誘発するための方法であって、

前記 P S M A 発現細胞を、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチドまたは請求項 19 に記載の二量体 P S M A 結合タンパク質と接触させることを含み、

前記接触は、前記 P S M A 発現細胞に対する R T C C が誘発される条件下にあり、
ヒトまたは動物の体に対して行われる治療を目的とした治療方法ではない、
方法。

20

【請求項 24】

前立腺特異的膜抗原（P S M A）の過剰発現を特徴とする対象における疾患を治療するための方法において使用するための、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチドまたは請求項 19 に記載の二量体 P S M A 結合タンパク質であって、好ましくは、前記疾患は、癌、前立腺障害、新生血管障害、前立腺癌、大腸癌、胃癌、去勢抵抗性前立腺癌、良性前立腺肥大症、固体腫瘍成長、腎明細胞癌、大腸癌、膀胱癌、または肺癌である、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の P S M A 結合ポリペプチドまたは請求項 19 に記載の二量体 P S M A 結合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本出願は、2011 年 4 月 22 日に出願された米国特許仮出願第 61/478, 449 号の利益を請求するものであり、これは、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、前立腺特異的膜抗原（P S M A）発現細胞を特異的標的し、例えば、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性前立腺癌）、腫瘍関連血管形成、または良性前立腺肥大症（B P H）等の P S M A 過剰発現を特徴とする障害の治療に有用である単一特異性および多重特異性タンパク質治療学に関する。1 つの実施形態では、多重特異性タンパク質治療は、T 細胞上の P S M A 発現細胞と T 細胞受容体複合体の両方に結合して標的依存性 T 細胞の細胞傷害活性化および増殖を誘発する。

40

【0003】

添付の配列表

本明細書に添付して電子媒体で提出したテキストファイル（名称：「Sequence — Listing. txt」、サイズ：272, 014 バイト；作成日：2012 年 4 月 20 日）の内容は、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0004】

前立腺特異的膜抗原（P S M A）は、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ I I および N-アセチル化 α 結合した酸性ジペプチダーゼ 1 としても知られており、遺伝子 F O L H

50

1 (葉酸ヒドロラーゼ1)によってコードされるペプチダーゼファミリーM28に属す二量体2型膜貫通糖タンパク質である。タンパク質は、栄養葉酸および神経ペプチドN-アセチル-L-アスパルチル-L-グルタミン酸塩を含む異なる代替的基質上のグルタミン酸カルボキシペプチダーゼとして作用し、前立腺、および少ない範囲で、小腸、中枢および末梢神経系ならびに腎臓等のいくつかの組織に発現する。PSMAをコードする遺伝子は、少なくとも3つの変異型を産生するために代替的に挿入される。この遺伝子の変異は、食品葉酸の腸吸収不良に関連し得、低血液葉酸値および続発性高ホモシステイン血症に至り得る。脑中のこのタンパク質発現は、グルタミン酸興奮毒性に関連するいくつかの病的状態に関与し得る。

【0005】

PSMAは、十分に確立された、高度に限局性の前立腺癌関連細胞膜抗原である。前立腺癌細胞内、PSMAは正常な前立腺上皮上より1000倍高く発現する(Suet al., Cancer Res. 1995 44:1441-1443)。PSMA発現は前立腺癌進行と共に増大し、転移性疾患、ホルモン難治性、より高悪性度の病変の場合に最高となる(Israeli et al., Cancer Res. 1994, 54:1807-1811; Wright et al., Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 1995 1:18-28; Wright et al., Urology 1996 48:326-332; Swe et al., Urology 1998 52:637-640)。さらに、PSMAは、膀胱癌、膵癌、悪性黒色腫、肺癌および腎臓癌を含むが、正常な新血管系統上ではない様々な他の固形腫瘍の新血管系統上で豊富に発現する(Chang et al., Urology 2001 57:801-805; Divgi et al., Clin. Cancer Res. 1998 4:2729-3279)。

【0006】

PSMAは、ワクチンまたはモノクローナル抗体を用いた指向療法等、免疫アプローチにおいて重要な標的であることが示されている。分泌性タンパク質である他の前立腺限局的分子(PSA、前立腺性酸性ホスファターゼ)とは異なり、PSMAは非分泌型内在性細胞表面膜タンパク質であり、このため抗体療法において理想の標的である。PROSTASCINT(商標登録)(カプロマブペンデチド)は、新たに診断された再発性前立腺癌患者の造影および病期決定においてFDAによって承認されている¹¹¹Inラベル化抗PSMAマウスモノクローナル抗体である(Hinkle et al., Cancer 1998, 83:739-747)。しかしながら、カプロマブはPSMAの細胞内エピトープに結合し、PSMAの内部ドメインの内在化または曝露を必要とするため、アポトーシスまたは壊死細胞に選択的結合する(Troyer et al., Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations 1995 1:29-37; Troyer et al., Prostate 1997 30:232-242)。その結果、カプロマブは、治療的に有益ではない場合がある(Liu et al., Cancer Res. 1997 57:3629-3634)。

【0007】

PSMAの外部ドメインを標的とする他のモノクローナル抗体が開発されている(例えば、J591、J415、J533、およびE99)(Liu et al., Cancer Res. 1997 57:3629-3634)。放射ラベル化J591は、現在、臨床試験中である(Tagawa et al., Cancer 2010 116(S4):1075)。しかしながら、証拠は、PSMAが推定リガンドの内在化を媒介する受容体として作用し得ることを示唆する。PSMAは構成的に内在化を実施し、PSMA特異的抗体は内在化率を誘発および/または増大することができ、これは次いで、エンドソーム中で抗体を蓄積させる(Liu et al., Cancer Res. 1998 58:4055-4060)。PSMA特異的内在抗体は、前立腺癌細胞

10

20

30

40

50

の内側への毒素、薬剤、または放射同位体送達を標的とする治療開発に役立ち得る一方（Tagawa et al., Cancer 2010 116 (S4): 1075）、PSMA特異的抗体は、エフェクター細胞によって認識される前に内在化し得るため、天然または遺伝子操作したエフェクター機序（例えば、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）、補体依存性細胞傷害（CDC）、抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシス（ADCP）、または再指向T細胞の細胞傷害（RTCC））を利用するPSMA特異的抗体は問題である。

【発明の概要】

【0008】

1つの実施形態では、本明細書の開示は、アミノ末端からカルボキシル末端側への順で（a）ヒトPSMAと特異的結合するPSMA結合ドメイン、（b）ヒンジ領域、および（c）免疫グロブリン定常領域を含む前立腺特異的膜抗原（PSMA）結合ポリペプチドを提供する。ある実施形態では、適切なPSMA結合ドメインとしては、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する単鎖Fv（scFv）とヒトPSMA結合において競合する結合ドメインが挙げられる。ある実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、それぞれの免疫グロブリン定常領域および／またはヒンジ領域間の結合を介して第2の同一ポリペプチド鎖と二量体を形成可能である。

【0009】

ある実施形態では、PSMA結合ドメインは、（i）CDRL1、CDRL2、およびCDRL3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域、ならびに／または（ii）CDRH1、CDRH2、およびCDRH3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。あるバリエーションでは、CDRL3は、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、および／またはCDRH3は、配列番号11で表されるアミノ酸配列を有する；一部のかかる実施形態では、CDRL1およびCDRL2は、それぞれ配列番号15および配列番号16で表されるアミノ酸配列を有し、ならびに／またはCDRH1およびCDRH2は、それぞれ配列番号9および配列番号10で表されるアミノ酸配列を有する。別のバリエーションでは、（i）軽鎖可変領域は、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む；ならびに／または（ii）重鎖可変領域は、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む。軽鎖および重鎖可変領域の片方または両方がヒト化されていることができる。

【0010】

あるバリエーションでは、PSMA結合ドメインは、本明細書に開示された免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域を含む単鎖Fv（scFv）である。ある実施形態では、PSMA結合scFvは、例えば、配列番号19、配列番号21、配列番号30、配列番号31、配列番号34、または配列番号35で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含むscFvを含む。ある実施形態では、scFvの重鎖可変領域は、軽鎖可変領域に対するカルボキシル末端（本明細書において「VL-VH配向」とも称する）である。VL-VH配向を有するscFvのいくつかの実施形態では、scFvは配列番号21、配列番号30、または配列番号31で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、ペプチドリンカー、例えば、アミノ酸配列（Gly₄ Ser）_n、式中n=1~5（配列番号165）を含むペプチドリンカーによって結合することができる。

【0011】

本明細書に開示されたPSMA結合ポリペプチドのいくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、免疫グロブリンのヒンジ領域、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgDの免疫グロブリンのヒンジ領域等由来である。かか

る免疫グロブリンのヒンジ領域は、野生型免疫グロブリンのヒンジ領域であっても改変免疫グロブリンのヒンジ領域であってもよい。

【0012】

本明細書に開示されたP S M A結合ポリペプチドのさらなる実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメイン、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、またはI g Dの免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメインを含む。別の実施形態では、免疫グロブリン定常領域は免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメインを含み、定常領域は免疫グロブリンC H 1ドメインを含まない。

【0013】

あるバリエーションでは、本明細書に開示されたP S M A結合ポリペプチドは、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（A D C C）および補体依存性細胞傷害（C D C）から選択される少なくとも1つのエフェクター機能を含む。いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、免疫グロブリンのヒンジ領域由来であり、免疫グロブリン定常領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4の免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメインを含む。別の実施形態では、免疫グロブリンのヒンジ領域は、I g G 1のヒンジ領域由来であり、免疫グロブリン定常領域は、I g G 1の免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメインを含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されたP S M A結合ポリペプチドは、配列番号38、配列番号39、配列番号42、配列番号43、配列番号70、または配列番号72で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0015】

なおさらなる実施形態では、本明細書に開示されたP S M A結合ポリペプチドは、（d）免疫グロブリン定常領域に対する第2ヒンジ領域カルボキシル末端、および（e）第2ヒンジ領域に対する第2結合ドメインカルボキシル末端をさらに含む。いくつかの実施形態では、第2ヒンジ領域は、2型Cレクチンまたは免疫グロブリンのヒンジ領域の軸領域に由来するものを含む。あるバリエーションでは、第2ヒンジ領域は、配列番号63、配列番号64、配列番号65、または配列番号66で表されるアミノ酸配列を有する。

【0016】

別の実施形態では、本明細書の開示は、ヒトP S M Aと特異的結合する前立腺特異的膜抗原（P S M A）結合ポリペプチドを提供し、（i）C D R L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域、ならびに（i i）C D R H C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む第1結合ドメインを含む；L C D R 3は、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、ならびに／またはH C D R 3は、配列番号11で表されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、L C D R 1およびL C D R 2は、それぞれ配列番号15および配列番号16で表されるアミノ酸配列を有し、ならびに／またはH C D R 1およびH C D R 2は、それぞれ配列番号9および配列番号10で表されるアミノ酸配列を有する。一部のバリエーションでは、L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3は、それぞれ配列番号15、配列番号16、および配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、ならびにH C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3は、それぞれ配列番号9、配列番号10および配列番号11で表されるアミノ酸配列を有する。一部のバリエーションでは（i）軽鎖可変領域は、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む；ならびに／または（i i）重鎖可変領域は、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む。ある実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号3、配列番号4、または配列番号22で表される核酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、

10

20

30

40

50

少なくとも99%、または100%同一の核酸配列によってコードされる；ならびに／または重鎖可変領域は、配列番号1、配列番号24、または配列番号26で表される核酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%同一の核酸配列によってコードされる。軽鎖および重鎖可変領域の片方または両方がヒト化されていることができる。いくつかの実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、第2の同一ポリペプチド鎖と二量体を形成可能である。

【0017】

本明細書に開示されたある実施形態では、第1結合ドメインは、免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域を含む単鎖Fv (scFv) である。いくつかの実施形態では、PSMA結合scFvは、例えば、配列番号19、配列番号21、配列番号30、配列番号31、配列番号34、または配列番号35で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含むscFvを含む。ある実施形態では、scFvの重鎖可変領域は、軽鎖可変領域に対するカルボキシル末端 (「VL-VH配向」) である。VL-VH配向を有するscFvのいくつかの実施形態では、scFvは配列番号21、配列番号30、または配列番号31で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む。scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、ペプチドリンカー、例えば、アミノ酸配列 (Gly₄ Ser)_n、式中n=1~5 (配列番号165) を含むペプチドリンカーによって結合することができる。

【0018】

ある実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、免疫グロブリン定常領域をさらに含む。例えば、一部のバリエーションでは、免疫グロブリン定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgDの免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含む。一部のバリエーションでは、PSMA結合ポリペプチドは、1つまたは複数のヒンジ領域をさらに含む。ある実施形態では、ヒンジ領域は、例えば、2型Cレクチンの軸領域に由来しても免疫グロブリンのヒンジ領域に由来してもよい。

【0019】

別の実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、アミノからカルボキシル末端側への順で、第1結合ドメイン、ヒンジ領域、および免疫グロブリン定常領域を含む。この形態のPSMA結合ポリペプチドはPSMA特異的SMIP分子とも呼ばれ得る。一般的SMIP配置は、例えば、米国特許公開第2003/0133939号、同第2003/0118592号、および同第2005/0136049号 (これらは、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる) に提供される。

【0020】

別の実施形態では、ポリペプチド配向は、ポリペプチドがアミノからカルボキシル末端側への順で、免疫グロブリン定常領域、ヒンジ領域および第1結合ドメインを含むように逆行する。この配向において、ポリペプチドは、PSMA特異的PIMS分子とも呼ばれ得る。一般的PIMS配置は、例えば、米国特許公開第2009/0148447号 (これは、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる) に提供される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示された免疫グロブリン定常領域および、任意に、ヒンジ領域を有するPSMA結合ポリペプチドは、それぞれの免疫グロブリン定常領域および／またはヒンジ領域間の結合を介して第2の同一ポリペプチド鎖と二量体を形成可能である。

【0021】

別の実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、例えば、単鎖Fv (scFv) 等の第2結合ドメインを含む。例えば、一部のバリエーションでは、PSMA結合ポリペプチドは、アミノ末端からカルボキシル末端側への順でまたはカルボキシル末端からアミノ末端側への順で (a) 第1結合ドメイン、(b) 第1ヒンジ領域、(c) 免疫グロブリン定常領域、(d) 第2ヒンジ領域、および (e) 第2結合ドメインを含む。

【0022】

さらに別の実施形態では、本明細書の開示は、本明細書に開示された他の実施形態のP

10

20

30

40

50

SMA結合ポリペプチドを提供し、追加の結合ドメイン（例えば、第2結合ドメイン）を含み、第2結合ドメインはT細胞と特異的結合する。ある実施形態では、第2結合ドメインは、T細胞受容体（TCR）複合体またはその成分と特異的結合する。いくつかの実施形態では、第2結合ドメインは、CD3（例えば、CD3ε）に特異的結合するものを含む。あるバリエーションでは、第2結合ドメインは、CRIS-7またはHuM291モノクローナル抗体とCD3結合において競合する。一部のかかるバリエーションでは、第2結合ドメインは、CRIS-7またはHuM291モノクローナル抗体由来である免疫グロブリン軽鎖可変領域および免疫グロブリン重鎖可変領域を含む。例えば、ある実施形態では、第2結合ドメインの軽鎖および重鎖可変領域は、CRIS-7またはHuM291モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖CDRをそれぞれ含むヒト化可変領域である。別の実施形態では、第2結合ドメインの軽鎖および重鎖可変領域は、（a）配列番号47の残基139～245で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域ならびに配列番号47の残基1～121で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに（b）配列番号78の残基634～740で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域ならびに配列番号78の残基496～616で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域から選択される。

【0023】

第2結合ドメインを含むPSMA結合ポリペプチドのある実施形態では、第2結合ドメインは、単鎖Fv（scFv）である。例えば、CRIS-7モノクローナル抗体に由来する軽鎖および重鎖可変領域を含む第2結合ドメインのいくつかの実施形態では、第2結合ドメインは、（i）配列番号47の残基1～245で表されるアミノ酸配列、ならびに（ii）配列番号78の残基496～742で表されるアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%同一のアミノ酸配列を含むscFvである。一部のかかる実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、配列番号49、配列番号51、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号158、配列番号160、配列番号162、または配列番号164で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含むscFvである。

【0024】

別の実施形態では、本明細書の開示は、第1および第2ポリペプチド鎖を含む二量体PSMA結合タンパク質を提供し、前記ポリペプチド鎖のそれぞれは、本明細書に開示された任意の実施形態のPSMA結合ポリペプチドである。

【0025】

別の実施形態では、本明細書の開示は、アミノ末端からカルボキシル末端側への順で（a）ヒトPSMAと特異的結合する結合ドメイン、（b）ヒンジ領域、（c）免疫グロブリン定常領域、および（d）免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを含むPSMA結合ポリペプチドを提供する。ヘテロ二量体化ドメインは、例えば、免疫グロブリンCH1ドメインまたは免疫グロブリンCLドメインを含むことができる。ある実施形態では、PSMA結合ドメインは、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する単鎖Fv（scFv）とヒトPSMA結合において競合する。ある実施形態では、PSMA結合ドメインは、例えば、上に開示されたPSMA結合ドメインを含む。

【0026】

いくつかの実施形態では、ヒンジ領域は、免疫グロブリンのヒンジ領域、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgDの免疫グロブリンのヒンジ領域等由来である。かかる免疫グロブリンのヒンジ領域は、野生型免疫グロ

ブリンのヒンジ領域であっても改変免疫グロブリンのヒンジ領域であってもよい。さらなる実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリンCH2およびCH3ドメイン、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、もしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリンCH2およびCH3ドメイン；IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMもしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリンCH3ドメイン；またはIgE、IgMもしくはそれらの組み合わせの免疫グロブリンCH3およびCH4ドメイン等を含む。

【0027】

ある実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）から選択される少なくとも1つのエフェクター機能を含む。一部のかかる実施形態では、ヒンジ領域は、免疫グロブリンのヒンジ領域由来であり、免疫グロブリン定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含む。より具体的なバリエーションでは、免疫グロブリンのヒンジ領域は、IgG1のヒンジ領域由来であり、免疫グロブリン定常領域は、IgG1の免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含む。

【0028】

ある実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、配列番号46、配列番号58、配列番号59、配列番号60、または配列番号61で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0029】

別の実施形態では、本明細書の開示は、ヘテロ二量体化ドメイン（例えば、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン）によって結合し、ヘテロ二量体を形成する2つの非同ポリペプチド鎖を含むPSMA結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、ヘテロ二量体PSMA結合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシル末端側への順で（a）PSMAと特異的結合する第1結合ドメイン、（b）第1ヒンジ領域、（c）第1免疫グロブリン定常領域、および（d）第1免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを含む第1ポリペプチド鎖、ならびにアミノ末端からカルボキシル末端側への順で（a'）第2ヒンジ領域（b'）第2免疫グロブリン副領域、および（c'）第1ポリペプチド鎖の第1免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインと異なる第2免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを含む第2単鎖ポリペプチドを含み、第1および第2免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは互いに結合してヘテロ二量体を形成する。ある実施形態では、PSMA結合ドメインは、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する単鎖Fv（scFv）とヒトPSMA結合において競合する。ある実施形態では、PSMA結合ドメインは、例えば、上に開示されたPSMA結合ドメインを含む。

【0030】

ある実施形態では、ヘテロ二量体化ドメインは、免疫グロブリンCH1ドメインまたは免疫グロブリンCLドメインのいずれかを含むドメインを含む。一部のかかる実施形態では、第1免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、第1免疫グロブリンCH1ドメインを含み、第2免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、第1免疫グロブリンCLドメインを含む。あるいは、他の実施形態では、第1免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、第1免疫グロブリンCLドメインを含み、第2免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、第1免疫グロブリンCH1ドメインを含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、第1および第2ヒンジ領域の少なくとも1つは、免疫グロブリンのヒンジ領域、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgDの免疫グロブリンのヒンジ領域等に由来する。かかる免疫グロブリンのヒンジ領域は、野生型免疫グロブリンのヒンジ領域であっても改変免疫グロブリンのヒンジ領域であってもよい。さらなる実施形態では、第1および第2免疫グロブリン定常領域の少なくとも1つは、免疫グロブリンCH2およびCH3ドメイン、例えば、IgG1

、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、もしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメイン；I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g Mもしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリンC H 3ドメイン；またはI g E、I g Mもしくはそれらの組み合わせの免疫グロブリンC H 3およびC H 4ドメイン等を含む。

【0032】

本明細書に開示されたヘテロ二量体P S M A結合タンパク質のあるバリエーションでは、第1および第2ポリペプチド鎖の片方または両方は、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（A D C C）および補体依存性細胞傷害（C D C）から選択される少なくとも1つのエフェクター機能を含む。一部のかかる実施形態では、第1および第2ヒンジ領域のそれぞれは、免疫グロブリンのヒンジ領域に由来し、第1および第2免疫グロブリン定常領域のそれぞれは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4の免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメインを含む。ある実施形態では、第1および第2ヒンジ領域のそれぞれは、I g G 1のヒンジ領域に由来し、第1および第2免疫グロブリン定常領域のそれぞれは、I g G 1の免疫グロブリンC H 2およびC H 3ドメインを含む。

【0033】

本明細書に開示されたヘテロ二量体P S M A結合タンパク質のいくつかの実施形態では、第2ポリペプチド鎖は第2結合ドメインをさらに含む。例えば、第2ポリペプチド鎖は、第2ヒンジ領域に対する第2結合ドメインアミノ末端をさらに含むことができる。

【0034】

あるバリエーションでは、本明細書に開示されたヘテロ二量体P S M A結合タンパク質は、単一特異性（すなわち、P S M A単一特異性）であることができる。あるいは、他の実施形態では、ヘテロ二量体P S M A結合タンパク質は、多重特異性である。例えば、ヘテロ二量体の各ポリペプチド鎖は、異なる結合ドメイン、例えば、P S M A結合ドメインを含む第1ポリペプチド鎖およびP S M Aと異なる第2標的抗原に特異的な第2結合（例えば、第2ヒンジ領域に対するアミノ末端）を含む第2ポリペプチド鎖を含むことができる。

【0035】

多重特異性、ヘテロ二量体P S M A結合タンパク質のいくつかの実施形態では、第2結合ドメインは、T細胞と特異的結合する。ある実施形態では、T細胞結合ドメインは、例えば、上に開示された追加の結合ドメインおよび第2結合ドメインを含む。T細胞に特異的結合する第2結合ドメインを含むヘテロ二量体P S M A結合タンパク質のある実施形態では、例えば（a）第1ポリペプチド鎖は、配列番号46で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含み、第2ポリペプチド鎖は、配列番号47で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む；（b）第1ポリペプチド鎖は、配列番号58で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含み、第2ポリペプチド鎖は、配列番号57で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む；（c）第1ポリペプチド鎖は、配列番号59で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含み、第2ポリペプチド鎖は、配列番号57で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む；（d）第1ポリペプチド鎖は、配列番号60で表されるアミノ酸配列と少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも99%、または100%同一のアミノ酸配列を含み、第2ポリペプチド鎖は、配列番号47で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む；または（e）第1ポリペプチド鎖は、配列番号61で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含み、第2ポリ

ペプチド鎖は、配列番号47で表されるアミノ酸配列と少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%、もしくは100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0036】

本明細書に開示された二量体またはヘテロ二量体PSMA結合タンパク質のある実施形態では、PSMA結合タンパク質は、マウスモノクローナル抗体107-1A4と比較してPSMA発現細胞によって延長された血清半減期、低減した内在化、および／またはPSMA発現細胞表面上の延長された持続時間を示す。

【0037】

別の実施形態では、本明細書の開示は、PSMA結合ポリペプチドをコードする単離核酸を提供する。例えば、あるバリエーションでは、核酸は、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号41、配列番号44、配列番号48、配列番号50、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号69、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81、配列番号83、配列番号157、配列番号159、配列番号161、または配列番号163で表されるヌクレオチド配列を含む。

【0038】

別の実施形態では、本明細書の開示は、組換え宿主細胞内の本明細書に開示されたPSMA結合ポリペプチドまたはタンパク質発現用の発現ベクターを提供する。いくつかの実施形態では、発現ベクターは、PSMA結合ポリペプチドをコードする核酸セグメントを含み、核酸セグメントは、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に結合されている。いくつかの実施形態では、核酸セグメントは、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号41、配列番号44、配列番号48、配列番号50、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号69、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81、配列番号83、配列番号157、配列番号159、配列番号161、または配列番号163で表されるヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、発現ベクターは、第1および第2発現単位を含み、第1および第2発現単位はそれぞれ本明細書に開示されたある実施形態のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質の第1および第2ポリペプチド鎖をコードする第1および第2核酸セグメントを含み、第1および第2核酸セグメントは、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に連結している。あるバリエーションでは、(a)第1核酸セグメントは、配列番号44で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントは、配列番号45で表されるヌクレオチド配列を含む；(b)第1核酸セグメントは、配列番号53で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントは、配列番号52で表されるヌクレオチド配列を含む；(c)第1核酸セグメントは、配列番号54で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントは、配列番号52で表されるヌクレオチド配列を含む；(d)第1核酸セグメントは、配列番号55で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントは、配列番号45で表されるヌクレオチド配列を含む；または(e)第1核酸セグメントは、配列番号56で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントは、配列番号45で表されるヌクレオチド配列を含む。

【0039】

別の実施形態では、本明細書の開示は、本明細書に開示された発現ベクターを含む組換え宿主細胞を提供する。

【0040】

別の実施形態では、本明細書の開示は、PSMA結合ポリペプチドまたはタンパク質産生方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に開示されたPSMA結合ポリペプチド産生方法である。ある実施形態では、方法は、一般に発現ベクターを含む組換え宿主細胞を培養することを含み、発現ベクターは、PSMA結合ポリペ

チドをコードする核酸セグメントを含み、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に結合されており、培養は、核酸セグメントが発現し、したがって、P S M A 結合ポリペプチドを産生する条件下にある。あるバリエーションでは、核酸セグメントは、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 4、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 6 9、配列番号 7 1、配列番号 7 3、配列番号 7 5、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 8 1、配列番号 8 3、配列番号 1 5 7、配列番号 1 5 9、配列番号 1 6 1、または配列番号 1 6 3 で表されるヌクレオチド配列を含む。ある実施形態では、方法は、P S M A 結合ポリペプチド回収をさらに含む。

10

【0041】

いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に開示された二量体 P S M A 結合タンパク質産生方法である。あるバリエーションでは、発現ベクターの核酸セグメントは、本明細書に開示された P S M A 結合ポリペプチドをコードし、培養は、核酸セグメントが発現する条件下にあり、コードされた P S M A 結合ポリペプチドは、二量体 P S M A 結合タンパク質として産生する。方法は、二量体 P S M A 結合タンパク質回収をさらに含むことができる。

【0042】

他の実施形態では、方法は、本明細書に開示されたヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質産生方法である。ある実施形態では、方法は、一般に第 1 および第 2 発現単位を含む組換え宿主細胞を培養することを含み、第 1 および第 2 発現単位はそれぞれ本明細書に説明するヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質の第 1 および第 2 ポリペプチド鎖をコードする第 1 および第 2 核酸セグメントを含み、第 1 および第 2 核酸セグメントは、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に連結しており、培養は、第 1 および第 2 核酸セグメントが発現し、コードされたポリペプチド鎖が、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質として産生する条件下にある。いくつかの実施形態では、方法は、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質回収をさらに含む。

20

【0043】

別の実施形態では、本明細書の開示は、本明細書に説明する任意の P S M A 結合ポリペプチドもしくはタンパク質ならびに医薬上許容される担体、希釈液、または賦形剤を含む組成物を提供する。

30

【0044】

別の実施形態では、本明細書の開示は、P S M A 発現細胞に対する抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (A D C C) または補体依存性細胞傷害 (C D C) 誘発方法を提供する。例えば、いくつかの実施形態では、P S M A 発現細胞に対する A D C C または C D C 誘発方法は、P S M A 発現細胞を第 1 および第 2 ポリペプチド鎖を含む二量体 P S M A 結合タンパク質と接触させることを含み、各ポリペプチド鎖は、本明細書に開示された P S M A 結合ポリペプチドであり、前記接触は、P S M A 発現細胞に対して A D C C または C D C を誘発する条件下にある。他の実施形態では、P S M A 発現細胞に対する A D C C または C D C 誘発方法は、段落 [0031] のように、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質と細胞を接触させることを含み、前記接触は、P S M A 発現細胞に対して A D C C または C D C を誘発する条件下にある。

40

【0045】

別の実施形態では、本明細書の開示は、P S M A 発現細胞に対する再指向 T 細胞の細胞傷害 (R T C C) 誘発方法を提供する。一部のバリエーションでは、P S M A 発現細胞に対する R T C C 誘発方法は、P S M A 発現細胞を第 1 および第 2 ポリペプチド鎖を含む二量体 P S M A 結合タンパク質と接触させることを含み、前記ポリペプチド鎖のそれぞれは、本明細書に開示された P S M A 結合ポリペプチドであり、前記接触は、P S M A 発現細胞に対して R T C C を誘発する条件下にある。他の実施形態では、P S M A 発現細胞に対

50

する R T C C 誘発方法は、本明細書に開示されたヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質と細胞を接触させることを含み、前記接触は、P S M A 発現細胞に対して R T C C を誘発する条件下にある。

【0046】

別の実施形態では、本明細書の開示は、対象の P S M A 過剰発現を特徴とする障害の処置方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、治療有効量の上に開示された二量体 P S M A 結合タンパク質を対象に投与することを含む。一部のかかる実施形態では、二量体 P S M A 結合タンパク質の第 1 および第 2 ポリペプチド鎖は、P S M A 結合ポリペプチド（例えば、上に開示されたもの）であり、二量体 P S M A 結合タンパク質は対象中に再指向 T 細胞の細胞傷害（R T C C）を誘発する。他のバリエーションでは、方法は、治療有効量のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質（例えば、上に開示されたもの）を対象に投与することを含む。一部のバリエーションでは、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質は、上に開示されたタンパク質であり、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質は対象中に R T C C を誘発する。開示された方法のある実施形態では、障害は、癌、例えば、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性前立腺癌）、大腸癌、胃癌、淡明細胞型腎細胞癌、膀胱癌、または肺癌等である。いくつかの実施形態では、障害は、例えば、前立腺癌または良性前立腺肥大症等の前立腺障害である。他のバリエーションでは、障害は、新生血管障害である。治療する新生血管障害は、例えば、固体腫瘍成長を特徴とする癌、例えば、淡明細胞型腎細胞癌、大腸癌、膀胱癌、および肺癌等であることができる。

【0047】

本発明のこれらのおよび他の実施形態および／または他の態様は、本発明の以下の発明を実施するための形態および添付図について言及時に明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図 1】P S M A（+）（L N C a P）および P S M A（-）（D U-145）前立腺癌細胞系における T S C 085、T S C 092 および T S C 122 と親 107-1A4 マウス抗体（T S C 045）を比較するために使用された結合試験の結果を例証するグラフである。

【図 2A】P S M A（+）（C4-2）および P S M A（-）（D U-145）前立腺癌細胞系におけるヒト化 T S C 188 および T S C 189 を比較するために使用された結合試験の結果を例証するグラフである。

【図 2B】P S M A（+）（C4-2）および P S M A（-）（D U-145）前立腺癌細胞系における親ヒト化 S M I P 分子 T S C 188 および T S C 189 ならびにキメラインターセプター分子 T S C 122 に対するヒト化 S C O R P I O N 分子 T S C 194 および T S C 199 の結合を比較するために使用された結合試験の結果を例証するグラフである。

【図 3】インターセプターおよび S M I P 足場を足場とする P S M A 結合タンパク質に対する親 107-1A4 マウス抗体を比較する内在化実験の結果を例証するグラフである。

【図 4】2つの異なるドナー（A G および V V としてラベル）のヒト血液由来 T 細胞の存在下で、低減する濃度（300、100、30、10 および 0 pM）でキメラ T S C 122 インターセプター分子と共に 24 時間に渡り観察された強力な標的依存性細胞傷害活性を例証するグラフである。

【図 5】親キメラインターセプター分子 T S C 122 と並んだ T S C 200、T S C 202、T S C 204 の細胞傷害を例証するグラフである。

【図 6】キメラインターセプター分子 T S C 122 と比較したヒト化 107-1A4 S C O R P I O N 分子（T S C 194、T S C 199、T S C 212、T S C 213）によって媒介される T 細胞の細胞傷害を例証するグラフである。

【図 7A】C4-2 細胞と反応する抗 P S M A 二重特異性分子（T S C 194、T S C 199、T S C 202 および T S C 122）により誘発された C D 4 + T 細胞（図 7A）および C D 8 + T 細胞（図 7B）の標的依存性増殖を例証するグラフである。

【図 7 B】C 4-2 細胞と反応する抗 P S M A 二重特異性分子 (T S C 1 9 4、T S C 1 9 9、T S C 2 0 2 および T S C 1 2 2) により誘発された C D 4 + T 細胞 (図 7 A) および C D 8 + T 細胞 (図 7 B) の標的依存性増殖を例証するグラフである。

【図 8 A】C 4-2 細胞上の P S M A に対する m A b J 5 9 1 および J 4 1 5 対 1 0 7-1 A 4 m A b および キメラ および ヒト化 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子の競合結合試験を例証するグラフである。具体的に、図 8 A は、ヒト化 J 5 9 1 抗体 (H u 5 9 1) が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において 1 0 7-1 A 4、J 5 9 1 または J 4 1 5 マウス抗体と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す；図 8 B は、3 つのマウス抗体が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において キメラ 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子 (T S C 0 8 5) と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す；ならびに図 8 C は、3 つのマウス抗体が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において ヒト化 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子 (T S C 1 8 9) と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す。

10

【図 8 B】C 4-2 細胞上の P S M A に対する m A b J 5 9 1 および J 4 1 5 対 1 0 7-1 A 4 m A b および キメラ および ヒト化 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子の競合結合試験を例証するグラフである。具体的に、図 8 A は、ヒト化 J 5 9 1 抗体 (H u 5 9 1) が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において 1 0 7-1 A 4、J 5 9 1 または J 4 1 5 マウス抗体と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す；図 8 B は、3 つのマウス抗体が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において キメラ 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子 (T S C 0 8 5) と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す；ならびに図 8 C は、3 つのマウス抗体が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において ヒト化 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子 (T S C 1 8 9) と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す。

20

【図 8 C】C 4-2 細胞上の P S M A に対する m A b J 5 9 1 および J 4 1 5 対 1 0 7-1 A 4 m A b および キメラ および ヒト化 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子の競合結合試験を例証するグラフである。具体的に、図 8 A は、ヒト化 J 5 9 1 抗体 (H u 5 9 1) が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において 1 0 7-1 A 4、J 5 9 1 または J 4 1 5 マウス抗体と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す；図 8 B は、3 つのマウス抗体が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において キメラ 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子 (T S C 0 8 5) と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す；ならびに図 8 C は、3 つのマウス抗体が C 4-2 細胞上の P S M A に対する結合において ヒト化 1 0 7-1 A 4 S M I P 分子 (T S C 1 8 9) と競合するかどうかを決定する競合結合アッセイの結果を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0049】

I. 一般的詳細

本発明は、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) と特異的結合する P S M A 結合ポリペプチドおよびタンパク質を提供する。治療有効量の本発明の P S M A 結合ポリペプチドまたはタンパク質をそれを必要としている患者に投与することは、ある癌および前立腺障害等の P S M A 過剰発現に関連するある障害の治療に有用である。1 つの実施形態では、P S M A 結合ポリペプチドまたはタンパク質は P S M A 過剰発現標的細胞と T 細胞に同時に結合し、したがって、P S M A 過剰発現標的細胞と T 細胞を「架橋」する。標的に対する両ドメインの結合は、強力な標的依存性再指向 T 細胞の細胞傷害 (R T C C) を引き出す (例えば、標的依存性 T 細胞の細胞傷害、T 細胞活性化および T 細胞増殖を誘発する)。

40

【0050】

本明細書で使用する項の題名は、構成目的のみであり、記載の主題を限定するものとして解釈されない。特許、特許出願、記事、書物、および論文が挙げられるが、これらに限定されない本明細書に引用した全文書、または一部文書は、任意の目的で参照によってそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる。1 つまたは複数の組み込まれた文書または一部文書が出願中の用語の定義と矛盾する用語を定義する場合、本出願に示す定義が制

50

御する。

【0051】

本明細書の発明を実施するための形態において、任意の濃度範囲、割合範囲、比範囲、または整数範囲は、別段の指定のない限り、列挙した範囲内の任意の整数値、適切な場合、その留分（整数の10分の1および100分の1等）を含むものと理解されるべきである。本明細書で使用する「約」とは、別段の指定のない限り、提示の範囲、値、または構造の±20%を意味する。本明細書で使用する用語「a」および「an」とは、別段の指定のない限り、列挙した成分「の1つまたは複数」を指すものと理解されるべきである。代用物（例えば、「または」）の使用は、代用物の1つ、両方、もしくはは任意のそれらの組み合わせのいずれかを意味するものと理解されるべきである。本明細書で使用する用語「を含む（include）」と「を含む（comprise）」は同意語として使用される。さらに、本明細書に記載の様々な成分（例えば、ドメインまたは領域）および置換基の組み合わせを含むポリペプチドは、各ポリペプチドが個別に説明された場合と同一範囲で本明細書に開示されているものと理解されるべきである。したがって、各ポリペプチドの特定の成分の選択は、本明細書の開示の範囲内である。

II. 定義

【0052】

本明細書で使用する用語「結合ドメイン」または「結合領域」とは、抗原、リガンド、受容体、基質、または阻害剤（例えば、CD3、PSMA）等の標的分子を特異的に認識して結合する能力を保有するタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド、またはペプチドのドメイン、領域、部分、または部位を指す。例示的な結合ドメインとしては、単鎖抗体可変領域（例えば、ドメイン抗体、sFv、scFv、scFab）、受容体外部ドメイン、およびリガンド（例えば、サイトカイン、ケモカイン）が挙げられる。ある実施形態では、結合ドメインは、抗原結合部位（例えば、可変重鎖配列および可変軽鎖配列または代替的フレームワーク領域（FR）（例えば、任意に1つまたは複数のアミノ酸置換を含むヒトFR）内に置いた抗体由来の3本の軽鎖補体決定領域、（CDR）および3本の重鎖CDRを含むかまたはそれらからなる。特定の標的に特異的結合する本明細書に開示の結合ドメインを同定するための様々なアッセイ（ウエスタンブロット、ELISA、ファージディスプレイライブラリースクリーニング、およびBIACORE（商標登録）相互作用分析等）が既知である。本明細書で使用するPSMA結合ポリペプチドは、「第1結合ドメイン」および、任意に、「第2結合ドメイン」を有することができる。ある実施形態では、「第1結合ドメイン」とは、PSMA結合ドメインであり、特定のポリペプチド形態（例えば、SMIPまたはPIMS）に応じて、アミノ末端に位置してもカルボキシル末端に位置してもよい。第1および第2結合ドメインの両方を含むある実施形態では、第2結合ドメインは、T細胞表面抗原（例えば、CD3）に結合するマウスモノクローナル抗体（例えば、CRIS-7）に由来するscFv等のT細胞結合ドメインである。他の実施形態では、第2結合ドメインは、第2PSMA結合ドメインである。さらに他の実施形態では、第2結合ドメインは、PSMA結合ドメインまたはT細胞結合ドメイン以外の結合ドメインである。

【0053】

10^5 M^{-1} 以上の親和性または K_a （すなわち、単位 $1/\text{M}$ で相互作用する特定の結合の平衡結合定数）で標的と結合するが、試験試料に存在する他の成分には有意に結合しない場合、結合ドメインは標的に「特異的結合する」。結合ドメインは、「高い親和性」結合ドメインおよび「低い親和性」結合ドメインに分類できる。「高い親和性」結合ドメインは、少なくとも 10^7 M^{-1} 、少なくとも 10^8 M^{-1} 、少なくとも 10^9 M^{-1} 、少なくとも 10^{10} M^{-1} 、少なくとも 10^{11} M^{-1} 、少なくとも 10^{12} M^{-1} 、または少なくとも 10^{13} M^{-1} K_a の結合ドメインを指す。「低い親和性」結合ドメインは、最大 10^7 M^{-1} 、最大 10^6 M^{-1} 、最大 10^5 M^{-1} K_a の結合ドメインを指す。あるいは、親和性は、単位Mで相互作用する特定の結合の平衡解離定数（ K_d ）（例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）と定義することができる。本明細書の開示によって、結

合ドメインポリペプチドおよび単鎖ポリペプチドの親和性を、従来技術（例えば、Scatchard et al., (1949) Ann. N. Y. Acad. Sci. 51:660、ならびに米国特許第5,283,173号、同第5,468,614号、または均等物を参照されたい）を用いて容易に決定することができる。

【0054】

「CD3」は、T細胞受容体複合体サブユニットである6鎖の多タンパク質複合体として当該技術分野において知られている（例えば、Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., p. 172 and 178, 1999を参照されたい）。哺乳動物において、T細胞受容体複合体のCD3サブユニットは、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、およびCD3 ζ 鎖のホモ二量体である。CD3 γ 、CD3 δ 、およびCD3 ϵ 鎖は、単一免疫グロブリンドメインを含む免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連した細胞表面タンパク質である。CD3 γ 、CD3 δ 、およびCD3 ϵ 鎖の膜貫通領域は負的に負荷し、これは、これらの鎖に正に帯電したT細胞受容体鎖に結合させる特徴である。CD3 γ 、CD3 δ 、およびCD3 ϵ 鎖の細胞内尾は、それぞれ免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして既知である単一の保存的モチーフを含み、各CD3 ζ 鎖は3を有する。ITAMは、TCR複合体のシグナル伝達能において重要であることが考えられる。本明細書の開示に使用されるCD3は、ヒト、サル、マウス、ラット、または他の哺乳動物を含む様々な動物種に由来し得る。

【0055】

本明細書で使用する「保存的置換」とは、あるアミノ酸と類似の特性を有する別のアミノ酸との置換として当該技術分野において認識されている。例示的な保存的置換は、当該技術分野において周知である（例えば、WO97/09433号、page 10、1997年3月13日公開；Lehninger, Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp. 71-77; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA (1990), p. 8を参照されたい）。ある実施形態では、保存的置換は、ロイシンからセリンへの置換を含む。

【0056】

本明細書で使用する用語「誘導体」とは、酵素を用いたまたは用いない化学的または生物学的な手段、例えば、グリコシル化、アルキル化、アシル化、エステル形態、またはアミド形態によるペプチドの1つまたは複数のアミノ酸残基の改変を指す。

【0057】

本明細書で使用する設計化したポリペプチドまたはタンパク質「に由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列とは、ポリペプチド起点を指す。ある実施形態では、特定の配列（「開始」または「親（parent）」または「親の（parental）」配列と呼ばれることもある）に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、開始配列またはその部分と本質的に同一のアミノ酸配列を有し、前記部分は少なくとも10～20個のアミノ酸、少なくとも20～30個のアミノ酸、または少なくとも30～50個のアミノ酸、または少なくとも50～150個のアミノ酸からなるか、あるいは開始配列中にその起点を有するとして当業者が識別可能である。

【0058】

別のポリペプチドに由来するポリペプチドは、開始ポリペプチド、例えば、別のアミノ酸残基と置換されているかまたは1つもしくは複数のアミノ酸残基が挿入されたかもしくは欠失した1つまたは複数のアミノ酸残基と比較して1つまたは複数の変異を有することができる。ポリペプチドは、天然ではないアミノ酸配列を含むことができる。かかるバリエーションは必然的に、開始ポリペプチドと100%未満の配列同一性または類似性を有する。1つの実施形態では、変異型は、開始ポリペプチドのアミノ酸配列と約60%～100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性のアミノ酸配列を有する。別の実施形態で

は、変異型は、開始ポリペプチドのアミノ酸配列と約75%～100%未満、約80%～100%未満、約85%～100%未満、約90%～100%未満、約95%～100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性のアミノ酸配列を有する。

【0059】

別段の提示のない限り、本明細書で使用する免疫グロブリン分子の変領域内のアミノ酸残基位置は、カバット番号付け法 (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Bethesda, MD: Public Health Service, National Institutes of Health (1991)) によって番号付け、免疫グロブリン分子の定常領域内のアミノ酸残基位置は、EU 命名法によって番号付ける (Ward et al., 1995 Therap. Immunol. 2: 77-94)。

【0060】

本明細書で使用する用語「二量体」とは、共有結合 (例えば、ジスルフィド結合) および他の相互作用 (例えば、電気静的相互作用、塩架橋、水素結合、および疎水相互作用) を含む分子内力の1つまたは複数の形態を介して互いに結合し、適切な条件下 (例えば、組換えタンパク質の発現、純化、および／もしくは保存に適した水溶液中の生理的条件下、または電気泳動の変性しないおよび／もしくは低減しない条件下) で安定している2つのサブユニットからなる生物学的実体を指す。「ヘテロ二量体」または「ヘテロ二量体タンパク質」とは、本明細書で使用する場合、2つの異なるポリペプチドから形成された二量体を指す。ヘテロ二量体は、4つのポリペプチド (すなわち、2つの軽鎖および2つの重鎖) から形成された抗体を含まない。「ホモ二量体」または「ホモ二量体タンパク質」とは、本明細書で使用する場合、2つの同一ポリペプチドから形成された二量体を指す。

【0061】

本明細書で使用する「ヒンジ領域」または「ヒンジ」とは、(a) 膜貫通型タンパク質 (例えば、1型膜貫通型タンパク質) のインタードメイン領域; または (b) 2型C-レクチンの軸領域由来であるポリペプチドを指す。例えば、ヒンジ領域は、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバのインタードメイン領域由来であることができる; この特定のクラス内の適切なヒンジ領域としては、(i) 野生型および改変免疫グロブリンヒンジを含む免疫グロブリンのヒンジ領域 (例えば、上および／または核領域 (1つまたは複数) からなる) もしくはその機能的変異型、ならびに (ii) 免疫グロブリンV様または免疫グロブリンC様ドメインに接続する領域 (またはその機能的変異型) が挙げられる。

【0062】

「野生型免疫グロブリンのヒンジ領域」とは、抗体重鎖に見られる、(IgG、IgA、およびIgDにおける) CH1ドメインとCH2ドメイン間に介入されてそれらを接続するかまたは (IgEおよびIgMにおける) CH1ドメインとCH3ドメイン間に介入されてそれらを接続する天然上および中心ヒンジアミノ酸配列を指す。ある実施形態では、野生型免疫グロブリンのヒンジ領域配列はヒトであり、ヒトIgGヒンジ領域を含むことができる。

【0063】

「改変野生型免疫グロブリンのヒンジ領域」もしくは「改変免疫グロブリンのヒンジ領域」とは、(a) 最大30%のアミノ酸変化 (例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失) を有する野生型免疫グロブリンのヒンジ領域、または (b) 長さ約5アミノ酸 (例えば、約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸) 最大約120個のアミノ酸 (例えば、長さ約10～約40個のアミノ酸または約15～約30個のアミノ酸または約15～約20個のアミノ酸または約20～約25アミノ酸を有する)、最大約30%のアミノ酸変化 (例えば、最大約25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、または1%のアミノ酸置換または欠失もしくはそれらの組み合わせ) を有し、PCT/米国特許第2010/62436号およびPCT/米国特許第2010/6

10

20

30

40

50

2404号に開示のIgG核ヒンジ領域を有する野生型免疫グロブリンのヒンジ領域の一部を指す。

【0064】

本明細書で使用する用語「ヒト化」とは、ヒトに対して免疫原性の低い非ヒト種（例えば、マウスまたはラット）に由来しつつ、遺伝学的技術の使用によって元の抗体の抗原結合特性を保持する抗体または免疫グロブリン結合タンパク質およびポリペプチドの作製プロセスを指す。いくつかの実施形態では、抗体または免疫グロブリン結合タンパク質およびポリペプチド（例えば、軽鎖および重鎖可変領域、Fab、scFv）の結合ドメイン（1つまたは複数）はヒト化されている。非ヒト結合ドメインは、「再形成」（Verhooeyen, et al., 1988 Science 239:1534-1536; Riechmann, et al., 1988 Nature 332:323-337; Tempest, et al., Bio/Technol 1991 9:266-271）、「高キメラ化」（Queen, et al., 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:10029-10033; Co, et al., 1991 Proc Natl Acad Sci USA 88:2869-2873; Co, et al., 1992 J Immunol 148:1149-1154）、および「化粧張り」（Mark, et al., “Derivation of therapeutically active humanized and veneered anti-CD18 antibodies. In: Metcalf BW, Dalton BJ, eds. Cellular adhesion: molecular definition to the therapeutic potential. New York: Plenum Press, 1994: 291-312）を含むCDRグラフト（Jones et al., Nature 321:522 (1986)）およびその変異型として既知である技術を用いてヒト化することができる。非ヒト供給源に由来する場合、ヒンジ領域および定常領域ドメイン等の抗体または免疫グロブリン結合タンパク質およびポリペプチドの他の領域もヒト化できる。

10

20

【0065】

「免疫グロブリン二量体化ドメイン」または「免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン」とは、本明細書で使用する場合、第2ポリペプチド鎖の異なる免疫グロブリンドメインと選択的に相互作用するかまたは結合するポリペプチド鎖の免疫グロブリンドメインを指し、異なる免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインの相互作用は、第1および第2ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化に実質的に関与するかまたは効率的に促進する（すなわち、「ヘテロ二量体」とも呼ばれる2つの異なるポリペプチド鎖間の二量体形成）。第1ポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインおよび／または第2ポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインの不在下で第1および第2ポリペプチド鎖間の二量体化に統計的有意な低下がある場合、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン間の相互作用は、第1および第2ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化に「実質的に関与するかまたは効率的に促進する」。ある実施形態では、第1および第2ポリペプチド鎖が共発現する場合、互いに少なくとも60%、少なくとも約60%～約70%、少なくとも約70%～約80%、少なくとも80%～約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の第1および第2ポリペプチド鎖形態ヘテロ二量体である。代表的な免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインとしては、そこに提供される野生型免疫グロブリンCH1およびCLドメインならびに改変（または変異）免疫グロブリンCH1およびCLドメインを含む免疫グロブリンCH1ドメイン、免疫グロブリンCLドメイン（例えば、CκまたはCλアイソタイプ）、またはその誘導体が挙げられる。

30

40

【0066】

「免疫グロブリン定常領域」または「定常領域」とは、1つまたは複数の定常領域ドメインの一部またはすべてと一致するかまたはそれらに由来するペプチドまたはポリペプチド配列について言及するように本明細書において定義した用語である。ある実施形態では

50

、免疫グロブリン定常領域は、1つまたは複数の定常領域ドメインの一部またはすべてであるが抗体源の定常領域ドメインのすべてではないものと一致するかまたはそれらに由来する。ある実施形態では、定常領域は、I g G C H 2 および C H 3 ドメイン（例えば、I g G 1 C H 2 および C H 3 ドメインを含む。ある実施形態では、定常領域は、C H 1 ドメインを含まない。ある実施形態では、定常領域を作製する定常領域ドメインは、ヒトである。いくつかの実施形態では（例えば、C D 3 または別の T 細胞表面抗原に特異的結合する第 2 結合ドメインを含む P S M A 結合ポリペプチドまたはタンパク質のあるバリエーションでは）、本開示の融合タンパク質の定常領域ドメインは、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（A D C C）ならびに補体活性化および補体依存性細胞傷害（C D C）のエフェクター機能がないかほとんどないのに対し、一部の F_c 受容体（F_c R n、新生児 F_c 受容体等）の結合能を保持し、比較的長い i n v i v o 半減期を保持する。他のバリエーションでは、本開示の融合タンパク質は、A D C C および C D C の片方または両方のかかるエフェクター機能を保持する定常ドメインを含む。ある実施形態では、本開示の結合ドメインは、ヒト I g G 1 定常領域に融合され、I g G 1 定常領域は、1つまたは複数の以下のアミノ酸変異：234 位のロイシン（L 234）、235 位のロイシン（L 235）、237 位のグリシン（G 237）、318 位のグルタミン酸（E 318）、320 位のリジン（K 320）、322 位のリジン（K 322）、もしくは任意のそれらの組み合わせ（E U 番号付け）を有する。例えば、任意の 1つまたは複数のこれらのアミノ酸は、アラニンに変異することができる。さらなる実施形態では、I g G 1 F c ドメインは、アラニン（すなわち、それぞれ L 234 A、L 235 A、G 237 A、E 318 A、K 320 A、および K 322 A）に変異している各 L 234、L 235、G 237、E 318、K 320、および K 322（E U 番号付け）を有し、任意に N 297 A 変異も同様に有する（すなわち、C H 2 ドメインのグリコシル化を本質的に除去する）。

【0067】

「F_c 領域」または「F_c ドメイン」とは、細胞上の抗体受容体および補体の C 1 q 成分への結合に関与する抗体源部分に相当するかまたは由来するポリペプチド配列を指す。F_c は、タンパク質結晶を容易に形成する抗体断片である「断片結晶」を表す。当初タンパク質分解の消化によって記載された異なるタンパク質断片は、免疫グロブリンタンパク質の全体の一般的構造を定義することができる。当初文献に定義されていたように、F_c 断片はジスルフィド結合した重鎖ヒンジ領域、C H 2、および C H 3 ドメインからなる。しかしながら、より最近、本用語は、C H 3、C H 2、および第 2 のかかる鎖とジスルフィド結合した二量体を形成する上で十分な少なくとも一部のヒンジからなる単鎖に適用されている。免疫グロブリン構造および機能の総説については、Putnam, The Plasma Proteins, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140; および Padlan, Mol. Immunol. 31:169-217, 1994 を参照されたい。本明細書で使用する用語 F_c は、天然配列の変異型を含む。

【0068】

本明細書で使用する用語「S M I P」とは、例えば、米国特許公開第 2003/0133939 号、同第 2003/0118592 号、および同第 2005/0136049 号（これらは、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に一般に開示されるようにタンパク質足場について言及するために使用される。実施例および本明細書の開示全体に記載する「P S M A 特異的 S M I P 分子」または「S M I P 分子」とは、S M I P 足場（例えば、アミノからカルボキシル末端側への順で）、第 1 結合ドメイン、ヒンジ領域、および免疫グロブリン定常領域を含む P S M A 結合タンパク質であるものと理解されるべきである。

【0069】

本明細書で使用する用語「P I M S」とは、例えば、米国特許公開第 2009/0148447 号（これは、参照によってその全体が本明細書に組み込まれる）に一般に開示されるようにタンパク質足場について言及するために使用される。実施例および本明細書の

開示全体に記載する「PSMA特異的PIMS分子」または「PIMS分子」とは、PIMS足場（例えば、アミノからカルボキシル末端側への順で）、免疫グロブリン定常領域、ヒンジ領域および第1結合ドメインを含むPSMA結合タンパク質であるものと理解されるべきである。

【0070】

本明細書で使用する用語「インターセプター」とは、PCT出願のPCT／米国特許第2010／62436号およびPCT／米国特許第2010／62404号（これらは、それらの全体が本明細書に組み込まれる）に一般に開示されるように単一特異性または多重特異性ヘテロ二量体タンパク質足場について言及するために使用される。実施例および本明細書の開示全体に記載する「PSMA特異的インターセプター分子」または「インターセプター分子」とは、インターセプター足場、例えば、2つの非同ポリペプチド鎖を含むPSMA結合タンパク質であり、各ポリペプチド鎖は免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを含むものと理解されるべきである。界面免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは異なる。1つの実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、CH1ドメインまたはその誘導体を含む。別の実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、CLドメインまたはその誘導体を含む。1つの実施形態では、CLドメインは、C κ もしくはC λ アイソタイプまたはその誘導体である。

【0071】

本明細書で使用する「SCORPION」とは、多重特異性結合タンパク質足場について言及するために使用される用語である。SCORPION（商標）は、Emergent Product Development Seattle, LLC商標である。多重特異性結合タンパク質およびポリペプチドは、例えば、PCT出願WO2007／146968号、米国特許出願第2006／0051844号、PCT出願WO2010／040105号、PCT出願WO2010／003108号、および米国特許第7,166,707号（これらは、参照によってそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に開示されている。SCORPIONポリペプチドは、2つの結合ドメイン（ドメインは、同一または異なる標的と特異的結合するように設計することができる）、2つのヒンジ領域、および免疫グロブリン定常領域を含む。SCORPIONタンパク質は、2つの同一、ジスルフィド結合SCORPIONポリペプチドを含むホモ二量体タンパク質である。実施例および本明細書の開示全体に記載する「PSMA特異的SCORPION分子」または「SCORPION分子」とは、SCORPION足場、例えば、2つの結合ドメイン（ドメインは、同一または異なる標的と特異的結合するように設計することができる）、2つのヒンジ領域、および免疫グロブリン定常領域を含むPSMA結合タンパク質であるものと理解されるべきである。

【0072】

本明細書で使用する2型C-レクチンの「軸領域」とは、Cタイプレクチン様ドメイン（CTL D；（例えば、ナチュラルキラー細胞受容体のCTL Dに類似）と膜貫通ドメイン間に位置する2型C-レクチンの余剰細胞ドメイン部分を指す。例えば、ヒトCD94分子（GenBank寄託番号AAC50291.1、PRI1995年11月30日）において、余剰細胞ドメインはアミノ酸残基34～179と一致し、CTL Dはアミノ酸残基61～176と一致する。したがって、ヒトCD94分子の軸領域は、膜およびCTL D間で見られるアミノ酸残基34～60を含む（Boyington et al., Immunity 10:75, 1999を参照されたい；他の軸領域の詳細については、Beavil et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:753, 1992；およびFigdor et al., Nature Rev. Immunol. 2:77, 2002も参照されたい）。これらの2型C-レクチンは、軸領域および膜貫通領域またはCTL D間で6～10連結アミノ酸を有することもできる。別の例では、233アミノ酸ヒトNKG2Aタンパク質（GenBank寄託番号P26715.1、PRI2010年6月15日）は、アミノ酸71～93の膜貫通ドメインおよびアミノ酸94～233の余剰細胞ドメインを有する。CT

LDは、アミノ酸119～231からなり、軸領域は、アミノ酸99～116を含み、これは、5および2アミノ酸接合によって側面に位置する。他の2型C-レクチン、ならびにそれらの余剰細胞リガンド結合ドメイン、インタードメインもしくは軸領域、およびCTL Dは、当該技術分野において知られている（例えば、ヒトCD23、CD69、CD72、NKG2AおよびNKG2Dの配列ならびにそれらの詳細において、それぞれGenBank 寄託番号NP_001993.2；AAH07037.1、PRI2006年7月15日；NP_001773.1、PRI2010年6月20日；AAL65234.1、PRI2002年1月17日、およびCAA04925.1、PRI2006年1月14日を参照されたい）。

【0073】

本明細書で使用する膜貫通型タンパク質（例えば、1型膜貫通型タンパク質）の「インタードメイン領域」とは、2つの隣接ドメイン間に位置する膜貫通型タンパク質の余剰細胞ドメインの一部を指す。インタードメイン領域例としては、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバの隣接Igドメインを連結する領域（例えば、IgG、IgA、IgD、もしくはIgE由来の免疫グロブリンのヒンジ領域；CD2のIgVおよびIgC2ドメインを連結する領域；またはCD80もしくはCD86のIgVおよびIgCドメインを連結する領域）が挙げられる。インタードメイン領域の別の例は、CD22、1型シアル酸結合Ig様レクチンの非IgおよびIgC2ドメインを連結する領域である。

【0074】

2型C-レクチンの軸領域「に由来する」または膜貫通型タンパク質インタードメイン領域（例えば、免疫グロブリンのヒンジ領域）「に由来する」ポリペプチド領域とは、約5～約150個のアミノ酸配列、約5～約100個のアミノ酸配列、約5～約50個のアミノ酸配列、約5～約40個のアミノ酸配列、約5～約30個のアミノ酸配列、約5～約25アミノ酸配列、約5～約20個のアミノ酸配列、約10～約25アミノ酸配列、約10～約20個のアミノ酸配列、約8～約20個のアミノ酸配列、約9～約20個のアミノ酸配列、約10～約20個のアミノ酸配列、約11～約20個のアミノ酸配列、約12～約20個のアミノ酸配列、約13～約20個のアミノ酸配列、約14～約20個のアミノ酸配列、約15～約20個のアミノ酸配列、または約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のアミノ酸配列を指し、これらのすべてまたは少なくとも一部は以下（i）野生型軸領域もしくはインタードメイン領域配列；（ii）野生型軸領域もしくはインタードメイン領域配列の断片；（iii）（i）または（ii）のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、もしくは95%のアミノ酸配列同一性を有するポリペプチド；または（iv）欠失、挿入、置換、もしくは任意のそれらの組み合わせを有する、例えば、1つもしくは複数の変化は置換を含むかまたは1つもしくは複数の変異は1つの欠失のみを含む1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸中の（i）もしくは（ii）のいずれかを含む。いくつかの実施形態では、軸領域誘導体は、NKG2A、NKG2D、CD23、CD64、CD72、またはCD94の約8～約20個のアミノ酸に由来するもの等、野生型軸領域配列と比較してタンパク質分解切断に対してより耐性である。

【0075】

本明細書で使用する用語「連結アミノ酸」または「連結アミノ酸残基」とは、ヒンジおよび隣接免疫グロブリン定常領域間、またはヒンジおよび隣接結合ドメイン間、または2つの免疫グロブリン可変ドメインおよび隣接免疫グロブリン可変ドメインを連結するペプチドリンカー間等のポリペプチドの2つの隣接領域またはドメイン間の1つまたは複数の（例えば、約2～10）アミノ酸残基を指す。連結アミノ酸は、ポリペプチド構築物設計（例えば、ポリペプチドをコードする核酸分子の構築物中の制限酵素部位の使用に起因するアミノ酸残基）の結果であることができる。

【0076】

本明細書で使用する語句「CH3およびCH1またはCL間リンカー」とは、CH3ドメイン（例えば、野生型CH3または変異CH3）のC末端ならびにCH1ドメインもし

10

20

30

40

50

くはC Lドメイン（例えば、C k）のN末端間の1つもしくは複数の（例えば、約2～12、約2～10、約4～10、約5～10、約6～10、約7～10、約8～10、約9～10、約8～12、約9～12、もしくは約10～12）アミノ酸残基を指す。

【0077】

本明細書で使用する用語「必要としている患者」とは、治療が奏効するかまたは本明細書に提供されるP S M A結合タンパク質もしくはポリペプチドまたはその組成物を用いて改善される疾患、障害もしくは状態リスクのあるかまたはそれらを呈している患者を指す。

【0078】

本明細書で使用する用語「ペプチドリinker」とは、同一の軽鎖および重鎖可変領域を含む抗体と同一標的分子に対して重鎖可変領域を軽鎖可変領域と接続し、得られたポリペプチドが特異的な結合親和性を保持するように2つの副結合ドメインの相互作用と互換性のあるスパーサー機能を提供するアミノ酸配列を指す。ある実施形態では、リンカーは、5～約35アミノ酸、例えば、約15～約25アミノ酸からなる。

【0079】

本明細書で使用する用語「医薬上許容される」とは、当該技術分野において周知である経路を用いて投与時にアレルギー性または他の重篤な副作用を産生しない分子構成要素および組成物を指す。動物における、特にヒトにおける使用において、連邦もしくは州政府規制当局によって承認されているかまたは米国薬局方もしくは他の一般に認識された薬局方に掲載された分子構成要素および組成物は、「医薬上許容される」とみなされる。

【0080】

本明細書で使用する用語「プロモーター」とは、結合RNAポリメラーゼに関与し転写を開始するDNA領域を指す。

【0081】

本明細書で使用する用語「核酸」、「核酸分子」、もしくは「ポリヌクレオチド」とは、単一または二重鎖形態のいずれかのデオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドならびにそのポリマーを指す。特に限定されない限り、用語は、基準ヌクレオチドと類似の結合特性を有し、天然ヌクレオチドに類似の方法で代謝される天然核酸のアナログを含む核酸を包含する。別段の指定のない限り、特定の核酸配列はまた保存的に修飾されたその変異型（例えば、縮退コドン置換）および補体配列ならびに明白に提示された配列も暗に包含される。具体的には、縮退コドン置換は、1つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの第3位が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基と置換されている配列を生成することによって達成できる（Batzner et al. (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; Cassol et al. (1992); Rossolini et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98）。核酸という用語は、遺伝子、cDNA、および遺伝子によってコードされるmRNAと同義的に使用される。本明細書で使用する用語「核酸」、「核酸分子」、または「ポリヌクレオチド」とは、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチドアナログを用いて生成したDNAまたはRNAアナログ、ならびにその誘導体、断片およびホモログを含むことが意図される。

【0082】

用語「発現」とは、核酸によってコードされる生成物の生体合成を指す。例えば、目的のポリペプチドをコードする核酸セグメントの場合、発現は、mRNA内への核酸セグメント転写ならびに1つもしくは複数のポリペプチド内へのmRNA翻訳に関与する。

【0083】

用語「発現単位」と「発現カセット」は本明細書において同義的に使用され、目的のポリペプチドをコードする核酸セグメントを示し、宿主細胞内核酸セグメントの発現を提供することが可能である。発現単位は、典型的には、転写プロモーター、目的のポリペプチ

ドをコードするオープンリーディングフレーム、および転写ターミネーターをすべて作動可能な配置で含む。転写プロモーターおよびターミネーターに加えて、発現単位は、例えば、エンハンサーまたはポリアデニル化シグナル等の他の核酸セグメントをさらに含むことができる。

【0084】

用語「発現ベクター」とは、本明細書で使用する場合、1つまたは複数の発現単位を含む線形または円形の核酸分子を指す。1つまたは複数の発現単位に加えて、発現ベクターは、例えば、1つもしくは複数の複製起源または1つもしくは複数の選択マーカー等の追加の核酸セグメントも含むことができる。発現ベクターは、一般には、プラスミドもしくはウイルスDNAに由来するかまたは両要素を含むことができる。

10

【0085】

本明細書で使用する用語「配列同一性」とは、2つ以上のポリヌクレオチド配列間または2つ以上のポリペプチド配列間の関連を指す。ある配列中の位置が比較配列の相当する位置の同一核酸塩基またはアミノ酸残基に占められる場合、配列は、該位置で「同一」と記載される。「配列同一性」の割合とは、同一核酸塩基またはアミノ酸残基が両配列において生じ、「同一」位置数が得られる位置数を決定することによって計数される。次いで、「同一」位置数を比較窓中の位置の総数で割り、100を掛けて「配列同一性」の割合を得る。「配列同一性」の割合とは、比較窓上の至適に整列した2配列の比較によって決定する。核酸配列の比較窓は、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300、400、500、600、700、800、900または1000またはそれ以上の核酸長であることができる。ポリペプチド配列の比較窓は、例えば、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、300またはそれ以上のアミノ酸長であることができる。比較用に配列を至適に整列するため、比較窓中の一部のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、添加またはすき間と呼ばれる欠失を含むことができ、基準配列は一定を保つ。至適アライメントは、すき間を有してさえ、基準配列と比較配列間の潜在的「同一」位置数が最も高いアライメントである。2配列間の「配列同一性」の割合は、国立生物工学情報センターから利用可能であった(2004年9月1日時点)プログラム「BLAST2配列」版を用いて決定することができる。このプログラムはBLASTNプログラム(ヌクレオチド配列比較用)とBLASTPプログラム(ポリペプチド配列比較用)を組み込み、Karlin and Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90(12): 5873-5877, 1993)のアルゴリズムに基づく。「BLAST2配列」を利用する場合、2004年9月1日時点でデフォルトパラメーターであったパラメーターを、ワード長(3)、オープンギャップペナルティ(11)、延長ギャップペナルティ(1)、すき間の欠落(50)、期待値(10)およびマトリックス選択肢が挙げられるが、これらに限定されない他の任意の必要なパラメーターに使用することができる。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列は、2配列が互いに比較して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%配列同一性を有する場合、「実質的に類似の配列同一性」または「実質的な配列同一性」を有するとみなされる。

20

30

40

【0086】

本明細書で使用する「ポリペプチド」または「ポリペプチド鎖」とは、共有結合したアミノ酸の単、線形および連続的配列である。それは、鎖内ジスルフィド結合を介して非線形状で共に連結する2つのポリペプチド鎖(例えば、軽鎖がジスルフィド結合を介して重鎖と連結する半分の免疫グロブリン分子)を含まない。ポリペプチドは、1つまたは複数の鎖内ジスルフィド結合を有することも形成することもできる。本明細書に記載のポリペプチドに関して、配列番号に特定されるものに相当するアミノ酸残基についての言及は、かかる残基の翻訳後の改変を含む。

50

【0087】

「タンパク質」とは、1つまたは複数のポリペプチド鎖を含む巨分子である。タンパク質は炭水化物基等の非ペプチド成分も含むことができる。炭水化物および他の非ペプチド置換基は、タンパク質が産生する、細胞によってタンパク質に加えることができ、細胞種で変わる。タンパク質は、アミノ酸骨格構造に関して本明細書において定義する；炭水化物基等の置換基は、一般に、特定されないが、存在し得る。

【0088】

本明細書で使用する「小モジュラー免疫薬タンパク質」またはSMIPとは、例えば、米国特許公開第2003/0133939号、同第2003/0118592号、および同第2005/0136049号に一般に開示されているタンパク質足場を指す。SMIP（商標）は、（商標）は、Emergent Product Development Seattle, LLC商標である。SMIPタンパク質は、結合ドメイン、ヒンジ領域および免疫グロブリン定常領域を有するポリペプチド鎖を含むことができる。

【0089】

用語「アミノ末端」および「カルボキシル末端」とは、ポリペプチド内の位置を示すために本明細書で使用する。文脈上、無理のない限り、これらの用語は特定の配列または一部のポリペプチドに関連して使用され、近位または相対的位置を示す。例えば、ポリペプチド内の基準配列に対するカルボキシル末端に位置するある配列は、基準配列のカルボキシル末端の近位であるが、必ずしも完全なポリペプチドのカルボキシル末端にある必要はない。

【0090】

「T細胞受容体」（TCR）は、CD3と共にT細胞表面上に見られる分子であり、一般に主な組織適合性複合体（MHC）分子に結合した抗原を認識することに関与する。それは、ほとんどのT細胞内の最も可変的な α および β 鎖のジスルフィド結合したヘテロ二量体からなる。他のT細胞内では、可変 γ および δ 鎖からなる代替的受容体が発現する。TCR各鎖は、免疫グロブリンスーパーファミリーメンバであり、1つのN末端免疫グロブリン可変ドメイン、1つの免疫グロブリン定常ドメイン、膜貫通領域、およびC末端の短い細胞質尾を保有する（Abbas and Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (5th Ed.), Editor: Saunders, Philadelphia, 2003; Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th Ed., Current Biology Publications, p148, 149, and 172, 1999を参照されたい）。本明細書の開示に使用されるTCRは、ヒト、マウス、ラット、または他の哺乳動物を含む様々な動物種に由来し得る。

【0091】

「TCR複合体」とは、本明細書で使用する場合、CD3鎖と他のTCR鎖との結合によって形成された複合体を指す。例えば、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖ホモ二量体、TCR α 鎖、およびTCR β 鎖を構成することができる。あるいは、TCR複合体は、CD3 γ 鎖、CD3 δ 鎖、2つのCD3 ϵ 鎖、CD3 ζ 鎖ホモ二量体、TCR γ 鎖、およびTCR δ 鎖を構成することができる。

【0092】

「TCR複合体の成分」とは、本明細書で使用する場合、TCR鎖（すなわち、TCR α 、TCR β 、TCR γ またはTCR δ ）、CD3鎖（すなわち、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ またはCD3 ζ ）、または2つ以上のTCR鎖もしくはCD3鎖によって形成された複合体（例えば、TCR α およびTCR β 複合体、TCR γ およびTCR δ 複合体、CD3 ϵ およびCD3 δ 複合体、CD3 γ およびCD3 ϵ 複合体、またはTCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、および2つのCD3 ϵ 鎖の副TCR複合体）を指す。

【0093】

「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」および「ADCC」とは、本明細書で使用する場合

10

20

30

40

50

、F c γ Rを発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞およびマクロファージ等の単球細胞）が標的細胞上の結合抗体（またはF c γ R結合が可能な他のタンパク質）を認識し、続いてその標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性プロセスを指す。本質的に、活性化F c γ Rを有する任意のエフェクター細胞がA D C Cを媒介するきっかけとなり得る。A D C Cを媒介する主な細胞はNK細胞であり、これはF c γ R I I Iのみを発現するが、単球は、それらの活性化、局所化、または分化状態に応じて、F c γ R I、F c γ R I I、およびF c γ R I I Iを発現することができる。造血細胞上のF c γ R発現の総説については、例えば、R a v e t c h e t a l. , 1991, Annu. Rev. Immunol. , 9: 457-92を参照されたい。

10

【0094】

用語「A D C C活性を有する」とは、ポリペプチドまたはタンパク質についての言及において本明細書で使用する場合、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、I g G（例えば、I g G 1）由来等のC H 2およびC H 3ドメインを有する免疫グロブリンのヒンジ領域および免疫グロブリン定常領域を含むもの）は、F c受容体（例えば、NK細胞）を発現する細胞可溶性免疫エフェクター細胞上の細胞可溶性F c受容体（例えば、F c γ R I I I）の結合を介して抗体依存性細胞介在性細胞傷害（A D C C）媒介が可能であることを意味する。

【0095】

「補体依存性細胞傷害」および「C D C」とは、本明細書で使用する場合、正常な血清中成分（「補体」）が標的抗原に結合した抗体または他のC 1 qー補体結合タンパク質と共に、標的抗原を発現する標的細胞の溶解を示すプロセスを指す。補体は、調和して規則正しい配列中で作用してそれらの効果を発揮する血清タンパク質群からなる。

20

【0096】

用語「従来の補体経路」および「従来の補体系」とは、本明細書で使用する場合、同義語であり、活性化の特定の経路を指す。従来の経路は、C 1～C 9設計された9つの主なタンパク質成分を順に開始する抗原抗体複合体を必要とし、活性化に参与する。活性化プロセス中のいくつかの工程において、生成物は、連続工程を触媒する酵素である。このカスケードは、比較的小さな初回シグナルによって大量補体の増幅および活性化を提供する。

30

【0097】

用語「C D C活性を有する」とは、ポリペプチドまたはタンパク質についての言及において本明細書で使用する場合、ポリペプチドまたはタンパク質（例えば、I g G（例えば、I g G 1）由来等のC H 2およびC H 3ドメインを有する免疫グロブリンのヒンジ領域および免疫グロブリン定常領域を含むもの）は、C 1 q補体タンパク質の結合および従来の補体系の活性化を介して依存性細胞傷害（C D C）媒介が可能であることを意味する。

【0098】

「再指向T細胞の細胞傷害」および「R T C C」とは、本明細書で使用する場合、細胞傷害T細胞と標的細胞の両方に特異的結合可能な多重特異性タンパク質を用いて細胞傷害T細胞が標的細胞に補充され、標的依存性細胞傷害T細胞反応が標的細胞に対して引き出されるT細胞媒介性プロセスを指す。

40

【0099】

用語「新血管新生」と「血管形成」は、本明細書において同義的に使用される。新血管新生および血管形成は、細胞、組織、または臓器内の新規血管産出を指す。血管形成の制御は、ある病態において典型的に改変され、多くの場合、疾患関連の病的損傷は、改変されたまたは未調節の血管形成に関する。持続性、未調節の血管形成は、内皮細胞による異常増殖を特徴とするもの等の様々な病態に生じ、血管の漏出および浸透等の状態に見られる病的損傷を支持する。

【0100】

用語「新生血管障害」とは、増大したまたは未調節の血管形成活性に少なくとも部分的

50

に媒介された病理を有する任意の疾患または障害を指すために本明細書で使用する。かかる疾患または障害例としては、固形腫瘍を含む様々な癌が挙げられる。P S M A 過剰発現を特徴とする血管系を含むかかる疾患または障害（例えば、淡明細胞型腎細胞癌、大腸癌、膀胱癌、および肺癌等の固形腫瘍を含むある癌）は、本明細書に詳述のとおり血管形成を阻害するある治療法に特に反応する。

【0101】

本明細書で使用する用語「処置（treatment）」、「処置する（treating）」、または「改善する」とは、治療的処置または予防（prophylactic/preventative）処置のいずれかを指す。処置は、処置中の個体の疾患の少なくとも1つの症状を改善するかまたは処置が個体の進行性疾患悪化を遅延化することができるかまたは追加の関連疾患発現を予防する場合、治療的である。

10

【0102】

本明細書で使用する用語、特異的な結合分子または化合物の「治療的有效量（または投与量）」または「有効量（または投与量）」とは、処置中の疾患の1つまたは複数の症状の統計的有意な改善に至る化合物の十分な量を指す。各活性成分について言及時、単独投与する治療的有效量とは、成分単独を指す。併用について言及時、治療的有效量とは、連続投与するか（同一製剤でまたは別々の製剤で同時に）同時投与するかに関わらず、治療効果に至る活性成分の併用量を指す。

【0103】

本明細書で使用する用語「形質転換」、「トランスフェクション」、および「形質導入」とは、細胞内への核酸（すなわち、ヌクレオチドポリマー）移動を指す。本明細書で使用する用語「遺伝子形質転換」とは、細胞内へのDNA、特に組換えDNAの移動および挿入を指す。移した核酸は、発現ベクターを介して細胞内に導入できる。

20

【0104】

本明細書で使用する用語「変異型」とは、基準核酸またはポリペプチドとは異なるが、その本質的な特性を保持する核酸またはポリペプチドを指す。一般に、変異型は全体に密接に類似し、多くの領域内において基準核酸またはポリペプチドと同一である。例えば、変異型は、活性な部分または全長基準核酸またはポリペプチドと比較して少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%配列同一性を示し得る。

30

【0105】

用語「軽鎖可変領域」（「軽鎖可変ドメイン」または「VL」とも呼ばれる）および「重鎖可変領域」（「重鎖可変ドメイン」または「VH」とも呼ばれる）はそれぞれ抗体軽鎖および重鎖由来の可変結合領域を指す。可変結合領域は、「補体決定領域」（CDR）および「フレームワーク領域」（FR）として既知である不連続で十分に定義された副領域で構成されている。1つの実施形態では、FRはヒト化されている。用語「CL」、「免疫グロブリン軽鎖定常領域」または「軽鎖定常領域」とは、すなわち、抗体軽鎖由来の定常領域を指す。用語「CH」とは、抗体アイソタイプに応じてCH1、CH2、およびCH3（IgA、IgD、IgG）、またはCH1、CH2、CH3、およびCH4ドメイン（IgE、IgM）にさらに分割可能な「免疫グロブリン重鎖定常領域」または「重鎖定常領域」を指す。「Fab」（抗原結合断片）は、抗原に結合する抗体の一部であり、鎖内ジスルフィド結合を介して軽鎖に連結する重鎖の可変領域およびCH1ドメインを含む。

40

【0106】

III. P S M A 結合ポリペプチド、タンパク質、およびその成分

本明細書の開示は、結合ドメイン、特に、P S M A と特異的結合する第1結合ドメインを含むポリペプチドおよびタンパク質を提供する。本開示の結合ドメインを含むポリペプチドおよびタンパク質は、免疫グロブリン定常領域、リンカーペプチド、ヒンジ領域、免疫グロブリン二量体化／ヘテロ二量体化ドメイン、連結アミノ酸、タグ等をさらに含むこ

50

とができる。開示されたポリペプチドおよびタンパク質のこれらの成分を以下にさらに詳述する。

【0107】

さらに、本明細書に開示されたP S M A結合ポリペプチドおよびタンパク質は、任意の様々な異なる形態の抗体または融合タンパク質形態であることができる（例えば、融合タンパク質は、S M I P分子、P I M S分子、S C O R P I O N分子またはインターセプター分子形態であることができる）。

【0108】

本発明によるP S M A結合タンパク質は、一般に（a）本明細書に説明するP S M A結合ドメインを含む少なくとも1つのP S M A結合ポリペプチド鎖を含む。あるバリエーションでは、P S M A結合ポリペプチドは、（b）P S M A結合ドメインに対するヒンジ領域カルボキシル末端、および（c）免疫グロブリン定常領域（例えば、S M I P分子）をさらに含む。さらなるバリエーションでは、P S M A結合ポリペプチドは、（d）免疫グロブリン定常領域に対する第2ヒンジ領域カルボキシル末端、および（e）第2ヒンジ領域に対する第2結合ドメインカルボキシル末端（例えば、S C O R P I O Nポリペプチド）をさらに含む。

【0109】

さらに他のバリエーションでは、P S M A結合ポリペプチドは、（b）P S M A結合ドメインに対するヒンジ領域アミノ末端、および（c）ヒンジ領域に対する免疫グロブリン副領域アミノ末端（例えば、P I M Sポリペプチド）を含む。

【0110】

典型的に、上記形態（S M I P、S C O R P I O N、またはP I M S）のP S M A結合ポリペプチドは、典型的に免疫グロブリン定常領域および／またはヒンジ領域を介した（例えば、I g G C H 2およびC H 3ドメインならびにI g Gヒンジ領域を含む免疫グロブリン定常領域を介した）ジスルフィド結合によりホモ二量体化が可能である。したがって、本発明のある実施形態では、2つの同一P S M A結合ポリペプチドはホモ二量体化して二量体P S M A結合タンパク質を形成する。

【0111】

他の実施形態では、P S M A結合ポリペプチドは、第2の、非同一ポリペプチド鎖中の異なるヘテロ二量体化ドメインとヘテロ二量体化可能なヘテロ二量体化ドメインをさらに含む。あるバリエーションでは、ヘテロ二量体化のための第2ポリペプチド鎖は、第2結合ドメインを含む。したがって、本発明のある実施形態では、2つの非同一ポリペプチド鎖（1つ目はP S M A結合ドメインを含み、2つ目は任意に第2結合ドメインを含む）は二量体化してヘテロ二量体P S M A結合タンパク質を形成する。

【0112】

P S M A結合ポリペプチド、タンパク質、およびそれらの様々な成分について、本明細書の以下に詳述する。

【0113】

A. 結合ドメイン

上に示したように、本明細書に開示の免疫グロブリン結合ポリペプチドは、P S M Aと特異的結合する結合ドメインを含む。一部のバリエーションでは、P S M A結合ドメインは、配列番号5および配列番号2にそれぞれ示すアミノ酸配列（例えば、m A b 107-1 A 4）を有するV_LおよびV_H領域を有する抗体、または配列番号21に示すアミノ酸配列を有する単鎖F_v（s c F_v）とP S M A結合において競合可能である。ある実施形態では、P S M A結合ドメインは、（i）C D R L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域（V_L）、ならびに（i i）C D R H C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域（V_H）を含む。適切なP S M A結合ドメインとしては、m A b 107-1 A 4由来のV_LおよびV_H領域を有するものが挙げられる。一部のかかる実施形態では、L C D R 3は配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、ならびに／またはH C D R 3は配列番号11で表される

アミノ酸配列を有し、ならびにLCDR1およびLCDR2は任意にそれぞれ配列番号15および配列番号16で表されるアミノ酸配列を有し、HCDR1およびHCDR2は任意にそれぞれ配列番号9および配列番号10で表されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、例えば、LCDR1、LCDR2、およびLCDR3は、それぞれ配列番号15、16、および17に示すアミノ酸配列を有する；ならびに／またはHCDR1、HCDR2、およびHCDR3は、それぞれ配列番号9、10、および11に示すアミノ酸配列を有する。

【0114】

ある実施形態では、PSMA結合タンパク質は、PSMA以外の標的に結合する1つまたは複数の追加の結合ドメイン（例えば、第2結合ドメイン）を含むことができる。これらの他の標的分子は、例えば、特定の細胞種、毒素、追加の細胞受容体、抗体等への結合ドメインポリペプチドを標的とする特定のサイトカインまたは分子を含むことができる。

【0115】

ある実施形態では、結合ドメインは、例えば、インターセプターまたはSCORPION分子部分として、T細胞補充のためのTCR結合ドメインを含み、PSMA発現細胞を標的とすることができる。ある実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドヘテロ二量体は、TCR複合体もしくはその成分（例えば、TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、およびCD3 ϵ ）に特異的結合する結合ドメインならびにPSMAに特異的結合する別の結合ドメインを含むことができる。

【0116】

本開示の結合ドメインが由来し得る例示的な抗CD3抗体としては、CRIS-7モノクローナル抗体（Reinherz, E. L. et al. (eds.), Leukocyte typing II., Springer Verlag, New York, (1986)；それぞれ配列番号153

(QVVL TQSPA IMSAFPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDSS

KLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMETEDAATYYCQQWSRNPPTFGGGTKLQITR)および配列番号154

(QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRSTMHWVKQRPQGGLIEWIGYINP

SSAYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCASPPQVHYDYNQFPYWGQGTLVTVSA))に示されるV_LおよびV_Hアミノ酸配列；HuM291 (Chau et al. (2001) Transplantation 71:941-950；それぞれ配列番号86 (DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASSSV

SYMNWYQQKPGKAPKRLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSNPPPTFGGGTKVEIK)および配列番号87 (QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFISYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPRSGYTHYNQKLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSAYYDYDGFAYWGQ

GTLVTVSS))に示されるV_LおよびV_Hアミノ酸配列；BC3モノクローナル抗体 (Anasetti et al. (1990) J. Exp. Med. 172:1691)；OKT3モノクローナル抗体 (Ortho multicenter Transplant Study Group (1985) N. Engl. J. Med. 313:337)およびOKT3 α - α 等のその誘導体 (OKT3 α -FLまたはOKT3 β -FLとも呼ばれる)、234位および235位にアラニン置換を有するヒト化Fc変異型 (Herold et al. (2003) J. Clin. Invest. 11:409)；ビジリズマブ (Carpenter et al. (2002) Blood 99:2712)、G19-4モノクローナル抗体 (Ledbetter et al., 1986, J. Immunol.

136:3945)ならびに145-2C11モノクローナル抗体(Hirsch et al. (1988) J. Immunol. 140: 3766)が挙げられる。例示的な抗TCR抗体は、BMA031モノクローナル抗体である(Borst et al. (1990) Human Immunology 29:175-188)。

【0117】

いくつかの実施形態では、結合ドメインは、目的の標的に特異的なV_HおよびV_L領域を含む単鎖Fc断片(scFv)である。ある実施形態では、V_HおよびV_L領域は、ヒトである。

【0118】

ある実施形態では、PSMA結合ドメインは、配列番号19、21、30、31、34または35のscFvのアミノ酸配列を含むかまたは、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%同一のscFvである。

【0119】

関連実施形態では、PSMA結合ドメインは、軽鎖可変領域(V_L) (例えば、配列番号23)または重鎖可変領域(V_H) (例えば、配列番号25または配列番号27)のアミノ酸配列、または両方を含むかまたは、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約99.5%、または100%同一の配列である。

【0120】

さらなる実施形態では、各CDRは、目的の標的(例えば、PSMA)に特異的結合するモノクローナル抗体またはその断片もしくは誘導体由来と比較して1つ、2つ、または3つ以下の置換、挿入または欠失を含む。

【0121】

CD3εに特異的結合する第2結合ドメインを含むPSMA結合タンパク質のいくつかの実施形態では、第2結合ドメインは、CRIS-7またはHuM291モノクローナル抗体とCD3ε結合において競合する。あるバリエーションでは、CD3結合ドメインは、CRIS-7またはHuM291モノクローナル抗体に由来する免疫グロブリン軽鎖可変領域(V_L)および免疫グロブリン重鎖可変領域(V_H)を含む(例えば、第2結合ドメインのV_LおよびV_Hは、モノクローナル抗体の軽鎖CDRおよび重鎖CDRをそれぞれ含むヒト化可変領域であることができる)。例えば、CRIS-7に由来するV_LおよびV_H領域は、(a)配列番号47の残基139~245で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一もしくは100%同一のアミノ酸配列を含むV_L領域ならびに配列番号47の残基1~122で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一もしくは100%同一のアミノ酸配列を含むV_H領域、ならびに(b)配列番号78の残基634~740で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一もしくは100%同一のアミノ酸配列を含むV_L領域、ならびに配列番号78の残基496~616で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%もしくは100%同一のアミノ酸配列を含むV_H領域から選択できる。

【0122】

ある実施形態では、本明細書に開示の結合ドメインV_Lおよび/またはV_H領域は、既知のモノクローナル抗体(例えば、107-1A4、CRIS-7、またはHuM291)のV_Lおよび/またはV_Hに由来し、既知のモノクローナル抗体のV_Lおよび/またはV_Hと比較して約1つまたは複数の(例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10)挿入、約1つまたは複数の(例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10)欠失、約1つまたは複数の(例えば、約2、3、4、5、6、7、8、9、10)アミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換または非保存的アミノ酸置換)、または上記変化の組み合わせを含む。各CDRが変化を含まないかまたは最大1つ、2つ、または3つの変化を

含み、修飾 V_L および／または V_H 領域を含む結合ドメインを提供し、依然として野生型結合ドメインに類似の親和性でその標的と特異的結合することができる場合、挿入（１つまたは複数）、欠失（１つまたは複数）または置換（１つまたは複数）は、 V_L および／または V_H 領域内（本領域のアミノまたはカルボキシル末端または両端を含む）の任意の箇所であることができる。

【0123】

一部のバリエーションでは、結合ドメインは、ペプチドリンカーによって結合する免疫グロブリン V_L および V_H 領域を含む単鎖 F_v ($s c F_v$) である。 V_L および V_H 領域に結合するためのペプチドリンカーの使用は、当該技術分野において周知であり、大量の刊行物がこの特定の分野に存在する。広範囲に使用されるペプチドリンカーは、 $G l y - G l y - G l y - S e r$ アミノ酸配列の３反復 ($G l y_4 S e r$)₃（配列番号 152）からなる 15mer である。他のリンカーも使用されており、ファージディスプレイ技術ならびに選択的感染性ファージ技術が適切なリンカー配列の多様化するおよび選択に使用されている (Tang et al., J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Hennecke et al., Protein Eng. 11, 405-410, 1998)。ある実施形態では、 V_L および V_H 領域は、式 ($G l y_4 S e r$)_n、式中 $n = 1 \sim 5$ （配列番号 165）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーによって結合する。他の適切なリンカーは、無作為変異法を介した単純リンカー（例えば ($G l y_4 S e r$)_n）の至適化によって得ることができる。

【0124】

ある実施形態では、結合ドメインは、ヒト化免疫グロブリン V_L および／または V_H 領域を含む。ヒト化免疫グロブリン V_L および V_H 領域技術は、当該技術分野において知られており、例えば、米国特許出願第 2006/0153837 号に論じられている。

【0125】

「ヒト化」は、元の分子の抗原結合特性を完全に保持する免疫原性の低い抗体に至ることが予期される。元の抗体のすべての抗原結合特性を保持するために、その抗原結合部位構造は「ヒト化」版で再産生されるべきである。これは、重要なフレームワーク残基を保持するかまたは保持しないヒト可変フレームワークドメインおよび定常領域上に非ヒト CDR のみグラフトすることによって (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Verhoeyen et al., Science 239:1539 (1988)) または (リガンド結合特性を保持するための) 完全非ヒト可変ドメインの再結合によって、ただし (抗原性を低減するために) 露出残基の慎重な置換を介してヒト様表面でそれらを「覆う」ことによって (Padlan, Molec. Immunol. 28:489 (1991)) 達成できる。

【0126】

本質的に、CDR グラフトによるヒト化は、ヒト可変領域フレームワークおよびヒト定常領域上の非ヒト抗体 CDR のみの再結合に参与する。理論的に、これは、免疫原性を実質的に低減または除去するべきである (アロタイプまたはイディオタイプ差が存在する場合を除く)。しかしながら、元の抗体の一部フレームワーク残基も保持する必要があることが報告されている (Reichmann et al., Nature, 332:323 (1988); Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10,029 (1989))。

【0127】

保持する必要があるフレームワーク残基は、コンピュータモデル化により同一性に従う。あるいは、重要なフレームワーク残基は、既知の抗原結合部位構造の比較によって潜在的に同定できる (Padlan, Molec. Immunol., 31(3):169-217 (1994)、参照によって本明細書に組み込まれる)。

【0128】

抗原結合に潜在的に影響を及ぼす残基は、数群に分類される。第 1 群は、抗原部位表面

10

20

30

40

50

と連続的な残基を含み、したがって、抗原と直接接触させることができる。これらの残基は、アミノ末端残基およびCDR隣接部を含む。第2群は、抗体のCDRまたは別のペプチド鎖に接触することによってCDRの構造または相対的アライメントを改変し得る残基を含む。第3群は、可変ドメインの構造的完全性に影響し得る埋没した側鎖を有するアミノ酸を含む。これらの群の残基は、通常、同位置に見られるが（上記Padlan, 1994）、同定されるそれらの位置は番号付け系に応じて異なり得る（Kab et al., "Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Pub. No. 91-3242, U. S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991を参照されたい）。

10

【0129】

本明細書に記載の実施形態は、SMIP、SCORPION、およびインターセプター分子のヒト化に参与し、抗体に参与しないが、当該技術分野におけるヒト化抗体に関する知識は本発明によるポリペプチドに適応可能である。

【0130】

B. ヒンジ領域

ある実施形態では、ヒンジは、野生型ヒト免疫グロブリンのヒンジ領域である。ある他の実施形態では、1つまたは複数のアミノ酸残基を、融合タンパク質構築物設計の一部として野生型免疫グロブリンのヒンジ領域のアミノまたはカルボキシル末端に追加することができる。例えば、ヒンジアミノ末端への追加の連結アミノ酸残基は「RT」、「RSS」、「TG」、または「T」であることもでき、ヒンジカルボキシル末端は「SG」であることもでき、ヒンジ欠失は、カルボキシル末端で追加された「SG」を有するΔP等、添加と組み合わせることもできる。

20

【0131】

ある実施形態では、ヒンジは、野生型免疫グロブリンのヒンジ領域内の1つまたは複数のシステイン残基が1つまたは複数の他のアミノ酸残基（例えば、セリンまたはアラニン）と置換された改変免疫グロブリンヒンジである。

【0132】

例示的な改変免疫グロブリンヒンジとしては、1つ、2つまたは3つの異なるアミノ酸残基（例えば、セリンまたはアラニン）によって置換された野生型ヒトIgG1ヒンジに見られる1つ、2つまたは3つのシステイン残基を有する免疫グロブリンヒトIgG1ヒンジ領域が挙げられる。改変免疫グロブリンヒンジは、別のアミノ酸（例えば、セリンまたはアラニン）と置換されたプロリンをさらに有することができる。例えば、上記の改変ヒトIgG1ヒンジは、別のアミノ酸残基（例えば、セリン、アラニン）によって置換された野生型ヒトIgG1ヒンジ領域の3つのシステインに対するカルボキシル末端に位置するプロリンをさらに有することができる。1つの実施形態では、核ヒンジ領域のプロリンは置換されていない。

30

【0133】

ある実施形態では、ヒンジポリペプチドは、野生型ヒトIgG1ヒンジ、野生型ヒトIgG2ヒンジ、または野生型ヒトIgG4ヒンジ等の野生型免疫グロブリンのヒンジ領域を含むかまたは、少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一の配列である。

40

【0134】

さらなる実施形態では、PSMA結合ポリペプチドに存在するヒンジは、免疫グロブリンヒンジに基づかないかまたは由来しない（すなわち、野生型免疫グロブリンヒンジまたは改変免疫グロブリンヒンジではない）ヒンジであり得る。かかるヒンジ例としては、膜貫通型タンパク質のインタードメイン領域または2型C-レクチンの軸領域に由来する約

50

5～約150個のアミノ酸ペプチド、例えば、約8～25アミノ酸ペプチドおよび約7～18アミノ酸ペプチドが挙げられる。

【0135】

ある実施形態では、インタードメインまたは軸領域ヒンジは、7～18アミノ酸を有し、 α らせん状に巻いた巻き構造を形成することができる。ある実施形態では、インタードメインまたは軸領域ヒンジは、0、1、2、3、または4システインを含む。例示的なインタードメインまたは軸領域ヒンジは、CD69、CD72、CD94、NKG2AおよびNKG2D軸領域由来の10～150個のアミノ酸断片等のインタードメインまたは軸領域のペプチド断片である。

【0136】

ある実施形態では、ヒンジ配列は、約5～150個のアミノ酸、5～10個のアミノ酸、10～20個のアミノ酸、20～30個のアミノ酸、30～40個のアミノ酸、40～50個のアミノ酸、50～60個のアミノ酸、5～60個のアミノ酸、5～40個のアミノ酸、8～20個のアミノ酸、または10～15アミノ酸を有する。ヒンジは、主に可塑性であることができるが、より硬い特徴を提供することも、最小の β シート構造を有する主に α らせん状構造を含むこともできる。ヒンジの長さまたは配列は、ヒンジが直接または間接的に（ヘテロ二量体化ドメイン等の別の領域またはドメインを介して）接続した結合ドメインの結合親和性、ならびにヒンジが直接または間接的に接続したFc領域部分の1つもしくは複数の活性に影響を及ぼすことができる。

【0137】

ある実施形態では、ヒンジ配列は、血漿および血清中で安定し、タンパク質分解切断に耐性である。IgG1上ヒンジ領域内第1リジンは、タンパク質分解切断を最小限に抑えるように変異していることができる、例えば、リジンは、メチオニン、トレオニン、アラニンまたはグリシンと置換されることができ、または欠失していることができる。

【0138】

本発明のいくつかの実施形態では、PSMA結合ポリペプチドは、第2ポリペプチド鎖を有するヘテロ二量体を形成可能であり、(a)免疫グロブリン定常領域に対するアミノ末端近位（例えば、免疫グロブリン定常領域がCH2およびCH3ドメインを含むアミノ末端～CH2ドメイン、または免疫グロブリン副領域がCH3およびCH4ドメインを含むアミノ末端～CH3ドメイン）で、(b)結合ドメイン（例えば、scFv）と免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン間に介入されてそれらを接続し、(c)（例えば、免疫グロブリン定常領域がCH2およびCH3ドメインまたはCH3およびCH4ドメインを含む）免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインと免疫グロブリン定常領域間に介入されてそれらを接続し、(d)免疫グロブリン定常領域と結合ドメイン間に介入されてそれらを接続し、(e)ポリペプチド鎖のアミノ末端にあるか、または(f)ポリペプチド鎖のカルボキシル末端にあるヒンジ領域を含む。本明細書に記載のヒンジ領域を含むポリペプチド鎖は、異なるポリペプチド鎖と結合して本明細書に提供されるヘテロ二量体タンパク質を形成可能であり、形成されたヘテロ二量体はその標的特異性またはその特異的な標的結合親和性を保持する結合ドメインを含む。

【0139】

ある実施形態では、別のポリペプチド鎖とヘテロ二量体を形成するポリペプチドに存在するヒンジは、野生型免疫グロブリンのヒンジ領域またはその改変免疫グロブリンのヒンジ領域等の免疫グロブリンヒンジであることができる。ある実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質の一方のポリペプチド鎖のヒンジは、ヘテロ二量体の他方のポリペプチド鎖の相当するヒンジと同一である。ある他の実施形態では、ある鎖のヒンジは、他鎖と（長さまたは配列が）異なる。異なる鎖中の異なるヒンジに、ヒンジが接続している結合ドメインの結合親和性の異なる操作をさせ、ヘテロ二量体がある結合ドメイン標的に対して他の結合ドメイン標的より選択的に結合可能であるようにする。例えば、ある実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質は、片鎖にCD3またはTCR結合ドメインを有し、他方鎖にPSMA結合ドメインを有する。2鎖中に2つの異なるヒンジを有することは、ヘテロ二量

10

20

30

40

50

体をまず P S M A に結合させて、次いで C D 3 または他の T C R 成分に結合させ得る。したがって、ヘテロ二量体は、C D 3 ⁺ T 細胞を P S M A 発現細胞（例えば、P S M A 発現腫瘍細胞）に補充し得、これは順に、P S M A 発現細胞を損傷または破壊し得る。

【 0 1 4 0 】

本発明による使用に適した例示的なヒンジ領域を下表 1 および 2 に示す。追加の例示的なヒンジ領域は、W O 2 0 1 1 / 0 9 0 7 6 2 号の配列番号 2 4 1 ~ 2 4 4、6 0 1、7 8、7 6 3 ~ 7 9 1、2 2 8、3 7 9 ~ 4 3 4、6 1 8 ~ 7 4 9（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。

【表 1】

例示的なヒンジ領域

ヒンジ領域	アミノ酸配列	配列番号
sss(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPSS	88
csc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPCS	89
ssc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPCS	90
scc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPCS	91
css(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPSS	92
scs(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPSS	93
ccc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPCS	94
ccc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPCP	95
sss(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPSP	96
csc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPCP	97
ssc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPCP	98
scc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPCP	99
css(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPSP	100
scs(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPSP	101
Scppcp	SCPPCP	102
STD1	NYGGGSGGGSGGGSGNS	103
STD2	NYGGGSGGGSGGGSGNYGGGSGGGSGGGSGNS	104
H1	NS	105
H2	GGGSGNS	106
H3	NYGGGSGNS	107
H4	GGGSGGGSGNS	108
H5	NYGGGSGGGSGNS	109
H6	GGGSGGGSGGGSGNS	110
H7	GCPPCPNS	62
(G ₄ S) ₃	GGGSGGGSGGGGS	111

10

20

30

40

ヒンジ領域	アミノ酸配列	配列番号
H105	SGGGSGGGSGGGGS	155
(G,S) ₄	GGGSGGGSGGGSGGGGS	112
H75 (NKG2A 四重突然変異)	QRHNSSLNTGTQMAGHSPNS	63
H83 (NKG2A 由来)	SSLNTGTQMAGHSPNS	65
H106 (NKG2A 由来)	QRHNSSLNTGTQMAGHS	156
H81 (NKG2D 由来)	EVQIPLTESYSPNS	64
H91 (NKG2D 由来)	NSLANQEVQIPLTESYSPNS	66
H94	SGGGSGGGSGGGGSPNS	67

10

【表 2】

例示的なヒンジ領域 (H7 ヒンジ、2型C-レクチンの軸領域、または1型膜貫通型タンパク質のイントロドメイン領域由来)

20

ヒンジ領域	アミノ酸配列	分子および/または由来したヒンジ	配列番号
<u>H16</u>	<u>LSVKADFLTPSIGN</u>	<u>CD80</u>	<u>113</u>
<u>H17</u>	<u>LSVKADFLTPSISCPPCPNS</u>	<u>CD80 + H7</u>	<u>114</u>
<u>H18</u>	<u>LSVLANFSQPEIGN</u>	<u>CD86</u>	<u>115</u>
<u>H19</u>	<u>LSVLANFSQPEISCPPCPNS</u>	<u>CD86 + H7</u>	<u>116</u>
<u>H20</u>	<u>LKIQERVSKPKISNS</u>	<u>CD2</u>	<u>117</u>
<u>H21</u>	<u>LKIQERVSKPKISCPPCPNS</u>	<u>CD2 + H7</u>	<u>118</u>
<u>H22</u>	<u>LNVSERPFPPHIQNS</u>	<u>CD22</u>	<u>119</u>
<u>H23</u>	<u>LDVSERPFPPHIQSCPPCPNS</u>	<u>CD22 + H7</u>	<u>120</u>
<u>H24</u>	<u>REQLAEVTLCLKANS</u>	<u>CD80</u>	<u>121</u>
<u>H25</u>	<u>REQLAEVTLCLKACPPCPNS</u>	<u>CD80 + H7</u>	<u>122</u>
<u>H26</u>	<u>RIHQMNSELSVLANS</u>	<u>CD86</u>	<u>123</u>
<u>H27</u>	<u>RIHQMNSELSVLACPPCPNS</u>	<u>CD86 + H7</u>	<u>124</u>
<u>H28</u>	<u>DTKGKNVLEKIFSNS</u>	<u>CD2</u>	<u>125</u>
<u>H30</u>	<u>LPPETQESQEVTLNS</u>	<u>CD22</u>	<u>126</u>

30

40

ヒンジ領域	アミノ酸配列	分子および/または由来したヒンジ	配列番号
<u>H32</u>	<u>RIHLNVSERPFPPNS</u>	<u>CD22</u>	<u>127</u>
<u>H33</u>	<u>RIHLNVSERPFPPCPNPNS</u>	<u>CD22 + H7</u>	<u>128</u>
<u>H36</u>	<u>GCPPCPGGGGSNS</u>	<u>H7</u>	<u>129</u>
<u>H40</u>	<u>GCPPCPANS</u>	<u>H7</u>	<u>130</u>
<u>H41</u>	<u>GCPPCPANS</u>	<u>H7</u>	<u>131</u>
<u>H42</u>	<u>GCPPCPNS</u>	<u>H7</u>	<u>132</u>
<u>H44</u>	<u>GGGASCPPCPGNS</u>	<u>H7</u>	<u>133</u>
<u>H45</u>	<u>GGGASCPPCAGNS</u>	<u>H7</u>	<u>134</u>
<u>H46</u>	<u>GGGASCPPCANS</u>	<u>H7</u>	<u>135</u>
<u>H47</u>	<u>LSVKADFLTPSIGNS</u>	<u>CD80</u>	<u>136</u>
<u>H48</u>	<u>ADFLTPSIGNS</u>	<u>CD80</u>	<u>137</u>
<u>H50</u>	<u>LSVLANFSQPEIGNS</u>	<u>CD86</u>	<u>138</u>
<u>H51</u>	<u>LSVLANFSQPEIGNS</u>	<u>CD86</u>	<u>139</u>
<u>H52</u>	<u>SQPEIVPISNS</u>	<u>CD86</u>	<u>140</u>
<u>H53</u>	<u>SQPEIVPISCPPCPNS</u>	<u>CD86 + H7</u>	<u>141</u>
<u>H54</u>	<u>SVLANFSQPEISCPPCPNS</u>	<u>CD86 + H7</u>	<u>142</u>
<u>H55</u>	<u>RIHQMNSELSVLANS</u>	<u>CD86</u>	<u>143</u>
<u>H56</u>	<u>QMNSELSVLANS</u>	<u>CD86</u>	<u>144</u>
<u>H57</u>	<u>VSERPFPPNS</u>	<u>CD22</u>	<u>145</u>
<u>H58</u>	<u>KPFFTCGSADTCPNS</u>	<u>CD72</u>	<u>146</u>
<u>H59</u>	<u>KPFFTCGSADTCPNS</u>	<u>CD72</u>	<u>147</u>
<u>H60</u>	<u>QYNCPGQYTFMPNS</u>	<u>CD69</u>	<u>148</u>
<u>H61</u>	<u>EPAFTPGPNIELQKSDCPNS</u>	<u>CD94</u>	<u>149</u>
<u>H62</u>	<u>QRHNSSLNTRTQKARHCPNS</u>	<u>NKG2A</u>	<u>150</u>

ヒンジ領域	アミノ酸配列	分子および/または由来したヒンジ	配列番号
<u>H63</u>	<u>NSLFNQEVQIPLTESYCPNS</u>	<u>NKG2D</u>	<u>151</u>

10

20

30

40

50

【0141】

C. 免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン

ある実施形態では、本発明の P S M A 結合ポリペプチドまたはタンパク質は、「免疫グロブリン二量体化ドメイン」または「免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン」を含むことができる。

【0142】

「免疫グロブリン二量体化ドメイン」または「免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン」とは、本明細書で使用する場合、別のポリペプチド鎖の異なる免疫グロブリンドメインと選択的に相互作用するかまたは結合するポリペプチド鎖の免疫グロブリンドメインを指し、異なる免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインの相互作用は、第1および第2ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化に実質的に関与するかまたは効率的に促進する（すなわち、「ヘテロ二量体」または「ヘテロ二量体タンパク質」とも呼ばれる2つの異なるポリペプチド鎖間の二量体形成）。第1ポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインおよび／または第2ポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインの不在下で第1および第2ポリペプチド鎖間の二量体化に統計的に有意な低下がある場合、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン間の相互作用は、第1および第2ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化に「実質的に関与するかまたは効率的に促進する」。ある実施形態では、第1および第2ポリペプチド鎖が共発現する場合、互いに少なくとも60%、少なくとも約60%～約70%、少なくとも約70%～約80%、少なくとも80%～約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の第1および第2ポリペプチド鎖形態ヘテロ二量体である。代表的な免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインとしては、本明細書に提供される野生型免疫グロブリン C H 1 および C L ドメインならびに改変（または変異）免疫グロブリン C H 1 および C L ドメインを含む免疫グロブリン C H 1 ドメイン、免疫グロブリン C L 1 ドメイン（例えば、C κ または C λ アイソタイプ）、またはその誘導体が挙げられる。

【0143】

二量体化／ヘテロ二量体化ドメインは、片方または両ポリペプチド鎖が結合ドメインを含む2つの非同ポリペプチド鎖からヘテロ二量体を形成することが所望される場合に使用することができる。ある実施形態では、本明細書に記載のあるヘテロ二量体の一方のポリペプチド鎖メンバは、結合ドメインを含まない。上に示したように、本明細書に開示のヘテロ二量体タンパク質は、各ポリペプチド鎖中に免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを含む。ヘテロ二量体のポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは互いに異なるため、両鎖のヘテロ二量体化を促進して片鎖のホモ二量体化を最小限に抑えるように異なって修飾することができる。実施例に示すように、本明細書に提供される免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、異なるポリペプチド間の効率的なヘテロ二量体化を可能とし、得られたヘテロ二量体タンパク質の精製を促進する。

【0144】

本明細書に提供されるように、本明細書の開示によって2つの異なる単鎖ポリペプチド（例えば、一方は短く、一方は長い）のヘテロ二量体化を促進する上で有用な免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインとしては、免疫グロブリン C H 1 および C L ドメイン、例えば、ヒト C H 1 および C L ドメインが挙げられる。ある実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、野生型 I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、または I g M C H 1 ドメイン等の野生型 C H 1 ドメインである。さらなる実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、P C T 公開 W O 2 0 1 1 / 0 9 0 7 6 2 号の配列番号 1 1 4、1 8 6～1 9 2 および 1 9 4（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）にそれぞれ説明される野生型ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、または I g M C H 1 ドメインである。ある実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、W O 2 0 1 1 / 0 9 0 7 6 2 号の配列番号 1 1 4（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される野生型ヒト I g G 1 C H 1 ドメインである。

【0145】

さらなる実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、改変IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgM CH1ドメイン等の改変免疫グロブリンCH1ドメインである。ある実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、改変ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgM CH1ドメインである。なおさらなる実施形態では、野生型免疫グロブリンCLドメイン（例えば、ヒトCL）とのジスルフィド結合形成に關与する野生型CH1ドメイン（例えば、ヒトCH1）のシステイン残基は、改変CH1ドメインと野生型CLドメイン間でジスルフィド結合が形成されないように、改変免疫グロブリンCH1ドメイン中で欠失しているかまたは置換されている。

10

【0146】

ある実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、野生型Cκドメインまたは野生型Cλドメイン等の野生型CLドメインである。ある実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、WO2011/090762号の配列番号112および113（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）にそれぞれ説明される野生型ヒトCκまたはヒトCλドメインである。さらなる実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、改変CκまたはCλドメイン、例えば、改変ヒトCκまたはヒトCλドメイン等の改変免疫グロブリンCLドメインである。

【0147】

ある実施形態では、野生型免疫グロブリンCH1ドメイン（例えば、ヒトCH1）とのジスルフィド結合形成に關与する野生型CLドメイン（例えば、ヒトCL）のシステイン残基は、改変免疫グロブリンCLドメイン中で欠失しているかまたは置換されている。かかる改変CLドメインは、それらのアミノ末端にアミノ酸欠失をさらに含むことができる。例示的なCκドメインは、野生型ヒトCκドメインの第1アルギニンおよび最終システインが共に欠失しているWO2011/090762号の配列番号141（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。ある実施形態では、野生型ヒトCκドメインから欠失した第1アルギニンは、そのカルボキシル末端にアルギニンを有し、改変Cκドメインのアミノ末端を別のドメイン（例えば、免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含む副領域等の免疫グロブリン副領域）と連結するリンカーによって提供できるため、改変Cκドメイン中で野生型ヒトCκドメインの最終システインのみ欠失している。例示的なCλドメインは、野生型ヒトCλドメインの第1アルギニンが欠失し、CH1ドメイン中のシステインとのジスルフィド結合形成に關与するシステインがセリンによって置換されているWO2011/090762号の配列番号140（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。

20

30

【0148】

さらなる実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、野生型Cκドメインと比較して、Cκ-Cκ界面で鎖内水素結合ネットワーク形成に關与し得る位置で1つまたは複数のアミノ酸置換を含む改変Cκドメインである。例えば、ある実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、異なるアミノ酸と置換されるN29、N30、Q52、V55、T56、S68またはT70位に1つまたは複数のアミノ酸を有する改変ヒトCκドメインである。アミノ酸番号は、WO2011/090762号の配列番号141（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される改変ヒトCκ配列中のそれらの位置に基づく。ある実施形態では、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、N29、N30、V55、またはT70位に1つ、2つ、3つまたは4つのアミノ酸置換を有する改変ヒトCκドメインである。上記位置で置換基として使用されるアミノ酸は、アラニンであることも、アルギニン、トリプトファン、チロシン、グルタミン酸塩、グルタミン、またはリジン等の大量側鎖部分を有するアミノ酸残基であることもできる。野生型ヒトCκ配列のアミノ酸残基を上記位置（例えば、N30）で置換するために使用することができる追加のアミノ酸残基としては、アスパラギン酸塩、メチオニン、セリンおよびフェニルアラニンが挙げられる。例示的な改変ヒトCκドメインは、WO20

40

50

11／090762号の配列番号142～178（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。改変ヒトCκドメインは、CH1ドメインとのヘテロ二量体化を促進するが、別のCκドメインとのホモ二量体化を最小限に抑えるものである。代表的な改変ヒトCκドメインは、WO2011／090762号の配列番号160（N29W V55A T70A）、161（N29Y V55A T70A）、202（T70E N29A N30A V55A）、167（N30R V55A T70A）、168（N30K V55A T70A）、170（N30E V55A T70A）、172（V55R N29A N30A）、175（N29W N30Y V55A T70E）、176（N29Y N30Y V55A T70E）、177（N30E V55A T70E）、178（N30Y V55A T70E）、838（N30D V55A T70E）、839（N30M V55A T70E）、840（N30S V55A T70E）、および841（N30F V55A T70E）（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。

【0149】

ある実施形態では、本明細書に記載のCκドメイン変異に加えてまたは代替的に、ポリペプチドヘテロ二量体の両免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン（すなわち、免疫グロブリンCH1およびCLドメイン）は、得られた免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが変異部位でアミノ酸残基間に塩架橋（すなわち、イオン性相互作用）を形成するように変異を有する。例えば、ポリペプチドヘテロ二量体の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、変異Cκドメインと組み合わせた変異CH1ドメインであることができる。変異CH1ドメイン中、野生型ヒトCH1ドメインの68位のバリリン（V68）は、負電荷を有するアミノ酸残基（例えば、アスパラギン酸塩またはグルタミン酸塩）によって置換されているが、第1アルギニンおよび最終システインが欠失している変異ヒトCκドメインの29位のロイシン（L29）は、正電荷を有するアミノ酸残基（例えば、リジン、アルギニンまたはヒスチジン）によって置換されている。得られた変異CH1ドメインの負電荷を有するアミノ酸残基と得られた変異Cκドメインの正電荷を有するアミノ酸残基間の電荷－電荷相互作用は塩架橋を形成し、これは変異CH1およびCκドメイン間のヘテロ二量体界面を安定させる。あるいは、野生型CH1のV68は、正電荷を有するアミノ酸残基によって置換されることができ、第1アルギニンおよび最終システインが欠失している変異ヒトCκドメインのL29は、負電荷を有するアミノ酸残基によって置換されることができ、V68が負電荷または正電荷のいずれかを有するアミノ酸によって置換されている例示的な変異CH1配列は、WO2011／090762号の配列番号844および845（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。L29が負電荷または正電荷のいずれかを有するアミノ酸によって置換されている例示的な変異Cκ配列は、WO2011／090762号の配列番号842および843（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。

【0150】

CH1ドメインのV68およびCκドメインのL29中の変異に加えてまたは代替的に、ヒトCH1ドメインのV68およびヒトCκドメインのL29以外の位置は、逆電荷を有するアミノ酸と置換されて、アミノ酸間でイオン性相互作用を生じることができ、かかる位置は、無作為変異法、CH1－Cκ対の結晶構造分析等の任意の適切な方法により同定し、一連の基準（例えば、イオン性相互作用に關与する傾向、潜在的パートナー残基への接近等）を用いてCH1－Cκ界面でアミノ酸残基を同定し、CH1－Cκ界面でアミノ酸残基間の適切な位置をさらに同定することができる。

【0151】

ある実施形態では、本明細書に開示のポリペプチドヘテロ二量体は、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを1対のみ含む。例えば、ポリペプチドヘテロ二量体の第1鎖は、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインとしてCH1ドメインを含むことができ、第2鎖は、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインとしてCLドメイン（例えば、CκまたはCλ）を含むことができる。あるいは、第1鎖は、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン

としてC Lドメイン（例えば、C_κまたはC_λ）を含むことができ、第2鎖は、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインとしてC H1ドメインを含むことができる。本明細書に説明する第1および第2鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、結合して本開示のヘテロ二量体タンパク質を形成することが可能である。

【0152】

ある他の実施形態では、本明細書に開示のヘテロ二量体タンパク質は、免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを2対有することができる。例えば、ヘテロ二量体の第1鎖は、2つのC H1ドメインを含むことができ、第2鎖は、第1鎖中の2つのC H1ドメインに関する2つのC Lドメインを有することができる。あるいは、第1鎖は、2つのC Lドメインを含むことができ、第2鎖は、第1鎖中の2つのC Lドメインに関する2つのC H1ドメインを有することができる。ある実施形態では、第1ポリペプチド鎖は、C H1ドメインおよびC Lドメインを含み、第2ポリペプチド鎖は、第1ポリペプチド鎖のC H1ドメインおよびC Lドメインにそれぞれ結合するC LドメインおよびC H1ドメインを含む。

10

【0153】

ヘテロ二量体タンパク質が一方のヘテロ二量体化対（すなわち、各鎖の1つの免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン）のみ含む実施形態では、各鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、該鎖の免疫グロブリン定常領域に対するアミノ末端に位置することができる。あるいは、各鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、該鎖の免疫グロブリン定常領域に対するカルボキシル末端に位置することができる。

20

【0154】

ヘテロ二量体タンパク質が2つのヘテロ二量体化対（すなわち、各鎖の2つの免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン）を含む実施形態では、各鎖の両免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが、該鎖の免疫グロブリン定常領域に対するアミノ末端に位置することができる。あるいは、各鎖の両免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが、該鎖の免疫グロブリン定常領域に対するカルボキシル末端に位置することができる。さらなる実施形態では、各鎖の1つの免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、該鎖の免疫グロブリン定常領域に対するアミノ末端に位置することができ、各鎖の他の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインは、該鎖の免疫グロブリン定常領域に対するカルボキシル末端に位置することができる。すなわち、それらの実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、各鎖の2つの免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン間に介入する。

30

【0155】

D. 免疫グロブリン定常領域

本明細書において示されるように、ある実施形態では、本明細書に開示のP S M A結合ポリペプチド（例えば、S M I P、P I M S、S C O R P I O N、およびインターセプター分子）は各ポリペプチド鎖中に免疫グロブリン定常領域（定常領域とも呼ばれる）を含む。免疫グロブリン定常領域の含有によって、対象に投与後、循環由来の2つのP S M A結合ポリペプチド鎖から形成されたホモ二量体およびヘテロ二量体タンパク質のクリアランスを緩慢化する。変異または他の改変によって、免疫グロブリン定常領域は、当該技術分野において知られており本明細書に記載のように、二量体ポリペプチドエフェクター機能（例えば、A D C C、A D C P、C D C、補体固定、およびF c受容体への結合）の調節をさらに比較的容易にすることができ、処置中の疾患に応じて増大することも低減することもできる。ある実施形態では、本明細書に開示のポリペプチドホモ二量体およびヘテロ二量体のポリペプチド鎖の片方または両方の免疫グロブリン定常領域は、1つまたは複数のこれらのエフェクター機能の媒介が可能である。他の実施形態では、1つまたは複数のこれらのエフェクター機能は、相当する野生型免疫グロブリン定常領域と比較して、本明細書に開示のポリペプチドホモ二量体およびヘテロ二量体のポリペプチド鎖の片方または両方の免疫グロブリン定常領域内で低減または欠損する。例えば、（例えば、C D 3結合ドメインの含有を介して）R T C Cを引き出すように設計された二量体P S M A結合ポリペプチドにおいて、免疫グロブリン定常領域は、好ましくは、相当する野生型免疫グロ

40

50

ブリン定常領域と比較して、エフェクター機能が低減しているか有さない。

【0156】

本明細書に開示のPSMA結合ポリペプチドに存在する免疫グロブリン定常領域は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、もしくは任意のそれらの組み合わせの一部またはすべてを含んでもそれらに由来してもよい。例えば、免疫グロブリン定常領域は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH2およびCH3の両ドメイン、CH3およびCH4の両ドメイン、2つのCH3ドメイン、CH4ドメイン、2つのCH4ドメイン、およびCH2ドメインおよび一部のCH3ドメインを含むことができる。

【0157】

本明細書に開示のPSMA結合ポリペプチドの免疫グロブリン定常領域を形成することができるCH2ドメインは、ある免疫グロブリンクラスもしくはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgD）由来および様々な種（ヒト、マウス、ラット、および他の哺乳動物等）由来の野生型免疫グロブリンCH2ドメインであることもその改変免疫グロブリンCH2ドメインであることもできる。

10

【0158】

ある実施形態では、CH2ドメインは、例えばPCT公開WO2011/090762号の配列番号115、199～201および195～197（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）にそれぞれ説明されるヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、またはIgDの野生型CH2ドメイン等の野生型ヒト免疫グロブリンCH2ドメインである。ある実施形態では、CH2ドメインは、WO2011/090762号の配列番号115（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される野生型ヒトIgG1 CH2ドメインである。

20

【0159】

ある実施形態では、CH2ドメインは、297位のアスパラギンでアミノ酸置換（例えば、アスパラギンからアラニンへの置換）を含む改変免疫グロブリンCH2領域（例えば、改変ヒトIgG1 CH2ドメイン）である。かかるアミノ酸置換は、この部位でグリコシル化を低減するかまたは除き、FcγRおよびC1qへの効率的Fc結合を無効にする。297位でAsnをAlaと置換した改変ヒトIgG1 CH2ドメイン配列は、WO2011/090762号の配列番号324で表される（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）。

30

【0160】

ある実施形態では、CH2ドメインは、234～238位に少なくとも1つの置換または欠失を含む改変免疫グロブリンCH2領域（例えば、改変ヒトIgG1 CH2ドメイン）である。例えば、免疫グロブリンCH2領域は、234位、235位、236位、237位もしくは238位、234位および235位、234位および236位、234位および237位、234位および238位、234～236位、234位、235位および237位、234位、236位および238位、234位、235位、237位、および238位、236～238位、または234～238位の2つ、3つ、4つまたは5つのアミノ酸の他の任意の組み合わせの置換を含むことができる。加えてまたは代替的に、改変CH2領域は、234～238位、例えば、236位または237位の1つの1つまたは複数の（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つの）アミノ酸欠失を含み、他の位置は置換されていることができる。上記変異（1つまたは複数）は、改変CH2ドメインを含むポリペプチドヘテロ二量体の抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）活性またはFc受容体結合能を低減または除去する。ある実施形態では、234～238位の1つまたは複数位置のアミノ酸残基は、1つまたは複数のアラニン残基と置換されている。さらなる実施形態では、234～238位のアミノ酸残基の1つのみが欠失しているが、234～238位の残りのアミノ酸の1つまたは複数は、別のアミノ酸（例えば、アラニンまたはセリン）と置換されることができる。

40

【0161】

50

ある他の実施形態では、CH₂ドメインは、253位、310位、318位、320位、322位、および331位のアミノ酸置換を1つまたは複数含む改変免疫グロブリンCH₂領域（例えば、改変ヒトIgG1 CH₂ドメイン）である。例えば、免疫グロブリンCH₂領域は、253位、310位、318位、320位、322位、もしくは331位、318位および320位、318位および322位、318位、320位および322位、または253位、310位、318位、320位、322位、および331位の2つ、3つ、4つ、5つもしくは6つのアミノ酸の他の任意の組み合わせの置換を含むことができる。上記変異（1つまたは複数）は、改変CH₂ドメインを含むポリペプチドヘテロ二量体の補体依存性細胞傷害（CDC）を低減または除去する。

【0162】

ある他の実施形態では、297位のアミノ酸置換に加えて、改変CH₂領域（例えば、改変ヒトIgG1 CH₂ドメイン）は、234～238位に1つまたは複数の（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つの）追加の置換をさらに含むことができる。例えば、免疫グロブリンCH₂領域は、297位に加えて、234位および297位、234位、235位、および297位、234位、236位および297位、234～236位および297位、234位、235位、237位および297位、234位、236位、238位および297位、234位、235位、237位、238位および297位、236～238位および297位、または234～238位の2つ、3つ、4つまたは5つのアミノ酸の任意の組み合わせの置換を含むことができる。加えてまたは代替的に、改変CH₂領域は、1つまたは複数の（例えば、2つ、3つ、4つまたは5つの）アミノ酸欠失、236位または237位等の234～238位を含むことができる。追加の変異（1つまたは複数）は、改変CH₂ドメインを含むポリペプチドヘテロ二量体の抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）活性またはFc受容体結合能を低減または除去する。ある実施形態では、234～238位の1つまたは複数位置のアミノ酸残基は、1つまたは複数のアラニン残基と置換されている。さらなる実施形態では、234～238位のアミノ酸残基の1つのみが欠失しているが、234～238位の残りのアミノ酸の1つまたは複数は、別のアミノ酸（例えば、アラニンまたはセリン）と置換されることができる。

【0163】

ある実施形態では、234～238位の1つまたは複数の（例えば、2つ、3つ、4つ、または5つの）アミノ酸置換に加えて、本明細書に開示の融合タンパク質中の変異CH₂領域（例えば、改変ヒトIgG1 CH₂ドメイン）は、補体固定（例えば、I253、H310、E318、K320、K322、またはP331位）に参与する1つまたは複数の位置に1つまたは複数の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの）追加のアミノ酸置換（例えば、アラニンとの置換）を含むことができる。変異免疫グロブリンCH₂領域例としては、234位、235位、237位（存在する場合）、318位、320位および322位にアラニン置換を有するヒトIgG1、IgG2、IgG4およびマウスIgG2a CH₂領域を含む。例示的な変異免疫グロブリンCH₂領域は、L234、L235、G237、E318、K320、およびK322にアラニン置換を有するマウスIGHG2c CH₂領域である。

【0164】

なおさらなる実施形態では、297位のアミノ酸置換ならびに234～238位の追加の欠失（1つまたは複数）もしくは置換（1つまたは複数）に加えて、改変CH₂領域（例えば、改変ヒトIgG1 CH₂ドメイン）は、253位、310位、318位、320位、322位、および331位に1つまたは複数の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つまたは6つの）追加の置換をさらに含むことができる。例えば、免疫グロブリンCH₂領域は、（1）297位の置換、（2）234～238位の1つもしくは複数の置換もしくは欠失またはそれらの組み合わせ、ならびにE318、K320およびK322位の1つ、2つ、3つの置換等のI253、H310、E318、K320、K322、およびP331位の1つもしくは複数の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの）アミノ酸置換を含むことができる。上記位置のアミノ酸は、アラニンまたはセリンによって置

10

20

30

40

50

換されることができる。

【0165】

ある実施形態では、免疫グロブリンCH2領域ポリペプチドは、以下(i) 297位のアスパラギンのアミノ酸置換ならびに234位、235位、236位もしくは237位の1アミノ酸置換；(ii) 297位のアスパラギンのアミノ酸置換および234～237位の2つのアミノ酸置換；(iii) 297位のアスパラギンのアミノ酸置換および234～237位のうち3つのアミノ酸置換；(iv) 297位のアスパラギンのアミノ酸置換、234位、235位および237位のアミノ酸置換、および236位のアミノ酸欠失；(v) 234～237位のうち3つのアミノ酸置換、ならびに318位、320位および322位のアミノ酸置換；または(vi) 234～237位のうち3つのアミノ酸置換、236位のアミノ酸欠失、ならびに318位、320位および322位のアミノ酸置換を含む。

10

【0166】

297位のアスパラギンでアミノ酸置換を有する例示的な改変免疫グロブリンCH2領域としては、L234、L235、G237およびN297にアラニン置換を有し、G236で欠失しているヒトIgG1 CH2領域(WO2011/090762号の配列番号325、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)、V234、G236、およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG2 CH2領域(WO2011/090762号の配列番号326、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)、F234、L235、G237およびN297にアラニン置換を有し、G236で欠失しているヒトIgG4 CH2領域(WO2011/090762号の配列番号322、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)、F234およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域(WO2011/090762号の配列番号343、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)、L235およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域(WO2011/090762号の配列番号344、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)、G236およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域(WO2011/090762号の配列番号345、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)、およびG237およびN297にアラニン置換を有するヒトIgG4 CH2領域(WO2011/090762号の配列番号346、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)が挙げられる。

20

30

【0167】

ある実施形態では、上記アミノ酸置換に加えて、改変CH2領域(例えば、改変ヒトIgG1 CH2ドメイン)は、1つまたは複数の追加のアミノ酸置換、上記位置以外の1つまたは複数の位置を含むことができる。かかるアミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換であることも非保存的アミノ酸置換であることもできる。例えば、ある実施形態では、P233は、改変IgG2 CH2領域内のE233への変異であることができる(例えば、WO2011/090762号の配列番号326を参照されたい、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)。加えてまたは代替的に、ある実施形態では、改変CH2領域は、1つまたは複数のアミノ酸挿入、欠失、または両方を含むことができる。挿入(1つまたは複数)、欠失(1つまたは複数)または置換(1つまたは複数)は、ヒンジを介したCH2領域と別の領域(例えば、結合ドメインまたは免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン)との連結に起因する野生型免疫グロブリンCH2領域のNまたはC末端等の免疫グロブリンCH2領域内の任意の箇所であることができる。

40

【0168】

ある実施形態では、本明細書に開示のポリペプチド中の改変CH2領域は、野生型ヒトIgG1、IgG2、またはIgG4、またはマウスIgG2a(例えば、IGHG2c)のCH2領域等の野生型免疫グロブリンCH2領域を含むかまたは、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99

50

%同一の配列である。

【0169】

本明細書に開示のPSMA結合ポリペプチドの改変免疫グロブリンCH2領域は、様々な種（ヒト、マウス、ラット、および他の哺乳動物等）のIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、およびIgD等の様々な免疫グロブリンアイソタイプのCH2領域由来であることができる。ある実施形態では、本明細書に開示の融合タンパク質中の改変免疫グロブリンCH2領域は、ヒトIgG1、IgG2もしくはIgG4、またはマウスIgG2a（例えば、IGHG2c）のCH2領域由来であることができ、この配列は、WO2011/090762号の配列番号115、199、201、および320（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。

10

【0170】

ある実施形態では、改変CH2ドメインは、235位、318位、320位、および322位にアラニン置換を有し（すなわち、L235A、E318A、K320AおよびK322A置換を有するヒトIgG1 CH2ドメイン）（WO2011/090762号の配列番号595、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）、任意にN297変異（例えば、アラニンへの置換）を有するヒトIgG1 CH2ドメインである。ある他の実施形態では、改変CH2ドメインは、234位、235位、237位、318位、320位および322位（すなわち、L234A、L235A、G237A、E318A、K320AおよびK322A置換を有するヒトIgG1 CH2ドメイン）のアラニン置換（WO2011/090762号の配列番号596、前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）、ならびに任意にN297変異（例えば、アラニンへの置換）を有するヒトIgG1 CH2ドメインである。

20

【0171】

ある実施形態では、改変CH2ドメインは、ADCC、ADCP、CDC、補体固定、Fc受容体結合、または任意のそれらの組み合わせ等の免疫活性を高める当該技術分野において知られている変異を有する改変ヒトIgG1 CH2ドメインである。

【0172】

本明細書に開示のPSMA結合ポリペプチドの免疫グロブリン定常領域を形成することができるCH3ドメインは、様々な種（ヒト、マウス、ラット、および他の哺乳動物等）のある免疫グロブリンクラスもしくはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgM）由来の野生型免疫グロブリンCH3ドメインであることもその改変免疫グロブリンCH3ドメインであることもできる。ある実施形態では、CH3ドメインは、WO2011/090762号の配列番号116、208～210、204～207、および212（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）にそれぞれ説明されるヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgMの野生型CH3ドメイン等の野生型ヒト免疫グロブリンCH3ドメインである。ある実施形態では、CH3ドメインは、WO2011/090762号の配列番号116（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される野生型ヒトIgG1 CH3ドメインである。ある実施形態では、CH3ドメインは、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、またはIgM抗体の野生型CH3ドメインに基づくかまたは由来する改変CH3ドメイン等の改変ヒト免疫グロブリンCH3ドメインである。例えば、改変CH3ドメインは、H433およびN434位（位置は、EU番号付けにより番号付ける）に1つまたは2つの変異を有するヒトIgG1 CH3ドメインであることができる。かかる位置の変異は、補体固定に関与することができる。ある他の実施形態では、改変CH3ドメインは、F405またはY407位で1つまたは2つのアミノ酸置換を有するヒトIgG1 CH3ドメインであることができる。かかる位置のアミノ酸は、別のCH3ドメインとの相互作用に関与する。ある実施形態では、改変CH3ドメインは、最終リジンが欠失した改変ヒトIgG1 CH3ドメインであることができる。この改変CH3ドメイン配列は、WO2011/090762号の配列番号761（前記配列は、参照

30

40

50

によって本明細書に組み込まれる)で表される。

【0173】

ある実施形態では、ポリペプチドヘテロ二量体を形成するPSMA結合ポリペプチドは、いわゆる「knobs-into-holes」変異を含むCH3対を含む(Marvin and Zhu, Acta Pharmacologica Sinica 26:649-58, 2005; Ridgway et al., Protein Engineering 9:617-21, 1996を参照されたい)。より具体的には、CH3/CH3結合に必要な立体補体が、これら2つのCH3ドメインが互いに対となる偏性となるように、各ポリペプチド鎖の2つのCH3ドメインのそれぞれに変異を導入できる。例えば、ポリペプチドヘテロ二量体の1つの単鎖ポリペプチド中のCH3ドメインは、T366W変異(小さなアミノ酸を大きなアミノ酸と置換する「knob」変異)を含むことができ、ポリペプチドヘテロ二量体の他の単鎖ポリペプチド中のCH3ドメインは、Y407A変異(大きなアミノ酸を小さなアミノ酸と置換する「hole」変異)を含むことができる。他の例示的なknobs-into-holes変異としては、(1)あるCH3ドメイン中のT366Y変異および他のCH3ドメイン中のY407T、ならびに(2)あるCH3ドメイン中のT366W変異および他のCH3ドメイン中のT366S、L368AおよびY407V変異が挙げられる。

10

【0174】

本明細書に開示のPSMA結合ポリペプチドの免疫グロブリン定常領域を形成することができるCH4ドメインは、IgEまたはIgM分子由来の野生型免疫グロブリンCH4ドメインであることもその改変免疫グロブリンCH4ドメインであることもできる。ある実施形態では、CH4ドメインは、WO2011/090762号の配列番号213および214(前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる)にそれぞれ説明されるヒトIgEおよびIgM分子の野生型CH4ドメイン等の野生型ヒト免疫グロブリンCH4ドメインである。ある実施形態では、CH4ドメインは、IgEまたはIgM Fc領域に関連することが知られている免疫活性を増大または低減する変異を有するヒトIgEまたはIgM分子のCH4ドメインに基づくかまたは由来する改変CH4ドメイン等の改変ヒト免疫グロブリンCH4ドメインである。

20

【0175】

ある実施形態では、本明細書に開示のPSMA結合ポリペプチドの免疫グロブリン定常領域は、CH2、CH3またはCH4ドメイン(すなわち、CH2、CH3およびCH4から選択される複数の定常領域ドメイン)の組み合わせを含む。例えば、免疫グロブリン定常領域は、CH2およびCH3ドメインを含むこともCH3およびCH4ドメインを含むこともできる。ある他の実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、2つのCH3ドメインを含み、CH2ドメインもCH4ドメインも含まないことができる(すなわち、2つ以上のCH3のみ)。免疫グロブリン定常領域を形成する複数の定常領域ドメインは、同一免疫グロブリン分子、または同一クラスもしくはサブクラスの免疫グロブリン分子に基づくことも由来することもできる。ある実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、IgG CH2CH3(例えば、IgG1 CH2CH3、IgG2 CH2CH3、およびIgG4 CH2CH3)であり、ヒト(例えば、ヒトIgG1、IgG2、およびIgG4)CH2CH3であることができる。例えば、ある実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、(1)野生型ヒトIgG1 CH2およびCH3ドメイン、(2)N297A置換を有するヒトIgG1 CH2(すなわち、CH2(N297A))および野生型ヒトIgG1 CH3、または(3)ヒトIgG1 CH2(N297A)および最終リジンの欠失した改変ヒトIgG1 CH3を含む。

30

40

【0176】

あるいは、複数の定常領域ドメインは、異なる免疫グロブリン分子、または異なるクラスもしくはサブクラスの免疫グロブリン分子に基づくことも由来することもできる。例えば、ある実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、ヒトIgM CH3ドメインおよびヒトIgG1 CH3ドメインの両方を含む。免疫グロブリン定常領域を形成する複数の

50

定常領域ドメインは、直接結合されていることも1つまたは複数の（例えば、約2～10の）アミノ酸を介して互いに連結することもできる。

【0177】

例示的な免疫グロブリン定常領域は、WO2011/090762号の配列番号305～309、321、323、341、342、および762（前記配列は、参照によって本明細書に組み込まれる）で表される。

【0178】

ある実施形態では、ポリペプチドホモ二量体またはヘテロ二量体の両PSMA結合ポリペプチドの免疫グロブリン定常領域は互いに同一である。ある他の実施形態では、ヘテロ二量体タンパク質の一方のポリペプチド鎖の免疫グロブリン定常領域は、ヘテロ二量体の他方のポリペプチド鎖の免疫グロブリン定常領域と異なる。例えば、ヘテロ二量体タンパク質の一方の免疫グロブリン定常領域は、「knob」変異を有するCH3ドメインを含むことができ、ヘテロ二量体タンパク質の他方の免疫グロブリン定常領域は、「hole」変異を有するCH3ドメインを含むことができる。

【0179】

IV. 核酸、宿主細胞、および生成方法

本発明は、本明細書に記載のPSMA結合ポリペプチドをコードする核酸（例えば、DNAまたはRNA）、または本明細書に記載の二量体もしくはヘテロ二量体PSMA結合タンパク質の1つもしくは複数のポリペプチド鎖も含む。本発明の核酸は、下表3に掲載されるポリヌクレオチドと実質的に同一である領域を有する核酸を含む。ある実施形態では、本発明による核酸は、表3に掲載されるポリヌクレオチドをコードするポリペプチドと少なくとも80%、典型的には少なくとも約90%、より典型的には少なくとも約95%または少なくとも約98%同一である。本発明の核酸は、補体核酸も含む。一部の場合、配列は整列時に完全に相補的である（ミスマッチなし）。他の場合、配列中、最大約20%ミスマッチであることができる。本発明のいくつかの実施形態では、本発明のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質の第1および第2ポリペプチド鎖の両方をコードする核酸が提供される。本明細書に提供される核酸配列は、コドン至適化、縮退配列、サイレント変異、および特に宿主中の発現を至適化する他のDNA技術を用いて利用することができ、本発明はかかる配列改変を包含する。

【0180】

所望のポリヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド分子は、ベクター内に分子を置くことによって繁殖する。プラスミドを含むウイルスおよび非ウイルスベクターが使用される。プラスミドの選択は、繁殖が所望される細胞種および繁殖目的による。あるベクターは、大量の所望のDNA配列の増幅および作製に有用である。他のベクターは、培養細胞内の発現に適している。さらに、他のベクターは、完全動物またはヒトの細胞内の移動および発現に適している。適切なベクターの選択は、十分に当該技術内である。多くのかかるベクターが市販されている。部分または全長ポリヌクレオチドは、典型的にはDNAリガーゼをベクター中の切断した制限酵素部位に結合させる手段によってベクター内に挿入する。あるいは、所望のヌクレオチド配列は、*in vivo* 相同再組み合わせによって挿入できる。典型的には、これは所望のヌクレオチド配列の側面上のベクターに対して相同領域を結合することによって成し遂げられる。相同領域は、例えば、オリゴヌクレオチド結紮によって、または相同領域および一部の所望のヌクレオチド配列を両方含むプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって添加する。

【0181】

発現において、発現カセットまたは系を適用してよい。本明細書に開示されたポリペプチドをコードする核酸を発現するため、発現ベクター中の転写発現を制御する調節配列に使用可能に連結しているポリペプチドをコードする核酸分子を宿主細胞内に導入する。プロモーターおよびエンハンサー等の転写の調節配列に加えて、発現ベクターは、発現ベクターを運ぶ細胞の選択に適した翻訳調節配列およびマーカー遺伝子を含むことができる。本発明のポリヌクレオチドによってコードされる遺伝子生成物は、例えば、バクテリア、

酵母菌、昆虫、両生類および哺乳動物系等、任意の好都合な発現系において発現する。発現ベクターにおいて、ポリヌクレオチドをコードするポリペプチドは、所望の発現特性を得る上で適した調節配列に連結している。これらは、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター、オペレーター、リプレッサー、および誘導体を含むことができる。プロモーターは、調節されていることも（例えば、pINDベクター導入可能なステロイド由来のプロモーター（Invitrogen））かまたは構成的（例えば、CMV、SV40、伸長因子、またはLTR配列由来のプロモーター）であることもできる。これらは、ベクター連結のための上記技術を用いて所望のヌクレオチド配列に連結している。当該技術分野において知られている任意の技術を使用することができる。したがって、発現ベクターは、一般には、導入可能または構成的であることができる転写および翻訳開始領域を提供し、コード領域は、転写開始領域、ならびに転写および翻訳終了領域の転写制御下で使用可能に結合している。

10

【0182】

発現カセット（「発現単位」）は、例えば、λ、P1、M13等のプラスミド、BAC、YAC、バクテリオファージ、植物または動物ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター）等の様々なベクター内に導入でき、ベクターは、通常、発現ベクターを含む細胞選択を得る能力を特徴とする。ベクターは、特にプラスミドまたはウイルスとして、余剰染色体の維持、または宿主染色体内への統合のために提供することができる。余剰染色体の維持が所望される場合、起点配列がプラスミド複製に提供され、これは、低い転写数であることも高い転写数であることもできる。多種多様のマーカー、特に毒素から、より特に抗生物質から保護するものが選択において利用可能である。選択する特定のマーカーは、宿主の性質によって選択され、一部の場合、栄養要求性宿主と共に補足物を使用することができる。DNA構築物の導入には、例えば、接合、バクテリアの形質転換、カルシウム沈殿DNA、電気穿孔、融合、トランスフェクション、ウイルスベクター感染、微粒子銃等の任意の好都合な方法を使用することができる。

20

【0183】

したがって、本発明において使用するタンパク質は、従来技術により遺伝学的操作した宿主細胞内に産生することができる。適切な宿主細胞は、形質転換することも外因性DNAでトランスフェクトすることもできる細胞種であり、培養中で増殖し、バクテリア、真菌細胞、および培養した高等真核細胞（多細胞生物の培養細胞等）、特に培養した哺乳動物細胞を含む。クローン化DNA分子の操作および様々な宿主細胞内への外因性DNA導入技術については、Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001)、およびAusubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (4th ed., John Wiley & Sons, 1999)に開示されている。

30

【0184】

例えば、本明細書に記載の2つの同一PSMA結合ポリペプチドを含むホモ二量体PSMA結合タンパク質の組換え発現において、発現ベクターは一般に、プロモーターに使用可能に連結しているPSMA結合ポリペプチドをコードする核酸セグメントを含む。異なる第1および第2ポリペプチド鎖を含むヘテロ二量体PSMA結合タンパク質の組換え発現において、第1および第2ポリペプチド鎖は、完全ヘテロ二量体タンパク質発現のための宿主細胞内の別々のベクターから共発現することができる。あるいは、ヘテロ二量体PSMA結合タンパク質発現において、第1および第2ポリペプチド鎖は、完全ヘテロ二量体タンパク質発現のための宿主細胞内の同一ベクターの別々の発現単位から共発現する。発現ベクター（1つまたは複数）は、従来技術によって宿主細胞に移し、トランスフェクトした細胞は、次いで、従来技術によって培養し、相当するPSMA結合タンパク質を産

40

50

生するコードされたポリペプチド（１つまたは複数）を産生する。

【０１８５】

宿主細胞の分泌経路内に組換えタンパク質を導くため、分泌シグナル配列（リーダー配列としても知られている）が発現ベクター内に提供される。分泌シグナル配列は、組換えタンパク質の天然形態であることも、別の分泌タンパク質もしくは *de novo* 合成由来であることもできる。分泌シグナル配列は、DNA 配列をコードするポリペプチドに使用可能に結合されている、すなわち、２配列は、正確なリーディングフレーム中で結合し、新たに合成されるポリペプチドを宿主細胞の分泌経路内に導くように位置する。分泌シグナル配列は一般に目的のポリペプチドをコードする DNA 配列の 5 位に位置するが、あるシグナル配列は目的の DNA 配列内の他の位置に位置することができる（例えば、Weilch et al., 米国特許第 5,037,743 号; Holland et al., 米国特許第 5,143,830 号を参照されたい）。あるバリエーションでは、本発明によって使用される分泌シグナル配列は、MEAPAQLLFLLLWLPLDTTG（配列番号 85）アミノ酸配列を有する。

【０１８６】

培養した哺乳動物細胞は、本発明において使用する組換えタンパク質の産生に適した宿主である。哺乳動物宿主細胞内への外因性 DNA の導入方法としては、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション (Wigler et al., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Vander Eb, Virology 52:456, 1973)、電気穿孔 (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982)、DEAE デキストラン媒介性トランスフェクション (上記 Ausubel et al.)、およびリポソーム媒介性トランスフェクション (Hawley-Nelson et al., Focus 15:73, 1993; Ciccarone et al., Focus 15:80, 1993) が挙げられる。培養した哺乳動物細胞内の組換えポリペプチドの産生は、例えば、Levinson et al., 米国特許第 4,713,339 号; Hagen et al., 米国特許第 4,784,950 号; Palminter et al., 米国特許第 4,579,821 号、ならびに Ringold, 米国特許第 4,656,134 号に開示されている。適切な哺乳動物宿主細胞例としては、アフリカミドリザル腎細胞 (Vero; ATCC CRL 1587)、ヒト胎児腎細胞 (293-HEK; ATCC CRL 1573)、ベビーハムスター腎細胞 (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314)、犬科腎細胞 (MDCK; ATCC CCL 34)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1; ATCC CCL 61; CHO DG44; CHO DXB11 (HyClone, Logan, UT); 例えば、Chasin et al., Som. Cell. Molec. Genet. 12:555, 1986 も参照されたい)、ラット下垂体性細胞 (GH1; ATCC CCL 82)、HeLa S3 細胞 (ATCC CCL 2.2)、ラット肝細胞 (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) SV40 形質転換サル腎細胞 (COS-1; ATCC CRL 1650) およびマウス胎児細胞 (NIH-3T3; ATCC CRL 1658) を挙げることができる。追加の適切な細胞系は当該技術分野において知られており、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、Manassas, Virginia 等の公開保管場所から利用可能である。SV-40 または サイトメガロウイルス由来のプロモーター等の強い転写プロモーターを使用することができる。例えば、米国特許第 4,956,288 号を参照されたい。他の適切なプロモーターとしては、メタロチオネイン遺伝子 (米国特許第 4,579,821 号および同第 4,601,978 号) および アデノウイルス主要後期プロモーター由来のものが挙げられる。

【０１８７】

薬剤選択は、外来 DNA が挿入されている培養哺乳動物細胞を選択するために一般に使

用される。かかる細胞は、一般に「トランスフェクタント」と呼ばれる。選択的薬剤の存在下で培養されている細胞は、目的の遺伝子をそれらの子孫に伝達可能であり、「安定したトランスフェクタント」と呼ばれる。例示的な選択マーカーとしては、ネオマイシンタイプ薬剤、例えばG-418およびその他の存在下で実施するために選択される抗生物質ネオマイシン耐性をコードする遺伝子；ミコフェノール酸／キサンチンの存在下で宿主細胞増殖を可能にするキサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼのgpt遺伝子；ならびにゼオシン、ブレオマイシン、ブラストサイジン、およびハイグロマイシン耐性を提供するマーカーが挙げられる（例えば、Gatignol et al., Mol. Gen. Genet. 207:342, 1987; Drocourt et al., Nucl. Acids Res. 18:4009, 1990を参照されたい）。選択系は、目的の遺伝子発現レベルを増大する、「増幅」と呼ばれるプロセスに使用することもできる。増幅は、低レベルの選択的薬剤の存在下でトランスフェクタントの培養によって実施し、次いで、選択的薬剤の量を増大して、導入された遺伝子の高値の生成物を産生する細胞を選択する。例示的な増幅可能な選択マーカーは、メトトレキサート耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼである。他剤耐性遺伝子（例えば、ハイグロマイシン耐性、多剤耐性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）も使用することができる。

【0188】

昆虫細胞、植物細胞および鳥細胞を含む他の高等真核細胞も宿主として使用することができる。植物細胞内の遺伝子を発現するベクターとしてのアグロバクテリウムリゾゲネスの使用については、Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore) 11:47-58, 1987に概説されている。昆虫細胞の形質転換およびそこでの外来ポリペプチドの産生については、Guarino et al., 米国特許第5,162,222号およびWIPO公開WO94/06463号に開示されている。

【0189】

昆虫細胞は、組換えバキュロウイルスへ感染させることができ、一般にオートグラファカリフォルニカ核多角体病ウイルス（AcNPV）由来である。King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide (Chapman & Hall, London); O'Reilly et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual (Oxford University Press, New York 1994); およびBaculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology (Richardson ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1995)を参照されたい。組換えバキュロウイルスは、Luckow et al. (J. Virol. 67:4566-4579, 1993)に記載されているトランスポゾンベース系の使用を介して産生することもできる。導入ベクターを使用するこの系は、キット形態（BAC-TO-BACキット; Life Technologies, Gaithersburg, MD）で市販されている。導入ベクター（例えば、PFASTBAC1; Life Technologies）はTn7トランスポゾンを含み、目的のタンパク質をコードするDNAを「bacmid」と呼ばれる大きなプラスミドとして大腸菌中に維持されたバキュロウイルスのゲノム内に移す。Hill-Perkins and Possee, J. Gen. Virol. 71:971-976, 1990; Bonning et al., J. Gen. Virol. 75:1551-1556, 1994; およびChazenbalk and Rapoport, J. Biol. Chem. 270:1543-1549, 1995を参照されたい。さらに、導入ベクターは、上に開示されたポリペプチド延長または親和性タグをコードするDNAとのインフレーム融合物を含むことができる。当該技術分野において知られている技術

を用いて、DNA配列をコードするタンパク質を含む導入ベクターは大腸菌宿主細胞内に形質転換され、細胞は、組換えバキュロウイルスを標示する中断されたlacZ遺伝子を含むbacmidについてスクリーニングされる。組換えバキュロウイルスのゲノムを含むbacmid DNAは共通の技術を用いて単離し、ツマジロク・サヨトウ細胞（Sf9細胞等）のトランスフェクトに使用される。続いて、興味のあるタンパク質を発現する組換えウイルスを産生する。組換えウイルスストックは、当該技術分野において一般に使用される方法により作製される。

【0190】

タンパク質生成のため、宿主細胞を感染させるために使用される組換えウイルスは、典型的にはフォールアーミーワーム、スポドプテラ・フルギペルダ（例えば、Sf9またはSf21細胞）またはトリコブラシア・ニ（例えば、HIGH FIVE細胞；Invitrogen、Carlsbad、CA）由来の細胞系である。一般にGlick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA (ASM Press, Washington, D.C., 1994)を参照されたい。米国特許第5,300,435号も参照されたい。血清不含培地を用いて細胞を増殖および維持する。適切な培地製剤は、当該技術分野において知られており、市販供給者から得ることができる。細胞は、接種密度約 $2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞から密度 $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞まで増殖し、この時点で感染多重度(MOI)0.1~10、より典型的には3近くで組換えウイルスストックを追加する。使用される手順は、利用可能である実験室マニュアルに一般に記載されている（例えば、上記King and Possee；上記O'Reilly et al.；上記Richardsonを参照されたい）。

【0191】

酵母細胞等の真菌細胞も本発明において使用することができる。これに関する酵母種としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ、ピキア・パストリス、およびピキア・メタノリカが挙げられる。外因性DNAを用いたサッカロマイセス・セレビシエ細胞の形質転換方法およびそこに由来する組換えポリペプチドの産生方法は、例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号；Kawasaki et al.、米国特許第4,931,373号；Brake、米国特許第4,870,008号；Welch et al.、米国特許第5,037,743号、ならびにMurray et al.、米国特許第4,845,075号に開示されている。形質転換細胞は、選択マーカー、一般に薬剤耐性または特定の栄養素（例えば、ロイシン）の不在下での増殖能によって決定された表現型により選択される。サッカロマイセス・セレビシエに使用する例示的なベクター系は、Kawasaki et al.（米国特許第4,931,373号）に開示されているPOT1ベクター系であり、これはグルコース含有培地中の増殖によって形質転換細胞を選択させる。酵母中の使用に適したプロモーターおよびターミネーターとしては、解糖系酵素遺伝子（例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号；Kingsman et al.、米国特許第4,615,974号、ならびにBitter、米国特許第4,977,092号を参照されたい）およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子由来のものが挙げられる。米国特許第4,990,446号；同第5,063,154号；同第5,139,936号、ならびに同第4,661,454号も参照されたい。ハンセヌラポリモルファ、シゾサッカロマイセスポンベ、クルイペロマイセス・ラクチス、クルイペロマイセス・フラギリス、ウスチラゴ・マイディス、ピキア・パストリス、ピキア・メタノリカ、ピキア・ギリエルモンデイ、およびカンジダ・マルトーサ等の他の酵母菌の形質転換系が当該技術分野において知られている。例えば、Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132:3459-3465, 1986；Cregg、米国特許第4,882,279号、ならびにRaymond et al., Yeast 14:11-23, 1998を参照されたい。アスペルギルス細胞は、McKnight et al.、米国特許第4,935,349号の方法により使用することができる。アクレモニウム・クリソゲヌムの形質転換方法は、S

10

20

30

40

50

umino et al.、米国特許第5, 162, 228号に開示されている。ニューロスポーラの形質転換方法は、Lambowitz、米国特許第4, 486, 533号に開示されている。ピキア・メタノリカ中の組換えタンパク質の産生は、米国特許第5, 716, 808号；同第5, 736, 383号；同第5, 854, 039号、ならびに同第5, 888, 768号に開示されている。

【0192】

バクテリア大腸菌、枯草菌株、および他属等の原核生物宿主細胞も本発明において有用な宿主細胞である。これら宿主の形質転換およびそこでクローニングした外来DNA配列の発現技術については、当該技術分野において周知である（例えば、上記 Sambrook and Russellを参照されたい）。大腸菌等のバクテリア中の組換えタンパク質発現時、タンパク質は、典型的には不溶性顆粒として細胞質中に保持することも、バクテリア分泌配列による周辺腔を指向とすることもできる。前者の場合、細胞は溶解し、顆粒は例えば、グアニジンイソチオシアネートまたは尿素を用いて回収され変性する。変性タンパク質は、次いで、尿素液ならびに還元および酸化グルタチオンの組み合わせに対する透析、続いて、緩衝生理食塩水溶液に対する透析による等、変性剤の希釈によって、再折畳み、二量体化することができる。あるいは、タンパク質は細胞質から可溶形態で単離し、変性剤を使用せずに回収することができる。タンパク質は、例えば、リン酸緩衝生理食塩水中、水性抽出物として細胞から回収する。目的のタンパク質を捕獲するため、抽出物は、固定化抗体またはヘパリンセファロースカラム等のクロマトグラフ培地に直接適用する。細胞を（例えば、超音波処理または浸透圧ショックによって）中断して周辺腔の中味を放出し、タンパク質を回収し、したがって、変性および再折畳みの必要を回避することによって、分泌タンパク質を可溶形態および官能形態で周辺腔から回収することができる。単鎖抗体を含む抗体は、既知の方法によりバクテリアの宿主細胞内に産生することができる。例えば、Bird et al., Science 242: 423-426, 1988; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883, 1988; および Pantoli ano et al., Biochem. 30: 10117-10125, 1991を参照されたい。

【0193】

栄養剤および選択した宿主細胞の増殖に必要な他の成分を含む培養培地中で従来の手順によって形質転換されたまたはトランスフェクトした宿主細胞を培養する。定義した培地および複合体培地を含む様々な適切な培地が当該技術分野において知られており、一般に、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよびミネラルを含む。培地は、必要に応じて増殖因子または血清等の成分を含むこともできる。増殖培地は、一般に、例えば、薬剤選択または発現ベクター上で行われる選択マーカーによって補充されるかまたは宿主細胞内に共トランスフェクトされる必須栄養素欠乏によって外的に添加されたDNAを含む細胞のために選択される。

【0194】

PSMA結合タンパク質は、従来のタンパク質精製方法により、典型的にはクロマトグラフ技術の組み合わせによって精製する。一般にAffinity Chromatography: Principles & Methods (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice (Springer-Verlag, New York 1994)を参照されたい。免疫グロブリンFc領域を含むタンパク質は、固定化タンパク質Aまたはタンパク質G上の親和性クロマトグラフィーによって精製することができる。追加の精製工程（ゲル濾過等）を用いて所望のレベルの純度を得ることも脱塩緩衝液交換等を得ることもできる。

【0195】

V. 治療法

10

20

30

40

50

別の実施形態では、本発明は、P S M A 過剰発現を特徴とする障害の処置方法を提供する。一般に、かかる方法は、治療有効量の本明細書に記載のP S M A 結合タンパク質にかかる治療を必要としている対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、P S M A 結合タンパク質は、対象中のP S M A 発現細胞に対して、P S M A 結合タンパク質がA D C C および／またはC D C を誘発するように抗体依存性細胞介在性細胞傷害（A D C C ）および補体依存性細胞傷害（C D C ）から選択される少なくとも1つのエフェクター機能を含む。他の実施形態では、P S M A 結合タンパク質が、T細胞（例えば、T C R 複合体またはC D 3 ε 等のその成分）に特異的結合する第2結合ドメインを含む場合、P S M A 結合タンパク質は対象中のP S M A 発現細胞に対して再指向T細胞の細胞傷害（R T C C ）を誘発する。

10

【0196】

方法のあるバリエーションでは、障害は癌である。本発明による治療が奏効する例示的な癌としては、例えば、前立腺癌（例えば、去勢抵抗性前立腺癌）、大腸癌、胃癌、淡明細胞型腎細胞癌、膀胱癌、および肺癌が挙げられる。他のバリエーションでは、障害は、例えば、前立腺癌または良性前立腺肥大症（B P H ）等の前立腺障害である。さらに他の実施形態では、障害は、例えば、固体腫瘍成長を特徴とする癌等の新生血管障害である。P S M A 過剰発現を特徴とし、本発明による治療が奏効する腫瘍血管系を有する例示的な癌としては、例えば、淡明細胞型腎細胞癌（C C R C C ）、大腸癌、乳癌、膀胱癌、肺癌、および膵癌が挙げられる（例えば、B a c c a l a e t a l . , U r o l o g y 70 : 385 - 390 , 2007（C C R C C 中のP S M A 発現）； L i u e t a l . , C a n c e r R e s . 57 : 3629 - 3634 , 1997（腎臓癌、尿路上皮癌、肺癌、結腸癌、乳癌、および腺癌から肝癌等の様々な非前立腺癌中のP S M A 発現）； およびM i l l o w s k y e t a l . , J . C l i n . O n c o l . 25 : 540 - 547 , 2007（例えば、腎臓、結腸、膀胱、および膵癌中の発現、ならびに抗P S M A m A b を用いたヒトの腫瘍血管系の特異的な標的の実証）を参照されたい。

20

【0197】

本明細書に記載の治療法の各実施形態では、P S M A 結合タンパク質は、治療が探される疾患または障害管理に関する従来の方法と一致する方法で送達される。本明細書の開示によって、P S M A 結合タンパク質の有効量は、一定時間かかる治療を必要としている対象に疾患または障害を予防または治療する上で十分な条件下で投与する。

30

【0198】

本明細書に記載のP S M A 結合タンパク質を投与する対象としては、P S M A 過剰発現を特徴とする特定の障害の発現リスクが高い患者ならびに既存のかかる障害を呈する患者が挙げられる。典型的に、対象は、治療が探される障害を呈すると診断されている。さらに、対象は、障害における任意の変化について（例えば、障害の臨床症状の増大または低減について）治療経過中にモニタリングすることができる。また、一部のバリエーションでは、対象は、P S M A 発現細胞の標的に関与する治療を必要とする別の障害を呈さない。

40

【0199】

予防適応において、医薬組成物または薬剤は、特定の障害を呈しやすいか、あるいはリスクのある患者に、障害リスクを除去もしくは低減するかまたは障害の発現を遅延化する上で十分な量で投与する。治療適応において、組成物または薬剤は、かかる障害が疑われるかまたはすでに呈している患者に、障害の症状およびその合併症を治療するかまたは少なくとも部分的に停止する上で十分な量で投与する。これに達する上で適した量は治療的有效投与量または治療的有效量と呼ばれる。予防レジメンと治療レジメンの両方において、薬剤は、通常、十分な反応（例えば、不適切な血管形成活性の阻害）に達するまで数回の投与量で投与する。典型的に、反応はモニタリングし、所望の反応が消え始めた場合に反復投与する。

【0200】

50

本発明の方法により治療の対象患者を同定するため、承認されたスクリーニング方法を使用して、特定の障害関連リスク因子を決定することも対象に同定された既存障害の状態を決定することもできる。かかる方法は、例えば、個体に特定の障害が診断されている親類がいるかどうかの決定を含むことができる。スクリーニング方法は、例えば、従来のワークアップも含み、遺伝要素を有することが知られている特定の障害の家族状態を決定することもできる。例えば、様々な癌もある遺伝要素を有することが知られている。癌の遺伝要素としては、例えば、形質転換する複数遺伝子の変異（例えば、Ras、Raf、EGFR、cMet、およびその他）、あるHLAおよびキラー阻害受容体（KIR）分子の存在もしくは不在、または癌細胞が、直接または間接的のいずれかでNK細胞およびT細胞等の細胞の免疫抑制を調節可能である機序が挙げられる（例えば、Ljunggren and Malmberg, Nature Rev. Immunol. 7: 329-339, 2007; Boyton and Altmann, Clin. Exp. Immunol. 149: 1-8, 2007を参照されたい）。この目的のため、ヌクレオチドプローブは、目的の特定の障害に関連する遺伝子マーカーを保有する個体を同定するために日常的に使用することができる。さらに、特定の障害マーカーを同定する上で有用である多種多様の免疫方法が当該技術分野において知られている。例えば、特定の腫瘍に関する抗原を検出するモノクローナル抗体プローブを使用する様々なELISA免疫アッセイ方法が利用可能であり、当該技術分野において周知である。スクリーニングは、既知の患者症候、年齢因子、関連リスク因子等によって示されるように実施できる。これらの方法により、臨床医は、治療において本明細書に記載の方法を必要としている患者を日常的に選ぶことができる。これらの方法により、病的、PSMA発現細胞の標的は、独立した治療プログラムとして、またはフォローアップ、調整、もしくは他の治療に対する治療レジメン調整として実施できる。

【0201】

投与において、PSMA結合タンパク質は、医薬組成物として製法される。PSMA結合タンパク質を含む医薬組成物は、治療分子が医薬上許容される担体との混合物中に併用される製薬的に有用な組成物を調製するために既知の方法により製法することができる。投与がレシピエント患者に忍容可能であることができる場合、組成物は「医薬上許容される担体」と呼ばれる。滅菌リン酸緩衝生理食塩水は、医薬上許容される担体の1例である。他の適切な担体は当業者に周知である（例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19th ed. 1995)を参照されたい）。製剤は、賦形剤、保存剤、可溶化剤、緩衝剤、アルブミンの1つまたは複数をさらに含み、バイアル表面上等のタンパク質損失を防ぐことができる。

【0202】

PSMA結合タンパク質を含む医薬組成物は、治療的有效量で対象に投与する。本発明の方法により、PSMA結合タンパク質を、例えば、筋肉内、皮下、静脈内、心房内、関節内、非経口、経鼻、肺内、経皮、胸膜内、髄腔内、および経口投与等の様々な投与経路によって対象に投与できる。予防および治療目的において、アンタゴニストは、長時間に渡る持続的な送達（例えば、持続的な経皮送達）を介して、対象に単一ボラス送達で投与することも、反復投与プロトコルで（例えば、1時間1回、1日1回、または週1回）投与することもできる。

【0203】

組成物の「治療的有效量」とは、疾患進行の統計的有意な低減または臓器機能の統計的有意な改善等、障害の1つまたは複数の症状の改善において統計的有意な効果を生じる量である。正確な用量は、治療する状態の性質および重症度、患者特性等を考慮して、承認された標準によって臨床医によって決定される。用量決定は、当該技術分野の通常技術レベル内である。

【0204】

本文脈における有効投与量の決定は、典型的には動物モデル試験、続いてヒト臨床試験

10

20

30

40

50

に基づき、モデル対象における対象障害の発現または重症度を有意に低減する有効投与量および投与プロトコルを決定することによって導かれる。本発明の組成物の有効量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状态、患者がヒトか動物か、投与する他剤、治療が予防的か治療的か、ならびに組成物自体の特異的な活性および個体中で所望の反応を引き出す能力等の多くの異なる要因によって異なる。通常、患者はヒトであるが、一部の疾患において、患者は非ヒト哺乳動物であることができる。典型的に、投与量レジメンは、至適治療反応を得る、すなわち、安全性および有効性を至適化するように調節する。したがって、治療の有効量はまた、本明細書に記載の P S M A 結合タンパク質を投与することの有益な効果の方が任意の望ましくない付帯効果に勝る量である。P S M A 結合タンパク質投与において、投与量は、典型的には約 $0.1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ または $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 50 \text{mg} / \text{kg}$ 、より通常は $10 \mu\text{g} \sim 5 \text{mg} / \text{kg}$ の対象体重である。より具体的な実施形態では、薬剤有効量は、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 20 \text{mg} / \text{kg}$ 、約 $10 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ 、または約 $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 5 \text{mg} / \text{kg}$ である。この範囲内の投与量は、単回投与によって達成することも複数回投与（例えば、1日複数回投与または1日1回、週1回、各週1回、または月1回投与等）によって達成することもできる。例えば、あるバリエーションでは、レジメンは、初回投与、続いて複数回、週1回または各週1回間隔の連続投与からなる。別のレジメンは、初回投与、続いて複数回、月1回または隔月1回間隔の連続投与からなる。あるいは、投与は、障害の臨床症状モニタリングによって示されるように不規則であることができる。

【0205】

医薬組成物の投与量は、担当臨床医によって標的部位の所望の濃度を維持するように変更し得る。例えば、静脈内送達経路が選択される場合、標的組織の血流中の局所薬剤濃度は、対象の状態および投影測定反応に応じて、約 $1 \sim 50$ ナノモル組成物/リットル、場合によっては約 1.0 ナノモル/リットルならびに 10 、 15 、もしくは 25 ナノモル/リットルであることもできる。送達経路、例えば、経皮送達対粘膜表面への送達に基づき、より高濃度を選択することもより低濃度を選択することもできる。投与量はまた、例えば、経鼻的スプレー対粉末、持続放出経口または注射粒子、経皮製剤等、投与する製剤の放出速度に基づき調節するべきである。同一血清濃度レベルに達するため、例えば、放出速度 5 ナノモルの低放出粒子（標準的な条件下）は放出速度 10 ナノモル粒子の投与量の約 2 倍で投与する。

【0206】

本明細書に記載の医薬組成物は、併用療法の文脈においても使用することができる。用語「併用療法」とは、対象に、少なくとも1つの治療的有效量の P S M A 結合タンパク質および別の治療薬を投与することを示すために本明細書で使用する。

【0207】

例えば、癌免疫療法の文脈において、本発明の P S M A 結合タンパク質は化学療法または放射線との併用において使用することができる。本明細書に記載の P S M A 結合タンパク質は、従来タイプの化学療法または放射線と相乗的に作用することができる。P S M A 結合タンパク質は、腫瘍負荷をさらに低減し、化学治療によってより効率的に殺傷させることができる。

【0208】

本発明の組成物は、様々なサイトカインおよび共刺激/阻害性分子を含む免疫調節化合物との併用においても使用することができる。これらとしては、抗癌免疫反応を刺激するサイトカイン（例えば、IL-2、IL-12、または IL-21）の使用が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、P S M A 結合タンパク質は、CD137 活性化 (Wilcox et al., J. Clin. Invest. 109:651-9, 2002 を参照されたい) または CTLA4 阻害 (Chambers et al., Ann. Rev. Immunol. 19:565-94, 2001 を参照されたい) 等の免疫ベースのエフェクター細胞上に見られる様々な細胞表面分子を共刺激する試薬と併用することができる。あるいは、P S M A 結合タンパク質は、TNF スーパー

ファミリー受容体（例えば、T R A I L 関連受容体、D R 4、D R 5、F a s、またはC D 3 7）との相互作用によって腫瘍細胞アポトーシスを導入する試薬と使用可能である（例えば、T a k e d a e t a l., J. E x p. M e d. 1 9 5 : 1 6 1 - 9, 2 0 0 2 ; S r i v a s t a v a, N e o p l a s i a 3 : 5 3 5 - 4 6, 2 0 0 1 を参照されたい）。かかる試薬としては、T N F スーパーファミリー受容体リガンド（リガンド-I g 融合物等）、およびT N F スーパーファミリー受容体の抗体特異性（例えば、T R A I L リガンド、T R A I L リガンド-I g 融合物、抗T R A I L 抗体等）が挙げられる。

【0209】

特に固形腫瘍治療に関して、評価項目および抗腫瘍活性を評価するプロトコルは、当該技術分野において周知である。各プロトコルは腫瘍反応評価を別々に定義し得るのに対し、R E C I S T（固形腫瘍中の反応評価基準）基準は、現在、米国国立癌研究所による腫瘍反応評価の推奨ガイドラインとみなされている（T h e r a s s e e t a l., J. N a t l. C a n c e r I n s t. 9 2 : 2 0 5 - 2 1 6, 2 0 0 0 を参照されたい）。R E C I S T 基準により、腫瘍反応は、すべての測定可能な病変または転移の低減または除去を意味する。疾患は、医学的写真もしくはX線、コンピュータ軸トモグラフィー（C T）、核磁性共鳴画像（M R I）、または臨床検査（病変が表面的である場合）によって明確に縁を定義する従来技術を用いて ≥ 20 mmまたはスパイラルC T スキャンで ≥ 10 mmとして少なくとも1つの寸法で正確に測定することができる病変を含む場合、一般に測定可能であるとみなされる。測定不能な疾患とは、従来技術を用いて < 20 mmもしくはスパイラルC T スキャンで < 10 mmの病変、ならびに文字通り測定不能な病変（正確に測定するには小さすぎる）を含む疾患を意味する。測定不能な疾患としては、胸水、腹水、および間接的証拠により記載された疾患が挙げられる。

【0210】

客観状態基準は、固体腫瘍反応を評価するプロトコルを必要とする。代表的な基準は、下記の（1）すべての測定可能疾患の完全な消失と定義した完全奏効（C R）；新規病変なし；疾患関連症状なし；測定不能疾患の証拠なし；（2）標的病変の最長直径計30%短縮と定義した部分奏効（P R）（3）標的病変の最長直径計20%増長または任意の新規病変出現と定義した進行性疾患（P D）；（4）C R、P R、または進行性疾患に該当しないものと定義した安定または無奏効を含む（上記T h e r a s s e e t a l. を参照されたい）。

【0211】

腫瘍学分野において承認されている追加の評価項目としては、全体の生存率（O S）、無疾患生存率（D F S）、客観奏効率（O R R）、進行時間（T T P）、および無進行生存率（P F S）が挙げられる（Guidance for Industry: Clinical Trial Endpoints for the Approval of Cancer Drugs and Biologics, April 2005, Center for Drug Evaluation and Research, FDA, Rockville, MDを参照されたい）。

【0212】

医薬組成物は、本明細書に記載の医薬組成物を含む容器を含むキットとして供給することができる。医薬組成物は、例えば、単回または複数回用量用の注射液状で提供することも、注射前に再構成される滅菌粉末として提供することもできる。あるいは、かかるキットは、医薬組成物投与用の乾燥粉末ディスペンサー、液体エアロゾル発生器、またはネブライザーを含むこともできる。かかるキットは、医薬組成物の適応および使用に関する書面情報をさらに含むことができる。

実施例

実施例 1

【0213】

107-1A4からのマウス可変ドメイン単離およびヒト化変異型の調製

10

20

30

40

50

ヒト P S M A 特異的 1 0 7 - 1 A 4 モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマ細胞からマウス可変ドメインをクローニングした (Brown et al, 1998, Prostate Cancer and Prostatic Diseases. 1: 208-215 を参照されたい)。RNeasy (商標登録) 保護ミニキット (QIAGEN Inc.、74124) を製造業者の説明書に従い用いて総 RNA をハイブリドーマから単離した。SMART (商標) RACE cDNA 増幅キット (Clontech Laboratories, Inc., 634914) を製造業者の説明書に従い用いて、オリゴ (dT) プライマーと 5' RACE-ready cDNA を生成した。異なるマウス V K または V H 遺伝子族に対して特異的な独占的縮退遺伝子プライマープールを用いて SMART (商標) RACE プロトコルにより cDNA から抗体の V_H および V_L 領域を PCR 増幅した。ゲル電気泳動により PCR 増幅生成物を確認し、正確に測定したバンドを単離して、TOPO (商標登録) TA クローニングキットを製造業者の説明書 (Invitrogen Corporation) に従い用いて pCR (商標登録) 2.1-TOPO (商標登録) プラスミドベクター内にクローニングした。得られた組換えベクターを TOP10 大腸菌内に形質転換させた。クローン由来の DNA シークエンスによって、マウス生殖系列フレームワーク L17134 (Genbank) に対して高い相同 (92.7%) を有するマウス V H 1 フレームワークを有する重鎖領域、およびマウス生殖系列フレームワーク A J 235936 (EMBL) に対して非常に高い相同 (98.6%) を有するマウス V k 16 フレームワークを有する κ 鎖領域の複数の単離が示された。中性変異によって、親マウス κ (軽鎖) 可変ドメインをコードする DNA から 2 つの制限部位、1 つの H i n d I I I および 1 つの E c o R I 部位を除去し、目的の哺乳動物発現ベクター内へのクローニングを簡略化し、ヒト V k 3 リーダー配列のために天然マウス分泌 / リーダー配列も用いなかった。P S M A 特異的マウス V H 領域のポリヌクレオチド配列 (107-1A4) は配列番号 1 とし、アミノ酸配列は配列番号 2 とする。制限部位を有する P S M A 特異的マウス V L 領域のポリヌクレオチド配列 (107-1A4) は配列番号 3 とする。制限部位を除くように修飾された P S M A 特異的マウス V L 領域のポリヌクレオチド配列 (107-1A4) は配列番号 4 とし、アミノ酸配列は配列番号 5 とする。

【0214】

これらのマウス s c F v 配列をコードし、適切な足場 (例えば、S M I P、S C O R P I O N、および単一特異性または多重特異性ヘテロ二量体ポリペプチド) 内への挿入用にカセット化した DNA 配列を設計した。構築物を次いで、Blue Heron (Bothe11, WA) によって合成し、標準、制限消化ベースのクローニング技術を用いて T S C 084 (配列番号 44; アミノ酸配列の配列番号 46)、T S C 085 (配列番号 36; アミノ酸配列の配列番号 38)、および T S C 092 (配列番号 37; アミノ酸配列の配列番号 39) に相当する遺伝子配列を産生した。

【0215】

ヒトフレームワークへの C D R グラフトを介して設計されたヒト化配列を同様に Blue Heron によって合成し、2 つのアプローチを用いて以下の遺伝子配列を産生する制限消化を用いて類似のベクター内にクローニングした: (A) H i n d I I I / B a m H I 断片、B a m H I / X h o I 断片、ならびに T S C 188 (配列番号 40 個のアミノ酸配列の配列番号 42) および T S C 189 (配列番号 41; アミノ酸配列の配列番号 43) に相当する遺伝子配列を産生するために H i n d I I I / X h o I で切断した目的ベクターを用いた 3 片の結紮、ならびに (B) H i n d I I I / X h o I 断片ならびに T S C 192 (配列番号 53; アミノ酸配列の配列番号 58)、T S C 193 (配列番号 54; アミノ酸配列の配列番号 59)、T S C 194 (配列番号 48; アミノ酸配列の配列番号 49)、T S C 195 (配列番号 55; アミノ酸配列の配列番号 60)、T S C 196 (配列番号 56; アミノ酸配列の配列番号 61)、T S C 199 (配列番号 50 個のアミノ酸配列の配列番号 51)、T S C 210 (配列番号 69; アミノ酸配列の配列番号 70)、T S C 211 (配列番号 71; アミノ酸配列の配列番号 72)、T S C 212 (配列

番号 73 ; アミノ酸配列の配列番号 74) 、 T S C 2 1 3 (配列番号 75 ; アミノ酸配列の配列番号 76) ; T S C 2 4 9 (配列番号 77 ; アミノ酸配列の配列番号 78) 、 T S C 2 5 0 (配列番号 79 ; アミノ酸配列の配列番号 80) 、 T S C 2 5 1 (配列番号 81 ; アミノ酸配列の配列番号 82) 、 および T S C 2 5 2 (配列番号 83 ; アミノ酸配列の配列番号 84) に相当する遺伝子配列を産生するために H i n d I I I / X h o I で切断した目的ベクターを用いた 2 片の結紮、ならびに (C) B s r G I / E c o R I 断片および T S C 2 9 5 (配列番号 157 ; アミノ酸配列の配列番号 158) 、 T S C 2 9 6 (配列番号 159 ; アミノ酸配列の配列番号 160) 、 T S C 3 0 1 (配列番号 161 ; アミノ酸配列の配列番号 162) 、 および T S C 3 0 2 (配列番号 163 ; アミノ酸配列の配列番号 164) に相当する遺伝子配列を産生するために B s r G I / E c o R I で切断した 2 つの目的ベクターのうち 1 つを用いた 2 片の結紮。ヒト化 P S M A 特異的 (107-1A4) V L 領域ポリヌクレオチド配列は配列番号 22 とし、アミノ酸配列は配列番号 23 とする。ヒト化 P S M A 特異的 (107-1A4) V H 領域 # 1 ポリヌクレオチド配列は配列番号 24 とし、アミノ酸配列は配列番号 25 とする。ヒト化 P S M A 特異的 (107-1A4) V H 領域 # 2 ポリヌクレオチド配列は配列番号 26 とし、アミノ酸配列は配列番号 27 とする。

10

【 0 2 1 6 】

様々なクローン化配列および成分の配列も表 3 に提示する。ポリペプチド構築物 (例えば、 S M I P 、 S C O R P I O N 、 単一または多重特異性ヘテロ二量体タンパク質) のアミノ酸配列は、ヒト V k 3 リーダー配列を含まない。

20

【表 3】

結合ポリペプチド配列および成分

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
マウス 107-1A4 VH 領域	gagatccagctgcaacagctctggacctgagctgggaagcctggggcttc agtgaagatgtcctgcaaggcttctggatacacattcactgactactaca tgcactgggtgaagcagaacaatggagagagccttgagtggattggatat tttaatccttataatgattatactagatacaaccagaatttcaatggcaa ggccacattgactgtagacaagtccctccagcacagcctacatgcagctca acagcctgacatctgaggactctgcattctattactgtgcaagatcggat ggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaacctcagtcaccgt ctcctcg	eiqlqqsgpelvkpgas vkmsckasgytftdyym hvwkqrngeslewigyf npynytrynqnfnfngka tltvdkssstaymqlns ltsedsafyycarsdgy ydamdywgq	配列番号 1 (配列番号 2)
マウス 107-1A4 VL 領域、追加の制限部位を有する	Gatgtccagataaaccagctctccatcttatcttctgtgcatctcctggaga aaccattactattaatgtcagggcaagtaagagcattagcaaatatttag cctggatatcaagagaaacctgggaaagctaataagcttcttatccattct ggatccactttgcaatctggaattccatcaagggttcagtggcagtggtatc tggtacagatttcactctcaccatcagtagcctggagcctgaagattttg caatgtattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggtggt ggcaccaaaactggaaattaaacgggct		配列番号 3
マウス 107-1A4 VL 領域修飾	gatgtccagataaaccagctctccatcttatcttctgtgcatctcctggaga aaccattactattaatgtcagggcaagtaagagcattagcaaatatttag cctggatatcaagagaaacctgggaaagctaataagctacttatccattct ggatccactttgcaatctggaataccatcaagggttcagtggcagtggtatc tggtacagatttcactctcaccatcagtagcctggagcctgaagattttg caatgtattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggtggt ggcaccaaaactggaaattaaacgggcc	dvqitqspyslaaspe titincraskysiskyla wyqekpgkankllihsg stlqsgiprsrfsqsgsg tdftltisslepedfam yycqghieypwtfgggt kleikra	配列番号 4 (配列番号 5)
107-1A4 VH CDR1	tctggatacacattcactgactactacatgcac	sgytftdyymh	配列番号 6 (配列番号 9)

10

20

30

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
107-1A4 VH CDR2	tattttaatccttataatgattataactaga	Yfnpyndytr	配列番号 7(配列番号 10)
107-1A4 VH CDR3	tgtgcaagatcggatggttactacgatgctatggactactgg	carsdgydamdyw	配列番号 8(配列番号 11)
107-1A4 VL CDR1	Aagagcattagcaaatat	Ksisky	配列番号 12(配列番号 15)
107-1A4 VL CDR2	Tctggatcc	Sgs	配列番号 13(配列番号 16)
107-1A4 VL CDR3	Caacagcatattgaatacccgtaggacg	Qqhieypwt	配列番号 14(配列番号 17)
107-1A4 VH-VL scFv	gagatccagctgcaacagctctggacctgagctgggaagcctggggcttc agtgaagatgtcctgcaagccttctggatacacattcactgactactaca tgcaactgggtgaagcagaacaatggagagagccttgagtgattggatat tttaatccttataatgattataactagatacaaccagaatttcaatggcaa ggccacattgactgtagacaagtcctccagcacagcctacatgcagctca acagcctgacatctgaggactctgcattctattactgtgcaagatcggat ggttactacgatgctatggactactgggtcaaggaacctcagtcaccgt ctctcaggcggcgcggaagcggcggtggcgagcagcggcgcgcgcg gcagcgatgtccagataaaccagctctccattcttctgtgcatctcct ggagaaccattactattaatgtcagggaagtaagagcattagcaaata tttagcctggtatcaagagaaacctgggaaagctaataagctacttatcc attctggatccactttgcaatctggaataccatcaaggttcagtggcagt ggatctggtacagatttctactctcaccatcagtagcctggagcctgaaga ttttgcaatgtattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcg gtggtggcaccacaaactggaaattaaacgggcctcg	eiqlqqsgpelvkpgas vkmsckasgytftdyym hwwkqngeslewigyf npyndytrynqnfngka tltdvdkssstaymqlns ltsedsafyycarsdgy ydamdywgqgtsvtvss ggggsgggsgggsgsd vqitqspysylaaspget itincrasksis skylaw yqekpgkankllihsgs tlqsgipsrfs gsgsgt dftltisslepedfamy ycqqhieypwtfgggtk leikras	配列番号 18(配列番号 19)
107-1A4 VL-VH scFv	gatgtccagataaaccagctcctcatcttatcttctgctgcatctcctggaga aaccattactattaatgcaagggaagtaagagcattagcaaatatttag cctggtatcaagagaaacctgggaaagctaataagctacttatcattct ggatccactttgcaatctggaataccatcaaggttcagtggcagtgatc tggtacagatttctactctcaccatcagtagcctggagcctgaagatttg caatgtattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggtggt	dvqitqspysylaaspge titincrasksis skylaw wyqekpgkankllihsg stlqsgipsrfs gsgsg tdftltisslepedfam yycqqhieypwtfgggt	配列番号 20(配列番号 21)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ggcaccaaaactggaaattaaacgggcccggcgccggaagcggcgggtgg cggcagcagcggcgccggcgccgagatccagctgcaacagtctggac ctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaagatgtcctgcaagcttct ggatacacattcactgactactacatgcactgggtgaagcagaacaatgg agagagccttgagtgattggataatccttataatgattataacta gatacaaccagaatttcaatggcaaggccacattgactgtagacaagtc tccagcacagcctacatgcagctcaacagcctgacatctgaggactctgc attctattactgtgcaagatcgatggttactacgatgctatggactact ggggccaaggaacctcagtcaccgtctcctcg	kleikragggsggggs sggggseiqlqqsgpel vkpgasvkmcskasgyt ftdyymhvwkqngesl ewigyfnpyndytrynq nfnkgatltdksssta ymqlnsltsedsafyyc arsdgyydandywgqgt svtvss	
ヒ ト 化 107-1A4 VL	gatatccagatgaccagctctccatccgccatgtctgcatctgtaggaga cagagtcaccatcacttgccggcgagtaagagcattagcaaatatttag cctggtttcagcagaacagggaagtctcctaagctccgcattcattct ggatctactttgcaatcagggtcccctctcggttcagtggcagtgatc tgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttg caacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggccaa gggaccaaggtggaaatcaaacga	diqmtqspmsasvvd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsqsgsg teftltisslqpedfat yycqqhieypwtfgqgt kveikr	配列番号 22 (配列番 号 23)
ヒ ト 化 107-1A4 VH#1	gaggtcagctggtacagctctgggctgaggtgaagaagcctgggctac agtgaagatctcctgcaagcttctggatacacattcactgactactaca tgcactgggtgcaacaggccccctggaaaagggttcagtggatgggatat tttaatccttataatgattatactagatacgacagaagttccagggcag agtcaccataaccgcgacagctctacagacacagcctacatggagctga gcagcctgagatctgaggacacggcgtgtattactgtgcaagatcgat ggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaccacagtcaccgt ctcctcg	evqlvqsgaevkkgat vkisckasgyftdyym hwwqapqglewmgyf npyndytryaekfqgrv titadtstdtaymelss lrsdtaavyycarsdgy ydandywgqgtvtvss	配列番号 24 (配列番 号 25)
ヒ ト 化 107-1A4 VH#2	caggtcagctggtacagctctgggctgaggtgaagaagcctgggcttc agtgaagctctcctgcaagcttctggatacacattcactgactactaca tgcactgggtgcagacggccccctggacaagggttcagtggatgggatat tttaatccttataatgattatactagatacgacacagaagttccagggcag agtcaccatgaccaggacagctctatcagcacagcctacatggagctga gcagcctgagatctgacgacacggcgtgtattactgtgcaagatcgat ggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaccacagtcaccgt ctcctcg	qvqlvqsgaevkkgas vkvsckasgyftdyym hwwrqpqglewmgyf npyndytryaqkfqgrv tmtrdtsistaymelss lrsddtaavyycarsdgy	配列番号 26 (配列番 号 27)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaccacagtcacgtctcctcg	ydandywgqgttvss	
ヒト化 107-1A4 VL-VH#1 scFv	gatatccagatgaccagctctccatccgcatgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcgagtaagagcattagcaaatatttagcctggtttcagcagaaaccagggaagtccctaagctccgcatccattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagtggcagtggtatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggccaaaggacaaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctgggggtggcggatccggaggtggtggctctgaggtccagctggtagctctggggtgaggtgaagaagcctggggtacagtgaagatctcctgcaagccttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcaacaggccctggaaaaggccttgagtggatgggatattttaaccttataatgattatactagatacgcagagaagttccagggcagagtcaccataaccgcggacacgtctacagacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcctgtattactgtcaagatcggtggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaccacagtcacgtctcctcg	diqmtqspamsasvgrvtitcrasksiskylawfqkpgkvpklrihsgstlqsgvpsrfsrgsgsteflttisslqpedefatyycqchieypwtfgqgtkveikrgggsgggsgggsevglvqsgaevkkgatvkiackasgytftdymhvwqapqglewmgynpyndytryaekfqgrvtitadtstdtaymelsslrstedavyycarsdgyydamdywgqgtvtvss	配列番号 28 (配列番号 30)
ヒト化 107-1A4 VL-VH#2 scFv	gatatccagatgaccagctctccatccgcatgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcgagtaagagcattagcaaatatttagcctggtttcagcagaaaccagggaagtccctaagctccgcatccattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagtggcagtggtatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggccaaaggacaaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctgggggtggcggatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtagctctggggtgaggtgaagaagcctggggttcagtgaaggtctcctgcaagccttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcacaggccctggacaaggccttgagtggatgggatattttaaccttataatgattatactagataccacagaagttccagggcagagtcaccatgaccaggacacgtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgacacggcctgtattactgtcaagatcggtggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaccacagtcacgtctcctcg	diqmtqspamsasvgrvtitcrasksiskylawfqkpgkvpklrihsgstlqsgvpsrfsrgsgsteflttisslqpedefatyycqchieypwtfgqgtkveikrgggsgggsgggsevglvqsgaevkkgasvkvackasgytftdymhvwraqpqqglewmgynpyndytryaqkfqgrvtmtrdtsistaymelsslrddtavyycar	配列番号 29 (配列番号 31)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ttactgtgcaagatcggatggttactacgatgctatggactactggggtc aaggaaccacagtcaccgtctctctcg	sdgyydandywgqgttv tvss	
ヒ ト 化 I07-1A4 VI#1-VI. scFv	gaggtccagctggtacagctctggggtgaggtgaagaagcctggggtac agtgaagatctcctgcaaggcttctggatacacattcactgactactaca tgcactgggtgcaacaggcccclggaaaagggttgagtggatgggatat tttaatccttataatgattatactagatacgcagagaagttccagggcag agtcaccataaccgaggacagctctacagacacagcctacatggagctga gcagcctgagatctgaggacacggcgtgtattactgtgcaagatcggat ggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaccacagtcaccgt ctcctcaggtggcggagggtctgggggtggcggatccggaggtggtggct ctgatatccagatgaccagctctccatccgcatgtctgcatctgtagga gacagagtcaccatcacttgccgggcgagtaagagcattagcaaatttt agcctggtttcagcagaaccagggaagttcctaagctccgcatccatt ctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagtggcagtgga tctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattt tgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggcc aagggaaccaaggtggaatcaaacgagcctcg	evqlvqsgaevkkgat vkisckasgytftdyym hwwqapqkglewmgf npynytryaekfqgrv titadtstdtaymelss lrsedtavyycarsdgy ydandywgqgttvss gggsgggsgggsgdi qmtqspamsasvgrv titerasksiskylawf qqkpgkvpklrihsgst lqsgvpsrfsrgsggte ftltisslqpedfatyy cqqhieypwtfqggtkv eikras	配列番号 32 (配列番 号 34)
ヒ ト 化 I07-1A4 VI#2-VI. scFv	caggtccagctggtacagctctggggtgaggtgaagaagcctggggttc agtgaaggtctcctgcaaggcttctggatacacattcactgactactaca tgcactgggtgcaacaggcccclggacaagggttgagtggatgggatat tttaatccttataatgattatactagatacgcacagaagttccagggcag agtcaccatgaccaggacagctctatcagcacagcctacatggagctga gcagcctgagatctgacgacacggcgtgtattactgtgcaagatcggat ggttactacgatgctatggactactggggtcaaggaaccacagtcaccgt ctcctcaggtggcggagggtctgggggtggcggatccggaggtggtggct ctgatatccagatgaccagctctccatccgcatgtctgcatctgtagga gacagagtcaccatcacttgccgggcgagtaagagcattagcaaatttt agcctggtttcagcagaaccagggaagttcctaagctccgcatccatt ctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagtggcagtgga tctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattt tgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggcc tgcacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggacgttcggcc	qvqlvqsgaevkkgas vkvsckasgytftdyym hwwrqpqgglewmgf npynytryaqkfqgrv tmtrdtsistaymelss lrsddtavyycarsdgy ydandywgqgttvss gggsgggsgggsgdi qmtqspamsasvgrv titcrasksiskylawf qqkpgkvpklrihsgst lqsgvpsrfsrgsggte ftltisslqpedfatyy cqqhieypwtfqggtkv	配列番号 33 (配列番 号 35)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	aagggaaccaaggtggaatcaaacgcgcctcg	eikras	
TSC085 キメラ SMIP(マウス 107-1A4 VL-VH scFv-ヒトFc)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctctctgctactctggctcccaga taccacgggtgatgtccagataacccagctctccatcttatcttggctcat ctcctggagaaaccattactattaattgcagggaagtaagagcattagc aaatatlttagcctggatcaagagaaacctgggaagctaataagctact tatccattctggatccactttgcaatctggaataccatcaaggttcagt gcagtggaatctgttacagatttactctcaccatcagtagcctggagcct gaagattttgcaatgtattactgtcaacagcatattgaatacccgtagc gttcgggtggtagcaccacaaactggaaattaaacgggcggcgaggcga gcggcggtggcgagcagcgggcgaggcgagcagatccagctgcaa cagctctggacctgagctgggaagcctggggcttcagtgaagatgtcctg caagctcttggatacacatttactgactactacatgcactgggtgaagc agaacaatggagagagccttgagtgattggatattttaatccttataat gattatactagatacaaccagaatttcaatggcaagccacattgactgt agacaagctctccagcacagcctacatgcagctcaacagcctgacatctg aggactctgcattcttattactgtgcaagatcggtggttactacgatgt atggactactggggtaaggaacctcagtcacgctctcctcgagtggcc caaattcttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaag ccgcggtgacacgtcagcttctcttcccccaaaaccaaggacacc ctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtgggtgggacgtgag ccacgaagacctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtggagg tgcataatgccaagacaaagccgaggagcagtagacaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactgggtgaatggcaa ggcgtacgcgtgcgggtctccaacaagccctccagccccatcgaga aaacctatctcaaagccaaaggcagcccgagaaccacaggtgtacacc ctgccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagctgacctg cctggtcaaagcttctatccaagcagatcgccgtggagtgggagagca atgggcagcggagagaacaactacaagaccagcctcccgctgctggactcc gacggctccttcttctctacagcaagctcacgctggacaagagcaggtg gcagcagggaagcgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaca accactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga	dvqitqspysylaaspge titincrasksiskyla wyqekpgkankllihsg stlqsgipsrfsrgsgsg tdftltisslepedfam yycqghieypwtfgggt kleikragggsggggs sggggseiqlqsgpel vkpgasvkmcsckasgyt ftdyymhwvkqnnngesl ewigyfnpyndytrnq nfnkatltvdkssta ymqlnsltsedsafyyc arsdgyydandywgqgt svtvsssepksdktht cppcpapeaagapsvfl fppkpkdtlmsrtpev tcvvdvshedpevkfn wyvdgvevhnaktkpre eqynstyrvvsvltvlh qdwlngkayacavsnka lpapiektiskakqpr epqvytlppsrdeltkn qvsltclvkgyfypsia vewesngqpennykttp pvlstdsgfflyskltv dksrwqqgnvfscsvmh ealhnhytqkslsisp k	配列番号36 (配列番号38)
TSC092 キメラ	atggaagcaccagcgcagcttctcttctctctgctactctggctcccaga	eiqlqsgpelvkpgas	配列番号37

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
ラ SMIP (マウス 107-1A4 VH-VL scFv-ヒトFc)	taccaccggtgagatccagctgcaacagctctggacctgagctgggtgaagc ctggggcttcagtgaaagtgcctgcaaggcttctggatacacattcact gactactacatgcactgggtgaagcagaacaatggagagagccttgagtg gattggatattttaatccttataatgattatactagatacaaccagaatt tcaatggcaaggccacattgactgtagacaagtcctccagcacagcctac atgcagctcaacagcctgacatctgaggactctgcattctattactgtgc aagatcggtatggttactacgatgctatggactactgggtcaaggaacct cagtcaccgtctcctcaggcgggcggaagcggtggcggcagcagc ggcgggcgggcgagcagtgctccagataaccagctctccatcttattctgc tgcatctcctggagaaccattactattaattgcaggcgaagtaagagca ttagcaaatatttagcctggtatcaagaaaacctgggaaagctaataag ctacttatccattctggatccactttgcaatctggaataccatcaaggtt cagtggcagtgagcttgtagagatttaccatctcaccatcagtagcctgg agcctgaagattttgcaatgtattactgtcaacagcatattgaatacccg tggaagcttcggtggtggcaccaaactggaaattaaacgggctcagtgga gccccaaatctcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctg aagccgcgggtgcaccgtcagcttctcctcttcccccaaaaccaaggac accctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgt gagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtgg aggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg taccgtgtggtcagctcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatgg caaggcgtacgctgcggtctccaacaaagccctccagcccccatcg agaaaacatctccaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtac accctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgac ctgcctggtcaaaagcttctatccaagcgacatgccgtggagtgggaga gcaatgggcagccggagaaactacaagaccacgctcccggtgctggac tccgacggtccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcag gtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgc acaaccactacagcagaagagcctctcctgtctccgggtaaatga	vkmsckasgytftdyym hwwkqnnngeslewigyf npyndytrynqnfngka tltdvdkssstaymqlns ltsedsafyycarsdgy ydamdywgqtsvtvss ggggsgggsgggsgsd vqitqspyslaaspgct itincrasksis kylaw yqekpgkankllihsgs tlqsgipsrfs gsgsgt dftltisslepedfamy ycqqhieypwtfgggk leikrassepksdkth tcppcpapeaagapsvf lfppkpkdtlmisrtp vtcvvvdvshedpevkf nwvydgvvhnaktpr eeqynstyrvsvltvl hqdwlngkayacavsnk alpapiektiskakqp repqvytlppsrdeltk nqvsltclvkgfypsdi avewesngqpennyktt ppvldsdgsfflysklt vdksrwqqgnvfscsvm healhnhytqkslslsp gk	(配列番号 39)
TSC188 ヒト化 SMIP (107-1A4 VL-VH#1 scFv-Fc)	atggaagcaccagcgcagcttcttctcctctgctactctggtctccaga taccaccggtgatatccagatgaccagctctccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccggcgagtaagagcattagc aaatatittagctggtttcagcagaaccagggaagtctctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagtg	dqmtqspasmsasvvd rvtitcrasksis kylaw wfqqkpgkvpklihs stlqsgvpsrfs gsgsg teftltisslqpedfat	配列番号 40 (配列番号 42)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	gcagtggatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagatittgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggac gttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctg ggggtggcggatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtacagtct ggggctgaggtgaagaagcctgggctacagtgaagatctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcaacaggccc ctggaaaaggccttgagtgatgggatatattaatccttataatgattat actagatacgcagagaagttccagggcagagtcaccataaccgcggacac gtctacagacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggaca cggccgtgtattactgtgcaagatcggatggttactacgatgctatggac tactggggtcaaggaaaccacagtcaccgtctcctcagtgagcccaaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagcttctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatg atctcccggaaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgaggagagcagtagaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgta cgcgtgcgggtctccaacaaagcctccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc ccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggttcttatcaagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagaaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggc tcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga	yycqchieypwtfgqgt kveikrgggsgggsg gggseqlvqsgaevkk pgatvkiskasgytft dyymhwvqqapgkglew mgyfnpindytryaekf qgrvtitadtstdtym elsslrstedavyycar sdgyydandywgqgttv tvsssepksdkthtcp pcpapeaagapsvflfp pkpkdtlmsrtpevtc vvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqv sltlvkgfypsdiave wesngqpennykttpv ldsdsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslsispk	
TSC189 ヒト 化 SMIP(107-1A 4 VL-VII#2 scFv-Fc)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctcctctgctactctlggtccaga taccaccggtgatatccagatgaccagctcctatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccggcgagtaagagcattagc aaatatattagcctggtttcagcagaaccagggaagtctctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagt gcagtggatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagatittgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggac gttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctg ggggtggcggatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtacagtct	dqmtqspsamsasvvd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg teftltisslqpedfat yycqchieypwtfgqgt kveikrgggsgggsg gggsqqlvqsgaevkk pgasvkvskasgytft	配列番号 41 (配列番号 43)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaggtctcctgcaaggc ttctggatacacatttactgactactacatgcactgggtgcgacaggccc ctggacaagggttgagtgatgggatattttaatccttataatgattat actagatacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccaggacac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cggcctgtattactgtgcaagatcggatggttactacgatgctatggac tactggggtcaaggaaccacagtcaccgtctcctcgagtgcgcaaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagtccttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatg atctcccgagccctgaggtcacatgcgtggtggtagcgtgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtagcggcgtggagtgacata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg gtcagcttctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgtg cgcgtgcgggtctccaacaagccctccagccccatcgagaaacca tctccaaagcgaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc ccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggtctctatccaagcgacatgcgctggagtgaggagcaatgggc agccggagaacaactacaagaccagcctcccgctgctggactccgacggc tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatga	dyymhwvrqapqglew megyfnpyndytryaqkf qgrvtmtrdtsistaym elsslrddtavvyicar sdgyydandywgqgttv tvsssepksdkthtcp pcpeaagapsvflfp pkpkdtlmsrtpvct vvvdvshdepvkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlnkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlppsrdeltnqv sltclvkgfypsdiave wesngqpennyktpvp ldsdgsfflyskltvdk srwqgnvfscsvmhea lhnhytqkslspsgk	10
			20
TSC084 キメラ インター セプター(マ ウス VL-VH 107-1A4 scFv-Fc-CHI)	atggaagcaccagcgcagcttcttctcctgctactctggctccaga taccaccgtgatgtccagalaaccagcttccatcttatcttctgctgat ctcttgagaaaccattactattaattgcagggaagtaagagcattagc aaatatttagcctggatcaagagaacctgggaaagctaataagctact tatccattctggatccactttgcaatctggaatccatcaaggttcagtg gcagtgatctggtacagatttactctcaccatcagtagcctggagcct gaagattttgcaatgtattactgtcaacagcatattgaataccctggac gttcgggtgggcaccaaactggaaattaaacgggccggcgccgggaa gcggcggtggcggcagcagcgccggcggcgcgcgcgcgcgaa cagcttggaacctgagctggtgaagcctggggttcagtgagatgtcctg caaggttcttgatacacatttactgactactacatgcactgggtgaagc agaacaattggagagaccttgagtggttgatattttaatccttataat gattatactagatacaaccagaatttcaatggcaaggccacattgactgt	dvqitqspyslaaspge titincrasksiskyla wyqekpgkankllihsg stlqsgipsrfsrgsgsg tdftltisslepedfam yycqqhieypwtfgggt kleikragggsgsgsgs sggggseiqllqsgpel vkpgasvkmsckasgyt ftdyymhwvkqngesl ewigyfnpyndytrynq nfngkatltvdkssta ymqlnsltsedsafyyc	30
			40

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	gctcaagtgttaagtacatgaactggtaccagcagaagccccggcaaggcc ccccaaagatggatttatgactcatccaaactggcttctggagtcctgc tcgcttcagtgccagtggtctgggaccgactataccctcacaatcagca gcctgcagccccgaagatttccgacttattactgcagcagtggtgcgt aaccacccacgcttcggaggggggaccaagctacaaattacacgctcgag tgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcac ctgaagccgctgggtgcacgcgtcagcttctcttccccccaaaaccaag gacacctcatgatctcccgaccctcgaggtcacatgcgtggtggtgga cgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcg tggaggtgcataatgccaagacaaagccgaggaggagcagtacaacagc acgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaa tggcaaggcgtacgcgtgcgggtctccaacaaagccctccagccccca tcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtg tacacctgcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcct gacctgcctggtcaaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgga agagcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgctcccgctgctg gactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagag caggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtc tgacacaaccactacacgcagaagacctctccctgtctccgggtaaatct agaactgtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagca gttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgtgaattacttctatc ccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgcctccaatcggt aactcccaggagagtgccacagagcaggacagcaaggacagcacctacag cctcagcagcgagctgacgtgagcaagcagactacgagaacacaaaag tctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaag agcttcaacaggggagagtga	ssklasgvparfsgsgs gtdytltisslqpedfa tyycqwsrnpptfggg tklqitrsepkssdk htcppcpapeagapsv flfppkpkdtlmsrtp evtcvvvdvshedpevk fnwyvdgvevhnaktkp reeqynstyrvsvltv lhqdwlngkayacavsn kalpapiektiskakgq prepvytlppsrdeft knqvsltclvkgfypsd iavewesngqpennykt tppvldsdgsfflyskl tvdksrwqqgnvfscsv mhealhnhytqksls pgksrtvaapsvfifpp sdeqlksgtasvclln yfypreakvqwkvdnal qsgnsqesateqdsks tyslsseltskadyek hkvyacevthqglsspv tksfnrge	10 20 30
TSC194SCORP ION(huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-Cri s7 scFv)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctcctctgactctggtccaga taccaccggtgatatccagatgaccagctcctcatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcacatcacttgccgggcagtaagagcattagc aaatatttagcctggtttcagcagaaaccagggaagtctctaagctcog catccattctggatctactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagt gcagtggtatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccggtggac gttcggccaagggaaggtggaaatcaaacaggtggcgagggtctg	dqmtqspmsasvvd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg teftltisslqpedfat yyccqhieypwtfgqgt kveikrgggsgggsgsg ggsgsqvqlvqsgaevkk	配列番号 48 (配列番号 49) 40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ggggtggcggatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtacagtct ggggctgaggtgaagaagccctggggcttcagtgaaggtctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcgacaggccc ctggacaagggcttgagtggtgggatattttaatccttataatgattat actagatacgacagaagttccagggcagagtcaccatgaccaggggacac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cggcctgtattactgtgcaagatcggatgggtactacgatgctatggac tactggggctcaaggaaccacagtcaccgtctcctcgagtgaagccaaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgcccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagttctctcttcccccaaaacccaaggacacctcatg atctcccggaacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga agacctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtccctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgta cgcgtgcgggtctccaacaagccctccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc ccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccact acacgcagaagagcctctcctgtctcgggtcagaggcacaacaattct tccctgaatacaggaactcagatggcaggtcattctccgaattctcaggt ccagctggtgcagctctggggcggagtggtgcagcctggcggtcactga ggctgtcctgcaaggcttctggctacaccttactagatctacgatgcac tgggtgaaggcaggcccttggaaagggtctggaatggattggatacattaa tcctagcagtgcttatactaattacaatcagaaattcaaggacaggttca caatcagcgcagacaaatccaagagcacagccttctgcagatggacagc ctgaggccccaggacacccggctctatttctgtgcacggcccaagtcca ctatgattacaacgggttctcttactggggccaagggactcccgctcactg tctctagcgggtggcgagggtctgggggtggcggatccggaggtggtggc tctgcacaagacatccagatgaccagctctccaagcagcctgtctgcaag cgtgggggacagggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgtgaagt acatgaactggtaccagcagaagccccgcaaggcccccaaaagatggatt	pgasvkvscasgytft dyyinhwvrqapggglew mgyfnpyndytryaqkf qgrvmtmrtdtsistaym elsslrssdtavyyicar sdgyydandywqggttv tvsssepkssdkthtcp pcppapeaagapsvflfp pkpkdtlmi srtpevtc vvvdvshdepvkfinwy vdgvvehnaktkpreeq ynstyrvvsvltvlhq wlnkayacavsnkalp apiektiskakqprep qvytlppsrdeltnqv sltclvkgfypsdiave wesngqpennykttppv ldsdgsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqksls l spgqr hnnsslntgtqmaghsp nsqqlvqsgggvvvqpg rslrlsckasgytfrs tmhwrqapkgglewig yinpssaytnynqkfk rftisadkskstaf lqm dslrpedtgyvfcarpq vhydyngfpywqgtpv tvssgggsgggsggg gsaqdiqmtqspssl sa svgdrvtmtcsasssvs ymnwyqqkpgkapkrwi ydssklasgvparfsgs gsgtdytlitisslqped	

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	tatgactcatccaaactggcttcttgagtcctctgcttcagtggcag tgggtctgggaccgactataccctcacaatcagcagcctgcagcccgaag atttcgccacttattactgccagcagtgaggctcgtaacccaccacgttc ggaggggggaccaagctacaaattacacgataa	fatyyccqwsrnpptfg ggtklqitr	
TSC199SCORP ION (huVL-VH #1 107-1A4 scFv-Fc-Cri s7 scFv)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctcctgctactctggctcccaga taccaccggtgatatccagatgacccagctctccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcagtaagagcattagc aaatatattgacctggtttcagcagaaaccagggaagtctctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagt gcagtggaatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggac gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacgaggtggcggagggtctg ggggtggcgatccggaggtggtggtctgaggtccagctggtacagtct ggggtgaggtgaagaagcctggggtacagtgaagatctcctgcaaggc tcttgatacacattcactgactactacatgcactgggtgcaacaggcc ctggaaaaggccttgagtggtgggataatttaattccttataatgattat actagatagcagagaagttccagggcagagtcaccataacccgggacac gtctacagacacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggaca cgccgtgtattactgtgcaagatcggtggttactacgatgctatggac tactgggtcaaggaaccacagtcaccgtctcctcgagtgagccaaatc tctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagttctctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatg atctccgggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggaogtgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgggaggagcagtagacaacagcagctaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgta cgctgctgcgggtctccaacaaagcctccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc ccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggttctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggc agccgggagaaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggc tcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctcctgatgcatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtcagaggcacaacaattct	dqmtqspmsasvvd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg teftltisslqpedfat yycqqhieypwtfgqgt kveikrgggsgggsgsg gggseqlvqsgaevkk pgatvkiskcasgytft dymhwvqqapkglew mgyfnpyndytryaekf qgrvtitadtstdtaym elsslrsestavvyar sdgyydamdywqgttv tvsssepksdkthtcp pcpapeaagapsvflfp pkpkdtlmisrtpcvtc vvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqv slctlvkgfypsdiave wesngqpennykttpv ldsdsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslspsgqr hnnsslntgtqmaghsp nsqvqlvqsggvvqpg	配列番号 50 (配列番号 51)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	tcctgaatacaggaactcagatggcaggtcattctccgaattctcaggt ccagctgggtgcagctctggggcgaggagggtgcagcctgggcgggtcactga ggclgtcctgcaaggcttctggctacacctttactagatctacgatgcac tgggtaaggcagggcccttggaaagggtctggaatggattggatacattaa tcctagcagtgttataactaattacaatcagaaattcaaggacaggttca caatcagcgcagacaaatccaagagcacagccttctgcagatggacagc ctgaggcccgaggacaccggcgtctatttctgtgcacggcccaagtcca ctatgattacaacgggtttccttactggggccaagggactcccgtcactg tctctagcgggtggcgagggtctgggggtggcggtccggagggtggc tctgcacaagacatccagatgacccagcttccaagcagcctgtctgcaag cgtgggggacagggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgttaagt acatgaactggtaccagcagaagcccggaaggcccccagaagtgatt tatgactcatccaaactggcttctggagtcctctgcttgcgttcagtggcag tgggtctgggaccgactataccctcacaatcagcagcctgcagccgaag atttcgccacttattactgccagcagtgagtcgtaaccacccacgttc ggaggggggaccaagctacaaattacacgataa	rsrlrskasgytfrs tmhwvrqapkglewig yinpssaytnynqkfk rftisadkskstafqm dslrpedtgyvfcarpq vhydyngfpywgqtpv tvssgggsgggsggg gsaqdiqmtqspsslsa svgdrvtmtcsasssvs ymnwyqqkpgkapkrwi ydssklasgvparfsgs gsgtdytltisslqped fatyyccqwsrnpptfg ggtklqitr	
TSC125 インターセプター (Cris7 scFv-Fc-CH1)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctctctgctactctggctcccaga taccaccgggtcaggtccagctgggtgcagctctggggcgaggagggtgcagc ctggggcggtcactgaggtgtcctgcaaggcttctggctacacctttact agatctacgatgcactgggtlaaggcagggcccttggaaagggtctggaatg gattggatacattaatcctagcagtgttataactaattacaatcagaaat tcaaggacaggttcacaatcagcgcagacaaatccaagagcacagccttc ctgcagatggacagcctgaggcccgaggacaccggcgtctatttctgtgc acggccccaagtccactatgatatacaccgggttcttactggggccaag ggactcccgctcactgtctctagcgggtggcgagggtctgggggtggcgga tccggagggtgggtgctctgcacaagacatccagatgacccagcttccaag cagcctgtctgcaagcgtgggggacaggggtcaccatgacctgcagtgcca gctcaagtgttaagtacatgaactggtaccagcagaagcccggaaggcc cccaaaagatggatttatgactcatccaaactggcttctggagtcctgtc tcgcttcagtggcagtggtctgggaccgactataccctcacaatcagca gcctgcagccgaagatttcgccacttattactgccagcagtgagtcgt aaccacccacgttcggaggggggaccaagctacaaattacacgctcgag tgagcccaaatctcttgcaaaaatcacacatgccaccgtgccagcac ctgaagcccggggtgcacgtcagcttctcttccccccaaaacccaag	qvqlvqsgggvvqpgsr lrlskasgytfrstm hmwvrqapkglewigyi npssaytnynqkfkdrf tisadkskstafmqds lrpeditgyvfcarpqvh ydyngfpywgqtpvtv ssgggsgggsgggsgs aqdiqmtqspsslsasv gdrvtmtcsasssvsym nwyqqkpgkapkrwiyd ssklasgvparfsgsgs gtdytltisslqpedfa tyycqwsrnpptfggg tkqlitrssepkssdk htcpapeapeagapsv flfpkpkdltmistrtp evtcvvvdvshedpevk	配列番号 52 (配列番号 57)

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagctcttctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga agaccctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcacctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgtg cgcgtgcgcgtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaaggcgagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc ccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggt caaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc tcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgagctctgcacaaccact acacgcagaagacgtctccctgtctccggtaaattctagaactgtggct gcaccatctgtcttcatcttccgccatctgatgagcagttgaaatctgg aactgcctctgttgtgtgctgctgaattacttctatcccagaggcca aagtacagtgaaggtggataacgcctccaatcggttaactcccaggag agtgccacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagca gctgacgtgagcaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcg aagtcacccatcagggcctgagctcgccgtcacaaagagcttcaacagg ggagagtga	pkpkdtlmisrtpetvc vvvdvshedpevkfnwy vdgevehnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlppsrdeltnqv sltclvkgfypsdiave wesngqpennyktppv ldsdgsfflyskltvdk srwqgnvfscsvmhea lhnhytqkslspsgks rtvaapsvfi fppsdeq lksgtasvcllnyfyp reakvqwkdnlqsgn sqesateqdskdstysl ssel t lskadyekhkvy acevthqglsspvtksf nrge	
TSC193 イン ターセプタ ー (huVL-VH#1 107-1A4 scFv-Fc-C _{K_Y} _N)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctcctgctactctggctccaga taccaccggtgatatccagatgaccagctctccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgcggggcagtaagagcattagc aaatatattagcctggtttcagcagaaccagggaagtctctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagt gcagtggatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagat tttgcaacttattactgtcaacagcatattgaataccgtggac gttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctg ggggtggcggtaccggaggtggtggtctgaggtccagctggtacagct ggggctgaggtgaagaagcctggggtacagtgaagatctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcaacaggccc ctggaaaagggttgagtggtgggata ttttaactcttataatgattat actagatacgcagagaagttccagggcagagtcaccataaccgaggacac	diqmtqspamsasvvd rvtiterasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg tefltlisslqpedfat yycqqhieypwtfqgt kveikrgggsgggsgsg gggsevlvqsgaevkk pgatvkisckasytft dyymhwvqqapgglew mgyfnpyndytryaekf qgrvtitadtstdtaym elsslrse dtavyyar	配列番号 54 (配列番号 59)

10

20

30

40

40

40

40

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	atctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcgagtaagagcatta gcaaatatttagcctgggttcagcagaaaccagggaagtccctaagctc cgcattcattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcag tggcagtggaatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagc ctgaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccggtg acgttcggccaagggaacaggtggaaatcaaacgagcctcgagtgcagcc caaatcttctgacaaaactcacatgcccaccgtgccagcacctgaag ccgctgggtgcaccgtcagctcttctcttcccccaaaaccaaggacacc ctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtgggtgacgtgag ccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagg tgcataatgccaaagcaaaaggcgggaggagcagtagaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaa ggctacgcgtgcgcgtctccaacaagccctcccagcccccatcgaga aaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc ctgcccccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctg cctggtcaaaggcttctatccaagcgacatgccgtggagtgggagagca atgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccggtgctggactcc gagcgtccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtg gcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctccggglaaatga	qqkpgkvpklrihsgst lqsgvpsrfsrgsgsgte ftltisslqpedfatyy cqqhieypwtfgggtkv eikrassepksdktht cppcpapeaagapsvfl fppkpkdtlmisrtpev tcvvvdvshedpevkfn wyvdgvevhnaktkpre eqynstyrvsvltvlh qdwlngkayacavsnka lpapiektiskakgqpr epqvtylppsrdeltkn qvslctclvkgyfypsia vewesngqpennykttp pvldsdgsfflyskltv dksrwqqgnvfscsvmh ealhhhtqkslslspg k	10
ヒ ト 化 TSC212SCORP ION(huVH#2- VL 107-1A4 scFv-Fc-Cri s7 scFv)	atggaagcaccagcgcagcttcttctctctgctactctggctccaga taccaccggtcaggtccagctggtacagtctgggctgaggtgaagaagc ctgggcttcagtgaaagtctcctgcaagcttctggatacacattcact gactactacatgcaactgggtgcgacagccccctggacaagggttgagt gatgggatattttaatccttataatgattatactagatacgacagagaag tccagggcagagtcaccatgaccaggacacgtctatcagcacagcctac atggagctgagcagcctgagatctgacgacacggcgtgtattactgtgc aagatcggatggttactacgatgctatggactactgggtcaaggaacca cagtcaccgtctcctcaggtggcggagggtctgggggtggcggatccgga ggtgggtggtctgatccagatgaccagctcctcatccgcatgtctgc atctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcgagtaagagcatta gcaaatatttagcctgggttcagcagaaaccagggaagtccctaagctc cgcattcattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcag tggcagtggaatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagc	qvqlvqsgaevkkpgas vkvskasgytftdyym hwvrqapggglewmyf npyndytryaqkfqgrv tmtrdtsistaymelss lrsddtavyycarsdgy ydamdywgqgtvtvss gggsgggsgggsggsdi qmtqspamsasvgrv titcrasksiskylawf qqkpgkvpklrihsgst lqsgvpsrfsrgsgsgte ftltisslqpedfatyy cqqhieypwtfgggtkv	配列番号 73 (配列番号 74)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ctgaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccggtg acgttcggccaagggaacgaaggtggaatcaaacgcgcctcgagtgaacc caaatcttctgacaaaactcacatgcccaccgtgccagcacctgaag ccgcgggtgcaccgtcagctcttccctctcccccaaaacccaaggacacc ctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggaggagctgag ccacgaagaccctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtggagg tgcataatgccaaagcaaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaa ggcgtacgcgtgcgcggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgaga aaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacc ctgcccccatccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctg cctggtcaaaggtctctatccaagcgacatgcgcgtggagtgggagagca atgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactcc gacggtctcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtg gcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtcttcaca accactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtcagaggcacaac aattcttccctgaatacaggaactcagatggcaggtcattctccgaattc tcaggtccagctggtgacgtctggggcgaggagtggtgcagcctgggcggt cactgaggctgtctgcaaggcttctggctacacctttactagatctacg atgcactgggtgaaggcaggccccctggaaagggtctggaatggattggata cattaatcttagcagtgcttatactaattacaatcagaattcaaggaca ggttcacaatcagcgcagacaatccaagagcacagccttctgcagatg gacagcctgaggcccgaggacaccggcgtctatttctgtgcacggcccca agtcacactatgattacaacgggtttccttactggggccaagggactccg tcaactgtctctagcgtggcgaggaggtctgggggtggcggatccggaggt ggtggctctgcacaagacatccagatgacctcagctccaagcagcctgtc tgcaagcgtgggggacagggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtg taagttacatgaactggtaccagcagaagcccgcaaggcccccaaaaga tggtattatgactcatccaaactggcttctggagtcctgtctgcttcag tggcagtggtgtgggaccgactataccctcacaatcagcagcctgcagc ccgaagatttcgccacttattactgccagcagtgaggctcgtaacccacc acgttcggagggggggaacgaactacaaattacacagataa	eikrassepkssdktht cppcpapeaagapsvfl fppkpkdtlmi.srtpev tcvvvdvshedpevkfn wyvdgvevhnaktkpre eqynstyrvsvltvllh qdwlngkayacavsnka lpapiektiskakgqpr epqvvtlppsrdeltkn qvslctclvkgyfypsdia vewesngqpennykttp pvldsdgsfflyskltv dksrwqqgnvfscsvmh ealhnhytqkslslspg qrhnnsslntgtqmagh spnsqqlvqsgggvvq pgrslrlsckasgytft rstnhwvrqapkgglew igyinpssaytnynqkf kdrftisadkskstaf qmdslrpedtgvfyfcar pqvhydyngfpywgqgt pvtvssggggsgggsg gggsaqdiqmtqspssl sasvgdrvtmtcsasss vsymnwyyqkpgkapkr wiydssklasgvparfs gsgsgtdytltisslpq edfatyyccqwsmppt fgggtklqitr	
ヒト化 TSC213SCORP	atggaagcaccagcgcagcttctcttctctgctactctggctcccaga taccaccggtgaggtccagctggtacagcttggggctgaggtgaagaagc	Evqlvqsgaevkpgat vkiskcasgytftdyym	配列番号 75

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
ION(huVH#1- VL 107-1A4 scFv-Fc-Cri s7 scFv)	ctggggctacagtgaagatctctgcaaggcttctggatacacattcact gactactacatgcacitgggtlgaacaggccctggaaaagggttgagt gatgggatattttaatccttataatgattatactagatagacagagaagt tccagggcagagtaccataaaccgcggacacgtctacagacacagcctac atggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcgtgtattactgtgc aagatcggttggttactacgatgctatggactactgggtcaaggaacca cagtcaccgtctcctcaggtggcggagggtctgggggtggcggatccgga gggtgtgggtctgatatccagatgacccagtcctcatccgcatgtctgc atctgtaggagacagagtaccatcacttgcgggcgagtaagagcatta gcaaatatttagccttggtttcagcagaaaccagggaagtctctaagctc cgcatccattctggatctacttgaatcagggtcccatctcggttcag tggcagtggtatcggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagc ctgaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaataccgtgg acgttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgagcctcgagtggcc caaatcttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaag ccgagggtgcaccgtcagttctcttcccccaaaaccaaggacacc ctcatgatctcccgacccttgaggtcacatgcgtggtggtagctgag ccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggagg tgcataatgccaaagcaaaaggcgggaggagcagtacaacagcacgtac cgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaa ggcgtacgcgtgcgcgggtctccaacaaagccctcccagccccatcgaga aaaccatctccaagcaaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacacc ctgccccatcccggtatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctg cctggtcaaaggcttctatccaagcagacatcgccgtggagtgggagagca atgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccggtgctggactcc gacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtg gcagcagggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcaca accactacacgcagaagagcctctcctgtctccgggtcagaggcacaac aattcttcctgaatacaggaactcagatggcaggtcattctccgaattc tcaggtccagctggtgcagctctggggcggagtggtgcagcctgggcggt cactgaggctgtcctgcaaggcttctggctacaccttactagatctacg atgcactgggtaaggcaggccctggaaagggtctggaatggattggata cattaatcctagcagtgcttatactaattacaatcagaaattcaaggaca ggttcacaatcagcgcagacaaatccaagagcacagccttctgcagatg	hwvqqapkgglewmgfy npnydytryaekfqgrv titadtstdtaymelss lrsedtavvyrcarsdgy ydamdywgqgttvtvss ggggsgggsggggsdi qmtqspamsasvdrv titcrasksiskylawf qqkpgkvpklrihsgst lqsgvpsrfsrgsggte ftltisslqpedfatyy cqqhieypwtfqggtkv eikrassepksdktht cpocpapeaagapsvfl fppkpkdtlmsrtpev tcvvvdvshedpevkfn wyvdgvevhnaktkpre eqynstyrvsvltvlh qdwlnkayacavsnka lpapiektiskakgqpr epqvytlppsrdeltkn qvsltclvkgyfypsdi vewesngqpennykttp pvl dsdgsfflyskltv dksrwqqgnvfscsvmh ealhnhytqkslspsg qrhnnsslntgtqmagh spnsqvqlvqsgggvvq pgrslrlsckasgytft rstmhvwrqapkglew igyinpssaytnynqkf kdrftisadkskstaf qmdslrpedtgyvfcar pqvhydyngfpywgqgt	(配列番号 76)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	gacagcctgagggcccgaggacaccggcgtctatttctgtgcacggcccca agtccactatgattacaacgggttttcttactggggccaagggaactcccg tactgtctctagcgggtggcggagggtctgggggtggcggatccggaggt gggtggctctgcacaagacatccagatgacccagctctccaagcagcctgtc tgcaagcgtgggggacagggtcaccatgacctgcagtccagctcaagtg taagttacatgaactggtaccagcagaagcccggaaggcccccaaaaga tggatttatgactcatccaaactggcttctggagtcctgtctgcttcag tggcagtggtctgggaccgactataccctcacaatcagcagcctgcagc ccgaagatttcgccacttattactgccagcagtgaggctcgttaaccaccc acgttcggaggggggaccaagctacaaattacacgataa	pvtvssgggsgggsg gggsaqdiqmtqspssl sasvdrvmtcsasss vsymnwyqqkpgkapkr wiydssklasgvparfs gsgsgtdytltisslqp edfatyyccqwsmppt fgggtklqitr	
ヒ ト 化 TSC249SCORP ION(huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-DRA 222 scFv)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctctctgactctggctccaga taccaccggtgatatccagatgacccagctctccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggagtaagagcattagc aaatatttagcctggtttcagcagaaccagggaagtctctaagctcog catccattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagt gcagtgatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatatgaatacccgtagc gttcggccaagggaccaaggtggaatcaaagcaggtggcggagggtctg ggggtggcgatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtacagct ggggtgaggtgaagaagcctggggttcagtgaaagtctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcacaggccc ctggacaagggttgagtgatgggatattttaatccttataatgattat actagatagcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggacac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cgccgtgtattactgtgcaagatcggttggttactacgatgctatggac tactggggtcaaggaaccacagtcaccgtctcctcgagtgaagccaaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagcttctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatg atctcccgagccctgaggtcacatgcgtggtgggtggacgtgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtaacagcagctaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgtg cggtgcgggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc	Dlqmtqspssamsasv rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg teftltisslqpedefat yycqqhieypwtfqggt kveikrgggsgggsgsg gggsqvlvqsgaevkk pgasvkvsckasgytft dyymhwvrqapqglew mgyfnpyndytryaqkf qgrvtntrdtsistaym elsslrddtavyyicar sdgyydandywggttv tvsssepksdkthtcp pcpapeaagapsvflfp pkpkdtlmsrtpevtc vvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlppsrdeltnqv sltlvkgfypsdiave	配列番号 77 (配列番号 78)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ccatcccgggatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctggt caaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggc agccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggctctgcacaaccact acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtcagaggcacaacaattct tcctgaatacacgaactcagatggcaggtcatttccgaattctcaggt ccagctggtggagctctggggcgagggtggtgcagcctgggcggtcactga ggctgtcctgcaaggcttctggctacacctttactagatctacgatgcac tgggtaaggcaggcccttgacaaggctctggaatggattggatacattaa tcctagcagtgttataactaattacaatcagaaattcaaggacaggttca caatcagcgcagacaaaatccaagagcacagccttcctgcagatggacagc ctgaggcccaggacaccggcgtctatttctgtgcacggcccaagtcca ctatgattacaacgggtttccttactggggccaagggactcccgtcactg tctctagcgtggcggagggtctgggggtggcggatccggaggtggtggc tctgcacaagacatccagatgaccaggtctccaagcagcctgtctgcaag cgtgggggacagggtcacatgacctgcagtgccagctcaagtgtlaagtt acatgaactggtaccagcagaagccgggcaaggcccccagaagatggatt tatgactcatccaaactggcttctggagtccttgcctcagttggcag tgggtctgggaccgactataccctcacaatcagcagcctgcagcccgaag atttcgccacttattactgccagcagtgagtgtaaccacccacgttc ggaggggggaccaagctacaaattacatcctccagctaa	wesngqpennyktppv ldsdgsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslsrspqr hnnsslntgtqmaghsp nsqvqlvesgggvvqpg rslrlsckasgytftsr tmhwvrqapqglewig yinpssaytnynqkfkd rftisadkskstafmqm dslrpedtgyvfcarpq vhydyngfpywgqgtpv tvssgggsgggsggg gsaqdiqmtqspsslsa svgdrvmtcsasssvs ymnwyqqkpgkapkrwi ydssklasgvparfsgs gsgtdytltisslqped fatyyccqwsrnpptfg ggtklqitsss	
ヒ ト 化 TSC250SCORP ION(huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-DRA 222 scFv、H81 リンカーを 有する)	atggaagcaccagcgcagcttcttctcctcgtactctggctcccaga taccaccggtgatatccagatgaccagcttccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcacatcacttgccggcgagtaagagcattagc aaatatattagcctggtttcagcagaaaccagggaagtctctaagctccg catccattctggtatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagtg gcagtggatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggac gttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctg ggggtggcggatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtacagctt ggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaggtctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcgacaggccc ctggacaagggttgagtgatgggatattttaatccttataatgattat	Diqmtqspmsasavgd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg teftltisslqpedfat yycqqhieypwtfgqgt kveikrgggsgggsgsg gggsgvqlvqsgaevkk pgasvkvscaskasytft dyymhwvrqapqglew mgyfnpydytryaqkf qgrvmttrdtsistaym	配列番号 79 (配列番号 80)

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	actagatacgcacagaagttccagggcagagtcacatgaccaggacac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cggccgtgtattactgtgcaagatcggatggttactacgatgctatggac tactggggctcaaggaaccacagtcaccgtctcctcgagtgaagccaaatc ttctgacaaaactcacacatgcccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcacogtcagttctcctcttcccccaaaacccaaggacacccctcatg atctcccgagaccctgaggtcacatgcgtgggtggagctgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtagctggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggacaggctgaatggcaaggcgta cgcgtgcgcggcttccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacca tctccaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacccctgcc ccatcccggtgatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggc agccgggagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggc tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagcctctccctgtctcgggtgaagttcaaattcccttg accgaaagttagaccccgaattctcaggtccagctgggtggagcttggggg cggagtggtgcagcctgggcgggtcactgaggtgtcctgcaaggtctctg gctacaccttactagatctacgatgcactgggtgaagcaggccctgga caaggtctggaatggattggatacattaatcctagcagtgcttatactaa ttacaatcagaaattcaaggacaggttcacaatcagcgcagacaaatcca agagcacagccttctgcagatggacagcctgagggccgaggacaccggc gtctatttctgtgcacggcccaagtcactatgattacaacgggtttcc ttactggggccaaggactcccgctcactgtctctagcgggtggcggagggt ctgggggtggcggatccggaggtgggtggctctgcacaagacatccagatg accagtcctcaagcagcctgtctgcaagcgtgggggacagggtcacat gacctgcagtgccagctcaagtgttaagtacatgaactggtaccagcaga agccgggcaaggcccccaaaagatggatttatgactcatcaaactggct tctggagtcctgtctgcttctcagtggtggcgtctgggaccgactatac cctcacaatcagcagcctgcagcccgaagatttcgccacttattactgcc agcagtggaagtcgaaccacccacgttcggaggggggaccaagctacaa attacatcctccagctaa	elsslrddtavyycar sdgyydandywgqgttv tvsssepksdkthtcp pcpapeaagapsvflfp pkpkdtlmsrtpevtc vvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvvsvltvlhq wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqv slctclvkgyfypsdiave wesngqpennykttpv ldsdsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslsispgev qipltesyspnsqvqlv esgggvqpgrslrlsc kasgytfrstnhwvrq apggglewigyinpssa ytnynqkfkdrtisad kskstafllqmdslrped tgvyfcarpqvhydyng fpywgqgtpvtvssggg gsgggsgsggggsaqdiq mtqspsslssasvdrvt mtcsasssvsynwyqq kpgkapkrwydsskla sgvparfsgsgsgtdyt ltisslqpedfatyyccq qwsrnpptfgggtklqi tsss	

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
ヒト化 TSC251SCORP ION(huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-DRA 222 scFv、H83 リンカーを 有する)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctctctgctactctggctccaga taccaccggtgatatccagatgaccagctctccatccgcatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcgagtaagagcattagc aaatatttagcctggtttcagcagaaaccagggaagtctctaagctcog catccattctggatctactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagt gcagtggtatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaatacccgtaggac gttcggccaaggaccaaaggtggaatacaaacaggtggcgagggtctg ggggtggcggtatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtacagtct ggggtgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaggtctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcgacaggccc ctggacaagggtctgagtggtgggatattttaatccttataatgattat actagatcacgcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccaggacac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cggcgtgtattactgtgcaagatcggtggttactacgatgctatggac tactgggtcaaggaaccacagtcaccgtctcctcagtgagcccaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgagg gtgcaccgtcagcttctctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatg atctcccgacccttgaggtcacatgcgtggtggtggagctgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaagccgaggaggagcagtcacaacagcacgtaccgtgtg gtcagctcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgtg cgcgtgcgggtctccaacaagccctccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc ccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagacaactacaagaccagcctcccgctgctggactccgacggc tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtcttccctgaatacagga actcagatggcaggtcattctccgaattctcaggtccagctggtggagtc tggggcgaggtggtgcagcctggcggtcactgaggtgtctctgcaagg cttctggtctacaccttactagatctacgatgcactgggtaaggcaggcc cctggacaaggtctggaatggattggatacataatcctagcagtgctta	Diqmtqspmsasvkd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg teftltisslqpedfat yycqhqieypwtfgqgt kveikrgggsgggsgsg gggsqvqlvqsgaevkk pgasvkvsckasgytft dymhwvrqapqglew mgyfnpyndytryaqkf qgrvtmtrdtsistaym elsslrddtavyyicar sdgyydamdywgqgttv tvsssepkssdkthtcp pcpapeaagapsvflfp pkpkdtlmsrtpevtc vvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhq wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlpssrdeltknqv sltlvkgfypsdiave wesngqpennyktpvp ldsdsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslsispss lntgtqmaghspsnsqvq lvesgggvvqgrslrl sckasgytfrstnhwv rqapqglewigyins saytnynqkfkdrftis adkskstafmqmdslrp	配列番号81 (配列番号82)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	tactaattacaatcagaaattcaaggacaggttcacaatcagcgagaca aatccaagagcacagccttctgcagatggacagcctgagggccgaggac accggcgtctatttctgtgcacggcccaagtcactatgattacaacgg gtttccttactggggccaagggaactcccgctactgtctctagcggtggcg gagggtctgggggtggcggaatccggaggtggtggtctgcacaagacatc cagatgaccagctctccaagcagcctgtctgcaagcgtgggggacagggt caccatgacctgcagtccagctcaagttaagttacatgaactggtacc agcagaagccgggcaaggcccccagaaagattgactcatccaaa ctggcttctggagtcctgtctgcttgcagtgagtggtctgggaccga ctataccctcacaatcagcagcctgcagccgaagatttcgcaacttatt actgccagcagtgagtcgtaacccacccacgttcggaggggggaccaag ctacaaattacatcctccagctaa	edtgvyfcarpqvhydy ngfpywgqgtpvtvssg ggsgggsgggsgsaqd iqmtqspsslsasvdr vtmtcsasssvsymnwy qqkpgkapkriwydssk lasgvparfsgsgsgtd ytltisslqpedfatyy cqqwsrnpptfgggtkl qitsss	
ヒ ト 化 TSC252SCORP ION(huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-DRA 222 scFv,H91 リンカーを 有する)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctctgctactctggtcccaga taccaccggtgatattccagatgaccagctctccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgcggggcagtaagagcattagc aaatatttagcctggtttcagcagaaccagggaagtccctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagt gcagtggtatcgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaataccctggac gttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacaggtggcgagggtctg gggggtggcgatccggaggtggtggtctcaggtccagctggtacagtct ggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaggtctctgcaaggc ttctggatacacatttactgactactacatgcacgggtgcacaggccc ctggacaagggttgagtggtggtatatttaacctataatgattat actagatacgcacagaagtccagggcagagtcaccatgaccagggaac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cggccgtgtattactgtgcaagatcggtggttactacgatgctatggac tactggggtcaaggaaccacagtcaccgtctcctcagtgagcccaaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagttctctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatg atctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga agaccctgaggtcaagtccaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgggaggagcagtaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgtg	Diqmtqspmsasvgr rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsfgsgsg teftltisslqpedfat yycqqhieypwtfgqgt kveikrgggsgggsgsg gggsqvlvqsgaevkk pgasvkvsckasgytft dymhwvrqapggglew mgfyfnpndytryaqkf qgrvtmtrdtsistaym elsslrddtavyyicar sdgyydamdywgqgttv tvsssepkssdkthtcp pcpapeaagapsvflfp pkpkdtlmsrtpevtc vvvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp apiektiiskagqprep	配列番号 83 (配列番号 84)

10

20

30

40

10
20
30
40

10
20
30
40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	cacccacgttcggaggggggaccaagctacaaattacatcctccagctaa		
ヒト化 TSC296SCORP ION(huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-DRA 222 scFv,H94 リンカーを 有する)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctcctgctactctggctccaga taccaccggtgatatccagatgacccagctccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcgagtaagagcattagc aaalatitlagcctgggttccagcagaaccagggaagttcctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagtg gcagtggtatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaataccgtggac gttcggccaagggaaccaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctg gggtggcggatccggaggtggtggtctcaggtccagctggtacagtct ggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaggctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcgacaggccc ctggacaagggttgagtggaaggatatttaaccttataatgattat actagatagcacagaagttccagggcagagtcaccatgaccagggaac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cggcctgtattactgtgcaagatcggatggttactacgatgctatggac tactgggtcaaggaaccacagtcaccgtctcctcagtgagcccaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagcttctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatg atctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtagctgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtcata atgccaagacaaagccggggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtg gtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgtg cgctgctgggtctccaacaaagcctccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaaggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc ccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggc agccggagagaacaactacaagaccacgcctcccgctgctggactccgacggc tcttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctcgtgatgcatgaggctctgcacaaccact acacgcagaagacgtctccctgtctccgggttctggtggaggcggttca ggcggaggtggtccggcgtggcgatcgccgaattctcaggtccagct ggtggagctcggggcgagtggtgcagcctggcggtcactgaggtgt cctgcaaggcttctggctacaccttactagatctacgatgcactgggta	diqmtqspmsasvvd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsqsgsg teftltisslqpedfat yycqqhieypwtfggt kveikrgggsgggsgsg gggsqvlvqsgaevkk pgasvkvsckasgytft dymhvwrrqapqglew mgyfnpyndytryaqkf qgrvtmtrdtsistaym elsslrddtavvyicar sdgydamdywgqgttv tvsssepksdkthtcp pcpapeaagapsvflfp pkpkdtlmisrtpetv vvvdvshdepvknwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvvtlppsrdeltknqv sltlvkgfypsdiave wesngqpennyktpvp ldsdsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslslspgsg ggsgggsgggsgspns qvqlvesgggvvqpgrs lrlsckasgytfrstm hvwrrqapqglewiyi npssaytnynqfkdrf	配列番号 159 (配列番号 160)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	aggcaggcccttgacaaggtctggaatggattggatacattaatcctag cagtgtctataactaattacaatcagaattcaaggacaggttcacaatca gcgcagacaaatccaagagcacagccttcctgcagatggacagcctgagg cccgaggacaccggcgtctatttctgtgcacggcccaagtcactatga ttacaacgggtttccttactggggccaagggaactccgtcactgtctcta gcggtggcggagggtctgggggtggcggtccggagtggtggctctgca caagacatccagatgacccagctccaagcagcctgtctgcaagcgtggg ggacagggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatga actggtaccagcagaagccgggcaaggcccccagagatggatttatgac tcatccaaactggcttctggagtcctgtcgttcagtggcagtggtgct tgggaccgactataccctcacaatcagcagcctgcagcccggaagatttcg ccacttattactgccagcagtgagtcgtaaccaccccaagttcggaggg gggaccaagctacaaattacatcctccagctaa	tisadkskstaflqmds lrpdtgvyfcarpqvh ydyngfpywgqgtpvtv ssgggsgggsgggsgs aqdiqmtqspsslsasv gdrvtmtcsassvsym nwyqkpgkapkrwiyd ssklasgvparfsgsgs gtdytlitisslqpedfa tyycqwsrnpptfggg tkltitsss	
ヒ ト 化 TSC301SCORP ION(huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-DRA 222 scFv、 HI05 リンカ ーを有する)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctcctgctactctggctccaga taccaccggtgatattccagatgacccagctctccatccgcatgtctgat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcgagtaagagcattagc aaatatttagcctggtttcagcagaaaccagggaagtctcctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcagggtcccatctcggttcagtgc gcagtggtctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaataccgtggac gttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaggtggcgagggtctg ggggtggcggtaccggaggtgggtgctctcaggtccagctggtacagctct ggggctgaggtgaagaagcctggggttcagtgaaaggtctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcgacaggccc ctggacaagggttgagtggtgggatattttaatccttataatgattat actagatacgacagaagttccagggcagagtcaccatgaccaggacac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cgccgtgtattactgtgcaagatcggttggttactacgatgctatggac tactgggtcaaggaaccacagtcaccgtctcctcgagtggcccaaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagcttctcttccccccaaaaccaaggacaccctcatg atctcccgaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacga agaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcata atgccaagacaaagccgggaggagcagtaacaacagcacgtaccgtgtg	Diqmtqspamsasvvd rvtitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg tefltitisslqpedfat yycqchieypwtfqggt kveikrgggsgggsgsg gggsgvqlvqsgaevkk pgasvkvsckasgytft dymhwrqapggglew mgyfnpyndytryaqkf qgrvtmrtdtsistaym elsslrddtavyyicar sdgyydamdywgqgttv tvsssepksdkthtcp pcpeapeagapsvflfp pkpkdtlmsrtpevtc vvdvshedpevkfnwy vdgvevhnaktkpreeq ynstyrvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp	配列番号 161 (配列番号 162)

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	gtcagcgctcctcacgctcctgcaccaggactggctgaatggcaaggcgta cgcggtgcgggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccc ccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctgggt caaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggc tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagccctctccctgctccgggttctggtggaggcggttca ggcggaggtggctccggcggtggcggatcgaggtccagctggtggagt tggggcgagggtggtgcagcctggcggtcactgaggtgctcctgcaagg cttctggctacacctttactagatctacgatgcactgggtaaggcaggcc cctggacaaggtctggaatggattggatacattaatcctagcagtgcctta tactaattacaatcagaattcaaggacaggttcacaalcagcgcagaca aatccaagagcacagccttctgcagatggacagcctgaggcccgaggac accggcgctctatttctgtgcacggcccaagtcactatgattacaacgg gtttcttactggggccaagggactcccgctactgtctctagcgggtggcg gagggtcgggggtggcggatccggaggtggtggctctgcacaagacatc cagatgaccaggtctccaagcagctgtctgcaagcgtgggggacagggt caccatgacctgcagtgccagctcaagtgttaagtacatgaactggtacc agcagaagccgggcaaggcccccaaataggatttatgactcatccaaa ctggcttctggagtcctctgctcgttcagtggcagtggtctgggaccga ctataccctcacaatcagcagcctgcagcccgaagatttcgccacttatt actgccagcagtgagtcgtaaccaccacagttcggaggggggaccaag ctacaattacatcctccagctaa	apiektiskakgqprep qvytlppsrdeltknqv sltclvkgfypsdiave wesngqpennyktppv ldsdgsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lhnhytqkslspsgsg ggsgggsgsgsgsqvq lvesgggvqpgrslrl sckasgytfrstmhv rqapqglewigvinps saytnynqkfkdrftis adkskstafldmslrp edtgvyfcarpqvhydy ngfpywgqtpvtvssg ggsgggsgsgsgsaqd iqmtqspsslssavgdr vtmtcsasssvsymnwy qqkpgkapkrwiydssk lasgvparfsgsgsgtd ytltisslqpedfatyy cqqswnpptfgggtkl qitsss	
ヒ ト 化 TSC302SCORP ION (huVL-VH #2 107-1A4 scFv-Fc-DRA 222 scFv、 HI06 リンカ ーを有する)	atggaagcaccagcgcagcttctcttctcctctgctactctggtccaga taccaccggtgatattccagatgaccagctctccatccgccatgtctgcat ctgtaggagacagagtcaccatcacttgcggggcgagtaagagcattagc aaatatattagcctggtttcagcagaaccagggaagtctctaagctccg catccattctggatctactttgcaatcaggggtcccatctcggttcagt gcagtggatctgggacagaatttactctcaccatcagcagcctgcagcct gaagattttgcaacttattactgtcaacagcatattgaataccgtggac gttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaggtggcggagggtctg gggtggcggatccggaggtggtggctctcaggtccagctggtacagtct	diqmtqspmsasvgsd rvitcrasksiskyla wfqqkpgkvpklrihsg stlqsgvpsrfsrgsgsg teftltisslqpedfat yycqqhieypwtfgggt kveikrgggsgggsgsg ggsgsqvlvqsgaevkk pgasvkvscasgytft	配列番号 163 (配列番号 164)

10

20

30

40

名称	スクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	ggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaggctctcctgcaaggc ttctggatacacattcactgactactacatgcactgggtgcgacaggccc ctggacaagggcttgagtggaaggatattttaatccttataatgattat actagatacgcacagaagtccaggggcagagtcaccatgaccaggggacac gtctatcagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgacgaca cggccgtgtattactgtgcaagatcggatgggtactacgatgctatggac tactggggtcaaggaaccacagtcacogtctcctcgagtgaagccaaatc ttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgg gtgcaccgtcagttctctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatg atctcccgagcccctgaggtcacatgcgtgggtggaggagtgagccacga agaccctlgaggtcaagtlcaactggtagcggcgtggaggtgcata atgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtg gtgagcgtctcaccgtctcgtcaccaggactggctgaatggcaaggcgta cgcgtgcgggtctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaacca tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcc ccatcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggt caaaggttctatccaagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggc agccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggaactccgacggc tccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagca ggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgcacaaccact acacgcagaagagcctctccctgtctccgggtcagaggcacaacaattct tccctgaatacaggaactcagatggcaggtcattctcaggtccagctggt ggagctctggggcgagtggtgcagcctgggcggtcactgaggtgtcct gcaaggtctctggtacaccttactagatctacgatgcactgggtaagg caggccctggacaaggtctggaatggattggatacatataatcctagcag tgcttatactaattacaatcagaaattcaaggacaggttcacaatcagcg cagacaaatccaagagcacagccttctgcagatggacagcctgaggccc gaggacaccggcgtctatttctgtgcacggccccaagtccactatgatta caacgggttctcttactggggccaagggaactcccgtcactgtctctagcg gtggcggagggtctgggggtggcggatccggagggtgggtgctctgcaca gacatccagatgaccagctctccaagcagcctgtctgcaagcgtggggga cagggtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgtaagttacatgaact ggtaccagcagaagccgggcaaggcccccaaaagatggatttatgactca tccaactggcttctggagtcctgtcgtctcagtggcagtggtgtggtg	dyymhwvrqapggglew mgyfnpyndytryaqkf qgrvmttrdtsistaym elsslrddtavvyicar sdgyydamdywggttv tvsssepksdkthtep pcpapcaagapsvflfp pkpkdtlmi srtpvctc vvdvshdedpevkfnwy vdgevehnaktkpreeq ynstyrvvsvltvlhqd wlngkayacavsnkalp apiektiskakgqprep qvytlppsrdeitknqv sltclvkgyfypsdiave wesngqpennykttppv ldsdgsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhea lnhhytqkslsispqqr hnnsslntgtqmaghsq vqlvesgggvvqgrsl rlsckasgytfttrsmh wvrqapggglewigyin pssaytnynqkfkdrrft isadkskstafmqmndsl rpedtgyvfcarpqvhy dyngfpywggtptvts sgggsgggsgggsgsa qdiqmtqspsslsasvg drvtmtcsasssvsymn wyqqkpgkapkriwyds sklasgvparfsgsgsg tdytltisslqpedefat yycqqswnpftfgggt	

10

20

30

40

名称	ヌクレオチド配列	アミノ酸配列	配列番号 (アミノ酸)
	gaccgactataccctcacaatcagcagcctgcagccgaagatttcgcca cttattactgccagcagtgaggctgtaacccacccacgttcggagggggg accaagctacaaattacatcctccagctaa	klqitsss	

実施例 2

【0217】

10

ヘテロ二量体分子

PCT国際出願／米国特許第2010／62436号およびPCT／米国特許第2010／62404号に一般に開示のようにインターセプター足場を用いてPSMA特異的インターセプター分子を作製した。簡単に述べると、一方のポリペプチド鎖は免疫グロブリンCH1ヘテロ二量体化ドメインを含み、他方のポリペプチド鎖は免疫グロブリンCLヘテロ二量体化ドメインを含む2つの異なるポリペプチド鎖を共発現させることによってPSMA特異的ポリペプチドヘテロ二量体を作製した。トランスフェクション前日、HEK293細胞をGIBCO（商標登録）FreeStyle（商標）293発現培地（Invitrogen）中、細胞濃度 0.5×10^6 細胞/mlで懸濁した。大きなトランスフェクションにおいて250ml細胞を用い、小さなトランスフェクションにおいて60ml細胞を用いた。トランスフェクション当日、320μlの293fectin（商標）トランスフェクション試薬（Invitrogen）を8mLの培地と混合した。同時に、各単鎖ポリペプチドの250μgのDNAを8mL培地と混合して、5分間インキュベートした。インキュベート15分後、DNA-293fectin混合物を250mLの293細胞に添加し、37℃の振盪機に戻し、速度120RPMで攪拌した。60mL細胞を使用する小さなトランスフェクションにおいて、第4DNA、293fectin、および培地を用いた。

20

【0218】

タンパク質A親和性クロマトグラフィー用いてタンパク質を純化した。2mlの充てんしたタンパク質Aアガロース（Repligen）をEcono-Column（商標登録）クロマトグラフィーカラム、サイズ2.5×10cm（Bio-Rad Laboratories）に加え、PBS（10倍カラム容積）で広範に洗浄し、上清を負荷して、PBSで再洗浄し、3カラム容積のPierce IgG溶出緩衝液で溶出した。タンパク質を次いで、PBSに対して広範に透析した。タンパク質を次いで、Amicon（商標登録）Centricon（商標登録）遠心濾過機（Millipore Corp.）を用いて最終容積約0.5mlに濃縮した。

30

【0219】

XCell SureLock（商標）ミニ細胞電気泳動系（Invitrogen）を用いて精製したタンパク質を、10%SDS-PAGEゲル上で分析した。

【0220】

40

二価ポリペプチドヘテロ二量体TSC122を、単鎖ポリペプチドTSC084およびTSC093を共発現させることによって作製した。単鎖ポリペプチドTSC084は、そのアミノからカルボキシル末端で：マウス107-1A4（抗PSMA）VL-VH scFv、ヒトIgG1 SCC-Pヒンジ、ヒトIgG1 CH2、ヒトIgG1 CH3、およびヒトCH1を含む。TSC084のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号44および46で表される。単鎖ポリペプチドTSC093は、そのアミノからカルボキシル末端で：Cr17（抗CD3）scFv、ヒトIgG1 SCC-Pヒンジ、ヒトIgG1 CH2、ヒトIgG1 CH3、およびヒトCκ（YAE）（すなわち、第一Argまたは最終Cysはないが、N30Y、V55A、およびT70E置換基を有するヒトCκ）を含む。TSC093のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、

50

それぞれ配列番号 45 および 47 で表される。

【0221】

二価ポリペプチドヘテロ二量体 TSC200 を、ポリペプチド鎖 TSC192 および TSC125 を共発現させることによって作製した。TSC192 は、そのアミノからカルボキシル末端で：ヒト化 107-1A4（抗 PSMA）VL-VH#2 scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト Cκ（YAE）を含む。TSC192 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 53 および 58 で表される。TSC125 は、そのアミノからカルボキシル末端で：Criss7（抗 CD3）scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト CH1 を含む。TSC125 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 52 および 57 で表される。

10

【0222】

二価ポリペプチドヘテロ二量体 TSC202 を、ポリペプチド鎖 TSC193 および TSC125 を共発現させることによって作製した。TSC193 は、そのアミノからカルボキシル末端で：ヒト化 107-1A4（抗 PSMA）VL-VH#1 scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト Cκ（YAE）を含む。TSC193 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 54 および 59 で表される。TSC125 は、そのアミノからカルボキシル末端で：Criss7（抗 CD3）scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト CH1 を含む。TSC125 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 52 および 57 で表される。

20

【0223】

二価ポリペプチドヘテロ二量体 TSC204 を、ポリペプチド鎖 TSC195 および TSC093 を共発現させることによって作製した。TSC195 は、そのアミノからカルボキシル末端で：ヒト化 107-1A4（抗 PSMA）VL-VH#2 scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト CH1 を含む。TSC195 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 55 および 60 で表される。TSC093 は、そのアミノからカルボキシル末端で：Criss7（抗 CD3）scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト Cκ（YAE）を含む。TSC093 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 45 および 47 で表される。

30

【0224】

二価ポリペプチドヘテロ二量体 TSC205 を、ポリペプチド鎖 TSC196 および TSC093 を共発現させることによって作製した。TSC196 は、そのアミノからカルボキシル末端で：ヒト化 107-1A4（抗 PSMA）VL-VH#1 scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト CH1 を含む。TSC196 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 56 および 61 で表される。TSC093 は、そのアミノからカルボキシル末端で：Criss7（抗 CD3）scFv、ヒト IgG1 SCC-P ヒンジ、ヒト IgG1 CH2、ヒト IgG1 CH3、およびヒト Cκ（YAE）を含む。TSC093 のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 45 および 47 で表される。

40

実施例 3

【0225】

SCORPION 分子構築

標準的な分子生物学技術を用いて、鋳型として既存の SCORPION 足場で開始し、例えば、PCT 出願 WO2007/146968 号、米国特許出願第 2006/0051844 号、PCT 出願 WO2010/040105 号、PCT 出願 WO2010/003108 号、および米国特許第 7,166,707 号に一般に開示された方法を用いて、PSMA 特異的 SCORPION 分子（TSC194（配列番号 48（核酸）、配列番号 49（アミノ酸）；TSC199（配列番号 50（核酸）、配列番号 51（アミノ酸））；

50

T S C 2 1 2（配列番号 7 3（核酸）、配列番号 7 4（アミノ酸））；T S C 2 1 3（配列番号 7 5（核酸）、配列番号 7 6（アミノ酸））；T S C 2 4 9（配列番号 7 7（核酸）、配列番号 7 8（アミノ酸））；T S C 2 5 0（配列番号 7 9（核酸）、配列番号 8 0（アミノ酸））；T S C 2 5 1（配列番号 8 1（核酸）、配列番号 8 2（アミノ酸））、ならびに T S C 2 5 2（配列番号 8 3（核酸）、配列番号 8 4（アミノ酸）））を作製した（表 3 も参照されたい）。N 末端 s c F v 結合ドメインの挿入は、親鋳型の消化ならびに制限酵素 H i n d I I I および X h o I もしくは A g e I および X h o I のいずれかで挿入した s c F v を介して成し遂げ、アガロースゲル精製、および結紮によって所望の断片を同定し、単離した。C 末端 s c F v 結合ドメイン挿入は、親鋳型の消化ならびに制限酵素 E c o R I および N o t I で挿入した s c F v を介して成し遂げ、アガロースゲル精製、および結紮によって所望の断片を同定し、単離した。

実施例 4

【0226】

P S M A（+）および P S M A（-）細胞系に対するキメラおよびヒト化分子の結合

モノクローナル抗体を標準的な手順によってハイブリドーマ細胞培養培地から精製した。本明細書に開示された S M I P、インターセプター、および S C O R P I O N 分子をヒト H E K 2 9 3 細胞の一過性トランスフェクションによって産生し、タンパク質 A 親和性クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。親和性クロマトグラフィー後に凝集が検出された場合、二次サイズ排除クロマトグラフィーも行つてタンパク質の均質性を確実にした。

【0227】

P S M A +（C 4 - 2, W u e t a l., 1994 Int. J. Cancer 57:406-12）および P S M A -（D U - 1 4 5, S t o n e e t a l., 1978, Intl. J. Cancer 21:274-81）前立腺癌細胞系上の結合試験を標準的な F A C S ベースの染色手順によって行った。典型的な実験は、氷上で 100 μ L F A C S 緩衝液（P B S + 2 % 正常なヤギ血清 + 2 % 胎児性ウシ血清 + 0.1 % アジ化ナトリウム）中、300,000 細胞／ウェルを 200 nM ~ 0.1 nM 結合分子でラベル化し、続いて洗浄し、蛍光ラベル二次抗体、ヤギ抗ヒト I g G（I n v i t r o g e n # 11013 = 5 μ g / m l の 1 : 400 希釈）でインキュベートする。細胞の二次抗体を洗浄後、細胞を 7 - アミノアクチノマイシン D（7 - A A D）染色溶液（B D P h a r m i n g e n（商標）cat # 559925）（6 μ L 7 A A D ~ 100 μ L F A C S 緩衝液）で 20 分間インキュベートした。F A C S C a l i b u r（商標）フローサイトメトリー（B D B i o s c i e n c e s）を用いて結合分子シグナルを検出し、F l o w J o フローサイトメトリー分析ソフトウェアによって分析した。7 - A A D + 細胞を分析から除外した。グラフパッドプリズム（商標登録）グラフ化および統計ソフトウェアにおいて E C 50 を決定する非線形回帰分析を行った。

【0228】

結合試験（図 1）を用いて、親 107-1A4 マウス抗体（すなわち、T S C 0 4 5）をキメラ S M I P 分子（T S C 0 8 5、T S C 0 9 2）および二重特異性、キメラインターセプター分子 T S C 1 2 2 と比較した。両キメラ S M I P 分子が P S M A + 細胞に対して親マウス抗体と同等の親和性を示したが、1 つ（V L - V H s c F v 配向の T S C 0 8 5）は細胞表面上で飽和レベルがより低いことが示された。単一の 107-1A4 結合ドメインのみ有する二重特異性、キメラインターセプター分子（T S C 1 2 2）は、P S M A + 細胞に対するより低い結合親和性を示した。P S M A 細胞系 D U - 1 4 5 への非結合においてすべて少ないことが示された。ヒト化 S M I P 分子 T S C 1 8 8 および T S C 1 8 9 の結合試験（図 2 A）によって、親モノクローナル抗体に対する先に決定した親和性と同等の親和性（データは示さない）、同様に高い飽和レベルおよび P S M A - D U - 1 4 5 細胞に勝る P S M A + C 4 - 2 細胞選択性が示された。ヒト化 S C O R P I O N 分子 T S C 1 9 4 および T S C 1 9 9 の結合試験によって、親ヒト化 S M I P 分子 T S C 1 8 8 および T S C 1 8 9 と同等の親和性（図 2 B）、P S M A - D U - 1 4 5 細胞系への

非結合が示された。

実施例 5

【0229】

107-1A4抗体、SMIPおよびインターセプター足場間で見られる差動細胞内在化

内在化試験用の結合タンパク質をCypHer (商標) 5E Mono NHS Ester (GE Healthcare、#PA15401)で製造業者の説明書に従い直接ラベル化した。CypHer 5Eは、低pHで蛍光を発光するpH感受性紅色励起染色であり、典型的にはエンドソームおよびリソソームの内側と衝突する；CypHer 5E蛍光は結果として、細胞内在化の代替物として使用することができる。新規DMSO中で溶解させた染色を、PBS/炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.3 (9:1)中の精製したタンパク質、染色：タンパク質モル比20:1に加えた。暗闇、室温で少なくとも1時間インキュベート後、ラベル化タンパク質を4℃で透析によって未反応染色から分離した。吸光度280nmおよび500nmを用いて、ラベル材料におけるタンパク質および染色濃度を計算した。得られた染色：タンパク質比6~14であり、この値を用いて造影データを正常化した。各分子の凝集値(>5%)が検出可能である場合、タンパク質凝集の存在を確実にすることは内在化データのバイアスにならず、二次サイズ排除クロマトグラフィーを用いて分子を非常に高均質性(>95%)まで純化した。

【0230】

実験2日前、通常の培養培地中でポリ-Dーリジンでコーティングした96ウェルプレート、黒色透明底(BD Biocoat、356640)内の4000細胞/ウェルで細胞をプレート化した。実験中、慎重に培地を変更して表面への細胞付着を維持した。血清不含フェノールレッド不含RPMI培地(Invitrogen、11835)+20mM HEPES (Invitrogen、15630)(PRF-RPMIと呼ばれる)中のヘキスト 33342 (Invitrogen、H3570)で核を1時間染色した。ウェルをPRF-RPMI+10%FBSで洗浄し、100μl温PRF-RPMI+10%FBSを添加した。プレートを氷に5分間移してから、各種希釈したラベル化結合タンパク質を5倍原液から添加して氷上で1時間結合させた。プレートを37℃のCO₂インキュベーターに60分間移して内在化させて進行させた。造影前、培地をPRF-RPMI+1%FBSと交換した。

【0231】

IN Cell分析器1000自己細胞および亜細胞画像系(GE Healthcare)上でウェルをスキャンし、内在化タンパク質を定量し、データを各ウェル中の8フィールドから収集した。ヘキストおよびCypHer 5Eに設置された適切なフィルターならびに明視野画像でデータを収集するため、取得プロトコルを設定した。各核を包囲し、それらの領域を測定する細胞質ゾーン内で蛍光顆粒を検出するために開発されたプロトコルを用いて、データをIN Cell Investigatorソフトウェアによって分析した。検出した総小粒領域を正常化して、染色置換/ラベル化タンパク質の相対的レベルを補填した。

【0232】

親107-1A4マウス抗体、またはキメラSMIPおよびインターセプター分子を用いた内在化実験によって、PSMA-DU-145細胞系に内在化は示されなかったが(データは示さない)、一部の内在化はPSMA+LNCaP(CRL-1740(商標)、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション)またはC4-2細胞系上に検出できた(図3)。親抗体の内在化は、試験したすべての濃度でSMIPまたはインターセプター分子より高かった。(一価)インターセプター分子からの明らかな内在化は、(二価)SMIP分子からより高かった。これは高い潜在的結合化学量論に起因する可能性がある。各インターセプター分子はPSMAの1分子のみに関与することができ、各SMIP分子はPSMAの2分子に関与することができ、細胞表面上に蓄積するインターセプター分子は潜在的に2倍となる。インターセプター分子とSMIP分子の両内在化値が類似する

場合、常にインターセプター分子からより高い明らかなシグナルが見える。

実施例 6

【0233】

P S M A (+) 細胞系に対する再指向 T 細胞の細胞傷害

標準的なフィコール勾配を用いて、(A G または V V としてラベルした) 2 つの異なるドナー由来のヒト血液から末梢血単核細胞 (P B M C) を単離した。単離細胞を緩衝生理食塩水中で洗浄した。M i l t e n y i B i o t e c (B e r g i s c h G l a d b a c h, G e r m a n y) 製 P a n T 細胞単離キット I I を製造業者のプロトコルを用いて使用し、T 細胞をさらに単離した。別段の記載のない限り、図 (図 4 ~ 6 参照) に記したように、刺激したまたは刺激しない T 細胞を用い、10 : 1 比 (T 細胞 : 標的細胞) で添加した。

10

【0234】

それらを T 細胞から区別するために、製造業者のプロトコルに従って C 4 - 2 去勢抵抗性前立腺癌 (C R P C) 細胞を C e l l T r a c k e r (商標) G r e e n 細胞質染色 (I n v i t r o g e n, C 7 0 2 5) でラベルした。T 細胞およびインターセプター分子を添加する前日、実施例 3 に使用されるように、標準的な増殖培地中 8000 細胞 / ウェルで、ラベル化 C 4 - 2 細胞をポリ-D-リジンでコーティングした 96 ウェルプレート内に播種した。10 μ L の濃縮二重特異性インターセプター分子 (T S C 1 2 2、T S C 2 0 0、T S C 2 0 2、または T S C 2 0 4) を標準的な増殖培地中 100 μ l 培地 / ウェル + 50 μ L T 細胞 (80,000 細胞) に加えた。細胞培養を C O ₂ インキュベーター内で 37 $^{\circ}$ C で一晩保持した。インターセプター分子への曝露 24 時間後、細胞を 7 - A A D およびヘキスト染色で染色して死細胞の定量を可能にした。培地は 100 μ l R P M I + 1 % F B S + 10 μ g / m l 7 - A A D + ヘキスト、1 : 1000 希釈ストックに変更し、さらに 30 分間インキュベートした。

20

【0235】

10 フィールド / ウェルからデータを収集する I n C e l l 分析顕微鏡 (G E) を用いて造影および定量を行った。a) ヘキスト染色を介した核検出、b) C e l l T r a c k e r (商標) G r e e n 検出を介した細胞種識別、c) 7 - A A D 染色を介した生 / 死細胞状態決定のために設置された適切なフィルターならびに明視野画像でデータを収集するため、取得プロトコルを設定した。I n C e l l W o r k s t a t i o n ソフトウェアによって決定木適応を用いて定量を行った。ヘキスト核染色の存在により各細胞を検出した。グリーンチャンネル (C e l l T r a c k e r (商標) G r e e n) 中のシグナル閾値を用いて、細胞を C 4 - 2 (正) と T 細胞 (負) 集団に分けた。レッドチャンネル (7 - A A D) 中のシグナル閾値を用いて、細胞を死細胞 (正) と生細胞 (負) 集団に分けた。

30

【0236】

107-1A4 マウス s c F v またはヒト化 107-1A4 s c F v のいずれかならびに抗 C D 3 s c F v (C r i s 7) を特徴とする二重特異性インターセプター分子の T 細胞を標的 P S M A + 腫瘍細胞に交差して標的依存性細胞傷害 T 細胞反応 (いわゆる「再指向 T 細胞の細胞傷害」、または R T C C) を可能にする能力を試験した。2 つの異なるドナー由来の T 細胞を有するキメラ T S C 1 2 2 インターセプター分子 (図 4) で強力な標的依存性細胞傷害活性が 24 時間に渡り観察された ; 100 p M ほどの少ない T S C 1 2 2 インターセプター分子を用いた治療によって約 60 % の標的細胞を溶解させた。エフェクター T 細胞の不在下の P S M A + 細胞上で、直接的な細胞傷害は観察されなかった (図 4) ; 同様に、エフェクター T 細胞の存在下の P S M A 細胞上で、細胞傷害は観察されなかった (データは示さない)。親キメラインターセプター分子 (T S C 1 2 2) と共にヒト化インターセプター分子 (T S C 2 0 0、T S C 2 0 2、および T S C 2 0 4) の細胞傷害活性も試験した (図 5)。ヒト化インターセプター分子の 2 つ (T S C 2 0 0、T S C 2 0 4) の R T C C 活性は親より低いことが示された ; ヒト化インターセプター分子の 1 つ (T S C 2 0 2) の R T C C 活性は親キメラインターセプター分子 (T S C 1 2 2) と等しく、類似した低い p M 効力を有することが示された。これらの結果は、あるヒ

40

50

ト化インターセプター分子は親キメラインターセプター分子と類似のT細胞の細胞傷害を有することを示した。

【0237】

キメラインターセプター分子TSC122の活性と比較したヒト化SCORPION分子(TSC194、TSC199、TSC212、TSC213)の細胞傷害活性も検討した(図6)。VL-VH配向の抗PSMA scFvを有するヒト化SCORPION分子(TSC194、TSC199)は、二重特異性キメラインターセプター分子(同様にVL-VH配向のscFvを有し、抗CD3 scFv(Cris7)も含む)と同等の細胞傷害活性を有した。一方、VH-VL配向の抗PSMA scFvを有するヒト化SCORPION分子の全体の細胞傷害はより低かった。

実施例7

【0238】

二重特異性107-1A4由来分子に導かれたPSMA+細胞系に対して誘発された標的依存性T細胞活性化および増殖

標的依存性T細胞活性化および増殖誘発時に異なる二重特異性ポリペプチド分子効果を比較するため、TSC122(キメラインターセプター分子)、TSC202(ヒト化インターセプター分子)、TSC194(ヒト化SCORPION分子)、およびTSC199(ヒト化SCORPION分子)を含む4つの異なる抗PSMAおよび抗CD3二重特異性分子を比較した。

【0239】

提供されるプロトコルにより、C4-2前立腺癌細胞(PSMA+)をMDアンダーソン癌センター(Houston, TX)から得て培養した。標準的なフィコール勾配を用いて、末梢血単核細胞(PBMC)をヒト血液から単離した。単離細胞を緩衝生理食塩水中で洗浄した。Miltenyi Biotec(Bergisch Gladbach, Germany)製Pan T細胞単離キットIIを製造業者のプロトコルを用いて使用し、T細胞をさらに単離した。

【0240】

カルボキシフルオレセインジアセタートスクシンイミジルエステル(CFSE)を用いた単離されたT細胞集団のラベル化によって増殖を評価した。U底96ウェルプレート内でそれぞれ100,000細胞/ウェル、30,000 C4-2腫瘍細胞/ウェルでCFSEラベル化T細胞をプレート化し、T細胞対腫瘍細胞比約3:1に達した。試験分子濃度10nM~0.1pMを10%ヒトまたはウシ血清、ピルビン酸ナトリウムおよび非必須アミノ酸で補充されたRPMI 1640培地中総200μl/ウェル中の細胞混合物に添加した。プレートを加湿インキュベーター内で37℃、5%CO₂でインキュベートした。3日後、フローサイトメトリー分析用に細胞を抗体でラベルした。細胞をラベル化し、それらの元のプレート内で洗浄して移動中の細胞損失を最小限に抑え、0.2%ウシ血清アルブミンを有する緩衝生理食塩水中ですべてのラベル化を行った。まず、細胞を100μg/mlヒトIgGで、室温で15分間、前インキュベートした。続いて、細胞を次の染色ラベル抗体:CD5-PE、CD4-APC、CD8-パシフィックブルー、CD25-PE-Cy7、ならびに7-アミノアクチノマイシンD(以後、7AAD)の混合物(総容積50μl)で40分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、80~120μl容積中で再懸濁し、BD LSRIIフローサイトメトリー中で迅速に測定して各ウェルの中味80%を得た。活性化した生CD4+またはCD8+T細胞(それぞれ7AAD-、CD5+CD25+CD4+または7AAD-CD5+CD25+CD8+)上の連続ゲーティングにより、それらのCFSEプロファイルによって、FlowJoソフトウェアを用いて試料ファイルを分析し、少なくとも1つの細胞分裂で細胞の割合および数を計算した。マイクロソフトエクセルソフトウェアを用いて平均値および標準偏差を計数した。マイクロソフトエクセルまたはグラフパッドプリズムを用いてグラフをプロットした。

【0241】

T細胞で処理したC4-2細胞を有するウェルからの生CD4+およびCD8+集団の分析(図7Aおよび図7B)は、標的PSMA抗原を示すC4-2細胞存在下で総細胞数および増殖細胞パーセントの両方の有意な上昇を示した。増殖はCD4+T細胞においてCD8+T細胞よりわずかに高く、インターセプター分子TSC122およびTSC202により誘発された増殖は、SCORPION分子TSC194およびTSC199により誘発された反応より高レベルで飽和した。全分子が低濃度(100 pM)でT細胞増殖の誘発を示した。分子間にCD4+対CD8+細胞増殖の相対的誘発の明らかな有意差はなかった。

実施例 8

【0242】

抗PSMA分子の競合結合試験は107-1A4がPSMA上の独特なエピトープに結合することを確認する

共通の文献抗体(J415、J591)によって認識されないPSMA上で、抗PSMAマウスモノクローナル抗体107-1A4、キメラ107-1A4 SMIP分子(TSC085)およびヒト化107-1A4 SMIP分子(TSC189)が独特なエピトープに結合し、マウスモノクローナル抗体107-1A4のSMIP形態への変換によってその結合エピトープ中でシフトしなかったことを示すため、競合結合試験を実施した。J591、Hu591(ヒト化版J591)を産生するハイブリドーマおよびJ415抗体をTCCから得た。モノクローナル抗体を標準的な手順によってハイブリドーマ細胞培養培地から精製した。SMIP分子をヒト293細胞の一過性トランスフェクションによって産生し、タンパク質A親和性クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。親和性クロマトグラフィー後に凝集が検出された場合、二次サイズ排除クロマトグラフィーも行ってタンパク質の均質性を確実にした。

【0243】

PSMA+C4-2前立腺癌細胞系上の競合結合試験を標準的なFACSベースの染色手順によって行った。結合測定を簡略化するため、マウスFcドメインを有する分子に対する競合にヒトFcドメインを有する分子を用いて、抗ヒト抗体または抗マウス抗体のいずれかを用いて標的細胞系への結合を検出した。

【0244】

典型的な実験では、分子X(結合剤)を分子Y(競合物)と混合し、氷上に置き、次いで、氷上で4 nM分子Xおよび100 μL FACS緩衝液(PBS+2%正常なヤギ血清+2%胎児性ウシ血清+0.1%アジ化ナトリウム)中250 nM~0.4 nM分子Yで300,000細胞/ウェルのラベル化に用い、続いて洗浄し、分子Xに特異性の蛍光ラベル二次抗体、ヤギ抗ヒトIgG(Invitrogen 11013=5 μg/mlの1:400希釈)またはヤギ抗マウスIgG(Invitrogen 11017の1:400希釈)のいずれかでインキュベートした。細胞の二次抗体を洗浄後、細胞を7AAD(6 μL BD Pharmingen 7AAD, cat#559925)~100 μL FACS緩衝液)で20分間インキュベートした。FACS Caliburフローサイトメトリーを用いて結合分子シグナルを検出し、FlowJoによって分析した。7AAD+細胞を分析から除外した。グラフパッドプリズムにおいてEC50を決定する非線形回帰分析を行った。

【0245】

競合結合試験(図8A)を用いて、ヒト化J591抗体、Hu591が107-1A4、J591またはJ415マウス抗体と細胞結合において競合し得るかどうかを見た。107-1A4の結合において競合は観察されず、非競合エピトープに結合することを示唆する;しかしながら、J591およびJ415抗体の両結合においては競合が観察された。次に、追加の結合試験を実施して、3つのマウス抗体がキメラ107-1A4 SMIP分子TSC085と細胞結合において競合し得るかどうかを見た(図8B)。親107-1A4抗体の結合から強い競合が見え、SMIP分子が同一エピトープに結合することが確認された。J591またはJ415マウス抗体から効果的な競合は見えなかった。最

10

20

30

40

50

後に結合試験を実施して、3つのマウス抗体がヒト化107-1A4 SMIP分子TS C189と細胞結合において競合し得るかどうかを見た(図8C)。やはり、親107-1A4抗体の結合から同様の強い競合が見えたが、J591またはJ415マウス抗体から効果的な競合は見えなかった。これは、107-1A4はPSMA上の独特なエピトープに結合することを確認する。これは、107-1A4ベースのSMIPおよび親107-1A4抗体由来のインターセプター分子の行動におけるシフトはいずれも、結合エピトープ中のシフトによるものではないことも示す。

実施例9

【0246】

抗PSMA二重特異性分子を用いたin vivo腫瘍成長の阻害

in vivo腫瘍成長の阻害における本明細書に開示の抗PSMA二重特異性分子(例えば、抗PSMAおよび抗CD3二重特異性分子)の効果を確認するため、抗PSMA二重特異性分子を以下のとおり評価する。

【0247】

皮下腫瘍の腫瘍移植の予防処置、または予防：培養したPSMA発現腫瘍細胞系(LNCaP、LNCaP C4-2、LNCaP C4-2B、VCaP、CWR22Rv1、LAPC4、MDA-PCa-2b、LuCaP23.1、LuCaP58、LuCaP70、LuCaP77等)をヒトリンパ球(ヒト末梢血単核細胞もしくは精製したT細胞のいずれか)と混合して、免疫欠損マウス(SCID、NOD/SCID等)に皮下注射する。抗PSMA二重特異性分子は、注射日および連日数日間静脈内注射する。腫瘍容積によって評価した用量依存性の腫瘍成長阻害から、それぞれの分子は、in vivo PSMA発現腫瘍に対して効果を有することが示される。

【0248】

先に確立された皮下腫瘍の治療的処置、または退行：培養したPSMA発現腫瘍細胞系(LNCaP、LNCaP C4-2、LNCaP C4-2B、VCaP、CWR22Rv1、LAPC4、MDA-PCa-2b、LuCaP23.1AI、LuCaP58、LuCaP70、LuCaP77等)を免疫欠損マウス(SCID、NOD/SCID等)に皮下注射する。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍が確立された増殖徴候(典型的には容積200mm³)を示した時点で試験を開始する。ヒトリンパ球(ヒト末梢血単核細胞もしくは精製したT細胞のいずれか)を注射日に抗PSMA二重特異性分子と共に静脈内注射する。抗PSMA二重特異性分子は、連日数日間注射する。腫瘍容積によって評価した用量依存性の腫瘍成長阻害から、それぞれの分子は、in vivo PSMA発現腫瘍に対して効果を有することが示される。

【0249】

脛骨内腫瘍の腫瘍移植の予防処置、または予防：培養したPSMA発現腫瘍細胞系(LNCaP C4-2、LNCaP C4-2B、VCaP、CWR22Rv1、LAPC4、MDA-PCa-2b、LuCaP23.1、LuCaP58、LuCaP70、LuCaP77等)をヒトリンパ球(ヒト末梢血単核細胞もしくは精製したT細胞のいずれか)と混合して、免疫欠損マウス(SCID、NOD/SCID等)に脛骨内注射する。抗PSMA二重特異性分子は、注射日および連日数日間静脈内注射する。血清生物指標、X線、蛍光造影、体重減少、および他の代替的な腫瘍容積測定によって評価した用量依存性の腫瘍成長阻害から、それぞれの分子は、in vivo PSMA発現腫瘍に対して効果を有することが示される。

【0250】

先に確立された脛骨内腫瘍の治療的処置、または退行：培養したPSMA発現腫瘍細胞系(LNCaP C4-2、LNCaP C4-2B、VCaP、CWR22Rv1、LAPC4、MDA-PCa-2b、LuCaP23.1AI、LuCaP58、LuCaP70、LuCaP77等)を免疫欠損マウス(SCID、NOD/SCID等)に脛骨内注射する。腫瘍成長をモニタリングして、腫瘍が確立された増殖徴候(典型的には容積200mm³)を示した時点で試験を開始する。ヒトリンパ球(ヒト末梢血単核細胞もし

10

20

30

40

50

くは精製したT細胞のいずれか)を注射日に抗PSMA二重特異性分子と共に静脈内注射する。抗PSMA二重特異性分子は、連日数日間注射する。血清生物指標、X線、蛍光造影、体重減少、および他の代替的な腫瘍容積測定によって評価した用量依存性の腫瘍成長阻害から、それぞれの分子は、*in vivo* PSMA発現腫瘍に対して効果を有することが示される。

【0251】

本願は以下の発明をも包含する。

(1)

前立腺特異的膜抗原(PSMA)結合ポリペプチドであり、

アミノ末端からカルボキシル末端側への順でまたはカルボキシル末端からアミノ末端側への順で、

(a) ヒトPSMAと特異的結合するPSMA結合ドメイン、

(b) ヒンジ領域、および

(c) 免疫グロブリン定常領域、

を含む、PSMA結合ポリペプチド。

(2)

PSMA結合ドメインが、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する単鎖Fv(scFv)とヒトPSMA結合において競合する、(1)のPSMA結合ポリペプチド。

(3)

PSMA結合ドメインが、(i) LC DR 1、LC DR 2、およびLC DR 3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域、ならびに(ii) HC DR 1、HC DR 2、およびHC DR 3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、(1)または(2)のPSMA結合ポリペプチド。

(4)

LC DR 3が、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、HC DR 3が、配列番号11で表されるアミノ酸配列を有する、(3)のPSMA結合ポリペプチド。

(5)

LC DR 1およびLC DR 2が、それぞれ配列番号15および配列番号16で表されるアミノ酸配列を有し、HC DR 1およびHC DR 2が、それぞれ配列番号9および配列番号10で表されるアミノ酸配列を有する、(4)のPSMA結合ポリペプチド。

(6)

軽鎖可変および重鎖可変領域の少なくとも1つがヒト化されている、(3)～(5)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(7)

軽鎖可変領域が、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(3)～(6)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(8)

軽鎖可変領域が、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列を含む、(7)のPSMA結合ポリペプチド。

(9)

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(3)～(8)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(10)

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む、(9)のPSMA結合ポリペプチド。

(11)

PSMA結合ドメインがscFvである、(3)～(10)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

10

20

30

40

50

(12)

前記 s c F v が、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 34、または配列番号 35 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、(11) の P S M A 結合ポリペプチド。

(13)

前記 s c F v が、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 34、または配列番号 35 で表されるアミノ酸配列を含む、(12) の P S M A 結合ポリペプチド。

(14)

前記 s c F v の重鎖可変領域が、軽鎖可変領域に対するカルボキシ末端である、(11) の P S M A 結合ポリペプチド。 10

(15)

前記 s c F v が、配列番号 21、配列番号 30、または配列番号 31 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、(14) の P S M A 結合ポリペプチド。

(16)

前記 s c F v が、配列番号 21、配列番号 30、または配列番号 31 で表されるアミノ酸配列を含む、(15) の P S M A 結合ポリペプチド。

(17)

前記 s c F v の軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、(G l y₄ S e r)_n、式中 n = 1 ~ 5 (配列番号 165) を含むアミノ酸配列によって結合している、(11) または (14) の P S M A 結合ポリペプチド。 20

(18)

ヒンジ領域が、免疫グロブリンのヒンジ領域由来である、(1) ~ (17) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(19)

免疫グロブリン定常領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2 または I g D の免疫グロブリン C H 2 および C H 3 ドメインを含む、(1) ~ (18) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(20)

前記ヒンジ領域が、免疫グロブリンのヒンジ領域由来であり、免疫グロブリン定常領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 の免疫グロブリン C H 2 および C H 3 ドメインを含む、(19) の P S M A 結合ポリペプチド。 30

(21)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (A D C C) および補体依存性細胞傷害 (C D C) からなる群から選択される少なくとも 1 つのエフェクター機能を含む、(1) ~ (20) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(22)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 70、または配列番号 72 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、(1) の P S M A 結合ポリペプチド。 40

(23)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 70、または配列番号 72 で表されるアミノ酸配列を含む、(22) の P S M A 結合ポリペプチド。

(24)

(d) 免疫グロブリン定常領域に対する第 2 ヒンジ領域カルボキシ末端、および
(e) 第 2 ヒンジ領域に対する第 2 結合ドメインカルボキシ末端をさらに含む、(1) ~ (23) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(25)

第2ヒンジ領域が、(i) 2型Cレクチンの軸領域または(ii) 免疫グロブリンのヒンジ領域由来である、(24)のPSMA結合ポリペプチド。

(26)

前立腺特異的膜抗原(PSMA)結合ポリペプチドであり、

第1結合ドメインが(i) LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域、ならびに(ii) HCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む；

LCDR3が配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、HCDR3が配列番号11で表されるアミノ酸配列を有するヒトPSMAと特異的結合する第1結合ドメインを含む、PSMA結合ポリペプチド。

10

(27)

LCDR1およびLCDR2が、それぞれ配列番号15および配列番号16で表されるアミノ酸配列を有し、HCDR1およびHCDR2が、それぞれ配列番号9および配列番号10で表されるアミノ酸配列を有する、(26)のPSMA結合ポリペプチド。

(28)

軽鎖可変および重鎖可変領域の少なくとも1つがヒト化されている、(26)または(27)のPSMA結合ポリペプチド。

(29)

軽鎖可変領域が、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列を有する、(27)のPSMA結合ポリペプチド。

20

(30)

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列を有する、(27)または(29)のPSMA結合ポリペプチド。

(31)

第1結合ドメインが単鎖Fv(scFv)である、(26)～(30)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(32)

前記scFvが、配列番号19、配列番号21、配列番号30、配列番号31、配列番号34、または配列番号35で表されるアミノ酸配列を含む、(31)のPSMA結合ポリペプチド。

30

(33)

前記scFvの重鎖可変領域が、軽鎖可変領域に対するカルボキシ末端である、(31)のPSMA結合ポリペプチド。

(34)

前記scFvが、配列番号21、配列番号30、または配列番号31で表されるアミノ酸配列を含む、(33)のPSMA結合ポリペプチド。

(35)

scFvの軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、(Gly₄Ser)_n、式中n=1～5(配列番号165)を含むアミノ酸配列によって結合している、(31)または(33)のPSMA結合ポリペプチド。

40

(36)

前記PSMA結合ポリペプチドが免疫グロブリン定常領域をさらに含む、(26)～(35)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(37)

前記免疫グロブリン定常領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2またはIgDの免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含む、(36)のPSMA結合ポリペプチド。

(38)

前記PSMA結合ポリペプチドが、(i) 2型Cレクチンの軸領域または(ii) 免疫グロブリンのヒンジ領域由来である少なくとも1つのヒンジ領域をさらに含む、(36)

50

の P S M A 結合ポリペプチド。

(3 9)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが第 2 結合ドメインをさらに含む、(2 6) ~ (3 8) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(4 0)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、アミノ末端からカルボキシル末端側への順でまたはカルボキシル末端からアミノ末端側への順で、

- (a) 第 1 結合ドメイン、
- (b) 第 1 ヒンジ領域、
- (c) 免疫グロブリン定常領域、
- (d) 第 2 ヒンジ領域、および
- (e) 第 2 結合ドメイン

を含む、(3 9) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 1)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、アミノ末端からカルボキシル末端側への順で、

- (a) 第 1 結合ドメイン、
- (b) ヒンジ領域、および
- (c) 免疫グロブリン定常領域

を含む、(3 6) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 2)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが

- (d) 免疫グロブリン定常領域に対する第 2 ヒンジ領域カルボキシ末端、および
- (e) 第 2 ヒンジ領域に対する第 2 結合ドメインカルボキシ末端

をさらに含む、(4 1) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 3)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、アミノ末端からカルボキシル末端側への順で、

- (a) 免疫グロブリン定常領域、
- (b) ヒンジ領域、および
- (c) 第 1 結合ドメイン

を含む、(3 6) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 4)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、

- (d) 免疫グロブリン定常領域に対する第 2 ヒンジ領域アミノ末端、および
- (e) 第 2 ヒンジ領域に対する第 2 結合ドメインアミノ末端

を含む、(4 3) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 5)

第 2 結合ドメインが、T 細胞と特異的結合している、(2 4)、(2 5)、(3 9)、(4 0)、(4 2)、および (4 4) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(4 6)

第 2 結合ドメインが、T 細胞受容体 (T C R) 複合体またはその成分と特異的結合している、(4 5) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 7)

第 2 結合ドメインが、C D 3 と特異的結合している、(4 6) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 8)

第 2 結合ドメインが、C D 3 ϵ と特異的結合している、(4 7) の P S M A 結合ポリペプチド。

(4 9)

第 2 結合ドメインが、C R I S - 7 および H u M 2 9 1 からなる群から選択されるモノクローナル抗体と C D 3 ϵ 結合において競合する、(4 8) の P S M A 結合ポリペプチド

10

20

30

40

50

。

(50)

第2結合ドメインが、C R I S-7およびH u M 2 9 1からなる群から選択されるモノクローナル抗体由来である免疫グロブリン軽鎖可変領域および免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、(49)のP S M A結合ポリペプチド。

(51)

第2結合ドメインの軽鎖および重鎖可変領域が、モノクローナル抗体の軽鎖および重鎖C D Rをそれぞれ含むヒト化可変領域である、(50)のP S M A結合ポリペプチド。

(52)

第2結合ドメインの軽鎖および重鎖可変領域が、

10

(a) 配列番号47の残基139~245で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号47の残基1~121で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに

(b) 配列番号78の残基634~740で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号78の残基496~616で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域からなる群から選択される、(50)のP S M A結合ポリペプチド。

(53)

第2結合ドメインの軽鎖および重鎖可変領域が、

20

(a) 配列番号47の残基139~245で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号47の残基1~121で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに

(b) 配列番号78の残基634~740で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号78の残基496~616で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域からなる群から選択される、(50)のP S M A結合ポリペプチド。

(54)

第2結合ドメインがs c F vである、(39)、(40)、(42)、および(44)~(53)のいずれかのP S M A結合ポリペプチド。

(55)

第2結合ドメインが、(i) 配列番号47の残基1~245で表されるアミノ酸配列、および(ii) 配列番号78の残基496~742で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むs c F vである、(50)のP S M A結合ポリペプチド。

30

(56)

第2結合ドメインが、(i) 配列番号47の残基1~245で表されるアミノ酸配列、および(ii) 配列番号78の残基496~742で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、(55)のP S M A結合ポリペプチド。

(57)

前記P S M A結合ポリペプチドが、配列番号49、配列番号51、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号158、配列番号160、配列番号162、または配列番号164で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(54)のP S M A結合ポリペプチド。

40

(58)

前記P S M A結合ポリペプチドが、配列番号49、配列番号51、配列番号74、配列番号76、配列番号78、配列番号80、配列番号82、配列番号84、配列番号158、配列番号160、配列番号162、または配列番号164で表されるアミノ酸配列を含む、(54)のP S M A結合ポリペプチド。

(59)

前記ポリペプチド鎖のそれぞれが、(1)~(58)のいずれか一項のP S M A結合ポリペプチドである、第1および第2ポリペプチド鎖を含む二量体P S M A結合タンパク質

50

。

(60)

アミノ末端からカルボキシル末端側への順で、

(a) ヒトPSMAと特異的結合する結合ドメイン、

(b) ヒンジ領域、

(c) 免疫グロブリン定常領域、および

(d) 免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン

を含む、PSMA結合ポリペプチド。

(61)

結合ドメインが、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する単鎖Fv (scFv) とヒトPSMA結合において競合する、(60)のPSMA結合ポリペプチド。

10

(62)

結合ドメインが、(i) LCDR1、LCDR2、およびLCDR3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域、ならびに(ii)およびHCDR1、HCDR2、およびHCDR3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、(60)または(61)のPSMA結合ポリペプチド。

(63)

LCDR3が、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、HCDR3が、配列番号11で表されるアミノ酸配列を有する、(62)のPSMA結合ポリペプチド。

(64)

LCDR1およびLCDR2が、それぞれ配列番号15および配列番号16で表されるアミノ酸配列を有し、HCDR1およびHCDR2が、それぞれ配列番号9および配列番号10で表されるアミノ酸配列を有する、(63)のPSMA結合ポリペプチド。

20

(65)

軽鎖可変および重鎖可変領域の少なくとも1つがヒト化されている、(62)～(64)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(66)

軽鎖可変領域が、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(62)～(65)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

30

(67)

軽鎖可変領域が、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列を含む、(66)のPSMA結合ポリペプチド。

(68)

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(62)～(67)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(69)

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む、(68)のPSMA結合ポリペプチド。

40

(70)

結合ドメインがscFvである、(62)～(69)のいずれかのPSMA結合ポリペプチド。

(71)

前記scFvが、配列番号19、配列番号21、配列番号30、配列番号31、配列番号34、または配列番号35で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(70)のPSMA結合ポリペプチド。

(72)

前記scFvが、配列番号19、配列番号21、配列番号30、配列番号31、配列番号34、または配列番号35で表されるアミノ酸配列を含む、(71)のPSMA結合ポ

50

リペプチド。

(73)

前記 s c F v の重鎖可変領域が、軽鎖可変領域に対しカルボキシ末端である、(70) の P S M A 結合ポリペプチド。

(74)

前記 s c F v が、配列番号 21、配列番号 30、または配列番号 31 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、(73) の P S M A 結合ポリペプチド。

(75)

s c F v が、配列番号 21、配列番号 30、または配列番号 31 で表されるアミノ酸配列を含む、(74) の P S M A 結合ポリペプチド。 10

(76)

s c F v の軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、(G l y₄ S e r)_n、式中 n = 1 ~ 5 (配列番号 165) を含むアミノ酸配列によって結合している、(70) または (73) の P S M A 結合ポリペプチド。

(77)

免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが、免疫グロブリン C H 1 ドメインまたは免疫グロブリン C L ドメインを含む、(60) ~ (76) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(78)

免疫グロブリン定常領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、もしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリン C H 2 および C H 3 ドメイン；I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g M もしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリン C H 3 ドメイン；または I g E、I g M もしくはそれらの組み合わせの免疫グロブリン C H 3 および C H 4 ドメインを含む、(60) ~ (77) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(79)

ヒンジ領域が、免疫グロブリンのヒンジ領域由来であり、免疫グロブリン定常領域が、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 の免疫グロブリン C H 2 および C H 3 ドメインを含む、(78) の P S M A 結合ポリペプチド。 30

(80)

P S M A 結合ポリペプチドが、抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (A D C C) および補体依存性細胞傷害 (C D C) からなる群から選択される少なくとも 1 つのエフェクター機能を含む、(60) ~ (79) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチド。

(81)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、配列番号 46、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、または配列番号 61 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を含む、(60) の P S M A 結合ポリペプチド。

(82)

前記 P S M A 結合ポリペプチドが、配列番号 46、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 60、または配列番号 61 で表されるアミノ酸配列を含む、(81) の P S M A 結合ポリペプチド。 40

(83)

(1) アミノ末端からカルボキシル末端側への順で、
(a) ヒト P S M A と特異的結合する第 1 結合ドメイン、
(b) 第 1 ヒンジ領域、
(c) 第 1 免疫グロブリン定常領域、および
(d) 第 1 免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン
を含む第 1 ポリペプチド鎖、ならびに

(2) アミノ末端からカルボキシル末端側への順で、

50

(a') 第2ヒンジ領域、

(b') 第2免疫グロブリン定常領域、および

(c') 第1単鎖ポリペプチドの第1免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインと異なる第2免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインを含む第2ポリペプチド鎖

を含むヘテロ二量体P S M A結合タンパク質であり、

第1および第2免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが互いに結合してヘテロ二量体を形成する、ヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(84)

第1結合ドメインが、配列番号21で表されるアミノ酸配列を有する単鎖F_v (s c F_v) とヒトP S M A結合において競合する、(83)のヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(85)

P S M A結合ドメインが、(i) L C D R 1、L C D R 2、およびL C D R 3を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域、ならびに(i i) H C D R 1、H C D R 2、およびH C D R 3を含む免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、(83)または(84)のヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(86)

L C D R 3が、配列番号17で表されるアミノ酸配列を有し、H C D R 3が、配列番号11で表されるアミノ酸配列を有する、(85)のヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(87)

L C D R 1およびL C D R 2が、それぞれ配列番号15および配列番号16で表されるアミノ酸配列を有し、H C D R 1およびH C D R 2が、それぞれ配列番号9および配列番号10で表されるアミノ酸配列を有する、(86)のヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(88)

軽鎖可変および重鎖可変領域の少なくとも1つがヒト化されている、(85)～(87)のいずれかのヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(89)

軽鎖可変領域が、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(85)～(88)のいずれかのヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(90)

軽鎖可変領域が、配列番号5または配列番号23で表されるアミノ酸配列を含む、(89)のヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(91)

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(85)～(90)のいずれかのヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(92)

重鎖可変領域が、配列番号2、配列番号25、または配列番号27で表されるアミノ酸配列を含む、(91)のヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(93)

P S M A結合ドメインがs c F_vである、(85)～(92)のいずれかのヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

(94)

前記s c F_vが、配列番号19、配列番号21、配列番号30、配列番号31、配列番号34、または配列番号35で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む、(93)のヘテロ二量体P S M A結合タンパク質。

10

20

30

40

50

(9 5)

前記 s c F v が、配列番号 1 9、配列番号 2 1、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 4、または配列番号 3 5 で表されるアミノ酸配列を含む、(9 4) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(9 6)

前記 s c F v の重鎖可変領域が、軽鎖可変領域に対しカルボキシ末端である、(9 3) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(9 7)

s c F v が、配列番号 2 1、配列番号 3 0、または配列番号 3 1 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む、(9 6) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

10

(9 8)

s c F v が、配列番号 2 1、配列番号 3 0、または配列番号 3 1 で表されるアミノ酸配列を含む、(9 7) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(9 9)

s c F v の軽鎖可変領域および重鎖可変領域が、(G l y₄ S e r)_n、式中 n = 1 ~ 5 (配列番号 1 6 5) を含むアミノ酸配列によって結合している、(9 3) または (9 6) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(1 0 0)

第 1 免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが、第 1 免疫グロブリン C H 1 ドメインを含み、第 2 免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが、第 1 免疫グロブリン C L ドメインを含み、または

20

第 1 免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが、第 1 免疫グロブリン C L ドメインを含み、第 2 免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインが、第 1 免疫グロブリン C H 1 ドメインを含む、(8 3) ~ (9 9) のいずれかのヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(1 0 1)

第 1 および第 2 免疫グロブリン定常領域の少なくとも 1 つが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、もしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリン C H 2 および C H 3 ドメイン；I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、I g D、I g E、I g M もしくは任意のそれらの組み合わせの免疫グロブリン C H 3 ドメイン；または I g E、I g M もしくはそれらの組み合わせの免疫グロブリン C H 3 および C H 4 ドメインを含む、(8 3) ~ (1 0 0) のいずれかのヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

30

(1 0 2)

第 1 および第 2 ヒンジ領域のそれぞれが、免疫グロブリンのヒンジ領域に由来し、第 1 および第 2 免疫グロブリン定常領域のそれぞれが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 の免疫グロブリン C H 2 および C H 3 ドメインを含む、(1 0 1) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(1 0 3)

第 1 および第 2 ポリペプチド鎖の少なくとも 1 つが、抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (A D C C) および補体依存性細胞傷害 (C D C) からなる群から選択される少なくとも 1 つのエフェクター機能を含む、(8 3) ~ (1 0 2) のいずれかのヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

40

(1 0 4)

前記第 2 ポリペプチド鎖が第 2 結合ドメインをさらに含む、(8 3) ~ (1 0 3) のいずれかのヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(1 0 5)

第 2 結合ドメインが、第 2 ヒンジ領域に対するアミノ末端である、(1 0 4) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(1 0 6)

50

第2結合が、T細胞と特異的結合している、(104)または(105)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(107)

第2結合ドメインが、T細胞受容体(TCR)複合体またはその成分と特異的結合している、(106)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(108)

第2結合ドメインが、CD3と特異的結合している、(107)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(109)

第2結合ドメインが、CD3εと特異的結合している、(108)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

10

(110)

第2結合ドメインが、CRIS-7およびHuM291からなる群から選択されるモノクローナル抗体とCD3ε結合において競合する、(109)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(111)

第2結合ドメインが、CRIS-7およびHuM291からなる群から選択されるモノクローナル抗体由来である免疫グロブリン軽鎖可変領域および免疫グロブリン重鎖可変領域を含む、(110)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(112)

20

第2結合ドメインの軽鎖および重鎖可変領域が、モノクローナル抗体の軽鎖CDRおよび重鎖CDRをそれぞれ含むヒト化可変領域である、(111)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(113)

第2結合ドメインの軽鎖および重鎖可変領域が、

(a) 配列番号47の残基139～245で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号47の残基1～121で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに

(b) 配列番号78の残基634～740で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号78の残基496～616で表されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域からなる群から選択される、(111)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

30

(114)

軽鎖および重鎖可変領域が、

(a) 配列番号47の残基139～245で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号47の残基1～121で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、ならびに

(b) 配列番号78の残基634～740で表されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号78の残基496～616で表されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域からなる群から選択される、(111)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

40

(115)

第2結合ドメインがscFvである、(104)～(114)のいずれかのヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(116)

第2結合ドメインが、(i) 配列番号47の残基1～245で表されるアミノ酸配列、および(ii) 配列番号78の残基496～742で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含むscFvである、(111)のヘテロ二量体PSMA結合タンパク質。

(117)

第2結合ドメインscFvが、(i) 配列番号47の残基1～245で表されるアミノ

50

酸配列、および (i i) 配列番号 78 の残基 496 ~ 742 で表されるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、(116) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(118)

(a) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 46 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 47 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含む；

(b) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 58 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 57 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含む；

(c) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 59 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 57 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含む；

(d) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 60 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 47 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含む；または

(e) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 61 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 47 で表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % 同一のアミノ酸配列を含む、

(115) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(119)

(a) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 46 で表されるアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 47 で表されるアミノ酸配列を含む；

(b) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 58 で表されるアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 57 で表されるアミノ酸配列を含む；

(c) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 59 で表されるアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 57 で表されるアミノ酸配列を含む；

(d) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 60 で表されるアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 47 で表されるアミノ酸配列を含む；または

(e) 第 1 ポリペプチド鎖が、配列番号 61 で表されるアミノ酸配列を含み、第 2 ポリペプチド鎖が、配列番号 47 で表されるアミノ酸配列を含む、

(118) のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質。

(120)

P S M A 結合タンパク質が、マウスモノクローナル抗体 107-1A4 と比較して P S M A 発現細胞によって延長された血清半減期、低減した内在化、および／または P S M A 発現細胞表面上の延長された持続時間を示す、(59) および (83) ~ (119) のいずれかの P S M A 結合タンパク質。

(121)

(1) ~ (58) および (60) ~ (82) のいずれかの P S M A 結合ポリペプチドをコードする単離核酸。

(122)

核酸が、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 44、配列番号 48、配列番号 50、配列番号 53、配列番号 54、配列番号 55、配列番号 56、配列番号 69、配列番号 71、配列番号 73、配列番号 75、配列番号 77、配列番号 79、配列番号 81、配列番号 83、配列番号 157、配列番号 159、配列番号 161、または配列番号 163 で表されるヌクレオチド配列を含む、(121) の単離核酸。

(123)

核酸セグメントが、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に結

10

20

30

40

50

合されている、(1)～(58)および(60)～(82)のいずれかのP S M A結合ポリペプチドをコードする核酸セグメントを含む発現ベクター。

(124)

核酸セグメントが、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号29、配列番号32、配列番号33、配列番号36、配列番号37、配列番号40、配列番号41、配列番号44、配列番号48、配列番号50、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号69、配列番号71、配列番号73、配列番号75、配列番号77、配列番号79、配列番号81、配列番号83、配列番号157、配列番号159、配列番号161、または配列番号163で表されるヌクレオチド配列を含む、(123)の発現ベクター。

10

(125)

(123)または(124)の発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

(126)

第1および第2発現単位がそれぞれ(83)～(119)のいずれかに説明されるヘテロ二量体P S M A結合タンパク質の第1および第2ポリペプチド鎖をコードする第1および第2核酸セグメントを含み、

第1および第2核酸セグメントが、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に連結している、第1および第2発現単位を含む発現ベクター。

(127)

(a)第1核酸セグメントが、配列番号44で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントが、配列番号45で表されるヌクレオチド配列を含む；

20

(b)第1核酸セグメントが、配列番号53で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントが、配列番号52で表されるヌクレオチド配列を含む；

(c)第1核酸セグメントが、配列番号54で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントが、配列番号52で表されるヌクレオチド配列を含む；

(d)第1核酸セグメントが、配列番号55で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントが、配列番号45で表されるヌクレオチド配列を含む；または

(e)第1核酸セグメントが、配列番号56で表されるヌクレオチド配列を含み、第2核酸セグメントが、配列番号45で表されるヌクレオチド配列を含む、

(126)の発現ベクター。

30

(128)

(126)または(127)の発現ベクターを含む組換え宿主細胞。

(129)

P S M A結合ポリペプチドの産生方法であり、該方法が、

核酸セグメントが発現する条件下で、(123)または(124)の発現ベクターを含む組換え宿主細胞を培養し、したがって、P S M A結合ポリペプチドを産生することを含む、P S M A結合ポリペプチドの産生方法。

(130)

P S M A結合ポリペプチド回収をさらに含む、(129)に記載の方法。

(131)

40

二量体P S M A結合タンパク質の産生方法であり、該方法が、

発現ベクターを含む組換え宿主細胞を培養することを含み、発現ベクターが、(1)～(58)のいずれかのP S M A結合ポリペプチドをコードする核酸セグメントを含み、核酸セグメントが、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に結合されている、および

前記培養が、核酸セグメントが発現し、コードされたP S M A結合ポリペプチドが、二量体P S M A結合タンパク質として産生する条件下にある、二量体P S M A結合タンパク質の産生方法。

(132)

二量体P S M A結合タンパク質回収をさらに含む、(131)に記載の方法。

50

(133)

ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質の産生方法であり、該方法が、

第1および第2発現単位を含む組換え宿主細胞を培養することを含み、第1および第2発現単位がそれぞれ(83)～(119)のいずれかに説明されるヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質の第1および第2ポリペプチド鎖をコードする第1および第2核酸セグメントを含み、第1および第2核酸セグメントが、宿主細胞内核酸セグメントの発現に適した調節配列に使用可能に連結している、および

前記培養が、第1および第2核酸セグメントが発現し、コードされたポリペプチド鎖が、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質として産生する条件下にある、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質の産生方法。

10

(134)

ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質回収をさらに含む、(133)に記載の方法。

(135)

(59)の P S M A 結合タンパク質、ならびに

医薬上許容される担体、希釈液、または賦形剤を含む組成物。

(136)

(83)～(119)のいずれかのヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質、ならびに

医薬上許容される担体、希釈液、または賦形剤を含む組成物。

20

(137)

前立腺特異的膜抗原(P S M A)発現細胞に対する抗体依存性細胞介在性細胞傷害(A D C C)および補体依存性細胞傷害(C D C)の少なくとも1つの誘発方法であり、該方法が、

前記 P S M A 発現細胞を第1および第2ポリペプチド鎖を含む二量体 P S M A 結合タンパク質と接触させることを含み、前記ポリペプチド鎖のそれぞれが、(20)または(21)の P S M A 結合ポリペプチドであり、前記接触が、P S M A 発現細胞に対して A D C C および C D C の少なくとも1つを誘発する条件下にある、A D C C および C D C の少なくとも1つの誘発方法。

(138)

前立腺特異的膜抗原(P S M A)発現細胞に対する抗体依存性細胞介在性細胞傷害(A D C C)および補体依存性細胞傷害(C D C)の少なくとも1つの誘発方法であり、該方法が、

前記 P S M A 発現細胞を(102)または(103)のヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質と接触させることを含み、前記接触が、P S M A 発現細胞に対して A D C C および C D C の少なくとも1つを誘発する条件下にある、A D C C および C D C 誘発方法の少なくとも1つの誘発方法。

30

(139)

前立腺特異的膜抗原(P S M A)発現細胞に対する再指向 T 細胞の細胞傷害(R T C C)誘発方法であり、該方法が、

前記 P S M A 発現細胞を、第1および第2ポリペプチド鎖を含む二量体 P S M A 結合タンパク質と接触させることを含み、前記ポリペプチド鎖のそれぞれが、(45)～(58)のいずれかの P S M A 結合ポリペプチドであり、前記接触が、P S M A 発現細胞に対して R T C C を誘発する条件下にある、R T C C 誘発方法。

40

(140)

前立腺特異的膜抗原(P S M A)発現細胞に対する再指向 T 細胞の細胞傷害(R T C C)誘発方法であり、該方法が、

前記 P S M A 発現細胞を(106)～(119)のいずれかのヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質と接触させることを含み、前記接触が、P S M A 発現細胞に対して R T C C

50

を誘発する条件下にある、
R T C C 誘発方法。

(1 4 1)

前記障害が、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) の過剰発現を特徴とし、該方法が、
治療有効量の (5 9) の二量体 P S M A 結合タンパク質を対象に投与することを含む、
対象の障害の処置方法。

(1 4 2)

二量体 P S M A 結合タンパク質の第 1 および第 2 ポリペプチド鎖が、 (4 5) ~ (5 8)
のいずれかの P S M A 結合ポリペプチドであり、二量体 P S M A 結合タンパク質が対象
中の再指向 T 細胞の細胞傷害 (R T C C) を誘発する、 (1 4 1) に記載の方法。

10

(1 4 3)

前記障害が、前立腺特異的膜抗原 (P S M A) の過剰発現を特徴とし、該方法が、
治療有効量の (8 3) ~ (1 1 9) のいずれかのヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質
を対象に投与することを含む、対象の障害の処置方法。

(1 4 4)

ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質が、 (1 0 6) ~ (1 1 9) のいずれかのタンパ
ク質であり、ヘテロ二量体 P S M A 結合タンパク質が対象中の再指向 T 細胞の細胞傷害 (R T C C) を誘発する、 (1 4 3) に記載の方法。

(1 4 5)

障害が、癌である、 (1 4 1) ~ (1 4 4) のいずれかに記載の方法。

20

(1 4 6)

癌が、前立腺癌、大腸癌、および胃癌からなる群から選択される、 (1 4 5) に記載の
方法。

(1 4 7)

癌が、前立腺癌である、 (1 4 6) に記載の方法。

(1 4 8)

前立腺癌が、去勢抵抗性前立腺癌である、 (1 4 7) に記載の方法。

(1 4 9)

障害が、前立腺障害である、 (1 4 1) ~ (1 4 4) のいずれかに記載の方法。

(1 5 0)

前立腺障害が、前立腺癌および良性前立腺肥大症からなる群から選択される、 (1 4 9)
に記載の方法。

30

(1 5 1)

障害が、新生血管障害である、 (1 4 1) ~ (1 4 4) のいずれかに記載の方法。

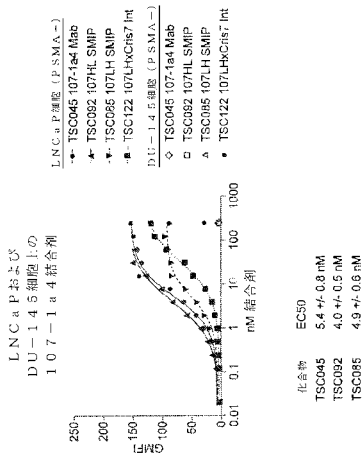
(1 5 2)

新生血管障害が、固体腫瘍成長を特徴とする癌である、 (1 5 1) に記載の方法。

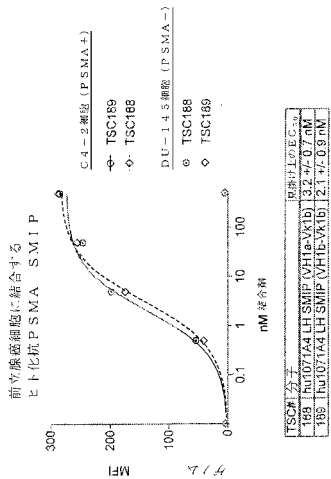
(1 5 3)

癌が、淡明細胞型腎細胞癌、大腸癌、膀胱癌、および肺癌からなる群から選択される、
(1 5 2) に記載の方法。

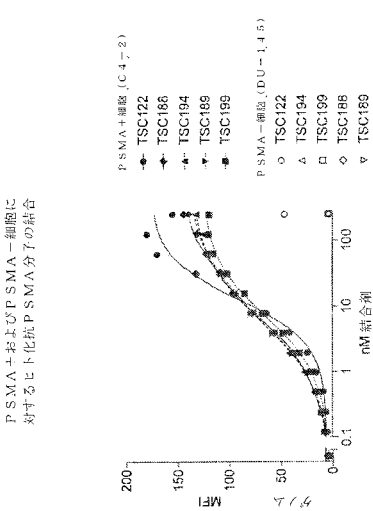
【図 1】



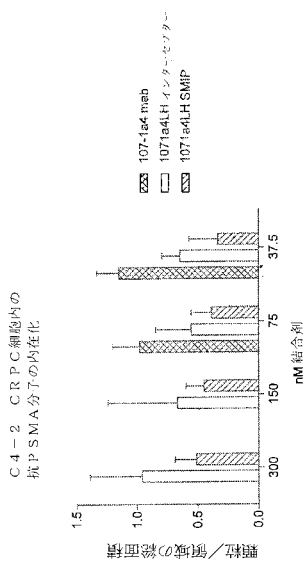
【図 2 A】



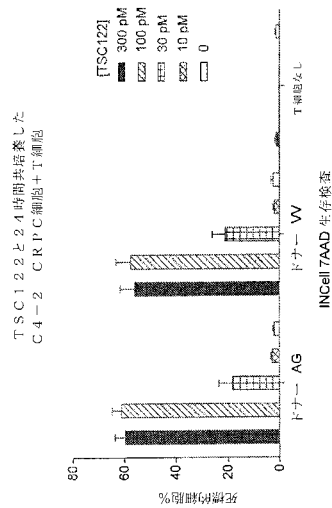
【図 2 B】



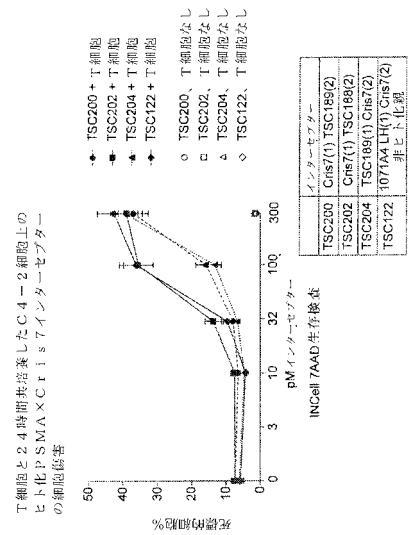
【図 3】



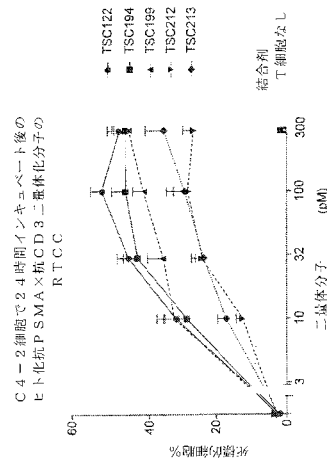
【図 4】



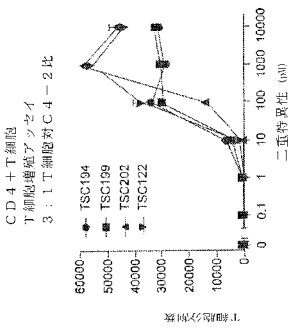
【図 5】



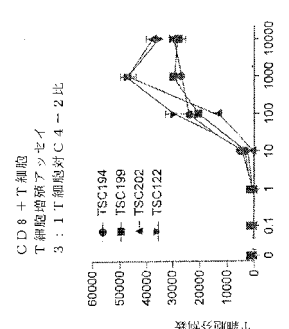
【図 6】



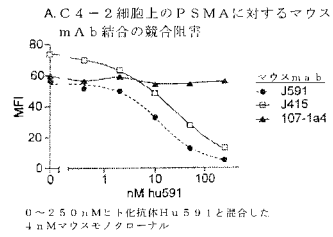
【図 7 A】



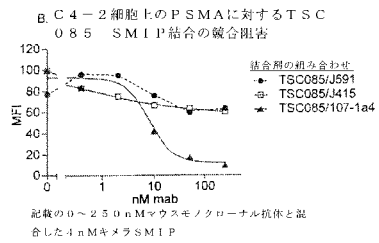
【図 7 B】



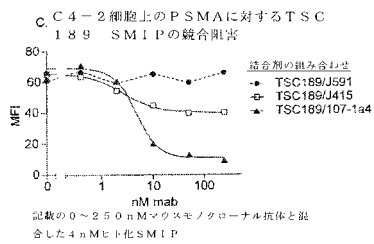
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



【配列表】

2017127305000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 N
A 6 1 P	1/04	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04
A 6 1 P	13/08	(2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/08
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	13/12
			A 6 1 P	35/00

- (72)発明者 ブランケンシップ, ジョン ダブリュー.
 アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォー
 ス アベニュー, アプティボ リサーチ アンド デベロップメント エルエルシー
- (72)発明者 シューエル, エレイン トッド
 アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォー
 ス アベニュー, アプティボ リサーチ アンド デベロップメント エルエルシー
- (72)発明者 タン, フィリップ
 アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォー
 ス アベニュー, アプティボ リサーチ アンド デベロップメント エルエルシー

F ターム(参考) 4B065 AA91Y AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C085 AA14 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG08 GG10
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA22 EA28 FA74