

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7577435号
(P7577435)

(45)発行日 令和6年11月5日(2024.11.5)

(24)登録日 令和6年10月25日(2024.10.25)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z Z N A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
請求項の数 19 外国語出願 (全95頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2019-143907(P2019-143907)	(73)特許権者	513105328	
(22)出願日	令和1年8月5日(2019.8.5)		アムジェン リサーチ (ミュニック)	
(65)公開番号	特開2020-18298(P2020-18298A)		ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテ	
(43)公開日	令和2年2月6日(2020.2.6)		ル ハフツング	
審査請求日	令和4年8月4日(2022.8.4)		ドイツ連邦共和国 8 1 4 7 7 ミュンヘ	
(31)優先権主張番号	62/714,366		ン シュタッフエルゼーシュトラッセ 2	
(32)優先日	平成30年8月3日(2018.8.3)	(73)特許権者	500049716	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		アムジェン・インコーポレーテッド	
			アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 1	
			3 2 0, サウザンド オークス, ワン ア	
			ムジェン センター ドライブ	
		(74)代理人	110001173	
			弁理士法人川口国際特許事務所	
		(72)発明者	クリストフ・ダールホフ	
			ドイツ国、8 1 4 7 7・ミュニック、シ	
			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 C L D N 1 8 . 2 及び C D 3 に対する抗体コンストラクト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- ・ 標的細胞の表面上の C L D N 1 8 . 2 に結合する第 1 のドメインと、
 - ・ T 細胞の表面上のヒト C D 3 に結合する第 2 のドメインと
- を含む抗体コンストラクトであって、

前記第 1 のドメインが、

配列番号 1 2 1 に示される C D R - H 1、配列番号 1 2 2 に示される C D R - H 2 及び配列番号 1 2 3 に示される C D R - H 3 を含む V H 領域、並びに配列番号 1 2 4 に示される C D R - L 1、配列番号 1 2 5 に示される C D R - L 2 及び配列番号 1 2 6 に示される C D R - L 3 を含む V L 領域を含む、抗体コンストラクト。

【請求項 2】

前記第 1 のドメインが、配列番号 1 2 7 または配列番号 1 3 9 に示されるアミノ酸配列を有する V H 領域を含む、請求項 1 に記載の抗体コンストラクト。

【請求項 3】

前記第 1 のドメインが、配列番号 1 2 8 または配列番号 1 4 0 に示されるアミノ酸配列を有する V L 領域を含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体コンストラクト。

【請求項 4】

前記第 1 のドメインが、配列番号 1 2 7 に示される V H 領域及び配列番号 1 2 8 に示される V L 領域、又は配列番号 1 3 9 に示される V H 領域及び配列番号 1 4 0 に示される V

L 領域を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクト。

【請求項 5】

前記第 1 のドメインが、配列番号 1 2 9 または配列番号 1 4 1 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクト。

【請求項 6】

前記第 1 のドメインが、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 2、配列番号 1 4 3、および配列番号 1 4 4 に示されるアミノ酸配列の群から選ばれるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、またはから成る、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクト。

【請求項 7】

前記第 2 のドメインは、ヒト CD3 ϵ 、及びコモンマーモセット (Callithrix jacchus) 又はリスザル (Saimiri sciureus) CD3 ϵ に結合する、請求項 1～6 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクト。

10

【請求項 8】

a) 前記抗体コンストラクトは、単鎖抗体コンストラクトであり、
b) 前記第 1 のドメインは、scFv のフォーマットであり、
c) 前記第 2 のドメインは、scFv のフォーマットであり、
d) 前記第 1 のドメイン及び前記第 2 のドメインは、リンカーを介して接続されており、及び／又は

e) 前記抗体コンストラクトは、延長された血清半減期をもたらすドメインを含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクト。

20

【請求項 9】

前記第 1 のドメインは、CLDN18.1、CLDN1、CLDN2、CLDN3、CLDN4、CLDN6 及び／又は CLDN9 に結合しないか又は有意に結合しない、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクト。

【請求項 10】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクトをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 11】

請求項 10 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 12】

請求項 10 に記載のポリヌクレオチド又は請求項 11 に記載のベクターで形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞。

30

【請求項 13】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクトを作製する方法であって、前記抗体コンストラクトの発現を許容する条件下において、請求項 12 に記載の宿主細胞を培養することと、前記作製された抗体コンストラクトを培養物から回収することを含む方法。

【請求項 14】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクトを含む医薬組成物。

【請求項 15】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクトを含む、疾患の予防、治療又は改善のための医薬組成物。

40

【請求項 16】

前記疾患が、新生物である、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記疾患又は新生物は、消化管がん、卵巣がん及び肺がんからなる群から選択される、請求項 15 又は 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記消化管がんは、胃がん、食道がん、胃食道がん、膵がん及び結腸直腸がんからなる群から選択される、請求項 17 に記載の医薬組成物。

50

【請求項 19】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体コンストラクト、請求項 10 に記載のポリヌクレオチド、請求項 11 に記載のベクター及び／又は請求項 12 に記載の宿主細胞を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、クロードイン 18.2 (CLDN18.2) に結合するドメインと、CD3 に結合する別のドメインとを含む抗体コンストラクトに関する。更に、本発明は、この抗体コンストラクトをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含むベクター及び前記ポリヌクレオチド又はベクターで形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。更に、本発明は、本発明の抗体コンストラクトを作製する方法、前記抗体コンストラクトの医学的使用及び前記抗体コンストラクトを含むキットを提供する。

【背景技術】

【0002】

クロードインは、上皮タイトジャンクションの重要な構造的及び機能的成分であり、細胞間透過性を調節し、イオン恒常性を維持し、細胞接着及び極性を支える役割を果たす。クロードインは、細胞膜内で又は細胞膜を越えて多量体化することにより防護壁を形成する 22～27 kD の 4 回膜貫通型タンパク質である。既報告の 24 個のクロードインタンパク質は、その組織局在の特異性及び他のタンパク質とのその相互作用が異なっている。

【0003】

クロードイン 18 (CLDN18) は、当初、転写因子 T/EBP/NKX2.1 の標的遺伝子として同定された。他のクロードインファミリーメンバーとのその相同性と一致して、CLDN18 は、マウス及びヒトの細胞タイトジャンクションに局在することが確認された。CLDN18 は、選択的スプライシングによって生成される 2 つのアイソフォーム：正常肺に特異的に発現する CLDN18.1 及び胃粘膜の分化型細胞に発現する CLDN18.2 をコードすることが示された。

【0004】

CLDN18.2 は、2 つの細胞外ループを含む 261 アミノ酸タンパク質であり、CLDN18.1 と 92 % の配列同一性を有する。第 2 の細胞外ループと異なり、CLDN18.2 の第 1 の細胞外ループは、CLDN18.1 と 8 アミノ酸の差を有する。他のファミリーメンバーとの CLDN18.2 の相同性は、より限られたものであり、CLDN1、CLDN6 及び CLDN7 との全体的同一性は、29～34 % である。

【0005】

CLDN18.2 は、胃がん、膵がん、食道がん、ムチン性卵巣がん及び非小細胞肺癌を含め、幾つかの腫瘍型に発現する。胃がんにおける CLDN18.2 発現は、浸潤最深部及び転移部位を含むが、しかし、これらの状況では、絶対的 CLDN18 レベルが低下することが報告される。複数の腫瘍型での CLDN18.2 の発現は、正常組織発現が主に胃の分化型細胞に限定されることと併せて、CLDN18.2 を胃がん及び他の対象疾患の治療標的として考えることにつながっている。

【0006】

胃がん及び胃食道がんは、依然として医療ニーズがありながらも未だ対処されていない疾患であり、毎年世界で少なくとも 140 万件の新規症例及び 110 万件の死亡例が報告されている (Lordick and Janjigian, Nat Rev Cancer 2016)。典型的な第一選択治療には、手術並びに白金及びフルオロピリミジン化合物を含む併用化学療法が関わる。このレジメンによってクオリティオブライフが向上し、生存が中央値で 8～10 ヶ月延びる可能性があり得るものの、5 年生存率は、依然として低い。

【0007】

ターゲット療法は、代替的治療戦略を提供する。化学療法との併用で Her2 陽性胃が

10

20

30

40

50

ん及び胃食道がんの第一選択治療として抗Her2モノクローナル抗体トラスツズマブが承認されている (Bang et al., The Lancet 2010)。化学療法後に進行した胃がん及び胃食道がんの治療のために抗VEGFR2抗体ラムシルマブが承認されている (Fuchs et al., The Lancet 2014)。これらの標的化薬剤により、化学療法単独と比較して生存率が更に上昇するが、その有効性は、標的発現の不均一さ及び耐性機構によって制限されている。

【0008】

近年、免疫チェックポイント療法が特定の状況で活性を実証している。ペンブロリズマブは、胃がんを含めた高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) 腫瘍の治療 (Lee et al., Science 2017) 及び2次以上の化学療法ライン後に進行した切除不能な進行又は再発胃がんの治療 (Fuchs et al., J Clin Oncol 2017) のために米国で承認された。ニボルマブは、化学療法後に進行した切除不能な進行又は再発胃がんの治療のために日本で承認された (Kang et al., The Lancet, 2017)。これらの試験において完全奏効を示したのは、任意抽出集団における患者の僅か1~2%及びMSI-H (高頻度マイクロサテライト不安定性) 集団の60% (胃及び胃食道全症例の9%) であった。従って、より大きい患者集団に持続的奏効をもたらす潜在的な能力のある新規療法がなお必要とされている。

【0009】

膵がんは、利用可能な療法に対する奏効性が胃がん又は胃食道がんよりも更に低いことが分かっている。毎年世界で膵がんによる少なくとも338,000症例及び331,000死亡例が報告されており、生存期間中央値は、6ヵ月である (Illic and Illic, World J Gastroenterol 2016)。外科的切除の候補となるのは、僅か20~30%の患者である。これまで、ゲムシタビンが第一選択療法と考えられてきたが、最近になって併用化学療法レジメン、フォルフィリノックス (5-フルオロウラシル、ロイコボリン、オキサリプラチン、イリノテカン) 及びゲムシタビンとnab-パクリタキセルは、ゲムシタビン治療単独と比べて全生存を約2~5ヵ月上昇させることが示された (Uccello et al., Curr Oncol 2018)。第二選択療法では、典型的には他の化学療法併用が用いられる。進行膵がんにおける幾つかのターゲット療法及び免疫療法薬剤が評価されているが、成功は限られている。膵腫瘍は、この奏効性の欠如に至らしめる線維形成及び免疫抑制性免疫浸潤によって特徴付けられる。この免疫抑制環境を克服し、生存を延長させる潜在的な能力のある新規療法が必要とされている。

【0010】

T細胞上のCD3に結合する1つのドメインと、標的細胞上に発現するタンパク質に結合する1つのドメインとを含む二特異性抗体コンストラクトは、T細胞を標的細胞に直接結び付けてT細胞リダイレクト溶解を誘導する。この作用機序は、それが、共刺激活性化シグナルとは独立に任意のCD3陽性T細胞で機能し得る点で化学療法、ターゲット療法及び他の免疫療法と異なる (Klinger et al., Immunol Reviews 2016)。胃がん、胃食道がん及び膵がんの細胞表面上におけるCLDN18.2の発現は、CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトによるこれらの腫瘍型のターゲティングに向けた基礎を提供する。更に、CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、ムチン性卵巣がん、結腸直腸がん及び非小細胞肺癌を含め、CLDN18.2を発現する更なる腫瘍型を標的とする潜在的な能力を有する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【文献】 Lordick and Janjigian, Nat Rev Cancer 2016

【文献】 Bang et al., The Lancet 2010

【文献】 Fuchs et al., The Lancet 2014

10

20

30

40

50

【文献】Le et al., Science 2017

【文献】Fuchs et al., J Clin Oncol 2017

【文献】Kang et al., The Lancet, 2017

【文献】Ilic and Ilic, World J Gastroenterol 2016

【文献】Uccello et al., Curr Oncol 2018

【文献】Klinger et al., Immunol Reviews 2016

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0012】

このように、一態様において、本発明は、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合する第1のドメインと、T細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインを含む抗体コンストラクトを提供する。

10

【0013】

また、

(1) 本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、CLDN18.2の第1の細胞外ループ（ループ1）に結合し；

(2) 本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合するドメインであって、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

20

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

c) 配列番号127に示されるとおりのVH領域及び配列番号128に示されるとおりのVL領域；又は

d) 配列番号139に示されるとおりのVH領域及び配列番号140に示されるとおりのVL領域

30

を含むドメインを含む抗体又は抗体コンストラクトと同じCLDN18.2のエピトープに結合し；

(3) 本発明の抗体コンストラクトは、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合するドメインであって、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

40

c) 配列番号127に示されるとおりのVH領域及び配列番号128に示されるとおりのVL領域；又は

d) 配列番号139に示されるとおりのVH領域及び配列番号140に示されるとおりのVL領域

を含むドメインを含む抗体又は抗体コンストラクトと結合に関して競合し；

(4) 本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、配列番号22に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体に結合し、任意選択で、配列番号24に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCL

50

ＤＮ１８．２突然変異体にも結合するが、配列番号２３に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のＣＬＤＮ１８．２突然変異体に結合せず；

（５）本発明の抗体コンストラクトの第１のドメインは、配列番号１４に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のＣＬＤＮ１８．２突然変異体及び／又はアミノ酸配列、配列番号１５を有する標的細胞の表面上のＣＬＤＮ１８．２突然変異体に結合し、任意選択で、配列番号１１、１２、１３、１６、１７、１９、２０及び２１に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上の１つ以上のＣＬＤＮ１８．２突然変異体にも結合するが、配列番号１８に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のＣＬＤＮ１８．２突然変異体に結合せず；

（６）本発明の抗体コンストラクトの第１のドメインは、標的細胞の表面上のヒトＣＬＤＮ１８．２に結合し、ここで、ヒトＣＬＤＮ１８．２の５６位のＧｌｕ（Ｅ）は、第１のドメインの結合に必須であり、ヒトＣＬＤＮ１８．２の４２位のＡｌａ（Ａ）及び／又は４５位のＡｓｎ（Ｎ）は、第１のドメインの結合に必須でなく；及び／又は

（７）本発明の抗体コンストラクトの第１のドメインは、配列番号２６６に示されるとおりのアミノ酸配列を含むが、配列番号２６５に示されるとおりのアミノ酸配列を含まず、任意選択で、配列番号２６７に示されるとおりのアミノ酸配列も含まないＣＬＤＮ１８．２のエピトープに結合すること

ことも想定される。

【００１４】

有利には、本発明の抗体コンストラクトによって認識されるＣＬＤＮ１８．２のエピトープのターゲティングは（実施例２も参照されたい）、以下の利益を提供する：

（１）ＣＬＤＮ１８．１に対するＣＬＤＮ１８．２×ＣＤ３抗体コンストラクトの選択性（実施例６を参照されたい）、及び

（２）ＣＬＤＮ１８．２×ＣＤ３抗体コンストラクトの予想外に高い細胞傷害能（実施例７．４を参照されたい）。

【００１５】

用語「抗体コンストラクト」は、その構造及び／又は機能が抗体、例えば完全長免疫グロブリン分子の構造及び／又は機能をベースとする分子を指す。従って、抗体コンストラクトは、その標的又は抗原に免疫特異的に結合し、且つ／又は抗体コンストラクトは、抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）及び／又は軽鎖可変領域（ＶＬ）を含むか、又はそれに由来するドメインを含む。本発明に係る抗体コンストラクトは、免疫特異的標的結合を可能にする抗体の最小限の構造要件を含む。この最小限の要件は、例えば、少なくとも３つの軽鎖ＣＤＲ（即ちＶＬ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）及び／又は３つの重鎖ＣＤＲ（即ちＶＨ領域のＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）、好ましくは６つ全てのＣＤＲの存在によって定義付けられ得る。従って、抗体コンストラクトは、いずれか一方又は両方の結合ドメインにおける３つ又は６つのＣＤＲの存在によって特徴付けられ得、当業者は、結合ドメイン内でそれらのＣＤＲがいずれの箇所に（どのような順序で）位置するかを分かっている。

【００１６】

本発明に係る「抗体」の定義は、ラクダ科動物抗体及びバイオテクノロジー又はプロテインエンジニアリングの方法又はプロセスによって作成される他の免疫グロブリンも含め、完全長抗体を含む。こうした完全長抗体は、例えば、モノクローナル、組換え、キメラ、脱免疫化、ヒト化及びヒト抗体並びにマウス、ハムスター、ウサギ、ラット、ヤギ又は非ヒト霊長類などの他の種からの抗体であり得る。

【００１７】

本発明の「抗体コンストラクト」は、それが天然に存在するとおりの完全長免疫グロブリンの構造を有し得る。例えば、抗体コンストラクトは、（少なくとも）２つの完全長抗体重鎖と２つの完全長抗体軽鎖とを含み得る。しかしながら、本発明に係る抗体コンストラクトが、ＣＬＤＮ１８．２に結合する１つのドメインと、ＣＤ３に結合する別のドメインとを含むことを考えれば、これは、天然に存在せず、天然に存在する産物とその機能が

10

20

30

40

50

著しく異なる。従って、本発明の抗体コンストラクトは、特異性が異なる少なくとも2つの個別の結合ドメインを含む人工「ハイブリッド」分子である。

【0018】

本発明の「抗体コンストラクト」は、VH、VHH、VL、(s)dAb、Fv、軽鎖(VL-CL)、Fd(VH-CH1)、重鎖、Fab、Fab'、F(ab')₂又は「IgG」(重鎖と軽鎖とからなる「半抗体」)など、完全長抗体の断片も含み得る。本発明に係る抗体コンストラクトは、抗体変異体又は抗体誘導体とも称される抗体の修飾断片も含み得る。例としては、限定されないが、scFv、di-scFv又はbi(s)-scFv、scFv-Fc、scFv-ジッパー、scFab、Fab₂、Fab₃、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ、タンデムダイアボディ(Tandab)、タンデムdi-scFv、タンデムtri-scFv、以下のとおりの構造：(VH-VL-CH3)₂、(scFv-CH3)₂、((scFv)₂-CH3+CH3)、((scFv)₂-CH3)又は(scFv-CH3-scFv)₂によって例示される「ミニボディ」、トリアボディ又はテトラボディなどのマルチボディ及び他の可変領域又はドメインと無関係に抗原又は標的に特異的に結合する、VHH、VH又はVLであり得る1つのみの可変領域を含むナノボディ又はシングル可変ドメイン抗体などのシングルドメイン抗体が挙げられる。本発明に係る抗体コンストラクトの更なる可能なフォーマットは、クロスボディ、マキシボディ、ヘテロFcコンストラクト、モノFcコンストラクト及びscFcコンストラクトである。これらのフォーマットの例については、本明細書で以下に記載する。

【0019】

更に、用語「抗体コンストラクト」の定義には、2、3つ又はそれを超える抗原構造に異なる結合ドメインを介して特異的に結合する二価及び多価／多原子価コンストラクト並びに二特異性及び多特異性／多重特異性コンストラクトが含まれる。抗体コンストラクトは、特異性よりも大きい結合価を有することもあり、例えば、それが第1の標的(CLDN18.2)に対して2つの結合ドメインを有し、第2の標的(CD3)に対して1つの結合ドメインを有する場合又はその逆の場合であり、この場合、コンストラクトは、三価であり且つ二特異性である。一般に、用語「二特異性」には、抗体コンストラクトがCLDN18.2及びCD3など、(少なくとも)2つの異なる抗原に結合するという意味が含まれる。

【0020】

更に、用語「抗体コンストラクト」の定義には、1つのポリペプチド鎖のみからなる分子が含まれると共に、2、3、4つ又はそれを超えるポリペプチド鎖からなる分子も含まれ、これらの鎖は、同じであるか(ホモ二量体、ホモ三量体又はホモオリゴマー)又は異なり得る(ヘテロ二量体、ヘテロ三量体又はヘテロオリゴマー)。上記に特定した抗体及びその断片、変異体、誘導体並びにそれに由来する抗体コンストラクトの例は、とりわけ、Harlow and Lane, Antibodies: A laboratory manual, CSHL Press (1988); Kontermann and Duebel, Antibody Engineering, Springer, 2nd ed. 2010; 及び Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009に記載されている。

【0021】

用語「結合ドメイン」又は「～に結合するドメイン」は、本発明に関連して、標的又は抗原(ここでは、第1のドメインの場合にCLDN18.2及び第2のドメインの場合にCD3)上のエピトープに免疫特異的に結合する／それと相互作用する／それを認識する抗体コンストラクトのドメインを特徴付ける。第1のドメインの構造及び機能(CLDN18.2への結合)並びにまた好ましくは第2のドメインの構造及び／又は機能(CD3への結合)は、抗体、例えば完全長免疫グロブリン分子の構造及び／又は機能をベースとする。従って、「結合ドメイン」又は「～に結合するドメイン」は、免疫特異的標的結合を可能にする抗体の最小限の構造要件を含み得る。第1のドメインのこの最小限の構造要

件は、例えば、少なくとも3つの軽鎖CDR（即ちVL領域のCDR1、CDR2及びCDR3）及び／又は3つの重鎖CDR（即ちVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3）、好ましくは6つ全てのCDRの存在によって定義付けられ得る。第2のドメインも、免疫特異的標的結合を可能にする抗体のこの最小限の構造要件を含むことが想定される。より好ましくは、第2のドメインも少なくとも3つの軽鎖CDR（即ちVL領域のCDR1、CDR2及びCDR3）及び／又は3つの重鎖CDR（即ちVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3）、好ましくは6つ全てのCDRを含む。「～に結合するドメイン」（又は「結合ドメイン」）は、典型的には抗体軽鎖可変領域（VL）と抗体重鎖可変領域（VH）とを含み得る。しかしながら、それが両方を含む必要はなく、VH又はVLの一方のみを含み得る。Fd断片は、例えば、インタクトな抗原結合ドメインの一部の抗原結合機能を保持していることが多い。

【0022】

「～に結合するドメイン」（又は「結合ドメイン」）のフォーマットの例としては、限定されないが、完全長抗体、完全長抗体の断片（VH、VHH、VLなど）、(s)dAb、Fv、軽鎖（VL-CL）、Fd（VH-CH1）、重鎖、Fab、Fab'、Fab'₂又は「r IgG」（「半抗体」）、抗体変異体又は誘導体、例えばscFv、di-scFv又はbi(s)-scFv、scFv-Fc、scFv-ジッパー、scFab、Fab₂、Fab₃、ダイアボディ、単鎖ダイアボディ、タンデムダイアボディ（Tandab）、タンデムdi-scFv、タンデムtri-scFv、（VH-VL-CH3）₂、（scFv-CH3）₂、（（scFv）₂-CH3+CH3）、（（scFv）₂-CH3）又は（scFv-CH3-scFv）₂などのフォーマットから選択される「ミニボディ」、トリアボディ又はテトラボディなどのマルチボディ及びVHH、VH又はVLであり得る1つのみの可変領域を含むナノボディ又はシングル可変ドメイン抗体などのシングルドメイン抗体が挙げられる。「～に結合するドメイン」（又は「結合ドメイン」）のフォーマットの更なる例としては、（1）VL、VH、CL及びCH1を含む抗体断片又は変異体（Fabなど）；（2）2つの連結したFab断片を含む抗体断片又は変異体（Fab'₂など）；（3）VH及びCH₁を含む抗体断片又は変異体（Fdなど）；（4）VL及びCLを含む抗体断片又は変異体（軽鎖など）；（5）VL及びVHを含む抗体断片又は変異体（Fvなど）；（6）dAb断片（Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546）、これは、VHドメインを有する；（7）重鎖及び／又は軽鎖の少なくとも3つの単離されたCDRを含む抗体変異体；及び（8）単鎖Fv（scFv）が挙げられる。本発明に係る抗体コンストラクト又は結合ドメインの実施形態の例は、例えば、国際公開第00/006605号パンフレット、国際公開第2005/040220号パンフレット、国際公開第2008/119567号パンフレット、国際公開第2010/037838号パンフレット、国際公開第2013/026837号パンフレット、国際公開第2013/026833号パンフレット、米国特許出願公開第2014/0308285号明細書、米国特許出願公開第2014/0302037号明細書、国際公開第2014/144722号パンフレット、国際公開第2014/151910号パンフレット及び国際公開第2015/048272号パンフレットに記載されている。

【0023】

本発明の抗体コンストラクトについて、

- a) 抗体コンストラクトは、単鎖ポリペプチド又は単鎖抗体コンストラクトであり、
 - b) 第1のドメインは、scFvのフォーマットであり、
 - c) 第2のドメインは、scFvのフォーマットであり、
 - d) 第1のドメイン及び第2のドメインは、リンカー、好ましくはペプチドリンカー、より好ましくはグリシン／セリンリンカーを介して接続されており、及び／又は
 - e) 抗体コンストラクトは、Fcベースのドメインなど、延長された血清半減期をもたらすドメインを含む
- ことが想定される。

10

20

30

40

50

【0024】

本発明の抗体コンストラクトは、好ましくは、「インビトロ生成抗体コンストラクト」及び／又は「組換え抗体コンストラクト」である。本発明との関連において、用語「インビトロ生成」は、結合ドメイン又は可変領域（例えば、少なくとも1つのCDR）の全て又は一部がタンパク質チップ上の非免疫細胞選択、例えばインビトロファージディスプレイ又は候補アミノ酸配列をその抗原への結合能力に関して試験することのできる任意の他の方法で生成されている上記の定義に従う抗体コンストラクトを指す。従って、この用語は、好ましくは、単に動物の免疫細胞におけるゲノム再編成によって生成された配列を除外する。抗体コンストラクトの第1及び／又は第2のドメインは、既存の（モノクローナル）抗体からのCDR配列を足場にグラフトすることによるよりむしろ、ファージディスプレイ又はライブラリスクリーニング方法によって作製されるか又はそれによって入手可能であることが想定される。「組換え抗体コンストラクト」は、（とりわけ）組換えDNA技術又は遺伝子工学を用いて生成又は作製された抗体コンストラクトである。

10

【0025】

本発明の抗体コンストラクトは、モノクローナルであることが想定される。本明細書で使用されるとき、「モノクローナル」（mAb）と称される抗体又は抗体コンストラクトは、実質的に均一な抗体／抗体コンストラクトの集団から入手され、即ち、集団中に含まれる個々の抗体／抗体コンストラクトは、微量で存在し得る天然に起こる可能な突然変異及び／又は翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）を除けば（詳細にはそのアミノ酸配列の点で）同一である。モノクローナル抗体／抗体コンストラクトは、高度に特異的であり、抗原内の単一のエピトープを対象とし、これは、典型的には異なる決定基（又はエピトープ）を対象とする異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的である。その特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養によって合成され、従って他の免疫グロブリンによる汚染を受けない点で有利である。修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体集団から入手されるものとしての抗体／抗体コンストラクトの性質を指し示し、いずれかの特定の方法による抗体の作製が必要なものと解釈されてはならない。

20

【0026】

モノクローナル抗体の調製には、連続細胞株培養物によって作製される抗体を提供する任意の技法を用いることができる。例えば、使用されるモノクローナル抗体は、Koehler et al., Nature, 256:495 (1975) によって最初に記載されたハイブリドーマ方法によって作られ得、又は組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号明細書を参照されたい）によって作られ得る。ヒトモノクローナル抗体を作製する更なる技法の例としては、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72）及びEBV-ハイブリドーマ技法（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96）が挙げられる。

30

【0027】

次に、ハイブリドーマは、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）及び表面プラズモン共鳴（BIAcore（商標））分析などの標準方法を用いてスクリーニングして、特定の抗原に免疫特異的に結合する抗体を作製する1つ以上のハイブリドーマを同定することができる。免疫原としては、任意の形態の関連抗原、例えば組換え抗原、天然に存在する形態、その任意の変異体又は断片並びにその抗原ペプチドを使用し得る。BIAcore（商標）システムで利用されているとおりの表面プラズモン共鳴を用いると、標的抗原のエピトープに結合するファージ抗体／抗体コンストラクトの効率を増加させることができる（Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13）。

40

【0028】

50

抗体コンストラクト又は結合ドメインを作製する別の例示的方法としては、タンパク質発現ライブラリ、例えばファージディスプレイ又はリボソームディスプレイライブラリのスクリーニングが挙げられる。ファージディスプレイについては、例えば、Ladner et al.、米国特許第5,223,409号明細書；Smith (1985) Science 228:1315-1317、Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) に記載されている。

【0029】

ディスプレイライブラリの使用に加えて、関連抗原を使用して非ヒト動物、例えばげっ歯類（マウス、ハムスター、ウサギ又はラットなど）を免疫化することができる。一実施形態において、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子の少なくとも一部を含む。例えば、ヒトIg（免疫グロブリン）遺伝子座の大型断片を有するマウス抗体産生が欠損したマウス系統をエンジニアリングすることが可能である。ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する遺伝子に由来する抗原特異的モノクローナル抗体を作製し、選択し得る。例えば、Xenomouse（商標）、Green et al. (1994) Nature Genetics 7:13-21、米国特許出願公開第2003-0070185号明細書、国際公開第96/34096号パンフレット及び国際公開第96/33735号パンフレットを参照されたい。

【0030】

モノクローナル抗体は、非ヒト動物から入手し、次に当該技術分野において公知の組換えDNA技法を用いて修飾する、例えばヒト化する、脱免疫化する、キメラにするなども行うことができる。修飾された抗体コンストラクト又は結合ドメインの例としては、非ヒト抗体／抗体コンストラクトのヒト化変異体、「親和性成熟」抗体コンストラクト又は結合ドメイン（例えば、Hawkins et al. J. Mol. Biol. 254, 889-896 (1992) 及びLowman et al., Biochemistry 30, 10832-10837 (1991) を参照されたい）及び改変されたエフェクター機能を有する抗体変異体又は突然変異体（例えば、米国特許第5,648,260号明細書、Kontermann and Duebel (2010), loc. cit. 及びLittle (2009), loc. cit. を参照されたい）が挙げられる。

【0031】

免疫学では、親和性成熟は、免疫応答の過程でB細胞が抗原親和性の増加した抗体を産生するプロセスである。同じ抗原への曝露が繰り返されると、宿主は、連続してより高い親和性の抗体を産生することになる。天然のプロトタイプと同様に、インビトロ親和性成熟は、突然変異と選択の原理に基づく。インビトロ親和性成熟は、抗体、抗体断片、抗体変異体、抗体コンストラクト又は結合ドメインの最適化に成功裏に用いられている。放射線、化学的突然変異原又はエラープライムPCRを用いてCDR内部にランダム突然変異が導入される。加えて、チェインシャッフリングにより遺伝的多様性を増加させることができる。通常、ファージディスプレイなどのディスプレイ方法を用いた2又は3ラウンドの突然変異及び選択により、低ナノモル濃度範囲の親和性の抗体、抗体断片、抗体変異体、抗体コンストラクト又は結合ドメインが得られる。

【0032】

本発明の抗体コンストラクト又は結合ドメインの好ましい種類のアミノ酸置換変異には、親抗体構造（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体構造）の超可変領域内の1つ以上の残基を置換することが関わる。概して、結果として得られた、更なる開発のために選択された1つ又は複数の変異体は、その生成の元になった親抗体構造と比べて向上した生物学的特性を有することになる。かかる置換変異体の好都合な生成方法には、ファージディスプレイを用いた親和性成熟が関わる。簡潔に言えば、超可変領域の幾つかの部位（例えば、6〜7部位）を突然変異させて、各部位に可能な全てのアミノ酸置換を生成する。このように生成された変異体を、各粒子内にパッケージングされたM13の遺伝子III産物との融合物として繊維状ファージ粒子から一価方式で提示させる。次に、ファージに提示され

た変異体を、本明細書に開示されるとおりその生物学的活性（例えば、結合親和性）に関してスクリーニングする。抗原結合に大きく寄与する候補超可変領域部位（修飾候補）を同定するため、アラニンスキャニング突然変異誘発も実施し得る。代わりに又は加えて、抗原と抗体コンストラクト又は結合ドメインとの間の複合体の結晶構造の解析は、結合ドメインとその特異的抗原との間の接触点の同定に有益であり得る。かかる接触残基及び隣接残基は、本明細書に詳述する技法による置換の候補である。かかる変異体が生成されたら、変異体のパネルを本明細書に記載されるとおりのスクリーニングに供し、1つ以上の関連アッセイにおいて優れた特性を有する抗体、その抗原結合断片、抗体コンストラクト又は結合ドメインを更なる開発のために選択し得る。

【0033】

本発明の抗体コンストラクト及び結合ドメインは、特に、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が、特定の種に由来する抗体又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同である一方、残りの鎖が、別の種に由来する抗体又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体並びに所望の生物学的活性を呈する限り、かかる抗体の断片又は変異体の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」バージョンを含む（米国特許第4,816,567号明細書；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)）。本明細書における目的のキメラ抗体コンストラクト又は結合ドメインには、非ヒト霊長類（例えば、旧世界サル、類人猿等）に由来する可変ドメイン抗原結合配列とヒト定常領域配列とを含む「霊長類化」抗体コンストラクトが含まれる。キメラ抗体又は抗体コンストラクトを作製する種々の手法が記載されている。例えば、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985; Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号明細書；Boss et al., 米国特許第4,816,397号明細書；Tanaguchi et al., 欧州特許第0171496号明細書；欧州特許第0173494号明細書；及び英国特許第2177096号明細書を参照されたい。

【0034】

抗体、抗体コンストラクト、抗体断片、抗体変異体又は結合ドメインは、例えば、国際公開第98/52976号パンフレット又は国際公開第00/34317号パンフレットに開示される方法を用いて、ヒトT細胞エпитープの特異的欠失（「脱免疫化」と呼ばれる方法）によっても修飾され得る。簡潔に言えば、MHCクラスIIに結合するペプチドに関して抗体、抗体コンストラクト又は結合ドメインの重鎖及び軽鎖可変領域を分析することができる。これらのペプチドは、潜在的T細胞エпитープに相当する（例えば、国際公開第98/52976号パンフレット及び国際公開第00/34317号パンフレットに定義されるとおり）。潜在的T細胞エпитープの検出のため、「ペプチドスレッディング」と称されるコンピュータモデリング手法を適用することができ、加えて、国際公開第98/52976号パンフレット及び国際公開第00/34317号パンフレットに記載されるとおり、VH及びVL配列に存在するモチーフに関してヒトMHCクラスII結合ペプチドのデータベースを検索することができる。これらのモチーフは、18個の主要MHCクラスII DRアロタイプのいずれかに結合し、従って潜在的T細胞エпитープを成す。検出された潜在的T細胞エпитープは、可変ドメイン又は可変領域内の少数のアミノ酸残基の置換によって又は好ましくは単一アミノ酸置換によって除去することができる。典型的には、保存的置換が行われる。多くの場合、限定されないが、ヒト生殖細胞系列抗体配列においてある位置に共通するアミノ酸を使用し得る。ヒト生殖細胞系列配列については、例えば、Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G. P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5):237-242; 及びTomlinson et al. (1995) EMBO J. 14:14:4628-4638に開示されている。VBASEディレクトリ (www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/)

10

20

30

40

50

i s t 2 . p h p) は、ヒト免疫グロブリン可変領域配列の包括的な要覧を提供する（編纂者 Tomlinson, L A . e t a l . M R C C e n t r e f o r P r o t e i n E n g i n e e r i n g , C a m b r i d g e , U K ） 。 これらの配列は、例えば、フレームワーク領域及び C D R のヒト配列供給源として使用することができる。コンセンサスヒトフレームワーク領域も、例えば、米国特許第 6 , 3 0 0 , 0 6 4 号明細書に記載されるとおり使用することができる。

【 0 0 3 5 】

「ヒト化」抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト及び結合ドメインは、主としてヒト配列の免疫グロブリンをベースとし、これは、非ヒト免疫グロブリンに由来する 1 つ又は複数の最小限の配列を含有する。ほとんどの場合、ヒト化抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト及び結合ドメインは、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）をベースとし、超可変領域又は C D R からの残基は、所望の特異性、親和性、能力及び／又は生物学的活性を有するげっ歯類（例えば、マウス、ハムスター、ラット又はウサギ）などの非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域又は C D R 残基に置き換えられている。一部の例では、ヒト免疫グロブリンの F v フレームワーク領域（F R）残基は、対応する非ヒト残基に置き換えられる。更に、本明細書で使用されるとおりの「ヒト化」抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト及び結合ドメインは、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基も含み得る。これらの修飾は、抗体性能を更に改良し、最適化するために行われる。ヒト化抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト及び結合ドメインは、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分（F c など）、典型的にはヒト免疫グロブリンのものも含み得る。更なる詳細については、Jones et al. , Nature, 321 : 522 - 525 (1986) ; Reichmann et al. , Nature, 332 : 323 - 329 (1988) ; 及び Presta, Curr. Op. Struct. Biol. , 2 : 593 - 596 (1992) を参照されたい。

【 0 0 3 6 】

ヒト化抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト及び結合ドメインは、抗原結合に直接関わらない（F v）可変領域の配列をヒト（F v）可変領域からの均等な配列に置き換えることにより作成され得る。かかる分子の例示的作成方法は、Morrison (1985) Science 229 : 1202 - 1207 により ; O i e t a l . (1986) BioTechniques 4 : 214 により ; 及び米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号明細書 ; 米国特許第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号明細書 ; 米国特許第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号明細書 ; 米国特許第 5 , 8 5 9 , 2 0 5 号明細書 ; 及び米国特許第 6 , 4 0 7 , 2 1 3 号明細書により提供される。これらの方法は、重鎖又は軽鎖の少なくとも一方からの免疫グロブリン（F v）可変領域の全て又は一部をコードする核酸配列を単離すること、操作すること、及び発現させることを含む。かかる核酸は、上記に記載したとおり、所定の標的に対する抗体を産生するハイブリドーマ及び他の供給源から入手され得る。次に、ヒト化抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト又は結合ドメインをコードする組換え DNA を適切な発現ベクターにクローニングすることができる。

【 0 0 3 7 】

ヒト化抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト及び結合ドメインは、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現するが、内因性マウス免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子の発現能を有しないマウスなど、トランスジェニック動物を使用しても作製され得る。Winter は、本明細書に記載されるヒト化分子の調製に用い得る例示的 C D R グラフト方法について記載している（米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号明細書）。特定のヒト配列の C D R の全てが非ヒト C D R の少なくとも一部分に置き換えられ得るか、又は C D R の一部のみが非ヒト C D R に置き換えられ得る。ヒト化分子が所定の抗原に結合するのに必要な数の C D R を置き換えるのみで十分である。

【 0 0 3 8 】

ヒト化抗体、その変異体又は断片、抗体コンストラクト又は結合ドメインは、保存的置換、コンセンサス配列置換、生殖細胞系列置換及び／又は復帰突然変異の導入によって最

適化することができる。かかる改変された免疫グロブリン分子は、当該技術分野において公知の幾つかの技法のいずれによって作られ得る（例えば、Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80:7308-7312, 1983; Kozbor et al., Immunology Today, 4:7279, 1983; Olsson et al., Meth. Enzymol., 92:3-16, 1982 及び欧州特許第239 400号明細書）。

【0039】

ヒト抗マウス抗体（HAMA）反応のため、この業界では、キメラ又は他のヒト化抗体／抗体コンストラクトが調製されるようになった。しかしながら、特に抗体又は抗体コンストラクトの慢性又は多用量利用において、ある種のヒト抗キメラ抗体（HACA）反応が観察されるであろうことが予想される。従って、HAMA又はHACA反応の懸念及び／又は効果を払拭するため、CLDN18.2に対するヒト結合ドメイン及び／又はCD3に対するヒト結合ドメインを含む抗体コンストラクトを提供することが望ましいであろう。

【0040】

従って、一実施形態によれば、抗体コンストラクト、第1の結合ドメイン及び／又は第2の結合ドメインは、「ヒト」である。用語「ヒト抗体」、「ヒト抗体コンストラクト」及び「ヒト結合ドメイン」には、例えば、Kabatt et al. (1991) (Loc. cit.) により記載されるものを含め、当該技術分野において公知のヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列に実質的に対応する可変及び定常領域又はドメインなどの抗体由来領域を有するそれぞれ抗体、抗体コンストラクト及び結合ドメインが含まれる。本発明のヒト抗体コンストラクト又は結合ドメインは、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでランダム又は部位特異的突然変異誘発により導入されるか、又はインビボで体細胞突然変異により導入された突然変異）を例えばCDR、詳細にはCDR3に含み得る。ヒト抗体コンストラクト又は結合ドメインは、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基に置き換えられた少なくとも1、2、3、4、5つ又はそれを超える位置を有し得る。本明細書で使用されるとおりのヒト抗体、抗体コンストラクト及び結合ドメインの定義は、Xenomouseなどの技術又はシステムを用いて誘導し得るもののよう、抗体の人工的及び／又は遺伝的に改変されていないヒト配列のみを含む完全ヒト抗体、抗体コンストラクト及び結合ドメインも企図する。

【0041】

少なくとも1つのヒト結合ドメインを含む抗体コンストラクトは、非ヒト、例えばげっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター又はウサギ）可変及び／又は定常領域を有する抗体又は抗体コンストラクトに関連する問題の一部を回避する。かかるげっ歯類由来のタンパク質の存在は、抗体若しくは抗体コンストラクトの急速なクリアランスにつながることもあり、又は患者による抗体若しくは抗体コンストラクトに対する免疫応答の発生につながることもある。げっ歯類由来の抗体コンストラクトの使用を回避するため、げっ歯類が完全ヒト抗体を産生するようにげっ歯類にヒト抗体機能を導入してヒト化又は完全ヒト抗体コンストラクトを作成することができる。

【0042】

YACにメガベースサイズのヒト遺伝子座をクローニング及び再構築し、そのYACをマウス生殖細胞系列に導入可能であることにより、極めて大きい又は大雑把にのみマッピングされる遺伝子座の機能的構成要素を解明し、且つ有用なヒト疾患モデルを作成する強力な手法が得られる。更に、マウス遺伝子座をそのヒト均等物に置換するためのかかる技術を用いれば、発生中のヒト遺伝子産物の発現及び調節、他のシステムとのそのコミュニケーション及び疾患の誘導及び進行におけるその関与に関してユニークな洞察を得ることができるであろう。

【0043】

かかる戦略の実際上重要な適用は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。内因性I

10

20

30

40

50

g 遺伝子が不活性化されているマウスにヒト免疫グロブリン (I g) 遺伝子座を導入することにより、抗体のプログラム化された発現及びアセンブリの根底にある機構並びに B 細胞発生におけるその役割を研究する機会がもたらされる。更に、かかる戦略であれば、完全ヒトモノクローナル抗体 (m A b) の作製に理想的な供給源 — ヒト疾患における抗体療法の有望さの実現に向けた重要なマイルストーンがもたらされ得る。完全ヒト抗体又はそれに由来する抗体コンストラクトは、マウス又はマウス誘導体化 m A b に固有の免疫原性反応及びアレルギー反応を最小限に抑え、従って投与された抗体／抗体コンストラクトの有効性及び安全性が高まることが期待される。完全ヒト抗体又は抗体コンストラクトの使用は、反復的な化合物投与が必要な慢性及び再発性ヒト疾患、例えば炎症、自己免疫及びがんの治療において実質的な利点をもたらすことを期待できる。

10

【0044】

この目標に向けた1つの手法は、マウス抗体産生が欠損したマウス系統をヒト I g 遺伝子座の大型断片でエンジニアリングすることであり、かかるマウスであればマウス抗体の非存在下で大きいレパートリーのヒト抗体を産生し得ることを見越したものであった。大型ヒト I g 断片であれば、大きい可変遺伝子多様性並びに抗体産生及び発現の適切な調節を維持し得る。マウスの抗体多様化及び選択機構並びにヒトタンパク質に対する免疫寛容の欠如を利用することにより、こうしたマウス系統で再現されたヒト抗体レパートリーは、ヒト抗原を含め、任意の目的抗原に対して高親和性抗体をもたらすはずである。ハイブリドーマ技術を用いれば、所望の特異性を備える抗原特異的ヒト m A b を容易に作製及び選択することができるであろう。この一般的な戦略は、最初の X e n o M o u s e マウス系統の作成に関連して実証された (G r e e n e t a l . N a t u r e G e n e t i c s 7 : 1 3 - 2 1 (1 9 9 4) を参照されたい)。この X e n o M o u s e 系統は、コア可変領域配列及び定常領域配列を含有した、ヒト重鎖遺伝子座及び κ 軽鎖遺伝子座のそれぞれ 2 4 5 k b 及び 1 9 0 k b サイズの生殖細胞系列配置断片を含有する酵母人工染色体 (Y A C) でエンジニアリングされた。ヒト I g を含有する Y A C は、抗体の再配列及び発現の両方についてマウスシステムと適合性があることが分かり、不活性化されたマウス I g 遺伝子の置換能を有した。これは、B 細胞発生を誘導し、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、且つ抗原特異的ヒト m A b を作成するその能力によって実証された。これらの結果は、より多数の V 遺伝子、追加的な調節エレメント及びヒト I g 定常領域を含有するヒト I g 遺伝子座のより大きい部分を導入すれば、感染及び免疫化に対するヒト体液性応答に特有の実質的に完全なレパートリーが再現され得ることも示唆した。G r e e n e t a l . の研究は、それぞれヒト重鎖遺伝子座及び κ 軽鎖遺伝子座のメガベースサイズの生殖細胞系列配置 Y A C 断片を導入することによる約 8 0 % 超のヒト抗体レパートリーの導入にまで拡張された。M e n d e z e t a l . N a t u r e G e n e t i c s 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 (1 9 9 7) 及び米国特許出願第 0 8 / 7 5 9 , 6 2 0 号明細書を参照されたい。

20

30

【0045】

X e n o M o u s e モデルの作製については、米国特許出願第 0 7 / 4 6 6 , 0 0 8 号明細書、同第 0 7 / 6 1 0 , 5 1 5 号明細書、同第 0 7 / 9 1 9 , 2 9 7 号明細書、同第 0 7 / 9 2 2 , 6 4 9 号明細書、同第 0 8 / 0 3 1 , 8 0 1 号明細書、同第 0 8 / 1 1 2 , 8 4 8 号明細書、同第 0 8 / 2 3 4 , 1 4 5 号明細書、同第 0 8 / 3 7 6 , 2 7 9 号明細書、同第 0 8 / 4 3 0 , 9 3 8 号明細書、同第 0 8 / 4 6 4 , 5 8 4 号明細書、同第 0 8 / 4 6 4 , 5 8 2 号明細書、同第 0 8 / 4 6 3 , 1 9 1 号明細書、同第 0 8 / 4 6 2 , 8 3 7 号明細書、同第 0 8 / 4 8 6 , 8 5 3 号明細書、同第 0 8 / 4 8 6 , 8 5 7 号明細書、同第 0 8 / 4 8 6 , 8 5 9 号明細書、同第 0 8 / 4 6 2 , 5 1 3 号明細書、同第 0 8 / 7 2 4 , 7 5 2 号明細書及び同第 0 8 / 7 5 9 , 6 2 0 号明細書；及び米国特許第 6 , 1 6 2 , 9 6 3 号明細書；同第 6 , 1 5 0 , 5 8 4 号明細書；同第 6 , 1 1 4 , 5 9 8 号明細書；同第 6 , 0 7 5 , 1 8 1 号明細書及び同第 5 , 9 3 9 , 5 9 8 号明細書並びに日本国特許第 3 0 6 8 1 8 0 B 2 号公報、同第 3 0 6 8 5 0 6 B 2 号公報及び同第 3 0 6 8 5 0 7 B 2 号公報に更に考察及び詳説されている。M e n d e z e t a

40

50

L. Nature Genetics 15:146-156 (1997) 及び Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998)、欧州特許第0 463 151 B1号明細書、国際公開第94/02602号パンフレット、国際公開第96/34096号パンフレット、国際公開第98/24893号パンフレット、国際公開第00/76310号パンフレット及び国際公開第03/47336号パンフレットも参照されたい。

【0046】

代替的な手法において、GenPharm International, Inc. を含めた他の研究者らは、「ミニ遺伝子座」手法を利用している。ミニ遺伝子座手法では、Ig 遺伝子座からのピース（個々の遺伝子）を含めることにより外因性Ig 遺伝子座が模倣される。従って、1つ以上のVH遺伝子、1つ以上のDH遺伝子、1つ以上のJH遺伝子、 μ 定常領域及び第2の定常領域（好ましくは γ 定常領域）が動物への挿入用コンストラクトとして形成される。この手法については、Surani et al. に対する米国特許第5, 545, 807号明細書及び各々Lonberg and Kayに対する米国特許第5, 545, 806号明細書；同第5, 625, 825号明細書；同第5, 625, 126号明細書；同第5, 633, 425号明細書；同第5, 661, 016号明細書；同第5, 770, 429号明細書；同第5, 789, 650号明細書；同第5, 814, 318号明細書；同第5, 877, 397号明細書；同第5, 874, 299号明細書；及び同第6, 255, 458号明細書、Krimpenfort and Bernsに対する米国特許第5, 591, 669号明細書及び同第6, 023, 010号明細書、Berns et al. に対する米国特許第5, 612, 205号明細書；同第5, 721, 367号明細書；及び同第5, 789, 215号明細書、及びChoi and Dunnに対する米国特許第5, 643, 763号明細書、及びGenPharm Internationalの米国特許出願第07/574, 748号明細書、同第07/575, 962号明細書、同第07/810, 279号明細書、同第07/853, 408号明細書、同第07/904, 068号明細書、同第07/990, 860号明細書、同第08/053, 131号明細書、同第08/096, 762号明細書、同第08/155, 301号明細書、同第08/161, 739号明細書、同第08/165, 699号明細書、同第08/209, 741号明細書に記載されている。欧州特許第0 546 073 B1号明細書、国際公開第92/03918号パンフレット、国際公開第92/22645号パンフレット、国際公開第92/22647号パンフレット、国際公開第92/22670号パンフレット、国際公開第93/12227号パンフレット、国際公開第94/00569号パンフレット、国際公開第94/25585号パンフレット、国際公開第96/14436号パンフレット、国際公開第97/13852号パンフレット及び国際公開第98/24884号パンフレット及び米国特許第5, 981, 175号明細書も参照されたい。更に、Taylor et al. (1992)、Chen et al. (1993)、Tuailon et al. (1993)、Choi et al. (1993)、Lonberg et al. (1994)、Taylor et al. (1994) 及びTuailon et al. (1995)、Fishwild et al. (1996) を参照されたい。

【0047】

Kirinもマウスからのヒト抗体の作成を実証しており、ここでは、マイクロセル融合によって大型の染色体ピース又は染色体全体が導入されている。欧州特許出願第773 288号明細書及び同第843 961号明細書を参照されたい。Xenerex Biosciencesは、ヒト抗体の潜在的作成技術を開発中である。この技術では、SCIDマウスがヒトリンパ細胞、例えばB細胞及び／又はT細胞で再構成される。次に、マウスは、抗原で免疫化され、その抗原に対して免疫応答を生じ得る。米国特許第5, 476, 996号明細書；同第5, 698, 767号明細書；及び同第5, 958, 765号明細書を参照されたい。

【0048】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、本発明の抗体コンストラクトは、「単離された」又は「実質的に純粋な」抗体コンストラクトである。「単離された」又は「実質的に純粋な」は、本明細書に開示される抗体コンストラクトの記載に使用されるとき、その産生環境の成分から同定、分離及び／又は回収されている抗体コンストラクトを意味する。好ましくは、抗体コンストラクトは、その産生環境からの他の全ての成分との関連を含まないか又は実質的に含まない。組換えトランスフェクト細胞から生じるものなど、その産生環境の夾雑成分は、抗体コンストラクトの診断又は治療使用を妨げ得る材料であり、酵素、ホルモン及び他のタンパク質性又は非タンパク質性化合物を挙げることができる。単離された又は実質的に純粋な抗体コンストラクトは、状況に応じて、所与の試料における全タンパク質／ポリペプチド含量の5重量%～99.9重量%を占め得ることが理解される。所望の抗体コンストラクトは、誘導性プロモーター又は高発現プロモーターを使用することにより大幅に高い濃度で産生され得る。この定義には、当該技術分野において公知の多様な生物及び／又は宿主細胞における抗体コンストラクトの産生が含まれる。特定の実施形態において、抗体コンストラクトは、(1)スピニングカップシークエネーターを用いることによりN末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで、又は(2)クマシーブルー又は好ましくは銀染色法を用いた非還元又は還元条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製されることになる。しかしながら、通常、単離された抗体コンストラクトは、少なくとも1つの精製工程によって調製されることになる。

【0049】

一実施形態によれば、抗体コンストラクト全体及び／又は結合ドメインは、1つ以上のポリペプチドの形態又はタンパク質の形態である。タンパク質性の部分に加えて、かかるポリペプチド又はタンパク質は、非タンパク質性の部分（例えば、化学的リンカー又は化学的架橋剤、例えばグルタルアルデヒド）を含み得る。

【0050】

ペプチドは、共有結合性ペプチド（アミド）結合によって連結されたアミノ酸単量体の短鎖である。従って、ペプチドは、広範な化学的クラスの生物学的オリゴマー及びポリマーに分類される。ペプチド又はポリペプチド鎖の一部であるアミノ酸は、「残基」と称され、連続番号が付され得る。環状ペプチドを除く全てのペプチドは、ペプチドの一端にN末端残基を有し、他端にC末端残基を有する。オリゴペプチドは、ごく少数のアミノ酸からなる（通常、2～20個）。ポリペプチドは、より長い連続した非分岐ペプチド鎖である。ペプチドは、タンパク質とサイズを基準として区別され、独断的な基準として約50アミノ酸以下を含むものと理解され得る。タンパク質は、通常、生物学的に機能的な方法で配置された1つ以上のポリペプチドからなる。ペプチドとポリペプチド及びタンパク質に適用される実験技法の態様（例えば、電気泳動法、クロマトグラフィー等の詳細）が異なるが、ペプチドをポリペプチド及びタンパク質と区別するサイズ境界は、絶対的ではない。従って、本発明との関連において、用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、同義的に使用され得、用語「ポリペプチド」が好ましいことが多い。

【0051】

ポリペプチドは、二量体、三量体及び更に高次のオリゴマーなど、2つ以上のポリペプチド分子からなる多量体を更に形成し得る。かかる二量体、三量体等を形成するポリペプチド分子は、同一であっても又は同一でなくてもよい。このため、高次のかかる多量体の対応する構造は、ホモ二量体又はヘテロ二量体、ホモ三量体又はヘテロ三量体等と称される。ヘテロ多量体の例は、その天然に存在する形態で2つの同一の軽鎖ポリペプチド鎖と2つの同一の重鎖ポリペプチド鎖とからなる抗体又は免疫グロブリン分子である。用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、天然の修飾ペプチド／ポリペプチド／タンパク質も指し、ここで、修飾は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化などの翻訳後修飾により達成される。「ペプチド」、「ポリペプチド」又は「タンパク質」は、本明細書において言及されるとき、ペグ化など、化学的にも修飾され得る。かかる修飾は、当該技術分野において周知であり、本明細書において以下に記載する。

【0052】

用語「～に（特異的又は免疫特異的に）結合する」、「～を（特異的又は免疫特異的に）認識する」又は「～と（特異的又は免疫特異的に）反応する」は、本発明によれば、抗体コンストラクト又は結合ドメインが、標的分子（抗原）、ここでは、それぞれCLDN18.2及びCD3上の所与のエピトープと相互作用するか又は（免疫）特異的に相互作用することを意味する。この相互作用又は会合は、代替的物質（非標的分子）と比べて特定の標的上のエピトープに対してより高頻度に、より迅速に、より長い持続期間で、より高い親和性で又は前述の何らかの組み合わせで起こる。しかしながら、異なる種における相同タンパク質間の配列類似性のため、その標的（ヒト標的など）に免疫特異的に結合する抗体コンストラクト又は結合ドメインは、異なる種（非ヒト霊長類など）からの相同標的分子と交差反応し得る。従って、用語「特異的／免疫特異的結合」は、抗体コンストラクト又は結合ドメインによる2つ以上の種におけるエピトープ又は構造的に関連性のあるエピトープへの結合を含み得る。

10

【0053】

本発明との関連において、用語「エピトープ」は、結合ドメインによって認識される／免疫特異的に認識される抗原の一部又は領域を指す。「エピトープ」は、抗原性であり、従って、用語のエピトープは、時に「抗原構造」又は「抗原決定基」とも称される。結合ドメインのうち、エピトープに結合する部分は、パラトープと呼ばれる。特異的結合は、結合ドメイン及び抗原のアミノ酸配列における特異的モチーフによって達成されと考えられる。従って、結合は、その一次、二次及び／又は三次構造の結果として且つ前記構造の潜在的な二次修飾の結果として実現する。パラトープがその抗原決定基と特異的に相互作用すると、前記部位が抗原に単純に結合し得る。ある場合には、代わりに又は加えて、特異的相互作用により、例えば抗原のコンホメーション変化の誘導、抗原のオリゴマー形成等に起因してシグナルが惹起され得る。

20

【0054】

タンパク質抗原のエピトープは、その構造及びパラトープとの相互作用に基づいて2つのカテゴリー、立体エピトープと線状エピトープとに分類される。立体エピトープは、抗原のアミノ酸配列の不連続なセクションで構成される。こうしたエピトープは、抗原の三次元表面特徴及び形状又は三次構造（折り畳み）に基づいてパラトープと相互作用する。エピトープのコンホメーションの決定方法としては、限定されないが、X線結晶学、二次元核磁気共鳴（2D-NMR）分光法及び部位特異的スピン標識及び電子常磁性共鳴（EPR）分光法が挙げられる。対照的に、線状エピトープは、その一次構造に基づいてパラトープと相互作用する。線状エピトープは、抗原からの連続アミノ酸配列によって形成され、典型的には、ユニーク配列に少なくとも3又は少なくとも4及びより通常には少なくとも5、又は少なくとも6、又は少なくとも7、例えば約8～約10アミノ酸を含む。

30

【0055】

CLDN18.2エピトープマッピング方法を以下に記載する：ヒトCLDN18.2タンパク質の細胞外ループ内の予め定義付けられた領域（連続アミノ酸ストレッチ）をCLDN18.2パラログ（ヒトCLDN6又はヒトCLDN9など、但し使用するパラログと結合ドメインとが交差反応性でない限り、他のパラログも企図可能である）の対応する領域に交換／置換する。これらのヒトCLDN18.2／パラログキメラを宿主細胞（CHO細胞など）の表面上に発現させる。抗体又は抗体コンストラクトの結合をFACS分析で試験することができる。抗体又は抗体コンストラクトによるキメラ分子への結合が完全になくなったとき又は大幅な結合の低下が観察されたとき、このキメラ分子から取り除かれたヒトCLDN18.2の領域が免疫特異的エピトープ／パラトープ認識に関連すると結論付けることができる。前記結合の低下は、ヒト（野生型）CLDN18.2への結合と比較して好ましくは少なくとも10%、20%、30%、40%又は50%；より好ましくは少なくとも60%、70%又は80%及び最も好ましくは90%、95%又は更に100%（ここでは、ヒトCLDN18.2への結合を100%とする）である。或いは、上述のエピトープマッピング分析は、CLDN18.2の配列、具体的には細胞外ループ1又はループ2の配列に1つ以上の点突然変異を導入することにより修正され得る

40

50

。これらの点突然変異は、例えば、CLDN18.2とその近縁パラログCLDN18.1との違いを反映し得る。例えば、突然変異は、Q29M、N37D、A42S、N45Q、Q47E、E56Q、G65P及びL69Iからなる群から選択することができる。実施例1及び2を参照されたい。

【0056】

抗体コンストラクト又は結合ドメインによる認識に対する標的抗原の特定の残基の寄与を決定する更なる方法は、アラニンスキャニングであり（例えば、Morrison K L & Weiss G A. Curr Opin Chem Biol. 2001 Jun; 5 (3): 302-7を参照されたい）、ここでは、分析する各残基が例えば部位特異的突然変異誘発によってアラニンに置き換えられる。アラニンが使用されるのは、そのバルキーでない、化学的に不活性なメチル官能基が理由であり、それにも関わらず、他のアミノ酸の多くが有する二次構造優先性を模倣するためである。時に、突然変異残基のサイズの保存が所望される場合、バリン又はロイシンなどのバルキーなアミノ酸が使用され得る。

【0057】

結合ドメインと標的抗原のエピトープとの間の相互作用は、結合ドメインがエピトープ／標的抗原（ここでは、それぞれCLDN18.2及びCD3）に対して認識可能な又は有意な親和性を呈し、概して標的抗原（ここでは、CLDN18.2／CD3）以外のタンパク質又は抗原に対して - 上記で考察した他の種由来の相同標的との交差反応性があったとしても - 有意な親和性を呈しないことを含意する。「有意な親和性」としては、 $\leq 10^{-6}$ Mの親和性（解離定数、KD）での結合が挙げられる。好ましくは、結合は、結合親和性が $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-9}$ M、 $\leq 10^{-10}$ M又は更に $\leq 10^{-11}$ M若しくは $\leq 10^{-12}$ Mのとき、特異的と見なされる。結合ドメイン（免疫）が標的と特異的に反応又は結合するかどうかは、例えば、その所望の標的タンパク質又は抗原に対する前記結合ドメインの親和性を非標的タンパク質又は抗原（ここでは、それぞれCLDN18.2又はCD3以外のタンパク質）に対する前記結合ドメインの親和性と比較することにより、容易に試験することができる。好ましくは、本発明の抗体コンストラクトは、それぞれCLDN18.2又はCD3以外のタンパク質又は抗原に有意に結合しない（即ち、第1のドメインは、CLDN18.2以外のタンパク質に結合せず、第2のドメインは、CD3以外のタンパク質に結合しない） - 但し、別の標的に対する任意の更なる1つ又は複数の結合ドメインが本発明の抗体コンストラクトに意図的に導入される場合を除き、その場合、その結合ドメインのその特異的標的への結合も本発明によって提供される。

【0058】

CLDN18.2（例えば、ヒトCLDN18.2）に対する第1のドメインの親和性は、 ≤ 100 nM、 ≤ 90 nM、 ≤ 80 nM、 ≤ 70 nM、 ≤ 60 nM、 ≤ 50 nM、 ≤ 40 nM、 ≤ 30 nM又は ≤ 20 nMであることが想定される。これらの値は、好ましくは、スキャッチャードアッセイなど、細胞ベースのアッセイで測定される。実施例4を参照されたい。他の親和性決定方法も周知である。更に、CD3（例えば、ヒトCD3）に対する第2のドメインの親和性は、 ≤ 100 nM、 ≤ 90 nM、 ≤ 80 nM、 ≤ 70 nM、 ≤ 60 nM、 ≤ 50 nM、 ≤ 40 nM、 ≤ 30 nM、 ≤ 20 nM又は ≤ 10 nMであることが想定される。これらの値は、好ましくは、Biacoreアッセイなど、表面プラズモン共鳴アッセイで測定される。実施例3を参照されたい。

【0059】

用語「有意に結合しない」は、本発明の抗体コンストラクト又は結合ドメインがCLDN18.2又はCD3以外のタンパク質又は抗原に対し、前記タンパク質又は抗原が細胞の表面上に発現するときに結合しないことを意味する。従って、抗体コンストラクトは、CLDN18.2又はCD3以外のタンパク質又は抗原と（前記タンパク質又は抗原が細胞の表面上に発現するときに） $\leq 30\%$ 、好ましくは $\leq 20\%$ 、より好ましくは $\leq 10\%$ 、特に好ましくは $\leq 9\%$ 、 $\leq 8\%$ 、 $\leq 7\%$ 、 $\leq 6\%$ 、 $\leq 5\%$ 、 $\leq 4\%$ 、 $\leq 3\%$ 、 $\leq 2\%$ 又は $\leq 1\%$ の反応性（ここでは、それぞれCLDN18.2又はCD3への結合を100%

とする)を示す。「反応性」は、例えば、親和性値(上記を参照されたい)で表すことができる。

【0060】

本発明の抗体コンストラクト(及びより具体的にはその第1のドメイン)は、CLDN18.2パラログ、より具体的にはヒトCLDN18.2パラログ及び／又はマカク／カニクイザルCLDN18.2パラログに結合しないか又は有意に結合しないことが想定される。また、抗体コンストラクトが標的細胞の表面上の(ヒト又はマカク／カニクイザル)CLDN18.2パラログに結合しないか又は有意に結合しないことも想定される。CLDN18.2パラログとしては、— 限定されないが — CLDN18.1、CLDN1、CLDN2、CLDN3、CLDN4、CLDN6及びCLDN9が挙げられる。一実施形態によれば、CLDN18.2のヒトパラログは、配列番号2～10に示されるとおりの配列を有する。実施例6及び図6を参照されたい。従って、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、CLDN18.1、CLDN1、CLDN2、CLDN3、CLDN4、CLDN6及び／又はCLDN9(標的細胞の表面上)に結合しないか又は有意に結合しないことが想定される。

【0061】

本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合する。「標的細胞」は、その表面上にCLDN18.2を発現する任意の原核細胞又は真核細胞であり得る。好ましくは、標的細胞は、特定のCLDN18.2発現がん若しくは腫瘍細胞又はCLDN18.2陽性新生物の細胞など、ヒト又は動物の体の一部の細胞である。用語「表面上」は、本発明との関連において、抗体コンストラクトの第1のドメインが、第1のCLDN18.2細胞外ループ(CLDN18.2 ECL1)内、第2のCLDN18.2細胞外ループ(CLDN18.2 ECL2)内に含まれるか、又は両方のループの組み合わせの範囲内に含まれるエピトープに特異的に結合することを意味するものと理解される。従って、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、CLDN18.2、好ましくはヒトCLDN18.2の細胞外ループに結合することが想定される。細胞外ループは、第1のループ又は第2のループであり得る。また、両方のループが結合に寄与することも想定される。この場合、一方のループ(第1のループなど)は、抗体コンストラクトの主要な結合パートナーに相当し、他方のループ(第2のループなど)は、例えば、安定化パートナーとして結合に寄与するが、結合に絶対的に不可欠というわけではない可能性がある。従って、本発明に係る第1のドメインは、天然に発現する細胞又は細胞株(ヒト胃がん株SNU-601、SNU-620又はまたSNU-16、NUGC、NUGC4、GSU又はIM95など)及び／又はCLDN18.2で形質転換又は(安定に／一過性に)トランスフェクトされた細胞又は細胞株によってCLDN18.2が発現されると、それに結合し得る。一実施形態において、第1のドメインは、スクッチャードなどの細胞ベースの結合アッセイにおいてCLDN18.2が標的分子として使用されるとき、CLDN18.2に結合する(例えば、実施例4を参照されたい)。更に、抗体コンストラクト／その第1のドメインが標的細胞の表面上のヒトCLDN18.2に結合することが想定される。ヒトCLDN18.2の好ましいアミノ酸配列は、配列番号1に示される。

【0062】

本発明に係る抗体コンストラクト(及びより具体的には前記抗体コンストラクトの第1のドメイン)は、CLDN18.2の第1の細胞外ループ(ECL1、ループ1)に結合することが想定される。これは、第2の細胞外ループも、程度は低いながらパラトープーエピトープ相互作用部位に寄与することを必ずしも除外しない。用語「CLDN18.2 ECL」(ECL=細胞外ループ)は、CLDN18.2のうち、CLDN18.2の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインを本質的に含まない部分を指す。本発明のCLDN18.2ポリペプチドについて同定される膜貫通ドメインは、当該技術分野においてそのタイプの疎水性ドメインの同定に日常的に用いられる基準に準じて同定されることが理解される。膜貫通ドメインの正確な境界は、本明細書において具体的に言及されるドメインのい

いずれかの末端において最も高い可能性として約5アミノ酸以下だけ変わり得る。好ましいヒトCLDN18.2 ECL1は、配列番号2に示され、好ましいヒトCLDN18.2 ECL2は、配列番号3に示される。

【0063】

本発明は、

・本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインが、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合するドメインであって、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

c) 配列番号127に示されるとおりのVH領域及び配列番号128に示されるとおりのVL領域；又は

d) 配列番号139に示されるとおりのVH領域及び配列番号140に示されるとおりのVL領域

を含むドメインを含む抗体又は抗体コンストラクトと同じCLDN18.2のエピトープに結合し；

・本発明の抗体コンストラクトが、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合するドメインであって、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

c) 配列番号127に示されるとおりのVH領域及び配列番号128に示されるとおりのVL領域；又は

d) 配列番号139に示されるとおりのVH領域及び配列番号140に示されるとおりのVL領域

を含むドメインを含む抗体又は抗体コンストラクトと結合に関して競合し；

・本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインが、配列番号22に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体に結合し、任意選択で、配列番号24に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体にも結合するが、配列番号23に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体に結合せず；

・本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインが、配列番号14に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体及び／又はアミノ酸配列、配列番号15を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体に結合し、任意選択で、配列番号11、12、13、16、17、19、20及び21に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上の1つ以上のCLDN18.2突然変異体にも結合するが、配列番号18に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体に結合せず；

・本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインが標的細胞の表面上のヒトCLDN18.2に結合し、ここで、第1のドメインの結合にヒトCLDN18.2の56位のGlu

10

20

30

40

50

(E) が必須であり、ヒトCLDN18.2の42位のAla (A) 及び／又は45位のAsn (N) が必須でなく；及び／又は

・本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインが、配列番号266に示されるとおりのアミノ酸配列を含むが、配列番号265に示されるとおりのアミノ酸配列を含まず、任意選択で配列番号267に示されるとおりのアミノ酸配列も含まないCLDN18.2のエピトープに結合することを更に提供する。

【0064】

他の抗CLDN18.2結合体 (CL-3、CL-4) も、エピトープマッピング時のそのCLDN18.2結合特異性に関して分析した (実施例2を参照されたい)。これらのCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、異なるエピトープ特異性を有することが分かったと同時に、本発明の抗体コンストラクトと比較して大幅に低い細胞傷害能を有することが示された。実施例7.4において、本発明の抗体コンストラクトは、2桁ピコモル濃度範囲のEC₅₀値を示す一方、比較コンストラクトは、CLDN18.2に対して同様の親和性を有するにも関わらず、3桁～5桁にまで至るピコモル濃度範囲のEC₅₀値を示したことが実証された。後者の範囲の細胞傷害活性を示す抗体コンストラクトは、患者の免疫系、より具体的にはT細胞の細胞傷害活性をがん細胞に対して仕向けることに治療的に使用するには十分に強力でない可能性がある。他方では、本発明に係る抗体コンストラクトは、極めて好ましいエピトープ-活性関係を示し、従って強力な抗体コンストラクト媒介性細胞傷害活性が裏付けられる。

【0065】

抗体、抗体コンストラクト又は結合ドメインが別の所与の抗体、抗体コンストラクト又は結合ドメインと標的細胞の表面上のCLDN18.2の同じエピトープに結合するか否かは、本明細書に記載されるとおりの種々の分析、例えば本明細書において上記又は実施例1及び2に記載されるとおり、キメラ又は突然変異CLDN18.2分子でのエピトープマッピングにより測定することができる。アラニンスキャニングなど、他のエピトープ決定方法が本明細書に記載される。

【0066】

抗体又は抗体コンストラクトが別の所与の抗体又は抗体コンストラクトと標的細胞の表面上の抗原 (CLDN18.2など) への結合に関して競合するか否かは、競合ELISAなどの競合アッセイで測定することができる。アビジンがカップリングされたマイクロパーティクル (ビーズ) も使用することができる。アビジンでコートされたELISAプレートと同様に、ビオチン化タンパク質と反応すると、これらのビーズの各々は、そこでアッセイを実施し得る基質として使用することができる。抗原をビーズにコーティングし、次に第1の抗体でプレコーティングする。二次抗体を加え、任意の更なる結合を決定する。フローサイトメトリーで読み取りを行う。好ましくは、CLDN18.2を天然に発現する細胞又はCLDN18.2で安定に若しくは一過性に形質転換した細胞のいずれかを使用して、細胞ベースの競合アッセイを用いる。用語「結合に関して競合する」は、これに関連して、上記に開示されるアッセイのいずれか1つ、好ましくは細胞ベースのアッセイによって決定したとき、2つの試験抗体間に少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%又は少なくとも90%の競合が起こることを意味する。当然ながら、CD3などの他の標的についても同じ分析を適用することができる。

【0067】

競合的抗体結合アッセイは、2つの抗体／抗体コンストラクトと細胞表面結合抗原との競合的結合を決定するアッセイを含む。一般的な方法は、2つの抗体／抗体コンストラクトA及びBによる細胞の表面上の同じ抗原への結合を検出することを目標とし、

a) 細胞を抗体／抗体コンストラクトAとプレインキュベートすることにより細胞表面抗原を遮断し、続いて標識した抗体／抗体コンストラクトBを最大下で添加するステップ、及びAの非存在下における結合と比較したBの結合を検出するステップ；

b) 最大下量の標識抗体／抗体コンストラクトBの存在下における抗体／抗体コンストラクトAのタイトレーションステップ（即ち種々の量を添加するステップ）、及びBの結合に対する効果を検出するステップ；又は

c) 両方の抗体／抗体コンストラクトが最大濃度で併せてインキュベートされるAとBとの共タイトレーションステップ、及び全結合量がA又はBのいずれか一方単独の結合量と等しいか又はそれを上回るかどうかを検出するステップ、即ち抗体／抗体コンストラクトの添加順序又は相対量の影響を受け得ない方法を含み得る。

【0068】

2つの抗体／抗体コンストラクトA及びBが細胞表面結合抗原に関して競合するとき、これらの抗体は、非常に多くの場合に遮断アッセイにおいて抗体の添加順序とは無関係に互いに競合することになる。換言すれば、アッセイがいずれの方向で行われる場合にも競合が検出される。しかしながら、常にそうとは限らず、ある状況下では、抗体の添加順序又はアッセイの方向が生成されるシグナルに効果を及ぼし得る。これは、潜在的に競合する抗体／抗体コンストラクトの親和性又はアビディティの差に起因し得る。添加順序が生成されるシグナルに大きい効果を及ぼす場合、少なくとも一方の順序で競合が検出されたならば、それらの2つの抗体／抗体コンストラクトは、確かに競合すると結論付けられる。

【0069】

一実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインが標的細胞の表面上のヒトCLDN18.2に結合し、ここで、ヒトCLDN18.2の56位のGlu（E）は、第1のドメインの結合に必須であり、ヒトCLDN18.2の42位のAla（A）及び／又は45位のAsn（N）は、第1のドメインの結合に必須でない。これに関連して、用語「～は結合に必須である」とは、抗体コンストラクトによるCLDN18.2への結合が起こるために指定のアミノ酸（56位のGlu）が必要であることを意味する。56位のアミノ酸Gluが例えばGlnに交換された場合（→E56Q）、抗体コンストラクトの結合は、消失するか又は大幅に低下する（図4、「P6」と表示された列を参照されたい）。用語「～は結合に必須でない」とは、抗体コンストラクトによるCLDN18.2への結合が起こるために指定のアミノ酸（42位のAla及び／又は45位のAsn）が必要でないことを意味する。42位のアミノ酸Ala及び／又は45位のAsnが例えば42位においてSer（→A42S）及び／又は45位においてGln（→N45Q）に交換されても、抗体コンストラクトの結合は、低下しないか又は大幅には低下しない（図4、「P3」及び「P4」と表示された列を参照されたい）。

【0070】

一実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3、配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3；及び

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3

からなる群から選択されるCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3を含むVH領域、並びにCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3を含むVL領域を含む。

【0071】

本発明との関連において、用語「可変」は、抗体又は免疫グロブリンドメインのうち、その配列において可変性を呈し、且つ特定の抗体の特異性及び結合親和性の決定に関わる一部分（即ち1つ又は複数の「可変領域」）を指す。通常、重鎖可変領域（VH）と軽鎖可変領域（VL）とが一緒になって対を成し、単一の抗原結合部位を形成する。

【0072】

可変性は、抗体の可変領域全体にわたって均一に分布せず、重鎖及び軽鎖可変領域の各々のサブドメインに集中している。これらのサブドメインは、「超可変領域」又は「相補性決定領域」(CDR)と呼ばれる。可変領域のうち、より保存性の高い(即ち超可変性でない)部分は、「フレームワーク」(FR)領域と呼ばれ、6つのCDRが抗原結合表面を形成するための三次元空間における足場を提供する。天然に存在する抗体重鎖及び軽鎖の可変領域は、主としてβシート配置をとる4つのFR領域(FR1、FR2、FR3及びFR4)をそれぞれ含む。FR領域は、可変重鎖又は軽鎖内でCDRと一緒にあって以下の配列を形成する：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。各鎖の超可変領域は、フレームワーク領域によってごく近接して一体に保持され、通常、他方の鎖の超可変領域と一緒にあって抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al., loc. cit. を参照されたい)。

10

【0073】

用語「CDR」及びその複数形「CDRs」は、そのうちの3つが軽鎖可変領域の結合特性を構成し(CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3)、3つが重鎖可変領域の結合特性を構成する(CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3)相補性決定領域を指す。CDRは、抗体(又は抗体コンストラクト又は結合ドメイン)による抗原との特異的相互作用に關与する残基の大半を含有し、従って抗体分子の機能的活性に寄与する。CDRは、抗原特異性の主要な決定基である。

【0074】

CDR境界及び長さの正確な定義は、異なる分類及び付番方式に依存する。従って、CDRは、本明細書に記載される付番方式を含め、Kabat、Chothia、コンタクト又は任意の他の境界定義によって参照され得る。異なる境界にも関わらず、これらの方式の各々は、可変配列内においていわゆる「超可変領域」を構成するものがある程度重複している。従って、これらの方式によるCDR定義は、長さ及び隣接フレームワーク領域に対する境界範囲が異なり得る。例えば、Kabat(異種間配列可変性に基づく手法)、Chothia(抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づく手法)及び/又はMacCallum(Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol., 1987, 196:901-917; 及びMacCallum et al., J. Mol. Biol., 1996, 262:732)を参照されたい。抗原結合部位の特徴付けのためのなおも別の標準は、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって用いられるAbM定義である。例えば、Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg)を参照されたい。2つの残基同定技法が、重複する領域ながら同一ではない領域を定義する限り、それらを組み合わせてハイブリッドCDRを定義することができる。しかしながら、いわゆるKabat方式に従う付番が好ましい。

20

30

【0075】

典型的には、CDRは、カノニカル構造として分類することのできるループ構造を形成する。用語「カノニカル構造」は、抗原結合(CDR)ループがとる主鎖コンホメーションを指す。比較構造研究から、6つの抗原結合ループのうちの5つは、限られたレパートリーのコンホメーションのみが利用可能であることが分かっている。各カノニカル構造は、ポリペプチド骨格のねじれ角によって特徴付けることができる。従って、抗体間の対応するループは、ループのほとんどの部分でアミノ酸配列可変性が高いにも関わらず、極めて類似した三次元構造を有し得る(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196:901; Chothia et al., Nature, 1989, 342:877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol., 1996, 263:800)。更に、とられるループ構造と、その周囲のアミノ酸配列との間に關係がある。特定のカノニカルクラスのコンホメーションは、ループの長さ及び

40

50

ループ内並びに保存されたフレームワーク内（即ちループ外）で重要な位置に存在するアミノ酸残基によって決まる。従って、これらの重要なアミノ酸残基の存在に基づいて特定のカノニカルクラスへの割り当てを行うことができる。

【0076】

用語「カノニカル構造」は、例えば、Kabat (Kabat et al., loc. cit.) によって列挙されたとおりの、抗体の線状配列に関する考慮事項も含み得る。Kabat付番スキーム（方式）は、一貫した方法での抗体可変領域のアミノ酸残基の付番に広く採用されている標準であり、本明細書の他の部分でも言及されるとおり、本発明において適用される好ましいスキームである。追加の構造的考慮事項も用いて抗体のカノニカル構造を決定することができる。例えば、Kabat付番によっては完全に反映されない差異は、Chothia et al. の付番方式によって記述し、且つ／又は他の技法、例えば結晶学及び二次元又は三次元コンピュータモデリングによって明らかにすることができる。従って、所与の抗体配列は、あるカノニカルクラスに分けられ得、それにより、数ある中でも特に適切なクラス配列の同定が可能になる（例えば、ライブラリに種々のカノニカル構造を含める要望に基づく）。抗体アミノ酸配列のKabat付番及びChothia et al., loc. cit. により記載されるとおりの構造的考慮事項並びに抗体構造のカノニカルな側面を解釈する上でのこれらの含意するところは、文献に記載されている。種々のクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元配置は、当該技術分野において周知である。抗体構造のレビューについては、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988を参照されたい。

【0077】

軽鎖のCDR3及び特に重鎖のCDR3は、軽鎖及び重鎖可変領域内で抗原結合における最も重要な決定基を構成し得る。一部の抗体又は抗体コンストラクト／結合ドメインでは、重鎖CDR3が抗原と抗体との間の主要な接触範囲を構成するように見える。CDR3単独を変異させるインビトロ選択スキームを用いると、抗体又は抗体コンストラクト／結合ドメインの結合特性を変えるか、又はいずれの残基が抗原の結合に寄与するかを決定することができる。従って、CDR3は、典型的には抗体結合部位内における分子多様性の最大の供給源である。例えば、CDR-H3は、僅か2アミノ酸残基ほどであることも又は26アミノ酸より長いこともある。

【0078】

古典的完全長抗体又は免疫グロブリンでは、各軽（L）鎖は、1つの共有結合性ジスルフィド結合によって重（H）鎖に連結される一方、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに応じた1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結される。VHに最も近い重鎖定常（CH）ドメインは、通常、CH1と称される。定常（「C」）ドメインは、抗原結合に直接的に関与しないが、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）及び補体活性化（補体依存性細胞傷害、CDC）など、様々なエフェクター機能を呈する。抗体のFc領域は、Fc受容体と呼ばれる細胞表面受容体及び補体系の一部のタンパク質と相互作用する古典的抗体の「テール」領域である。IgG、IgA及びIgD抗体アイソタイプでは、Fc領域は、抗体の2つの重鎖の第2及び第3の定常ドメイン（CH2及びCH3）に由来する2つの同一のタンパク質断片で構成される。IgM及びIgE Fc領域は、各ポリペプチド鎖に3つの重鎖定常ドメイン（CH2、CH3及びCH4）を含有する。Fc領域は、1つ以上のジスルフィド及び非共有結合性相互作用によって一体に保持されたいわゆる「ヒンジ」領域の一部も含有する。天然に存在するIgGのFc領域は、高度に保存されたN-グリコシル化部位を担持している。Fc断片のグリコシル化は、Fc受容体媒介活性に必須である。

【0079】

ADCCは、膜表面抗原に特異抗体が結合した標的細胞を免疫系のエフェクター細胞が能動的に溶解する細胞媒介性免疫防御機構である。ADCCには、典型的にはIgG抗体と相互作用するナチュラルキラー（NK）細胞であることが古典的に公知の免疫エフェク

ター細胞が必要である。しかしながら、ADCCは、マクロファージ、好中球及び好酸球によっても媒介され得る。ADCCは、Fc受容体を発現するエフェクター細胞がFc部分を発現する抗体によって活性化されることを伴う。例えば、NK細胞の表面上の最も一般的なFc受容体は、CD16又はFcγRIIと呼ばれる。Fc受容体がIgGのFc領域に結合すると、NK細胞は、細胞傷害性因子を放出し、標的細胞の死滅を引き起こされる。同様に、好酸球のFc受容体(FcεRI)は、IgEを認識することになる。対照的に、CDCでは、補体系の分子「C1q」が抗体Fc領域に結合し、この結合が補体カスケードを惹起して、それが古典経路補体活性化の結果としての標的細胞の表面における膜侵襲複合体(MAC)の形成につながる。治療用抗体又は抗体コンストラクトでは、Fcアイソタイプのエンジニアリング、Fc遺伝子突然変異又はFcグリコシル化プロファイル修飾によってADCC及びCDCの両方を調節することができる。

10

【0080】

アセンブリ及び体細胞突然変異後の抗体遺伝子の配列に高度なばらつきがあり、これらのばらつきのある遺伝子は、 10^{10} 個の異なる抗体分子をコードすると推定される(Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995)。従って、免疫系は、免疫グロブリンのレパートリーを提供する。用語「レパートリー」は、少なくとも1つの免疫グロブリンをコードする少なくとも1つの配列に全体的に又は部分的に由来する少なくとも1つのヌクレオチド配列を指す。この1つ又は複数の配列は、重鎖のV、D及びJセグメント並びに軽鎖のV及びJセグメントのインビボでの再編成によって生成され得る。或いは、1つ又は複数の配列は、いずれの再編成が起こるか、例えばインビトロ刺激に応じて細胞から生成されることもある。或いは、1つ又は複数の配列の一部又は全ては、DNAスプライシング、ヌクレオチド合成、突然変異誘発及び他の方法によって得ることができ、例えば米国特許第5,565,332号明細書を参照されたい。レパートリーは、1つの配列のみを含み得るか、又は遺伝的に多様なコレクションのものを含め、複数の配列を含み得る。

20

【0081】

抗体コンストラクトは、第1のドメイン内にシステインランプを有することが想定される。このシステインランプは、コンストラクトの安定性を向上させるために導入され得る。例えば、米国特許出願公開第2016/0193295号明細書を参照されたい。

30

【0082】

本発明の一実施形態において、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、配列番号127又は配列番号139に示されるとおりのアミノ酸配列を有するVH領域を含む。更なる実施形態において、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、配列番号128又は配列番号140に示されるとおりのアミノ酸配列を有するVL領域を含む。別の実施形態において、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、配列番号127+128(VH+VL)又は配列番号139+140(VH+VL)に示されるとおりのアミノ酸配列を有するVH領域及びVL領域を含む。更に別の実施形態において、本発明の抗体コンストラクトの第1のドメインは、配列番号129又は配列番号141に示されるとおりのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。

40

【0083】

本明細書において上記に記載されるとおり、本発明は、抗体コンストラクトが、(scFv)₂、scFvシングルドメインmAb、ダイアボディ及び前述のフォーマットのいずれかのオリゴマーからなる群から選択されるフォーマットである実施形態を提供する。用語「フォーマットである」は、コンストラクトが本明細書に記載されるとおり、例えば他の部分への付加又は融合によって更に修飾され得ることを除外しない。本発明の抗体コンストラクトの一実施形態によれば、第1及び／又は第2のドメインは、scFvのフォーマットである。scFvでは、VH領域及びVL領域は、VH-VL又はVL-VHの順序(N末端からC末端に)で配置される。第1及び／又は第2の結合ドメインのVH領域及びVL領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して接続されることが想

50

定される。第1及び／又は第2のドメインの一実施形態によれば、VH領域がリンカーのN末端側に位置し、VL領域がリンカーのC末端側に位置する。換言すれば、第1及び／又は第2のドメインの一実施形態において、scFvは、N末端からC末端に、VHーリンカーーVLを含む。更に、抗体コンストラクトの第1のドメイン及び第2のドメインがリンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して接続されることが想定される。抗体コンストラクトは、例えば、(N末端からC末端に)第1のドメインーリンカーー第2のドメインの順序でドメインを含み得る。逆の順序(第2のドメインーリンカーー第1のドメイン)も可能である。

【0084】

リンカーは、好ましくは、ペプチドリンカー、より好ましくは短鎖ペプチドリンカーである。本発明において、「ペプチドリンカー」は、抗体コンストラクトの1つのドメインのアミノ酸配列を別の(可変及び／又は結合)ドメイン(例えば、可変ドメイン又は結合ドメイン)と接続するアミノ酸配列を含む。かかるペプチドリンカーの必須の技術的特徴は、それがいかなる重合活性も含まないことである。好適なペプチドリンカーの中には、米国特許第4,751,180号明細書及び同第4,935,233号明細書又は国際公開第88/09344号パンフレットに記載されるものがある。ペプチドリンカーは、本発明の抗体コンストラクトに他のドメイン又はモジュール又は領域(半減期延長ドメインなど)を付加するためにも使用することができる。有用なペプチドリンカーの例は、配列番号155~168に示される。これに関連して、「短鎖」リンカーは、2~50アミノ酸、好ましくは3~35、4~30、5~25、6~20又は6~17アミノ酸を有する。1つの結合ドメインの2つの可変領域間のリンカーは、2つの結合ドメイン間のリンカーと異なる長さを有し得る(例えば、それより長いものであり得る)。例えば、1つの結合ドメインの2つの可変領域間のリンカーは、7~15アミノ酸、好ましくは9~13の長さを有し得、2つの結合ドメイン間のリンカーは、3~10アミノ酸、好ましくは4~8の長さを有し得る。更に、ペプチドリンカーは、配列番号156及び158~168に示されるものなど、グリシン／セリンリンカーであることが想定される。グリシン／セリンリンカーのアミノ酸の大部分は、グリシン及びセリンから選択される。

【0085】

リンカーが使用される場合、そのリンカーは、好ましくは、第1及び第2のドメインの各々が、互いに独立に、その差異のある結合特異性を保持し得ることを確実にするのに十分な長さ及び配列である。抗体コンストラクトにおいて少なくとも2つの結合ドメイン(又は1つの結合ドメインを形成する2つの可変領域)を接続するペプチドリンカーについては、ごく少数のアミノ酸残基のみ、例えば12アミノ酸残基以下を含むペプチドリンカーが想定される。従って、12、11、10、9、8、7、6又は5アミノ酸残基のペプチドリンカーが好ましい。5アミノ酸未満の想定されるペプチドリンカーは、4、3、2又は1アミノ酸を含み、ここでは、Glyリッチリンカーが好ましい。前記「ペプチドリンカー」との関連において「単一アミノ酸」リンカーは、Glyである。ペプチドリンカーの別の実施形態は、アミノ酸配列Gly-Gly-Gly-Gly-Ser、即ちGly₄Ser(配列番号156)又はそのポリマー、即ち(Gly₄Ser)_x(式中、xは、1以上の整数(例えば、2又は3)である)によって特徴付けられる。使用可能なリンカーは、配列番号155~163に示される。前記ペプチドリンカーの特徴は、当該技術分野において公知であり、例えばDall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273)、Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30)及びRaag and Whitlow (FASEB (1995) 9 (1), 73-80)に記載されている。いかなる二次構造も促進しないペプチドリンカーが好ましい。前記ドメインの互いの連結は、例えば、遺伝子工学によって提供されることができる。融合した且つ作動可能に連結した二特異性単鎖コンストラクトを調製して、それを哺乳類細胞又は細菌で発現させる方法は、当該技術分野において周知である(例えば、国際公開第99/54440号パンフレット又はSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory

10

20

30

40

50

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001)。

【0086】

本発明の一実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトは、「単鎖抗体コンストラクト」である。また、第1又は第2のいずれか一方又は両方の結合ドメインが「単鎖Fv」(scFv)のフォーマットであり得ることも想定される。Fv断片の2つのドメインVL及びVHは、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を用いて人工リンカーによって — 前述のとおり — つなぎ合わせることができ、VL及びVH領域が対になって一価分子を形成する単一のタンパク質鎖としてそれらが構成されることがリンカーによって可能になる。例えば、Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい。このような抗体断片は、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、断片は、完全長抗体又はIgGと同じように機能に関して評価される。従って、単鎖可変断片(scFv)は、通常、短鎖リンカーペプチドで接続された、免疫グロブリンの重鎖(VH)及び軽鎖(VL)の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは、通常、可動性のためグリシンリッチであると共に溶解度のためにセリン又は同様にスレオニンリッチであり、VHのN末端をVLのC末端に接続するか又はその逆のいずれかであり得る。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にも関わらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持している。

【0087】

二特異性単鎖分子は、当該技術分野において公知であり、国際公開第99/54440号パンフレット、Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970、Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025、Kufner, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197、Loeffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103、Bruehl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426、Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56に記載されている。単鎖抗体コンストラクトの作製について記載される技法(とりわけ、米国特許第4,946,778号明細書、Kontermann and Duebel (2010), loc. cit. 及びLittle (2009), loc. cit. を参照されたい)は、選択された1つ又は複数の標的を特異的に認識する単鎖抗体コンストラクトの作製に採用することができる。

【0088】

フォーマット(scFv)₂を有する二価(二原子価)とも称される)又は二特異性単鎖可変断片(bi-scFv又はdi-scFv)は、2つのscFv分子を(例えば、前述のと通りのリンカーで)連結することによりエンジニアリングし得る。連結は、2つのVH領域と2つのVL領域とを有する単一ポリペプチド鎖を作製してタンデムscFvを生じさせることにより行われ得る(例えば、Kufner P. et al., (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244を参照されたい)。別の可能性は、2つの可変領域が一体に折り畳まれるには短か過ぎるため(例えば、約5アミノ酸)、強制的にscFvを二量化させるリンカーペプチドを含むscFv分子の作成である。この場合、結合ドメイン(標的抗原CLDN18.2又はCD3のいずれかに結合する)のVH及びVLは、ペプチドリinkerによって直接接続されない。従って、CD3結合ドメインのVHがCLDN18.2結合ドメインのVLにペプチドリinkerを介して例えば融合し得、CLDN18.2結合ドメインのVHがかかるペプチドリinkerを介してCD3結合ドメインのVLに融合する。このタイプは、ダイアボディとして公知である(例えば、Hollinger, Philipp et al., (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90(14):6444-8. を参照されたい)。

【0089】

「シングルドメイン抗体」と称される抗体コンストラクトは、他の可変領域とは無関係に、特異的抗原に選択的に結合することが可能な1つの（単量体）抗体可変領域を含む。最初のシングルドメイン抗体は、ラクダ科動物に見られる重鎖抗体からエンジニアリングされたものであり、これは、 V_HH 断片と呼ばれる。軟骨魚類も、それから V_{NAR} 断片と呼ばれるシングルドメイン抗体を得ることのできる重鎖抗体（IgNAR）を有する。代替的な手法は、共通の免疫グロブリンからの二量体可変領域を単量体に分割し、従って V_H 又は V_L をシングルドメインAbとして得ることである。現在、シングルドメイン抗体に関する研究のほとんどは、重鎖可変領域をベースとしているが、軽鎖に由来するナノボディも標的エпитープに特異的に結合することが示された。シングルドメイン抗体の例は、sdAb、ナノボディ又はシングル可変ドメイン抗体と呼ばれる。従って、（シングルドメインmA b）₂は、 V_H 、 V_L 、 V_{HH} 及び V_{NAR} を含む群から個別に選択される（少なくとも）2つのシングルドメインモノクローナル抗体コンストラクトで構成されたモノクローナル抗体コンストラクトである。リンカーは、好ましくは、ペプチドリリンカーの形態である。同様に、「scFvシングルドメインmA b」は、上記に記載したとおりの少なくとも1つのシングルドメイン抗体と、上記に記載したとおりの1つのscFv分子とで構成されたモノクローナル抗体コンストラクトである。この場合もやはり、リンカーは、好ましくは、ペプチドリリンカーの形態である。

【0090】

また、本発明の抗体コンストラクトは、標的分子CLDN18.2及びCD3に結合するその機能に加えて更なる機能を有することも想定される。このフォーマットでは、抗体コンストラクトは、CLDN18.2結合を通じて標的細胞を標的化し、CD3結合を通じて細胞傷害性T細胞活性を媒介し、且つ血清半減期を亢進又は延長させる手段又はドメイン、エフェクター細胞の動員を通じてADCCを媒介する完全に機能性の又は修飾されたFc定常ドメイン、標識（蛍光等）、毒素又は放射性核種などの療法用薬剤など、更なる機能を提供することにより、三機能又は多機能抗体コンストラクトであり得る。

【0091】

本発明の抗体コンストラクトの血清半減期を延長させる手段又はドメインの例としては、抗体コンストラクトに融合されるか又は他の方法で付加されたペプチド、タンパク質又はタンパク質のドメインが挙げられる。ペプチド、タンパク質又はタンパク質ドメインの群には、血清アルブミンなど、人体において好ましい薬物動態プロファイルで他のタンパク質に結合するペプチドが含まれる（国際公開第2009/127691号パンフレットを参照されたい）。かかる半減期延長ペプチドの代替的な概念には、新生児Fc受容体（FcRn、国際公開第2007/098420号パンフレットを参照されたい）に結合するペプチドが含まれ、これも本発明の抗体コンストラクトに使用することができる。タンパク質の大型ドメイン又は完全なタンパク質を付加する概念には、ヒト血清アルブミン、ヒト血清アルブミンの変異体又は突然変異体（国際公開第2011/051489号パンフレット、国際公開第2012/059486号パンフレット、国際公開第2012/150319号パンフレット、国際公開第2013/135896号パンフレット、国際公開第2014/072481号パンフレット、国際公開第2013/075066号パンフレットを参照されたい）又はそのドメインの融合並びに免疫グロブリン定常領域（Fcドメイン）及びその変異体の融合が含まれる。Fcドメインのかかる変異体は、Fcベースのドメインと呼ばれ、例えば二量体又は多量体の所望の対形成を可能にするため、Fc受容体結合を消失させる（例えば、それによりADCC又はCDCを回避する）ために又は他の理由で最適化／修飾され得る。人体における物質又は分子の半減期を延長させるための当該技術分野において公知の更なる概念は、そうした分子（本発明の抗体コンストラクトなど）のペグ化である。

【0092】

一実施形態において、本発明に係る抗体コンストラクトは、例えば、コンストラクトの血清半減期の延長を目的として、融合パートナー（タンパク質、ポリペプチド又はペプチドなど）と（例えば、ペプチド結合で）連結される。こうした融合パートナーは、ヒト血

清アルブミン（「HSA」又は「HALB」）並びにその配列変異体、HSAに結合するペプチド、FcRnに結合するペプチド（「FcRn BP」）又は（抗体由来の）Fc領域を含むコンストラクトから選択することができる。これらの融合パートナーの例示的配列は、配列番号170～232に示される。一般に、融合パートナーは、本発明に係る抗体コンストラクトのN末端又はC末端に直接（例えば、ペプチド結合で）又は（GGGGs）_n（式中、「n」は、2以上の整数、例えば2又は3又は4である）などのペプチドリンカーを介するかのいずれかで連結され得る。好適なペプチドリンカーは、配列番号155～163に示される。

【0093】

従って、本発明に係る抗体コンストラクトは、

（a）N末端からC末端に以下の順序で、

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリンカーは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；

- ・配列番号155～163からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；及び

- ・配列番号36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254及び255からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリンカーは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；及び

- ・任意選択で、例えば配列番号169、269、270又は271から選択されるHisタグを含むポリペプチド；

（b）N末端からC末端に以下の順序で、

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリンカーは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；

- ・配列番号155～163からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254及び255からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリンカーは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；

- ・任意選択で、配列番号155～163からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号170及び176～205からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；及び

- ・任意選択で、例えば配列番号169、269、270又は271から選択されるHisタグを含むポリペプチド；

（c）N末端からC末端に以下の順序で、

- ・アミノ酸配列QRFVTGHFGGLX₁PANG（配列番号171）（式中、X₁は、Y又はHである）を有するポリペプチド；及び

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリンカーは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えること

10

20

30

40

50

ができる；

- ・配列番号 155～163 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号 36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254 及び 255 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号 163 を有するペプチドリンカーは、配列番号 155～162 及び 164～168 のいずれか 1 つに置き換えることができる；

- ・配列番号 173 又は配列番号 175 に示されるとおりのアミノ酸配列を有するポリペプチド；及び

- ・任意選択で、例えば配列番号 169、269、270 又は 271 から選択される His タグ

を含むポリペプチド；

(d) N 末端から C 末端に以下の順序で、

- ・配列番号 34、配列番号 43、配列番号 52、配列番号 61、配列番号 70、配列番号 79、配列番号 88、配列番号 97、配列番号 106、配列番号 115 及び配列番号 118 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

- ・配列番号 162 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号 128 及び配列番号 140 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、それに続く C 末端のセリン残基；

- ・配列番号 206 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；及び

N 末端から C 末端に以下の順序で、

- ・配列番号 127 及び配列番号 139 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

- ・配列番号 162 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号 35、配列番号 44、配列番号 53、配列番号 62、配列番号 71、配列番号 80、配列番号 89、配列番号 98、配列番号 107、配列番号 116 及び配列番号 119 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；それに続く C 末端のセリン残基；及び

- ・配列番号 207 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；

(e) N 末端から C 末端に以下の順序で、

- ・配列番号 34、配列番号 43、配列番号 52、配列番号 61、配列番号 70、配列番号 79、配列番号 88、配列番号 97、配列番号 106、配列番号 115 及び配列番号 118 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

- ・配列番号 162 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号 128 及び配列番号 140 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；及び

- ・配列番号 208 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；及び

N 末端から C 末端に以下の順序で、

- ・配列番号 127 及び配列番号 139 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；

- ・配列番号 162 に示されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号 35、配列番号 44、配列番号 53、配列番号 62、配列番号 71、配列番号 80、配列番号 89、配列番号 98、配列番号 107、配列番号 116 及び配列番号 119 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、それに続く C 末端のセリン残基；及び

- ・配列番号 209 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド

10

20

30

40

50

を含むポリペプチド；

(f) N末端からC末端に以下の順序で、

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリinkerは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；

- ・配列番号155～163からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリinker；

- ・配列番号36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254及び255からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリinkerは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；

- ・配列番号210に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；及び

配列番号211に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；

(g) N末端からC末端に以下の順序で、

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリinkerは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；及び

- ・配列番号212に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；及び

N末端から開始して以下の順序で、

- ・配列番号36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254及び255からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリinkerは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；及び

- ・配列番号213に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；

(h) N末端からC末端に以下の順序で、

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリinkerは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；及び

- ・配列番号214に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；及び

N末端から開始して以下の順序で、

- ・配列番号36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254及び255からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリinkerは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；及び

- ・配列番号215に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチド；

又は

(i) N末端からC末端に以下の順序で、

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリ

10

20

30

40

50

ンカーは、配列番号 155～162 及び 164～168 のいずれか 1 つに置き換えることができる；

- ・配列番号 155～163 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号 36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254 及び 255 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号 163 を有するペプチドリンカーは、配列番号 155～162 及び 164～168 のいずれか 1 つに置き換えることができる；及び

- ・配列番号 216 に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むポリペプチドを含むことが想定される。

【0094】

別の実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトは、ヒンジ、CH2 及び CH3 ドメインを各々含む 2 つのポリペプチド単量体を含む第 3 のドメインを（第 1 及び第 2 のドメインに加えて）含み、ここで、前記 2 つのポリペプチド単量体は、ペプチドリンカーを介して互いに融合している。前記第 3 のドメインは、N 末端から C 末端に順番に、ヒンジ－CH2－CH3－リンカー－ヒンジ－CH2－CH3 を含むことが想定される。前記第 3 のドメインに使用することのできるアミノ酸配列は、配列番号 225～232 に示される。前記ポリペプチド単量体の各々は、配列番号 217～224 からなる群から選択されるアミノ酸配列又はそれらの配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を有し得る。別の実施形態において、本発明の抗体コンストラクトの第 1 及び第 2 のドメインは、配列番号 155、156、157、158、159、160、161、162 又は 163 からなる群から例えば選択されるペプチドリンカーを介して第 3 のドメインに融合される。

【0095】

本発明によれば、「ヒンジ」は、IgG ヒンジ領域である。この領域は、Kabat 付番を用いた類推によって同定することができ、例えば Kabat 位置 223～243 を参照されたい。上記によれば、「ヒンジ」としての最小限の要件は、Kabat 付番に基づくとき、D231～P243 の IgG₁ 配列ストレッチに対応するアミノ酸残基である。用語「CH2」及び「CH3」は、免疫グロブリン重鎖定常領域 2 及び 3 を指す。これらの領域も同様に Kabat 付番を用いた類推によって同定することができ、例えば CH2 について Kabat 位置 244～360 及び CH3 について Kabat 位置 361～478 を参照されたい。免疫グロブリン間には、その IgG₁ Fc 領域、IgG₂ Fc 領域、IgG₃ Fc 領域、IgG₄ Fc 領域、IgM Fc 領域、IgA Fc 領域、IgD Fc 領域及び IgE Fc 領域に関して幾らかのばらつきがあることが理解される（例えば、Padlan, Molecular Immunology, 31 (3), 169-217 (1993) を参照されたい）。用語の Fc 領域は、IgA、IgD 及び IgG の最後の 2 つの重鎖定常領域並びに IgE 及び IgM の最後の 3 つの重鎖定常領域を指す。Fc 領域は、これらのドメインの N 末端側にある可動性ヒンジも含み得る。IgA 及び IgM について、Fc 領域は、J 鎖を含み得る。IgG について、Fc 領域は、免疫グロブリンドメイン CH2 及び CH3 並びに最初の 2 つのドメインと CH2 との間のヒンジを含む。免疫グロブリンの Fc 領域の境界は、様々であり得るが、機能性ヒンジ、CH2 及び CH3 ドメインを含むヒト IgG 重鎖 Fc 部分の例は、例えば、IgG₄ について、それぞれ（ヒンジドメインの）残基 D231～（CH3 ドメインの C 末端の）P476 又は D231～L476（ここで、付番は、Kabat に基づく）を含むものと定義し得る。

【0096】

従って、本発明の抗体コンストラクトは、N 末端から C 末端に順番に、

（a）第 1 のドメイン；

（b）配列番号 156、162 及び 163 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

10

20

30

40

50

(c) 第2のドメイン；

(d) 配列番号155、156、158、159、160、162及び163からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

(e) 第3のドメインの第1のポリペプチド単量体（ヒンジ、CH₂及びCH₃ドメインを含む）；

(f) 配列番号165、166、167及び168からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；及び

(g) 第3のドメインの第2のポリペプチド単量体（ヒンジ、CH₂及びCH₃ドメインを含む）

を含み得る。

【0097】

また、本発明の抗体コンストラクトは、N末端からC末端に順番に、

- ・配列番号129及び配列番号141からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第1のドメイン；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリンカーは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；

- ・配列番号156、162及び163からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；

- ・配列番号36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254及び255からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第2のドメイン；ここで、これらの配列内に含まれる、配列番号163を有するペプチドリンカーは、配列番号155～162及び164～168のいずれか1つに置き換えることができる；

- ・配列番号155、156、158、159、160、162及び163からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドリンカー；及び

- ・配列番号225～232からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する第3のドメイン

を含むことも想定される。

【0098】

従って、一実施形態において、本発明の抗体コンストラクトは、配列番号131、配列番号132、配列番号143又は配列番号144に示されるものの群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか又はそれからなる。

【0099】

抗体コンストラクトの共有結合修飾も本発明の範囲内に含まれ、これは、必ずしもというわけではないが、概して翻訳後に行われる。例えば、抗体コンストラクトの特定のアミノ酸残基を、選択の側鎖又はN末端若しくはC末端残基との反応能を有する有機誘導体化剤と反応させることにより、抗体コンストラクトの幾つかのタイプの共有結合修飾が分子に導入される。二官能性薬剤による誘導体化は、種々の方法で用いられる水不溶性支持体マトリックス又は表面に本発明の抗体コンストラクトを架橋結合するのに有用である。高頻度でグルタミル及びアスパラギン残基が脱アミド化され、それぞれ対応するグルタミル及びアスパルチル残基にされる。或いは、これらの残基は、弱酸性条件下で脱アミド化される。これらの残基のいずれの形態も本発明の範囲内に含まれる。他の修飾としては、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリル又はスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のα-アミノ基のメチル化（T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86）、N末端アミンのアセチル化及び任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0100】

本発明の範囲内に含まれる抗体コンストラクトの別のタイプの共有結合修飾は、タンパ

10

20

30

40

50

ク質のグリコシル化パターンの改変を含む。当該技術分野において公知のとおり、グリコシル化パターンは、タンパク質の配列（例えば、特定のグリコシル化アミノ酸残基の存在又は非存在、以下で考察する）又はタンパク質が産生される宿主細胞若しくは生物の両方に依存し得る。特定の発現システムを以下で考察する。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的にはN結合型又はO結合型のいずれかである。N結合型は、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の付加を指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン（ここで、Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である）は、アスパラギン側鎖への糖質部分の酵素的付加の際の認識配列である。従って、ポリペプチドにこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作り出される。O結合型グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも使用し得るが、最も一般的にはセリン又はスレオニンへの糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース又はキシロースの1つの付加を指す。

【0101】

抗体コンストラクトへのグリコシル化部位の付加は、好都合には、上述のトリペプチド配列の1つ以上が含まれるようにアミノ酸配列を改変することにより達成される（N結合型グリコシル化部位について）。この改変は、出発配列に対する1つ以上のセリン又はスレオニン残基の付加又はそれによる置換によっても行われ得る（O結合型グリコシル化部位について）。容易にするため、抗体コンストラクトのアミノ酸配列は、DNAレベルでの変更を通じて、特にポリペプチドをコードするDNAを予め選択された塩基で突然変異させて、所望のアミノ酸に翻訳されることになるコドンを生じさせることにより改変され得る。

【0102】

抗体コンストラクト上の糖質部分の数を増やす別の手段は、タンパク質へのグリコシドの化学的又は酵素的カップリングによるものである。このような手順は、N結合型及びO結合型グリコシル化に際してグリコシル化能力を有する宿主細胞におけるタンパク質の産生が必要ない点で有利である。用いるカップリングモードに依存して、1つ又は複数の糖は、（a）アルギニン及びヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）システインのものなどの遊離スルフヒドリル基、（d）セリン、スレオニン又はヒドロキシプロリンのものなどの遊離ヒドロキシル基、（e）フェニルアラニン、チロシン又はトリプトファンのもなどの芳香族残基、又は（f）グルタミンのアミド基に付加され得る。これらの方法は、国際公開第87/05330号パンフレット及びAppl. in and Wriston, 1981, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306に記載されている。

【0103】

出発抗体コンストラクト上に存在する糖質部分の除去は、化学的又は酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシル化は、タンパク質を化合物トリフルオロメタンスルホン酸又は均等な化合物に曝露する必要がある。この処理により、連結糖（N-アセチルグルコサミン又はN-アセチルガラクトサミン）を除くほとんど又は全ての糖類に切断が生じる一方、ポリペプチドは、インタクトなまま残る。化学的脱グリコシル化については、Hakimuddin et al., 1987, Arch. Biochem. Biophys. 259: 52及びEdge et al., 1981, Anal. Biochem. 118: 131により記載されている。ポリペプチド上の糖質部分の酵素的切断は、Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138: 350により記載されたとおり、種々のエンド及びエキソグリコシダーゼの使用によって実現することができる。潜在的なグリコシル化部位におけるグリコシル化は、Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 3105により記載されたとおり、化合物ツニカマイシンの使用によって防止し得る。ツニカマイシンは、タンパク質-N-グリコシド連結の形成を阻止する。

【0104】

抗体コンストラクトの他の修飾も本明細書において企図される。例えば、抗体コンスト

ラクトの別のタイプの共有結合修飾は、米国特許第4,640,835号明細書；同第4,496,689号明細書；同第4,301,144号明細書；同第4,670,417号明細書；同第4,791,192号明細書又は同第4,179,337号明細書に示される方法で抗体コンストラクトをポリオール類を含めた様々な非タンパク質性ポリマーに連結することを含む。加えて、例えばポリエチレングリコール（PEG）などのポリマーの付加を促進するため、当該技術分野において公知のとおり、抗体コンストラクト内の様々な位置にアミノ酸置換が作られ得る。

【0105】

一部の実施形態において、本発明の抗体コンストラクトの共有結合修飾は、1つ以上の標識の付加を含む。標識基は、立体障害の可能性を低減するため様々な長さのスペーサーアームを介して抗体コンストラクトにカップリングされ得る。様々なタンパク質標識方法が当該技術分野において公知であり、本発明の実施に用いることができる。用語「標識」又は「標識基」は、任意の検出可能標識を指す。一般に、標識は、それを検出するアッセイに応じて種々のクラスに分けられる — 限定されないが、以下の例が挙げられる：

a) 同位体標識、これは、ラジオアイソトープ又は放射性核種などの放射性同位体又は重同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{89}Zr 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）であり得る

b) 磁性標識（例えば、磁性粒子）

c) 酸化還元活性のある部分

d) 蛍光群（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、化学発光群及び「小分子」蛍光又はタンパク質性蛍光のいずれかであり得るフルオロフォアなどの光学色素（限定されないが、発色団、蛍光体及びフルオロフォアを含む）

e) 酵素群（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）

f) ビオチン化群

g) 二次レポーター（例えば、ロイシンジッパーペア配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ等）によって認識される所定のポリペプチドエピトープ。

【0106】

「蛍光標識」は、その固有の蛍光特性を用いて検出し得る任意の分子を意味する。好適な蛍光標識としては、限定されないが、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン類、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、Cascade Blue J、テキサスレッド、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5、LC Red 705、オレゴングリーン、Alexa-Fluor 色素（Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680）、Cascade Blue、Cascade Yellow及びR-フィコエリトリン（PE）（Molecular Probes、Eugene, OR）、FITC、ローダミン及びテキサスレッド（Pierce、Rockford, IL）、Cy5、Cy5.5、Cy7（Amersham Life Science、Pittsburgh, PA）が挙げられる。フルオロフォアを含めた好適な光学色素がMolecular Probes Handbook by Richard P. Hauglandに記載されている。

【0107】

好適なタンパク質性蛍光標識としては、限定されないが、ウミシイタケ属（Renilla）、プティロサルクス属（Ptilosarcus）又はオワンクラゲ属（Aequorea）GFP種（Chalfie et al., 1994, Science 263: 802-805）、EGFP（Clontech Laboratories, Inc

10

20

30

40

50

、Genbank（登録商標）受託番号U55762）を含めた緑色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質（BFP、Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal, Quebec, Canada H3H 1J9; Stauber, 1998, Biotechniques 24:462-471; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6:178-182）、高感度黄色蛍光タンパク質（EYFP、Clontech Laboratories, Inc.）、ルシフェラーゼ（Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150:5408-5417）、 β ガラクトシダーゼ（Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:2603-2607）及びウミシイタケ属（Renilla）（国際公開第92/15673号パンフレット、国際公開第95/07463号パンフレット、国際公開第98/14605号パンフレット、国際公開第98/26277号パンフレット、国際公開第99/49019号パンフレット、米国特許第5,292,658号明細書；同第5,418,155号明細書；同第5,683,888号明細書；同第5,741,668号明細書；同第5,777,079号明細書；同第5,804,387号明細書；同第5,874,304号明細書；同第5,876,995号明細書；同第5,925,558号明細書）も挙げられる。

【0108】

ロイシンジッパードメインは、それが存在するタンパク質のオリゴマー形成を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは、当初、幾つかのDNA結合タンパク質に同定されたものであり（Landschulz et al., 1988, Science 240:1759）、以来、種々の異なるタンパク質に見付け出されてきた。公知のロイシンジッパーの中には、天然に存在するペプチド及び二量化又は三量化するその誘導体がある。可溶性オリゴマータンパク質の作製に好適なロイシンジッパードメインの例がPCT出願の国際公開第94/10308号パンフレットに記載されており、且つ肺サーファクタントタンパク質D（SPD）に由来するロイシンジッパーがHoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191に記載されている。それに融合した異種タンパク質の安定三量化を可能にする修飾ロイシンジッパーの使用がFanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78に記載されている。

【0109】

本発明の抗体コンストラクトは、例えば、分子の分離に役立つか、又は分子の適合薬物動態プロファイルに関係する追加的なドメインも含み得る。抗体コンストラクトの分離に役立つドメインは、分離方法、例えば分離カラムにおいて捕捉することのできるペプチドモチーフ又は二次的に導入された部分から選択され得る。かかる追加的なドメインの非限定的な実施形態は、Mycタグ、HATタグ、HAタグ、TAPタグ、GSTタグ、キチン結合ドメイン（CBDタグ）、マルトース結合タンパク質（MBPタグ）、Flagタグ、Strepタグ及びその変異体（例えば、StrepIIタグ）及びHisタグとして知られるペプチドモチーフを含む。同定されたCDRによって特徴付けられる本明細書に開示される抗体コンストラクトの全ては、概して、分子のアミノ酸配列における連続したHis残基、例えば5個のHis残基（配列番号269）又は6個のHis残基（ヘキサヒスチジン、配列番号169）の繰り返しとして知られるHisタグドメインを含み得る。Hisタグは、例えば、抗体コンストラクトのN末端又はC末端に位置し得る。一実施形態では、本発明に係る抗体コンストラクトのC末端にペプチド結合によってヘキサヒスチジntag（HHHHHH）が連結される。

【0110】

また、本発明の抗体コンストラクトは、配列番号130及び142に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、且つそのN末端又はそのC末端でタンパク質精製タグに好ましくはペプチド結合（アミド結合）によって連結されるポリペプチドを含むか又はそれからなることも想定される。ポリペプチドのC末端におけるタンパク質精製タグの連結が好ましい。タンパク質精製タグは、短鎖ペプチドであることが想定される。

例えば、短鎖ペプチドの長さは、2～30アミノ酸、4～25アミノ酸、5～20アミノ酸又は6～19アミノ酸であり得る。タンパク質精製タグの例としては、限定されないが、AU1エピトープ（例えば、配列番号272に示されるとおり）、AU5エピトープ（例えば、配列番号273に示されるとおり）、T7タグ（例えば、配列番号274に示されるとおり）、V5タグ（例えば、配列番号275に示されるとおり）、Bタグ（例えば、配列番号276に示されるとおり）、E2エピトープ（例えば、配列番号277に示されるとおり）、FLAGエピトープ／FLAGタグ（例えば、配列番号278に示されるとおり）、Glu-Gluタグ（例えば、配列番号279又は280に示されるとおり）、HAタグ、ヒスチジンアフィニティータグ（例えば、配列番号281に示されるとおり）、HSVエピトープ（例えば、配列番号282に示されるとおり）、KT3エピトープ（例えば、配列番号283に示されるとおり）、Mycエピトープ（例えば、配列番号284に示されるとおり）、ポリアルギニンタグ（5～6個のArg残基）、ポリアスパルテートタグ（5～16個のAsp残基）、ポリヒスチジンタグ（2～10個のHis残基、通常6個のHis残基、例えば配列番号169及び269～271を参照されたい）、ポリフェニルアラニンタグ（通常11個のPhe残基）、S1タグ（例えば、配列番号285に示されるとおり）、Sタグ（例えば、配列番号286に示されるとおり）、Streptタグ（例えば、配列番号287又は288に示されるとおり）、ユニバーサルタグ（例えば、配列番号289に示されるとおり）、VSV-G（例えば、配列番号290に示されるとおり）、プロテインC（例えば、配列番号291に示されるとおり）及びプロテインAが挙げられる。ヒスチジンタグ、特に6×Hisタグ（配列番号169）が好ましい。従って、本発明の抗体コンストラクトは、配列番号130及び142に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸配列を有し、且つそのC末端でペプチド結合によって6×Hisタグに連結されるポリペプチドからなることが更に想定される。本発明の抗体コンストラクトの実施形態は、配列番号131又は配列番号143に示されるとおりのアミノ酸配列を有する。

【0111】

T細胞又はTリンパ球は、細胞媒介性免疫において中心的な役割を果たすリンパ球の一種（それ自体白血球細胞の一種）である。T細胞のサブセットが幾つかあり、各々が異なる機能を有する。T細胞は、細胞表面上のT細胞受容体（TCR）の存在によってB細胞及びNK細胞などの他のリンパ球と区別することができる。TCRは、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）分子に結合した抗原の認識に関与し、2つの異なるタンパク質鎖で構成される。T細胞の95%において、TCRは、アルファ（ α ）鎖とベータ（ β ）鎖とからなる。TCRが抗原ペプチド及びMHC（ペプチド／MHC複合体）と会合すると、関連する酵素、共受容体、特殊化したアダプター分子及び活性化した又は放出された転写因子によって媒介される一連の生化学的イベントを通じてTリンパ球が活性化される。

【0112】

本発明の抗体コンストラクトは、T細胞の表面上のCD3に結合するドメインを含む。「CD3」（分化クラスター3）は、4つの鎖で構成されるT細胞共受容体である。哺乳類では、CD3タンパク質複合体は、CD3 γ （ガンマ）鎖、CD3 δ （デルタ）鎖及び2つのCD3 ϵ （イプシロン）鎖を含有する。これらの4つの鎖がT細胞受容体（TCR）及びいわゆる ζ （ゼータ）鎖と結び付いて「T細胞受容体複合体」を形成し、Tリンパ球において活性化シグナルを生成する。CD3 γ （ガンマ）、CD3 δ （デルタ）及びCD3 ϵ （イプシロン）鎖は、免疫グロブリンスーパーファミリーの高度に関連性のある細胞表面タンパク質であり、各々が単一の細胞外免疫グロブリンドメインを含有する。CD3分子の細胞内テールは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）として知られる単一の保存モチーフを含有し、これは、TCRのシグナル伝達能に必須である。CD3 ϵ 分子は、ヒトでは11番染色体に存在するCD3E遺伝子によってコードされるポリペプチドである。

【0113】

T細胞上のCD3及び標的細胞上の標的タンパク質に結合する抗体コンストラクトによ

るT細胞の動員を介してリダイレクトされた標的細胞の溶解には、概して、細胞溶解性シナプス形成並びにパーフォリン及びグランザイムの送達に関わる。会合したT細胞は、一連の標的細胞溶解能力を有し、ペプチド抗原プロセッシング及び提示又はクローナルなT細胞分化を妨げる免疫エスケープ機構の影響を受けない。例えば、国際公開第2007/042261号パンフレットを参照されたい。

【0114】

CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトによって媒介される細胞傷害性は、様々な方法で測定することができる。実施例7を参照されたい。「最大半量有効濃度」(EC₅₀)は、本発明の抗体コンストラクトなど、生物学的に活性な分子の効力の尺度として一般的に使用される。これは、モル濃度単位で表され得る。この場合の細胞傷害性の測定では、EC₅₀値は、ベースラインと最大値との中間の細胞傷害性応答(標的細胞の溶解)を生じさせる抗体コンストラクトの濃度を指す。細胞傷害性アッセイにおけるエフェクター細胞は、例えば、刺激されたエンリッチ(ヒト)CD8陽性T細胞又は刺激されていない(ヒト)末梢血単核球(PBMC)であり得る。典型的には、エフェクター細胞として刺激/エンリッチされたCD8+ T細胞を使用したとき、刺激されていないPBMCと比較して、EC₅₀値は、低くなると予想され得る。標的細胞がマカク由来であるか、又はマカクCLDN18.2を発現するか若しくはトランスフェクトされている場合、エフェクター細胞もマカクT細胞株、例えば4119LnPxなど、マカク由来でなければならない。標的細胞は、細胞表面上にヒト又はマカクCLDN18.2などのCLDN18.2を発現するはずである。好ましくは、標的細胞は、細胞表面上にCLDN18.2ループ1及び/又はループ2など、CLDN18.2の1つ又は複数の細胞外ループを少なくとも発現するはずである。標的細胞は、CLDN18.2、例えばヒト又はマカクCLDN18.2を安定に又は一過性にトランスフェクトされている細胞株(CHOなど)であり得る。或いは、標的細胞は、ヒト胃がん株SNU-601又はSNU-620又は同様にSNU-16、NUGC、NUGC4、GSU又はIM95など、CLDN18.2陽性の天然発現体である細胞株であり得る。通常、細胞表面上に高レベルのCLDN18.2を発現する標的細胞を使用したとき、それより標的発現率が低い標的細胞と比較して、EC₅₀値は、低くなると予想される。

【0115】

細胞傷害性アッセイにおけるエフェクター対標的細胞(E:T)比は、通常、約10:1であり、しかし、これはまた、異なり得る。CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの細胞傷害活性は、51-クロム遊離アッセイ(例えば、約18時間のインキュベーション時間を伴う)又はFACSベースの細胞傷害性アッセイ(例えば、約48時間のインキュベーション時間を伴う)において測定することができる。インキュベーション時間(細胞傷害性反応)の修正も想定される。他の細胞傷害性測定方法は、周知であり、MTT又はMTSアッセイ、生物発光アッセイを含めたATPベースのアッセイ、スルホローダミンB(SRB)アッセイ、WSTアッセイ、クローン形成アッセイ及びECIS技術を含む。

【0116】

一実施形態によれば、本発明のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトによって媒介される細胞傷害活性は、細胞ベースの細胞傷害性アッセイにおいて測定される。これは、51-クロム遊離アッセイでも測定され得る。本発明の抗体コンストラクトのEC₅₀値は、 ≤ 300 pM、 ≤ 280 pM、 ≤ 260 pM、 ≤ 250 pM、 ≤ 240 pM、 ≤ 220 pM、 ≤ 200 pM、 ≤ 180 pM、 ≤ 160 pM、 ≤ 150 pM、 ≤ 140 pM、 ≤ 120 pM、 ≤ 100 pM、 ≤ 90 pM、 ≤ 80 pM、 ≤ 70 pM、 ≤ 60 pM、 ≤ 50 pM、 ≤ 40 pM、 ≤ 30 pM、 ≤ 20 pM、 ≤ 15 pM、 ≤ 10 pM又は ≤ 5 pMであることが想定される。

【0117】

上記に示したEC₅₀値は、種々のアッセイにおいて種々の条件下で測定することができる。例えば、エフェクター細胞としてヒトPBMCが使用され、且つ標的細胞としてC

HO細胞などのCLDN18.2トランスフェクト細胞が使用されるとき、CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトのEC₅₀値は、 ≤ 500 pM、 ≤ 400 pM、 ≤ 300 pM、 ≤ 280 pM、 ≤ 260 pM、 ≤ 250 pM、 ≤ 240 pM、 ≤ 220 pM、 ≤ 200 pM、 ≤ 180 pM、 ≤ 160 pM、 ≤ 150 pM、 ≤ 140 pM、 ≤ 120 pM、 ≤ 100 pM、 ≤ 90 pM、 ≤ 80 pM、 ≤ 70 pM、 ≤ 60 pM、 ≤ 50 pM、 ≤ 40 pM、 ≤ 30 pM、 ≤ 20 pM、 ≤ 15 pM、 ≤ 10 pM又は ≤ 5 pMであることが想定される。エフェクター細胞としてヒトPBMCが使用されるとき、且つ標的細胞がSNU-601又はSNU-620などのCLDN18.2陽性細胞株であるとき、CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトのEC₅₀値は、 ≤ 300 pM、 ≤ 280 pM、 ≤ 260 pM、 ≤ 250 pM、 ≤ 240 pM、 ≤ 220 pM、 ≤ 200 pM、 ≤ 180 pM、 ≤ 160 pM、 ≤ 150 pM、 ≤ 140 pM、 ≤ 120 pM、 ≤ 100 pM、 ≤ 90 pM、 ≤ 80 pM、 ≤ 70 pM、 ≤ 60 pM、 ≤ 50 pM、 ≤ 40 pM、 ≤ 30 pM、 ≤ 20 pM、 ≤ 15 pM、 ≤ 10 pM又は ≤ 5 pMであることが想定される。

【0118】

一実施形態によれば、本発明のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、CHO細胞など、その表面上にCLDN18.2を発現しない細胞（CLDN18.2陰性細胞）の溶解を誘導／媒介せず、又はその溶解を本質的に誘導／媒介しない。用語「溶解を誘導しない」、「溶解を本質的に誘導しない」、「溶解を媒介しない」又は「溶解を本質的に媒介しない」は、本発明の抗体コンストラクトが、CLDN18.2陰性細胞の30%を超える溶解を誘導又は媒介しない、好ましくは20%を超えない、より好ましくは10%を超えない、特に好ましくは9%、8%、7%、6%又は5%を超えない（ここでは、CLDN18.2を発現する標的細胞（CLDN18.2で形質転換又はトランスフェクトされた細胞又はヒト胃がん株SNU-601若しくはSNU-620などの天然の発現体である細胞株など）の溶解を100%とする）ことを意味する。これは、通常、最高500 nMまでの抗体コンストラクトの濃度に適用される。細胞溶解測定は、ルーチンの技法である。更に、本明細書は、細胞溶解の測定方法についての具体的な指示を教示する。

【0119】

個々のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの単量体アイソフォームと二量体アイソフォームとの細胞傷害活性の差は、「効力ギャップ」と称される。この効力ギャップは、例えば、分子の単量体型と二量体型とのEC₅₀値間の比として計算することができる。このギャップを決定する1つの方法では、後述するとおり（実施例7.1及び7.2）、精製抗体コンストラクト単量体及び二量体で18時間51-クロム遊離アッセイ又は48時間FACSベース細胞傷害性アッセイが実施される。エフェクター細胞は、刺激されたエンリッチヒトCD8+T細胞又は刺激されていないヒトPBMCである。標的細胞は、hu CLDN18.2トランスフェクトCHO細胞である。エフェクター対標的細胞（E:T）比は、10:1である。本発明のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの効力ギャップは、好ましくは、 ≤ 5 、より好ましくは ≤ 4 、更により好ましくは ≤ 3 、更により好ましくは ≤ 2 及び最も好ましくは ≤ 1 である。

【0120】

本発明の抗体コンストラクトの第1及び／又は第2のドメインは、好ましくは、マカクなどの霊長類の哺乳類目のメンバーに異種間特異的である。異種間特異的CD3結合ドメインについては、例えば、国際公開第2008/119567号パンフレットに記載されている。一実施形態によれば、第2のドメインは、ヒトCD3への結合に加えて、（限定されないが）新世界霊長類（コモンマーモセット（*Callithrix jacchus*）、ワタボウシタマリン（*Saguinus Oedipus*）又はリスザル（*Saimiri sciureus*）など）、旧世界霊長類（ヒヒ及びマカクなど）、テナガザル、オランウータン及び非ヒトのヒト亜科（*Homininae*）を含め、霊長類のCD3にも結合することになる。T細胞の表面上のヒトCD3に結合する第2のドメインは、少なくともマカクCD3にも結合することが想定される。好ましいマカクは、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）である。アカゲザル（*Macaca mu*

10

20

30

40

50

l a t t a) (赤毛猿)も想定される。本発明の1つの抗体コンストラクトは、標的細胞の表面上のヒトC L D N 1 8 . 2に結合する第1のドメインと、T細胞の表面上のヒトC D 3及び少なくともマカクC D 3に結合する第2のドメインとを含む。

【0121】

一実施形態において、マカクC D 3と比べたヒトC D 3への結合に関する本発明に係る抗体コンストラクトの親和性ギャップ [K D m a C D 3 : K D h u C D 3] は、(例えば、B i a C o r e又はスキャッチャード分析によって決定したとき)、0 . 0 1 ~ 1 0 0、好ましくは0 . 1 ~ 1 0、より好ましくは0 . 2 ~ 5、より好ましくは0 . 3 ~ 4、更により好ましくは0 . 5 ~ 3又は0 . 5 ~ 2 . 5及び最も好ましくは0 . 5 ~ 1である。実施例3を参照されたい。

10

【0122】

本発明の抗体コンストラクトの第2のドメインは、C D 3に結合する。より好ましくは、これは、T細胞の表面上のC D 3に結合する。更に、第2のドメインは、ヒトC D 3、好ましくはT細胞の表面上のヒトC D 3に結合することが想定される。また、第2のドメインは、C D 3 εに結合することも想定される。より好ましくは、これは、ヒトC D 3 ε、例えばT細胞の表面上のヒトC D 3 εに結合する。ヒトC D 3 εの細胞外ドメインについて好ましいアミノ酸配列は、配列番号256に示す。

【0123】

本発明の一実施形態において、抗体コンストラクトの第2のドメインは、ヒトC D 3 ε (又はT細胞の表面上のヒトC D 3 ε) 及びコモンマーモセット (C a l l i t h r i x j a c c h u s) 又はリスザル (S a i m i r i s c i u r e u s) C D 3 εに結合する。また、第2のドメインは、C D 3 εの細胞外エピトープ、好ましくはヒトC D 3 εの細胞外エピトープに結合することも想定される。また、第2のドメインは、ヒト及びマカク属 (M a c a c a) C D 3 ε鎖の細胞外エピトープに結合することも想定される。C D 3 εの1つの好ましいエピトープは、ヒトC D 3 ε細胞外ドメインのアミノ酸残基1~27の範囲内に含まれる (配列番号257を参照されたい)。更により具体的には、エピトープは、少なくともアミノ酸配列G l n - A s p - G l y - A s n - G l uを含む。コモンマーモセット (C a l l i t h r i x j a c c h u s) は、マーモセット科 (C a l l i t r i c h i d a e) に属する新世界霊長類である一方、リスザル (S a i m i r i s c i u r e u s) は、オマキザル科 (C e b i d a e) に属する新世界霊長類である。かかる特徴を有する結合体が国際公開第2008/119567号パンフレットに詳細に記載されている。

20

30

【0124】

(ヒト) C D 3に対する又は具体的にはC D 3 εに対する抗体又は二特異性抗体コンストラクトは、当該技術分野において公知であり、そのC D R、V H及びV L配列は本発明の抗体コンストラクトの第2の結合ドメインのベースとしての役割を果たし得る。例えば、K u n g e t a l . は、1979年、ヒトT細胞上のC D 3 (具体的にはC D 3のε鎖) を認識する最初のm A bであるO K T 3 (O r t h o K u n g T 3) の開発を報告した。O K T 3 (ムロモナブ) は、ヒトにおける治療に利用可能になった最初のマウス由来モノクローナル抗体であった。最近の抗C D 3モノクローナル抗体には、オテリキシズマブ (T R X 4)、テプリズマブ (M G A 0 3 1)、フォラルマブ及びビジリズマブが含まれ、いずれもC D 3のε鎖を標的とする。(がん) 標的及びC D 3に対する二特異性抗体コンストラクトも開発及び(前) 臨床試験が行われているところであり、そのC D 3結合ドメイン (C D R、V H、V L) は、本発明の抗体コンストラクトの第2の結合ドメインのベースとしての役割を果たし得る。例としては、限定されないが、ブリナツモマブ、ソリトマブ (M T 1 1 0、A M G 1 1 0)、カツマキソマブ、デュボルツキシズマブ、エルツマキソマブ、モスネツズマブ、F B T A 0 5 (B i 2 0、T P B s 0 5)、C E A - T C B (R G 7 8 0 2、R O 6 9 5 8 6 8 8)、A F M 1 1及びM G D 0 0 6 (S 8 0 8 8 0) が挙げられる。C D 3結合ドメインの他の例は、例えば、米国特許第7,994,289 B2号明細書、米国特許第7,728,114 B2号明細書、米国特許第7,3

40

50

81, 803 B1号明細書、米国特許第6,706,265 B1号明細書に開示されている。

【0125】

本発明の抗体コンストラクトについて、T細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインは、

(a) 配列番号37に示されるとおりのCDR-L1、配列番号38に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号39に示されるとおりのCDR-L3；

(b) 配列番号82に示されるとおりのCDR-L1、配列番号83に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号84に示されるとおりのCDR-L3；及び

(c) 配列番号100に示されるとおりのCDR-L1、配列番号101に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号102に示されるとおりのCDR-L3

から選択されるCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3を含むVL領域を含むことが想定される。

【0126】

また、本発明の抗体コンストラクトについて、T細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインは、

(a) 配列番号31に示されるとおりのCDR-H1、配列番号32に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号33に示されるとおりのCDR-H3；

(b) 配列番号40に示されるとおりのCDR-H1、配列番号41に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号42に示されるとおりのCDR-H3；

(c) 配列番号49に示されるとおりのCDR-H1、配列番号50に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号51に示されるとおりのCDR-H3；

(d) 配列番号58に示されるとおりのCDR-H1、配列番号59に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号60に示されるとおりのCDR-H3；

(e) 配列番号67に示されるとおりのCDR-H1、配列番号68に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号69に示されるとおりのCDR-H3；

(f) 配列番号76に示されるとおりのCDR-H1、配列番号77に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号78に示されるとおりのCDR-H3；

(g) 配列番号85に示されるとおりのCDR-H1、配列番号86に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号87に示されるとおりのCDR-H3；

(h) 配列番号94に示されるとおりのCDR-H1、配列番号95に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号96に示されるとおりのCDR-H3；

(i) 配列番号103に示されるとおりのCDR-H1、配列番号104に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号105に示されるとおりのCDR-H3；及び

(j) 配列番号112に示されるとおりのCDR-H1、配列番号113に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号114に示されるとおりのCDR-H3

から選択されるCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3を含むVH領域を含むことも想定される。

【0127】

更に、本発明の抗体コンストラクトについて、CD3に結合する第2のドメインは、

(a) 配列番号28に示されるとおりのCDR-L1、配列番号29に示されるとおりのCDR-L2、配列番号30に示されるとおりのCDR-L3、配列番号31に示されるとおりのCDR-H1、配列番号32に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号33に示されるとおりのCDR-H3；

(b) 配列番号37に示されるとおりのCDR-L1、配列番号38に示されるとおりのCDR-L2、配列番号39に示されるとおりのCDR-L3、配列番号40に示されるとおりのCDR-H1、配列番号41に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号42に示されるとおりのCDR-H3；

(c) 配列番号46に示されるとおりのCDR-L1、配列番号47に示されるとおりのCDR-L2、配列番号48に示されるとおりのCDR-L3、配列番号49に示される

10

20

30

40

50

とおりのCDR-H1、配列番号50に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号51に示されるとおりのCDR-H3；

(d) 配列番号55に示されるとおりのCDR-L1、配列番号56に示されるとおりのCDR-L2、配列番号57に示されるとおりのCDR-L3、配列番号58に示されるとおりのCDR-H1、配列番号59に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号60に示されるとおりのCDR-H3；

(e) 配列番号64に示されるとおりのCDR-L1、配列番号65に示されるとおりのCDR-L2、配列番号66に示されるとおりのCDR-L3、配列番号67に示されるとおりのCDR-H1、配列番号68に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号69に示されるとおりのCDR-H3；

(f) 配列番号73に示されるとおりのCDR-L1、配列番号74に示されるとおりのCDR-L2、配列番号75に示されるとおりのCDR-L3、配列番号76に示されるとおりのCDR-H1、配列番号77に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号78に示されるとおりのCDR-H3；

(g) 配列番号82に示されるとおりのCDR-L1、配列番号83に示されるとおりのCDR-L2、配列番号84に示されるとおりのCDR-L3、配列番号85に示されるとおりのCDR-H1、配列番号86に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号87に示されるとおりのCDR-H3；

(h) 配列番号91に示されるとおりのCDR-L1、配列番号92に示されるとおりのCDR-L2、配列番号93に示されるとおりのCDR-L3、配列番号94に示されるとおりのCDR-H1、配列番号95に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号96に示されるとおりのCDR-H3；

(i) 配列番号100に示されるとおりのCDR-L1、配列番号101に示されるとおりのCDR-L2、配列番号102に示されるとおりのCDR-L3、配列番号103に示されるとおりのCDR-H1、配列番号104に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号105に示されるとおりのCDR-H3；及び

(j) 配列番号109に示されるとおりのCDR-L1、配列番号110に示されるとおりのCDR-L2、配列番号111に示されるとおりのCDR-L3、配列番号112に示されるとおりのCDR-H1、配列番号113に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号114に示されるとおりのCDR-H3

から選択されるCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3を含むVL領域、並びにCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3を含むVH領域を含むことが想定される。

【0128】

本発明の抗体コンストラクトについて、T細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインは、配列番号44、配列番号89、配列番号107、配列番号233、配列番号234及び配列番号235のいずれか1つに示されるとおりのVL領域からなる群から選択されるVL領域を含むことが想定される。

【0129】

また、T細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインは、配列番号34、配列番号43、配列番号52、配列番号61、配列番号70、配列番号79、配列番号88、配列番号97、配列番号106、配列番号115、配列番号118、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244及び配列番号245のいずれか1つに示されるとおりのVH領域からなる群から選択されるVH領域を含むことも想定される。

【0130】

より好ましくは、本発明の抗体コンストラクトは、

(a) 配列番号35又は233に示されるとおりのVL領域及び配列番号34又は236に示されるとおりのVH領域；

(b) 配列番号44又は233に示されるとおりのVL領域及び配列番号43又は237に示されるとおりのVH領域；

(c) 配列番号 53 又は 233 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 52 又は 238 に示されるとおりの V H 領域；

(d) 配列番号 62 又は 233 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 61 又は 239 に示されるとおりの V H 領域；

(e) 配列番号 71 又は 234 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 70 又は 240 に示されるとおりの V H 領域；

(f) 配列番号 80 又は 233 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 79 又は 241 に示されるとおりの V H 領域；

(g) 配列番号 89 又は 234 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 88 又は 242 に示されるとおりの V H 領域；

(h) 配列番号 98 又は 233 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 97 又は 243 に示されるとおりの V H 領域；

(i) 配列番号 107 又は 235 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 106 又は 244 に示されるとおりの V H 領域；

(j) 配列番号 116 又は 235 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 115 又は 245 に示されるとおりの V H 領域；及び

(k) 配列番号 119 に示されるとおりの V L 領域及び配列番号 118 に示されるとおりの V H 領域

からなる群から選択される V L 領域及び V H 領域を含む T 細胞の表面上の C D 3 に結合する第 2 のドメインによって特徴付けられる。

【0131】

本発明の上述の抗体コンストラクトの好ましい実施形態は、配列番号 36、45、54、63、72、81、90、99、108、117、120、246、247、248、249、250、251、252、253、254 及び 255 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む T 細胞の表面上の C D 3 に結合する第 2 のドメインによって特徴付けられる。

【0132】

本明細書に記載される抗体コンストラクトのアミノ酸配列修飾も企図される。例えば、抗体コンストラクトの結合親和性及び／又は他の生物学的特性を向上させることが望ましい場合もある。抗体コンストラクトのアミノ酸配列変異体は、ペプチド合成によるか、又は抗体コンストラクトをコードする核酸分子に適切なヌクレオチド変化を導入することによって調製される。以下に記載するアミノ酸配列修飾の全ては、非修飾親分子の所望の生物学的活性（C L D N 18.2 及び C D 3 への結合、C L D N 18.2 陽性標的細胞に対する細胞傷害性の誘導など）を保持している抗体コンストラクトをもたらすはずである。

【0133】

用語「アミノ酸」又は「アミノ酸残基」は、典型的には、アラニン（A l a 又は A）；アルギニン（A r g 又は R）；アスパラギン（A s n 又は N）；アスパラギン酸（A s p 又は D）；システイン（C y s 又は C）；グルタミン（G l n 又は Q）；グルタミン酸（G l u 又は E）；グリシン（G l y 又は G）；ヒスチジン（H i s 又は H）；イソロイシン（I l e 又は I）；ロイシン（L e u 又は L）；リジン（L y s 又は K）；メチオニン（M e t 又は M）；フェニルアラニン（P h e 又は F）；プロリン（P r o 又は P）；セリン（S e r 又は S）；スレオニン（T h r 又は T）；トリプトファン（T r p 又は W）；チロシン（T y r 又は Y）；及びバリン（V a l 又は V）からなる群から選択されるアミノ酸など、その当該技術分野で認められている定義を有するアミノ酸を指し、但し、必要に応じて修飾された、合成の又は稀なアミノ酸が使用され得る。基本的に、異なる側鎖によって決まる 4 つの異なるアミノ酸クラスがある。

(1) 非極性及び中性（非荷電）：A l a、G l y、I l e、L e u、M e t、P h e、P r o、V a l

(2) 極性及び中性（非荷電）：A s n、C y s（ごく僅かに極性である）、G l n、S e r、T h r、T r p（ごく僅かに極性である）、T y r

10

20

30

40

50

(3) 酸性及び極性（負電荷）：A s p及びG l u

(4) 塩基性及び極性（正電荷）：A r g、H i s、L y s

【0134】

疎水性アミノ酸は、脂肪族側鎖を有するか、又は芳香族側鎖を有するかに応じて分けることができる。P h e及びT r p（疎水性が極めて高い）、T y r及びH i s（疎水性が低い）は、芳香族アミノ酸に分類される。厳密に言えば、脂肪族とは、側鎖が水素及び炭素原子のみを含有することを意味する。この厳密な定義上、脂肪族側鎖を有するアミノ酸は、アラニン、イソロイシン、ロイシン（またノルロイシン）、プロリン及びバリンである。極めて短いものであるアラニンの側鎖は、それが特に疎水性でないことを意味し、プロリンは、タンパク質においてそれに特別な役割を与える独特な幾何学を有する。多くの場合、メチオニンをイソロイシン、ロイシン及びバリンと同じカテゴリーと考えることが好都合であるが、メチオニンは、硫黄原子も含有する。統一テーマは、これらのアミノ酸が概して非反応性且つ可動性の側鎖を含有することである。アミノ酸アラニン、システイン、グリシン、プロリン、セリン及びスレオニンは、いずれもサイズが小さいという理由から、多くの場合に一緒にまとめられる。G l y及びP r oは、鎖配向に影響し得る。

【0135】

アミノ酸修飾としては、例えば、抗体コンストラクトのアミノ酸配列からの残基の欠失、そこへの残基の挿入及び／又はその範囲内での残基の置換が挙げられる。欠失、挿入及び／又は置換の任意の組み合わせが設けられることにより最終的な抗体コンストラクトに至り、但し、最終的なコンストラクトは、非修飾親分子の所望の特性、例えば生物学的活性（C L D N 1 8 . 2 及びC D 3 への結合、C L D N 1 8 . 2 陽性標的細胞に対する細胞傷害性の誘導など）を有するものとする。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数又は位置の変化など、抗体コンストラクトの翻訳後プロセスも改変し得る。

【0136】

例えば、C D Rの各々において1、2、3、4、5又は6アミノ酸が挿入、欠失及び／又は置換され得る（当然ながらC D Rのそれぞれの長さに依存する）一方、F Rの各々において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は25アミノ酸が挿入、欠失及び／又は置換され得る。アミノ酸配列挿入には、長さが例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10残基～10残基超、例えば100残基以上を含有するポリペプチドに及ぶ範囲のアミノ酸のN末端及び／又はC末端付加並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入も含まれる。本発明の抗体コンストラクトの挿入変異体は、抗体コンストラクトの血清半減期を増加又は延長させるポリペプチドが抗体コンストラクトのN末端又はC末端に融合したものを含む。また、かかる挿入が抗体コンストラクト内、例えば第1のドメインと第2のドメインとの間に行われることも企図可能である。

【0137】

アミノ酸修飾、詳細にはアミノ酸置換に最も有利な部位としては、重鎖及び／又は軽鎖の超可変領域、詳細には個々のC D Rが挙げられ、しかし、重鎖及び／又は軽鎖におけるF Rの改変も企図される。置換は、本明細書に記載されるとおりの保存的置換であり得る。好ましくは、それぞれC D R又はF Rの長さに依存して、C D Rの1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10アミノ酸が置換され得る一方、フレームワーク領域（F R）の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20又は25アミノ酸が置換され得る。例えば、C D R配列が6アミノ酸を含む場合、これらのアミノ酸の1、2又は3個が置換されることが想定される。同様に、C D R配列が15アミノ酸を含む場合、これらのアミノ酸の1、2、3、4、5又は6個が置換されることが想定される。

【0138】

突然変異誘発に好ましい位置にある抗体コンストラクト内の特定の残基又は領域を同定する有用な方法は、「アラニンスキニング突然変異誘発」と呼ばれ、例えばC u n n i n g h a m B . C . a n d W e l l s J . A . (S c i e n c e . 1 9 8 9 J u n

10

20

30

40

50

2 ; 2 4 4 (4 9 0 8) : 1 0 8 1 - 5) に記載されている。ここでは、抗体コンストラクト内にある残基又は残基の群が同定され（例えば、A r g、H i s、L y s、A s p 及び G l u などの荷電残基）、中性又は非極性アミノ酸（最も好ましくはアラニン又はポリアラニン）に置き換えられることにより、標的タンパク質のエピトープとのそれぞれのアミノ酸の相互作用に影響が及ぶ。アラニンスキャニングは、所与のタンパク質の安定性又は機能に対する特定の残基の寄与を決定するために用いられる技法である。アラニンが使用されるのは、そのバルキーでない、化学的に不活性なメチル官能基が理由であり、それにも関わらず、他のアミノ酸の多くが有する二次構造優先性を模倣するためである。時に、突然変異残基のサイズの保存が必要な場合、バリン又はロイシンなどのバルキーなアミノ酸が使用され得る。この技法は、特定の残基の側鎖が生物活性において重要な役割を果たすかどうかの決定にも有用であり得る。アラニンスキャニングは、通常、部位特異的突然変異誘発又はランダムに P C R ライブラリの作成によって達成される。更に、理論的アラニン置換に基づいて熱力学的パラメータを推定する計算的方法が開発されている。データは、I R、N M R 分光法、数学的方法、バイオアッセイ等により試験することができる。

【 0 1 3 9 】

次に、置換部位に又は置換部位に向けて更なる又は他の変異体を導入することにより、置換に対して（例えば、アラニンスキャニングによって決定したときに）機能的感受性を示すアミノ酸位置を精緻化することができる。従って、アミノ酸配列変異を導入する部位又は領域は、予め決定されているが、突然変異自体の性質が予め決定されている必要はない。例えば、所与の部位における突然変異のパフォーマンスを分析又は最適化するため、標的コドン又は領域においてアラニンスキャニング又はランダム突然変異誘発を実施し得、発現させた抗体コンストラクト変異体が所望の活性の最適な組み合わせに関してスクリーニングされる。既知の配列を有する D N A の所定の部位における置換突然変異の作成技法、例えば M 1 3 プライマー突然変異誘発及び P C R 突然変異誘発は、周知である。突然変異体のスクリーニングは、例えば、抗原（例えば、C L D N 1 8 . 2 又は C D 3 ）結合活性及び／又は細胞傷害活性のアッセイを用いて行われる。

【 0 1 4 0 】

概して、重鎖及び／又は軽鎖の C D R の 1 つ以上又は全てにおいてアミノ酸が置換される場合、そうして得られた「置換後の」配列は、「元の」又は「親」C D R 配列と少なくとも 6 0 % 又は 6 5 %、より好ましくは 7 0 % 又は 7 5 %、更により好ましくは 8 0 % 又は 8 5 % 及び特に好ましくは 9 0 % 又は 9 5 % 同一／相同であることが想定される。これは、元の配列と置換後の配列との間の同一性／相同性の程度が C D R の長さに依存することを意味する。例えば、合計 5 アミノ酸を有し、且つ 1 つのアミノ酸置換を含む C D R は、「元の」又は「親」C D R 配列と 8 0 % 同一である一方、合計 1 0 アミノ酸を有し、且つ 1 つのアミノ酸置換を含む C D R は、「元の」又は「親」C D R 配列と 9 0 % 同一である。従って、本発明の抗体コンストラクトの置換後の C D R は、その元の配列と種々の程度の同一性を有し得、例えば、C D R L 1 は、8 0 % の相同性を有し得る一方、C D R L 3 は、9 0 % を有し得る。同じ考察がフレームワーク領域並びに V H 及び V L 領域全体にも当てはまる。

【 0 1 4 1 】

「変異 C D R」は、本発明の親 C D R と特定の配列相同性、類似性又は同一性を有する C D R であり、限定されないが、親 C D R の特異性及び／又は活性の少なくとも 6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 1 %、8 2 %、8 3 %、8 4 %、8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % を含め、親 C D R と生物学的機能を共有する。概して、個々の変異 C D R 間のアミノ酸相同性、類似性又は同一性は、本明細書に示される親配列に対して少なくとも 6 0 % であり、より典型的には、少なくとも 6 5 % 又は 7 0 %、好ましくは少なくとも 7 5 % 又は 8 0 %、より好ましくは少なくとも 8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 % 及び最も好ましくは 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 及びほぼ 1 0 0 % の増加する相同性、類似性又は同一性を伴う。同じことが「変異 V H」及び「

変異 V L」にも当てはまる。一実施形態によれば、「変異 V H」及び／又は「変異 V L」の範囲内における配列変異は、C D R に及ばない。従って、本発明は、本明細書に定義するとおりの特定の配列（「親」V H 及び V L）と特定の配列相同性（上記を参照されたい）を有する V H 及び V L 配列を含む本明細書に定義するとおりの抗体コンストラクトに関し、ここで、C D R 配列は、本明細書に定義するとおりの特定の C D R 配列（「親」C D R）と 100 % 同一である。

【0142】

好ましい置換（又は置き換え）は、保存的置換である。しかしながら、抗体コンストラクトが第 1 のドメインによって C L D N 18 . 2 に結合し、第 2 のドメインによって C D 3 又は C D 3 ε に結合するその能力を保持している限り、且つ／又はその C D R、F R、V H 及び／又は V L 配列が元の配列又は親配列と少なくとも 60 % 又は 65 %、より好ましくは少なくとも 70 % 又は 75 %、更により好ましくは少なくとも 80 % 又は 85 % 及び特に好ましくは少なくとも 90 % 又は 95 % の程度の同一性を有しているならば、任意の置換（非保存的置換又は以下の表 1 に挙げられる「例示的置換」からの 1 つ以上を含む）が想定される。

【0143】

保存的置き換え（保存的突然変異又は保存的置換とも称される）は、所与のアミノ酸を同様の生化学的特性（例えば、電荷、疎水性、サイズ）の別のアミノ酸に変えるアミノ酸置換である。タンパク質における保存的置き換えは、多くの場合にタンパク質機能に及ぼす効果が非保存的置き換えよりも小さい。保存的置換を表 1 に示す。例示的な保存的置換は、「例示的置換」として示される。かかる置換が生物学的活性の変化をもたらす場合、アミノ酸クラスに関して本明細書に更に記載するとおり、より実質的な変化が導入され、産物が所望の特性に関してスクリーニングされ得る。

【0144】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1: アミノ酸置換 (aa = アミノ酸)

元の aa	保存的置換	例示的置換
Ala (A)	小型 aa	Gly, Ser, Thr
Arg (R)	極性 aa、特に Lys	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	極性 aa、特に Asp	Asp, Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu 又は他の極性 aa、特に Asn	Glu, Asn
Cys (C)	小型 aa	Ser, Ala
Gln (Q)	極性 aa、特に Glu	Glu, Asn
Glu (E)	Asp 又は他の極性 aa、特に Gln	Asp, Gln
Gly (G)	小型 aa、例えば Ala	Ala
His (H)		Asn, Gln, Arg, Lys, Tyr
Ile (I)	疎水性、特に脂肪族 aa	Ala, Val, Met, Leu, Phe
Leu (L)	疎水性、特に脂肪族 aa	ノルロイシン, Ile, Ala, Val, Met
Lys (K)	極性 aa、特に Arg	Arg, Gln, Asn
Met (M)	疎水性、特に脂肪族 aa	Leu, Ala, Ile, Val, Phe
Phe (F)	芳香族又は疎水性 aa、特に Tyr	Tyr, Trp, Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	小型 aa	Ala
Ser (S)	極性又は小型 aa、特に Thr	Thr
Thr (T)	極性 aa、特に Ser	Ser
Trp (W)	芳香族 aa	Tyr, Phe
Tyr (Y)	芳香族 aa、特に Phe	Phe, Trp, Thr, Ser
Val (V)	疎水性、特に脂肪族 aa	Leu, Ile, Ala, Met, Phe

【0145】

本発明の抗体コンストラクトの生物学的特性の実質的な修飾は、(a) 例えばシート又はヘリックスコンホメーションなど、置換範囲におけるポリペプチド骨格の構造、(b) 標的部位における分子の電荷又は疎水性、又は(c) 側鎖のバルク性の維持に対するその効果が有意に異なる置換を選択することにより達成される。非保存的置換は、通常、上記に定義されるアミノ酸クラス(極性、中性、酸性、塩基性、脂肪族、芳香族、小型など)の1つのメンバーから別のクラスへの交換を必然的に伴うことになる。抗体コンストラクトの酸化安定性を向上させるため、抗体コンストラクトの正しいコンホメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基を概してセリンと置換し得る。

【0146】

アミノ酸配列の配列同一性、相同性及び／又は類似性は、限定されないが、Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482の局所配列同一性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (J Mol Biol. 1970 Mar; 48(3): 443-53)の配列同一性アラインメントアル

ゴリズム、Pearson and Lipman (Proc Natl Acad Sci USA. 1988 Apr; 85 (8) : 2444-8) の類似性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. におけるGAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)、Devereux et al. (Nucleic Acids Res. 1984 Jan 11; 12 (1 Pt 1) : 387-95) によって記載されるBest Fit 配列プログラムであって、好ましくはデフォルト設定を用いるもの、又は目視によることを含め、当該技術分野において公知の標準技法を用いることにより決定される。パーセント同一性は、FastDBにより、以下のパラメータ： mismatches penalty 1; gaps penalty 1; gap size penalty 0.33; 及びジョイニングペナルティ30に基づいて計算されることが想定される。“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis”, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc. も参照されたい。

【0147】

有用なアルゴリズムの例は、PILEUPである。PILEUPは、関連配列の群から累進的ペアワイズアラインメントを用いて多重配列アラインメントを生成する。これは、アラインメントの生成に用いられるクラスタリング関係を示すツリーもプロットすることができる。PILEUPは、Feng and Doolittle (J Mol Evol. 1987; 25 (4) : 351-60) の累進的アラインメント方法の単純化を用いる。この方法は、Higgins and Sharp (Comput Appl Biosci. 1989 Apr; 5 (2) : 151-3) によって記載されるものと類似している。有用なPILEUPパラメータとしては、デフォルトギャップ加重3.00、デフォルトギャップ長加重0.10及び加重付き末端ギャップが挙げられる。

【0148】

有用なアルゴリズムの別の例は、Altschul et al. (J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215 (3) : 403-10.) ; Altschul et al., (Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25 (17) : 3389-402) ; 及びKarlin and Altschul (Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jun 15; 90 (12) : 5873-7) に記載されるBLASTアルゴリズムである。特に有用なBLASTプログラムは、WU-Blast-2プログラムであり、これは、Altschul et al., (Methods Enzymol. 1996; 266 : 460-80) から得られたものである。WU-Blast-2は、幾つかの検索パラメータを使用し、そのほとんどがデフォルト値に設定される。調整可能なパラメータは、以下の値：オーバーラップスパン=1、オーバーラップフラクション=0.125、ワード閾値 (T) = IIで設定される。HSP S及びHSP S2パラメータは、ダイナミック値であり、特定の配列の組成及び目的の配列が検索される特定のデータベースの組成に依存してプログラム自体によって確立される。しかしながら、感度を増加させるために値が調整され得る。

【0149】

更なる有用なアルゴリズムは、Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1; 25 (17) : 3389-402) によって報告されるとおりのギャップ付きBLASTである。ギャップ付きBLASTは、BLOSUM-62置換スコア；9に設定された閾値Tパラメータ；2ヒット法によるギャップなし伸長の開始、kのギャップ長に10+kのコストを課し；16に設定されたXu及びデータベース検索段階について40に設定され、アルゴリズムの出力段階について67に設定されたXgを使用する。ギャップ付きアラインメントは、約22ビットに対応するスコアによって開始される。

【0150】

これと一致して、本明細書に同定される抗体コンストラクトをコードする核酸配列に関する用語「パーセント (%) 核酸配列同一性／相同性／類似性」は、抗体コンストラクトのコード配列中のヌクレオチド残基と同一である候補配列中のヌクレオチド残基のパーセンテージとして定義される。2つの配列をアラインメントし、それによりその相同性を決定する1つの方法は、オーバーラップスパン及びオーバーラップフラクションをそれぞれ1及び0.125に設定したデフォルトパラメータ設定のWU-Blast2のBLASTNモジュールを使用する。概して、個々の変異CDRをコードするヌクレオチド配列と本明細書に示されるヌクレオチド配列と間の核酸配列相同性、類似性又は同一性は、少なくとも60%であり、より典型的には、少なくとも65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%及びほぼ100%の増加する相同性、類似性又は同一性を伴う。この場合も、「変異VH」及び／又は「変異VL」をコードする核酸配列に同じことが当てはまる。

10

【0151】

一実施形態において、本発明に係る抗体コンストラクト又はこれらの抗体コンストラクトの第1及び第2のドメイン（結合ドメイン）のヒト生殖細胞系列との同一性パーセンテージは、 $\geq 70\%$ 又は $\geq 75\%$ 、より好ましくは $\geq 80\%$ 又は $\geq 85\%$ 、更により好ましくは $\geq 90\%$ 及び最も好ましくは $\geq 91\%$ 、 $\geq 92\%$ 、 $\geq 93\%$ 、 $\geq 94\%$ 、 $\geq 95\%$ 又は更に $\geq 96\%$ である。ヒト抗体生殖細胞系列遺伝子産物との同一性は、治療用タンパク質が治療中の患者において薬物に対する免疫応答を引き起こすリスクを低減するのに重要な特徴と考えられる。Hwang W. Y. and Foote J. (Methods. 2005 May; 36 (1) : 3-10) は、薬物抗体コンストラクトの非ヒト部分を減らすと、治療中の患者に抗薬物抗体を生じさせるリスクの低下につながることを実証している。網羅的な数の臨床的に評価された抗体薬物及びそれぞれの免疫原性データの比較により、タンパク質の免疫原性が、改変されていない非ヒト可変領域を有する抗体／抗体コンストラクト（平均23.59%の患者）と比べて、抗体／抗体コンストラクトの可変領域のヒト化によって低くなる傾向が示される（平均5.1%の患者）。従って、可変領域をベースとする抗体コンストラクトの形態のタンパク質療法薬には、ヒト配列との高度な同一性が望ましい。生殖細胞系列同一性を決定することを目的として、VLのV領域をヒト生殖細胞系列Vセグメント及びJセグメント (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>) のアミノ酸配列とVector NTIソフトウェアを用いてアラインメントし、同一のアミノ酸残基をVLのアミノ酸残基の総数で除すことによりアミノ酸配列をパーセントで計算することができる。VHセグメント (<http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/vbase/>) についても同様に行うことができ、但し、VH CDR3は多様性が高く、且つヒト生殖細胞系列VH CDR3アラインメントパートナーが存在しないために除外し得る点異なる。次に、組換え技術を用いてヒト抗体生殖細胞系列遺伝子との配列同一性を高めることができる。

20

30

【0152】

更なる実施形態において、本発明の抗体コンストラクトは、標準的な研究スケール条件下において、例えば標準的な二段階精製プロセスで高い単量体収率を呈する。本発明に係る抗体コンストラクトの単量体収率は、 $\geq 0.25 \text{ mg/L}$ 上清 (SN)、好ましくは $\geq 0.5 \text{ mg/L}$ SN、より好ましくは $\geq 1 \text{ mg/L}$ SN、更により好ましくは $\geq 2 \text{ mg/L}$ SN及び最も好ましくは $\geq 3 \text{ mg/L}$ SNであることが想定される。「CL-1 $\times$ I2C-6His」と称される抗体コンストラクトの収率は、 4.1 mg/L 上清であることが示され、「CL-1 $\times$ I2C-scFc」と称される抗体コンストラクトの収率は、 36.5 mg/L 上清であることが示された。

40

【0153】

同様に、二量体抗体コンストラクトアイソフォームの収率、従って抗体コンストラクトの単量体パーセンテージ（即ち単量体：（単量体＋二量体））を決定することができる。

50

単量体及び二量体抗体コンストラクトの生産性並びに単量体パーセンテージ計算値は、例えば、ローラーボトルにおける標準化された研究スケール生産からの培養上清のSEC精製ステップで求めることができる。一実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトの単量体パーセンテージは、 $\geq 80\%$ 、より好ましくは $\geq 85\%$ 、更により好ましくは $\geq 90\%$ 及び最も好ましくは $\geq 95\%$ である。

【0154】

一実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトは、血漿安定性（血漿なしでのEC₅₀に対する血漿ありでのEC₅₀の比）が ≤ 5 又は ≤ 4 、より好ましくは ≤ 3.5 又は ≤ 3 、更により好ましくは ≤ 2.5 又は ≤ 2 及び最も好ましくは ≤ 1.5 又は ≤ 1 である。抗体コンストラクトの血漿安定性は、ヒト血漿中で精製コンストラクトを例えば $2 \sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において 37°C で $24 \sim 96$ 時間インキュベートし、続いて 18 時間 51 クロム遊離又は 48 時間FACS細胞傷害性アッセイ（例えば、実施例7.1及び7.2に記載されるとおりのアッセイ）でEC₅₀を決定することにより試験し得る。細胞傷害性アッセイにおけるエフェクター細胞は、刺激されたエンリッチヒトCD8陽性T細胞（好ましい）又は刺激されていないヒトPBMCであり得る。標的細胞は、例えば、ヒトCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞であり得る。エフェクター対標的細胞（E:T）比は、 $10:1$ であり得る。細胞傷害性アッセイにおける抗体コンストラクトの出発濃度は、 $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり得る。この目的で使用されるヒト血漿プールは、EDTAコートしたシリンジによって採取された健常ドナーの血液に由来する。細胞成分を遠心によって除去し、上部血漿相を収集し、続いてプールする。対照として、インキュベートしていない抗体コンストラクトを希釈した後、直ちにRPMI-1640などの適切な培地で細胞傷害性アッセイを行う。血漿安定性は、EC₅₀（対照/インキュベーションなし）に対するEC₅₀（血漿インキュベーション後）の比として計算する。

【0155】

更に、本発明の抗体コンストラクトの単量体から二量体への変換率は、低いことが想定される。変換は、種々の条件下で測定し、高性能サイズ排除クロマトグラフィーによって分析することができる。実施例8を参照されたい。例えば、抗体コンストラクトの単量体アイソフォームのインキュベーションは、インキュベーターにおいて汎用製剤化緩衝液中、例えば $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 又は $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 37°C で7日間行うことができ、続いて高性能SECにより、当初単量体であったのが二量体抗体コンストラクトに変換された抗体コンストラクトのパーセンテージを決定することができる。これらの条件下において、本発明の抗体コンストラクトは、 $\leq 8\%$ 、好ましくは $\leq 6\%$ 、より好ましくは $\leq 5\%$ 、より好ましくは $\leq 4\%$ 、更により好ましくは $\leq 3\%$ 、更により好ましくは $\leq 2.5\%$ 、更により好ましくは $\leq 2\%$ 、更により好ましくは $\leq 1.5\%$ 及び最も好ましくは $\leq 1\%$ 又は $\leq 0.5\%$ 又は更に 0% の二量体パーセンテージを示すことが想定される。

【0156】

同様に、本発明の抗体コンストラクトは、数回の凍結/融解サイクル後にも極めて低い二量体変換率を呈することが想定される。例えば、抗体コンストラクト単量体を例えば汎用製剤化緩衝液中に $250 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に調整して3回の凍結/融解サイクルに供し（ -80°C で30分間凍結、続いて室温で30分間融解）、続いて高性能SECにより、当初単量体であったのが二量体抗体コンストラクトに変換された抗体コンストラクトのパーセンテージを決定する。抗体コンストラクトの二量体パーセンテージは、例えば、3回の凍結/融解サイクル後に $\leq 8\%$ 、好ましくは $\leq 6\%$ 、より好ましくは $\leq 5\%$ 、より好ましくは $\leq 4\%$ 、更により好ましくは $\leq 3\%$ 、更により好ましくは $\leq 2.5\%$ 、更により好ましくは $\leq 2\%$ 、更により好ましくは $\leq 1.5\%$ 及び最も好ましくは $\leq 1\%$ 又は $\leq 0.5\%$ 又は更に 0% であることが想定される。

【0157】

一実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトは、凝集温度 $\geq 45^\circ\text{C}$ 又は $\geq 46^\circ\text{C}$ 、より好ましくは $\geq 47^\circ\text{C}$ 又は $\geq 48^\circ\text{C}$ 、更により好ましくは $\geq 49^\circ\text{C}$ 又は $\geq 50^\circ\text{C}$ 及び

最も好ましくは $\geq 51^{\circ}\text{C}$ の好ましい熱安定性を示す。熱安定性パラメータは、以下のとおり抗体凝集温度に関して決定することができる：濃度 $250\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体溶液を使い捨てキュベットに移し、動的光散乱（DLS）装置に置く。定期的に半径測定値を取得しながら試料を $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の加熱速度で 40°C から 70°C に加熱する。タンパク質の融解及び凝集の指標である半径の増加を用いて抗体の凝集温度を計算する。実施例9を参照されたい。

【0158】

或いは、示差走査熱量測定（DSC）により温度融解曲線を決定して、抗体コンストラクトの固有の生物物理学的タンパク質安定性を決定することができる。このような実験は、MicroCal LLC VP-DSC装置を使用して行うことができる。製剤化緩衝液のみを含有する試料と比較した抗体コンストラクト含有試料の 20°C から 90°C へのエネルギー吸収を記録する。抗体コンストラクトは、例えば、SECランニング緩衝液中 $250\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度に調整する。それぞれの融解曲線を記録するため、全体の試料温度を段階的に上昇させる。各温度における試料及び製剤化緩衝液参照のエネルギー吸収を記録する。試料から参照を差し引いたエネルギー吸収の差 C_p （ $\text{kcal}/\text{mol}/^{\circ}\text{C}$ ）をそれぞれの温度に対してプロットする。融解温度は、最初のエネルギー吸収最大値における温度として定義される。

【0159】

本発明の抗体コンストラクトは、濁度が ≤ 0.2 又は ≤ 0.15 、好ましくは ≤ 0.1 又は ≤ 0.08 、より好ましくは ≤ 0.06 又は ≤ 0.05 及び最も好ましくは ≤ 0.04 又は ≤ 0.03 であることも想定される。濁度は、 $2.5\text{mg}/\text{mL}$ の抗体コンストラクト濃度及び 5°C で16時間のインキュベーションにおけるOD340によって測定することができる。実施例10を参照されたい。

【0160】

T細胞の非存在下における標的細胞上のコンストラクトのプレインキュベーションに応じた標的×CD3抗体コンストラクトの効力の変化を測定することができる。抗体コンストラクトがインターナライズされた場合、それは、リソソーム分解を受けるものと予想される。従って、有効濃度は、時間と共に低下するものと予想され、従って見かけの効力も同様に低下するはずである。一部の標的でこの効果が観察されており、そのため、これは、公知の現象である。本発明の抗体コンストラクトは、標的細胞によってインターナライズされないか、又はそれによる有意なインターナリゼーションを受けないことが想定される。インターナリゼーション率は、例えば、以下に記載されるとおりアッセイすることができる：T細胞をカウントし、アッセイ培地中に $1 \times 10^5/\text{mL}$ の濃度に希釈する。標的陽性標的細胞をカウントし、例えば2500細胞/ウェル（cpw）でプレーティングする。抗体コンストラクトを例えば100nMの出発濃度で1：2段階希釈する。抗体コンストラクトを培養アッセイプレートに加えて0時間、1時間又は2時間インキュベートさせた後、T細胞を加える。次に、T細胞を25000cpwでプレーティングし（E：T=10：1）、アッセイを 37°C で48時間インキュベートする。標的細胞生存を例えばSteady-Glo（登録商標）システム（ $25\mu\text{L}/\text{ウェル}$ ）で分析する。好ましくは、抗体コンストラクトを標的細胞と2時間（プレ）インキュベートした後のインターナリゼーション率（例えば、細胞傷害性の低下として測定される）は、 $\leq 20\%$ 、より好ましくは $\leq 15\%$ 、更により好ましくは $\leq 10\%$ 及び最も好ましくは $\leq 5\%$ である。

【0161】

更に、本発明の抗体コンストラクトについて、シェディングされた又は可溶性の標的は、その有効性又は生物活性を著しく損なうことがないと想定される。これは、例えば、可溶性標的をアッセイに漸増濃度、例えば $0\text{nM}-0.3\text{nM}-0.7\text{nM}-1\text{nM}-3\text{nM}-7\text{nM}-12\text{nM}$ で加える細胞傷害性アッセイにおいて測定することができる。例示的E：T値は、10：1である。試験した抗体コンストラクトのEC50値は、可溶性標的の存在下で有意に増加しないはずである。

【0162】

更なる実施形態において、本発明に係る抗体コンストラクトは、酸性 pH で安定している。pH 5.5 などの非生理的 pH（例えば、陽イオン交換クロマトグラフィーの実行に必要な pH）で挙動する抗体コンストラクトの耐性が高いほど、ロードしたタンパク質の総量に対するイオン交換カラムから溶出した抗体コンストラクトの回収率が高くなる。pH 5.5 でのイオン（例えば、陽イオン）交換カラムからの抗体コンストラクトの回収率は、好ましくは、 $\geq 30\%$ 、より好ましくは $\geq 40\%$ 、より好ましくは $\geq 50\%$ 、更により好ましくは $\geq 60\%$ 、更により好ましくは $\geq 70\%$ 、更により好ましくは $\geq 80\%$ 及び最も好ましくは $\geq 95\%$ である。パーセンテージは、主ピークの曲線下面積（= AUC）に相当する。実施例 11 を参照されたい。

【0163】

更に、本発明の抗体コンストラクトは、治療有効性を呈し、それが抗腫瘍活性又は腫瘍成長阻害として現れることが想定される。これは、例えば、実施例 13 又は 14 に開示されるとおりの試験で評価することができる。一実施形態において、本発明の抗体コンストラクトの腫瘍成長阻害 T/C [%] は、 ≤ 70 、 ≤ 60 、 ≤ 50 、 ≤ 40 、 ≤ 30 、 ≤ 20 、 ≤ 10 、 ≤ 5 、 ≤ 4 、 ≤ 3 又は ≤ 2 である。こうした試験の特定のパラメータ（注入する腫瘍細胞の数、注入部位、移植するヒト T 細胞の数、抗体コンストラクトの投与量及びタイムラインなど）の修正又は調整も想定されるが、それでもなお有意義且つ再現可能な結果に至る。

【0164】

本発明は、本発明の抗体コンストラクトをコードするポリヌクレオチド／核酸分子を更に提供する。核酸分子は、ヌクレオチドで構成されるバイオポリマーである。ポリヌクレオチドは、鎖状に共有結合的に結合した 13 個以上のヌクレオチド単量体で構成されるバイオポリマーである。DNA（cDNA など）及び RNA（mRNA など）は、個別的な生物学的機能を備えたポリヌクレオチド／核酸分子の例である。ヌクレオチドは、DNA 又は RNA などの核酸分子の単量体又はサブユニットとしての役割を果たす有機分子である。本発明の核酸分子又はポリヌクレオチドは、二本鎖又は一本鎖、線状又は環状であり得る。核酸分子又はポリヌクレオチドは、ベクターに含まれることが想定される。更に、かかるベクターは、宿主細胞に含まれることが想定される。前記宿主細胞は、例えば、本発明のベクター又はポリヌクレオチド／核酸分子による形質転換又はトランスフェクション後、抗体コンストラクトの発現能を有する。この目的で、ポリヌクレオチド又は核酸分子は、制御配列に作動可能に連結される。

【0165】

遺伝子コードは、遺伝物質（核酸）内にコードされる情報がタンパク質に翻訳される際に従う一連の規則である。生細胞における生物学的解釈は、mRNA が指定する順序にアミノ酸を連結するリボソームが、tRNA 分子を用いてアミノ酸を運び、mRNA を一度に 3 ヌクレオチドずつ読み取ることにより達成される。コードは、タンパク質合成中に次にいずれのアミノ酸が付加されるかについて、コドンと呼ばれるこれらのヌクレオチドトリプレットの配列がどのように指定するかを定義する。幾つかの例外があるものの、核酸配列中の 3 ヌクレオチドコドンは、単一のアミノ酸を指定する。大多数の遺伝子は、正確に同じコードでコードされるため、多くの場合、この特定のコードがカノニカル又は標準遺伝子コードと称される。

【0166】

コドンの縮重は、アミノ酸を指定する 3 塩基対コドンの組み合わせの多重性として示される遺伝子コードの重複性である。縮重は、コード可能なアミノ酸よりコドンが多いために生じる。1 つのアミノ酸をコードするコドンは、その 3 つの位置のいずれかにおいて異なり得る。しかしながら、多くの場合、この違いは、2 番目又は 3 番目の位置である。例えば、コドン GAA 及び GAG の両方は、グルタミン酸を指定し、重複性を呈する。しかし、いずれも、いかなる他のアミノ酸も指定せず、従って曖昧さを示さない。異なる生物の遺伝子コードは、同じアミノ酸をコードする幾つかのコドンのうち、他と比べてある 1 つの使用に偏り得る — 即ち、ある 1 つが、偶然に予想されるよりも高頻度に見られ得る

10

20

30

40

50

。例えば、ロイシンは、6つの個別的なコドンによって指定され、そのうちの幾つかは、ほとんど使用されない。多くの生物についてのゲノムコドン使用頻度を詳述するコドン使用表が利用可能である。組換え遺伝子技術では、コドン最適化と称される技法を実施することによりこの効果がよく利用され、ここでは、例えば、タンパク質発現を増加させるため、ポリヌクレオチドの設計にそれぞれの宿主細胞（ヒト、ハムスター由来の細胞、大腸菌（*Escherichia coli*）細胞又はサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）細胞など）が優先するコドンが使用される。従って、本開示のポリヌクレオチド／核酸分子はコドン最適化されることが想定される。それにも関わらず、本発明の抗体コンストラクトをコードするポリヌクレオチド／核酸分子は、所望のアミノ酸をコードする任意のコドンを使用して設計され得る。

10

【0167】

一実施形態によれば、本発明の抗体コンストラクトをコードする本発明のポリヌクレオチド／核酸分子は、1つの単一分子の形態又は2つ以上の別個の分子の形態である。本発明の抗体コンストラクトが単鎖抗体コンストラクトである場合、かかるコンストラクトをコードするポリヌクレオチド／核酸分子も1つの単一分子の形態である可能性が最も高いことになる。しかしながら、また抗体コンストラクトの異なる成分（異なるドメイン、例えばCLDN18.2に結合するドメイン、CD3に結合するドメイン及び／又は抗体定常ドメインなどの更なるドメインなど）が別個のポリペプチド鎖上に位置することも想定され、この場合、ポリヌクレオチド／核酸分子は、2つ以上の別個の分子の形態である可能性が最も高い。

20

【0168】

同じことが本発明のポリヌクレオチド／核酸分子を含むベクターにも当てはまる。本発明の抗体コンストラクトが単鎖抗体コンストラクトである場合、1つのベクターは、1つの単一の位置に（1つの単一のオープンリーディングフレーム、ORFとして）抗体コンストラクトをコードするポリヌクレオチドを含み得る。1つのベクターは、別個の位置に（個別のORFで）2つ以上のポリヌクレオチド／核酸分子も含み、その各々が本発明の抗体コンストラクトの異なる成分をコードし得る。本発明のポリヌクレオチド／核酸分子を含むベクターは、1つの単一のベクター又は2つ以上の別個のベクターの形態であることが想定される。一実施形態において及び宿主細胞において抗体コンストラクトを発現させる目的上、本発明の宿主細胞は、抗体コンストラクトをコードするポリヌクレオチド／核酸分子又はかかるポリヌクレオチド／核酸分子を含むベクターを全体として含まなければならない、これは、即ち抗体コンストラクトの全ての成分が — 1つの単一分子としてコードされるか、又は別個の分子／位置でコードされるかに関わらず — 翻訳後にアセンブルし、一緒になって本発明の生物学的に活性な抗体コンストラクトを形成するであろうことを意味する。

30

【0169】

本発明は、本発明のポリヌクレオチド／核酸分子を含むベクターも提供する。ベクターは、通常、複製及び／又は発現を目的として（外来性）遺伝物質を細胞に移入させるための媒体として使用される核酸分子である。用語「ベクター」は、— 限定されないが — プラスミド、ウイルス、コスミド及び人工染色体を包含する。あるベクターは、特にクローニングのために設計され（クローニングベクター）、他はタンパク質発現のために設計される（発現ベクター）。そのインサートの増幅には、いわゆる転写ベクターが主に使用される。DNAの操作は、通常、大腸菌（*E. coli*）ベクター上に行われ、これは、大腸菌（*E. coli*）におけるDNAの維持に必要なエレメントを含む。しかしながら、ベクターは、酵母、植物又は哺乳類細胞などの別の生物におけるその維持を可能にするエレメントも有することができ、こうしたベクターは、シャトルベクターと呼ばれる。標的又は宿主細胞へのベクターの挿入は、通常、細菌細胞について形質転換、真核細胞についてトランスフェクションと呼ばれる一方、ウイルスベクターの挿入は、形質導入と呼ばれることが多い。

40

【0170】

50

一般に、エンジニアリングされたベクターは、複製起点、多クローニング部位及び選択可能マーカを含む。ベクター自体は、概して、インサート（トランス遺伝子）及びベクターの「骨格」としての役割を果たすより大型の配列を含むヌクレオチド配列、一般にはDNA配列である。遺伝子コードは、所与のコード領域のポリペプチド配列を決定する一方、他のゲノム領域は、そうしたポリペプチドがいずれの時点及びいずれの箇所で産生されるかに影響し得る。従って、現代のベクターは、トランス遺伝子インサート及び骨格以外にも追加的な特徴：プロモーター、遺伝マーカー、抗生物質耐性、レポーター遺伝子、ターゲティング配列、タンパク質精製タグを包含し得る。特に発現ベクター（発現コンストラクト）と呼ばれるベクターは、標的細胞におけるトランス遺伝子の発現のためのものであり、概して制御配列を有する。

10

【0171】

用語「制御配列」は、作動可能に連結されたコード配列が特定の宿主生物において発現するのに必要なDNA配列を指す。例えば、原核生物に好適な制御配列としては、プロモーター、任意選択でオペレーター配列及びリボソーム結合部位が挙げられる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、コザック配列及びエンハンサーを利用することが公知である。

【0172】

核酸は、それが別の核酸配列と機能的関係に置かれるとき、「作動可能に連結されている」。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのDNAは、それがポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、そのポリペプチドのDNAに作動可能に連結されているか、プロモーター又はエンハンサーは、それが配列の転写に影響を及ぼす場合、コード配列に作動可能に連結されているか、又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を促進するような位置に置かれる場合、コード配列に作動可能に連結されている。概して、「作動可能に連結されている」とは、連結されているヌクレオチド配列が連続的であり、分泌リーダーの場合に連続的で且つ読み取りフェーズにあることを意味する。しかしながら、エンハンサーが連続的である必要はない。連結は、好都合な制限部位におけるライゲーションによって達成される。かかる部位が存在しない場合、従来の慣習に従って合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーが使用される。

20

【0173】

「トランスフェクション」は、標的細胞に核酸分子又はポリヌクレオチド（ベクターを含む）を意図的に導入するプロセスである。この用語は、主として真核細胞における非ウイルス方法に用いられる。核酸分子又はポリヌクレオチドのウイルス媒介移入の記載には、形質導入が用いられることが多い。動物細胞のトランスフェクションには、典型的には、細胞膜に一過性の細孔又は「穴」を開けて材料の取り込みを可能にすることが関わる。トランスフェクションは、生物学的粒子（ウイルス形質導入とも称される、ウイルストラランスフェクションなど）、化学ベースの方法（リン酸カルシウム、リポフェクション、Fugene、カチオン性ポリマー、ナノ粒子を用いるなど）又は物理的处理（電気穿孔、マイクロインジェクション、遺伝子銃、細胞スクイーミング、マグネトフェクション、静水圧、インペイルフェクション、音波処理、光学的トランスフェクション、熱ショックなど）を用いて行うことができる。

30

【0174】

用語「形質転換」は、細菌への、また植物細胞を含めた非動物真核細胞への核酸分子又はポリヌクレオチド（ベクターを含む）の非ウイルス移入の記載に用いられる。従って、形質転換は、その周囲からの1つ又は複数の細胞膜を通じた直接的な取り込み及び続く外因性遺伝物質（核酸分子）の組み込みによって生じる細菌又は非動物真核細胞の遺伝子改変である。形質転換は、人為的手段によって達成することができる。形質転換が起こるには、細胞又は細菌が形質転換受容状態でなければならず、これは、飢餓及び細胞密度などの環境条件に対する時間的に限られた反応として起こる可能性があり、また人為的に生じさせることもできる。

40

【0175】

50

更に、本発明は、本発明のポリヌクレオチド／核酸分子又は本発明のベクターで形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞を提供する。

【0176】

本明細書で使用されるとき、用語「宿主細胞」又は「レシピエント細胞」には、本発明の抗体コンストラクトをコードするベクター、外因性核酸分子及び／又はポリヌクレオチドのレシピエント；及び／又は抗体コンストラクト自体のレシピエントであることができるか、又はそれであった任意の個々の細胞又は細胞培養物が含まれることが意図される。細胞へのそれぞれの材料の導入は、形質転換、トランスフェクションなどを用いて行われる（上記を参照されたい）。用語「宿主細胞」には、単細胞の子孫又は潜在的子孫が含まれることも意図される。後続の世代で、天然の、偶然の又は計画的な突然変異のいずれかに起因した又は環境の影響に起因したある種の修飾が起こり得るため、かかる子孫は、実際には親細胞と（形態又はゲノム若しくは全DNA相補体が）完全に同一でないこともあるが、それもなお、本明細書で使用されるとおりのこの用語の範囲内に含まれる。好適な宿主細胞には原核細胞又は真核細胞が含まれ、また、－ 限定されないが － 細菌（大腸菌（*E. coli*）など）、酵母細胞、真菌細胞、植物細胞、並びに昆虫細胞及び哺乳類細胞、例えばハムスター、マウス、ラット、マカク又はヒトなどの動物細胞も含まれる。

【0177】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物が本発明の抗体コンストラクトに好適なクローニング又は発現宿主である。下等真核生物宿主微生物の中でも、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、即ち一般的なパン酵母が最も一般的に用いられる。しかしながら、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、クルイベロミセス属（*Kluyveromyces*）宿主、例えば*K. ラクチス*（*K. lactis*）、*K. フラギリス*（*K. fragilis*）（ATCC 12424）、*K. ブルガリカス*（*K. bulgaricus*）（ATCC 16045）、*K. ウィッカーハミイ*（*K. wickerhamii*）（ATCC 24178）、*K. ワルチイ*（*K. waltii*）（ATCC 56500）、*K. ドロソフィラルム*（*K. drosophilae*）（ATCC 36906）、*K. サーモトレランス*（*K. thermotolerans*）及び*K. マルクシアヌス*（*K. marxianus*）；ヤロウイア属（*Yarrowia*）（欧州特許第402 226号明細書）；ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）（欧州特許第183 070号明細書）；カンジダ属（*Candida*）；トリコデルマ・レエシア（*Trichoderma reesei*）（欧州特許第244 234号明細書）；アカパンカビ（*Neurospora crassa*）；シュワンニオミセス属（*Schwanniomyces*）、例えばシュワンニオミセス・オクシデンタリス（*Schwanniomyces occidentalis*）；及び糸状菌、例えばアカパンカビ属（*Neurospora*）、ペニシリウム属（*Penicillium*）、トリポクラジウム属（*Tolyposcladium*）及びアスペルギルス属（*Aspergillus*）宿主、例えば*A. ニデュランス*（*A. nidulans*）及び*A. ニガー*（*A. niger*）など、幾つもの他の属、種及び株が一般的に利用可能であり、本明細書において有用である。

【0178】

グリコシル化された抗体コンストラクトの発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物に由来する。無脊椎細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。ツマジロクサヨトウ（*Spodoptera frugiperda*）（イモムシ）、ネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）（カ）、ヒトスジシマカ（*Aedes albopictus*）（カ）、キイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）（ショウジョウバエ）及びカイコガ（*Bombyx mori*）などの宿主から、多くのバキュロウイルス株及び変異体並びに対応する許容的昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えばオートグラファ・カリフォルニカ（*Autographa californica*）NPVのL-1変異体及びカイコガ（

10

20

30

40

50

Bombyx mori) NPVのBm-5株が公的に利用可能であり、かかるウイルスは、特にツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞のトランスフェクションのために、本明細書において本発明に係るウイルスとして使用し得る。

【0179】

綿、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、シロイヌナズナ属 (*Arabidopsis*) 及びタバコの植物細胞培養物も宿主として使用することができる。植物細胞培養物におけるタンパク質の産生において有用なクローニング及び発現ベクターは、当業者に公知である。例えば、Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78、Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794、Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750及びFecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986を参照されたい。

【0180】

しかしながら、最も高い関心を持たれてきたのは、脊椎動物細胞であり、培養下（細胞培養下）での脊椎動物細胞の増殖は、日常的手順となっている。有用な哺乳類宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7、ATCC CRL 1651など)；ヒト胎児腎臓株 (293細胞又は浮遊培養で成長させるためサブクローニングされた293細胞など、Graham et al., *J. Gen Virol* 36: 59 (1977))；ベビーハムスター腎細胞 (BHK、ATCC CCL 10など)；チャイニーズハムスター卵巣細胞／-DHFR (CHOなど、Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980))；マウスセルトリ細胞 (TM4など、Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251 (1980))；サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70など)；アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76、ATCC CRL 1587など)；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA、ATCC CCL 2など)；イヌ腎細胞 (MDCK、ATCC CCL 34など)；バッファローラット肝細胞 (BRL 3A、ATCC CRL 1442など)；ヒト肺細胞 (W138、ATCC CCL 75など)；ヒト肝細胞 (Hep G2, 1413 8065など)；マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562、ATCC CCL-51など)；TRI細胞 (Mather et al., *Annals N. Y Acad. Sci.* (1982) 383: 44-68)；MRC 5細胞；FS4細胞；及びヒトヘパトーマ株 (Hep G2など)である。

【0181】

更なる実施形態において、本発明は、本発明の抗体コンストラクトを作製する方法を提供し、前記方法は、本発明の抗体コンストラクトの発現を許容する条件下において、本発明の宿主細胞を培養することと、作製された抗体コンストラクトを培養物から回収することを含む。

【0182】

本明細書で使用されるとき、用語「培養すること」は、培地中における好適な条件下での細胞のインピットでの維持、分化、成長、増殖及び／又は伝播を指す。細胞は、適切な温度及び混合気体で細胞成長培地中において成長及び維持される。培養条件は、細胞型毎に幅広く異なる。典型的な成長条件は、約37℃の温度、約5%のCO₂濃度及び約95%の湿度である。成長培地のレシピは、例えば、pH、炭素源（グルコースなど）の濃度、成長因子の性質及び濃度並びに他の栄養素（アミノ酸又はビタミンなど）の存在が異なり得る。補足培地に使用される成長因子は、胎仔ウシ血清 (FBS)、仔ウシ血清 (FCS)、ウマ血清及びブタ血清など、動物血液の血清に由来することが多い。細胞は、浮遊培養液中でも又は付着培養物としても成長させることができる。また、浮遊培養下で生存可能であるように修飾された、従って付着条件で可能であろうよりも高密度に成長することができる細胞株もある。

【0183】

用語「発現」には、限定されないが、転写、転写後修飾、翻訳、折り畳み、翻訳後修飾

、特定の細胞内又は細胞外位置へのターゲティング及び分泌を含め、本発明の抗体コンストラクトの作製に関わる任意のステップが含まれる。用語「回収」は、細胞培養物から抗体コンストラクトを単離することを意図した一連のプロセスを指す。「回収」又は「精製」プロセスでは、細胞培養物のタンパク質部分と非タンパク質部分とが分離され、最終的に他の全てのポリペプチド及びタンパク質から所望の抗体コンストラクトが分離される。分離ステップは、通常、タンパク質サイズ、物理化学的特性、結合親和性及び生物学的活性の違いを利用する。分取的精製は、後続の使用のため比較的多量の精製タンパク質を生じさせることを目指す一方、分析的精製は、種々の研究又は分析目的で比較的小量のタンパク質を生じさせる。

【0184】

組換え技術を用いるとき、抗体コンストラクトは、細胞内に産生され得るか、細胞膜周辺腔に産生され得るか、又は培地中に直接分泌され得る。抗体コンストラクトが細胞内に産生される場合、最初のステップとして、粒子状デブリ、宿主細胞又は溶解断片のいずれかが例えば遠心又は限外ろ過によって除去される。本発明の抗体コンストラクトは、例えば、大腸菌（*E. coli*）などの細菌で産生され得る。発現後、可溶性画分中の細菌細胞ペーストからコンストラクトが単離され、これは、例えば、アフィニティークロマトグラフィー及び／又はサイズ排除によって精製することができる。最終的な精製は、哺乳類細胞で発現して培地中に分泌した抗体コンストラクトの精製プロセスと同じように行うことができる。Carter et al. (Biotechnology (NY) 1992 Feb; 10 (2) : 163-7) は、大腸菌（*E. coli*）の細胞膜周辺腔に分泌される抗体の単離手順について記載している。

【0185】

抗体が培地中に分泌される場合、概して、かかる発現システムからの上清は、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えば限外ろ過ユニットを使用して初めに濃縮される。

【0186】

宿主細胞から調製された本発明の抗体コンストラクトは、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて回収又は精製することができる。回収しようとする抗体コンストラクトに応じて、イオン交換カラムでの分画、混合モードイオン交換、HIC、エタノール沈殿、サイズ排除クロマトグラフィー、逆相HPLC、シリカクロマトグラフィー、ヘパリンセファロースクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂クロマトグラフィー（ポリアスパラギン酸カラムなど）、イムノアフィニティー（プロテインA／G／Lなど）クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、超遠心法及び硫酸塩析など、他のタンパク質精製技法も利用可能である。

【0187】

前述のステップのいずれにも、タンパク質分解を阻害するためプロテアーゼ阻害薬が含まれ得、汚染物質の成長を防止するため抗生物質が含まれ得る。

【0188】

更に、本発明は、本発明の抗体コンストラクト又は本発明の方法によって作製された抗体コンストラクトを含む医薬組成物又は製剤を提供する。

【0189】

本明細書で使用されるとき、用語「医薬組成物」は、患者、好ましくはヒト患者への投与に好適な組成物に関する。本発明の特に好ましい医薬組成物は、好ましくは、治療有効量である本発明の抗体コンストラクトを1つ又は複数含む。好ましくは、医薬組成物は、1つ以上の（薬学的に有効な）担体、安定剤、賦形剤、希釈剤、可溶化剤、界面活性剤、乳化剤、保存剤及び／又は補助剤の好適な製剤を更に含む。本組成物の許容可能な構成成分は、好ましくは、用いられる投薬量及び濃度で被投与者にとって非毒性である。本発明の医薬組成物としては、限定されないが、液体、凍結及び凍結乾燥組成物が挙げられる。

【0190】

本組成物は、薬学的に許容可能な担体を含み得る。一般に、本明細書で使用されるとき

10

20

30

40

50

、「薬学的に許容可能な担体」は、製剤投与、詳細には非経口投与と適合性のあるあらゆる水性及び非水性溶液、滅菌溶液、溶媒、緩衝液、例えばリン酸緩衝食塩水（PBS）溶液、水、懸濁液、油／水エマルションなどのエマルション、各種湿潤剤、リボソーム、分散媒及びコーティングを意味する。医薬組成物におけるかかる培地及び薬剤の使用は、当該技術分野において周知であり、かかる担体を含む組成物は、周知の従来方法によって製剤化することができる。

【0191】

特定の実施形態は、本発明の抗体コンストラクトと、本節及び本明細書の他の部分で例示的に記載されるものなどの更なる1つ以上の賦形剤とを含む医薬組成物を提供する。賦形剤は、本発明では、本発明の方法及び／又は粘度の調整など、製剤の物理的、化学的又は生物学的特性の調整など、多様な目的で使用して有効性を向上させ、且つ／又は例えば製造、出荷、貯蔵、使用前準備、投与中及びその後に起こるストレスに起因する分解及び変質に対してかかる製剤及びプロセスを安定化させることができる。賦形剤は、一般にその最低有効濃度で使用されるべきである。

【0192】

特定の実施形態において、本医薬組成物は、pH、オスモル濃度、粘度、清澄性、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解又は放出速度、吸着又は透過など、組成物の特定の特徴を修正、維持又は保存する目的で製剤化材料を含有し得る（Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, 1990, Mack Publishing Companyを参照されたい）。かかる実施形態において、好適な製剤化材料としては、限定されないが、以下を挙げることができる。

- ・ アミノ酸
- ・ 抗細菌剤及び抗真菌剤などの抗微生物薬
- ・ 抗酸化剤
- ・ 組成物を生理的 pH 又はそれより僅かに低い pH、典型的には約 5 ～ 約 8 又は 9 の pH 範囲内に維持するために使用される緩衝液、緩衝系及び緩衝剤
- ・ 非水性溶媒、植物油及び注射用有機エステル
- ・ 生理食塩水及び緩衝媒体を含め、水を含めた水性担体、アルコール性／水性溶液、エマルション又は懸濁液
- ・ ポリエステルなどの生分解性ポリマー
- ・ 増量剤
- ・ キレート剤
- ・ 等張剤及び吸収遅延剤
- ・ 錯化剤
- ・ 充填剤
- ・ 糖質
- ・ 好ましくはヒト由来の（低分子量）タンパク質、ポリペプチド又はタンパク質性担体
- ・ 着色剤及び香味剤
- ・ 含硫還元剤
- ・ 希釈剤
- ・ 乳化剤
- ・ 親水性ポリマー
- ・ 塩形成対イオン
- ・ 保存剤
- ・ 金属錯体
- ・ 溶媒及び共溶媒
- ・ 糖類及び糖アルコール類
- ・ 懸濁剤
- ・ 界面活性剤又は湿潤剤
- ・ 安定促進剤

10

20

30

40

50

- ・等張化促進剤
- ・非経口送達媒体
- ・静脈内送達媒体

【0193】

医薬組成物の種々の構成成分が異なる効果を有し得ることは常識であり、例えば、アミノ酸は、緩衝液、安定剤及び／又は抗酸化剤としての役割を果たし得；マンニトールは、増量剤及び／又は等張化促進剤としての役割を果たし得；塩化ナトリウムは、送達媒体及び／又は等張化促進剤としての役割を果たし得る等である。

【0194】

本発明との関連において、医薬組成物は、

- (a) 本明細書に記載されるとおりの抗体コンストラクト、
- (b) 少なくとも1つの緩衝剤、
- (c) 少なくとも1つの糖、及び
- (d) 少なくとも1つの界面活性剤

を含み得、ここで、医薬組成物のpHは、3.5～6の範囲である。

【0195】

上記に記載される組成物において、第1のドメインは、好ましくは、4～9.5の範囲の等電点(pI)を有し；第2のドメインは、8～10、好ましくは8.5～9.0の範囲のpIを有し；及び抗体コンストラクトは、任意選択で、ヒンジと、CH2ドメインと、CH3ドメインとを各々含む2つのポリペプチド単量体を含む第3のドメインを含み、ここで、前記2つのポリペプチド単量体は、ペプチドリンカーによって互いに融合されている。

【0196】

上記に記載される組成物において、更に、少なくとも1つの緩衝剤は、5～200mMの濃度範囲、より好ましくは10～50mMの濃度範囲で存在することが想定される。また、少なくとも1つの糖は、単糖、二糖、環状多糖、糖アルコール、線状分岐デキストラン又は線状非分岐デキストランからなる群から選択されることも想定される。また、二糖は、スクロース、トレハロース及びマンニトール、ソルビトール及びこれらの組み合わせからなる群から選択されることも想定される。更に、糖アルコールは、ソルビトールであることが想定される。また、少なくとも1つの糖は、1～15% (m/V)の範囲の濃度、好ましくは9～12% (m/V)の濃度範囲で存在することも想定される。更に、抗体コンストラクトは、0.1～8mg/ml、好ましくは0.2～2.5mg/ml、より好ましくは0.25～1.0mg/mlの濃度範囲で存在することが想定される。

【0197】

上記に記載される組成物の一実施形態によれば、少なくとも1つの界面活性剤は、ポリソルベート20、ポリソルベート40、ポリソルベート60、ポリソルベート80、ポロキサマー188、プルロニックF68、トリトンX-100、ポリオキシエチレン、PEG 3350、PEG 4000及びこれらの組み合わせからなる群から選択される。更に、少なくとも1つの界面活性剤は、0.004～0.5% (m/V)の範囲、好ましくは0.001～0.01% (m/V)の範囲の濃度で存在することが想定される。組成物のpHは、4.0～5.0の範囲、好ましくは4.2であることが想定される。また、医薬組成物は、150～500mOsmの範囲のオスモル濃度を有することも想定される。更に、医薬組成物は、1つ以上のポリオール及び1つ以上のアミノ酸からなる群から選択される賦形剤を更に含むことが想定される。本発明との関連において、前記1つ以上の賦形剤は、0.1～15% (w/V)の濃度範囲で存在することが想定される。

【0198】

本発明は、

(a) 好ましくは、0.1～8mg/ml、好ましくは0.2～2.5mg/ml、より好ましくは0.25～1.0mg/mlの濃度範囲の、本明細書に記載されるとおりの抗体コンストラクト；

(b) 10 mM グルタミン酸塩又は酢酸塩；

(c) 9% (m/V) スクロース又は6% (m/V) スクロース及び6% (m/V) ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン；

(d) 0.01% (m/V) ポリソルベート80

を含む医薬組成物も提供し、ここで、液体医薬組成物のpHは、4.2である。

【0199】

本発明の組成物は、本明細書に定義される本発明の抗体コンストラクトに加えて、組成物の使用目的に応じて更なる生物学的に活性な薬剤を含む可能性があることが想定される。かかる薬剤は、胃腸系に作用する薬物、細胞増殖抑制剤として作用する薬物、高尿酸血症を予防する薬物、免疫応答を抑制する薬物、炎症反応を調節する薬物、循環系に作用する薬物及び／又は当該技術分野において公知のサイトカインなどの薬剤である可能性がある。また、本発明の抗体コンストラクトは、併用療法で、即ち別の抗がん医薬と組み合わせて適用されることも想定される。

【0200】

これに関連して、本発明の医薬組成物（これは、本明細書において上記に更に詳細に記載したとおり、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合する第1のドメインとT細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインとを含む抗体コンストラクトを含む）は、免疫チェックポイント経路のタンパク質（PD-1又はCTLA-4など）又は共刺激免疫チェックポイント受容体（4-1BBなど）に結合する薬剤、好ましくは抗体又は抗体コンストラクトを更に含むことが想定される。本発明は、本発明に係る抗体コンストラクト（これは、本明細書において上記に更に詳細に記載したとおり、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合する第1のドメインとT細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインとを含む抗体コンストラクトを含む）と、免疫チェックポイント経路のタンパク質（PD-1又はCTLA-4など）又は共刺激免疫チェックポイント受容体（4-1BBなど）に結合する薬剤、好ましくは抗体又は抗体コンストラクトとの併用にも関する。この併用の少なくとも2つの成分の性質、即ちそれらの薬学的活性のため、この併用は、治療的併用と称することもできる。一部の実施形態において、併用は、医薬組成物の形態又はキットの形態であり得る。一実施形態によれば、医薬組成物又は併用は、本発明の抗体コンストラクトと、PD-1に結合する抗体又は抗体コンストラクトとを含む。この目的に有用な抗PD-1結合タンパク質については、例えば、PCT/米国特許出願公開第2019/013205号明細書に詳細に記載されている。

【0201】

従って、更なる態様において、本発明は、

- ・本明細書において上記に更に詳細に記載したとおりの、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合する第1のドメインと、T細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインとを含む抗体コンストラクト、及び

- ・PD-1に結合し、且つ

- a) 配列番号292に示されるとおりのCDR-H1、配列番号293に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号294に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号295に示されるとおりのCDR-L1、配列番号296に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号297に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

- b) 配列番号302に示されるとおりのCDR-H1、配列番号303に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号304に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号305に示されるとおりのCDR-L1、配列番号306に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号307に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

- c) 配列番号312に示されるとおりのCDR-H1、配列番号313に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号314に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号315に示されるとおりのCDR-L1、配列番号316に示され

るとおりのCDR-L2及び配列番号317に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

d) 配列番号322に示されるとおりのCDR-H1、配列番号323に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号324に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号325に示されるとおりのCDR-L1、配列番号326に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号327に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

e) 配列番号332に示されるとおりのCDR-H1、配列番号333に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号334に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号335に示されるとおりのCDR-L1、配列番号336に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号337に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

10

f) 配列番号342に示されるとおりのCDR-H1、配列番号343に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号344に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号345に示されるとおりのCDR-L1、配列番号346に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号347に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

g) 配列番号352に示されるとおりのCDR-H1、配列番号353に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号354に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号355に示されるとおりのCDR-L1、配列番号356に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号357に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；又は

20

h) 配列番号362に示されるとおりのCDR-H1、配列番号363に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号364に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに／又は配列番号365に示されるとおりのCDR-L1、配列番号366に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号367に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域

を含む抗体又は抗体コンストラクト

を含む医薬組成物又は併用に関する。

【0202】

30

一実施形態において、PD-1に結合する上述の抗体又は抗体コンストラクトは、

a) 配列番号298に示されるとおりのVH領域及び配列番号299に示されるとおりのVL領域；

b) 配列番号308に示されるとおりのVH領域及び配列番号309に示されるとおりのVL領域；

c) 配列番号318に示されるとおりのVH領域及び配列番号319に示されるとおりのVL領域；

d) 配列番号328に示されるとおりのVH領域及び配列番号329に示されるとおりのVL領域；

e) 配列番号338に示されるとおりのVH領域及び配列番号339に示されるとおりのVL領域；

40

f) 配列番号348に示されるとおりのVH領域及び配列番号349に示されるとおりのVL領域；

g) 配列番号358に示されるとおりのVH領域及び配列番号359に示されるとおりのVL領域；又は

h) 配列番号368に示されるとおりのVH領域及び配列番号369に示されるとおりのVL領域を含む。

【0203】

一実施形態において、PD-1に結合する上記の抗体又は抗体コンストラクトは、

50

- a) 配列番号 3 0 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 0 1 に示されるとおりの軽鎖；
- b) 配列番号 3 1 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 1 1 に示されるとおりの軽鎖；
- c) 配列番号 3 2 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 2 1 に示されるとおりの軽鎖；
- d) 配列番号 3 3 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 3 1 に示されるとおりの軽鎖；
- e) 配列番号 3 4 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 4 1 に示されるとおりの軽鎖；
- f) 配列番号 3 5 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 5 1 に示されるとおりの軽鎖；
- g) 配列番号 3 6 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 6 1 に示されるとおりの軽鎖；又は
- h) 配列番号 3 7 0 に示されるとおりの重鎖及び配列番号 3 7 1 に示されるとおりの軽鎖を含む。

【0204】

特定の実施形態において、最適な医薬組成物は、例えば、意図される投与経路、送達フォーマット及び所望の投薬量に応じて決まる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, supraを参照されたい。特定の実施形態において、かかる組成物は、本発明の抗体コンストラクトの物理的状态、安定性、インビボ放出速度及びインビボクリアランス速度に影響し得る。特定の実施形態において、医薬組成物中の主要な媒体又は担体は、本質的に水性又は非水性のいずれでもあり得る。例えば、好適な媒体又は担体は、場合により非経口投与用組成物によく見られる他の材料が補足された注射用水又は生理食塩水溶液であり得る。特定の実施形態において、本発明の抗体コンストラクトを含む組成物は、所望の程度の純度を有する選択の組成物を任意選択の製剤化薬剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences, supra) と混合することにより、凍結乾燥ケーキ又は水溶液の形態で貯蔵のために調製され得る。更に、特定の実施形態において、本発明の抗体コンストラクトは、適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として製剤化され得る。

【0205】

非経口投与が企図される場合、本発明に用いられる治療組成物は、薬学的に許容可能な媒体中に本発明の所望の抗体コンストラクトを含むパイロジェンフリーの非経口的に許容可能な水溶液の形態で提供され得る。非経口注射に特に好適な媒体は、滅菌蒸留水であり、その中に本発明の抗体コンストラクトが滅菌等張液として製剤化され、適切に保存される。特定の実施形態において、この調製には、デポー注射によって送達することのできる製剤の制御放出又は持続放出をもたらし得る薬剤又は循環中における有効時間の持続を促進し得る薬剤と共に所望の分子を製剤化することが関わり得る。特定の実施形態では、植込み型薬物送達を用いて所望の抗体コンストラクトを導入し得る。

【0206】

当業者には、持続送達又は制御送達製剤状の本発明の抗体コンストラクトが関わる製剤を含め、更なる医薬組成物が明らかであろう。種々の持続送達又は制御送達手段を製剤化する技法は、当業者に公知である。抗体コンストラクトは、例えば、コアセルベーション技法によるか、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、コロイド薬物送達システム又はマクロエマルションにも取り込まれ得る。かかる技法については、Remington's Pharmaceutical Sciences, supraに開示されている。

【0207】

生体内投与に使用される医薬組成物は、典型的には滅菌製剤として提供される。滅菌は、滅菌ろ過膜でのろ過により達成することができる。組成物が凍結乾燥される場合、この

方法を用いた滅菌は、凍結乾燥及び再構成前又は後のいずれでも行われ得る。非経口投与用組成物は、凍結乾燥形態で又は溶液中に貯蔵することができる。非経口組成物は、概して、滅菌アクセスポートを有する容器、例えば皮下注射針で穿刺可能な栓を有する静脈内注射用溶液バッグ又はバイアルに入れられる。

【0208】

本発明の別の態様は、本発明の抗体コンストラクトを含む自己緩衝製剤を含み、国際公開第2006/138181号パンフレットに記載されるとおり、これは、医薬組成物として使用することができるものである。この関連で有用なタンパク質安定化及び製剤化材料及び方法に関しては、Arawaka T. et al., Pharm Res. 1991 Mar; 8 (3) : 285-91; Kendrick et al., “Physical stabilization of proteins in aqueous solution” in: Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002) 及び Randolph and Jones, Pharm Biotechnol. 2002; 13: 159-75 など、種々の文献が利用可能であり、特に自己緩衝タンパク質製剤のための賦形剤及び方法に関する部分、特に獣医学的及び／又はヒト医学的使用のためのタンパク質医薬製品及び方法に関して参照されたい。

【0209】

本発明の特定の実施形態において、例えば組成物又は製剤のイオン強度及び／又は等張性を調整するため、及び／又は本発明に係る組成物の抗体コンストラクト又は他の成分の溶解度及び／又は物理的安定性を向上させるため、塩が使用され得る。イオンは、タンパク質の表面上の荷電残基に結合することにより、且つタンパク質の荷電基及び極性基を遮蔽して、その静電相互作用、引力及び斥力相互作用の強度を低下させることにより、天然状態のタンパク質を安定化させることができる。イオンは、タンパク質の特に変性ペプチド連結（—CONH）に結合することにより、変性状態のタンパク質を安定化させることもできる。更に、タンパク質の荷電基及び極性基とのイオン相互作用は、分子間静電相互作用を低下させ、それによりタンパク質凝集及び不溶を防止又は低減することもできる。

【0210】

イオン種は、タンパク質に対するその効果が著しく異なる。イオン及びそれがタンパク質に及ぼす効果について幾つものカテゴリー別順位付けが開発されており、本発明に係る医薬組成物の製剤化において用いることができる。一例は、ホフマイスター系列であり、これは、溶液中のタンパク質のコンホメーション安定性に対するその効果によってイオン性及び極性非イオン性溶質を順位付けする。安定化溶質は、「コスモトロピック」と称される。不安定化溶質は、「カオトロピック」と称される。コスモトロップは、一般に、溶液からタンパク質を沈殿させるため高濃度で使用される（「塩析」）。カオトロップは、一般に、タンパク質を変性及び／又は可溶化させるために使用される（「塩溶」）。「塩溶」及び「塩析」に対するイオンの相対的有効性がホフマイスター系列におけるその順位を定義する。

【0211】

本発明の様々な実施形態において本発明の抗体コンストラクトを含む製剤又は組成物には、増量剤、安定剤及び抗酸化剤として並びに他の標準的な用途において遊離アミノ酸を使用することができる。ある種のアミノ酸は、製剤中のタンパク質を安定化させるために使用することができ、他のアミノ酸は、凍結乾燥中に正しいケーキ構造及び活性成分の特性を確保するのに有用である。一部のアミノ酸は、液体製剤及び凍結乾燥製剤の両方でタンパク質凝集の阻害に有用であり得、他のアミノ酸は、抗酸化剤として有用である。

【0212】

ポリオール類は、コスモトロピックであり、液体製剤及び凍結乾燥製剤の両方で安定化剤としてタンパク質を物理的及び化学的分解過程から保護するのに有用である。ポリオー

10

20

30

40

50

ル類は、製剤の張性の調整及び輸送中の凍結融解ストレスからの保護又は製造過程におけるバルク調製にも有用である。ポリオール類は、本発明との関連において凍結保護物質としての役割を果たすこともできる。

【0213】

本発明の抗体コンストラクトを含む製剤又は組成物の特定の実施形態は、界面活性剤を含み得る。タンパク質は、表面上への吸着及び変性並びに結果として生じる気液、固液及び液液界面での凝集を起こし易いものであり得る。これらの有害相互作用は、概してタンパク質濃度と逆比例して規模が増減し、典型的には、製品の配送及び出荷中に生じるものなど、物理的動揺によって悪化する。界面活性剤は、表面吸着を防止するか、最小限に抑えるか、又は低減するために日常的に使用されている。界面活性剤は、タンパク質コンホメーション安定性の制御にもよく使用されている。これに関して、1つの特定の界面活性剤が典型的には一部のタンパク質を安定化させ、他のタンパク質を不安定化させるであろうことから、界面活性剤の使用は、タンパク質特異的である。

10

【0214】

本発明の抗体コンストラクトを含む製剤又は組成物の特定の実施形態は、1つ以上の抗酸化剤を含み得る。医薬製剤においてタンパク質の有害な酸化は、適切な周囲酸素及び温度レベルを維持することにより、及び光への曝露を回避することにより、ある程度防ぐことができる。抗酸化賦形剤は、タンパク質の酸化分解の防止にも使用することができる。本発明に係る治療用タンパク質製剤に用いられる抗酸化剤は、水溶性であり得、製品（抗体コンストラクトを含む組成物）の有効期間全体を通じてその活性を維持し得ることが想定される。抗酸化剤は、タンパク質に損傷を与えることもあり、従って — 数ある中でも特に — 抗酸化剤が抗体コンストラクト又は製剤中の他のタンパク質に損傷を与える可能性がなくなるか又は十分に低くなるように選択されなければならない。

20

【0215】

本発明の抗体コンストラクトを含む製剤又は組成物の特定の実施形態は、1つ以上の保存剤を含み得る。保存剤は、例えば、同じ容器から2回以上取り出すことが関わる複数回用量非経口製剤の開発時に必要である。その主な機能は、微生物増殖を抑制し、薬物製品の有効期間又は使用期間全体を通じて製品の無菌性を確保することである。保存剤には、小分子非経口物質で使用されてきた長い歴史があるが、保存剤を含むタンパク質製剤の開発は難題であり得る。保存剤は、タンパク質に不安定効果（凝集）を及ぼすことが極めて多く、これは、複数回用量タンパク質製剤におけるその使用が制限される主因になっている。これまで、多くのタンパク質薬物は、単回使用向けにのみ製剤化されてきた。しかしながら、複数回用量製剤が可能である場合、そうした製剤には、患者の利便性を実現し、市場性を高めるという追加的な利点がある。好例がヒト成長ホルモン（hGH）のそれであり、この場合、保存剤入り製剤の開発は、より利便性の高い複数回使用のペン型注射体裁の商業化につながっている。保存剤入り投薬形態の製剤化及び開発時、幾つかの側面を考慮する必要がある。薬物製品中における有効保存剤濃度が最適化されなければならない。これには、タンパク質安定性を損なうことなく抗微生物有効性を付与する濃度範囲に関して投薬形態における所与の保存剤を試験する必要がある。

30

【0216】

当然ながら、保存剤を含有する液体製剤の開発は、凍結乾燥製剤と比べて更に難題である。フリーズドライ製品は、保存剤なしに凍結乾燥し、使用時に保存剤を含有する希釈剤で再構成することができる。これにより、保存剤が抗体コンストラクトと接触している時間が短縮され、付随する安定性リスクが大幅に小さく抑えられる。液体製剤では、製品の全有効期間にわたって保存剤の有効性及び安定性が維持されなければならない。留意すべき重要な点は、保存剤の有効性が、活性薬物及び全ての賦形剤成分を含有する最終的な製剤で実証されなければならないことである。医薬組成物が製剤化されると、それは、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、結晶として又は脱水若しくは凍結乾燥粉末として滅菌バイアルに貯蔵され得る。かかる製剤は、即時使用可能な形態又は投与前に再構成される形態（例えば、凍結乾燥）のいずれでも貯蔵され得る。

40

50

【0217】

本明細書に定義される医薬組成物の生物学的活性は、以下の実施例において、国際公開第99/54440号パンフレットにおいて、又はSchlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12) によって記載されるとおり、例えば細胞傷害性アッセイにより決定することができる。「有効性」又は「インビボ有効性」は、本明細書で使用されるとき、例えば標準化されたNCI奏効基準を使用した、本発明の医薬組成物又は製剤による治療の奏効性を指す。本発明の医薬組成物を使用した治療の成功又はインビボ有効性は、その意図した目的に関する組成物の有効性、即ち組成物がその所望の効果を生じさせる能力、即ち病的細胞、例えば腫瘍細胞の枯渇を指す。インビボ有効性は、限定されないが、白血球数、分画、蛍光活性化細胞選別、骨髓穿刺を含め、それぞれの疾患実体についての確立された標準方法によってモニタされ得る。加えて、様々な疾患特異的臨床化学パラメータ及び他の確立された標準方法が用いられ得る。更に、コンピュータ支援断層撮影、X線、核磁気共鳴断層撮影、陽電子放射断層撮影スキャン、リンパ節生検／組織像及び他の確立された標準方法が用いられ得る。

10

【0218】

本発明の医薬組成物などの薬物の開発における別の大きい課題は、薬物動態特性の予測可能な調節である。この目的で、薬物候補の薬物動態プロファイル、即ち特定の薬物が所与の病態を治療する能力に影響を及ぼす薬物動態パラメータのプロファイルを確立し得る。薬物が特定の疾患実体を治療する能力に影響する薬物の薬物動態パラメータとしては、限定されないが、半減期、分布容積、肝臓初回通過代謝及び血清結合度が挙げられる。所与の薬物剤の有効性には、上述のパラメータの各々が影響し得る。

20

【0219】

「半減期」は、ある分量がその初期値の半分に減るまでに要する時間である。医科学では、人体における物質又は薬物の半減期を指す。医学的に関連して、半減期とは、物質／薬物がその活性、例えば薬理学的、生理学的又は放射線学的活性の2分の1を失うまでにかかる時間を指し得る。半減期は、薬物又は物質（例えば、本発明の抗体コンストラクト）の血漿中／血清中濃度がその定常状態値の2分の1に達するまでにかかる時間も表し得る（「血清半減期」）。典型的には、投与された物質／薬物の排出又は除去は、代謝、排泄などの生物学的過程を通じた、また腎臓及び肝臓の機能も関わる体の清浄化作用を指す。「初回通過代謝」は、薬物が循環に達する前にその濃度が低下する薬物代謝現象である。これは、吸収過程で失われた薬物の割合である。従って、「肝臓初回通過代謝」とは、薬物が肝臓との最初の接触で、即ち肝臓を通るその初回通過時に代謝される傾向を意味する。「分布容積」(V_D)は、薬物が血漿でなく、むしろ生体組織に分布する程度を意味し、高い V_D ほど組織分布量が多いことを示す。薬物の滞留は、細胞内及び細胞外間隙、組織及び器官など、体の様々なコンパートメントにわたって起こり得る。「血清結合程度」は、薬物がアルブミンなどの血清タンパク質と相互作用してそれに結合することにより薬物の生物学的活性の低下又は消失につながる傾向を意味する。

30

【0220】

薬物動態パラメータには、投与された所与の量の薬物についてのバイオアベイラビリティ、遅延時間 (T_{lag})、 T_{max} 、吸収速度及び／又は C_{max} も含まれる。「バイオアベイラビリティ」は、薬物／物質の投与用量のうち、体循環（血液コンパートメント）に達する割合を指す。薬物治療が静脈内投与される場合、そのバイオアベイラビリティは、100%と見なされる。しかしながら、薬物治療が他の経路（経口など）で投与される場合、そのバイオアベイラビリティは、概して低下する。「遅延時間」は、薬物の投与から血中又は血漿中でそれが検出される及び測定可能となるまでの時間遅延を意味する。 C_{max} は、薬物がその投与後（及び2回目の用量の投与前）に実現する最高血漿濃度である。 T_{max} は、 C_{max} に達したときの時間である。その生物学的効果に必要な薬物の血中又は組織内濃度に達するまでの時間は、あらゆるパラメータの影響を受ける。異種間特異性を呈する抗体コンストラクトの薬物動態パラメータは、上記に概説したとおり

40

50

及び例えば Schlereth et al. (supra) に示されるとおり、前臨床動物試験において非チンパンジー霊長類で決定し得る。

【0221】

一実施形態は、疾患、好ましくは新生物の予防、治療又は改善における使用のための本発明の抗体コンストラクト（又は本発明の方法によって作製される抗体コンストラクト）を提供する。別の実施形態は、疾患、好ましくは新生物の予防、治療又は改善のための医薬の製造における本発明の抗体コンストラクトの（又は本発明の方法によって作製される抗体コンストラクトの）使用を提供する。また、本発明の抗体コンストラクト（又は本発明の方法によって作製される抗体コンストラクト）を、それを必要としている対象に投与するステップを含む、疾患、好ましくは新生物の予防、治療又は改善方法を提供することも想定される。用語「必要としている対象」、「患者」又は「治療を必要としている」それらの者には、既に疾患を有するそれらの者、並びに疾患を予防すべきそれらの者が含まれる。これらの用語には、予防的治療又は療法的治療のいずれを受けるヒト及び他の哺乳類対象も含まれる。

10

【0222】

本発明の抗体コンストラクト及び本明細書に記載される製剤／医薬組成物は、それを必要としている患者における本明細書に記載されるとおりの医学的状態の治療、改善及び／又は予防において有用である。用語「治療」は、療法的治療及び予防的又は防御的手段の両方を指す。治療には、疾患、疾患の症状又は疾患に罹り易い素因を根治し、治癒し、軽減し、緩和し、改変し、修復し、改善し、向上させるか、又はそれに作用することを目的とした、本明細書に記載されるとおりの疾患／障害、かかる疾患／障害の症状又はかかる疾患／障害に罹り易い素因を有する必要としている患者又は対象の体、又は摘出組織、又は細胞への抗体コンストラクト／医薬組成物の適用又は投与が含まれる。用語「改善」は、本明細書で使用されるとき、患者の疾患状態が、それを必要としているかかる患者又は対象への本発明に係る抗体コンストラクトの投与によって何らかの向上することを指す。かかる向上は、患者の疾患の進行の減速若しくは停止として、及び／又は疾患症状の重症度の低下、無疾患症状期間の頻度若しくは持続時間の増加又は疾患に起因する機能障害若しくは能力障害の予防として見られ得る。用語「予防」は、本明細書で使用されるとき、それを必要としている対象への本発明に係る抗体コンストラクトの投与によって本明細書に指定されるとおりの疾患の発生又は再発が回避されることを意味する。

20

30

【0223】

用語「疾患」は、本明細書に記載される抗体コンストラクト又は医薬組成物による治療から利益を受け得る任意の病態を指す。これには、哺乳類において問題の疾患の素因になる病理学的状態を含めた慢性及び急性障害又は疾患が含まれる。疾患は、好ましくは、新生物、がん又は腫瘍である。疾患、新生物、がん又は腫瘍は、好ましくは、CLDN18.2陽性であり、即ち、それは、CLDN18.2の発現又は過剰発現によって特徴付けられる。

【0224】

「新生物」は、必ずというわけではないが、通常、腫瘍を形成する組織の異常な成長である。腫瘍も形成する場合、それは、一般に「腫瘍」と称される。脳腫瘍では、細胞の無制御な分裂とは、新生物の腫瘍のサイズが増加することを意味し、頭蓋内腔などの閉鎖空間では、腫瘍が脳の空間に浸潤してそれを押しのけ、脳組織の圧迫及び頭蓋内圧の上昇及び脳実質の破壊につながるため、これは、急速に問題化する。新生物又は腫瘍は、良性、潜在的に悪性（前がん性）又は悪性（がん性）であり得る。悪性新生物／腫瘍は、一般にがんと呼ばれる。これは、通常、周囲組織に浸潤してそれを破壊し、且つ転移を形成することもあり、即ち体の他の部分、組織又は器官に広がり得る。「原発腫瘍」は、腫瘍進行が始まり、進行してがん性腫瘍をもたらした解剖学的部位で成長する腫瘍である。例えば、脳腫瘍は、脳内で異常細胞が形成されると起こる。多くのがんは、その原発部位で発達するが、次に体の他の部分（例えば、組織及び器官）に転移するか又は広がる。こうした更なる腫瘍は、「二次性腫瘍」である。多くのがんは、体の他の部分に広がった後でもそ

40

50

の原発部位にちなんで呼ばれ続ける。

【0225】

リンパ腫及び白血病は、リンパ系新生物である。本発明の目的上、これらも用語「腫瘍」又は「がん」に包含される。本発明の目的上、用語「新生物」、「腫瘍」及び「がん」は、同義的に使用され得、これらは、原発腫瘍／がん及び二次性腫瘍／がん（又は「転移」）の両方並びに腫瘤形成新生物（腫瘍）及びリンパ系新生物（リンパ腫及び白血病など）及びまたMRDも含む。

【0226】

用語「微小残存病変」（MRD）は、がん治療後、例えば患者が寛解状態（疾患の症状又は徴候なし）にあるときの患者に残る少数の残存がん細胞の存在のエビデンスを指す。残っているがん細胞が極めて少数であれば、がんの評価又は検出に用いられる標準検査は、MRDを検出するのに感度が不十分であるため、通常、常法手段によって検出できない。最近では、フローサイトメトリー、PCR及び次世代シーケンシングなど、極めて高感度の分子生物学的MRD検査が利用可能である。これらの検査では、時に百万個の正常細胞中僅か1個のがん細胞ほどの組織試料中の最小限レベルのがん細胞を測定することができる。本発明との関連において、がんの「予防」、「治療」又は「改善」という用語は、MRDが検出されたか否かに関わらず、「MRDの予防、治療又は改善」も包含することが想定される。

【0227】

本発明の一実施形態において、新生物、がん又は腫瘍は、限定されないが、消化管がん、卵巣がん及び肺がんを含む（又はそれからなる）群から選択される。本発明の一実施形態によれば、消化管がんは、胃がん又は胃のがん、食道がん、胃食道がん、膵がん及び結腸直腸がんからなる群から選択される。本発明の別の実施形態によれば、卵巣がんは、ムチン性卵巣がんである。本発明の更なる実施形態によれば、肺がんは、非小細胞肺がんである。

【0228】

本発明の抗体コンストラクトは、概して、数ある中でも特に、特定の投与経路及び投与方法のために、特定の投薬量及び投与頻度のために、特定の疾患の特定の治療のために、バイオアベイラビリティ及び持続性の範囲と共に設計されることになる。組成物の材料は、好ましくは、投与部位に許容可能な濃度で製剤化される。従って、製剤及び組成物は、本発明に従って任意の好適な投与経路による送達のために設計され得る。本発明との関連において、投与経路としては、限定されないが、局所経路、経腸経路及び非経口経路が挙げられる。

【0229】

医薬組成物が凍結乾燥されている場合、凍結乾燥された材料は、投与前に初めに適切な液体で再構成される。凍結乾燥された材料は、例えば、注射用静菌水（BWF I）、生理食塩水、リン酸緩衝食塩水（PBS）又はタンパク質が凍結乾燥前にあったのと同じ製剤で再構成され得る。本発明の医薬組成物及び抗体コンストラクトは、非経口投与、例えば静脈内送達（例えば、注射又は注入による）に特に有用である。医薬組成物は、医療装置を使用して投与され得る。医薬組成物の投与用医療装置の例については、米国特許第4, 475, 196号明細書；同第4, 439, 196号明細書；同第4, 447, 224号明細書；同第4, 447, 233号明細書；同第4, 486, 194号明細書；同第4, 487, 603号明細書；同第4, 596, 556号明細書；同第4, 790, 824号明細書；同第4, 941, 880号明細書；同第5, 064, 413号明細書；同第5, 312, 335号明細書；同第5, 312, 335号明細書；同第5, 383, 851号明細書；及び同第5, 399, 163号明細書に記載されている。

【0230】

本発明の組成物は、例えば、用量漸増試験で決定することのできる好適な用量で対象に投与し得る。上記に示されるとおり、本明細書に記載されるとおりの異種間特異性を呈する本発明の抗体コンストラクトも、有利には、非チンパンジー霊長類での前臨床試験にお

10

20

30

40

50

いて使用することができる。投薬量レジメンは主治医及び臨床学的因子によって決定されることになる。医学分野で周知のとおり、任意の1人の患者に対する投薬量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与する詳細な化合物、性別、投与時間及び経路、全般的な健康及び同時に投与される他の薬物を含め、多くの要因に依存する。

【0231】

「有効用量」は、所望の効果を実現するか又は少なくとも部分的に実現するのに十分な治療剤の量である。「治療有効用量」は、疾患に罹患している患者の疾患及びその合併症、徴候及び症状を根治するか又は少なくとも部分的に止めるのに十分な量である。この使用に有効な量又は用量は、治療しようとする疾患（対象疾患）、送達される抗体コンストラクト、治療の状況及び目的、疾患の重症度、前回の療法、患者の病歴及び治療剤に対する奏効、投与経路、患者のサイズ（体重、体表）及び／又は状態（年齢及び全般的な健康）及び患者自身の免疫系の全体的状態に依存することになる。最適な治療効果を得るため、適切な用量が主治医の判断に基づいて調整され得る。

【0232】

本発明の抗体コンストラクトの治療有効量は、好ましくは、疾患症状の重症度の低下、無疾患症状期間の頻度若しくは持続時間の増加又は疾患に起因する機能障害若しくは能力障害の予防をもたらす。CLDN18.2発現腫瘍の治療では、本発明の抗体コンストラクトの治療有効量は、好ましくは、未治療の患者と比べて腫瘍細胞成長を少なくとも約20%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%又は少なくとも約90%阻害する。化合物が腫瘍成長を阻害する能力は、ヒト腫瘍における有効性の予測指標となる動物モデルでも評価され得る。

【0233】

更なる実施形態において、本発明は、本発明の抗体コンストラクト、本発明の方法によって作製される抗体コンストラクト、本発明のポリヌクレオチド、本発明のベクター及び／又は本発明の宿主細胞を含むキットを提供する。本発明との関連において、用語「キット」は、収容箱、容器又は他のものに一緒に包装された2つ以上の構成要素 — その1つは、本発明の抗体コンストラクト、医薬組成物、ポリヌクレオチド、ベクター又は宿主細胞に対応する — を意味する。従って、キットは、単一ユニットとして販売することのできる、ある種の目的を達成するのに十分な製品及び／又は用具の組として記載され得る。

【0234】

本発明のキットの更なる構成要素は、免疫チェックポイント経路のタンパク質（PD-1又はCTLA-4など）又は共刺激免疫チェックポイント受容体（4-1BBなど）に結合する薬剤、好ましくは抗体又は抗体コンストラクトであることが想定される。こうした薬剤は、本明細書において上記に更に詳細に記載される。一実施形態によれば、キットは、本発明の抗体コンストラクトと、PD-1に結合する抗体又は抗体コンストラクトとを含む。本目的上有用な抗PD-1結合タンパク質は、例えば、PCT/米国特許出願公開第2019/013205号明細書に詳細に記載される。特定の実施形態において、キットは、構成要素の同時及び／又は逐次投与を可能にする。

【0235】

キットは、投与に適切な投薬量の本発明の抗体コンストラクト又は医薬組成物（上記を参照されたい）を入れる任意の適切な形状、サイズ及び材料（好ましくは防水性、例えばプラスチック又はガラス）の1つ以上の容器（バイアル、アンプル、コンテナ、シリンジ、ボトル、バッグなど）を含み得る。キットには、更に、使用指図（例えば、小冊子又は取扱説明書の形式）、シリンジ、ポンプ、注入器など、本発明の抗体コンストラクト又は医薬組成物の投与手段、本発明の抗体コンストラクトの再構成手段及び／又は本発明の抗体コンストラクトの希釈手段が入っていてもよい。

【0236】

本発明は、単回用量投与単位のためのキットも提供する。本発明のキットには、乾燥／凍結乾燥した抗体コンストラクト又は医薬組成物を含む第1の容器及び水性製剤を含む第2の容器が入っていてもよい。本発明の特定の実施形態では、単一チャンバ及び複数チャ

ンバを備えたプレフィルドシリンジが入ったキットが提供される。

【0237】

本発明は、以下の項目に関する。

【0238】

項目1．標的細胞の表面上のCLDN18.2（好ましくは配列番号1を有する）に結合する第1のドメインと、T細胞の表面上のCD3に結合する第2のドメインを含む抗体コンストラクト。

【0239】

項目2．第1のドメインは、CLDN18.2の第1の細胞外ループ（ループ1）に結合し、ループは、好ましくは、配列番号2を有する、項目1に係る抗体コンストラクト。

【0240】

項目3．項目1又は2に係る抗体コンストラクトであって、

- ・標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合する第1のドメインと、
- ・T細胞の表面上のヒトCD3に結合する第2のドメインと

を含み、

第1のドメインは、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合するドメインであって、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

c) 配列番号127に示されるとおりのVH領域及び配列番号128に示されるとおりのVL領域；又は

d) 配列番号139に示されるとおりのVH領域及び配列番号140に示されるとおりのVL領域

を含むドメインを含む抗体又は抗体コンストラクトと同じCLDN18.2のエピトープに結合する、抗体コンストラクト。

【0241】

項目4．抗体コンストラクトは、標的細胞の表面上のCLDN18.2に結合するドメインであって、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3を含むVH領域、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3を含むVL領域；

c) 配列番号127に示されるとおりのVH領域及び配列番号128に示されるとおりのVL領域；又は

d) 配列番号139に示されるとおりのVH領域及び配列番号140に示されるとおりのVL領域

を含むドメインを含む抗体又は抗体コンストラクトと結合に関して競合する、項目1～3のいずれか1つに係る抗体コンストラクト。

【0242】

項目5．抗体コンストラクトの第1のドメインは、配列番号22に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上のCLDN18.2突然変異体に結合し、任意選択

10

20

30

40

50

で、配列番号 24 に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上の CLDN 18.2 突然変異体にも結合するが、配列番号 23 に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上の CLDN 18.2 突然変異体に結合しない、項目 1～4 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクト。

【0243】

項目 6. 抗体コンストラクトの第 1 のドメインは、配列番号 14 に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上の CLDN 18.2 突然変異体及び／又はアミノ酸配列、配列番号 15 を有する標的細胞の表面上の CLDN 18.2 突然変異体に結合し、任意選択で、配列番号 11、12、13、16、17、19、20 及び 21 に示されるものからなる群から選択されるアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上の 1 つ以上の CLDN 18.2 突然変異体にも結合するが、配列番号 18 に示されるとおりのアミノ酸配列を有する標的細胞の表面上の CLDN 18.2 突然変異体に結合しない、項目 1～5 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクト。

【0244】

項目 7. 抗体コンストラクトの第 1 のドメインは、標的細胞の表面上の ヒト CLDN 18.2 に結合し、ここで、ヒト CLDN 18.2 の 56 位の Glu (E) は、第 1 のドメインの結合に必須であり、ヒト CLDN 18.2 の 42 位の Ala (A) 及び／又は 45 位の Asn (N) は、第 1 のドメインの結合に必須でない、項目 1～6 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクト；及び／又は

【0245】

項目 8. 抗体コンストラクトの第 1 のドメインは、配列番号 266 に示されるとおりのアミノ酸配列を含むが、配列番号 265 に示されるとおりのアミノ酸配列を含まず、任意選択で配列番号 267 に示されるとおりのアミノ酸配列も含まない CLDN 18.2 のエピトープに結合する、項目 1～7 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクト。

【0246】

項目 9. 第 2 のドメインは、ヒト CD3ε 及びコモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) 又はリスザル (*Saimiri sciureus*) CD3ε に結合する、項目 1～8 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクト。

【0247】

項目 10. 項目 1～9 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクトであって、
a) 抗体コンストラクト、第 1 のドメイン及び／又は第 2 のドメインは、ヒト又はヒト化であり、
b) 抗体コンストラクトは、単鎖抗体コンストラクトであり、
c) 第 1 のドメインは、scFv のフォーマットであり、
d) 第 2 のドメインは、scFv のフォーマットであり、
e) 第 1 のドメイン及び第 2 のドメインは、リンカー、好ましくはペプチドリンカー、より好ましくはグリシン／セリンリンカーによって接続されており、及び／又は
f) 抗体コンストラクトは、Fc ベースのドメインなど、延長された血清半減期をもたらすドメインを含む、抗体コンストラクト。

【0248】

項目 11. 第 1 のドメインは、CLDN 18.1、CLDN 1、CLDN 2、CLDN 3、CLDN 4、CLDN 6 及び／又は CLDN 9 に結合しないか又は有意に結合しない、項目 1～10 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクト。

【0249】

項目 12. 項目 1～11 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクトであって、
a) CLDN 18.2 (例えば、hu CLDN 18.2) に対する第 1 のドメインの親和性は、好ましくは、スキッチャードアッセイなどの細胞ベースのアッセイで測定したとき、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 90 \text{ nM}$ 、 $\leq 80 \text{ nM}$ 、 $\leq 70 \text{ nM}$ 、 $\leq 60 \text{ nM}$ 、 $\leq 50 \text{ nM}$ 、 $\leq 40 \text{ nM}$ 、 $\leq 30 \text{ nM}$ 又は $\leq 20 \text{ nM}$ であり；
b) CD3 (例えば、hu CD3、例えば hu CD3ε) に対する第 2 のドメインの

10

20

30

40

50

親和性は、好ましくは、B i a c o r eアッセイなどの表面プラズモン共鳴アッセイで測定したとき、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 90 \text{ nM}$ 、 $\leq 80 \text{ nM}$ 、 $\leq 70 \text{ nM}$ 、 $\leq 60 \text{ nM}$ 、 $\leq 50 \text{ nM}$ 、 $\leq 40 \text{ nM}$ 、 $\leq 30 \text{ nM}$ 、 $\leq 20 \text{ nM}$ 又は $\leq 10 \text{ nM}$ であり；及び／又は

c) 抗体コンストラクトの EC_{50} 値は、好ましくは、CLDN18.2陽性標的細胞(SNU-601、SNU-620又はCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞など)及びエフェクター細胞としての刺激したエンリッチ(ヒト)CD8陽性T細胞又は刺激されていない(ヒト)末梢血単核球による細胞傷害性アッセイで測定したとき、 $\leq 500 \text{ pM}$ 、 $\leq 400 \text{ pM}$ 、 $\leq 300 \text{ pM}$ 、 $\leq 280 \text{ pM}$ 、 $\leq 260 \text{ pM}$ 、 $\leq 250 \text{ pM}$ 、 $\leq 240 \text{ pM}$ 、 $\leq 220 \text{ pM}$ 、 $\leq 200 \text{ pM}$ 、 $\leq 180 \text{ pM}$ 、 $\leq 160 \text{ pM}$ 、 $\leq 150 \text{ pM}$ 、 $\leq 140 \text{ pM}$ 、 $\leq 120 \text{ pM}$ 、 $\leq 100 \text{ pM}$ 、 $\leq 90 \text{ pM}$ 、 $\leq 80 \text{ pM}$ 、 $\leq 70 \text{ pM}$ 、 $\leq 60 \text{ pM}$ 、 $\leq 50 \text{ pM}$ 、 $\leq 40 \text{ pM}$ 、 $\leq 30 \text{ pM}$ 、 $\leq 20 \text{ pM}$ 、 $\leq 15 \text{ pM}$ 、 $\leq 10 \text{ pM}$ 又は $\leq 5 \text{ pM}$ である、抗体コンストラクト。

【0250】

項目13. 第1のドメインは、

a) 配列番号121に示されるとおりのCDR-H1、配列番号122に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号123に示されるとおりのCDR-H3、配列番号124に示されるとおりのCDR-L1、配列番号125に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号126に示されるとおりのCDR-L3；及び

b) 配列番号133に示されるとおりのCDR-H1、配列番号134に示されるとおりのCDR-H2及び配列番号135に示されるとおりのCDR-H3、並びに配列番号136に示されるとおりのCDR-L1、配列番号137に示されるとおりのCDR-L2及び配列番号138に示されるとおりのCDR-L3

からなる群から選択されるCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3を含むVH領域、並びにCDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3を含むVL領域を含む、項目1～12のいずれか1つに係る抗体コンストラクト。

【0251】

項目14. 第1のドメインは、配列番号127又は配列番号139に示されるとおりのアミノ酸配列を有するVH領域を含む、項目1～13のいずれか1つに係る抗体コンストラクト。

【0252】

項目15. 第1のドメインは、配列番号128又は配列番号140に示されるとおりのアミノ酸配列を有するVL領域を含む、項目1～14の1つに係る抗体コンストラクト。

【0253】

項目16. 第1のドメインは、配列番号127+128又は配列番号139+140に示されるとおりのアミノ酸配列を有するVH領域及びVL領域を含む、項目1～15の1つに係る抗体コンストラクト。

【0254】

項目17. 第1のドメインは、配列番号129又は配列番号141に示されるとおりのアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む、項目1～16の1つに係る抗体コンストラクト。

【0255】

項目18. 配列番号131、配列番号132、配列番号143及び配列番号144に示されるものの群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを含むか又はそれからなる、項目1～17の1つに係る抗体コンストラクト。

【0256】

項目19. 項目1～18のいずれか1つに定義されるとおりの抗体コンストラクトをコードするポリヌクレオチド。

【0257】

項目20. 項目19に定義されるとおりのポリヌクレオチドを含むベクター。

【0258】

10

20

30

40

50

項目 21. 項目 19 に定義されるとおりのポリヌクレオチド又は項目 20 に定義されるとおりのベクターで形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞。

【0259】

項目 22. 項目 1～18 のいずれか 1 つに定義されるとおりの抗体コンストラクトを作製する方法であって、前記抗体コンストラクトの発現を許容する条件下において、項目 21 に定義されるとおりの宿主細胞を培養することと、作製された抗体コンストラクトを培養物から回収することを含む方法。

【0260】

項目 23. 項目 1～18 のいずれか 1 つに定義されるとおりの抗体コンストラクト又は項目 22 の方法によって作製されるとおりの抗体コンストラクトを含む医薬組成物。

【0261】

項目 24. 疾患、好ましくは新生物、より好ましくは CLDN18.2 陽性新生物の予防、治療又は改善における使用のための、項目 1～18 のいずれか 1 つに係る抗体コンストラクト又は項目 22 の方法によって作製される抗体コンストラクト。

【0262】

項目 25. 疾患又は新生物は、消化管がん、卵巣がん及び肺がんからなる群から選択される、項目 24 に係る抗体コンストラクト。

【0263】

項目 26. 消化管がんは、胃がん、食道がん、胃食道がん、膵がん及び結腸直腸がんからなる群から選択される、項目 25 に係る抗体コンストラクト。

【0264】

項目 27. 項目 1～18 のいずれか 1 つに定義されるとおりの抗体コンストラクト、項目 22 の方法によって作製される抗体コンストラクト、項目 19 に定義されるとおりのポリヌクレオチド、項目 20 に定義されるとおりのベクター及び／又は項目 21 に定義されるとおりの宿主細胞を含むキット。

【0265】

項目 28. 免疫チェックポイント経路のタンパク質（PD-1 又は CTLA-4 など）又は共刺激免疫チェックポイント受容体（4-1BB など）に結合する薬剤、好ましくは抗体又は抗体コンストラクトを更に含む、項目 23 の医薬組成物又は項目 27 のキット。

【0266】

項目 29. 治療用途、好ましくは疾患、好ましくは新生物、より好ましくは CLDN18.2 陽性新生物の予防、治療又は改善における使用のための、項目 23 又は 28 の医薬組成物又は項目 27 又は 28 のキット。

【図面の簡単な説明】

【0267】

【図 1】ヒト CLDN18.1 及び CLDN18.2 アミノ酸配列のアラインメントである。第 1 及び第 2 の細胞外ドメイン（＝細胞外ループ）並びに CLDN18.1 と CLDN18.2 との間で異なるアミノ酸位置を強調表示する。細胞外ループ 1 の範囲内では、CLDN18.2 と CLDN18.1 とは、8 つの位置で異なる。実施例 1 も参照されたい。

【図 2】実施例 2 のエピトープマッピング解析のために作成した CLDN18.2 コンストラクト（キメラ／点突然変異）を示す。また、ヒト CLDN18.1 ループ 1 とヒト CLDN18.2 ループ 1 との間の配列アラインメントも示し、これらの 2 つの分子で異なる 8 つの位置 P1～P8 を強調表示する。実施例 1 も参照されたい。

【図 3】エピトープマッピング解析の結果である（実施例 2 を参照されたい）。この図は、トランスフェクトされていない CHO 細胞並びに hu CLDN18.1、hu CLDN18.2、hu CLDN6 及び hu CLDN9 をトランスフェクトした CHO 細胞の FACS 分析を示す（左側）。右側では、この図は、3 個の異なるキメラ hu CLDN18.2 コンストラクトをトランスフェクトした CHO 細胞の FACS 分析を示す。ループ 2 全体（ECL2、E2）のアミノ酸配列をヒト CLDN9 由来の配列と交換し、領域 E

10

20

30

40

50

2 A 及び E 2 B をヒト C L D N 6 の対応配列と交換した。抗体／抗体コンストラクトは、全て 5 μ g / m l の濃度で試験した。

【図 4】エピトープマッピング解析の結果である（実施例 2 を参照されたい）。この図は、トランスフェクトされていない C H O 細胞並びに h u C L D N 1 8 . 1、h u C L D N 1 8 . 2、h u C L D N 6 及び h u C L D N 9 をトランスフェクトした C H O 細胞の F A C S 分析を示す。更に、この図は、指示される位置 P 1 ~ P 8 に 1、2 又は 3 つの点突然変異を有する 1 1 個の異なる h u C L D N 1 8 . 2 コンストラクトをトランスフェクトした C H O 細胞（更なる詳細については、実施例 1 も参照されたい）並びに 4 個の異なるキメラ h u C L D N 1 8 . 2 コンストラクトをトランスフェクトした C H O 細胞の F A C S 分析を示す。ループ 2 全体（E C L 2、E 2）のアミノ酸配列をヒト C L D N 9 由来の配列と交換し、領域 E 1 B、E 1 D 及び E 1 C をヒト C L D N 6 の対応配列と交換した（更なる詳細については、実施例 1 も参照されたい）。単一特異抗体は、全て 5 μ g / m l の濃度で試験する一方、C D 3 $\times$ C L D N 1 8 . 2 二特異性抗体コンストラクトは、2 0 μ g / m l の濃度で試験した。第 1 行：インハウス α -h u C L D N - 1 8 . 1 第 2 行：インハウス α -h u C L D N - 1 8 . 2 第 3 行： α -h u C L D N - 6 (R & D ; M A B 3 6 5 6) 第 4 行： α -h u C L D N - 9 (A B I N 1 7 2 0 9 1 7) 第 5 行：C L - 1 $\times$ I 2 C - s c F c 第 6 行：C L - 2 $\times$ I 2 C - s c F c 第 7 行：C L - 4 $\times$ I 2 C - s c F c 第 8 行：C L - 3 $\times$ I 2 C - s c F c

【図 5】実施例 5 に記載される F A C S アッセイの結果である。

【図 6】実施例 6 に記載される F A C S アッセイの結果である。

【図 7 - 1】実施例 7 . 4 に記載される F A C S ベース細胞傷害性アッセイの結果である。試験した 6 つの細胞株全てにおいて（5 つは、天然の発現体である細胞株及び h u C L D N 1 8 . 2 をトランスフェクトした C H O 細胞）、本発明の抗体コンストラクト（C L - 1 及び C L - 2）は、異なる C L D N 1 8 . 2 エピトープ（C L - 3 及び C L - 4）に結合する対照コンストラクトと比較して有意に高い E C 5 0 値を示した。

【図 7 - 2】実施例 7 . 4 に記載される F A C S ベース細胞傷害性アッセイの結果である。試験した 6 つの細胞株全てにおいて（5 つは、天然の発現体である細胞株及び h u C L D N 1 8 . 2 をトランスフェクトした C H O 細胞）、本発明の抗体コンストラクト（C L - 1 及び C L - 2）は、異なる C L D N 1 8 . 2 エピトープ（C L - 3 及び C L - 4）に結合する対照コンストラクトと比較して有意に高い E C 5 0 値を示した。

【図 8】C L D N 1 8 . 2 $\times$ C D 3 抗体コンストラクトの抗腫瘍活性（平均腫瘍容積と平均値の標準誤差（S E M））である。実施例 1 3 を参照されたい。

【図 9】C L D N 1 8 . 2 $\times$ C D 3 抗体コンストラクトの抗腫瘍形成活性（平均腫瘍容積と平均値の標準誤差（S E M））である。実施例 1 4 を参照されたい。

【発明を実施するための形態】

【0 2 6 8】

本明細書で使用されるとき、単数形「1 つの (a)」、「1 つの (a n)」及び「その」には、文脈上特に明確に指示されない限り複数形の言及が含まれる。従って、例えば、「試薬」への言及には、かかる種々の試薬の 1 つ以上が含まれ、「方法」への言及には、本明細書に記載される方法に修正又は置換され得る当業者に公知の均等なステップ及び方法への言及が含まれる。

【0 2 6 9】

特に指示されない限り、一連の要素の前にある用語「少なくとも」は、その一連の中にある全ての要素に言及しているものと理解されるべきである。当業者は、本明細書に記載される本発明の具体的な実施形態の多くの均等物を認識するか、又はルーチンに過ぎない実験を用いてそれを確認することができるであろう。かかる均等物は、本発明に包含されることが意図される。

【0 2 7 0】

用語「及び／又は」は、本明細書のいずれの箇所で使用されるにしても、「及び」、「又は」及び「前記用語によって接続される要素のあらゆる他の組み合わせ」の意味を含む。

10

20

30

40

50

【0271】

用語「約」又は「近似的に」は、本明細書で使用されるとき、所与の値又は範囲の±20%以内、好ましくは±15%以内、より好ましくは±10%以内及び最も好ましくは±5%以内を意味する。これには具体的な値も含まれ、例えば「約50」は、値「50」を含む。

【0272】

本明細書及び特許請求の範囲全体を通じて、文脈上特に要求されない限り、語句「含む (comprise)」並びに「含む (comprises)」及び「含んでいる」などの変化形は、記載されている完全体又はステップ又は完全体若しくはステップ群を含むが、任意の他の完全体又はステップ又は完全体若しくはステップ群を除外しないことを含意するものと理解されるであろう。本明細書において使用されるとき、用語「含んでいる」は、用語「含有している」、又は「包含している」、又は時に本明細書において使用されるときに用語「有している」を代わりに用いることができる。

10

【0273】

本明細書において使用されるとき、「～からなる」は、クレーム要素に指定されていないいかなる要素、ステップ又は成分も除外する。本明細書において使用されるとき、「～から本質的になる」は、クレームの基本的な新規の特徴に事実上影響を与えない材料又はステップを除外しない。

【0274】

本明細書における各例において、用語「含む」、「～から本質的になる」及び「～からなる」のいずれも他の2つの用語の一方に置き換えられ得る。

20

【0275】

上述の説明及び以下の例は、例示的構成を提供するが、しかし、本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、技法、プロトコル、材料、試薬、物質等に限定されず、従って異なり得ることが理解されなければならない。本明細書で使用される用語は、詳細な実施形態を説明することを目的としているに過ぎず、特許請求の範囲によってのみ定義される本発明の範囲を限定することを意図されない。本発明の態様は、独立クレームに提供される。本発明の一部の任意選択の特徴は、従属クレームに提供される。

【0276】

以上であれ以下であれ、本明細書の本文全体を通じて引用される全ての刊行物及び特許（全ての特許、特許出願、科学刊行物、製造者仕様書、説明書等を含む）は、本明細書によって全体として参照により援用される。本明細書のいかなる事項も、先行発明であるという理由でかかる開示に本発明が先行する資格がないことを認めるものとして解釈されてはならない。参照によって援用される資料が本明細書と矛盾するか又は整合性がない限り、いかなるかかる資料にも本明細書が優先するものとする。

30

【0277】

例示目的で提供されるに過ぎない以下の実施例から、本発明及びその利点の更なる理解が得られるであろう。これらの実施例は、決して本発明の範囲を限定することを意図されず、且つそのように解釈されてはならない。

【実施例】

40

【0278】

実施例1

CLDN18.2突然変異を発現するCHO細胞の作成

エピトープマッピングを目的として、CLDN18.2のE1（細胞外ループ1；ECL1、配列番号2）を4つのサブドメイン（E1A、E1B、E1C及びE1D）に分け、E2（細胞外ループ2；ECL2、配列番号3）を2つのサブドメイン（E2A及びE2B）に分けた。ヒトCLDN18.2のそれぞれのエピトープ領域（ループ／ドメイン又はサブドメイン）（E1、E1A、E1B、E1C、E1D、E2、E2A及びE2B）のアミノ酸配列をヒトCLDN6の対応配列と交換し、但し、2つは、例外とし（図1及び図2を参照されたい）：E2は、ヒトCLDN9由来の配列と交換し；及び突然変異

50

E1Cを有するコンストラクト (CLDN18.2-E1Cを対応CLDN6領域と交換) では、CLDN18.2のE2もヒトCLDN9由来の配列と交換した。後者は、CLDN18.2/CLDN6-キメラの発現の検出手段としての役割を果たした。CHO細胞における全てのキメラコンストラクトの発現をFACS分析で確認した(下記を参照されたい)。E1及びE1Aキメラコンストラクトについて発現の証拠がなかったため、これらのコンストラクトは、エピトープマッピング解析に使用しなかった。従って、以下のコンストラクトが作成され、エピトープマッピングに使用した。

CLDN18.2-E1B (CLDN6) → 配列番号 22

CLDN18.2-E1C (CLDN6) - E2 (CLDN9) → 配列番号 23

CLDN18.2-E1D (CLDN6) → 配列番号 24

CLDN18.2-E2 (CLDN9) → 配列番号 25

CLDN18.2-E2A (CLDN6) → 配列番号 26

CLDN18.2-E2B (CLDN6) → 配列番号 27

【0279】

ヒトCLDN18.2-ECL2及びヒトCLDN18.1-ECL2のアミノ酸配列は、同一であるが、細胞外ループ1内において、CLDN18.2とCLDN18.1とは、8つの位置(29、37、42、45、47、56、65及び69)が異なる。従って、追加的なCLDN18.2突然変異体を作成し、CHO細胞で発現させ、ここでは、これらの8つのCLDN18.2位置「P1」～「P8」を個別に、或いは2又は3つの位置をまとめて、そのそれぞれのCLDN18.1対応物に交換した。従って、以下のコンストラクトが作成された。

CLDN18.2-P1-CLDN18.1 (Q29M突然変異) → 配列番号 11

CLDN18.2-P2-CLDN18.1 (N37D突然変異) → 配列番号 12

CLDN18.2-P1/P2-CLDN18.1 (Q29M/N37D突然変異) → 配列番号 13

CLDN18.2-P3-CLDN18.1 (A42S突然変異) → 配列番号 14

CLDN18.2-P4-CLDN18.1 (N45Q突然変異) → 配列番号 15

CLDN18.2-P5-CLDN18.1 (Q47E突然変異) → 配列番号 16

CLDN18.2-P3/P4/P5-CLDN18.1 (A42S/N45Q/Q47E突然変異) → 配列番号 17

CLDN18.2-P6-CLDN18.1 (E56Q突然変異) → 配列番号 18

CLDN18.2-P7-CLDN18.1 (G65P突然変異) → 配列番号 19

CLDN18.2-P8-CLDN18.1 (L69I突然変異) → 配列番号 20

CLDN18.2-P7/P8-CLDN18.1 (G65P/L69I突然変異) → 配列番号 21

【0280】

上記のコンストラクトを発現するCHO細胞並びに対照としてのhu-CLDN18.2、hu-CLDN18.1、hu-CLDN6及びhu-CLDN9(配列番号1、4、9及び10)を発現するCHO細胞を作成するため、それぞれのコード配列をpEF-DHFRと称されるプラスミド(pEF-DHFRについては、Raum et al. Cancer Immunol Immunother 50 (2001) 141-150に記載されている)にクローニングした。クローニング手順は、全て標準的なプロトコル(Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York (2001))に従って行った。各コンストラクトについて、Kaufman R. J. (1990) Methods Enzymol. 185, 537-566により記載されるとおり、対応するプラスミドを真核生物発現のためのDHFR欠損CHO細胞にトランスフェクトした。

【0281】

10

20

30

40

50

CHO細胞上での上記のコンストラクトの発現は、それぞれCLDN18.2（インハウスモノクローナル抗hu CLDN18.2抗体）、CLDN18.1（インハウスモノクローナル抗hu CLDN18.1抗体）、CLDN6（R&Dマウス抗ヒトCLDN6モノクローナル抗体MAB3656）及びCLDN9（ラット抗ヒトCLDN9モノクローナル抗体ABIN1720917）に対する抗体を5 µg/mlの濃度で使用して、FACSアッセイで確認した。陰性対照として、細胞を最初の抗体の代わりにアイソタイプ対照抗体（BD 553454/R&D MAB0041/R&D MAB0061）とインキュベートした。結合したモノクローナル抗体を二次抗マウス／抗ラット／抗ヒトIgG Fc-γ-PE（Jackson ImmunoResearch 115-116-071/112-116-071/109-116-098）で検出した。試料は、フローサイトメトリーによって測定した。

10

【0282】

実施例2

抗CLDN18.2抗体コンストラクトのエピトープマッピング

実施例1に記載されるコンストラクトをトランスフェクトしたCHO細胞を20 µg/mlの濃度の精製CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトで染色した。結合した抗体コンストラクトを抗ヒトIgG Fc-γ-PE（Jackson ImmunoResearch; 1:100）で検出した。抗体は、全てPBS/2%FCSで希釈した。陰性対照として、細胞をPBS/2%FCSとインキュベートし、続いて抗ヒトIgG Fc-γ-PEとインキュベートした。試料は、フローサイトメトリーによって測定した。

20

【0283】

エピトープマッピング解析の結果を図3及び図4に示す。特定のCLDN18.2キメラ又は突然変異を発現する細胞についてFACSシグナルの喪失が観察されると、それぞれのCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、そのCLDN18.2キメラ又は突然変異分子において交換されたエピトープ（ループ／ドメイン／サブドメイン）又は特定のアミノ酸に結合すると見なされる。換言すれば、そのエピトープ領域又はアミノ酸は、分析されたCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの結合に必要である。それぞれの標的が正しく発現することの実証に使用した対照抗体に加えて、以下のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトをエピトープマッピング解析で特別に試験した。

CL-1×I2C-scFc（配列番号132）

30

CL-2×I2C-scFc（配列番号144）

CL-3×I2C-scFc（配列番号149）

CL-4×I2C-scFc（配列番号154）

【0284】

CL-1×I2C-scFc及びCL-2×I2C-scFcは、本発明に係る抗体コンストラクトである一方、CL-3×I2C-scFc及びCL-4×I2C-scFcは、国際公開第2014/075788号パンフレットのそれぞれ配列番号8+15及び配列番号6+11として開示される抗CLDN18.2 VH及びVL領域を有する。

【0285】

図4に示されるとおり、CL-3×I2C-scFc抗体コンストラクトは、CLDN18.2へのその特異的結合に明らかに位置P3（A42）、P4（N45）及びP6（E56）が必要である。位置P4は、E1Bと称されるサブドメイン内にあり、位置P6は、E1Cと称されるサブドメイン内にある。結果的に及び同様に、これらのサブドメインをCLDN6対応配列と交換すると、FACSシグナルの喪失につながる。これらの3つの位置がCL-3×I2C-scFcによるCLDN18.2への結合に関連性があるという観察は、既発表の結果を裏付ける。CL-4×I2C-scFcと称される抗体コンストラクトは、極めて類似した結合パターンを有する（図4を参照されたい）。

40

【0286】

対照的に、抗体コンストラクトCL-1×I2C-scFc及びCL-2×I2C-scFcの両方は、CLDN18.2へのその特異的結合に明らかに位置P6（E56）が

50

必要である。しかしながら、他の位置、詳細にはP3及びP4の交換は、CLDN18.2へのCL-1×I2C-scFc又はCL-2×I2C-scFcの結合に何ら影響がないように見える。この観察と一致して、サブドメインE1C（これには位置P6がある）をCLDN6対応配列に交換すると、FACSシグナルの喪失につながる。しかし、E1B又はE1Dを交換しても喪失はない。従って、図4に示すエピトープマッピング結果は、CL-1×I2C-scFc及びCL-2×I2C-scFcがCLDN18.2内の同じエピトープに結合し、このエピトープがCL-3×I2C-scFc及びCL-4×I2C-scFcのものと異なることを示している。

【0287】

実施例3

Biacoreに基づくヒト及びマカクCD3及びFcRnに対する親和性の決定
組換えヒト／マカクCD3-ECD（ECD＝細胞外ドメイン）融合タンパク質をニワトリアルブミンと共に使用してBiacore分析実験を実施し、本発明の抗体コンストラクトの標的結合を決定した。

【0288】

詳細には、製造者のマニュアルに従って酢酸塩緩衝液pH4.5を使用して約600～800RUのそれぞれの組換え抗原をCM5センサーチップ（GE Healthcare）に固定化した。CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトを以下の濃度の希釈系列でロードした：HBS-EPランニング緩衝液（GE Healthcare）に希釈した50nM、25nM、12.5nM、6.25nM及び3.13nM。流速は、3分間30μl／分とし、次に再びHBS-EPランニング緩衝液を30μl／mlの流速で8分～20分間加えた。10mMグリシン 10mM NaCl pH1.5溶液を使用してチップの再生処理を実施した。データセットは、BiaEVALソフトウェアを使用して分析した。一般に、2つの独立した実験を実施した。

【0289】

本発明に係るCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、ヒトCD3に対してナノモル濃度範囲の高い親和性を示した。マカクCD3への結合は、均衡し、これも同様の範囲の親和性を示した。親和性値及び親和性ギャップ計算値を表2に示す。

【0290】

【表2】

表2: Biacore 分析によって決定したときのヒト及びマカク CD3 に対する CLDN18.2xCD3 抗体コンストラクトの親和性、並びに種間親和性ギャップ計算値。第3～5行のコンストラクトは第1及び2行のコンストラクトと異なる(別個の)アッセイで測定した。

	CLDN18.2 x CD3 抗体コンストラクト	KD hu CD3 [nM]	KD cyno CD3 [nM]	親和性ギャップ KD mac/KD hu
1	CL-1 x I2C-scFc	23.5 ± 1.0	19.7 ± 1.1	0.84
2	CL-1 x I2C-6His	4.0 ± 0.2	3.4 ± 0.2	0.85
3	CL-2 x I2C-scFc	8.32 ± 0.64	4.67 ± 0.18	0.56
4	CL-3 x I2C-scFc	14.50 ± 0.07	7.91 ± 0.37	0.55
5	CL-4 x I2C-scFc	15.30 ± 2.55	9.19 ± 0.16	0.60

【0291】

同様に、CL-1×I2C-scFc、CL-2×I2C-scFc、CL-3×I2C-scFc及びCL-4×I2C-scFcと称されるコンストラクトについて、Biacoreアッセイにより、ヒト及びカニクイザルFcRnへの均衡した結合が確認された。

【0292】

実施例 4

標的抗原陽性細胞上のヒト及びマカクCLDN18.2に対する親和性のスクッチャードベース分析

ヒト又はマカクCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞に対するCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの親和性をスクッチャード分析によって決定した。この分析のため、一価検出系を用いてそれぞれの細胞株に対するCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの一価結合を正確に決定する飽和結合実験を実施した。

【0293】

ヒトCLDN18.2を組換え発現するCHO細胞株の 2×10^4 細胞を、それぞれの抗体コンストラクトの100～200 nMから始まる50 µlの希釈系列（1：2で12の希釈物）と共に（飽和に達するまで）それぞれインキュベートし、続いて攪拌下に4℃で16時間インキュベートし、1回の残留物洗浄ステップを行った。次に、細胞を更に1時間、30 µlのAlexa Fluor（商標）488コンジュゲートAffiniPure（商標）Fab断片ヤギ抗ヒトIgG（H+L）溶液と共にインキュベートした。1回の洗浄ステップ後、細胞を3.5%ホルムアルデヒド含有150 µl FACS緩衝液に再懸濁し、更に15分間インキュベートし、遠心し、FACS緩衝液に再懸濁し、FACSソフトウェアで分析した。データは、各々トリプリケートを用いた2つの独立した実験セットから生成した。それぞれの1部位特異的結合評価を計算して最大結合（Bmax）を推定した。それぞれのKDを反映して最大半量結合時における抗体コンストラクトの濃度を決定した。トリプリケート測定値が双曲線として及びS字形曲線としてプロットされ、最小結合から最適結合までの適切な濃度範囲が示された。

【0294】

表3に示す値は、抗体コンストラクト毎に2つの独立した実験から得られた。細胞ベースのスクッチャード分析により、本発明のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、ヒトCLDN18.2に対する親和性がナノモル濃度であり、且つヒト及びマカク細胞外ドメインの配列同一性に起因して1のカニクイザル／ヒト種間親和性ギャップを呈することが確認された。

【0295】

【表3】

表3: 細胞ベースのスクッチャード分析で決定したときのCLDN18.2に対するCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの親和性(KD)。2つの独立した実験で、各々希釈系列を使用して抗体コンストラクトを測定した。*ヒト及びカニクイザルCLDN18.2は細胞外ドメインにおいて同一のアミノ酸配列を共有する。従って、定義上、親和性ギャップは「1」に等しい

CLDN18.2×CD3 抗体コンストラクト	細胞ベースの親和性 hu CLDN18.2 [nM]	親和性ギャップ KD mac/KD hu *
CL-1 x I2C-scFc	56.8 ± 10.7	1
CL-1 x I2C-6His	13.9 ± 1.8	1

【0296】

同じ条件下で実施した別個のスクッチャードアッセイにおいて、同じ条件下でCL-

2×I2C-s c F cについて11.13±2.72のヒトCLDN18.2に対する細胞ベースの親和性が測定された。

【0297】

実施例5

CLDN18.2及びヒト／カニクイザルCD3発現細胞への結合の確認

ヒトCLDN18.2及びCD3並びにカニクイザルCD3への結合を確認するため、以下を使用して本発明の抗体コンストラクトをフローサイトメトリーにより試験した。

- ・ヒトCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞、
- ・CD3発現ヒトT細胞白血病細胞株HPB-all (DSMZ、Braunschweig、ACC483)、及び
- ・カニクイザルCD3発現T細胞株LnPx4119

【0298】

フローサイトメトリーのため、それぞれの細胞株の200,000細胞を5µg/mlの濃度の精製抗体コンストラクトと共に4℃で60分間インキュベートした。洗浄後、Fcドメインを有する結合した抗体コンストラクトをヤギ抗ヒトFc-γ-PE (1:100)によって4℃で30分間検出した。hisタグを有する抗体コンストラクトをCD3結合部分に特異的なインハウスマウス抗体によって検出し、続いてヤギ抗マウスFc-γ-PE (1:100)によって4℃で30分間検出した。試料は、フローサイトメトリーによって測定した。非トランスフェクトCHO細胞を陰性対照として使用した。

【0299】

結果は、図5に示す。本発明のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、ヒトCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞を染色した。CD3を発現するヒト及びカニクイザルT細胞株も抗体コンストラクトによって認識された。非トランスフェクトCHO細胞の染色はなく、及び陰性対照の抗EGFRvIII×I2C-s c F c抗体コンストラクトによるCLDN18.2トランスフェクトCHO細胞の染色はなかった。

【0300】

実施例6

ヒトCLDN18.2パラログへの結合がないことの確認

ヒトCLDN18.2パラログのCLDN18.1、CLDN1、CLDN2、CLDN3、CLDN4、CLDN6及びCLDN9をCHO細胞に安定にトランスフェクトした。本例で使用されるとおりのパラログの配列は、配列番号4～10に示される。FACS分析でそれぞれのパラログに特異的な抗体によってタンパク質発現が確認された。

CLDN1：ラットー抗ヒト (5µg/ml最終) ストック：100µg/ml R&D、MAB4618

CLDN2：インハウスマウスAb (1:100～200)

CLDN3：マウスー抗ヒト (5µg/ml最終) ストック：500µg/ml R&D、MAB4620

CLDN4：マウスー抗ヒト (5µg/ml最終) ストック：500µg/ml R&D、MAB4219

CLDN6：マウスー抗ヒト (5µg/ml最終) ストック：500µg/ml R&D、MAB3656

CLDN9：ラットー抗ヒト (5µg/ml最終) ストック：2mg/ml、antibodies-online.com、ABIN1720917

CLDN18.1：インハウスモノクローナルマウスAb (5µg/ml最終)

【0301】

トランスフェクトしたCHO細胞を4℃で60分間にわたって5µg/mlの濃度のそれぞれの抗体 (上記を参照されたい)、続いてそれぞれのPEコンジュゲート抗体ヤギー抗マウスIgG、Fc-γ断片PEコンジュゲート (1:100)、Jackson 115-116-071又はヤギー抗ラットIgG、Fc-γ断片PEコンジュゲート (1:100) Jackson、112-116-071と共にインキュベートした。

【0302】

実施例5に記載されるとおりフローサイトメトリーアッセイを実施した。結果は、図6に示す。この分析により、本アッセイで試験した本発明のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトは、ヒトCLDN18.2パラログと交差反応しないことが確認された。

【0303】

実施例7

細胞傷害活性

エフェクターT細胞をCLDN18.2発現標的細胞に対してリダイレクトする本発明のCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの効力について、種々のインビトロ細胞傷害性アッセイで分析した。

・刺激したヒトCD8+エフェクターT細胞をヒトCLDN18.2トランスフェクトCHO細胞に対してリダイレクトするCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの効力を48時間FACSベース細胞傷害性アッセイで測定した。

・マカクT細胞株をヒトCLDN18.2トランスフェクトCHO細胞に対してリダイレクトするCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの効力を48時間FACSベース細胞傷害性アッセイで測定した。

・刺激されていないヒトPBMCにおけるT細胞をヒトCLDN18.2トランスフェクトCHO細胞にリダイレクトするCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの効力を（ヒトCLDN18.1トランスフェクトCHO細胞を使用した陰性対照と併せて）48時間FACSベース細胞傷害性アッセイで測定した。

・刺激されていないヒトPBMCにおけるT細胞をSNU-601又はSNU-620などのCLDN18.2陽性ヒト胃がん株に対してリダイレクトするCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの効力を48時間FACSベース細胞傷害性アッセイで測定した。

【0304】

実施例7.1

刺激ヒトT細胞によるクロム遊離アッセイ

CD8⁺T細胞をエンリッチした刺激T細胞を以下のとおり入手する：ペトリ皿（145mm直径）を1μg/mlの最終濃度の市販の抗CD3特異抗体（OKT3、オルソクロン）によって37℃で1時間コーティングする。PBSによる1回の洗浄ステップによって未結合のタンパク質を除去する。3~5×10⁷個のヒトPBMCを、プレコートしたペトリ皿にある安定化グルタミン/10%FCS/20U/ml IL-2含有の120mlのRPMI 1640に加え、2日間刺激する。3日目、細胞を回収し、RPMI 1640で1回洗浄する。20U/mlの最終濃度となるようにIL-2を加え、細胞を上記と同じ細胞培養培地で再び1日培養する。DynaBeadsを製造者のプロトコルに従って使用して、CD4⁺T細胞及びCD56⁺NK細胞の枯渇によりCD8⁺細胞傷害性Tリンパ球（CTL）をエンリッチする。

【0305】

ヒトCLDN18.2トランスフェクトCHO標的細胞をPBSで2回洗浄し、50%FCS含有RPMIの最終容積100μl中11.1MBq ⁵¹Crによって37℃で60分間標識する。続いて、標識した標的細胞を5ml RPMIで3回洗浄し、次に細胞傷害性アッセイで使用する。アッセイは、96ウェルプレートにおいて10:1のE:T比で総容積200μlの補足RPMIで実施する。0.01~1μg/mlの出発濃度の精製抗体コンストラクト及びその3倍希釈物を使用する。アッセイのインキュベーション時間は、18時間である。細胞傷害性は、最大溶解（Triton-Xの添加）と自発的溶解（エフェクター細胞なし）との差に関する上清中に遊離したクロムの相対値として決定される。測定は、全てクアドルプリケートで行う。上清中のクロム活性の測定は、ガンマカウンターで実施する。結果の分析は、適切なソフトウェアで行う。細胞傷害活性の比較には、分析プログラムによってシグモイド用量反応曲線から計算されたEC50値を使用する。

【0306】

実施例7.2

刺激されていないヒトPBMCによるFACSベース細胞傷害性アッセイ
エフェクター細胞の単離

エンリッチしたリンパ球調製物（バフィーコート）からFicoll密度勾配遠心法によってヒト末梢血単核球（PBMC）を調製した。PBMCは、採血当日に調製した。Ficoll密度遠心及び大量のダルベッコPBSでの洗浄後、残った赤血球を赤血球溶解緩衝液（155mM NH₄Cl、10mM KHCO₃、100μM EDTA）とインキュベートすることによりPBMCから除去した。100×gでPBMCを遠心すると、上清を介して血小板が除去された。残ったリンパ球は、主にBリンパ球、Tリンパ球、NK細胞及び単球を含む。PBMCは、10%FCS含有RPMI培地中37℃/5%CO₂で培養下に保った。

10

【0307】

CD14⁺及びCD56⁺細胞の枯渇

CD14⁺細胞の枯渇には、ヒトCD14マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、MACS、#130-050-201）を使用した。NK細胞の枯渇には、ヒトCD56マイクロビーズ（Miltenyi Biotec、MACS、#130-050-401）を使用した。PBMCをカウントし、室温で10分間、300×gで遠心した。上清を廃棄し、細胞ペレットをMACS単離緩衝液（80μl/10⁷細胞；PBS、0.5%（v/v）FBS、2mM EDTA）に再懸濁した。CD14マイクロビーズ及びCD56マイクロビーズ（20μl/10⁷細胞）を加え、4～8℃で15分間インキュベートした。MACS単離緩衝液（1～2ml/10⁷細胞）で細胞を洗浄した。遠心後（上記を参照されたい）、上清を廃棄し、細胞をMACS単離緩衝液（500μl/10⁸細胞）に再懸濁した。次に、CD14/CD56陰性細胞をLSカラム（Miltenyi Biotec、#130-042-401）を使用して単離した。CD14⁺/CD56⁺細胞のないPBMCを必要になるまでインキュベーターにおいてRPMI完全培地（即ち10%FBS、1×非必須アミノ酸、10mMヘペス緩衝液、1mMピルビン酸ナトリウム及び100U/mlペニシリン/ストレプトマイシンを補足したRPMI 1640）中37℃で培養した。

20

【0308】

標的細胞標識

フローサイトメトリーアッセイで細胞溶解を分析するため、蛍光膜色素DiOC₁₈（DiO）（Molecular Probes）を使用して標的細胞（ヒトCLDN18.2トランスフェクトCHO細胞など）を標識し、それをエフェクター細胞と区別した。簡潔に言えば、細胞を回収し、PBSで1回洗浄し、2%（v/v）FBS及び膜色素DiOを含有するPBS（5μl/10⁶細胞）中に10⁶細胞/mlに調整した。37℃で3分間インキュベートした後、細胞を完全RPMI培地で2回洗浄し、細胞数を1.25×10⁵細胞/mlに調整した。0.5%（v/v）等張性エオシンG溶液を用いて細胞の生存を決定した。

30

【0309】

フローサイトメトリーベースの分析

このアッセイは、CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの段階希釈物の存在下で標的細胞（ヒトCLDN18.2トランスフェクトCHO細胞など）の溶解を定量化するように設計した。等容積のDiO標識標的細胞及びエフェクター細胞（即ちCD14⁺細胞のないPBMC）を混合し、10：1のE：T細胞比を得た。160μlのこの懸濁液を96ウェルプレートの各ウェルにトランスフェクトした。分析しようとするCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの段階希釈物40μl（及び場合により、無関係の標的抗原を認識する抗CD3（I2C）ベースの二特異性抗体コンストラクトなど、陰性対照抗体コンストラクト）又は更なる陰性対照としてのRPMI完全培地を加えた。7%CO₂加湿インキュベーターにおいて抗体コンストラクト媒介性細胞傷害性反応を48時

40

50

間続行した。次に、細胞を新しい96ウェルプレートに移し、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度のヨウ化プロピジウム (PI) を加えることにより、標的細胞膜の完全性の喪失をモニタした。PIは、通常、生細胞から排除される膜不透過性色素である一方、死細胞は、それを取り込み、蛍光発光により同定可能になる。

【0310】

試料は、FACS Canto II機器のフローサイトメトリーによって測定し、FACS Divaソフトウェアによって分析した(両方ともBecton Dickinsonから)。標的細胞は、DiO陽性細胞として同定された。PI陰性標的細胞は、生存標的細胞に分類した。細胞傷害パーセンテージを以下の式に従って計算した。

【数1】

$$\text{細胞傷害} [\%] = \frac{n_{\text{死滅標的細胞}}}{n_{\text{標的細胞}}} \times 100$$

n = イベント数

10

【0311】

Prismソフトウェア(GraphPad Software Inc.)を使用して、細胞傷害パーセンテージを対応する抗体コンストラクト濃度に対してプロットした。ヒル勾配を一定としたシグモイド用量反応曲線の評価のため、用量反応曲線を4パラメータロジスティック回帰モデルで分析し、EC50値を計算した。

20

【0312】

実施例7.3

刺激されていないヒトPBMCを標的細胞に対してリダイレクトする効力

FACSベースの48時間細胞傷害性アッセイにおいて、刺激されていないヒトPBMC(CD14陰性/CD56陰性)をエフェクター細胞として使用し、且つ標的細胞として10:1のE:T比において、

(1) ヒトCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞、

(2) ヒトCLDN18.1をトランスフェクトしたCHO細胞、及び

(3) 天然の発現体である細胞株SNU-601及びSNU-620

30

を使用して、CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの細胞傷害活性を分析した。

【0313】

アッセイは、上記の実施例7.2に記載のとおり行った。細胞傷害性アッセイの結果は、表4に示す。

【0314】

40

50

【表 4】

表 4: 刺激されていないヒト PBMC をエフェクター細胞とした 48 時間 FACS ベース細胞傷害性アッセイで測定したときの CLDN18.2xCD3 抗体コンストラクトの EC50 値[pM]。標的細胞: (1) hu CLDN18.2 をトランスフェクトした CHO 細胞; (2) hu CLDN18.1 をトランスフェクトした CHO 細胞; (3) SNU-601; (4) SNU-620。

標的細胞	CLDN18.2xCD3 抗体コンストラクト	EC50 [pM]
(1)	CL-1 x I2C-scFc	5.2
(1)	CL-1 x I2C-6His	0.5
(2)	CL-1 x I2C-scFc	99396
(2)	CL-1 x I2C-6His	1985
(3)	CL-1 x I2C-scFc	104
(3)	CL-1 x I2C-6His	2.3
(4)	CL-1 x I2C-scFc	185
(4)	CL-1 x I2C-6His	12

【0315】

このアッセイは、本発明の抗体コンストラクトが、CLDN18.2 パラログ CLDN18.1 をトランスフェクトした CHO 細胞に対して有意な望ましくない細胞傷害活性を呈しない（灰色で強調表示した行）ことを実証している。「CL-1 x I2C-6His」と称されるコンストラクトの場合、CLDN18.2-CHO の EC50 値と CLDN18.1-CHO の EC50 値との間の倍数は、ほぼ 4,000 である。更に、「CL-1 x I2C-scFc」と称されるコンストラクトの場合、CLDN18.2-CHO の EC50 値と CLDN18.1-CHO の EC50 値との間の倍数は、ほぼ 20,000 である。

【0316】

通常、EC50 値は、標的発現率が低い標的細胞と比較して、細胞表面上で高い CLDN18.2 レベルを発現する標的細胞を使用するときほど低くなると予想される。従って、通常、CLDN18.2 をトランスフェクトした CHO 細胞を使用すると、天然の発現体を使用する場合と比較して EC50 値が低くなる傾向があることが観察される。及び本アッセイで実証される。

【0317】

実施例 7.4

ヒト PBMC を天然発現体の標的細胞に対してリダイレクトする効力

本発明の CLDN18.2 x CD3 抗体コンストラクトの細胞傷害活性を、CLDN18.2 標的内の異なるエピトープに結合する他の CLDN18.2 x CD3 抗体コンストラクト（CL-3 及び CL-4、実施例 2 を参照されたい）と比較した。内因性レベルの CLDN18.2 を安定に発現するがん細胞株（GSU、NUGC、IM95、SNU620、SNU601）及び CLDN18.2 陰性対照細胞株 AGS をルシフェラーゼ（Luc）で安定に標識した。更に、CLDN18.2 を過剰発現するように CHO 細胞を安定にトランスフェクトした。2 つのヒト T 細胞ドナーをエフェクター細胞の供給源として使用した。細胞傷害性アッセイの E:T 比は、10:1 であった。抗体コンストラクトの 1:3 系列タイトレーションは、30 nM の濃度から開始した。このアッセイを 37℃ で 48 時間インキュベートした。Luc 標識細胞についてルシフェラーゼアッセイシステム

ONE-Glo (商標) (Promega) 及び CLDN18.2 トランスフェクト CHO 細胞について発光細胞生存アッセイ CellTiter-Glo (商標) (Promega) により、細胞傷害性の読み取りを実施した。

【0318】

抗 CLDN18.2 VH 及び VL 領域の配列を除き、抗体コンストラクト CL3 及び CL-4 は、本実施例の細胞傷害性アッセイで分析した本発明の抗体コンストラクトであると同定された。2つの抗体コンストラクト CL-3 及び CL-4 の VH 及び VL 領域は、国際公開第 2014/075788 号パンフレットのそれぞれ配列番号 8+15 及び配列番号 6+11 として開示されている。本明細書に開示されるとおりの配列番号 145+146 及び配列番号 150+151 も参照されたい。

10

【0319】

以下の表 5 及び図 7 に結果を示す。標的細胞とは無関係に、本発明の抗体コンストラクト（ここでは、CL-1、CL-2）は、異なる CLDN18.2 エピトープに結合する抗体コンストラクト（CL-3、CL-4）と比べて有意に高い細胞傷害能を有することが示された。本発明の抗体コンストラクトは、2桁ピコモル濃度範囲の EC₅₀ 値を示すが、比較コンストラクトは、3桁～最高 5 桁ピコモル濃度範囲の EC₅₀ 値を示す。いずれのコンストラクトも、標的陰性細胞株に対していかなる活性も示さなかった（データは示さず）。

【0320】

【表 5】

20

表 5: 48 時間細胞傷害性アッセイで測定したときの CLDN18.2xCD3 抗体コンストラクトの EC₅₀ 値 [pM]。

標的細胞	CL-1 x I2C-scFc	CL-2 x I2C-scFc	CL-3 x I2C-scFc	CL-4 x I2C-scFc
GSU	7.4 ± 0.3	12.1 ± 0.7	360.3 ± 47.2	1655.5 ± 71.5
IM95	16.0 ± 2.7	21.4 ± 4.2	623.1 ± 93.3	5900.0 ± 514.0
NUGC4	117.1 ± 46.2	97.1 ± 35.1	1196.5 ± 426.4	>30000
SNU-601	61.9 ± 6.9	64.7 ± 6.7	13797.5 ± 4169.5	>30000
SNU-620	29.0 ± 3.6	31.0 ± 5.3	557.1 ± 98.4	11093.5 ± 1996.5
CHO-CLDN18.2	13.6 ± 0.1	13.2 ± 0.5	440.2 ± 112.5	3181.0 ± 119.0

30

【0321】

これらの観察が、対照コンストラクト（ここでは、CL-3）と比較したときの本発明の抗体コンストラクト（ここでは、CL-1、CL-2）の有意に高い親和性に起因したことを除外するため、hu CLDN18.2 をトランスフェクトした CHO 細胞で細胞ベースの親和性アッセイを実施した。3つの試験したコンストラクト CL-1、CL-2 及び CL-3 の親和性は、ほぼ同様の範囲内にあったことが示された。これは、本発明の抗体コンストラクトについて実証された好ましいエピトープ／活性関係が、単に対照コンストラクトの親和性が低く、従って低い細胞傷害活性を呈することに起因するのではないことを意味する。むしろ、効力は、本抗体コンストラクトによって認識される CLDN18.2 内の特定のエピトープに起因するよう見える。

40

【0322】

50

実施例 7. 5

マカクT細胞をCLDN18.2発現CHO細胞にリダイレクトする効力

48時間FACSベース細胞傷害性アッセイにおいて、ヒトCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞を標的細胞として使用し、且つマカクT細胞株4119LnPx (Knappe et al. Blood 95:3256-61 (2000)) をエフェクター細胞の供給源として使用して、10:1のE:T比でCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの細胞傷害活性を分析した。ヒトCLDN18.2とカニクイザルCLDN18.2とは、細胞外ドメインに同一のアミノ酸配列を共有することに留意されたい。トランスフェクトCHO細胞の標的細胞標識及び細胞傷害活性のフローサイトメトリーベースの分析を上記の実施例7.2に記載のとおり実施した。

10

【0323】

結果を表6に示す。細胞株4119LnPxからのマカクT細胞は、本発明に係るCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトによってCLDN18.2トランスフェクトCHO細胞を効率的に死滅させるように誘導された。抗体コンストラクトは、このアッセイで強力に1桁～2桁ピコモル濃度のEC50値を示したことから、それは、マカク系で極めて高活性であることが裏付けられた。

【0324】

【表6】

表6: マカクT細胞株4119LnPxをエフェクター細胞とし、ヒトCLDN18.2をトランスフェクトしたCHO細胞を標的細胞とした48時間FACSベース細胞傷害性アッセイで測定したときのCLDN18.2×CD3抗体コンストラクトのEC50値[pM]。

20

CLDN18.2×CD3抗体コンストラクト	EC50 [pM]
CL-1 x I2C-scFc	38
CL-1 x I2C-6His	7.2

30

【0325】

実施例 8

(i) 3回の凍結／融解サイクル後及び(ii) 37℃で7日間のインキュベーション後の単量体から二量体への変換

CLDN18.2×CD3単量体抗体コンストラクトを種々のストレス条件に供し、続いて高性能SECにより、当初単量体であったのが二量体抗体コンストラクトに変換された抗体コンストラクトのパーセンテージを決定した。

【0326】

(i) 25µgの単量体抗体コンストラクトを汎用製剤化緩衝液で250µg/mlの濃度に調整し、次に-80℃で30分間凍結し、続いて室温で30分間融解した。3回の凍結／融解サイクル後、二量体含有率をHP-SECによって決定した。

40

【0327】

(ii) 25µgの単量体抗体コンストラクトを汎用製剤化緩衝液で250µg/mlの濃度に調整し、続いて37℃で7日間インキュベートした。二量体含有率をHP-SECによって決定した。

【0328】

高性能(HP)シリカベースサイズ排除液体クロマトグラフィー(SEC)カラムをオートサンプラーが装備されたFPLCに接続した。カラム平衡化及びランニング緩衝液は、pH6.6に調整した100mM KH₂PO₄-200mM Na₂SO₄からなった

50

。平衡化したカラムに抗体コンストラクト溶液（25 µg タンパク質）を適用し、7 MPa の最大圧力下において0.75 ml / 分の流速で溶出を行った。ラン全体を280、254 及び210 nm 光学的吸収率でモニタした。分析は、ソフトウェアラン評価シートに記録された210 nm シグナルのピーク積分により行った。二量体ピークの面積を単量体 + 二量体ピークの総面積で除すことにより、二量体含有率を計算した。

【0329】

結果は、以下の表7に示す。分析したCLDN18.2×CD3 抗体コンストラクトは、3回の凍結／融解サイクル後に0.0%の二量体パーセンテージを示し、37℃で7日間のインキュベーション後に≤2%の二量体パーセンテージを示した。

【0330】

【表7】

表 7: 高性能サイズ排除クロマトグラフィー(HP-SEC)によって決定したときの単量体対二量体 CLDN18.2xCD3 抗体コンストラクトのパーセンテージ。

CLDN18.2xCD3 抗体コンストラクト	3回の凍結/融解サイクル後の 二量体パーセンテージ	37℃で7日間のインキュベーション 後の二量体パーセンテージ
CL-1 x I2C-scFc	0.0	0.0
CL-1 x I2C-6His	0.72	0.0

【0331】

実施例9

熱安定性

抗体凝集温度を以下のとおり決定した：250 µg / ml の濃度の40 µl の抗体コンストラクト溶液を使い捨てキュベットに移し、動的光散乱装置に置いた。定期的に半径測定値を取得しながら試料を0.5℃ / 分の加熱速度で40℃から70℃に加熱した。DLS 装置と共に配布されるソフトウェアパッケージにより、タンパク質の融解及び凝集の指標である半径の増加を用いて抗体コンストラクトの凝集温度を計算した。

【0332】

抗体コンストラクトCL-1×I2C-scFcは、≥51℃、より具体的には51.7℃の有益な凝集温度を有することが示された。別のアッセイでは、CL-1×I2C-6His と称される分子の凝集温度が≥45℃、より具体的には49.7℃の値であることが示された。

【0333】

実施例10

2. 5 mg / ml の単量体抗体コンストラクト濃度における濁度

250 µg / ml の濃度の精製抗体コンストラクト溶液1 ml をスピン濃縮ユニットによって2500 µg / ml に濃縮した。5℃で16時間貯蔵した後、汎用製剤化緩衝液に対するOD340 nm 光学的吸収測定によって溶液の濁度を決定した。

【0334】

抗体コンストラクトCL-1×I2C-scFcは、≤0.021の極めて好ましい濁度を有することが示された一方、CL-1×I2C-6His は、≤0.029の極めて好ましい濁度を有することが示された。3回の凍結／融解サイクル後の同様の濁度測定の結果、CL-1×I2C-scFc について0.021の濁度となった。

【0335】

実施例 1 1

高分解能陽イオン交換クロマトグラフィーによるタンパク質均一性

本発明の抗体コンストラクトのタンパク質均一性を高分解能陽イオン交換クロマトグラフィー (C I E X) によって分析した。

【0336】

1つのアッセイでは、50 μ g の抗体コンストラクト単量体を50ml 結合緩衝液A (20mMリン酸二水素ナトリウム、30mM NaCl、0.01%オクタン酸ナトリウム、pH5.5) で希釈し、40mlのこの溶液をFPLC装置に接続した1ml BioPro SP-Fカラム (YMC、Germany) に適用した。試料結合後、更なる結合緩衝液による洗浄ステップを行った。タンパク質溶出のため、緩衝液B (20mMリン酸二水素ナトリウム、1000mM NaCl、0.01%オクタン酸ナトリウム、pH5.5) を使用した50%パーセント緩衝液Bに至る線形増加塩勾配を10カラム容積で適用した。ラン全体を280、254及び210nm光学的吸収率でモニタした。分析は、ソフトウェアラン評価シートに記録された280nmシグナルのピーク積分により行った。このアッセイでは、「CL-1 $\times$ I2C-6His」と称される分子 (配列番号131) の均一性が82.5%の値であることが示された。

【0337】

別のアッセイでは、Bio SCX分析的C I E Xカラム (Agilent、Frankfurt、Germany) をUPLC装置 (Waters、Eschborn、Germany) に接続し、50mM MES、pH5.6、0.05%ナトリウムアジドからなる緩衝液A (結合緩衝液) と平衡化させた。10 μ g の抗体コンストラクト単量体をカラムに適用し、カラムマトリックスに結合させた。試料結合後、更なる結合緩衝液Bによる洗浄ステップを行った。タンパク質溶出のため、50mM MES、1000mM塩化ナトリウム、pH5.6、0.05%ナトリウムアジドからなる緩衝液Bを使用した50%パーセント緩衝液Bに至る線形増加塩勾配を適用した。ラン全体を280nm光学的吸収率でモニタした。分析は、ソフトウェアラン評価シートに記録された280nmシグナルのピーク積分により行った。このアッセイでは、「CL-1 $\times$ I2C-scFc」と称される分子 (配列番号132) が97.6% (主ピークの曲線下面積 (=AUC)) の均一性を有することが示された。

【0338】

実施例 1 2

HICブチルによって測定したときの表面疎水性

抗体コンストラクトCL-1 $\times$ I2C-scFc及びCL-1 $\times$ I2C-6Hisの表面疎水性をフロースルーモードの疎水性相互作用クロマトグラフィーHIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) で試験した。

【0339】

50 μ g の単量体抗体コンストラクトを汎用製剤化緩衝液で500 μ lの最終容積に希釈し (10mMクエン酸、75mMリジンHCl、4%トレハロース、pH7.0)、Aekta Purifier FPLCシステムに接続した1mlブチルセファロースFFカラムに適用した。ラン全体を280、254及び210nm光学的吸収率でモニタした。分析は、Aekta Unicornソフトウェアラン評価シートに記録された280nmシグナルのピーク積分により行った。タンパク質シグナルの上昇及び下降の面積及び速度を比較し、それによって抗体コンストラクトとマトリックスの相互作用強度の指標とすることにより、溶出挙動を評価した。

【0340】

抗体コンストラクトは、良好な溶出挙動を有し、それは、迅速で完全であった。

【0341】

実施例 1 3

NOD/SCIDマウスのGSU-luc進行期胃がんモデルにおけるCLDN18.2 $\times$ CD3抗体コンストラクトの有効性評価

1日目に 5×10^6 個のGSU-luc（ルシフェラーゼ）細胞を皮下注射した雌NOD／SCIDマウスのモデルにおいて、配列番号132を有するCLDN18．2×CD3抗体コンストラクト（CL-1×I2C-scFc）の抗腫瘍活性を試験した。8日目に 2×10^7 個のエフェクター細胞（インビトロ拡大培養して活性化させたヒトCD3⁺T細胞）を腹腔内注射した。治療は、12、19及び26日目に行った（Q7D×3）。2つの対照群、1つがT細胞なし（群1）、もう1つがT細胞あり（群2）は、0．1mL／投与の媒体（25mM L-リジン、0．002%（w／v）ポリソルベート80、0．9%（w／v）塩化ナトリウム中、pH7．0）で静脈内ボラス注射によって処置した。抗体コンストラクトは、0．1mLの最終容積で1mg／kg／投与の濃度で静脈内ボラス注射によって投与した（群3）。各群のマウスの数は、5匹（群1）、10匹（群2）及び10匹（群3）であった。

10

【0342】

試験中、腫瘍をノギスによって測定し、進行を腫瘍容積（TV）の群間比較によって評価した。x日目における腫瘍成長阻害T／C [%]は、腫瘍容積を $T/C (\%) = 100 \times (\text{分析群の中央値TV}) / (\text{対照群の中央値TV})$ として計算することにより決定し、計算値を表8に示す。

【0343】

【表8】

表8: NOD/SCID マウスにおけるGSU-luc 進行期胃癌モデルのT/C [%]値。「中央値」= 分析群の腫瘍容積中央値。

20

試験日	群2			群3		
	中央値	n	T/C [%]	中央値	n	T/C [%]
11	208	10	100	208	10	100
13	275	10	100	316	10	115
15	430	10	100	369	10	86
18	695	10	100	185	10	27
20	891	10	100	123	10	14
22	896	4	100	79	10	9
25	1373	2	100	52	9	4

30

【0344】

結果を更に図8に示す。本進行期腫瘍分析においてNOD／SCIDマウスモデルで有意な腫瘍成長阻害が示された。更に、CLDN18．2×CD3抗体コンストラクトによる処置は、マウスの体重に何ら効果を及ぼさなかった（データは示さず）。

40

【0345】

実施例14

雌無胸腺ヌードマウスのSNU620-luc腫瘍形成異種移植モデルにおけるCLDN18．2×CD3抗体コンストラクトの抗腫瘍活性の評価

1日目に50%マトリゲル中のSNU620-luc（ 5×10^6 個の標的細胞）／PBMC（ 2.5×10^6 個のエフェクター細胞）混合物を皮下注射した雌無胸腺ヌードマウスのモデルにおいて、配列番号132を有するCLDN18．2×CD3抗体コンスト

50

ラクト（CL-1×I2C-scFc）の抗腫瘍活性を試験した。群1～4の治療は、3、10及び17日目に行った（Q7D）。腫瘍／PBMC混合物の投与を受けた対照群（群1）は、0.1ml／投与の媒体（25mM L-リジン、0.002%（w/v）ポリソルベート80、0.9%（w/v）塩化ナトリウム中、pH7.0）で静脈内ボーラス注射によって処置した。抗体コンストラクトは、1mg／kg／投与（群2）、0.1mg／kg／投与（群3）及び0.01mg／kg／投与（群4）の濃度で0.1mlの容積の静脈内ボーラス注射として投与した。各群のマウスの数は、10匹であった。

【0346】

試験中、腫瘍をノギスによって測定し、進行を腫瘍容積（TV）の群間比較によって評価した。x日目における腫瘍成長阻害T/C [%]は、腫瘍容積をT/C（%）＝100×（分析群の中央値TV）／（対照群の中央値TV）として計算することにより決定し、計算値を表9に示す。

【0347】

【表9】

表9: 雌無胸腺ヌードマウスにおけるSNU620-luc腫瘍形成異種移植モデルのT/C [%]値。「中央値」＝分析群の腫瘍容積中央値。

日	群1		群2		群3		群4		群5	
	中央値	T/C [%]	中央値	T/C [%]	中央値	T/C [%]	中央値	T/C [%]	中央値	T/C [%]
5	142	100	97	68	107	76	148	104	156	110
8	196	100	53	27	96	49	110	56	180	91
10	231	100	34	15	51	22	83	36	217	94
12	274	100	21	8	29	11	46	17	168	61
15	321	100	13	4	19	6	27	8	70	22
17	353	100	10	3	13	4	21	6	44	12
19	448	100	8	2	11	2	16	4	53	12
22	552	100	7	1	10	2	15	3	64	12

【0348】

結果を更に図9に示す。CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトの全ての試験濃度で無胸腺ヌードマウスモデルにおいて有意な腫瘍成長阻害が示された。更に、CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトによる処置は、マウスの体重に何ら効果を及ぼさなかった（データは示さず）。

【0349】

実施例15

カニクイザル探索的毒性試験

CLDN18.2×CD3抗体コンストラクトCL-1×I2C-6His（配列番号131）で静脈内投与による探索的NHP忍容性試験を実施した。25μg／kg／日（ヒトEC90の約20倍）の出発用量が良好に忍容された後、全身曝露を実現した。125μg／kg／日（ヒトEC90の約120倍）の用量漸増の結果、CLDN18.2を標的とするT細胞会合抗体コンストラクトから予想される臨床的効果並びに病理組織学的

効果が得られた。

【0350】

実施例16

インビトロ併用療法試験

CL-1×I2C-scFcによる治療は、ヒトT細胞を活性化し、T細胞上のPD-1の上方制御につながる（データは示さず）。この治療は、腫瘍細胞上のPD-L1の上方制御にもつながり得る。PD-L1を過剰発現するように、CLDN18.2陽性であるGSU及びNUG-C4胃がん細胞株をエンジニアリングした。配列番号360に示されるとおりの重鎖アミノ酸配列と、配列番号361に示されるとおりの軽鎖アミノ酸配列とを有する抗PD-1抗体の非存在下又は存在下で細胞をCL-1×I2C-scFcとインキュベートし、且つ活性化ヒトT細胞とインキュベートした。24時間のインキュベーション後に細胞傷害性を評価した。結果は、以下の表10に示す。

【0351】

【表10】

表 10: 各 2 つの異なる細胞株についての 2 つの別個の細胞傷害性アッセイの EC₅₀ 値及び EC₉₀ 値 [pM]。

	GSU		NUG-C4	
	EC ₅₀	EC ₉₀	EC ₅₀	EC ₉₀
CL-1xI2C-scFc 単独	52.8 ± 9.4	168.0 ± 77.7	168.0 ± 85.1	712 ± 91.7
CL-1xI2C-scFc + 抗 PD-1 抗体	28.1 ± 10.7	83.4 ± 45.0	63.9 ± 57.0	219.9 ± 77.2

【0352】

このアッセイは、抗PD-1抗体を加えると本発明のCD3×CLDN18.2抗体コンストラクトの有効性が高まることを実証する。

【0353】

実施例17

マウスにおける併用療法試験

ヒト／マウスキメラCD3εノックインマウスモデルを使用して、本明細書に記載されるとおりの二特異性抗体コンストラクトの有効性を潜在的に亢進させるための抗体／抗体コンストラクトの治療的併用を評価した。二特異性単鎖抗ヒトCD3（「I2C」scFv）×抗マウスCLDN18.2（scFv）-scFcサロゲート抗体コンストラクトを作成した。この分子は、インビトロでマウスCLDN18.2発現細胞に対して強力な活性を実証した。次に、この分子について、遺伝子修飾された免疫コンピテントマウスモデル（ヒト／マウスキメラCD3εノックイン）において、CLDN18.2陽性皮下移植腫瘍（B16F10 muCLDN18.2同系モデル）に対する抗マウスPD-1抗体、抗マウスCTLA4抗体及び抗マウス4-1BB（CD137）抗体と併用したその抗腫瘍活性を試験した。この試験デザインに従い、10日目、約50～100mm³の腫瘍容積を有するマウスを無作為化した。各群には10匹のマウスを含めた。11及び18日目にCD3×CLDN18.2抗体コンストラクト（150μg/kg）又は対照（抗CD3×抗EGFRvIII、150μg/kg）二特異性抗体コンストラクトを投与（i.v.）し、11、14、17及び20日目に抗体（抗PD-1 100μg/kg；抗4-

1BB 150 μ g ; 抗CTLA4 300 μ g ; 対照として抗体アイソタイプ) を投与した。10、13、17、20及び25日目に腫瘍容積を測定した(最終摘出、全群)。

【0354】

3つ全ての抗体が二特異性コンストラクトの有効性を亢進させた。アゴニスト抗4-1BBモノクローナル抗体は、CLDN18.2陽性腫瘍に対して単一薬剤活性を示さなかった。具体的には、25日目の腫瘍成長阻害(TGI)は、以下のとおり決定された。

対照二特異性抗体コンストラクト+抗体アイソタイプ→0%(標準)

対照二特異性抗体コンストラクト+抗4-1BB ab→有意差なし

対照二特異性抗体コンストラクト+抗CTLA-4 ab→21%

CD3×CLDN18.2抗体コンストラクト+抗体アイソタイプ→36%

対照二特異性抗体コンストラクト+抗PD-1 ab→57%

CD3×CLDN18.2抗体コンストラクト+抗CTLA-4 ab→76%

CD3×CLDN18.2抗体コンストラクト+抗4-1BB ab→77%

CD3×CLDN18.2抗体コンストラクト+抗PD-1 ab→79%

10

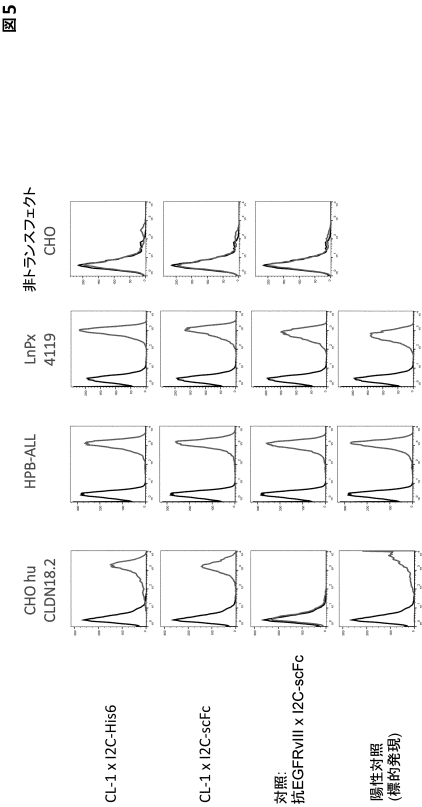
20

30

40

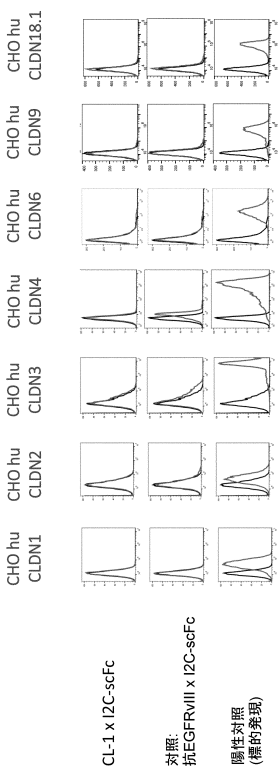
50

【図 5】

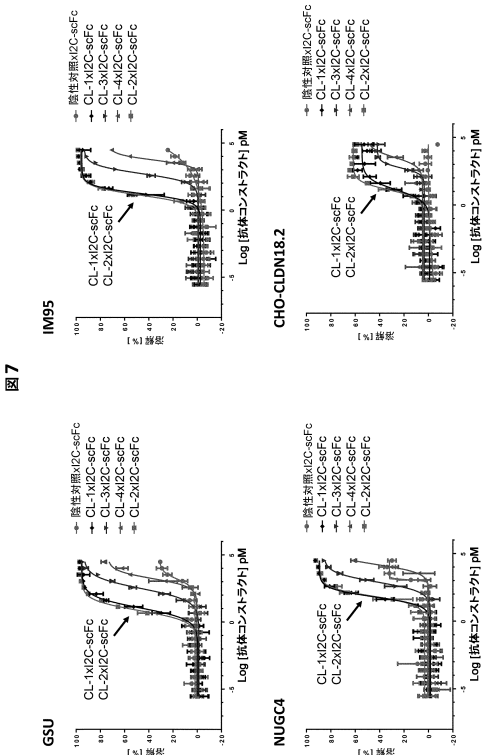


【図 6】

図 6

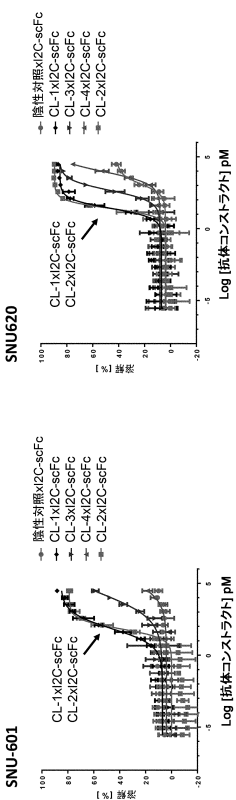


【図 7 - 1】

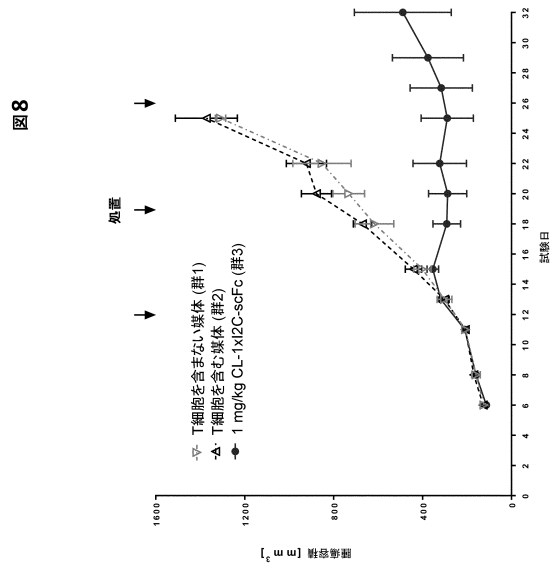


【図 7 - 2】

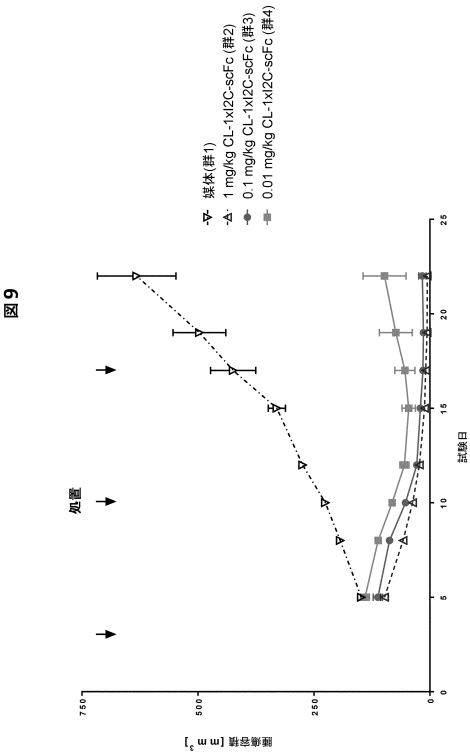
図 7 (続き)



【図 8】



【図 9】



【配列表】

[0007577435000001.app](#)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	

シュタッフエルゼーシュトラッセ・2、アムジェン リサーチ (ミュニッック) ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング気付

(72)発明者

クラウディア・ブルーム

ドイツ国、8 1 4 7 7・ミュニッック、シュタッフエルゼーシュトラッセ・2、アムジェン リサーチ (ミュニッック) ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング気付

(72)発明者

ヨハannes・ブローギー

ドイツ国、8 1 4 7 7・ミュニッック、シュタッフエルゼーシュトラッセ・2、アムジェン リサーチ (ミュニッック) ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング気付

(72)発明者

トビアス・ラウム

ドイツ国、8 1 4 7 7・ミュニッック、シュタッフエルゼーシュトラッセ・2、アムジェン リサーチ (ミュニッック) ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング気付

(72)発明者

エリーザベト・ナールボルト

ドイツ国、8 1 4 7 7・ミュニッック、シュタッフエルゼーシュトラッセ・2、アムジェン リサーチ (ミュニッック) ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング気付

(72)発明者

タラ・アーベッドソン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0-1 7 9 9、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド気付

(72)発明者

アーウィン・チェン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0-1 7 9 9、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド気付

(72)発明者

サンドラ・ロス

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0-1 7 9 9、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド気付

(72)発明者

ジュリー・ベリス

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0-1 7 9 9、サウザンド・オークス、ワン・アムジェン・センター・ドライブ、アムジェン・インコーポレーテッド気付

審査官 林 康子

(56)参考文献

特表2016-500059 (JP, A)

国際公開第2018/054484 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15/13

C 0 7 K 16/46

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

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

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