

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-510539
(P2025-510539A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 C 0 8 5
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 H 0 4 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全59頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-552041(P2024-552041)	(71)出願人	522276068
(86)(22)出願日	令和5年3月1日(2023.3.1)		バイオネクス・ファーマシューティカルズ
(85)翻訳文提出日	令和6年9月27日(2024.9.27)		フランス・7 5 0 1 4・パリ・リュ・デュ・フォーブール・サン・ジャック・2 9
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/055243		
(87)国際公開番号	WO2023/166098		
(87)国際公開日	令和5年9月7日(2023.9.7)		
(31)優先権主張番号	22305242.4	(71)出願人	507002516
(32)優先日	令和4年3月2日(2022.3.2)		アンスティチュート、ナショナル、ドゥ、ラ、サンテ、エ、ドゥ、ラ、ルシエルシュ、メディカル
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		INSTITUT NATIONAL D E L A S A N T E E T D E L A R E C H E R C H E M E D I C A L E
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		フランス・7 5 0 1 3・パリ・リュ・ドゥ・トルビアク・1 0 1
最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 H E R - 3 に及び H E R - 2 又は E G F R のいずれかに結合する二特異性抗体

(57)【要約】

本発明は、HER3、並びにHER-2及びEGFR抗原から選
択される別の抗原を標的化する二特異性結合分子、特に
、抗体、このような分子の産生のための方法、組成物、
並びにそれらの使用に関する。

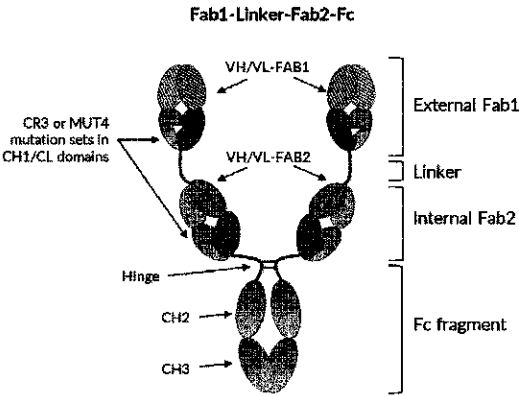


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 抗体 1 (Ab1) の VL-CL 軽鎖と会合した VH-CH1 重鎖を含む Fab 断片、及び
(ii) 抗体 2 (Ab2) の VL-CL 軽鎖と会合した VH-CH1 重鎖を含む Fab 断片
を含む、HER-3 に並びに HER-2 及び EGFR 抗原から選択される別の抗原に同時結合することが可能な二特異性抗原結合性断片であって、
Ab1 の Fab 断片の VH ドメインの N 末端側の端が、ポリペプチドリンカーを介して Ab2 の Fab 断片の CH1 ドメインの C 末端側の端に連結されており、
Ab1 又は Ab2 の一方が、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、
Ab1 又は Ab2 の他方が、トラスツズマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される、二特異性抗原結合性断片。

10

【請求項 2】

Ab2 が、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab1 が、トラスツズマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される、請求項 1 に記載の二特異性抗原結合性断片。

【請求項 3】

セツキシマブの機能的な誘導体が、それぞれセツキシマブの VH 及び VL 鎖アミノ酸配列と少なくとも 80% 同一である VH 及び VL 鎖アミノ酸配列を含むヒト化形態である、請求項 1 又は 2 に記載の二特異性抗原結合性断片。

20

【請求項 4】

Ab1 の CH1 及び CL ドメインが、Ab2 の CH1 及び CL ドメインとは異なる配列を有する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の二特異性抗原結合性断片。

【請求項 5】

Ab1 若しくは Ab2 の一方の Fab CH1 ドメインが、前記 CH1 ドメインの位置 192 におけるスレオニン残基のグルタミン酸による置換によって免疫グロブリンの CH1 ドメインから派生する変異したドメインであり、コグネート CL ドメインが、前記 CL ドメインの位置 137 におけるアスパラギン残基のリジン残基による置換及び前記 CL ドメインの位置 114 におけるセリン残基のアラニン残基による置換によって免疫グロブリンの CL ドメインから派生する変異したドメインである、及び/又は Ab1 若しくは Ab2 の一方若しくは他方の Fab CH1 ドメインが、前記 CH1 ドメインの位置 143 におけるロイシン残基のグルタミンによる置換及び前記 CH1 ドメインの位置 188 におけるセリン残基のバリン残基による置換によって免疫グロブリンの CH1 ドメインから派生する変異したドメインであり、コグネート CL ドメインが、前記 CL ドメインの位置 133 におけるバリン残基のスレオニン残基による置換及び前記 CL ドメインの位置 176 におけるセリン残基のバリン残基による置換によって免疫グロブリンの CL ドメインから派生する変異したドメインである、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の二特異性抗原結合性断片。

30

【請求項 6】

ポリペプチドリンカー配列が、アミノ酸配列:EPKX1CDKX2HX3X4PPX5PAPELLGGPX6X7PPX8PX9PX10GG (配列番号 33) を含むか又はそれからなり、配列中、同一であるか又は異なる X1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9、X10 が、いずれかのアミノ酸である、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の二特異性抗原結合性断片。

40

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗原結合性断片からそれぞれなる 2 個の同一の抗原結合性アームを含む二特異性分子。

【請求項 8】

2 個の重鎖及び 4 個の軽鎖を含む全長抗体であり、各重鎖が、

d. ヒンジ-CH2-CH3 ドメインを含む免疫グロブリンの Fc 領域を含み、

e. この Fc 領域が、前記ヒンジドメインによって Ab1 の Fab VH-CH1 重鎖に連結され、ヒ

50

ンジドメインが、前記CH2ドメインのN末端側の端をAb1のCH1ドメインのC末端側の端と連結し、

f.次いでこれが、ポリペプチドリンカー配列によってAb2のFab VH-CH1重鎖に連結され、ポリペプチドリンカー配列が、Ab1の前記VHドメインのN末端側の端をAb2の前記CH1ドメインのC末端側の端と連結し、

4個の軽鎖が、それらのコグネート重鎖ドメインと会合したAb1の2個のFab VL-CL軽鎖及びAb2の2個のFab VL-CL軽鎖を含む、請求項7に記載の二特異性分子。

【請求項9】

a)それぞれが配列番号27を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及びb)2個が配列番号14を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号18を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、請求項7又は8に記載の二特異性分子。

10

【請求項10】

a)それぞれが配列番号29を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及びb)2個が配列番号14を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号16を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、請求項7又は8に記載の二特異性分子。

【請求項11】

a)それぞれが配列番号31を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及びb)2個が配列番号14を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号20を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、請求項7又は8に記載の二特異性分子。

20

【請求項12】

請求項7から11のいずれか一項に記載の二特異性分子を産生するための方法であって、
a.好適な培地及び培養条件で、請求項6から10のいずれか一項に規定の抗体重鎖及び請求項6から10のいずれか一項に規定の抗体軽鎖を発現する宿主細胞を培養する工程と、
b.培養培地又は前記培養された細胞から前記産生された抗体を回収する工程とを含む方法。

【請求項13】

医薬としての使用のための、請求項1から6のいずれか一項に記載の二特異性抗原結合性断片又は請求項7から11のいずれか一項に記載の二特異性分子。

【請求項14】

がん、好ましくは、固形腫瘍、例えば、膵臓がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、乳がん又は肺がんの処置における使用のための、好ましくは、膵臓がんの処置における使用のための、請求項1から6のいずれか一項に記載の二特異性抗原結合性断片又は請求項7から11のいずれか一項に記載の二特異性分子。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、HER-3、並びにHER-2及びEGFRから選択される別の抗原を標的化する二特異性抗原結合分子、特に、抗体、このような分子の産生のための方法、組成物、並びにそれらの使用に関する。

【背景技術】

40

【0002】

4種のチロシンキナーゼ受容体(EGFR/HER1、HER2、HER3及びHER4)を含むHERファミリーは、細胞増殖に参与する、複数の、部分的に冗長な、互いにつながっている下流シグナリングカスケード、例えば、MAPK及びPI3K/AKT経路を活性化する。HER受容体の共有される一般構造は、細胞外ドメイン、一回膜貫通ドメイン、並びに保存された触媒キナーゼドメイン及びカルボキシ末端テイルを含有する細胞内ドメインからなる。このファミリーにおけるシグナリングの基本的な側面は、2個の受容体の二量体化である。多数の下流シグナリング経路の活性化を生じる初期シグナルを生成するのは、2個のHERファミリーメンバーのホモ二量体化及びヘテロ二量体化、並びにそれらの細胞内領域のトランスリン酸化である。HERファミリーの4種のメンバーは、28種のホモ及びヘテロ二

50

量体を形成することが可能である。

【0003】

遺伝子増幅又は変異によるHERシグナリングの調節解除は、多くのヒト腫瘍で見られ、実験的証拠の豊富さは、がん病理発生におけるこれらの事象の病原学的役割を支持する。HER異常シグナリングは、多数の固形腫瘍(肺、結腸直腸、膵臓等)において観察された。例えば、HERファミリーが膵臓がんにおいて調節解除されるという証拠がある。EGFRは、膵臓がんの45~95%において発現され、発現は一般に、切除された膵臓がんにおける、より悪いアウトカムと相関する。HER2の過剰発現もまた、膵臓がんの7~58%において記載されており、HER2増幅型膵臓がんは、非定型転移性パターンを示し、HER2もまた膵臓がんにおける腫瘍発生の重要なドライバーである可能性があることを示唆する。加えて、HER3発現は、膵臓がん患者における腫瘍進行及び生存時間低減と相関する。

10

【0004】

膵臓がんは、症例数が毎年増え続けている(男性で+2%、女性で+10%)、欧州におけるがん死亡の4番目に多い原因である。これは、早期に診断された場合であっても、予後が非常に不良である。これは、過去40年間にわたって生存率がほとんど改善されていない数少ないがんの1つである:生存は、それぞれ1及び5年後で20%及び5%より劣る。膵臓がんは依然として、有効な処置の欠如が原因で、新たに診断された患者数(495,773名)と同じくらいの多さの2020年に世界で記録された死亡者数(466,003名)を有する、稀な疾患である。現在、膵臓腺癌(膵臓がんの90%)は、外科的に、化学療法により、又は放射線及び化学療法の組合せにより処置されるが、結果は限定的である。第一選択処置としての1996年におけるゲムシタビンの発売は、中央値で1.3ヶ月目まで再発なしで生存を改善し、1年目の全生存(OS)は、2%~18%であった。2005年以来、主に組合せが関与し、ただし革新はほとんどない様々な臨床試験にもかかわらず、2種の薬物、Tarceva(登録商標)(エルロチニブ)及びAbraxane(登録商標)(nab-パクリタキセル)のみが、膵臓がんのために認可された。最初の標的化療法であったエルロチニブは、ゲムシタビンと関連して、中央値でわずか1ヶ月目まで再発なしで生存を改善した。HER3阻害剤に関して、様々な分子が、臨床試験(フェーズI/II)において研究及び評価されている。

20

【0005】

直接的にHER受容体を又は下流キナーゼを標的化する治療剤を用いた処置は、多くの場合、獲得抵抗性に直面するか、又はシグナル伝達ネットワークの内在するロバスト性によって限定される。

30

【0006】

そのような場合、併用療法が、天然の対抗策として出現したが、その最適な設計は、明快なものではなく、腫瘍又はそのサブタイプに依存する場合があります。よって、事前の患者層別化を要求する(Fitzgerald JB、Schoeberl B、Nielsen UB、Sorger PK、Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy、Nat Chem Biol.2006;2:458~66頁)。HERシグナリングの阻害に利用できる現在利用可能な選択肢は、小分子チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)、例えば、ラパチニブ又はエルロチニブ及び治療用抗体、例えば、セツキシマブ又はトラスツズマブを含む。実際、シグナリングモジュレーションに限定されるTKIとは対照的に、抗体は、腫瘍の排除に役立つシグナリング低減に加えた免疫学的効果を誘導する強力なアプローチを表す。

40

【0007】

組み合わせた抗体に基づく治療法が、多くの著者によって提案されてきた。mAb組合せによるHER二量体、特に、EGFR/HER2ヘテロ二量体の標的化は、膵臓腫瘍成長の阻害に有利であることが実証された。

【0008】

2種のmAbの標的を組み合わせる二特異性抗体(BsAb)が更に設計された。しかしこれは、劣った製造可能性及び安定性を通常もたらす複雑な設計の問題を抱え、in vivo膵臓がんモデルにおいて、腫瘍は二特異性抗体による処置中であっても成長し続けたため、このような抗体の有効性はまだ改善の余地がある。

50

【0009】

例えば、Liuと同僚(Liuら、A Novel Antibody Engineering Strategy for Making Monovalent Bispecific Heterodimeric IgG Antibodies by Electrostatic Steering Mechanism.、J Biol. Chem.2015;290(12):7535～62頁)は、それぞれパニツムマブ及びトラスツズマブ配列が利用された二特異性抗EGFR及び抗HER2抗体の構築及び特徴付けについて記載した。抗体は、in vitro及びin vivoでEGFR+/HER2+細胞株に対する改善された活性を示したが、この抗体の活性は依然として改善される必要がある。

【0010】

Merrimack Pharma社(McDonaghら、2012;Spiessら、2015)によって開発された抗HER2/抗HER3二特異性抗体であるMM-111は、遠位食道、胃食道(GE)接合部及び胃のHER2陽性癌を有する患者において研究された。フェーズII臨床試験は、有意でない結果が原因で中止された。

【0011】

抗EGFR/抗HER3二特異性抗体であるドウリゴツズマブ(Duligotuzumab)(Schaeferら、2011b;Spiessら、2015)は、転移性結腸直腸がん患者における第二選択療法としてのFOLFIRIと組み合わせたセツキシマブと比較された。この試験において、ドウリゴツズマブは、FOLFIRIと組み合わせたセツキシマブを上回る利益を示さず、放棄された。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】EP0359282

【特許文献2】EP0667165

【特許文献3】US6217866

【特許文献4】EP0590058

【特許文献5】US5821337

【特許文献6】US8075890

【特許文献7】US6407213

【特許文献8】US6054297

【特許文献9】US5772997

【特許文献10】US6165464

【特許文献11】US6399063

【特許文献12】US6639055

【特許文献13】米国特許第5,225,539号

【特許文献14】WO2012020059

【特許文献15】WO2020/136566

【特許文献16】米国特許出願第2014/0200331号

【特許文献17】米国特許出願第2014/150973号

【特許文献18】米国特許出願第2014/0154254号

【特許文献19】WO2007/147901

【特許文献20】WO2013/005194

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Fitzgerald JB、Schoeberl B、Nielsen UB、Sorger PK.、Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy.、Nat Chem Biol.2006;2:458～66頁

【非特許文献2】Liuら、A Novel Antibody Engineering Strategy for Making Monovalent Bispecific Heterodimeric IgG Antibodies by Electrostatic Steering Mechanism.、J Biol. Chem.2015;290(12):7535～62頁

【非特許文献3】Karlin及びAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264～68頁、1990

【非特許文献4】Karlin及びAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873～77頁、1993

【非特許文献5】Altschulら、J. Mol. Biol. 215:403～10頁、1990

【非特許文献6】Altschulら、Nucleic Acids Res. 25(17):3389～3402頁、1997

【非特許文献7】Molecular Cloning: A Laboratory Manual、J. Sambrookら編、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989

【非特許文献8】Current Protocols in Molecular Biology、F.M. Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc.、New York

【非特許文献9】Riechmannら、Nature 332:323～327頁(1988)

【非特許文献10】Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.(1991)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

上述を考慮すると、依然として、腫瘍を処置するための、HER受容体を標的化する改善された二特異性抗体の必要がある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

そこで本発明者らは、種々のがんの処置において有用な、HER3、及びEGFR又はHER2のいずれかから選択される別の抗原を標的化する新規二特異性抗体を設計した。

【0016】

本発明は、より具体的には、

(i)抗体1(Ab1)のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

(ii)抗体2(Ab2)のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

を含む、HER-3に及びHER-2又はEGFR抗原のいずれかから選択される別の抗原に同時結合することが可能な二特異性抗原結合性断片であって、

Ab1のFab断片のVHドメインのN末端側の端が、ポリペプチドリッカーを介してAb2のFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結されており、

Ab1又はAb2の一方が、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、

Ab1又はAb2の他方が、トラスツズマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される、二特異性抗原結合性断片を提供する。

【0017】

好まれる実施形態では、Ab2は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab1は、トラスツズマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される。

【0018】

特定の実施形態では、セツキシマブの機能的な誘導体は、それぞれセツキシマブのVH及びVL鎖アミノ酸配列と少なくとも80%同一であるVH及びVL鎖アミノ酸配列を含むヒト化形態である。

【0019】

特定の実施形態では、Ab1のCH1及びCLドメインは、Ab2のCH1及びCLドメインとは異なる配列を有する。

【0020】

特定の実施形態では、Ab1若しくはAb2の一方のFab CH1ドメインは、前記CH1ドメインの位置192におけるスレオニン残基のグルタミン酸による置換によって免疫グロブ

10

20

30

40

50

リンのCH1ドメインから派生する変異したドメインであり、コグネートCLドメインは、前記CLドメインの位置137におけるアスパラギン残基のリジン残基による置換及び前記CLドメインの位置114におけるセリン残基のアラニン残基による置換によって免疫グロブリンのCLドメインから派生する変異したドメインである、並びに/又はAb1若しくはAb2の一方若しくは他方のFab CH1ドメインは、前記CH1ドメインの位置143におけるロイシン残基のグルタミンによる置換及び前記CH1ドメインの位置188におけるセリン残基のバリン残基による置換によって免疫グロブリンのCH1ドメインから派生する変異したドメインであり、コグネートCLドメインは、前記CLドメインの位置133におけるバリン残基のスレオニン残基による置換及び前記CLドメインの位置176におけるセリン残基のバリン残基による置換によって免疫グロブリンのCLドメインから派生する変異したドメインである。

10

【0021】

特定の実施形態では、ポリペプチドリンカー配列は、アミノ酸配列:EPKX1CDKX2HX3X4PPX5PAPELLGGPX6X7PPX8PX9PX10GG(配列番号33)(配列中、同一であるか又は異なるX1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9、X10は、いずれかのアミノ酸である)を含むか又はそれからなる。

【0022】

本発明はまた、上に定義されている抗原結合性断片からそれぞれなる2個の同一の抗原結合性アームを含む二特異性分子を提供する。

【0023】

好まれる実施形態では、本発明の二特異性分子は、2個の重鎖及び4個の軽鎖を含む全長抗体であり、各重鎖は、

20

- ヒンジ-CH2-CH3ドメインを含む免疫グロブリンのFc領域を含み、
 - このFc領域が、前記ヒンジドメインによってAb1のFab VH-CH1重鎖に連結され、ヒンジドメインが、前記CH2ドメインのN末端側の端をAb1のCH1ドメインのC末端側の端と連結し、
 - 次いでこれが、ポリペプチドリンカー配列によってAb2のFab VH-CH1重鎖に連結され、ポリペプチドリンカー配列が、Ab1の前記VHドメインのN末端側の端をAb2の前記CH1ドメインのC末端側の端と連結し、
- 4個の軽鎖は、それらのコグネート重鎖ドメインと会合したAb1の2個のFab VL-CL軽鎖及びAb2の2個のFab VL-CL軽鎖を含む。

30

【0024】

別の実施形態では、二特異性分子は、a)それぞれが配列番号27を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及びb)2個が配列番号14を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号18を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む。

【0025】

別の実施形態では、二特異性分子は、a)それぞれが配列番号29を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及びb)2個が配列番号14を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号16を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む。

40

【0026】

別の実施形態では、二特異性分子は、a)それぞれが配列番号31を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及びb)2個が配列番号14を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号20を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む。

【0027】

- 本発明はまた、本発明の二特異性分子を産生するための方法であって、
- 好適な培地及び培養条件で、上に定義されている抗体重鎖及び上に定義されている抗体軽鎖を発現する宿主細胞を培養する工程と、
 - 培養培地又は前記培養された細胞から前記産生された抗体を回収する工程とを含む方法に関する。

50

【0028】

本発明はまた、医薬としての使用のための、本発明の二特異性抗原結合性断片又は二特異性分子に関する。

【0029】

本発明はまた、がん、好ましくは、固形腫瘍、例えば、膵臓がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、乳がん又は肺がんの処置における使用のための、好ましくは、膵臓がんの処置における使用のための、本発明の二特異性抗原結合性断片又は二特異性分子に関する。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】本発明の二特異性抗体の模式図。

10

【図2】ELISAによる同時での2種の抗原の二重のエンゲージメント。(A)固定化されたHER3-Fc及びHER2-His(左パネル)並びに固定化されたHER2-Fc及びHER3-His(右パネル)へのPatri-Trastu-Fc、(B)固定化されたHER3-Fc及びEGFR-His(左パネル)並びに固定化されたEGFR-Fc及びHER3-His(右パネル)へのPatri-Matu-Fc、又は(C)固定化されたHER3-Fc及びEGFR-His(左パネル)並びに固定化されたEGFR-Fc及びHER3-His(右パネル)へのPatri-Cetu-Fcの同時結合を示す結合曲線。ELISA結合曲線から得た最大半量効率的(efficient)濃度(EC50)を示す。

【図3】AKT(pAKT)及びERK(pERK)のリン酸化を阻害する二特異性抗体の生物学的特性。細胞株(A)を、20分間にわたり二特異性抗体(B)で予め刺激し、その後、更に10分間にわたりNRG1/EGFリガンドのミックスを添加した。細胞溶解後に、pAKT及びpERKの発現レベルをHTRFによって定量化した。二特異性抗体なしのNRG1/EGFR刺激細胞において得られる最大リン酸化(100%;培地)と比べた、TR-FRETシグナル(665nm/620nm発光比)をPherastarリーダーにおいて測定した。リン酸化レベルは、0%(白色)~100%(黒色)(BsAb「培養培地」の非存在下でのリン酸化に対応する)の範囲に及ぶパーセンテージとして提示される。

20

【図4】ヌードマウスモデルにおける二特異性抗体のin vivo有効性。Sw1990(A)及びPDX P2846(B)PDAC細胞を異種移植された二特異性抗体処置マウスの腫瘍成長(左パネル)及び生存(中央パネル)。処置の終わりにおける腫瘍成長阻害(TGI)の%及び50%延命効果(日)を右パネルに示す。灰色区域は、抗体処置の持続時間に対応する。

【図5】Sw-1990異種移植片における二特異性抗体の腫瘍内浸透。二特異性抗体によるSw1990腫瘍浸透の免疫組織化学解析。二特異性抗体は、ペルオキシダーゼをコンジュゲートされた抗ヒトFcを使用して標識される。BsAb IRRは、CD19及びCD3を標的化する対照二特異性抗体である。陰性対照として9% NaCl溶液を使用した。Patri-Cetu-Fcの腫瘍浸透を腫瘍全体スライスで全体的に(左)及び×40顕微鏡下で(右)可視化した。

30

【図6-1】TMEの抗腫瘍特色は、本発明の二特異性抗体による処置後のSw1990異種移植片膵臓マウスモデルにおいて観察される。(A)処置マウス由来の切除されたSw1990異種移植片におけるCD31+血管新生をモニタリングするための免疫組織化学解析。Patri-Cetu-Fc対BsAb IRR及びNaCl処置異種移植片切片の顕微鏡画像が例として示される(左パネル)。腫瘍全体切片においてQupathソフトウェアを使用して、腫瘍におけるCD31+微小血管の平均サイズを定量化した。(B)BiXAb処置マウス由来の切除されたSw1990異種移植片のフローサイトメトリーによるNK細胞免疫表現型検査。解離された細胞を、ヒトL/D、CD45、CD3、CD19、CD49、NKp46、IFN γ 及びCD107a特異的抗体で標識した。CD45+CD3+CD19+細胞の負の選択後に、CD107a及び細胞内IFN γ 標識の前に、CD49+NKp46+NK細胞が正にゲーティングされた。C)in vivo ErbB分解の解析。Patri-Cetu-Fc対BsAb IRR及びNaCl処置Sw1990異種移植片切片のEGFR染色の免疫蛍光顕微鏡画像(上部パネル)。それぞれNaCl溶液、Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcで処置されたSw1990異種移植片抽出物毎のErbB受容体発現のウエスタンブロット解析。ローディング対照としてチューブリンを使用した。LI-COR Odysseyイメージングシステムを使用して、ウエスタンブロットを可視化及び定量化した(中央パネル)。切除された異種移植片の各群における、チューブリンに対して正規化さ

40

50

れたErbB発現の定量化(下部パネル)。各実験は、3匹のSw1990異種移植マウスにおいて行った。BsAb IRRは、ヒトCD19及びCD3に同時に結合する陰性対照である。

【図6-2】TMEの抗腫瘍特色は、本発明の二特異性抗体による処置後のSw1990異種移植片脾臓マウスモデルにおいて観察される。(A)処置マウス由来の切除されたSw1990異種移植片におけるCD31+血管新生をモニタリングするための免疫組織化学解析。Patri-Cetu-Fc対BsAb IRR及びNaCl処置異種移植片切片の顕微鏡画像が例として示される(左パネル)。腫瘍全体切片においてQupathソフトウェアを使用して、腫瘍におけるCD31+微小血管の平均サイズを定量化した。(B)BiXAb処置マウス由来の切除されたSw1990異種移植片のフローサイトメトリーによるNK細胞免疫表現型検査。解離された細胞を、ヒトL/D、CD45、CD3、CD19、CD49、NKp46、IFNg及びCD107a特異的抗体で標識した。CD45+CD3+CD19+細胞の負の選択後に、CD107a及び細胞内IFNg標識の前に、CD49+NKp46+NK細胞が正にゲーティングされた。C)in vivo ErbB分解の解析。Patri-Cetu-Fc対BsAb IRR及びNaCl処置Sw1990異種移植片切片のEGFR染色の免疫蛍光顕微鏡画像(上部パネル)。それぞれNaCl溶液、Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcで処置されたSw1990異種移植片抽出物毎のErbB受容体発現のウエスタンブロット解析。ローディング対照としてチューブリンを使用した。LI-COR Odysseyイメージングシステムを使用して、ウエスタンブロットを可視化及び定量化した(中央パネル)。切除された異種移植片の各群における、チューブリンに対して正規化されたErbB発現の定量化(下部パネル)。各実験は、3匹のSw1990異種移植マウスにおいて行った。BsAb IRRは、ヒトCD19及びCD3に同時に結合する陰性対照である。

【図7】二特異性抗体Patri-Cetu-Fc対単一特異性抗体のin vivo有効性。Sw1990細胞を異種移植された処置マウスの腫瘍成長(上部パネル)及び生存(下部パネル)。異なるマウスコホートにおける全ての抗体は、それらのFc含有量に基づき、同一の容積モル濃度の抗体を含有した:Patri-Cetu-Fcは17mg/kgで、モノクローナル対照(パトリツマブ又はセツキシマブ)は10mg/kgで、組合せ(パトリツマブ+セツキシマブ)はそれぞれ5mg/kgで使用した。灰色区域は、抗体処置の持続時間に対応する。

【図8】HER3抗原結合ELISAにおけるBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(ヒト化Patri-Cetu-Fc)及びBMX003-011(ヒト化Patri-Cetu-Fc改変)の結合プロフィール(n=1)。

【図9】EGFR抗原結合ELISAにおけるBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(ヒト化Patri-Cetu-Fc)及びBMX003-011(ヒト化Patri-Cetu-Fc改変)の結合プロフィール(n=3)。

【図10】フローサイトメトリーを使用して測定された、SW-1990細胞の細胞表面に発現されたHER3及びEGFRタンパク質に結合するBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(ヒト化Patri-Cetu-Fc)及びBMX003-011(ヒト化Patri-Cetu-Fc改変)の能力(n=3)。

【図11】成長因子に応答してAKT(A)及びERK(B)のリン酸化を阻害するBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(ヒト化Patri-Cetu-Fc)及びBMX003-011(ヒト化Patri-Cetu-Fc改変)の生物学的特性。

【図12】HCT-116がん細胞(2名の独立したドナーA及びB)の存在下でNK細胞脱顆粒(CD107aの発現)を誘導するBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(ヒト化Patri-Cetu-Fc)及びBMX003-011(ヒト化Patri-Cetu-Fc改変)の性能。

【図13】SW1990脾臓がん異種移植(xenograph)モデルによるBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(ヒト化Patri-Cetu-Fc)及びBMX003-011(ヒト化Patri-Cetu-Fc改変)のin vivo有効性研究(BMX003-01、BMX003-010及びBMX003-011を8.5mg/kgで、BMX対照を17mg/kgで使用した)。

【発明を実施するための形態】

【0031】

定義:

天然に存在する抗体分子の基本構造は、非共有結合性相互作用及び鎖間ジスルフィド結

10

20

30

40

50

合によって一体に保持された、2個の同一重鎖及び2個の同一軽鎖からなるY字形四量体四次構造である。

【0032】

哺乳類種において、5つの型の重鎖： α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ が存在し、これらは、それぞれ免疫グロブリンのクラス(アイソタイプ):IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMを決定する。重鎖N末端可変ドメイン(VH)の後に、重鎖 γ 、 α 及び δ では3個のドメイン(N末端からC末端にCH1、CH2及びCH3と番号付けされる)を含有する定常領域が続くが、重鎖 μ 及び ϵ の定常領域は、4個のドメイン(N末端からC末端にCH1、CH2、CH3及びCH4と番号付けされる)で構成される。IgA、IgG及びIgDのCH1及びCH2ドメインは、異なるクラスの間で、また、IgA及びIgGの場合は異なるサブタイプの間で長さが変動する可動性ヒンジによって分離される:IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4は、15、12、62(又は77)及び12アミノ酸のヒンジをそれぞれ有し、IgA1及びIgA2は、20及び7アミノ酸のヒンジをそれぞれ有する。

10

【0033】

2つの型の軽鎖： λ 及び κ が存在し、これらは、重鎖アイソタイプのいずれと会合することもできるが、両方とも、所与の抗体分子において同じ型のものとなる。両方の軽鎖は、機能的に同一であると思われる。それらのN末端可変ドメイン(VL)の後に、CLと命名される単一ドメインからなる定常領域が続く。

【0034】

重鎖及び軽鎖は、CH1及びCLドメインの間のタンパク質/タンパク質相互作用によって並びにVH/VL相互作用により対形成し、2個の重鎖は、それらのCH3ドメインの間のタンパク質/タンパク質相互作用によって会合する。免疫グロブリン分子の構造は一般に、CH1及びCLドメインの間の並びにヒンジ間の鎖間ジスルフィド結合によって安定化される。

20

【0035】

抗原結合性領域又は抗原結合性断片は、重鎖のVH及びCH1ドメインと対形成した完全な軽鎖からそれぞれなるY字形構造のアーム部に対応し、Fab断片(抗原結合性の断片として)と呼ばれる。Fab断片は最初に、鎖間ジスルフィド結合のアミノ末端側でヒンジ領域において抗体分子を切断し、これにより2個の同一の抗原結合性アームを放出するパパイソ消化によって、ネイティブ免疫グロブリン分子から生成された。他のプロテアーゼ、例えば、ペプシンもまた、ヒンジ領域において、ただし、鎖間ジスルフィド結合のカルボキシ末端側で抗体分子を切断し、ジスルフィド結合を介して連結された2個の同一Fab断片及び残り部分からなる断片を放出する;F(ab')₂断片におけるジスルフィド結合の還元は、Fab'断片を生成する。

30

【0036】

VH及びVLドメインに対応する抗原結合性領域の一部は、Fv断片(可変の断片として)と呼ばれる;これは、抗原結合部位(パルトープとも命名される)を形成するCDR(相補性決定領域)を含有する。

【0037】

エフェクター分子又は細胞へのその結合の原因となる抗体のエフェクター領域は、Y字形構造のステム部に対応し、重鎖の対形成したCH2及びCH3ドメイン(又は抗体のクラスに応じて、CH2、CH3及びCH4ドメイン)を含有し、Fc(結晶化可能な断片として)領域と呼ばれる。

40

【0038】

2個の重鎖及び2個の軽鎖の同一性により、天然に存在する抗体分子は、2個の同一抗原結合部位を有し、よって、2個の同一エプトープに同時に結合する。

【0039】

抗体は、他の物質に結合するよりも優れた親和性、アビディティで、より容易に及び/又はより長い持続時間で結合する場合、標的抗原に「特異的に結合する」。「特異的結合」又は「優先的結合」は、排他的結合を必ずしも要求しない(それを含むことができる

50

が)。必ずではなく一般に、結合の参照は、優先的結合を意味する。

【0040】

用語「対象」、「個体」及び「患者」は、本明細書で互換的に使用されており、処置について査定されている及び/又は処置されている哺乳類を指す。対象は、ヒトであり得るが、他の哺乳類、特に、ヒト疾患のための実験モデルとして有用な哺乳類、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ等も含む。

【0041】

用語「処置」又は「処置すること」は、人間を含む対象が、直接的に又は間接的に対象の状態を改善する目的で医学的援助に付される、行為、適用又は治療法を指す。特に、この用語は、一部の実施形態では、発生率を低減させること、又は症状を軽減すること、再発を排除すること、再発を予防すること、発生率を予防すること、症状を改善すること、予後を改善すること、又はこれらの組合せを指す。当業者は、処置が、必ずしも症状の完全な非存在又は除去をもたらさないことを理解するであろう。例えば、がんに関して、「処置」又は「処置すること」は、新生物若しくは悪性細胞成長、増殖若しくは転移を遅くすること、新生物若しくは悪性細胞成長、増殖若しくは転移を予防する若しくはその発症を遅延させること、又はそれらの何らかの組合せを指すことができる。

10

【0042】

用語「腫瘍」は、本明細書で用語「がん」と互換的に使用され、例えば、両方の用語は、固形及び液体、例えば、びまん性又は循環する腫瘍を包含する。本明細書で使用される場合、用語「がん」又は「腫瘍」は、前悪性と共に悪性のがん及び腫瘍を含む。

20

【0043】

用語「変異した誘導体」、「変異体」又は「機能的な誘導体」は、1個又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は挿入によって参照する親配列とは異なる配列を名付ける。好ましくは、変異した誘導体は、ネイティブ配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるアミノ酸配列を有する。

【0044】

セツキシマブ(Erbix(登録商標);ImClone/Lilly社、Merck-Serono社)は、上皮成長因子受容体(EGFR)を標的化するキメラマウス-ヒトモノクローナル抗体(ATCC HB-9764&ATCC-97-63)である。EP0359282、EP0667165及びUS6217866も参照されたい。セツキシマブは、結腸直腸がん及び頭頸部の扁平上皮癌の処置としての使用のために承認される。

30

【0045】

トラスツマブ(Herceptin(登録商標);Genentech/Roche社)は、HER2/neu受容体に干渉するヒト化IgG1である。EP0590058、US5821337、US8075890、US6407213、US6054297、US5772997、US6165464、US6399063及びUS6639055も参照されたい。その適応症は、アジュバント並びに転移性乳及び転移性胃がんの処置である。

【0046】

パトリツマブ(U1-59/U3-1287/AMG888)は、その標的に対し1~3nM親和性を保有する、IgG1様アイソタイプを有する完全にヒト抗HER3モノクローナル抗体であり、HER3の膜近傍部分に対して作製されている。パトリツマブは、肺、頭頸部及び乳がんモデルにおいてin vitro及びin vivoで有望な抗腫瘍効果を示し、それによるとこれは、HER3リン酸化を有効に遮断し、HER3受容体を分解し、腫瘍負荷を低減させる。

40

【0047】

マツズマブ(EMD72000)は、ヒトA431扁平上皮癌細胞で免疫化されたBALB/cマウス脾臓からリンパ球雑種形成によって産生されたマウス抗体MAb425(EMD55900)に由来するヒト化IgG1である。マツズマブは、単独及び化学療法との組合せの両方で、多くのがんに対してフェーズI臨床試験において検査された。

【0048】

1. 二特異性抗原結合性断片の設計

50

本発明は、HER-3に対する1個の結合部位、及びHER-2又はEGFR抗原のいずれかから選択される別の抗原に対する1個の結合部位を含む二特異性二価抗原結合性断片を提供する。特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、HER-3及びHER-2に同時結合することが可能である。別の特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、HER-3及びEGFRに同時結合することが可能である。

【0049】

本発明の抗原結合性断片は、タンデムに配置されたFab断片から本質的になる。本発明は、2種のモノクローナル抗体「Ab1」及び「Ab2」の重鎖(VH)及び軽鎖(VL)可変領域のアミノ酸配列を使用して構築された二特異性抗原結合性断片であって、Ab1又はAb2の一方が、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab1又はAb2の他方が、トラスツマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される、二特異性抗原結合性断片に特に関する。

【0050】

前記二特異性抗原結合性断片は、

(i) 抗体1(Ab1)のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

(ii) 抗体2(Ab2)のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

を含み、Ab1のFab断片のVHドメインのN末端側の端は、ポリペプチドリンカーを介してAb2のFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結されており、

Ab1又はAb2の一方は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、

Ab1又はAb2の他方は、トラスツマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される。

【0051】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、異なるCH1及びCLドメインを有する2個のFab断片を含む。好まれる実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、

(i) ヒトIgG1/カッパーに由来するCH1及びCLドメイン並びにAb1のVH及びVLドメインを有するFab断片、

(ii) ヒトIgG1/カッパーに由来するCH1及びCLドメイン並びにAb2のVH及びVLドメインを有するFab断片

からなる、異なるCH1及びCLドメインを有する2個のFab断片を含む。

【0052】

特定の実施形態では、Ab1は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab2は、トラスツマブ又はその機能的な誘導体である。別の特定の実施形態では、Ab1は、トラスツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab2は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体である。

【0053】

特定の実施形態では、Ab1は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab2は、セツキシマブ又はその機能的な誘導体である。別の特定の実施形態では、Ab1は、セツキシマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab2は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体である。

【0054】

特定の実施形態では、Ab1は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab2は、マツズマブ又はその機能的な誘導体である。別の特定の実施形態では、Ab1は、マツズマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab2は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体である。

【0055】

好まれる実施形態では、Ab2は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab1は、トラスツマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される。

【0056】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片を含み、

- VHドメインは、配列番号5又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

- VLドメインは、配列番号6又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

CH1ドメインは、好ましくは、ヒトIgG1のCH1定常ドメイン又はその変異した誘導体であり、

CLドメインは、好ましくは、ヒトカッパー定常ドメイン又はその変異した誘導体である。

【0057】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、セツキシマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片を含み、

- VHドメインは、配列番号7又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

- VLドメインは、配列番号8又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

CH1ドメインは、好ましくは、ヒトIgG1のCH1定常ドメイン又はその変異した誘導体であり、

CLドメインは、好ましくは、ヒトカッパー定常ドメイン又はその変異した誘導体である。

【0058】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、トラスツズマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片を含み、

- VHドメインは、配列番号9又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

- VLドメインは、配列番号10又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

CH1ドメインは、好ましくは、ヒトIgG1のCH1定常ドメイン又はその変異した誘導体であり、

CLドメインは、好ましくは、ヒトカッパー定常ドメイン又はその変異した誘導体である。

【0059】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、マツズマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片を含み、

- VHドメインは、配列番号11又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

- VLドメインは、配列番号12又はその変異した誘導体を含む、好ましくは、それからなり、

CH1ドメインは、好ましくは、ヒトIgG1のCH1定常ドメイン又はその変異した誘導体であり、

CLドメインは、好ましくは、ヒトカッパー定常ドメイン又はその変異した誘導体である。

【0060】

変異した誘導体

本発明は、野生型配列(パトリツマブ、マツズマブ、セツキシマブ又はトラスツズマブの)又はその変異した誘導体(derivate)を利用する。

【0061】

用語「変異した誘導体」、「変異体」又は「機能的な誘導体」は、1個又は数個のアミノ酸の欠失、置換又は挿入によって参照する親配列とは異なる配列を名付ける。好ましくは、変異した誘導体又は機能的なバリエーションは、ネイティブ配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるアミノ酸配列を有する。特定の実施形態では、変異は、抗体の機能に実質的には影響しない。

10

20

30

40

50

【0062】

変異した誘導体又は機能的なバリエーションは、本明細書に列挙されている参照配列のいずれかと少なくとも80%(例えば、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%)同一であるアミノ酸配列を含むVH鎖、本明細書に列挙されている参照配列のいずれかと少なくとも80%(例えば、少なくとも85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%)同一であるアミノ酸配列を有するVL鎖、又はその両方を含むことができる。パトリツマブの機能的なバリエーションは、HER3に結合することが可能である。セツキシマブの機能的なバリエーションは、EGFRに結合することが可能である。マツズマブの機能的なバリエーションは、EGFRに結合することが可能である。トラスツズマブの機能的なバリエーションは、HER2に結合することが可能である。

10

【0063】

一部の例では、バリエーションは、上に記載されている参照抗体と比べて同様の抗原結合親和性を保有する(例えば、 1×10^{-8} 未満、好ましくは、 1×10^{-9} 又は 1×10^{-10} M未満のKdを有する)。一部の実施形態では、本来の(original)抗体の機能的なバリエーションは、同じ結合特異性を有し、本来の抗体の親和性の少なくとも50%、例えば、少なくとも60%、70%、80%又は少なくとも90%であるその標的との親和性を有する。

【0064】

結合の親和性は、ka(会合速度定数)、kd(解離速度定数)又はKD(平衡解離)という用語によって定義される。典型的には、特異的に結合するとは、抗体に関して使用される場合、 10^{-8} M未満、例えば、 10^{-9} M又は 10^{-10} M未満の親和性(KD)値でその標的に特異的に結合する(「認識する」)抗体を指す。より低いKD値は、より高い結合親和性(即ち、より強い結合)を表すため、 10^{-9} のKD値は、 10^{-8} のKD値よりも高い結合親和性を示す。

20

【0065】

2種のアミノ酸配列の「パーセント同一性」は、Karlin及びAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873~77頁、1993の通りに改変されたKarlin及びAltschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264~68頁、1990のアルゴリズムを使用して決定される。そのようなアルゴリズムは、Altschulら、J. Mol. Biol. 215:403~10頁、1990のNBLAST及びXBLASTプログラム(バージョン2.0)に取り込まれる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて行って、目的のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。2種の配列の間にギャップが存在する場合、Altschulら、Nucleic Acids Res. 25(17):3389~3402頁、1997に記載されている通りにGapped BLASTを利用することができる。BLAST及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLAST及びNBLAST)のデフォルトパラメータを使用することができる。

30

【0066】

他の実施形態では、本明細書に記載されている機能的なバリエーションは、好ましくは、CDRの1個又は複数と相互作用すると予測される残基において発生しない1個又は複数の変異(例えば、保存的置換)を含有することができる。

【0067】

参照抗体と実質的に同一である変異した誘導体又は機能的なバリエーションが本明細書に記載されている。

40

【0068】

用語「実質的に同一」又は「僅かな(insubstantial)」は、バリエーションが、参照抗体と比べて実質的に同様の結合活性(例えば、親和性、特異性又はその両方)及び生物活性を有するように、バリエーションの関連するアミノ酸配列(例えば、フレームワーク領域(FR)、CDR、VH又はVLドメインにおける)が、参照抗体と比較して僅かに異なる(例えば、保存的アミノ酸置換を含む)ことを意味する。そのようなバリエーションは、指定の領域の5アミノ酸配列において軽微なアミノ酸変化、例えば、1又は2個の置換を含むことができる。一般に、抗体の結合機能に有害に影響する(本来の抗体と比較して50%を超える結合親和

50

性の低減等)ことのない限り、より多くの置換を、CDR領域とは対照的にFR領域において為すことができる。一部の実施形態では、配列同一性は、本来の抗体及び改変された抗体の間で約85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上であり得る。一部の実施形態では、改変された抗体は、同じ結合特異性を有し、本来の抗体の親和性の少なくとも50%を有する。一部の実施形態では、変異は、CDR領域内に発生しない。

【0069】

保存的置換は、そのような改変が為される元の分子と同様の機能的及び化学的特徴を有する分子を産生するであろう。例えば、「保存的アミノ酸置換」は、当該位置におけるアミノ酸残基の極性又は電荷に効果がほとんど又は全くないような、ネイティブアミノ酸残基の、別の残基による置換が関与することができる。所望のアミノ酸置換(保存的であれ非保存的であれ)は、当業者によって決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、分子配列の重要な残基を同定することができる、又は本明細書に記載されている分子の親和性を増加若しくは減少させることができる。1個又は複数の保存的アミノ酸置換を含むバリエーションは、当業者に知られたポリペプチド配列を変更させるための方法、例えば、そのような方法を編集する参考文献、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、J. Sambrookら編、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989又はCurrent Protocols in Molecular Biology、F.M. Ausubelら編、John Wiley & Sons, Inc.、New Yorkに見出されるもの等に従って調製することができる。アミノ酸の保存的置換は、次の群内のアミノ酸の間で為される置換を含む:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;及び(g)E、D。

【0070】

本開示はまた、抗体の改善された生物学的特性、例えば、より高い若しくは低い結合親和性を有する、又は変更されたADCC特性を有する、又はHER3、EGFR及び/若しくはHER2発現細胞の生存率阻害の変更された効果を有する抗体バリエーションを提供する。

【0071】

抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することにより、又はペプチド合成により調製することができる。そのような改変は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失及び/又はそれへの挿入及び/又はその置換を含む。最終構築物を達成するために欠失、挿入及び置換のいかなる組合せが為されてもよいがただし、最終構築物が所望の特徴を保有することを条件とする。抗体のアミノ酸配列バリエーションをコードする核酸分子は、当技術分野で知られた種々の方法によって調製することができる。そのような方法は、抗体のより初期に調製されたバリエーション又は非バリエーション(天然)バージョンのオリゴヌクレオチド媒介性(又は部位指向性)変異誘発、PCR変異誘発及びカセット変異誘発を含むがこれらに限定されない。一実施形態では、本発明の抗体の平衡解離定数(KD)値は、 10^{-8} M未満、特に、 10^{-9} M又は 10^{-10} M未満である。結合親和性は、当技術分野で知られた技法、例えば、ELISA若しくは生体分子特異的相互作用解析、又は当技術分野で知られた他の技法を使用して決定することができる。

【0072】

ルーチン方法に従って、本明細書に記載されている抗体のいずれかを試験して、その特性、例えば、抗原結合活性、抗原結合特異性及び生物学的機能を決定することができる。

【0073】

本明細書に記載されている抗体のいずれかは、例えば、ペグ化、高度グリコシル化、毒素のコンジュゲーション、放射性標識その他により、当技術分野で知られており容易に利用できる追加の非タンパク質性部分を含有するように改変することができる。血清半減期を増強することができる改変が興味深い。

【0074】

本発明の抗体は、グリコシル化されていてもされていなくてもよい、又は種々のグリコシル化プロファイルを示すことができる。好まれる実施形態では、抗体は、重鎖及び軽鎖の可変領域ではグリコシル化されていないが、Fc領域ではグリコシル化されている。

【0075】

例えば、セツキシマブのVHドメインにおけるN-グリコシル化部位を除去するために、Kabat位置H85におけるAsnは、配列番号77の配列に従ってアスパラギン酸(D)に変異される、又はKabat位置H85におけるAsnは、配列番号78の配列に従ってグルタミン酸(E)に変異される。

【0076】

セツキシマブのある特定の変異した誘導体は、その本来の形態においてマウス起源の重鎖及び軽鎖可変領域を有するキメラ抗体である、参照セツキシマブ抗体のヒト化形態である。ヒト化アプローチにおいて、ドナーマウス可変領域由来の相補性決定領域(CDR)及びある特定の他のアミノ酸は、ヒト可変アクセプター領域にグラフトされ、次いでヒト定常領域に接続される;いくつかのCDRアミノ酸は、アクセプター領域のヒト生殖系列配列に見出されるアミノ酸によって更に置き換えられてよい。例えば、Riechmannら、Nature 332:323~327頁(1988);米国特許第5,225,539号を参照されたい。

【0077】

本発明は、セツキシマブの軽鎖及び/又は重鎖のヒト化バージョンを含有する二特異性抗原結合性断片を更に包含する。

【0078】

特定の実施形態では、Ab1又はAb2は、セツキシマブ又はセツキシマブのヒト化バージョンである。特定の実施形態では、セツキシマブのヒト化形態は、配列番号7と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するVHドメイン;及び配列番号8と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%又は少なくとも99%同一であるアミノ酸配列を有するVLドメインを有する。

【0079】

特定の実施形態では、セツキシマブのヒト化形態は、特許出願WO2012020059に記載されているいずれかのヒト化形態である。

【0080】

特定の実施形態では、Ab1又はAb2は、EGFRに結合することが可能であり、

- 配列番号49のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号50のアミノ酸配列を有するCDR2及び配列番号51のアミノ酸配列を有するCDR3を含む重鎖可変領域(VH);並びに/又は
- 配列番号52のアミノ酸配列を有するCDR1、配列番号53のアミノ酸配列を有するCDR2及び配列番号54のアミノ酸配列を有するCDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、セツキシマブのヒト化形態である。

【0081】

一実施形態では、ヒト化セツキシマブの重鎖可変領域(VH)のフレームワーク領域1、2及び3のうち少なくとも2個、好ましくは、全ては、配列番号55を含むアミノ酸配列をコードするヒト生殖系列VH遺伝子4-59*01に由来するか又はそれに対応する。更に、重鎖可変領域(VH)のフレームワーク領域4は、好ましくは、配列番号56を含むアミノ酸配列をコードするヒト生殖系列遺伝子JH1に由来するか又はそれに対応する。一実施形態では、ヒト化セツキシマブの軽鎖可変領域(VL)のフレームワーク領域1、2及び3のうち少なくとも1個は、配列番号57を含むアミノ酸配列をコードするヒト生殖系列VL遺伝子6-21*01に由来するか又はそれに対応する。好ましくは、軽鎖可変領域のフレームワーク領域1、2及び3のうち少なくとも2個、より好ましくは、全3個は、配列番号57を含むアミノ酸配列をコードするヒト生殖系列VL遺伝子6-21*01に由来するか又はそれに対応する。更に、軽鎖可変領域(VL)のフレームワーク領域4は、好ましくは、配列番号58を含むアミノ酸配列をコードするヒト生殖系列遺伝子JK2に由来するか又はそれに対応する。

【0082】

好ましくは、ヒト化セツキシマブは、配列番号59のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(

VH)及び/又は配列番号60のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。重鎖可変領域(VH)は、好ましくは、配列番号61～68からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号63のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ヒト化セツキシマブの重鎖可変領域(VH)は、好ましくは、配列番号81のアミノ酸配列を含む。更に、軽鎖可変領域(VL)は、好ましくは、配列番号69～72からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号71のアミノ酸配列を含む。配列番号63のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)及び配列番号71のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含むヒト化抗体が特に好まれる。配列番号81のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)及び配列番号71のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含むヒト化セツキシマブが別の特に好まれるものである。

10

【0083】

特定の実施形態では、ヒト化セツキシマブは、

- 配列番号81のVHドメイン及び配列番号2のCH1ドメイン(配列番号83のVH-CH1配列に対応する)
 - 配列番号71のVLドメイン及び配列番号4のCLドメイン(配列番号84のVL-CL配列に対応する)
- を含む。

【0084】

特定の実施形態では、ヒト化セツキシマブは、配列番号59と又は配列番号61～68と、特に、配列番号63のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%又は少なくとも99%同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む。特定の実施形態では、ヒト化セツキシマブは、配列番号60と又は配列番号69～72と、特に、配列番号71のアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%又は少なくとも99%同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。

20

【0085】

一部の例では、Ab1又はAb2は、次のものを含むヒト化セツキシマブである：

- IMGT/遺伝子データベースにおいて定義されているヒト免疫グロブリン遺伝子カップー可変6-11アレル02(IGKV6-21*02)に基づくセツキシマブの軽鎖ヒト化バージョン、

30

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPDQSPKLLIKYASESISGV
PSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNNNWPTTFGQGTKLEIK(配列番号73)
配列中、次のKabat位置において、アミノ酸残基は以下の通りである：

Kabat位置L31は、Thr又はSer

Kabat位置L32は、Asn又はSer

Kabat位置L33は、Ile又はLeu

Kabat位置L53は、Glu又はGln

Kabat位置L89は、Gln又はHis

必要に応じて、Kabat位置L91は、Asn、Ser、His、Lys又はArg

Kabat位置L92は、Asn、Ser、His、Lys又はArg

40

Kabat位置L93は、Asn、Ser、His、Lys又はArg

Kabat位置L94は、Trp、Tyr又はPhe

Kabat位置L96は、Thr又はTyr。

【0086】

明確化を目的として、L31は、軽鎖における残基31を指す。

- IMGT/遺伝子データベースにおいて定義されているヒト免疫グロブリン遺伝子カップー可変3-11アレル01(IGKV3-11*01)に基づくセツキシマブの軽鎖ヒト化バージョン、

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSIGTNIHWYQQKPGQAPRLLIKYASESISGIP
ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQNNNWPTTFGQGTKLEIK(配列番号74)

50

配列中、次のKabat位置において、アミノ酸残基は以下の通りである：

Kabat位置L29は、Ile又はVal

Kabat位置L30は、Gly又はSer

Kabat位置L31は、Thr又はSer

Kabat位置L32は、Asn又はTyr

Kabat位置L33は、Ile又はLeu

Kabat位置L34は、His又はAla

Kabat位置L49は、Lys又はTyr

Kabat位置L50は、Tyr又はAsp

Kabat位置L53は、Glu又はAsn

Kabat位置L54は、Ser又はArg

Kabat位置L55は、Ile又はAla

Kabat位置L56は、Ser又はThr

必要に応じて、Kabat位置L91は、Asn、Arg、His又はLys

Kabat位置L92は、Asn、Ser、His、Lys又はArg

Kabat位置L94は、Trp、Tyr又はPhe

Kabat位置L96は、Thr又はTyr。

- IMGT/遺伝子データベースにおいて定義されているヒト免疫グロブリン遺伝子重可変4-59アレル01(IGHV4-59*01)に基づくセツキシマブmAbの重鎖ヒト化バージョン、QVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQPPGKGLEWLGVIWSSGN TDYNTPLTSRLTISKDNSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARALTYDYEFAYWGQGT LVTVSS(配列番号75)

配列中、次のKabat位置において、アミノ酸残基は以下の通りである：

Kabat位置H29は、Leu又はIle

Kabat位置H30は、Thr又はSer

Kabat位置H31は、Asn又はSer

Kabat位置H33は、Gly又はTyr

Kabat位置H35は、His又はSer

Kabat位置H37は、Val又はIle

Kabat位置H48は、Leu又はIle

Kabat位置H50は、Val又はTyr

Kabat位置H52は、Trp、Tyr又はPhe

Kabat位置H53は、Ser又はTyr

Kabat位置H54は、Gly又はSer

Kabat位置H56は、Asn又はSer

Kabat位置H58は、Asp又はAsn

Kabat位置H61は、Thr又はPro

Kabat位置H62は、Pro又はSer

Kabat位置H64は、Thr又はLys

Kabat位置H67は、Leu又はVal

Kabat位置H73は、Asn又はThr

Kabat位置H78は、Val又はPhe。

【0087】

明確化を目的として、H29は、重鎖における残基29を指す。

- IMGT/遺伝子データベースにおいて定義されているヒト免疫グロブリン遺伝子重可変3-33アレル01(IGHV3-33*01)に基づくセツキシマブmAbの重鎖ヒト化バージョン、QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAVSGFSLTNYGVHWVRQAPGKGLEWLGVIWSSGN TDYNTPTVTSRFTISKDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARALTYDYEFAYWGQG TLVTVSS(配列番号76)

配列中、次のKabat位置において、アミノ酸残基は以下の通りである：

Kabat位置H28は、Ser又はThr
Kabat位置H30は、Thr又はSer
Kabat位置H48は、Leu又はVal
Kabat位置H49は、Gly又はAla
Kabat位置H53は、Ser又はAsp
Kabat位置H55は、Gly又はSer
Kabat位置H57は、Lys又はThr
Kabat位置H58は、Asp又はTyr
Kabat位置H60は、Asn又はAla
Kabat位置H61は、Thr又はAsp
Kabat位置H62は、Pro又はSer
Kabat位置H64は、Thr又はLys
Kabat位置H65は、Ser又はGly
Kabat位置H78は、Val又はLeu。
【0088】

10

特定の実施形態では、Ab1のFab断片及び/又はAb2のFab断片は、Fab重鎖とFab軽鎖の対形成を容易にするためのVH/VLドメインにおける変異を含む。具体的な変異は、全て参照により本明細書に組み込む国際特許出願WO2020/136566に記載されている。
【0089】

20

特定の実施形態では、Ab1のFab断片及び/又はAb2のFab断片は、Kabat位置39における残基がグルタミンからリジンへと変異された、変異したVHドメイン;及びKabat位置38における残基がグルタミンからグルタミン酸へと変異された、VLドメインを含む。
【0090】

特定の実施形態では、Ab1のFab断片及び/又はAb2のFab断片は、Kabat位置39における残基がグルタミンからリジンへと変異された、変異したVHドメイン;及びKabat位置38における残基がグルタミンからアスパラギン酸へと変異された、VLドメインを含む。
【0091】

30

特定の実施形態では、Ab1のFab断片及び/又はAb2のFab断片は、Kabat位置39における残基がグルタミンからグルタミン酸へと変異された、変異したVHドメイン;及びKabat位置38における残基がグルタミンからリジンへと変異された、VLドメインを含む。
【0092】

CH1/CL変異したドメイン

Fabドメインのアセンブリーは、ペプチドリinkerを使用しない、軽鎖及び重鎖の天然の対形成により達成される。軽鎖及び重鎖の間のコグネート対形成の傾向を最大化するために、Fab断片における軽鎖及び重鎖の界面(CL/CH1界面)における変異の導入を企図することができる。
【0093】

特定の実施形態では、Ab1及び/又はAb2のCH1ドメインは、いずれかのアロタイプのヒトIgG1由来のCH1定常ドメイン又はその変異した誘導体である。特定の実施形態では、Ab1及び/又はAb2のCH1ドメインは、G1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1のCH1ドメイン又はその変異した誘導体である。別の特定の実施形態では、Ab1及び/又はAb2のCH1ドメインは、G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH1ドメイン又はその変異した誘導体である。
【0094】

40

好まれる実施形態では、各CH1ドメインは、少なくとも1個の変異を保有し、各CL1ドメインも、少なくとも1個の変異を保有し、これらの変異は、CH1及びCL1ドメインの正しいコグネート対形成が改善されるように選択される。
【0095】

これらの変異は、次のリストから選択することができる:

- de novo導入されたイオン対又はFab断片の重鎖及び軽鎖の界面に既に存在するネ

50

イティブイオン対の逆極性荷電変異;

- 「ノブホール(knobs-into-holes)」変異;
- 強く極性から高度に疎水性へと(逆もまた同じ)それらを変化させるための、Fab断片における重鎖及び軽鎖界面の反対側の定常領域の表面を直す(resurface)変異。

【0096】

よって、変異のいくつかのセットは、より詳細に下に記載される通り、好適である。

【0097】

注目すべきことに、本明細書を通して、CH1及びCLドメインについて本明細書で使用されているアミノ酸配列及び配列位置番号は、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.(1991)に従って定義される。

【0098】

CLカップードメインにおける変異され得る残基は、例えば、S114、F116、F118、E123(例えば、E123K)、Q124、T129、S131、V133、L135、N137、Q160、S162、S174、S176、T178及びT180からなる群から選択され得る。

【0099】

CH1ドメインにおける変異され得る残基は、例えば、L124、A139、L143、D144、K145、D146、H172、F174、P175、Q179、S183、S188、V190、T192及びK221(例えば、K221E)からなる群から選択され得る。

【0100】

具体的な変異は、全て参照により本明細書に組み込む米国特許出願第2014/0200331号、米国特許出願第2014/150973号、米国特許出願第2014/0154254号及び国際特許出願WO2007/147901に記載されている。

【0101】

CH1/CL変異した誘導体の例は、下に記載される。

【0102】

特定の実施形態によると、二特異性抗原結合性断片は、

- 配列番号1に対応する、ヒトIgG1由来の変異したCH1定常ドメイン(Kabat位置192における残基が、スレオニンからグルタミン酸(E)に変異された);
 - 配列番号45に対応する、ヒトIgG1由来の変異したCH1定常ドメイン(Kabat位置192における残基が、スレオニンからアスパラギン酸(D)に変異された);
 - 配列番号2に対応する、ヒトIgG1由来の変異したCH1定常ドメイン(Kabat位置143における残基が、ロイシンからグルタミン(Q)に変異され;Kabat位置188における残基が、セリンからバリン(V)に変異された);
 - 配列番号46に対応する、ヒトIgG1由来の変異したCH1定常ドメイン(Kabat位置124における残基が、ロイシンからグルタミン(Q)に変異された;Kabat位置188における残基が、セリンからバリン(V)に変異された);
 - 配列番号3に対応する、変異したヒトカップー定常ドメイン(Kabat位置114における残基が、セリンからアラニン(A)に変異され、Kabat位置137における残基が、アスパラギンからリジン(K)に変異された);
 - 配列番号4に対応する、変異したヒトカップー定常ドメイン(Kabat位置133における残基が、バリンからスレオニン(T)に変異され、Kabat位置176における残基が、セリンからバリン(V)に変異された)
- を含む。

【0103】

好まれる実施形態では、相互作用する極性界面残基の対は、中性及び塩橋形成残基の対と交換される。CH1鎖におけるThr192のグルタミン酸又はアスパラギン酸による置換え、及びCL鎖におけるAsn137のLysへの交換を、必要に応じて、前記CLドメインの位置114におけるセリン残基のアラニン残基による置換えと共に選択することができる。

【0104】

10

20

30

40

50

変異の別のセットにおいて、CH1ドメインのLeu143をGln残基によって置き換えることができる一方、Val33であるCL鎖の直面する残基は、Thr残基によって置き換えられる。この最初の二重変異は、疎水性相互作用から極性相互作用へのスイッチを構成する。同時に2個の相互作用するセリン(CH1鎖におけるSer18及びCL鎖におけるSer176)からバリン残基への変異は、極性相互作用から疎水性相互作用へのスイッチを達成することができる。

【0105】

更に別の実施形態では、変異は、CH1ドメインの位置124におけるロイシン残基のグルタミンによる置換及びCH1ドメインの位置188におけるセリン残基のバリン残基による置換;並びにCLドメインの位置133におけるバリン残基のスレオニン残基による置換及び前記CLドメインの位置176におけるセリン残基のバリン残基による置換を含むことができる。

【0106】

「ノブホール(knob into holes)」変異は、CH1ドメインのLeu124及びLeu143がそれぞれAla及びGlu残基によって置き換えられた一方でCL鎖のVal33がTrp残基によって置き換えられた、変異のセット(KH1)を含み、一方、H2と命名された変異のセットにおいて、CH1ドメインのVal90はAla残基によって置き換えられ、CL鎖のLeu135及びAsn137はそれぞれTrp及びAla残基によって置き換えられた。

【0107】

好まれる変異は、下のtable(表1)に開示される:

【0108】

【表1】

好まれる変異 (LC は軽鎖であり、HC は重鎖である)	変異セットの名称
LC(S114A/N137K), HC(T192E)	CR3変異
LC(S114A/N137K), HC(T192D)	CC1変異
LC(V133T/S176V), HC(L143Q/S188V)	Mut4
LC(V133T/S176V), HC(L124Q/S188V)	ML1

【0109】

特定の実施形態では、多特異性抗体は、二重変異を保有することができ、例えば、一方のFabがCR3変異を有し、他方のFabがMut4変異を有する。

【0110】

二特異性抗原結合性断片は、より具体的に記載され、それによると、Ab1又はAb2は、

- 配列番号5又はその変異した誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号1、配列番号2、配列番号45、配列番号46及び配列番号47からなる群から選択されるCH1ドメイン、

- 配列番号6又はその変異した誘導体からなるVLドメイン、
- 配列番号3、配列番号4及び配列番号48からなる群から選択されるCLドメイン

を含むパトリツマブ又はその変異した誘導体であり、CL及びCH1ドメインは、好ましくは、次の通りに会合する:

- 配列番号48と配列番号47、
- 配列番号3と配列番号1又は配列番号45のいずれか、
- 配列番号4と配列番号2又は配列番号46のいずれか。

【0111】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

10

20

30

40

50

- 配列番号5又はその変異した誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号1又はその変異した誘導体からなるCH1ドメイン、
- 配列番号6又はその変異した誘導体からなるVLドメイン、
- 配列番号3又はその変異した誘導体からなるCLドメイン

を含むパトリツマブ又はその変異した誘導体である。

【0112】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

- 配列番号13又は配列番号13と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVH-CH1重鎖;及び

10

- 配列番号14又は配列番号14と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVL-CL軽鎖

を含むパトリツマブ又はその変異した誘導体である。

【0113】

二特異性抗原結合性断片は、より具体的に記載され、それによると、Ab1又はAb2は、

- 配列番号7、その変異した誘導体又はそのヒト化された誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号1、配列番号2、配列番号45、配列番号46及び配列番号47からなる群から

選択されるCH1ドメイン、

- 配列番号8、その変異した誘導体又はそのヒト化された誘導体からなるVLドメイン、
- 配列番号3、配列番号4及び配列番号48からなる群から選択されるCLドメイン

20

を含むセツキシマブ又はその変異した誘導体であり、CL及びCH1ドメインは、好ましくは、次の通りに会合する:

- 配列番号48と配列番号47、
- 配列番号3と配列番号1又は配列番号45のいずれか、
- 配列番号4と配列番号2又は配列番号46のいずれか。

【0114】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

- 配列番号7、その変異した誘導体又はそのヒト化された誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号2又はその変異した誘導体からなるCH1ドメイン、
- 配列番号8、その変異した誘導体又はそのヒト化された誘導体からなるVLドメイン、
- 配列番号4又はその変異した誘導体からなるCLドメイン

30

を含むセツキシマブ又はその変異した誘導体である。

【0115】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

- 配列番号15又は配列番号15と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVH-CH1重鎖;及び

- 配列番号16又は配列番号16と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVL-CL軽鎖

40

を含むセツキシマブ又はその変異した誘導体である。

【0116】

二特異性抗原結合性断片は、より具体的に記載され、それによると、Ab1又はAb2は、

- 配列番号9又はその変異した誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号1、配列番号2、配列番号45、配列番号46及び配列番号47からなる群から

選択されるCH1ドメイン、

- 配列番号10又はその変異した誘導体からなるVLドメイン、
- 配列番号3、配列番号4及び配列番号48からなる群から選択されるCLドメイン

を含むトラスツマブ又はその変異した誘導体であり、CL及びCH1ドメインは、好まし

50

くは、次の通りに会合する：

- 配列番号48と配列番号47、
- 配列番号3と配列番号1又は配列番号45のいずれか、
- 配列番号4と配列番号2又は配列番号46のいずれか。

【0117】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

- 配列番号9又はその変異した誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号2又はその変異した誘導体からなるCH1ドメイン、
- 配列番号10又はその変異した誘導体からなるVLドメイン、
- 配列番号4又はその変異した誘導体からなるCLドメイン

を含むトラスツズマブ又はその変異した誘導体である。

【0118】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

- 配列番号17又は配列番号17と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVH-CH1重鎖；及び

- 配列番号18又は配列番号18と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVL-CL軽鎖

を含むトラスツズマブ又はその変異した誘導体である。

【0119】

二特異性抗原結合性断片は、より具体的に記載され、それによると、Ab1又はAb2は、

- 配列番号11又はその変異した誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号1、配列番号2、配列番号45、配列番号46及び配列番号47からなる群から選択されるCH1ドメイン、

- 配列番号12又はその変異した誘導体からなるVLドメイン、

- 配列番号3、配列番号4及び配列番号48からなる群から選択されるCLドメイン

を含むマツズマブ又はその変異した誘導体であり、CL及びCH1ドメインは、好ましくは、次の通りに会合する：

- 配列番号48と配列番号47、
- 配列番号3と配列番号1又は配列番号45のいずれか、
- 配列番号4と配列番号2又は配列番号46のいずれか。

【0120】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

- 配列番号11又はその変異した誘導体からなるVHドメイン、
- 配列番号2又はその変異した誘導体からなるCH1ドメイン、
- 配列番号12又はその変異した誘導体からなるVLドメイン、
- 配列番号4又はその変異した誘導体からなるCLドメイン

を含むマツズマブ又はその変異した誘導体である。

【0121】

好ましくは、Ab1又はAb2は、

- 配列番号19又は配列番号19と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVH-CH1重鎖；及び

- 配列番号20又は配列番号20と少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、96%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含むか又はそれからなるVL-CL軽鎖

を含むマツズマブ又はその変異した誘導体である。

【0122】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、

10

20

30

40

50

(i) トラスツズマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

(ii) パトリツマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

を含み、トラスツズマブのFab断片のVHドメインのN末端側の端は、ポリペプチドリンカーを介してパトリツマブのFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結され、トラスツズマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号17からなる、トラスツズマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号18からなる、パトリツマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号13からなる、及び/又はパトリツマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号14からなる。

10

【0123】

好まれる実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、配列番号21又はその機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる1個の重鎖、並びに配列番号18及び配列番号14又はそれらの機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる2個の異なる軽鎖を含む。

【0124】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、

(i) パトリツマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

(ii) トラスツズマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

20

を含み、パトリツマブのFab断片のVHドメインのN末端側の端は、ポリペプチドリンカーを介してトラスツズマブのFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結され、トラスツズマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号17からなる、トラスツズマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号18からなる、パトリツマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号13からなる、及び/又はパトリツマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号14からなる。

【0125】

好まれる実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、配列番号22又はその機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる1個の重鎖、並びに配列番号18及び配列番号14又はそれらの機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる2個の異なる軽鎖を含む。

30

【0126】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、

(i) セツキシマブ又はその機能的な若しくはヒト化された誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

(ii) パトリツマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

を含み、セツキシマブのFab断片のVHドメインのN末端側の端は、ポリペプチドリンカーを介してパトリツマブのFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結され、セツキシマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号15からなる、セツキシマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号16からなる、パトリツマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号13からなる、及び/又はパトリツマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号14からなる。

40

【0127】

好まれる実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、配列番号23又はその機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる1個の重鎖、並びに配列番号16及び配列番号14又はそれらの機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる2個の異なる軽鎖を含む。

【0128】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、

(i) パトリツマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

50

(ii) セツキシマブ又はその機能的な若しくはヒト化された誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

を含み、パトリツマブのFab断片のVHドメインのN末端側の端は、ポリペプチドリンカーを介してセツキシマブのFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結され、セツキシマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号15からなる、セツキシマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号16からなる、パトリツマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号13からなる、及び/又はパトリツマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号14からなる。

【0129】

好まれる実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、配列番号24又はその機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる1個の重鎖、並びに配列番号16及び配列番号14又はそれらの機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる2個の異なる軽鎖を含む。

【0130】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、

(i) マツズマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

(ii) パトリツマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

を含み、マツズマブのFab断片のVHドメインのN末端側の端は、ポリペプチドリンカーを介してパトリツマブのFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結され、マツズマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号19からなる、マツズマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号20からなる、パトリツマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号13からなる、及び/又はパトリツマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号14からなる。

【0131】

好まれる実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、配列番号25又はその機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる1個の重鎖、並びに配列番号20及び配列番号14又はそれらの機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる2個の異なる軽鎖を含む。

【0132】

特定の実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、

(i) パトリツマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片、及び

(ii) マツズマブ又はその機能的な誘導体のVL-CL軽鎖と会合したVH-CH1重鎖を含むFab断片

を含み、パトリツマブのFab断片のVHドメインのN末端側の端は、ポリペプチドリンカーを介してマツズマブのFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結され、マツズマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号19からなる、マツズマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号20からなる、パトリツマブのVH-CH1重鎖は好ましくは、配列番号13からなる、及び/又はパトリツマブのVL-CL軽鎖は好ましくは、配列番号14からなる。

【0133】

好まれる実施形態では、二特異性抗原結合性断片は、配列番号26又はその機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる1個の重鎖、並びに配列番号20及び配列番号14又はそれらの機能的なバリエーションを含むか又はそれからなる2個の異なる軽鎖を含む。

【0134】

リンカーの設計

ポリペプチドリンカーは、Ab1のFab断片のVHドメインのN末端側の端をAb2のFab断片のCH1ドメインのC末端側の端に連結するために使用される。

【0135】

本発明の文脈において、用語「ポリペプチドリンカー配列」は、約20～80アミノ酸、

10

20

30

40

50

好ましくは30～60アミノ酸の間、なお好ましくは、30～40アミノ酸の間のポリペプチドである。ポリペプチドリンカー配列は、典型的には、80アミノ酸未満、好ましくは60アミノ酸未満、なお好ましくは40アミノ酸未満からなる。有利には、リンカー配列は、ポリペプチドリンカーが、好ましくはヒト起源の、IgA、IgG及びIgDの中から選択される1種又は複数の免疫グロブリンのヒンジ領域の配列の全て又は一部を含むことを意味する、「ヒンジ由来」である。これは、「ヒンジ由来のポリペプチドリンカー配列」又は「シュード(pseudo)ヒンジリンカー」とも名付けられる。前記ポリペプチドリンカーは、ただ1種の免疫グロブリンのヒンジ領域の配列の全て又は一部を含むことができる。この場合、前記免疫グロブリンは、隣接CH1ドメインが由来する免疫グロブリンと同じアイソタイプ及びサブクラスに、又は異なるアイソタイプ(isotype)若しくはサブクラスに属することができる。その代わりに、前記ポリペプチドリンカーは、異なるアイソタイプ又はサブクラスの少なくとも2種の免疫グロブリンのヒンジ領域の配列の全て又は一部を含むことができる。この場合、CH1ドメインに直接後続するポリペプチドリンカーのN末端部分は、好ましくは、前記CH1ドメインが由来する免疫グロブリンと同じアイソタイプ及びサブクラスに属する免疫グロブリンのヒンジ領域の全て又は一部からなる。

10

【0136】

必要に応じて、前記ポリペプチドリンカーは、免疫グロブリンのCH2ドメインの2～15、好ましくは5～10個のN末端アミノ酸の配列を更に含むことができる。

【0137】

一部の 경우에는、ネイティブヒンジ領域由来の配列を使用することができる;他の場合には、これらの配列に点変異を生じさせることができ、特に、望まれない鎖内又は鎖間ジスルフィド結合を回避するために、ネイティブIgG1、IgG2又はIgG3ヒンジ配列における1個又は複数のシステイン残基の、アラニン又はセリンによる置換を生じさせることができる。

20

【0138】

特定の実施形態では、ポリペプチドリンカー配列は、アミノ酸配列EPKX1CDKX2HX3X4PPX5PAPELLGGPX6X7PPX8PX9PX10GG(配列番号33)(配列中、同一であるか又は異なるX1、X2、X3、X4、X5、X6、X7、X8、X9、X10は、いずれかのアミノ酸である)を含むか又はそれからなる。

【0139】

特定の実施形態では、同一であるか又は異なるX1、X2及びX3は、スレオニン(T)又はセリン(S)である。

30

【0140】

別の特定の実施形態では、同一であるか又は異なるX1、X2及びX3は、Ala(A)、Gly(G)、Val(V)、Asn(N)、Asp(D)及びIle(I)からなる群から選択され、なお好ましくは、同一であるか又は異なるX1、X2及びX3は、Ala(A)又はGly(G)であり得る。

【0141】

その代わりに、同一であるか又は異なるX1、X2及びX3は、Leu(L)、Glu(E)、Gln(Q)、Met(M)、Lys(K)、Arg(R)、Phe(F)、Tyr(T)、His(H)、Trp(W)、好ましくはLeu(L)、Glu(E)又はGln(Q)であり得る。

40

【0142】

特定の実施形態では、同一であるか又は異なるX4及びX5は、セリン(S)、システイン(C)、アラニン(A)及びグリシン(G)からなる群から選択されるいずれかのアミノ酸である。

【0143】

好まれる実施形態では、X4は、セリン(S)又はシステイン(C)である。

【0144】

好まれる態様では、X5は、アラニン(A)又はシステイン(C)である。

【0145】

特定の実施形態では、同一であるか又は異なるX6、X7、X8、X9、X10は、スレオニ

50

ン(T)又はセリン(S)以外のいずれかのアミノ酸である。好ましくは、同一であるか又は異なるX6、X7、X8、X9、X10は、Ala(A)、Gly(G)、Val(V)、Asn(N)、Asp(D)及びIle(I)からなる群から選択される。

【0146】

その代わりに、同一であるか又は異なるX6、X7、X8、X9、X10は、Leu(L)、Glu(E)、Gln(Q)、Met(M)、Lys(K)、Arg(R)、Phe(F)、Tyr(T)、His(H)、Trp(W)、好ましくはLeu(L)、Glu(E)又はGln(Q)であり得る。

【0147】

好まれる実施形態では、同一であるか又は異なるX6、X7、X8、X9、X10は、Ala(A)及びGly(G)からなる群から選択される。

【0148】

なお好まれる実施形態では、X6及びX7は、同一であり、好ましくは、Ala(A)及びGly(G)からなる群から選択される。

【0149】

好まれる実施形態では、ポリペプチドリンカー配列は、配列番号33の配列を含むか又はそれからなり、配列中、

同一であるか又は異なるX1、X2及びX3は、スレオニン(T)、セリン(S)であり；

X4は、セリン(S)又はシステイン(C)であり；

X5は、アラニン(A)又はシステイン(C)であり；

同一であるか又は異なるX6、X7、X8、X9、X10は、Ala(A)及びGly(G)からなる群から選択される。

【0150】

別の好まれる実施形態では、ポリペプチドリンカー配列は、配列番号33の配列を含むか又はそれからなり、配列中、

同一であるか又は異なるX1、X2及びX3は、Ala(A)又はGly(G)であり；

X4は、セリン(S)又はシステイン(C)であり；

X5は、アラニン(A)又はシステイン(C)であり；

同一であるか又は異なるX6、X7、X8、X9、X10は、Ala(A)及びGly(G)からなる群から選択される。

【0151】

特に、ポリペプチドリンカー配列は、

EPKSCDKTHTSPPAPAPELLGGPAAPPAPAPAGG(配列番号34)；

EPKSCDKTHTAPPAPAPELLGGPAAPPAPAPAGG(配列番号35)；

EPKSCDKTHTSPPAPAPELLGGPGGPPGPGPGGG(配列番号36)；

EPKSCDKTHTSPPAPAPELLGGPAAPPGPAPGGG(配列番号37)；

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSTPPTPSPSGG(配列番号38)；

及びEPKSCDKTHTSPPSPAPELLGGPSTPPTPSPSGG(配列番号39)

からなる群から選択される配列を含むか又はそれからなることができる。

【0152】

好ましくは、ポリペプチドリンカー配列は、配列番号34又は配列番号35のアミノ酸配列を含むか又はそれからなる。

【0153】

抗体が異なるFab断片を含む実施形態では、Fab断片を分離するポリペプチドリンカーは、同一であっても異なってもよい。

【0154】

2. 二特異性抗体の設計

本発明はまた、上に定義されている抗原結合性断片からそれぞれなる2個の同一の抗原結合性アームを含む二特異性分子に関する。好まれる実施形態では、二特異性分子は、全長抗体である。

【0155】

10

20

30

40

50

Fc媒介性効果がない抗体、又はそれが標的とする2種の抗原のそれぞれについて一価の抗体を得ることを望むのであれば、抗体は、Fc領域を含まないであろう。この場合、2個の抗原結合性アームは、例えば、

- Fab断片を分離するポリペプチドリinkerによって提供される鎖間ジスルフィド結合による抗原結合性アームのホモ二量体化によって;並びに/又は
- 各抗原結合性アームのC末端側の端における、鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にするシステイン残基を含有するポリペプチド伸長であって、非限定的な例として、例えばIgG1、IgG2若しくはIgG3のヒンジ配列であり得るポリペプチド伸長の付加、及びヒンジ様構造をもたらす前記ポリペプチド伸長のホモ二量体化により;
- 2個の抗原結合性アームの重鎖のC末端側の端を接続して、単一のポリペプチド鎖を形成し、互いに十分な距離に前記抗原結合性アームを維持する、リンカー、好ましくは、半硬性リンカーにより、
一体に連結されてよい。

10

【0156】

その代わりに、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、補体依存性細胞傷害(CDC)及び/若しくは抗体依存性ファゴサイトーシス(ADP)、又は2種の抗原のそれぞれに対する二価結合が所望される場合、本発明の多特異性抗体は、これらのエフェクター機能を提供するFcドメインを更に含むことができる。Fcドメインの選択は、所望のエフェクター機能の型に依存するであろう。

【0157】

20

本発明はまた、HER-3に対する2個の結合部位、及びHER-2又はEGFRのいずれかである別の抗原に対する2個の結合部位を含む二特異性四価抗体を提供する。より具体的には、本発明は、2個の同一の抗原結合性アーム(これにより対称的な抗体フォーマットを提供する)を含む二特異性抗体であって、各抗原結合性アームが、HER-3に対する1個の結合部位及びHER-2に対する1個の結合部位を含む、二特異性抗体に関する。本発明はまた、2個の同一の抗原結合性アーム(これにより対称的な抗体フォーマットを提供する)を含む二特異性抗体であって、各抗原結合性アームが、HER-3に対する1個の結合部位及びEGFRに対する1個の結合部位を含む、二特異性抗体に関する。

【0158】

特定の実施形態では、各抗原結合性アームは、上に定義されている二特異性抗原結合性断片からなる。

30

【0159】

好まれる実施形態では、リンカーは、テトラ-Fab二特異性抗体フォーマットにおいて2対のFabドメインを接続し、そのアミノ酸配列は、適切な軽鎖配列と同時発現される、リンカーによって接続された少なくとも2個のFabの重鎖配列と、それに続くヒンジ配列、それに続くFc配列を含む。

【0160】

IgG様構造を有する本発明の抗体の例は、図1に説明されている。

【0161】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、免疫グロブリン様構造を有し、

40

- 本明細書に記載されている二特異性抗原結合性断片からそれぞれなる2個の同一の抗原結合性アーム、並びに
- 好ましくは機能的である、即ち、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、ファゴサイトーシス及び補体依存性細胞傷害 (CDC)の活性化を可能にする、Fcドメインを含む。

【0162】

特定の実施形態では、本発明の二特異性抗体は、

- Fcから構築された継続的重鎖(ヒンジ-CH2-CH3)
- それに続く、抗体1(Ab1)のFab重鎖(CH1-VH)及び抗体2(Ab2)の連続的Fab重鎖

50

(CH1-VH)を含み、

後者は、上に記載されているポリペプチドリンカー配列によって接続され、

・ タンパク質発現の際に、その結果得られる重鎖は、ホモ二量体へとアセンブルし、一方、同時発現されたAb1の2個の軽鎖(VL-CL)及びAb2の2個の軽鎖(VL-CL)は、それらのコグネート重鎖と会合して、最終タンデムF(ab)'₂-Fc分子を形成し、Ab1又はAb2の一方は、パトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、Ab1又はAb2の他方は、トラスツマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な誘導体からなる群から選択される。

【0163】

ヒンジドメインが、Ab1のCH1ドメインのC末端側の端にCH2ドメインのN末端側の端を連結し、ポリペプチドリンカー配列が、Ab2のCH1ドメインのC末端側の端にAb1のVHドメインのN末端側の端を連結することが理解される。

【0164】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

・ 本明細書に記載されている二特異性抗原結合性断片からそれぞれなる2個の同一の抗原結合性アーム；

・ 免疫グロブリンの二量体化されたCH2及びCH3ドメイン

・ CH2ドメインのN末端側の端に抗原結合性アームのCH1ドメインのC末端側の端を連結する、免疫グロブリンのヒンジ領域

を含む免疫グロブリン様構造を有する。

【0165】

特定の実施形態では、CH2及び/又はCH3ドメインは、IgG1若しくはIgG4アイソタイプのCH2及びCH3ドメイン、又はその変異した誘導体である。好ましくは、CH2ドメインは、ヒトIgG1のCH2ドメイン(配列番号41)である。好ましくは、CH3ドメインは、G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメイン(配列番号42)である。別の特定の実施形態では、CH3ドメインは、G1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメインである。

【0166】

特定の実施形態では、ヒンジ領域は、CH2ドメインのN末端側の端に抗原結合性アームのCH1ドメインのC末端側の端を連結する、IgA、IgG1、IgG4、IgDのヒンジ領域、又はその変異した誘導体である。特定の実施形態では、ヒンジ領域は、S228P置換を有するIgG4のヒンジ領域である。好ましくは、ヒンジ領域は、配列番号40のIgG1の領域である。

【0167】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、免疫グロブリン様構造を有し、野生型免疫グロブリンFcドメイン又はその変異した誘導体であり得るFcドメインを含む。特定の実施形態では、Fcドメインは、IgG1 Fcドメインの変異した誘導体又はIgG4 Fcドメインの変異した誘導体である。特定の実施形態では、前記変異した誘導体は、親Fcドメインと比較して、少なくとも1種のFcガンマ受容体(FcγR)に対して改変された親和性を有するFcドメインである。

【0168】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、免疫グロブリン様構造を有し、野生型Fcドメインと比較してFcガンマ受容体への結合が低減されたFcドメイン、例えば、IgG1又はIgG4 Fcドメインを含み、低減されたエフェクター機能を有する二特異性抗体を生じる。

【0169】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、免疫グロブリン様構造を有し、野生型Fcドメインと比較してFcガンマ受容体への結合を示さない又は実質的に結合を示さない、Fcドメイン、例えば、IgG1又はIgG4 Fcドメインを含み、静められた又は低減されたエフェクター機能を有する二特異性抗体を生じる。

【0170】

前記Fcドメインは、CH2及び/又はCH3ドメインにおける変異等、それがFcガンマ受

10

20

30

40

50

容体に結合するのを低減又は排除する1個又は複数の変異を含むことができる。前記変異は、アミノ酸置換、挿入及び/又は欠失を含む。Fcガンマ受容体へのFcドメインの結合活性を低減又は排除する説明上の変異は、L/F234A、L235A/E、G236R/del、G237A、P238S、D265A、H/Q268A、L328R、P329G、S/A330R/S及び/又はP331Sを含むがこれらに限定されない。Fcドメインにおける変異した残基は全て、EU命名規則(nomenclature convention)に従って本明細書で番号付けされている。

【0171】

明確化を目的として、「L/F234A」は、ロイシン又はフェニルアラニン(どちらかそれぞれIgG1又はIgG4の位置234に存在する方)のアラニンによる置換を示す。明確化を目的として、「L235A/E」は、位置235におけるロイシンのアラニン又はグルタミン酸のいずれかによる置換を示す。明確化を目的として、「G236R/del」は、位置236におけるグリシンのアルギニンによる置換又は位置236におけるグリシン残基の欠失のいずれかを示す。明確化を目的として、「A/S330R/S」は、アラニン又はセリン(どちらかそれぞれIgG1又はIgG4の位置330に存在する方)のアルギニン又はセリンのいずれかによる置換を示す。

【0172】

Fcガンマ受容体へのIgG1 Fcドメインの結合活性を低減又は排除する説明上の変異は、L234A、L235A/E、G236R/del、G237A、P238S、D265A、H268A、L328R、P329G、A330R/S及び/又はP331Sを含むがこれらに限定されない。Fcガンマ受容体へのIgG4 Fcドメインの結合活性を低減又は排除する説明上の変異は、F234A、L235A/E、G236R/del、G237A、P238S、D265A、Q268A、L328R、P329G及び/又はS330Rを含むがこれらに限定されない。

【0173】

別の特定の実施形態では、二特異性抗体は、免疫グロブリン様構造を有し、野生型Fcドメインと比較してFcガンマ受容体への結合が増加したFcドメイン、例えば、IgG1又はIgG4 Fcドメインを含み、改善されたエフェクター機能を有する二特異性抗体を生じる。

【0174】

前記Fcドメインは、CH2及び/又はCH3ドメインにおける変異等、それがFcガンマ受容体に結合するのを増加させる1個又は複数の変異を含むことができる。Fcガンマ受容体へのFcドメイン、例えば、IgG1又はIgG4 Fcドメインの結合活性を増加させる説明上の変異は、S239D、I332E、S298A、E333A、K334A、D280H、K290S、S298D、F243L、R292P、Y300L、V305I、P396L、A330L、G236A、L234Y、G236W及び/又はS298Aを含むがこれらに限定されない。好まれる実施形態では、Fcドメイン、例えば、IgG1又はIgG4 Fcドメインは、変異S239D及びI332Eを含む。

【0175】

特定の実施形態では、Fcドメイン、例えば、IgG1又はIgG4 Fcドメインは、CH2ドメインの位置297で、Fcグリカンにおける低減されたフコース含有量を有する。

【0176】

特定の実施形態によると、Fcドメイン、例えば、IgG1又はIgG4 Fcドメインは、グリコシル化部位(Asn297)にN-グリカンを含み、前記N-グリカンは、65%よりも低い、好ましくは60%よりも低い、好ましくは55%よりも低い、好ましくは50%よりも低い、より好ましくは45%よりも低い、好ましくは40%よりも低い、好ましくは35%よりも低い、好ましくは30%よりも低い、好ましくは25%よりも低い、好ましくは20%よりも低い、好ましくは10%よりも低い、フコシル化の程度を有する。

【0177】

より特定の実施形態によると、Fcドメインは、グリコシル化部位(Asn297)にN-グリカンを含み、前記N-グリカンは、0%に等しいフコシル化の程度を有する。よって、本発明は、そのグリコシル化部位Asn297にN-グリカンを含み、前記N-グリカンは、0%に等しいフコシル化の程度を有するFcドメインを含む二特異性抗体であって、Fcドメインの前記N-グリカンがフコース不含であることを特徴とする二特異性抗体を提供する。

10

20

30

40

50

【0178】

有利には、位置297のグリコシル化部位に改変されたグリコシル化を有する、特に、低いフコシル化を有するFcドメインは、Fc-ガンマ受容体への結合増加を示す。

【0179】

- 特定の実施形態では、Fcドメインは、
- 配列番号40のヒンジドメイン;及び
 - 配列番号43のCH2-CH3ドメイン

を含む、好ましくは、それからなる。

【0180】

特定の実施形態では、Fcドメインは、配列番号44又は配列番号44と少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含む、好ましくは、それからなる。別の特定の実施形態では、Fcドメインは、配列番号82又は配列番号82と少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%若しくは少なくとも99%配列同一性を有する機能的なバリエーションを含む、好ましくは、それからなる。

【0181】

特定の実施形態は、2個の重鎖及び4個の軽鎖を含む二特異性抗体であって、各重鎖が、

- a.上に記載されているヒンジ-CH2-CH3ドメイン又は変異した誘導体を含む免疫グロブリンのFc領域を含み、
- b.このFc領域が、前記ヒンジドメインによって抗体1(Ab1)のFab CH1-VH重鎖に連結され、
- c.次いでこれが、ポリペプチドリンカー配列によって抗体2(Ab2)のFab CH1-VH重鎖に連結され、ポリペプチドリンカー配列が、Ab1の前記VHドメインのN末端をAb2の前記CH1ドメインのC末端と連結し、

4個の軽鎖が、自身のコグネート重鎖ドメインと会合されたAb1の2個のFab CL-VL軽鎖及びAb2の2個のFab CL-VL軽鎖を含み、

Ab1又はAb2の一方が、上に記載されているパトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、

Ab1又はAb2の他方が、上に記載されているトラスツズマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な若しくはヒト化された誘導体からなる群から選択される、

二特異性抗体に関する。

【0182】

特定の実施形態は、2個の重鎖及び4個の軽鎖を含む二特異性抗体であって、各重鎖が、

- a.上に記載されているヒンジ-CH2-CH3ドメイン又は変異した誘導体を含む免疫グロブリンのFc領域を含み、
- b.このFc領域が、前記ヒンジドメインによって抗体1(Ab1)のFab CH1-VH重鎖に連結され、
- c.次いでこれが、ポリペプチドリンカー配列によって抗体2(Ab2)のFab CH1-VH重鎖に連結され、ポリペプチドリンカー配列が、Ab1の前記VHドメインのN末端をAb2の前記CH1ドメインのC末端と連結し、

4個の軽鎖が、自身のコグネート重鎖ドメインと会合されたAb1の2個のFab CL-VL軽鎖及びAb2の2個のFab CL-VL軽鎖を含み、

Ab2が、上に記載されているパトリツマブ又はその機能的な誘導体であり、

Ab1が、上に記載されているトラスツズマブ又はその機能的な誘導体、マツズマブ又はその機能的な誘導体、及びセツキシマブ又はその機能的な若しくはヒト化された誘導体からなる群から選択される、

二特異性抗体に関する。

【0183】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

a)それぞれが配列番号27又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び

b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号18又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0184】

配列番号27の重鎖は、

- パトリツマブのVH(配列番号5)
- パトリツマブFabのCH1ドメイン(変異T192Eを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号1)
- APリンカー(配列番号34)
- トラスツズマブのVH(配列番号9)
- トラスツズマブFabのCH1ドメイン(変異L143Q及びS188Vを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号2)
- ヒトIgG1のヒンジ(配列番号40)
- ヒトIgG1のCH2ドメイン(配列番号41)
- G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメイン(配列番号42)

を含む。

【0185】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

a)それぞれが配列番号28又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び

b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号18又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0186】

配列番号28の重鎖は、

- トラスツズマブのVH(配列番号9)
- トラスツズマブFabのCH1ドメイン(変異L143Q及びS188Vを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号2)
- APリンカー(配列番号34)
- パトリツマブのVH(配列番号5)
- パトリツマブFabのCH1ドメイン(変異T192Eを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号1)
- ヒトIgG1のヒンジ(配列番号40)
- ヒトIgG1のCH2ドメイン(配列番号41)
- G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメイン(配列番号42)

を含む。

【0187】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

a)それぞれが配列番号29又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び

b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号16又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0188】

配列番号29の重鎖は、

- パトリツマブのVH(配列番号5)
- パトリツマブFabのCH1ドメイン(変異T192Eを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号1)

- APリンカー(配列番号34)
 - セツキシマブのVH(配列番号7)
 - トラスツズマブFabのCH1ドメイン(変異L143Q及びS188Vを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号2)
 - ヒトIgG1のヒンジ(配列番号40)
 - ヒトIgG1のCH2ドメイン(配列番号41)
 - G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメイン(配列番号42)
- を含む。

【0189】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

10

- a)それぞれが配列番号30又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び
- b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号16又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0190】

配列番号30の重鎖は、

- セツキシマブのVH(配列番号7)
 - セツキシマブFabのCH1ドメイン(変異L143Q及びS188Vを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号2)
 - APリンカー(配列番号34)
 - パトリツマブのVH(配列番号5)
 - パトリツマブFabのCH1ドメイン(変異T192Eを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号1)
 - ヒトIgG1のヒンジ(配列番号40)
 - ヒトIgG1のCH2ドメイン(配列番号41)
 - G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメイン(配列番号42)
- を含む。

20

【0191】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

30

- a)それぞれが配列番号31又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び
- b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号20又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0192】

配列番号31の重鎖は、

- パトリツマブのVH(配列番号5)
 - パトリツマブFabのCH1ドメイン(変異T192Eを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号1)
 - APリンカー(配列番号34)
 - マツズマブのVH(配列番号11)
 - トラスツズマブFabのCH1ドメイン(変異L143Q及びS188Vを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号2)
 - ヒトIgG1のヒンジ(配列番号40)
 - ヒトIgG1のCH2ドメイン(配列番号41)
 - G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメイン(配列番号42)
- を含む。

40

【0193】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

50

- a)それぞれが配列番号32又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び
- b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号20又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0194】

配列番号32の重鎖は、

- マツズマブのVH(配列番号11)
- セツキシマブFabのCH1ドメイン(変異L143Q及びS188Vを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号2)
- APリンカー(配列番号34)
- パトリツマブのVH(配列番号5)
- パトリツマブFabのCH1ドメイン(変異T192Eを有するG1m(1,17)アロタイプのヒトIgG1)(配列番号1)
- ヒトIgG1のヒンジ(配列番号40)
- ヒトIgG1のCH2ドメイン(配列番号41)
- G1m(3)アロタイプのヒトIgG1のCH3ドメイン(配列番号42)

を含む。

【0195】

配列番号14の軽鎖は、

- パトリツマブのVL(配列番号6)
- 変異S114A及びN137Kを有するCカップドメイン(配列番号3)

を含む。

【0196】

配列番号16の軽鎖は、

- セツキシマブのVL(配列番号8)
- 変異V133T及びS176Vを有するCカップドメイン(配列番号4)

を含む。

【0197】

配列番号18の軽鎖は、

- トラスツズマブのVL(配列番号10)
- 変異V133T及びS176Vを有するCカップドメイン(配列番号4)

を含む。

【0198】

配列番号20の軽鎖は、

- マツズマブのVL(配列番号12)
- 変異V133T及びS176Vを有するCカップドメイン(配列番号4)

を含む。

【0199】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

- a)それぞれが配列番号85又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び
- b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2個が配列番号84又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0200】

特定の実施形態では、二特異性抗体は、

- a)それぞれが配列番号86又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、2個の重鎖、及び
- b)2個が配列番号14又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなり、他方の2

個が配列番号84又はその変異性誘導体を含む、好ましくは、それからなる、4個の軽鎖を含む、好ましくは、それからなる。

【0201】

3. 二特異性抗体の産生

当業者は、多特異性抗体を発現させる一般技法について、参照により本明細書に組み込む国際特許出願WO2013/005194を参照することができる。

【0202】

本発明の分子又は抗体のタンパク質鎖をコードする配列を含むポリヌクレオチドもまた、本明細書に記載されている。前記ポリヌクレオチドは、追加の配列を含むこともできる：特にそれは、有利には、前記タンパク質鎖の分泌を可能にするリーダー配列又はシグナルペプチドをコードする配列を含むことができる。前記ポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞も開示されている。

【0203】

典型的には、必要に応じて哺乳類の発現のためのコドン最適化の後に、二特異性抗体のアミノ酸配列を使用して、DNA配列を設計する。重鎖のため、シグナルペプチド、Fab1の可変領域及び定常CH1ドメインと、それに続くヒンジリンカー並びにFab2の可変領域及び定常CH1ドメインと、制限酵素消化のためのフランキング配列をコードするDNAが合成される。軽鎖のため、シグナルペプチド並びに可変及び定常カッパー領域をコードするDNAが合成される。

【0204】

本発明の二特異性抗原結合性断片又は抗体の重鎖及び軽鎖をコードする核酸は、発現ベクターに挿入される。軽鎖及び重鎖は、同じ又は異なる発現ベクターにクローニングすることができる。免疫グロブリン鎖をコードするDNAセグメントは、免疫グロブリンポリペプチドの発現を確実にする、発現ベクターにおける制御配列に作動可能に連結される。そのような制御配列は、シグナル配列、プロモーター、エンハンサー及び転写終結配列を含む。発現ベクターは典型的に、エピソードとして又は宿主染色体DNAの不可分の一部として、宿主生物において複製可能である。一般的に、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能にするための選択マーカー、例えば、テトラサイクリン又はネオマイシンを含有するであろう。

【0205】

一例では、重鎖及び軽鎖の両方をコードする配列(例えば、VH及びVL、VH-CH1及びVL-CL、又は全長重鎖及び全長軽鎖をコードする配列)が、1個の発現ベクターに含まれる。別の例では、抗体の重鎖及び軽鎖のそれぞれが、個々のベクターにクローニングされる。後者の場合、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターは、両方の鎖の発現のために1個の宿主細胞にコトランスフェクトすることができ、両方の鎖をin vivo又はin vitroのいずれかでアセンブルしてインタクトな抗体を形成することができる。その代わりに、重鎖をコードする発現ベクター及び軽鎖をコードする発現ベクターは、重鎖及び軽鎖のそれぞれの発現のために異なる宿主細胞に導入することができ、次いで重鎖及び軽鎖のそれぞれをin vitroで精製し、アセンブルして、インタクトな抗体を形成することができる。

【0206】

特定の実施形態では、宿主細胞は、3種の独立した発現ベクター、例えば、プラスミドでコトランスフェクトされ、全3種の鎖(即ち、それぞれ重鎖HC、並びに2種の軽鎖LC1及びLC2)の同時産生及び二特異性抗体の分泌を生じる。より具体的には、3種のベクターは有利には、2:1:1の分子比(HC:LC1:LC2)で使用するすることができる。

【0207】

本明細書に記載されている抗体の発現のための組換えベクターは典型的に、構成的又は誘導性のいずれかであるプロモーターに作動可能に連結された抗体アミノ酸配列をコードする核酸を含有する。ベクターは、原核生物、真核生物又はその両方における複製及び組み込みに好適であり得る。典型的なベクターは、転写及び翻訳ターミネーター、開始配列、並びに抗体をコードする核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含有する。ベクターは

必要に応じて、少なくとも1個の独立したターミネーター配列、真核生物及び原核生物の両方におけるカセットの複製を可能にする配列、即ち、シャトルベクター、並びに原核生物及び真核生物の系の両方のための選択マーカ含有するジェネリック発現カセットを含有する。

【0208】

本明細書に記載されている二特異性抗体は、原核生物又は真核生物発現系、例えば、細菌、酵母、糸状真菌、植物、昆虫(例えば、バキュロウイルスベクターを使用した)及び哺乳類細胞において産生され得る。本発明の組換え抗体が、真核細胞においてグリコシル化又は発現される必要はない;しかし、哺乳類細胞における発現が一般に好まれる。有用な哺乳類宿主細胞株の例は、ヒト胎児由来腎臓系統(293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK細胞)、チャイニーズハムスター卵巣細胞/-又は+DHFR(CHO、CHO-S、CHO-DG44、Flp-in CHO細胞)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO細胞)及びヒト肝臓細胞(Hep G2細胞)である。

10

【0209】

インタクトな免疫グロブリンを分泌することが可能な多くの好適な宿主細胞株が当技術分野で開発されており、CHO細胞株、様々なCos細胞株、HeLa細胞、好ましくは骨髓腫細胞株(NS0等)又は形質転換されたB細胞若しくはハイブリドーマを含むため、哺乳類組織細胞培養が、ポリペプチドの発現及び産生に好まれる。

【0210】

最も好まれる実施形態では、本発明の二特異性抗体は、CHO細胞株、最も有利には、CHO-S若しくはCHO-DG-44細胞株又はそれらの誘導体を使用することにより産生される。これらの細胞のための発現ベクターは、発現制御配列、例えば、複製起点、プロモーター及びエンハンサー、並びに必要なプロセッシング情報部位、例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位及び転写ターミネーター配列を含むことができる。好まれる発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルスその他に由来するプロモーターである。目的のポリヌクレオチド配列(例えば、重鎖及び軽鎖コード配列並びに発現制御配列)を含有するベクターは、細胞宿主の型に応じて変動するよく知られた方法によって宿主細胞に移入することができる。例えば、リン酸カルシウム処置又は電気穿孔を、他の細胞宿主のために使用することができる(一般に、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press、第2版、1989を参照)。重鎖及び軽鎖が、別々の発現ベクター上にクローニングされる場合、ベクターはコトランスフェクトされて、インタクトな免疫グロブリンの発現及びアセンブリーが得られる。

20

30

【0211】

宿主細胞は、ベクターで形質転換又はトランスフェクトされ(例えば、化学的トランスフェクション又は電気穿孔方法によって)、プロモーターを誘導するため、形質転換体を選択するため又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために従来の栄養培地(又は適宜改変される)において培養される。

【0212】

抗体の発現は、一過性又は安定であり得る。

40

【0213】

好ましくは、二特異性抗体は、安定した発現の方法によって産生され、この方法において、二特異性抗体の全てのポリペプチド鎖をコードするDNAで安定にトランスフェクトされた細胞株は、持続的発現が可能であり、これにより治療薬の製造が可能となる。例えば、CHO細胞株における安定した発現が、特に有利である。

【0214】

発現されると、本発明の抗体全体、それらの二量体、個々の軽鎖及び重鎖、又は他の免疫グロブリン形態を更に単離又は精製して、更なるアッセイ及び適用のための実質的に均一な調製物を得ることができる。当技術分野で知られた標準タンパク質精製方法を使用することができる。例えば、好適な精製手順は、免疫親和性又はイオン交換カラムにおける

50

分画、エタノール沈殿、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、硫酸アンモニウム沈殿及びゲル濾過を含むことができる(一般に、Scopes、Protein Purification(Springer-Verlag、N. Y.、1982を参照)。医薬品使用のため、少なくとも約90~95%均一性の実質的に純粋な免疫グロブリンが好まれ、98~99%以上の均一性が、最も好まれる。

【0215】

in vitro産生は、大量の本発明の所望の二特異性抗体を得るためのスケールアップを可能にする。そのような方法は、例えば、エアリフト(airlift)リアクタ内若しくは継続的スターラーリアクタ内における均一懸濁培養、又は例えば、中空繊維中、マイクロカプセル中、アガロースマイクロビーズ上若しくはセラミックカートリッジ上における固定化若しくは捕捉された細胞培養を用いることができる。

10

【0216】

4. 治療用途

本発明の二特異性抗体は、腫瘍成長阻害を誘導することが示された。

【0217】

本発明の二特異性抗原結合性断片又は抗体は、特に、がんの処置における医薬として有用である。

【0218】

用語「がん」は、本明細書で使用される場合、HER3、EGFR又はHER2発現又は過剰発現によって特徴付けされるいずれかのがん、特に、膵臓がん及びいずれか他のがん、特に、HER3及びEGFR、又はHER3及びHER2の両方の同時発現によって特徴付けされるがんを含む。

20

【0219】

一部の実施形態では、がんは、野生型KRAS遺伝子を有する細胞を含む。

【0220】

がんの例は、固形腫瘍、例えば、膵臓がん、扁平上皮癌を含む頭頸部がん、結腸直腸がん、乳がん、肺がん、胃がん、食道がん、卵巣がんである。

【0221】

好ましくは、がんは、膵臓がんである。

【0222】

よって、がんを患う患者の処置方法であって、そのような処置を必要とする前記患者に本発明に係る抗体を投与することによる方法が記載される。よって、本発明の別の態様は、がんの処置のための医薬の製造のための、本発明に係る二特異性抗体の使用である。

30

【0223】

本発明の一態様は、本発明に係る二特異性分子を含む医薬組成物である。本発明の別の態様は、医薬組成物の製造のための本発明に係る二特異性分子の使用である。本発明の更なる態様は、本発明に係る二特異性分子を含む医薬組成物の製造のための方法である。

【0224】

別の態様では、本発明は、医薬担体と共に製剤化された、本明細書に定義されている二特異性分子を含有する組成物、例えば、医薬組成物を提供する。

40

【0225】

本明細書で使用される場合、「医薬担体」は、生理的に適合性である、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌及び抗真菌剤、等張及び吸収遅延剤その他を含む。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は上皮投与(例えば、注射又は注入による)に好適である。

【0226】

本発明の組成物は、当技術分野で知られた種々の方法によって投与することができる。投与の経路及び/又は機序は、所望の結果に応じて変動するであろう。

【0227】

ある特定の投与経路によって本発明の二特異性分子又は抗体を投与するために、その不

50

活性化を防止するための材料で本発明の二特異性分子又は抗体をコーティングする、又はそれと本発明の二特異性分子又は抗体を同時投与することが必要となり得る。例えば、本発明の二特異性分子又は抗体は、適切な担体、例えば、リポソーム又は希釈剤において対象に投与することができる。薬学的に許容される希釈剤は、食塩水及び水性バッファー溶液を含む。医薬担体は、滅菌水性溶液又は分散体、及び滅菌注射用溶液又は分散体の即時調製のための滅菌粉末を含む。薬学的に活性な物質のためのそのような培地及び薬剤の使用は、当技術分野で知られている。

【0228】

このような組成物は、アジュバント、例えば、保存料、湿潤剤、乳化剤及び分散剤を含むこともできる。微生物の存在の防止は、滅菌手順、並びに様々な抗細菌及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸その他の包含の両方によって確実であり得る。組成物中に等張剤、例えば、塩化ナトリウムを含むことが望ましい場合もある。加えて、注射用医薬品形態の延長された吸収は、吸収を遅延させる薬剤の包含によってもたらされ得る。

10

【0229】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、患者に対する毒性を伴わない、特定の患者、組成物及び投与機序のために所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分の量を得るように変動され得る。

【0230】

選択された投薬量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物の活性、投与の経路、投与の時間、処置の持続時間、用いられる特定の組成物と組み合わせて使用される他の薬物、化合物及び/又は材料、処置されている患者の年齢、性別、体重、状態、全体的な健康及び以前の病歴、並びに医学の技術分野でよく知られた同様の因子を含む種々の薬物動態因子に依存するであろう。例えば、本発明の二特異性分子又は抗体は、3回/週～1回/月で、0.2～20 mg/kgの投薬量で投与することができる。

20

【0231】

このように上に全般的に記載されている本発明は、説明として提供され本発明の限定を意図しない、次の実施例を参照することにより、より容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0232】

(実施例1)

本発明の二特異性抗体の調製

本発明の二特異性抗体(BsAb)は、2個の重鎖及び4個の軽鎖を含む。特に、BsAbは、4個の抗原結合部位(Fab)を有し、2個のFabはAb1に由来し、2個の他のFabはAb2に由来する(図1)。よってこれは、2種の標的抗原のそれぞれに対して二重結合能を有する(四価)。Fcドメインの遠位にあるFabは、「外側Fab」と命名され、Fcドメインの近位にあるFabは、「内側Fab」と命名される(図1)。

【0233】

4種の親抗体:パトリツマブ(抗HER3)、アテゾリズマブ(抗PDL1)、セツキシマブ(抗EGFR)及びマツズマブ(抗EGFR)に基づき6種の抗体を設計した。各構築物の重鎖及び軽鎖の命名法及び配列は、Table 1(表2)に詳述されている:

40

【0234】

【表 2】

名称	外側 Fab	内側 Fab	重鎖	軽鎖 (外側 Fab)	軽鎖 (内側 Fab)
Patri-trastu-Fc	パトリツマブ	トラスツズマブ	配列番号 27	配列番号 14	配列番号 18
Trastu-Patri-Fc	トラスツズマブ	パトリツマブ	配列番号 28	配列番号 18	配列番号 14
Patri-Cetu-Fc	パトリツマブ	セツキシマブ	配列番号 29	配列番号 14	配列番号 16
Cetu-Patri-Fc	セツキシマブ	パトリツマブ	配列番号 30	配列番号 16	配列番号 14
Patri-Matu-Fc	パトリツマブ	マツズマブ	配列番号 31	配列番号 14	配列番号 20
Matu-Patri-Fc	マツズマブ	パトリツマブ	配列番号 32	配列番号 20	配列番号 14

10

Table 1: 二特異性抗体構築物の説明

【0235】

図1に示す通り、各二特異性抗体は、

- 各重鎖が、外側FabのVHドメイン及びCH1ドメイン、リンカー、内側FabのVHドメイン及びCH1ドメイン、定常Fcドメイン(ヒンジ-Ch2-Ch3を含む)を含む(N末端からC末端に)、2個の同一重鎖、
- 各軽鎖が、外側FabのVLドメイン及びCLドメインを含む(N末端からC末端に)、外側Fabの2個の同一軽鎖、
- 各軽鎖が、内側FabのVLドメイン及びCLドメインを含む(N末端からC末端に)、内側Fabの2個の同一軽鎖を含む。

20

【0236】

各構築物の重鎖及び軽鎖を構成する配列に関する詳細は、Table 2(表3)に提示されている。

【0237】

【表 3】

名称	重鎖						軽鎖 (外側 Fab)		軽鎖 (内側 Fab)	
	外側 Fab			内側 Fab			VL	CL	VL	CL
	VH	CH1	リンカー	VH	CH1	Fc				
Patri-trastu-Fc	配列番号 5	配列番号 1	配列番号 34	配列番号 9	配列番号 2	配列番号 44	配列番号 6	配列番号 3	配列番号 10	配列番号 4
Trastu-Patri-Fc	配列番号 9	配列番号 2	配列番号 34	配列番号 5	配列番号 1	配列番号 44	配列番号 10	配列番号 4	配列番号 6	配列番号 3
Patri-Cetu-Fc	配列番号 5	配列番号 1	配列番号 34	配列番号 7	配列番号 2	配列番号 44	配列番号 6	配列番号 3	配列番号 8	配列番号 4
Cetu-Patri-Fc	配列番号 7	配列番号 2	配列番号 34	配列番号 5	配列番号 1	配列番号 44	配列番号 8	配列番号 4	配列番号 6	配列番号 3
Patri-Matu-Fc	配列番号 5	配列番号 1	配列番号 34	配列番号 11	配列番号 2	配列番号 44	配列番号 6	配列番号 3	配列番号 12	配列番号 4
Matu-Patri-Fc	配列番号 11	配列番号 2	配列番号 34	配列番号 5	配列番号 1	配列番号 44	配列番号 12	配列番号 4	配列番号 6	配列番号 3

30

40

Table 2: 各二特異性構築物の配列に関する詳細

【0238】

50

遺伝子合成

パトリツマブ(抗HER3)、アテゾリズマブ(抗PDL1)、セツキシマブ(抗EGFR)及びマツズマブ(抗EGFR)のアミノ酸配列を使用して、哺乳類の発現のためのコドン最適化の後に、DNA配列を設計した。これらの抗体は、「親」抗体と称される。

【0239】

重鎖のDNA構築物は、次のようなものとして設計した:

- シグナルペプチド(配列番号79)、
- それに続いて、外側Fabの可変領域からなる配列、それに続いて、外側Fabの定常CH1ドメイン

- それに続いて、リンカー

- それに続いて、内側Fabの可変領域、それに続いて、内側Fabの定常CH1ドメイン。

【0240】

制限酵素消化のためのフランキング配列を重鎖DNA構築物の両端に導入した。

【0241】

外側Fabの軽鎖のためのDNA構築物は、次のようなものとして設計した:

- シグナルペプチド(配列番号80)、
- それに続いて、外側Fabの可変領域、それに続いて、外側Fabの定常カップー領域。

【0242】

内側Fabの軽鎖のためのDNA構築物は、次のようなものとして設計した:

- シグナルペプチド(配列番号80)、
- それに続いて、内側Fabの可変領域、それに続いて、内側Fabの定常カップー領域。

【0243】

全てのDNA構築物は、GeneWis社又はEurofins社によって合成された。PfuTurbo Hot Startを使用したPCR反応を実行して、挿入物を増幅し、次いでこれを、それぞれ重鎖及び軽鎖のためにNotI及びApaI、並びにNotI及びHindIIIで消化した。二重消化された重鎖断片を、ヒトIgG1ヒンジとそれに続くCH2-CH3ドメインが既に挿入されているNotI及びApaIで消化されたIcosagen社専売のpQMCF発現ベクターとライゲーションした。二重消化された軽鎖断片を、NotI及びHindIIIで消化されたIcosagen社専売のpQMCF発現ベクターとライゲーションした。プラスミドDNAを二本鎖DNA配列決定によって検証した。

【0244】

発現及び精製

2:1:1=HC:LC1:LC2分子比(1個の継続的重鎖(HC)及び2個の軽鎖(LC))における別々のベクター上にコードされた3種の遺伝子のコトランスフェクトにより、一過性遺伝子発現を用いて二特異性抗体を産生した。50mLスケール発現のため、Icosagen社専売のpQMCFベクターにおける総計50µgのプラスミドDNA(25µg重鎖+12.5µgの各軽鎖、LC1及びLC2)を、1.5mL Eppendorfチューブ内で、Icosagen社専売のトランスフェクション試薬007を含有する1mLのCHO TF(Xell AG)成長培地と混合し、RTで20分間インキュベートした。混合物を、125mL振盪フラスコ内のCHO TF(Xell AG)成長培地における $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mLの49mLのCHO EBNA LT85 $1E^9$ 細胞上にロードした。細胞を2日間37°Cで振盪した;3日目に、温度を32°Cにシフトし、培養物に栄養を与えた;4日目に、温度を30°Cに低下させた;完全産生の持続時間は10日間であった。細胞を3,000rpmで15分間遠心分離することにより、上清を収集した。収集された上清から、二特異性抗体をプロテインA樹脂(MabSelect SuRe 5mLカラム)によって精製した。0.1MグリシンpH3.5を使用してプロテインAから抗体を溶出し、1M TRISによって溶離液を中和した。Superdex 200 HiLoad 26/60pg調製用カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて二特異性抗体を更に精製し、一方、Superdex 200 Increase 10/300 GLを用いてFab-Fab抗体を精製した;全ての抗体をPBS pH7.4へとバッファー交換した。0.2µm ULTRA Capsule GFを用いて全ての試料を滅菌濾過した。Ladder Precision Plus Protein Unstained Standards(Biorad社)を使用して見かけ上のM

10

20

30

40

50

Wを決定した。二特異性抗体は典型的に、一過性CHO発現において優れた発現力価を示した。

【0245】

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製された抗体の品質を評価するために、本出願人らはSDS-PAGEを行った。ランニングバッファー中のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在下で、抗体がゲルの中を遊走する速度は主にそのサイズに依存し、分子量決定を可能にする。このアッセイは、非還元条件下及び還元条件下で行われた;後者は、ジスルフィド結合の破壊を、従って、個々のポリペプチド鎖(軽鎖及び重鎖)の可視化を可能にする。

【0246】

全ての二特異性抗体のSDS-PAGEは、非還元及び還元条件下の両方で、予想されたプロファイルを示し、計算された理論上の分子量と一致した。

【0247】

サイズ排除クロマトグラフィー解析

タンパク質凝集は、操作されたタンパク質分子において頻繁に観察される。本出願人らは、分析的サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を行って、ゲル濾過クロマトグラフィー後に最終抗体調製物の高分子量種含有量をアッセイした。

【0248】

SECクロマトグラムは、より高分子量種のパーセンテージ含有量が、軽微であり(5%未満)、CHO発現系において産生された従来のモノクローナル抗体と同様であることを実証した。結果は、凝集物の非存在又は軽微な含有量を確認する。結果は、各抗体が正しくアセンブルされたことも示した。

【0249】

(実施例2)

抗体のそのコグネート抗原への単一特異性結合

EGFR、HER2及びHER3に対するBsAb「Patri-Trastu-Fc」、「Patri-Matu-Fc」及び「Patri-Cetu-Fc」の見かけ上の親和性を直接的ELISAによって査定した。各BsAbの単一特異性結合、即ち、一度に1種の抗原に対する結合は、親MAbと比較される。EC50(ベースライン及び最大結合の間の50%結合中央値を誘導する抗体濃度)が次いで、各BsAb及び親抗体について定義される。

【0250】

材料及び方法

800ng/mlのEGFR Hisタグ、HER2 Hisタグ又はHER3 Hisタグ抗原を、Nunc Maxisorp 96プレートにおいて50µlの1×PBS中に希釈した。プレートを一晚4℃でインキュベートし、次いで0.1%PBS-Tween(PBS-T)で4回洗浄し、1時間37℃で1%BSAを含有するPBS-Tで飽和させた。0.1%PBS-Tにおける4回の洗浄後に、抗体(BsAb、MAb及び対照)を最終体積50µlで1×PBS中に希釈し、1時間37℃でインキュベートした。0.1%PBS-Tにおける4回の洗浄後に、検出抗体(HRPがカップリングされた抗ヒトFc)を50µl体積の1×PBSにおける1/40000で添加し、1時間37℃でインキュベートした。プレートを0.1%PBS-Tにおいて4回洗浄し、10~30分間室温で各ウェルに50µlのTMBを添加し、遮光した。50µlの1M塩酸で反応を停止させ、その後、450nmの波長で光学密度を読み取った。

【0251】

結果

結果を下のTable 3(表4)に示す。

【0252】

10

20

30

40

50

【表 4】

ID	EC50 (nM)		
	EGFR	HER2	HER3
マツズマブ	0.09	n.a.	n.a.
セツキシマブ	0.07	n.a.	n.a.
トラスツズマブ	n.a.	0.09	n.a.
パトリツマブ	n.a.	n.a.	0.09
Patri-Trastu-Fc	n.a.	0.09	0.18
Patri-Matu-Fc	0.39	n.a.	0.16
Patri-Cetu-Fc	0.14	n.a.	0.19

Table 3.

【0253】

HER3、HER2又はEGFRへの単一特異性結合についてのELISA解析。HER3、HER2又はEGFR抗原に対する親抗体(陽性対照として)又はBiXAb毎の最大半量効率的濃度(EC50)の測定。

【0254】

二特異性抗体は全て抗原に結合することができ、対応する親抗体と非常に類似した結合プロファイルを示した。それらのコグネート抗原に対するナノモル濃度に満たない見かけ上の親和性を全ての構築物について測定したところ、それらの親抗体とほとんど同一であった。

【0255】

(実施例3)

二特異性抗体によるそのコグネート抗原への二重結合

HER3/HER2及びHER3/EGFRへの抗体の二特異性結合をELISAサンドイッチアッセイによって査定した。手短に説明すると、タグなし抗原をプレート上にコーティングし、先ずBsAbと、次いでHisタグを有する第2の抗原と共にインキュベートした;最後に、抗HISペルオキシダーゼ抗体を使用して、アッセイを発色させた。この設計は、両方の抗原への二特異性抗体による同時結合を査定することを可能にする。

【0256】

材料及び方法

1000ng/mlのEGFR、HER2又はHER3タグなし抗原を、Nunc Maxisorp 96プレートにおいて50µlの1×PBS中に希釈した。プレートを一晩4℃でインキュベートし、次いで0.1%PBS-Tweenにおいて4回洗浄し、1時間37℃で1%BSAを含有するPBS-Tで飽和させた。0.1%PBS-Tにおける4回の洗浄後に、抗体(BsAb又はIRR)を最終体積50µlの1×PBSにおける様々な希釈で添加し、1時間37℃でインキュベートした。0.1%PBS-Tにおける4回の洗浄後に、50µlのPBS 1×中の1000ng/ml EGFR Hisタグ、HER2 Hisタグ又はHER3 Hisタグ抗原を1時間37℃でインキュベートした。プレートを0.1%PBS-Tで4回洗浄し、HRPがカップリングされた抗Hisタグ検出抗体を50µlの1×PBSにおける1/2000で添加した。プレートを1時間37℃でインキュベートした。プレートを0.1%PBS-Tにおいて4回洗浄し、50µlのTMB発色溶液を10~30分間室温で添加し、遮光した。50µlの1M塩酸で反応を停止させ、その後、450nmの波長で光学密度を読み取った。

【0257】

結果

図2(A)の結合曲線は、用量依存性様式での、可溶性HER2-Hisによって発生された固

定化されたHER3への(左パネル)及び可溶性HER3-Hisによって発生された固定化されたHER2への(右パネル)Patri-Trastu-Fcの同時結合プロファイルを示す。図2(B)の結合曲線は、固定化されたHER3-Fc及びEGFR-Hisへの(左パネル)並びに固定化されたEGFR-Fc及びHER3-Hisへの(右パネル)Patri-Matu-Fcの同時結合を示す。これは、Patri-Cetu-Fcについて図2(C)に示される結合曲線にも当てはまる。

【0258】

これにより、結果は、本発明のBsAbが、両方の抗原に同時に結合することができることを示す。

【0259】

(実施例4)

二特異性抗体は、AKT及びERKのリン酸化を阻害する

受容体のHERファミリーを標的化する抗体の主要な抗腫瘍効果は、当該受容体に関連するシグナリングを阻害するその能力である。よって本出願人らは、EGFR、HER2及びHER3シグナリングに関連付けられた2種の主要なシグナリング経路:MAPK/ERK及びPI3K/AKTを調べた。HTRF技法を使用して、本出願人らは、EGF+NRG1リガンドによる刺激後に二特異性抗体の添加によって誘導されるpERK及びpAKTのリン酸化阻害を査定した。

【0260】

材料及び方法

0日目に、ウェル当たり50,000個の細胞を、96ウェル平底プレートにおいて100 µlの完全培地(DMEM又はRPMI 10%SVF)中に播種した。1日目に、細胞は、10%FCS培養培地を2%FCS培地に交換することにより、FCSが枯渇された。2日目に、全ての条件について培養培地を除去し、細胞を100 µlの2%FCS培養培地に希釈された70nMの抗体(BsAb又はMAb)で20分間処置し、そこに、2種のリガンドである16.6nM(100ng/ml)のEGF及び3.71nM(100ng/ml)のNRG1を更に10分間37℃で添加した。30分間処置の終わりに、培地を次いで除去し、細胞を冷1×PBSで1回リンスした。次に、細胞を、攪拌下で1時間溶解し、製造業者の推奨に従ってHTRFキットpERK Thr202/Tyr204(CisBio(登録商標)、#64ERKPEG)及びpAKT Ser473(CisBio(登録商標)、#64AKSPET)を用いて、pERK及びpAKTレベルを測定した。次に、Pherastarリーダー(BMG LabTech)で665nm及び620nmにおいてプレートを読み取った。

【0261】

結果

検査された3種のPDAC細胞株(BxPC-3、AsPC-1及びCFPAC)について、全てのBsAb(Patri-Trastu-Fc、Patri-Cetu-Fc及びPatri-Matu-Fc)が、リガンド誘導後にpAKT及びpERKシグナリングの強い阻害を示した(図3B)。両方のEGFR/HER3二特異性抗体は、BxPC-3細胞における基礎pAKTシグナリングのほとんど100%を、また、HER2/HER3抗体と同様にASPC1及びCFPAC細胞における約85~90%を遮断した。これらは、BxPC3細胞におけるpERKシグナリングも効率的に阻害した(Patri-Trastu-Fcについての50%と比較して、それぞれPatri-Matu-Fc及びPatri-Cetux-Fcについて85及び99%)。全ての抗体が、BxPC3細胞株において最も強いシグナリング経路を阻害したが、その理由として、この細胞株がWT Krasを発現する唯一のものであったことが挙げられ、一方、pERK阻害は、変異したKrasを発現したASPC1及びCFPACにおいてより弱かった。全3種の細胞株において、EGFR密度は、HER2又はHER3のものよりもはるかに高かった(図3A)。抗HER2/HER3抗体と比較して、抗EGFR含有BiXAbの優位性も予想された。

【0262】

(実施例5)

Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcのin vivo効果

Sw1990及びPDX P2846 PDAC細胞を異種移植された二特異性抗体処置マウスの腫瘍成長及び生存を評価した。これらのモデルは、変異したKras、及び同様の抗原密度の

10

20

30

40

50

EGFR、HER2又はHER3抗原を発現する。

【0263】

材料及び方法

0日目に、5週齢スイスヌード免疫不全マウスに、3百万個のSw-1990細胞を皮下移植した(n=9匹のマウス/群)。腫瘍が平均して90mm³になったら処置を開始した。200ul注射において腹腔内投与される17mg/kgの二特異性抗体でマウスを処置した。処置スケジュールは、4週間にわたる1週間当たり2回の注射であった。腫瘍サイズをノギスで測定した。腫瘍サイズが1500~2000mm³に達したら、マウスを殺した。

【0264】

150mm³のサイズを有するP2846 P7を、褐色体下の肩甲骨内に(intrascapularly)移植した。処置レジメンは、Sw-1990マウスモデルと同じままとした。

【0265】

結果

Sw1990細胞を異種移植されたマウスにおいて、腫瘍成長は、それぞれPatri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcにより42%、62%及び69%阻害された(図4A)。

【0266】

Sw-1990異種移植マウスの生存は、Patri-Trastu-Fc処置群で11日間、Patri-Matu-Fc処置群で15日間及びPatri-Cetu-Fc処置群で15日間改善された。EGFR/HER3 BsAbは、3Patri-2Trastu-Fc EGFR/HER2 BsAb(46日目に1200mm³)と比較して、最も強い腫瘍成長阻害を誘導した(46日目に3Patri-1Matu-Fc and 3Patri-1Cetu-Fcで875mm³)。BsAb 3Patri-1Cetu-Fcは、より優れた全生存を提供した。本実験において毒性又は体重減少の徴候は認められなかった。陰性対照媒体vs無関係二特異性抗体(BsAb IRR)は、同様の腫瘍成長及び生存を示した。

【0267】

PDX P2846を異種移植されたマウスにおいて、腫瘍成長は、Patri-Cetu-Fcで87%、Patri-Trastu-Fcで77%及びPatri-Matu-Fcで63%阻害された(グラフト45日後)(図4B)。

【0268】

80日目に、P2846 P7 PDXを異種移植されたマウスの生存は、BsAb IRR群と比較して、Patri-Trastu-Fc及びPatri-Cetu-Fc処置群で70%並びにPatri-Matu-Fc処置群で20%改善された。BsAb Patri-Trastu-Fc及びPatri-Cetu-Fcは、Patri-Matu-Fcと比較して、最も強い腫瘍成長阻害を誘導した。生存は、対照BsAb IRR群と比較して、Patri-Trastu-Fc群で34日間及びPatri-Cetu-Fc群で41日間改善された。本治療において毒性又は体重減少の徴候は認められなかった。

【0269】

(実施例6)

Sw-1990異種移植片におけるBsAbの腫瘍内浸透

従来の抗体(150kDa)と比べて大きい分子量のBsAb(250kDa)に関するよくある疑問は、腫瘍に、特に、豊富かつ高密度の間質を有することが知られた脾臓腫瘍に浸透するその能力に関する。摘出された腫瘍から組織学的切片を作製した;二特異性抗体によるSw1990腫瘍浸透を免疫組織化学によって解析した。ペルオキシダーゼをコンジュゲートされた抗ヒトFcを使用して、二特異性抗体を標識した。BsAb IRRは、CD19及びCD3を標的化する対照二特異性抗体であった。陰性対照としてNaClを使用した(図5)。

【0270】

BsAbの特異的標識は、Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcで処置された腫瘍において観察された。40×の画像は、標識が、高密度間質にもかかわらず腫瘍の中心及び周辺の間で均一であることを示し、BsAbが腫瘍に浸透することを示唆する。加えて、腫瘍中心の腫瘍上皮細胞の膜において顕著な標識が観察され、腫瘍塊内部の腫瘍細胞の膜におけるBsAbの結合及び蓄積を実証する。NaClで処置された腫瘍につい

10

20

30

40

50

て、非特異的標識は観察されなかった。BsAb IRRは、腫瘍周辺又は間質で弱く検出され、腫瘍上皮細胞では検出されず、BsAb IRRが、腫瘍細胞に結合しないことを示す。

【0271】

(実施例7)

Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcは、血管新生を減少させる

血管新生又は新血管新生は、免疫組織化学(IHC)による抗CD31染色を使用して研究されてきた。CD31は、内皮細胞上で発現されるため、血管の標識を可能にする。血管新生は、特に膵臓がんにおける腫瘍形質転換における主なパラメータである。対照(NaCl及びBsAb IRR)と比較して、3種のBsAbによる処置後の血管の比率を評価した。処置毎に、3匹の異なるマウスに対応する3枚の腫瘍切片を標識し、ImageJソフトウェアによって画像を解析した。定量化の結果は、処置に従った血管サイズの変動を強調するヒストグラムにおいて表される(図6A)。

10

【0272】

IHC結果は、対照群(NaCl、BsAb IRR)の75 μ mから本発明のBsAbで処置された群の55 μ mへの血管サイズの減少を実証する。このことは、BsAbによる異種移植片新血管新生の阻害を示唆する。

【0273】

(実施例8)

Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcによって処置された腫瘍におけるNK浸潤のex vivo解析

20

材料及び方法

BsAb処置マウス由来の切除されたSw1990異種移植片におけるフローサイトメトリーによってNK細胞免疫表現型検査を行った。解離された細胞を生/死、マウスCD45、CD3、CD19、CD49、NKp46、IFN γ 及びCD1070特異的抗体で標識した。負の選択のためにフィコエリトリンコンジュゲート抗CD3及びAPC-Cy7コンジュゲート抗CD19抗体を、並びに正の選択のためにAF700コンジュゲート抗CD45、APCコンジュゲート抗CD49b、フルオレセインコンジュゲート抗NKp46を含有するパネルを使用した免疫表現型検査のために、NK細胞を単離した。BV786コンジュゲート抗CD107a及び細胞内BV421コンジュゲート抗IFN γ 標識後に、フローサイトメトリーによってCD45+CD49b+NKp46+NK細胞の活性化を解析した。

30

【0274】

結果

NK浸潤は、CD49+NKp46+解析に示される通り、NaCl及びBsAb IRR群と比較して、本発明のBsAbで処置された腫瘍において2倍増加した(図5B)。NK細胞におけるIFN γ +及びCD107a+の増加は、これらの腫瘍内NK細胞も、無処置腫瘍と比較して活性化され、よって、ADCCを媒介し得ることを示唆した。

【0275】

(実施例9)

EGFR、HER2及びHER3受容体分解におけるPatri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcのex vivo有効性

40

材料及び方法

Patri-Cetu-Fc対BsAb IRR及びNaCl処置Sw1990異種移植片切片のEGFR染色を実行した。それぞれNaCl、Patri-Trastu-Fc、Patri-Matu-Fc及びPatri-Cetu-Fcで処置されたSw1990異種移植片抽出物毎のウエスタンブロット解析によってHER受容体発現を決定した。ローディング対照としてチューブリンを使用した。EGFR、HER2及びHER3に対する一次ウサギモノクローナル抗体を使用し、その後、二次IRDye800コンジュゲートヤギ抗ウサギIgG(1/20000希釈)を添加して、ウエスタンブロットを可視化した。LI-COR Odysseyイメージングシステムを使用して蛍光を定量化した。次に、切除された異種移植片の各群におけるHER受容体発現を定量化し、チューブリンに対して正規化した。各実験は、3匹のSw1990異種移植マウスにおいて行った。BsAb IRRは、ヒ

50

トCD19及びCD3に同時に結合する陰性対照である。

【0276】

結果

×20及び×40拡大率で得た画像(図5C、上部パネル)は、NaCl又はBsAb IRRで処置された腫瘍と比較して、Patri-Cetu-Fcで処置された腫瘍におけるEGFRシグナルの明らかな減少を示した。

【0277】

EGFR、HER2及びHER3総タンパク質レベルをSw-1990異種移植片由来のタンパク質抽出物におけるウエスタンブロットによって査定し、免疫蛍光によって明らかにした。総タンパク質レベルを定量化し、チューブリンに対して正規化した。図5C(中央及び上部パネル)の結果は、本発明の3種のBsAbが、NaCl及びBsAb IRR群と比較して、EGFR、HER2又はHER3分解を誘導することを示す。

10

【0278】

(実施例10)

二特異性抗体Patri-Cetu-Fcは、Sw1990異種移植片モデルにおいて、単一特異性抗体又はその組合せと比較して、腫瘍成長をより強力に減少させた

材料及び方法

Sw1990細胞を異種移植されたマウスを、(1)BsAb IRR抗CD19-CD3、(2)二特異性抗体Patri-Cetu-Fc(17mg/Kg)、(3)セツキシマブ親抗体(10mg/kg)、(4)パトリツマブ親抗体(10mg/kg)又は組合せ(セツキシマブ+パトリツマブ、5+5mg/kg)で処置した(1群当たり9匹のマウス)。二特異性抗体及び親抗体の用量は、それらのFc含有量に基づく同一の容積モル濃度を保有した。

20

【0279】

0日目に、スイスヌード免疫不全マウスに、3百万個のSw-1990細胞を皮下移植した。腫瘍が140mm³の平均サイズを得たら、処置を開始した。処置スケジュールは、4週間にわたる1週間当たり2回の注射であった。処置マウスの腫瘍成長及び生存を評価した(図7)。

【0280】

結果

BsAbのPatri-Cetu-Fcは、in vivoで腫瘍成長の強い阻害を誘導した(IRR処置マウスと比較してグラフト後38日目に77%の腫瘍成長阻害)。単一特異性抗体のセツキシマブ及びパトリツマブは、グラフト後38日目にそれぞれ50%及び43%の腫瘍成長阻害を誘導した。最後に、2種のモノクローナル抗体の組合せは、IRR処置マウスと比較して65%の腫瘍成長阻害を示した。よって、二特異性抗体のPatri-Cetu-Fcは、腫瘍成長阻害の観点から、単一特異性親抗体よりもはるかに強力である。

30

【0281】

Patri-Cetu-Fcは、in vivoで強い延命効果も誘導した。二特異性抗体のPatri-Cetu-Fcは、延命効果の観点から、単一特異性親抗体よりも強力であることが示された。

【0282】

(実施例11)

ヒト化セツキシマブFabを含む2種の追加の二特異性抗体を設計した:

- 「BMX003-010」抗体:これは、パトリツマブFabドメイン(外側Fabとして)及びセツキシマブFabドメインのヒト化バージョン(内側Fabとして)を含む。
- 「BMX003-011」抗体、これは、Fcドメインに2個の変異(S239D及びI332E)を更に含むことを除いてBMX003-010と同一である。

40

【0283】

BMX003-010及びBMX003-011は両者共に、

- 配列番号81のVHドメイン及び配列番号2のCH1ドメイン(配列番号83のVH-CH1配列に対応)

- 配列番号71のVLドメイン及び配列番号4のCLドメイン(配列番号84のVL-CL配列

50

に対応)

を含むヒト化セツキシマブFabを含む。

【0284】

BMX003-011は、Fcドメインに2個の変異(S239D及びI332E)を含む(配列番号82の変異したFcドメイン)という点においてBMX003-010とは異なる。

【0285】

【表5】

名称	重鎖	軽鎖 (外側 Fab)	軽鎖 (内側 Fab)
BMX003-010	配列番号 85	配列番号 14	配列番号 84
BMX003-011	配列番号 86	配列番号 14	配列番号 84

Table 4:二特異性構築物「BMX003-010」及び「BMX003-011」の配列に関する詳細

10

【0286】

ヒト化セツキシマブFab断片を含むBMX003-010及びBMX003-011の活性を、親セツキシマブFabを含む「BMX003-001」の活性と比較した(「BMX003-001」は、上に記載されている「Patri-cetu-Fc」構築物に対応する)。

20

【0287】

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動及びサイズ排除クロマトグラフィー解析

精製された抗体の品質を評価するために、SDS-PAGE及びサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を上に記載されている通りに行った。BMX003-010及びBMX003-011二特異性抗体のSDS-PAGEは、予想されるプロファイルを示した。SECクロマトグラムは、凝集物の非存在又は軽微な含有量を確認し、各抗体が正しくアSEMBルされたことを示した。

【0288】

ELISAによって査定されたHER3及びEGFRに対する親和性

30

HER3及びEGFRに対するBsAbのBMX003-010、BMX003-011及びBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)抗体の見かけ上の親和性を直接的ELISAによって査定した。各BsAbの単一特異性結合、即ち、一度に1種の抗原に対する結合は、親MAbと比較される。EC50(ベースライン及び最大結合の間の50%結合中央値を誘導する抗体濃度)が次いで、各BsAb及び親抗体について定義される。ELISAアッセイを上に記載されている通りに実行した。

【0289】

図8及び図9は、二特異性抗体が全て、対応する親抗体と非常に類似した結合プロファイルで、その抗原(それぞれHER3及びEGFR)に結合することができたことを示す。

【0290】

40

フローサイトメトリー結合プロファイル

SW-1990細胞の細胞表面に発現されたHER3及びEGFRタンパク質に結合するBMX003-010、BMX003-011及びBMX003-001(Patri-Cetu-Fc)の能力をフローサイトメトリーによって測定した(n=3)。

【0291】

図10の結果は、BMX-003-001並びにヒト化BMX-003-010及びBMX-003-011が、非常に類似したEC50及びECmaxを有することを示す。

【0292】

リン酸化アッセイ

Perkin Elmer社のAdvanced Phospho-ERK及びAdvanced Phospho-AKTキッ

50

トに基づく。HCT-116結腸がん細胞を、96ウェル平底マイクロタイタープレートにおいて50,000細胞/ウェルの密度でcDMEM培地中にプレATINGし、一晚37℃(5%CO₂)で育成した。組織培養培地を除去し、無血清培地(DMEM+GlutaMAX)と交換し、細胞を更に24時間37℃(5%CO₂)でインキュベートした。組織培養培地を除去し、DMEMに再懸濁された被験物(BiXAb、Mab又は対照)と交換し、20分間37℃(5%CO₂)でインキュベートした。成長因子(16.6nM EGF及び3.71nM NRG1)をウェルに添加し、更に10分間インキュベートした。培地を除去し、次いで細胞を冷PBSで1回洗浄した。次に、溶解バッファー(Perkin Elmer社のキットに提供)の添加により細胞を溶解した。Perkin Elmer社によって提供されたFRETアッセイキット説明書に従うことにより、蛍光体(phosphor)シグナルの定量化を達成した。本質的に、4マイクロLの予め混合されたユーロピウム標識抗体を、細胞ライセートと共に4時間室温でインキュベートした。次に、上清を蛍光プレートリーダーに移し、665nm及び620nmでHTRFを測定した。

10

【0293】

結果は、全ての二特異性抗体が、リガンド誘導後にpAKT(図11A)及びpERK(図11B)シグナリングの強い阻害を示したことを示す。

【0294】

脱顆粒アッセイ

2名の独立したドナー由来のPBMCを標準手順に従って調製し、完全RPMI培地中で一晚静置した。HCT116結腸がん細胞株を、10%FBSを補充したRPMI組織培養培地において育成した。20,000個のHCT116細胞を、100,000個のPBMCと共にU字底96ウェルマイクロタイタープレートにおいてプレATINGした(PBMCのおよそ10%であるNK集団に基づき1:2のエフェクター対標的(E:T)比を生じる)。次に、BiXAb被験物及び対照を、抗CD107a-AF488 mAbと共に細胞混合物に添加し、1時間37℃(5%CO₂)でインキュベートした。次に、GolgiStopをウェルに添加し、プレートを更に4時間インキュベートした。次に、抗CD45、抗CD3及びCD56 mAbをウェルに添加して、典型的なFACS染色によるNK細胞の同定を可能にした。NK細胞におけるゲーティングによるCD107aのFACS解析によって、NK脱顆粒を査定した。

20

【0295】

図12の結果は、セツキシマブ、BMX003-001及びBMX003-010が匹敵することを示す。はるかに多い脱顆粒がBMX003-011(Fc改変)の存在下で観察され、BMX003-011変異Fcドメインが、野生型Fcドメインと比較して、Fcガンマ受容体への結合が増加し、改善されたエフェクター機能を有する二特異性抗体を生じることを示唆する。

30

【0296】

in vivo有効性

BMX003-001(Patri-Cetu-Fc)、BMX003-010(ヒト化Patri-Cetu-Fc)及びBMX003-011(ヒト化Patri-Cetu-Fc改変)のin vivo有効性をSW1990膵臓がん異種移植(xenograph)モデルにおいて査定した。BMX003-01、BMX003-010及びBMX003-011は8.5mg/kgで使用し、BMX対照は17mg/kgで使用した。方法は、上に記載されている通りである。

【0297】

40

35日目に(32日目の最後の注射の後に)、HER3×EGFR BiXAbで処置された全群は、対照群PBSよりも有意に低い腫瘍体積を提示した。BMX003-001、BMX-003-010及びBMX-003-011 BiXAbの間に大きな差は観察されなかった。

【0298】

結論

結果は、本発明の二特異性抗体が効率的に産生され、適正にアセンブルされたことを示す。結果は、二特異性抗体の治療特性も実証する：

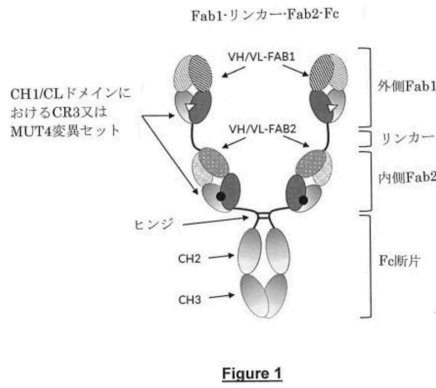
- 親抗体と比較して、優れた親和性でその標的に同時に結合し；
- リン酸化シグナリング経路を阻害することにより、HER3/HER2/EGFR受容体の活性化を阻害し；

50

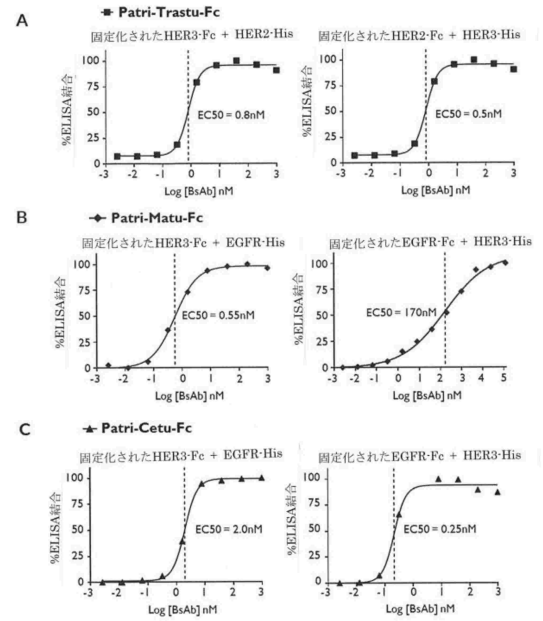
- 2種の標的化された受容体を同時に分解し;
- 腫瘍に浸透し;
- 新血管新生を阻害し;
- 腫瘍における免疫細胞の浸潤をモジュレートし;
- *in vivo*で腫瘍成長を有意に阻害し、生存を改善する。

【図面】

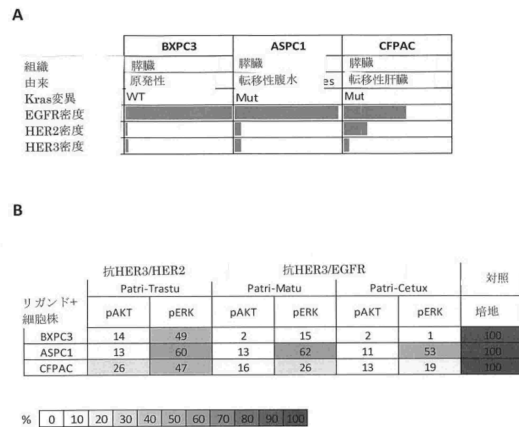
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【図 4】

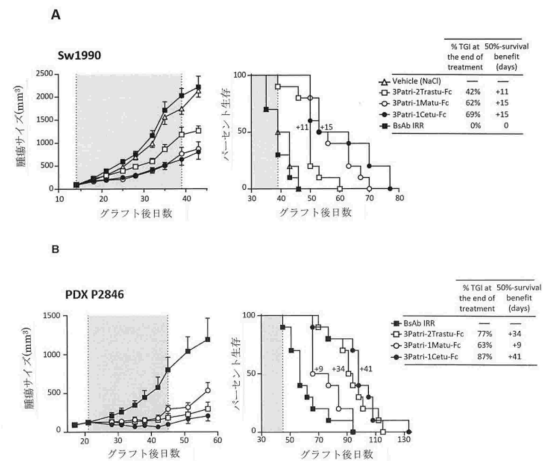


Figure 3

Figure 4

【図 5】

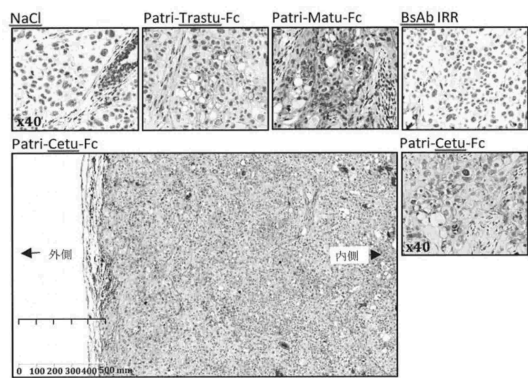


Figure 5

【図 6 - 1】

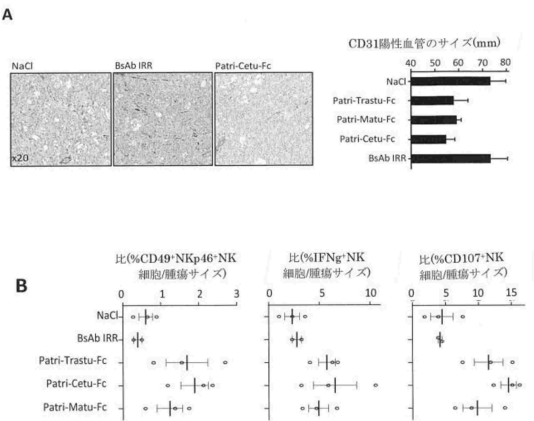


Figure 6

【図 6 - 2】

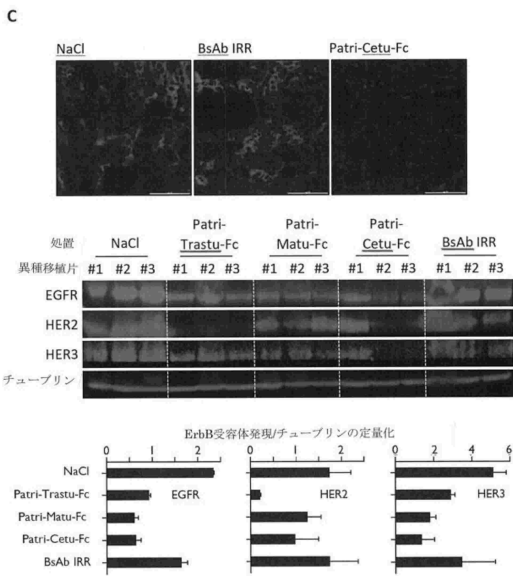


Figure 6 (CONT.)

【図 7】

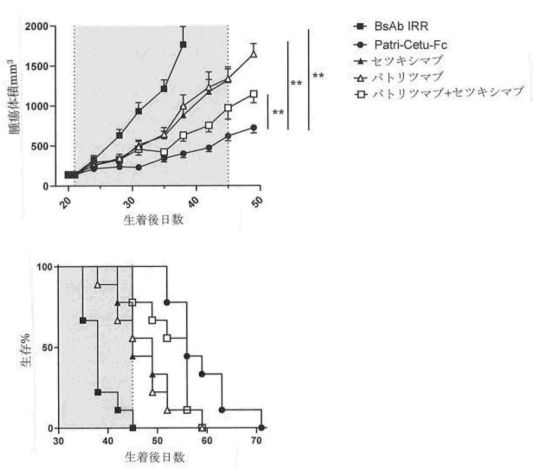


Figure 7

10

20

30

40

50

【図 8】

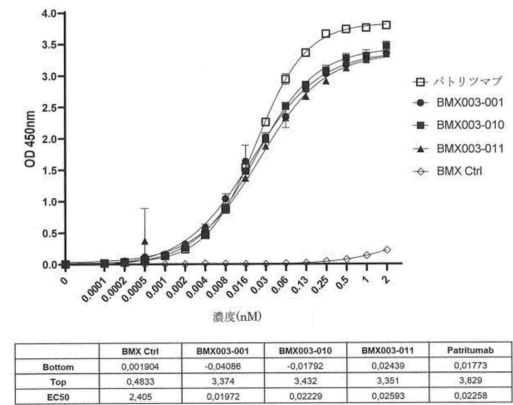


Figure 8

【図 9】

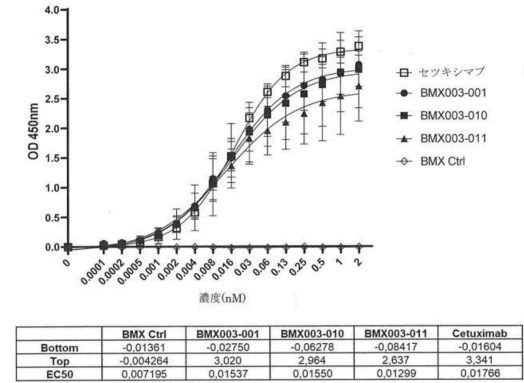


Figure 9

【図 10】

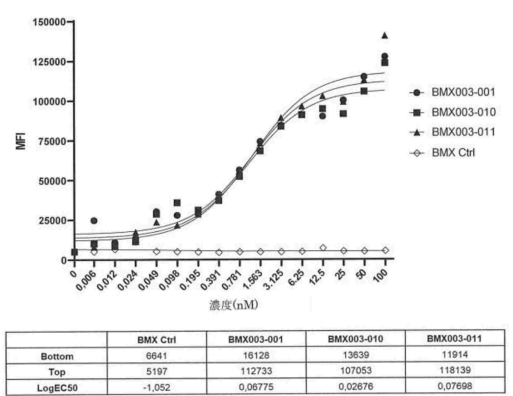


Figure 10

【図 11】

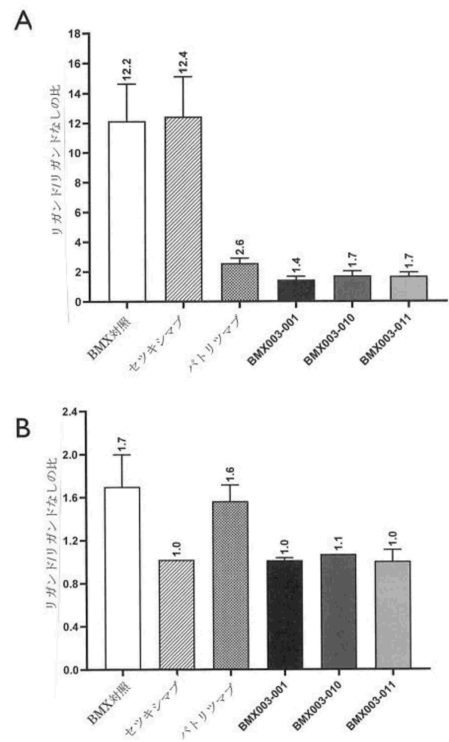


Figure 11

【図 12】

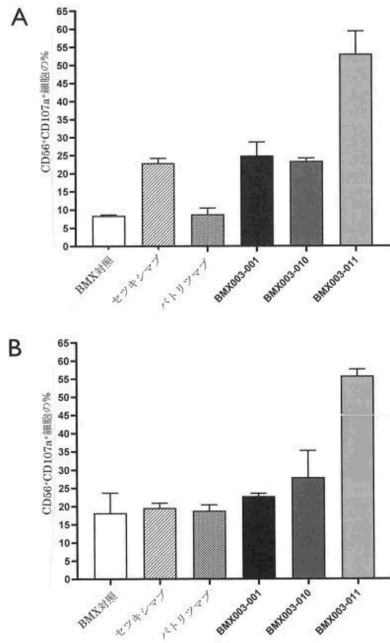


Figure 12

【図 13】

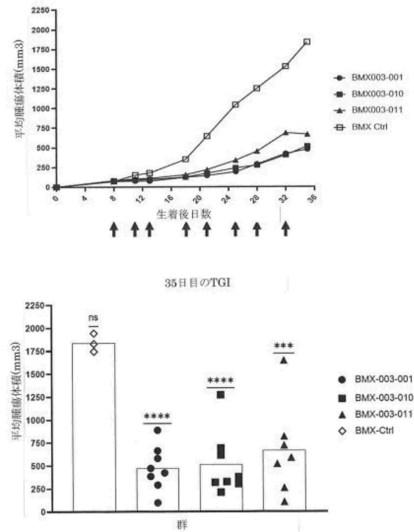


Figure 13

10

20

【配列表】

2025510539000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055243

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	C07K16/28	C07K16/32
	C07K16/46	A61P35/00
		A61K39/395
ADD.		
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)		
C07K A61P A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2011/050262 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US] ET AL.) 28 April 2011 (2011-04-28) sequences 618, 616, 610, 608, , 378, 376, 374, 372 -----	1-14
Y	WO 2009/134776 A2 (ABBOTT LAB [US]; GHAYUR TARIQ [US] ET AL.) 5 November 2009 (2009-11-05) sequences 605, 603, 597, 595, 365, 363, 361, 359 -----	1-14
Y	WO 2017/136820 A2 (EPIMAB BIOTHERAPEUTICS INC; WU CHENGBIN [CN]) 10 August 2017 (2017-08-10) paragraph [0487] sequences 354, 363, 368 ----- -/--	1-14
☒ 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		"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date		"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
"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)		"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
10 May 2023		22/05/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bumb, Peter

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055243

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GARCÍA-FONCILLAS JESUS ET AL: "Distinguishing Features of Cetuximab and Panitumumab in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors", FRONT. ONCOL., vol. 9, no. 849, 20 September 2019 (2019-09-20), pages 1-16, XP055941845, DOI: 10.3389/fonc.2019.00849 paragraph spanning pages 2-3 -----	1-14
Y	LABRIJN ARAN F ET AL: "Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 18, no. 8, 7 June 2019 (2019-06-07), pages 585-608, XP036850121, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/s41573-019-0028-1 [retrieved on 2019-06-07] the whole document -----	1-14
Y	WU X & DEMAREST S J ED - WU X & DEMAREST S J: "Building blocks for bispecific and trispecific antibodies", METHODS,, vol. 154, 28 August 2018 (2018-08-28), pages 3-9, XP002801879, the whole document -----	1-14
T	CLAUDIA BLUEMEL ET AL: "Epitope distance to the target cell membrane and antigen size determine the potency of T cell-mediated lysis by BiTE antibodies specific for a large melanoma surface antigen", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 59, no. 8, 23 March 2010 (2010-03-23), pages 1197-1209, XP019842190, ISSN: 1432-0851 whole document; page 1206 last nine lines; page 1207, first sixteen lines; page 1207, paragraph spanning columns ----- -/--	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/055243

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	STEFFEN DICKOPF ET AL: "Format and geometries matter: Structure-based design defines the functionality of bispecific antibodies", COMPUTATIONAL AND STRUCTURAL BIOTECHNOLOGY JOURNAL, vol. 18, 14 May 2020 (2020-05-14), pages 1221-1227, XP055740966, Sweden ISSN: 2001-0370, DOI: 10.1016/j.csbj.2020.05.006 page 1223, top right -----	1-14
T	RODA-NAVARRO PEDRO ET AL: "Understanding the Spatial Topology of Artificial Immunological Synapses Assembled in T Cell-Redirecting Strategies: A Major Issue in Cancer Immunotherapy", FRONTIERS IN CELL AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, vol. 7, 10 January 2020 (2020-01-10), XP055830746, DOI: 10.3389/fcell.2019.00370 figure 1 -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/055243

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

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/055243

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011050262 A2	28-04-2011	AR 078728 A1	30-11-2011
		AU 2010310565 A1	31-05-2012
		BR 112012009043 A2	08-09-2015
		CA 2778176 A1	28-04-2011
		CL 2012000980 A1	11-01-2013
		CN 102741423 A	17-10-2012
		CR 20120267 A	14-08-2012
		DO P2012000117 A	31-07-2012
		DO P2012000122 A	15-09-2013
		EC SP12011911 A	31-07-2012
		EP 2491129 A2	29-08-2012
		JP 2013507969 A	07-03-2013
		KR 20130004563 A	11-01-2013
		PE 20121249 A1	06-10-2012
		RU 2012121189 A	27-11-2013
		TW 201127956 A	16-08-2011
		US 2010260668 A1	14-10-2010
		UY 32965 A	28-02-2011
		WO 2011050262 A2	28-04-2011
		ZA 201203688 B	23-12-2014
WO 2009134776 A2	05-11-2009	AR 071526 A1	23-06-2010
		AU 2009241589 A1	05-11-2009
		BR PI0910482 A2	24-09-2019
		CA 2722466 A1	05-11-2009
		CL 2009001033 A1	12-11-2010
		CN 102076355 A	25-05-2011
		CO 6331296 A2	20-10-2011
		CR 11795 A	12-01-2011
		DO P2010000325 A	15-11-2010
		EC SP10010580 A	30-11-2010
		EP 2282769 A2	16-02-2011
		EP 2899209 A1	29-07-2015
		JP 5646457 B2	24-12-2014
		JP 2011523400 A	11-08-2011
		JP 2014193170 A	09-10-2014
		KR 20110014607 A	11-02-2011
		NZ 588554 A	28-03-2013
		PE 20091845 A1	08-01-2010
		SG 190572 A1	28-06-2013
		TW 200950805 A	16-12-2009
WO 2017136820 A2	10-08-2017	US 2010076178 A1	25-03-2010
		US 2015104452 A1	16-04-2015
		UY 31792 A	14-12-2009
		WO 2009134776 A2	05-11-2009
		AU 2017214692 A1	30-08-2018
		BR 112018015485 A2	18-12-2018
		CA 3011746 A1	10-08-2017
		CN 109195993 A	11-01-2019
		CU 20180084 A7	03-05-2019
		EP 3411412 A2	12-12-2018
		JP 7014724 B2	01-02-2022
		JP 2019514839 A	06-06-2019
		KR 20180104147 A	19-09-2018
		RU 2018129878 A	06-03-2020
		TW 201731873 A	16-09-2017
		US 2019233517 A1	01-08-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International application No
Information on patent family members			PCT/EP2023/055243
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017136820 A2 10-08-2017			

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (71)出願人 515011944
ウニヴェルシテ・ドゥ・モンペリエ
フランス・F-34090・モンペリエ・リュ・オーギュスト・ブルソネ・163
- (71)出願人 518064994
アンスティテュ・レジオナル・デュ・カンセール・ドゥ・モンペリエ
フランス・34298・モンペリエ・セデックス・5・パルク・ユーロメドウシーヌ・アヴニュ・デ・アポティケール・208
- (74)代理人 100108453
弁理士 村山 靖彦
- (74)代理人 100110364
弁理士 実広 信哉
- (74)代理人 100133400
弁理士 阿部 達彦
- (72)発明者 ユージーン・ジュコフスキー
アメリカ合衆国・コネチカット・06801・ベセル・ヒドゥン・ブルック・トレイル・35
- (72)発明者 ピエール・エマニュエル・ジェラルド
フランス・75016・パリ・リュ・ミシェル・アンジュ・34
- (72)発明者 クリステル・ラルブレ
フランス・34270・ヴァルフロネス・リュ・デ・ミコクリエ・243
- (72)発明者 ラビア・エミリア
フランス・95870・ブゾン・アヴニュ・ガブリエル・ペリ・36
- (72)発明者 ティエリ・シャルド
フランス・34820・アッサス・シュマン・ドゥ・ラ・コンブ・470
- (72)発明者 アンドレ・ペレグリン
フランス・34070・モンペリエ・リュ・デ・アマリス・32・レス・エンブルエム
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 CE20 DA05
4C085 AA14 BB41 BB42 CC23 DD62 EE01 GG01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA28 FA72 FA74
GA22 GA26