

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-514610

(P2025-514610A)

(43)公表日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 7 6
C 1 2 N 5/0783(2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全77頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2024-556337(P2024-556337)	(71)出願人	519093229
(86)(22)出願日	令和5年3月24日(2023.3.24)		シャンハイ・ヘンリウス・バイオテック
(85)翻訳文提出日	令和6年9月20日(2024.9.20)		・インコーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/083531		SHANGHAI HENLIUS BI
(87)国際公開番号	WO2023/179740		OTECH, INC.
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)		中華人民共和国シャンハイ、ジャンヘン
(31)優先権主張番号	PCT/CN2022/082932		・ロード、ナンバー1999、ブロック
(32)優先日	令和4年3月25日(2022.3.25)		7、ルーム303、304
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(71)出願人	524227734
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV		シャンハイ ヘンリウス バイオファーマ
	最終頁に続く		スーティカル カンパニー リミテッド
			SHANGHAI HENLIUS BI
			OPHARMACEUTICAL CO
			., LTD.
			中華人民共和国 200233 シャンハ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗MSLN抗体及び使用方法

(57)【要約】

本開示は、MSLNに結合する抗体及び抗体誘導体、並びにそれらの使用方法に関する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体は、MSLNに結合する単ドメイン抗体を含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

M S L N に結合する抗体であって、 1×10^{-7} M 以下の K D で M S L N に結合する単一ドメイン抗体を含む、抗体。

【請求項 2】

前記単一ドメイン抗体は、 5×10^{-8} M 以下の K D で M S L N に結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記単一ドメイン抗体は、 1×10^{-8} M 以下の K D で M S L N に結合する、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

前記単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-10} M ~ 約 5×10^{-8} M の K D で M S L N に結合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 5】

前記単一ドメイン抗体は V H H を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 6】

前記単一ドメイン抗体又は前記 V H H は、重鎖可変領域 (V H) を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記単一ドメイン抗体は、

20

a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、

b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、

c) 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、

d) 配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、

30

e) 配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、

f) 配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、

g) 配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 33 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、又は

40

h) 配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 38 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、

を含む重鎖可変領域を含む参照抗 M S L N 単一ドメイン抗体と、M S L N への結合に関して交差競合する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記単一ドメイン抗体は、

a) 配列番号 1、6、11、16、21、26、31 若しくは 36 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、又は最大約 3 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可

50

変領域 C D R 1、

b) 配列番号 2、7、12、17、22、27、32 若しくは 37 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、又は最大約 3 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域 C D R 2、或いは

c) 配列番号 3、8、13、18、23、28、33 若しくは 38 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、又は最大約 3 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域 C D R 3、

を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 9】

前記単一ドメイン抗体は、C D R 1 ドメイン、C D R 2 ドメイン、及び C D R 3 ドメインを含む重鎖可変領域を含み、そのうち、前記 C D R 1 ドメイン、前記 C D R 2 ドメイン、及び前記 C D R 3 ドメインはそれぞれ、配列番号 4、9、14、19、24、29、34 及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む参照重鎖可変領域に含まれる、C D R 1 ドメイン、C D R 2 ドメイン、及び C D R 3 ドメインを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

10

【請求項 10】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

20

【請求項 11】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 12】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

30

【請求項 13】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 14】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

【請求項 15】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 16】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 33 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

50

【請求項 17】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR1、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR2、及び配列番号 38 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 CDR3 を含む、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 18】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 4、9、14、19、24、29、34 及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも約 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～17 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 19】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 20】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 21】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 22】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 23】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 24】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 25】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 26】

前記単一ドメイン抗体は、配列番号 39 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項 1～18 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 27】

前記単一ドメイン抗体はヒト抗体を含む、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 28】

前記抗体は Fc 領域を含む、請求項 1～27 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 29】

前記 Fc 領域は、ヒト Fc 領域を含む、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 30】

前記 Fc 領域は、IgG、IgA、IgD、IgE、及び IgM の Fc 領域からなる群から選択される Fc 領域を含む、請求項 1～29 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 31】

前記 Fc 領域は、IgG1、IgG2、IgG3、及び IgG4 の Fc 領域からなる群から選択される Fc 領域を含む、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 32】

前記 Fc 領域は IgG1 Fc 領域を含む、請求項 1～31 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

前記 I g G 1 F c 領域は、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を増強する 1 つ又は複数の変異を含む、請求項 3 2 に記載の抗体。

【請求項 3 4】

前記 I g G 1 F c 領域は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、及び Y 3 0 0 L の変異、S 2 3 9 D、A 3 3 0 L、及び I 3 3 2 E の変異、又は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、及び P 3 9 6 L の変異を含む、請求項 3 2 又は 3 3 に記載の抗体。

【請求項 3 5】

前記 I g G 1 F c 領域は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、及び Y 3 0 0 L の変異を含む、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

10

【請求項 3 6】

前記 I g G 1 F c 領域は、S 2 3 9 D、A 3 3 0 L、及び I 3 3 2 E の変異を含む、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 3 7】

前記 I g G 1 F c 領域は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、及び P 3 9 6 L の変異を含む、請求項 3 2 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 3 8】

前記重鎖可変領域は、リンカーを介して F c 領域に連結する、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 3 9】

20

前記リンカーはペプチドリンカーである、請求項 3 8 に記載の抗体。

【請求項 4 0】

前記ペプチドリンカーは、約 4 ~ 約 3 0 個のアミノ酸を含む、請求項 3 9 に記載の抗体

【請求項 4 1】

前記ペプチドリンカーは、配列番号 4 4 ~ 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 9 又は 4 0 に記載の抗体。

【請求項 4 2】

前記抗体は、完全長免疫グロブリン、一本鎖 F v (s c F v) 断片、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ') 2、F v 断片、ジスルフィド安定化 F v 断片 (d s F v)、(d s F v) 2、V H H、V H H - F c 融合物、F v - F c 融合物、s c F v - F c 融合物、s c F v - F v 融合物、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の抗体。

30

【請求項 4 3】

前記抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体に含まれ、そのうち、前記多重特異性抗体は、第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の抗体部分を含む、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 4 4】

前記第 2 の抗原は腫瘍関連抗原である、請求項 4 3 に記載の抗体。

【請求項 4 5】

40

前記腫瘍関連抗原は、H e r - 2、E G F R、P D L 1、c - M e t、B 細胞成熟抗原 (B C M A)、カルボニックアンヒドラーゼ I X (C A 1 X)、癌胎児性抗原 (C E A)、C D 5、C D 7、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 4、C D 4 9 f、C D 5 6、C D 7 4、C D 1 2 3、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 2 7 6 (B 7 H 3)、上皮糖タンパク質 (E G P 2)、栄養膜細胞表面抗原 2 (T R O P - 2)、上皮糖タンパク質 - 4 0 (E G P - 4 0)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、受容体チロシンプロテインキナーゼ e r b - B 2, 3, 4、葉酸結合タンパク質 (F B P)、胎児アセチルコリン受容体 (A C h R)、葉酸受容体 a、ガングリオシド G 2 (G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A

50

1.9.9)、ルイスY (LeY)、B7H3、L1細胞接着分子(L1CAM)、ムチン16 (Muc-16)、ムチン1 (Muc-1)、NG2Dリガンド、癌胎児抗原(h5T4)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72 (TAG-72)、クローディン18.2 (CLDN18.2)、血管内皮成長因子R2 (VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)、1型チロシンプロテインキナーゼ膜貫通受容体(ROR1)、PVR、PVRL2、GPC3、CD47、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項44に記載の抗体。

【請求項46】

前記第2の抗原は、免疫チェックポイント制御因子である、請求項45に記載の抗体。

10

【請求項47】

前記免疫チェックポイント制御因子は、TIGIT、PD1、CTLA4、LAG-3、2B4、BTLA、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項46に記載の抗体。

【請求項48】

前記第2の抗原は、免疫共刺激分子、又はT細胞受容体/CD3複合体のサブユニットである、請求項47に記載の抗体。

【請求項49】

前記免疫共刺激は、CD28、ICOS、CD27、4-1BB、OX40、及びCD40、並びにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項48に記載の抗体。

20

【請求項50】

前記T細胞受容体/CD3複合体の前記サブユニットは、CD3、CD3、CD3、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、請求項49に記載の抗体。

【請求項51】

治療剤又は標識に連結する、請求項1~50のいずれか1項に記載の抗体を含む、免疫複合体。

【請求項52】

前記治療剤は、細胞毒素又は放射性同位体である、請求項51に記載の免疫複合体。

30

【請求項53】

前記標識は、放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される、請求項52に記載の免疫複合体。

【請求項54】

請求項1~50のいずれか1項に記載の抗体を含む細胞外抗原結合ドメインを含む、抗原認識受容体。

【請求項55】

キメラ抗原受容体(CAR)又は組換えT細胞受容体である、請求項54に記載の抗原認識受容体。

【請求項56】

CARである、請求項54又は55に記載の抗原認識受容体。

40

【請求項57】

前記抗体はVHHを含む、請求項54~56のいずれか1項に記載の抗原認識受容体。

【請求項58】

請求項54~57のいずれか1項に記載の抗原認識受容体を含む、免疫応答細胞。

【請求項59】

前記免疫応答細胞は、T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、制御性T細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、及び骨髄細胞からなる群から選択される、請求項58に記載の免疫応答細胞。

【請求項60】

50

前記免疫応答細胞はT細胞である、請求項59に記載の免疫応答細胞。

【請求項61】

a) 請求項1～50のいずれか1項に記載の抗体、請求項51～53のいずれか1項に記載の免疫複合体、又は請求項58～60のいずれか1項に記載の免疫応答細胞、及びb) 薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項62】

請求項1～50のいずれか1項に記載の抗体をコードする、1つ又は複数の核酸。

【請求項63】

請求項62に記載の核酸を含む、1つ又は複数のベクター。

【請求項64】

請求項62に記載の核酸又は請求項63に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項65】

請求項51に記載の宿主細胞において前記抗体を発現させることと、前記宿主細胞から前記抗体を単離することと、を含む、請求項1～50のいずれか1項に記載の抗体を調製する方法。

【請求項66】

被験体における腫瘍量を軽減する方法であって、前記被験体に、有効量の請求項1～50のいずれか1項に記載の抗体、請求項51～53のいずれか1項に記載の免疫複合体、請求項58～60のいずれか1項に記載の免疫応答細胞、又は請求項61に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項67】

前記方法は、腫瘍細胞の数を減少させる、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記方法は、腫瘍サイズを減少させる、請求項66又は67に記載の方法。

【請求項69】

前記方法は、前記被験体における腫瘍を根絶する、請求項66～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

前記腫瘍は、高いマイクロサテライト不安定性(MSI)を示す、請求項66～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項71】

前記腫瘍は、中皮腫、肺癌、膵癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌、胸膜腫瘍、グリア芽腫、食道癌、胃癌、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃腫瘍、胆管癌、頭頸癌、血液癌、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項66～70のいずれか1項に記載の方法。

【請求項72】

癌を治療及び/又は予防する方法であって、前記被験体に、有効量の請求項1～50のいずれか1項に記載の抗体、請求項51～53のいずれか1項に記載の免疫複合体、請求項58～60のいずれか1項に記載の免疫応答細胞、又は請求項61に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項73】

癌を有する被験体の生存期間を延長する方法であって、前記被験体に、有効量の請求項1～50のいずれか1項に記載の抗体、請求項51～53のいずれか1項に記載の免疫複合体、請求項58～60のいずれか1項に記載の免疫応答細胞、又は請求項61に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項74】

前記癌は、高いマイクロサテライト不安定性(MSI)を示す、請求項72又は73に記載の方法。

【請求項75】

前記癌は、中皮腫、肺癌、膵癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌、胸膜腫瘍、グリア芽腫、食道

10

20

30

40

50

癌、胃癌、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃腫瘍、胆管癌、頭頸癌、血液癌、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 2 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 6】

薬剤として使用するための、請求項 1 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7 7】

癌の治療に使用するための、請求項 1 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7 8】

薬剤として使用するための、請求項 6 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7 9】

癌の治療に使用するための、請求項 6 1 に記載の医薬組成物。

10

【請求項 8 0】

前記癌は、高いマイクロサテライト不安定性 (M S I) を示す、請求項 7 7 に記載の抗体、又は請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 1】

前記癌は、中皮腫、肺癌、膵癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌、胸膜腫瘍、グリア芽腫、食道癌、胃癌、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃腫瘍、胆管癌、頭頸癌、血液癌、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 7 7 に記載の抗体、又は請求項 7 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 8 2】

請求項 1 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の抗体、請求項 5 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の免疫複合体、請求項 6 1 に記載の医薬組成物、請求項 6 2 に記載の核酸、請求項 6 3 に記載のベクター、又は請求項 5 8 ~ 6 0 に記載の免疫応答細胞を含む、キット。

20

【請求項 8 3】

新生物を治療及び / 又は予防するための、書面による指示を更に含む、請求項 8 2 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本開示は、M S L N に結合する抗体及び抗体誘導体、並びにそれらの使用方法に関する

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

メソセリン (M S L N) は、中皮細胞で発現する、4 0 k D a のグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー細胞表面タンパク質である。M S L N の正確な機能ははっきりとしていないが、腫瘍分化抗原として周知であり、多くの種類の腫瘍、例えば、上皮型中皮腫、卵巣癌、膵臓腺癌、肺腺癌、胆管癌、及びある特定の扁平上皮癌において過剰発現することが発見されている。以前の研究では、腫瘍細胞での異常な M S L N 発現が、鍵となる細胞シグナル経路、例えば、N F B、M A P K、及び P I 3 K 経路を活性化することによって腫瘍細胞増殖及び浸潤を促進したことが示されている。M S L N 発現レベルの増加が、腫瘍量及び予後不良の増大と関連することもまた、臨床研究は示した。従って、癌治療のための、治療用分子、及び M S L N を標的とする方法の開発が、当該技術分野において必要とされている。

40

【発明の概要】

【0 0 0 3】

本開示は、単一特異性抗 M S L N 抗体、及び M S L N と 1 つ又は複数の他の標的に結合する多重特異性抗体を含む、M S L N に高親和性で特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体及び抗体誘導体を提供する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体は、M S L N に結合する単一ドメイン抗体を含む。本開示は、例えば、疾患及び障害、例えば、癌を治療するための、本明細書で開示する抗体及び抗体誘導体

50

、並びにそれらを含む医薬組成物の、作製及び使用方法を更に提供する。本発明は、部分的には、腫瘍細胞を標的とすることができ、及び/又は、腫瘍細胞に対する免疫応答を増加させることができ、それにより、改善された抗腫瘍効果をもたらすことができる、MSLNに結合する新規の単ドメイン抗体の発見に基づく。

【0004】

本開示は、MSLNに結合する単ドメイン抗体を含む、MSLNに結合する抗体を提供する。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、 1×10^{-7} M以下のKDでMSLNに結合する。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、 5×10^{-8} M以下のKDでMSLNに結合する。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、 1×10^{-8} M以下のKDでMSLNに結合する。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、約 1×10^{-10} M ~ 約 5×10^{-8} MのKDでMSLNに結合する。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体はVHHを含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体又はVHHは、重鎖可変領域(VH)を含む。

10

【0005】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、a) 配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、b) 配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、c) 配列番号11に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号13に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、d) 配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号18に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、e) 配列番号21に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号22に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、f) 配列番号26に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号27に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、g) 配列番号31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3、又はh) 配列番号36に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号37に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号38に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む、重鎖可変領域を含む参照抗MSLN単ドメイン抗体と、MSLNへの結合に関して交差競合する。

20

30

【0006】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、a) 配列番号1、6、11、16、21、26、31若しくは36のいずれか1つのアミノ酸配列、又は最大約3個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域CDR1、b) 配列番号2、7、12、17、22、27、32若しくは37のいずれか1つのアミノ酸配列、又は最大約3個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域CDR2、及びc) 配列番号3、8、13、18、23、28、33若しくは38のいずれか1つのアミノ酸配列、又は最大約3個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域CDR3、を含む重鎖可変領域を含む。

40

【0007】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、CDR1ドメイン、CDR2ドメイン、及びCDR3ドメインを含む重鎖可変領域を含み、そのうち、上記CDR1ドメイン、上記CDR2ドメイン、及び上記CDR3ドメインはそれぞれ、配列番号4、9、14、19、24、29、34及び39からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む参照重鎖

50

可変領域に含まれる、CDR1ドメイン、CDR2ドメイン、及びCDR3ドメインを含む。

【0008】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号6に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。ある特定の
10 実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号11に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号12に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号13に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。ある特定の
実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号17に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号18に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。ある特定の
20 実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号21に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号22に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。ある特定の
実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号26に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号27に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。ある特定の
実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号33に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。ある特定の
実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号36に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1、配列番号37に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2、及び配列番号38に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3を含む。

【0009】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号4、9、14、19、24、
29、34及び39からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも約90%の配
30 列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単
ドメイン抗体は、配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある
特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号9に示されるアミノ酸配列を含む重
鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号14に示さ
れるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗
体は、配列番号19に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の
実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号24に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可
変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号29に示されるア
ミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配
列番号34に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では
40 、単ドメイン抗体は、配列番号39に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む
。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体はヒト抗体を含む。

【0010】

ある特定の実施形態では、抗体はFc領域を含む。ある特定の実施形態では、Fc領域
は、ヒトFc領域を含む。ある特定の実施形態では、Fc領域は、IgG、IgA、Ig
D、IgE、及びIgMのFc領域からなる群から選択されるFc領域を含む。ある特定の
実施形態では、Fc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4のFc領域
からなる群から選択されるFc領域を含む。ある特定の実施形態では、Fc領域は、Ig
G1 Fc領域を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、抗体依存性細
胞傷害(ADCC)を増強する1つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、I
50

g G 1 F c 領域は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、及び Y 3 0 0 L の変異、S 2 3 9 D、A 3 3 0 L、及び I 3 3 2 E の変異、又は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、及び P 3 9 6 L の変異を含む。ある特定の実施形態では、I g G 1 F c 領域は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、及び Y 3 0 0 L の変異を含む。ある特定の実施形態では、I g G 1 F c 領域は、S 2 3 9 D、A 3 3 0 L、及び I 3 3 2 E の変異を含む。ある特定の実施形態では、I g G 1 F c 領域は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、及び P 3 9 6 L の変異を含む。

【 0 0 1 1 】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、リンカーを介して F c 領域に連結する。ある特定の実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、約 4 ~ 約 3 0 個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号 4 4 ~ 7 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗体は、完全長免疫グロブリン、一本鎖 F v (s c F v) 断片、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ') 2、F v 断片、ジスルフィド安定化 F v 断片 (d s F v)、(d s F v) 2、V H H、V H H - F c 融合物、F v - F c 融合物、s c F v - F c 融合物、s c F v - F v 融合物、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【 0 0 1 2 】

ある特定の実施形態では、抗体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体に含まれ、そのうち、多重特異性抗体は、第 2 の抗原に特異的に結合する第 2 の抗体部分を含む。ある特定の実施形態では、第 2 の抗原は腫瘍関連抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍関連抗原は、H e r - 2、E G F R、P D L 1、c - M e t、B 細胞成熟抗原 (B C M A)、カルボニックアンヒドラーゼ I X (C A 1 X)、癌胎児性抗原 (C E A)、C D 5、C D 7、C D 1 0、C D 1 9、C D 2 0、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 3 4、C D 3 8、C D 4 1、C D 4 4、C D 4 9 f、C D 5 6、C D 7 4、C D 1 2 3、C D 1 3 3、C D 1 3 8、C D 2 7 6 (B 7 H 3)、上皮糖タンパク質 (E G P 2)、栄養膜細胞表面抗原 2 (T R O P - 2)、上皮糖タンパク質 - 4 0 (E G P - 4 0)、上皮細胞接着分子 (E p C A M)、受容体チロシン - プロテインキナーゼ e r b - B 2 , 3 , 4、葉酸結合タンパク質 (F B P)、胎児アセチルコリン受容体 (A C h R)、葉酸受容体 a、ガングリオシド G 2 (G D 2)、ガングリオシド G 3 (G D 3)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (h T E R T)、キナーゼ挿入ドメイン受容体 (K D R)、ルイス A (C A 1 . 9 . 9)、ルイス Y (L e Y)、B 7 H 3、L 1 細胞接着分子 (L 1 C A M)、ムチン 1 6 (M u c - 1 6)、ムチン 1 (M u c - 1)、N G 2 D リガンド、癌胎児抗原 (h 5 T 4)、前立腺幹細胞抗原 (P S C A)、前立腺特異的膜抗原 (P S M A)、腫瘍関連糖タンパク質 7 2 (T A G - 7 2)、クローディン 1 8 . 2 (C L D N 1 8 . 2)、血管内皮成長因子 R 2 (V E G F - R 2)、ウィルムス腫瘍タンパク質 (W T - 1)、1 型チロシンプロテインキナーゼ膜貫通受容体 (R O R 1)、P V R、P V R L 2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、第 2 の抗原は、免疫チェックポイント制御因子である。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント制御因子は、T I G I T、P D 1、C T L A 4、L A G - 3、2 B 4、B T L A、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、第 2 の抗原は、免疫共刺激分子、又は T 細胞受容体 / C D 3 複合体のサブユニットである。ある特定の実施形態では、免疫共刺激分子は、C D 2 8、I C O S、C D 2 7、4 - 1 B B、O X 4 0、及び C D 4 0、並びにそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、T 細胞受容体 / C D 3 複合体のサブユニットは、C D 3、C D 3、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。

【 0 0 1 3 】

本開示は、治療剤又は標識に連結した、本明細書で開示する任意の抗体を含む免疫複合体を提供する。ある特定の実施形態では、治療剤は、細胞毒素又は放射性同位体である。ある特定の実施形態では、標識は、放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選

10

20

30

40

50

扱われる。

【0014】

本開示は、本明細書で開示する抗体を含む細胞外抗原結合ドメインを含む、抗原認識受容体を更に提供する。ある特定の実施形態では、抗原認識受容体は、キメラ抗原受容体（CAR）又は組換えT細胞受容体である。ある特定の実施形態では、抗原認識受容体はCARである。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインに含まれる抗体は、VHを含む。

【0015】

本開示は、本明細書で開示する抗原認識受容体を含む免疫応答細胞を提供する。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞は、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）、制御性T細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、及び骨髄細胞からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞はT細胞である。

10

本開示は、a)本明細書で開示する任意の抗体、本明細書で開示する任意の免疫複合体、又は本明細書で開示する任意の免疫応答細胞、及びb)薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物を提供する。

【0016】

本開示は、本明細書で開示する任意の抗体をコードする核酸、本明細書で開示する任意の核酸を含むベクター、及び本明細書で開示する任意の核酸又はベクターを含む、宿主細胞を更に提供する。

20

【0017】

本開示は、本明細書で開示する宿主細胞において抗体を発現させることと、宿主細胞から抗体を単離することと、を含む、本明細書で開示する抗体を調製する方法を提供する。本開示は、被験体における腫瘍量を軽減する方法を更に提供する。ある特定の実施形態では、上記方法は、被験体に、有効量の本明細書で開示する抗体、本明細書で開示する免疫複合体、又は本明細書で開示する医薬組成物を投与することを含む。ある特定の実施形態では、上記方法は、腫瘍細胞の数を減少させる。ある特定の実施形態では、上記方法は、腫瘍サイズを減少させる。ある特定の実施形態では、上記方法は、被験体における腫瘍を根絶する。ある特定の実施形態では、腫瘍は、高いマイクロサテライト不安定性（MSI）を示す。ある特定の実施形態では、腫瘍は、中皮腫、肺癌、膵癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌、胸膜腫瘍、グリア芽腫、食道癌、胃癌、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃腫瘍、胆管癌、頭頸癌、血液癌、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

30

【0018】

本開示は、癌を治療及び/若しくは予防する方法、又は癌を有する被験体の生存期間を延長する方法を提供する。ある特定の実施形態では、上記方法は、被験体に、有効量の本明細書で開示する抗体、本明細書で開示する免疫複合体、又は本明細書で開示する医薬組成物を投与することを含む。ある特定の実施形態では、癌は、高いマイクロサテライト不安定性（MSI）を示す。ある特定の実施形態では、癌は、中皮腫、肺癌、膵癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌、胸膜腫瘍、グリア芽腫、食道癌、胃癌、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃腫瘍、胆管癌、頭頸癌、血液癌、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

40

【0019】

本開示は、薬剤として使用するための、本明細書で開示する任意の抗体及び/又は医薬組成物を更に提供する。本開示は、癌の治療に使用するための、本明細書で開示する任意の抗体及び/又は医薬組成物を更に提供する。ある特定の実施形態では、癌は、高いマイクロサテライト不安定性（MSI）を示す。ある特定の実施形態では、癌は、中皮腫、肺癌、膵癌、卵巣癌、乳癌、結腸癌、胸膜腫瘍、グリア芽腫、食道癌、胃癌、滑膜肉腫、胸腺癌、子宮内膜癌、胃腫瘍、胆管癌、頭頸癌、血液癌、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。

【0020】

50

本開示は、本明細書で開示する抗体、本明細書で開示する免疫複合体、本明細書で開示する医薬組成物、本明細書で開示する核酸、本明細書で開示するベクター、又は本明細書で開示する免疫応答細胞を含む、キットを提供する。ある特定の実施形態では、キットは、新生物を治療及び/又は予防するための、書面による指示を更に含む。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1A】ELISAにより評価された、ヒトMSLN(1A)及びカニクイザルMSLN(1B)に対する、代表的な抗MSLN VHHクローンの結合能力を示す。参照抗MSLN抗体、Ab237類似体を、陽性対照として使用した。抗PD1抗体、h1G4を、陰性対照として使用した。

10

【図1B】ELISAにより評価された、ヒトMSLN(1A)及びカニクイザルMSLN(1B)に対する、代表的な抗MSLN VHHクローンの結合能力を示す。参照抗MSLN抗体、Ab237類似体を、陽性対照として使用した。抗PD1抗体、h1G4を、陰性対照として使用した。

【図2】FACSにより評価された、N87細胞に対する抗MSLN VHH-Fcの結合活性を示す。Ab237類似体を、陽性対照として使用した。

【図3】NK92-CD16細胞をエフェクター細胞として、N87細胞を標的細胞として使用して、細胞溶解パーセントにより測定した、抗MSLN VHH-Fc抗体の、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を示す。

【図4】ヒトPBMCsをエフェクター細胞として、N87細胞を標的細胞として使用して、細胞溶解パーセントにより測定した、抗MSLN VHH-Fc抗体の、抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0022】

本開示は、単一特異性抗MSLN抗体、及びMSLNと1つ又は複数の他の標的に結合する多重特異性抗体を含む、MSLNに高親和性で特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体及び抗体誘導体を提供する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体は、MSLNに結合する単一ドメイン抗体を含む。本開示は、例えば、疾患及び障害、例えば、癌を治療するための、本明細書で開示する抗体及び抗体誘導体、並びにそれらを含む医薬組成物の、作製及び使用方法を更に提供する。本発明は、部分的には、腫瘍細胞を標的とすることができ、及び/又は、腫瘍細胞に対する免疫応答を増加させることができ、それにより、改善された抗腫瘍効果をもたらすことができる、MSLNに結合する新規の単一ドメイン抗体の発見に基づく。

30

【0023】

限定するものではなく、明確にするために、今回開示される主題の詳細の説明を、以下の小節に分ける：

1. 定義、
2. 抗体と抗体誘導体、
3. 使用方法、
4. 薬学的製剤、及び
5. 製品。

40

【0024】

1. 定義

【0025】

本明細書において述べられる場合、「抗体」という用語は、完全長抗体、及び任意のその抗原結合断片(即ち、抗体断片)を含む。「抗体」は、独立した分子、又は抗体誘導体の一部であることができる。例示的な抗体誘導体としては、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、抗原認識受容体(例えば、キメラ抗原受容体)、別のタンパク性又は非タンパク性部分を含む抗体複合体(例えば、抗体-薬物複合体又はポリマー被覆抗体)、及び抗体を含む他の多機能性分子が挙げられるが、これらに限定されない。

50

【0026】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」は、天然抗体構造に似ているか、又は本明細書で定義するFc領域を含有する重鎖を有する、抗体を指す。ある特定の実施形態では、完全長抗体は、2本の重鎖及び2本の軽鎖を含む。ある特定の実施形態では、軽鎖と重鎖の可変領域は、抗原結合を担う。重鎖と軽鎖の可変領域は、それぞれ、「VH」及び「VL」と呼ばれる場合がある。両方の鎖の可変領域は一般に、相補性決定領域(CDR)(LC-CDR1、LC-CDR2、及びLC-CDR3を含む軽鎖(LC)CDR、HC-CDR1、HC-CDR2、及びHC-CDR3を含む重鎖(HC)CDR)と呼ばれる、3つの高度可変ループを含有する。本明細書で開示する抗体及び抗原結合断片に対するCDR境界は、周知の慣習、例えば、後述するKabata、Chothia、MacCallum、IMGT、及びAhoの慣習により、定義又は同定することができる。重鎖又は軽鎖の3つのCDRは、CDRよりも保存されており、超可変ループを支持するための足場を形成する、フレームワーク領域(FR)として知られているフランキングストレッチの間に挿入される。重鎖と軽鎖の定常領域は、抗原結合には関与しないが、様々なエフェクター機能を示す。抗体は、その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づき、クラスに割り当てられる。抗体の5つの主要なクラス又はアイソタイプは、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMであり、これらはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 及び μ 重鎖の存在によって特徴付けられる。主要な抗体のクラスの幾つかは、IgG1(1重鎖)、IgG2(2重鎖)、IgG3(3重鎖)、IgG4(4重鎖)、IgA1(1重鎖)、又はIgA2(2重鎖)などのサブクラスに分けられる。ある特定の
10
20
実施形態では、完全長抗体はグリコシル化されている。ある特定の実施形態では、完全長抗体は、そのFc領域に連結したグリカンを含む。ある特定の実施形態では、完全長抗体は、分岐グリカンを含む。

【0027】

本明細書で使用する場合、「抗原結合部分」、「抗体断片」、及び「抗体部分」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の、1つ又は複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、ダイアボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子(例えば、scFv及びscFv-Fc)、単一ドメイン抗体、VHH、VHH-Fc、ナノボディ、ドメイン抗体、二価ドメイン抗体、又は抗原
30
35
40
に結合する抗体の任意の他の断片若しくはそれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。「VHH」は、ラクダ科動物から単離された単一ドメイン抗体を指す。ある特定の実施形態では、VHHは、ラクダ科動物重鎖抗体の重鎖の可変領域を含む。ある特定の実施形態では、VHHは、約25kDaを超えないサイズを有する。ある特定の実施形態では、VHHは、約20kDaを超えないサイズを有する。ある特定の実施形態では、VHHは、約15kDaを超えないサイズを有する。

【0028】

参照抗体と「結合に関して交差競合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体がその抗原に結合することを50%以上遮断する抗体、及び逆に、競合アッセイにおいて、抗体がその抗原に結合することを50%以上遮断する参照抗体を指す。例示的な競合アッセイは、Antibodies, HarlowとLane(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)に記載されている。
40

【0029】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を含有する最小の抗体断片である。この断片は、密接に非共有結合した1つの重鎖可変領域と1つの軽鎖可変領域の二量体で構成される。これら2つのドメインの折り畳みから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に対する抗原結合特異性を付与する6つの超可変ループ(重鎖と軽鎖のそれぞれに、3つのループ)が生じる。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は、抗原に特異的なCDRを3つのみ含むFvの半分)でさえも、抗原を認識し、それに結合することが
50

できるが、場合によっては、結合部位全体よりも親和性が低い。

【0030】

「sFv」、又は「scFv」とも略される、「一本鎖Fv」は、単一ポリペプチド鎖に接続されたV_H及びV_L抗体ドメインを含む、抗体断片である。幾つかの実施形態では、scFvポリペプチドは、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする、V_HとV_Lドメインの間のポリペプチドリッカーを更に含む。scFvの概説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, RosenburgとMore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994)を参照されたい。

10

【0031】

本明細書の目的のための、「アクセプターヒトフレームワーク」、又は「ヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変領域(V_L)フレームワーク又は重鎖可変領域(V_H)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含むことができる、又は、アミノ酸配列変化を含有することができる。ある特定の実施形態では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。ある特定の実施形態では、V_Lアクセプターヒトフレームワークは、V_Lヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

20

【0032】

「親和性」は、分子の単一の結合部位(例えば、抗体)とその結合パートナー(例えば、抗原)との非共有結合性相互作用の合計の強さを指す。特に指示がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合ペア(例えば、抗体と抗原)のメンバーの間の1:1の相互作用を反映する、固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は一般に、解離定数(K_D)で表すことができる。親和性は、本明細書に記載するものを含め、当該技術分野で周知の方法によって測定することができる。結合親和性を測定するための具体的な説明用、及び例示的な実施形態は、以下に記載されている。

【0033】

「親和性成熟」抗体は、親抗体と比較して、1つ又は複数のCDR又は超可変領域(HVR)に1つ又は複数の変更を有する抗体を指し、当該親抗体はこのような変更を有せず、これらの変更によって、抗原に対する抗体の親和性の改善がもたらされる。

30

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の源又は種に由来する一方で、重鎖及び/又は軽鎖の残部が異なる源又は種に由来する抗体を指す。ある特定の実施形態では、本明細書で開示するキメラ抗体は、マウス重鎖可変領域、及びヒトFc領域を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で開示するキメラ抗体は、ラクダ科動物重鎖可変領域、及びヒトFc領域を含む。

【0034】

本明細書で使用する場合、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重鎖及び/又は軽鎖の可変領域内の、非連続の抗原結合部位を意味することが意図される。これらの特定の領域は、Kabata, J. Biol. Chem. 252: 6609 - 6616 (1977)、Kabata, U. S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of proteins of immunological interest」(1991)、Chothia, J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)、Al-Lazikani B.ら, J. Mol. Biol., 273: 927 - 948 (1997)、MacCallumら, J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996)、AbhinandanとMartin, Mol. Immunol., 45: 3832 - 3839 (2008)、Lefranc M. P.ら, Dev. Comp. Immunol., 27: 55 -

40

50

77 (2003)、及び Honegger と Pluckthun, J. Mol. Biol., 309: 657 - 670 (2001) により記載されており、互いに比較する場合、この定義はアミノ酸残基の重なり合い又はサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体若しくは移植抗体、又はそれらの変異体の CDR を指すための定義のいずれか 1 つを適用することは、本明細書で定義されて使用される用語の範囲内であることが意図される。上記で引用した参考文献のそれぞれで定義される CDR を包含するアミノ酸残基を、比較のため下表 1 に示す。CDR 予測アルゴリズム及びインターフェースは、当該技術分野において周知であり、例えば、Abhinandan と Martin, Mol. Immunol., 45: 3832 - 3839 (2008)、Ehrenmann F. ら, Nucleic Acids Res., 38: D301 - D307 (2010)、及び Adol 10
f - Bryfogle J. ら, Nucleic Acids Res., 43: D432 - D438 (2015) を含む。本章節で引用される参考文献の内容は、本願で使用するために、且つ本明細書の 1 つ又は複数の請求項に含めることができるように、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

【0035】

表 1: CDR 定義

【0036】

【表 1】

	K a b a t ¹	C h o t h i a ²	M a c C a l l u m ³	I M G T ⁴	A H o ⁵
V _H CDR 1	31 - 35	26 - 32	30 - 35	27 - 38	25 - 40
V _H CDR 2	50 - 65	53 - 55	47 - 58	56 - 65	58 - 77
V _H CDR 3	95 - 102	96 - 101	93 - 101	105 - 1 17	109 - 1 37
V _L CDR 1	24 - 34	26 - 32	30 - 36	27 - 38	25 - 40
V _L CDR 2	50 - 56	50 - 52	46 - 55	56 - 65	58 - 77
V _L CDR 3	89 - 97	91 - 96	89 - 96	105 - 1 17	109 - 1 37

¹ 残基番号付けは、上記 K a b a t らの命名法に従う。

² 残基番号付けは、上記 C h o t h i a らの命名法に従う。

³ 残基番号付けは、上記 M a c C a l l u m らの命名法に従う。

⁴ 残基番号付けは、上記 L e f r a n c らの命名法に従う。

⁵ 残基番号付けは、上記 H o n e g g e r 及び P l u c k t h u n らの命名法に従う。

【0037】

「K a b a t における可変領域残基番号付け」、又は「K a b a t におけるアミノ酸位置番号付け」という表現、及びその変形は、上記 K a b a t らにおける抗体の編集の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域に用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用すると、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインの F R 又は C D R の短縮又はその中への挿入に対応するより少ない又は追加のアミノ酸を含有することができる。例えば、重鎖可変領域は、H 2 の残基 5 2 の後に単一のアミノ酸挿入 (K a b a t に従うと残基 5 2 a)、及び重鎖 F R 残基 8 2 の後に挿入される残基 (例えば、K a b a t に従うと、残基 8 2 a、8 2 b、及び 8 2 c) を含み得る。「標準的な」K a b a t 番号付け配列と、抗体の配列との相同領域をアライメントすることにより、所与の抗体に対して、残基の K a b a t 番号付けを決定することができる。

【0038】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体のCDRを包含するアミノ酸残基は、上記LeffranらにおけるIMGT命名法に従い、定義される。ある特定の実施形態では、完全長抗体のCDRを包含するアミノ酸残基は、上記KabataらにおけるKabata命名法に従い、定義される。ある特定の実施形態では、免疫グロブリン重鎖における、例えば、Fc領域における、残基の番号付けは、上記KabataらにおけるようなEUIンデックスの番号付けである。「KabataにおけるようなEUIンデックス」は、ヒトIgG1 EU抗体の残基番号付けを指す。

【0039】

「フレームワーク」又は「FR」は、本明細書で定義されるCDR残基以外のそれらの可変ドメイン残基である残基を指す。

【0040】

「ヒト化」抗体は、非ヒトCDR/HVR由来のアミノ酸残基と、ヒトFR由来のアミノ酸残基と、を含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインを含むものであり、そのうち、HVR/CDRの全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のHVR/CDRに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト抗体のFRに対応する。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【0041】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生された抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体、及び/又は本明細書で開示するヒト抗体を作製するための技術のいずれかを使用して作製された抗体である。ヒト抗体のこの定義は、具体的には、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む当該技術分野で周知の種々の技術を使用して産生され得る。HoogenboomとWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)、Marksら, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boernerら, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)に記載されている方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。また、van Dijkとvan de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001)を参照されたい。抗原投与に
 20 応答して、そのような抗体を産生するように修飾されているが、内因性遺伝子座が不全となっている、トランスジェニック動物、例えば、免疫したゼノマウスに抗原を投与することにより、ヒト抗体を調製することができる（例えば、XENOMOUSE（登録商標）技術に関する米国特許第6,075,181号及び第6,150,584号を参照されたい）。例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体に関する、Liら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)もまた参照されたい。

【0042】

本明細書で同定されたポリペプチド及び抗体配列に関する、「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」、又は「相同性」は、配列同一性の一部として任意の保存的置換を考慮して配列をアライメントした後の、比較されたポリペプチドにおけるアミノ酸残基と同一である、候補配列におけるアミノ酸残基のパーセント(%)として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR)、又はMUSCLEソフトウェアなどの公的に取得可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当該技術分野の技術範囲内のさまざまな方法で達成できる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書の目的のために、アミノ酸配列同一性%の値は、配列比較コンピュータプログラムMUSCLE
 40
 50

E (Edgar, R. C., *Nucleic Acids Research* 32 (5) : 1792 - 1797, 2004、Edgar, R. C., *BMC Bioinformatics* 5 (1) : 113, 2004) を使用して生成される。

【0043】

「相同」は、2つのポリペプチド間、又は2つの核酸分子間の、配列類似性又は配列同一性を指す。比較した配列の両方における位置が、同じ塩基又はアミノ酸モノマーサブユニットにより占められる場合、例えば、2つのDNA分子におけるそれぞれの位置がアデニンにより占められる場合、分子は、当該位置において相同である。2つの配列間の相同性パーセントは、2つの配列により共有される一致又は相同位置の数を、比較した位置の数で割って、100倍した関数である。例えば、2つの配列の10つの位置のうち6つが一致するか、又は相同である場合、2つの配列は60%相同である。例えば、DNA配列ATTGCC及びTATGGCは、50%の相同性を共有する。一般に、2つの配列をアライメントし、最大相同性を得る際に、比較を行う。

【0044】

任意の哺乳類種由来の抗体（例えば、免疫グロブリン）の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（「 κ 」）及びラムダ（「 λ 」）と呼ばれる2つの明確に異なるタイプのうちの一方に割り当てることができる。

【0045】

「定常ドメイン」という用語は、抗原結合部位を含有する免疫グロブリンの他の部分、即ち可変ドメインと比較して、より保存されているアミノ酸配列を有する、免疫グロブリン分子の部分の部分を指す。定常ドメインは、重鎖のCH1、CH2、及びCH3ドメイン（まとめて、CH）、並びに軽鎖のCLドメインを含有する。ある特定の実施形態では、「CH1ドメイン」（「H1」ドメインの「C1」とも呼ばれる）は、約アミノ酸118から、約アミノ酸215（EU番号付けシステム）に延びる。ある特定の実施形態では、「ヒンジ領域」は一般に、ヒトIgG1のGlu216からPro230に対応するIgG内の領域として定義される（Burton, *Molec. Immunol.* 22 : 161 - 206 (1985)）。同一位置に、重鎖間S-S結合を形成する最初及び最後のシステイン残基を配置することにより、他のIgGアイソタイプのヒンジ領域を、IgG1配列とアライメントすることができる。ある特定の実施形態では、ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」（「C2」ドメインとも呼ばれる）は通常、約アミノ酸231から約アミノ酸340に延びる。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対形成していない、という点で独特である。むしろ、2つのN結合分岐炭水化物鎖が、インタクトな天然IgG分子の2つのCH2ドメイン間に介在している。炭水化物は、ドメイン同士の対形成のための代替品を提供し、CH2ドメインの安定化を助ける可能性がある」と推測されている。Burton, *Molec. Immunol.* 22 : 161 - 206 (1985)。ある特定の実施形態では、「CH3ドメイン」（「C2」ドメインとも呼ばれる）は、CH2ドメインとFc領域のC末端との間の残基（即ち、約アミノ酸残基341から抗体配列のC末端、典型的には、IgGのアミノ酸残基446又は447）を含む。

【0046】

本明細書における「Fc領域」又は「断片結晶化可能領域」という用語は、天然配列のFc領域及び変異体Fc領域、又はその二量体を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。ある特定の実施形態では、ヒトIgG Fc領域は、Cys226から、そのカルボキシル末端まで伸びる。ある特定の実施形態では、ヒトIgG Fc領域は、Pro231から、そのカルボキシル末端まで伸びる。ある特定の実施形態では、ヒトIgG Fc領域は、CH2ドメイン及びCH3ドメインを含む。ある特定の実施形態では、Fc領域のC末端リジン（EU番号付けシステムに従うと残基447）は、例えば、抗体の産生若しくは精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を遺伝子組換えすることにより、取り除かれ得る。ある特定の実施形態では、インタクトな抗体の組成物は、K447残基が全て取り除かれた抗体集団、K447残基が取り除かれていない抗体集団、又はK447残基を有する、及び有しない抗体の混合物を有する抗体集団を含む

ことができる。本明細書に記載する抗体で使用するのに好適な天然配列Fc領域としては、ヒトIgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3、及びIgG4のFc領域が挙げられる。

「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体について描写している。好ましいFcRは、天然ヒトFcRである。更に、好ましいFcRは、IgG抗体(ガンマ受容体)に結合するものであり、これらの受容体の、アレル変異体及び選択的スプライシングを受けた形態を含む、FcRI、FcRII、及びFcRIIIサブクラスの受容体を含み、FcRII受容体としては、FcRIIA(「活性化受容体」)及びFcRIIB(「阻害受容体」)が挙げられ、それは、その細胞質ドメインが主に異なる、類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ(ITAM)を含有する。阻害性受容体FcRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ(ITIM)を含有する。(M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203 - 234 (1997)を参照されたい)。FcRは、RavetchとKinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 92 (1991)、Capeira, Immunomethods 4: 25 - 34 (1994)、及びde Haasら, J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 41 (1995)に概説される。将来同定されるFcRを含む他のFcRは、本明細書において「FcR」という用語に包含される。

10

【0047】

20

本明細書で使用する場合、「エピトープ」という用語は、抗体又は抗体誘導体が結合する抗原上の、原子又はアミノ酸の特定の基を指す。2つの抗体又は抗原結合部分は、抗原に対して競合的結合を示す場合に、抗原内の同一のエピトープに結合することができる。

【0048】

本明細書で使用する場合、「特異的に結合する」、「特異的に認識する」、及び「に対して特異的である」という用語は、生体分子を含む分子の不均質な集団の存在下において標的の存在を決定する、標的と抗体又は抗体分子との間の結合といった、測定可能及び再現可能な相互作用を指す。例えば、標的(エピトープであることができる)を特異的に認識する抗体又は抗体部分は、他の標的への結合よりも、高い親和性、高いアフィニティー、高い即応性、及び/又は長い持続時間で、この標的に結合する抗体又は抗体部分である。幾つかの実施形態では、無関係の標的への抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定する、標的への抗体の結合の約10%未満である。幾つかの実施形態では、標的に特異的に結合する抗体は、 $10^{-5}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $10^{-11}M$ 、又は $10^{-12}M$ の解離定数(K_D)を有する。幾つかの実施形態では、抗体は、異なる種由来のタンパク質の間で保存されているタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。幾つかの実施形態では、特異的結合は排他的結合を含むことができるが、必ずしも必要ない。抗体又は抗原結合ドメインの結合特異性は、当該技術分野において周知の方法により実験によって決定することができる。このような方法は、ウエスタンブロット、ELISAテスト、RIAテスト、ECLテスト、IRMAテスト、EIAテスト、BIACORETMテスト、及びペプチドスキャンを含むが、これらに限定されない。

30

40

【0049】

「単離した」抗体(又は、構築物)は、その産生環境の構成成分(例えば、自然又は組換え)から同定されている、分離されている、及び/又は回収されているものである。ある特定の実施形態では、単離したポリペプチドは、その産生環境からの、全ての他の構成成分との関連がない、又は、実質的に関連がない。

【0050】

本明細書に記載する構築物、抗体、又はその抗原結合断片をコードする「単離した」核酸分子は、それが産生される環境において通常関連する少なくとも一つの汚染物核酸分子から同定され、分離された核酸分子である。ある特定の実施形態では、単離した核酸は、

50

産生環境に関連する全ての構成成分との関連がない、又は、実質的に関連がない。本明細書に記載するポリペプチド及び抗体をコードする単離した核酸分子は、自然において見出される形態又は設定以外の形態である。従って、単離した核酸分子は、細胞内に自然に存在している本明細書に記載のポリペプチド及び抗体をコードする核酸と区別される。単離した核酸は、通常核酸分子を含む細胞に含まれている当該核酸分子を含むが、この核酸分子が、染色体外に存在するか、又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

「調節配列」という用語は、特定の宿主生物内で作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な、DNA配列を指す。原核生物に対して適した調節配列としては、例えば、プロモーター、任意選択的に、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、及びエンハンサーを利用することが知られている。

10

【0051】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係で配置されている場合、「作動可能に連結される」。例えば、プレ配列又は分泌リーダーのためのDNAは、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、ポリペプチドのためのDNAに作動可能に連結し、プロモーター若しくはエンハンサーは、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し、又はリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置される場合、コード配列に作動可能に連結する。一般に、「作動可能に連結される」ことは、連結されるDNA配列が連続的であり、分泌リーダーである場合は、連続的であり、且つ読み取りフレーム内にあることを意味する。しかし、エンハンサーは連続的である必要はない。連結は、都合の良い制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプター又はリンカーを、従来の慣習に従って用いる。

20

【0052】

本明細書で使用する場合、「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を伝搬し得る核酸分子を指す。この用語には、自己複製する核酸構造として働くベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクターが含まれる。特定のベクターは、それらが機能的に連結される核酸の発現を導くことが可能である。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

30

【0053】

本明細書で使用する場合、「トランスフェクトした」、又は「形質転換した」、又は「形質導入した」という用語は、外因性核酸が宿主細胞に移される、又は導入されるプロセスを指す。「トランスフェクトした」、又は「形質転換した」、又は「形質導入した」細胞は、外因性核酸がトランスフェクト、形質転換、又は形質導入された細胞であり、この細胞は、初代対象細胞、及びその子孫を含む。

【0054】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」という用語は互換的に使用され、外因性核酸が導入されている細胞を指し、そのような細胞の子孫を包含する。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、これらには初代形質転換細胞、及びそれに由来する子孫が継代数に関係なく含まれる。子孫は、親細胞と核酸含量が完全に同一でなくてもよく、突然変異を含んでもよい。本明細書には、最初に形質転換された細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異子孫が含まれる。

40

【0055】

「被験体」、「個体」、及び「患者」という用語は、本明細書では互換的に使用され、限定されるものではないが、ヒト、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、齧歯類、又は霊長類を含む、哺乳類を指す。幾つかの実施形態では、被験体はヒトである。

薬剤の「有効量」は、必要な用量及び期間で所望の治療又は予防結果を達成するのに有効な量を指す。具体的な用量は、選択される特定の薬剤、従うべき投与レジメン、それが

50

他の化合物と組み合わせて投与されるか否か、投与のタイミング、イメージングされる組織、及びそれが運搬される物理的デリバリーシステムのうちの1つ又は複数に応じて変化し得る。

「治療有効量」の、本願の物質/分子、アゴニスト、又はアンタゴニストは、個体の病状、年齢、性別、及び体重、並びに当該物質/分子、アゴニスト、又はアンタゴニストが個体において所望の応答を誘発する能力などの因子によって変化し得る。治療有効量はまた、治療上の有益な効果が、物質/分子、アゴニスト、又はアンタゴニストの任意の毒性又は有害作用にまさる量でもある。治療有効量は、1回又は複数回の投与で送達することができる。

「予防有効量」は、必要な用量及び期間で所望の治療又は予防結果を達成するのに有効な量を指す。必ずしもではないが典型的には、予防的用量は疾患の初期段階時又は前に被験体において使用されるため、予防有効量は、治療有効量よりも少ない。

【0056】

本明細書で使用する場合、「治療」又は「治療すること」は、臨床結果を含む有益な、又は所望の結果を得るためのアプローチである。本願の目的のために、有益な、又は所望の臨床結果としては、以下のうちの1つ又は複数：疾患から生じる1つ又は複数の症状の緩和、疾患の程度の軽減、疾患の安定化（例えば、疾患の悪化の予防若しくは遅延）、疾患の拡散（例えば、転移）の予防若しくは遅延、疾患の再発の予防若しくは遅延、疾患の進行の遅延若しくは緩め、病状の改善、疾患の寛解（部分的若しくは完全的）の提供、疾患の治療に必要な1つ又は複数の他の薬物の用量の減少、疾患の進行の遅延、生活の質の向上若しくは改善、体重増加の増加、及び/又は生存期間の延長が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」には、癌の病理学的結果（例えば、腫瘍体積など）の減少もまた含まれる。本願の方法は、これらの治療の態様のいずれか1つ又は複数を検討する。「治療」は必ずしも、治療されている状態が治癒することを意味するわけではない。

【0057】

本明細書に記載される本願の実施形態は「... からなる」及び/又は「基本的に... からなる」の実施形態を含むものと理解される。

【0058】

本明細書で使用する場合、「約」又は「大体」という用語は、当業者により決定された特定の値が許容可能な誤差範囲内にあることを意味し、これは、値をどのように測定又は決定するかによって部分的に左右され、即ち、測定システムによって制限される。ある特定の実施形態では、「約」は、当該技術分野の実践によれば、3標準偏差、又は3標準偏差超以内を意味し得る。ある特定の実施形態では、「約」は、所与の値の最大20%、例えば、最大10%、最大5%、又は最大1%の範囲を意味することができる。ある特定の実施形態では、とりわけ、生物学的系又はプロセスに関して、この用語は、ある値のマグニチュードのオーダー以内、例えば、5倍以内、又は2倍以内を意味することができる。

【0059】

本明細書で使用する場合、「調節」という用語は、正の方向、又は負の方向に変更することを意味する。例示的な調節としては、約1%、約2%、約5%、約10%、約25%、約50%、約75%、又は約100%の変化が挙げられる。

【0060】

本明細書で使用する場合、「増加」という用語は、少なくとも約5%、正の方向に変更することを意味する。変更は、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%、約100%、又はそれ以上であることができる。

【0061】

本明細書で使用する場合、「減少」という用語は、少なくとも約5%、負の方向に変更することを意味する。変更は、約5%、約10%、約25%、約30%、約50%、約75%、又は更に約100%であることができる。

【0062】

本明細書で使用する「約X~Y」という用語は、「約X~約Y」と同じ意味を有する。

10

20

30

40

50

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「1つ/種(a)」、「又は(or)」及び「これら/当該/上記/前記(the)」は、文脈が明らかに別様を指示しない限り、複数の指示対象を含む。

【0063】

「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に帰属可能な生物学的活性を指し、これは、抗体アイソタイプによって変わる。抗体エフェクター機能の例としては、以下のものが挙げられる：C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞傷害(ADCC)、ファゴサイトーシス、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体)の下方制御、及びB細胞活性化。

【0064】

「免疫複合体」とは、細胞毒性剤を含むが、これに限定されない1つ又は複数の異種分子に複合体化される抗体を指す。

【0065】

「薬学的製剤」という用語は、その中に含有される活性成分の生物学的活性が有効となるような形態であり、且つ製剤が投与され得る被験体に対して許容できない毒性を有する追加の成分を含有しない、製剤を指す。

【0066】

本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される担体」は、被験体にとって無毒である、活性成分以外の薬学的製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0067】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗体の抗原への結合に関与する、抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。ある特定の実施形態では、天然抗体の重鎖と軽鎖の可変ドメイン(それぞれ、VH及びVLである)は一般に、類似の構造を持ち、各ドメインが、4つの保存フレームワーク領域(FR)及び3つのCDRを含む(例えば、Kindtら, *Kuby Immunology*, 61ed., W.H. Freeman and Co., 91ページ(2007)を参照されたい)。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を与えるに十分であり得る。更に、特定の抗原に結合する抗体は、その抗原に結合する抗体から、VH又はVLドメインを使用して単離され、相補的VL又はVHドメインのライブラリをそれぞれスクリーニングすることができる。例えば、Portolanoら, *J. Immunol.* 150: 880-887(1993)、Clarksonら, *Nature* 352: 624-628(1991)を参照されたい。

【0068】

本明細書で使用する場合、「抗原認識受容体」という用語は、抗原へのその結合に応じ、免疫応答細胞(例えば、T細胞)を活性化することができる受容体を指す。抗原認識受容体の非限定的な例としては、天然及び修飾T細胞受容体(「TCR」)及びキメラ抗原受容体(「CAR」)が挙げられる。

【0069】

本明細書で使用する場合、「キメラ抗原受容体」又は「CAR」という用語は、免疫応答細胞を活性化又は刺激可能な細胞内シグナル伝達ドメインに融合した、細胞外抗原結合ドメインと、膜貫通ドメインと、を含む分子を指す。ある特定の実施形態では、CARの細胞外抗原結合ドメインは、抗体又は抗体断片、例えば、VHH又はscFvを含む。ある特定の実施形態では、抗体(例えば、VHH又はscFv)は、膜貫通ドメインに融合し、これは、細胞内シグナル伝達ドメインに融合する。ある特定の実施形態では、CARは、抗原に対して高い結合親和性又は結合活性を有するように選択される。

「免疫応答細胞」とは、免疫応答において機能する細胞、又はその前駆細胞若しくは子孫を意味する。

【0070】

本明細書で使用する場合、「MSLN」、「MSLNタンパク質」、又は「MSLNポリペプチド」は、霊長類(例えば、ヒト及びカニクイザル)などの哺乳類を含む、任意の

10

20

30

40

50

脊椎動物源由来の任意のMSLNポリペプチド、又はその任意の断片を指し、任意選択的に、最大1個、最大2個、最大3個、最大4個、最大5個、最大6個、最大7個、最大8個、最大9個若しくは最大10個のアミノ酸置換、付加、及び/又は欠失を含むことができる。この用語は、完全長の未処理MSLN、加えて、細胞内での処理によりもたらされるMSLNの任意の形態を包含する。この用語は、MSLNの自然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又はアレル変異体も包含する。ある特定の実施形態では、MSLNポリペプチドは、NCBI参照番号：NP__001170826.1、NP__005814.2、又はNP__037536.2を有する配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、又は少なくとも約100% 10
%相同又は同一である、アミノ酸配列を含む、又は、有する（本明細書における相同性は、BLAST又はFASTAなどの標準的なソフトウェアを用いて決定することができる）。ある特定の実施形態では、MSLNポリペプチドは、配列番号41、42若しくは43の全体、又は連続する部分である、アミノ酸配列を含むか、又は有する。

【0071】

「MSLNのECD」という用語は、MSLNの細胞外ドメインを指す。ある特定の実施形態では、例示的なMSLNポリペプチドのECDは、配列番号43に示されるアミノ酸配列を含むことができる。

【0072】

「抗MSLN抗体」及び「MSLNに結合する抗体」という用語は、抗体が、MSLN 20
を標的とするための診療剤及び/又は治療剤として有用であるような、十分な親和性でMSLNに結合可能である抗体を指す。一実施形態では、抗MSLN抗体の、無関係の非MSLNタンパク質への結合の程度は、例えば、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイにより測定されるように、MSLNへの抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、MSLNに結合する抗体は、<約1µM、<約100nM、<約10nM、<約1nM、<約0.1nM、<約0.01nM、又は<約0.001nM（例えば、 10^{-8} M以下、例えば、 10^{-8} M~ 10^{-12} M、例えば、 10^{-9} M~ 10^{-10} M）の解離定数（KD）を有する。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、異なる種に由来するMSLN間で保存されたMSLNのエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、タンパク質のECD内にある、MSLN上のエ 30
ピトープに結合する。

【0073】

2. 抗体及び抗体誘導体

【0074】

本開示は、単一特異性抗MSLN抗体、及びMSLNと1つ又は複数の他の標的に結合する多重特異性抗体を含む、単離されたモノクローナル抗体及び抗体誘導体を提供する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体は、MSLNに結合する単一ドメイン抗体を含む。ある特定の実施形態では、本開示は、部分的には、MSLNに結合する単一ドメイン抗体の発見に基づき、これは、抗体が、腫瘍細胞を選択的に標的とし、及び/又はMSLNにより媒介されるシグナル経路を阻害し、それにより、腫瘍細胞 40
に対する有益な抗腫瘍効果を誘発することができる、抗腫瘍治療に使用可能である。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する単一ドメイン抗体は、アンタゴニスト抗体であり、これはMSLN機能を阻害する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、MSLNタンパク質を発現する腫瘍細胞に対する、抗腫瘍免疫応答を増強することができる。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ラクダ科動物抗体又はVHH抗体を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、IgG、Fab、及び/又はscFvの形態の、従来の抗体と比較して、そのサイズが小さいことで、改善された組織浸潤の能力を有する。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、被験体において、抗腫瘍効果を示す。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、参照抗体、例えば、Ab237類似体と比較して、優れた抗腫瘍効果を示す。Ab237は、国際公開番号WO201 50

4004549A2に開示されている、抗MSLN f a b抗体である。

【0075】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、キメラ、ヒト化、又はヒト抗体を含むモノクローナル抗体であるか、又はそれを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体は、ヒト抗体を含む。ある特定の実施形態では、抗体は、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワーク、又はヒトコンセンサスフレームワークを含む。

【0076】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、抗体断片、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、又はF(ab')₂断片であることができる。ある特定の実施形態では、抗体は、完全長抗体、例えば、インタクトなIgG1抗体、又は本明細書で定義する他の抗体クラス若しくはアイソタイプである。ある特定の実施形態では、本開示の抗体又は抗体誘導体は、本願に記載される、例えば、本明細書のセクション2.1~2.12に詳述される特徴のいずれかを、単独で、又は組み合わせで、組み込むことができる。

本開示の抗体及び抗体誘導体は、例えば、新生物又は癌の診断又は治療のために、有用である。ある特定の実施形態では、本開示の抗体を用いて増殖を阻害可能である新生物及び癌としては、通常免疫療法に応答する新生物及び癌が挙げられる。ある特定の実施形態では、新生物及び癌としては、乳癌（例えば、乳細胞癌）、卵巣癌（例えば、卵巣細胞癌）、及び、腎細胞癌（RCC）が挙げられる。本開示の方法を用いて治療可能な他の癌の例としては、黒色腫（例えば、転移性悪性黒色腫）、前立腺癌、結腸癌、肺癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、脳腫瘍、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病を含む慢性又は急性白血病、リンパ腫（例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、リンパ球性リンパ腫、原発性CNSリンパ腫、T細胞リンパ腫）、鼻咽頭癌、頭又は頸癌、皮膚又は眼内悪性黒色腫、子宮癌、直腸癌、肛門領域癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、乳腺癌、軟部組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児固形腫瘍、膀胱癌、腎臓又は尿管癌、乳癌、骨盤癌、中枢神経系（CNS）新生物、腫瘍血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、石綿により誘発されるものを含む、環境により誘発される癌、例えば、中皮腫、及び上記癌の組み合わせが挙げられる。

【0077】

2.1 例示的な抗MSLN抗体

【0078】

本開示は、MSLNタンパク質に結合する、単離された抗体を提供する。ある特定の実施形態では、本開示の抗MSLN抗体は、MSLNのECDに結合する。ある特定の実施形態では、ECDは、配列番号43に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、本明細書に記載する抗MSLN抗体と同一のエピトープに結合する。

ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗MSLN抗体は、MSLNベースのシグナル経路のアンタゴニストとして機能することができる。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、MSLNタンパク質に依存するシグナル経路を、遮断するか、又は減少させることができる。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、シグナル経路の活性を、少なくとも約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約99%、又は約99.9%低下させることができる。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体を用いる治療は、被験体において抗腫瘍効果を示し、これにより、腫瘍増殖が減少する、及び/又は被験体の生存期間が長くなる。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、MSLNを発現する腫瘍細胞に対する免疫細胞、例えば、T細胞及び/又はNK細胞の免疫応答及び/又は抗腫瘍効果を増加させる。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体（例えば、VHH）を含む抗MSLN抗体は、完全長

抗体の F a b ドメインと比較して、単一ドメイン抗体のサイズが小さいために、完全長抗体と比較して分子サイズが小さく、これにより、完全長抗体と比較して、例えば腫瘍部位において、優れた組織浸潤がもたらされることができるとある。ある特定の実施形態では、抗 M S L N 抗体を用いる治療は、完全長抗 M S L N 抗体を用いる治療と比較して、優れた抗腫瘍効果を示す。

【 0 0 7 9 】

ある特定の実施形態では、抗 M S L N 抗体は、M S L N に結合する単一ドメイン抗体を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は V H H を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、重鎖可変領域 (V H) を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、F c 領域に連結する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、F c 領域に連結しない。

10

【 0 0 8 0 】

ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-7} M 以下の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-8} M 以下の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 5×10^{-9} M 以下の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-9} M 以下の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-10} M 以下の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-11} M ~ 約 1×10^{-7} M の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-10} M ~ 約 1×10^{-7} M の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-10} M ~ 約 1×10^{-8} M の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-11} M ~ 約 1×10^{-9} M の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 2×10^{-10} M ~ 約 5×10^{-9} M の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-9} M ~ 約 5×10^{-8} M の K D で M S L N に結合する。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、約 1×10^{-10} M ~ 約 1×10^{-9} M の K D で M S L N に結合する。

20

【 0 0 8 1 】

ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、a) 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、c) 配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、d) 配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、e) 配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、f) 配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、g) 配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 33 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3、又は h) 配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 38 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む、重鎖可変領域を含む参照抗 M S L N 単一ドメイン抗体と、M S L N への結合に関して交差競合

30

40

50

する。

【 0 0 8 2 】

ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、a) 配列番号 1、6、11、16、21、26、31 若しくは 36 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、又は最大約 3 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域 C D R 1、b) 配列番号 2、7、12、17、22、27、32 若しくは 37 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、又は最大約 3 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域 C D R 2、及び c) 配列番号 3、8、13、18、23、28、33 若しくは 38 のいずれか 1 つのアミノ酸配列、又は最大約 3 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含む、重鎖可変領域 C D R 3、を含む重鎖可変領域を含む。

10

【 0 0 8 3 】

ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、C D R 1 ドメイン、C D R 2 ドメイン、及び C D R 3 ドメインを含む重鎖可変領域を含み、そのうち、上記 C D R 1 ドメイン、上記 C D R 2 ドメイン、及び上記 C D R 3 ドメインはそれぞれ、配列番号 4、9、14、19、24、29、34 及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む参照重鎖可変領域に含まれる、C D R 1 ドメイン、C D R 2 ドメイン、及び C D R 3 ドメインを含む。

【 0 0 8 4 】

ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 11 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 12 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 13 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 16 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 21 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 22 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 23 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 26 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 27 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 31 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 33 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 36 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 1、配列番号 37 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び配列番号 38 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 C D R 3 を含む。

20

30

40

【 0 0 8 5 】

ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 4、9、14、19、24、29、34 及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも約 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、配列番号 4、9、14、19、24、29、34 及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも約 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単一ドメ

50

ン抗体は、配列番号 4、9、14、19、24、29、34 及び 39 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0086】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 14 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の
10
実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 19 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 24 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 29 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 34 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 39 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体はヒト抗体を含む。

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域に含まれるアミノ酸配列のいずれか 1 つは、最大約 1 個、約 2 個、約 3 個、約 4 個、約 5 個、約 6 個、約 7 個、約 8 個、約 9 個若しくは約 10 個のアミノ酸置換、欠失、及び / 又は付加を含むことができる。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換は、保存的置換である。

【0087】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体はヒトフレームワークを含む。ある特定の
20
実施形態では、ヒトフレームワークは、配列番号 4、9、14、19、24、29、34、又は 39 に示される重鎖可変領域配列のフレームワーク配列を含む。

ある特定の実施形態では、抗 M S L N 抗体は F c 領域を含まない。ある特定の実施形態では、抗 M S L N 抗体は、F c 領域を更に含む。ある特定の実施形態では、F c 領域は、ヒト F c 領域を含む。ある特定の実施形態では、F c 領域は、I g G、I g A、I g D、I g E、及び I g M の F c 領域からなる群から選択される F c 領域を含む。ある特定の
30
実施形態では、F c 領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 の F c 領域からなる群から選択される F c 領域を含む。ある特定の実施形態では、F c 領域は、I g G 1 F c 領域を含む。ある特定の実施形態では、I g G 1 F c 領域は、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を修飾する 1 つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、I g G 1 F c 領域は、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を低下させる 1 つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、I g G 1 F c 領域は、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を増強する 1 つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、I g G 1 F c 領域は、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、及び P 3 9 6 L の変異を含む。ある特定の
40
実施形態では、I g G 1 F c 領域は、S 2 3 9 D、A 3 3 0 L、及び I 3 3 2 E の変異を含む。

【0088】

ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 5、10、15、20、25、
40
30、35 及び 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも約 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 5、10、15、20、25、30、35 及び 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも約 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、配列番号 5、10、15、20、25、30、35 及び 40 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0089】

ある特定の実施形態では、抗 M S L N 抗体は、配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗 M S L N 抗体は、配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗 M S L N 抗体は、配列番号 15 に示されるアミノ酸
50

配列を含む。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、配列番号25に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、配列番号30に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、配列番号35に示されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、配列番号40に示されるアミノ酸配列を含む。

【0090】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、リンカーを介してFc領域に連結する。ある特定の実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、約4～約30個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、約4～約15個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号44～78からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、完全長免疫グロブリン、一本鎖Fv(scFv)断片、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)₂、VHH、Fv-Fc融合物、scFv-Fc融合物、VHH-Fv融合物、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【0091】

ある特定の実施形態では、抗体は、抗体誘導体である、より大きな分子に含まれる。ある特定の実施形態では、抗体誘導体は、多重特異性抗体、例えば、二重特異性抗体であり、そのうち、当該多重特異性抗体は、第2の抗原に特異的に結合する第2の抗体部分を含む。ある特定の実施形態では、第2の抗原は腫瘍関連抗原である。ある特定の実施形態では、腫瘍関連抗原は、Her-2、EGFR、PD-L1、MSLN、c-Met、B細胞成熟抗原(BCMA)、カルボニックアンヒドラーゼIX(CAIX)、癌胎児性抗原(CEA)、CD5、CD7、CD10、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD34、CD38、CD41、CD44、CD47、CD49f、CD56、CD74、CD123、CD133、CD138、CD276(B7H3)、上皮糖タンパク質(EGP2)、栄養膜細胞表面抗原2(TROP-2)、上皮糖タンパク質-40(EGP-40)、上皮細胞接着分子(EpCAM)、受容体チロシンプロテインキナーゼerb-B2, 3, 4、葉酸結合タンパク質(FBP)、胎児アセチルコリン受容体(AChR)、葉酸受容体a、ガングリオシドG2(GD2)、ガングリオシドG3(GD3)、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)、キナーゼ挿入ドメイン受容体(KDR)、ルイスA(CA1.9.9)、ルイスY(LeY)、L1細胞接着分子(L1CAM)、ムチン16(Muc-16)、ムチン1(Muc-1)、NG2ドリガンド、癌胎児抗原(h5T4)、前立腺幹細胞抗原(PSCA)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、クローディン18.2(CLDN18.2)、血管内皮成長因子R2(VEGF-R2)、ウィルムス腫瘍タンパク質(WT-1)、1型チロシンプロテインキナーゼ膜貫通受容体(ROR1)、PVR、PVR-L2、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、第2の抗原は、免疫チェックポイント制御因子である。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント制御因子は、TIGIT、PD1、CTLA4、LAG-3、2B4、BTLA、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、抗体誘導体又は多重特異性抗体の、第2の抗原への結合は、免疫チェックポイント制御因子を阻害する。ある特定の実施形態では、第2の抗原は、免疫共刺激分子、又はT細胞受容体/CD3複合体のサブユニットである。ある特定の実施形態では、免疫共刺激分子は、CD28、ICOS、CD27、4-1BB、OX40、CD40、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、抗体誘導体又は多重特異性抗体の、第2の抗原への結合は、免疫共刺激分子を活性化する。ある特定の実施形態では、T細胞受容体/CD3複合体のサブユニットは、CD3、CD3、CD3、及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。ある特定の実施形態

では、抗体誘導体又は多重特異性抗体の、第2の抗原への結合は、T細胞受容体/CD3複合体を活性化する。

【0092】

ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、リンカーを介して、第2の抗原結合部分に連結する。ある特定の実施形態では、リンカーはペプチドリンカーである。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、約4～約30個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、約4～約15個のアミノ酸を含む。ある特定の実施形態では、ペプチドリンカーは、配列番号44～78からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

ある特定の実施形態では、抗MSLN抗体は、治療剤又は標識に複合体化される。ある特定の実施形態では、標識は、放射性同位体、蛍光色素、及び酵素からなる群から選択される。

【0093】

2.2 抗体親和性

【0094】

ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体は、その標的抗原に対して、高い結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-7} M以下のKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-8} M以下のKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 5×10^{-9} M以下のKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-9} M以下のKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-10} M以下のKDで標的に結合する。

【0095】

ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-11} M～約 1×10^{-7} MのKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-10} M～約 1×10^{-7} MのKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-10} M～約 1×10^{-8} MのKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-11} M～約 1×10^{-9} MのKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 2×10^{-10} M～約 5×10^{-9} MのKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-9} M～約 5×10^{-8} MのKDで標的に結合する。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約 1×10^{-10} M～約 1×10^{-9} MのKDで標的に結合する。

【0096】

抗体又は抗体誘導体のKDは、当該技術分野において周知の方法により決定されてもよい。このような方法は、ウエスタンブロット、ELISAテスト、RIAテスト、ECLテスト、IRMAテスト、EIAテスト、Octet-BIACORE（登録商標）テスト、及びペプチドスキャンを含むが、これらに限定されない。

【0097】

ある特定の実施形態では、KDは、BIACORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを用いて測定することができる。例えば、限定されるものではないが、BIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）3000（Biacore, Inc., ピスカタウェイ（Piscataway）、ニュージャージー州（NJ））を用いるアッセイは、約10応答単位（RU）にて、固定した固定化抗原CMSチップを用いて25で行われる。ある特定の実施形態では、供給元の指示に従い、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CMS, Biacore, Inc.）が、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミドヒドロクロリド（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化される。pH4.8の10 mMの酢酸ナトリウムにより、抗原を $5 \mu\text{g/mL}$ （約 $0.2 \mu\text{M}$ ）まで希釈してから5

10

20

30

40

50

μL /分の流速で注入し、約10応答単位(RU)の共役タンパク質を得る。抗原の注入後、1Mのエタノールアミンを注入して、未反応の基をブロックする。動力学測定のために、25℃にて、0.05%のポリソルベート20(TWEEN-20TM)界面活性剤を含むPBS(PBST)に、Fabの2倍の連続希釈液(0.78nM~500nM)をおよそ25 μL /分の流速で注入する。会合速度(k_{on})及び解離速度(k_{off})を、単純な1対1ラングミュア結合モデル(BIACORE(登録商標)評価ソフトウェアバージョン3.2)を使用して、会合センサーグラム及び解離センサーグラムを同時にフィッティングすることによって、計算する。平衡解離定数(KD)を k_{off}/k_{on} の比率として算出することができる。例えば、Chenら, J. Mol. Biol. 293: 865-881(1999)を参照されたい。上記表面プラズモン共鳴アッセイによるオン速度が $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ を超える場合、オン速度は蛍光消光技術によって決定されてもよく、当該技術は、増加する抗原濃度の存在下で、25℃で、PBS中の20nMの抗-抗原抗体(Fab形態)(pH7.2)の蛍光発光強度(励起=295nm、発光=340nm、16nmバンドパス)の増加又は減少を測定し、例えば、ストップフローを備えた分光光度計(Aviv Instruments)、又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO(登録商標)分光光度計(Thermo Spectronic)などの分光計で測定される。

10

【0098】

2.3 抗体断片

【0099】

20

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、抗原結合断片又は抗体断片を含む。抗体断片としては、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、VHH、Fv、及びscFv断片、並びに本明細書に記載する他の断片が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudsonら, Nat. Med. 9: 129-134(2003)を参照されたい。scFv断片に関する概説については、例えばThe Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, RosenbergとMoore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315(1994)中のPluckhlinを参照されたく、また、WO 93/16185、及び米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピソード残基を含み、インビボ半減期が増加したFab及びF(ab)₂断片の検討については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

30

【0100】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ダイアボディであることができる。ダイアボディは、二価又は二重特異性であってもよい、2つの抗原結合部位を有する抗体断片である。例えば、EP 404,097; WO 1993/01161; Hudsonら, Nat. Med. 9: 129-134(2003); 及びHollingerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448(1993)を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディは更に、Hudsonら, Nat. Med. 9: 129-134(2003)に記載されている。

40

【0101】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、単一ドメイン抗体を含むことができる。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部若しくは一部、又は軽鎖可変ドメインの全部若しくは一部を含む抗体断片である。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第6,248,516B1号を参照されたい)。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ラクダ科動物単一ドメイン抗体である。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、VHHである。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体は、ヒト化されている。ある特定の実施形態では、単一ドメイン抗体はヒト抗体を含むか、又はヒト抗体である。

50

【0102】

抗体断片は、限定されるものではないが、本明細書に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク分解消化、加えて、組換え宿主細胞（例えば、大腸菌又はファージ）による産生を含む各種の技術により作製可能である。

【0103】

2.4 キメラ抗体及びヒト化抗体

【0104】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号、及び、Morrissonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。ある特定の実施形態では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウスに由来する可変領域）、及びヒト定常領域を含む。ある特定の実施形態では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のそれらから変更されている「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

10

【0105】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ヒト化抗体であることができる。一般的に、非ヒト抗体をヒト化すると、ヒトに対する免疫原性は低下すると共に、親非ヒト抗体の特異性及び親和性は維持される。通常、ヒト化抗体は、HVR、例えばCDR（又はその一部）が非ヒト抗体に由来し、1つ又は複数のフレームワーク（FR）（又は、その任意の部分）がヒト抗体配列に由来する、1つ又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は任意選択的に、ヒト定常領域の少なくとも一部もまた含むことができる。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体中のある特定のFR残基は、例えば、抗体特異性又は親和性を復元又は改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

20

ヒト化抗体及びその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に記載されており、更に、例えば、Riechmannら, Nature 332:323-329 (1988); Queenら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号、及び同第7,087,409号; Kashmiriら, Methods 36:25-34 (2005) (dSDR (a-CDR) 移植について記載している); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)（「リサーフェシング」について記載している）; Dall'Acquaraら, Methods 36:43-60 (2005)（「FRシャッフリング」について記載している）; 並びにOsbourneら, Methods 36:61-68 (2005) 及びKlimkaら, Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)（FRシャッフリングのための「誘導選択」アプローチについて記載している）に記載されている。

30

【0106】

ヒト化のために使用可能なヒトフレームワーク領域としては、「ベストフィット」法を用いて選択されるフレームワーク領域（例えば、Simsら, J. Immunol. 151:2296 (1993)を参照されたい）、軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（例えば、Carterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)、及びPrestara, J. Immunol., 151:2623 (1993)を参照されたい）、ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域又はヒト生殖細胞系フレームワーク領域（例えば、AlmagroとFransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照されたい）、及びFRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（例えば、Bacara, J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997)及びRosokら, J. Biol. Chem

40

50

． 271 : 22611 - 22618 (1996)) を参照されたい) が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0107 】

2 . 5 ヒト抗体

【 0108 】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体は、ヒト抗体（例えば、ヒトドメイン抗体、又はヒトDAb）であることができる。ヒト抗体は、当該技術分野において周知である様々な技術を使用して産生することができる。ヒト抗体は、一般に、van Dijkとvan de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5 : 368 - 74 (2001), Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20 : 450 - 459 (2008), 及びChen, Mol. Immunol. 47 (4) : 912 - 21 (2010) に記載されている。完全ヒト単ドメイン抗体（又は、DAb）を産生可能なトランスジェニックマウス又はラットが、当該技術分野において周知である。例えば、US 20090307787A1、米国特許第8,754,287号、US 20150289489A1、US 20100122358A1、及びWO 2004049794を参照されたい。

10

【 0109 】

抗原投与に対して応答するヒト可変領域を有するインタクトなヒト抗体又はインタクトな抗体を産生するために修飾したトランスジェニック動物に免疫原を投与することにより、ヒト抗体（例えば、ヒトDAb）を調製することができる。そのような動物は通常、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、又は染色体外に存在し、若しくは動物の染色体中にランダムに組み込まれるヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含有する。そのようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は通常、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23 : 1117 - 1125 (2005) を参照されたい。例えば、XENOMOUSETM技術について記載した米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号、HuMab（登録商標）技術について記載した米国特許第5,770,429号、K-M MOUSE（登録商標）技術について記載した米国特許第7,041,870号、及びVelociMouse（登録商標）技術について記載した米国特許公開公報番号US 2007/0061900もまた参照されたい。そのような動物により産生されたインタクトな抗体からのヒト可変領域を、例えば異なるヒト定常領域と組み合わせることにより、更に修飾することができる。

20

30

【 0110 】

ヒト抗体（例えば、ヒトDAb）もまた、ハイブリドーマに基づく方法により作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒトヘト骨髄腫細胞株が記載されている（例えば、Kozbor J. Immunol., 133 : 3001 (1984), Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), 及びBoernerら, J. Immunol., 147 : 86 (1991) を参照されたい）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されるヒト抗体はまた、Liら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 : 3557 - 3562 (2006) にも記載されている。更なる方法としては、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生について記載する）及びNi, Xiandai Mianyixue, 26 (4) : 265 - 268 (2006) （ヒト-ヒトハイブリドーマについて記載する）に記載されるものが挙げられる。ヒトハイブリドーマ技術（Trioma技術）はまた、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20 (3) : 927 - 937 (2005) 及びVollmersとBrandlein, Methods and Findings in Experimental and

40

50

Clinical Pharmacology, 27(3):185-91(2005)にも記載されている。

【0111】

ヒト抗体(例えば、ヒトDAb)は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成され得る。次いで、そのような可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わせることができる。抗体ライブラリからヒト抗体を選択する技術については以下で説明する。

【0112】

2.6 ライブラリ由来の抗体

【0113】

本開示の抗体は、所望の活性を有する抗体に対するコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることにより単離することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成し、所望の結合特性を有する抗体に関してそのようなライブラリをスクリーニングするための様々な方法が当該技術分野で周知である。そのような方法は、例えば、Hoogenboomら, Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brienら, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001)に記載されており、更に、例えば、McCaffertyら, Nature 348:552-554、Clacksonら, Nature 352:624-628(1991)、Marksら, J. Mol. Biol. 222:581-597(1992)、MarksとBradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhuら, J. Mol. Biol. 338(2):299-310(2004)、Leeら, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093(2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472(2004)、及びLeeら, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132(2004)に記載されている。単一ドメイン抗体ライブラリを構築するための方法は、例えば、米国特許第7371849号に記載されている。

【0114】

ある特定のファージディスプレイ法では、V_H及びV_L遺伝子のレパートリーはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により別々にクローニングされ、ファージライブラリ内でランダムに再結合され、次いでWinterら, Ann. Rev. Immunol, 12:433-455(1994)に記載されているように、抗原結合ファージに対してスクリーニングすることが可能である。ファージは典型的には、抗体断片を、scFv断片又はFab断片のいずれかとしてディスプレイする。免疫付与された源からのライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とせずに、免疫原に対して高親和性の抗体を提供する。或いは、ナイーブレパートリーを(例えばヒトから)クローニングして、Griffithsら, EMBO J, 12:725-734(1993)に記載されているように、任意の免疫付与を行わずに、単一源の抗体を、広範囲の非自己抗原及び自己抗原を提供することができる。最後に、ナイーブラライブラリはまた、HoogenboomとWinter, J. Mol. Biol., 227:381-388(1992)に記載されるように、幹細胞から再配列されていないV遺伝子断片をクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを使用して高度可変CDR3領域をコードし、インピットで再配列を遂行することによって、合成的に作製することができる。ヒト抗体ファージライブラリについて記載している特許公報としては例えば、米国特許第5,750,373号、並びに米国特許番号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936、及び2009/0002360が挙げられる。

【0115】

ヒト抗体ライブラリから単離した抗体又は抗体断片は、本明細書において、ヒト抗体又

10

20

30

40

50

はヒト抗体断片と考えられている。

【 0 1 1 6 】

2 . 7 抗体変異体

本開示は更に、開示された抗体のアミノ酸配列変異体を提供する。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物学的性質を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、適切な修飾を、抗体をコードするヌクレオチド配列に導入することにより、又はペプチド合成により調製することができる。そのような修飾としては、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び/又は残基への挿入、及び/又は残基の置換が挙げられるが、これらに限定されない。最終構築物に到達するために欠失、挿入、及び置換を任意に組み合わせることができるが、但し、その最終抗体、即ち、修飾抗体が所望の特性、例えば、抗原結合を有することを条件とする。

10

【 0 1 1 7 】

2 . 7 . 1 置換、挿入、及び欠失変異体

【 0 1 1 8 】

ある特定の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換による変異誘発のための、対象となる部位としては、HVR（又は、CDR）及びFRが挙げられる。保存的置換を、「好ましい置換」の見出しの下で、表2に示す。より実質的な変化は、表2において、「例示的な置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して以下に更に記載されるとおりである。アミノ酸置換を、対象となる抗体に導入することができ、所望の活性、例えば、保持/改善した抗原結合、低下した免疫原性、又は改善したADCC若しくはCDCのために生成物をスクリーニングする。

20

【 0 1 1 9 】

表 2 . アミノ酸置換

【 0 1 2 0 】

30

40

50

【表 2】

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、L y s、A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、A l a、P h e、ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、I l e、A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、P h e、A l a、ノルロイシン	L e u

10

20

【0121】

アミノ酸は、共通の側鎖特性：(1)疎水性：ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e、(2)中性親水性：C y s、S e r、T h r、A s n、G l n、(3)酸性：A s p、G l u、(4)塩基性：H i s、L y s、A r g、(5)鎖の配向に影響を及ぼす残基：G l y、P r o、及び(6)芳香族：T r p、T y r、P h eに従ってグループ分けすることができる。ある特定の実施形態では、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを必要とする。

30

【0122】

ある特定の実施形態では、ある種類の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体)の1つ又は複数の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、更なる研究のために選択される、得られた変異体は、親抗体と比較して、ある特定の生物学的性質における修飾(例えば、改善)(例えば、増加した親和性、低下した免疫原性)を有し、及び/又は実質的に保持された親抗体のある特定の生物学的性質を有することになる。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載されるようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用い、簡便に生成することができる。簡潔に述べると、1つ又は複数のHVR(又は、CDR)残基が変異され、変異体抗体がファージにディスプレイされ、特定の生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。

40

【0123】

改変(例えば、置換)は、HVR(又は、CDR)中で、例えば、抗体親和性を改善するために行うことができる。そのような改変は、HVR(又は、CDR)「ホットスポット」、即ち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基(例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207: 17

50

9 - 196 (2008) を参照されたい)、及び/又は SDR (a - CDR) において行われ得、得られた変異体 VH 又は VL が結合親和性について試験される。二次ライブラリを構築し、それから再選択することによる親和性成熟が、例えば、Hoogenboomら, in *Methods in Molecular Biology* 178: 1 - 37 (O'Brienら, ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)) に記載されている。親和性成熟のある特定の実施形態では、多様な方法(例えば、エラーブローン PCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド指向性変異誘発)のいずれかによって、成熟のために選択される可変遺伝子に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリが構築される。次いで、このライブラリをスクリーニングし、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入する別の方法は、幾つかの HVR (又は、CDR) 残基(例えば、一度に4~6個の残基)をランダム化する、HVR (又は、CDR) 指向性アプローチを含む。抗原結合に關与する HVR (又は、CDR) 残基は、例えば、アラニンスキャンニング変異誘発又はモデリングを使用して、特異的に同定することができる。とりわけ、CDR - H3 及び CDR - L3 が、多くの場合標的とされる。

10

【0124】

ある特定の実施形態では、置換、挿入、又は欠失は、そのような改変が抗体の抗原に結合する能力を実質的に低下させない限り、1つ又は複数の HVR (又は、CDR) 内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変(例えば、本明細書で提供する保存的置換)を、HVR (又は、CDR) 中に行うことができる。このような改変は、HVR (又は CDR) 「ホットスポット」、又は CDR の外側にある場合がある。上述の変異体 VH 配列のある特定の実施形態では、各 HVR (又は、CDR) は、改変されていないか、又は1つ、2つ、若しくは3つを超えないアミノ酸置換を有するかのいずれかである。

20

【0125】

変異誘発を標的とし得る抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、Cunningham と Wells (1989) *Science*, 244: 1081 - 1085 によって記載されるように、「アラニンスキャンニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるか否かを決定するために、残基又は標的残基群(例えば、荷電残基、例えば、Arg、Asp、His、Lys 及び Glu) が同定され、中性又は負に荷電したアミノ酸(例えば、アラニン又はポリアラニン)によって置き換えられる。更なる置換が、初期置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入されてもよい。或いは、又は更に、抗原 - 抗体複合体の結晶構造は、抗体と抗原との間の接点を同定するために用いられる。そのような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的とされるか、又は除去されてもよい。変異体は、所望の特性を有するか否かを決定するためにスクリーニングされてもよい。

30

【0126】

アミノ酸配列挿入として、1個の残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さ範囲のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端の融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例として、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、酵素(例えば、ADEPT のための)、又は抗体の血清半減期を増大させるポリペプチドへの、抗体のN末端又はC末端の融合が挙げられる。

40

【0127】

2.7.2 グリコシル化変異体

【0128】

ある特定の実施形態では、抗体を変えて、構築物のグリコシル化の程度を増加又は減少させる。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1つ又は複数のグリコシル化部位が生成又は除去されるようにアミノ酸配列を変えることにより、簡便に実現することができる。

50

抗体がFc領域（例えば、scFv-Fc）を含む場合、そこに連結する炭水化物を変更することができる。哺乳動物細胞によって産生された天然抗体は、典型的には、N結合によってFc領域のC_H2ドメインのAsn297に一般に連結される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wrightら, *TIBTECH* 15:26-32 (1997)を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「ステム」においてGlcNAcに連結したフコースが含まれ得る。ある特定の実施形態では、ある特定の改善された性質を有する抗体変異体を生成するために、抗体中のオリゴ糖の修飾を行うことができる。

【0129】

ある特定の実施形態では、抗体は、Fc領域に（直接的又は間接的に）連結したフコースを欠く炭水化物構造を有する。例えば、そのような抗体におけるフコースの量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%、又は20%~40%であることができる。フコースの量は、例えば、WO 2008/077546に記載のMALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に連結した全ての糖構造（例えば、複合体、ハイブリッド、及び高マンノース構造）の合計に対する、Asn297での糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域内の約297位（Fc領域残基のEU番号付け）に位置するアスパラギン残基を指し、しかし、Asn297はまた、抗体における微小な配列変化に起因して、297位から約±3アミノ酸の上流又は下流、即ち、294~300位の間に位置してもよい。そのようなフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有してもよい。例えば、米国特許公報番号US 2003/0157108 (Presta, L.)、US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)を参照されたい。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関する公報の例としては、US 2003/0157108、WO 2000/61739、WO 2001/29246、US 2003/0115614、US 2002/0164328、US 2004/0093621、US 2004/0132140、US 2004/0110704、US 2004/0110282、US 2004/0109865、WO 2003/085119、WO 2003/084570、WO 2005/035586、WO 2005/035778、WO 2005/053742、WO 2002/031140、Okazakiら, *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnukiら, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化欠損 Lec13 CHO細胞 (Ripkaら, *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)、米国特許出願番号US 2003/0157108 A1、Presta, L、及びWO 2004/056312 A1, Adamsら)、及びノックアウト細胞株、例えば、-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-Ohnukiら, *Biotech. Bioeng.* 87:614 (2004)、Kanda, Y.ら, *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688 (2006)、及びWO 2003/085107を参照されたい)が挙げられる。

【0130】

ある特定の実施形態では、抗体は、例えば、抗体のFc領域に連結した二分岐オリゴ糖がGlcNAcにより二分されているバイセクトオリゴ糖 (bisected oligosaccharide) を有する。そのような抗体変異体は、低減されたフコシル化、及び/又は改善されたADCC機能を有してもよい。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO 2003/011878 (Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号 (Umanaら)、及びUS 2005/0123546 (Umanaら)に記載されている。Fc領域に連結したオリゴ糖内の少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体もまた提供する。そのような抗体変異体は、改善されたCDC機能を

10

20

30

40

50

有してもよい。そのような抗体変異体は例えば、WO 1997/30087 (Patelら)、WO 1998/58964 (Raju, S.)、及びWO 1999/22764 (Raju, S.)に記載されている。

【0131】

2.7.3 Fc領域変異体

【0132】

ある特定の実施形態では、今回開示される抗体又は抗体誘導体のFc領域は、1つ又は複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾(例えば置換)を含む、ヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域)を含むことができる。ある特定の実施形態では、1つ又は複数のアミノ酸修飾を、抗体部分のFc領域(例えば、scFv-Fc又はVHH-Fc)に導入し、それにより、Fc領域変異体を生成することができる。

10

【0133】

ある特定の実施形態では、Fc領域は、全てではないが、一部のエフェクター機能を有し、このような機能により、それが、インビボでの抗体の半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能(例えば、補体及びADCC)が不必要又は有害である用途のための所望の候補となる。インビトロ及び/又はインビボ細胞毒性アッセイを行って、CDC及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体(FcR)結合アッセイを行って、抗体がFcR結合を欠く(故にADCC活性を欠く可能性が高い)が、FcRn結合能力を保持することを確実にし得る。ADCCを媒介するための初代細胞であるNK細胞が、FcRIIIのみを発現する一方で、単球は、FcRI、FcRII、及びFcRIIIを発現する。造血細胞におけるFcRの発現は、RavetchとKinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)にまとめられている。対象となる分子のADCC活性を評価するインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号(例えば、Hellstrom, I.ら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063(1986))及びHellstrom, I.ら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502(1985)、5,821,337(Brugemann, M.ら, J. Exp. Med. 166:1351-1361(1987))を参照されたい)に記載されている。或いは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(登録商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA)、及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Promega, Madison, WI))。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。或いは、又は更に、対象となる分子のADCC活性をインビボで、例えば、Clynesら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656(1998)に記載されているような動物モデル内で評価することができる。C1q結合アッセイを実行して、抗体がC1qに結合することができないためにCDC活性を欠くことを確認することができる。例えば、WO 2006/029879及びWO 2005/100402に記載されているC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってよい(例えば、Gazzano-Santoroら, J. Immunol. Methods 202:163(1996)、Cragg, M.S.ら, Blood 101:1045-1052(2003)、及びCragg, M.S.とM.J. Glennie, Blood 103:2738-2743(2004))を参照されたい)。当該技術分野において周知の方法を使用して、FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期測定もまた実施することができる(例えば、Petkova, S.B.ら, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769(2006))を参照されたい)。

20

30

40

【0134】

50

低下したエフェクター機能を有する抗体としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327及び329のうちの一つ又は複数の置換を有するものが挙げられる(米国特許第6,737,056号)。このようなFc変異体としては、アミノ酸位置265、269、270、297及び327のうちの一つ以上に置換を有するFc変異体が挙げられ、残基265及び297がアラニンに置換されている、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む(米国特許第7,332,581号)。

【0135】

FcRへの結合が向上又は低下した特定の抗体変異体について記載されている。(例えば、米国特許第6,737,056号、WO 2004/056312、及びShieldsら, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)を参照されたい)。

ある特定の実施形態では、Fc領域は、残基のEU番号付けに従った一つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、Fc領域はIgG1 Fc領域である。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、L234A変異、及び/又はL235A変異を含む。ある特定の実施形態では、Fc領域は、IgG2又はIgG4 Fc領域である。ある特定の実施形態では、Fc領域は、F234A、及び/又はL235A変異を含むIgG4 Fc領域である。

【0136】

ある特定の実施形態では、Fc領域はIgG1 Fc領域である。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を修飾する一つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を低下させる一つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を増強する一つ又は複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、L235V、F243L、R292P、Y300L、及びP396Lの変異を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、S239D、A330L、及びI332Eの変異を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、L235V、F243L、R292P、及びY300Lの変異を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、Fc領域の位置298、333、及び/又は334における置換を含む。ある特定の実施形態では、IgG1 Fc領域は、S267E及びL328Fの変異を含む。

【0137】

ある特定の実施形態では、Fc領域は、IgG4 Fc領域を含む。ある特定の実施形態では、IgG4 Fc領域は、S228P変異を含む。

【0138】

ある特定の実施形態では、例えば米国特許第6,194,551号、WO 99/51642、及びIdusogieら, J. Immunol. 164:4178-4184(2000)に記載されているように、C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害(CDC)の改変(即ち、向上又は低下のいずれか)をもたらすFc領域内で改変が行われる。

【0139】

ある特定の実施形態では、抗体(例えば、scFv-Fc又はVHH-Fc)変異体は、半減期を変更し、及び/又は胎児性Fc受容体(FcRn)への結合を改変する一つ又は複数のアミノ酸置換を含む、変異体Fc領域を含む。延長した半減期、母体IgGを胎児に移行する役割を担う胎児性Fc受容体(FcRn)への改善した結合を有する抗体(Guyerら, J. Immunol. 117:587(1976)及びKimら, J. Immunol. 24:249(1994))が、US2005/0014934A1(Hintonら)に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改変する、一つ又は複数の置換を有するFc領域を含む。このようなFc変異体としては、Fc領域残基の一つ又は複数における置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものが挙げられる(米国特許第7,371,826号)。

【0140】

10

20

30

40

50

更に、Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及びFc領域変異体の他の例に関係するWO 94/29351を参照されたい。

【0141】

2.7.4 システインエンジニアリング抗体変異体

【0142】

ある特定の実施形態では、システインエンジニアリング抗体部分、例えば、「thioMAb」の生成が望ましく、ここで抗体の1つ又は複数の残基がシステイン残基により置換されている。ある特定の実施形態では、置換された残基は、抗体の接触可能な部位にて発生する。これらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基が抗体の接触可能な部位に位置付けられており、本明細書で更に記載するように、抗体を他の部位、例えば薬物部位、又はリンカー薬物部位に複合体化して、免疫複合体を生成するのに用いられる場合がある。ある特定の実施形態では、以下の残基のうちの任意の1つ又は複数

10

【0143】

2.8 抗体誘導体

ある特定の実施形態では、本明細書に記載する抗体は、当該技術分野において周知であり、且つ容易に得られる別のタンパク質又は非タンパク質部分を含む、抗体誘導体に、更に修飾されてもよい。抗体の誘導体化に適した非タンパク質部分としては水溶性ポリマーが挙げられるが、それに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、並びにそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造時に有利であり得る。当該ポリマーは、任意の分子量を有してもよく、且つ分岐状であっても非分岐状であってもよい。抗体に連結したポリマーの数は変わってもよく、且つ1つよりも多いポリマーが連結している場合、それらは、同じ又は異なる分子であることができる。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又は種類は、改善される抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が限定条件下で診断に使用されるかなどを含むが、これらに限定されない、考慮すべき事項に基づいて決定され得る。

20

30

ある特定の実施形態では、抗体は、1つ又は複数の生物学的に活性なタンパク質、ポリペプチド、又はその断片を含む、抗体誘導体に、更に修飾されてもよい。本明細書で互換的に使用される場合、「生物活性」、又は、「生物学的に活性な」は、体内で、特定の機能を実施するための生物学的活性を示すことを意味する。例えば、それは、例えば、タンパク質、DNAなどの特定の生体分子に結合し、次に、そのような生体分子の活性を促進又は阻害することを意味することができる。ある特定の実施形態では、生物活性タンパク質、又はその断片としては、疾患又は病状の予防又は治療のための活性薬剤物質として患者に投与されるタンパク質とポリペプチド、及び診断試験又はインビトロアッセイで用いられる酵素などの、診断目的で用いられるタンパク質とポリペプチド、及びワクチンなどの、疾患を予防するために患者に投与されるタンパク質とポリペプチドが挙げられる。

40

【0144】

2.9 産生方法

【0145】

50

本明細書で開示する抗体及び抗体誘導体を、当該技術分野において利用可能な、又は周知の、任意の技術を用いて産生することができる。限定されるものではないが、例えば、抗体及び抗体誘導体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているように、組換え方法及び組成物を用いて産生することができる。抗体及び抗体誘導体を生成する詳細の手順を、以下の実施例に記載する。

【0146】

今回開示される主題は、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体をコードする単離された核酸を更に提供する。例えば、単離された核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び/又は抗体のVHを含むアミノ酸配列、例えば、抗体の軽鎖及び/又は重鎖をコードすることができる。

10

【0147】

ある特定の実施形態では、核酸は1つ又は複数のベクター、例えば発現ベクターに存在することができる。本明細書で使用する場合、「ベクター」という用語は、それが連結された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つの種類のベクターは「プラスミド」であり、これは、別のDNAセグメントがライゲーションされ得る、環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、そのうち、別のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲーションされ得る。ある特定のベクターは、それらが導入された宿主細胞内で自律的に複製可能である(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば非エピソーム哺乳動物ベクター)が宿主細胞に導入された後、宿主細胞のゲノム内に組み込まれ、これにより、宿主ゲノムと共に複製される。更に、ある特定のベクター、発現ベクターは、それらが作動可能に連結された遺伝子の発現を指導することができる。一般に、組換えDNA技術において実用性のある発現ベクターは、プラスミド(ベクター)の形態である場合が多い。しかし、開示される主題は、等価な機能を果たす、他の形態の発現ベクター、例えばウイルスベクター(例えば、複製欠失型レトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)を含むことを意図する。

20

【0148】

本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体の様々な部分を、単一のマルチシストロニック発現カセット、単一ベクターの複数の発現カセット、又は複数のベクターに構築することができる。、ポリシストロニック発現カセットを生成するエレメントの例としては、様々なウイルス及び非ウイルス内部リボソーム進入部位(IRES、例えば、FGF-1 IRES、FGF-2 IRES、VEGF IRES、IGF-II IRES、NF-kB IRES、RUNX1 IRES、p53 IRES、A型肝炎 IRES、C型肝炎 IRES、ペスチウイルス IRES、アフトウイルス IRES、ピコルナウイルス IRES、ポリオウイルス IRES、及び脳筋炎ウイルス IRES)、並びに切断可能なリンカー(例えば、2Aペプチド、例えば、P2A、T2A、E2A、及びF2Aペプチド)が挙げられるが、これらに限定されない。レトロウイルスベクターと、適切なパッケージング株との組み合わせもまた好適であり、ここで、カプシドタンパク質が、ヒト細胞を感染させるのに機能的である。PA12(Millerら(1985)Mol. Cell. Biol. 5:431-437)、PA317(Millerら(1986)Mol. Cell. Biol. 6:2895-2902)、及びCRIP(Danosら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6460-6464)を含むが、これらに限定されない、様々なアンホトロピックウイルス産生細胞株が知られている。非アンホトロピック粒子も好適であり、例えば、VSVG、RD114、又はGALVエンベロープを有する偽型粒子、及び当該技術分野において周知の任意の他のものである。

30

40

【0149】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体若しくは抗体誘導体をコードする核酸、及び/又は当該核酸を含む1つ又は複数のベクターを、宿主細胞に導入することができる。ある特定の実施形態では、核酸の細胞への導入は、トランスフェクション、電気穿孔法、マイ

50

クロインジェクション、核酸配列含有ウイルス又はバクテリオファージベクターでの感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子転移、微小細胞媒介遺伝子転移、スフェロプラスト融合などを含むが、それらに限らない当該技術分野において周知の任意の方法により実施することができる。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、例えば、単ドメイン抗体、及び/又は単ドメイン抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクターによって形質転換された宿主細胞を含んでもよい。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、例えば、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列、及び抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、又は、(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター、及び、抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターによって形質転換されていた宿主細胞を含んでもよい。ある特定の実施形態では、宿主細胞は真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又はリンパ系細胞(例えば、YO、NSO、Sp20細胞)である。

10

【0150】

ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体の作製方法は、抗体又は抗体誘導体をコードする核酸が導入されている宿主細胞を、抗体又は抗体誘導体の発現に適した条件下で培養することと、任意選択的に、宿主細胞及び/又は宿主細胞培地から、抗体又は抗体誘導体を回収することと、を含むことができる。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、クロマトグラフィー技術により、宿主細胞から回収される。

【0151】

本開示の抗体又は抗体誘導体の組換え産生のために、例えば、上述した抗体又は抗体誘導体をコードする核酸を、宿主細胞で更にクローニングする、及び/又は発現させるために、単離し、1つ又は複数のベクターに挿入することができる。従来の手順を使用して(例えば、抗体又は抗体誘導体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)、そのような核酸を容易に単離し、配列決定することができる。抗体をコードするベクターをクローニングする、又は発現させるのに適した宿主細胞としては、本明細書に記載する原核細胞又は真核細胞が挙げられる。例えば、抗体又は抗体誘導体は、とりわけ、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合に、細菌中で産生することができる。細菌での抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、及び同第5,840,523号を参照されたい。(また、大腸菌における抗体断片の発現について記載している、Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Human a Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254も参照されたい)。発現後、抗体又は抗体誘導体は、可溶性画分中で細菌細胞ペーストから単離され得、更に精製することができる。

20

30

【0152】

原核生物に加え、真核微生物、例えば、糸状菌又は酵母は、抗体をコードするベクターに対する適切なクローニング又は発現の宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌株及び酵母株を含み、部分的又は完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体又は抗体誘導体が産生される。Gemgross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004)、及びLira, *Nat. Biotech.* 24: 210-215 (2006)を参照されたい。グリコシル化抗体の発現に適した宿主細胞もまた、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)に由来することができる。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。数多くのバキュロウイルス株が同定されており、とりわけ、スポドプテラ・フルギペルダ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションのために、これを昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。ある特定の実施形態では、植物細胞培養物を宿主細胞として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号(トランスジェニック植物で抗体を産生するためのPLANTIBODIES(登録商標)技術

40

50

について記載している)を参照されたい。

ある特定の実施形態では、脊椎動物細胞もまた、宿主として使用することができる。例えば、限定するものではないが、懸濁成長に適合された哺乳動物細胞株が、有用である可能性がある。有用な哺乳動物宿主細胞の非限定的な例は、SY40(COS-7)により形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胎児腎臓株(例えば、Grahamら, *J Gen Viral* . 36:59(1977)に記載されているような293又は293細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251(1980)に記載されているようなTM4細胞)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK、バッファローラット(buffaloratt)肝臓細胞(BRL 3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝臓細胞(Hep 02)、マウス乳房腫瘍(MMT 060562)、例えば、Matherら, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68(1982)に記載されているようなTRI細胞、MRC 5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞を含み、DHFK CHO細胞(Urlaubら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216(1980)、及びYO、NSO、及びSp2/0などの骨髓腫細胞株を含む。抗体又は抗体誘導体の産生に適した、ある特定の哺乳動物宿主細胞の概説については、例えば、YazakiとWu, *Methods in Molecular Biology* , Vol. 248(B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268(2003)を参照されたい。

10

20

【0153】

ある特定の実施形態では、二重特異性及び/又は多重特異性抗体を作製するための技術としては、重鎖又は軽鎖の1つ又は2つが、異なる特異性を有する抗原結合部分(例えば、単ドメイン抗体、例えば、VHH)に融合する、同じ特異性を有する2つの免疫グロブリンの重鎖-軽鎖ペアの組換え発現、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの組換え共発現(Milstei nとCuello, *Nature* 305:537(1983)、PCT特許出願番号WO 93/08829、及びTraun eckerら, *EMBO J* 10:3655(1991))、並びに「ノブ-イン-ホール」エンジニアリング(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)が挙げられるが、これらに限定されない。二重特異性抗体は、抗体Fc-ヘテロ二量体分子を作製するための、エンジニアリング静電ステアリング効果(WO 2009/089004A1)、2つ以上の抗体若しくは断片の架橋(例えば、米国特許第4,676,980号、及びBrennanら, *Science* , 229:81(1985)を参照されたい)、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること(例えば、Kostelnyら, *J. Immunol.* , 148(5):1547-1553(1992)を参照されたい)、二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術の使用(例えば、Hollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 90:6444-6448(1993)を参照されたい)、及び一本鎖Fv(sFv)二量体の使用(例えば、Gruberら, *J. Immunol.* , 152:5368(1994)を参照されたい)、及び、例えばTuttrら *J Immunol.* 147:60(1991)に記載されているような三重特異性抗体の調製によってもまた、作製することができる。

30

40

【0154】

本開示の二重特異性及び多重特異性分子もまた、化学技術(例えば、Kranz(1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5807を参照されたい)、 「ポリドーマ」技術(例えば、米国特許第4,474,893号を参照されたい)、又は組換えDNA技術を用いて作製することができる。今回開示される主題の二重特異性及び多重特異性分子もまた、当該技術分野において周知の、及び、本明細書に記載する方法を使用して、構成部分の結合特異性、例えば、第1のエピトープと第2のエピトープの

50

結合特異性を複合体化することにより調製することができる。例えば、限定するものではないが、二重特異性及び多重特異性分子の各結合特異性は、組換え融合タンパク質技術により共に生成することができる、又は、個別に生成し、その後、互いに複合体化することができる。結合特異性がタンパク質又はペプチドである場合、種々のカップリング又は架橋剤を共有結合に使用可能である。架橋剤の非限定的な例としては、タンパク質A、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、及びスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)が挙げられる(例えば、Karpovskiy(1984) J. Exp. Med. 160:1686、Liu(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)を参照されたい)。他の方法としては、Paulus(Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132、Brennan(1985) Science 229:81-83)、Glennie(1987) J. Immunol. 139:2367-2375)により記載されているものが挙げられる。結合特異性が抗体(例えば、2つのヒト化抗体)である場合、これらは2本の重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して複合体化することができる。ある特定の実施形態では、ヒンジ領域を修飾し、奇数、例えば、1つのスルフヒドリル残基を、複合体化の前に含めることができる。

【0155】

ある特定の実施形態では、二重特異性抗体の両方の結合特異性を、同じベクター内でコードし、同じ宿主細胞で発現させ、組み立てることができる。二重特異性及び多重特異性分子がMAb x MAb、MAb x Fab、Fab x F(ab')₂、又はリガンド x Fab融合タンパク質である場合に、本方法がとりわけ有用である。ある特定の実施形態では、本開示の二重特異性抗体は、一本鎖分子、例えば、一本鎖二重特異性抗体、1つの一本鎖抗体と結合決定クラスターとを含む一本鎖二重特異的分子、又は、2つの結合決定クラスターを含む一本鎖二重特異的分子であることができる。二重特異性及び多重特異性分子は、一本鎖分子であることもまた可能であり、又は少なくとも2つの一本鎖分子を含むことができる。二重特異性分子及び多重特異性分子の調製方法は、例えば、米国特許第5,260,203号、米国特許第5,455,030号、米国特許第4,881,175号、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号、米国特許第5,476,786号、米国特許第5,013,653号、米国特許第5,258,498、及び米国特許第5,482,858号に記載されている。「タコ抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位(例えば、エピトープ結合部位)を有するエンジニアリング抗体もまた、本明細書に含まれる(例えば、US 2006/0025576 A1を参照されたい)。

【0156】

ある特定の実施形態では、動物系を使用して、本開示の抗体又は抗体誘導体を産生することができる。ハイブリドーマを調製するためのある動物系は、マウス系である。

【0157】

マウスにおけるハイブリドーマの産生は、非常によく確立された手順である。免疫付与した脾細胞を単離するための、免疫付与方案及び技術は、当技術分野において周知である。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)及び融合手順もまた、知られている(例えば、HarlowとLane(1988), Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New Yorkを参照されたい)。

【0158】

2.10 アッセイ

【0159】

本明細書で提供する本開示の抗体及び抗体誘導体の、物理的/化学的性質、及び/又は

生物学的活性に対して、当該技術分野において周知の、及び本明細書で提供する様々なアッセイにより同定、スクリーニング、又は特徴付けを行うことができる。

【0160】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体又は抗体誘導体の、抗原結合活性を、周知の方法、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、又はウエスタンブロットアッセイにより試験することができる。これらのアッセイはそれぞれは、通常、対象となる複合体に特異的な標識試薬 (例えば、抗体) を用いることにより対象となる特定のタンパク質 - 抗体複合体の存在を検出する。例えば、抗体又は抗体誘導体を、例えば、抗体又は抗体誘導体を認識し、これに特異的に結合する、酵素結合抗体又は抗体断片を用いて検出することができる。或いは、抗体又は抗体誘導体を、種々の他の免疫アッセイのいずれかを用いて検出することができる。例えば、抗体又は抗体誘導体を放射性標識し、ラジオイムノアッセイ (RIA) で使用することができる (例えば、本明細書に参考として組み込まれる Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986 を参照されたい)。放射性同位体は、ガイガー (Geiger) カウンター若しくはシンチレーションカウンターを使用するそのような方法により、又は、オートラジオグラフィーにより検出することができる。

10

【0161】

ある特定の実施形態では、競合アッセイを使用して、本開示の抗体と、MSLNへの結合に関して競合する抗体又は抗体誘導体を同定することができる。ある特定の実施形態では、このような競合抗体は、本明細書で開示する抗体が結合するのと同じのエピトープ (例えば、線状又は立体構造エピトープ) に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示の方法は、Morris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」 in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ) に示されている。

20

【0162】

競合アッセイの非限定的な例において、固定化MSLNを、MSLNに結合する、第1の標識抗体又は抗体誘導体と、MSLNへの結合に関して、第1の抗体と競合する能力について試験されている、第2の非標識抗体と、を含む溶液でインキュベートすることができる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清に存在する場合がある。対照として、固定化MSLNを、第2の非標識抗体ではなく、第1の標識抗体を含む溶液でインキュベートする。第1の抗体がMSLNに結合することを可能にする条件下でのインキュベーション後に、過剰の未結合抗体を取り除き、固定化MSLNと会合する標識の量を測定する。固定化MSLNと会合する標識の量が、対照試料と比較して、試験試料で大幅に減少している場合、第2の抗体が、MSLNへの結合に関して、第1の抗体と競合していることを示す。HarlowとLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

30

40

【0163】

本開示は、生物学的活性を有する抗MSLN抗体、又はその抗体誘導体を同定するためのアッセイを提供する。生物学的活性としては、例えば、免疫細胞、又は、免疫活性化レポーター、例えば、NFATレポーター若しくはNF- κ Bレポーターを活性化することを挙げることができる。そのような生物学的活性をインビボ及び/又はインビトロで有する抗体もまた、提供する。

【0164】

2.11 免疫複合体

【0165】

50

今回開示される主題は、1つ又は複数の検出プローブ及び/又は細胞毒性剤、例えば、化学療法剤若しくは薬物、成長阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物若しくは動物由来の酵素活性毒素、又はこれらの断片）、又は放射性同位体に複合体化した、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体を含む免疫複合体を更に提供する。例えば、開示される主題の抗体又は抗原結合部分は、1つ又は複数の他の結合分子、例えば、別の抗体、抗体断片、ペプチド、又は結合模倣物に（例えば化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合又は別の方法で）機能的に結合することができる。

【0166】

ある特定の実施形態では、免疫複合体は、マイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、同第5,416,064号、及び欧州特許EP 0425235を参照されたい）、モノメチルアウリスタチン薬物部分DEとDF（MMAEとMMAF）などのアウリスタチン（米国特許第5,635,483号、同第5,780,588号、及び同第7,498,298号を参照されたい）、ドラスタチン、カリケアマイシン又はその誘導体（米国特許第5,712,374号、同第5,714,586号、同第5,739,116号、同第5,767,285号、同第5,770,701号、同第5,770,710号、同第5,773,001号、及び同第5,877,296号、Hinmanら, 53:3336-3342(1993)、及びLodeら, Cancer Res. 58:2925-2928(1998)）、ダウノマイシン又はドキソルピシンなどのアントラサイクリン（Kratzら, Current Med Chem. 13:477-523(2006)、Jeffreyら, Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362(2006)、Torgovら, Bioconj. Chem. 16:717-721(2005)、Nagyら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834(2000)、Dubowchikら, Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532(2002)、Kingら, J. Med. Chem. 45:4336-4343(2002)、及び米国特許第6,630,579号を参照されたい）、メトトレキサート、ビンデシン、タキサン、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、及びオルタタキセル、トリコテセン、並びにCC1065を含むがこれらに限定されない、抗体が1つ又は複数の薬物に複合体化した抗体薬物複合体（ADC）である。

ある特定の実施形態では、免疫複合体は、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、エキソトキシンA鎖（緑膿菌由来のもの）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリタンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、ツルレイシ阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、並びにトリコテセンを含むが、これらに限定されない、酵素活性毒素又はその断片に複合体化した、本明細書に記載する抗体を含む。

【0167】

ある特定の実施形態では、免疫複合体は、放射性原子に複合体化され、放射性複合体を形成する、本明細書に記載する抗体を含む。放射性複合体の作製のために、種々の放射性同位体が利用可能である。非限定的な例としては、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、及びLuの放射性同位体が挙げられる。放射性複合体を検出のために使用する場合、それは、シンチグラフィ研究のための放射性原子、例えば、 ^{99m}Tc 若しくは ^{112}In 、又は核磁気共鳴（NMR）画像法（磁気共鳴画像法とも呼ばれ、MRI）のためのスピン標識、例えば、再びヨウ素123、ヨウ素131、インジウム111、フッ素19、炭素13、窒素15、酸素17、ガドリニウム、マンガン、若しくは鉄を含むことができる。

【0168】

抗体及び細胞毒性剤の複合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、イミノチオラン（IT）、イミドエステ

ルの二官能性誘導体（例えば、アジブイミド酸ジメチル H C l）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス - アジド化合物（例えば、ビス（p - アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス - ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス - （p - ジアゾニウムベンゾイル） - エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン 2 , 6 - ジイソシアネート）、及びビス - 活性フッ素化合物（例えば、1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン）などの多様な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、V i t e t t a ら , S c i e n c e 2 3 8 : 1 0 9 8 (1 9 8 7) に記載されているように調製することができる。炭素 4 標識 1 - イソチオシアナトベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (M X - D T P A) は、抗体に放射性ヌクレオチドを複合体化するための例示的なキレート剤である。W O 9 4 / 1 1 0 2 6 を参照されたい。リンカーは、細胞内において細胞毒性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であることができる。例えば、酸に不安定なリンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカー、又はジスルフィド含有リンカー (C h a r i ら , C a n c e r R e s . 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 (1 9 9 2) 、米国特許第 5 , 2 0 8 , 0 2 0 号) を使用することができる。

10

本明細書の免疫複合体又は A D C は、市販されている B M P S 、 E M C S 、 G M B S 、 H B V S 、 L C - S M C C 、 M B S 、 M P B H 、 S B A P 、 S I A 、 S I A B 、 S M C C 、 S M P B 、 S M P H 、スルホ - E M C S 、スルホ - G M B S 、スルホ - K M U S 、スルホ - M B S 、スルホ - S I A B 、スルホ - S M C C 、及びスルホ - S M P B 、並びに S V S B (スクシンイミジル - (4 - ビニルスルホン) ベンゾエート) (例えば、P i e r c e B i o t e c h n o l o g y , I n c . , R o c k f o r d , I L . , U . S . A からのも) を含むが、これらに限定されない架橋剤試薬で調製されるような複合体を明示的に企図するが、これらに限定されない。

20

【 0 1 6 9 】

2 . 1 2 抗原認識受容体

【 0 1 7 0 】

今回開示される主題は、本明細書で開示する抗体又は抗体断片を含む抗原認識受容体を更に提供する。抗原認識受容体は、抗原への結合に応答して、免疫応答細胞（例えば、T 細胞）を活性化、刺激、又は阻害可能な受容体である。抗原認識受容体の非限定的な例としては、天然及び組換え T 細胞受容体 (T C R) 、キメラ共刺激性受容体 (C C R) 、キメラ抗原受容体 (C A R) 、又は阻害性 C A R (i C A R) が挙げられる。抗原認識受容体の設計、及び使用方法は、当該技術分野において周知であり、文献、例えば、国際公報 W O 2 0 1 8 / 0 2 7 1 5 5 、 W O 2 0 1 9 / 0 9 9 4 8 3 、 W O 2 0 1 9 / 1 5 7 4 5 4 、 W O 2 0 1 9 / 1 3 3 9 6 9 、 W O 2 0 1 9 / 0 9 9 9 9 3 、 W O 2 0 1 5 / 1 4 2 3 1 4 、 W O 2 0 1 8 / 0 2 7 1 9 7 、 及び W O 2 0 1 4 0 5 5 6 6 8 に記載されている。

30

【 0 1 7 1 】

ある特定の実施形態では、今回開示される主題は、本明細書で開示する抗体又は抗体断片を含むキメラ抗原受容体 (C A R) を提供する。C A R はエンジニアリング受容体であり、これは、対象となる特異性を免疫エフェクター細胞に移植する、又は付与することができる。ある特定の実施形態では、C A R を使用して、モノクローナル抗体の特異性を T 細胞に移植することができ、そのコード配列の転移は、ベクターにより促進される。ある特定の実施形態では、C A R は「第 1 世代」の C A R であり、これは、典型的には、膜貫通ドメインに融合した細胞外抗原結合ドメイン（例えば、s c F v 、 F a b 、又は V H H ）で構成され、当該膜貫通ドメインは、細胞質 / 細胞内シグナル伝達ドメインに融合している。「第 1 世代」の C A R は、デノボ抗原認識を提供し、H L A が媒介する抗原提示に依存することなく、単一の融合分子における、C D 3 z 鎖のシグナル伝達ドメインを介して、免疫応答細胞、例えば、C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞の活性化を引き起こすことができる。ある特定の実施形態では、C A R は「第 2 世代」の C A R であり、これは更に、免

40

50

疫応答細胞に更なるシグナルを提供するために、様々な共刺激分子（例えば、CD28、4-1BB、ICOS、OX40、CD27、CD40/My88、及びNKGD2）から、CARの細胞質尾部への細胞内シグナル伝達ドメインを含み、これにより、「第2世代」のCARは、共刺激（例えば、CD28又は4-1BB）と活性化（CD3z）の両方を提供するものを含む。ある特定の実施形態では、CARは「第3世代」のCARであり、これは、複数の共刺激ドメイン（例えば、CD28及び4-1BB）と活性化（CD3z）とを含む。ある特定の実施形態では、CARは第2世代のCARである。ある特定の実施形態では、CARは、抗原に結合する細胞外抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞内シグナル伝達ドメインを含み、ここで当該細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激性シグナル伝達ドメインを含む。ある特定の実施形態では、CARは、細胞外抗原結合ドメインと膜貫通ドメインとの間に、ヒンジ/スペーサ領域を更に含む。ある特定の実施形態では、細胞外抗原結合ドメインは、本明細書で開示する抗体又は抗体断片を含む。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体断片は、VHH又はscFvを含む。

10

【0172】

ある特定の実施形態では、今回開示される主題は、本明細書で開示する抗体又は抗体断片を含む組換えTCRを提供する。天然TCRは、CD3鎖分子との複合体の一部として発現する、2本の可変鎖で構成されるジスルフィド結合ヘテロ二量体タンパク質を含むタンパク質複合体である。天然TCRはT細胞の表面に見出され、主要組織適合複合体（MHC）分子に結合したペプチドとして、抗原の認識を担う。ある特定の実施形態では、天然TCRは、鎖及び鎖（それぞれ、TRA及びTRB遺伝子によりコードされる）を含む。ある特定の実施形態では、TCRは、鎖及び鎖（それぞれ、TRG及びTRD遺伝子によりコードされる）を含む。鎖、鎖、鎖、及び鎖のそれぞれは、2つの細胞外ドメイン：可変（V）領域及び定常（C）領域を含む。定常領域は細胞膜の近くにあり、これに、膜貫通領域及び短い細胞質尾部が続く。可変領域は、ペプチド/MHC複合体に結合する。各可変領域は、3つの相補性決定領域（CDR）を有する。ある特定の実施形態では、TCRは、CD3、CD3、CD3、及びCD3との受容体複合体を含む。TCR複合体が、その抗原及びMHC（ペプチド/MHC）に結合すると、TCR複合体を発現するT細胞が活性化される。

20

【0173】

ある特定の実施形態では、組換えTCRは、自然に存在しないTCRである。ある特定の実施形態では、組換えTCRは、組換え鎖及び/又は組換えb鎖を含み、ここで組換え鎖及び/又は組換えb鎖の可変領域の一部又は全体は、本明細書で開示する抗体又は抗体断片により置き換えられる。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体断片は、VHH、VH、VL、又はscFvを含む。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体断片は、VHHを含む。ある特定の実施形態では、組換えTCRは、MHC/HLAとは非依存的な方式で、対象となる抗原に結合する。ある特定の非限定的な実施形態では、抗原の結合によって、組換えTCRを含む免疫応答細胞を活性化することができる。

30

【0174】

今回開示される主題は、本明細書で開示する抗原認識受容体（例えば、CAR又はTCR）を含む免疫応答細胞を提供する。ある特定の実施形態では、抗原認識受容体は、免疫応答細胞を活性化することができる。今回開示される主題の免疫応答細胞は、リンパ系系統の細胞であることができる。B細胞、T細胞、及びナチュラルキラー（NK）細胞を含むリンパ系系統は、抗体の産生、細胞免疫系の制御、血液中での外来作用物質の検出、宿主に対する外来の細胞の検出などを提供する。リンパ系系統の免疫応答細胞の非限定的な例としては、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、胚幹細胞、及び多分化能幹細胞（例えば、そこからリンパ系細胞が分化可能なもの）が挙げられる。T細胞は、胸腺で成熟するリンパ球であることができ、細胞が媒介する免疫を主に担う。T細胞は、適応免疫系に参与する。今回開示される主題のT細胞は、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、メモリーT細胞（セントラルメモリーT細胞、幹細胞様メモリーT細胞（又は幹様メモリーT細胞）、及び2種類のエフェクターメモリーT細胞：例えばTEM細胞及びTEMRA細胞

40

50

胞を含む)、制御性T細胞(サブレッサーT細胞とも呼ばれる)、ナチュラルキラーT細胞、粘膜関連不変T細胞、並びにgd T細胞を含むが、これらに限定されないあらゆる種類のT細胞であることができる。細胞傷害性T細胞(CTL又はキラーT細胞)は、感染した体細胞又は腫瘍細胞の死を誘発可能なTリンパ球のサブセットである。患者自身のT細胞を遺伝的に改変し、抗原認識受容体、例えば、CAR又はTCRの導入により、特異的抗原を標的とすることができる。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞はT細胞である。T細胞は、CD4+T細胞又はCD8+T細胞であってもよい。ある特定の実施形態では、T細胞はCD4+T細胞である。ある特定の実施形態では、T細胞はCD8+T細胞である。ナチュラルキラー(NK)細胞は、細胞媒介免疫の一部であるリンパ球であることができ、先天性免疫応答の間に作用する。NK細胞は、標的細胞に対して細胞毒性効果を実施するために、前もって活性化をする必要はない。今回開示される主題のヒトリンパ球の種類としては、限定されるものではないが、末梢性ドナーリンパ球、例えば、Sadelain, M.ら, 2003 Nat Rev Cancer 3:35-45(CARを発現するように遺伝的に改変した、末梢性ドナーリンパ球について開示している)、Morgan, R.A.ら, 2006 Science 314:126-129(a及びbヘテロ二量体を含む、完全長腫瘍抗原認識T細胞受容体複合体を発現するように遺伝的に改変した、末梢性ドナーリンパ球について開示している)、Panelli, M.C.ら, 2000 J Immunol 164:495-504、Panelli, M.C.ら, 2000 J Immunol 164:4382-4392(腫瘍生検の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)に由来するリンパ球培養物について開示している)、及び、Dupont, J.ら, 2005 Cancer Res 65:5417-5427、Papanicolaou, G.A.ら, 2003 Blood 102:2498-2505(人工抗原提示細胞(AAPC)又はパルス樹状細胞を用いる、選択的にインビトロで増殖された抗原特異的末梢血白血球について開示している)に開示されているものが挙げられる。ある特定の実施形態では、免疫応答細胞(例えば、T細胞)は、自家である、非自家(例えば同種異系)である、又はエンジニアリングした前駆細胞若しくは幹細胞のインビトロ由来であることができる。

10

20

【0175】

3. 使用方法

【0176】

今回開示される主題は、開示した抗体及び抗体誘導体の使用方法を更に提供する。ある特定の実施形態では、方法は、今回開示される抗体又は抗体誘導体の治療的使用に関する。ある特定の実施形態では、方法は、今回開示される抗体又は抗体誘導体の診断的使用に関する。

30

【0177】

3.1 治療方法

【0178】

本開示は、疾患及び障害の治療のための、又は、免疫応答を増大させるための、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体の方法及び使用を提供する。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体、抗体誘導体、又はそれらを含む医薬組成物を被験体(例えば、ヒトなどの哺乳類)に投与し、疾患及び障害を治療するか、又は免疫応答を増加させることができる。ある特定の実施形態では、疾患及び障害は、免疫チェックポイント阻害、及び/又は異常なMSLN活性を伴う。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体により治療可能な疾患及び障害としては、新生物、例えば、癌が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0179】

ある特定の実施形態では、本開示は、薬剤の製造で使用するための、本明細書に記載する抗体若しくは抗体誘導体(又は、その断片)を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、癌を治療するための薬剤の製造で使用するための、本明細書に記載する抗体若しくは抗体誘導体(又は、その断片)を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、被

50

験体における癌の治療に使用するための、本明細書に記載する抗体若しくは抗体誘導体（又は、その断片）を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、被験体における癌の治療に使用するための、本明細書で提供する抗体若しくは抗体誘導体（又は、その断片）を含む医薬組成物を提供する。ある特定の実施形態では、癌は、血液癌（例えば、白血病、リンパ腫、及び骨髄腫）、卵巣癌、乳癌、膀胱癌、脳腫瘍、結腸癌、腸癌、肝癌、肺癌、膵癌、前立腺癌、皮膚癌、胃癌、グリア芽腫、咽喉癌、黒色腫、神経芽細胞腫、腺癌、神経膠腫、軟部組織肉腫、並びに様々な癌腫（前立腺癌及び小細胞肺癌を含む）であることができる。好適な癌腫としては更に、限定されるものではないが、星状膠細胞腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、乏突起膠腫、脳室上衣腫、髄芽腫、原始神経外胚葉性腫瘍（PNET）、軟骨肉腫、骨原性肉腫、膵管腺癌、小細胞肺腺癌及び大細胞肺腺癌、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、扁平上皮癌、気管支肺癌、上皮腺癌、及びその肝転移、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、肝癌、胆管癌、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、横紋筋肉腫、結腸癌、基底細胞癌、汗腺癌、乳頭状癌、脂腺癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎児性癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、多発性骨髄腫、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、乳管癌及び小葉腺癌などの乳房の腫瘍、子宮頸部扁平上皮癌及び腺癌、子宮上皮癌及び卵巣上皮癌、前立腺癌、膀胱の移行性扁平上皮癌、B及びT細胞リンパ腫（結節性及びびまん性）形質細胞腫、急性及び慢性白血病、悪性黒色腫、軟部組織肉腫、並びに平滑筋肉腫を含む、腫瘍学の分野における任意の周知の癌腫が挙げられる。

10

20

【0180】

ある特定の実施形態では、癌は、黒色腫、NSCLC、頭頸癌、尿路上皮癌、乳癌（例えば、トリプルネガティブ乳癌、TNBC）、胃癌、胆管癌、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）、非ホジキンリンパ腫原発縦隔B細胞リンパ腫（NHLPMBCL）、中皮腫、卵巣癌、肺癌（例えば、小細胞肺癌）、食道癌、鼻咽頭癌（NPC）、胆道癌、結腸直腸癌、子宮頸癌、又は甲状腺癌であることができる。

【0181】

ある特定の実施形態では、治療される被験体は、哺乳類（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコなど）である。ある特定の実施形態では、被験体はヒトである。ある特定の実施形態では、被験体は、癌を有することが疑われるか、若しくは癌を有するリスクにあるか、又は、癌、若しくは異常なMSLN発現若しくは活性を有する任意の他の疾患の診断がされている。

30

【0182】

癌、又は異常なMSLN活性を示す任意の他の疾患に対する多くの診断方法、及び、これらの疾患の臨床的描写は、当技術分野において周知である。そのような方法としては、例えば、免疫組織化学、PCR、蛍光インサイツハイブリダイゼーション（FISH）が挙げられるが、これらに限定されない。異常なMSLN活性又は発現に対する診断方法に関する、更なる詳細は、例えば、Guptaら、（2009）Mod Pathol. 22（1）：128 - 133、Lopez-Riosら、（2013）J Clin Pathol. 66（5）：381 - 385、Ellisonら、（2013）J Clin Pathol. 66（2）：79 - 89、及びGuhaら、（2013）PLoS ONE 8（6）：e67782に記載されている。

40

【0183】

投与は、例えば、静脈内、筋肉内、又は皮下を含む、任意の好適な経路によるものであることができる。幾つかの実施形態では、本明細書で提供する抗体若しくは抗体誘導体（若しくは、その断片）、及び/又は組成物は、第2、第3、又は第4の薬剤（例えば、抗腫瘍薬、増殖阻害剤、細胞毒性剤、又は化学療法剤）と組み合わせて投与され、異常なMSLN活性を伴う疾患又は障害を治療する。このような薬剤としては、例えば、ドセタキセル、ゲフィチニブ、FOLFIRI（イリノテカン、5-フルオロウラシル、及びロイ

50

コボリン)、イリノテカン、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ベバシズマブ(抗VEGF抗体)、FOLFOLX-4、注入型フルオロウラシル、ロイコボリン、及びオキサリプラチン、アフアチニブ、ゲムシタピン、カベシタピン、ペメトレキセド、チバンチニブ、エベロリムス、CpG-ODN、ラパマイシン、レナリドマイド、ベムラフェニブ、エンドスタチン、ラパチニブ、PX-866、Imprime PGG、及びエルロチニブが挙げられる。幾つかの実施形態では、抗体若しくは抗体誘導体(又は、その断片)は、別の剤に複合体化される。

【0184】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供する抗体若しくは抗体誘導体(若しくは、その断片)、及び/又は組成物は、1つ又は複数の追加の治療法、例えば、放射線療法、手術、化学療法、及び/又は標的療法と組み合わせて投与される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供する抗体、抗体誘導体(若しくは、その断片)、及び/又は組成物は、放射線療法と組み合わせて投与される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供する抗体、抗体誘導体(若しくは、その断片)、及び/又は組成物と、放射線療法との組み合わせは、本明細書で開示する新生物又は癌の治療に用いられる。

10

【0185】

治療される適応症、及び、当業者に周知の投薬に関する因子に応じて、本明細書で提供する抗体又は抗体誘導体は、毒性及び副作用を最小限に抑えながら、適応症の治療に効果的な用量で投与される。癌の治療に関して、典型的な用量は、例えば、0.001~1000µgの範囲であることができるが、この例示的範囲を下回る、又は上回る用量は、本発明の範囲内である。1日の投与量は、約0.1µg/kg~約100mg/kg総体重、約0.1µg/kg~約100µg/kg総体重、又は、約1µg/kg~約100µg/kg総体重であることができる。上記のとおり、治療された患者の周期的な評価により、治療又は予防効果をモニターすることができる。数日以上にわたる反復投与に関しては、状況に応じて、病徴が所望に抑制されるまで治療が反復される。しかし、他の投薬レジメンも有用であり得、且つ本発明の範囲内である。所望の用量は、組成物の単回ボラス投与により、組成物の複数回ボラス投与により、又は、組成物の連続注入による投与により送達することができる。

20

【0186】

本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体を含む医薬組成物は、1日1回、2回、3回、又は4回投与することができる。組成物はまた、毎日よりも少ない頻度で、例えば、週に6回、週に5回、週に4回、週に3回、週に2回、週に1回、2週に1回、3週に1回、月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、又は6ヶ月に1回、投与することができる。組成物は、一定時間にわたり、使用のための組成物を徐々に放出し、投与される組成物の、頻度を下げた投与、例えば、月に1回、2~6ヶ月に1回、年に1回、又は更に単回投与を可能にするインプラントにおけるような、持続放出性製剤で投与することもまた可能である。持続放出性装置(例えば、ペレット、ナノ粒子、微小粒子、ナノスフィア、微粒子など)を、様々な場所に、注射により投与する、又は、手術により移植することができる。

30

【0187】

癌治療は、例えば、限定されるものではないが、腫瘍退縮、腫瘍重量又はサイズの収縮、進行までの時間、生存期間、無進行生存期間、全奏効率、奏効期間、生活の質、タンパク質発現、及び/又は活性により評価することができる。例えば、放射線医学イメージングによる応答の測定を含む、治療法の効果を決定するためのアプローチを用いることができる。

40

【0188】

ある特定の実施形態では、治療の効果は、腫瘍増殖阻害パーセント(%TGI)により測定され、等式 $100 - (T / C \times 100)$ を用いて計算され、式中、Tは、治療された腫瘍の平均相対腫瘍体積であり、Cは、治療されていない腫瘍の平均相対腫瘍体積である。ある特定の実施形態では、%TGIは、約10%、約20%、約30%、約40%、

50

約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 91%、約 92%、約 93%、約 94%、約 95%、又は 95% 超である。

【0189】

3.2 診断及びイメージングの方法

【0190】

標識した抗体又は抗体誘導体を、診断目的のために使用し、MSLNの発現、異常発現、及び/又は活性と関連する疾患及び/又は障害を検出、診断、又はモニターすることができる。例えば、本明細書で提供する抗体及び抗体誘導体を、インサイチュ、インビボ、エクスピボ、及びインビトロ診断アッセイ又はイメージングアッセイで使用することができる。MSLNポリペプチドの発現を検出する方法は、(a)1つ又は複数の抗体又は抗体誘導体を用いて、個体の細胞(例えば、組織)又は体液でのポリペプチドの発現をアッセイすること、及び(b)遺伝子発現レベルを、標準的な遺伝子発現レベルと比較することであって、標準的な発現レベルと比較して、アッセイした遺伝子発現レベルの増加又は減少は、異常発現を示すこと、を含む。

10

【0191】

本明細書で提供する別の実施形態は、動物(例えば、ヒトなどの哺乳類)における、MSLNの発現又は異常発現と関連する疾患又は障害を診断する方法を含む。方法は、哺乳類でMSLN分子を検出することを含む。ある特定の実施形態では、診断は、(a)有効量の、標識された抗体又は抗体誘導体を哺乳類に投与することと、(b)投与後に、標識された抗体又は抗体誘導体が、MSLN分子が発現する(及び、未結合の標識分子が、バックグラウンドレベルまで取り除かれる)箇所において、優先的に集中することができるように、一定の時間間隔の待つことと、(c)バックグラウンドレベルを測定することと、(d)バックグラウンドレベルを上回る、標識された分子の検出によって、対象が、MSLNの発現又は異常発現と関連する特定の疾患又は障害を有することが示されるように、対象内の標識された分子を検出することと、を含む。バックグラウンドレベルは、検出された、標識された分子の量を、特定の系に対して以前に決定した標準値と比較することを含む、様々な方法により決定することができる。

20

【0192】

本明細書で提供する抗体及び抗体誘導体を使用して、当業者に周知の古典的な免疫組織学的方法を用い、生体試料のタンパク質レベルをアッセイすることができる(例えば、Jalkanen, ら, J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985)、Jalkanen, ら, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)を参照されたい)。タンパク質の遺伝子発現を検出するのに有用な、他の抗体ベースの方法としては、免疫学的検定、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及びラジオイムノアッセイ(RIA)が挙げられる。好適な抗体アッセイ標識は、当該技術分野において周知であり、グルコースオキシダーゼ、放射性同位体、例えば、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、三重水素(^3H)、インジウム(^{115}mIn 、 ^{113}mIn 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、及び、テクネチウム(^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、タリウム(^{201}Ti)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム(^{103}Pd)、モリブデン(^{99}Mo)、キセノン(^{133}Xe)、フッ素(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、ルミノール、並びに、蛍光標識、例えば、フルオレセイン及びローダミン、及びビオチンなどの酵素標識が挙げられる。

30

40

【0193】

当該技術分野において周知の技術を、本明細書で提供する、標識された抗体(又は、その断片)に適用することができる。このような技術としては、二官能性複合体化剤(例えば、米国特許第5,756,065号、同第5,714,631号、同第5,696,239号、同第5,652,361号、同第5,505,931号、同第5,489,425号、同第5,435,990号、同第5,428,139号、同第5,342,604

50

号、同第5, 274, 119号、同第4, 994, 560号、及び同第5, 808, 003号を参照されたい)の使用が挙げられるが、これに限定されない。

【0194】

或いは、又は更に、例えば、MSLNをコードする核酸、又はその補体に対応する、核酸ベースのプロブを用いる、蛍光インサイツハイブリダイゼーション、(FISH、1998年10月に公開されたWO98/45479を参照されたい)、サザンブロッティング、ノーザンブロッティング、又は、リアルタイム定量PCR(RT-PCR)などのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術により、細胞内の、MSLNポリペプチドをコードする核酸又はmRNAのレベルを測定することができる。例えば、抗体ベースのアッセイを用いて、血清などの生物学的流体における、脱落した抗原を測定することにより、MSLNの過剰発現を研究することもまた可能である(例えば、1990年6月12日に公開された米国特許第4, 933, 294号、1991年4月18日に公開されたWO91/05264、1995年3月28日に公開された米国特許第5, 401, 638号、及び、Siasら、J. Immunol. Methods 132:73-80(1990)もまた参照されたい)。上記アッセイとは別に、様々なインビボ及びエクスピボアッセイを、熟練の施術者は利用することができる。例えば、哺乳類の体内の細胞を、検出可能な標識、例えば、放射性同位体で任意選択的に標識される抗体に曝すことができ、抗体の、体細胞への結合を、例えば、放射能を外部走査することにより、抗体に以前に曝された哺乳類から採取した試料(例えば、生検、又は、他の生体試料)を分析することにより評価することができる。

10

20

【0195】

4. 薬学的製剤

【0196】

今回開示される主題は、本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体と、薬学的に許容される担体と、を含有する薬学的製剤を更に提供する。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、今回開示される主題の、複数(例えば、2つ以上)の抗体、及び/又は抗体誘導体の組み合わせを含むことができる。

【0197】

ある特定の実施形態では、開示した薬学的製剤は、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で、所望の程度の純度を有する抗体又は抗体誘導体を、1つ又は複数の任意の薬学的に許容される担体(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))と組み合わせることにより調製することができる。例えば、限定されるものではないが、凍結乾燥した抗体製剤は、米国特許第6, 267, 958号に記載されている。ある特定の実施形態では、水性抗体製剤としては、米国特許第6, 171, 586号、及びWO2006/044908に記載されているものを挙げることができ、後者の製剤としては、ヒスチジンアセテート緩衝液が挙げられる。ある特定の実施形態では、抗体又は抗体誘導体は、約80%超、約90%超、約91%超、約92%超、約93%超、約94%超、約95%超、約96%超、約97%超、約98%超、約99%超、約99.1%超、約99.2%超、約99.3%超、約99.4%超、約99.5%超、約99.6%超、約99.7%超、約99.8%超、又は約99.9%超の純度であることができる。

30

40

【0198】

薬学的に許容される担体は一般に、使用する用量及び濃度においてレシピエントに無毒であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩の緩衝液、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤、防腐剤(例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル若しくはベンジルアルコール、メチル若しくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール)、低分子量(約10個未満の残基)ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポ

50

リマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジンなどのアミノ酸、単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース若しくはデキストランを含む他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース若しくはソルビトールなどの糖類、ナトリウムなどの塩生成対イオン、金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）、並びに/又はポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されない。本明細書における例示的な薬学的に許容される担体は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）、例えば、rHuPH20（HYLENE X（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質などの間質性薬物分散剤を更に含む。rHuPH20を含む、ある特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、米国特許公報番号2005/0260186、及び2006/0104968に記載されている。ある特定の実施形態では、SHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの、1つ又は複数の更なるグルコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

10

【0199】

担体は、（例えば注射又は注入による）静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄又は表皮投与に好適であることができる。投与経路に応じて、活性化合物、例えば、抗MSLN抗体を、ある材料でコーティングし、化合物を、酸、及び化合物を不活性化し得る他の自然条件の作用から保護することができる。

【0200】

20

本開示の医薬組成物は、併用療法で投与する、即ち、他の薬剤と組み合わせることもまた可能である。ある特定の実施形態では、本明細書で開示する医薬組成物は、必要に応じて、治療されている特定の適応症に対する1つよりも多くの活性成分、例えば、互いに悪影響を及ぼさない相補活性を有するものもまた含有することができる。ある特定の実施形態では、薬学的製剤は、第1の治療剤により治療されるものと同じ疾患を治療するための、第2の活性成分を含むことができる。このような活性成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせ、好適に存在する。例えば、限定されるものではないが、本開示の製剤は、必要に応じて、治療されている特定の適応症に対する1つよりも多くの活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補活性を有するものもまた含有することができる。例えば、同じ疾患の治療に有用な、第2の治療剤を更に提供することが望ましい場合がある。このような活性成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせ、好適に存在する。

30

【0201】

本開示の組成物は、種々の当該技術分野において周知の方法により投与することができる。投与経路及び/又は方法は、所望の結果に応じて変化する。活性化合物を、迅速な放出から化合物を保護する担体、例えば、インプラント、経皮貼付剤及びマイクロカプセル化デリバリーシステムを含む制御放出製剤と共に調製することができる。エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸などの生分解性・生体適合性ポリマーを使用することができる。このような製剤を調製するための多くの方法は、例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978により記載されている。ある特定の実施形態では、医薬組成物は、米国食品医薬品局の、グッドマニュファクチャリングプラクティス（GMP）条件の下で製造される。

40

【0202】

本明細書で開示する抗体又は抗体誘導体を含む徐放性調製物もまた、調製することができる。徐放性調製物の適切な例としては、抗体又は抗体誘導体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、例えば、フィルム又はマイクロカプセルなどの成型物品の形態である。ある特定の実施形態では、活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、又は界面重合によって調製されたマイ

50

クロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチン - マイクロカプセル及びポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達システム (例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル) 内、又はマイクロエマルション中に包埋することができる。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

【0203】

ある特定の投与経路により、本開示の抗体又は抗体誘導体を投与するためには、化合物を、その不活性化を防ぐ材料でコーティングするか、又は化合物を、その不活性化を防ぐ材料と同時投与する必要がある。例えば、化合物を、適切な担体、例えば、リポソーム又は希釈剤内で、被験体に投与することができる。薬学的に許容される希釈剤としては、生理食塩水及び水性緩衝溶液が挙げられる。リポソームとしては、水中油中水型 C G F エマルション、加えて、従来のリポソームが挙げられる (Strejanら, (1984) J Neuroimmunol. 7: 27)。

10

【0204】

薬学的に許容される担体としては、滅菌水溶液又は分散液、及び無菌注射可能な溶液又は分散液の即席調製のための、滅菌粉末が挙げられる。薬学的活性物質用のそのような媒体及び薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。

任意の従来の媒体又は薬剤が活性化合物に対して不適合性である場合を除いて、本開示の医薬組成物におけるその使用が想到される。補助活性化合物もまた、組成物に組み込むことができる。

20

【0205】

治療用組成物は通常、製造及び保管条件下で滅菌され、実質的に等張性であり、安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルション、リポソーム、又は、高濃度の用量に適した、他の秩序構造として製剤化することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、及びそれらの好適な混合物を含有する、溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散の場合には必要とされる粒径の維持によって、及び界面活性剤の使用によって、維持することができる。多くの場合、組成物内に等張剤、例えば糖類、ポリアルコール (マンニトール、ソルビトールなど)、又は塩化ナトリウムを含めるのが好ましい。組成物内に、吸収を遅らせる作用物質、例えばモノステアレート塩及びゼラチンを含めることにより、注射可能な組成物の吸収を遅らせることができる。

30

【0206】

無菌注射可能な溶液は、適切な溶媒中の必要な量の、本明細書で開示する1つ又は複数の抗体又は抗体誘導体に、必要に応じて、上に列挙した成分の1つ又は組み合わせを組み込むこと、続けて、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過による、滅菌精密濾過により調製することができる。一般に、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒及び上で列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって、調製される。無菌注射可能な溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過したその溶液から、活性成分の粉末に加えて追加の所望の成分を得る、真空乾燥及びフリーズドライ (凍結乾燥) である。

40

【0207】

治療用組成物もまた、当該技術分野において既知の医療デバイスを用いて投与することができる。例えば、本開示の治療用組成物は、例えば、米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、又は同第4,596,556号に開示されている装置などの、無針皮下注射装置により投与することができる。本開示で有用なインプラント及びモジュールとしては、制御した速度にて薬剤を分配するための、

50

埋め込み型マイクロ注入ポンプについて開示している、米国特許第4,487,603号、皮膚を通して薬剤を投与するための治療用装置について開示している、同第4,486,194号、正確な注入速度にて薬剤を送達するための薬剤注入ポンプについて開示している、同第4,447,233号、連続薬剤送達のための、流れ変更可能な埋め込み型注入装置について開示している、同第4,447,224号、複数のチャンバ区画を有する浸透性ドラッグデリバリーシステムについて開示している、同第4,439,196号、及び、浸透性ドラッグデリバリーシステムについて開示している、同第4,475,196号が挙げられる。多くのこのような他のインプラント、デリバリーシステム、及びモジュールが周知である。

【0208】

10

治療用組成物に関して、本開示の製剤は、経口、経鼻、局所（口腔及び舌下を含む）、直腸、腔内、並びに/又は非経口的投与に好適なものを含む。これらの配合物は単位剤形にて便利に提示されてよく、また薬学の当該技術分野において周知な任意の方法によって調製することができる。担体材料と組み合わせて単回投与剤形を作製することができる、抗体又は抗体誘導体の量は、治療される対象、及び、特定の投与方法に応じて変化する。担体材料と組み合わせて単回投与剤形を作製することができる、抗体又は抗体誘導体の量は一般に、治療効果を生み出す組成物の量である。一般に、100%のうち、この量は、活性成分の約0.01%~約99%、約0.1%~約70%、又は、約1%~約30%の範囲である。

本開示の組成物を局所又は経皮投与するための投薬形態としては、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、貼付剤及び吸入薬が挙げられる。活性化合物は滅菌状態下にて、薬学的に許容される担体と、及び、必要となり得る任意の防腐剤、緩衝剤、又は噴射剤と混合してよい。

20

【0209】

「非経口的投与」及び「非経口投与される」という語句、は腸内及び局所投与以外の投与方法を意味し、通常注射による投与並びに静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内注射及び注入挙げられるが、これらに限定されない。

【0210】

これらの医薬組成物は、防腐剤、湿潤剤、乳化剤、及び分散剤などのアジュバントもまた含有することができる。微生物が存在することを防止することが、上述した滅菌手順、及び、種々の抗菌及び抗カビ剤（例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸など）を含めることの両方により確保されてよい。組成物中に糖類、塩化ナトリウムなどの等張剤が含まれることも望ましい場合がある。加えて、注射可能な薬剤処方での吸収を長引かせることは、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの、吸収遅延剤を含有することによりもたらされることができる。

30

【0211】

ある特定の実施形態では、本開示の抗体又は抗体誘導体が、薬剤としてヒト及び動物に投与される場合、これらは単独で、又は、薬学的に許容される担体と組み合わせて、例えば、約0.01%~約99.5%（又は、約0.1%~約90%）の抗体又は抗体誘導体を含有する医薬組成物として投与されることができる。

40

【0212】

5. 製造品

【0213】

今回開示される主題は、上記の障害の治療、予防、及び/又は診断に有用な材料を含有する製品を更に提供する。

【0214】

ある特定の実施形態では、製造品は、容器、及び、当該容器上にある又は付属するラベル又は添付文書を含む。好適な容器の非限定例としては、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの種々の材料が

50

ら形成することができる。容器は、組成物それ自体、又は状態の治療、予防及び/若しくは診断に効果的な他の組成物と組み合わせた組成物を保持することができ、且つ、滅菌点検口を有してよい（例えば、容器は静注液バッグ又は皮下注射針で貫通可能なストッパを有するバイアルであることができる）。

【0215】

ある特定の実施形態では、組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本開示の抗体又は抗体誘導体である。ラベル又は添付文書は、組成物が、選択される病態を治療するために使用されることを示すことができる。

【0216】

ある特定の実施形態では、製造品は、(a)組成物が含有される第1の容器であって、当該組成物は、本開示の抗体又は抗体誘導体を含む、第1の容器、及び(b)組成物が含有される第2の容器であって、当該組成物は、更なる細胞毒性又は別の治療剤を含む組成物を含む、第2の容器を含むことができる。ある特定の実施形態では、製造品は、組成物を特定の状態を治療するために使用可能であることを示す添付文書を更に含むことができる。

10

【0217】

或いは、又は更に、製造品は、限定されるものではないが、注射用の静菌水(BWFI)、リン酸塩緩衝生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液などの、薬学的に許容される緩衝液を含む、追加の容器、例えば、第2又は第3の容器を含むことができる。製造品としては、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及び使用者の視点から望ましい他の材料を挙げることができる。

20

【0218】

配列

【0219】

30

40

50

【表 3】

配列番号	名称	アミノ酸配列
1.	1 G 7 CD R 1	G T I S T A R T
2.	1 G 7 CD R 2	I S T G T N T Y
3.	1 G 7 CD R 3	A V S Y Y P N E Y D G V P Y D Y
4.	1 G 7 VH H	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G T I S T A R T M H W F R Q A P G K E R E L V A T I S T G T N T Y Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A V S Y Y P N E Y D G V P Y D Y W G Q G T L V T V S S
5.	1 G 7 VH H-F c	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G T I S T A R T M H W F R Q A P G K E R E L V A T I S T G T N T Y Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A V S Y Y P N E Y D G V P Y D Y W G Q G T L V T V S S E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K
6.	2 B 9 CD R 1	G S I S K F R S
7.	2 B 9 CD R 2	I D L G A N T Y
8.	2 B 9 CD R 3	A A A P K W Y S D P G Q S D D L H D Y
9.	2 B 9 VH H	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G S I S K F R S M H W V R Q A P G K E R E S V A T I D L G A N T Y Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A A A P K W Y S D P G Q S D D L H D Y W G Q G T L V T V S S
10.	2 B 9 VH H-F c	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G S I S K F R S M H W V R Q A P G K E R E S V A T I D L G A N T Y Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A A A P K W Y S D P G Q S D D L H D Y W G Q G T L V T V S S E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G

10

20

30

40

【 0 2 2 0 】

50

【表 4】

		VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11.	2C5 CD R1	GTISEALY
12.	2C5 CD R2	INTGATTN
13.	2C5 CD R3	AVRKDRGVENGGPGHDY
14.	2C5 VH H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGTISEALYMGWVRQAPGKERELV AGINTGATTNYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AVRKDRGVENGGPGHDYWGQGT LVTVSS
15.	2C5 VH H-Fc	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGTISEALYMGWVRQAPGKERELV AGINTGATTNYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AVRKDRGVENGGPGHDYWGQGT LVTVSS TVSSEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
16.	7H1 CD R1	GNIFNWFY
17.	7H1 CD R2	INRGANTY
18.	7H1 CD R3	AVRTGDSYTSDYRRDLHDY
19.	7H1 VH H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGNIFNWFYMGWVRQAPGKGRELV AGINRGANTYYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AVRTGDSYTSDYRRDLHDYWGQGT LVTVSS
20.	7H1 VH H-Fc	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGNIFNWFYMGWVRQAPGKGRELV AGINRGANTYYYADSVKGRFTISR

10

20

30

40

【0221】

50

【表 5】

		DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AVRTGDSYTSDYRRDLHDYWGQGT LVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
21.	8D3 CD R1	GTISDTSR	
22.	8D3 CD R2	ISVGTTY	
23.	8D3 CD R3	AAYGVDVDVNGYLLDY	
24.	8D3 VH H	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGTISDTSRMHWFRQAPGKERELV AAISVGTTTTYYADSVKGRFTISL DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAYGVDVDVNGYLLDYWGQGT LVT VSS	20
25.	8D3 VH H-Fc	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGTISDTSRMHWFRQAPGKERELV AAISVGTTTTYYADSVKGRFTISL DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAYGVDVDVNGYLLDYWGQGT LVT VSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
26.	11E6 C DR1	GTIFGYQY	
27.	11E6 C DR2	ISYGSITY	
28.	11E6 C DR3	AAILDGDGWDGGYNY	
29.	11E6 V HH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGTIFGYQYMGWVRQAPGKEREFV AAISYGSITYYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	40

【 0 2 2 2 】

【表 6】

		AAILDGDGWDGGYNYWGQGTLVTVSS	
30.	11E6 V HH-Fc	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGTIFGYQYMGWVRQAPGKEREFV AAISYGSITYYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAILDGDGWDGGYNYWGQGTLVTV SSEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK	10
31.	12D12 CDR1	GSIFESDR	
32.	12D12 CDR2	INIGTNTY	
33.	12D12 CDR3	AAFLWKS YGSSDGGYYLQY	
34.	12D12 VHH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGSIFESDRMHWFRRQAPGKERELV AGINIGTNTYYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAFLWKS YGSSDGGYYLQYWGQGT LVTVSS	20
35.	12D12 VHH-Fc	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGSIFESDRMHWFRRQAPGKERELV AGINIGTNTYYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAFLWKS YGSSDGGYYLQYWGQGT LVTVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
36.	13G5 C DR1	GSISWYAW	
37.	13G5 C DR2	ISTGGSTY	
38.	13G5 C	AAFSAFNYVDSEARYDY	40

【0223】

【表 7】

	DR 3		
39.	13G5 V HH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGSISWYAWMHWRQAPGKEREWV AAISTGGSTYYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAFSAFNYVDSEARYDYWGQGLV TVSS	
40.	13G5 V HH-Fc	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAA SGSISWYAWMHWRQAPGKEREWV AAISTGGSTYYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AAFSAFNYVDSEARYDYWGQGLV TVSSEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
41.	ヒトMSLN ポリペプチド 1	EVEKTACPSGKKAREIDESLIFYK KWELEACVDAALLLATQMDRVNAIP FTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPE VIQHLYLFLKMSPEDIRKWNVTS LETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRP LPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLD TLTAFYPGYLCSLSPHEELSSVPPS SIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPK ARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGA PTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLR TDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLK AEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLG LGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALS	20
42.	ヒトMSLN ポリペプチド 2	EVEKTACPSGKKAPEIDESLIFYK KWELEACVDAALLLATQMDRVNAIP FTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPE VIQHLYLFLKMSPEDIRKWNVTS LETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRP LPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLD TLTAFYPGYLCSLSPHEELSSVPPS SIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPK ARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGA PTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLR TDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLK AEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLG LGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALS	30
43.	ヒトMSLN	EVEKTACPSGKKAPEIDESLIFYK	40

【0224】

【表 8】

	ポリペプチド のECD	KW E L E A C V D A A L L A T Q M D R V N A I P F T Y E Q L D V L K H K L D E L Y P Q G Y P E S V I Q H L G Y L F L K M S P E D I R K W N V T S L E T L K A L L E V N K G H E M S P Q V A T L I D R F V K G R G Q L D K D T L D T L T A F Y P G Y L C S L S P E E L S S V P P S S I W A V R P Q D L D T C D P R Q L D V L Y P K A R L A F Q N M N G S E Y F V K I Q S F L G G A P T E D L K A L S Q Q N V S M D L A T F M K L R T D A V L P L T V A E V Q K L L G P H V E G L K A E E R H R P V R D W I L R Q R Q D D L D T L G L G L Q	
44.	例示的なリン カー	G G G G S G G G G S	10
45.	例示的なリン カー	G S G G S G G S G G S G	
46.	例示的なリン カー	G G G G S G G G G S G G G G S	
47.	例示的なリン カー	G G G S G	
48.	例示的なリン カー	G G G S G G G G S G	
49.	例示的なリン カー	G G S G G G S G	
50.	例示的なリン カー	G G S G G G S G G G S G	20
51.	例示的なリン カー	G S G G S G	
52.	例示的なリン カー	G S G G S G G S G	
53.	例示的なリン カー	G S G S G S G	
54.	例示的なリン カー	G S G G S G G S G G S G	
55.	例示的なリン カー	G G G G S G G G G S G G G G S G G G	
56.	例示的なリン カー	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S	30
57.	例示的なリン カー	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S	
58.	例示的なリン カー	G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S	
59.	例示的なリン カー	P A P A P	
60.	例示的なリン カー	P A P A P P A P A P P A P A P	
61.	例示的なリン カー	I K R T V A A	
62.	例示的なリン カー	V S S A S T K	40

【 0 2 2 5 】

【表 9】

63.	例示的なリンカー	G G G G S G A S T K
64.	例示的なリンカー	A S T K G G G G S G
65.	例示的なリンカー	A S T K
66.	例示的なリンカー	A S T K S G G S G G S G
67.	例示的なリンカー	A E A A A K A
68.	例示的なリンカー	A E A A A K E A A A K A
69.	例示的なリンカー	G R P G S G R P G S
70.	例示的なリンカー	G R P G S G R P G S G R P G S G R P G S
71.	例示的なリンカー	G R G G S G R G G S
72.	例示的なリンカー	G R G G S G R G G S G R G G S G R G G S
73.	例示的なリンカー	G K P G S G K P G S
74.	例示的なリンカー	G K P G S G K P G S G K P G S G K P G S
75.	例示的なリンカー	G E P G S G E P G S
76.	例示的なリンカー	G E G G S G E G G S G E G G S G E G G S
77.	例示的なリンカー	G D P G S G D P G S
78.	例示的なリンカー	G D P G S G D P G S G D P G S G D P G S

10

20

30

【0226】

以下の実施例は、今回開示される主題を単に示すものであり、いかなる方法においても、限定と見なされるべきではない。

【実施例】

【0227】

実施例 1 . 抗 M S L N V H H 抗体の生成及びスクリーニング

40

【0228】

指定の抗原を標的とする V H H 抗体を発見するために、自然のラマ V H H に見出される多様性の配列決定分析に基づき、合成 V H H ライブラリを設計し生成した。簡潔に述べると、C D R 1 及び C D R 2 の長さを 8 アミノ酸で固定して、5 つの長さの C D R 3 (1 5 、 1 6 、 1 7 、 1 9 、 及び 2 1 アミノ酸) を選択し、ランダムなアミノ酸 (システイン及びメチオニンを除く) を、各位置に導入した。ヒト化足場でこのライブラリを作製するために、ヒト生殖細胞系 I G H V 3 - 3 0 をフレームワークとして導入した一方で、幾つかの鍵となる残基を、フレームワーク 2 (F R 2) 内で、ヒト様又はラマ様 (5 0 / 5 0) のいずれかとして維持した。ファージライブラリを標準的な方法により調製し、ファージライブラリは、標準的な品質管理分析をパスした。

50

【0229】

抗MSLN特異的VHH抗体を同定するために、C末端ポリヒスチジンタグに融合した、組換えヒトMSLN細胞外ドメイン(ECD)タンパク質(残基296~580)の抗原を、ACROBiosystemsから購入した(MSN-H5223)。パニングの前に、ビオチン:タンパク質を2:1の比率で、ヒトMSLN-Hisを、EZ-Link Sulfo-NHS-SS-ビオチン、No-Weighフォーマット(ThermoFisher #A39258)でビオチン化した。ビオチン化ヒトMSLN-Hisを、ストレプトアビジン結合Dynabeads M280(ThermoFisher #11206D)でコーティングし、ライブラリファージでインキュベートした。パニングを3ラウンドした後、第3ラウンドからのMSLNのバインダーを示す、溶出ファージを使用して、SS320細胞を感染させた。SS320細胞のコロニーを選択し、2xYT培地で培養し、VHH抗体を分泌させるために、1mMのIPTGを添加した。VHH抗体を含む細菌上清をELISAアッセイによりスクリーニングし、陽性ヒトMSLNバインダーを配列決定のために選択した。様々な配列を有する抗体クローンを選択し、ヒトIgG1Fcに融合させて、二価の完全長VHH-Fc抗体を、更なる評価のために形成した。得られた構築物を、Exp-CHO過性系で発現させ、社内で精製した。Ab237は、国際公開番号WO2014004549A2に開示されている、抗MSLN Fab抗体である。抗MSLN VHH-Fc抗体との比較のために、Ab237の二価IgG1形態を、参照抗MSLN抗体として社内で作製した。精製VHH-Fc抗体の交差種活性を、2µg/mLの組換えヒトMSLN-Hisプレコートプレートを用いて、ELISAアッセイにより測定し、1:8,000x希釈液中の、HRP複合体化ヤギ抗ヒトIgG Fc抗体(Southern Biotech #2047-05)により検出し、続けて、TMB基質を添加した。図1A~1Bは、ヒト及びカニクイザルMSLNへの特異的結合を示す、代表的な抗MSLN VHH-Fc抗体を示す。上位8つのクローン(1G7、2B9、2C5、7H1、8D3、11E6、12D12、及び13G5)のCDR及びVHH配列を、配列番号1~40に示す。

10

20

【0230】

実施例2. 抗MSLN VHH抗体のインビトロ特徴付け

【0231】

選択した抗MSLN VHH-Fcの全細胞結合活性を、MSLNを内因的に発現する、NCI-N87ヒト胃癌細胞株(ATCCから購入)に対するフローサイトメトリーにより測定した。簡潔に述べると、NCI-N87細胞を、10%のFBSを補充した、ロズウェルパーク記念研究所培地(RPMI)1640培地中で、接着性単層として増殖させた。細胞を、1xPBS(Gibco)で2回洗い流し、予熱した(37)0.05%のトリプシン-EDTA溶液で、5~7分間インキュベートした。細胞が剥離すると、10%のFBSを含む4x体積の完全増殖培地を添加することにより、トリプシンを中和した。次に、細胞を、 2×10^6 cell/mLで、FACS緩衝液(2%のFBS/PBS)に穏やかに再懸濁し、ウェル当たり、 2×10^5 cellの細胞密度で播種した。精製したVHH-Fc抗体を、100nMの濃度から開始して、3倍連続希釈で調製し(合計で8回希釈)、氷上で30分間、FACS緩衝液中で細胞と共にインキュベートした。洗浄後、Alexa fluor 488複合体化抗ヒトIgG Fc抗体(1:500)(Alexa Fluor 488 AffiniPureヤギ抗ヒトIgG、Fc断片特異的、Jackson Labs)を添加し、30分間氷上でインキュベートした。1500rpmで3分間遠心分離にかけることにより、上清を除去した後、細胞を100µLのFACS緩衝液に再懸濁し、CytomFlex(Beckman Coulter)によりフローサイトメトリーに通した。細胞表面に存在するヒトMSLNに対する抗体結合活性を、GraphPad Prismにより計算した。図2に示すように、抗MSLN VHH-Fcは、Ab237類似体と比較して、NCI-N87細胞に対する強力な結合、及び、NCI-N87細胞に対して、より大きな最大結合を示した。

30

40

【0232】

50

更に、ヒトNCI-N87ヒト胃癌に対する抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘発する、抗MSLN VHH-Fcの能力を評価した。簡潔に述べると、ヒトNK細胞株であるCD16陽性NK92細胞(NK92-CD16細胞)を、エフェクター細胞として使用した。標的細胞であるNCI-N87細胞を、37で30分間、 1×10^6 cell/mLの密度で、BATDAビス(アセトキシメチル)2,2':6',2''-テルピリジン-6,6''-ジカルボキシレート)DELFLIA試薬(解離向上ランタニド蛍光免疫測定法、Perkin Elmer)で標識し、その後、増殖培地で洗浄し、ウェル当たり 5×10^3 cellの細胞密度で播種した。標的細胞を、5倍のエフェクター-標的(ET)比で、NK92-CD16細胞と共培養した。37で3時間インキュベーションした後、Varioskán LUX(Thermo Fisher Scientific)を用いる時間分解蛍光(TRF)により、標的細胞溶解を測定した。図3に示すように、8つのVHH-Fc抗体のうちの5つ(13G5、12D12、2B9、8D3、及び2C5)が、用量依存の腫瘍溶解を示した。参照抗MSLN抗体(Ab237類似体)は、用量依存の腫瘍溶解をなら示さなかった。

10

【0233】

ヒトNCI-N87ヒト胃癌に対する抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘発する、抗MSLN VHH-Fcの能力を、ヒト末梢血単核球細胞(hPBMC)を用いて更に評価した。簡潔に述べると、hPBMCを勾配遠心分離により、ヘパリン化血液試料から単離した。標的細胞であるNCI-N87細胞を、37で30分間、 1×10^6 cell/mLの密度で、BATDAビス(アセトキシメチル)2,2':6',2''-テルピリジン-6,6''-ジカルボキシレート)DELFLIA試薬(解離向上ランタニド蛍光免疫測定法、Perkin Elmer)で標識し、その後、増殖培地で洗浄し、ウェル当たり 5×10^3 cellの細胞密度で播種した。標的細胞を、40倍のエフェクター-標的(ET)比で、7名の健常なドナーに由来するhPBMCと共培養した。37で3時間インキュベーションした後、Varioskán LUX(Thermo Fisher Scientific)を用いる時間分解蛍光(TRF)により、標的細胞溶解を測定した。図4に示すように、7つのVHH-Fc抗体(1G7、2B9、7H1、8D3、11E6、12D12、及び13G5)、並びにAb237類似体は、用量依存の腫瘍溶解を示し、VHH-Fc抗体は、Ab237類似体と比較して、はるかに低いEC50を示した。抗MSLN VHH抗体が、Ab237類似体と比較して、優れた抗腫瘍効果を有することを、結果は示す。

30

【0234】

記載及び特許請求される様々な実施形態に加えて、開示される主題はまた、本明細書で開示及び特許請求される特徴の、他の組み合わせを有する他の実施形態にも関する。そのため、本明細書で提示する特定の特徴を、開示される主題が、本明細書で開示する特徴の任意の好適な組み合わせを含むように、開示した主題の範囲内で、他の方法で互いに組み合わせることができる。開示される主題の特定の実施形態についての前述の記載は、例示及び説明の目的で記載されている。これは、網羅的であること、又は開示される主題を、開示されるこれらの実施形態に限定することを意図するものではない。

【0235】

開示される主題の精神又は範囲を逸脱することなく、種々の修正及び変形を、開示した主題の組成物及び方法に加えることができることが、当業者には明らかとなろう。従って、開示される主題は、添付の特許請求の範囲及びそれらの均等物の範囲内にある修正及び変形を含むことが意図される。

40

【0236】

様々な刊行物、特許、及び特許出願が本明細書に引用されており、それらの内容は、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0237】

関連出願の相互参照

本願は、2022年3月25日に提出された国際特許出願番号PCT/CN2022/

50

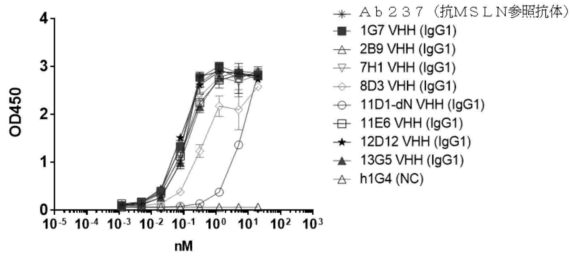
082932に対する優先権を主張し、その内容全体が参照により組み込まれており、それに対する優先権が主張される。

【図面】

【図1A】

hu-MSLN, His上の抗MSLN VHH結合曲線

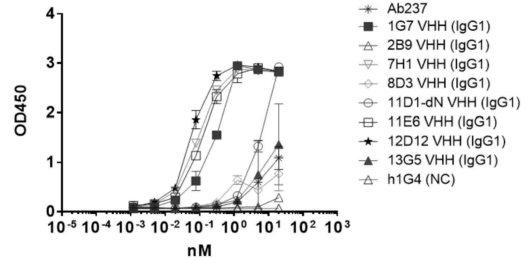
Ag (1µg/mL) -- Abs (20nM, 4x希釈, 8ポイント) -- 抗-hu-FcHRP (1:5000)



【図1B】

Cyno-MSLN, His上の抗MSLN VHH結合曲線

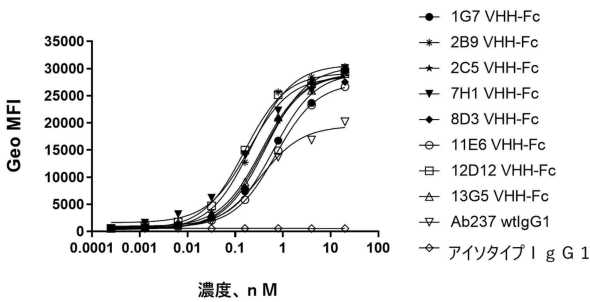
Ag (1µg/mL) -- Abs (20nM, 4x希釈, 8ポイント) -- 抗-hu-FcHRP (1:5000)



10

【図2】

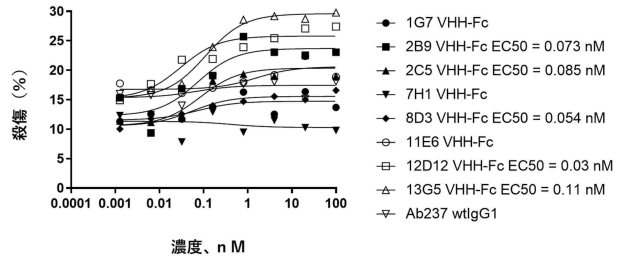
MSLN VHHに対するWCBからNCI-N87



【図3】

MSLN VHHに対するADCCアッセイ

NK92-CD16 (E) : NCI-N87 (T) の比5 : 1 (12072021)



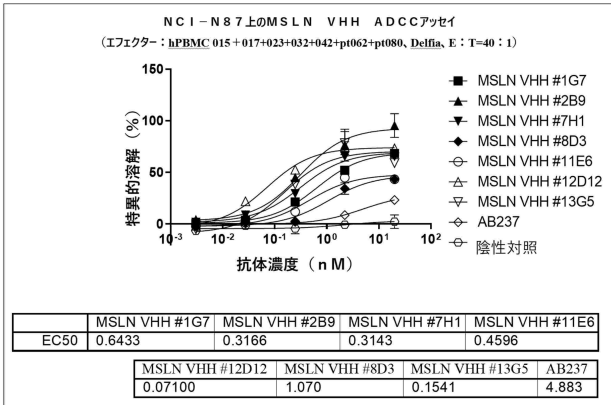
20

30

40

50

【 図 4 】



10

【 配列表 】

2025514610000001.xml

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/083531
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K, C12N, A61K, A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cnabs, wpabs, dwpi, cntxt, wotxt, ustxt, eptxt, cnki, isi web of science, pubmed, wanfang database: msln, mesothelin, vhh, antibody, nanobody, single domain antibody, car, cancer, tumor. EBI+GENBANK+Retrieve system for chinese patent sequences: sequence search of SEQ ID NOs.1-4, 6-9, 11-14, 16-19, 21-24, 26-29, 31-34, 36-39.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103819559 A (WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 28 May 2014 (2014-05-28) see the abstract and claims 1-4	1-83
A	US 2018002439 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECH MEDICALE (INSERM) et al.) 04 January 2018 (2018-01-04) see claims 1-18	1-83
A	WO 2021188599 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 23 September 2021 (2021-09-23) see paragraph 36	1-83
A	CN 110913908 A (HARPOON THERAPEUTICS INC.) 24 March 2020 (2020-03-24) see claims 1-87	1-83
A	CN 109517070 A (NANJIING KATI MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 26 March 2019 (2019-03-26) see the abstract	1-83
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 12 June 2023		Date of mailing of the international search report 24 June 2023
Name and mailing address of the ISA/CN CHINA NATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY ADMINISTRATION 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer ZHANG, DanDan Telephone No. (+86) 010-62411308

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/083531

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109476736 A (AMGEN RESEARCH (MUNICH) GMBH et al.) 15 March 2019 (2019-03-15) see the abstract and paragraph 19	1-83
A	YAKUSHIJI H et al. "Novel single-chain variant of antibody against mesothelin established by phage library" <i>Cancer Sci</i> , Vol. 110, No. 9, 28 August 2019 (2019-08-28), Pages 2722-2733, see the abstract	1-83
A	WANG G et al. "Fully human antibody VH domains to generate mono and bispecific CAR to target solid tumors" <i>J Immunother Cancer</i> , Vol. 9, No. 4, 01 April 2021 (2021-04-01), Pages 1-12, see the abstract	1-83

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/083531

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

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

- a. forming part of the international application as filed.
- b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

10

2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/083531

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

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

- 1. Claims Nos.: **66-75**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 66-75 relates to methods for treatment of the human or animal body by therapy, on which an Authority is not required to carry out international search according to Rule 39.1 PCT.

The search and written opinion of claims 66-75 are based on the reasonable expected subject matter "The use of making preparation for"
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-9,18,27-83 (all partial), 10,19, directed to anti-MSLN VHH antibody 1G7, relevant immunoconjugate, immunoresponsive cell, pharmaceutical composition, nucleic acid, vector, host cell, kit, method and use thereof;

Invention 2: claims 1-9,18,27-83 (all partial), 11, 20, directed to anti-MSLN VHH antibody 2B9, relevant immunoconjugate, immunoresponsive cell, pharmaceutical composition, nucleic acid, vector, host cell, kit, method and use thereof;

Inventions 3-8: claims 1-83 (all partial), directed to anti-MSLN VHH antibody 2C5, 7H1, 8D3, 11E6, 12D12, 13G5 respectively, relevant immunoconjugate, immunoresponsive cell, pharmaceutical composition, nucleic acid, vector, host cell, kit, method and use thereof.

The same or corresponding technical feature of inventions 1-8 is anti-MSLN VHH antibody. However, the vhh of msln is disclosed by the prior art (WO2021188599 A1, 23. Sep2021 (23.09.2021), see paragraph 36). Thus, the same or corresponding technical feature among inventions 1-8 is not the special technical feature that makes a contribution over the prior art. Therefore, the 8 inventions do not share a same or corresponding special technical feature that makes a contribution over the prior art. Above all, unity of inventions 1-8 is lacking and thus does not meet the requirements of Rule 13.1, 13.2.

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/083531

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

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

10

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

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/083531

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103819559	A	28 May 2014	None			
US	2018002439	A1	04 January 2018	None			
WO	2021188599	A1	23 September 2021	AU	2021237570	A1	08 September 2022
				JP	2023518049	A	27 April 2023
				CA	3171906	A1	23 September 2021
				BR	112022018359	A2	24 January 2023
				KR	20220169488	A	27 December 2022
				EP	4121079	A1	25 January 2023
				IL	296411	A	01 November 2022
CN	110913908	A	24 March 2020	JP	2020519643	A	02 July 2020
				JP	7209936	B2	23 January 2023
				EP	3621648	A1	18 March 2020
				EP	3621648	A4	20 January 2021
				KR	20200026810	A	11 March 2020
				US	2018327508	A1	15 November 2018
				US	10730954	B2	04 August 2020
				AU	2018265860	A1	16 January 2020
				AU	2018265860	B2	11 August 2022
				WO	2018209304	A1	15 November 2018
				CA	3063362	A1	15 November 2018
				BR	112019023856	A2	09 June 2020
CN	109517070	A	26 March 2019	None			
CN	109476736	A	15 March 2019	CA	2991672	A1	09 February 2017
				SG	10202000828	TA	30 March 2020
				PH	12018500107	A1	23 July 2018
				EA	201890383	A1	29 June 2018
				EA	201890383	A8	30 September 2019
				AU	2016302575	A1	07 December 2017
				AU	2016302575	B2	19 January 2023
				CL	2020003416	A1	08 October 2021
				JP	2018529317	A	11 October 2018
				JP	7026610	B2	28 February 2022
				MX	2018001157	A	05 September 2018
				TW	201708256	A	01 March 2017
				JO	3747	B1	31 January 2021
				WO	2017021356	A1	09 February 2017
				CO	2018000885	A2	19 April 2018
				EP	3328893	A1	06 June 2018
				BR	112018001638	A2	18 September 2018
				BR	112018001638	A8	26 February 2019
				UA	125580	C2	27 April 2022
				PE	20180798	A1	09 May 2018
				IL	256873	A	29 March 2018
				IL	256873	B	01 October 2022
				US	2017029502	A1	02 February 2017
				HK	1248250	A1	12 October 2018
				CL	2018000268	A1	05 October 2018
				---	42535	A	06 June 2018
				20180037950	A	13 April 2018	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/083531

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
<hr/> <p style="text-align: center;">TN 2017000552 A1 12 April 2019</p> <hr/>			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 C 0 8 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 0 7 K 1/14 (2006.01)	C 0 7 K 1/14	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 35/17 (2025.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 40/11 (2025.01)	A 6 1 K 39/395	Y
A 6 1 K 40/31 (2025.01)	A 6 1 K 35/17	
A 6 1 K 40/15 (2025.01)	A 6 1 K 40/11	
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 40/31	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 40/15	
A 6 1 K 31/7088(2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 K 47/65	
	A 6 1 K 48/00	
	A 6 1 K 31/7088	
	A 6 1 K 35/12	

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW
イ, シューファイ ディストリクト, イーシャン ロード, ナンバー 1 2 8 9, ビルディング 1 (ビルディング ディー)

- (71)出願人 524227745
 シャンハイ ヘンリウス バイオロジックス カンパニー リミテッド
 SHANGHAI HENLIUS BIOLOGICS CO., LTD.
 中華人民共和国 2 0 1 6 1 6 シャンハイ, ソンジアン ディストリクト, ディンユアン ロード
 , レーン 6 1 8, ナンバー 1, ビルディング 2 9, ルーム 6 1 7
- (74)代理人 100103894
 弁理士 家入 健
- (72)発明者 リン ペイ - ファ
 中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 シャンハイ, プードン ニュー エリア, チャイナ (シャンハイ)
 パイロット フリー トレード ゾーン, カンナン ロード ナンバー 2 2 2, コンプレックス ビル
 ディング, ルーム 3 3 0
- (72)発明者 ジャン ウェイ - ドン
 中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 シャンハイ, プードン ニュー エリア, チャイナ (シャンハイ)
 パイロット フリー トレード ゾーン, カンナン ロード ナンバー 2 2 2, コンプレックス ビル
 ディング, ルーム 3 3 0
- (72)発明者 シュー ウェンフェン
 中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 シャンハイ, プードン ニュー エリア, チャイナ (シャンハイ)
 パイロット フリー トレード ゾーン, カンナン ロード ナンバー 2 2 2, コンプレックス ビル
 ディング, ルーム 3 3 0
- (72)発明者 イサフラス ハッサン
 中華人民共和国 2 0 1 2 1 0 シャンハイ, プードン ニュー エリア, チャイナ (シャンハイ)
 パイロット フリー トレード ゾーン, カンナン ロード ナンバー 2 2 2, コンプレックス ビル

-
- ディング, ルーム 330
(72)発明者 ツェン チー - リン
中華人民共和国 201210 シャンハイ, プードン ニュー エリア, チャイナ (シャンハイ)
パイロット フリー トレード ゾーン, カンナン ロード ナンバー 222, コンプレックス ビル
ディング, ルーム 330
- (72)発明者 ワン ジイン - タルン
中華人民共和国 201210 シャンハイ, プードン ニュー エリア, チャイナ (シャンハイ)
パイロット フリー トレード ゾーン, カンナン ロード ナンバー 222, コンプレックス ビル
ディング, ルーム 330
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 CE10 DA01
DA13
4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
AB01 AC14 BA02 CA44 CA46
4C076 AA95 CC27 EE41 EE59
4C084 AA13 NA14 ZB26
4C085 AA14 AA16 AA25 AA27 BB01 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43
CC23
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 AA03 BB65 CA12 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA20 AA30 BA09 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74