

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-520399

(P2023-520399A)

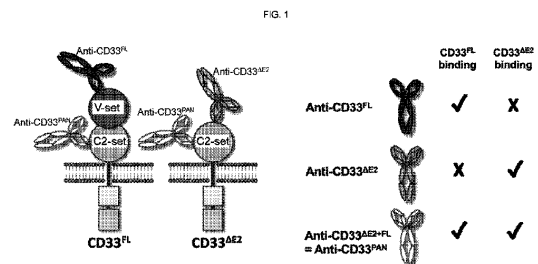
(43)公表日 令和5年5月17日(2023.5.17)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 7 6
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全111頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-559585(P2022-559585)	(71)出願人	522256406		
(86)(22)出願日	令和3年3月31日(2021.3.31)		フレッド ハッチンソン キャンサー センター		
(85)翻訳文提出日	令和4年11月25日(2022.11.25)		アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 0		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/025220		9 シアトル フェアビュー アベニュー		
(87)国際公開番号	WO2021/202770		ノース 1 1 0 0		
(87)国際公開日	令和3年10月7日(2021.10.7)	(74)代理人	110001173		
(31)優先権主張番号	63/003,203		弁理士法人川口国際特許事務所		
(32)優先日	令和2年3月31日(2020.3.31)	(72)発明者	ウォルター, ローランド・ビー		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 1 0		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(72)発明者	ラースロー, ジョージ・エス		
			アメリカ合衆国、ワシントン・9 8 1 0		
			9、シアトル、フェアビュー・アベニュー		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 ヒト抗CD33抗体及びその使用

(57)【要約】

一揃いの新規ヒトCD33抗体が説明される。提供されている抗体は、CD33のVセットIg様ドメインの存在下又は非存在下でC2セットIg様ドメインに結合するpan結合剤であり、又はCD33のVセットIg様ドメインに結合するVセット結合剤である。この抗体は、急性骨髄性白血病（AML）などのCD33関連障害に対する新規治療及び診断手段を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 配列番号 2 4 に記載の配列を有する C D R L 1 、
配列番号 2 5 に記載の配列を有する C D R L 2 、
配列番号 2 6 に記載の配列を有する C D R L 3 、
配列番号 2 7 に記載の配列を有する C D R H 1 、
配列番号 2 8 に記載の配列を有する C D R H 2 、及び
配列番号 2 9 に記載の配列を有する C D R H 3 、

(i i) 配列番号 1 8 3 に記載の配列を有する C D R 、
配列 A A S を有する C D R L 2 、
配列番号 2 6 に記載の配列を有する C D R L 3 、
配列番号 1 8 4 に記載の配列を有する C D R H 1 、
配列番号 1 8 5 に記載の配列を有する C D R H 2 、及び
配列番号 2 9 に記載の配列を有する C D R H 3 、

(i i i) 配列番号 2 4 に記載の配列を有する C D R L 1 、
配列番号 2 0 4 に記載の配列を有する C D R L 2 、
配列番号 2 6 に記載の配列を有する C D R L 3 、
配列番号 2 0 5 に記載の配列を有する C D R H 1 、
配列番号 2 0 6 に記載の配列を有する C D R H 2 、及び
配列番号 2 0 7 に記載の配列を有する C D R H 3 、又は

(i v) 配列番号 2 4 に記載の配列を有する C D R L 1 、
配列番号 2 0 4 に記載の配列を有する C D R L 2 、
配列番号 2 6 に記載の配列を有する C D R L 3 、
配列番号 2 2 2 に記載の配列を有する C D R H 1 、
配列番号 2 2 3 に記載の配列を有する C D R H 2 、及び
配列番号 2 0 7 に記載の配列を有する C D R H 3

を有する相補性決定領域 (C D R) のセットを含む抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

配列番号 5 5 に記載の配列を有する可変軽鎖及び配列番号 5 6 に記載の配列を有する可変重鎖、又は

配列番号 5 5 に記載の配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する可変軽鎖及び配列番号 5 6 に記載の配列を有する可変重鎖と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する可変重鎖

を有する、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 3】

抗原結合断片が、V H - V L 配向又は V L - V H 配向の一本鎖可変断片 (s c F v) である、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 4】

s c F v が、配列番号 2 3 4 又は 2 3 5 に記載の配列を有する、請求項 3 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 5】

C D 3 に結合する第 2 の結合ドメインを有する二重特異性抗体の一部としての、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 6】

第 2 の結合ドメインが、

配列番号 1 6 2 に記載の配列を有する可変軽鎖及び配列番号 1 6 1 に記載の配列を有する可変重鎖、又は

配列番号 1 6 2 に記載の配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する可変軽鎖及び配列番号 1 6 1 に記載の配列を有する可変重鎖と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する可変重鎖

10

20

30

40

50

を有する、請求項 5 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 7】

二重特異性抗体が、配列番号 242 又は 243 に記載の配列を有する、請求項 5 に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 8】

IMGT、Kabat、North、又は Chothia によって定義される 1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、又は 2E3 の相補性決定領域 (CDR) のセットを含む抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 9】

抗 CD33 免疫毒素、抗 CD33 抗体-薬物コンジュゲート、抗 CD33 抗体-放射性同位元素コンジュゲート、抗 CD33 二重特異性抗体、抗 CD33 二重特異性免疫細胞誘導抗体、抗 CD33 三重特異性抗体、及び／又は抗 CD33 四重特異性抗体の一部として IMGT、Kabat、North、又は Chothia によって定義される 1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、又は 2E3 の相補性決定領域 (CDR) のセットを含む結合ドメインを含む CD33 ターゲティング剤。

【請求項 10】

抗 CD33 免疫毒素、抗 CD33 抗体-薬物コンジュゲート、抗 CD33 抗体-放射性同位元素コンジュゲート、抗 CD33 二重特異性抗体、抗 CD33 二重特異性免疫細胞誘導抗体、抗 CD33 三重特異性抗体、及び／若しくは抗 CD33 四重特異性抗体の一部として

1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは 2E3 の可変軽鎖及び可変重鎖；又は

1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは 2E3 の可変軽鎖に少なくとも 90% 配列同一性を有する配列及び 1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは 2E3 の対応する可変重鎖に少なくとも 90% 配列同一性を有する配列

を含む結合ドメインを含む CD33 ターゲティング剤。

【請求項 11】

CD33 ターゲティング剤が、抗 CD33 免疫毒素を含み、毒素が、ホロ毒素又はヘミ毒素を含む、請求項 9 又は 10 に記載の CD33 ターゲティング剤。

【請求項 12】

CD33 ターゲティング剤が、抗 CD33 免疫毒素を含み、毒素が、アブリン、ブーガニン、プリオジン 1、ジフテリア毒素 (DT)、ゲロニン、ヤドギリレクチン、モデシン、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質 (PAP)、シュードモナス (Pseudomonas) 外毒素 (PE)、リシン及び／又はサポリンを含む、請求項 9 又は 10 に記載の CD33 ターゲティング剤。

【請求項 13】

CD33 ターゲティング剤が、抗 CD33 抗体-薬物コンジュゲートを含み、薬物が、モノメチルアウリスタチン E [MMAE]、ベドチン、ドラスタチン、アウリスタチン、カリケマイシン、ピロロベンゾジアゼピン (PBD)、ネモルピシン、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ピンカアルカロイド、タキサン、トリコテセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、タキソール、サイトカラシン B、グラミシジン D、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン及び／又はプロプラノロールを含む、請求項 9 又は 10 に記載の CD33 ターゲティング剤。

【請求項 14】

CD33 ターゲティング剤が、抗 CD33 抗体-放射性同位体コンジュゲートを含み、

放射性同位体が、ヒ素－72、ヒ素－74、ヨウ素－131、インジウム－111、イットリウム－90、ルテチウム－177、アスタチン－211、アクチニウム－225、ビスマス－212及び／又はビスマス－213を含む、請求項9又は10に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項15】

CD33ターゲティング剤が、抗CD33抗体－放射性同位体コンジュゲートを含み、放射性同位体が、 ^{225}Ac 、 ^{228}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{124}Am 、 ^{74}As 、 ^{211}At 、 ^{209}At 、 ^{194}Au 、 ^{128}Ba 、 ^7Be 、 ^{206}Bi 、 ^{245}Bk 、 ^{246}Bk 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{47}Ca 、 ^{254}Cf 、 ^{242}Cm 、 ^{51}Cr 、 ^{67}Cu 、 ^{153}Dy 、 ^{157}Dy 、 ^{159}Dy 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{171}Er 、 ^{250}Es 、 ^{254}Es 、 ^{147}Eu 、 ^{157}Eu 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{251}Fm 、 ^{252}Fm 、 ^{253}Fm 、 ^{66}Ga 、 ^{72}Ga 、 ^{146}Gd 、 ^{153}Gd 、 ^{68}Ge 、 ^{170}Hf 、 ^{171}Hf 、 ^{193}Hg 、 $^{193\text{m}}\text{Hg}$ 、 $^{160\text{m}}\text{Ho}$ 、 ^{130}I 、 ^{131}I 、 ^{135}I 、 $^{114\text{m}}\text{In}$ 、 ^{185}Ir 、 ^{42}K 、 ^{43}K 、 ^{76}Kr 、 ^{79}Kr 、 $^{81\text{m}}\text{Kr}$ 、 ^{132}La 、 ^{262}Lr 、 ^{169}Lu 、 $^{174\text{m}}\text{Lu}$ 、 $^{176\text{m}}\text{Lu}$ 、 ^{257}Md 、 ^{260}Md 、 ^{28}Mg 、 ^{52}Mn 、 ^{90}Mo 、 ^{24}Na 、 ^{95}Nb 、 ^{138}Nd 、 ^{57}Ni 、 ^{66}Ni 、 ^{234}Np 、 ^{15}O 、 ^{182}Os 、 $^{189\text{m}}\text{Os}$ 、 ^{191}Os 、 ^{32}P 、 ^{201}Pb 、 ^{101}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{191}Pt 、 ^{243}Pu 、 ^{225}Ra 、 ^{81}Rb 、 ^{188}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{211}Rn 、 ^{103}Ru 、 ^{35}S 、 ^{44}Sc 、 ^{72}Se 、 ^{153}Sm 、 ^{125}Sn 、 ^{91}Sr 、 ^{173}Ta 、 ^{154}Tb 、 ^{127}Te 、 ^{234}Th 、 ^{45}Ti 、 ^{166}Tm 、 ^{230}U 、 ^{237}U 、 ^{240}U 、 ^{48}V 、 ^{178}W 、 ^{181}W 、 ^{188}W 、 ^{125}Xe 、 ^{127}Xe 、 ^{133}Xe 、 $^{133\text{m}}\text{Xe}$ 、 ^{135}Xe 、 $^{85\text{m}}\text{Y}$ 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{93}Y 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{65}Zn 、 $^{71\text{m}}\text{Zn}$ 、 ^{86}Zr 、 ^{95}Zr 及び／又は ^{97}Zr を含む、請求項9又は10に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項16】

多重特異性抗体を含む、請求項9又は10に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項17】

多重特異性抗体が、二重特異性抗体、三重特異性抗体又は四重特異性抗体を含む、請求項16に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項18】

多重特異性抗体が、免疫細胞を活性化する結合ドメインを含む、請求項16に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項19】

免疫細胞が、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞又はマクロファージである、請求項18に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項20】

T細胞が、CD3T細胞、CD4T細胞、CD8T細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞及び／又はナイーブT細胞である、請求項19に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項21】

免疫細胞を活性化する結合ドメインが、CD3、CD28、CD8、NKG2D、CD8、CD16、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR3DS1、NKG2C、NKG2E、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、NKP80、DNAM-1、CD11b、CD11c、CD64、CD68、CD119、CD163、CD206、CD209、F4／80、IFGR2、Toll様受容体1-9、IL-4R α 又はMARCOに結合する、請求項18に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項22】

配列番号157又は238～245のいずれか1つに記載の配列を有する、請求項18に記載のCD33ターゲティング剤。

【請求項23】

結合ドメインがT細胞を活性化し、O K T 3 抗体のC D R、4 B 4 - D 7 抗体のC D R、4 E 7 - C 9 抗体のC D R、1 8 F 5 - H 1 0 抗体のC D R、T G N 1 4 1 2 抗体のC D R、O K T 8 抗体のC D R、配列番号1 6 2に記載の配列を有する可変軽鎖及び配列番号1 6 1に記載の配列を有する可変重鎖、又はT C Rを含む、請求項1 8に記載のC D 3 3 ターゲティング剤。

【請求項2 4】

1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、1 D 2、1 B 9、1 H 8、2 D 3、又は2 E 3のF v、F a b、F a b'、F(a b')₂、又は一本鎖F v断片(s c F v)を含む、請求項9又は1 0に記載のC D 3 3 ターゲティング剤。

【請求項2 5】

s c F vが、配列番号2 3 0～2 3 7のいずれか1つに記載の配列を有する、請求項2 4に記載のC D 3 3 ターゲティング剤。

【請求項2 6】

リンカーをさらに含む、請求項1に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項9若しくは1 0に記載のC D 3 3 ターゲティング剤。

【請求項2 7】

リンカーがG l y - S e r リンカーである、請求項2 6に記載のC D 3 3 ターゲティング剤。

【請求項2 8】

G l y - S e r リンカーが、(G l y_x S e r_y)_nを含み、x及びyが、独立して、0～1 0の整数であり、ただし、x及びyの両方が0ではなく、nが、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は1 0の整数である、請求項2 7に記載のC D 3 3 ターゲティング剤。

【請求項2 9】

G l y - S e r リンカーが、(G l y₄ S e r)₄ (配列番号1 2 5)、(G l y₄ S e r)₃ (配列番号1 2 6)、(G l y₄ S e r)₂ (配列番号1 2 7)、(G l y₄ S e r)₁ (配列番号1 2 8)、(G l y₃ S e r)₂ (配列番号1 2 9)、(G l y₃ S e r)₁ (配列番号1 3 0)、(G l y₂ S e r)₂ (配列番号1 3 1)又は(G l y₂ S e r)₁、G G S G G G S G G S G (配列番号1 3 2)、G G S G G G S G S G (配列番号1 3 3)又はG G S G G G S G (配列番号1 3 4)を含む、請求項2 8に記載のC D 3 3 ターゲティング剤。

【請求項3 0】

抗体又はその抗原結合断片がP E G化されている、請求項8に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3 1】

抗体がF c 改変を含む、請求項8に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3 2】

F c 改変が、M 4 2 8 L / N 4 3 4 S、G 2 3 6 A / S 2 3 9 D / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E (G A S D A L I E)、h u I g G 4 P r o A l a A l a、h u I g G 2 m 4、及び／又はh u I g G 2 s i g m a 変異を含む、請求項3 1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

【請求項3 3】

対象への投与のために製剤化された、請求項1若しくは8に記載の抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は請求項9若しくは1 0に記載のC D 3 3 ターゲティング剤を含む組成物。

【請求項3 4】

対象への投与のために製剤化された、請求項8に記載の抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は請求項9若しくは1 0に記載のC D 3 3 ターゲティング剤を発現するように遺伝的に改変された細胞。

【請求項3 5】

10

20

30

40

50

インビボ又はエキスピボにおけるものである、請求項 34 に記載の細胞。

【請求項 36】

T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球／マクロファージ、造血幹細胞（HSC）又は造血前駆細胞（HPC）である、請求項 34 に記載の細胞。

【請求項 37】

CD3＋T 細胞、CD4＋T 細胞、CD8＋T 細胞、セントラルメモリー T 細胞、エフェクターメモリー T 細胞及び／又はナイーブ T 細胞から選択される T 細胞である、請求項 34 に記載の細胞。

【請求項 38】

細胞が CD8＋T 細胞である、請求項 34 に記載の細胞。

10

【請求項 39】

請求項 34 に記載の細胞の集団及び薬学的に許容される担体を含む製剤。

【請求項 40】

それを必要とする対象において CD33 関連障害を処置する方法であって、治療有効量の請求項 33 に記載の組成物及び／又は請求項 39 に記載の製剤を対象に投与することを含み、それによって、それを必要とする対象において CD33 関連障害を処置する、方法。

【請求項 41】

CD33 関連障害が、急性骨髄性白血病（AML）を含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

CD33 関連障害が、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、肥満細胞白血病、骨髄異形成症候群（MDS）、B 細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、T 細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）又は巨核球性白血病を含む、請求項 40 に記載の方法。

20

【請求項 43】

製剤中の細胞の集団が、対象にとって自己性である又は同種である、請求項 40 のいずれかに記載の方法。

【請求項 44】

対象が CD33 の V セットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに対象が CD33 の V セットドメインを発現する場合、

30

1H10、1A9、1E6、1D2、及び 1B9 のうちの 1 つ以上の結合ドメイン、並びに

1H8、2D3、及び 2E3 のうちの 1 つ以上の結合ドメイン

を含む組成物を含む併用療法を選択することをさらに含む、請求項 40 のいずれかに記載の方法。

【請求項 45】

対象が CD33 の V セットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに対象が CD33 の V セットドメインを発現しない場合、

1H10、1A9、1E6、1D2、及び 1B9 のうちの 1 つ以上の結合ドメインを含む組成物

40

を含む療法を選択することをさらに含む、請求項 40 のいずれかに記載の方法。

【請求項 46】

それを必要とする対象において CD33 発現細胞に対する免疫応答を活性化させる方法であって、治療有効量の請求項 33 に記載の組成物及び／又は請求項 39 に記載の製剤を対象に投与することを含み、それによって、それを必要とする対象において CD33 発現細胞に対する免疫応答を活性化させる、方法。

【請求項 47】

CD33 発現細胞が、急性骨髄性白血病（AML）細胞を含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

50

C D 3 3 発現細胞が、急性リンパ芽球性白血病（A L L）、慢性骨髄性白血病（C M L）、慢性骨髄単球性白血病（C M L）、肥満細胞白血病、骨髄異形成症候群（M D S）、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B－A L L）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T－A L L）又は巨核球性白血病細胞を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

製剤中の細胞の集団が、対象にとって自己性である又は同種である、請求項 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 0】

対象が C D 3 3 の V セットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに対象が C D 3 3 の V セットドメインを発現する場合、

1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、1 D 2、及び 1 B 9 のうちの 1 つ以上の結合ドメイン並びに 1 H 8、2 D 3、及び 2 E 3 のうちの 1 つ以上の結合ドメインを含む組成物を含む併用療法を選択することをさらに含む、請求項 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

対象が C D 3 3 の V セットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに対象が C D 3 3 の V セットドメインを発現しない場合、

1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、1 D 2、及び 1 B 9 のうちの 1 つ以上の結合ドメインを含む組成物

を含む療法を選択することをさらに含む、請求項 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 2】

1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、1 D 2、及び 1 B 9 のうちの 1 つ以上の結合ドメイン並びに 1 H 8、2 D 3、及び 2 E 3 のうちの 1 つ以上の結合ドメインを含む組成物を含むキット。

【請求項 5 3】

1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、1 D 2、及び 1 B 9 のうちの 1 つ以上の結合ドメインを含む組成物並びに 1 H 8、2 D 3、及び 2 E 3 のうちの 1 つ以上の結合ドメインを含む組成物を含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 2 0 年 3 月 3 1 日に出版された米国仮特許出願第 6 3 / 0 0 3 , 2 0 3 号に対する優先権を主張し、これは、本明細書に完全に記載されているかのように、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

連邦政府が支援する研究又は開発に関する声明

本発明は、国立衛生研究所によって与えられた C A 2 3 4 2 0 3 及び C A 2 2 3 4 0 9 の下で政府の支援を受けてなされた。政府は本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 3】

配列表の参照

本出願に関連する配列表は、紙の複写の代わりにテキスト形式で提供され、本明細書に参照により組み込まれる。配列表を含むテキストファイルの名前は、2 G U _ S T 2 5 . t x t である。テキストファイルは 1 9 6 K B であり、2 0 2 1 年 3 月 3 1 日に作成され、E F S - W e b により電子的に提出されている。

【0 0 0 4】

本開示の分野

一組の新規抗 C D 3 3 抗体が記載されている。提供されている抗体は、C D 3 3 の V セット I g 様ドメインの存在下又は非存在下で C 2 セット I g 様ドメインに結合する p a n 結合剤であり、C D 3 3 の V セット I g 様ドメインの非存在下でのみ C 2 セット I g 様ドメインに結合する C 2 セット結合剤であり、又は C D 3 3 の V セット I g 様ドメインに結合する V セット結合剤である。この抗体は、急性骨髄性白血病（A M L）などの C D 3 3

10

20

30

40

50

関連障害に対する新規治療及び診断手段を提供する。

【背景技術】

【0005】

世界保健機関によると、がんは世界で2番目に多い死因であり、2018年には推定960万人の死亡の原因であった。急性骨髄性白血病（AML）は、クローン性の増殖性骨髄芽球細胞の悪性腫瘍に起因するがんの種類である。米国では年間20,000件のAMLの新しい症例があり、毎年11,000人がAMLにより死亡している（Siegelら、2021年、CA Cancer J Clin. 71（1）：7～33頁）。AMLを有する若年患者では、従来の化学療法により60%～80%の率の高い完全寛解率を達成することができるが（Dohnerら、2017年、Blood. 129（4）：424～447頁）、65歳以上の年齢の高齢患者についての治療結果は、診断から1年以内に70%もの患者がこの疾患で死亡しており、不十分なままである（Meyersら、Appl Health Econ Health Policy、11：275～286頁、2013年）。残念ながら、白血病幹細胞の化学療法抵抗性のために、従来の治療後の再発は一般的であり（Eppertら、2011年、Nat. Med. 17（9）：1086～1093頁）、再発／難治性（R/R）AMLに対する現在の治療選択肢は散々であり、12か月の全生存率は30%未満という結果になる。

10

【0006】

CD33は、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン（SIGLEC）タンパク質ファミリーのメンバーである。これは、67kDaのグリコシル化膜貫通タンパク質である。CD33（SIGLEC-3としても知られている）は、AMLを有するほぼ全ての患者における少なくとも一部の白血病細胞、おそらく、一部の症例ではAML幹細胞に見出される骨髄分化抗原である。この広範な発現パターンに基づいて、CD33は、AMLにおける治療標的として広く追求されてきた。いくつかの無作為化研究からの最近のデータにより、CD33抗体-薬物コンジュゲートである、ゲムツズマブオゾガマイシン（GO）が、新たに診断されたAMLを有する患者の定義されたサブセットにおいて化学療法に追加されると、生存率を改善することが実証された。このデータは、CD33が、AMLにおける免疫療法についての最初の（そしてこれまでのところ唯一の）標的であることを確認している。GOで指摘された制限を克服するための、新たな、より効果的なCD33指向療法（例えば、抗体-薬物コンジュゲート、放射性イムノコンジュゲート、二重特異性抗体、キメラ抗原受容体〔CAR〕修飾T細胞）の開発と並行して、他の悪性及び非悪性障害についての薬物標的としてのCD33への関心が高まっている。これらの取り組みには、GOによって認識されないCD33スプライスバリエーションのターゲティング、並びに他の血液悪性腫瘍におけるCD33+腫瘍細胞、様々な疾患におけるCD33+骨髄由来サプレッサー細胞（MDS）、及びアルツハイマー病における正常なCD33+ミクログリア細胞のターゲティングが含まれる（Walter、Expert Opin Biol Ther. 2020年、20（9）：955～958頁）。

20

30

【0007】

全長CD33タンパク質（CD33^{FL}）は、その細胞外部分におけるアミノ末端の膜遠位のVセット免疫グロブリン（Ig）様ドメイン及び膜近位のC2セットIg様ドメインによって特徴付けられる（図1）。CD33のより短いアイソフォームが存在する。CD33のより短いアイソフォームには、Vセットドメイン（CD33^{ΔE2}）をコードする、エクソン2を欠く1つのバリエーションが含まれる。少なくともmRNAレベルでは、CD33^{ΔE2}は、AMLを有する患者の骨髄及び末梢血の骨髄細胞において広範に発現される。しかしながら、現在、ほぼ全ての商業的及び臨床的に利用可能なCD33抗体は、免疫優勢なVセットIg様ドメインを認識する。このことは、これらの抗体が、CD33^{ΔE2}などのVセットドメインを欠く、より短い形態のCD33を認識しないことを意味する。このことは、CD33^{ΔE2}の選択的転写及びCD33^{FL}の翻訳の減少をもたらす、CD33遺伝子における一塩基多型を有する患者が、集中化学療法へのGO（これはまた、CD33のVセットドメインにも結合する。）の追加から恩恵を受けなかったとい

40

50

う小児 A M L におけるある臨床試験において行われた観察を説明することができる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Siegelら、2021年、CA Cancer J Clin. 71 (1) : 7~33 頁

【非特許文献2】Dohnerら、2017年、Blood. 129 (4) : 424~447 頁

【非特許文献3】Meyersら、Appl Health Econ Health Policy、11 : 275~286 頁、2013年

【非特許文献4】Eppertら、2011年、Nat. Med. 17 (9) : 1086~1093 頁

【非特許文献5】Walter、Expert Opin Biol Ther. 2020年、20 (9) : 955~958 頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

(本開示の要旨)

本開示は、VセットIg様ドメインが存在するかどうかに関係なく、CD33タンパク質におけるC2セットIg様ドメインに結合／認識する抗体を提供する(図1)。これらの抗体は、pan結合剤と称される(CD33^{PAN}抗体)。pan結合剤は、CD33^{FL}及びCD33^{ΔE2}バリエーションなどのより短いアイソフォームを発現する標的細胞に結合することができるため、より高いパーセンテージのCD33発現細胞を標的とすることができる。本明細書に開示されているCD33^{PAN}抗体には、1H10、1A9、1E6、1D2及び1B9が含まれる。

【0010】

本開示は、CD33のVセットIg様ドメインに結合する新たに開発された抗CD33抗体も提供する。これらのVセット結合剤は、1H8、2D3、及び2E3を含み、CD33^{FL}を発現している患者に追加の診断及び治療選択肢を提供する。

【0011】

本明細書に開示されている抗体は、抗CD33抗体コンジュゲートなどの多数のフォーマットに操作され得る。抗CD33抗体コンジュゲートは、CD33抗体ベースの結合ドメインにコンジュゲートした分子を含む人工分子である。抗CD33抗体コンジュゲートには、抗CD33免疫毒素、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)及び放射性同位体コンジュゲートが含まれる。本明細書に開示されている抗体はまた、抗CD33多重特異性抗体(例えば、抗CD33二重特異性抗体、抗CD33三重特異性抗体、抗CD33四重特異性抗体など)に操作され得る。多重特異性フォーマットの場合、操作された分子は、CD33並びに例えば、CD3、CD16、CD28、CD64及び／又は4-1BBなどの、免疫細胞上の免疫活性化エピトープに結合することができる。これらの実施形態は、活性化された免疫細胞をCD33発現細胞にもたらし、CD33発現細胞を破壊するのに役立つ。

【0012】

本明細書で提出された図面の一部は、カラーでより良く理解される。出願人は、図面のカラー版を元の提出物の一部とみなし、後の手続きで図面のカラー画像を提示する権利を留保する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】全長CD33(CD33^{FL})及びVセットドメインの欠失をもたらす、エクソン2の欠失を伴うCD33(CD33^{ΔE2})の図である。CD33^{FL}のみ(抗CD33^{FL})、CD33^{ΔE2}のみ(抗CD33^{ΔE2})又はCD33^{FL}及びCD33^{ΔE2}

10

20

30

40

50

(抗CD33^{FL}+ΔE²又は抗CD33^{PAN})に結合する抗体が示される。

【図2】CD33^{FL}並びにVセットドメインの膜近位再配置をもたらす、エクソン3及び4の欠失を伴う人工CD33分子(CD33^{ΔE3-4})又はCD22の2つのC2セットドメイン(「CD33^{FL}+CD22 2D」)若しくはCD22の4つのC2セットドメインいずれかの挿入(「CD33^{FL}+CD22 4D」)の概略図である。CD33^{ΔE3-4}は、ヒトCD33^{FL}細胞外ドメイン(ECD)のCD33アミノ酸(aa)140~232をスプライスアウトするために部位特異的突然変異誘発を使用して操作された。CD33^{FL}+CD22 4Dは、内在性CD33シグナルペプチド(aa1~17)、6-ヒスチジンタグ、3×グリシンリンカー、ヒトCD33 ECD(aa18~259)、C2型ドメイン3~6を含むヒトCD22 ECDの一部(aa331~683)、CD33膜貫通ドメイン及びCD33細胞内ドメイン(aa260~364)を使用して生成された。CD22 aa331~504(C2型ドメイン3及び4)は、CD33^{FL}+CD22 2Dを生成するためにCD33^{FL}+CD22 24から除去された。

10

【図3A】細胞膜からの結合距離の減少により、ヒト骨髓性白血病細胞に対するCD33/CD3 BsAbの抗腫瘍効果が増強する図である。内因性CD33遺伝子座のCRISPR/Cas9媒介性欠失を伴うヒトCD33+骨髓性白血病細胞株((3A)ML-1、(3B)HL-60、(3C)K562)は、レンチウイルス遺伝子移入を介してCD33^{FL}又はCD33^{ΔE3-4}のいずれかを過剰発現するように操作された。標的タンパク質の相対的発現は、VセットドメインCD33抗体、P67.6によりフローサイトメトリーで評価され、代表的なヒストグラムが右下のパネルに示されている。次いで細胞は、1000 pg/mLの濃度のVセットドメインターゲティングCD33/CD3 BsAb及び示したエフェクター：標的(E:T)細胞比の健康な成人ボランティアから採取された非刺激末梢血単核細胞から濃縮された健康なドナーT細胞により処理された(上側パネル)。骨髓細胞はまた、示した濃度のゲムツズマブオゾガマイシン(GO)により処理された(左下のパネル)。細胞傷害性は、2日後(BsAbの場合)又は3日後(GOの場合)に、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)染色によって測定した死細胞のパーセンテージの変化として、フローサイトメトリーで定量された。

20

【図3B】細胞膜からの結合距離の減少により、ヒト骨髓性白血病細胞に対するCD33/CD3二重特異性抗体(BsAb)の抗腫瘍効果が増強する図である。内因性CD33遺伝子座のCRISPR/Cas9媒介性欠失を伴うヒトCD33+骨髓性白血病細胞株((3A)ML-1、(3B)HL-60、(3C)K562)は、レンチウイルス遺伝子移入を介してCD33^{FL}又はCD33^{ΔE3-4}のいずれかを過剰発現するように操作された。標的タンパク質の相対的発現は、VセットドメインCD33抗体、P67.6によりフローサイトメトリーで評価され、代表的なヒストグラムが右下のパネルに示されている。次いで細胞は、1000 pg/mLの濃度のVセットドメインターゲティングCD33/CD3 BsAb及び示したエフェクター：標的(E:T)細胞比の健康な成人ボランティアから採取された非刺激末梢血単核細胞から濃縮された健康なドナーT細胞により処理された(上側パネル)。骨髓細胞はまた、示した濃度のゲムツズマブオゾガマイシン(GO)により処理された(左下のパネル)。細胞傷害性は、2日後(BsAbの場合)又は3日後(GOの場合)に、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI)染色によって測定した死細胞のパーセンテージの変化として、フローサイトメトリーで定量された。

30

40

【図3C】細胞膜からの結合距離の減少により、ヒト骨髓性白血病細胞に対するCD33/CD3二重特異性抗体(BsAb)の抗腫瘍効果が増強する図である。内因性CD33遺伝子座のCRISPR/Cas9媒介性欠失を伴うヒトCD33+骨髓性白血病細胞株((3A)ML-1、(3B)HL-60、(3C)K562)は、レンチウイルス遺伝子移入を介してCD33^{FL}又はCD33^{ΔE3-4}のいずれかを過剰発現するように操作された。標的タンパク質の相対的発現は、VセットドメインCD33抗体、P67.6

50

によりフローサイトメトリーで評価され、代表的なヒストグラムが右下のパネルに示されている。次いで細胞は、 1000 pg/mL の濃度のVセットドメインターゲティングCD33/CD3 BsAb及び示したエフェクター：標的（E：T）細胞比の健康な成人ボランティアから採取された非刺激末梢血単核細胞から濃縮された健康なドナーT細胞により処理された（上側パネル）。骨髓細胞はまた、示した濃度のゲムツズマブオゾガマイシン（GO）により処理された（左下のパネル）。細胞傷害性は、2日後（BsAbの場合）又は3日後（GOの場合）に、4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール（DAPI）染色によって測定した死細胞のパーセンテージの変化として、フローサイトメトリーで定量された。抗Vセットドメイン指向CD33/CD3 BsAbは、配列番号259に示され、米国特許出願公開第2016/0317657号に記載されている配列を利用する本明細書ではRC1又はA3と呼ばれる構築物を使用してscFv-scFvフォーマットに構築された。 $*p < 0.05$ ； $**p < 0.01$ ； $***p < 0.001$ 。

【図4】細胞膜からの結合距離の減少により、CD33タンパク質を発現するように操作されたヒト急性リンパ芽球性白血病細胞に対するCD33/CD3 BsAbの抗腫瘍効果が増強する図である。ヒトCD33^{neg}急性リンパ芽球性白血病（ALL）細胞株RS4；11は、レンチウイルス遺伝子移入を介してCD33^{FL}又はCD33^{ΔE3-4}のいずれかを過剰発現するように操作された。標的タンパク質の相対的発現は、VセットドメインCD33抗体、P67.6によりフローサイトメトリーで評価され、代表的なヒストグラムが下のパネルに示されている。次いで細胞は、 1000 pg/mL の濃度のVセットドメインターゲティングCD33/CD3 BsAb及び示したエフェクター：標的（E：T）細胞比の健康な成人ボランティアから採取された非刺激末梢血単核細胞から濃縮された健康なドナーT細胞により処理された（上側パネル）。細胞傷害性は、2日後に、DAPI染色によって測定した死細胞のパーセンテージの変化として、フローサイトメトリーで定量された。抗Vセットドメイン指向CD33/CD3 BsAbは、配列番号259に示され、米国特許出願公開第2016/0317657号に記載されている配列を利用する本明細書ではRC1又はA3と呼ばれる構築物を使用してscFv-scFvフォーマットに構築された。 $*p < 0.05$ ； $**p < 0.01$ ； $***p < 0.001$ 。

【図5】細胞膜からの結合距離の増加により、CD33/CD3 BsAbの抗腫瘍効果が減少する図である。内因性CD33遺伝子座のCRISPR/Cas9媒介性欠失を伴うヒト骨髓性白血病細胞株（ML-1 [上側パネル]、K562 [下側パネル]）は、レンチウイルス遺伝子移入を介してCD33^{FL}、CD33^{FL}+CD22^{2D}又はCD33^{FL}+CD22^{4D}を過剰発現するように操作された。CD33構築物の相対的発現は、VセットドメインCD33抗体、P67.6を使用してフローサイトメトリーで評価された（右側パネル）。次いで細胞は、示した濃度（ pg/mL ）のVセットドメインターゲティングCD33/CD3 BsAb及び1：1のE：T細胞比の健康なドナーの非刺激末梢血単核細胞から濃縮された健康なドナーT細胞により処理された。細胞傷害性は、2日後に、DAPI染色によって測定した死細胞のパーセンテージの変化として、フローサイトメトリーで定量された。抗Vセットドメイン指向CD33/CD3 BsAbは、配列番号259に示され、米国特許出願公開第2016/0317657号に記載されている配列を利用する本明細書ではRC1又はA3と呼ばれる構築物を使用してscFv-scFvフォーマットに構築された。 $*p < 0.05$ ； $**p < 0.01$ ； $***p < 0.001$ 。

【図6A】ヒトCD33^{PAN}抗体クローン（クローン1A9、1H10、1B9、1E6、及び1D2）は、指示通りに、CD33+親ML-1細胞及びCD33がCRISPR/Cas9媒介性欠失したML-1細胞（「CD33 KO」）に対して並びにCD33^{FL}又はCD33^{ΔE2}を発現するように操作されているREH垂系統に対してフローサイトメトリーで試験された。一次抗体なしの対照が含まれた。

【図6B】ヒトCD33^Vセット抗体クローン（クローン2E3、2D3、及び1H8）は、指示通りに、CD33+親ML-1細胞及びCD33がCRISPR/Cas9媒介

欠失したML-1細胞（「CD33 KO」）に対して並びにCD33^{FL}又はCD33^{ΔE2}を発現するように操作されているREH亜系統に対してフローサイトメトリーで試験された。一次抗体なしの対照が含まれた。

【図7A】Carterra装置の表面プラズモン共鳴技術（SPR）の使用によって精製された抗CD33抗体から反応速度プロファイルが確立された図である。SPRは、結合相互作用の反応速度定数を推定するための優れた方法であり、この反応速度定数は、on速度（ k_a ）及びoff速度（ k_d ）を決定するために1：1ラングミュア結合モデルに適合させることができる。これらの速度パラメーターの両方は、結合親和性と称される解離速度定数（ k_D ）の計算を可能にする。抗体クローンはプロテインA／Gローン上でアレイとして捕捉され、このローンはHC30Mチップに固定されていた。第1の動態実験は完全長CD33（CD33^{FL}）抗原を使用し、これは、2nMまでの4倍滴定に先立って2μMの濃度で開始した。10のHBSTEバッファーブランクの後、続いて、アレイにプリントされた各クローンの反応速度、1分のベースライン、5分の会合、10分の解離を評価するために低濃度から高濃度までの6回の注入がアレイ上に流された。次いで、目的の第2の抗原との相互作用を阻止するアレイに結合したままのいずれかの抗原が残存する場合、チップが、プロテインA／Gローンへのクローンの同じアレイの新たな再プリントのために0.85%リン酸pH1.7で再生され、その中でCD33^{ΔE2}が抗体のアレイ上に流された。Carterra反応速度ソフトウェアが、アレイ上に注入された抗原の各濃度についての反応速度曲線に生データを適合させるためにデータを処理するために使用された。

【図7B-1】捕捉された1H10及び2D3に結合するCD33^{FL}又はCD33^{ΔE2}からの精製ECDのSPR評価。実験は、Series S CM4チップを用いてBiacoreT100器具上、25℃で実施した。pH4.0の10mM酢酸ナトリウム中60μg/mLのプロテインA／Gは、標準アミンカップリング化学反応を使用して2フローセル（1000RU）上に固定された。捕捉動態実験は、10mMのHEPES、pH7.4、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%の界面活性剤P20及び0.1mg/mLの無IgGウシ血清アルブミンバッファー中で実行した。0.5μg/mLの抗ヒトCD33抗体は、CD33^{FL}結合実験では40～58RUの抗体を捕捉するために30～40秒間、又はCD33^{ΔE2}結合実験では70～95RUの抗体を捕捉するために45～80秒間、固定されたプロテインA／Gの第2のフローセル上に10μL/分で注入された。CD33^{FL}及びCD33^{ΔE2}についての精製外部ドメインは、補足された抗体とプロテインA／G単独（参照）表面の両方の上に50μL/分で濃度系列として流された。CD33^{FL}系列は、2D3及び1H10について高濃度の160nMで開始し、CD33^{ΔE2}系列は1H10については40nMで、2D3については300nMで開始した。CD33は7分間注入され、大半の対について20又は30分間解離させておいた。外部ドメイン濃度の段階2倍希釈は、2通り、ランダム化されて実行され、4注入ごとにバッファーブランクを含んだ。CM4チップは、50μL/分での0.85%のH₃PO₄の2回30秒注入で再生され、抗体はそれぞれのCD33注入に先立って再補足された。データは二重参照され、ローカルRmaxを使用する1：1結合モデルを用いてBiaEVAL 2.0.4ソフトウェアにおいて分析された。

【図7B-2】捕捉された1H10及び2D3に結合するCD33^{FL}又はCD33^{ΔE2}からの精製ECDのSPR評価。実験は、Series S CM4チップを用いてBiacoreT100器具上、25℃で実施した。pH4.0の10mM酢酸ナトリウム中60μg/mLのプロテインA／Gは、標準アミンカップリング化学反応を使用して2フローセル（1000RU）上に固定された。捕捉動態実験は、10mMのHEPES、pH7.4、150mMのNaCl、3mMのEDTA、0.05%の界面活性剤P20及び0.1mg/mLの無IgGウシ血清アルブミンバッファー中で実行した。0.5μg/mLの抗ヒトCD33抗体は、CD33^{FL}結合実験では40～58RUの抗体を捕捉するために30～40秒間、又はCD33^{ΔE2}結合実験では70～95RUの抗体を捕捉するために45～80秒間、固定されたプロテインA／Gの第2のフローセル上に1

0 μ L / 分で注入された。CD33FL及びCD33 Δ E2についての精製外部ドメインは、補足された抗体とプロテインA/G単独（参照）表面の両方の上に50 μ L / 分で濃度系列として流された。CD33FL系列は、2D3及び1H10について高濃度の160 nMで開始し、CD33 Δ E2系列は1H10については40 nMで、2D3については300 nMで開始した。CD33は7分間注入され、大半の対について20又は30分間解離させておいた。外部ドメイン濃度の段階2倍希釈は、2通り、ランダム化されて実行され、4注入ごとにバッファブランクを含んだ。CM4チップは、50 μ L / 分での0.85%のH3PO4の2回30秒注入で再生され、抗体はそれぞれのCD33注入に先立って再補足された。データは二重参照され、ローカルRmaxを使用する1:1結合モデルを用いてBiaEva1 2.0.4ソフトウェアにおいて分析された。

10

【図8】1E6及びP67.6の内在化。AML細胞系は、37℃で指示された時間CD33抗体と一緒にインキュベートされた。次いで、蛍光標識された二次抗体が、細胞表面上に残っているCD33抗体を定量するために添加された。結果が、時間0で存在する蛍光シグナルのパーセンテージとして提示されている。

【図9】ヒトCD33^{FL}を発現するように操作されたREH細胞（ヒト急性リンパ性白血病細胞系、内因性にCD33^{neg}）へのヒトIgG1フレームワークを有する組換え完全ヒトCD33^Vセット抗体1H8の結合。

【図10】ヒトCD33^{PAN}/CD33BsAbは、ヒトCD33+AML細胞に対してT細胞媒介細胞傷害性を再誘導する。親AML細胞系は、示されるエフェクター：標的（E:T）細胞比及び様々な用量の1E6/CD33BsAbで、健康なドナーT細胞を用いて処理された。細胞傷害性は、DAPI染色により測定された場合の死細胞のパーセンテージの変化として2日後にフローサイトメトリーで定量化された。CD33rs12459419遺伝子型は丸括弧に示されている。

20

【図11】ヒトCD33^{PAN}/CD33BsAbは、ヒトAML細胞に対してT細胞媒介細胞傷害性をCD33特異的に再誘導する。親ML-1細胞及びCD33がCRISPR/Cas9媒介ノックアウト（KO）された亜系統は、1E6BsAbを示された濃度で用いて及び健康なドナーT細胞を1:1のE:Tで用いて処理された。死んだ白血病細胞は、フローサイトメトリーによって48時間後に数えられ、BsAb処理なしと比較した死細胞の変化が示されている。3つの別々の実験の平均値 $\pm$ SEMが示されている。
*** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ 。

30

【図12】ヒトCD33^{PAN}/CD33BsAbが、CD33及びエピトープに特異的な方法でヒト急性白血病細胞に対するT細胞媒介細胞傷害性を再誘導する図である。親CD33^{neg}REH細胞又はCD33^{FL}若しくはCD33 Δ E2を過剰発現するように操作された亜系統は、抗VセットCD33/CD33BsAb又は1E6BsAbを用量1000 pg/mL及び3:1のE:Tで用いて処理された。死んだ白血病細胞は、フローサイトメトリーによって48時間後に数えられ、BsAb処理なしと比較した死細胞の変化が示されている。3つの別々の実験の平均値 $\pm$ SEMが示されている。

【図13】ヒトCD33^{PAN}/CD33BsAbが、初代ヒトAML細胞に対するT細胞媒介細胞傷害性を再誘導する図である。11個の初代AML患者試料のパネルが、1E6/CD33BsAb及び示したE:T比の健康なドナーT細胞で処理された。細胞傷害性は、死細胞（4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール[DAPI]染色を使用して）と総細胞数の両方を数え上げるフローサイトメトリーにより2日後に決定した。11の患者試料に及ぶ平均細胞傷害性 $\pm$ SEMが示されている。

40

【図14-1】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長（FL）CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される（hsCD33-mmFc；配列番号2）；マウスFcドメインを有するCD33のヒト Δ E2バージョン（CD33 Δ E2）、ヒトCD33 Δ E2に対する免疫原として使用される（hsCD33- Δ E2-mmFc；配列番号3）；マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号4）及びコード（配列番号5）CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、

50

CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (mmCD33__Vセット-mmCD33__C2セット-hsCD33__Fc__hslgG1) ; マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号6) 及びコード (配列番号7) CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される ; 並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号8) 及びコード (配列番号9) CD33 ヒトCD33についての免疫原 ; ヒトΔE2タンパク質 (配列番号10) 及びコード (配列番号11) CD33 (CD33^{ΔE2})、ヒトCD33^{ΔE2}についての免疫原 ; CD33 : CD22 4Dタンパク質 (配列番号1) 及びコード配列 (配列番号135) ; CD33 : CD22 2Dタンパク質 (配列番号136) 及びコード配列 (配列番号137) ; CD33 Vセット構築物 (エクソン3及び4欠失) タンパク質 (配列番号138) 及びコード配列 (配列番号139) ; CD33シグナルペプチド (配列番号140) 及びコード配列 (配列番号141) ; 6-ヒスチジンタグ (配列番号142) 及びコード配列 (配列番号143) ; 3×グリシンリンカー及びコード配列 ; CD33 ECD (配列番号145) 及びコード配列 (配列番号146) ; CD33アミノ酸140~232を欠くCD33 ECD (配列番号147) 及びコード配列 (配列番号148) ; CD33膜貫通ドメイン (配列番号149) 及びコード配列 (配列番号150) ; CD33細胞内ドメイン (配列番号151) 及びコード配列 (配列番号152) ; Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号153) 及びコード配列 (配列番号154) ; Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号155) 及びコード配列 (配列番号156) ; 1E6/CD3二重特異性分子 (配列番号157) ; IgKシグナルペプチド (配列番号158) ; 1H10 scFv VH-VL配向 (配列番号230) ; 1H10 scFv VL-VH配向 (配列番号231) ; 1A9 scFv VH-VL配向 (配列番号232) ; 1A9 scFv VL-VH配向 (配列番号233) ; 1E6 scFv VH-VL配向 (配列番号234) ; 1E6 scFv VL-VH配向 (配列番号235) ; 2D3 scFv VH-VL配向 (配列番号236) ; 2D3 scFv VL-VH配向 (配列番号237) ; 1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (engager) (配列番号238) ; 1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (配列番号239) ; 1A9 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (engager) (配列番号240) ; 1A9 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (engager) (配列番号241) ; 1E6 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (配列番号242) ; 1E6 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (配列番号243) ; 2D3 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (配列番号244) ; 2D3 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー (配列番号245) ; ヒトCD33完全長DNAコード (細胞ベースの免疫原について使用される ; CD33シグナルペプチドコード配列は太字で) (配列番号246) ; ヒトCD33完全長タンパク質 (配列番号247) ; 並びに1H10、1A9、1E6、及び/又は1B9軽鎖シグナルペプチド (配列番号248) ; 1D2軽鎖シグナルペプチド (配列番号249) ; 1H8軽鎖シグナルペプチド (配列番号250) ; 2D3軽鎖シグナルペプチド (配列番号251) ; 1H10重鎖シグナルペプチド (配列番号252) ; 1A9重鎖シグナルペプチド (配列番号253) ; 1E6及び/又は2E3重鎖シグナルペプチド (配列番号254) ; 1D2重鎖シグナルペプチド (配列番号255) ; 1B9重鎖シグナルペプチド (配列番号256) ; 1H8重鎖シグナルペプチド (配列番号257) ; 2D3重鎖シグナルペプチド (配列番号258) ; Vセット指向CD33

10

20

30

40

50

／CD3 BsAb (RC1) (配列番号259) ; 並びにリーダー配列又はHisタグのないVセット指向CD33／CD3 BsAb (RC1) (配列番号260)。

【図14-2】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長 (FL) CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される (hsCD33-mmFc ; 配列番号2) ; マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン (CD33ΔE2)、ヒトCD33ΔE2に対する免疫原として使用される (hsCD33__ΔE2-mmFc ; 配列番号3) ; マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号4) 及びコード (配列番号5) CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (mmCD33__Vセット-mmCD33__C2セット-hsCD33__Fc__hslgG1) ; マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号6) 及びコード (配列番号7) CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される ; 並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号8) 及びコード (配列番号9) CD33 ヒトCD33についての免疫原 ; ヒトΔE2タンパク質 (配列番号10) 及びコード (配列番号11) CD33 (CD33ΔE2)、ヒトCD33ΔE2についての免疫原 ; CD33 : CD22 4Dタンパク質 (配列番号1) 及びコード配列 (配列番号135) ; CD33 : CD22 2Dタンパク質 (配列番号136) 及びコード配列 (配列番号137) ; CD33 Vセット構築物 (エクソン3及び4欠失) タンパク質 (配列番号138) 及びコード配列 (配列番号139) ; CD33シグナルペプチド (配列番号140) 及びコード配列 (配列番号141) ; 6-ヒスチジンタグ (配列番号142) 及びコード配列 (配列番号143) ; 3×グリシンリンカー及びコード配列 ; CD33 ECD (配列番号145) 及びコード配列 (配列番号146) ; CD33アミノ酸140～232を欠くCD33 ECD (配列番号147) 及びコード配列 (配列番号148) ; CD33膜貫通ドメイン (配列番号149) 及びコード配列 (配列番号150) ; CD33細胞内ドメイン (配列番号151) 及びコード配列 (配列番号152) ; Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号153) 及びコード配列 (配列番号154) ; Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号155) 及びコード配列 (配列番号156) ; 1E6／CD3二重特異性分子 (配列番号157) ; IgKシグナルペプチド (配列番号158) ; 1H10 scFv VH-VL配向 (配列番号230) ; 1H10 scFv VL-VH配向 (配列番号231) ; 1A9 scFv VH-VL配向 (配列番号232) ; 1A9 scFv VL-VH配向 (配列番号233) ; 1E6 scFv VH-VL配向 (配列番号234) ; 1E6 scFv VL-VH配向 (配列番号235) ; 2D3 scFv VH-VL配向 (配列番号236) ; 2D3 scFv VL-VH配向 (配列番号237) ; 1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (engager) (配列番号238) ; 1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号239) ; 1A9 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (engager) (配列番号240) ; 1A9 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (engager) (配列番号241) ; 1E6 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号242) ; 1E6 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号243) ; 2D3 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号244) ; 2D3 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号245) ; ヒトCD33完全長DNAコード (細胞ベースの免疫

10

20

30

40

50

原について使用される；CD33シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号246）；ヒトCD33完全長タンパク質（配列番号247）；並びに1H10、1A9、1E6、及び／又は1B9軽鎖シグナルペプチド（配列番号248）；1D2軽鎖シグナルペプチド（配列番号249）；1H8軽鎖シグナルペプチド（配列番号250）；2D3軽鎖シグナルペプチド（配列番号251）；1H10重鎖シグナルペプチド（配列番号252）；1A9重鎖シグナルペプチド（配列番号253）；1E6及び／又は2E3重鎖シグナルペプチド（配列番号254）；1D2重鎖シグナルペプチド（配列番号255）；1B9重鎖シグナルペプチド（配列番号256）；1H8重鎖シグナルペプチド（配列番号257）；2D3重鎖シグナルペプチド（配列番号258）；Vセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号259）；並びにリーダー配列又はHisタグのないVセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号260）。

【図14-3】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長（FL）CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される（hsCD33-mmFc；配列番号2）；マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン（CD33ΔE2）、ヒトCD33ΔE2に対する免疫原として使用される（hsCD33__ΔE2-mmFc；配列番号3）；マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号4）及びコード（配列番号5）CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される（mmCD33__Vセット-mmCD33__C2セット-hsCD33__Fc__hslgG1）；マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号6）及びコード（配列番号7）CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される；並びに完全長ヒトタンパク質（配列番号8）及びコード（配列番号9）CD33 ヒトCD33についての免疫原；ヒトΔE2タンパク質（配列番号10）及びコード（配列番号11）CD33（CD33ΔE2）、ヒトCD33ΔE2についての免疫原）；CD33：CD22 4Dタンパク質（配列番号1）及びコード配列（配列番号135）；CD33：CD22 2Dタンパク質（配列番号136）及びコード配列（配列番号137）；CD33 Vセット構築物（エクソン3及び4欠失）タンパク質（配列番号138）及びコード配列（配列番号139）；CD33シグナルペプチド（配列番号140）及びコード配列（配列番号141）；6-ヒスチジンタグ（配列番号142）及びコード配列（配列番号143）；3×グリシンリンカー及びコード配列；CD33 ECD（配列番号145）及びコード配列（配列番号146）；CD33アミノ酸140～232を欠くCD33 ECD（配列番号147）及びコード配列（配列番号148）；CD33膜貫通ドメイン（配列番号149）及びコード配列（配列番号150）；CD33細胞内ドメイン（配列番号151）及びコード配列（配列番号152）；Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部（配列番号153）及びコード配列（配列番号154）；Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部（配列番号155）及びコード配列（配列番号156）；1E6／CD3二重特異性分子（配列番号157）；IgKシグナルペプチド（配列番号158）；1H10 scFv VH-VL配向（配列番号230）；1H10 scFv VL-VH配向（配列番号231）；1A9 scFv VH-VL配向（配列番号232）；1A9 scFv VL-VH配向（配列番号233）；1E6 scFv VH-VL配向（配列番号234）；1E6 scFv VL-VH配向（配列番号235）；2D3 scFv VH-VL配向（配列番号236）；2D3 scFv VL-VH配向（配列番号237）；1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号238）；1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体C

10

20

30

40

50

D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 3 9）；1 A 9 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（e n g a g e r）（配列番号 2 4 0）；1 A 9 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（e n g a g e r）（配列番号 2 4 1）；1 E 6 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 2）；1 E 6 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 3）；2 D 3 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 4）；2 D 3 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 5）；ヒト C D 3 3 完全長 D N A コード（細胞ベースの免疫原について使用される；C D 3 3 シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号 2 4 6）；ヒト C D 3 3 完全長タンパク質（配列番号 2 4 7）；並びに 1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、及び／又は 1 B 9 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 4 8）；1 D 2 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 4 9）；1 H 8 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 0）；2 D 3 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 1）；1 H 1 0 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 2）；1 A 9 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 3）；1 E 6 及び／又は 2 E 3 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 4）；1 D 2 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 5）；1 B 9 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 6）；1 H 8 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 7）；2 D 3 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 8）；V セット指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b（R C 1）（配列番号 2 5 9）；並びにリーダー配列又は H i s タグのない V セット指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b（R C 1）（配列番号 2 6 0）。

【図 1 4 - 4】開示を支える配列：マウス F c ドメインを有するヒト完全長（F L）C D 3 3、ヒト F L C D 3 3 に対して免疫原として使用される（h s C D 3 3 - m m F c；配列番号 2）；マウス F c ドメインを有する C D 3 3 のヒト Δ E 2 バージョン（C D 3 3 Δ E 2）、ヒト C D 3 3 Δ E 2 に対する免疫原として使用される（h s C D 3 3 _ Δ E 2 - m m F c；配列番号 3）；マウス由来の C 2 セット I g 様ドメインが、ヒト C D 3 3 由来の C 2 セット I g 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の E C D（配列番号 4）及びコード（配列番号 5）C D 3 3、ヒト I g G 1 由来の F c 領域と組み合わせられ、C D 3 3 のヒト C 2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される（m m C D 3 3 _ V セット - m m C D 3 3 _ C 2 セット - h s C D 3 3 _ F c _ h s l g G 1）；マウス由来の C 2 セット I g 様ドメインがヒト C D 3 3 由来の C 2 セット I g 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の E C D（配列番号 6）及びコード（配列番号 7）C D 3 3、両方ともヒト C D 3 3 由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、C D 3 3 のヒト C 2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される；並びに完全長ヒトタンパク質（配列番号 8）及びコード（配列番号 9）C D 3 3 ヒト C D 3 3 についての免疫原；ヒト Δ E 2 タンパク質（配列番号 1 0）及びコード（配列番号 1 1）C D 3 3（C D 3 3 Δ E 2）、ヒト C D 3 3 Δ E 2 についての免疫原）；C D 3 3：C D 2 2 4 D タンパク質（配列番号 1）及びコード配列（配列番号 1 3 5）；C D 3 3：C D 2 2 2 D タンパク質（配列番号 1 3 6）及びコード配列（配列番号 1 3 7）；C D 3 3 V セット構築物（エクソン 3 及び 4 欠失）タンパク質（配列番号 1 3 8）及びコード配列（配列番号 1 3 9）；C D 3 3 シグナルペプチド（配列番号 1 4 0）及びコード配列（配列番号 1 4 1）；6 - ヒスチジンタグ（配列番号 1 4 2）及びコード配列（配列番号 1 4 3）；3 × グリシンリンカー及びコード配列；C D 3 3 E C D（配列番号 1 4 5）及びコード配列（配列番号 1 4 6）；C D 3 3 アミノ酸 1 4 0 ~ 2 3 2 を欠く C D 3 3 E C D（配列番号 1 4 7）及びコード配列（配列番号 1 4 8）；C D 3 3 膜貫通ドメイン（配列番号 1 4 9）及びコード配列（配列番号 1 5 0）；C D 3 3 細胞内ドメイン（配列番号 1 5 1）及びコード配列（配列番号 1 5 2）；I g 様 C 2 - タイプ 3、I g 様 C 2 - タイプ 4、I g 様 C 2 - タイプ 5、I g 様 C 2 - タイプ 6 として定義される C D 2 2 ドメインを含有する C D 2 2 E C D の一部分（配列番号 1 5 3）及びコード配列（配列番号 1 5 4）；I g 様 C 2 - タイプ 5、I g 様 C 2 - タイプ 6 として定義される C D 2 2 ドメインを含有する C D 2 2 E C D の一部分（配列番号

155) 及びコード配列 (配列番号 156) ; 1E6 / CD3 二重特異性分子 (配列番号 157) ; IgK シグナルペプチド (配列番号 158) ; 1H10 scFv VH-VL 配向 (配列番号 230) ; 1H10 scFv VL-VH 配向 (配列番号 231) ; 1A9 scFv VH-VL 配向 (配列番号 232) ; 1A9 scFv VL-VH 配向 (配列番号 233) ; 1E6 scFv VH-VL 配向 (配列番号 234) ; 1E6 scFv VL-VH 配向 (配列番号 235) ; 2D3 scFv VH-VL 配向 (配列番号 236) ; 2D3 scFv VL-VH 配向 (配列番号 237) ; 1H10 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 238) ; 1H10 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (配列番号 239) ; 1A9 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 240) ; 1A9 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 241) ; 1E6 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (配列番号 242) ; 1E6 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (配列番号 243) ; 2D3 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (配列番号 244) ; 2D3 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (配列番号 245) ; ヒト CD33 完全長 DNA コード (細胞ベースの免疫原について使用される ; CD33 シグナルペプチドコード配列は太字で) (配列番号 246) ; ヒト CD33 完全長タンパク質 (配列番号 247) ; 並びに 1H10、1A9、1E6、及び / 又は 1B9 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 248) ; 1D2 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 249) ; 1H8 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 250) ; 2D3 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 251) ; 1H10 重鎖シグナルペプチド (配列番号 252) ; 1A9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 253) ; 1E6 及び / 又は 2E3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 254) ; 1D2 重鎖シグナルペプチド (配列番号 255) ; 1B9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 256) ; 1H8 重鎖シグナルペプチド (配列番号 257) ; 2D3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 258) ; V セット指向 CD33 / CD3 BsAb (RC1) (配列番号 259) ; 並びにリーダー配列又は His タグのない V セット指向 CD33 / CD3 BsAb (RC1) (配列番号 260) 。

【図 14-5】開示を支える配列 : マウス Fc ドメインを有するヒト完全長 (FL) CD33、ヒト FL CD33 に対して免疫原として使用される (hsCD33-mmFc ; 配列番号 2) ; マウス Fc ドメインを有する CD33 のヒト ΔE2 バージョン (CD33^{ΔE2})、ヒト CD33^{ΔE2} に対する免疫原として使用される (hsCD33-ΔE2-mmFc ; 配列番号 3) ; マウス由来の C2 セット Ig 様ドメインが、ヒト CD33 由来の C2 セット Ig 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の ECD (配列番号 4) 及びコード (配列番号 5) CD33、ヒト IgG1 由来の Fc 領域と組み合わせられ、CD33 のヒト C2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (mmCD33-V セット-mmCD33-C2 セット-hsCD33-Fc-hsIgG1) ; マウス由来の C2 セット Ig 様ドメインがヒト CD33 由来の C2 セット Ig 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の ECD (配列番号 6) 及びコード (配列番号 7) CD33、両方ともヒト CD33 由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33 のヒト C2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される ; 並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号 8) 及びコード (配列番号 9) CD33 ヒト CD33 についての免疫原 ; ヒト ΔE2 タンパク質 (配列番号 10) 及びコード (配列番号 11) CD33 (CD33^{ΔE2})、ヒト CD33^{ΔE2} についての免疫原 ; CD33 : CD22 4D タンパク質 (配列番号 1) 及びコード配列 (配列番号 135) ; CD33 : CD22 2D タンパク質 (配列番号 136) 及びコード配列 (配列番号 137) ; CD33 V セット構築物 (エクソン 3 及び 4 欠失) タンパク質 (配列番号 138) 及びコード配列 (配列番号 139) ; CD33 シグナルペプチド (配列番号 140) 及びコード配列 (配列番号 141) ; 6-ヒスチジンタグ (配列番号

10

20

30

40

50

142) 及びコード配列 (配列番号 143) ; 3×グリシンリンカー及びコード配列 ; CD33 ECD (配列番号 145) 及びコード配列 (配列番号 146) ; CD33 アミノ酸 140~232 を欠く CD33 ECD (配列番号 147) 及びコード配列 (配列番号 148) ; CD33 膜貫通ドメイン (配列番号 149) 及びコード配列 (配列番号 150) ; CD33 細胞内ドメイン (配列番号 151) 及びコード配列 (配列番号 152) ; Ig 様 C2-タイプ 3、Ig 様 C2-タイプ 4、Ig 様 C2-タイプ 5、Ig 様 C2-タイプ 6 として定義される CD22 ドメインを含有する CD22 ECD の一部分 (配列番号 153) 及びコード配列 (配列番号 154) ; Ig 様 C2-タイプ 5、Ig 様 C2-タイプ 6 として定義される CD22 ドメインを含有する CD22 ECD の一部分 (配列番号 155) 及びコード配列 (配列番号 156) ; 1E6/CD3 二重特異性分子 (配列番号 157) ; IgK シグナルペプチド (配列番号 158) ; 1H10 scFv VH-VL 配向 (配列番号 230) ; 1H10 scFv VL-VH 配向 (配列番号 231) ; 1A9 scFv VH-VL 配向 (配列番号 232) ; 1A9 scFv VL-VH 配向 (配列番号 233) ; 1E6 scFv VH-VL 配向 (配列番号 234) ; 1E6 scFv VL-VH 配向 (配列番号 235) ; 2D3 scFv VH-VL 配向 (配列番号 236) ; 2D3 scFv VL-VH 配向 (配列番号 237) ; 1H10 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 238) ; 1H10 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (配列番号 239) ; 1A9 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 240) ; 1A9 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 241) ; 1E6 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (配列番号 242) ; 1E6 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (配列番号 243) ; 2D3 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (配列番号 244) ; 2D3 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33/CD3 エンゲージャー (配列番号 245) ; ヒト CD33 完全長 DNA コード (細胞ベースの免疫原について使用される ; CD33 シグナルペプチドコード配列は太字で) (配列番号 246) ; ヒト CD33 完全長タンパク質 (配列番号 247) ; 並びに 1H10、1A9、1E6、及び/又は 1B9 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 248) ; 1D2 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 249) ; 1H8 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 250) ; 2D3 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 251) ; 1H10 重鎖シグナルペプチド (配列番号 252) ; 1A9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 253) ; 1E6 及び/又は 2E3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 254) ; 1D2 重鎖シグナルペプチド (配列番号 255) ; 1B9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 256) ; 1H8 重鎖シグナルペプチド (配列番号 257) ; 2D3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 258) ; V セット指向 CD33/CD3 BsAb (RC1) (配列番号 259) ; 並びにリーダー配列又は His タグのない V セット指向 CD33/CD3 BsAb (RC1) (配列番号 260)。

【図 14-6】開示を支える配列 : マウス Fc ドメインを有するヒト完全長 (FL) CD33、ヒト FL CD33 に対して免疫原として使用される (hsCD33-mmFc ; 配列番号 2) ; マウス Fc ドメインを有する CD33 のヒト ΔE2 バージョン (CD33^{ΔE2})、ヒト CD33^{ΔE2} に対する免疫原として使用される (hsCD33-ΔE2-mmFc ; 配列番号 3) ; マウス由来の C2 セット Ig 様ドメインが、ヒト CD33 由来の C2 セット Ig 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の ECD (配列番号 4) 及びコード (配列番号 5) CD33、ヒト IgG1 由来の Fc 領域と組み合わせられ、CD33 のヒト C2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (mmCD33-V セット-mmCD33-C2 セット-hsCD33-Fc-hsIgG1) ; マウス由来の C2 セット Ig 様ドメインがヒト CD33 由来の C2 セット Ig 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の ECD (配列番号 6) 及びコード (配列番号 7) CD33、両方ともヒト CD33 由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ド

10

20

30

40

50

メインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される；並びに完全長ヒトタンパク質（配列番号8）及びコード（配列番号9）CD33 ヒトCD33についての免疫原；ヒトΔE2タンパク質（配列番号10）及びコード（配列番号11）CD33（CD33^{ΔE2}）、ヒトCD33^{ΔE2}についての免疫原；CD33：CD22 4Dタンパク質（配列番号1）及びコード配列（配列番号135）；CD33：CD22 2Dタンパク質（配列番号136）及びコード配列（配列番号137）；CD33 Vセット構築物（エクソン3及び4欠失）タンパク質（配列番号138）及びコード配列（配列番号139）；CD33シグナルペプチド（配列番号140）及びコード配列（配列番号141）；6-ヒスチジンタグ（配列番号142）及びコード配列（配列番号143）；3×グリシンリンカー及びコード配列；CD33 ECD（配列番号145）及びコード配列（配列番号146）；CD33アミノ酸140～232を欠くCD33 ECD（配列番号147）及びコード配列（配列番号148）；CD33膜貫通ドメイン（配列番号149）及びコード配列（配列番号150）；CD33細胞内ドメイン（配列番号151）及びコード配列（配列番号152）；Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部（配列番号153）及びコード配列（配列番号154）；Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部（配列番号155）及びコード配列（配列番号156）；1E6／CD3二重特異性分子（配列番号157）；IgKシグナルペプチド（配列番号158）；1H10 scFv VH-VL配向（配列番号230）；1H10 scFv VL-VH配向（配列番号231）；1A9 scFv VH-VL配向（配列番号232）；1A9 scFv VL-VH配向（配列番号233）；1E6 scFv VH-VL配向（配列番号234）；1E6 scFv VL-VH配向（配列番号235）；2D3 scFv VH-VL配向（配列番号236）；2D3 scFv VL-VH配向（配列番号237）；1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号238）；1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号239）；1A9 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号240）；1A9 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号241）；1E6 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号242）；1E6 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号243）；2D3 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号244）；2D3 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号245）；ヒトCD33完全長DNAコード（細胞ベースの免疫原について使用される；CD33シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号246）；ヒトCD33完全長タンパク質（配列番号247）；並びに1H10、1A9、1E6、及び／又は1B9軽鎖シグナルペプチド（配列番号248）；1D2軽鎖シグナルペプチド（配列番号249）；1H8軽鎖シグナルペプチド（配列番号250）；2D3軽鎖シグナルペプチド（配列番号251）；1H10重鎖シグナルペプチド（配列番号252）；1A9重鎖シグナルペプチド（配列番号253）；1E6及び／又は2E3重鎖シグナルペプチド（配列番号254）；1D2重鎖シグナルペプチド（配列番号255）；1B9重鎖シグナルペプチド（配列番号256）；1H8重鎖シグナルペプチド（配列番号257）；2D3重鎖シグナルペプチド（配列番号258）；Vセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号259）；並びにリーダー配列又はHisタグのないVセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号260）。

【図14-7】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長（FL）CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される（hsCD33-mmFc；配列番号2）；マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン（CD33^Δ

10

20

30

40

50

E^2 ）、ヒトCD33 ΔE^2 に対する免疫原として使用される（hsCD33 ΔE^2 -mmFc；配列番号3）；マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号4）及びコード（配列番号5）CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される（mmCD33 ΔE^2 -Vセット-mmCD33 ΔE^2 -C2セット-hsCD33 ΔE^2 -Fc-hsIgG1）；マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号6）及びコード（配列番号7）CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される；並びに完全長ヒトタンパク質（配列番号8）及びコード（配列番号9）CD33 ヒトCD33についての免疫原；ヒト ΔE^2 タンパク質（配列番号10）及びコード（配列番号11）CD33（CD33 ΔE^2 ）、ヒトCD33 ΔE^2 についての免疫原）；CD33：CD22 4Dタンパク質（配列番号1）及びコード配列（配列番号135）；CD33：CD22 2Dタンパク質（配列番号136）及びコード配列（配列番号137）；CD33 Vセット構築物（エクソン3及び4欠失）タンパク質（配列番号138）及びコード配列（配列番号139）；CD33シグナルペプチド（配列番号140）及びコード配列（配列番号141）；6-ヒスチジンタグ（配列番号142）及びコード配列（配列番号143）；3×グリシンリンカー及びコード配列；CD33 ECD（配列番号145）及びコード配列（配列番号146）；CD33アミノ酸140～232を欠くCD33 ECD（配列番号147）及びコード配列（配列番号148）；CD33膜貫通ドメイン（配列番号149）及びコード配列（配列番号150）；CD33細胞内ドメイン（配列番号151）及びコード配列（配列番号152）；Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部分（配列番号153）及びコード配列（配列番号154）；Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部分（配列番号155）及びコード配列（配列番号156）；1E6／CD3二重特異性分子（配列番号157）；IgKシグナルペプチド（配列番号158）；1H10 scFv VH-VL配向（配列番号230）；1H10 scFv VL-VH配向（配列番号231）；1A9 scFv VH-VL配向（配列番号232）；1A9 scFv VL-VH配向（配列番号233）；1E6 scFv VH-VL配向（配列番号234）；1E6 scFv VL-VH配向（配列番号235）；2D3 scFv VH-VL配向（配列番号236）；2D3 scFv VL-VH配向（配列番号237）；1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号238）；1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号239）；1A9 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号240）；1A9 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号241）；1E6 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号242）；1E6 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号243）；2D3 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号244）；2D3 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号245）；ヒトCD33完全長DNAコード（細胞ベースの免疫原について使用される；CD33シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号246）；ヒトCD33完全長タンパク質（配列番号247）；並びに1H10、1A9、1E6、及び／又は1B9軽鎖シグナルペプチド（配列番号248）；1D2軽鎖シグナルペプチド（配列番号249）；1H8軽鎖シグナルペプチド（配列番号250）；2D3軽鎖シグナルペプチド（配列番号251）；1H10重鎖シグナルペプチド（配列番号2

10

20

30

40

50

52) ; 1A9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 253) ; 1E6 及び / 又は 2E3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 254) ; 1D2 重鎖シグナルペプチド (配列番号 255) ; 1B9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 256) ; 1H8 重鎖シグナルペプチド (配列番号 257) ; 2D3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 258) ; V セット指向 CD33 / CD3 BsAb (RC1) (配列番号 259) ; 並びにリーダー配列又は His タグのない V セット指向 CD33 / CD3 BsAb (RC1) (配列番号 260) 。

【図 14-8】開示を支える配列：マウス Fc ドメインを有するヒト完全長 (FL) CD33、ヒト FL CD33 に対して免疫原として使用される (hsCD33-mmFc ; 配列番号 2) ; マウス Fc ドメインを有する CD33 のヒト ΔE2 バージョン (CD33^{ΔE2})、ヒト CD33^{ΔE2} に対する免疫原として使用される (hsCD33__ΔE2-mmFc ; 配列番号 3) ; マウス由来の C2 セット Ig 様ドメインが、ヒト CD33 由来の C2 セット Ig 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の ECD (配列番号 4) 及びコード (配列番号 5) CD33、ヒト IgG1 由来の Fc 領域と組み合わせられ、CD33 のヒト C2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (mmCD33__V セット-mmCD33__C2 セット-hsCD33__Fc__hslgG1) ; マウス由来の C2 セット Ig 様ドメインがヒト CD33 由来の C2 セット Ig 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の ECD (配列番号 6) 及びコード (配列番号 7) CD33、両方ともヒト CD33 由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33 のヒト C2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される ; 並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号 8) 及びコード (配列番号 9) CD33 ヒト CD33 についての免疫原 ; ヒト ΔE2 タンパク質 (配列番号 10) 及びコード (配列番号 11) CD33 (CD33^{ΔE2})、ヒト CD33^{ΔE2} についての免疫原 ; CD33 : CD22 4D タンパク質 (配列番号 1) 及びコード配列 (配列番号 135) ; CD33 : CD22 2D タンパク質 (配列番号 136) 及びコード配列 (配列番号 137) ; CD33 V セット構築物 (エクソン 3 及び 4 欠失) タンパク質 (配列番号 138) 及びコード配列 (配列番号 139) ; CD33 シグナルペプチド (配列番号 140) 及びコード配列 (配列番号 141) ; 6-ヒスチジンタグ (配列番号 142) 及びコード配列 (配列番号 143) ; 3×グリシンリンカー及びコード配列 ; CD33 ECD (配列番号 145) 及びコード配列 (配列番号 146) ; CD33 アミノ酸 140~232 を欠く CD33 ECD (配列番号 147) 及びコード配列 (配列番号 148) ; CD33 膜貫通ドメイン (配列番号 149) 及びコード配列 (配列番号 150) ; CD33 細胞内ドメイン (配列番号 151) 及びコード配列 (配列番号 152) ; Ig 様 C2-タイプ 3、Ig 様 C2-タイプ 4、Ig 様 C2-タイプ 5、Ig 様 C2-タイプ 6 として定義される CD22 ドメインを含有する CD22 ECD の一部分 (配列番号 153) 及びコード配列 (配列番号 154) ; Ig 様 C2-タイプ 5、Ig 様 C2-タイプ 6 として定義される CD22 ドメインを含有する CD22 ECD の一部分 (配列番号 155) 及びコード配列 (配列番号 156) ; 1E6 / CD3 二重特異性分子 (配列番号 157) ; IgK シグナルペプチド (配列番号 158) ; 1H10 scFv VH-VL 配向 (配列番号 230) ; 1H10 scFv VL-VH 配向 (配列番号 231) ; 1A9 scFv VH-VL 配向 (配列番号 232) ; 1A9 scFv VL-VH 配向 (配列番号 233) ; 1E6 scFv VH-VL 配向 (配列番号 234) ; 1E6 scFv VL-VH 配向 (配列番号 235) ; 2D3 scFv VH-VL 配向 (配列番号 236) ; 2D3 scFv VL-VH 配向 (配列番号 237) ; 1H10 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 238) ; 1H10 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (配列番号 239) ; 1A9 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 240) ; 1A9 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (engager) (配列番号 241) ; 1E6 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 CD33 / CD3 エンゲージャー (配列番号 242) ; 1E6 scFv VL

10

20

30

40

50

－VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号243）；2D3 scFv VH－VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号244）；2D3 scFv VL－VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号245）；ヒトCD33完全長DNAコード（細胞ベースの免疫原について使用される；CD33シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号246）；ヒトCD33完全長タンパク質（配列番号247）；並びに1H10、1A9、1E6、及び／又は1B9軽鎖シグナルペプチド（配列番号248）；1D2軽鎖シグナルペプチド（配列番号249）；1H8軽鎖シグナルペプチド（配列番号250）；2D3軽鎖シグナルペプチド（配列番号251）；1H10重鎖シグナルペプチド（配列番号252）；1A9重鎖シグナルペプチド（配列番号253）；1E6及び／又は2E3重鎖シグナルペプチド（配列番号254）；1D2重鎖シグナルペプチド（配列番号255）；1B9重鎖シグナルペプチド（配列番号256）；1H8重鎖シグナルペプチド（配列番号257）；2D3重鎖シグナルペプチド（配列番号258）；Vセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号259）；並びにリーダー配列又はHisタグのないVセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号260）。

【図14－9】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長（FL）CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される（hsCD33－mmFc；配列番号2）；マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン（CD33ΔE2）、ヒトCD33ΔE2に対する免疫原として使用される（hsCD33__ΔE2－mmFc；配列番号3）；マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号4）及びコード（配列番号5）CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される（mmCD33__Vセット－mmCD33__C2セット－hsCD33__Fc__hslgG1）；マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号6）及びコード（配列番号7）CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される；並びに完全長ヒトタンパク質（配列番号8）及びコード（配列番号9）CD33 ヒトCD33についての免疫原；ヒトΔE2タンパク質（配列番号10）及びコード（配列番号11）CD33（CD33ΔE2）、ヒトCD33ΔE2についての免疫原）；CD33：CD22 4Dタンパク質（配列番号1）及びコード配列（配列番号135）；CD33：CD22 2Dタンパク質（配列番号136）及びコード配列（配列番号137）；CD33 Vセット構築物（エクソン3及び4欠失）タンパク質（配列番号138）及びコード配列（配列番号139）；CD33シグナルペプチド（配列番号140）及びコード配列（配列番号141）；6－ヒスチジンタグ（配列番号142）及びコード配列（配列番号143）；3×グリシンリンカー及びコード配列；CD33 ECD（配列番号145）及びコード配列（配列番号146）；CD33アミノ酸140～232を欠くCD33 ECD（配列番号147）及びコード配列（配列番号148）；CD33膜貫通ドメイン（配列番号149）及びコード配列（配列番号150）；CD33細胞内ドメイン（配列番号151）及びコード配列（配列番号152）；Ig様C2－タイプ3、Ig様C2－タイプ4、Ig様C2－タイプ5、Ig様C2－タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部（配列番号153）及びコード配列（配列番号154）；Ig様C2－タイプ5、Ig様C2－タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部（配列番号155）及びコード配列（配列番号156）；1E6／CD3二重特異性分子（配列番号157）；IgKシグナルペプチド（配列番号158）；1H10 scFv VH－VL配向（配列番号230）；1H10 scFv VL－VH配向（配列番号231）；1A9 scFv VH－VL配向（配列番号232）；1A9 scFv VL－VH配向（配列番号233）；1E6 scFv VH－VL配向（配列番号234）；1E

10

20

30

40

50

6 s c F v V L - V H 配向 (配列番号 2 3 5) ; 2 D 3 s c F v V H - V L 配向 (配列番号 2 3 6) ; 2 D 3 s c F v V L - V H 配向 (配列番号 2 3 7) ; 1 H 1 0 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (e n g a g e r) (配列番号 2 3 8) ; 1 H 1 0 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (配列番号 2 3 9) ; 1 A 9 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (e n g a g e r) (配列番号 2 4 0) ; 1 A 9 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (e n g a g e r) (配列番号 2 4 1) ; 1 E 6 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (配列番号 2 4 2) ; 1 E 6 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (配列番号 2 4 3) ; 2 D 3 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (配列番号 2 4 4) ; 2 D 3 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー (配列番号 2 4 5) ; ヒト C D 3 3 完全長 D N A コード (細胞ベースの免疫原について使用される ; C D 3 3 シグナルペプチドコード配列は太字で) (配列番号 2 4 6) ; ヒト C D 3 3 完全長タンパク質 (配列番号 2 4 7) ; 並びに 1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、及び / 又は 1 B 9 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 2 4 8) ; 1 D 2 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 2 4 9) ; 1 H 8 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 0) ; 2 D 3 軽鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 1) ; 1 H 1 0 重鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 2) ; 1 A 9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 3) ; 1 E 6 及び / 又は 2 E 3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 4) ; 1 D 2 重鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 5) ; 1 B 9 重鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 6) ; 1 H 8 重鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 7) ; 2 D 3 重鎖シグナルペプチド (配列番号 2 5 8) ; V セット指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b (R C 1) (配列番号 2 5 9) ; 並びにリーダー配列又は H i s タグのない V セット指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b (R C 1) (配列番号 2 6 0) 。

【図 1 4 - 1 0】開示を支える配列 : マウス F c ドメインを有するヒト完全長 (F L) C D 3 3、ヒト F L C D 3 3 に対して免疫原として使用される (h s C D 3 3 - m m F c ; 配列番号 2) ; マウス F c ドメインを有する C D 3 3 のヒト Δ E 2 バージョン (C D 3 3 Δ E 2)、ヒト C D 3 3 Δ E 2 に対する免疫原として使用される (h s C D 3 3 _ Δ E 2 - m m F c ; 配列番号 3) ; マウス由来の C 2 セット I g 様ドメインが、ヒト C D 3 3 由来の C 2 セット I g 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の E C D (配列番号 4) 及びコード (配列番号 5) C D 3 3、ヒト I g G 1 由来の F c 領域と組み合わせられ、C D 3 3 のヒト C 2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (m m C D 3 3 _ V セット - m m C D 3 3 _ C 2 セット - h s C D 3 3 _ F c _ h s l g G 1) ; マウス由来の C 2 セット I g 様ドメインがヒト C D 3 3 由来の C 2 セット I g 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の E C D (配列番号 6) 及びコード (配列番号 7) C D 3 3、両方ともヒト C D 3 3 由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、C D 3 3 のヒト C 2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される ; 並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号 8) 及びコード (配列番号 9) C D 3 3 ヒト C D 3 3 についての免疫原 ; ヒト Δ E 2 タンパク質 (配列番号 1 0) 及びコード (配列番号 1 1) C D 3 3 (C D 3 3 Δ E 2)、ヒト C D 3 3 Δ E 2 についての免疫原) ; C D 3 3 : C D 2 2 4 D タンパク質 (配列番号 1) 及びコード配列 (配列番号 1 3 5) ; C D 3 3 : C D 2 2 2 D タンパク質 (配列番号 1 3 6) 及びコード配列 (配列番号 1 3 7) ; C D 3 3 V セット構築物 (エクソン 3 及び 4 欠失) タンパク質 (配列番号 1 3 8) 及びコード配列 (配列番号 1 3 9) ; C D 3 3 シグナルペプチド (配列番号 1 4 0) 及びコード配列 (配列番号 1 4 1) ; 6 - ヒスチジンタグ (配列番号 1 4 2) 及びコード配列 (配列番号 1 4 3) ; 3 × グリシンリンカー及びコード配列 ; C D 3 3 E C D (配列番号 1 4 5) 及びコード配列 (配列番号 1 4 6) ; C D 3 3 アミノ酸 1 4 0 ~ 2 3 2 を欠く C D 3 3 E C D (配列番号 1 4 7) 及びコード配列 (配列番号 1 4 8) ; C D 3 3 膜貫通ドメイン (配列番号 1 4 9) 及びコード配列 (配列番号 1 5 0) ; C D 3 3 細胞内ドメイン (配列番号 1 5 1) 及びコード配列 (配列番号 1 5 2) ;

I g 様 C 2 -タイプ 3、I g 様 C 2 -タイプ 4、I g 様 C 2 -タイプ 5、I g 様 C 2 -タイプ 6 として定義される C D 2 2 ドメインを含有する C D 2 2 E C D の一部分（配列番号 1 5 3）及びコード配列（配列番号 1 5 4）；I g 様 C 2 -タイプ 5、I g 様 C 2 -タイプ 6 として定義される C D 2 2 ドメインを含有する C D 2 2 E C D の一部分（配列番号 1 5 5）及びコード配列（配列番号 1 5 6）；1 E 6 / C D 3 二重特異性分子（配列番号 1 5 7）；I g K シグナルペプチド（配列番号 1 5 8）；1 H 1 0 s c F v V H - V L 配向（配列番号 2 3 0）；1 H 1 0 s c F v V L - V H 配向（配列番号 2 3 1）；1 A 9 s c F v V H - V L 配向（配列番号 2 3 2）；1 A 9 s c F v V L - V H 配向（配列番号 2 3 3）；1 E 6 s c F v V H - V L 配向（配列番号 2 3 4）；1 E 6 s c F v V L - V H 配向（配列番号 2 3 5）；2 D 3 s c F v V H - V L 配向（配列番号 2 3 6）；2 D 3 s c F v V L - V H 配向（配列番号 2 3 7）；1 H 1 0 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（e n g a g e r）（配列番号 2 3 8）；1 H 1 0 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 3 9）；1 A 9 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（e n g a g e r）（配列番号 2 4 0）；1 A 9 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（e n g a g e r）（配列番号 2 4 1）；1 E 6 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 2）；1 E 6 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 3）；2 D 3 s c F v V H - V L 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 4）；2 D 3 s c F v V L - V H 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージャー（配列番号 2 4 5）；ヒト C D 3 3 完全長 D N A コード（細胞ベースの免疫原について使用される；C D 3 3 シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号 2 4 6）；ヒト C D 3 3 完全長タンパク質（配列番号 2 4 7）；並びに 1 H 1 0、1 A 9、1 E 6、及び / 又は 1 B 9 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 4 8）；1 D 2 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 4 9）；1 H 8 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 0）；2 D 3 軽鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 1）；1 H 1 0 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 2）；1 A 9 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 3）；1 E 6 及び / 又は 2 E 3 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 4）；1 D 2 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 5）；1 B 9 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 6）；1 H 8 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 7）；2 D 3 重鎖シグナルペプチド（配列番号 2 5 8）；V セット指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b（R C 1）（配列番号 2 5 9）；並びにリーダー配列又は H i s タグのない V セット指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b（R C 1）（配列番号 2 6 0）。

【図 1 4 - 1 1】開示を支える配列：マウス F c ドメインを有するヒト完全長（F L）C D 3 3、ヒト F L C D 3 3 に対して免疫原として使用される（h s C D 3 3 - m m F c；配列番号 2）；マウス F c ドメインを有する C D 3 3 のヒト Δ E 2 バージョン（C D 3 3 Δ E 2）、ヒト C D 3 3 Δ E 2 に対する免疫原として使用される（h s C D 3 3 _ Δ E 2 - m m F c；配列番号 3）；マウス由来の C 2 セット I g 様ドメインが、ヒト C D 3 3 由来の C 2 セット I g 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の E C D（配列番号 4）及びコード（配列番号 5）C D 3 3、ヒト I g G 1 由来の F c 領域と組み合わせられ、C D 3 3 のヒト C 2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される（m m C D 3 3 _ V セット - m m C D 3 3 _ C 2 セット - h s C D 3 3 _ F c _ h s l g G 1）；マウス由来の C 2 セット I g 様ドメインがヒト C D 3 3 由来の C 2 セット I g 様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質の E C D（配列番号 6）及びコード（配列番号 7）C D 3 3、両方ともヒト C D 3 3 由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、C D 3 3 のヒト C 2 セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される；並びに完全長ヒトタンパク質（配列番号 8）及びコード（配列番号 9）C D 3 3 ヒト C D 3 3 についての免疫原；ヒト Δ E 2 タンパク質（配列番号 1 0）及びコード（配列番号 1 1）C D 3 3（C D 3 3 Δ E 2）、ヒト C D 3 3 Δ E 2 についての免疫原）；C D 3 3：C D 2 2 4 D タンパク質（配列番号 1）及びコード配

10

20

30

40

50

列（配列番号135）；CD33：CD22 2Dタンパク質（配列番号136）及びコード配列（配列番号137）；CD33 Vセット構築物（エクソン3及び4欠失）タンパク質（配列番号138）及びコード配列（配列番号139）；CD33シグナルペプチド（配列番号140）及びコード配列（配列番号141）；6-ヒスチジンタグ（配列番号142）及びコード配列（配列番号143）；3×グリシンリンカー及びコード配列；CD33 ECD（配列番号145）及びコード配列（配列番号146）；CD33アミノ酸140～232を欠くCD33 ECD（配列番号147）及びコード配列（配列番号148）；CD33膜貫通ドメイン（配列番号149）及びコード配列（配列番号150）；CD33細胞内ドメイン（配列番号151）及びコード配列（配列番号152）；Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部分（配列番号153）及びコード配列（配列番号154）；Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部分（配列番号155）及びコード配列（配列番号156）；1E6/CD3二重特異性分子（配列番号157）；IgKシグナルペプチド（配列番号158）；1H10 scFv VH-VL配向（配列番号230）；1H10 scFv VL-VH配向（配列番号231）；1A9 scFv VH-VL配向（配列番号232）；1A9 scFv VL-VH配向（配列番号233）；1E6 scFv VH-VL配向（配列番号234）；1E6 scFv VL-VH配向（配列番号235）；2D3 scFv VH-VL配向（配列番号236）；2D3 scFv VL-VH配向（配列番号237）；1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（engager）（配列番号238）；1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（配列番号239）；1A9 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（engager）（配列番号240）；1A9 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（engager）（配列番号241）；1E6 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（配列番号242）；1E6 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（配列番号243）；2D3 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（配列番号244）；2D3 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33/CD3エンゲージャー（配列番号245）；ヒトCD33完全長DNAコード（細胞ベースの免疫原について使用される；CD33シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号246）；ヒトCD33完全長タンパク質（配列番号247）；並びに1H10、1A9、1E6、及び／又は1B9軽鎖シグナルペプチド（配列番号248）；1D2軽鎖シグナルペプチド（配列番号249）；1H8軽鎖シグナルペプチド（配列番号250）；2D3軽鎖シグナルペプチド（配列番号251）；1H10重鎖シグナルペプチド（配列番号252）；1A9重鎖シグナルペプチド（配列番号253）；1E6及び／又は2E3重鎖シグナルペプチド（配列番号254）；1D2重鎖シグナルペプチド（配列番号255）；1B9重鎖シグナルペプチド（配列番号256）；1H8重鎖シグナルペプチド（配列番号257）；2D3重鎖シグナルペプチド（配列番号258）；Vセット指向CD33/CD3 BsAb（RC1）（配列番号259）；並びにリーダー配列又はヒスタグのないVセット指向CD33/CD3 BsAb（RC1）（配列番号260）。

【図14-12】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長（FL）CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される（hsCD33-mmFc；配列番号2）；マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン（CD33ΔE2）、ヒトCD33ΔE2に対する免疫原として使用される（hsCD33_ΔE2-mmFc；配列番号3）；マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD（配列番号4）及びコード（配列番号5）CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用さ

10

20

30

40

50

れる (mmCD33 __ Vセット-mmCD33 __ C2セット-hsCD33 __ Fc __ hslgG1) ; マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号6) 及びコード (配列番号7) CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される ; 並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号8) 及びコード (配列番号9) CD33 ヒトCD33についての免疫原 ; ヒトΔE2タンパク質 (配列番号10) 及びコード (配列番号11) CD33 (CD33ΔE2)、ヒトCD33ΔE2についての免疫原 ; CD33 : CD22 4Dタンパク質 (配列番号1) 及びコード配列 (配列番号135) ; CD33 : CD22 2Dタンパク質 (配列番号136) 及びコード配列 (配列番号137) ; CD33 Vセット構築物 (エクソン3及び4欠失) タンパク質 (配列番号138) 及びコード配列 (配列番号139) ; CD33シグナルペプチド (配列番号140) 及びコード配列 (配列番号141) ; 6-ヒスチジンタグ (配列番号142) 及びコード配列 (配列番号143) ; 3×グリシンリンカー及びコード配列 ; CD33 ECD (配列番号145) 及びコード配列 (配列番号146) ; CD33アミノ酸140~232を欠くCD33 ECD (配列番号147) 及びコード配列 (配列番号148) ; CD33膜貫通ドメイン (配列番号149) 及びコード配列 (配列番号150) ; CD33細胞内ドメイン (配列番号151) 及びコード配列 (配列番号152) ; Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部分 (配列番号153) 及びコード配列 (配列番号154) ; Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部分 (配列番号155) 及びコード配列 (配列番号156) ; 1E6 / CD3二重特異性分子 (配列番号157) ; IgKシグナルペプチド (配列番号158) ; 1H10 scFv VH-VL配向 (配列番号230) ; 1H10 scFv VL-VH配向 (配列番号231) ; 1A9 scFv VH-VL配向 (配列番号232) ; 1A9 scFv VL-VH配向 (配列番号233) ; 1E6 scFv VH-VL配向 (配列番号234) ; 1E6 scFv VL-VH配向 (配列番号235) ; 2D3 scFv VH-VL配向 (配列番号236) ; 2D3 scFv VL-VH配向 (配列番号237) ; 1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (engager) (配列番号238) ; 1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (配列番号239) ; 1A9 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (engager) (配列番号240) ; 1A9 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (engager) (配列番号241) ; 1E6 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (配列番号242) ; 1E6 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (配列番号243) ; 2D3 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (配列番号244) ; 2D3 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33 / CD3エンゲージャー (配列番号245) ; ヒトCD33完全長DNAコード (細胞ベースの免疫原について使用される ; CD33シグナルペプチドコード配列は太字で) (配列番号246) ; ヒトCD33完全長タンパク質 (配列番号247) ; 並びに1H10、1A9、1E6、及び / 又は1B9軽鎖シグナルペプチド (配列番号248) ; 1D2軽鎖シグナルペプチド (配列番号249) ; 1H8軽鎖シグナルペプチド (配列番号250) ; 2D3軽鎖シグナルペプチド (配列番号251) ; 1H10重鎖シグナルペプチド (配列番号252) ; 1A9重鎖シグナルペプチド (配列番号253) ; 1E6及び / 又は2E3重鎖シグナルペプチド (配列番号254) ; 1D2重鎖シグナルペプチド (配列番号255) ; 1B9重鎖シグナルペプチド (配列番号256) ; 1H8重鎖シグナルペプチド (配列番号257) ; 2D3重鎖シグナルペプチド (配列番号258) ; Vセット指向CD33 / CD3 BsAb (RC1) (配列番号259) ; 並びにリーダー配列又はHis

10

20

30

40

50

タグのないVセット指向CD33／CD3 BsAb (RC1) (配列番号260)。

【図14-13】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長 (FL) CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される (hsCD33-mmFc；配列番号2)；マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン (CD33ΔE2)、ヒトCD33ΔE2に対する免疫原として使用される (hsCD33__ΔE2-mmFc；配列番号3)；マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号4) 及びコード (配列番号5) CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (mmCD33__Vセット-mmCD33__C2セット-hsCD33__Fc__hsIgG1)；マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号6) 及びコード (配列番号7) CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される；並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号8) 及びコード (配列番号9) CD33 ヒトCD33についての免疫原；ヒトΔE2タンパク質 (配列番号10) 及びコード (配列番号11) CD33 (CD33ΔE2)、ヒトCD33ΔE2についての免疫原)；CD33：CD22 4Dタンパク質 (配列番号1) 及びコード配列 (配列番号135)；CD33：CD22 2Dタンパク質 (配列番号136) 及びコード配列 (配列番号137)；CD33 Vセット構築物 (エクソン3及び4欠失) タンパク質 (配列番号138) 及びコード配列 (配列番号139)；CD33シグナルペプチド (配列番号140) 及びコード配列 (配列番号141)；6-ヒスチジンタグ (配列番号142) 及びコード配列 (配列番号143)；3×グリシンリンカー及びコード配列；CD33 ECD (配列番号145) 及びコード配列 (配列番号146)；CD33アミノ酸140～232を欠くCD33 ECD (配列番号147) 及びコード配列 (配列番号148)；CD33膜貫通ドメイン (配列番号149) 及びコード配列 (配列番号150)；CD33細胞内ドメイン (配列番号151) 及びコード配列 (配列番号152)；Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号153) 及びコード配列 (配列番号154)；Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号155) 及びコード配列 (配列番号156)；1E6／CD3二重特異性分子 (配列番号157)；IgKシグナルペプチド (配列番号158)；1H10 scFv VH-VL配向 (配列番号230)；1H10 scFv VL-VH配向 (配列番号231)；1A9 scFv VH-VL配向 (配列番号232)；1A9 scFv VL-VH配向 (配列番号233)；1E6 scFv VH-VL配向 (配列番号234)；1E6 scFv VL-VH配向 (配列番号235)；2D3 scFv VH-VL配向 (配列番号236)；2D3 scFv VL-VH配向 (配列番号237)；1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (engager) (配列番号238)；1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号239)；1A9 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (engager) (配列番号240)；1A9 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (engager) (配列番号241)；1E6 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号242)；1E6 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号243)；2D3 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号244)；2D3 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号245)；ヒトCD33完全長DNAコード (細胞ベースの免疫原について使用される；CD33シグナルペプチドコード配列は太字で) (配列番号

10

20

30

40

50

246) ; ヒトCD33完全長タンパク質 (配列番号247) ; 並びに1H10、1A9、1E6、及び／又は1B9軽鎖シグナルペプチド (配列番号248) ; 1D2軽鎖シグナルペプチド (配列番号249) ; 1H8軽鎖シグナルペプチド (配列番号250) ; 2D3軽鎖シグナルペプチド (配列番号251) ; 1H10重鎖シグナルペプチド (配列番号252) ; 1A9重鎖シグナルペプチド (配列番号253) ; 1E6及び／又は2E3重鎖シグナルペプチド (配列番号254) ; 1D2重鎖シグナルペプチド (配列番号255) ; 1B9重鎖シグナルペプチド (配列番号256) ; 1H8重鎖シグナルペプチド (配列番号257) ; 2D3重鎖シグナルペプチド (配列番号258) ; Vセット指向CD33／CD3 BsAb (RC1) (配列番号259) ; 並びにリーダー配列又はHisタグのないVセット指向CD33／CD3 BsAb (RC1) (配列番号260)。

10

【図14-14】開示を支える配列：マウスFcドメインを有するヒト完全長 (FL) CD33、ヒトFLCD33に対して免疫原として使用される (hsCD33-mmFc ; 配列番号2) ; マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン (CD33ΔE2)、ヒトCD33ΔE2に対する免疫原として使用される (hsCD33__ΔE2-mmFc ; 配列番号3) ; マウス由来のC2セットIg様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号4) 及びコード (配列番号5) CD33、ヒトIgG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される (mmCD33__Vセット-mmCD33__C2セット-hsCD33__Fc__hsIgG1) ; マウス由来のC2セットIg様ドメインがヒトCD33由来のC2セットIg様ドメインで置き換えられているマウスタンパク質のECD (配列番号6) 及びコード (配列番号7) CD33、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される ; 並びに完全長ヒトタンパク質 (配列番号8) 及びコード (配列番号9) CD33 ヒトCD33についての免疫原 ; ヒトΔE2タンパク質 (配列番号10) 及びコード (配列番号11) CD33 (CD33ΔE2)、ヒトCD33ΔE2についての免疫原 ; CD33 : CD22 4Dタンパク質 (配列番号1) 及びコード配列 (配列番号135) ; CD33 : CD22 2Dタンパク質 (配列番号136) 及びコード配列 (配列番号137) ; CD33 Vセット構築物 (エクソン3及び4欠失) タンパク質 (配列番号138) 及びコード配列 (配列番号139) ; CD33シグナルペプチド (配列番号140) 及びコード配列 (配列番号141) ; 6-ヒスチジンタグ (配列番号142) 及びコード配列 (配列番号143) ; 3×グリシンリンカー及びコード配列 ; CD33 ECD (配列番号145) 及びコード配列 (配列番号146) ; CD33アミノ酸140~232を欠くCD33 ECD (配列番号147) 及びコード配列 (配列番号148) ; CD33膜貫通ドメイン (配列番号149) 及びコード配列 (配列番号150) ; CD33細胞内ドメイン (配列番号151) 及びコード配列 (配列番号152) ; Ig様C2-タイプ3、Ig様C2-タイプ4、Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号153) 及びコード配列 (配列番号154) ; Ig様C2-タイプ5、Ig様C2-タイプ6として定義されるCD22ドメインを含有するCD22 ECDの一部 (配列番号155) 及びコード配列 (配列番号156) ; 1E6／CD3二重特異性分子 (配列番号157) ; IgKシグナルペプチド (配列番号158) ; 1H10 scFv VH-VL配向 (配列番号230) ; 1H10 scFv VL-VH配向 (配列番号231) ; 1A9 scFv VH-VL配向 (配列番号232) ; 1A9 scFv VL-VH配向 (配列番号233) ; 1E6 scFv VH-VL配向 (配列番号234) ; 1E6 scFv VL-VH配向 (配列番号235) ; 2D3 scFv VH-VL配向 (配列番号236) ; 2D3 scFv VL-VH配向 (配列番号237) ; 1H10 scFv VH-VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (engager) (配列番号238) ; 1H10 scFv VL-VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー (配列番号239) ; 1A9 scFv VH-VL

20

30

40

50

配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号240）；1A9 scFv VL－VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（engager）（配列番号241）；1E6 scFv VH－VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号242）；1E6 scFv VL－VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号243）；2D3 scFv VH－VL配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号244）；2D3 scFv VL－VH配向、二重特異性抗体CD33／CD3エンゲージャー（配列番号245）；ヒトCD33完全長DNAコード（細胞ベースの免疫原について使用される；CD33シグナルペプチドコード配列は太字で）（配列番号246）；ヒトCD33完全長タンパク質（配列番号247）；並びに1H10、1A9、1E6、及び／又は1B9軽鎖シグナルペプチド（配列番号248）；1D2軽鎖シグナルペプチド（配列番号249）；1H8軽鎖シグナルペプチド（配列番号250）；2D3軽鎖シグナルペプチド（配列番号251）；1H10重鎖シグナルペプチド（配列番号252）；1A9重鎖シグナルペプチド（配列番号253）；1E6及び／又は2E3重鎖シグナルペプチド（配列番号254）；1D2重鎖シグナルペプチド（配列番号255）；1B9重鎖シグナルペプチド（配列番号256）；1H8重鎖シグナルペプチド（配列番号257）；2D3重鎖シグナルペプチド（配列番号258）；Vセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号259）；並びにリーダー配列又はHisタグのないVセット指向CD33／CD3 BsAb（RC1）（配列番号260）。

10

20

【発明を実施するための形態】

【0014】

世界保健機関によると、がんは世界で2番目に多い死因であり、2018年には推定960万人の死亡の原因であった。急性骨髄性白血病（AML）は、クローン性の増殖性骨髄芽球細胞の悪性腫瘍である。AMLはまた、急性骨髄球性白血病、急性骨髄白血病、急性顆粒球性白血病及び急性非リンパ球性白血病としても知られている。

【0015】

AMLを有する患者についての高い完全寛解率が、若年成人で60%～80%、60歳を超える成人で40%～60%の割合で従来の化学療法により達成され得る（Dohnerら、2017年、Blood、129（4）：424～447頁）。残念ながら、白血病幹細胞の化学療法抵抗性のために、従来の治療後の再発は一般的であり（Epperterら、2011年、Nat. Med. 17（9）：1086～1093頁）、再発／難治性（R/R）AMLに対する現在の治療選択肢は散々であり、12か月の全生存率は30%未満という結果になる。

30

【0016】

全長CD33タンパク質（CD33^{FL}）は、その細胞外部分におけるアミノ末端の膜遠位のVセット免疫グロブリン（Ig）様ドメイン及び膜近位のC2セットIg様ドメインによって特徴付けられる膜貫通糖タンパク質である（図1）。

【0017】

CD33^{FL}は主に骨髄系統の成熟している細胞及び成熟した細胞上で提示され、最初には多能性骨髄前駆細胞上で発現する。それは造血系以外では見出されず、多能性造血幹細胞上では発現していないと考えられる。骨髄分化抗原としての役割と一致して、CD33^{FL}は骨髄性新生物を有する患者の悪性細胞上で広範に発現され、例えば、AMLでは、それはほぼ全ての症例において少なくともAML芽細胞のサブセットに見られ、一部の症例では白血病幹細胞に見られる可能性がある。この発現パターンのために、CD33^{FL}はAMLの標的化療法のための抗原として広範に利用されてきた（Walterら、Blood 119（26）：6198～6208頁、2012年；Cowanら、Front. Biosci.（Landmark Ed）18：1311～1334頁、2013年；Laszloら、Blood Ref. 28（4）：143～153頁、2014年；及びWalter、Expert Opin Investig Drugs 27（4）：339～348頁、2018年）。コンジュゲートしていないモノクローナルCD

40

50

33抗体は、臨床において効果がないことが証明されているが、CD33抗体-薬物コンジュゲート(ADC)ゲムツズマブオゾガマイシン(GO)を用いたいくつかの最近の無作為化試験により、AMLを有する患者のサブセットにおいて生存率の改善が実証され、この疾患における抗体の価値が確立され、CD33^{FL}が、AMLの免疫療法についての最初の、そしてこれまでのところ唯一の治療標的であることが確認された(Laszlóら、Blood Rev. 28(4):143~153頁、2014年; Godwinら、Leukemia 31(9):1855~1868頁、2017年)。GOで指摘された制限を克服するための、新たな、より効果的なCD33指向療法(例えば、抗体-薬物コンジュゲート、放射性イムノコンジュゲート、二重特異性抗体、キメラ抗原受容体[CAR]修飾T細胞)の開発と並行して、他の悪性及び非悪性障害についての薬物標的としてのCD33への関心が高まっている。これらの取り組みには、GOによって認識されないCD33スプライスバリエーションのターゲティング、並びに他の血液悪性腫瘍におけるCD33+腫瘍細胞、様々な疾患におけるCD33+骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)、及びアルツハイマー病における正常なCD33+ミクログリア細胞のターゲティングが含まれる(Walter、Expert Opin Biol Ther. 2020年、20(9):955~958頁)。

10

20

30

40

50

【0018】

しかしながら、一部の患者は、エクソン2を欠き、CD33^{ΔE2}と称されるCD33のトランケートされたスプライスバリエーション型を発現する。CD33^{ΔE2}は、正常な造血細胞及び白血病細胞においてmRNAレベルで同定されている。後者に関して、CD33^{ΔE2}mRNAは、試験された29個のAML患者検体のうちの29個で同定され、ヒトAMLにおいて普遍的な発現を示している。CD33^{ΔE2}は、CD33のC2セットIg様ドメインを含むが、VセットIg様ドメインを含まない(図1)。mRNAレベルで同定されたさらなるスプライスバリエーションには、CD33^{E7a}及びCD33^{ΔE2/E7a}が含まれる。CD33^{E7a}は、CD33の細胞内ドメインのトランケーションをもたらす選択的エクソン7(E7a)を使用する。CD33^{ΔE2/E7a}はエクソン2を欠き、また、CD33の細胞内ドメインのトランケーションも有する。

【0019】

しかしながら、現在、ほぼ全ての商業的な診断用CD33抗体及び現在臨床的に利用可能なCD33抗体ベースの治療法は、エクソン2によってコードされる免疫優性なVセットIg様ドメインを認識する(図1)。すなわち、VセットIg様ドメインを欠くCD33^{ΔE2}及び他のCD33タンパク質は、ほとんどの任意の商業的及び臨床的に利用可能なCD33抗体によって認識されない。このことは、これらの抗体が、CD33^{ΔE2}などのVセットドメインを欠く、より短い形態のCD33を認識しないことを意味する。このことは、CD33^{ΔE2}の選択的転写及びCD33^{FL}の翻訳の減少をもたらす、CD33遺伝子における一塩基多型を有する患者が、集中化学療法へのGO(これはまた、CD33のVセットドメインにも結合する。)の追加から恩恵を受けなかったという小児AMLにおけるある臨床試験において行われた観察を説明することができる。

【0020】

VセットIg様ドメインの存在/非存在に関係なく、CD33タンパク質のC2セットIg様ドメインを認識し、結合する抗体(例えば、CD33^{PAN}抗体と称される、CD33^{ΔE2}及びCD33^{FL}アイソフォームに結合する抗体)は、全てのCD33アイソフォームのターゲティングに大きな進歩をもたらし、より広範な治療効果をもたらす。これらのpan-結合抗体も、細胞膜の近位で結合するので、進歩をもたらすと考えられる(図1)。いくつかの治療標的について、標的化エピトープの特異性が、抗体ベースの治療にとって非常に重要であることが示されており、CD20、CD22、CD25及びEpCAMについて示されているように、膜近位エピトープは、膜遠位エピトープよりも強力な抗腫瘍効果をもたらす。例えば、Clearyら、J Immunol. 2017年; 198(10):3999~4011頁; Lin、Pharmgenomics Pers Med. 2010年; 3:51~59頁; Hasoら、Blood. 2013年;

121 (7) : 1165 ~ 1174 頁 ; 及び Blumelら、Cancer Immunol Immunother. 2010 年 ; 59 (8) : 1197 ~ 1209 頁を参照のこと。

【0021】

本開示は、VセットIg様ドメインが存在するかどうかに関係なく、CD33のC2セットIg様ドメインに結合する新規のpan結合抗体を提供する。これらのCD33^{PA}N結合抗体は、1H10、1A9、1E6、1D2、及び1B9を含む。

【0022】

本開示は、CD33のVセットIg様ドメインに結合する新たに開発された抗CD33抗体も提供する。これらのVセット結合剤は、1H8、2D3、及び2E3を含み、CD33^{FL}を発現している患者に追加の診断及び治療選択肢を提供する。

【0023】

特定の実施形態では、本明細書で開示される抗体はCD33に結合し以下の特徴のうちの1つ以上を有する：(a)組換えヒトCD33に結合する；(b)ヒト末梢血単核球(PBMC)又は他の骨髓性若しくは非骨髓性ヒト細胞の表面の内因性CD33に結合する；(c)がん細胞の表面の内因性CD33に結合する；(d)AMLがん細胞の表面の内因性CD33に結合する；(e)VセットIg様ドメインの存在下CD33 C2セットIg様ドメイン内のエピトープに結合する(例えば、CD33^{FL}において)；(f)VセットIg様ドメインの非存在下CD33 C2セットIg様ドメイン内のエピトープに結合する(例えば、CD33^{ΔE2}において)；(g)CD33の膜に近位のエピトープに結合する；(h)1H10のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(i)1A9のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(j)1E6のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(k)1D2のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(l)1B9のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(m)1H8のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(n)2D3のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(o)2E3のV_L鎖及びV_H鎖を含む；(p)1H10のCDRセットを含む；(q)1A9のCDRセットを含む；(r)1E6のCDRセットを含む；(s)1D2のCDRセットを含む；(t)1B9のCDRセットを含む；(u)1H8のCDRセットを含む；(v)2D3のCDRセットを含む；及び／又は(w)2E3のCDRセットを含む。CDRセットは、IGMT、Kabatt、North、Chothia、又は「Set5」により予測される通りが可能である。

【0024】

本明細書に記載された様々な形態の抗体及びその結合断片は、本明細書ではCD33ターゲティング剤と称され得る。

【0025】

本開示の重要な態様を強調してきたが、本開示を実施するための以下のさらなる詳細及び選択肢が以下のように提供されている；(i)CD33抗体；(ii)抗CD33抗体コンジュゲート；(iii)抗CD33多重特異性抗体；(iv)製剤；(v)免疫細胞試料採取及び細胞濃縮；(vi)組換えタンパク質を発現するように細胞集団を遺伝子修飾すること；(vii)細胞活性化培養条件；(viii)エキスピボで製造された細胞製剤；(ix)使用方法；(x)対照集団に由来する参照レベル；(xi)例示的な実施形態；(xii)実験例；並びに(xiii)最終パラグラフ。これらの見出しは、構成の目的のためにのみ提供されており、本開示の範囲又は解釈を限定するものではない。

【0026】

(i)CD33抗体。CD33とは、細胞内でのCD33前駆体タンパク質のプロセッシングから生じる任意の天然の成熟CD33を指す。CD33陽性細胞とは、その表面上にCD33を発現する任意の細胞を指す。CD33陽性がんとは、それらの表面上にCD33を発現する1つ以上の細胞を含むがんを指す。CD33陽性がんの例には、白血病、骨髓肉腫及びリンパ腫が含まれる。このようながんのより具体的な例には、急性骨髓性白血病(AML)、骨髓異形成症候群(MDS)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓単球性白血病(CMML)、急性前骨髓球性白血病(APL)、骨髓増殖性新生物、巨核球性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)、T細胞急性リンパ芽球性白血

10

20

30

40

50

病（T-A L L）、多発性骨髄腫（M M）及びその他の形質細胞異常増殖症、肥満細胞疾患、肥満細胞白血病、肥満細胞肉腫並びに骨髄肉腫が含まれる。

【0027】

本開示は、VセットIg様ドメインの存在／非存在に関係なくCD33のC2セットIg様ドメインを標的とする抗体及びCD33のVセットIg様ドメインを標的とする抗体を提供する。特定の実施形態では、抗体の組合せを選択することができる。例えば、対象がVセットドメインを発現する場合、1A9、1H10、1B9、1E6、及び1D2のうちの1つ以上を含む併用療法は、2E3、2D3、及び1H8のうちの1つ以上と組み合わせて選択できると考えられる。対象がVセットドメインを発現しない場合は、2E3、2D3、及び1H8は投与されないと考えられる。

10

【0028】

天然に存在する抗体構造単位には四量体が含まれる。各四量体は2対のポリペプチド鎖を含み、各対は1本の軽鎖及び1本の重鎖を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識及びエпитープ結合に關与する可変領域を含む。可変領域は、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる3つの超可変領域によって接合された比較的保存されたフレームワーク領域（FR）の同じ一般構造を示す。各対の2つの鎖からのCDRは、特定のエピトープへの結合を可能にするフレームワーク領域によって整列されている。N末端からC末端まで、軽鎖及び重鎖可変領域の両方は、ドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、典型的に、免疫学的関心のあるタンパク質のKabat配列（National Institutes of Health、Bethesda、Md.、1987年及び1991年）、又はChothia & Lesk、J. Mol. Biol.、196：901～917頁、1987年；Chothiaら、Nature、342：878～883頁、1989年の定義に従う。

20

【0029】

CDRの明確な描写及び抗体の結合部位を含む残基の同定は、抗体の構造を解明すること及び／又は抗体－エピトープ複合体の構造を解明することによって達成され得る。特定の実施形態では、これは、X線結晶構造解析などの方法によって達成され得る。或いは、CDRは、既知の抗体（直鎖状配列）との比較によって決定され、結晶構造の解明に頼ることはない。結合に關与する残基を決定するために、標的に結合したFab（抗体断片）の共結晶構造が任意選択的に決定され得る。ABodyBuilderなどのソフトウェアプログラムも使用され得る。

30

【0030】

各鎖のカルボキシ末端部分は、特に重鎖（Fc）におけるエフェクター機能に關与し得る定常領域を規定する。エフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）；抗体依存性細胞媒介細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション；並びにB細胞活性化が含まれる。

【0031】

全長の軽鎖及び重鎖内で、可変領域及び定常領域は、アミノ酸の「J」領域によって接合され、重鎖はまた、アミノ酸の「D」領域も含む。例えば、Fundamental Immunology、Ch. 7（Paul, W.、ed.、第2版、Raven Press、N. Y.（1989年））を参照のこと。

40

【0032】

ヒト軽鎖は、カッパ及びラムダ軽鎖として分類される。重鎖は、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ又はイプシロンとして分類され、抗体のアイソタイプをそれぞれIgM、IgD、IgG、IgA及びIgEとして定義する。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4を含む、いくつかのサブクラスを有する。IgMは、IgM1及びIgM2を含むサブクラスを有する。IgAは同様に、IgA1及びIgA2を含むサブクラスに細分される。

【0033】

50

示されているように、抗体は抗原上のエピトープに結合する。抗原という用語は、抗体が結合することができる分子又は分子の一部を指す。エピトープは、抗体の可変領域が結合する抗原の領域である。エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル又はスルホニル基などの分子の化学的に活性な表面グルーピングを含むことができ、特定の三次元構造特性及び／又は特定の電荷特性を有することができる。抗原がタンパク質又はペプチドである場合、エピトープは、抗体の可変領域と接触するそのタンパク質又はペプチド内に特定のアミノ酸を含む。

【0034】

特定の実施形態では、エピトープは、抗体の対応する可変領域が結合するCD33上の結合部位を表す。可変領域は、直線状エピトープ（例えば、5～12個の連続したアミノ酸のストレッチを含むエピトープ）に結合する又は可変領域は、タンパク質標的のいくつかの短いストレッチの空間的配置によって形成される三次元構造に結合する。可変領域によって、例えば、抗体又は抗体断片のエピトープ認識部位又はパラトープによって認識される三次元エピトープは、エピトープ分子の三次元表面の特徴であると考えられ得る。これらの特徴は、可変領域の対応する結合部位に（内に）正確に適合し、それによって可変領域とその標的タンパク質（より一般的には、抗原）との間の結合が促進される。特定の実施形態では、エピトープは、2つのレベルを有すると考えられ得る：（i）抗体の可変領域が、結合する抗原に投じる影であると考えられ得る「カバーされたパッチ」；及び（ii）結合を促進する個々の関与する側鎖及び骨格残基。次いで結合は、イオン相互作用、水素結合及び疎水性相互作用の集合に起因する。

【0035】

特定の実施形態では、本開示の抗体のエピトープ（すなわち、抗体が結合するエピトープ）は、CD33のC2セットIg様ドメイン内に見出される。エピトープは「pan結合」部位を提供し、これは、CD33分子もVセットIg様ドメインを含む（例えば、CD33^{FL}である場合）又は含まない（例えば、CD33^{ΔE2}である場合）かどうかに関係なく、抗体が結合することを意味する（図1）。特定の実施形態では、C2セットIg様ドメイン上のエピトープは、膜近位エピトープである。特定の実施形態では、膜近位エピトープは、膜貫通領域の115残基以内；膜貫通領域の100残基以内；膜貫通領域の75残基以内；膜貫通領域の50残基以内；膜貫通領域の25残基以内又は膜貫通領域の15残基以内にある。特定の実施形態では、本開示の抗体のエピトープは、CD33のVセットIg様ドメイン内に見出される。

【0036】

特定の実施形態では、「結合する」は、可変領域が、 10^{-8} M以下、特定の実施形態では 10^{-5} M～ 10^{-13} M、特定の実施形態では 10^{-5} M～ 10^{-10} M、特定の実施形態では 10^{-5} M～ 10^{-7} M、特定の実施形態では 10^{-8} M～ 10^{-13} M又は特定の実施形態では 10^{-9} M～ 10^{-13} Mの解離定数（Kd又はKD）で、その標的エピトープと会合することを意味する。この用語は、可変領域が、存在する他の生体分子に結合しないことを示すためにさらに使用され得る（例えば、これは、 10^{-4} M以上、特定の実施形態では 10^{-4} M～1 Mの解離定数（Kd）で他の生体分子に結合する。）。

【0037】

特定の実施形態では、Kdは、BIACoreを使用して特徴付けられ得る。例えば、特定の実施形態では、Kdは、10応答単位（RU）での固定化抗原CM5チップと共に、25℃でBIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-3000（BIACore, Inc.、Piscataway, N. J.）を使用した表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定され得る。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）は、供給者の説明書に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化され得る。抗原は、10応答単位（RU）のカップリングタンパク質を得るために5 µl／分の流量での注入の前に、10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.8で5 µg／ml（0.2 µM）に希

釈され得る。抗原の注入後、1 Mのエタノールアミンが、未反応基を遮断するために注入され得る。反応速度測定のために、Fabの2倍連続希釈液（0.78 nM～500 nM）が、25℃の0.05%ポリソルベート20（TWEEN（登録商標）-20）界面活性剤（PBST）を有するPBS中に25 μL／分の流量で注入される。会合速度（ k_{on} ）及び解離速度（ k_{off} ）は、単純な1対1のラングミュア結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2）を使用して、会合センサグラム及び解離センサグラムを同時に当てはめることによって計算され得る。平衡解離定数（ K_d ）は、比率 k_{off}/k_{on} として計算され得る。例えば、Chenら、J. Mol. Biol. 293: 865～881頁、1999年を参照のこと。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる k_{on} 速度が $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、 k_{on} 速度は、ストップフローを備えた分光光度計（Aviv Instruments）、又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic）などの分光計で測定される場合に、増加する抗原濃度の存在下で、25℃で、PBS中20 nMの抗-抗原抗体（Fab型）、pH 7.2の蛍光発光強度（励起=295 nm、発光=340 nm、16 nm帯域通過）の増加又は減少を測定する蛍光消光技術を使用することによって決定され得る。

10

【0038】

特に指示がない限り、「抗体」という用語は、（上記の2つの全長重鎖及び2つの全長軽鎖を有する抗体に加えて）そのバリエーション、誘導体及び断片を含み、それらの例は以下に記載されている。さらに、明示的に除外されない限り、抗体には、それぞれ、モノクローナル抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、多重特異性抗体、ポリクローナル抗体、線状抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体、キメラ抗体、抗体融合体及びそれらの断片が含まれ得る。特定の実施形態では、抗体には、抗体のオリゴマー又は多重型が含まれ得る。

20

【0039】

モノクローナル抗体とは、実質的に同種の抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ／又は同じエピトープに結合するが、例えば、天然に存在する突然変異を含有する又はモノクローナル抗体調製物の産生中に発生する、想定されるバリエーション抗体を除いて、このようなバリエーションは一般に少量で存在する。異なるエピトープに対して指向される異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに対して指向される。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られるものとして抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む、様々な技術によって作製され得る。

30

【0040】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生される又はヒト抗体レパートリー若しくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を含む抗体である。

40

【0041】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV_L又はV_Hフレームワーク配列の選択において最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV_L又はV_H配列の選択は、可変ドメイン配列の下位集団からである。配列の下位集団は、Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、NIH Publication 91～3242頁、Bethesda MD.（1991年）、vols. 1～3にあるような下位集団であり得る。特定の実施形態では、V_Lについて、下位集団は、Kabataら（上記）にあるような下位集団カッパIである。特定の実施形態

50

では、 V_H について、下位集団は、 $K a b a t$ ら（上記）にあるような下位集団 $I I I$ である。

【0042】

本明細書で提供されている抗体に関して、以下のCDRセットが提供されている。CDRセットとは、一緒になってCD33への結合を生じる3つの軽鎖CDR及び3つの重鎖CDRを指す。

【0043】

【表1】

表1：Northを使用する抗体CDR配列

抗体	CDR	配列	配列番号:
1H10	CDRL1	RASQGIRIYLG	12
	CDRL2	YATSSLQS	13
	CDRL3	LQDYNYPWT	14
	CDRH1	KGSGYIFTSYDMH	15
	CDRH2	IIDPSGGSTS	16
	CDRH3	TRDYSWSYFDY	17
1A9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	YGASSLQS	19
	CDRL3	LQEYNYPCT	20
	CDRH1	AASGFTFSIYDMH	21
	CDRH2	AIGTAGDTY	22
	CDRH3	AREYSGYYFDY	23
1E6	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	YAASNLQS	25
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	AASGFTFSSYDIH	27
	CDRH2	VIWYDGSHNY	28
	CDRH3	ARDYSGSYDY	29
1D2	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	YATSSLQS	13
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	AASGFTFSSYDIH	27
	CDRH2	VIWYDGSQKY	30
	CDRH3	ARDYSGSYDY	29
1B9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	YAASSLQS	31
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	AASGFIFSSYDIH	32
	CDRH2	VIWYDGSHNY	28
	CDRH3	ARDYSGSYFDY	33
1H8	CDRL1	RASQNIGGNLH	34
	CDRL2	RYATQPFS	163
	CDRL3	HQSSSLPLT	36
	CDRH1	AASGFTFGSYGMH	164
	CDRH2	VIWYDGSNEY	165
	CDRH3	ARLDYDSSGGDY	166
2D3	CDRL1	RASQSGSSSFLS	167
	CDRL2	YGASTRAT	168
	CDRL3	QQDYNLPFT	42
	CDRH1	AASGFTFSIYAMS	169

10

20

30

40

50

抗体	CDR	配列	配列番号:
	CDRH2	AISDSGGTTY	170
	CDRH3	AKRTRYFNGMDV	171
2E3	CDRL1	RASQSVSSSYLA	172
	CDRL2	YGTSSRAT	173
	CDRL3	QQYGSSPT	48
	CDRH1	AASGFTFSSYGMH	174
	CDRH2	VIWYGGSNKY	175
	CDRH3	ARDGTGENYYYYVMDV	176

10

【 0 0 4 4 】

【 表 2 】

表 2 : I M G T を使用する抗体 C D R 配列

抗体	CDR	配列	配列番号:
1H10	CDRL1	QGIRIY	177
	CDRL2	ATS	N/A
	CDRL3	LQDYNYPWT	14
	CDRH1	GYIFTSYD	178
	CDRH2	IDPSGGST	179
	CDRH3	TRDYSWSYFDY	17
1A9	CDRL1	QDIRND	180
	CDRL2	GAS	N/A
	CDRL3	LQEYNYPCT	20
	CDRH1	GFTFSIYD	181
	CDRH2	IGTAGDT	182
	CDRH3	AREYSGYYFDY	23
1E6	CDRL1	QGIRND	183
	CDRL2	AAS	N/A
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	GFTFSSYD	184
	CDRH2	IWYDGSHN	185
	CDRH3	ARDYSGSYDY	29
1D2	CDRL1	QGIRND	183
	CDRL2	ATS	N/A
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	GFTFSSYD	184
	CDRH2	IWYDGSQK	186
	CDRH3	ARDYSGSYDY	29
1B9	CDRL1	QDIRND	180
	CDRL2	AAS	N/A
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	GFIFSSYD	187
	CDRH2	IWYDGSHN	185

20

30

40

50

抗体	CDR	配列	配列番号:
	CDRH3	ARDYSGSYFDY	33
1H8	CDRL1	QNIGGN	188
	CDRL2	YAT	N/A
	CDRL3	HQSSSLPLT	36
	CDRH1	GFTFGSYG	189
	CDRH2	IWYDGSNE	190
	CDRH3	ARDLDYDSSGGDY	166
2D3	CDRL1	QSGSSSF	191
	CDRL2	GAS	N/A
	CDRL3	QQDYNLPFT	42
	CDRH1	GFTFSIYA	192
	CDRH2	ISDSGGTT	193
	CDRH3	AKRTRYFNGMDV	171
2E3	CDRL1	QSVSSSY	194
	CDRL2	GTS	N/A
	CDRL3	QQYGSSPT	48
	CDRH1	GFTFSSYG	195
	CDRH2	IWYGGSNK	196
	CDRH3	ARDGTGENYYYYVMDV	176

10

20

【 0 0 4 5 】

【 表 3 】

表 3 : K a b a t を使用する抗体 C D R 配列

抗体	CDR	配列	配列番号:
1H10	CDRL1	RASQGIRIYLG	12
	CDRL2	ATSSLQS	208
	CDRL3	LQDYNYPWT	14
	CDRH1	SYDMH	197
	CDRH2	IIDPSGGSTSYAQKFQG	198
	CDRH3	DYSWSYFDY	199
1A9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	GASSLQS	200
	CDRL3	LQEYNYPCT	20
	CDRH1	IYDMH	201
	CDRH2	AIGTAGDTYYAGSVKG	202
	CDRH3	EYSGYYFDY	203
1E6	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	AASNLQS	204
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	SYDIH	205
	CDRH2	VIWYDGSHNYYSDSVKG	206
	CDRH3	DYSGSYDY	207

30

40

50

抗体	CDR	配列	配列番号:
1D2	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	ATSSLQS	208
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	SYDIH	205
	CDRH2	VIWYDGSQKYYADSVKG	209
	CDRH3	DYSGSYDY	207
1B9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	AASSLQS	210
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	SYDIH	205
	CDRH2	VIWYDGSHNYYSDSVKG	206
	CDRH3	DYSGSYFDY	211
1H8	CDRL1	RASQNIGGNLH	34
	CDRL2	YATQPFS	35
	CDRL3	HQSSSLPLT	36
	CDRH1	SYGMH	37
	CDRH2	VIWYDGSNEYADSVKG	212
	CDRH3	DLDYDSSGGDY	213
2D3	CDRL1	RASQSGSSSFLS	167
	CDRL2	GASTRAT	41
	CDRL3	QQDYNLPFT	42
	CDRH1	IYAMS	43
	CDRH2	AISDSGGTTYADSVKG	214
	CDRH3	RTRYFNGMDV	215
2E3	CDRL1	RASQSVSSSYLA	172
	CDRL2	GTSSRAT	47
	CDRL3	QQYGSSPT	48
	CDRH1	SYGMH	37
	CDRH2	VIWYGGSNKYYADSVKG	216
	CDRH3	DGTGENYYYYVMDV	217

10

20

30

【 0 0 4 6 】

【 表 4 】

表 4 : C h o t h i a を使用する抗体 C D R 配列

40

抗体	CDR	配列	配列番号:
1H10	CDRL1	RASQGIRIYLG	12
	CDRL2	ATSSLQS	208
	CDRL3	LQDYNYPWT	14
	CDRH1	GYIFTSY	218
	CDRH2	DPSGGS	219
	CDRH3	DYSWSYFDY	199

50

抗体	CDR	配列	配列番号:
1A9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	GASSLQS	200
	CDRL3	LQEYNYPCT	20
	CDRH1	GFTFSIY	220
	CDRH2	GTAGD	221
	CDRH3	EYSGYYFDY	203
1E6	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	AASNLS	204
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	GFTFSSY	222
	CDRH2	WYDGS	223
	CDRH3	DYSGSYDY	207
1D2	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	ATSSLQS	208
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	GFTFSSY	222
	CDRH2	WYDGS	224
	CDRH3	DYSGSYDY	207
1B9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	AASSLQS	210
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	GFIFSSY	225
	CDRH2	WYDGS	223
	CDRH3	DYSGSYFDY	211
1H8	CDRL1	RASQNIGGNLH	34
	CDRL2	YATQPFS	35
	CDRL3	HQSSSLPLT	36
	CDRH1	GFTFGSY	226
	CDRH2	WYDGS	227
	CDRH3	DLDYDSSGGDY	213
2D3	CDRL1	RASQSGSSSFLS	167
	CDRL2	GASTRAT	41
	CDRL3	QQDYNLPFT	42
	CDRH1	GFTFSIY	220
	CDRH2	SDSGGT	228
	CDRH3	RTRYFNGMDV	215
2E3	CDRL1	RASQSVSSSYLA	172
	CDRL2	GTSSRAT	47
	CDRL3	QQYGSSPT	48
	CDRH1	GFTFSSY	222

抗体	CDR	配列	配列番号:
	CDRH2	WYGGSN	229
	CDRH3	DGTGENYYYYVMDV	217

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5 : 抗体 C D R 配列 - S e t 5

抗体	CDR	配列	配列番号:
1H10	CDRL1	RASQGIRIYLG	12
	CDRL2	YATSSLQS	13
	CDRL3	LQDYNYPWT	14
	CDRH1	KGSGYIFTSYDMH	15
	CDRH2	IIDPSGGSTS	16
	CDRH3	TRDYSWSYFDY	17
1A9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	YGASSLQS	19
	CDRL3	LQEYNYPCT	20
	CDRH1	AASGFTFSIYDMH	21
	CDRH2	AIGTAGDTY	22
	CDRH3	AREYSGYYFDY	23
1E6	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	YAASNLQS	25
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	AASGFTFSSYDIH	27
	CDRH2	VIWYDGSHNY	28
	CDRH3	ARDYSGSYDY	29
1D2	CDRL1	RASQGIRNDLG	24
	CDRL2	YATSSLQS	13
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	AASGFTFSSYDIH	27
	CDRH2	VIWYDGSQKY	30
	CDRH3	ARDYSGSYDY	29
1B9	CDRL1	RASQDIRNDLG	18
	CDRL2	YAASSLQS	31
	CDRL3	LQDYSYPRT	26
	CDRH1	AASGFIFSSYDIH	32
	CDRH2	VIWYDGSHNY	28
	CDRH3	ARDYSGSYFDY	33
1H8	CDRL1	RASQNIGGNLH	34
	CDRL2	YATQPFS	35
	CDRL3	HQSSSLPLT	36
	CDRH1	SYGMH	37
	CDRH2	IWYDGSNEYADSVKG	38

10

20

30

40

50

抗体	CDR	配列	配列番号:
	CDRH3	DLDYDSSG	39
2D3	CDRL1	QSGSSSFLS	40
	CDRL2	GASTRAT	41
	CDRL3	QQDYNLPFT	42
	CDRH1	IYAMS	43
	CDRH2	ISDSGGTTYADSVKG	44
	CDRH3	RTRYFNG	45
2E3	CDRL1	QSVSSSYLA	46
	CDRL2	GTSSRAT	47
	CDRL3	QQYGSSPT	48
	CDRH1	SYGMH	37
	CDRH2	IWYGGSNKYYADSVKG	49
	CDRH3	DGTGENYYYYV	50

10

【 0 0 4 8 】

特定の実施形態では、1 H 1 0 抗体は、配列：

【 0 0 4 9 】

20

【化 1】

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRIYLGWYQQKPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPWTFGQGKVEIK (配列番号51)

を含む可変軽鎖、及び

配列：

【 0 0 5 0 】

【化 2】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYIFTSYDMHWVRQAPGQGLEWMGIIDPSGGSTSYA
QKFQGRVTMTRDTSMTVYMESSLRSEDVAVYYCTRDYSWSYFDYWGQGTLLTVSS
(配列番号52)

30

を含む可変重鎖を含む。

【 0 0 5 1 】

特定の実施形態では、1 A 9 抗体は、配列：

【 0 0 5 2 】

【化 3】

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIRNDLGWYQQKPGKAPKILIIYGASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTFITISLQPEDFATYYCLQEYNYPCTFGQGKLEIK (配列番号53)

40

を含む可変軽鎖、及び

配列：

【 0 0 5 3 】

【化 4】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYDMHWVRQATGKGLEWWSAIGTAGDITYAGS
VKGRFTISRENAKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREYSGYYFDYWGQGTLLTVSS
(配列番号54)

50

を含む可変重鎖を含む。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態では、1 E 6 抗体は、配列：

【 0 0 5 5 】

【化 5】

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASNLSQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYSYPRTFGQGKVEIK (配列番号55)

を含む可変軽鎖、及び

10

配列：

【 0 0 5 6 】

【化 6】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWWAVIWDGSHNYYS
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSGSYDYWGQGTLVTVSS
(配列番号56)

を含む可変重鎖を含む。

【 0 0 5 7 】

20

特定の実施形態では、1 D 2 抗体は、配列：

【 0 0 5 8 】

【化 7】

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPELLIYATSSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLIISSLQPEDFATYYCLQDYSYPRTFGQGKVEIK (配列番号57)

を含む可変軽鎖、及び

配列：

【 0 0 5 9 】

30

【化 8】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWWAVIWDGSQKYYA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSGSYDYWGQGTLVTVSS
(配列番号58)

を含む可変重鎖を含む。

【 0 0 6 0 】

特定の実施形態では、1 B 9 抗体は、配列：

【 0 0 6 1 】

40

【化 9】

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDIRNDLGWYLQRPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYSYPRTFGQGTVEIK (配列番号59)

を含む可変軽鎖、及び

配列：

【 0 0 6 2 】

50

【化 1 0】

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFISSYDIHWVRQAPGKGLEWWAVIWYDGS SHNYYS
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSGSYFDYWGQGT LVTVSS

(配列番号60)

を含む可変重鎖を含む。

【0 0 6 3】

特定の実施形態では、C D 3 3^Vセット抗体は1 H 8を含む。特定の実施形態では、1 H 8抗体は、配列：

10

【0 0 6 4】

【化 1 1】

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQNIGGNLHWYQQKPDQSPKLLIRYATQPFSGVPSRFGG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPLTFGGG TKVEIK (配列番号61)

を含む可変軽鎖、及び

配列：

【0 0 6 5】

【化 1 2】

20

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYGMHWVRQAPGKGLEWWAVIWYDGS NEYY
ADSVKGRFTVSRDN SKHTLYLQMNRLRAEDTAVYYCARDLDYDSSGGDYWGQ GILVLVSS

(配列番号62)

を含む可変重鎖を含む。

【0 0 6 6】

特定の実施形態では、C D 3 3^Vセット抗体は2 D 3を含む。特定の実施形態では、2 D 3抗体は、配列：

30

【0 0 6 7】

【化 1 3】

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSGSSSFLSWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQDYNLPFTFGPGTKVDIK (配列番号63)

を含む可変軽鎖、及び

配列：

【0 0 6 8】

【化 1 4】

40

EVQLLES GGGLVQPGGSLSLSCAASGFTFSIYAMSWVRQAPGKGLEWWSAISDSGGT TYYAD
SVKGRFTISRDN SKNMLYLEMNSLRAEDTAIYYCAKRTRYFNGMDVWGQGT TTVTVSS

(配列番号64)

を含む可変重鎖を含む。

【0 0 6 9】

特定の実施形態では、C D 3 3^Vセット抗体は2 E 3を含む。特定の実施形態では、2 E 3抗体は、配列：

【0 0 7 0】

50

【化 1 5】

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFS
GSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPTFGGGTKVEIK (配列番号65)

を含む可変軽鎖、及び

配列：

【0 0 7 1】

【化 1 6】

QVCLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYGGSNKYIA
DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGTGENYYYYVMDVWGQGTTVTVS
(配列番号66)

10

を含む可変重鎖を含む。

【0 0 7 2】

本明細書に開示された抗体は、様々な形態の関連する結合ドメイン分子を調製するために利用され得る。例えば、特定の実施形態は、抗体の結合断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂及び一本鎖Fv断片(scFv)又は本明細書に記載されたエピトープに特異的に結合する免疫グロブリンの任意の生物学的に有効な断片を含むことができる。

20

【0 0 7 3】

特定の実施形態では、抗体断片が使用される。「抗体断片」は、エピトープに結合する能力を保持する完全又は全長抗体の一部を意味する。抗体断片は、本明細書に記載されているように、無傷抗体のタンパク質消化並びに組換え宿主細胞(例えば、哺乳動物懸濁細胞株、E. コリ(E. coli)又はファージ)による産生を含む様々な技術によって作製され得る。抗体断片は、無傷抗体と同じ方法でそれらの結合特性についてスクリーニングされ得る。抗体断片の例には、Fv、scFv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ及び線状抗体が含まれる。

【0 0 7 4】

一本鎖可変断片(scFv)は、短いリンカーペプチドにより接続された免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域の融合タンパク質である。Fv断片は、抗体の単一のアームのV_L及びV_Hドメインを含むが、定常領域を欠く。Fv断片の2つのドメインである、V_L及びV_Hは、別個の遺伝子によりコードされるが、それらは、例えば、組換え方法を使用して、V_L及びV_H領域が一価分子(一本鎖Fv(scFv))を形成するために対合する、単一のタンパク質鎖となることを可能とする合成リンカーにより接合され得る。Fv及びscFvに関するさらなる情報について、例えば、Birdら、Science 242: 423~426頁、1988年; Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879~5883頁、1988年; Plueckthun、in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、vol. 113、Rosenburg及びMoore(eds.)、Springer-Verlag、New York(1994年)269~315頁; WO 1993/16185; 米国特許第5,571,894号; 並びに米国特許第5,587,458号を参照のこと。

30

40

【0 0 7 5】

scFvのV_L及びV_Hを接続するために使用されるリンカー配列は、一般に、5~35アミノ酸の長さである。特定の実施形態では、V_L-V_Hリンカーは、5~35、10~30アミノ酸又は15~25アミノ酸を含む。リンカーの長さの変化は、活性を保持又は増強する場合があり、活性研究において優れた有効性をもたらす。scFvのリンカー配列は、一般にGly-Serリンカーであり、本明細書の別の場所でより詳細に記載されている。

50

【0076】

抗体ベースの結合ドメインフォーマットのさらなる例には、s c F vベースのグラバボディ (g r a b a b o d y) 及び可溶性V Hドメイン抗体が含まれる。これらの抗体は、重鎖可変領域のみを使用して結合領域を形成する。例えば、J e s p e r s ら、N a t . B i o t e c h n o l . 2 2 : 1 1 6 1 頁、2 0 0 4 年；C o r t e z - R e t a m o z o ら、C a n c e r R e s . 6 4 : 2 8 5 3 頁、2 0 0 4 年；B a r a l ら、N a t u r e M e d . 1 2 : 5 8 0 頁、2 0 0 6 年；及びB a r t h e l e m y ら、J . B i o l . C h e m . 2 8 3 : 3 6 3 9 頁、2 0 0 8 年を参照のこと。

【0077】

F a b 断片は、V_L、V_H、C_L及びC_H1ドメインを含む一価抗体断片である。F (a b ')₂断片は、ヒンジ領域においてジスルフィド架橋により連結された2つのF a b断片を含む二価断片である。インビボ半減期が増加したF a b及びF (a b ')₂断片の考察について、米国特許第5, 869, 046号を参照のこと。ダイアボディは、二価であり得る2つのエピトープ結合性部位を含む。例えば、E P 0 4 0 4 0 9 7 ; W O 1 9 9 3 / 0 1 1 6 1 ; 及びH o l l i g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 9 0 : 6 4 4 4 ~ 6 4 4 8 頁、1 9 9 3 年を参照のこと。デュアルアフィニティリターゲティング抗体 (d u a l a f f i n i t y r e t a r g e t i n g a n t i b o d y) (DART (商標) ; ダイアボディフォーマットに基づくが、さらなる安定性のために、C末端のジスルフィド架橋を特徴とする (M o o r e ら、B l o o d , 1 1 7 : 4 5 4 2 ~ 5 1 頁、2 0 1 1 年)) も使用され得る。抗体断片はまた、単離されたC D Rも含むことができる。抗体断片の概説について、H u d s o n ら、N a t . M e d . , 9 : 1 2 9 ~ 1 3 4 頁、2 0 0 3 年を参照のこと。

【0078】

特定の実施形態では、1つ以上のアミノ酸修飾が、抗体のF c領域内に導入され得、それによってF c領域バリエーションが生成され得る。F c領域バリエーションは、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含むヒトF c領域配列 (例えば、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3又はI g G 4 F c領域) を含むことができる。多数のF c修飾が当該技術分野で公知であり、そのような可能な修飾の代表的なサンプリングが本明細書に記載されている。

【0079】

特定の実施形態では、バリエーション (F cバリエーションを含む) は、投与の利益をもたらすために参照配列から修飾されている。例示的な投与の利益には、(1) タンパク質分解に対する感受性の低下、(2) 酸化に対する感受性の低下、(3) タンパク質複合体を形成するための結合親和性の变化、(4) 結合親和性の变化、(5) 免疫原性の低下及び／又は(6) 半減期の延長が含まれ得る。以下の開示は、これらの修飾を抗体への適用に関して記載しているが、別の特定の抗C D 3 3結合ドメインフォーマット (例えば、s c F v、二重特異性抗体) に適用可能な場合、修飾は、これらの他のフォーマットにも適用され得る。

【0080】

特定の実施形態では、抗体は、F c受容体に対する親和性を増加させるために突然変異され得る。F c受容体に対する親和性を増加させる例示的な突然変異には、G 2 3 6 A / S 2 3 9 D / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E (G A S D A L I E) が含まれる。S m i t h ら、P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f S c i e n c e s o f t h e U n i t e d S t a t e s o f A m e r i c a , 1 0 9 (1 6) , 6 1 8 1 ~ 6 1 8 6 頁、2 0 1 2 年。特定の実施形態では、抗体バリエーションは、A D C Cを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、F c領域の2 9 8 位、3 3 3 位及び／又は3 3 4 位 (残基のE U番号付け) における置換を有するF c領域を含む。特定の実施形態では、例えば、米国特許第6, 194, 551号、W O 9 9 / 5 1 6 4 2 及びI d u s o g i e ら、J . I m m u n o l . 1 6 4 : 4 1 7 8 ~ 4 1 8 4 頁、2 0 0 0 年に記載されているように、改変されたC 1 q結合及び／又は補体依存性細胞傷害 (

C D C) をもたらす改変が F c 領域において行われる。

【0081】

特定の実施形態では、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている、システイン操作抗体、例えば、「thioMAb」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換残基は、抗体のアクセス可能な部位に存在する。これらの残基をシステインで置換することにより、したがって反応性チオール基が抗体のアクセス可能な部位に配置され、以下にさらに記載されているように、イムノコンジュゲートを作製するために、薬物部分又はリンカー-薬物部分などの他の分子と抗体をコンジュゲートするために使用され得る。特定の実施形態では、重鎖 F c 領域の残基 5400 (EU 番号付け) が選択される。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第 7, 521, 541 号に記載されているように生成され得る。

10

【0082】

F c 領域に (直接的又は間接的に) 結合されたフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体バリエーションが提供されている。例えば、このような抗体中のフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%又は20%~40%であり得る。フコースの量は、例えば、WO2008/077546に記載されている、MALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に結合した全ての糖構造 (例えば、複合体、ハイブリッド及び高マンノース構造) の合計に対するAsn297での糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297とは、F c 領域内の297位 (F c 領域残基のEU番号付け) に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297はまた、抗体における小規模な配列変化に起因して、297位から±3アミノ酸の上流又は下流、すなわち、294位から300位の間に位置してもよい。このようなフコシル化バリエーションは、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、WO2000/61739; WO2001/29246; WO2002/031140; US2002/0164328; WO2003/085119; WO2003/084570; US2003/0115614; US2003/0157108; US2004/0093621; US2004/0110704; US2004/0132140; US2004/0110282; US2004/0109865; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; Okazakiら、J. Mol. Biol. 336:1239~1249頁 (2004年); 及びYamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614頁 (2004年) を参照のこと。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例には、タンパク質フコシル化が欠損したLec13 CHO細胞 (Ripkaら、Arch. Biochem. Biophys. 249:533~545頁、1986年、及びアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞株 (例えば、Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614頁、2004年; Kandaら、Biotechnol. Bioeng. 94(4):680~688頁、2006年; 及びWO2003/085107を参照のこと。) が含まれる。

20

30

【0083】

特定の実施形態では、修飾抗体は、1つ以上のアミノ酸が非アミノ酸成分で置換されているもの又はアミノ酸が官能基にコンジュゲートされている若しくは他の状態で官能基がアミノ酸に会合しているものを含む。修飾アミノ酸は、例えば、グリコシル化アミノ酸、PEG化アミノ酸、ファルネシル化アミノ酸、アセチル化アミノ酸、ビオチン化アミノ酸、脂質部分にコンジュゲートされたアミノ酸又は有機誘導体化剤にコンジュゲートされたアミノ酸であり得る。アミノ酸は、例えば、組換え産生中に翻訳と同時に若しくは翻訳後に修飾され得る (例えば、哺乳動物細胞における発現中のN-X-S/TモチーフにおけるN-結合グリコシル化) 又は合成手段により修飾され得る。修飾アミノ酸は配列の内部に存在し得る又は配列の末端に存在し得る。修飾は亜硝酸化構築物も含む。

40

【0084】

特定の実施形態では、バリエーションは、グリコシル化部位の数及び/又は型が、参照配列

50

のアミノ酸配列と比べて変化したグリコシル化バリエーションを含む。特定の実施形態では、グリコシル化バリエーションは、参照配列よりも多い又は少ない数のN-結合グリコシル化部位を含む。N-結合グリコシル化部位は、配列：Asn-X-Ser又はAsn-X-Thrにより特徴付けられ、Xとして表されるアミノ酸残基はプロリンを除く任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N-結合炭水化物鎖の付加のための潜在的な新しい部位を提供する。或いは、この配列を削除する置換は、存在するN-結合炭水化物鎖を除去する。また、1つ以上のN-結合グリコシル化部位（例えば、天然に存在するもの）が削除され、1つ以上の新しいN-結合部位が作製されるN-結合炭水化物鎖の再配列も提供されている。さらなる抗体バリエーションは、1つ以上のシステイン残基が、削除されている又は参照配列と比較して別のアミノ酸（例えば、セリン）に置換されているシステインバリエーションを含む。これらのシステインバリエーションは、不溶性封入体の単離後のように、抗体を再び折り重ねて生物学的に活性な立体配座にすべき場合に有用となり得る。これらのシステインバリエーションは、一般に、参照配列より少ないシステイン残基を有し、典型的に、不對システインから生じる相互作用を最少化するために偶数を有する。

10

【0085】

PEG化は、特に、ポリエチレングリコール（PEG）ポリマー鎖が、タンパク質などの他の分子と共有結合によりコンジュゲートするプロセスである。タンパク質をPEG化するいくつかの方法が文献に報告されている。例えば、タンパク質のリジン残基及びN末端の遊離アミン基をPEG化するためにN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）-PEGが使用されており；還元剤の存在下でタンパク質のアミノ末端をPEG化するためにアルデヒド基を有するPEGが使用されており；タンパク質のシステイン残基の遊離チオール基を選択的にPEG化するためにマレイミド官能基を有するPEGが使用されており；アセチルフェニルアラニン残基の部位特異的PEG化が実施され得る。

20

【0086】

タンパク質のPEGとの共有結合は、生体内のタンパク質の半減期を延長させるための有用な方法であることが証明されている（Abuchowski, A.ら、Cancer Biochem. Biophys., 1984年、7:175~186頁；Hershey, M. S.ら、N. Engl. J. Medicine, 1987年、316:589~596頁；及びMeyers, F. J.ら、Clin. Pharmacol. Ther., 49:307~313頁、1991年）。PEGをタンパク質と結合させると、分子を酵素分解から保護するだけでなく、生体からのそれらのクリアランス速度も低下する。タンパク質と結合させるPEGのサイズは、タンパク質の半減期に大きな影響を与える。PEG化がクリアランスを減少させる能力は、一般に、PEG基がタンパク質にいくつ結合しているかではなく、改変されたタンパク質の総分子量に応じる。通常、PEGが大きいほど、結合させたタンパク質のインビボ半減期は長くなる。さらに、PEG化はタンパク質凝集を減少させ（Suzukiら、Biochem. Biophys. Acta 788:248頁、1984年）、タンパク質免疫原性を変化させ（Abuchowskiら、J. Biol. Chem. 252:3582頁、1977年）、例えば、PCT公開番号WO92/16221に記載されているようにタンパク質溶解度を増加させることもできる。

30

40

【0087】

目標とする循環半減期を有するタンパク質を産生するのに適したいくつかのサイズのPEGが市販されている（Nektar Advanced PEGylation Catalog 2005~2006年；及びNOF DDS Catalogue Ver 7.1）。mPEGスクシンイミジルスクシネート、mPEGスクシンイミジルカーボネート及びmPEGプロピオンアルデヒドなどのPEGアルデヒドを含む、様々な活性PEGが使用されている。

【0088】

特定の実施形態では、抗体は、アミノ酸を改変していない同じFcポリペプチドを含有

50

する同様の抗体の半減期と比較して、改変されたFcポリペプチドを含有する抗体のインビボ半減期を延長するアミノ酸改変を含むFcポリペプチドに融合され得る又はカップリングされ得る。特定の実施形態では、Fcポリペプチドのアミノ酸改変は、M252Y、S254T、T256E、M428L及び／又はN434Sを含むことができ、一緒に、別々に又は任意の組合せで使用され得る。例えば、M428L／N434Sは、Zalavskyら、Nature Biotechnology 28、157～159頁、2010年に記載されているように、血清中の抗体の半減期を増加させる一対の突然変異である。有用であり得る他の改変は、米国特許第7,083,784号、米国特許第7,670,600号、米国特許公開第2010/0234575号、PCT／US2012/070146及びZwolak、Scientific Reports 7:15521頁、2017年に記載されている。特定の実施形態では、Fcポリペプチドにおける以下のアミノ酸位置のうちの1つでの任意の置換は、半減期を延長するFc改変とみなされ得る：250、251、252、259、307、308、332、378、380、428、430、434、436。これらの改変の各々又はこれらの改変の組合せは、本明細書に記載されている二重特異性抗体の半減期を延長するために使用され得る。

10

【0089】

特定の実施形態では、Fc修飾には、huIgG4 ProAlaAla、huIgG2m4及び／又はhuIgG2sigma突然変異が含まれる。

【0090】

特定の実施形態では、本明細書に開示されている抗体は、Pechmanら（Am J Physiol 294:R1234-R1239、2008年）に記載されているDaedalus発現系を使用して形成される。Daedalus系は、ゲノムサイレンシングを低減又は予防し、デシグラムレベルの発現の安定性を維持するのを助けるために、導入ベクターにおける最小化遍在性クロマチンオープニングエレメントの含有を利用する。この系は、293 Freestyleなどの無血清適応ヒト懸濁細胞株の分泌経路を利用することによる他のタンパク質産生方法の面倒で時間のかかる工程を回避し得る。最適化レンチウイルスベクターを使用して、70kDaまでのサイズの適切にフォールディングした翻訳後修飾エンドトキシン非含有タンパク質の20～100mg／lの収量が、従来の小規模（100ml）の培養において得られ得る。これらの収量において、ほとんどのタンパク質は、構造的、生物物理学的又は治療的用途での使用に直接的に適した単一のサイズ排除クロマトグラフィー工程を使用して精製され得る。Bandaranayakeら、Nucleic Acids Res.、39（21）2011年。一部の場合、本明細書に記載されている方法による製造の純度に起因して、クロマトグラフィーによる精製は必要でなくてもよい。

20

30

【0091】

（ii）抗CD33抗体コンジュゲート。抗CD33抗体コンジュゲートは、抗CD33免疫毒素、抗体－薬物コンジュゲート（ADC）、蛍光コンジュゲート、及び放射性同位体コンジュゲートを含む。

【0092】

抗CD33免疫毒素。特定の実施形態では、抗体はまた、免疫毒素として形成され得る。抗CD33免疫毒素には、1つ以上の細胞毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物若しくは動物起源の酵素的に活性な毒素又はそれらの断片）にコンジュゲートされた、本明細書に開示されている抗CD33抗体が含まれる。毒素は、細胞に有害な任意の作用物質であり得る。頻繁に使用される植物毒素は、2つのクラス：（1）リシン、アブリン、ヤドリギレクチン及びモデシンなどのホロトキシン（又はクラスIIリボソーム不活性化タンパク質）並びに（2）ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質（PAP）、サポリン、ブリオジン（Bryodine）1、ブーガニン（bouganine）及びゲロニンなどのヘミトキシン（クラスIリボソーム不活性化タンパク質）に分類される。一般的に使用される細菌毒素には、ジフテリア毒素（DT）及びシュードモナス（Pseudomonas）外毒素（PE）が含まれる。Kreitman、Current Pharmac

40

50

e u t i c a l B i o t e c h n o l o g y 2 : 3 1 3 ~ 3 2 5 頁 (2 0 0 1 年) 。
毒素は、本質的に任意の供給源から得られ得、合成産物であってもよい又は天然産物であってもよい。

【 0 0 9 3 】

結合ドメインごとに複数（例えば、4つ）の細胞毒素を含む免疫毒素は、37℃で30分間、ジチオスレイトール（DTT）又はトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）などの過剰の還元試薬を用いて結合ドメインを部分的に還元することによって調製され得、次いで、バッファーは、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）中の1mMのDTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）を含むSEPHADEX G-25樹脂を通して溶出することにより交換され得る。溶出液はさらにDPBSで希釈され得、結合ドメインのチオール濃度が、5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）[エルマン試薬]を使用して測定され得る。過剰、例えば5倍のリンカー-細胞毒素コンジュゲートが4℃で添加され1時間おかれ得、コンジュゲーション反応は、かなり過剰、例えば20倍のシステインの添加によってクエンチされ得る。得られた免疫毒素混合物は、未反応のリンカー-細胞毒素コンジュゲートを除去するために、PBS中で平衡化されたSEPHADEX G-25で精製され得、所望の場合、脱塩され、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製され得る。次いで、得られた免疫毒素は、例えば、0.2 µmフィルターを通して滅菌濾過され得、保存が望まれる場合、凍結乾燥され得る。

10

【 0 0 9 4 】

抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、CD33発現細胞への薬物部分の標的化送達を可能にし、特定の実施形態では、コンジュゲートされていない薬物の全身投与が、正常細胞に対して許容できないレベルの毒性をもたらす可能性がある、細胞内蓄積を可能にする（Polakis P. (2005年) Current Opinion in Pharmacology 5:382~387頁）。

20

【 0 0 9 5 】

特定の実施形態では、ADCとは、強力な細胞毒性薬を抗原発がん細胞に標的化することによって、抗体及び細胞毒性薬の両方の特性を組み合わせ（Teicher, B. A. (2009年) Current Cancer Drug Targets 9:982~1004頁）、それにより、有効性を最大化し、オフターゲット毒性を最小化することによって治療指数を高める（Carter, P. J. 及び Senter P. D. (2008年) The Cancer Jour. 14 (3):154~169頁; Chari, R. V. (2008年) Acc. Chem. Res. 41:98~107頁）、標的化された化学療法分子を指す。ADCの開発に関する考慮事項について説明している、Kamath & Iyer (Pharm Res. 32 (11):3470~3479頁、2015年)も参照のこと。

30

【 0 0 9 6 】

ADCの薬物部分（D）は、細胞毒性効果又は細胞静止効果を有する任意の化合物、部分又は基を含むことができる。薬物部分は、チューブリン結合、DNA結合又はインターカレーション並びにRNAポリメラーゼ、タンパク質合成及び／又はトポイソメラーゼの阻害を含む機構によって細胞毒性効果及び細胞静止効果を与えることができる。例示的な薬物には、アクチノマイシンD、アントラサイクリン、アウリスタチン、カリケアマイシン、カンプトテシン、CC1065、コルヒチン、サイトカラシンB、ダウノルビシン、1-デヒドロテストステロン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ドラスタチン、ドキソルビシン、デュオカルマイシン、エリナフィド、エメチン、エチジウムブロマイド、エトポシド、グラミシジンD、グルココルチコイド、リドカイン、メイタンシノイド（モノメチルアウリスタチンE [MMAE]；ベドチンを含む）、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ネモルビシン、PNU-159682、プロカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、ピロロベンゾジアゼピン（PBD）、タキサン、タキソール、テノポシド、テトラカイン、トリコテセン、ビンブラスチン、ピンカアルカロイド、ビンクリスチン並びに細胞傷害活性を有するそれらの立体異性体、同配体、類似体及び誘導

40

50

体が含まれる。

【0097】

薬物は、本質的に任意の供給源から得られ得、合成産物であってもよい又は選択された供給源、例えば、植物、細菌、昆虫、哺乳動物若しくは真菌源から単離された天然産物であってもよい。薬物はまた、合成的に修飾された天然産物であってもよい又は天然産物の類似体であってもよい。

【0098】

本開示のADC化合物は、抗CD33活性を有するものを含む。特定の実施形態では、ADC化合物は、薬物部分にコンジュゲートされた、すなわち共有結合された抗体を含む。特定の実施形態では、抗体は、リンカーを介して薬物部分に共有結合されている。リンカーは、抗体、抗体断片（例えば、抗原結合断片）又は機能的等価物を、薬物部分などの別の部分に連結することができる任意の化学部分を含むことができる。リンカーは、化合物又は抗体が活性のままである条件下で、酸誘導切断、光誘導切断、ペプチダーゼ誘導切断、エステラーゼ誘導切断及びジスルフィド結合切断などの切断を受けやすい可能性がある（切断可能なリンカー）。或いは、リンカーは、切断に対して実質的に耐性であり得る（例えば、安定したリンカー又は切断不可能なリンカー）。一部の態様では、リンカーは、プロチャージリンカー、親水性リンカー又はジカルボン酸ベースのリンカーである。ADCは、有効用量の薬物をがん細胞に選択的に送達し、それにより、治療指数（「治療ウィンドウ」）を増加させながら、より高い選択性、すなわち、より低い有効用量が達成され得る。

【0099】

ADCを調製するために、リンカー-細胞毒素コンジュゲートは、Doroninaら（Bioconjugate Chem. 17:114~124頁、2006年）によって記載されているものと同様の従来の方法によって作製され得る。抗体ごとに複数（例えば、4つ）の薬物を含む抗体-薬物コンジュゲートは、37℃で30分間、ジチオスレイトール（DTT）又はトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）などの過剰の還元試薬を用いて抗体を部分的に還元することによって調製され得、次いで、バッファーは、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（DPBS）中の1mMのDTPAを含むSEPHADEX G-25樹脂を通して溶出することにより交換され得る。溶出液はさらにDPBSで希釈され得、抗体のチオール濃度が、5, 5'-ジチオビス（2-ニトロ安息香酸）[エルマン試薬]を使用して測定され得る。過剰、例えば5倍のリンカー-細胞毒素コンジュゲートが4℃で添加され1時間おかれ得、コンジュゲーション反応は、かなり過剰、例えば20倍のシステインの添加によってクエンチされ得る。得られたADC混合物は、未反応のリンカー-細胞毒素コンジュゲートを除去するために、PBS中で平衡化されたSEPHADEX G-25で精製され得、所望の場合、脱塩され、サイズ排除クロマトグラフィーによって精製され得る。次いで、得られたADCは、例えば、0.2 µmフィルターを通して滅菌濾過され得、保存が望まれる場合、凍結乾燥され得る。

【0100】

抗CD33蛍光コンジュゲートは、蛍光標識に連結したCD33結合ドメインを含む。蛍光標識は、任意の適切な標識又は例えば、光学的、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的又は化学的手段によって検出できる検出可能な基を含むことができる。

【0101】

蛍光標識は、細胞の染色、同定及び単離の用途において特に有用であり得る。例示的な蛍光標識には、青色蛍光タンパク質（例えば、eBFP、eBFP2、アジュライト、mKallama1、GFPuv、サファイア、T-サファイア）；シアン蛍光タンパク質（例えば、eCFP、セルリアン、CyPet、AmCyan1、ミドリイシーシアン（Midoriishi-Cyan）、mTurquoise）；緑色蛍光タンパク質（例えば、GFP、GFP-2、tagGFP、turboGFP、EGFP、エメラルド、アザミグリーン（Azami Green）、単量体アザミグリーン（mAzamigreen）

en))、CopGFP、AceGFP、avGFP、ZsGreen1、Oregon Green (商標) (Thermo Fisher Scientific)) ; ルシフェラーゼ ; オレンジ色蛍光タンパク質 (mOrange、mKO、クサビラーオレンジ (Kusabira-Orange))、単量体クサビラーオレンジ、mTangerine、tdTomato) ; 赤色蛍光タンパク質 (mKate、mKate2、mPlum、DsRedモノマー、mCherry、mRuby、mRFP1、DsRed-Express、DsRed2、DsRed-モノマー、HcRed-タンデム、HcRed1、AsRed2、eqFP611、mRaspberry、mStrawberry、Jred、Texas Red (商標) (Thermo Fisher Scientific)) ; 遠赤色蛍光タンパク質 (例えば、mPlum及びmNeptune) ; 黄色蛍光タンパク質 (例えば、YFP、eYFP、シトリン (Citrine))、SYFP2、Venus、YPet、PhiYFP、ZsYellow1) ; 及びタンデムコンジュゲートが含まれる。

10

【0102】

抗CD33-放射性同位体コンジュゲートは、核医学において使用するための放射性同位体に連結したCD33結合ドメインを含む。核医学とは、放射活性同位体 (放射性同位体又は放射性核種) を対象に投与することによる状態の診断及び／又は処置を指す。治療用核医学は、多くの場合、放射線療法又は放射免疫療法 (RIT) と称される。

【0103】

本開示の抗体にコンジュゲートされ得る放射活性同位体の例には、ヨウ素-131、ヒ素-72、ヒ素-74、ヨウ素-131、インジウム-111、イットリウム-90及びルテチウム-177並びにアスタチン211、アクチニウム-225、ビスマス-212又はビスマス-213などのアルファ線放射性核種が含まれる。放射性免疫コンジュゲートを調製するための方法は、当該技術分野において確立されている。Zevalin (商標) (DEC Pharmaceuticals) を含む、放射性免疫コンジュゲートの例は市販されており、同様の方法が、本開示の抗体を使用して放射性免疫コンジュゲートを調製するために使用され得る。

20

【0104】

放射線療法に有用な放射性核種の例には、 ^{225}Ac 及び ^{227}Th が含まれる。 ^{225}Ac は、半減期が10日の放射性核種である。 ^{225}Ac が崩壊すると、娘同位体 ^{221}Fr 、 ^{213}Bi 及び ^{209}Pb が形成される。 ^{227}Th は、半減期が19日であり、娘同位体 ^{223}Ra を形成する。

30

【0105】

有用な放射性同位体のさらなる例には、 ^{228}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{124}Am 、 ^{74}As 、 ^{211}At 、 ^{209}At 、 ^{194}Au 、 ^{128}Ba 、 ^7Be 、 ^{206}Bi 、 ^{245}Bk 、 ^{246}Bk 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{47}Ca 、 ^{254}Cf 、 ^{242}Cm 、 ^{51}Cr 、 ^{67}Cu 、 ^{153}Dy 、 ^{157}Dy 、 ^{159}Dy 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{171}Er 、 ^{250}Es 、 ^{254}Es 、 ^{147}Eu 、 ^{157}Eu 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{251}Fm 、 ^{252}Fm 、 ^{253}Fm 、 ^{66}Ga 、 ^{72}Ga 、 ^{146}Gd 、 ^{153}Gd 、 ^{68}Ge 、 ^{170}Hf 、 ^{171}Hf 、 ^{193}Hg 、 ^{193}mHg 、 ^{160}mHo 、 ^{130}I 、 ^{131}I 、 ^{135}I 、 ^{114}mIn 、 ^{185}Ir 、 ^{42}K 、 ^{43}K 、 ^{76}Kr 、 ^{79}Kr 、 ^{81}mKr 、 ^{132}La 、 ^{262}Lr 、 ^{169}Lu 、 ^{174}mLu 、 ^{176}mLu 、 ^{257}Md 、 ^{260}Md 、 ^{28}Mg 、 ^{52}Mn 、 ^{90}Mo 、 ^{24}Na 、 ^{95}Nb 、 ^{138}Nd 、 ^{57}Ni 、 ^{66}Ni 、 ^{234}Np 、 ^{15}O 、 ^{182}Os 、 ^{189}mOs 、 ^{191}Os 、 ^{32}P 、 ^{201}Pb 、 ^{101}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{191}Pt 、 ^{243}Pu 、 ^{225}Ra 、 ^{81}Rb 、 ^{188}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{211}Rn 、 ^{103}Ru 、 ^{35}S 、 ^{44}Sc 、 ^{72}Se 、 ^{153}Sm 、 ^{125}Sn 、 ^{91}Sr 、 ^{173}Ta 、 ^{154}Tb 、 ^{127}Te 、 ^{234}Th 、 ^{45}Ti 、 ^{166}Tm 、 ^{230}U 、 ^{237}U 、 ^{240}U 、 ^{48}V 、 ^{178}W 、 ^{181}W 、 ^{188}W 、 ^{125}Xe 、 ^{127}Xe 、 ^{133}Xe 、 ^{133}mXe 、 ^{135}Xe 、 ^{85}mY 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{93}Y 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{65}Zn 、 ^{71}mZn 、 ^{86}Zr 、 ^{95}Zr 及び／又は ^{97}Zr が含まれる。

40

50

【0106】

(iii) 抗CD33多重特異性抗体。抗CD33二重特異性抗体は、エピトープの少なくとも1つがCD33上に位置する少なくとも2つのエピトープに結合する。抗CD33三重特異性抗体は、エピトープの少なくとも1つがCD33上に位置する少なくとも3つのエピトープに結合する、などである。

【0107】

二重特異性抗体は、全長抗体として調製され得る又は抗体断片（例えば、F(ab')₂二重特異性抗体）として調製され得る。例えば、WO1996/016673は、二重特異性抗Erbb2／抗FcガンマRIII抗体を記載しており、米国特許第5,837,234号は、二重特異性抗Erbb2／抗FcガンマRI抗体を記載しており、WO1998/002463は、二重特異性抗Erbb2／Fcアルファ抗体を記載しており、US5,821,337は、二重特異性抗Erbb2／抗CD3抗体を記載している。特定の実施形態では、二重特異性抗体は、二重特異性T細胞誘導（BiTE（登録商標））抗体の形態であり得る。

【0108】

いくつかのさらなる例示的な二重特異性抗体は、2つの重鎖（各々が3つの重鎖CDRを有し、その後に（N末端からC末端へ）CH1ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン及びCH3ドメインが続く）及び各重鎖との会合を通じて抗原結合特異性を与える2つの免疫グロブリン軽鎖を有する。しかしながら、示されているように、軽鎖が各重鎖と会合するが、抗原結合特異性に寄与しない（又は最小限でしか寄与しない）又は重鎖抗原結合領域が結合するエピトープの1つ以上に結合することができる又は各重鎖と会合することができる1つ若しくは両方のエピトープへの重鎖の1つ若しくは両方の結合を可能にする二重特異性抗体を含む、さらなる構成が想定される。

【0109】

全抗体ではなく、scFv二量体又はダイアボディが使用され得る。ダイアボディ及びscFvは、Fc領域なしで、可変ドメイン（通常、ソース抗体の軽鎖及び重鎖の両方からの可変ドメイン成分を含む）のみを使用して構築され得、抗イディオタイプ反応の影響を低減させる可能性がある。二重特異性抗体の他の形態には、Trauneckerら（Embo Journal、10、3655～3659頁、1991年）に記載されている一本鎖「Janusins」が含まれる。

【0110】

半減期が延長された二重特異性抗体は、例えば、米国特許第8,921,528号及び米国特許公開第2014/0308285号に記載されている。

【0111】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該技術分野において公知である。例えば、全長二重特異性抗体の従来への産生は、2つの鎖が異なる特異性を有する、2つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の同時発現に基づく（例えば、Milsteinら、Nature 305:37～39頁、1983年を参照のこと。）。同様の手順は、例えば、WO1993/008829、Trauneckerら、EMBO J. 10:3655～3659頁、1991年及びHolliger & Winter、Current Opinion Biotechnol. 4、446～449頁（1993年）に開示されている。

【0112】

特定の実施形態では、二重特異性抗体は、化学結合を使用して調製され得る。例えば、Brennanら（Science 229:81頁、1985年）は、無傷抗体が、F(ab')₂断片を生成するためにタンパク質分解的に切断される手順を記載している。これらの断片は、近接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を阻止するために、ジチオール錯化剤である、亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。次いで生成されたFab'断片は、チオニトロベンゾエート（TNB）誘導体に変換される。次いでFab'-TNB誘導体の1つが、メルカプトエチルアミンでの還元によりFab'-チオールに再変換され、二重特異性抗体を形成するために等モル量の他のFab'-TNB誘導体と

10

20

30

40

50

混合される。

【0113】

特定の実施形態では、本明細書で開示される結合ドメインを使用すれば、二重特異性、三重特異性、（又はそれよりも多い特異性）の免疫細胞誘導抗体構築物を作製することができる。

【0114】

特定の実施形態では、本明細書で開示される結合ドメインを使用すれば、二重特異性、三重特異性、（又はそれよりも多い特異性）の免疫細胞誘導抗体構築物を作製することができる。免疫細胞誘導抗体構築物は、例えば、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T細胞、単球／マクロファージ、リンパ球、造血幹細胞（HSC）、造血前駆細胞（HPC）並びに／又はHSC及びHPCの混合物（すなわち、HSPC）を誘導することができる。特定の実施形態では、免疫細胞誘導抗体構築物はT細胞を誘導する。

10

【0115】

T細胞のいくつかの異なるサブセットが発見されており、各々が異なる機能を有する。例えば、T細胞の大部分は、いくつかのタンパク質の複合体として存在するT細胞受容体（TCR）を有する。実際のT細胞受容体は、独立したT細胞受容体アルファ及びベータ（TCR α 及びTCR β ）遺伝子から産生され、 α -TCR鎖及び β -TCR鎖と呼ばれる、2つの別個のペプチド鎖から構成される。

【0116】

$\gamma\delta$ T細胞は、それらの表面に異なるT細胞受容体（TCR）を有するT細胞の小さなサブセットを表す。 $\gamma\delta$ T細胞では、TCRは、1つの γ 鎖及び1つの δ 鎖から構成される。T細胞のこの群は、 $\alpha\beta$ T細胞ほど一般的ではない（全T細胞の2%）。

20

【0117】

CD3は、全ての成熟T細胞上で発現される。活性化T細胞は、4-1BB（CD137）、CD69及びCD25を発現する。CD5及びトランスフェリン受容体もまた、T細胞上で発現される。

【0118】

T細胞はさらにヘルパー細胞（CD4+T細胞）及び細胞溶解性T細胞を含む細胞障害性T細胞（CTL、CD8+T細胞）に分類され得る。Tヘルパー細胞は、B細胞の形質細胞への成熟、並びに細胞傷害性T細胞及びマクロファージの活性化などの機能を含む、免疫学的プロセスにおいて他の白血球を補助する。これらの細胞はまた、それらの表面上にCD4タンパク質を発現するため、CD4+T細胞としても知られている。ヘルパーT細胞は、抗原提示細胞（APC）の表面上で発現されるMHCクラスII分子によりペプチド抗原を提示されると、活性化される。活性化されると、それらは迅速に分裂し、能動免疫応答を調節する又は補助するサイトカインと呼ばれる小さいタンパク質を分泌する。

30

【0119】

細胞傷害性T細胞は、ウイルス感染細胞及び腫瘍細胞を破壊し、移植片拒絶反応にも関与している。これらの細胞はまた、それらの表面上にCD8糖タンパク質を発現するため、CD8+T細胞としても知られている。これらの細胞は、生体のほぼ全ての細胞の表面上に存在するMHCクラスIと会合した抗原と結合することにより、それらの標的を認識する。

40

【0120】

本明細書で使用される場合、「セントラルメモリー」T細胞（又は「TCM」）とは、抗原を経験したCTLであり、それらの表面上でCD62L又はCCR7及びCD45ROを発現し、ナイーブ細胞と比較してCD45RAを発現しない又は発現が低下しているものを指す。特定の実施形態では、セントラルメモリー細胞は、CD62L、CCR7、CD25、CD127、CD45RO及びCD95の発現が陽性であり、ナイーブ細胞と比較してCD45RAの発現が低下している。

【0121】

50

本明細書で使用される場合、「エフェクターメモリー」Ｔ細胞（又は「TEM」）とは、抗原を経験したＴ細胞であり、セントラルメモリー細胞と比較してそれらの表面上でCD62Lを発現しない又は発現が低下しており、ナイーブ細胞と比較してCD45RAを発現しない又は発現が低下しているものを指す。特定の実施形態では、エフェクターメモリー細胞は、ナイーブ細胞又はセントラルメモリー細胞と比較してCD62L及びCCR7の発現が陰性であり、CD28及びCD45RAの発現にばらつきがある。エフェクターＴ細胞は、メモリー又はナイーブＴ細胞と比較して、グランザイムB及びパーフォリンが陽性である。

【0122】

本明細書で使用される場合、「ナイーブ」Ｔ細胞とは、抗原を経験していないＴ細胞であり、セントラルメモリー細胞又はエフェクターメモリー細胞と比較して、CD62L及びCD45RAを発現し、CD45ROを発現しないものを指す。特定の実施形態では、ナイーブCD8＋Ｔリンパ球は、CD62L、CCR7、CD28、CD127及びCD45RAを含むナイーブＴ細胞の表現型マーカーの発現を特徴とする。

【0123】

ナチュラルキラー細胞（NK細胞、K細胞及びキラー細胞としても知られている）は、インターフェロン又はマクロファージ由来サイトカインに応答して活性化される。これらは、適応免疫応答により、感染症を排除することができる抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞が生成されている間に、ウイルス感染症を抑制するように機能する。NK細胞は、CD8、CD16及びCD56を発現するが、CD3を発現しない。

【0124】

NK細胞はNK－Ｔ細胞を含む。NK－Ｔ細胞は、セミンバリアントＴ細胞受容体（TCRa b）及び典型的にナチュラルキラー細胞と会合する表面抗原を発現するＴ細胞の特殊化した集団である。NK－Ｔ細胞は、抗菌及び抗ウイルス免疫応答に寄与し、腫瘍関連の免疫監視又は免疫抑制を促進する。ナチュラルキラー細胞と同様に、NK－Ｔ細胞もまた、パーフォリン関連、Fas関連及びTNF関連の細胞傷害性を誘導することができる。活性化されたNK－Ｔ細胞は、IFN－γ及びIL－4を産生することができる。特定の実施形態では、NK－Ｔ細胞はCD3＋／CD56＋である。

【0125】

マクロファージ（及びそれらの前駆細胞である単球）は、生体の全ての組織に（ある特定の場合では、小膠細胞、クッパー細胞及び破骨細胞として）存在し、アポトーシス細胞、病原体及び他の非自己成分を飲み込む。単球／マクロファージは、CD11b、F4／80、CD68、CD11c、IL－4Rα及び／又はCD163を発現する。

【0126】

未成熟樹状細胞（すなわち、活性化前）は、末梢において抗原及び他の非自己成分を飲み込んだ後、活性化形態において、リンパ組織のＴ細胞領域に移動し、Ｔ細胞への抗原提示を行う。樹状細胞は、CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD21、CD35、CD39、CD40、CD86、CD101、CD148、CD209及びDEC－205を発現する。

【0127】

造血幹細胞／前駆細胞又はHSPCとは、造血幹細胞及び造血前駆細胞の組合せを指す。

【0128】

造血幹細胞とは、インビボで自己複製でき、インビトロで本質的に無制限に増殖でき、他の全ての造血細胞型に分化できる未分化造血細胞を指す。

【0129】

造血前駆細胞は、成熟細胞型にさらに分化することができる造血幹細胞又は胎児組織に由来する細胞である。ある特定の実施形態では、造血前駆細胞は、CD24^{Lo}Lin[－]CD117⁺造血前駆細胞である。HPCは、（i）最終的に単球及びマクロファージ、好中球、好塩基球、好酸球、赤血球、巨核球／血小板若しくは樹状細胞を生じさせる骨髓

10

20

30

40

50

前駆細胞、又は (i i) 最終的に T 細胞、B 細胞及び N K 細胞を生じさせるリンパ系前駆細胞に分化することができる。

【 0 1 3 0 】

H S P C は、他の型の造血細胞と比べて、H S P C 上で増加したレベルで発現される特定のマーカーに対して陽性であり得る。例えば、そのようなマーカーには、C D 3 4、C D 4 3、C D 4 5 R O、C D 4 5 R A、C D 5 9、C D 9 0、C D 1 0 9、C D 1 1 7、C D 1 3 3、C D 1 6 6、H L A D R 又はそれらの組合せが含まれる。また、H S P C は、他の型の造血細胞と比べて発現マーカーに対して陰性であり得る。例えば、そのようなマーカーには、L i n、C D 3 8 又はそれらの組合せが含まれる。好ましくは、H S P C は C D 3 4⁺ 細胞である。

10

【 0 1 3 1 】

細胞又は細胞集団が、特定のマーカーに対して「陽性」である又は特定のマーカーを発現するという記述は、特定のマーカーの細胞上又は細胞中での検出可能な存在を指す。表面マーカーに言及する場合、この用語は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、前記抗体を検出することによって、検出される表面発現の存在を指すことができ、染色は、他の点では同一の条件下でアイソタイプが一致した対照を用いて同じ手順を実行して検出された染色を実質的に上回るレベルで及び／又はマーカーに対して陽性であることが知られている細胞についてのレベルと実質的に同様のレベルで及び／又はマーカーに対して陰性であることが知られている細胞についてのレベルより実質的に高いレベルでフローサイトメトリーによって検出可能である。

20

【 0 1 3 2 】

細胞又は細胞集団が、特定のマーカーに対して「陰性」である又はマーカーの発現を欠いているという記述は、特定のマーカーの細胞上又は細胞中での実質的に検出可能な存在がないことを指す。表面マーカーに言及する場合、この用語は、フローサイトメトリーによって、例えば、マーカーに特異的に結合する抗体で染色し、前記抗体を検出することによって、検出される表面発現の欠如を指すことができ、染色は、他の点では同一の条件下でアイソタイプが一致した対照を用いて同じ手順を実行して検出された染色を実質的に上回るレベルで及び／又はマーカーに対して陽性であることが知られている細胞についてのレベルより実質的に低いレベルで及び／又はマーカーに対して陰性であることが知られている細胞についてのレベルと比較して実質的に同様のレベルでフローサイトメトリーによって検出されない。

30

【 0 1 3 3 】

多重特異性免疫細胞誘導抗体構築物の例は、免疫細胞を C D 3 3 発現細胞に引き寄せて C D 3 3 発現細胞を破壊することを目的として、C D 3 3 及び免疫細胞（例えば、T 細胞又は N K 細胞）活性化エピトープの両方に結合するものを含む。例えば、U S 2 0 0 8 / 0 1 4 5 3 6 2 を参照のこと。そのような構築物は、本明細書では免疫活性化多重特異性又は I - A M S と称される。B i T E s（登録商標）（A m g e n、T h o u s a n d O a k s、C A）は I - A M S の 1 つの形態である。本開示内で I - A M S による局所活性化の標的とされ得る免疫細胞には、例えば、本明細書でより詳細に論じられる、T 細胞、ナチュラルキラー（N K）細胞及びマクロファージが含まれる。

40

【 0 1 3 4 】

T 細胞活性化は、2 つの異なるシグナル：抗原依存性一次活性化を開始し、T 細胞受容体様シグナルを提供するシグナル（一次細胞質シグナル伝達配列）及び抗原非依存的に作用し、二次又は共刺激シグナルを提供するシグナル（二次細胞質シグナル伝達配列）によって媒介され得る。本明細書に開示されている I - A M S は、結合すると T 細胞活性化を誘導する任意の T 細胞活性化エピトープを標的とすることができる。そのような T 細胞活性化エピトープの例は、C D 2、C D 3、C D 7、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 0、C D 4 0、C D 8 3、4 - 1 B B（C D 1 3 7）、O X 4 0、リンパ球機能関連抗原 - 1（L F A - 1）、L I G H T、N K G 2 C 及び B 7 - H 3 を含む T 細胞マーカー上にある。

【 0 1 3 5 】

50

特定の実施形態では、CD3結合ドメインは、配列：

【0136】

【化17】

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWWQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA
RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWWFGGGTKLTVL (配列番号162)

を含む可変軽鎖 (L c F v) 及び配列：

【0137】

【化18】

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY
YADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLTV
SS (配列番号161)

10

を含む可変重鎖 (H c F v) を含む。

【0138】

特定の実施形態では、CD3結合ドメイン (例えば、s c F v) は、OKT3抗体 (ブリナツモマブにおいて利用されているものと同じ) に由来する。OKT3抗体は、米国特許第5,929,212号に詳細に記載されている。それは、SASSSVSYMN (配列番号67) を含むCDRL1配列、RWIYDTSKLAS (配列番号68) を含むCDRL2配列及びQQWSSNPFT (配列番号69) を含むCDRL3配列を含む可変軽鎖を含む。特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、KASGYTFTRYTMH (配列番号70) を含むCDRH1配列、INPSRGYTNYNQKFKD (配列番号71) を含むCDRH2配列及びYYDDHYCLDY (配列番号72) を含むCDRH3配列を含む可変重鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン (例えば、s c F v) である。

20

【0139】

以下の配列は、CD3に結合する能力を保持するOKT3に由来するs c F vである：

【0140】

【化19】

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYN
QKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLLTVSSSGGG
GSGGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYD
TSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR
(配列番号73)

30

これはまた、CD3結合ドメインとして使用され得る。

【0141】

特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、QSLVHNNGNTY (配列番号74) を含むCDRL1配列、KVSを含むCDRL2配列及びGGTQYPFT (配列番号75) を含むCDRL3配列を含む可変軽鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン (例えば、s c F v) である。特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、GFTFTKAW (配列番号76) を含むCDRH1配列、IKDKSNSYAT (配列番号77) を含むCDRH2配列及びRGVYYALSPFDY (配列番号78) を含むCDRH3配列を含む可変重鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン (例えば、s c F v) である。これらは、20G6-F3抗体のCDR配列を反映する。

40

【0142】

50

特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、QSLVHDNGNTY（配列番号79）を含むCDRL1配列、KVSを含むCDRL2配列及びGQGTYPT（配列番号75）を含むCDRL3配列を含む可変軽鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン（例えば、scFv）である。特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、GFTFSNAW（配列番号80）を含むCDRH1配列、IKARSNNYAT（配列番号81）を含むCDRH2配列及びRGTYTASKPFY（配列番号82）を含むCDRH3配列を含む可変重鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン（例えば、scFv）である。これらは、4B4-D7抗体のCDR配列を反映する。

【0143】

特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、QSLVHDNGNTY（配列番号83）を含むCDRL1配列、KVSを含むCDRL2配列を含み；配列表に含まれない）及びGQGTYPT（配列番号75）を含むCDRL3配列を含む可変軽鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン（例えば、scFv）である。特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、GFTFSNAW（配列番号80）を含むCDRH1配列、IKDKSNNYAT（配列番号84）を含むCDRH2配列及びRYVHYGI GYAMDA（配列番号85）を含むCDRH3配列を含む可変重鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン（例えば、scFv）である。これらは、4E7-C9抗体のCDR配列を反映する。

【0144】

特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、QSLVHTNGNTY（配列番号86）を含むCDRL1配列、KVSを含むCDRL2配列及びGQGTHTPT（配列番号87）を含むCDRL3配列を含む可変軽鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン（例えば、scFv）である。特定の実施形態では、CD3T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、GFTFTNAW（配列番号88）を含むCDRH1配列、KDKSNNYAT（配列番号89）を含むCDRH2配列及びRYVHYRFA YALDA（配列番号90）を含むCDRH3配列を含む可変重鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン（例えばscFv）である。これらは、18F5-H10抗体のCDR配列を反映する。

【0145】

抗CD3抗体、結合ドメイン及びCDRのさらなる例は、WO2016/116626に見出され得る。TR66も使用され得る。

【0146】

CD28は、ヒトの末梢T細胞の80%に存在する表面糖タンパク質であり、休止T細胞及び活性化T細胞の両方に存在する。CD28は、B7-1（CD80）及びB7-2（CD86）に結合し、既知の共刺激分子の中で最も強力である（Juneら、Immunol. Today 15:321頁、1994年；Linsleyら、Ann. Rev. Immunol. 11:191頁、1993年）。特定の実施形態では、CD28結合ドメイン（例えば、scFv）は、CD80、CD86又は9D7抗体に由来する。CD28に結合するさらなる抗体には、9.3、KOLT-2、15E8、248.23.2及びEX5.3D10が含まれる。さらに、1YJDは、有糸分裂促進抗体（5.11A1）のFab断片と複合体を形成したヒトCD28の結晶構造を提供する。

【0147】

特定の実施形態では、CD28結合ドメインはTGN1412に由来する。特定の実施形態では、TGN1412の可変重鎖は、

【0148】

10

20

30

40

50

【化 2 0】

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWWRQAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNE
KFKDRATLTVDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGTTTVTVSS

(配列番号91)

を含み、T G N 1 4 1 2 の可変軽鎖は、

【0 1 4 9】

【化 2 1】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQGQTYPTYTFGGGTKVEIK (配列番号92)

10

を含む。

【0 1 5 0】

特定の実施形態では、C D 2 8 結合ドメインは、H A S Q N I Y V W L N (配列番号 9 3) を含む C D R L 1 配列、K A S N L H T (配列番号 9 4) を含む C D R L 2 配列及び Q Q G Q T Y P Y T (配列番号 9 5) を含む C D R L 3 配列を含む可変軽鎖、G Y T F T S Y Y I H (配列番号 9 6) を含む C D R H 1 配列、C I Y P G N V N T N Y N E K (配列番号 9 7) を含む C D R H 2 配列及び S H Y G L D W N F D V (配列番号 9 8) を含む C D R H 3 配列を含む可変重鎖を含む。

20

【0 1 5 1】

特定の実施形態では、C D 2 8 結合ドメインは、H A S Q N I Y V W L N (配列番号 9 3) を含む C D R L 1 配列、K A S N L H T (配列番号 9 4) を含む C D R L 2 配列及び Q Q G Q T Y P Y T (配列番号 9 5) を含む C D R L 3 配列を含む可変軽鎖、並びに S Y Y I H (配列番号 9 9) を含む C D R H 1 配列、C I Y P G N V N T N Y N E K F K D (配列番号 1 0 0) を含む C D R H 2 配列及び S H Y G L D W N F D V (配列番号 9 8) を含む C D R H 3 配列を含む可変重鎖を含む。

【0 1 5 2】

活性化 T 細胞は 4 - 1 B B (C D 1 3 7) を発現する。特定の実施形態では、4 - 1 B B 結合ドメインは、R A S Q S V S (配列番号 1 0 1) を含む C D R L 1 配列、A S N R A T (配列番号 1 0 2) を含む C D R L 2 配列及び Q R S N W P P A L T (配列番号 1 0 3) を含む C D R L 3 配列を含む可変軽鎖、並びに Y Y W S (配列番号 1 0 4) を含む C D R H 1 配列、I N H を含む C D R H 2 配列及び Y G P G N Y D W Y F D L (配列番号 1 0 5) を含む C D R H 3 配列を含む可変重鎖を含む。

30

【0 1 5 3】

特定の実施形態では、4 - 1 B B 結合ドメインは、S G D N I G D Q Y A H (配列番号 1 0 6) を含む C D R L 1 配列、Q D K N R P S (配列番号 1 0 7) を含む C D R L 2 配列及び A T Y T G F G S L A V (配列番号 1 0 8) を含む C D R L 3 配列を含む可変軽鎖並びに G Y S F S T Y W I S (配列番号 1 0 9) を含む C D R H 1 配列、K I Y P G D S Y T N Y S P S (配列番号 1 1 0) を含む C D R H 2 配列及び G Y G I F D Y (配列番号 1 1 1) を含む C D R H 3 配列を含む可変重鎖を含む。

40

【0 1 5 4】

本明細書に開示されている特定の実施形態は、C D 8 上のエピトープに結合する結合ドメインを含む。特定の実施形態では、C D 8 結合ドメイン (例えば、s c F v) は O K T 8 抗体に由来する。例えば、特定の実施形態では、C D 8 T 細胞活性化エピトープ結合ドメインは、R T S R S I S Q Y L A (配列番号 1 1 2) を含む C D R L 1 配列、S G S T L Q S (配列番号 1 1 3) を含む C D R L 2 配列及び Q Q H N E N P L T (配列番号 1 1 4) を含む C D R L 3 配列を含む可変軽鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン (例えば、s c F v) である。特定の実施形態では、C D 8 T 細胞活性化エピトープ結合ドメインは

50

、G F N I K D（配列番号115）を含むCDRH1配列、R I D P A N D N T（配列番号116）を含むCDRH2配列及びG Y G Y Y V F D H（配列番号117）を含むCDRH3配列を含む可変重鎖を含むヒト又はヒト化結合ドメイン（例えば、s c F v）である。これらは、O K T 8抗体のCDR配列を反映する。

【0155】

特定の実施形態では、ナチュラルキラー細胞（NK細胞、K細胞及びキラー細胞としても知られている）は、I - A M Sによる局所活性化の標的とされる。NK細胞は、細胞膜を破壊する顆粒を放出することによってアポトーシス又は細胞溶解を誘導することができる。他の免疫細胞を動員するためにサイトカインを分泌することができる。

【0156】

NK細胞の表面上に発現される活性化タンパク質の例には、N K G 2 D、C D 8、C D 1 6、K I R 2 D L 4、K I R 2 D S 1、K I R 2 D S 2、K I R 3 D S 1、N K G 2 C、N K G 2 E、N K G 2 D及び天然細胞傷害性受容体（N C R）ファミリーのいくつかのメンバーが含まれる。リガンド結合時にNK細胞を活性化するN C Rの例には、N K p 3 0、N K p 4 4、N K p 4 6、N K p 8 0及びD N A M - 1が含まれる。

【0157】

NK細胞受容体に結合し、NK細胞の活性化を誘導する及び／又は増強する市販の抗体の例には、N K G 2 Dに結合し、それを活性化する5 C 6及び1 D 1 1（B i o L e g e n d（登録商標）S a n D i e g o、C Aから入手可能）；K I R 2 D L 4に結合し、それを活性化するm A b 3 3（B i o L e g e n d（登録商標）から入手可能）；N K p 4 4に結合し、それを活性化するP 4 4 - 8（B i o L e g e n d（登録商標）から入手可能）；C D 8に結合し、それを活性化するS K 1；及びC D 1 6に結合し、それを活性化する3 G 8が含まれる。

【0158】

特定の実施形態では、I - A M Sは、NK細胞活性化を増強するために、NK細胞阻害受容体に結合し、それを遮断することができる。結合を受け、遮断され得るNK細胞阻害受容体の例には、K I R 2 D L 1、K I R 2 D L 2 / 3、K I R 3 D L 1、N K G 2 A及びK L R G 1が含まれる。特定の実施形態では、NK細胞阻害受容体K I R 2 D L 1及びK I R 2 D L 2 / 3に結合し、それを遮断する結合ドメインは、配列

【0159】

【化22】

EIVLTQSPVTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
SGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWMYTFGQGGTKLEIKRT（配列番号118）

の可変軽鎖領域及び配列

【0160】

【化23】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS

CKASGGTFSFYAISWWRQAPGQGLEWMGGFIPIFGAANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELS
SLRSDDTAVYYCARIPSGSYYYDYDMDVWGQGTTVTVSS（配列番号119）

の可変重鎖領域を含む。さらなるNK細胞活性化抗体は、W O / 2 0 0 5 / 0 0 0 3 1 7 2及び米国特許第9, 4 1 5, 1 0 4号に記載されている。

【0161】

特定の実施形態では、マクロファージは、I - A M Sによる局所活性化の標的とされる。マクロファージは、白血球（又は白血球細胞）の一種であり、食作用として知られているプロセスにおいて細胞、細胞残屑及び／又は異物を飲み込み、消化することができる。

【0162】

I-AMSは、マクロファージの表面上で発現されるタンパク質に結合するように設計され得る。マクロファージ（及びそれらの前駆細胞である単球）の表面上で発現される活性化タンパク質の例には、CD11b、CD11c、CD64、CD68、CD119、CD163、CD206、CD209、F4/80、IFGR2 TOLL様受容体（TLR）1～9、IL-4Rα及びMARCOが含まれる。マクロファージの表面上で発現されるタンパク質に結合する市販の抗体には、CD11bに結合し、それを活性化するM1/70（BioLegend（登録商標）から入手可能）；CD68に結合し、それを活性化するKP1（ABCAM（登録商標）、Cambridge、United Kingdomから入手可能）；及びCD163に結合し、それを活性化するab87099（ABCAM（登録商標）から入手可能）が含まれる。

10

【0163】

特定の実施形態では、I-AMSは、病原体認識受容体（PRR）を標的とすることができる。PRRは、危険シグナルを認識し、先天性免疫応答を活性化する及び／又は増強するタンパク質又はタンパク質複合体である。PRRの例には、グラム陰性菌を認識するTLR4/MD-2複合体；真菌及び他の病原体上のマンノース部分を認識するDectin-1及びDectin-2；グラム陽性菌を認識するTLR2/TLR6又はTLR2/TLR1ヘテロ二量体；フラジェリンを認識するTLR5；並びにDNAのCpGモチーフを認識するTLR9（CD289）が含まれる。特定の実施形態では、I-AMSは、TLR4/MD-2、Dectin-1、Dectin-2、TLR2/TLR6、TLR2/TLR1、TLR5及び／又はTLR9に結合し、それらを活性化することができる。

20

【0164】

特定の実施形態では、I-AMSは補体系を標的とすることができる。補体系とは、抗原結合抗体によって誘導され、補体タンパク質のシグナル伝達を伴う免疫経路を指し、抗体によりコーティングされた抗原の免疫認識及びクリアランスをもたらす。

【0165】

I-AMSの結合ドメイン及び本明細書に記載されている他の操作されたフォーマットは、リンカーを介して接合され得る。リンカーは、I-AMの結合ドメイン間の立体配座移動についての柔軟性及び余地を提供することができるアミノ酸配列である。任意の適切なリンカーが使用され得る。

30

【0166】

リンカーの例は、Chenら、Adv Drug Deliv Rev. 2013年10月15日；65（10）：1357～1369頁に見出され得る。リンカーは、標的への所望の機能ドメインの提示に応じて、柔軟、剛性又は半剛性であり得る。

【0167】

一般的に使用される柔軟なリンカーには、アミノ酸のグリシン及びセリンを含むリンカー配列（Gly-Serリンカー）が含まれる。特定の実施形態では、リンカー配列は、 $(Gly_xSer_y)_n$ （配列番号120）の1～10個の反復などのグリシン及びセリン反復のセットを含み、ここで、x及びyは独立して0～10の整数であり、ただし、x及びyの両方が0ではなく、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10の整数である。特定の例には、 $(Gly_4Ser)_n$ （配列番号121）、 $(Gly_3Ser)_n$ （配列番号122）、 $(Gly_2Ser)_n$ （配列番号123）及び $(Gly_3Ser)_n(Gly_4Ser)_1$ （配列番号124）が含まれる。特定の実施形態では、リンカーは、 $(Gly_4Ser)_4$ （配列番号125）、 $(Gly_4Ser)_3$ （配列番号126）、 $(Gly_4Ser)_2$ （配列番号127）、 $(Gly_4Ser)_1$ （配列番号128）、 $(Gly_3Ser)_2$ （配列番号129）、 $(Gly_3Ser)_1$ （配列番号130）、 $(Gly_2Ser)_2$ （配列番号131）又は $(Gly_2Ser)_1$ 、GGSGGGSGGGSG（配列番号132）、GGSGGGSGSGSG（配列番号133）又はGGSGGGSGSG（配列番号134）である。

40

【0168】

50

1つ以上の抗体ヒンジ領域及び／又は免疫グロブリン重鎖定常領域、例えばC H 3単独又はC H 2 C H 3配列を含むリンカーも使用され得る。

【0169】

一部の状況では、柔軟なリンカーは、特定の用途に必要な結合ドメインの距離又は配置を維持することができない場合がある。これらの例では、剛性又は半剛性リンカーが有用な場合がある。剛性又は半剛性リンカーの例には、プロリンリッチリンカーが含まれる。特定の実施形態では、プロリンリッチリンカーは、偶然のみに基づいて予測されるよりも多くのプロリン残基を有するペプチド配列である。特定の実施形態では、プロリンリッチリンカーは、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも36%、少なくとも39%、少なくとも40%、少なくとも48%、少なくとも50%又は少なくとも51%のプロリン残基を有するリンカーである。プロリンリッチリンカーの特定の例には、プロリンリッチ唾液タンパク質(PRP)の断片が含まれる。

10

【0170】

I-AMS分子の細胞溶解特性は、比較インビトロアッセイにおいて確認され得る。簡潔に述べると、細胞株の実験では、標的がん細胞が、健康なドナーT細胞(1:1及び3:1のE:T細胞比にて使用される)を含む又は含まない、増加した濃度の種々のI-AMS抗体(例えば、CD33-CD3二重特異性抗体(BsAb)を含むCD33/CD3 I-AMS)を含有する5~10,000細胞/ウェルにて96ウェル丸底プレート中でインキュベートされ得る。48時間後、非生存細胞を検出するために4',6-ジアミジノー2-フェニルインドール(DAPI)を使用して細胞数及び薬物誘発性細胞傷害が、フローサイトメトリーによって決定され得る。健康なドナーT細胞が追加される実験では、がん細胞は、前方/側方散乱特性及びCellVue Burgundy色素に対する陰性によって同定され得る。実験は技術的重複を含み得る。

20

【0171】

I-AMS構築物を含む特定の実施形態では、T細胞活性化エピトープ結合ドメインは、既知のTCRのV α 、V β 、C α 若しくはC β と比較した場合に、1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個)の挿入、1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個)の欠失、1つ以上(例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10個)のアミノ酸置換(例えば、保存的アミノ酸置換又は非保存的アミノ酸置換)又は上記の変化の組合せを含む。挿入、欠失又は置換は、これらの領域のアミノ末端若しくはカルボキシ末端又は両方の末端を含む、V α 、V β 、C α 又はC β 領域のいずれの場所でもよく、ただし、各CDRが、変化を含まない、又は1つ、2つ若しくは3つ以下の変化を含み、修飾されたV α 、V β 、C α 又はC β 領域を含む結合ドメインが、野生型と同様の親和性で、その標的に依然として特異的に結合することができる。

30

【0172】

特定の実施形態では、5'RACE(cDNA末端の迅速なクローニング)クローニングに由来する可変領域CD33抗体配列及びCD33-CD3 BsAbからのCD3配列を使用して、二重特異性分子が、標準的なBiTE(登録商標)抗体フォーマットにおいて重複するギブソンアセンブリ適合末端を有するDNA断片として各scFvを合成することによって組み立てられ得る。(Gly₄Ser)₃(配列番号126)リンカーなどの原型的な介在領域が、対になった可変ドメインと、2つのscFvの間の短いGly₄Ser(配列番号128)リンカーとの間で使用され得る。

40

【0173】

抗CD33三重特異性抗体は、抗原の少なくとも1つがCD33である、3つの異なる型の抗原に同時に結合する人工タンパク質である。三重特異性抗体は、例えば、WO2016/105450、WO2010/028796、WO2009/007124、WO2002/083738、US2002/0051780及びWO2000/018806に記載されている。

【0174】

(iv) 製剤。任意の例示的なフォーマットにおいて本明細書に記載されている抗体の

50

いずれかは、対象への投与のために単独で又は組み合わせて組成物に製剤化され得る。抗体の塩及び／又はプロドラッグも使用され得る。

【0175】

薬学的に許容される塩には、抗体の活性を保持し、薬学的使用に許容される任意の塩が含まれる。薬学的に許容される塩はまた、酸、別の塩又は酸若しくは塩に変換されるプロドラッグの投与の結果としてインビボで形成され得る任意の塩も指す。

【0176】

適切な薬学的に許容される酸付加塩は、無機酸又は有機酸から調製され得る。そのような無機酸の例は、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、炭酸、硫酸及びリン酸である。適切な有機酸は、脂肪族、脂環式、芳香族、アリール脂肪族、複素環式、カルボン酸及びスルホン酸クラスの有機酸から選択され得る。

10

【0177】

適切な薬学的に許容される塩基付加塩には、アルミニウム、カルシウム、リチウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウム及び亜鉛から作製される金属塩、又はN，N'-ジベンジルエチレンジアミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、N-メチルグルカミン、リジン、アルギニン及びプロカインから作製される有機塩が含まれる。

【0178】

プロドラッグは、投与後に、例えば開裂により又は生物学的に不安定な基の加水分解により治療的に活性な化合物に変換される活性成分を含む。

20

【0179】

特定の実施形態では、組成物は、組成物の少なくとも0.1% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも1% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも10% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも20% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも30% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも40% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも50% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも60% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも70% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも80% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも90% w/v若しくはw/w、組成物の少なくとも95% w/v若しくはw/w又は組成物の少なくとも99% w/v若しくはw/wの抗体を含む。

30

【0180】

例示的な一般に使用される薬学的に許容される担体には、あらゆる吸収遅延剤、抗酸化剤、結合剤、緩衝剤、増量剤若しくは充填剤、キレート剤、コーティング、崩壊剤、分散媒体、ゲル、等張剤、潤滑剤、保存剤、塩、溶媒若しくは共溶媒、安定剤、界面活性剤及び／又は運搬ビヒクルが含まれる。

【0181】

例示的な抗酸化剤には、アスコルビン酸、メチオニン及びビタミンEが含まれる。

【0182】

例示的な緩衝剤には、クエン酸バッファー、コハク酸バッファー、酒石酸バッファー、フマル酸バッファー、グルコン酸バッファー、シュウ酸バッファー、乳酸バッファー、酢酸バッファー、リン酸バッファー、ヒスチジンバッファー及び／又はトリメチルアミン塩が含まれる。

40

【0183】

例示的なキレート剤は、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）である。

【0184】

例示的な等張剤には、三価以上の糖アルコール、例えば、グリセリン、エリトリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール又はマンニトールを含む多価糖アルコールが含まれる。

【0185】

例示的な保存剤には、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラ

50

ベン、プロピルパラベン、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、ハロゲン化ベンザルコニウム、塩化ヘキサメトニウム、アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール及び3-ペンタノールが含まれる。

【0186】

安定剤とは、増量剤から、抗体を可溶化する又は変性若しくは容器壁面への付着を阻止する一助となる添加剤に至る機能の範囲にわたり得る、広範な類型の賦形剤を指す。典型的な安定剤には、多価糖アルコール；アミノ酸、例えば、アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸及びトレオニン；有機糖又は糖アルコール、例えば、ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニシトール、ガラクトール、グリセロール及びシクリトール、例えば、イノシトール；PEG；アミノ酸ポリマー；硫黄含有還元剤、例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α -モノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウム；低分子量ポリペプチド（すなわち、10残基未満）；タンパク質、例えば、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；単糖類、例えば、キシロース、マンノース、フルクトース及びグルコース；二糖類、例えば、ラクトース、マルトース及びスクロース；三糖類、例えば、ラフィノース並びに多糖類、例えば、デキストランが含まれ得る。安定剤は、典型的に、治療剤の重量に基づいて0.1～10,000重量部の範囲で存在する。

10

20

【0187】

本明細書に開示されている組成物は、例えば、注射、吸入、注入、灌流、洗浄又は摂取による投与用に製剤化され得る。本明細書に開示されている組成物はさらに、静脈内、皮内、動脈内、結節内、リンパ内、腹腔内、病巣内、前立腺内、腔内、直腸内、局所、髄腔内、腫瘍内、筋肉内、小胞内、経口、舌下及び／又は皮下投与用に製剤化され得る。

【0188】

注射用に、組成物は、水溶液として、例えば、ハンクス液、リンガー液又は生理食塩水を含むバッファー中で製剤化され得る。水溶液は、製剤化剤、例えば、懸濁化剤、安定剤及び／又は分散剤を含み得る。或いは、製剤は、適切なビヒクル、例えば、発熱物質非含有無菌水で使用前に構成するための凍結乾燥形態及び／又は粉末形態であり得る。

30

【0189】

経口投与用に、組成物は、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化され得る。経口固形製剤、例えば、散剤、カプセル剤及び錠剤の場合、適切な賦形剤には、結合剤（トラガカントガム、アラビアゴム、コーンスターチ、ゼラチン）、充填剤、例えば、糖類、例えば、ラクトース、スクロース、マンニトール及びソルビトール；リン酸ニカルシウム、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントガム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム及び／又はポリビニルピロリドン（PVP）；顆粒化剤；並びに結合剤が含まれる。所望により、崩壊剤、例えば、コーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸、架橋ポリビニルピロリドン、寒天又はアルギン酸若しくはその塩、例えば、アルギン酸ナトリウムが添加され得る。所望により、固形剤形は、標準的な技術を使用して、糖衣又は腸溶コーティングされ得る。香味剤、例えば、ペパーミント、ウィンターグリーンオイル、チェリーフレーバー、オレンジフレーバーなども使用され得る。

40

【0190】

組成物はエアロゾルとして製剤化され得る。特定の実施形態では、エアロゾルは、無水、液体又は乾燥粉末吸入器の一部として提供されている。加圧パック又はネブライザーか

50

らのエアロゾルスプレーも、適切な噴射剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素又は他の適切なガスと共に使用され得る。加圧エアロゾルの場合、投与単位は、定量を送達するための弁を設けることにより決定され得る。組成物及び適切な粉末基剤、例えば、ラクトース又はデンプンとの粉末混合物を含む、吸入器又は吹送器における使用のためのゼラチンのカプセル剤及びカートリッジも製剤化され得る。

【0191】

組成物は、デポー調製物としても製剤化され得る。デポー調製物は、適切なポリマー材料若しくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルジョンとして）又はイオン交換樹脂を用いて、又は難溶性誘導体、例えば、難溶性塩として製剤化され得る。

10

【0192】

さらに、組成物は、少なくとも1つの型の抗体を含む固体ポリマーの半透性マトリックスを利用する徐放系として製剤化され得る。種々の徐放性材料が確立されており、当業者に周知である。徐放系は、それらの化学的性質に応じて、投与後に数週間から100日以上にわたって1つ以上の抗体を放出し得る。デポー調製物は、注射；非経口注射；点眼；又は細い針を介した注射による軟組織、体腔若しくは時には血管内への移植により投与され得る。

【0193】

デポー製剤は、所望のラクチド：グリコリド比、平均分子量、多分散性及び末端基化学のポリ（ラクチド）、ポリ（グリコリド）、ポリ（カプロラクトン）及びポリ（ラクチド）-コ（グリコリド）（PLG）を含む様々な生体内分解性ポリマーを含み得る。種々のグレードを使用して異なるポリマータイプを異なる比率で混合することにより、寄与するポリマーのそれぞれから取り入れられる特性が得られ得る。

20

【0194】

異なる溶媒（例えば、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、トリアセチン、N-メチルピロリドン、テトラヒドロフラン、フェノール又はそれらの組合せ）の使用は微粒子のサイズ及び構造を改変して、放出特性を調節し得る。他の有用な溶媒には、水、エタノール、ジメチルスルホキシド（DMSO）、N-メチル-2-ピロリドン（NMP）、アセトン、メタノール、イソプロピルアルコール（IPA）、安息香酸エチル及び安息香酸ベンジルが含まれる。

30

【0195】

例示的な放出修飾剤には、界面活性剤、洗剤、内相増粘剤、錯化剤、界面活性分子、共溶媒、キレート剤、安定剤、セルロースの誘導体、（ヒドロキシプロピル）メチルセルロース（HPMC）、HPMCアセエート、セルロースアセテート、プルロニック（登録商標）（例えば、F68／F127）、ポリソルベート、Span（登録商標）（Croda Americas, Wilmington, Delaware）、ポリ（ビニルアルコール）（PVA）、Brij（登録商標）（Croda Americas, Wilmington, Delaware）、スクロースアセテートイソブチレート（SAB）、塩及びバッファーが含まれ得る。

【0196】

ポリソルベート、ジオクチルスルホスクシネート、ポロキサマー、PVAを含む界面活性剤などの微粒子の外部相境界に分配する賦形剤はまた、粒子安定性及び侵食速度、水及びチャネル構造、界面輸送並びに反応速度を含む特性を、好ましい状態で改変し得る。

40

【0197】

開示されている徐放性デポー製剤の追加的な処理は、トリス、シトレート又はヒスチジンなどのバッファー中に、マンニトール、スクロース、トレハロース及びグリシンを含む安定化賦形剤を、ポリソルベート、PVA及びジオクチルスルホスクシネートなどの他の成分と共に利用することができる。元の懸濁液の類似サイズ及び性能特性に再構成される非常に低い水分の散剤を製造するために、凍結乾燥サイクルも使用され得る。

【0198】

50

本明細書に開示されている任意の組成物は、投与の利益を越える有意に有害なアレルギー性の又は他の厄介な反応を引き起こさないものを含む任意の他の薬学的に許容される担体を有利に含み得る。例示的な薬学的に許容される担体及び製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Printing Company、1990年に開示されている。さらに、製剤は、米国FDA生物学的標準局（U.S. FDA Office of Biological Standards）及び／又は他の関連する外国の規制当局により要求される無菌性、発熱性、一般的安全性及び純度基準を満たすように調製され得る。

【0199】

（v）免疫細胞試料採取及び細胞濃縮。免疫細胞の型は上に記載されている。本開示は、二重特異性抗体などの組換えタンパク質を発現するように遺伝子修飾された細胞を記載している。本開示の教示に従って遺伝子修飾された細胞は、患者由来細胞（自己由来）であり得る又は適切な場合、同種異系であり得る。

10

【0200】

試料採取及び濃縮の方法は当業者に公知である。一部の実施形態では、細胞は細胞株に由来する。一部の実施形態では、細胞は、異種源、例えば、マウス、ラット、非ヒト霊長類又はブタから得られる。特定の実施形態では、細胞はヒトに由来する。

【0201】

一部の実施形態では、T細胞は、全血、末梢血単核細胞（PBMC）、白血球、骨髓、胸腺、組織生検、腫瘍、白血病、リンパ腫、リンパ節、腸管関連リンパ組織、粘膜関連リンパ組織、脾臓、他のリンパ組織、肝臓、肺、胃、腸、結腸、腎臓、膵臓、乳房、骨、前立腺、子宮頸部、精巣、卵巣、扁桃腺若しくは他の臓器及び／又はそれらに由来する細胞などの試料に由来する又はそれらから単離される。特定の実施形態では、対象の循環血液からの細胞は、例えば、アフエーシス又は白血球アフエーシスによって得られる。試料は、特定の実施形態では、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、HSC、HPC、HSPC、赤血球及び／又は血小板を含むリンパ球を含有し、一部の態様では、赤血球及び血小板以外の細胞を含有し、さらに処理が必要である。

20

【0202】

一部の実施形態では、対象から採取された血液細胞は、例えば、血漿画分を除去し、後続の処理工程のために、細胞を、適切なバッファー又は培地中に入れるように、洗浄される。特定の実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩液（PBS）により洗浄される。一部の実施形態では、洗浄液は、カルシウム及び／若しくはマグネシウム並びに／又は多くの二価カチオン若しくは全ての二価カチオンを欠く。洗浄は、製造元の指示書に従い、半自動式「フロースルー」型遠心分離機（例えば、Cobe 2991 cell processor、Baxter）を使用して達せられ得る。接線流濾過（TFF）もまた、実施され得る。特定の実施形態では、細胞は、洗浄の後に、Ca++／Mg++非含有PBSなどの様々な生体適合性バッファー中で再懸濁され得る。

30

【0203】

単離は、サイズ、密度、特定の試薬に対する感受性若しくは耐性及び／又は親和性、例えば、抗体若しくは他の結合パートナーに対する免疫親和性などの1つ以上の特性に基づく分離を含む、種々の細胞調製及び分離工程のうちの1つ以上を含み得る。特定の実施形態では、単離は、同じ装置又は機器を使用して、単一のプロセスストリームにおいて順次及び／又は同時に実行される。特定の実施形態では、異なる集団の単離、培養及び／又は操作は、同じ試料からなどの、同じ出発組成物又は材料から実行される。

40

【0204】

特定の実施形態では、試料は、密度に基づく細胞分離方法及び関連する方法を使用することによって、T細胞について濃縮され得る。例えば、白血球は、赤血球を溶解し、Percoll又はFicoll勾配により試料を遠心分離することによって末梢血中の他の細胞型から分離され得る。

【0205】

50

特定の実施形態では、特定のT細胞型について濃縮されていないバルクT細胞集団が使用され得る。特定の実施形態では、選択されたT細胞型は、細胞マーカーに基づく陽性及び／又は陰性選択に基づいて濃縮及び／又は単離され得る。陽性選択では、細胞マーカーに結合した細胞が、さらなる使用のために保持される。陰性選択では、抗体などの捕捉剤によって細胞マーカーに結合していない細胞が、さらなる使用のために保持される。一部の例では、両方の画分がさらなる使用のために保持され得る。

【0206】

分離は、特定の細胞集団又は特定のマーカーを発現する細胞の100%の濃縮又は除去をもたらす必要はない。例えば、特定の型の細胞の陽性選択又はそれについての濃縮とは、そのような細胞の数又はパーセンテージを増加させることを指すが、マーカーを発現しない細胞の完全な不在をもたらす必要はない。同様に、特定の型の細胞の陰性選択、除去又は枯渇は、そのような細胞の数又はパーセンテージを減少させることを指すが、そのような細胞の全ての完全な除去をもたらす必要はない。

【0207】

一部の例では、複数ラウンドの分離工程が実行され、ある工程から陽性又は陰性に選択された画分が、後続の陽性又は陰性選択などの別の分離工程に供される。

【0208】

一部の実施形態では、細胞マーカーについての抗体又は結合ドメインは、磁気ビーズ又は常磁性ビーズなどの固体支持体又はマトリックスに結合して、陽性及び／又は陰性選択のための細胞の分離を可能にする。例えば、一部の実施形態では、細胞及び細胞集団は、免疫磁性（又はアフィニティー磁気）分離技術を使用して分離又は単離される（S. A. Brooks及びU. Schumacher（コピーライト）Humana Press Inc.、Totowa、NJによって編集された、Methods in Molecular Medicine、vol. 58: Metastasis Research Protocols、Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo、17～25頁に概説されている）。US4,452,773、US4,795,698、US5,200,084及びEP452342も参照のこと。

【0209】

一部の実施形態では、親和性に基づく選択は、磁気活性化細胞選別（MACS）（Miltenyi Biotec、Auburn、CA）による。MACSシステムは、磁化粒子が付着した細胞の高純度選択を可能にする。ある特定の実施形態では、MACSは、外部磁場の印加後に非標的種及び標的種が順次溶出されるモードにおいて動作する。すなわち、磁化粒子に付着した細胞は所定の位置に保持されるが、付着していない種は溶出される。次に、この最初の溶出工程が完了した後、磁場に捕捉され、溶出が阻止された種は、溶出及び回収され得るように何らかの方法で解放される。ある特定の実施形態では、非標的細胞が標識され、不均一な細胞集団から枯渇される。

【0210】

一部の実施形態では、本明細書に記載されている細胞集団は、フローサイトメトリーによって採取及び濃縮（又は枯渇）され、フローサイトメトリーでは、複数の細胞表面マーカーについて染色された細胞が流体流中で運ばれる。一部の実施形態では、本明細書に記載されている細胞集団は、分取規模（FACS）選別によって採取及び濃縮（又は枯渇）される。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されている細胞集団は、FACSに基づく検出システムと組み合わせた微小電気機械システム（MEMS）チップの使用によって採取及び濃縮（又は枯渇）される（例えば、WO2010/033140、Chorら（2010年）Lab Chip 10、1567～1573頁；及びGodinら（2008年）J Biophoton. 1（5）：355～376頁を参照のこと。）。どちらの場合も、細胞は複数のマーカーで標識され得、明確に定義された細胞サブセットの単離を高純度で可能にする。

【0211】

異なるT細胞亜集団についての細胞マーカーは上に記載されている。特定の実施形態で

は、T細胞の特定の亜集団、例えば、陽性又は高レベルの1つ以上の表面マーカー、例えば、CCR7、CD45RO、CD8、CD27、CD28、CD62L、CD127、CD4及び／又はCD45RA T細胞を発現する細胞が、陽性又は陰性選択技術によって単離される。

【0212】

CD3+、CD28+ T細胞は、抗CD3／抗CD28コンジュゲート磁気ビーズ（例えば、DYNABEADS（登録商標）M-450 CD3／CD28 T Cell Expander）を使用して陽性選択され、拡大され得る。

【0213】

特定の実施形態では、CD8+又はCD4+選択工程が、CD4+ヘルパー及びCD8+細胞傷害性T細胞を分離するために使用される。そのようなCD8+及びCD4+集団は、1つ以上のナイーブ、メモリー及び／又はエフェクターT細胞亜集団上で発現された又は比較的高度に発現されたマーカーについての陽性又は陰性選択によって亜集団にさらに選別され得る。

【0214】

一部の実施形態では、セントラルメモリーT（TCM）細胞についての濃縮が実行される。特定の実施形態では、メモリーT細胞は、CD8+末梢血リンパ球の両方のCD62Lサブセットに存在する。PBMCは、抗CD8及び抗CD62L抗体を使用するなどして、CD62L、CD8及び／又はCD62L+CD8+画分について濃縮又は枯渇され得る。

【0215】

一部の実施形態では、セントラルメモリーT（TCM）細胞についての濃縮は、CCR7、CD45RO、CD27、CD62L、CD28、CD3及び／又はCD127の陽性又は高表面発現に基づき、一部の態様では、それは、CD45RA及び／又はグランザイムBを発現する又は高度に発現する細胞についての陰性選択に基づく。一部の態様では、TCM細胞について濃縮されたCD8+集団の単離は、CD4、CD14、CD45RAを発現する細胞の枯渇、並びにCCR7、CD45RO及び／又はCD62Lを発現する細胞についての陽性選択又は濃縮によって実行される。一態様では、セントラルメモリーT（TCM）細胞についての濃縮は、CD14及びCD45RAの発現に基づいて陰性選択に供される、CD4発現に基づいて選択された細胞の陰性画分、並びにCD62Lに基づく陽性選択から開始して実行される。このような選択は、一部の態様では同時に実行され、他の態様ではいずれかの順序で順次実行される。一部の態様では、CD8+細胞集団又は亜集団を調製する際に使用されるものと同じCD4発現に基づく選択工程もまた、CD4+細胞集団又は亜集団を生成するために使用され、それによって任意選択的に1つ以上のさらなる陽性又は陰性選択工程後にCD4に基づく分離からの陽性画分及び陰性画分の両方が保持される。

【0216】

特定の例では、PBMCの試料又は他の白血球試料は、CD4+細胞の選択に供され、陰性画分及び陽性画分の両方が保持される。次に、陰性画分は、CD14及びCD45RA又はROR1の発現に基づく陰性選択、並びにCCR7、CD45RO及び／又はCD62LなどのセントラルメモリーT細胞に特徴的なマーカーに基づく陽性選択に供され、陽性及び陰性選択はいずれかの順序で実行される。

【0217】

特定の実施形態では、細胞濃縮は、バルクCD8+FACs選別細胞集団をもたらす。

【0218】

他の細胞型は、公知のマーカープロファイル及び技術に基づいて濃縮され得る。例えば、CD34+HSC、HSP及びHSPCは、磁気細胞分離装置、例えば、CliniMACS（登録商標）Cell Separation System（Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany）に接続された磁性粒子に直接的又は間接的にコンジュゲートされた抗CD34抗体を使用して濃縮され得

10

20

30

40

50

る。

【0219】

(vi) 組換えタンパク質を発現するように細胞集団を遺伝子修飾すること。本明細書に開示されている組換えタンパク質をコードする所望の遺伝子は、トランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、遺伝子配列を含むウイルス又はバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子導入、マイクロセル媒介遺伝子導入、スフェロプラスト (spheroplast) 融合、インビボナノ粒子媒介送達などを含む、当該技術分野において公知の任意の方法によって細胞に導入され得る。外来遺伝子を細胞に導入するための多数の技術が当該技術分野において公知であり (例えば、Loeffler 及び Behr、1993 年、Meth. Enzymol. 217、599~618 頁; Cohen ら、1993 年、Meth. Enzymol. 217: 618~644 頁; Cline、1985 年、Pharmac. Ther. 29: 69~92 頁を参照のこと。)、レシピエント細胞の必要な発達及び生理学的機能が必要以上に破壊されない限り、使用され得る。この技術は、遺伝子が細胞によって発現可能であり、ある特定の場合、好ましくは遺伝性であり、この細胞子孫によって発現可能であるように、遺伝子の細胞への安定な導入を提供する。

【0220】

「遺伝子」という用語は、本明細書で開示されている組換えタンパク質をコードする核酸配列 (ポリヌクレオチド又はヌクレオチド配列と相互交換可能に使用される) を指す。この定義は、種々の配列の多型、変異及び／又は配列バリエーションを含み、このような変更はコードされた CAR の機能には実質的に影響を与えない。「遺伝子」という用語は、コード配列だけでなく、プロモーター、エンハンサー及び終結領域などの調節領域も含み得る。この用語はさらに、選択的スプライス部位から生じるバリエーションと共に、イントロンの全て及び mRNA の転写物からスプライスされた他の DNA 配列を含み得る。分子をコードする遺伝子配列はキメラ分子の発現を指図する DNA 又は RNA であり得る。これらの核酸配列は、RNA に転写される DNA 鎖配列であり得る又はタンパク質に翻訳される RNA 配列であり得る。核酸配列は、完全長の核酸配列及び完全長のタンパク質に由来する非完全長の配列の両方を含む。配列はまた、特定の細胞型においてコドン選択を提供するために導入され得る天然配列 (単数又は複数) の縮重コドンを含み得る。当業者によって理解されるように、本開示の全体を通して完全な遺伝子配列の一部が参照される。

【0221】

組換えタンパク質をコードする遺伝子配列が本明細書に提供され、また、関連するアミノ酸配列及び本明細書に提供されている他の記述から合成又は組換え方法によって容易に調製され得る。実施形態では、これらの配列のいずれかをコードする遺伝子配列はまた、容易な切り出し及び配列をコードする遺伝子配列の、異なる配列をコードする別の遺伝子配列による置き換えを提供するために、コード配列の 5' 及び／又は 3' 末端にて 1 つ以上の制限酵素部位を有し得る。実施形態では、配列をコードする遺伝子配列は、哺乳動物細胞での発現のためにコドン最適化され得る。

【0222】

「コードすること」とは、アミノ酸の定義された配列などの他の巨大分子の合成のための鋳型として役立つ、cDNA 又は mRNA などの遺伝子におけるヌクレオチドの特定の配列の特性を指す。したがって、遺伝子に相当する mRNA の転写及び翻訳が、細胞又は他の生物系においてタンパク質を産生するのであれば、遺伝子はタンパク質をコードしている。「タンパク質をコードする遺伝子配列」は、互いの縮重型であり、実質的に類似の形態及び機能の同じアミノ酸配列 (単数又は複数) をコードするヌクレオチド配列全てを含む。

【0223】

「ベクター」は、別の核酸を輸送することができる核酸分子である。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス又はファージであり得る。「発現ベクター」は、そ

れが適切な環境に存在する場合、ベクターによって運ばれる1つ以上の遺伝子によってコードされたタンパク質の発現を指図することができるベクターである。

【0224】

「レンチウイルス」とは、分裂細胞及び非分裂細胞に感染することができるレトロウイルスの属を指す。レンチウイルスのいくつかの例には、HIV（ヒト免疫不全ウイルス：1型HIV及び2型HIVを含む）；ウマ伝染性貧血ウイルス；ネコ免疫不全ウイルス（FIV）；ウシ免疫不全ウイルス（BIV）；及びサル免疫不全ウイルス（SIV）が含まれる。

【0225】

「レトロウイルス」はRNAゲノムを有するウイルスである。「ガンマレトロウイルス」とは、レトロウイルス科の属を指す。例示的なガンマレトロウイルスには、マウス幹細胞ウイルス、マウス白血病ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ肉腫ウイルス及びトリ細胞網内皮症ウイルスが含まれる。

【0226】

レトロウイルスベクター（Millerら、1993年、Meth. Enzymol. 217: 581～599頁を参照のこと。）が使用され得る。そのような実施形態では、発現される遺伝子は、細胞への送達のためにレトロウイルスベクターにクローニングされる。特定の実施形態では、レトロウイルスベクターは、ウイルスゲノムのパッケージング及び組込みに必要なシス作用性の配列の全て、すなわち、（a）ベクターの各末端での長い末端反復（LTR）又はその一部、（b）マイナス鎖及びプラス鎖DNAの合成のためのプライマー結合部位、並びに（c）ゲノムRNAのビリオンへの取込みに必要なパッケージングシグナルを含む。レトロウイルスベクターについてのさらなる詳細は、Boesenら、1994年、Biotherapy 6: 291～302頁；Clowesら、1994年、J. Clin. Invest. 93: 644～651頁；Kiemら、1994年、Blood 83: 1467～1473頁；Salmons及びGunzberg、1993年、Human Gene Therapy 4: 129～141頁；並びにGrossman及びWilson、1993年、Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110～114頁に見出され得る。アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）及びアルファウイルスも使用され得る。Kozarsky及びWilson、1993年、Current Opinion in Genetics and Development 3: 499～503頁、Rosenfeldら、1991年、Science 252: 431～434頁；Rosenfeldら、1992年、Cell 68: 143～155頁；Mastrangeliら、1993年、J. Clin. Invest. 91: 225～234頁；Walshら、1993年、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289～300頁；並びにLundstrom、1999年、J. Recept. Signal Transduct. Res. 19: 673～686頁を参照のこと。遺伝子送達の他の方法には、哺乳動物の人工染色体（Vos、1998年、Curr. Op. Genet. Dev. 8: 351～359頁）；リボソーム（Tarahovsky及びIvanitsky、1998年、Biochemistry (Moscow) 63: 607～618頁）；リボザイム（Branch及びKlotman、1998年、Exp. Nephrol. 6: 78～83頁）；並びにトリプレックスDNA（Chan及びGlazer、1997年、J. Mol. Med. 75: 267～282頁）の使用が含まれる。

【0227】

ヒトの遺伝子療法への応用のために特定されたものを含む、本開示の範囲内で好適な多数の利用できるウイルスベクターが存在する（Pfeifer及びVerma、2001年、Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 2: 177頁を参照のこと。）。レトロウイルスベクター及びレンチウイルスベクターを使用し、導入遺伝子を含むウイルス粒子を哺乳動物宿主細胞に形質導入するために細胞をパッケージングする方法は、例えば、US 8,119,772；Walchliら、2011年、PLoS On

10

20

30

40

50

e 6 : 3 2 7 9 3 0 頁 ; Z h a o ら、2 0 0 5 年、J . I m m u n o l . 1 7 4 : 4 4 1 5 頁 ; E n g e l s ら、2 0 0 3 年、H u m . G e n e T h e r . 1 4 : 1 1 5 5 頁 ; F r e c h a ら、2 0 1 0 年、M o l . T h e r . 1 8 : 1 7 4 8 頁 ; 及 び V e r h o e y e n ら、2 0 0 9 年、M e t h o d s M o l . B i o l . 5 0 6 : 9 7 頁 に 記 載 さ れ て い る 。 レ ト ロ ウ イ ル ス 及 び レ ン チ ウ イ ル ス の ベ ク タ ー 構 築 物 及 び 発 現 系 も 市 販 さ れ て い る 。

【0228】

標的化遺伝子操作アプローチも利用され得る。C R I S P R (ク ラ ス タ ー 化 し て 規 則 的 な 配 置 の 短 い 回 文 配 列 リ ピ ー ト) / C a s (C R I S P R 関 連 タ ン パ ク 質) ヌ ク レ ア ー ゼ 系 は、細 菌 系 に 基 づ く 遺 伝 子 操 作 の た め に 使 用 さ れ る 操 作 さ れ た ヌ ク レ ア ー ゼ 系 で あ る 。 C R I S P R - C a s 系 及 び そ の 成 分 に 関 す る 情 報 は、例 え ば、U S 8 6 9 7 3 5 9、U S 8 7 7 1 9 4 5、U S 8 7 9 5 9 6 5、U S 8 8 6 5 4 0 6、U S 8 8 7 1 4 4 5、U S 8 8 8 9 3 5 6、U S 8 8 8 9 4 1 8、U S 8 8 9 5 3 0 8、U S 8 9 0 6 6 1 6、U S 8 9 3 2 8 1 4、U S 8 9 4 5 8 3 9、U S 8 9 9 3 2 3 3 及 び U S 8 9 9 9 6 4 1 並 び に こ れ ら と 関 連 す る 出 願 ; 並 び に W O 2 0 1 4 / 0 1 8 4 2 3、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 5 9 5、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 6 2 2、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 6 3 5、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 6 5 5、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 6 6 1、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 6 9 4、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 7 0 1、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 7 0 9、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 7 1 2、W O 2 0 1 4 / 0 9 3 7 1 8、W O 2 0 1 4 / 1 4 5 5 9 9、W O 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 3、W O 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 4、W O 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 5、W O 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 6、W O 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 7、W O 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 8、W O 2 0 1 4 / 2 0 4 7 2 9、W O 2 0 1 5 / 0 6 5 9 6 4、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 3 5 1、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 3 5 4、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 3 6 4、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 4 1 9、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 4 2 7、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 4 6 2、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 4 6 5、W O 2 0 1 5 / 0 8 9 4 7 3 及 び W O 2 0 1 5 / 0 8 9 4 8 6、W O 2 0 1 6 2 0 5 7 1 1、W O 2 0 1 7 / 1 0 6 6 5 7、W O 2 0 1 7 / 1 2 7 8 0 7 並 び に こ れ ら と 関 連 す る 出 願 に 記 載 さ れ て い る 。

【0229】

特定の実施形態は、遺伝子編集剤として、亜鉛フィンガーヌクレアーゼ (Z F N) を 利 用 す る 。 Z F N は、特 異 的 な 位 置 に お い て、D N A に 結 合 し、そ れ を 切 断 す る よ う に 操 作 さ れ た 部 位 特 異 的 ヌ ク レ ア ー ゼ の ク ラ ス で あ る 。 Z F N は、D N A 配 列 内 の 特 異 的 な 部 位 に お い て 二 本 鎖 切 断 (D S B) を 導 入 す る の に 使 用 さ れ、こ れ は、Z F N が、様 々 な 異 な る 細 胞 に お け る ゲ ノ ム 内 の 固 有 の 配 列 を 標 的 と す る こ と を 可 能 と す る 。 Z F N 及 び 本 開 示 の 教 示 の 範 囲 内 の 有 用 な Z F N に 関 す る さ ら な る 情 報 に つ い て は、例 え ば、U S 6 , 5 3 4 , 2 6 1 ; U S 6 , 6 0 7 , 8 8 2 ; U S 6 , 7 4 6 , 8 3 8 ; U S 6 , 7 9 4 , 1 3 6 ; U S 6 , 8 2 4 , 9 7 8 ; 6 , 8 6 6 , 9 9 7 ; U S 6 , 9 3 3 , 1 1 3 ; 6 , 9 7 9 , 5 3 9 ; U S 7 , 0 1 3 , 2 1 9 ; U S 7 , 0 3 0 , 2 1 5 ; U S 7 , 2 2 0 , 7 1 9 ; U S 7 , 2 4 1 , 5 7 3 ; U S 7 , 2 4 1 , 5 7 4 ; U S 7 , 5 8 5 , 8 4 9 ; U S 7 , 5 9 5 , 3 7 6 ; U S 6 , 9 0 3 , 1 8 5 ; U S 6 , 4 7 9 , 6 2 6 ; U S 2 0 0 3 / 0 2 3 2 4 1 0 及 び U S 2 0 0 9 / 0 2 0 3 1 4 0 並 び に G a j ら、N a t M e t h o d s、2 0 1 2 年、9 (8) : 8 0 5 ~ 7 頁 ; R a m i r e z ら、N u c l A c i d s R e s、2 0 1 2 年、4 0 (1 2) : 5 5 6 0 ~ 8 頁 ; K i m ら、G e n o m e R e s、2 0 1 2 年、2 2 (7) : 1 3 2 7 ~ 3 3 頁 ; U r n o v ら、N a t u r e R e v i e w s G e n e t i c s、2 0 1 0 年、1 1 : 6 3 6 ~ 6 4 6 頁 ; M i l l e r ら、N a t u r e b i o t e c h n o l o g y 2 5、7 7 8 ~ 7 8 5 頁 (2 0 0 7 年) ; B i b i k o v a ら、S c i e n c e 3 0 0、7 6 4 頁 (2 0 0 3 年) ; B i b i k o v a ら、G e n e t i c s 1 6 1、1 1 6 9 ~ 1 1 7 5 頁 (2 0 0 2 年) ; W o l f e ら、A n n u a l r e v i e w o f b i o p h y s i c s a n d b i o m o l e c u l a r s t r u c t u r e 2 9、1 8 3 ~ 2 1 2 頁 (2 0 0 0 年) ; K i m ら、P r o c e e d i n g s o f t h e N a t i o n a l A c a d e m y o f

Sciences of the United States of America 93、1156～1160頁（1996年）；及びMillerら、The EMBO journal 4、1609～1614頁（1985年）を参照のこと。

【0230】

特定の実施形態は、遺伝子編集剤として、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（TALEN）を使用することができる。TALENとは、転写活性化因子様エフェクター（TALE）DNA結合タンパク質及びDNA切断ドメインを含む融合タンパク質を指す。TALENは、DNA内に、細胞内の修復機構を誘導する2つのDSBを誘導することにより、遺伝子及びゲノムを編集するのに使用される。一般に、2つのTALENは、DNA切断ドメインが、二量体化し、DSBを誘導するように、標的DNA部位の各側に結合し、これらを挟まなければならない。TALENに関するさらなる情報については、US 8,440,431；US 8,440,432；US 8,450,471；US 8,586,363；及びUS 8,697,853；並びにJoung及びSander、Nat Rev Mol Cell Biol、2013年、14（1）：49～55頁；Beurdeleyら、Nat Commun、2013年、4：1762頁；Scharenbergら、Curr Gene Ther、2013年、13（4）：291～303頁；Gajら、Nat Methods、2012年、9（8）：805～7頁；Millerら、Nature biotechnology 29、143～148頁（2011年）；Christianら、Genetics 186、757～761頁（2010年）；Bochら、Science 326、1509～1512頁（2009年）；並びにMoscou及びBogdanove、Science 326、1501頁（2009年）を参照のこと。

10

20

【0231】

特定の実施形態は、MegaTALを、遺伝子編集剤として利用することができる。MegaTALは、TALEが、メガヌクレアーゼのDNA切断ドメインと融合されたsc希少切断型ヌクレアーゼ構造を有する。ホーミングエンドヌクレアーゼとしても公知のメガヌクレアーゼは、同じドメイン内にDNA認識機能及びヌクレアーゼ機能の両方を有する、単一のペプチド鎖である。TALENとは対照的に、megaTALは、機能的な活性のために、単一のペプチド鎖の送達だけを要求する。

【0232】

標的化細胞型の選択的インビボ遺伝子修飾をもたらすナノ粒子が記載されており、本開示の教示の範囲内で使用され得る。特定の実施形態では、ナノ粒子は、WO 2014153114、WO 2017181110及びWO 201822672に記載されているものであり得る。

30

【0233】

（vii）細胞活性化培養条件。細胞集団は、遺伝子修飾された細胞集団を拡大するために培養開始組成物中でインキュベートされ得る。インキュベーションは、バッグ、細胞培養プレート、フラスコ、チャンバー、クロマトグラフィーカラム、架橋ゲル、架橋ポリマー、カラム、培養ディッシュ、中空糸、マイクロタイタープレート、シリカコーティングガラスプレート、チューブ、チューブセット、ウェル、バイアル又は培養若しくは細胞培養のための他の容器などの培養容器内で実行され得る。

40

【0234】

培養条件は、特定の培地、温度、酸素含量、二酸化炭素含量、時間、薬剤、例えば、栄養物質、アミノ酸、抗生物質、イオン及び／又はサイトカイン、ケモカイン、抗原などの刺激因子、結合パートナー、融合タンパク質、組換え可溶性受容体並びに細胞を活性化するように設計された任意の他の薬剤のうちの1つ以上を含み得る。

【0235】

一部の態様では、インキュベーションは、US 6,040,177、Klebanoffら（2012年）J Immunother. 35（9）：651～660頁；Terakuraら（2012年）Blood. 1：72～82頁及び／又はWangら（20

50

12年) J Immunother. 35 (9) : 689~701 頁に記載されている技術などの技術に従って実行される。

【0236】

T細胞を培養するための例示的な培養培地は、(i) 非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム及びペニシリン／ストレプトマイシンを補充されたRPMI；(ii) HEPES、5~15%のヒト血清、1~3%のL-グルタミン、0.5~1.5%のペニシリン／ストレプトマイシン及び0.25×10⁻⁴~0.75×10⁻⁴Mのβ-メルカプトエタノールを伴うRPMI；(iii) 10%のウシ胎仔血清(FBS)、2mMのL-グルタミン、10mMのHEPES、100U/mlのペニシリン及び100m/mlのストレプトマイシンを補充されたRPMI-1640；(iv) 10%のFBS、2mMのL-グルタミン、10mMのHEPES、100U/mlのペニシリン及び100m/mlのストレプトマイシンを補充されたDMEM培地；並びに(v) 5%のヒトAB型血清(Gemcell、West Sacramento、CA)、1%のHEPES(Gibco、Grand Island、NY)、1%のPen-Strep(Gibco)、1%のGlutaMax(Gibco)及び2%のN-アセチルシステイン(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)を補充されたX-Vivo 15培地(Lonza、Walkersville、MD)を含む。T細胞培養培地はまた、Hyclone(Logan、UT)からも市販されている。このような培養培地へと添加され得る、さらなるT細胞活性化成分については、下記において、より詳細に記載されている。

10

20

【0237】

一部の実施形態では、T細胞は、非分裂末梢血単核細胞(PBMC)などのフィーダー細胞を培養開始組成物に添加し(例えば、結果として得られる細胞集団が、拡大される初期集団内の各Tリンパ球につき、少なくとも5、10、20又は40個以上のPBMCフィーダー細胞を含有するように)、培養物をインキュベートする(例えば、T細胞の数を拡大するのに十分な時間)ことにより拡大される。一部の態様では、非分裂フィーダー細胞は、ガンマ照射PBMCフィーダー細胞を含み得る。一部の実施形態では、PBMCは、細胞分裂を阻止するように、3000~3600radの範囲のガンマ線により照射される。一部の態様では、フィーダー細胞は、T細胞の集団が添加される前に、培養培地に添加される。

30

【0238】

任意選択的に、インキュベーションは、EBV形質転換非分裂リンパ芽球様細胞(LCL)を、フィーダー細胞として添加することをさらに含み得る。LCLは、6000~10,000radの範囲のガンマ線により照射され得る。一部の態様では、LCLフィーダー細胞は、少なくとも10:1の比のLCLフィーダー細胞対初期Tリンパ球などの任意の適切な量において提供される。

【0239】

一部の実施形態では、刺激条件は、ヒトTリンパ球の成長に適する温度、例えば、少なくとも25℃、少なくとも30℃又は37℃を含む。

【0240】

特定の実施形態では、T細胞活性化培養条件の条件は、T細胞刺激エピトープを含み得る。T細胞刺激エピトープには、CD3、CD27、CD2、CD4、CD5、CD7、CD8、CD28、CD30、CD40、CD56、CD83、CD90、CD95、4-1BB(CD137)、B7-H3、CTLA-4、Frizzled-1(FZD1)、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、HVEM、ICOS、IL-1R、LAT、LFA-1、LIGHT、MHCI、MHCI I、NKG2D、OX40、ROR2及びRTKが含まれる。

40

【0241】

CD3は、T細胞受容体の主要なシグナル伝達エレメントである。以前に示されているように、CD3は全ての成熟T細胞上で発現される。特定の実施形態では、CD3刺激分

50

子（すなわち、CD3結合ドメイン）は、OKT3抗体（US5,929,212;US4,361,549;ATCC（登録商標）CRL-8001（商標）；及びArakawaら、J. Biochem. 120、657～662頁（1996年）を参照のこと。）、20G6-F3抗体、4B4-D7抗体、4E7-C9又は18F5-H10抗体に由来し得る。

【0242】

特定の実施形態では、CD3刺激分子は、少なくとも0.25若しくは0.5 ng/mlの濃度又は2.5～10 µg/mlの濃度にて培養培地内に含まれ得る。特定の実施形態は、5 µg/mlにてCD3刺激分子（例えば、OKT3）を利用する。

【0243】

特定の実施形態では、avタグに関連する活性化分子が、ビオチン化され、ストレプトアビジンビーズに結合され得る。このアプローチは、例えば、除去可能なT細胞エポープ刺激活性化システムを作製するために使用され得る。

【0244】

CD28についての例示的な結合ドメインは、TGN1412、CD80、CD86又は9D7抗体を含み得る又はそれらに由来し得る。CD28に結合するさらなる抗体には、9.3、KOLT-2、15E8、248.23.2、EX5.3D10及びCD28.3（GenBank受託番号AF451974.1の下で合成一本鎖Fv構築物として寄託されている；Vanhoveら、BLOOD、2003年7月15日、Vol. 102、No. 2、564～570頁も参照のこと。）が含まれる。さらに、1YJDは、有糸分裂促進抗体（5.11A1）のFab断片と複合体を形成したヒトCD28の結晶構造を提供する。特定の実施形態では、9D7と競合しない抗体が選択される。

【0245】

4-1BB結合ドメインは、Tarabanら、Eur J Immunol. 2002年12月；32（12）：3617～27頁に記載されているようにLOB12、IgG2a、LOB12.3又はIgG1に由来し得る。特定の実施形態では、4-1BB結合ドメインは、US9,382,328に記載されているモノクローナル抗体に由来する。さらなる4-1BB結合ドメインは、US6,569,997、US6,303,121及びMittlerら、Immunol Res. 2004年；29（1～3）：197～208頁に記載されている。

【0246】

OX40（CD134）及び／又はICOS活性化も使用され得る。OX40結合ドメインは、US20100196359、US20150307617、WO2015/153513、WO2013/038191及びMelerolaら、Clin Cancer Res. 2013年3月1日；19（5）：1044～53頁に記載されている。ICOSに結合し、それを活性化し得る例示的な結合ドメインは、例えば、US20080279851及びDengら、Hybrid Hybridomics. 2004年6月；23（3）：176～82頁に記載されている。

【0247】

可溶型の場合、T細胞活性化剤は、ポリエチレングリコール（PEG）分子などの別の分子とカップリングされ得る。任意の適切なPEG分子が使用され得る。典型的に、最大で1000 Daまでの分子量のPEG分子が水又は培養培地に溶解する。一部の場合、このようなPEGベースの試薬は、市販の活性化PEG分子（例えば、NOF North America Corporation、Irvine、Calif.、USAから入手可能なPEG-NHS誘導体、又はCreative PEGWorks、Chapel Hills、N.C.、USAから入手可能な活性化PEG誘導体）を使用して調製され得る。

【0248】

特定の実施形態では、細胞刺激剤は培養培地内の固相上に固定化される。特定の実施形態では、固相は、培養容器（例えば、バッグ、細胞培養プレート、チャンバー、クロマト

10

20

30

40

50

グラフィーカラム、架橋ゲル、架橋ポリマー、カラム、培養ディッシュ、中空系、マイクロタイタープレート、シリカコーティングガラスプレート、チューブ、チューブセット、ウェル、バイアル、培養若しくは細胞培養のための他の構造又は容器）の表面である。

【0249】

特定の実施形態では、固相は培養培地に添加され得る。このような固相には、例えば、ビーズ、中空系、樹脂、膜及びポリマーが含まれ得る。

【0250】

例示的なビーズには、磁気ビーズ、ポリマービーズ及び樹脂ビーズ（例えば、Streptactin（登録商標）Sephacryl、Streptactin（登録商標）Superflow及びStreptactin（登録商標）MacroPrep IBA GmbH, Göttingen）が含まれる。抗CD3／抗CD28ビーズは、T細胞拡大用の市販の試薬である（Invitrogen）。これらのビーズは、ヒトT細胞上のCD3及びCD28細胞表面分子に対するアフィニティー精製モノクローナル抗体の混合物でコーティングされた均一な、4.5 µmの超常磁性、無菌、非発熱性ポリスチレンビーズである。中空系は、Terumo BCT Inc.（Lakewood, Colo., USA）から入手可能である。樹脂には、金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）樹脂（例えば、TALON（登録商標）樹脂（Westburg, Leusden））が含まれる。膜には、紙及びクロマトグラフィーマトリックスの膜基材（例えば、ニトロセルロース膜又はポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜）が含まれる。

【0251】

例示的なポリマーには、多糖マトリックスなどの多糖が含まれる。このようなマトリックスには、アガロースゲル（例えば、Superflow（商標）アガロース又はSephacryl（登録商標）材料、例えば、異なるビーズ及び孔径で市販されているSuperflow（商標）Sephacryl（登録商標））又は架橋デキストランのゲルが含まれる。さらなる例示的な例は、デキストランが共有結合している、粒子状の架橋アガロースマトリックスであり、これは、（様々なビーズサイズ及び様々な孔径で）Sephadex（登録商標）又はSuperdex（登録商標）として市販されており、両方ともGE Healthcareから入手可能である。

【0252】

使用され得る合成ポリマーには、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、多糖及びアガロースのコポリマー（例えば、ポリアクリルアミド／アガロース複合体）又は多糖及びN, N'-メチレンビスアクリルアミドが含まれる。デキストラン及びN, N'-メチレンビスアクリルアミドのコポリマーの例は、Sephacryl（登録商標）（Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, NJ）シリーズの材料である。

【0253】

特定の実施形態は、多糖グラフトシリカ、ポリビニルピロリドングラフトシリカ、ポリエチレンオキシドグラフトシリカ、ポリ（2-ヒドロキシエチルアスパルタミド）シリカ及びポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）グラフトシリカなどの、合成ポリマー又は天然ポリマーにカップリングしたシリカ粒子を利用することができる。

【0254】

細胞活性化剤は、共有結合を介して固相に固定化され得る又は非共有結合を介して可逆的に固定化され得る。

【0255】

特定の実施形態では、T細胞活性化培養培地は、HEPES、5～15%のヒト血清、1～3%のL-グルタミン、0.5～1.5%のPen／strep、 0.25×10^{-4} ～ 0.75×10^{-4} Mのβ-メルカプトエタノールを含むRPMI内で、5～15（例えば、10）ng／µlで含まれるIL-7、IL-15及びIL-21と個々に培養されたFACS選別T細胞集団を含む。培養は、 $0.1 \sim 0.5 \times 10^6$ 個の細胞／ウェルをプレーティングした平底ウェルプレート上で実行される。活性化後3日目に、細胞

はTC処理プレートに移される。

【0256】

特定の実施形態では、T細胞活性化培養培地は、HEPES、10%のヒト血清、2%のL-グルタミン、1%のPen/strep、 0.5×10^{-4} Mの β -メルカプトエタノールを含むRPMI内で、5~15（例えば、10）ng/ μ lで含まれるIL-7、IL-15及びIL-21と個々に培養されたFACS選別CD8+T集団を含む。培養は、 $0.1 \sim 0.5 \times 10^6$ 個の細胞/ウェルをプレーティングした平底非組織培養（TC）処理96/48ウェルプレート上で実行される。活性化後3日目に、細胞はTC処理プレートに移される。

【0257】

HSC/HSPについての培養条件は、Notchアゴニストによる拡大（例えば、US7,399,633；US5,780,300；US5,648,464；US5,849,869；及びUS5,856,441を参照のこと、以下のような培養条件で存在する増殖因子：25~300 ng/mlのSCF、25~300 ng/mlのFlt-3L、25~100 ng/mlのTPO、25~100 ng/mlのIL-6及び10 ng/mlのIL-3を含み得る。より具体的な実施形態では、50、100又は200 ng/mlのSCF；50、100又は200 ng/mlのFlt-3L；50又は100 ng/mlのTPO；50又は100 ng/mlのIL-6；及び10 ng/mlのIL-3が使用され得る。

【0258】

(viii) エクスビオで製造された細胞製剤。特定の実施形態では、遺伝子修飾された細胞は、培養培地から採取され、洗浄され、治療有効量において、担体へと濃縮され得る。例示的な担体には、食塩水、緩衝食塩液、生理食塩液、水、ハンクス液、リンゲル液、Nonnosol-R (Abbott Labs)、PLASMA-LYTE A（登録商標）(Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL)、グリセロール、エタノール及びこれらの組合せが含まれる。

【0259】

特定の実施形態では、担体は、ヒト血清アルブミン（HSA）又は他のヒト血清成分又はウシ胎仔血清が補充され得る。特定の実施形態では、注入のための担体には、5%のHSA又はデキストロースを伴う緩衝食塩液が含まれる。さらなる等張剤には、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール又はマンニトールなどの三価以上の糖アルコールを含む、多価糖アルコールが含まれる。

【0260】

担体には、クエン酸バッファー、コハク酸バッファー、酒石酸バッファー、フマル酸バッファー、グルコン酸バッファー、シュウ酸バッファー、乳酸バッファー、酢酸バッファー、リン酸バッファー、ヒスチジンバッファー及び／又はトリメチルアミン塩などの緩衝剤が含まれ得る。

【0261】

安定剤とは、増量剤から、容器壁面への細胞の付着を阻止する一助となる添加剤に至る機能の範囲にわたり得る、広範な種類の賦形剤を指す。典型的な安定剤には、多価糖アルコール；アミノ酸、例えば、アルギニン、リジン、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アラニン、オルニチン、L-ロイシン、2-フェニルアラニン、グルタミン酸及びトレオニン；有機糖又は糖アルコール、例えば、ラクトース、トレハロース、スタキオース、マンニトール、ソルビトール、キシリトール、リビトール、ミオイニシトール、ガラクトース、グリセロール及びシクリトール、例えば、イノシトール；PEG；アミノ酸ポリマー；硫黄含有還元剤、例えば、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、アルファモノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウム；低分子量ポリペプチド（すなわち、10残基未満）；タンパク質、例えば、HSA、ウシ血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；単糖類、例えば、キシロース、マンノース、フルクトース及び

10

20

30

40

50

グルコース；二糖類、例えば、ラクトース、マルトース及びスクロース；三糖類、例えば、ラフィノース並びに多糖類、例えば、デキストランが含まれ得る。

【0262】

必要な場合又は有益な場合、組成物又は製剤は、注射部位における疼痛を和らげるように、リドカインなどの局所麻酔剤を含み得る。

【0263】

例示的な保存剤には、フェノール、ベンジルアルコール、メタクレゾール、メチルパラベン、プロピルパラベン、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、ハロゲン化ベンザルコニウム、塩化ヘキサメトニウム、アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール及び3-ペンタノールが含まれる。

【0264】

組成物又は製剤中の細胞の治療有効量は、 10^2 個超の細胞、 10^3 個超の細胞、 10^4 個超の細胞、 10^5 個超の細胞、 10^6 個超の細胞、 10^7 個超の細胞、 10^8 個超の細胞、 10^9 個超の細胞、 10^{10} 個超の細胞又は 10^{11} 個超であり得る。

【0265】

本明細書に開示された組成物及び製剤中において、細胞は、一般に、1リットル以下、500ml以下、250ml以下又は100ml以下の容量である。よって、投与された細胞の密度は、典型的に、 10^4 個の細胞/ml、 10^7 個の細胞/ml又は 10^8 個の細胞/mlより多い。

【0266】

示されているように、組成物は、少なくとも1つの遺伝子修飾された細胞型（例えば、修飾されたT細胞、NK細胞又は幹細胞）を含む。製剤は、異なる型の遺伝子修飾された細胞（例えば、T細胞、NK細胞及び／又は組み合わせた幹細胞）を含み得る。

【0267】

異なる型の遺伝子修飾された細胞又は細胞サブセット（例えば、修飾されたT細胞、NK細胞及び／又は幹細胞）は、異なる比、例えば、1:1:1の比、2:1:1の比、1:2:1の比、1:1:2の比、5:1:1の比、1:5:1の比、1:1:5の比、10:1:1の比、1:10:1の比、1:1:10の比、2:2:1の比、1:2:2の比、2:1:2の比、5:5:1の比、1:5:5の比、5:1:5の比、10:10:1の比、1:10:10の比、10:1:10の比などで提供され得る。これらの比は、同じ又は異なる組換えタンパク質を発現する細胞の数にも適用することができる。細胞型のうちの2つのみが組み合わせられる場合又は組換えタンパク質の2つの組合せのみが製剤内に含まれる場合、比は、上記に提供された3つの数字の組み合わせから作成され得る任意の2つの数字の組み合わせを含み得る。実施形態では、組み合わせられた細胞集団は、有効性及び／又は細胞増殖について、インビトロ、インビボ及び／又はエクスピボで試験され、細胞の有効性及び／又は増殖をもたらす細胞の比が選択される。特定の実施形態は、1:1の比のCD4T細胞及びCD8T細胞を含む。

【0268】

本明細書に開示された細胞ベースの組成物は、例えば、注射、注入、灌流又は洗浄による投与のために調製され得る。組成物及び製剤は、骨髄内、静脈内、皮内、動脈内、結節内、リンパ内、腹腔内、病巣内、腫瘍内、膀胱内及び／又は皮下注射のためにさらに製剤化され得る。

【0269】

(ix) 使用方法。本明細書に開示された方法は、本明細書に開示された組成物を用いて、対象（ヒト、獣医科動物（イヌ、ネコ、爬虫類、鳥類など）、家畜（ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、ヒツジ、ニワトリなど）及び研究動物（サル、ラット、マウス、魚類など）を処置することを含む。対象を処置することは、治療有効量を送達することを含む。治療有効量は、有効量、予防的処置及び／又は治療的処置を提供する量を含む。

【0270】

「有効量」は、対象において所望の生理学的変化をもたらすのに必要な組成物の量である。有効量は、多くの場合、研究目的で投与される。本明細書に開示された有効量は、CD33関連障害の発生又は進行の評価に関連した動物モデル又はインビトロアッセイにおける統計的に有意な効果をもたらし得る。

【0271】

「予防的処置」は、CD33関連（例えば、CD33発現）障害の徴候若しくは症状を示さず、又はCD33関連障害の初期の徴候若しくは症状のみを示す対象に投与された処置を含み、それにより、処置は、CD33関連障害をさらに進展させるリスクを低減又は減少させる目的で投与される。したがって、予防的処置は、CD33関連障害を予防する処置として機能する。

10

【0272】

「治療的処置」は、CD33関連障害の徴候又は症状を示す対象に投与され、CD33関連障害のそれらの徴候又は症状を低減又は排除する目的で対象に投与される処置を含み得る。治療的処置は、CD33関連障害の存在若しくは活性を低減、制御若しくは排除し、及び／又はCD33関連障害の副作用を低減、制御若しくは排除し得る。

【0273】

「治療的処置」はまた、画像化を必要とする対象に投与される処置を含み得る。対象は、診断を補助するため、治療介入についての位置を特定するため、身体部分の機能を評価するため、及び／又は状態の存在若しくは非存在を評価するために画像化を必要とし得る。治療的画像化処置の有効性は、その意図する目的に十分な画像の捕捉に基づいて確認され得る。例示的な種類の画像化には、陽電子放出断層撮影法（PET）、単一光子放出コンピュータ断層撮影法、ラジオアイソトープレノグラフィー及びシンチグラフィーが含まれる。

20

【0274】

有効量としての機能、予防的処置又は治療的処置は相互に排他的ではなく、特定の実施形態では、投与される用量は2つ以上の処置の種類を達成し得る。

【0275】

特定の実施形態では、治療有効量は抗がん効果をもたらす。抗がん効果は、がん細胞数の減少、転移数の減少、転移の予防若しくは低減、腫瘍体積の減少、腫瘍成長の阻害、平均余命の延長、対象の寿命の延長、がん細胞における化学感受性若しくは放射線感受性の誘発、がん細胞増殖の阻害、がん関連疼痛の低減及び／又は処置後のがんの再燃若しくは再発の低減を含む。

30

【0276】

「腫瘍」は、細胞（新生細胞又は腫瘍細胞と呼ばれる）の異常成長により形成される腫脹又は病変である。「腫瘍細胞」は、急速な無制御細胞増殖により成長する異常細胞であり、新たな成長を開始した刺激が停止した後も成長し続ける異常細胞である。腫瘍は、正常組織との構造的組織化及び機能的協調の部分的又は完全な欠如を示し、通常、良性、前悪性又は悪性であり得る明瞭な組織塊を形成する。

【0277】

特定の実施形態では、治療有効量は、免疫応答を誘導する。免疫応答は、がん細胞に対するものであり得る。

40

【0278】

CD33関連障害の例には、白血病及びリンパ腫などの血液がん及び他の骨髓性障害又はリンパ増殖性障害が含まれる。

【0279】

例示的な白血病には、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）、慢性骨髓単球性白血病（CMML）、肥満細胞白血病、骨髓異形成症候群（MDS）、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）及び巨核球性白血病が含まれる。

【0280】

50

A M L の例示的なサブタイプには、急性好塩基球性白血病、急性赤白血病（A M L - M 6）、急性巨核芽球性白血病（A M L - M 7）、急性単芽球性白血病（A M L - M 5 a）、急性単球性白血病（A M L - M 5 b）、顆粒球成熟を伴う急性骨髄芽球性白血病、成熟を伴わない急性骨髄芽球性白血病、急性骨髄単球性白血病（A M L - M 4）、骨髄線維症を伴う急性汎骨髄症、急性前骨髄球性白血病（A P L）、赤白血病（A M L - M 6 a）、最小分化急性骨髄芽球性白血病、骨髄好酸球増多を伴う骨髄単球性白血病及び純粋赤白血病（A M L - M 6 b）が含まれる。

【0281】

例示的なリンパ腫には、多発性骨髄腫が含まれる。

【0282】

本明細書に開示された組成物はまた、上記のリンパ球増殖性障害及び血液がんに関連する合併症又は疾患を処置するために使用され得る。例えば、A M L に関連する合併症には、先行する骨髄異形成症候群（M D S、以前は「前白血病」として知られていた）、二次性白血病、特に二次性 A M L、白血球数増加及びアウエル小体の欠如が含まれ得る。とりわけ、白血球停滞及び中枢神経系（C N S）の関与、白血球増加症、残存疾患もまた、A M L に関連する合併症又は疾患とみなされる。

【0283】

本明細書に開示された組成物は、骨髄由来サプレッサー細胞（M D S C）をターゲティングするために使用され得る。M D S C は、免疫抑制性腫瘍微小環境において主要なプレーヤーであり、T 細胞及び N K 細胞の抗腫瘍反応性を阻害することが見出されている。特定の M D S C は、C D 3 3 の発現が高く、単球性 M D S C 及び未成熟 M D S C を含め、抗 C D 3 3 処置の標的とされ得る。

【0284】

本明細書に開示された組成物はまた、ダウン症、トリソミー、ファンコニー貧血、ブルーム症候群、毛細血管拡張性運動失調症、ダイヤモンド・ブラックファン貧血、シュワツハマン・ダイヤモンド症候群、リ・フラウメニ症候群、神経線維腫症 I 型、重症先天性好中球減少症（コストマン症候群とも呼ばれる）などの、A M L のリスクに関連する他の病態又は遺伝的症候群の処置における使用も見出され得る。

【0285】

本明細書に開示された組成物はまた、アルツハイマー病の処置における使用も見出され得る。

【0286】

投与に関して、インビトロアッセイ及び／又は動物モデル研究からの結果に基づいて、治療有効量（本明細書において用量とも称される）が最初に推定され得る。そのような情報は、目的の対象における有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。特定の対象に投与される実際の投与量は、標的、体重、状態の重症度、C D 3 3 関連障害の種類、C D 3 3 関連障害の病期、過去の又は併用される治療的介入、対象の特発性疾患及び投与経路を含む、身体的及び生理学的要因などのパラメーターを考慮して、医師、獣医又は研究者により決定され得る。

【0287】

有用な用量は、 $0.1 \sim 5 \mu\text{g} / \text{kg}$ 又は $0.5 \sim 1 \mu\text{g} / \text{kg}$ の範囲であり得る。他の例では、用量は、 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $15 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $30 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $55 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $70 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $90 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $150 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $350 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $500 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $750 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $1000 \mu\text{g} / \text{kg}$ 、 $0.1 \sim 5 \text{mg} / \text{kg}$ 又は $0.5 \sim 1 \text{mg} / \text{kg}$ を含み得る。他の例では、用量は、 $1 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $10 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $30 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $50 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $70 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $300 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $500 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $700 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $1000 \text{mg} / \text{kg}$ 又はそれ以上を含み得る。

【0288】

治療有効量の細胞ベースの組成物は、 $10^4 \sim 10^9$ 細胞 / kg 体重又は $10^3 \sim 10$

10

20

30

40

50

10^{11} 細胞 / kg 体重を含み得る。投与するための治療有効量は、 10^2 個超の細胞、 10^3 個超の細胞、 10^4 個超の細胞、 10^5 個超の細胞、 10^6 個超の細胞、 10^7 個超の細胞、 10^8 個超の細胞、 10^9 個超の細胞、 10^{10} 個超の細胞又は 10^{11} 個超を含み得る。

【0289】

治療有効量は、治療レジメンの過程の間、単一又は複数の用量を（例えば、毎日、隔日、3日ごと、4日ごと、5日ごと、6日ごと、毎週、2週間ごと、3週間ごと、毎月、2か月ごと、3か月ごと、4か月ごと、5か月ごと、6か月ごと、7か月ごと、8か月ごと、9か月ごと、10か月ごと、11か月ごと又は毎年）投与することにより達成され得る。特定の実施形態では、処置プロトコールは、臨床試験プロトコール又は FDA によって承認された処置プロトコールによって指示され得る。

10

【0290】

本明細書に記載されている医薬組成物は、注射、吸入、注入、灌流、洗浄又は摂取によって投与され得る。投与経路には、静脈内、皮内、動脈内、非経口、鼻腔内、結節内、リンパ内、腹腔内、病巣内、前立腺内、腔内、直腸内、局所、髄腔内、腫瘍内、筋肉内、小胞内、経口、皮下及び／又は舌下投与、より詳細には、静脈内、皮内、動脈内、非経口、鼻腔内、結節内、リンパ内、腹腔内、病巣内、前立腺内、腔内、直腸内、局所、髄腔内、腫瘍内、筋肉内、小胞内、経口、皮下及び／又は舌下注射が含まれ得る。

【0291】

使用方法はまた、例えば、抗体が、放射性同位体コンジュゲートとして製剤化される場合、画像ベースの診断における本明細書に記載されている抗体の使用も含む。

20

【0292】

(x) 対照集団に由来する参照レベル。本明細書に記載されている治療に関連するパラメーターについて得られた値は、対照集団から導出された参照レベルと比較され得、この比較は、本明細書に記載されている治療が、それを必要とする対象に有効であるかどうかを示し得る。参照レベルは、対照集団からの1つ以上の関連するデータセットから得られ得る。本明細書で使用される場合、「データセット」は、所望の条件下での試料（又は試料の集団）の評価から得られる数値のセットである。データセットの値は、例えば、試料から測定値を実験的に取得し、これらの測定値からデータセットを構成することによって得られ得る。当業者によって理解されるように、参照レベルは、例えば、個々のデータ点の収集から意味のある集合参照レベルに到達するために当該技術分野において有用であり、公知の任意の数学的又は統計的式、例えば、平均、中央値、平均の中央値などにに基づき得る。或いは、参照レベル又は参照レベルを作製するためのデータセットは、検査室などのサービス提供者から得られ得る、又はデータセットが保存されているデータベース若しくはサーバーから得られ得る。

30

【0293】

データセットからの参照レベルは、対照集団から導出された以前の測定値から導出され得る。「対照集団」は、同様の特定の特徴の対象又は試料の任意の分類である。分類は、例えば、臨床パラメーター、臨床評価、治療レジメン、疾患状態、状態の重症度などに従い得る。特定の実施形態では、分類は、年齢範囲（例えば、60～65歳）及び非免疫不全状態に基づく。特定の実施形態では、正常な対照集団には、試験対象と年齢が一致し、免疫が低下していない個体が含まれる。特定の実施形態では、年齢の一致は、状況下で臨床的に関連するように、例えば、0～10歳、30～40歳、60～65歳、70～85歳などが含まれる。特定の実施形態では、対照集団は、CD33関連障害を有しており、治療有効量の組成物又は製剤を投与されることがない対照集団を含むことができる。

40

【0294】

特定の実施形態では、本明細書に記載されている治療に関連する特定のパラメーターの値についての関連する参照レベルは、本明細書に開示された治療が、それを必要とする対象に治療的に有効であるかどうかを決定するために対照集団における治療に関連する特定の対応するパラメーターの値に基づいて得られる。

50

【0295】

特定の実施形態では、試料の値が、参照レベルと統計的に有意に異なる又は参照レベルと統計的に有意に異ならないかどうかに基づいて、結論が導き出される。差が偶然のみに基づいて発生すると予測されるレベルの範囲内にある場合、測定値は統計的に有意に異ならない。対照的に、統計的に有意な差又は増加は、偶然だけで発生すると予測されるものより大きいものである。統計的有意性又はその欠如は、当該技術分野において周知の様々な方法のいずれかによって決定され得る。統計的有意性の一般的に使用される尺度の例は、p値である。p値は、データ点がランダムな偶然のみの結果である、特定のデータ点に相当する所与の結果を得る確率を表す。結果は、多くの場合、0.05以下のp値で有意である（ランダムな偶然ではない）とみなされる。特定の実施形態では、試料の値及び参照レベルが、統計的に有意に異ならない場合、試料の値は、正常な対照集団から導出された参照レベル「と同等である」。

10

【0296】

以下の例示的な実施形態及び実施例は、本開示の特定の非限定的な実施形態を実証するために含まれる。当業者は、本開示に照らして、本開示の精神及び範囲から逸脱することなく、本明細書に開示された特定の実施形態に対して多くの変更を行うことができ、依然として同様又は類似の結果を得ることができることを認識する。

【0297】

(xi) 例示的な実施形態。

【0298】

1. North、IMGT、Kab at、Ch o t h i a、又はSet 5に従った1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、又は2E3の相補性決定領域(CDR)を含む抗体又はその抗原結合断片。

20

【0299】

2. 1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは2E3の可変軽鎖及び可変重鎖、又は

1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは2E3の可変軽鎖に少なくとも90%配列同一性を有する可変軽鎖及び1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは2E3の対応する可変重鎖に少なくとも90%配列同一性を有する可変重鎖を含む抗体又はその抗原結合断片。

30

【0300】

3. 抗原結合断片が、VH-VL又はVL-VH配向のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂、又は一本鎖Fv断片(scFv)を含む（例えば、図14での配列番号230～237参照）、実施形態1又は2の抗体又は抗原結合断片。

【0301】

4. 抗体又はその抗原結合断片がPEG化されている、実施形態1～3のいずれかの抗体又はその抗原結合断片。

【0302】

5. 抗体がFc改変を含む、実施形態1～4のいずれかの抗体又はその抗原結合断片。

40

【0303】

6. Fc改変が、M428L/N434S、G236A/S239D/A330L/I332E(GASDALIE)、huIgG4 ProAlaAla、huIgG2m4、及び/又はhuIgG2sigma突然変異を含む、実施形態5の抗体又はその抗原結合断片。

【0304】

7. Vセットドメインの存在にかかわらず、膜貫通領域の115残基内のCD33のC2セットIg様ドメインに結合する又はVセットドメインの非存在下でのみC2セットIg様ドメインに結合する、実施形態1～6のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合断片。

50

【0305】

8. 抗CD33免疫毒素、抗CD33抗体-薬物コンジュゲート、抗CD33抗体-フルオロフォアコンジュゲート、抗CD33抗体-放射性同位元素コンジュゲート、抗CD33二重特異性抗体、抗CD33二重特異性免疫細胞誘導抗体、抗CD33三重特異性抗体、及び／又は抗CD33四重特異性抗体の一部としてNorth、IMGT、Kabata、Chothia、又はSet5に従った1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、又は2E3の相補性決定領域(CDR)セットを含む結合ドメインを含むCD33ターゲティング剤。

【0306】

9. 抗CD33免疫毒素、抗CD33抗体-薬物コンジュゲート、抗CD33抗体-フルオロフォアコンジュゲート、抗CD33抗体-放射性同位元素コンジュゲート、抗CD33二重特異性抗体、抗CD33二重特異性免疫細胞誘導抗体、抗CD33三重特異性抗体、及び／若しくは抗CD33四重特異性抗体の一部として1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは2E3の可変重及び可変軽鎖；又は抗CD33免疫毒素、抗CD33抗体-薬物コンジュゲート、抗CD33抗体-フルオロフォアコンジュゲート、抗CD33抗体-放射性同位元素コンジュゲート、抗CD33二重特異性抗体、抗CD33二重特異性免疫細胞誘導抗体、抗CD33三重特異性抗体、及び／若しくは抗CD33四重特異性抗体の一部として1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、若しくは2E3の対応する可変重及び軽鎖に少なくとも90%配列同一性を有する可変重及び軽鎖、を含む結合ドメインを含むCD33ターゲティング剤。

【0307】

10. CD33ターゲティング剤が、抗CD33免疫毒素を含み、毒素が、ホロ毒素又はヘミ毒素を含む、実施形態8又は9に記載のCD33ターゲティング剤。

【0308】

11. CD33ターゲティング剤が、抗CD33免疫毒素を含み、毒素が、アブリン、ブーガニン、プリオジン1、ジフテリア毒素(DT)、ゲロニン、ヤドギリレクチン、モデシン、ヤマゴボウ抗ウイルススタンパク質(PAP)、シュードモナス外毒素(PE)、リシン及び／又はサポリンを含む、実施形態8～10のいずれかに記載のCD33ターゲティング剤。

【0309】

12. CD33ターゲティング剤が、抗CD33抗体-薬物コンジュゲートを含み、薬物が、モノメチルアウリスタチンE[MMAE]、ベドチン、ドラスタチン、アウリスタチン、カリケマイシン、ピロロベンゾジアゼピン(PBD)、ネモルピシン、PNU-159682、アントラサイクリン、デュオカルマイシン、ピンカアルカロイド、タキサン、トリコテセン、CC1065、カンプトテシン、エリナフィド、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン及び／又はプロプラノロールを含む、実施形態8～11のいずれかに記載のCD33ターゲティング剤。

【0310】

13. CD33ターゲティング剤が、抗CD33抗体-放射性同位体コンジュゲートを含み、放射性同位体が、ヒ素-72、ヒ素-74、ヨウ素-131、インジウム-111、イットリウム-90、ルテチウム-177、アスタチン-211、アクチニウム-225、若しくはビスマス-212及び／又はビスマス-213を含む、実施形態8～12のいずれかに記載のCD33ターゲティング剤。

【0311】

14. CD33ターゲティング剤が、抗CD33抗体-放射性同位体コンジュゲートを

含み、放射性同位体が、 ^{225}Ac 、 ^{228}Ac 、 ^{111}Ag 、 ^{124}Am 、 ^{74}As 、 ^{211}At 、 ^{209}At 、 ^{194}Au 、 ^{128}Ba 、 ^7Be 、 ^{206}Bi 、 ^{245}Bk 、 ^{246}Bk 、 ^{76}Br 、 ^{11}C 、 ^{47}Ca 、 ^{254}Cf 、 ^{242}Cm 、 ^{51}Cr 、 ^{67}Cu 、 ^{153}Dy 、 ^{157}Dy 、 ^{159}Dy 、 ^{165}Dy 、 ^{166}Dy 、 ^{171}Er 、 ^{250}Es 、 ^{254}Es 、 ^{147}Eu 、 ^{157}Eu 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{251}Fm 、 ^{252}Fm 、 ^{253}Fm 、 ^{66}Ga 、 ^{72}Ga 、 ^{146}Gd 、 ^{153}Gd 、 ^{68}Ge 、 ^{170}Hf 、 ^{171}Hf 、 ^{193}Hg 、 ^{193}mHg 、 ^{160}mHo 、 ^{130}I 、 ^{131}I 、 ^{135}I 、 ^{114}mIn 、 ^{185}Ir 、 ^{42}K 、 ^{43}K 、 ^{76}Kr 、 ^{79}Kr 、 ^{81}mKr 、 ^{132}La 、 ^{262}Lr 、 ^{169}Lu 、 ^{174}mLu 、 ^{176}mLu 、 ^{257}Md 、 ^{260}Md 、 ^{28}Mg 、 ^{52}Mn 、 ^{90}Mo 、 ^{24}Na 、 ^{95}Nb 、 ^{138}Nd 、 ^{57}Ni 、 ^{66}Ni 、 ^{234}Np 、 ^{15}O 、 ^{182}Os 、 ^{189}mOs 、 ^{191}Os 、 ^{32}P 、 ^{201}Pb 、 ^{101}Pd 、 ^{143}Pr 、 ^{191}Pt 、 ^{243}Pu 、 ^{225}Ra 、 ^{81}Rb 、 ^{188}Re 、 ^{105}Rh 、 ^{211}Rn 、 ^{103}Ru 、 ^{35}S 、 ^{44}Sc 、 ^{72}Se 、 ^{153}Sm 、 ^{125}Sn 、 ^{91}Sr 、 ^{173}Ta 、 ^{154}Tb 、 ^{127}Te 、 ^{234}Th 、 ^{45}Ti 、 ^{166}Tm 、 ^{230}U 、 ^{237}U 、 ^{240}U 、 ^{48}V 、 ^{178}W 、 ^{181}W 、 ^{188}W 、 ^{125}Xe 、 ^{127}Xe 、 ^{133}Xe 、 ^{133}mXe 、 ^{135}Xe 、 ^{85}mY 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{93}Y 、 ^{169}Yb 、 ^{175}Yb 、 ^{65}Zn 、 ^{71}mZn 、 ^{86}Zr 、 ^{95}Zr 及び／又は ^{97}Zr を含む、実施形態8～13のいずれかに記載のCD33ターゲティング剤。

10

【0312】

15. 多重特異性抗体を含む、実施形態8～14のいずれかに記載のCD33ターゲティング剤。

20

【0313】

16. 多重特異性抗体が、二重特異性抗体、三重特異性抗体又は四重特異性抗体を含む、実施形態15に記載のCD33ターゲティング剤。

【0314】

17. 多重特異性抗体が、免疫細胞を活性化する結合ドメイン（例えば、図14の配列番号157及び238～245を参照のこと。）を含む、実施形態15又は16に記載のCD33ターゲティング剤。

【0315】

18. 免疫細胞が、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、NK-T細胞又はマクロファージである、実施形態17に記載のCD33ターゲティング剤。

30

【0316】

19. T細胞が、CD3T細胞、CD4T細胞、CD8T細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞及び／又はナイーブT細胞である、実施形態18に記載のCD33ターゲティング剤。

【0317】

20. 免疫細胞を活性化する結合ドメインが、CD3、CD28、CD8、NKG2D、CD8、CD16、KIR2DL4、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR3DS1、NKG2C、NKG2E、NKG2D、NKP30、NKP44、NKP46、NKP80、DNAM-1、CD11b、CD11c、CD64、CD68、CD119、CD163、CD206、CD209、F4/80、IFGR2、Toll様受容体1-9、IL-4R α 又はMARCOに結合する、実施形態17～19のいずれかに記載のCD33ターゲティング剤。

40

【0318】

21. 結合ドメインがT細胞を活性化し、OKT3抗体、4B4-D7抗体、4E7-C9抗体、18F5-H10抗体のCDRを含む、又は配列番号161及び162に示されるCD3 HcFv及びCD3 LcFvを含む、実施形態17～20のいずれかのCD33ターゲティング剤。

【0319】

22. 結合ドメインがT細胞を活性化し、TGN1412抗体のCDRを含む、実施形

50

態 17～21 のいずれかの CD33 ターゲティング剤。

【0320】

23. 結合ドメインが T 細胞を活性化し、OKT8 抗体の CDR を含む、実施形態 17～22 のいずれかの CD33 ターゲティング剤。

【0321】

24. 結合ドメインが T 細胞を活性化し、TCR を含む、実施形態 17～23 のいずれかの CD33 ターゲティング剤。

【0322】

25. CD33 ターゲティング剤が、
 1H10 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ;
 1A9 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ;
 1E6 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ;
 1D2 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ;
 1B9 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ;
 1H8 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ;
 2D3 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ; 又は
 2E3 の CDR セット並びに配列番号 161 に記載の配列を有する CD3 HcFv 及び配列番号 162 に記載の配列を有する CD3 LcFv ;
 を有する、実施形態 17～24 のいずれかの CD33 ターゲティング剤。

【0323】

26. CD33 ターゲティング剤が、配列番号 234 又は 235 に記載の配列を有する、実施形態 17～25 のいずれかの CD33 ターゲティング剤。

【0324】

27. 1H10、1A9、1E6、1D2、1B9、1H8、2D3、又は 2E3 の Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂、又は一本鎖 Fv 断片 (scFv) を含み、scFv は VH-VL 配向又は VL-VH 配向でも可能である (例えば、図 14 での配列番号 230～237 参照)、実施形態 8～26 のいずれかの CD33 ターゲティング剤。

【0325】

28. リンカーをさらに含む、実施形態 1～7 のいずれかの抗体若しくはその抗原結合断片又は実施形態 8～27 のいずれかの CD33 ターゲティング剤。

【0326】

29. リンカーが Gly-Ser リンカーである、実施形態 28 の CD33 ターゲティング剤。

【0327】

30. Gly-Ser リンカーが、(Gly_xSer_y)_n を含み、x 及び y が、独立して、0～10 の整数であり、ただし、x 及び y の両方が 0 ではなく、n が、1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10 の整数である、実施形態 29 に記載の CD33 ターゲティング剤。

【0328】

31. Gly-Ser リンカーが、(Gly₄Ser)₄ (配列番号 125)、(Gly₄Ser)₃ (配列番号 126)、(Gly₄Ser)₂ (配列番号 127)、(Gly₄Ser)₁ (配列番号 128)、(Gly₃Ser)₂ (配列番号 129)、(Gly₃Ser)₁ (配列番号 130)、(Gly₂Ser)₂ (配列番号 131) (Gly

2 Ser) 1、GGSGGGSGGGSG (配列番号132)、GGSGGGSGSGSG (配列番号133)又はGGSGGGSGSG (配列番号134)を含む、実施形態30に記載のCD33ターゲティング剤。

【0329】

32. 対象への投与のために製剤化された、実施形態1～7若しくは28のいずれかの抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は実施形態8～31のいずれかのCD33ターゲティング剤を含む組成物。

【0330】

33. 対象への投与のために製剤化された、実施形態1～7のいずれかの抗体若しくはその抗原結合断片及び／又は実施形態8、9、若しくは15～31のいずれかのCD33ターゲティング剤を発現するように遺伝的に改変された細胞。

10

【0331】

34. インビボ又はエクスビボにおけるものである、実施形態33に記載の細胞。

【0332】

35. T細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、NK-T細胞、単球／マクロファージ、造血幹細胞(HSC)又は造血前駆細胞(HPc)である、実施形態33又は34に記載の細胞。

【0333】

36. CD3+T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、セントラルメモリーT細胞、エフェクターメモリーT細胞及び／又はナイーブT細胞から選択されるT細胞である、実施形態33～35のいずれかに記載の細胞。

20

【0334】

37. 細胞がCD8+T細胞である、実施形態33～36のいずれかの細胞。

【0335】

38. 実施形態33～37のいずれかに記載の細胞の集団及び薬学的に許容される担体を含む製剤。

【0336】

39. それを必要とする対象においてCD33関連障害を処置する方法であって、治療有効量の実施形態32に記載の組成物及び／又は実施形態38に記載の製剤を対象に投与することを含み、それによって、それを必要とする対象においてCD33関連障害を処置する、方法。

30

【0337】

40. CD33関連障害が、急性骨髄性白血病(AML)を含む、実施形態39に記載の方法。

【0338】

41. CD33関連障害が、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性骨髄単球性白血病(CML)、肥満細胞白血病、骨髄異形成症候群(MDS)、B細胞急性リンパ芽球性白血病(B-ALL)、T細胞急性リンパ芽球性白血病(T-ALL)又は巨核球性白血病を含む、実施形態39に記載の方法。

【0339】

42. 製剤中の細胞の集団が、対象にとって自己性である又は同種である、実施形態39～41のいずれかの方法。

40

【0340】

43. 対象が、CD33のVセットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに

対象が、CD33のVセットドメインを発現する場合、

1H10、1A9、1E6、1D2及び1B9のうちの1つ以上の結合ドメイン、並びに

1H8、2D3及び2E3のうちの1つ以上の結合ドメイン

を含む組成物を含む併用療法を選択することをさらに含む、実施形態39～42のいずれ

50

かに記載の方法。

【0341】

44. 対象が、CD33のVセットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに

対象が、CD33のVセットドメインを発現しない場合、

6H9、9G2、3A5、7D5、1H7及び2D5のうちの1つ以上の結合ドメインを含む組成物を含む療法を選択することをさらに含む、実施形態39～42のいずれかに記載の方法。

【0342】

45. それを必要とする対象においてCD33発現細胞に対する免疫応答を活性化させる方法であって、治療有効量の実施形態32に記載の組成物及び／又は実施形態38に記載の製剤を対象に投与することを含み、必要とする対象においてCD33発現細胞に対する免疫応答を活性化させる、方法。

【0343】

46. CD33発現細胞が、急性骨髄性白血病（AML）細胞を含む、実施形態45に記載の方法。

【0344】

47. CD33発現細胞が、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、肥満細胞白血病、骨髄異形成症候群（MDS）、B細胞急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）、T細胞急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）又は巨核球性白血病細胞を含む、実施形態45に記載の方法。

【0345】

48. 製剤中の細胞の集団が、対象にとって自己性である又は同種である、実施形態45～47のいずれかの方法。

【0346】

49. 対象が、CD33のVセットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに

対象が、CD33のVセットドメインを発現する場合、

1H10、1A9、1E6、1D2及び1B9のうちの1つ以上の結合ドメイン、及び1H8、2D3及び2E3のうちの1つ以上の結合ドメインを含む組成物を含む併用療法を選択することをさらに含む、実施形態45～48のいずれかに記載の方法。

【0347】

50. 対象が、CD33のVセットドメインを発現するか又は欠くかを決定すること、並びに

対象が、CD33のVセットドメインを発現しない場合、

6H9、9G2、3A5、7D5、1H7及び2D5のうちの1つ以上の結合ドメインを含む組成物を含む療法を選択することをさらに含む、実施形態45～48のいずれかに記載の方法。

【0348】

51. 1H10、1A9、1E6、1D2、及び1B9のうちの1つ以上の結合ドメイン並びに1H8、2D3、及び2E3のうちの1つ以上の結合ドメインを含む組成物を含むキット。

【0349】

52. 1H10、1A9、1E6、1D2、及び1B9のうちの1つ以上の結合ドメインを含む組成物並びに1H8、2D3、及び2E3のうちの1つ以上の結合ドメインを含む組成物を含むキット。

【0350】

53. インビボ画像化における、並びに／又はインビトロ若しくはインビボでCD33発現細胞を濃縮、単離及び／若しくは検出するための、先行する実施形態のいずれかに記

10

20

30

40

50

載の抗体若しくはその抗原結合断片、又は先行する実施形態のいずれかに記載のCD33ターゲティング剤の使用。

【0351】

(xii) 実験例。概要。悪性障害及び非悪性障害においてCD33を標的とすることへの関心が高まっている。急性骨髄性白血病では、CD33抗体-薬物コンジュゲートであるゲムツズマブオゾガマイシン(GO)による生存期間の延長により、この戦略が有効であることが確証されている。それでも、GOは一部の患者にのみ有益であり、より強力なCD33指向治療法を開発する試みが促されている。1つの制限として、CD33抗体は典型的に膜遠位Vセットドメインを認識する。このドメインが分子の細胞外部分内に異なっており位置している、種々の人工CD33タンパク質を使用して、膜近位のターゲティングエピトープをターゲティングすることが、CD33抗体ベースの治療法のエフェクター機能を増強するかどうかを試験した。この考えと一致して、CD33Vセット/CD3二重特異性抗体(BsAb)は、全長CD33を発現する細胞より、C2セットドメイン全体を欠くCD33バリエーションを発現する細胞に対して、実質的に大きな細胞傷害性を誘発したが、GOによって誘導された細胞傷害効果はVセットドメインの位置とは無関係であった。したがって、マウス及びヒト抗体は、ヒトCD33のC2セットドメインに対して産生され、C2セットドメインの存在/非存在とは無関係にCD33に結合した抗体(「CD33^{PAN}抗体」)が同定された。これらの抗体は、CD33に結合すると内在化し、CD33^{PAN}/CD3BsAbとして、CD33⁺細胞に対して強力な細胞溶解効果をもたらした。このデータにより、CD33^{PAN}抗体ベースの治療法をさらに開発するための理論的根拠が得られる。

10

20

【0352】

序論。CD33(Siglec-3)は、主に成熟している及び成熟した骨髄細胞並びにそれらの新生細胞対応物に提示される分化抗原である(Walterら、Blood. 119(26):6198~6208頁、2012年;及びDuanら、Annu Rev Immunol. 38:365~395頁、2020年)。この発現パターンにより、何よりもまず急性骨髄性白血病(AML)において、CD33⁺細胞を治療的にターゲティングすることに長期間にわたる試みが行われてきたが(Walterら、Blood. 119(26):6198~6208頁、2012年;Grossbardら、Blood. 80(4):863~878頁、1992年;及びLaszloら、Blood Rev. 28(4):143~153頁、2014年)、同様に、他の悪性腫瘍におけるCD33⁺腫瘍細胞、CD33⁺骨髄由来サプレッサー細胞及び正常なCD33⁺ミクログリア細胞においても行われてきた(Walter, Expert Opin Biol Ther. 20(9):955~958頁、2020年)。AMLでは、抗体-薬物コンジュゲートであるGOにより処置された一部の患者の生存期間が延長したことから、薬物標的としてCD33が有効であることが確証されている(Godwinら、Leukemia. 31(9):1855~1868頁、2017年)。

30

【0353】

GOの成功及び限界により、より効果的なCD33指向治療法を開発するための進行中の研究が促進された。しかしながら、CD33をターゲティングすることは、困難であることが証明され、いくつかの薬物は、有効性の欠如のために臨床的に失敗した。したがって、T細胞誘導二重特異性抗体(BsAb)を含む、より強力な抗CD33治療法を開発することに試みが集中されている。これらの試みの1つの重要な制限として、GOを含む既存及び研究中的治療法は、CD33のエクソン2にコードされた膜遠位Vセットドメイン内の免疫優性エピトープをほぼ独占的に認識する(図1)(Walter, Expert Opin Investig Drugs. 27(4):339~348頁、2018年)。抗体の膜近位結合は、それらのエフェクター機能を増大させることができるので(Blumelら、Cancer Immunol Immunother. 59(8):1197~1209頁、2010年;Lin, Pharmgenomics Pers Med. 3:51~59頁、2010年;Hasoら、Blood. 121(7):

40

50

1165～1174頁、2013年；Clearyら、J Immunol. 198 (10) : 3999～4011頁、2017年)、膜近位C2セツドメインに対する抗体によりCD33をターゲティングすることは、免疫エフェクター細胞を誘導するCD33指向治療を最適化するはずである。ここで、この概念が実験的に試験され、一連のC2セツドメイン指向CD33抗体及びそれに由来する治療法の創出が記載されている。

【0354】

結果。細胞膜からの結合距離は、CD33抗体の免疫エフェクター機能と相関する。標的エピトープと細胞膜との間の距離がT細胞誘導免疫療法の有効性に影響を与えるかどうかを調べるために、ヒトCD33のVセツドメインが細胞膜から異なる距離に保持された一連の人工タンパク質を生成して、CD33^{Vセツト}/CD3^{BSAb}などのVセツトドメイン指向CD33抗体ベースの治療によるターゲティングを可能にした(図2)。具体的には、CD33標的エピトープを細胞膜に近づけるために、エクソン3及び4を除去することによってC2セツドメイン全体を欠いた人工CD33タンパク質(CD33^{ΔE3-4})を生成した。CRISPR/Cas9(Humbertら、Leukemia. 33(3) : 762～808頁、2019年)により内因性CD33が削除された、操作されたヒトCD33⁺AML細胞株を使用して、CD33^{FL}又はCD33^{ΔE3-4}のいずれかを発現させた。最初の一連の実験では、比較的類似したレベルの標的分子を発現する垂系統を、種々の用量のCD33^{Vセツト}/CD3^{BSAb}及び免疫エフェクター細胞としての健康なドナーT細胞を用いた短期間のインビトロ細胞傷害性アッセイに供した。比較物として、GOを使用し、これは、抗腫瘍効果のためにカリケアマイシン-γパイロードによって誘導された毒性効果に完全に依存する(Walterら、Blood. 119(26) : 6198～6208頁、2012年；Laszloら、Blood Rev. 28(4) : 143～153頁、2014年；及びGodwinら、Leukemia. 31(9) : 1855～1868頁、2017年)。図3A～3Cに示されているように、CD33^{Vセツト}/CD3^{BSAb}は、CD33^{FL}を発現する細胞よりもCD33^{ΔE3-4}を発現するAML及びALL細胞に対して大きな細胞傷害性を発揮したが、GOによって誘導された細胞傷害効果は同様であった。CD33^{Vセツト}/CD3^{BSAb}により処理した場合、これらの同じCD33構築物を発現するREH及びRS4；11細胞(ヒトCD33⁺B急性リンパ芽球性白血病[B-ALL]細胞株)において同様の効果が見られた(RS4；11についてのデータを図4に示した。)。T細胞を誘導するCD33指向治療の有効性に対する標的エピトープ膜距離の重要性をさらに実証するために、ヒトCD22の種々の部分を使用してキメラタンパク質を生成し、CD33標的エピトープと細胞膜との間の距離を延長した(図2)。図5に要約されているように、CD33^{Vセツト}/CD3^{BSAb}の細胞傷害効果は、CD33^{FL}を発現する対となった細胞よりもCD22/CD33^{FL}キメラタンパク質を発現するAML細胞に対して低かった。まとめると、これらのデータは、CD33抗体結合エピトープの位置を変化させると、CD33抗体由来治療のエフェクター機能が変化することを実証し、C2セツドメイン特異的治療法を介したCD33の膜近位ターゲティングが、CD33ターゲティングされたT細胞免疫療法の有効性を改善できることを示唆している。

【0355】

完全ヒト可変ドメイン配列を有する第2世代CD33^{PAN}抗体及び派生治療。ヒトCD33のC2セツドメインを認識するよく特徴付けられた抗体は現在存在しないので、ヒトCD33^{FL}の全ECD又はヒトCD33^{ΔE2}の全ECDに連結されているマウスIgG1 Fcドメインを含む免疫原を注射されたBALB/c、CD1、及びF1マウスにおいてこの特異性を有する抗体が産生された。一連のマウス抗ヒト抗体CD33^{PAN}抗体に関するデータが最近報告された(Godwinら、Leukemia. 2021年、DOI : 10.1038/s41375-021-01160-1)。マウスアミノ酸配列の免疫原性は潜在的な臨床的問題であるため、同じCD33免疫原をヒト化マウスにおいて使用して完全ヒト可変ドメイン配列を有する抗体を産生する第2の免疫化キャンペーンが実行された。図6A及び6Bに示されているように、CD33^{FL}のみを認識す

るハイブリドーマが、 $CD33^{\Delta E2}$ と $CD33^{FL}$ の両方に結合する（すなわち、 $CD33^{PAN}$ 抗体特異性）いくつかのハイブリドーマと一緒に同定された。 $CD33$ がCRISPR/Cas9媒介遺伝子編集により取り除かれた $CD33+ML-1$ 細胞及び $ML-1$ 亜系統を用いた実験により、ヒト $CD33$ へのこれらの抗体の結合特異性が確かめられた。Carterraによる生物物理学的特徴付け研究のまとめは、図7A、7Bに描かれている。さらなる特徴付けでは、1E6に抗体内在化実験を受けさせた。図8に示されるように、1E6は実際に、GOにおいて使用された親マウス $CD33^V$ セット抗体であるP67.6に類似する動態でヒトAML細胞に内在化された。Trianniマウス由来のハイブリドーマはキメラ抗体（ヒト可変結合配列、マウス定常領域）を分泌するので、種転換方法論を使用して、組換え完全ヒト $CD33^{PAN}$ 抗体を産生した。図9は一例を示している（ヒトIgG1フレームワークを有する1E6抗体）。

10

【0356】

ヒト $CD33^{PAN}$ 抗体の治療的価値に関する原理証明研究では、1E6/ $CD33$ BsAbをscFv-scFvフォーマットで構築した。マウス $CD33^{PAN}$ / $CD33$ BsAbについて見出されたこと、Godwinら、Leukemia、2021年、DOI:10.1038/s41375-021-01160-1に類似して、1E6/ $CD33$ BsAbは $CD33$ +ヒト急性白血病細胞に対して高度に強力であった（図10）が、 $CD33$ ノックアウト細胞に対する活性を欠いていた（図11）。1E6/ $CD33$ BsAbは、 $CD33^{FL}$ と $CD33^{\Delta E2}$ の両方を過剰発現しているREH細胞も強力に殺傷し、 $CD33^V$ セット/ $CD33$ BsAbは $CD33^{FL}$ 発現細胞に対してのみ活性を有していた（図12）。最後に、1E6/ $CD33$ BsAbは、インビトロで様々な原発AML患者検体に対しても頑強な活性を有していることが決定された（図13）。

20

【0357】

(xiii) 最終パラグラフ。本明細書に提供されている核酸及びアミノ酸配列は、37 C.F.R. §1.822において規定され、WIPO Standard ST. 25（1998年）、付録2、表1及び3の表に示されているヌクレオチド塩基及びアミノ酸残基についての略号を使用して示されている。各核酸配列の1つの鎖だけが示されているが、適切である実施形態では相補鎖も含まれるものとして理解される。

【0358】

本明細書で明示的に提供されていない範囲で、本明細書で開示されているタンパク質についてのコード配列及び本明細書で開示されているコード配列についてのタンパク質配列は、当業者によって容易に導出され得る。

30

【0359】

所与のCDR又はFRの正確なアミノ酸配列境界は、いくつかの周知スキームのいずれかを使用して容易に決定され得、そのようなスキームには、Kabataら（1991年）「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD.（Kabata番号付けスキーム）；Al-Lazikaniら（1997年）J Mol Biol 273:927~948頁（Chothia番号付けスキーム）；Maccallumら（1996年）J Mol Biol 262:732~745頁（Contact番号付けスキーム）；Martinら（1989年）Proc. Natl. Acad. Sci.、86:9268~9272頁（AbM番号付けスキーム）；Lefranc M Pら（2003年）Dev Comp Immunol 27(1):55~77頁（IMGT番号付けスキーム）；並びにHonegger及びPluckthun（2001年）J Mol Biol 309(3):657~670頁（「Aho」番号付けスキーム）に記載されているものが含まれる。所与のCDR又はFRの境界は、同定に使用されるスキームによって変わり得る。例えば、Kabataスキームは、構造アラインメントに基づき、その一方でChothiaスキームは、構造情報に基づく。Kabataスキーム及びChothiaスキームの両方についての番号付けは、最も一般的な抗体領域

40

50

配列長に基づくものであり、挿入には挿入文字、例えば「30a」によって対応し、一部の抗体には欠失が出現する。2つのスキームは、ある特定の挿入及び欠失（「インデル」）を異なる位置に配置するため、結果として異なる番号付けになる。Contactスキームは、複雑な結晶構造の分析に基づくものであり、多くの点でChothia番号付けスキームと類似している。特定の実施形態では、本明細書に開示されている抗体CDR配列は、Kabab番号付けに従う。

【0360】

本明細書で開示及び参照されている配列のバリエーションも含まれる。生物活性を失わずにどのアミノ酸残基を置換、挿入、又は削除できるかを決定する指針は、DNASTAR（商標）（Madison, Wisconsin）ソフトウェアなどの当該技術分野において周知のコンピュータプログラムを使用して見出すことができる。好ましくは、本明細書に開示されているタンパク質バリエーションにおけるアミノ酸変化は、保存的アミノ酸変化、すなわち、同様に帯電した又は帯電していないアミノ酸の置換である。保存的アミノ酸変化には、それらの側鎖において関連するアミノ酸ファミリーの1つの置換が含まれる。

【0361】

抗体のバリエーションには、タンパク質の結合に悪影響を及ぼさない1つ以上の保存的アミノ酸置換又は1つ以上の非保存的置換を有するものが含まれ得る。

【0362】

特定の実施形態では、V_L領域は、開示されたV_Lに由来し得る又はそれに基づき得、開示されたV_Lと比較した場合に、1つ以上の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個の）挿入、1つ以上の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個の）欠失、1つ以上の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個の）アミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換）又は上記において言及された変化の組合せを含み得る。挿入、欠失又は置換は、各CDRが、変化を含まない、又は1つ、2つ若しくは3つ以下の変化を含み、修飾されたV_L領域を含む抗体が、その標的エピトープに、野生型結合ドメインと同様の親和性により、なおも特異的に結合し得ることを条件として、この領域のアミノ末端若しくはカルボキシ末端又は両方の末端を含む、V_L領域内の任意の場所に存在し得る。

【0363】

特定の実施形態では、V_H領域は、開示されたV_Hに由来し得る又はそれに基づき得、本明細書に開示されたV_Hと比較した場合に、1つ以上の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個の）挿入、1つ以上の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個の）欠失、1つ以上の（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10個の）アミノ酸置換（例えば、保存的アミノ酸置換又は非保存的アミノ酸置換）又は上記において言及された変化の組合せを含み得る。挿入、欠失又は置換は、各CDRが、変化を含まない、又は1つ、2つ若しくは3つ以下の変化を含み、修飾されたV_H領域を含む抗体が、その標的エピトープに、野生型結合ドメインと同様の親和性により、なおも特異的に結合し得ることを条件として、この領域のアミノ末端若しくはカルボキシ末端又は両方の末端を含む、V_H領域内の任意の場所に存在し得る。

【0364】

特定の実施形態では、保存的アミノ酸置換は、参照配列の構造特徴を、実質的に変化させない場合がある（例えば、置換アミノ酸は、参照配列内において生じる螺旋を切断する、又は参照配列を特徴付ける他の種類の二次構造を破壊する傾向がないものとする。）。当該技術分野において認識されている、ポリペプチドの二次構造及び三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984年)) ; Introduction to Protein Structure (C. Branden & J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991年)) ; 並

10

20

30

40

50

びに Thorntonら、Nature、354:105 (1991年)に記載されている。

【0365】

ペプチド又はタンパク質において、アミノ酸の適切な保存的置換は当業者に公知であり、一般に、得られる分子の生物学的活性を変化させずに行うことができる。当業者は、一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸置換が、生物学的活性を実質的に変化させないことを認識する（例えば、Watsonら、Molecular Biology of the Gene、第4版、1987年、The Benjamin/Cummings Pub. Co.、224頁を参照のこと。）。天然に存在するアミノ酸は、一般に、以下のような保存的置換ファミリーに分類される：群1：アラニン（Ala）、グリシン（Gly）、セリン（Ser）及びトレオニン（Thr）；群2：（酸性）：アスパラギン酸（Asp）及びグルタミン酸（Glu）；群3：（酸性；極性負電荷残基及びそれらのアミドとしても分類される）：アスパラギン（Asn）、グルタミン（Gln）、Asp及びGlu；群4：Gln及びAsn；群5：（塩基性；極性正電荷残基としても分類される）：アルギニン（Arg）、リジン（Lys）及びヒスチジン（His）；群6（大きな脂肪族、非極性残基）：イソロイシン（Ile）、ロイシン（Leu）、メチオニン（Met）、バリン（Val）及びシステイン（Cys）；群7（非電荷極性）：チロシン（Tyr）、Gly、Asn、Gln、Cys、Ser及びThr；群8（大きな芳香族残基）：フェニルアラニン（Phe）、トリプトファン（Trp）及びTyr；群9（非極性）：プロリン（Pro）、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Met及びTrp；群11（脂肪族）：Gly、Ala、Val、Leu及びIle；群10（小さな脂肪族、非極性又はわずかに極性の残基）：Ala、Ser、Thr、Pro及びGly；並びに群12（硫黄含有）：Met及びCys。さらなる情報は、Creighton (1984年) Proteins、W. H. Freeman and Companyに見出され得る。

【0366】

このような変更を行う場合、アミノ酸のハイドロパシー指数が考慮され得る。相互作用的な生物学的機能をタンパク質に付与する上でのハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該技術分野において一般に理解されている（Kyte及びDoolittle、1982年、J. Mol. Biol. 157 (1)、105～32頁）。各アミノ酸には、その疎水性特徴及び電荷特徴に基づいてハイドロパシー指数が割り当てられている（Kyte及びDoolittle、1982年）。これらの値は下記のものである：Ile (+4.5)、Val (+4.2)、Leu (+3.8)、Phe (+2.8)、Cys (+2.5)、Met (+1.9)、Ala (+1.8)、Gly (-0.4)、Thr (-0.7)、Ser (-0.8)、Trp (-0.9)、Tyr (-1.3)、Pro (-1.6)、His (-3.2)、グルタミン酸 (-3.5)、Gln (-3.5)、アスパラギン酸 (-3.5)、Asn (-3.5)、Lys (-3.9) 及び Arg (-4.5)。

【0367】

当該技術分野では、ある特定のアミノ酸を同様のハイドロパシー指数又はスコアを有する他のアミノ酸によって置換し、同様の生物学的活性を有するタンパク質を依然として得ることができること、すなわち、生物学的機能的に同等のタンパク質を依然として得ることができることが知られている。そのような変更を行う場合、ハイドロパシー指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、±0.5以内であるアミノ酸の置換がさらに特に好ましい。当該技術分野において、同様のアミノ酸の置換は、親水性に基づいても効率的に行われ得ることも理解される。

【0368】

米国特許第4,554,101号に詳述されているように、アミノ酸残基には下記の親水性値が割り当てられている：Arg (+3.0)、Lys (+3.0)、アスパラギン酸 (+3.0±1)、グルタミン酸 (+3.0±1)、Ser (+0.3)、Asn (+

0.2)、Gln(+0.2)、Gly(0)、Thr(-0.4)、Pro(-0.5±1)、Ala(-0.5)、His(-0.5)、Cys(-1.0)、Met(-1.3)、Val(-1.5)、Leu(-1.8)、Ile(-1.8)、Tyr(-2.3)、Phe(-2.5)、Trp(-3.4)。アミノ酸を同様の親水性値を有する別のアミノ酸に置換し、生物学的に同等のタンパク質、具体的には免疫学的に同等のタンパク質を依然として得ることができることは理解される。そのような変更では、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、親水性値が±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、親水性値が±0.5以内であるアミノ酸の置換がさらに特に好ましい。

【0369】

上に概要が示されているように、アミノ酸置換は、アミノ酸側鎖置換基の関連類似性、例えば、その疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づくものであり得る。

10

【0370】

他の箇所に示されているように、遺伝子配列のバリエーションには、コドン最適化バリエーション、配列多型、スプライスバリエーション及び／又は統計的に有意な程度にコードタンパク質の機能に影響を与えない変異が含まれ得る。

【0371】

本明細書に開示されているタンパク質、核酸及び遺伝子配列のバリエーションには、本明細書に開示されているタンパク質、核酸又は遺伝子配列に対して、少なくとも70%の配列同一性、80%の配列同一性、85%の配列同一性、90%の配列同一性、95%の配列同一性、96%の配列同一性、97%の配列同一性、98%の配列同一性又は99%の配列同一性を有する配列も含まれる。

20

【0372】

特定の実施形態では、バリエーションは、本明細書に開示されている抗体配列に対して、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%、少なくとも99.5%の配列同一性を有する配列を含む又はそれらの配列である。特定の実施形態では、バリエーションは、軽鎖可変領域(V_L)及び／若しくは重鎖可変領域(V_H)又は両方に対して、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%、少なくとも99.5%の配列同一性を有する配列を含む又はそれらの配列であり、各CDRは、VセットIg様ドメインの存在若しくは非存在に関係なくC2セットIg様CD33エピトープに特異的に結合する又は本明細書に記載されている抗体のエピトープ特異性に従ってVセットIg様ドメインに結合する、本明細書に開示されている参照抗体又はその断片若しくは誘導体から、変化を含まない、又は1つ、2つ若しくは3つ以下の変化を含む。

30

【0373】

「配列同一性%」とは、2つ以上の配列を比較することによって決定されるそれらの配列の間の関連性を指す。当該技術分野では、「同一性」は、タンパク質配列の鎖間の一致、核酸配列の鎖間の一致又は遺伝子配列の鎖間の一致によって決定されるそのような配列の間の配列関連度も意味する。「同一性」（「類似性」と称されることが多い）は、公知の方法によって容易に計算され得、こうした方法には、（限定されないが）Computational Molecular Biology (Lesk, A. M., ed.) Oxford University Press, NY (1988年); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D. W., ed.) Academic Press, NY (1994年); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A. M. 及び Griffin, H. G., eds.) Humana Press, NJ (1994年); Sequence Analysis in Molecular Biology (Von Heijne, G., ed.) Academic Press (1987年); 並びに Sequence Analysis Prim

40

50

er (Gribskov, M. 及び Devereux, J., eds.) Oxford University Press, NY (1992年)に記載されているものが含まれる。同一性を決定するための好ましい方法は、被検配列間の一致が最良となるように設計される。同一性及び類似性を決定するための方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムにおいて体系化されている。配列アライメント及び同一性パーセント計算は、LASERGENE バイオインフォマティクスコンピューティングスイート (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin) の Megalign プログラムを使用して実施され得る。デフォルトパラメーター (ギャップペナルティ=10、ギャップ長ペナルティ=10) を用いて Clustal アライメント法 (Higgins 及び Sharp CABIOS, 5, 151~153 頁 (1989年)) を使用して多重配列アライメントも実施され得る。関連プログラムには、GCG プログラムスイート (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin); BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul, J. Mol. Biol. 215: 403~410 頁 (1990年)); DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wisconsin); 及び Smith-Waterman アルゴリズムが組み込まれた FASTA プログラム (Pearson, Comput. Methods Genome Res., [Proc. Int. Symp.] (1994年), Meeting Date 1992年, 111~20 頁, 編集者: Suhai, Sandor, 出版社: Plenum, New York, N. Y.) も含まれる。本開示の文脈内では、解析に配列解析ソフトウェアが使用される場合、解析の結果は言及プログラムの「デフォルト値」に基づくものであることが理解される。本明細書で使用される場合、「デフォルト値」は、任意の一連の値又はパラメーターを意味し、こうした一連の値又はパラメーターは、最初の初期化時にソフトウェアに最初に設定されるものである。

10

20

30

40

【0374】

バリエーションには、本明細書に開示された配列にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下でハイブリダイズし、参照配列と同じ機能を与える核酸分子も含まれる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例には、50%のホルムアミド、5×SSC (750mMのNaCl、75mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム (pH 7.6)、5×デンハート溶液、10%の硫酸デキストラン及び20 µg/mlの変性断片化サケ精子DNAを含む42℃の溶液中で一晩のインキュベーションを行い、その後50℃の0.1×SSC中でフィルターを洗浄するものが含まれる。ハイブリダイゼーション及びシグナル検出のストリンジェンシーの変更は、ホルムアミド濃度 (ホルムアミドのパーセントを下げるとストリンジェンシーが低下する。)、塩条件又は温度を操作することによって主に達成される。例えば、中程度に高いストリンジェンシー条件には、6×SSPE (20×SSPE=3MのNaCl、0.2MのNaH₂PO₄、0.02MのEDTA、pH 7.4)、0.5%のSDS、30%のホルムアミド、100 µg/mlのサケ精子ブロッキングDNAを含む37℃の溶液中で一晩のインキュベーションを行い、その後1×SSPE、0.1%のSDSを用いて50℃での洗浄を行うものが含まれる。さらに、ストリンジェンシーをさらに下げるには、ストリンジェントなハイブリダイゼーションの後に実施される洗浄が、塩濃度を高めて (例えば、5×SSC) 行われ得る。上記の条件の変形形態は、ハイブリダイゼーション実験でのバックグラウンドの抑制に使用される代替のブロッキング試薬を含め、及び/又はそれで置き換えることによって達成され得る。典型的なブロッキング試薬には、デンハート試薬、BLOTTO、ヘパリン、変性サケ精子DNA及び商業的に利用可能な専売製剤が含まれる。特定のブロッキング試薬を含めるには、適合性に関する問題に起因して上記のハイブリダイゼーション条件を改変する必要がある。

【0375】

「特異的に結合する」とは、結合ドメイン (例えば、二重特異性抗体結合ドメイン又はナノ粒子選択細胞をターゲティングするリガンドのもの) とその対応結合分子とが、関連

50

環境試料中のいずれの他の分子又は成分とも顕著に会合することなく 10^5 M^{-1} 以上の親和性又は K_a (すなわち、 $1/\text{M}$ の単位を有する特定の結合相互作用の平衡結合定数) で会合することを指す。結合ドメインは、「高親和性」又は「低親和性」として分類され得る。特定の実施形態では、「高親和性」結合ドメインとは、 K_a が少なくとも 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} 又は少なくとも 10^{13} M^{-1} である結合ドメインを指す。特定の実施形態では、「低親和性」結合ドメインとは、 K_a が最大 10^7 M^{-1} 、最大 10^6 M^{-1} 、最大 10^5 M^{-1} である結合ドメインを指す。或いは、親和性は、 M の単位を有する特定の結合相互作用の平衡解離定数 (K_d) (例えば、 $10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$) として定義され得る。ある特定の実施形態では、結合ドメインは、「親和性の増強」が行われたものであり得、これは、野生型 (又は親) 結合ドメインより対応結合分子への結合が強まるように結合ドメインが選択又は操作されることを指す。例えば、親和性の増強は、参照結合ドメインより対応結合分子に対する K_a (平衡会合定数) が大きいことに起因し得る、又は参照結合ドメインのものより対応結合分子に対する K_d (解離定数) が小さいことに起因し得る、又は参照結合ドメインのものより対応結合分子に対する off 速度 (K_{off}) が低いことに起因し得る。特定の対応結合分子に特異的に結合する結合ドメインを検出するため、並びに結合親和性を決定するための様々なアッセイ、例えば、ウエスタンブロット、ELISA 及び BIACORE (登録商標) 分析が知られている (例えば、Scatchard ら、1949 年、Ann. N. Y. Acad. Sci. 51: 660 頁; 及び米国特許第 5, 283, 173 号、同第 5, 468, 614 号又は同等の文献も参照のこと。)

10

20

【0376】

別段の指定がない限り、本開示の実施は、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学及び組換え DNA の従来技術を用いることができる。これらの方法は、下記の刊行物に記載されている。例えば、Sambrook ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 2 版 (1989 年); F. M. Ausubel ら、eds., Current Protocols in Molecular Biology、(1987 年); the series Methods IN Enzymology (Academic Press, Inc.); M. MacPherson ら、PCR: A Practical Approach、IRL Press at Oxford University Press (1991 年); MacPherson ら、eds. PCR 2: Practical Approach、(1995 年); Harlow 及び Lane、eds. Antibodies、A Laboratory Manual、(1988 年); 並びに R. I. Freshney、ed. Animal Cell Culture (1987 年) を参照のこと。

30

【0377】

当業者によって理解されるように、本明細書に開示された各実施形態は、その特定の記載の要素、工程、成分又は構成要素を含む、それから本質的になる、又はそれからなり得る。したがって、「含む (include)」又は「含む (including)」という用語は、「含む (comprise)、からなる、又はから本質的になる」を記載するものと解釈すべきである。「含む (comprise)」又は「含む (comprise s)」という移行用語は、主要量である場合でさえも、不特定の要素、工程、成分又は構成要素を含むこと、しかしそれに限定されないこと、及びそれを含むことが可能であることを意味する。「からなる」という移行句は、特定されない要素、工程、成分又は構成要素はいずれも除外するものである。「から本質的になる」という移行句は、特定の要素、工程、成分又は構成要素、及び実施形態に実質的に影響を与えないものに実施形態の範囲を限定するものである。実質的な影響があれば、抗体と抗原との結合が統計的に有意に低減されることになる。

40

【0378】

別段の指定がない限り、本明細書及び特許請求の範囲において使用される成分量、特性

50

、例えば、分子量、反応条件などを表す全ての数は、全ての場合において「約」という用語によって修飾されていると理解されるものとする。したがって、矛盾する指定がない限り、本明細書及び添付の特許請求の範囲に示されている数値パラメーターは、本発明によって得ようとする所望の特性に応じて変動し得る近似値である。最低でも、特許請求の範囲への均等論の適用を制限することは意図しないが、少なくとも、報告される有効桁の数を踏まえ、通常の丸め手法を適用することによって、各数値パラメーターを解釈すべきである。さらに明瞭化することが求められる場合、「約」という用語は、記載の数値又は範囲と共に使用される場合、当業者によって合理的に理解される意味を有し、すなわち、記載の値又は範囲よりいくらか多い又はいくらか少ないことを示し、記載の値の±20%の範囲内、記載の値の±19%の範囲内、記載の値の±18%の範囲内、記載の値の±17%の範囲内、記載の値の±16%の範囲内、記載の値の±15%の範囲内、記載の値の±14%の範囲内、記載の値の±13%の範囲内、記載の値の±12%の範囲内、記載の値の±11%の範囲内、記載の値の±10%の範囲内、記載の値の±9%の範囲内、記載の値の±8%の範囲内、記載の値の±7%の範囲内、記載の値の±6%の範囲内、記載の値の±5%の範囲内、記載の値の±4%の範囲内、記載の値の±3%の範囲内、記載の値の±2%の範囲内又は記載の値の±1%の範囲内である。

10

【0379】

本発明の広い範囲を示す数値範囲及びパラメーターが近似であるかにかかわらず、具体例に示されている数値は可能な限り正確に報告されている。しかしながら、いずれの数値も、そのそれぞれの試験測定において見られる標準偏差に必然的に起因するある特定の誤差を本質的に含む。

20

【0380】

本発明について記載する文脈において（特に、以下の特許請求の範囲の文脈において）使用された、「1つの(a)」、「1つの(an)」、「その」という用語及び同様の指示対象は、本明細書に別段の指定がない限り、又は文脈上明確に矛盾しない限り、単数及び複数の両方を含むと解釈されるものとする。本明細書での値の範囲の記載は、単に、そうした範囲に入るそれぞれの個々の値に個別に言及することを簡潔化する方法とすることを意図するものにすぎない。本明細書に別段の指定がない限り、それぞれの個別値は、それが本明細書に個別に記載されている場合と同様に本明細書に組み込まれる。本明細書に別段の指定がない限り、又はその他の状況で文脈上明確に矛盾しない限り、本明細書に記載されている方法は全て、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書で提供されている例又は例示の言葉（例えば、「など」）のいずれか又は全ての使用は、単に、本発明の理解を容易にすることを意図するものにすぎず、そうした言葉を使用せずに請求される本発明の範囲を限定するものではない。本明細書のいずれの言葉も、本発明の実施に必要な不可欠ないずれかの非請求要素を示すものとして解釈してはならない。

30

【0381】

本明細書に開示されている本発明の代替の要素又は実施形態を群化することは、限定とは解釈されない。それぞれの群メンバーは、個別に言及及び請求され得る、又は他の群のメンバー若しくは本明細書に見出される他の要素との任意の組み合わせで言及及び請求され得る。利便性及び／又は特許性の理由から、群のメンバーの1つ以上が、群に含められ得る、又は群から除外され得るものと予測される。いずれかのそのような包含又は除外が生じた場合、本明細書は、改変された群を含むものと見なされ、したがって、添付の特許請求の範囲において使用される全てのマーカー群の記述を満たす。

40

【0382】

本発明の実施に最良の様式であると本発明者らが認識するものを含めて、本明細書には本発明のある特定の実施形態が記載されている。当然のことながら、前述の説明を読めば、こうした記載の実施形態に対する変形形態が当業者に明らかになる。本発明者らは、そのような変形形態を当業者が必要に応じて利用することを予想し、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されているものとは異なる様式で本発明を実施することを意図する。したがって、本発明は、本明細書に添付される特許請求の範囲に記載の主題の改変形態及び

50

均等物を全て、適用法によって許容されるものとして含む。さらに、本明細書に別段の指定がない限り、又はその他の状況で文脈上明確に矛盾しない限り、上記の要素の任意の組合せがその可能な全ての変形形態において本発明に含まれる。

【0383】

さらに、本明細書を通じて特許、印刷刊行物、学術論文及び他の文書（本明細書での参照物）への参照が多数なされている。そうした参照物はそれぞれ、それらの全体がそれらの参照教示内容を対象として参照によって本明細書に個別に組み込まれる。

【0384】

最後に、本明細書に開示されている本発明の実施形態は本発明の原理を例示するものであることが理解される。利用され得る他の改変形態も本発明の範囲に含まれる。したがって、例として、限定されないが、本明細書の教示内容に従って本発明の代替構成が利用され得る。したがって、本発明は、明確に提示及び記載されているものに限定されない。

【0385】

本明細書に示されている詳細は例としてのものであり、本発明の好ましい実施形態の例示的な議論を目的とするものにすぎず、本発明の様々な実施形態の原理及び概念的側面の説明として最も有用かつ理解が容易であると考えられるものを提供するために提示される。この点に関して、本発明の基礎的理解に必要なものよりも詳細に本発明の構造詳細を示そうとしているわけではなく、説明を図面及び／又は例と併用することで、本発明のいくつかの形態が実施の際にどのように具体化し得るかを当業者に明らかにしようとするものである。

【0386】

本開示において使用される定義及び説明は、以下の例の中で明確かつ曖昧さを残さずに改変されない限り、又は意味を適用するといずれかの解釈が無意味若しくは本質的に無意味となる場合、任意の将来の解釈において優先される意図及び意向を有するものである。用語の解釈を当てはめると当該用語が無意味又は本質的に無意味になる場合、Webster's Dictionary、第3版又は当業者に知られている辞書、例えば、Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (Eds. Attwood 等、Oxford University Press、Oxford、2006年) から定義が取得されるものとする。

10

20

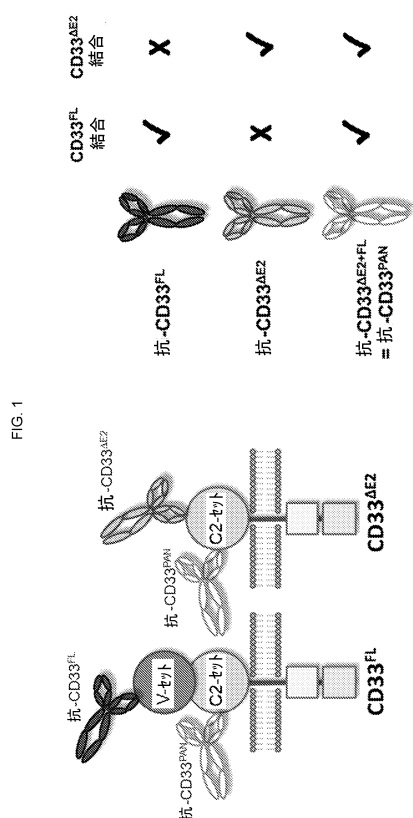
30

40

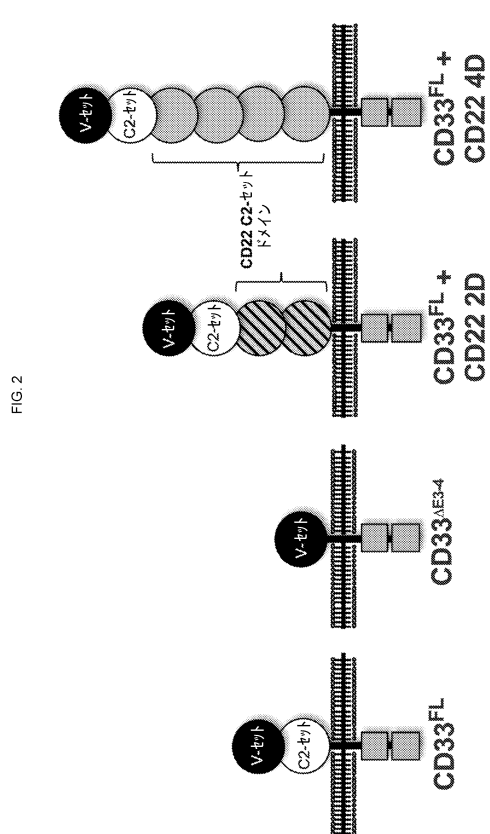
50

【凶面】

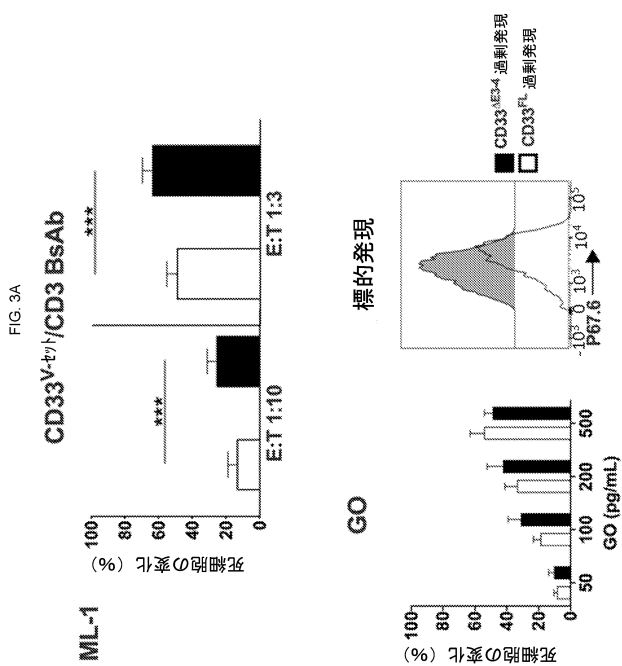
【図 1】



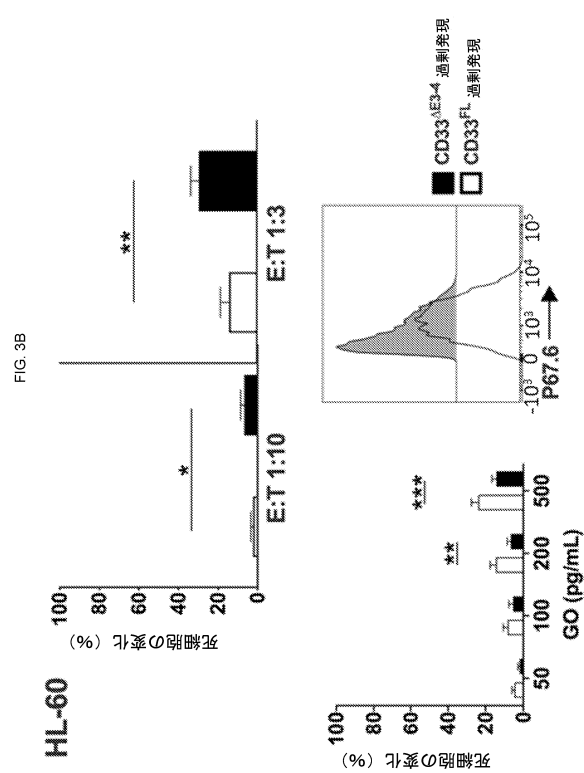
【図 2】



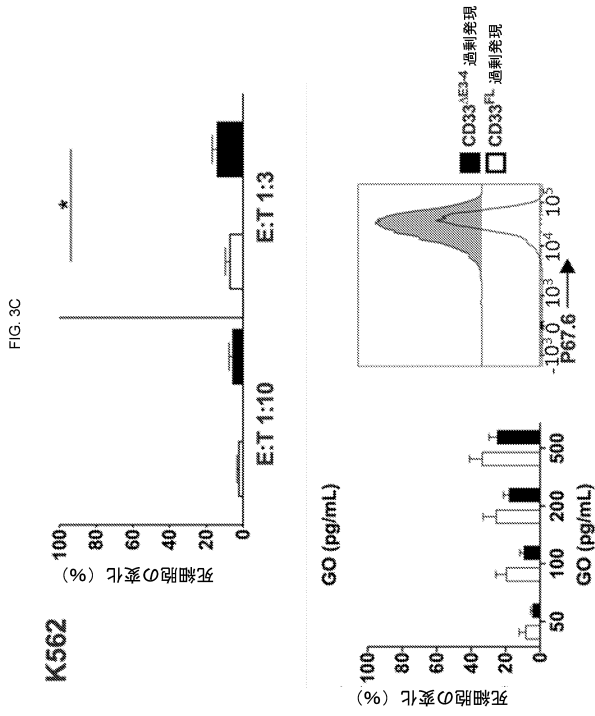
【図 3 A】



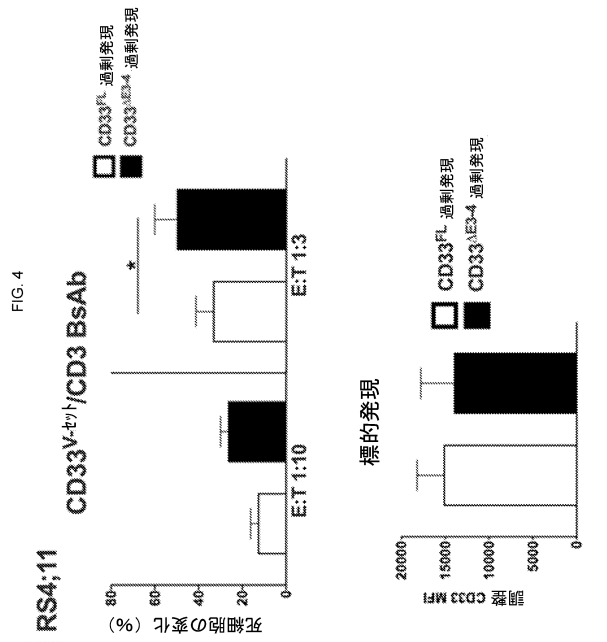
【図 3 B】



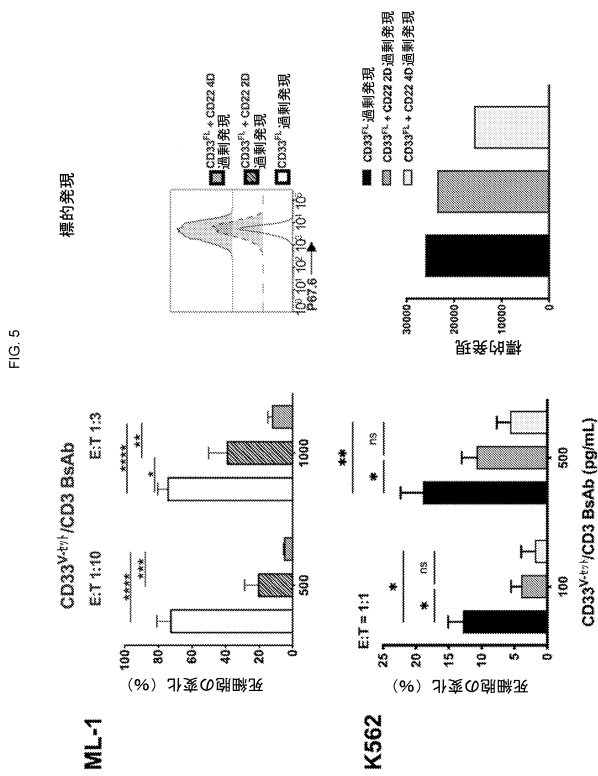
【図 3 C】



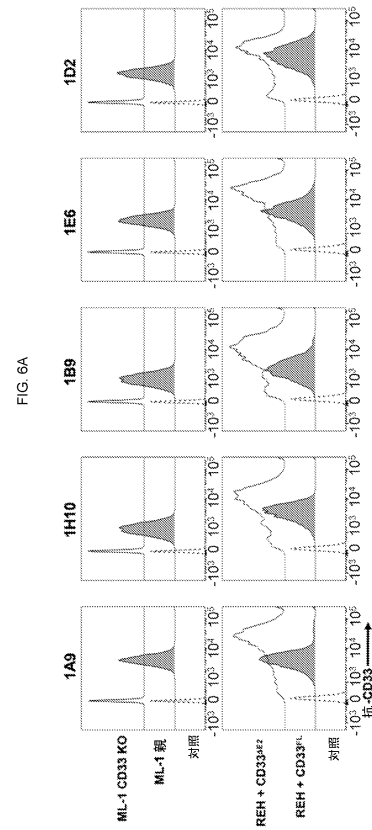
【図 4】



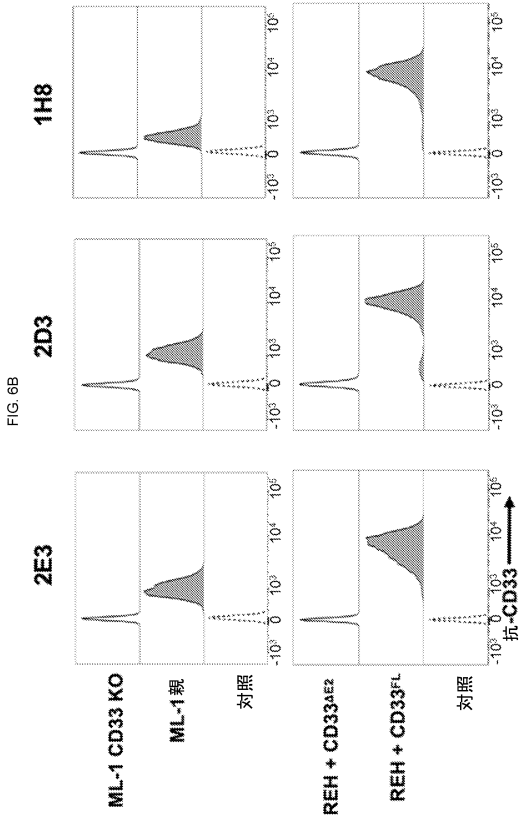
【図 5】



【図 6 A】



【図 6 B】

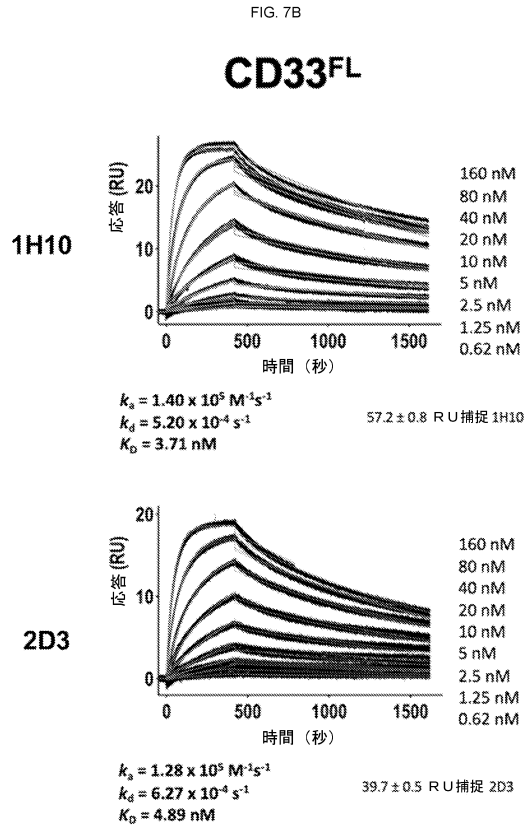


【図 7 A】

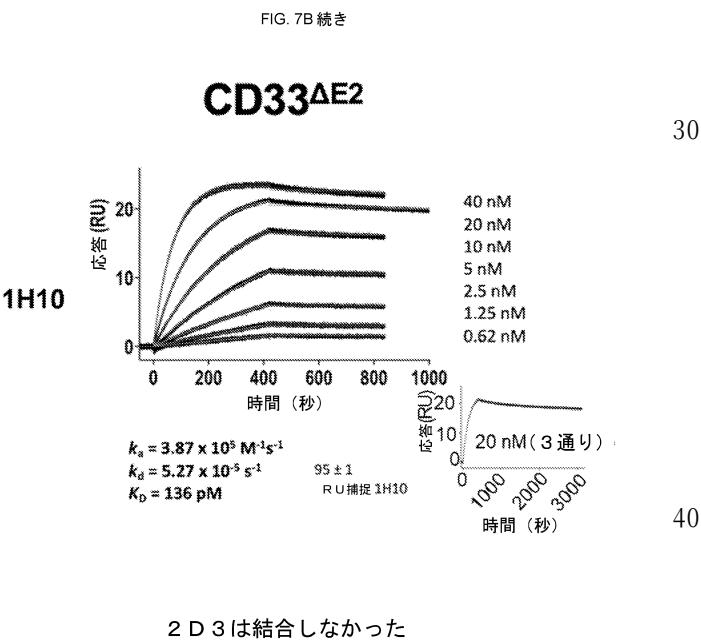
FIG. 7A

精製モノクローナル抗CD33抗体についてのCarterra結合データ (triannimマウス)									
クローン	CD33 ^{FL} KD (nM), 4 μg/mL	CD33 ^{ΔE2} KD (nM), 4 μg/mL	CD33 ^{ΔE2} KD (nM), 4 μg/mL	CD33 ^{FL} KD (nM), 1 μg/mL	CD33 ^{ΔE2} KD (nM), 1 μg/mL	CD33 ^{ΔE2} KD (nM), 1 μg/mL	CD33 ^{FL} KD (nM), 1 μg/mL	CD33 ^{FL} KD (nM), 1 μg/mL	mAb 型
1H10	42	13	13	112	0.154	31	31	31	Pan
2D3	27	18	---	N.D.	---	N.D.	N.D.	N.D.	V-тет
1H8	40	24	---	---	---	---	---	---	V-тет
1A9	130	36	23	67	1.3	19	19	19	Pan
1B9	---	---	---	77	---	44	44	44	Pan
1E6	78	67	49	69	25	37	37	37	Pan
1D2	---	---	---	116	---	115	115	115	Pan
2E3	2300	---	---	3000	---	---	---	---	V-тет

【図 7 B - 1】



【図 7 B - 2】



10

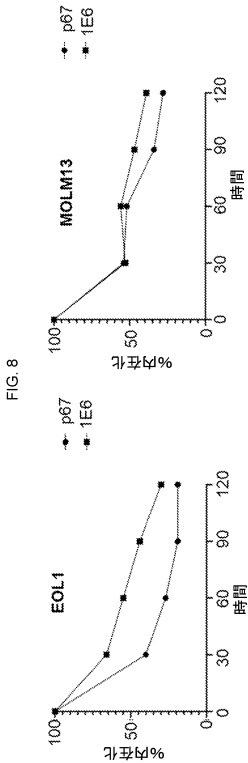
20

30

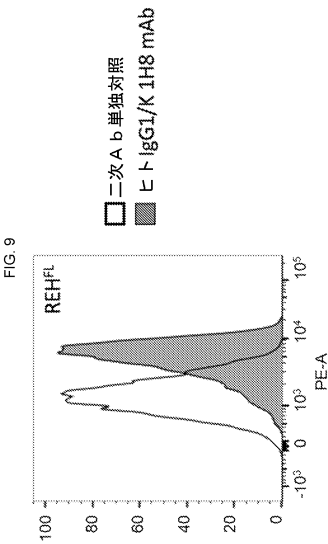
40

50

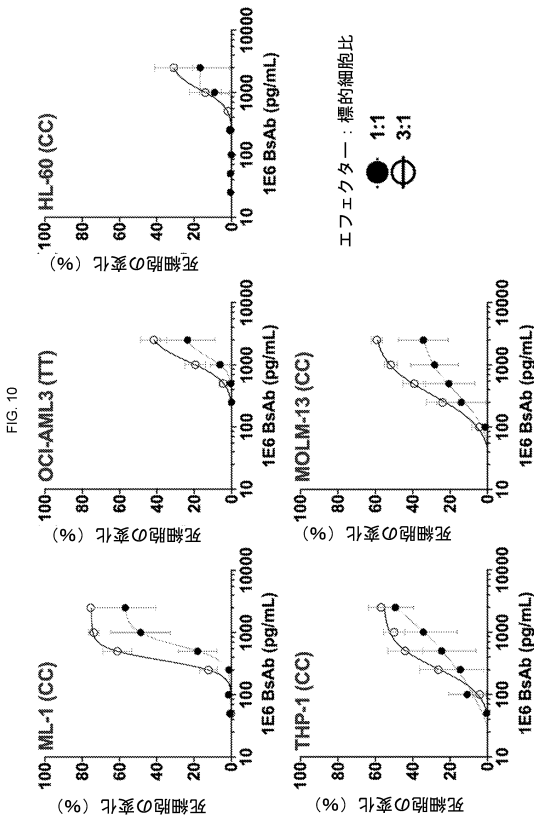
【図 8】



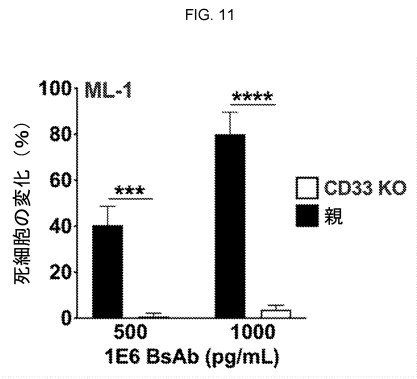
【図 9】



【図 10】



【図 11】



10

20

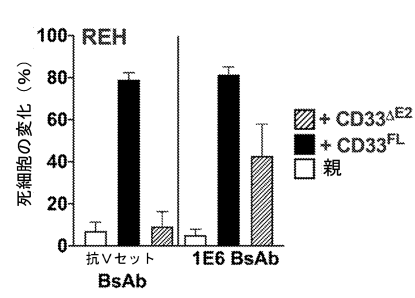
30

40

50

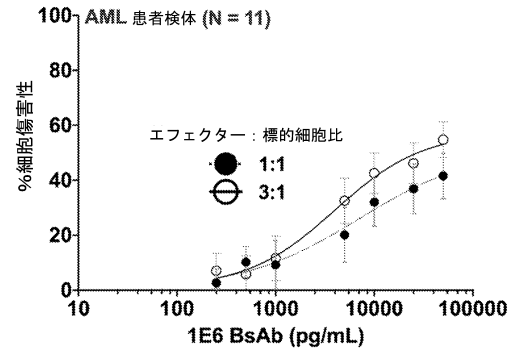
【圖 12】

FIG. 12



【圖 13】

FIG. 13



【図 14-1】

FIG. 14

マウスFcドメインを有するヒト完全長（FL）CD33、ヒトFL CD33に対する免疫原として使用される：

MLPILLLLVHVLWAGALAMPNFWLQVQESVTVQGGCLVLPCTFFHHPIYPYKDNSPVHYGWFRE
GAIIRSDDSPVATIKDQEEVQETOGRFLLLDGDSRNNLCLVDRDRRDSYQVFERMGRSTK
YSYSPQLSVPHVHDLTLHRKPIJLQVLEPHGSKNTLCSVWAGCEEQPPFISVLSAAPTSLGPR
THSSVLLSRDDHGTNLTKQVFGAGAVTERTQLNVLTYVQNPNTFPGFGDGSKQETR
AGGSGSGCKPCITPEVVSFVPIPPKPDVLTLLTPKTVCVVDISDQDPVQFVSVDVDEVH
TAQTQPREEQFQFVSSELPIIMHDDNLGKFEKCRVNSAFAPAEIKTISKTRGPKAPV
YTIPPPKGAMKDKVSLTKMTDFPFDITVSHQWQGAENYKNTQPIMNTNGSYFVYSKLN
VQKSNWEAGNTDTSVCHGLHNLHNHTKSLVSPGK (配記番号2)

マウスFcドメインを有するCD33のヒトΔE2バージョン（CD33ΔE2）、ヒトCD33ΔE2に対する免疫原として使用される：

MPLLLLLLP LLWADLTHRPKILIPGTLPEPGHSHKNTLCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTT
HSSVILTRPRQDQHNTLTCQVFCAGAVGTTERTILTKVTVYVPPNQPTTIFGGFGSGKGKQETRAG
GSGCKPCXICTPEVSSVYFPPKPDQDLTILTLTKPVTCVVDDIKSDPVEQFSWFVDVVEHTA
QTQPREEQFNSTRFSVSLPIMMHQDLNKGFEKQCRVNSAAFPKIEKTSKTRGRPKAPQVYTI
PPKQEAMAKDKVSLTCEMIFDPEDITVEWQKNGQPAENYKNTQPMINTNGSYFVYKSLNVQ
KS NWEAGNTFTTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (assembly code 3)

マウス由来のC2セットI_g様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットI_g様ドメインで置き換えられるマウスCD33の細胞外ドメイン、ヒトI_gG1由来のFc領域と組み合わせられ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される。

MLWPLFPLLCAGSLALOLEFQLVAPDVPTVEEGLCVHPVCSFYPSIKLTVGPVTSWGKRWGL
SLHSDPVSZSDPRLQVQKATGQRFLQPGQKDCSLFIRDAQKNTLMGYFVVRREPFRV
YSYKQSLSLWHLTHLHPKILIPGLHPSKGLCSVSWACEQGPPIIFSWASAPTSGLPR
THSSVILTPRPQDHGNTLTCQVFKAGAVTTERIQLNVLTVYQNPNTGIFFGDGSGKQETR
AGEPSKSDKHTTCCPAPPELLGPGSVFLPPKPKDLNLSIRTEPVCVNVDSHDEPEVKFV
VYVDGVEVNHAKTKPREEQYNTSVRVSVLTVLHQDLNLNGKEKCVKSNALPAIETKISA
KGFQPEQVQYTLPPSRDELTKGVSMLTVKGFVPSYDIAVWESNGSNOBNYKTKTLPVLDSDG
SFFYSYKLTVDKSRQQQGVNCSVMHEALNHYYTKQSLSSPGK (配製番号 4)

マウス由来のC2セットI_g様ドメインが、ヒトCD33由来のC2セットI_g様ドメインで置き換えられるマウスCD33の細胞外ドメイン（コドン最適化されている）、ヒトI_gG1由来のFc領域と組み合わせ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される。

[illegible]

【図 14-2】

FIG. 14 続き

AGGCATCTTCCAGAGGCGACGGCTCCGCGAAGCAGGAGACACGGCGCGAGTCCGAGCCCA
AGTCATGGCATAAGACCCACACCATGCCCAATGCCACCGCTGACGACTGCTGGGAGGAC
CAAGCGTGTTCTGTTTCTCTCCAAAGCGCAAGGACACCATGATGATCTCTCGGAGCCCCGA
GGTGACATCGCTGTGGTGGTGGAAGTACGCCACAGGACCCCGAGGTGAAGTTAACTGCT
ACGTGATGGTGGCTGGAGGTGTCACAACTGCCAAAGACCAAGCCAGGAGGAAGCATCAAC
TCCACTATCCGCTGGTGTCTGTGCTGACAGTCTGTCACACGGAGTGGCTGAACGGGAA
GAGTATAAGTGCAAGGTGTCAATAAGTGGCCCTGCCAGGCCCATCGAAGAAGCCATCTCT
AAGGCAAGAGGACAGCCGAGGAGGACCTCAGGTGTACACATGCCCCCTACCTCGGCGCAGC
GCTGACCAAGAACCGAGTGTCCCTGACATGTCCTGGTGAAGGCGTTCTATCCCTTGATATC
CGCGTGGATGGGAGACGAATGCCGACCCAGAGAACATTAACAGCAAGCAACCCCGT
CTGGACAGACCATGGCTCTCTTTCTGTATGAAGAGTGAACCGTGATAGTCCAGGTG
GCAGAGGCGCAACGTGTCCAGTCTCCGTGTACGACGAAAGCATGCACAAACCATACAC
TCAGAAATCATGCTGACTGTCCCGGACGAAGTAA (配列番号 5)

マウス由来のC2セットI_g様ドメインがヒトCD33由来のC2セットI_g様ドメインで置き換えられているマウスCD33の細胞外ドメイン、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される。

MLWLPPLFLLCAGSLAQDLEFLQVAPESVTVEEGLCVHVPCSVFYPSIKLTLGPVTVGSWLKRGV
SHEDSPVATSDPRQLVQKATQGRGFLGLDGPQKHDSCLFIRDAQKNDTGMFYVVRPEPVF
YKYKSLQSLHVDLTHRPKIPGTLPEGHSGDLTCSVSWACEGTPPIFSWLAAPTSLGPR
THSSVLTIPRPQDHTNLTCQVFKFAGVAGTERTIQLNVTVYPQNPPTGIFPGDGSKGQETR
AGVHVGAIGAGVDTALLLCLIFFIVG (配列番号 6)

マウス由来のC2セットI g様ドメインがヒトCD33由来のC2セットI g様ドメインで置き換えられているマウスCD33の細胞外ドメイン、両方ともヒトCD33由来の膜貫通ドメイン及び切断型細胞内ドメインと組み合わせ、CD33のヒトC2セットドメインに対する抗体を産生するための免疫原として使用される：

ATGCTGTGGCCTCTGCGCTCTGTTCCTGTGCGCTGGAAGTCTGCGTCAGGATCTGGAAAT
TTACGCTGGTGGCTCCCGAATCAGTACCGCTGGAGGAGGGCTCTGCGTCGACGTCGCTT
GTACGCTGTGTTCTACCCAGCATCAGCTGACCCCTGGGCCCTGTGACAGCGCTCTGGGTGA
GGAGGGGCGTGTCCCTGTCAGGAGGACTCTCCAGTGGCCACCGAGCTCATGAGGACGCTG
GTGCAAGAGGGCCACAGGGCAGATTCAGCTGCTGTGGGCAGCCCTCAGAAGACGACATTG
CAGCCTGTTTATCCGCGACGCCACGAAGAAGCATCCGGCATGTATTTCTTCGGGTGGT
GAGAGAGCACTTGTGCTGAGTACTCTCTATAAGAACTCTCAGCTGAGCTGCAGCTGACGGA
CCTGACACACCGCCAAAGATCTGATCGCCAGGACCCCTGGAGCGTGAGCATCTAAGAA
CTGTGACATGCTCGGTGTCTTGGGCATGTGAGCAGGGAAAGCCCACTATCTTTCTCGGTG
GTCTGCGCGCACCAACAGCTGTGGACACAGGACACACAGCTCCGTGTGATCATCAC
CCCTGAGACACAGGATCAGCGCACCAATCTGACATGCCAGGTGAAGTTCGCAAGACGAGG
AGTGACACCAAGAGGACCATCCAGCTGAAGCTGACATACGCTGCTCCAGAAATCAACCC
AGGCATCTTTCCAGAGGCAGCGCTCCGGACAGCAGAGACAGCGGCCGGAAGTGGTTTATG
GGCGCATTTGGAGGAGCTGTGTTCACGCCCTGCTCGCTCTTGTCTCGCCTCATCTTCT
CATAGTGAAGACTCGTA (配列番号 7)

完全長ヒトCD33、ヒトCD33についての免疫原：

MPLLLLLLPLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPPYYDKNSPVHGYWFRE

【図 1 4 - 3】

FIG. 14 続き

GAISRDSVPATNKLQDEVEQETQGRFRLLGDPSSRNNSCLSVIDARRRDNNGSYFFRMRGSGTK
YSYKSPOLSVHVVDLTHRPKILIPGLEPHGSKNLTCSSVWACEQGTPIPFISWLSAAPTSLGPR
THHSSVLIIPRPDQHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPITGIFPDGSGSKQETR
AGLVHGAIGGAGVATALLALCLLFIIVKTHRRKAARTAVGNSDHTPTTGSASPKHOKNSKLHG
PTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNHFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (配列番号 8)

完全長ヒトCD33:

ATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGGGGCCCTGGCTATGGATCCAAAT
TTCTGGCTGCAAGTGCAAGGAGTCACTGACGGTACAGGAGGGTTTGTGCGCTCCTCGTGCCC
TGCACTTTCTCCATCCCATACCTTACTACGACAAGAACTCCCCAGTTTCATGGTTACTGGTT
CCGGGAAAGGAGCCATTATATCCAGGGACTCTCCAGTGGGCCACAAACAGCTAGATCAAGA
AGTACAGGAGGAGACTCAGGGCAGATTCCGCCCTCCTTGGGGATCCCAAGTAGGAACAACTG
CTCCCTGAGCATCTAGACAGCCAGGAGGAGGGATAATGTTTCATCTTCTTCCGATGGA
GAGAGGAAGTACCAAAATACAGTTCACAACTCTCCCACTCTCTGTGCATGTGACAGACTTG
ACCCACAGGGCCCAAAATCCTCATCCTCGGCACTCTAGAACCCGGGCCACTCCAAAAACCTTA
CCTGCTCTGTGCTCTGGGCTGTGAGCAGGGAACACCCCGATCTTCTCCTGTTGTGACG
CTGGCCCCAGCTCCTCGGCGCCAGGACTCACTCACTCTCGGTGCTCATAAATCAACCCAC
GGCCCCGACACCTCCAGGCAACCTGACCTGTGACAGTGAAGTTGCTGGAGCTGGTG
ACTACGAGGAGAACCACTCAGCTCAACCTCACTATGTTCCACAGAACCCAAACACTGGTA
TCTTTCCAGGAGATGGCTCAGGGAACACAGAGACAGAGCAGGACTGGTTCTAGGGGCCA
TTGAGGAGAGCTGGTGTACAGCCCTGCTGCTCTTTGCTCTGCTCATCTTCTTCATAGT
GAAGACCCACAGGAGAAAGCAGCAGCAAGCACTGGCAGCAATGACAGCCCACTCA
CCACAGGCTCAGCTCCCCGAAACACCAAGAACTCCAAAGTTACATGGCCCCACTGAAA
CCTCAAGCTGTTCAGGTGCCCGCTCACTGCTGGAGATGGATGAGGAGCTGCATTATGCTT
CCCTCAACTTTTGGGATGAATCCTTCAAGGACACCTCCACCGAACTACTCAGAGGTGAG
GACCCAGTGA (配列番号 9)

CD33のヒトE2バージョン、ヒトE2についての免疫原:

MPLLLLLLPWADLTHRPKILIPGLEPHGSKNLTCSSVWACEQGTPIPFISWLSAAPTSLGPR
THHSSVLIIPRPDQHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPITGIFPDGSGSKQETR
AGLVHGAIGGAGVATALLALCLLFIIVKTHRRKAARTAVGNSDHTPTTGSASPKHOKNSKLHG
PTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNHFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (配列番号 10)

CD33のヒトE2バージョン:

ATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCTGCTGTGGGCAGACTTGACCCACAGGCCCAAAATC
CTCATCCTCGGCACTCTAGAACCCGGGCACTCCAAAAACCTTACCTGCTCTGTGCTCGGG
CTGTGAGCAGGGAACACCCCGCATCTTCTCGTGGTTGTCAGCTGCCCCACACCTCCCTGG
GCCCGAGGACTACTCACTCCTCGGTGCTCATAAATCACCCACAGGCCCCAGGACAGCCGCA
CCGAGTCACTGCTGAGGTGAAGTTGCTCGGAGCTGGTGACTGACAGGAGAGAACCTC
AGCTCAACGTCACCTATGTTCCACAGCAACCTCAACCACTGGTATCTTTCCAGGAGATGGCT
AGGGAACACAGAGACAGGAGCAAGTGGTCACTGGGCGCATTTGGAAGAGCTGGTGTTA
CAGCCCTGCTCGCTCTTTGCTCTGCTCATCTTCTTCATAGTGAAGACCCACAGGAGGAA
AGACGCCAGGACAGAGTGGGCGAGCAATGACACCCACCTTACACAGGGTCAAGCTCCCC
CGAAAGTACAGAAACCTCCAAAGTTACATGGCCCACTGAAACCTCAAGCTGTTCAGGTG
CGCCCCACTGTGGAGATGGATGAGGAGAGTGCATTATGCTTCCCTCAACTTTCATGGGAT
AATCCTTCCAAGGACACCTCCACCGAATCTCAGAGGTGAGGACCCAGTGA (配列番号 11)

【図 1 4 - 5】

FIG. 14 続き

TGGAAACTCGGTGAGCTTCCATGTGACTTCTCAAGCAGCCACCCCAAGAGTCCAGT
TCTTCTGGGAGAAAAATGCGAGGCTTCTGGGGAAGAAAGCCAGCTGAATTTTGACTCC
ATCTCCCCAGAGAATGCTCGGAGGTTCAGAGTCTGGGTGAACAACTCCATGACAGAGAC
AGCGCTCCAAAGGCTGGAGCTTGAAGTCTGCTATGCAACCCAGGAGGCTGCGTGTGTCCA
TGAGCCCAAGGGAACAAGTGTGAGGAGGAAGAAGTGAACCCCTGACCTGTGAGAGCGA
CGCCAAACCTCCCGCTTCCCATCTGCTGCTGGTTGACTGGAAATAACGAAGCCCTCCCTTA
CCACAGCCAGAAAGCTGAGATTGGAGCGGCTGAAGGTCCAGCAGCTCGGGTGCCTACTGG
TGCCAGGGGACCAACAGTGTGGGCAAGGGCCCTTCCGCTCTCAGCAGCTCAACCTGCTA
CTATAGCCCGGAGAGCCGGGCAATTGGAGGAGCTGGTGTTCACAGCCCTGCTCGCTCTTT
GTCTCTCGCCCTACTTCTTCAATAGTGAAGACCCACAGGAGGAAAGCAGCCAGGACAGCAG
TGGGCGAGGAATGACACCCACCTTCCACAGGGGTGACGCTCCCCGAAACACCAAGAAAGT
CCAAGTTACATGGGCCCACTGAAACCTCAAGCTGTTCAAGTGCCGCCCTCACTGTGGAGA
TGGATGAGGAGCTGCAATTATGCTTCCCTCAACTTTCATGGGATGAATCCTTCCAAGGACAC
CTCACCGAATACTCAGAGGTGAGGACCCAG (配列番号 135)

CD33: CD22 2Dタンパク質 (CD33シグナルペプチドは太字でイタリック体であり、6-ヒスチジンタグは下線が引かれており、3×グリシンリンカーはイタリック体で太字で下線が引かれており、CD33細胞外ドメインは通常フォントであり、CD22細胞外ドメインのうち1g様C2型5、1g様C2型6として定義されるCD22ドメインを含有する部分は太字であり、CD33膜貫通ドメインは二重下線が引かれ、CD33細胞内ドメインはイタリック体である。)

MPLLLLLLPWAGALAMHHHHHHGGGDPNFVLQVQESVTVQEGLCVLVPCFTFFHIPYDYK
NSPVHGYWFREGAISRDSVPATNKLQDEVEQETQGRFRLLGDPSSRNNSCLSVIDARRRDNNGS
YFFRMRGSGTKSYKSPQLSVHVVDLTHRPKILIPGLEPHGSKNLTCSSVWACEQGTPIPFISW
LSAAPTSLGPRTHHSSVLIIPRPDQHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPITGIFP
DGSGSKQETRAGVYVPRDVRVRKIKPLSEIHSNGSVSLQCFDSSSHPEKVEQFFWEKNGRLLG
KESQLNFDISPEDAGYSWCWVNSISGQTASKAWTLEVLVYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSA
TLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPYHSQKRLRLEPVKVQHSAGYWCQGTNSVGKRSPL
STLTVYSPETGAIIGGAGVATALLALCLLFIIVKTHRRKAARTAVGRNDHTPTTGSASPKHQK
SKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNHFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (配列番号 136)

CD33: CD22 2Dヌクレオチド (CD33シグナルペプチドは太字でイタリック体であり、6-ヒスチジンタグは下線が引かれており、3×グリシンリンカーはイタリック体で太字で下線が引かれており、CD33細胞外ドメインは通常フォントであり、CD22細胞外ドメインのうち1g様C2型5、1g様C2型6として定義されるCD22ドメインを含有する部分は太字であり、CD33膜貫通ドメインは二重下線が引かれ、CD33細胞内ドメインはイタリック体である。)

ATGCCTCTGCTGCTACTGCTACCTCTGCTGTGGGCTGGAGCCCTGGCTATGCATCATCAC
CACCATCACGGCGCGCGCGCATCAAATTTCTGGCTGCAAGTGCAAGGAGTCAAGTCAAGGTA
CAGGAGGATTGTGGCTGCTCGTGGCCCTGCACTTTCTTCCATCCCATACCTCACTACGACA
AGAACTCCCCAGTTTCAAGTTACTGGTTCGGGGAAGGAGCCATTATATCCAGGAGACTCTCC
AGTGCCCAACAAACAGCTAGATCAAGAGTACAGGAGGAGTCAAGGACATCTCCGCT
CCTTGGGAGTCCAGTGAAGAACCACTGCTCCCTGAGCATCTGACAGCCGAGGAGGAGG
ATAATGGTTGATCACTTTCTCGGATGGAGGAGGAGTACCAAAATACAGTTACAAATCTCCC
CAGCTCTCTGTGCATGTGACAGACTTGACCCACAGGCCCAAAATCCTCATCCTCGGCACT
TAGAACCCCGGCCACTCCAAACCTGACCTGCTGTGCTCGTGGGCTGAGCAGGGA
CACCCCGGATCTTCTCGTGGTTGTGACGTGCCCCACCTCCCTGGGCGCCAGGACTACTC
ACTCTCGGTGCTCATAAATGACCCACAGGCCACAGGACAGCCAGCAACCTGACCTGTC
AGGTGAAGTTCGCTGGAGCTGGTGTGACTACGAGAGAAACCATCCAGCTGAACGTCACCT

【図 1 4 - 4】

FIG. 14 続き

CD33: CD22 4Dタンパク質 (CD33シグナルペプチドは太字でイタリック体であり、6-ヒスチジンタグは下線が引かれており、3×グリシンリンカーはイタリック体で太字で下線が引かれており、CD33細胞外ドメインは通常フォントであり、CD22細胞外ドメインのうち1g様C2型3、1g様C2型4、1g様C2型5、1g様C2型6として定義されるCD22ドメインを含有する部分は太字であり、CD33膜貫通ドメインは二重下線が引かれ、CD33細胞内ドメインはイタリック体である。)

MPLLLLLLPWAGALAMHHHHHHGGGDPNFVLQVQESVTVQEGLCVLVPCFTFFHIPYDYK
NSPVHGYWFREGAISRDSVPATNKLQDEVEQETQGRFRLLGDPSSRNNSCLSVIDARRRDNNGS
YFFRMRGSGTKSYKSPQLSVHVVDLTHRPKILIPGLEPHGSKNLTCSSVWACEQGTPIPFISW
LSAAPTSLGPRTHHSSVLIIPRPDQHGNTLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTVYPQNPITGIFP
DGSGSKQETRAGVYVPEPSTVQILHSPAVEGSGVEFLCMLSLANPLPNTYWHYHNGKEMQGR
TEEKVHIPKLPWHAAGTYSVAENILGTGGRGPAELDVQYPPKKVTVTQNPMPPIREGDTVTL
VQYAPRDRVRKIKPLSEIHSNGSVSLQCFDSSSHPEKVEQFFWEKNGRLLGKESQLNFDIS
PEDAGYSWCWVNSISGQTASKAWTLEVLVYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPV
SHYTWFDWNNQSLPYHSQKRLRLEPVKVQHSAGYWCQGTNSVGKRSPLSTLTVYSPETG
AIGGAGVATALLALCLLFIIVKTHRRKAARTAVGRNDHTPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSC
SGAAPTVMDEELHYASLNHFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (配列番号 1)

CD33: CD22 4Dヌクレオチド (CD33シグナルペプチドは太字でイタリック体であり、6-ヒスチジンタグは下線が引かれており、3×グリシンリンカーはイタリック体で太字で下線が引かれており、CD33細胞外ドメインは通常フォントであり、CD22細胞外ドメインのうち1g様C2型3、1g様C2型4、1g様C2型5、1g様C2型6として定義されるCD22ドメインを含有する部分は太字であり、CD33膜貫通ドメインは二重下線が引かれ、CD33細胞内ドメインはイタリック体である。)

ATGCCTCTGCTGCTACTGCTACCTCTGCTGTGGGCTGGAGCCCTGGCTATGCATCATCAC
CACCATCACGGCGCGCGCGCATCAAATTTCTGGCTGCAAGTGCAAGGAGTCAAGTCAAGGTA
CAGGAGGATTGTGGCTGCTCGTGGCCCTGCACTTTCTTCCATCCCATACCTCACTACGACA
AGAACTCCCCAGTTTCAAGTTACTGGTTCGGGGAAGGAGCCATTATATCCAGGAGACTCTCC
AGTGCCCAACAAACAGCTAGATCAAGAAGTACAGAGGAGACTCAGGAGAGCTTCCGCTCT
CCTTGGGAGTCCCGATAGGAAACCACTGCTCCCTGAGCATCTGTAGACGCCAGGAGGAGG
ATAATGGTTTCACTACTTCTTTCGATGGAGAGGAGGAGTACCAAAATACAGTTTACAAATCTCCC
CAGCTCTCTGTGCATGTGACAGACTTGACCCACAGGCCCAAAATCCTCATCCTCGGCACT
TAGAACCCCGGCCACTCCAAAAACCTGACCTGCTGTGCTCGTGGGCTGAGCAGGGA
CACCCCGGATCTTCTCGTGGTTGTGACGTGCCCCCACTCCTCGTGGGCGCCAGGACTACTC
ACTCTCGGTGCTCATAAATGACCCCAAGGCCACAGCCAGGACCAACCACTGACCTGTC
AGGTGAAGTTTCGCTGGAGCTGGTGTGACTACGGAAGAACCACTCAGCTGAACTGCACTCACT
ATTTTCCACAGAACCCCAACCTGGTATCTTTCAGAGAGTCCCTCAGGGAACCAAGAGAC
CAGAGAGGAGGTGGTTTCACTCGGAACTTCCACGGTTCAGATTCTCCACTCACTCCAGGCT
GGAGGGAAGTCAAGTCAAGTCTTCTTTCATGTACTGACGCGCAATCTCTTCCAAACAAATTA
CAGGTGATACCAAAATGGGAAAGAAATGACAGGGAAGGAGGAGGAGGAAAGTCCAACTG
CCAAAGATCTCCTTGGCAGCTGGGCACTGATTTCTGCTGTGGACAGCAACCAATTTCTGGT
ACTGAGACAGAGGGGCGCTGGAGCTGAGCTGGATGTCAGGATTCCTCCCAAGAGGTTGA
CCACAGTGAATCAAAACCCCATGCGGATTCGCGGATTCGAGAGGACAGACAGACTGGAATTTCTG
TACTGAGATTTCCAGTAACCCAGTGTATCCCGGTTGAATGGAACCCGATGGCGCGCTG
GGAGAGGCCATCGCTTGGGCTGCTGAAAGTCCAAACCTGAGCCGACCAACCAAC
ATCGCTCGCGAGCTTGAATAGTTGGTGTGCTGTCGGCTCCCTGTCGCCCTGAAATGTC
CAGTATGCCCGCCGAGACGTGAGGGTCCGGAATAACAGCCCTTTCAGAGATTCACCT

【図 1 4 - 6】

FIG. 14 続き

ATGTTCCACAGAAACCCCAACCTGGTATCTTTCAGGAGATGGCTCAGGGAACCAAGAGAC
CAGAGCAGAGTGGTTTCACTCCCCGAGACGTGAGGGTCCGGAATAACAAGCCCTTTCGG
AGATTCCAGCTTGGAAACTCGGTGAGCTTCCATGTGACTTCTCAAGCAGCCACCCCAAA
GAAGTGGTCTTCTTTCGGGAGAAAAATGGCAGGCTTCTGGGGAAGAAAGAGCGAGCTGAA
TTTTGACTCCATCTTCCCCAGAGATGCTGGGAGTTACAGCTGCTGGGTGAAACAACTCCAT
AGGACAGCAGCGCTCCAAAGGCTTGGACACTTGAAGTGTGTTATGACACCGAGGAGCTG
CTGTGTGCTTACAGGCCAGGGGCAACAGTGTGAGGAGGGAAGAGTGAACCCCTGACCT
GTGAGAGCAGCGCCACCAACCTCCCGTCTCCCATCACTGAGTGTGTTGACTGGAATAACCAA
AGCTCCCTCCACACAGCCAGAAAGTGAAGTTGAGAGCGGTTGAAGTTCAGCAGCACTCGG
GTGCTCATGTTGGCAGGGGACCAACAGTGTGAGTGAAGGCCCTGAGCTGCTTCCAGCAG
CTCCTACCGCTTACTATAGCCCGGAGACCGGGGCCATTGGAGGAGCTGGTGTTCAGCGCC
TGCTCGCTCTTGTCTGCTGCTCATCTTCTTCAATAGTGAAGACCCACAGGAGGAAAGTCCG
CAGGACAGCAGTGGGCGAGGAATGACACCCACCTTACACAGGGTCAAGCTCCCCGAAAC
ACCAAGAAAGTTCGAAGTTACATGGCCCACTGAAACCTCAAGCTGTTGAGGTGCCCGCC
CTACTGTGGAGATGGATGAGGAGCTGCAATTATGCTTCCCTCAACTTTCATGGGATGAATCC
TTCCAAGGACACCTCCACCGAATACTCAGAGGTGAGGACCCAG (配列番号 137)

CD33 Vセット構築物 (エクソン3及び4は欠失している。) タンパク質 (CD33シグナルペプチドは太字でイタリック体であり、6-ヒスチジンタグは下線が引かれており、3×グリシンリンカーはイタリック体で太字で下線が引かれており、CD33アミノ酸140〜232を欠くCD33細胞外ドメインは通常フォントであり、CD33膜貫通ドメインは二重下線が引かれ、CD33細胞内ドメインはイタリック体である。)

MPLLLLLLPWAGALAMHHHHHHGGGDPNFVLQVQESVTVQEGLCVLVPCFTFFHIPYDYK
NSPVHGYWFREGAISRDSVPATNKLQDEVEQETQGRFRLLGDPSSRNNSCLSVIDARRRDNNGS
YFFRMRGSGTKSYKSPQLSVHVTVYPQNPITGIFPDGSGSKQETRAGVYVHAIGGAGVATALL
ALCLLFIIVKTHRRKAARTAVGRNDHTPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDE
EELHYASLNHFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (配列番号 138)

CD33 Vセット構築物 (エクソン3及び4は欠失している。) ヌクレオチド (CD33シグナルペプチドは太字でイタリック体であり、6-ヒスチジンタグは下線が引かれており、3×グリシンリンカーはイタリック体で太字で下線が引かれており、CD33アミノ酸140〜232を欠くCD33細胞外ドメインは通常フォントであり、CD33膜貫通ドメインは二重下線が引かれ、CD33細胞内ドメインはイタリック体である。)

ATGCCTCTGCTGCTACTGCTACCTCTGCTGTGGGCTGGAGCCCTGGCTATGCATCATCAC
CACCATCACGGCGCGCGCGCATCAAATTTCTGGCTGCAAGTGCAAGGAGTCAAGTCAAGGTA
CAGGAGGATTGTGGCTGCTCGTGGCCCTGCACTTTCTTCCATCCCATACCTCACTACGACA
AGAACTCCCCAGTTTCAAGTTACTGGTTCGGGGAAGGAGCCATTATATCCAGGAGACTCTCC
AGTGCCCAACAAACAGCTAGATCAAGAAGTACAGGAGGAGACTCAGGCGCAAGTCCCGCT
CCTTGGGATCCCATGAGCAACCACTGCTCGCTGAGCATCTGAGCAGCCAGGAGGAGG
ATAATGGTTTCACTACTTCTTTCGATGGAGAGGAGGAGTACCAAAATACAGTTTACAAATCTCCC
CAGCTCTCTGTGCATGTGACATGTTTCCACAGAACCCCAACCTGATGTTCTTCCAGGAG
ATGGCTCAGGGAACCAAGACAGCAGGAGGAGGTGGTTTCACTGGGCGCAATTGGAGGAGCT
GGTGTACAGCCCGCTGCTCGCTCTTTTGTCTCGTCCCTCATCTTCTTCAATAGTGAAGACCCCA
GGAGGAAAGCAGCCAGGACAGCAGTGGGCGAGGAATGACACCCACCTTCCACAGGGTGA
GCTTCCCCGAGCCAGGAAAGTCCAAAGTTACATGGCCCACTGAAACCTCAAGCTGTTG
CAGGTGCGGCCCTACTGTGGAGATGGATGAGGAGCTGCATTATGCTTCCCTCAACCTTTCA
TGGGATGAATCTTCCAAAGGACACCTCCACCGAATACTCAGAGGTGAGGACCCAGCAGC

CD33シグナルペプチド: MPLLLLLLPWAGALAM (配列番号 140)

10

20

30

40

50

【図 1 4 - 7】

FIG. 14 続き

C D 3 3 シグナルペプチドコード配列：
ATGCCTCTGCTGCTACTGCTACCTCTGCTGTGGGCTGGAGCCCTGGCTATG (配列番号 141)

6-ヒスチジンタグ：HHHHHH (配列番号 142)

6-ヒスチジンタグコード配列：CATCATCACCAACCATCAC (配列番号 143)

3 x グリシンリンカー：GGG

3 x グリシンリンカーコード配列：GGCGGCGGG

C D 3 3 細胞外ドメイン：
DPNFVLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPIYDKNSPVHGYWFGAIISRDSPVATNKLDQ
EVQEETQGRFRLLDGPPSRNNCSLIVDARRRDNYSYFFRMRGSKTKYSYKSQLSVHVTDLT
HRPKILPGTLEPHGSKNLCTCSVSWACEQGTPIIFSWLSAAPTSLGPRTHTHSSVLIITPRPQDGH
TNLTQVQKFAAGVTTERTILQNLVTVYPQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVH (配列番号 145)

C D 3 3 細胞外ドメインコード配列：
GATCCAAATTCTGGCTGCCAAGTGCAGGAGTCAGTGACGGTACAGGAGGGTTTGTGCGTC
CTCGTGCCCTGCACTTTCTCCATCCCATACCCCTACTACGACAAGAACTCCCCAGTTCAATG
GTTACTGGTTCGGGAAGGAGCCATTATATCCAGGCACTCTCCAGTGCCCAACAAAGC
TAGATCAAGAAGTACAGGAGGAGCTCAGGGCAGATTCCGCTCCTTGGGGAATCCAGTA
GGAACAACCTGCTCCCTGAGCATCTGAGACGCCAGGAGGAGGATTAATGGTTCACTACTTCT
TTCGGATGGAGAGAGGAAGTACCAAATACAGTTACAAATCTCCCGAGCTCTCTGTGCATGT
GACAGACTTGACCCACAGGCCCCAAATCTCATCTCCTGGCACTCTAGAAACCCGGCCACTC
CAAAACCTGACCTGCTCTGTGTCCTGGGCTGTGAGCAGGGAAACACCCCGATCTTCTC
CTGGTTGTACAGCTGCCGCCACCTCCCTGGGCCCCAGGACTACTCACTCCTCGGTGCTCAT
AATACCCCAAGGGCCCCAGGACCAAGGACCAACCTGACCTGTGCAAGTGAAGTTCCGCTGG
AGCTGGTGTGACTACGGAGAGAACCTCCAGCTGAACGCTCACCTATGTTCCACAGAACCC
AACAACTGGTATCTTTCCAGGAGATGGCTCAGGGAAACAAGAGACCAGAGCAGGAGTGGT
TCAT (配列番号 146)

C D 3 3 アミノ酸 1 4 0 ~ 2 3 2 を欠く C D 3 3 細胞外ドメイン：
DPNFVLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPIYDKNSPVHGYWFGAIISRDSPVATNKLDQ
EVQEETQGRFRLLDGPPSRNNCSLIVDARRRDNYSYFFRMRGSKTKYSYKSQLSVHVTYVP
QNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVH (配列番号 147)

C D 3 3 アミノ酸 1 4 0 ~ 2 3 2 を欠く C D 3 3 細胞外ドメインコード配列：
GATCCAAATTCTGGCTGCAAGTGCAGGAGTCAGTGACGGTACAGGAGGGTTTGTGCGTC
CTCGTGCCCTGCACTTTCTCCATCCCATACCCCTACTACGACAAGAACTCCCCAGTTCAATG
GTTACTGGTTCGGGAAGGAGCCATTATATCCAGGCACTCTCCAGTGCCCAACAAAGC
TAGATCAAGAAGTACAGGAGGAGACTCAGGGCAGATTCCGCTCCTTGGGGAATCCAGTA
GGAACAACCTGCTCCCTGAGCATCTGAGACGCCAGGAGGAGGATTAATGGTTCACTACTCT
TTCGGATGGAGAGGAAGTACCAAATACAGTTACAAATCTCCCGAGCTCTCTGTGCATGT

【図 1 4 - 9】

FIG. 14 続き

CCAGCAGCTGGGTGCTCTACTGGTGCCAGGGACCAACAGTGTGGGCAAGGGCCGCTGCC
CTCTCAGCACCTCACCCTGCTACTACTATGCCCCGAGACC (配列番号 154)

C D 2 2 細胞外ドメインのうち 1 g 様 C 2 型 5、1 g 様 C 2 型 6 として定義される C D 2 2
ドメインを含有する部分配列：
PRDVRVRKIPLSEIHSGNSVSLQCDFFSSHPKEVQFFWEKNRLLGKESLNFDSIPEDAG
SYSCWNNISIGQTASKAWTLEVLVYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYT
WFDWNNQSLPYHSQKLRLEPVKVQHSWAYWCGQTNVSGKGRSPLSTLTYYSPET (配列
番号 155)

C D 2 2 細胞外ドメインのうち 1 g 様 C 2 型 5、1 g 様 C 2 型 6 として定義される C D 2 2
ドメインを含有する部分コード配列：
CCCCGAGACGCTGAGGGTCGGGAAATCAAGCCCTTTCCGAGATTCACTCTGGAACCTCG
GTGACCGCTCCAATGTCTCAAGCAGCCACCCCAAGAAAGTCCAGTTCTTCTGGGGA
AAATCGGCAGGCTTCTGGGGAAGAAAGCCAGCTGAATTTTGACTCCATCTCCCCAGAAGA
TGCTGGGAGTTACAGCTGCTGGGTGAACAACCTCCATAGGACAGACAGCGTCCAAGGCCGTG
GACACTTGAAGTCTGCTATGACCAACGAGGAGCTGCGTGTGTCCATGACGCCAGGGGACCA
AGTGATGGAGGGGAAGTGAACAACCTGACCTGTGAGAGCGACGCCACCCCTCCGCTCT
CCCACTACACCTGGTTTGACTGGAATAACCAAGGCTCCCTACCAAGCCAGCAAGCTGA
GATTGGAGCCGCTGAAGAGTCCAGCACTCGGCTGCTACTGTGTCAGGGGACCAACAGT
GTGGGCAAGGGCCGTGCGCTCTCAGCACCTCACCCTGCTACTATAGCCCGAGAGCC
(配列番号 156)

1 E 6 / C D 3 二重特異性分子は、米国特許出願公開第 1 6 / 3 1 7、6 5 7 号で入手可能な
公表された配列を使用して、V H - V L 配向の 1 E 6 s c F v、及びヒト C D 3 に特異的な
結合ドメインを含む一本鎖抗体構築物として産生された

1 E 6 / C D 3 二重特異性分子 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり；
1 E 6 - H c F v は下線が引かれており；G 4 S x 3 リンカーはイタリック体であり；
1 E 6 - L c F v は通常フォントであり；G 4 S リンカーは太字でイタリック体で下線が引かれて
おり；C D 3 - H c F v は二重下線が引かれ、C D 3 - L c F v は太字であり；6-ヒスチジン
タグはイタリック体であり下線が引かれている。)：
METDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLVESGGGVQPGRLRLSCAASGFTFSYDIHWVRQAP
GKLEWAWIVYDGSNNYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSGS
YDYWYGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI
RLDGYWQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYSY
PRTFGGQTKVEIKGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFENKYAMNWVRQAPGK
GLEWAWIRSKYNNTATYVADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHNGFN
SYISYWAYVMGQGTILTVSSGGGGSGGGSGGGSGGSDVWVQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTG
AVTSGNNYPRVQKPGQAPRLGLIGTKFLAPGTPARFSGSLDGLGKAALTLSGVQPEDEAEY
YCVLWYSNRWVFGGGTKLTLHHHHHHH (配列番号 157)

1 g K シグナルペプチド：METDTLLLWVLLWVPGSTG (配列番号 158)

1 H 1 0 s c F v V H - V L 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり；
V H は下線が引かれており；G 4 S x 3 リンカーはイタリック体であり；V L は通常フォントで
ある。)：

METDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKGSGYIFTSYDMHWVRQAP
GQGLEWVMGIIDPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSMTSYMELSSRLSEDTAVYYCTRDYSWS

【図 1 4 - 8】

FIG. 14 続き

GACATATGTTCCACAGAACCCAACCACTGGTATCTTTCCAGGAGATGGCTCAGGGAAACAA
GAGACCAGAGCAGGAGTGTTTCAT (配列番号 148)

C D 3 3 膜貫通ドメイン：GAIGGAGVTALLALCLCLIFFIV (配列番号 149)

C D 3 3 膜貫通ドメインコード配列：
GGGGCCATTGGAGGAGCTGGTGTTACAGCCCTGCTCGCTCTTTGTCTGCTCATCTTCT
TCATATG (配列番号 150)

C D 3 3 細胞内ドメイン：
KTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLN
FHGMNPSKDTSEYSEVRTQ (配列番号 151)

C D 3 3 細胞内ドメインコード配列：
AAGACCCACAGGAGGAAGCAGCCAGGACAGCAGTGGGCAGGAATGACACCCACCCTAC
CACAGGGTCAGCCTCCCCGAAACACCAAGAAAGTCCAAAGTTACATGGCCCCACTGAAAC
CTCAAGCTGTTCAGGTCGCCGCCCTACTGTGGAGATGGATGAGGAGCTGCATTATGCTTC
CATCACTTCTTGGGATGAATCCTTCCAAGGACACCTCCACCGAATACTCAGAGGTCAGG
ACCCAG (配列番号 152)

C D 2 2 細胞外ドメインのうち 1 g 様 C 2 型 3、1 g 様 C 2 型 4、1 g 様 C 2 型 5、1 g 様
C 2 型 6 として定義される C D 2 2 ドメインを含有する部分：
PEPSTVQILHSPAIVEGSOVEFLCMSLANPLPTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAQT
YSCVACGTLTGORGPGAELDVQYPPKVTVIQNPMPPIREGDVTLSNYSNNSPVTRYEW
KPHGAWEEPSSLGLVKIQNVWDNTTIAACAACNSWCSWASVALNVQYAPRDRVRKIKPLSEI
HSGNSVSLQCDFFSSHPKEVQFFWEKNRLLGKESLNFDSIPEDAGSYSCVGDRTVITCRASQGI
RLEPVLVLYAPRRLRVSMSPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPYHSQ
KLRLEPVKVQHSWAYWCGQTNVSGKGRSPLSTLTYYSPET (配列番号 153)

C D 2 2 細胞外ドメインのうち 1 g 様 C 2 型 3、1 g 様 C 2 型 4、1 g 様 C 2 型 5、1 g 様
C 2 型 6 として定義される C D 2 2 ドメインを含有する部分コード配列：
CCGGAACCTTCCACGGTTCAGATCCTCCACTACCCGGCTGTGGAGGGAAGTCAAGTCGAG
TTTCTTTGCACTGTCACTGGCCAACTCTCTTCCAACAATTACACGTGGTACCAATGGGAA
AGAAATGAGCGGGAAGGACAGAGGAGAAAGTCCAGCTCCCAAGAGTCTCCTCTTGGCAGCG
TGGGACTTATTCCTGTGTGGCAAGAAACATTCTTGATCACTGGACAGAGGGGCCCTGGAAGC
TGAGCTGGATGTCAGTATCCTCCCAAGAAAGTGACCAAGTGAATCAAAACCCCACTGCG
GATTGAGAAAGGAGACACAGTGACCTTTCTCTGTAACTACAATTCAGTAACCCCACTGTT
ACCCGCTATGAATGAAACCCCACTGGCGCTGGGAGGAGCCATCGCTTGGGGTCTGTAA
AGTCCAAACAGTTGGCTGGGACAAACCAACCTCGCTGCGCAGCTGTGAATGATTTGGTG
CTCGTGGGCTCCCTCTGTGCCCTGAATGCCAGTATGCCCCCGAGACGTGAGGGGTCC
GGAATAACCAAGCCCTTTCCGAGATTCACTCTGCAACCTCGGTCAAGCTCCAATGTGACTT
CTCAAGACGCCACCCCAAGAAAGTCCAGTCTTCTTGGGAGAAAAATGGCAGGCTTCTGGG
GAAAGAAAGCCAGCTGAATTTTGACTCCATCTCCCCAGAAGATGCTGGGAGTTACAGCTGC
TGCGTGAAACCACTCCATAGGACAGACAGCGTCCAAGGCCCTGGACACTTGAAGTGTGTAT
GACCCAGCAAGCTGCGTGTGTCCATGAGCCCGAGGGAACCAAGTGAATGAGGGGGGAAG
TGCAACCCCTGACCTGTGAGAGCGGACGCCAACCCCTCCCGTCTCCCACTACACCTGTTTGA
CTGGAATAACCAAGCTCCCTACACAGCCAGAGCTGAAGTTGAGCGCGGTGAAGGT

【図 1 4 - 1 0】

FIG. 14 続き

YFDYWQGTGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI
RLDGYWQKPGKAPKLLIYATSSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYNP
WTFGQGTKEIK (配列番号 230)

1 H 1 0 s c F v V L - V H 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり；
V L は通常フォントであり；G 4 S x 3 リンカーはイタリック体であり；V H は下線が引かれて
いる。)：

METDTLLLWVLLWVPGSTGAIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI
RLDGYWQKPGKA
PKLLIYATSSLSQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYNPWTFFGGTKVEIK
GGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKGSGYIFTSYDMHWVRQAPGQGL
EWVMIIDPSGGSTSYAQKFQGRVTMTTRDTSMTSYMELSSRLSEDTAVYYCTRDYSWSYFDY
WGQGTGLTVTVSS (配列番号 231)

1 A 9 s c F v V H - V L 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり；
V H は下線が引かれており；G 4 S x 3 リンカーはイタリック体であり；V L は通常フォントで
ある)：

METDTLLLWVLLWVPGSTGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDIHWVRQAT
GKLEWWSAIGTAGDTYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREYSYYF
DYWGQGTILTVTVSSGGGGSGGGSGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI
RNDL
GYWQKPGKAPKILYLGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQEYNYPCT
FGQGTKLEIK (配列番号 232)

1 A 9 s c F v V L - V H L 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり；
V L は通常フォントであり；G 4 S x 3 リンカーはイタリック体であり；V H は下線が引かれて
いる。)：

METDTLLLWVLLWVPGSTGAIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQD
IRNDLGYWQKPGK
APKILYLGASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQEYNYPCTFGQGTKLEIK
GGGGSGGGSGGGSGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDIHWVRQATGKGL
EWWSAIGTAGDTYYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAGDTAVYYCAREYSYYFDYW
QGQGTILTVTVSS (配列番号 233)

1 E 6 s c F v V H - V L 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり；
V H は下線が引かれており；G 4 S x 3 リンカーはイタリック体であり；V L は通常フォントで
ある)：

METDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLVESGGGVQPGRLRLSCAASGFTFSYDIHWVRQAP
GKLEWVAIVWYDGSNNYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSGS
YDYWYGQGTILTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSAIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGI
RNDL
GYWQKPGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYSY
PRTFGGQTKVEIK (配列番号 234)

1 E 6 s c F v V L - V H L 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり；
V L は通常フォントであり；G 4 S x 3 リンカーはイタリック体であり；V H は下線が引かれて
いる。)：

METDTLLLWVLLWVPGSTGAIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQD
IRNDLGYWQKPGK
APKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYSYPRTFGGQTKVEIK
GGGGSGGGSGGGSGVQLVESGGGVQPGRLRLSCAASGFTFSYDIHWVRQAPGKGL
EWAVWYDGSNNYSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYSGSYDY
WGQGTILTVTVSS (配列番号 235)

【図 1 4 - 1 1】

FIG. 14 続き

2 D 3 s c F v V H - V L 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり ; V H は下線が引かれており ; G 4 S × 3 リンカーはイタリック体であり ; V L は通常フォントである。) :

METD T L L W L L L W P G S T G E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L S L S C A A S G F T F S I A M S W R Q A P G
K G L E W W S A I S D S G G T T Y A D S V K G R F T I S R D N S K N M L Y L E M N S L R A E D T A I Y Y C A K R T R Y F N G
M D V W G Q G T T V T V S S G G G S G G G S G G G S G G S E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S G S S
S F L S W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q D Y N L
P F T F G P G T K V D I K (配列番号 236)

2 D 3 s c F v V L - V H L 配向 (1 g K シグナルペプチドは太字でイタリック体であり ; V L は通常フォントであり ; G 4 S × 3 リンカーはイタリック体であり ; V H は下線が引かれて
いる。) :

M E T D T L L W L L L W P G S T G E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S G S S S F L S W Y Q Q K P G
Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q D Y N L P F T F G P G T K V D I
K G G G S G S G G G S G G G S E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L S L S C A A S G F T F S I A M S W R Q A P G K G
L E W W S A I S D S G G T T Y A D S V K G R F T I S R D N S K N M L Y L E M N S L R A E D T A I Y Y C A K R T R Y F N G M D
V W G Q G T T V T V S S (配列番号 237)

1 H 10 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージヤー :
M E T D T L L W L L L W P G S T G Q V Q L V Q S G A E V K P G A S V K V S C K G S G Y I F T S Y D M H W W R Q A P
G G G L E W M G I I D P S G G S T Y A Q K F Q G R V T M T R D T S M S T V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T R D Y S W S
Y F D Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G G S A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R Y
L G W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A T S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q D Y N Y P
W T F G G T K V E I K G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G
L E W W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S
Y I S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A
V T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C
V L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 238)

1 H 10 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 :
M E T D T L L W L L L W P G S T G A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R I Y L G W Y Q Q K P G K A
P K L L I Y A T S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q D Y N Y P W T F G G T K V E I K
G G G S G G G S G G G S Q V Q L V Q S G A E V K P G A S V K V S C K G S G Y I F T S Y D M H W W R Q A P G Q G L
E W M G I I D P S G G S T Y A Q K F Q G R V T M T R D T S M S T V Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C T R D Y S W S Y F D
W G Q G T L V T V S S G G G S E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G
L E W W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S
Y I S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A
V T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C
V L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 239)

1 A 9 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージヤー :
M E T D T L L W L L L W P G S T G E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S I A M S W W R Q A T G
K G L E W W S A I G T A G D T Y A G S V K G R F T I S R E N A K N S L Y L Q M N S L R A G D T A V Y Y C A R E Y S G Y F D
Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S O D I R N D L G
W Y Q Q K P G K A P K L I Y A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q E Y N Y P C T F
G O G T L E I K G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G
W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y I S Y
W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S
G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C V L W
Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 240)

【図 1 4 - 1 3】

FIG. 14 続き

L E W W S A I S D S G G T T Y A D S V K G R F T I S R D N S K N M L Y L E M N S L R A E D T A I Y Y C A K R T R Y F N G M D
V W G Q G T T V T V S S G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K
G L E W W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N
S Y I S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G
A V T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y
C V L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 245)

ヒト C D 3 3 完全長 DNA コード (細胞ベースの免疫原用に使用される ; C D 3 3 シグナル
ペプチドコード配列は太字で) :

A T G C C G C T G C T G C T A C T G C T G C C C C T G C T G T G G G C A G G G G C C C T G G C T A T G G A T C C A A A
T T T C T G C C T G C A A G T G C A G G A G T C A G T G A C G G T A C A G G A G G G T T T G T G C G T C C T C G T G C C
C T G C A G C T T T C T C A T C C C A T A C C C T A C T A C G A C A A G A A C T C C C C A G T T C A T G G T T A C T G G T
T C C G G A A G A G C A C A T T A T A T C C A G G A C T C T C A G T G G C C A C A A A C A G C T A G A C A A G
A A G T A C A G G A G A G A C T C A G G G C A G A T C C G C C T C C T T G G G A T C C C A G T A G G A A C A A C T
G C T C C C T G A G C A T C G T A G A C G C C A G G A G A G G A T A A T G G T T C A T A C T T C T T C C G A T G G
A G A G A G A A G T A C C A A A T A C A G T T A C A A A T C T C C C A G C T C T C T G T G C A T G T G A C A G A C T T
G A C C C A C A G C C C A A A T C C T C A T C C C T G G C A C T T A G A A C C C G G C C A C T C C A A A A A C C T
G A C C T G C T C T G T G C C T G G G C C T G T G A G C A G G A A C A C C C C G A T C T T C T C C T G G T T G T C
A G C T G C C C C A C C T C C C T G G G C C C A G G A C T A C T C A C T C C T C G G T G C T A A T C A C C C C
A C G G C C C C A G G A C C A C G G C A C C A C C T G A C C T G T C A G G T G A A G T T C G C T G G A G C T G G T G
T G A C T A C G G A G A G A A C C A T C C A G C T C A A C C T A C C A T A T G T T C C A C A G A A C C C A A C A C T G G
T A T C T T T C C A G G A G A T G G C T A G G G A A A C A A G A G A C C A G A C A G A C A G A G T G G T T C A T G G G G C
C A T T G A G G A G C T G G T G T T A C A G C C C T G C T G C C T T T G T C T C T G C C C T A C T T C T T C A T A
G T G A A G A C C C A C A G G A G A A A G A C A G C A G C A G A C A G A G T G G G C A G A A T G A C A C C C A C C C
T A C C A C A G G G T C A G C C T C C C C G A A C A C C A G A A G A A G T C C A A G T T A C A T G G C C C C A C T G A
A A C C T C A A G C T T T C A G G T G C C G C C C T A C T G T G G A G A T G G A T A G A G A G C T G C A T T A T G C
T T C C C T C A A C T T T C A T G G G A T A A T C C T T C C A A G A C A C C T C C A C C G A A T A C T C A G A G G T C
A G G A C C C A G (配列番号 246)

ヒト C D 3 3 完全長タンパク質 (細胞ベースの免疫原用に使用される) :
M P L L L L L P L L W A G A L A M D P N F W L Q V Q E S V T V Q E G L C V L V P C T F F H P I P Y D K N S P V H G Y W F R E
G A I N S D R S P V A T N K L D Q E V E E T Q G R F R L L G D P S R N N C S L S I V D A R R R D N S Y F F R M E R G S T K
Y S Y K S P O L S V H T D L T R P K I L P G T L E P H G S K N L C S V S W A C E Q G T P I F S W L S A A P T S L G P R
T H S S V L I I T P R P Q D H G T N L T C Q V K F A G A G V T T E R T I Q L N V T Y V P Q N P T T G I F F P D G S G K Q E T R
A G V H S G A I G G A V T A L L A L C L I F F I G T H R R K A A R T A V R N D T H P T G S A S P K H Q K S K L H G
P T E T S S G A A P T V E M D E E L H Y A S L N F H G M N P S K D S T E Y S E V R T Q (配列番号 247)

1 H 10、1 A 9、1 E 6、及び/又は 1 B 9 重鎖シグナルペプチド : M D M R V P A Q L L G L L L L W L P G A R C
(配列番号 248)

1 D 2 重鎖シグナルペプチド : M R V P A Q L L G L L L L W L P G A R C (配列番号 249)

1 H 8 重鎖シグナルペプチド : M D M R L P A Q L L G L L M L W P A S R G (配列番号 250)

2 D 3 重鎖シグナルペプチド : M E P W K P Q H S F F F L L W L P D S T G (配列番号 251)

1 H 1 0 重鎖シグナルペプチド : M D W T W R V F C L L A V A P G V H S (配列番号 252)

【図 1 4 - 1 2】

FIG. 14 続き

1 A 9 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージヤー :
M E T D T L L W L L L W P G S T G A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S O D I R N D L G W Y Q Q K P G K A
P K L I Y A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q E Y N Y P C T F G Q G T K L E I K G
G G G S G G G S G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S I A M S W W R Q A T G K G L E
W S A I G T A G D T Y A G S V K G R F T I S R E N A K N S L Y L Q M N S L R A G D T A V Y Y C A R E Y S G Y Y F D Y W G
Q G T L V T V S S G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G L E
W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y I
S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V
T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C V
L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 241)

1 E 6 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージヤー :
M E T D T L L W L L L W P G S T G Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y D I H W W R Q A P G
K G L E W W A I V W Y D G S H N Y Y S D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D Y S G S Y
Y D Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G G S A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R N D
L G W Y Q Q K P G K A P K L I Y A A S N L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q D Y S Y P
R T F G Q G T K V E I K G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G
W G Q G T L V T V S S G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G
L E W W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S
Y I S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A
V T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C
V L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 242)

1 E 6 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージヤー :
M E T D T L L W L L L W P G S T G A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R N D L G W Y Q Q K P G K A
P K L I Y A A S N L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q D Y S Y P R T F G Q G T K V E I K
G G G S G G G S G G G S Q V Q L V E S G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y D I H W W R Q A P G K G L
E W A V I W Y D G S H N Y Y S D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R D Y S G S Y Y D Y
W G Q G T L V T V S S G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G
L E W W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S
K I S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A
V T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C
V L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 243)

2 D 3 scFv VH-VL 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージヤー :
M E T D T L L W L L L W P G S T G E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S I A M S W W R Q A P G
K G L E W W S A I S D S G G T T Y A D S V K G R F T I S R D N S K N M L Y L E M N S L R A E D T A I Y Y C A K R T R Y F N G
M D V W G Q G T T V T V S S G G G S G G G S G G G S G G G S E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S O S G S S
S F L S W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q D Y N L
P F T F G P G T K V D I K G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K G
L E W W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N
S I S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A
A V T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C
C V L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 244)

2 D 3 scFv VL-VH 配向、二重特異性抗体 C D 3 3 / C D 3 エンゲージヤー :
M E T D T L L W L L L W P G S T G E I V M T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S G S S S F L S W Y Q Q K P G
Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A V Y Y C Q Q D Y N L P F T F G P G T K V D I
K G G G S G G G S G G G S E V Q L L E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S I A M S W W R Q A P G K G

【図 1 4 - 1 4】

FIG. 14 続き

1 A 9 重鎖シグナルペプチド : M E L G L S W W F L V A I L E G V Q C (配列番号 253)

1 E 6 及び/又は 2 E 3 重鎖シグナルペプチド : M E F G L S W W F L V A L L R G V Q C (配列番号 254)

1 D 2 重鎖シグナルペプチド : M E S G L S W W F L V A L L R G V Q C (配列番号 255)

1 B 9 重鎖シグナルペプチド : M E F G L S W W F L I A L L R G V Q C (配列番号 256)

1 H 8 重鎖シグナルペプチド : M L L L V T S L L L C E L P H P A F L L I P (配列番号 257)

2 D 3 重鎖シグナルペプチド : M E F G L S W L F V A I L K G V Q C (配列番号 258)

V - s e t 指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b (R C 1) (1 g クリーダー配列はイタリック体 ;
C D 3 3 s c F v は太字 ; リンカーはイタリック体で下線が引かれており ; C D 3
s c F v は標準テキストであり ; H i s タグは下線が引かれている。) :

M E T D T L L W L L L W P G S T G Q V Q L V Q S G A E V K K P G S E V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A
P G Q G L E W M G W I N T Y T G E P T Y A D K F Q G R V T M T T D T S T S T A Y M E I R N L G G D D T A V Y Y C A R W S
W S D G Y Y Y F D Y W G Q G T S V T V S S G G G S G G G S G G G S G G S D I V M T Q S P D S L T V S L G E R T T I N C
K S S Q S V L D S S T N K N S L A W Y Q Q K P G Q P P K L L S W A S T R E S G I P D R F S G S G S G T D F T L T I D S P Q
P E D S A T Y Y C Q Q S A H F P I T F G Q G T R L E I K S G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T
F N K Y A M N W R Q A P G K L E W W A R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K
E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y I S Y W A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G G S Q T V V T Q E P S L
T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K
A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C V L W Y S N R W F W F G G T K L T V L H H H H H H (配列番号 259)

リーダー配列又は H i s タグのない V セット指向 C D 3 3 / C D 3 B s A b (R C 1)
(C D 3 3 s c F v は太字 ; リンカーはイタリック体で下線が引かれており ; C D 3
s c F v は標準テキストである。) :

Q V Q L V Q S G A E V K K P G S E V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P G Q G L E W M G W I N T Y T G E P T Y
A D K F Q G R V T M T T D T S T S T A Y M E I R N L G G D D T A V Y Y C A R W S W S D G Y Y Y F D Y W G Q G T S V T V
S S G G G S G G G S G G G S G G S D I V M T Q S P D S L T V S L G E R T T I N C K S S Q S V L D S S T N K N S L A W Y Q Q
K P G Q G T R L E I K S W A S T R E S G I P D R F S G S G S G T D F T L T I D S P Q P E D A T Y Y C Q Q S A H F P I T F G G
T R L E I K S G G G S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W R Q A P G K L E W W A
R I S K Y N N Y A T Y A D S V K D R F T I S R D S K N T A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y I S Y W
A Y W G Q G T L V T V S S G G G S G G G S G G G S G T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G
N Y P N W W Q Q K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V Q P E D A E A Y Y C V L W Y
S N R W F W F G G T K L T V L (配列番号 260)
S

【配列表】

2023520399000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/25220

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

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

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/25220

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 33-51
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

-----please see supplemental sheet-----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-4, 8, limited as noted in extra sheet

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/25220

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61P 35/00, C07K 16/46, A61K 39/395, A61P 35/02, A61P 37/06, C07K 16/28 (2021.01)

CPC - C07K 16/2803, C07K 16/2809, C07K 2317/565, C07K 2317/567, C07K 2317/622, C07K 2317/626

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

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

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2011/0059085 A1 (MACDONALD et al.) 10 March 2011 (10.03.2011) para [0113], Example 2; SEQ ID NO 500	1-4
A	WO 2010/072740 A2 (ASTRAZENECA AB) 1 July 2010 (01.07.2010) pg 90, Example 9, SEQ ID NO: 65	1-4
A	US 2012/0251554 A1 (BACHMANN et al.) 4 October 2012 (04.10.2012) Abstract, para [0019]	1-4, 8
A	CN 103145849 A (FENG ZHENQING) 12 June 2013 (12.06.2013) Claim 2; SEQ ID NO 1	8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 August 2021

Date of mailing of the international search report

OCT 05 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US 21/25220

Continuation of Box No. III Observations where unity of invention is lacking:

Group I+, Claims 1-32, 52-53 directed to an antibody or antigen binding fragment thereof, CD33-targeting agent derived from said antibody and a kit. The antibody or antigen binding fragment thereof, CD33-targeting agent and kit will be searched to the extent that the antibody or antigen binding fragment thereof, CD33-targeting agent and kit encompasses an antibody or antigen binding fragment thereof comprising a complementarity determining region (CDR) set of 1E6 as defined by North, comprising a set of complementarity determining regions (CDRs) having

(i) a CDRL1 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 24,
a CDRL2 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 25,
a CDRL3 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 26,
a CDRH1 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 27,
a CDRH2 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 28, and
a CDRH3 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 29; further wherein the VL comprises SEQ ID NO:55, and VH comprises SEQ ID NO:56, and the scFv comprising said VL and VH comprises SEQ ID NO:234 (note, these are the first claimed sequences for the inventive antibody embodiment). It is believed that claims 1-4, 8 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the antibody or antigen binding fragment thereof, CD33-targeting agent and kit encompasses an antibody or antigen binding fragment thereof comprising a complementarity determining region (CDR) set of 1E6 as defined by North, comprising a set of complementarity determining regions (CDRs) having

(i) a CDRL1 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 24,
a CDRL2 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 25,
a CDRL3 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 26,
a CDRH1 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 27,
a CDRH2 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 28, and
a CDRH3 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 29; further wherein the VL comprises SEQ ID NO:55, and VH comprises SEQ ID NO:56, and the scFv comprising said VL and VH comprises SEQ ID NO:234. Additional antibody(ies) or antigen binding fragment(s) thereof, bi- or multi-specific derivatives, conjugates, immunotoxins or other derivative modified polypeptide(s) and/or composition(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antibody(ies) or antigen binding fragment(s) thereof, bi- or multi-specific derivatives, conjugates, immunotoxins or other derivative modified polypeptide(s) and/or composition(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an antibody or antigen binding fragment thereof, comprising a set of complementarity determining regions (CDRs) having

(i) a CDRL1 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 183,
a CDRL2 having the sequence AAS,
a CDRL3 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 26,
a CDRH1 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 184,
a CDRH2 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 185, and
a CDRH3 having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 29; further wherein the VL comprises SEQ ID NO:55, and VH comprises SEQ ID NO:56, and the scFv comprising said VL and VH comprises SEQ ID NO:234 (claims 1-4, 8).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features

The inventions of Group I+ each include the special technical feature of a unique amino acid sequence. Each amino acid sequence comprises a unique peptide, and is considered a distinct technical feature.

Common technical features

No technical features are shared between the antibody amino acid sequences of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ inventions were considered to share the technical features of including:

an antibody or antigen binding fragment thereof comprising a set of complementarity determining regions (CDRs) having an amino acid sequence;

an antibody or antigen binding fragment thereof comprising a complementarity determining region (CDR) set of 1H10, 1A9, 1E6, 1D2, 1B9, 1H8, 2D3, or 2E3, as defined by IMGT, Kabat, North, or Chothia;

a kit comprising a composition comprising a binding domain of one or more of 1H10, 1A9, 1E6, 1D2, and 1B9 and a binding domain of one or more of one or more of 1H8, 2D3, and 2E3; these shared technical features are made obvious by US 2007/0117185 A1 to Kopetzki (hereinafter "Kopetzki").

Kopetzki teaches an antibody comprising a complementarity determining region (CDR) set of 1D2 as defined by IMGT, Kabat, North, or Chothia (para [0090] - "The gene segments encoding an insulin-like growth factor I receptor (IGF-1R) antibody light chain variable region (VL) and the human kappa-light chain constant region (CL) were joined as were gene segments for the anti-IGF-1R heavy chain variable region (VH) and the human gamma1-heavy chain constant region"; para [0052] - "The variable domain of an immunoglobulin's light or heavy chain in turn comprises different segments, i.e. four framework regions (FR) and three hypervariable regions (CDR)"; para [0064]; Table 1; SEQ ID NO: 77 exhibits 100% match to claimed 1D2 light chain signal peptide: MRVPAQLLGLLLWLPGAR (SEQ ID NO: 249; para [0065] - "These biologically active compounds comprise, but are not limited to, ...proteins exhibiting cytotoxic, antiviral, antibacterial, or anti-cancer activity, as well as antigens."). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the antibody of Kopetzki could be combined with additional agents such as antibodies, for combinatorial therapy.

—please see continuation on next sheet —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/25220

—continued from previous sheet —

Kopetzki teaches an antibody comprising a complementarity determining region (CDR) set of 1D2 as defined by IMGT, Kabat, North, or Chothia (para [0090] - "The gene segments encoding an insulin-like growth factor I receptor (IGF-1R) antibody light chain variable region (VL) and the human kappa-light chain constant region (CL) were joined as were gene segments for the anti-IGF-1R heavy chain variable region (VH) and the human gamma1-heavy chain constant region"; para [0052] - "The variable domain of an immunoglobulin's light or heavy chain in turn comprises different segments, i.e. four framework regions (FR) and three hypervariable regions (CDR)"; para [0064]; Table 1; SEQ ID NO: 77 exhibits 100% match to claimed 1D2 light chain signal peptide: MRVPAQLLGLLLWLPGAR (SEQ ID NO: 249; para [0065] - "These biologically active compounds comprise, but are not limited to, ...proteins exhibiting cytotoxic, antiviral, antibacterial, or anti-cancer activity, as well as antigens."). It would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the antibody of Kopetzki could be combined with additional agents such as antibodies, for combinatorial therapy.

Group I+ inventions further share the technical features of:

a CD33-targeting agent comprising a binding domain comprising a complementarity determining region (CDR) set of 1H10, 1A9, 1E6, 1D2, 1B9, 1H8, 2D3, or 2E3, as defined by IMGT, Kabat, North, or Chothia as part of an anti-CD33 immunotoxin, an anti-CD33 antibody drug conjugate, an anti-CD33 antibody-radioisotope conjugate, an anti-CD33 bispecific antibody, an anti-CD33 bispecific immune cell engaging antibody, an anti-CD33 trispecific antibody, and/or an anti-CD33 tetraspecific antibody. However, these shared technical features are previously disclosed by US 2016/0002333 A1 to Amphivena Therapeutics, Inc. (hereinafter "Amphivena").

Amphivena teaches a CD33-targeting agent comprising a binding domain comprising a complementarity determining region (CDR) (Claim 1 - "A bispecific, antigen-binding tandem diabody specific to human CD33 and human CD3, wherein said tandem diabody comprises a first polypeptide and a second polypeptide, each polypeptide having at least four variable chain domains linked one after another, wherein each polypeptide comprises ...or VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33)."; para [0009-0010] - "In some embodiments, a CD33 binding protein has at least one binding site comprising a light chain variable domain and a heavy chain variable domain, wherein the light chain variable domain comprises a CDR1 ... a CDR2 ... and a CDR3 ... wherein the heavy chain variable domain comprises a CDR1 ... a CDR2 ... CDR3").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, continuation of Item 4 above: claims 33-51 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)
C 1 2 Q 1/6851(2018.01)
C 1 2 Q 1/686(2018.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)
A 6 1 K 35/15 (2015.01)
A 6 1 K 35/28 (2015.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 N 5/10
C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/6851 Z
C 1 2 Q 1/686 Z
A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 35/17
A 6 1 K 35/15
A 6 1 K 35/28
A 6 1 P 35/02
A 6 1 P 37/04
A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K 39/395 T
C 1 2 P 21/08

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

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

ー・ノース・1 1 0 0

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ08 QQ53 QR06 QR08 QR32 QR56 QR62
 QS25 QS34 QX02
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C076 AA95 CC07 CC27 CC41 EE41 EE59
 4C085 AA14 AA21 BB01 CC23 DD62 EE01 EE03
 4C087 AA01 AA02 BB37 BB44 BB65 CA04 NA05 NA13 NA14 ZB09
 ZB27 ZC75
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA22 EA28 FA74